

从细胞色素 b 基因全序列差异分析岩羊 和矮岩羊的系统进化关系*

曹丽荣 王小明** 方盛国

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062) (浙江大学生命科学院, 杭州 310029)

摘要 矮岩羊的分类地位从它被发现后就一直存在着争议。本文测定了分别来自四川和青海的岩羊 (*Pseudois nayaur*) 和矮岩羊 (*Pseudois schaeferi*) 共 7 个个体的 Cyt b 基因全序列 (1 140 bp), 结合山羊 (*Capra hircus*)、北山羊 (*Capra ibex*)、绵羊 (*Ovis aries*) 和盘羊 (*Ovis ammon*) 同源 DNA 序列进行比较, 分析了碱基组成和变异情况以及核苷酸序列差异。用简约法和距离矩阵法构建了分子系统树, 得到了相同的拓扑结构。结果显示: 岩羊和矮岩羊互为单系群, 有着较山羊、北山羊、绵羊和盘羊间更近的亲缘关系, 它们之间的序列差异 (Cyt b = 3.2%) 低于牛科不同种间的序列差异水平 (8.3%~12.1%), 明显高于种内个体的序列差异, 而处于牛科亚种的序列差异范围内。因此, 推测矮岩羊与岩羊之间的差异可能已经达到了亚种的水平。它们的分歧时间为 1~3 百万年 [动物学报 49 (2): 198~204, 2003]。

关键词 岩羊 矮岩羊 细胞色素 b 系统进化

A molecular phylogeny of Bharal and dwarf blue sheep based on mitochondrial cytochrome b gene sequences*

CAO Li-Rong WANG Xiao-Ming** FANG Sheng-Guo

(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

(School of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract The phylogenetic relationship between the bharal or blue sheep (*Pseudois nayaur*) and dwarf blue sheep (*Pseudois nayaur schaeferi*) has been an open question. Total DNA was extracted and sequenced from three dried skin samples of bharal and four dwarf blue sheep from Sichuan and Qinghai provinces in China. The complete sequences were deposited in the GenBank (accession numbers: AF473602 - AF473608). Based on the complete Cyt b gene sequences (1 140 bp) obtained from these samples, the authors aligned them using the Clustal W software program. By comparing the Cyt b sequences of four other species *Capra hircus*, *Capra ibex*, *Ovis ammon*, *Ovis aries* in the family Bovidae, the divergences and base substitutions among these sequences were analyzed with the MEGA software. Accordingly, the base composition of bharal and dwarf blue sheep showed the same characters as the other bovidae members. The phylogenetic trees constructed by multiple methods (NJ and MP) supported the same topology, in which the monophyly of bharal and dwarf blue sheep was obviously demonstrated and the phylogenetic trees were in agreement with the traditional morphological data. Our molecular results show that the sequence divergence between bharal and dwarf blue sheep is lower than that between other species in the family Bovidae. However, the differences surpassed the corresponding number within intraspecific individuals and were in the range of sequence variation that typically distinguishes subspecies. Together with these data, the authors propose that the dwarf blue sheep (*Pseudois nayaur schaeferi*) should be a subspecies of the bharal

2002-01-31 收稿, 2002-09-17 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970130)、教育部高等学校骨干教师资助计划、上海曙光计划和上海市生态学重点学科资助项目 [This research was funded by the National Natural Science Foundation of China (No. 39970130), The Ministry of Education Foundation for Key University Teachers, The "ShuGuang" Project of Shanghai and Shanghai Priority Academy Discipline of Ecology]

** 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: wxming@public3.sta.net.cn

第一作者简介 曹丽荣, 女, 硕士研究生。研究方向: 分子生态学。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

(*Pseudois nayaur*). In addition, the divergence times between clades was discussed in accordance to the Cyt *b* molecular clock, which estimated an approximate divergence time between the bharal and dwarf blue sheep of 1 - 3 million years [Acta Zoologica Sinica 49 (2): 198 - 204, 2003].

