

从 12S rRNA 和 Cyt *b* 基因部分序列研究 13 种猫科动物的分子系统关系*

郑涛¹ 费荣梅² 吴孝兵^{1**}

1. 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000

2. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

摘要 为探讨中国猫科动物 (Felidae) 的系统发生关系, 本文对中国产 13 种猫科动物的 12S rRNA 基因 (约 371 bp) 和细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*) 部分序列 (约 355 bp) 进行了分析, 并采用“最大简约法”和“最大似然法”构建了分子系统树。结果表明: 在 Cyt *b* 基因序列中, 有 113 个位点存在变异 (约为总位点数的 31.8%), 高于 12S rRNA 基因序列的 44 个变异位点 (约为总位点数的 11.9%); 构建的分子系统树显示, 猞猁 (*Lynx lynx*) 可能是中国最早起源的猫科动物, 与其它猫科动物之间的亲缘关系较远, 支持将其立为猞猁属 (*Lynx*) 的观点; 草原斑猫 (*Felis libyca*)、丛林猫 (*Felis chaus*)、兔狲 (*Otocolobus manul*) 和荒漠猫 (*Felis bieti*) 具有较近的亲缘关系, 支持将兔狲划归于猫属 (*Felis*) 的观点; 金猫 (*Caopuma temminckii*)、云猫 (*Pardofelis marmorata*) 具有较近的亲缘关系, 但它们与猫属物种之间的亲缘关系可能较远, 不支持将它们划归于猫属; 豹猫 (*Ponailurus ribengalensis*)、渔猫 (*Prionailurus viverrinus*) 具有较近的亲缘关系, 支持将它们同归于豹猫属 (*Ponailurus*); 云豹 (*Neofelis nebulosa*)、豹 (*Panthera pardus*)、雪豹 (*Uncia uncia*)、虎 (*Panthera tigris*) 具有较近的亲缘关系, 支持将它们同归于豹属 (*Panthera*) 的观点 [动物学报 51 (4): 630–639, 2005]。

关键词 中国 猫科动物 12S rRNA 基因 Cyt *b* 基因 系统发生

Phylogeny of 13 Felidae species from China based on partial 12S rRNA and Cyt *b* genes sequences*

ZHENG Tao¹, FEI Rong-Mei², WU Xiao-Bing^{1**}

1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China

2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract To study the phylogenetic relationships, partial 12S rRNA gene sequence (about 371 bp) and Cytochrome *b* (about 355 bp) gene sequences from 13 Felidae species from China were analyzed. Molecular phylogenetic trees were reconstructed using Maximum Parsimony (MP) method and Maximum Likelihood (ML) method. According to the results, 113 nucleotide sites substituted in Cyt *b* gene (31.8% of the total nucleotide sites in Cyt *b* gene) and 44 nucleotide sites substituted in 12S rRNA gene (11.9% nucleotide sites substituted in 12S rRNA gene) are obtained. On the other hand, the results reveal that *Lynx lynx* perhaps is basal to other Felidae species from China and support the opinion that *Lynx lynx* belongs to the *Lynx* genus. As to *Felis libyca*, *Felis chaus*, *Felis bieti* and *Otocolobus manul*, the results suggest that relationships among them are very close. Thus, the opinion that they should be grouped into the genus *Felis* are supported. Though *Caopuma temminckii* is strongly associated with *Pardofelis marmorata*, the relationships among *Caopuma temminckii*, *Pardofelis marmorata* and *Felis* genus are not so close respectively, supporting the position that *Caopuma temminckii* and *Pardofelis marmorata* cannot be included in *Felis* genus. Additionally, the results reveal that *Prionailurus bengalensis* is closely related to *Prionailurus viverrinus*. Last, the relationships among *Neofelis nebulosa*, *Panthera pardus*, *Uncia uncia* and *Panthera tigris*, the results show they are also close, supporting their inclusion in the genus *Panthera* [Acta Zoologica Sinica 51 (4): 630–639, 2005].

2005-01-25 收稿, 2005-04-05 接受

* 安徽省优秀青年基金 (No.04043049)、安徽省学术与技术带头人专项基金及重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室基金资助 [This research was funded by the grants from Special Fund for Anhui Young Leaders Fellowship (No.04043049), Anhui Scholar Special Fund in Science and Technology, and Conservation and Use of Important Biological Resources of Anhui Key Laboratories]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wuxb@mail.ahnu.edu.cn

© 2005 动物学报 Acta Zoologica Sinica

Key words China, Felidae species, 12S rRNA gene, Cyt *b* gene, Phylogenetic relationship

猫科动物隶属食肉目, 是一类外形十分相似的类群。全世界现存 37 种, 广泛分布于亚洲、非洲、欧洲、北美洲、南美洲, 其中中国分布有 13 种(表 1)。中国猫科动物之间的系统发生关系, 国内学者研究较少, 且多采用形态学方法, 观点多有争议: 依据形态学特征, 盛和林等(1985)将中国猫科动物划分为最少的 3 属: 猫属 (*Felis*), 包括荒漠猫 (*Felis bieti*)、草原斑猫 (*Felis libyca*)、兔狲 (*Otocolobus manul*)、丛林猫 (*Felis chaus*)、豹猫 (*Prionailurus bengalensis*)、渔猫 (*Prionailurus viverrinus*)、金猫 (*Caopuma temminckii*)、云猫 (*Pardofelis marmorata*)、猞猁 (*Lynx lynx*); 云豹属 (*Neofelis*), 云豹 (*Neofelis nebulosa*); 豹属 (*Panthera*), 包括豹 (*Panthera pardus*)、雪豹 (*Uncia uncia*)、虎 (*Panthera tigris*)。汪松等(2001)将金猫、猞猁、雪豹和兔狲分别另立为金猫属 (*Catopuma*)、猞猁属 (*Lynx*)、雪豹属 (*Uncia*) 和兔狲属 (*Otocolobus*), 将豹猫和渔猫另立为豹猫属 (*Prionailurus*), 云猫另立为云猫属 (*Pardofelis*), 从而将中国猫科动物划分为最多的 9 属(未提及草原斑猫)。金煜等(1995)同样将中国猫科动物划分为 9 属, 但是将金猫划归猫属, 将虎单独立为虎属 (*Tigris*)。可见, 由于所有的猫科动物都是在最近约 1 000 万年的时间里产生的, 在外形上都比较相似, 因而单纯依据形态学特征较难得出恰当的结论 (Nowak, 1991; Wayne et al., 1991)。

