

牦牛线粒体 DNA D-loop 区序列测定及其在牛亚科中分类地位的研究

李齐发^{1,3}, 李隐侠¹, 赵兴波^{2,3}, 潘增祥¹, 刘振山¹, 张庆波¹,
屈旭光¹, 宋大伟¹, 董丽艳¹, 李 宁^{2,3}, 谢 庄^{1*}

(1. 南京农业大学动物科技学院动物生殖遗传与分子进化实验室, 南京 210095;

2. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 3. 中国农业大学农业生物技术国家实验室, 北京 100094)

摘要: 根据普通牛线粒体 DNA 序列设计引物, 获得了九龙牦牛线粒体 D-loop 区全序列, 并以羊亚科绵羊属绵羊作为外类群利用 D-loop 区序列对牛亚科代表性物种(牦牛、野牦牛、普通牛、瘤牛、美洲野牛、欧洲野牛和亚洲水牛)进行了系统发育分析。结果发现: 牦牛线粒体 DNA D-loop 区序列全长 893 bp, 与普通牛源序列的同源性为 87.4%, 其中有 17 个碱基的缺失; 在牛亚科内, 牦牛、野牦牛与美洲野牛(美洲野牛属)间的序列差异百分比最小, 为 6.2%~6.8%, 而与牛属中普通牛、瘤牛间的序列差异百分比比较大, 为 10.0%~11.3%; 系统发育分析发现: 牦牛、野牦牛首先与美洲野牛聚为一类, 说明牦牛、野牦牛与美洲野牛属间的遗传相似性较高、亲缘关系较近, 而与牛属间的遗传相似性较低、亲缘关系较远; 结合古生物学、形态学、分子生物学的证据, 支持将牦牛、野牦牛划分为牛亚科中一个独立属即牦牛属的观点。

关键词: 牛亚科; 牦牛属; 牦牛; D-loop; 系统发育; 分类地位

中图分类号: S823.8⁺5.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)01-0001-06

Sequencing D-loop Region of Mitochondrial DNA in Yak and Study on Its Taxonomic Status in Bovinae

LI Qi-fa^{1,3}, LI Yin-xia², ZHAO Xing-bo^{2,3}, PAN Zeng-xiang¹, LIU Zhen-shan¹,
ZHANG Qing-bo¹, QU Xu-Guang¹, SONG Da-wei¹, DONG Li-yan¹, LI Ning^{2,3}, XIE Zhuang^{1*}

(1. Laboratory of Animal Reproductive Genetics and Molecular Evolution, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University,

Beijing 100094, China; 3. State Key Laboratory for Agribiotechnology,

China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Primers designed according to the mitochondrial gene sequences of *Bos taurus* reported was used to amplify and sequence jiulong yak's D-loop region, and the whole sequence was obtained. Using *Ovis aries* as outgroup taxa, the phylogeny about the representative species of *Bovinae* (*Poephagus grunniens*, *Poephagus mutus*, *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bison bison*, *Bison bonasus*, *Bubalus bubalis*) was analyzed. The results showed that the length of D-loop was 893 bp, owning 87.4% homology with the *Bos taurus* D-loop sequence, there existed 17 bp deficiency. Among *Bovinae*, the percentage nucleotide sequence divergence between *Poephagus grunniens*, *Poephagus mutus* and American bison of *Bison bison* was 6.2%-6.8%, which was less than that of *Bos taurus* and *Bos indicus* in *Bos* (10.0%-11.3%). Phylogeny analysis found that *Poephagus*

收稿日期: 2006-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(30500360); 南京农业大学青年科技创新基金(KJ05011)

作者简介: 李齐发(1975-), 男, 河南固始人, 副教授, 博士生, 主要从事动物分子进化与生殖遗传研究, E-mail: liqifa@njau.edu.cn

* 通讯作者: 谢 庄, 男, 教授, E-mail: zxie@njau.edu.cn

grunniens, *Poephagus mutus* and *Bison bison* were clustered first of all, indicating there was higher genetic comparability among them than that of *Bos*. Combining with the proof of paleontology, morphology, molecular biology, the data supports the point that *Poephagus grunniens* and *Poephagus mutus* are classified as an alone genus in *Bovinae*, that is *Poephagus*.