Key words Bharal (*Pseudois nayaur*), Dwarf blue sheep (*Pseudois nayaur schaeferi*), Cyt *b*, Molecular phylogeny

矮岩羊主要分布于我国四川省巴塘县一带, 其分类地位从它被发现后就一直存在着争议 (Wang *et al.*, 2000); Allen (1939) 认为矮岩羊就是岩羊, 并不是岩羊的一个独立的亚种; Englemann (1938) 和 Haltenorth (1963) 认为矮岩羊是岩羊的一个亚种; Groves (1978) 进一步对其标本研究, 认为矮岩羊在体形、角形、毛被和生境等方面与岩羊有显著差异, 因而将它独立为一个种 (*P. schaeferi*)。最近, Feng *et al.* (2001) 从线粒体 DNA 控制区和细胞核 Y 染色体上 ZFY 内含子的部分碱基序列的结果, 认为矮岩羊在分类地位中为岩羊的一个亚种。

细胞色素 *b* 基因已成为研究种内和近缘种间系统发育和遗传问题的理想工具之一 (Vladimir *et al.*, 1999; 曹祥荣等, 2002), 它的部分或者全部序列被广泛地应用于动物类群的系统进化和分类研究中 (Cibele *et al.*, 2001; 周继亮等, 2001; 王义权等, 1999)。为了进一步深入探讨岩羊和矮岩羊之间的系统进化关系, 我们对岩羊和矮岩羊的 mtDNA 细胞色素 *b* 基因全序列进行了测定, 并与牛科其它两个属的细胞色素 *b* 基因序列进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

岩羊的 3 个皮张标本分别来自四川康定地区和青海玉树州, 矮岩羊的 4 个皮张标本来自四川巴塘县。这些皮张标本取自于 1995 ~ 1999 年间野外死亡个体, 个体死亡的具体时间不详。所有皮张标本未经化学处理, 均自然风干后保存于 - 20 °C 冰箱内。各标本编号见表 1 注释。

1.2 总 DNA 的提取和 PCR 扩增

皮张标本中总 DNA 的提取参见饶刚等 (2001) 方法并在离心转速上稍加以调整。PCR 引物参考 Kocher *et al.* (1989) 和 Irwin *et al.* (1991) 报道的哺乳动物细胞色素 *b* 通用引物 L14724 和 H15915, 同时对 H15915 进行了改进, 改进成为与岩羊完全匹配的碱基序列, 改进后的引物序列为:

L14724 5'-GATATGAAAACCA TCGTTG3'

H15915 5'-CCTTCTCTGGTTTACAA GAC-3'

PCR 反应在 PTC-200 Peltier Thermal cycler (MJ Research, Inc. USA) 上进行。反应总体积为 50 μ l。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 42 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 并进行 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照, 以检查是否有污染存在。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 于 - 20 °C 保存。

1.3 纯化与测序

扩增得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 所需带切下后用上海生工 (Sangon) 生产的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒 (UNIQ-10 column PCR Products Purification Kit) 纯化回收, 并取适量回收产物作正反双向测序反应。测序试剂采用 DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA), 测序反应在 MEGABACE 1000 sequence Analyzer (Amersham Pharmacia Biotech Inc. USA) 上进行。从岩羊、矮岩羊的皮张标本中扩增并测定了线粒体 DNA 的 Cyt *b* 基因全序列, 空白对照实验并未有扩增产物出现。为保证测序结果的准确性, 分别从岩羊和矮岩羊中随机选取一个个体, 将 Cyt *b* 的 PCR 纯化产物克隆到 pMD18-T Vector 中 (购自宝生物工程公司), 鉴定阳性克隆后, 对重组质粒再进行测序。

1.4 DNA 序列的数据处理

我们采用 DNASTAR 软件 (DNASTAR Inc., 1996) 中的 MEGALIGN 程序对岩羊和矮岩羊的测定序列和从 GeneBank 中下载的山羊 (*Capra hircus*) (GeneBank 序列号: X56289)、北山羊 (*Capra ibex*) (GeneBank 序列号: AF034735)、绵羊 (*Ovis aries*) (GeneBank 序列号: AF034730) 和盘羊 (*Ovis ammon*) (GeneBank 序列号: AF034727) 的同源序列进行排序。用 MEGA 软件 (Kumar *et al.*, 1993) 计算不同序列间的碱基替代数、变异位点、简约信息位点数、颠换百分比、转换/颠换比率和 Kimura (1980) 两参数 (2-paramete-