国外一些学者曾利用多种方法对猫科动物的系统发生关系进行了研究 (Herrington, 1986; Salles, 1992; Janczewski et al., 1995; Masuda et al., 1996; Johnson and O'Brien, 1997; Slattery and O'Brien, 1998; Matter and McLennan, 2000)。这些研究涵盖了世界大多数猫科动物之间的系统发生关系, 包括分布于中国的大多数猫科动物。但是他们的结论同样并不统一, 特别是对于中国特有的荒漠猫与其它猫科动物之间的系统发生关系, 国外学者研究较少。

近年来, 分子生物学技术已广泛应用于物种间系统发生关系的研究上, 其中快速进化的线粒体 DNA, 尤其是线粒体上 12S rRNA 基因和 Cyt *b* 基因序列, 更成为研究哺乳动物系统发生关系最常用的工具 (张亚平、施立明, 1992)。为进一步探讨

中国猫科动物之间的系统发生关系, 本实验测定了金猫、荒漠猫的线粒体 12S rRNA 基因和 Cyt *b* 基因以及豹的 Cyt *b* 基因的部分序列, 结合来源于 Masuda et al. (1996) 以及从 GenBank 检索获得的中国其它猫科动物的同源序列, 构建分子系统树进行系统发生分析, 以期为进一步探讨中国猫科动物之间的系统发生关系提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验共对 4 个样品(金猫、荒漠猫、豹和猞猁)进行了测序, 其余 12S rRNA 基因和 Cyt *b* 基因的同源序列分别来源于 Masuda et al. (1996) 和 GenBank (见表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取 取 -80℃ 冻存的豹肌肉样品约 0.1 g, 其它皮张样品各取约 0.2 g。肌肉总 DNA 的提取参考 Sambrook and Russell (2001) 的方法, 皮革总 DNA 的提取参考兰宏等 (1995) 和史燕等 (2004) 从皮张中提取 DNA 的方法。实验过程中以灭菌滤纸代替样品作阴性对照, 以检测是否有外源 DNA 的污染。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增所用引物为线粒体 12S rRNA 基因的通用引物 (H1478: 5'-GAG-GGTGACGGGCGGTGTG-3'; L1091: 5'-AAAC-TGGGATTAGATACCCCACTAT-3') 和 Cyt *b* 基因的通用引物 (H15175: 5'-CCCTCAGAAT-GATATTTGTCCTCA-3'; L14724: 5'-TGAGA-TCTGAAAAACCATC GTTG-3'), 引物由上海申友生物技术有限公司合成, 可特异地扩增脊椎动物线粒体 DNA (mtDNA) 的 12S rRNA 基因 (约 370 bp) 和 Cyt *b* 基因 (约 355 bp) 片段 (Kocher et al., 1989)。

反应体系总体积为 30 μ l, 其中含有 10 mmol Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol KCl, 1.5 mmol MgCl₂, 0.001% 明胶, 100 μ mol dNTPs, 引物各 0.25 μ mol, 1 U Taq DNA 聚合酶, 总 DNA 约为 25 ng。反应程序为: 94℃ 变性 45 s, 54℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 50 s, 共进行 32 个循环。循环前 95℃ 预变性 5 min, 循环后继续延伸 7 min。

1.2.3 PCR 产物的纯化和测序 扩增得到的 PCR 产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳回收, 使用泛特津

表 1 本实验中猫科动物的样品及 DNA 序列数据来源

Table 1 The sources of samples and DNA data of Felidae species in the study

物种名称 Name of species	编号 Cods	样品类型 Type of samples	样品来源 Source of samples	序列来源 The origins of DNA data	
				12S rRNA gene	Cyt <i>b</i> gene
金猫 <i>Caopuma temminckii</i>	<i>C. te</i>	皮革 Hide	安徽师范大学 AHNU*	AY773085 (This paper)	AY773082 (This paper)
荒漠猫 <i>Felis bieti</i>	<i>F. bi</i>	皮革 Hide	安徽师范大学 AHNU	AY773084 (This paper)	AY773081 (This paper)
豹 <i>Panthera pardus</i>	<i>P. pa</i>	肌肉 Muscle	安徽黄山 Mt. Huangshan, Anhui Province	D28896 (GenBank)	AY773080 (This paper)
猞猁 <i>Lynx lynx</i>	<i>L. ly</i>	皮革 Hide	安徽师范大学 AHNU	D28891 (GenBank)	AY773083 (This paper)
豹猫 <i>Prionailurus bengalensis</i>	<i>P. be</i>	—	—	D28890 (GenBank)	AJ300700 (GenBank)
雪豹 <i>Uncia uncia</i>	<i>U. un</i>	—	—	D28897 (GenBank)	D28904 (GenBank)
虎 <i>Panthera tigris</i>	<i>P. tr</i>	—	—	D28898 (GenBank)	D28905 (GenBank)
云猫 <i>Pardofelis marmorata</i>	<i>P. ma</i>	—	—	AY499281 (GenBank)	AY499336 (GenBank)
云豹 <i>Neofelis nebulosa</i>	<i>N. ne</i>	—	—	AY499283 (GenBank)	AY499337 (GenBank)
草原斑猫 <i>Felis libyca</i>	<i>F. li</i>	—	—	Masuda et al., 1996	Masuda et al., 1996
兔狲 <i>Otocolobus manul</i>	<i>O. ma</i>	—	—	Masuda et al., 1996	Masuda et al., 1996
渔猫 <i>Prionailurus viverrinus</i>	<i>P. vi</i>	—	—	Masuda et al., 1996	Masuda et al., 1996
丛林猫 <i>Felis chaus</i>	<i>F. ch</i>	—	—	Masuda et al., 1996	Masuda et al., 1996

* AHNU = Anhui Normal University

DNA 凝胶回收试剂盒 (V-Gene DNA Gel Extraction Kit, 杭州维特洁生化技术有限公司) 回收后, 即直接作为测序的模板。个别扩增效果不理想者, 参照标准方法 (Sambrook and Russell, 2001) 经克隆之后, 筛选阳性克隆再进行测序。克隆采用 TaKaRa 试剂盒, 载体为 pMD 18-T Vector (大连宝生物工程有限公司)。