Key words: *Bovinae*; *Poephagus*; yak (*Poephagus grunniens*); D-loop; phylogeny; taxonomic status

牦牛起源于中国,是一个古老而原始的物种,现在的家养牦牛(*Poephagus grunniens*)是由野牦牛(*Poephagus mutus*)经过长期的自然选择和人工驯化而来^[1-2],在动物分类学上隶属于偶蹄目(*Artiodactyla*)、反刍亚目(*Ruminantia*)、牛科(*Bovidae*)、牛亚科,但在属级分类上很难确定^[3-4]。1766年分类学家 Linnaeus 首先将牦牛作为1个种(*Bos grunniens*)与普通牛(*Bos taurus*)、瘤牛(*Bos indicus*)一起统归为牛属(*Bos*)^[5],1843年 Gray 根据牦牛与牛亚科其它物种在形态学上的差异将牦牛划分成1个独立的牦牛属(*Poephagus*)^[6]。此后,关于牦牛在牛亚科中的分类地位问题一直存在着争议,并成为牛亚科分子进化与系统发育领域的研究热点,目前主要形成2种不同的观点:一种观点是将牦牛作为牛亚科中1个独立的属即牦牛属^[1,7-11],另一种观点就是将牦牛作为牛属中的1个亚属或1个种^[12-14]。

动物线粒体 DNA 因其进化速度快、在群体内变异大、分子结构简单、极少发生重组等特点,已成为进行物种起源、分子进化和系统发育研究的重要分子标记^[15-16],其中 D-loop 区的进化速度快,变异较大,适于进行亚科内属、种间的系统学研究^[17-18]。本文测定了牦牛线粒体 DNA D-loop 区的全序列,并以羊亚科(*Caprinae*)绵羊属(*Ovis*)绵羊(*Ovis aries*)作为外类群利用线粒体 DNA D-loop 区序列对牛亚科代表性物种(牦牛、野牦牛、普通牛、瘤牛、美洲野牛、欧洲野牛和亚洲水牛)进行系统发育分析,从分子水平上探讨牛亚科不同物种间的系统发育关系以及牦牛在牛亚科中的分类地位。

1 材料和方法

1.1 试验动物

试验动物为成年健康的九龙牦牛(Jiulong yak),来自四川龙日种畜场,尾动脉采血 10 mL,ACD 抗凝,-30℃保存备用。采用常规的酚-氯仿法提取血液基因组 DNA^[19]。

1.2 引物合成、扩增和测序

根据普通牛线粒体 DNA 的已知序列(AF492351)设计引物扩增九龙牦牛的 D-loop 区,正向引物为:5'-CTGCAGTCTCACCATCAACC-3',反向引物为:5'-GGGGTGTAGATGCTTGC-3';测序引物为 M13 通用引物,均由北京奥科生物技术有限公司合成。

牦牛线粒体 DNA D-loop 区 PCR 扩增的反应体系为 25 μL,反应条件为:94℃ 5 min 后;进行 30 个循环 94℃ 40 s,60℃ 45 s,72℃ 1 min;72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物用 GeneClean® III 试剂盒(Q. Biogene 公司)回收纯化,直接连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)上,然后转化到高效感受态细胞 DH5α 中,用 BioDev 质粒快速提取试剂盒(博大科技)提取质粒 DNA。测序反应用 BigDye 测序试剂盒(ABI 公司)进行,纯化后用 ABI 377DNA 序列自动分析仪进行序列测定。