ter) 距离; 用 DNASTAR 软件计算两两序列的遗传相似度和序列差异百分比; 依据分歧时间的计算公式 $D = 2t$ (Li *et al.*, 1981) 和已校正的 Cyt *b* 分子钟 (Matthee *et al.*, 1999), 以牛科动物中序列颠换分歧为 $0.23\% \pm 0.01$ /百万年来分别计算岩羊和矮岩羊的分歧时间; 用 MEGA 软件基于 Kimura 2-parameter 距离采用 NJ 法构建分子系统树, 同时也用 PHYLIP3.6 软件 (Felsenstein, 2001) 开启式功能搜寻最简约 (MP) 树, 均以牛 (*Bos taurus*) (GeneBank 序列号: V00654) 作为外群比较。系统树各分枝的置信度由 1 000 次自举法 (Bootstrap) 重复检测。

2 结果

2.1 细胞色素 *b* 基因序列及其变异

DNA 序列已输入 GeneBank, 岩羊序列登录号为 AF473606、AF473607 和 AF473608, 矮岩羊为 AF473602、AF473603、AF473604 和 AF473605。在岩羊和矮岩羊的序列中, 共有 47 个位点呈现变异, 其中 34 个简约信息位点。在密码子的第三位点中存在 33 个变异, 占总变异位点的 72%。在岩羊和矮岩羊的 Cyt *b* 序列中, A、T、C、G 碱基的平均含量为 31.3%、25.1%、29.9% 和 13.6%, 碱基组成的百分比中显示出了 G 的相对缺乏 (表 1)。核苷酸碱基的变异也存在很大的差异, 其中 $T \leftrightarrow C$ 的转换比 $A \leftrightarrow G$ 转换发生的多, $A \leftrightarrow C$ 和 $A \leftrightarrow T$ 的颠换明显高于 $T \leftrightarrow G$ 与 $C \leftrightarrow G$ 的颠换。核苷酸的替换主要以转换为数 (转换/颠换数为 28.9/5.41), 转换多于颠换, 表现出高的转换偏倚 (Bias)。

在岩羊、矮岩羊、山羊、北山羊、绵羊、盘羊

的细胞色素 *b* 基因序列比较中, 岩羊与矮岩羊的平均颠换数值 (5.41) 和平均颠换百分比 (0.474%) 明显小于岩羊与其它四个近缘种之间的平均颠换数值 (13.7) 和平均颠换百分比 (1.19%) (表 2), 后者的平均颠换数目和平均颠换百分比大约是前者的 3 倍。在 Kimura 双参数距离中 (表 3), 岩羊与山羊、北山羊、绵羊、盘羊间的数值在 0.0858 ~ 0.1270, 平均为 0.1069; 而岩羊和矮岩羊间的 Kimura 双参数距离为 0.0281 ~ 0.0373, 平均为 0.0313, 前者明显高于后者, 大约也是后者的 3 倍。采用两种不同的分歧时间计算方法, 结果显示岩羊和矮岩羊的分歧时间大约在 1 ~ 3 百万年。

2.2 分子系统树的构建

基于我们的序列数据与从 GeneBank 中下载的山羊、北山羊、绵羊和盘羊的序列一起进行系统发育分析。在这 12 条 1 140 bp 的 Cyt *b* 基因全序列中, 我们发现其变异位点共 305 个, 其中 171 个简约信息位点。我们基于 Kimura 两参数 (2-parameter) 距离采用邻接 (NJ) 法 (图 1: A) 以及采用简约 (MP) 法 (图 1: B) 来构建分子系统树, 均以牛 (*Bos taurus*) 作为外群比较。所有系统树支上数值为 1 000 次自举 (Bootstrap) 检测得到的对该支的支持百分数。从图中可看出这两种不同的分子系统树具有基本相同的拓扑结构: 拓扑结构分为 3 个支系, 岩羊和矮岩羊首先聚在一起, 互为单系, 自举置信水平 (BCL) 值分别为: BCL = 100% (图 1A), BCL = 97% (图 1B); 第 2 支系包括北山羊和山羊两个姊妹群 (BCL = 96%); 第 3 支系包括绵羊和盘羊 (BCL = 97%)。这与传统的形态分类相一致。

表 1 岩羊和矮岩羊的碱基组成频率 (%)