1.3 实验数据的处理

采用 ClustalX (1.8) 软件 (Thompson et al., 1997) 对本实验所测得的序列以及从 Masuda et al. (1996) 和 GenBank 检索获得的同源序列一起进行排序。基于 Kimura (1980) 两参数, 采用 Mega v2.1 (Kumar et al., 2001) 计算不同序列间的碱基变异位点、简约信息位点、转换/颠换比率以及 A、T、G、C 的平均含量。以犬科物种斑鬣狗 (*Crocuta crocuta*) 和马岛斑狸 (*Fossa fossa*) (Masuda et al., 1996) 为外群, 采用 PAUP (4.0) 最大简约法 (Maximum parsimony, MP) (Swofford, 1998) 构建最简约树, 采用 Tree-Puzzle (5.2) (Schmidt and Haeseler, 2003) 最大似然法 (Maximum likelihood, ML) (Strimmer and Haeseler, 1996) 构建似然树。系统树各分支的自举检验值 (Bootstrap) 由 1 000 次重复检验。所有的序列变化均被视为无序特征, DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值。

2 结果

2.1 所测 DNA 序列

本实验共测得 6 个序列, 包括荒漠猫和金猫的 12S rRNA 基因部分序列, 以及豹、猞猁、荒漠猫、金猫的 Cyt *b* 基因部分序列。序列已提交 NCBI, 登录号 (Accession No.) 见表 1。在总 DNA 提取过程中所作阴性对照, 其 PCR 扩增产物经 1.0% 的凝胶电泳检测, 没有出现亮带, 表明实验过程中未受到外源 DNA 分子的污染。

2.2 序列分析

用 PAUP (4.0) 软件对 12S rRNA 基因和 Cyt *b* 基因间不一致水平进行检验, 结果显示基因进化水平不具有显著差异 ($P > 0.01$), 因而可以将两组数据整合在一起进行分析。采用 Mega v2.0 软件, 基于 Kimura (1980) 两参数对中国猫科动物 12S rRNA 基因和 Cyt *b* 基因序列的整合数据进行分析。统计两两序列间的碱基转换/颠换比值和遗传距离 (见表 2)。

除外群以外, 在研究的所有 12S rRNA 基因和 Cyt *b* 基因部分序列中 (约 726 bp), 共有 157 个位点呈现变异, 为总位点数的 21.6%, 94 个信息简约位点, 为总变异位点的 59.8%; 核苷酸的替换以转换为主, 转换/颠换为 44/7; A、T、G、C 碱基的平均含量为 32.9%、26.0%、15.5%、

表 2 中国猫科动物整合数据间遗传距离（下三角）和转换/颠换比值（上三角）

Table 2 Pairwise distance of 12S rRNA and Cyt b combined sequences (below diagonal) and the numbers of nucleotide transitions/transversions (above diagonal) of Felidae species from China

	<i>C.te</i>	<i>P.ma</i>	<i>P.be</i>	<i>P.vi</i>	<i>F.bi</i>	<i>O.ma</i>	<i>F.ch</i>	<i>F.li</i>	<i>L.ly</i>	<i>P.ti</i>	<i>U.un</i>	<i>N.ne</i>	<i>P.pa</i>
<i>C.te</i>		13/2	39/6	34/5	36/3	44/7	44/2	37/0	40/5	40/5	50/9	49/10	60/9
<i>P.ma</i>	0.0208		36/6	33/5	42/5	43/5	42/4	43/2	34/5	46/9	43/10	54/9	43/10
<i>P.be</i>	0.0611	0.0583		21/1	44/5	40/7	41/6	45/6	37/5	50/9	52/10	50/9	51/10
<i>P.vi</i>	0.0528	0.0528	0.0306		37/4	35/6	38/5	44/5	42/4	46/8	50/9	46/8	47/9
<i>F.bi</i>	0.0528	0.0639	0.0653	0.0542		12/4	40/3	32/3	54/4	51/10	52/11	57/10	53/14
<i>O.ma</i>	0.0694	0.0667	0.0653	0.0569	0.0208		41/7	39/7	54/6	49/12	47/3	50/12	48/13
<i>F.ch</i>	0.0639	0.0639	0.0639	0.0583	0.0583	0.0653		31/2	47/5	50/11	53/12	56/11	57/12
<i>F.li</i>	0.0514	0.0625	0.0694	0.0667	0.0472	0.0625	0.0458		53/5	49/9	50/10	55/9	56/10
<i>L.ly</i>	0.0625	0.0542	0.0569	0.0625	0.0792	0.0819	0.0722	0.0806		43/10	49/11	52/10	47/11
<i>P.ti</i>	0.0819	0.0764	0.0806	0.0736	0.0833	0.0833	0.0847	0.0806	0.0736		32/5	36/6	33/9
<i>U.un</i>	0.0806	0.0736	0.0861	0.0819	0.0847	0.0833	0.0889	0.0819	0.0819	0.0500		40/5	39/8
<i>N.ne</i>	0.0944	0.0875	0.0819	0.0750	0.0903	0.0861	0.0917	0.0875	0.0847	0.0569	0.0625		45/9
<i>P.pa</i>	0.0833	0.0736	0.0833	0.0764	0.0875	0.0833	0.0958	0.0917	0.0806	0.0583	0.0639	0.0736	

编号所代表物种具体见表 1。

The name of species to which the abbreviation refers is in table one.

25.6%。其中，12S rRNA 基因序列中（约 371 bp），共有 44 个位点呈现变异，21 个信息简约位点，A、T、G、C 碱基的平均含量为 36.9%、24.0%、17.7%、21.4%、转换/颠换为 10/3；在 Cyt b 基因序列中（约 355 bp），共有 113 个位点呈现变异，73 个简约信息位点，A、T、G、C 的平均含量为 28.8%、28.1%、13.2%、29.9%，转换/颠换的比率为 34:4。

比较 3 组数据可见，Cyt b 基因的碱基变异百分比（31.8%）和变异中简约信息位点百分比（64.6%）明显高于 12S rRNA 基因的碱基变异百分比（11.9%）和变异中简约信息位点百分比（30.5%）；碱基组成百分比中都显示出了 G 的相对缺乏；碱基的替换以转换为主，转换数量都明显高于颠换数量。

2.3 分子系统树的构建

Knight and Mindell (1993) 认为，在重建系统树时转换/颠换值若小于 2.0，则此基因序列突变已达饱和状态，受进化噪音的影响可能性较大，重建系统发生时如不进行特别加权就会出现错误信息。本文中转换/颠换为 44/7，远大于 2.0，因而不需要特别加权。为进一步估计碱基替换的饱和程度，以遗传距离为横坐标，转换和颠换为纵坐标做散点图（图 1）。

由图 1 可见，转换数量明显高于颠换数量，各

序列间的遗传距离相对集中在 0.05–0.1 之间，且转换数（颠换数）与遗传距离成正相关。

以与猫科动物亲缘关系较近的犬科物种斑鬣狗（*Crocuta crocuta*）和马岛斑狸（*Fossa fossa*）（Masuda et al., 1996）作外群，对 12S rRNA 基因、Cyt b 基因序列数据集以及两者的整合数据集进行最大简约树搜索（参数见表 3），构建的 MP 树如图 2、图 4 和图 6；ML 树如图 3、图 5 和图 7。支上的数值为 1 000 次自举（Bootstrap）检测得到的对该支的支持百分数。各物种编码见表 1（图中以拉丁文属名的第一个字母代替其属名）。