1.3 牛亚科其它代表性物种和外类群 D-loop 区序列来源

选取牛亚科中具有代表性的物种,包括野牦牛、普通牛、瘤牛、美洲野牛(*Bison bison*)、欧洲野牛(*Bison bonasus*)和亚洲水牛(*Bubalus bubalis*)与牦牛进行比对分析,并选取与牛亚科亲缘关系较近的羊亚科绵羊属绵羊作为系统发育分析的外类群,从 GenBank 上下载相应物种 D-loop 区全序列(表 1)。

1.4 数据处理和系统发育分析

用 DNASTar5.02(DNASTAR Inc.)软件对所测序列和数据库中的序列进行比对分析、对位排列和计算序列间的序列差异百分比;用 MEGA3.1 软件^[20]统计序列的碱基组成、多态位点和转换/颠换比(Transition/Transversion, Ts/Tv);用 MEGA3.1 软件^[20]计算遗传距离,并运用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,自举分析(Bootstrap test)1 000 次重复抽样检验获得置信度(Bootstrap percentage, BP)。

表 1 牛亚科代表性物种和外类群的 D-loop 区序列
Table 1 The source of sequences for D-loop in Bovinae and outgroup

物种名 Species	序列号 Access numbers	序列长度/bp Sequence length
牦牛 <i>Poephagus grunniens</i>	AY374125*	893
野牦牛 <i>Poephagus mutus</i>	AY749414	892
普通牛 <i>Bos taurus</i>	AF492351	910
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	AF492350	911
美洲野牛 <i>Bison bison</i>	U12864	890
欧洲野牛 <i>Bison bonasus</i>	U34294	891
亚洲水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	AF475278	1 015
绵羊 <i>Ovis aries</i>	AY829430	1 181

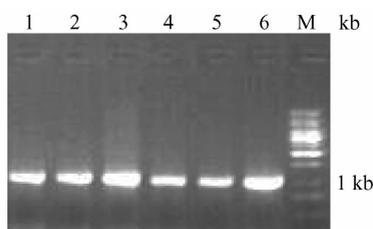
*. 为本文所测序列

*. Sequences produced during this work

2 结果

2.1 九龙牦牛线粒体 DNA D-loop 区全序列

根据普通牛线粒体 DNA 序列设计的引物在牦牛基因组中得到了较好的扩增(图 1)。测序发现九龙牦牛线粒体 D-loop 区全长为 893 bp, 序列中 T、C、A、G 等 4 种碱基含量分别为 28.6%、25.3%、32.4%和 13.7%, 其中 AT 含量(61%)明显高于 GC 含量(39%); 与普通牛源序列的同源性为 87.4%, 其中有 17 个碱基的缺失。九龙牦牛线粒体 D-loop 区序列已提交到 GenBank 上(登录号为 AY374125)。



1~6. D-loop 区扩增片段;M. 1 kb ladder marker

1-6. Product of D-loop region;M. 1 kb ladder marker

图 1 牦牛线粒体 DNA D-loop 区扩增产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of D-loop region in yak

2.2 牛亚科线粒体 DNA D-loop 区序列变异

牛亚科不同物种间 D-loop 区全长相差较大, 在 890~1 015 bp 之间, 序列中 T、C、A、G 4 种碱基含量与牦牛基本相同。在牛亚科线粒体 DNA D-loop 区全序列中发现 236 个变异位点, 多态位点百分率

为 23.25%, 其中单一多态位点 133 个, 占多态位点总数的 56.36%, 简约信息多态位点 103 个, 占多态位点总数的 43.64%。牛亚科 7 个物种间线粒体 DNA D-loop 区序列变异中碱基缺失/插入和碱基替换等变异类型均有发生, 其中碱基替换变异类型中转换 69 次, 颠换 24 次, 转换/颠换比为 2.9; 在转换变异类型中以 T/C 为主, 占 60.87%; 在颠换变异类型中以 A/T、A/C 颠换为主, 占 79.17%。