Table 1 Frequencies of base composition in Bharal and dwarf blue sheep

	A	T	C	G	A1	T1	C1	G1	A2	T2	C2	G2	A3	T3	C3	G3	
Ai2	31.1	25.1	29.6	14.1	30.7	20.4	26.2	22.8	Ai2	20.3	41.3	24.5	13.9	42.4	13.7	38.2	5.8
Ai5	31.2	25.2	29.8	13.9	30.8	20.5	26.1	22.6	Ai5	20.3	41.4	24.5	13.7	42.4	13.7	38.7	5.3
Ai6	31.6	25.2	29.6	13.7	31.7	20.6	25.6	22.2	Ai6	20.3	41.2	24.8	13.7	42.7	13.7	38.3	5.3
Ai3	31.2	25.3	29.9	13.6	31.1	20.5	26.1	22.4	Ai3	20.5	41.3	24.7	13.4	42.1	13.9	38.9	5.0
Si3	31.2	24.9	30.3	13.6	30.8	21.1	25.8	22.4	Si3	20.1	41.4	24.5	14.0	42.6	12.4	40.5	4.5
Si5	31.6	25.0	29.9	13.5	31.1	21.6	25.3	22.1	Si5	20.8	41.3	23.9	13.9	42.9	12.1	40.5	4.5
Qh	31.3	25.0	30.2	13.5	30.8	21.3	25.5	22.4	Qh	20.3	41.3	24.5	13.9	42.9	12.4	40.5	4.2

细胞色素 *b* 碱基的组成频率, 数字 1. 2. 3. 分别代表密码子第 1、2、3 位 (Frequencies are given by codon position for cytochrome *b*. No. 1, 2, 3 denote the 1st, 2nd and 3rd codon positions) Ai2, Ai3, Ai5, Ai6 分别代表矮岩羊四个个体, Si3, Si5 分别代表来自四川的两个岩羊个体, Qh 代表来自青海的一个岩羊个体 (Ai2, Ai3, Ai5, Ai6 denote four dwarf blue sheep samples; Si3, Si5 denote two blue sheep samples from Sichuan Province; Qh denotes a blue sheep sample from Qinghai Province)

表 2 不同物种间平均转换/颠换数 (对角线以上) 和颠换百分比 (对角线以下)

Table 2 Numbers of transitions/ transversions (above diagonal) and percent difference of base transversions (below diagonal) between different species

岩羊 <i>Pseudois nayaur</i>	北山羊 <i>Capra ibex</i>	山羊 <i>Capra hircus</i>	盘羊 <i>Ovis ammon</i>	绵羊 <i>Ovis aries</i>	牛 <i>Bos taurus</i>
岩羊 (<i>Pseudois nayaur</i>)	97.6/8.66	83.3/11.66	98.6/17.66	109.6/16.66	126/47.3
北山羊 (<i>Capra ibex</i>)	0.00756	52/5	106/15	113/14	124/45
山羊 (<i>Capra hircus</i>)	0.0102	0.0044	94/16	103/15	117/44
盘羊 (<i>Ovis ammon</i>)	0.01556	0.0132	0.0141	34/1	126/50
绵羊 (<i>Ovis aries</i>)	0.01466	0.0123	0.0132	0.0009	140/49
牛 (<i>Bos taurus</i>)	0.0416	0.0395	0.0386	0.0439	0.0431

岩羊与矮岩羊的平均转换/颠换数为 28.9/5.41, 平均颠换百分比为 0.00474 (Numbers of transitions/ transversions and percent difference of base transversion between Bharal and dwarf blue sheep were 28.9/5.41, 0.00474, respectively)

表 3 本文研究的牛科不同动物 Cyt *b* 基因序列的双参数距离 (对角上) 和序列差异百分比 (对角下)Table 3 Kimura 2-parameter distance (above diagonal) and percent difference (below diagonal) for cytochrome *b* nucleotide sequences of animals examined in this study