表 3 不同数据集进行最大简约法搜索的结果

Table 3 Heuristic search results of different sequences data using MP method

	比较 Comparative	12S rRNA	Cyt b	整合数据 Combined sequences
位点 Totale characters		377	355	732
可变位点数 Variable characters		48	58	106
简约信息位点数 Parsim-informative characters		29	86	115
最简约树棵数 Tree number		1	1	1
树长 Tree length		118	300	433
一致性指数 CI		0.7542	0.5800	0.6074
保留指数 RI		0.6420	0.5227	0.5072
重标指数 RC		0.4842	0.3032	0.3081

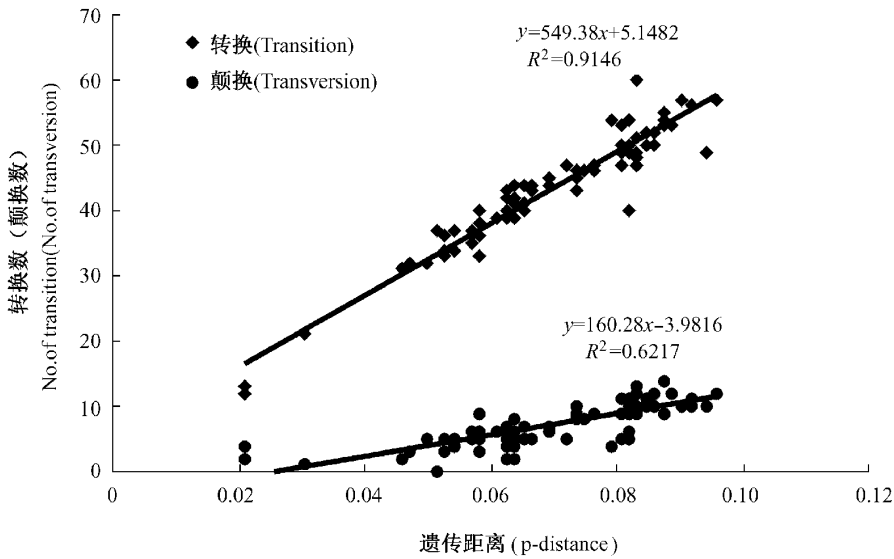


图 1 中国猫科动物 12S rRNA 和 Cyt b 基因序列整合数据替换饱和度分析散点图

Fig.1 Variation of substitution versus P-distance of 12S rRNA and Cyt b sequences fragment of Felidae species from China

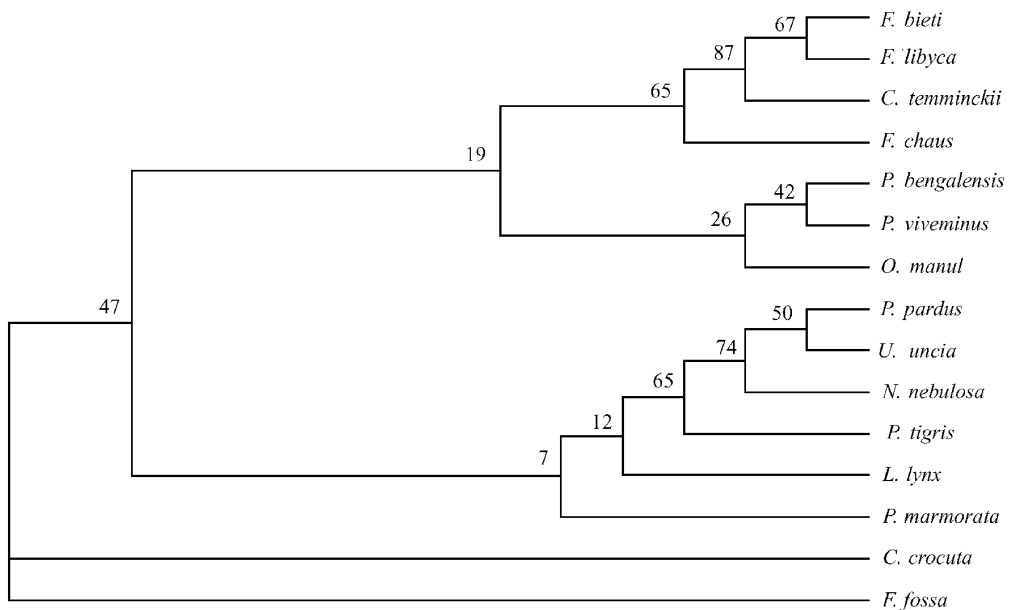


图 2 基于线粒体 12S rRNA 基因部分序列构建的 MP 树, 各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值

Fig.2 MP tree based on part of 12S rRNA gene sequences data with confident values of Bootstrap 1 000 indicated above each branch

从图 2、图 3 来看, 各分支的构成基本相似, 即荒漠猫、草原斑猫、金猫、丛林猫聚为一支; 豹猫、渔猫和兔狲聚为一支; 豹、雪豹、云豹、虎始终聚在一起; 猞猁和云猫聚在一起。不同的是, 图 3 中猞猁和云猫聚在一起后又与豹、雪豹、云豹、虎聚为一支。图 2 中较多分支的自举检验值很低。

图 4—图 7 中, 猞猁先与其它猫科动物形成一

对姐妹群。除猞猁外的其它猫科动物在图 4 和图 6 形成一对姐妹群, 并且每个分支的构成情况基本相似; 在图 5 和图 7 中形成并列的 4 个分支, 并且各分支的构成也基本相似。