牛亚科内不同物种间 D-loop 区序列差异百分比见表 2。从表 2 可以看出, 在牛亚科中牦牛与野牦牛的序列差异百分比最小, 为 3.7%, 普通牛与亚洲水牛间的序列差异百分比最大, 达 19.0%; 在牛亚科中, 牦牛、野牦牛与美洲野牛(美洲野牛属)间的序列差异百分比最小, 为 6.2%~6.8%, 而与牛属中的普通牛、瘤牛间的序列差异百分比较大, 为 10.0%~11.3%; 亚洲水牛与牛亚科其它物种间的序列差异百分比均较大。

2.3 牛亚科系统发育分析

牛亚科不同物种间的 Kimura 双参数遗传距离见表 3。从表 3 可以看出, 牛亚科不同物种间的遗传距离在 0.038 3~0.180 1, 平均遗传距离为 0.113 1, 牦牛与野牦牛间的遗传距离最小, 美洲野牛与亚洲水牛的遗传距离最大; 在牛亚科中, 牦牛、野牦牛与美洲野牛(美洲野牛属)间的遗传距离最小, 为 0.063 4~0.070 0, 而与牛属中的普通牛、瘤牛间的遗传距离较大, 为 0.097 9~0.108 9; 亚洲水牛与牛亚科其它物种间的遗传距离均较大。

表 2 牛亚科内不同物种间线粒体 DNA D-loop 区序列差异百分比

Table 2 Percentage divergence for D-loop sequences of mitochondrial DNA among species in Bovinae

%

	牦牛 <i>Poephagus grunniens</i>	野牦牛 <i>Poephagus mutus</i>	普通牛 <i>Bos taurus</i>	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	美洲野牛 <i>Bison bison</i>	欧洲野牛 <i>Bison bonasus</i>
野牦牛 <i>Poephagus mutus</i>	3.7					
普通牛 <i>Bos taurus</i>	11.3	11.0				
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	10.0	10.3	5.2			
美洲野牛 <i>Bison bison</i>	6.8	6.2	10.6	10.9		
欧洲野牛 <i>Bison bonasus</i>	9.5	9.9	9.6	10.6	9.9	
亚洲水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	18.0	17.3	19.0	18.1	18.2	17.3

表 3 牛亚科不同物种间 Kimura 双参数遗传距离

Table 3 Kimura 2-parameter genetic distance among species in Bovinae

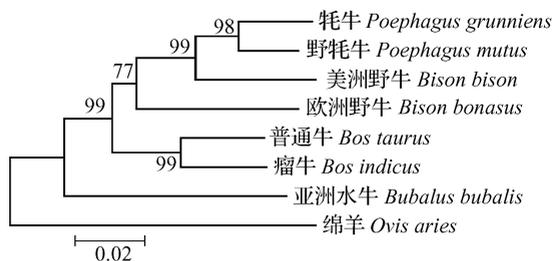
	牦牛 <i>Poephagus grunniens</i>	野牦牛 <i>Poephagus mutus</i>	普通牛 <i>Bos taurus</i>	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	美洲野牛 <i>Bison bison</i>	欧洲野牛 <i>Bison bonasus</i>
野牦牛 <i>Poephagus mutus</i>	0.038 3					
普通牛 <i>Bos taurus</i>	0.108 9	0.107 4				
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	0.097 9	0.101 9	0.051 0			
美洲野牛 <i>Bison bison</i>	0.070 0	0.063 4	0.103 2	0.106 1		
欧洲野牛 <i>Bison bonasus</i>	0.093 8	0.099 2	0.092 1	0.104 6	0.099 1	
亚洲水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	0.177 3	0.169 8	0.175 8	0.169 8	0.180 1	0.165 5

根据牛亚科 7 个物种线粒体 DNA D-loop 区全序列采用邻接法构建了牛亚科系统发育树, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 牛亚科和外类群(绵羊)各聚为一类, 在牛亚科内, 亚洲水牛与牛亚科其它物种各自聚为一类; 牦牛与野牦牛首先聚为一类, 节点的自举支持率(BP)为 98%, 然后再与美洲野牛属的美