OTUs	Ai2	Ai5	Ai6	Ai3	Si3	Si5	Qh	ibex	goat	argali	sheep	cow
Ai2		0.0018	0.0044	0.0053	0.0299	0.0364	0.0299	0.1101	0.1012	0.1236	0.1338	0.1818
Ai5	0.4		0.0062	0.0035	0.0281	0.0345	0.0281	0.1081	0.0993	0.1215	0.1317	0.1796
Ai6	0.6	0.6		0.0062	0.0308	0.0373	0.0308	0.1122	0.1022	0.1246	0.1348	0.1841
Ai3	0.7	0.2	0.5		0.0281	0.0346	0.0281	0.1093	0.0994	0.1205	0.1307	0.1797
Si3	2.8	2.9	3.1	3.2		0.0080	0.0035	0.1019	0.0879	0.1119	0.1242	0.1716
Si5	3.4	3.5	3.7	3.8	0.8		0.0098	0.1069	0.0928	0.1148	0.1270	0.1746
Qh	2.8	2.9	3.1	3.2	0.4	1.0		0.0976	0.0858	0.1098	0.1219	0.1716
ibex	11.1	10.9	11.3	11.3	10.3	10.8	9.9		0.0538	0.1197	0.1243	0.1717
goat	10.1	10.1	10.3	10.4	8.9	9.4	8.7	5.3		0.1065	0.1131	0.1611
argali	13.0	13.2	13.4	13.5	12.3	12.6	12.1	12.6	11.4		0.0309	0.1783
sheep	12.1	12.2	12.4	12.5	11.2	11.5	11.0	11.9	10.6	3.2		0.1918
cow	18.1	18.1	18.4	18.4	17.3	17.6	17.3	17.0	16.0	19.3	17.7	

ibex, goat, argali, sheep, cow 分别代表了北山羊、山羊、盘羊、绵羊 [ibex, goat, argali, sheep, cow denote ibex (*Capra ibex*), goat (*Capra hircus*), sheep (*Ovis aries*), argali (*Ovis ammon*), cow (*Bos taurus*) respectively] Ai2, Ai3, Ai5, Ai6, Si2, Si3, Qh 见表 1 注释 (Ai2, Ai3, Ai5, Ai6, Si2, Si3 and Qh are noted in Table 1)

3 讨论

3.1 岩羊和矮岩羊的线粒体 Cyt *b* 基因序列分析

在哺乳动物的 mtDNA 碱基替换中存在转换偏奇, 随着进化时间的增加, 颠换的积累, 转换偏奇会下降 (Hedges *et al.*, 1991; Zhang *et al.*,

1993)。在我们研究涉及到的牛科不同物种间, 转换差异与颠换差异呈现正相关, 这些动物中转换颠换比值最低为 5.34 (表 2), 数值均大于转换颠换比的临界值 2.0 (Knight *et al.*, 1993), 这说明了岩羊、矮岩羊、山羊、北山羊、盘羊、绵羊的线粒体 Cyt *b* 基因序列的突变可能未达到饱和状态, 随

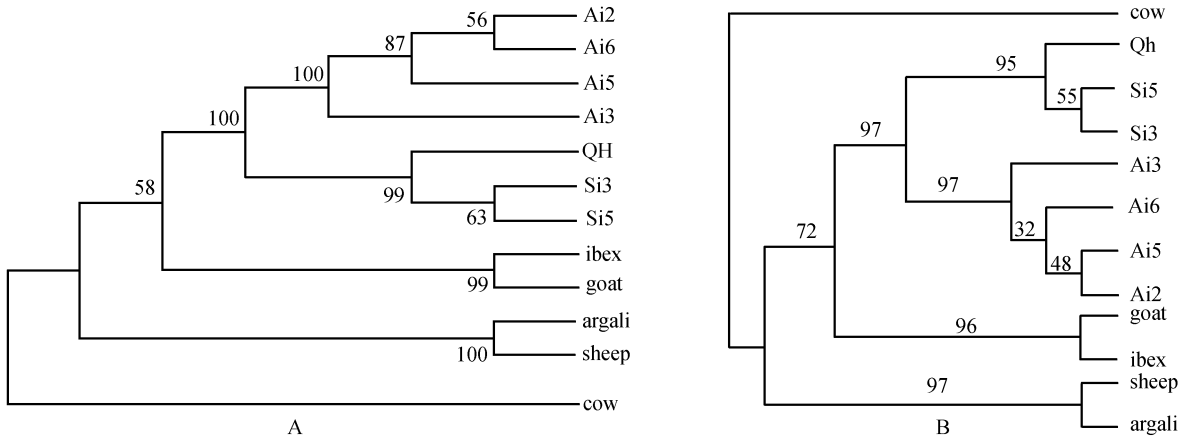


图 1 基于 Cyt b 基因序列构建的岩羊和矮岩羊分子系统树

Fig. 1 Molecular phylogenetic trees of Bharal and dwarf blue sheep based on cytochrome b sequences data with Bootstrap Test (1 000 replications)