比较各系统树可见, MP 树和 ML 树在各物种的聚类关系上基本一致, 但在系统树分支上有所不同。在各物种的聚类关系上, 荒漠猫、丛林猫和草

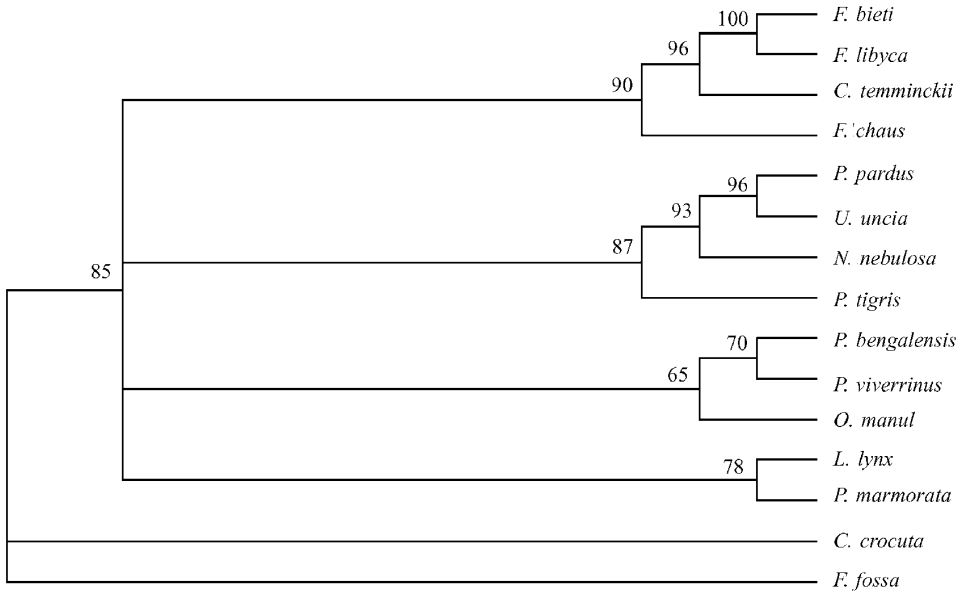


图 3 基于线粒体 12S rRNA 基因部分序列构建的 ML 树，各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值

Fig.3 ML tree based on part of 12S rRNA gene sequences data with confident values of Bootstrap 1 000 indicated above each branch

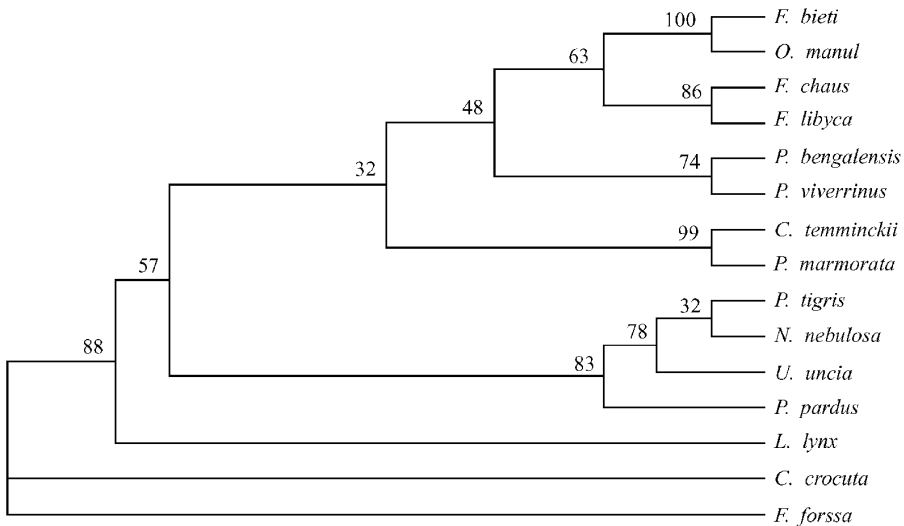


图 4 基于线粒体 Cyt *b* 基因部分序列构建的 MP 树，各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值

Fig.4 MP tree based on part of Cyt *b* gene sequences data with the confident values of Bootstrap 1 000 indicate above each branch

原斑猫聚为一支；豹、雪豹、云豹和虎聚为一支；豹猫和渔猫聚为一支。在系统树分支关系上，基于 12S rRNA 序列数据构建的分子系统树中，MP 树（图 2）显示，所有猫科物种聚为 2 个大的分支，而在 ML 树（图 3）中聚为并列的 4 支；基于 Cyt *b* 基因序列数据以及 Cyt *b* 和 12S rRNA 基因序列整合数据构建的分子系统树中，MP 树（图 4、图

6）显示，除猞猁外的所有猫科动物聚为 2 个大支，而在 ML 树中聚为并列的 4 支。另外，图 4—图 7 的聚类结果十分相似，都显示兔狲与荒漠猫聚为一支，金猫和云猫聚为一支，猞猁单独为一支，且自举检验值都较高；图 2 与图 3 各分支的构成基本相似，但它们与图 4—图 7 所显示的结果有较大的差异。

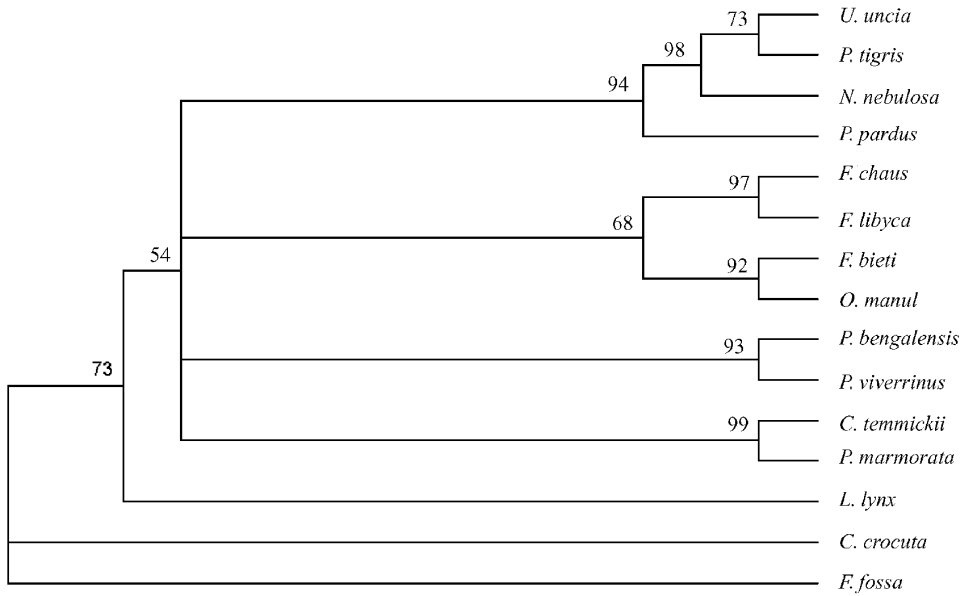


图 5 基于线粒体 *Cyt b* 基因部分序列构建的 ML 树, 各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值
 Fig.5 ML tree based on part of *Cyt b* gene sequences data with the confident values of Bootstrap 1 000 indicate above each branch