图中数字为自举置信水平 (BCL) 值, Ai2、Ai3、Ai5、Ai6、Si2、Si3、Qh 见表 1 注释 [The values of bootstrap confidence level (BCL) of the nodes are indicated above the branch. Ai2, Ai3, Ai5, Ai6, Si2, Si3 and Qh are noted in Table 1]

着遗传差异的增加, 转换趋于饱和。

3.2 岩羊和矮岩羊的系统发育关系

在线粒体 Cyt b 上代表同义替换的密码子第三位点上的颠换变化速率是随着时间而逐渐增加的, 并进一步指出整个细胞色素 b 基因的颠换与时间是成线性关系的 (Irwin *et al.*, 1991)。随着分歧时间增加, 亲缘关系越远, 颠换变化也随之增加, 我们的结果 (表 2) 充分显示出了岩羊和矮岩羊间存在着比岩羊与山羊、北山羊、绵羊、盘羊间更近的亲缘关系。岩羊与山羊、北山羊、绵羊、盘羊不同物种之间的平均序列差异为 9.0%~12.3% (表 3)。据研究, 在牛科动物中不同种间的序列差异在 8.3%~12.1% (Marc *et al.*, 1992) 和 6.3%~12.6% (Schreliber *et al.*, 1999)。已研究的牛科物种间的差异与我们的结果 (岩羊与山羊、北山羊、绵羊、盘羊不同物种之间的平均序列差异) 相一致; 同时, 本研究表明岩羊和矮岩羊之间的序列差异为 2.8%~3.8%, 平均为 3.2% (表 3), 并未达到牛科动物的种间序列差异, 说明了岩羊和矮岩羊之间的遗传分化并未到达种的水平。所以, 不支持矮岩羊为独立的一个种的观点 (Groves, 1978)。

在分子系统发育研究中, 由于对各种构树方法前提条件和适用范围所知甚微, 因而难以判断在某一具体情况下那种方法最佳, 得到最接近真实结果的系统关系 (Felsenstein *et al.*, 1988)。为了提高结果的可靠性, 最好采用多种方法构建系统树

(Kim *et al.*, 1993)。为此, 我们采用了简约法和距离矩阵法分别构建了分子系统树 (图 1: A, B)。在任何分析中, 自举置信水平 (BCL) 值小于 50% 的进化支都需谨慎对待, 只有当自举置信水平值大于 70% 时, 该进化支才是比较可信的 (Kimball *et al.*, 1999)。从构建的分子系统树 (图 1) 中充分说明了岩羊和矮岩羊来自同一个母系, 存在着很近的亲缘关系。但从我们的结果中又反映出了岩羊和矮岩羊之间还存在一定的遗传差异。岩羊和矮岩羊间的 Kimura 双参数距离为 0.0281~0.0373 (平均为 0.0314) 明显高于矮岩羊个体间的 Kimura 双参数距离 0.0018~0.0062 (平均为 0.0045) 以及岩羊个体间的 Kimura 双参数距离 0.0035~0.0098 (平均为 0.0071); 岩羊和矮岩羊之间的序列差异为 2.8%~3.8% (平均为 3.2%) 明显高于岩羊个体间的序列差异 0.4%~1.0% (平均为 0.7%) 和矮岩羊个体间的序列差异 0.2%~0.7% (平均为 0.5%) (表 3)。虽然岩羊和矮岩羊之间的序列差异 (Cyt b = 3.2%) 小于牛科不同种间的序列差异 8.3%~12.1% (Marc *et al.*, 1992), 但超过了 Schreliber *et al.* (1999) 报道的在牛科西里伯斯水牛 (*Bubalus depressicornis*) 种内个体间的差异 (0.7%~1.1%), 同时也超过了其它哺乳动物种内个体间的差异水平 (Masuda *et al.*, 1994; Wayne *et al.*, 1991; Nicole *et al.*, 2001), 而处于牛科中灰小羚羊 (*Sylvicapra grimmia*) 的亚种 (Cyt b = 2.8%) 和蓝小羚羊 (*Cephalophus*

monticola) 的亚种 (Cyt *b* = 6.2%) 的序列差异水平之间 (Bettine *et al.*, 2001)。在细胞学方面, 岩羊的染色体数目 $2n = 56$, 而矮岩羊染色体数目 $2n = 54$, 在核型上虽较为相似, 但已表现出了染色体的进化 (Bunch *et al.*, 2000)。因此, 我们推测在分子水平上, 矮岩羊与岩羊之间的差异可能已经达到了亚种的水平; 它们的分歧时间大约在 1~3 百万年。

致谢 本研究得到了浙江大学濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室饶刚博士、郑桦锐硕士、万秋红博士、张蓓博士和林岁羽硕士的热情帮助; 华东师范大学生态实验室的章克家博士为本文采集了标本以及丁由中博士、吴巍博士、王正寰博士、吴建盛硕士和戴捷硕士的热心帮助; 美国 Suffolk 大学的 Plick Craig 教授对本文提出了宝贵的修改意见, 在此谨致衷心感谢!

参考文献 (References)

- Allen, G. M. 1939 Zoological results of the second Dolan expedition to western China and eastern Tibet 1934 - 1936. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* **90**: 261 ~ 293.
- Bettine, J. V. and J. R. Terence 2001 Retrieval of four adaptive lineages in *Duiker antelope*: evidence from mitochondrial DNA sequences and fluorescence *in situ* hybridization. *Mol. Phy. Evol.* **20** (3): 409 ~ 425.
- Bunch, T. D., S. Wang, Y. Zhang, A. Liu and S. Lin 2000 Chromosome evolution of the blue sheep/bharal (*Pseudois nayaur*). *J. Here.* **91** (2): 168 ~ 170.
- Cao, X. R., F. J. Shu, X. R. Zhang, C. M. Bi, C. J. Li, J. Hu and J. Y. Fang 2002 Phylogenetic relationships of *E-laphodus cephalophus* and three *Muntiacus* species revealed by mitochondrial cytochrome *b* nucleotides sequence. *Acta Zool. Sin.* **48** (1): 44 ~ 49. [曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 毕春明, 李朝军, 胡均, 方笈阳 2002 毛冠鹿与 3 种麝属动物的线粒体细胞色素 *b* 的系统进化分析. *动物学报* **48** (1): 44 ~ 49.]
- Cibele, R. B. and A. M. Moreira 2001 Molecular phylogeny of Genus *Oryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) based on cytochrome *b* DNA sequences. *Mol. Phy. Evo.* **18** (2): 282 ~ 292.
- Englemann, C. 1938 Ueber die Grossauger Szetschwans. Sikongs und Osttibets. *Z. Säugetlerk* **13**: 1 ~ 76.
- Felsenstein, J. 2001 PHYLIP (phylogeny inference package). Version 3.6. Washington: University of Washington.
- Felsenstein, J. 1988 Molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 521 ~ 565.
- Feng, J., C. Lajia, D. J. Taylor and M. S. Webster 2001 Genetic distinctiveness of endangered dwarf blue sheep (*Pseudois nayaur schaeferi*): evidence from mitochondrial control region and Y-linked ZFY intron sequences. *J. Here.* **92** (1): 9 ~ 15.
- Groves, C. P. 1978 The taxonomic status of the dwarf blue sheep. *Säugetlekundliche Mitteilungen* **26**: 177 ~ 183.
- Haltenorth, T. 1963 Klassifikation der Säugetlere: Artiodactyla. *Handb d Zoologie*, Berlin **8**: 1 ~ 167.
- Hedges, S. B., R. L. Bezy and L. R. Maxson 1991 Phylogenetic relationships and biogeography of Xantuslid lizards, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Bio. Evol.* **8**: 767 ~ 780.
- Irwin, D. M., T. D. Kocher and A. C. Wilson 1991 Evolution of cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**: 128 ~ 144.
- Kim, J. 1993 Improving the accuracy of phylogenetic estimation by combining different methods. *Syst. Biol.* **42**: 331 ~ 340.
- Kimball, R. T., E. L. Braun, P. W. Zwartjes, T. M. Crowe and J. D. Ligon 1999 A molecular phylogeny of the pheasants and partridges suggests that these lineages are not monophyletic. *Mol. Phy. Evol.* **11**: 38 ~ 54.
- Kimura, M. 1980 A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111 ~ 120.
- Knight, A. and D. P. Mindell 1993 Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of fea s viper. *Syst. Biol.* **42** (1): 18 ~ 31.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas and A. Meyer 1989 Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplication and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6 190 ~ 6 200.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei 1993 MEGA: molecular evolutionary genetics analysis. Version 1.01. University Park: The Pennsylvania State University.
- Li, W. H., T. Gokobori and M. Nei 1981 Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* **292**: 237 ~ 239.
- Marc, W. A., M. M. Miyamoto, L. Jarecki, F. Kraus and M. R. Tennant 1992 DNA systematics and evolution of the artiodacyl family Bovidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3 972 ~ 3 976.
- Masuda, R. and M. C. Yoshida 1994 A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia, Carnivora), based on comparison of mitochondrial cytochrome *b* nucleotide sequences. *Zoo. Sci.* **11**: 605 ~ 612.
- Matthee, C. A. and T. J. Robinson 1999 Cytochrome *b* phylogeny of the family Bovidae: resolution within the *Alcelaphini*, *Antilopini*, *Neotragini* and *Tragelaphini*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**: 31 ~ 46.
- Nicole, L. O., A. P. Calvin and J. B. Robert 2001 Molecular systematics of the family Mormoopidae (Chiroptera) based on Cytochrome *b* and recombination activating gene sequences. *Mol. Phy. Evol.* **20** (3): 426 ~ 436.
- Nowak, R. M. 1999 Walker's Mammals of the World. 6th. edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Rao, G., M. Li, Y. D. Li, J. Wang., F. W. Wei and S. G. Fang 2001 A new method of extraction of genomic DNA from