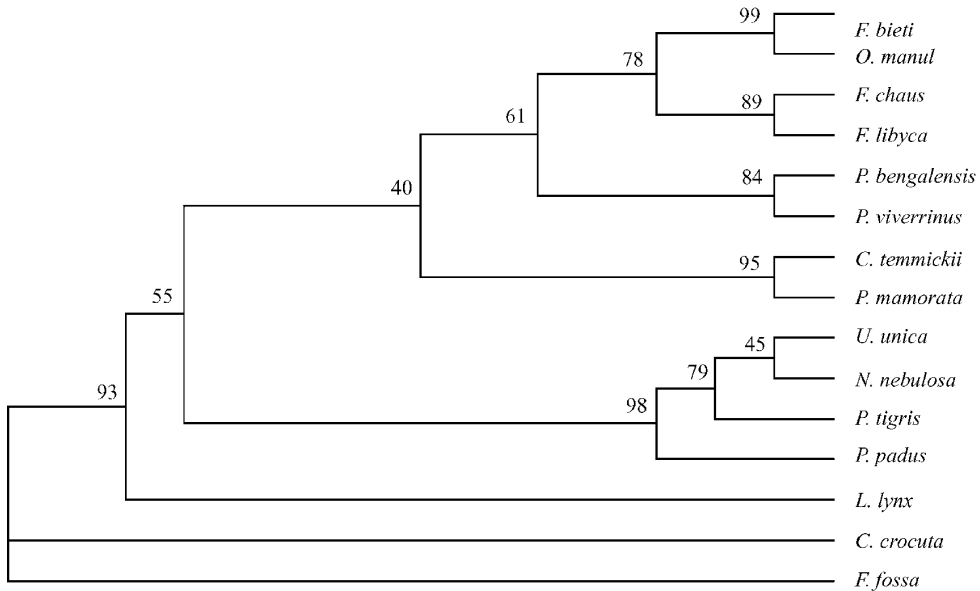


图 6 基于线粒体 12S rRNA 和 *Cyt b* 基因部分序列构建的 MP 树, 各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值
 Fig.6 MP tree based on part of 12S rRNA gene combined with *Cyt b* gene sequences data with the confident values of Bootstrap 1 000 indicate above each branch

3 讨论

对于猫科动物的系统发生关系, 前人曾采用多种方法对此进行了研究, 如依据形态学特征 (Herrington, 1986; Salles, 1992; 张淑云等, 1994; 胡清宇等, 1996; 金煜等, 1995)、免疫距离

(Collier and O'Brien, 1985)、化学信号 (Bininda-Emonds, 2001)、线粒体 DNA 序列分析 (Janczewski et al., 1995; Masuda et al., 1996; Johnson and O'Brien, 1997)、性染色体 DNA 序列分析 (Slattery and O'Brien, 1998) 等方法。他们的研究取得了许多成果, 但是他们的结论并不统

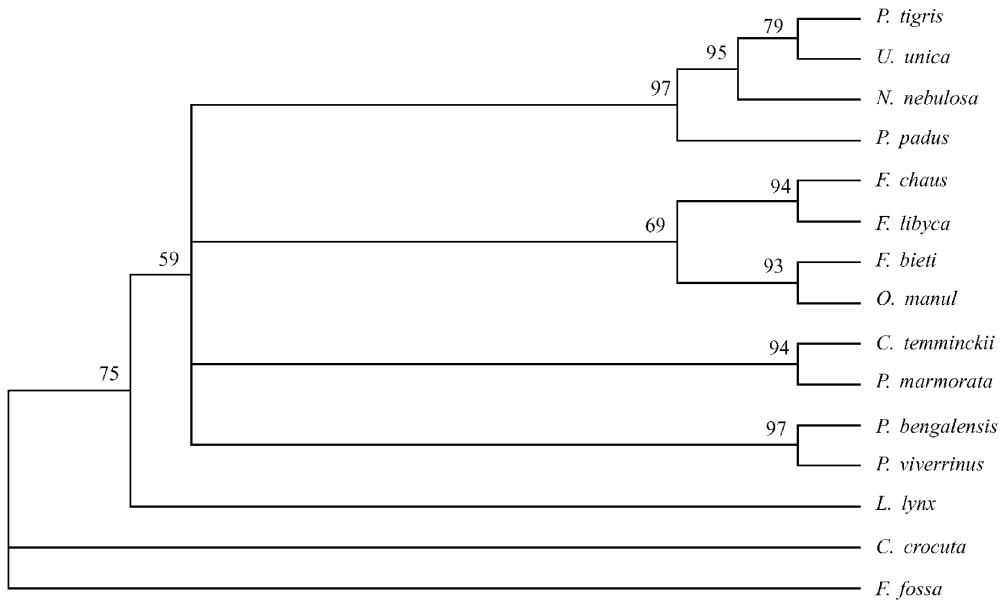


图 7 基于线粒体 12S rRNA 和 Cyt *b* 基因部分序列构建的 ML 树，各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值

Fig. 7 ML tree based on part of 12S rRNA gene combined with Cyt *b* gene sequences data with the confident values of Bootstrap 1 000 indicate above each branch

一，其中的许多问题仍没有很好的解决。

在对分子系统树的分析中，Kimball et al. (1999) 曾指出，任何自举检验值小于 50% 的分支都应谨慎对待，只有置信度大于 70% 的进化枝才是比较可信的。依据此原则，本文所构建的分子系统树中（图 2 - 图 7），图 2 中自举检验值低于 50% 的分支有 6 个，而高于 70% 的分支只有 2 个，因而图 2 显示的结果可能是不准确的。图 3 与图 2 一样，都是基于 12S rRNA 部分序列构建的系统树，且图 3 显示的结果与图 2 基本一致，因而可以推测图 3 显示的结果可信度也较低。因此，本文将主要依据图 4 - 图 7 的系统树来进行讨论。

在猞猁与其它猫科动物的系统发生关系上，国内外众多学者都认为，猞猁应单独立为猞猁属 (Collier and O'Brien, 1985; Herrington, 1986; Salles, 1992; Jancaewski et al., 1995; Johnson and O'Brien, 1997; Slattery et al., 1998; Bininda-Emond et al., 1999; Matter and McLennan, 2000; 金煜等, 1995)。在本文所构建的系统树中，图 4 - 图 7 都显示猞猁单独为一支，位于系统树基部，且自举检验值 > 70% (73% - 93%)。因而本文认为猞猁与中国其它猫科动物之间的亲缘关系可能较远，将其单独立为猞猁属可能是恰当的，这与大多数学者的观点也是一致的。由此可以推测，猞

猁可能为中国猫科动物中最早出现的分支。

在虎、豹、云豹、雪豹的系统发生关系上，尽管有些学者主张将云豹、雪豹、虎分别另立为不同的属 (Collier and O'Brien, 1985; 盛和林等, 1985; 金煜等, 1995; 汪松等, 2001)，但大多数学者认为它们之间的亲缘关系很近，可以同归于豹属 (Hemmer, 1978; Neff, 1982; Herrington, 1986; Salles, 1992; Janczewski et al., 1995; Johnson and O'Brien, 1997; Wayne et al., 1988; Slattery and O'Brien, 1998; Bininda-Emonds et al., 1999, 2001; Matter and McLennan, 2000; 张淑云等, 1994; 胡清宇等, 1996)。本实验所构建的分子系统树 (图 3 - 图 7) 都显示云豹、虎、豹、雪豹在分子系统树上聚为一大枝，这说明它们之间的亲缘关系可能较近，支持将它们同归于豹属的观点。在图 4 - 图 7 中，豹始终位于系统树此分支的基部，与虎、雪豹、云豹组成的分支又构成紧密的姐妹群，说明在中国所有豹属物种中，最早分化出来的可能是豹。至于云豹、雪豹、虎在此分支中的确切位置，由于本文中图 4 - 图 7 所显示的结果不统一，无法进一步确定，需要进一步探讨。

在丛林猫、草原斑猫、荒漠猫、兔狲的系统发生关系上，众多学者认为兔狲与同为猫属动物的丛林猫、草原斑猫、荒漠猫之间具有较近的亲缘关

系, 应同归于猫属 (Collier and O'Brien, 1985; Salles, 1992; Masuda et al., 1996; Johnson et al., 1996; Johnson and O'Brien, 1997; Bininda-Emonds et al., 1999; Matter and McLennan, 2000)。另一些学者则认为, 兔狲与荒漠猫、草原斑猫、丛林猫之间的亲缘关系较远, 应单独立为兔狲属 (*Otocolobus*) (Herrington, 1986; Slattery et al., 1998; 金煜等, 1995; 汪松等, 2001)。本文中, 图 4-图 7 都显示荒漠猫与兔狲聚为一支, 丛林猫和草原斑猫聚为一枝, 然后两支构成一姐妹群, 且自举检验值较高。因而可以推测它们之间具有较近的亲缘关系, 支持将兔狲列为猫属的观点。

需要指出的是, 对于中国特有的猫科动物——荒漠猫与丛林猫、草原斑猫、兔狲之间的系统发生关系, 前人研究较少。Herrington (1986) 依据形态学特征、Bininda-Emond et al. (1999) 利用化学信号方法的研究认为, 荒漠猫与丛林猫的亲缘关系最近, 这与本文中图 3 显示的结果是一致的。但本文所构建的系统树 (图 4-图 7) 都显示兔狲始终与荒漠猫聚在一起, 且自举检验值都较高 (92% - 100%), 因而本文认为荒漠猫与兔狲的亲缘关系可能比它与丛林猫的亲缘关系更近一些, 而丛林猫与草原斑猫的亲缘关系较近。从生活习性上来看, 荒漠猫主要栖息多灌木的稀树林、荒漠及半荒漠草原地区; 兔狲主要栖息在荒漠、戈壁、草原地区; 丛林猫则多栖息在河湖边的芦苇或灌丛, 海岸边森林或具高草的森林、田野等地, 说明在生活习性上荒漠猫与兔狲较为相似而与丛林猫相差较远, 这也进一步支持了本文观点。Slattery and O'Brien (1998) 通过对 Y 和 X 染色体 DNA 序列的分析, 认为荒漠猫与草原斑猫、家猫 (*Felis. Catus*) 具有较近的亲缘关系; Li et al. (2004) 通过对 IRBP 第一外源基因和 TTR 第一内源基因序列的研究认为, 荒漠猫与家猫和欧洲野猫 (*Felis silvestris*) 具有最近的亲缘关系, 这与本文观点不同。

在金猫、云猫与猫属物种之间的系统发生关系上, 金煜等 (1995) 将金猫归于猫属; 盛和林等 (1985) 则将金猫和云猫都归于猫属。本文所构建的分子系统树 (图 4-图 7) 都显示金猫、云猫与猫属物种之间的亲缘关系较远。因而本文认为, 将它们同归于猫属可能是不恰当的。国内外多数学者的研究同样认为金猫、云猫与猫属物种之间的亲缘关系较远 (Collier and O'Brien, 1985; Herrington, 1986; Wayne et al., 1988; Salles, 1992;

Johnson and O'Brien, 1997; Slattery and O'Brien, 1998; Matter and McLennan, 2000; 汪松等, 2001; 金煜等, 1995), 这与本文的观点是一致的。

在金猫与云猫的系统发生关系上, 至今尚未得出较一致的结论。一些学者认为两者的亲缘关系较近 (Salles, 1992; Janczewski et al., 1995; Slattery and McLennan, 1998; Bininda-Emond et al., 1999; Matter and McLennan, 2000); 另一些学者的研究结果认为, 两者之间的亲缘关系较远 (Collier and O'Brien, 1985; Herrington, 1986)。本文所构建的分子系统树 (图 4-图 7) 都显示两者聚在一起, 且自举检验值都较高 (94% - 99%), 说明两者之间的亲缘关系可能很近, 支持第一种观点。

在豹猫与渔猫的分类地位上, 图 4-图 7 都显示两者聚为一支, 且自举检验值较高 (74% - 97%), 说明两者之间具有很近的亲缘关系。国内外许多学者的研究结果同样认为它们之间的亲缘关系很近, 并将它们立为豹猫属 (金煜等, 1995; 汪松等, 2001; Collier and O'Brien, 1985; Herrington, 1986; Wayne et al., 1988; Masuda et al., 1996; Johnson and O'Brien, 1997; Slattery and O'Brien, 1998; Bininda-Emond et al., 1999; Matter and McLennan, 2000)。另外, 图 4 和图 6 还显示这一分支与猫属物种所在的分支又构成姐妹群关系, 但是自举检验值并不高 (分别为 48% 和 61%); 图 5 和图 7 则显示, 豹猫和渔猫所构的分支与除猞猁外的其它猫科物种所构成的分支成并列关系, 且与猫属物种所构成的分支并没有特别近的亲缘关系。

在猫科动物的起源上, Johnson and O'Brien (1997) 基于线粒体 NADH5 和 16S rRNA 基因序列, 同样以斑鬃狗和马岛斑狸为外群对此进行了研究, 认为猞猁起源距今约 670 万年, 豹属物种和猫属物种约 600 万年, 金猫约 543 万年, 豹猫和渔猫约 395 万年。从本文所构建的系统树 (图 4、图 6) 来看, 猞猁为我国最早出现的猫科动物, 其它物种的进化顺序与 Johnson and O'Brien (1997) 的研究结果基本相同, 但在猫属物种的起源上与本文不同, 需进一步探讨。