- dried skin samples. *Chinese Journal of Zoology*. **36** (4): 53 ~ 57. [饶刚, 李明, 牛屹东, 王静, 魏辅文, 方盛国 2001 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. *动物学杂志* **36** (4): 53 ~ 57.]
- Schreiber, I. S., G. Notzold and M. Wink 1999 Cytochrome *b* gene haplotypes characterize chromosomal lineages of Anoa, the Sulawesi dwarf buffalo (Bovidae: *Bubalus* sp.). *J. Hered.* **90**: 165 ~ 176.
- Vladimir, O., A. Poltoraus, L. A. Zhivotovsky, V. Spitsyn, P. Ivanov and N. Yankovsky 1999 Mitochondrial DNA sequence diversity in Russians. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 197 ~ 201.
- Wang, X. M., J. Peng and H. Zhou 2000 Preliminary observations on the distribution and status of dwarf blue sheep *Pseudois schaeferi*. *Oryx* **34**: 21 ~ 26.
- Wang, Y. Q., K. Y. Zhou, L. S. Xu., G. Yang and G. J. Xu 1999 The evolutionary relationships of several colubrid snakes suggested by sequences analysis of Cyt *b* gene fragment. *Acta Zool. Sin.* **45** (3): 332 ~ 338. [王义权, 周开亚, 徐璐珊, 杨光, 徐国均 1999 几种游蛇的 Cyt *b* 基因片段序列分析及其演化关系. *动物学报* **45** (3): 332 ~ 338.]
- Wayne, R. K. and S. M. Jenks 1991 Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Canis rufus*. *Nature* **351**: 565 ~ 568.
- Zhang, Y. P. and O. A. Ryder 1993 Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9 557 ~ 9 561.
- Zhou, J. L., Y. P. Zhang, M. H. Huang, Y. J. Chen, X. Q. Chen and G. D. Yao 2001 Phylogenetic relationships among Crotalinae based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations. *Acta Zool. Sin.* **47** (4): 361 ~ 366. [周继亮, 张亚平, 黄美华, 陈永久, 陈小青, 姚耿东 2001 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育. *动物学报* **47** (4): 361 ~ 366.]