参考文献 (References)

- Bininda-Emonds ORP, Gittleman JL, Purvis A. 1999. Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). *Biological Reviews* 74:

- 143-175.
- Bininda-Emonds ORP, 2001. The utility of chemical signals as phylogenetic characters: an example from the Felidae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 72: 1-15.
- Collier GE, O'Brien SJ, 1985. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. *Evolution* 39: 437-487.
- Hemmer H, 1978. The evolutionary systematics of living Felidae: present status and current problems. *Carnivore* 1: 71-79.
- Herrington SJ, 1986. Phylogenetic Relationships of the Wild Cats of the World. PhD Thesis. Lawrence: University of Kansas.
- Hu QY, Li SF, Chen L, Liu Y, Wu JJ, 1996. The cluster analysis between leopard skulls and counterfeit skulls. *Primary Journal of Chinese Material Medica* 10 (2): 9-10.
- Janczewski DN, Modi WS, Stephens JC, O'Brien SJ, 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12S rRNA and cytochrome *b* sequences in the Pantherine lineage of Felidae. *Mol. Biol. Evol.* 12 (4): 690-707.
- Jin Y, Jing SY, Zhang CS, Liu YP, 1999. The structure of hair and genus dividing of Felidae species from china. *Chinese Wildlife* 4: 29-35 (In Chinese).
- Johnson WE, O'Brien SJ, 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Mol. Evol.* 44: 98-116.
- Johnson WE, Dratch PA, Martenson JS, O'Brien SJ, 1996. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. *Mammal Evol.* 3: 97-120.
- Kimball RT, Braun EL, Zwartjes PW, 1999. A molecular phylogeny of the pheasants and part-ridges suggests that these lineages are not monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 38-54.
- Kimura M, 1980. A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kinght A, Mindell DP, 1993. Substitution bias, weighting of DNA sequences evolution, and the phylogenetic positions of Fea's viper. *Sys. Bio.* 42 (1): 18-31.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson WC, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6 196-6 200.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M, 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Tempe, AZ: Arizona State University.
- Lan H, Wang W, Shi LM, 1995. PCR analysis of DNA from fur specimens of *Muntjacs* (*Muntiacus*). *Zoological Research* 16 (2): 146-152 (In Chinese).
- Li Y, Li QW, Ryder OA, Zhang YP, 2004. Phylogenetic relationships within mammalian order Carnivora indicated by sequences of two nuclear DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 694-705.
- Masuda R, Lopez JV, Slattery JP, Yuhki N, O'Brien SJ, 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6 (3): 351-365.
- Matter MY, McLennan DA, 2000. Phylogeny and speciation of felids. *Cladistics* 16: 232-253.
- Neff NA, 1982. *The Big Cats: the Paintings of Guy Coheleach*. New York: Abrams Press.
- Nowak RM, 1991. *Walker's Mammals of the World*. 5th edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Salles L, 1992. Felid phylogenetics: extant taxa and skull morphology. *American Museum Novitates* 3 047: 1-67.
- Sambrook J, Russell DW, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt HA, Haeseler AV, 2003. Maximum likelihood analysis using TREE-PUZZLE. In: Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Stormo G, Stein L ed. *Current Protocols in Bioinformatics*. New York, USA: Wiley and Sons.
- Sheng HL, Wang PC, Lu HJ, Long LB, 1985. Felidae. In: Sheng HL, Wang PC, Lu HJ, Long LB ed. *The Conspectus of Mammalogy Therology*. Shanghai: East China Normal University Press, 193-196 (In Chinese).
- Shi Y, Wu XB, Yan P, Zhao Z, 2004. A method for DNA extraction from tannage and scalls of Alligator Sinensis. *Acta Zool. Sinica* 50 (2): 297-301 (In Chinese).
- Slattery JP, O'Brien SJ, 1998. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148: 1 245-1 255.
- Strimmer K, Haeseler AV, 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13: 964-969.
- Swofford DL, 1998. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak, F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The clustalx windows interface: exible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4 876-4 882.
- Wang S, Xie Y, Wang JJ, 2001. Felidae. In: Wang S, Xie Y, Wang JJ ed. *A Dictionary of Mammalian Names*. Changsha: Hunan Education Press, 76-78.
- Wayne RK, Valkenburgh BV, O'Brien SJ, 1991. Molecular distance and divergence time in carnivores and primates. *Mol. Bio. Evol.* 8: 297-319.
- Wayne RK, Benveniste RE, Janczewski DN, O'Brien SJ, 1988. Molecular and biochemical evolution of the Carnivora. In: Gittleman JL ed. *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 465-494.
- Zhang SY, Yang GT, Wang DF, 1994. Pelvic girdle morphologic compare of three leopard from China. *Chinese Wildlife* 4: 40-41 (In Chinese).
- Zhang YP, Shi LM, 1992. General situation of animal mitochondrial DNA polymorphism research. *Zool. Res.* 13: 289-298.
- 金 煜, 景松岩, 张长社, 刘英萍, 1995. 中国猫科动物毛的结构与属间划分. *野生动物* 4: 29-35.
- 兰 宏, 王 文, 施立明, 1995. 鹿属动物陈旧皮张标本的 DNA 提取及 PCR 扩增. *动物学研究* 16 (2): 146-152.
- 胡清宇, 李水福, 陈 玲, 刘 云, 吴俊娇, 1996. 豹骨头骨及其混伪品头骨的聚类分析. *基层中药杂志* 10 (2): 9-10.
- 盛和林, 王培潮, 陆厚基, 祝龙彪, 1985. 猫科. 见: 盛和林, 王培潮, 陆厚基, 祝龙彪主编. *哺乳动物学概论*. 上海: 华东师范大学出版社, 193-196.
- 史 燕, 吴孝兵, 晏 鹏, 赵 哲, 2004. 扬子鳄鞣制皮革和鳞片 DNA 的提取方法. *动物学报* 50 (2): 297-301.
- 汪 松, 解 焱, 王家骏, 2001. 猫科. 见: 汪 松, 解 焱, 王家骏主编. *世界哺乳动物名典*. 长沙: 湖南教育出版社, 76-78.
- 张淑云, 杨广涛, 王东风, 1994. 中国三种豹腰带骨形态学比较. *野生动物* 4: 40-41.
- 张亚平, 施立明, 1992. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. *动物学研究* 13: 289-298.