洲野牛聚在一起; 普通牛和瘤牛聚为一类, 节点的自举支持率(BP)为 99%。

3 讨论

牦牛在一般形态上与牛亚科中的牛属、美洲野牛属等比较接近, 因此关于牦牛在牛亚科中属级分类上的确切地位, 长期以来使动物学家们犹豫不决。牦牛乍看起来象一种普通的、结实的、体型小的牛种, 接近于牛属和美洲野牛属, 但事实上牦牛的形态学特征同牛属和美洲野牛属间存在有较大的差异, 例如叫声、肋骨数、裙毛、尾毛等^[3,21]。Olsen 研究发现牦牛的前额骨、上额骨和鼻骨在组织排列上与美洲野牛和欧洲野牛相似, 而与牛属的结构明显不同, 但牦牛与美洲野牛和欧洲野牛在上额骨骨边缘的干涉性延伸方面有一定的差别, 牦牛上额骨可以阻止鼻孔到达前额骨, 这可能是因为牦牛控制嘴唇和鼻孔的面部肌肉不同的组织结构引起的, 并指出牦牛与牛、野牛属是不同的属, 认为牦牛应划分为牛亚科中的一个独立属^[1,9], 与 Groves 根据头骨^[22], Ger-aads 根据 57 块骨骼(主要是头盖骨)特征和 32 类化



节点的数值为 1 000 次重复抽样检验的支持率
Bootstrap percentage values indicating the degree of support for each cluster are shown at the appropriate nodes

图 2 基于线粒体 DNA D-loop 区序列采用 NJ 法构建的牛亚科系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree reconstructed from D-loop region among species in Bovinae

石研究的结果^[23]一致。根据古生物学的研究,牦牛属(*Poephagus*)和牛属(*Bos*)是在 20 世纪末由 *Urmiabos* 中分离出来的,是牛科动物中在系统进化上分支较晚的 2 个属,二者关系较近,在以后的进化过程中,牦牛属和牛属各循不同的方向演化,在形态构造上产生了一定的差别,因而比一般的种间关系更远一些,所以牦牛、野牦牛应归于牛亚科中的一个与牛属并列的属即牦牛属^[6,8]。

Ritz 等利用 20 个微卫星标记对牛族(Tribe *Bovini*)进行系统发育学分析,认为可将普通牛、牦牛和转角牛亚属(*Bibos*)分别作为牛属中的一个亚属,而美洲野牛、欧洲野牛和非洲水牛则各作为一个独立的属^[13]。樊宝良等利用 κ 酪蛋白(κ -casein, κ -CN)第 4 外显子序列将牦牛、普通牛、欧洲野牛、印度野牛(*Bos gaurus*)和瘤牛划归为牛属中的一个亚属^[14]。李齐发等根据 *MHC-DRB3* 基因 exon2 序列变异信息^[10]和线粒体 DNA 细胞色素 b 基因(Cytochrome b, Cyt b)序列^[11]支持将牦牛作为牛亚科中一个独立属的观点。王玲^[24]根据线粒体 D-loop 序列研究发现牦牛与美洲野牛、欧洲野牛间的亲缘关系较近,与 Miyamoto 等^[25]、Kraus 等^[26]、Ward 等^[27]、Hassanin 等^[28]根据线粒体序列的研究结果是一致的。Hassanin 等根据乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)启动子区、细胞色素 b 基因、细胞色素 c 氧化酶 II 亚基(Subunit II of the cytochrome c oxidase, CO2)序列研究发现牦牛与美洲野牛的亲缘关系较近,普通牛、瘤牛与欧洲野牛的亲缘关系较近^[29],与 Janecek 等^[30]、Verkaar 等^[29]的研究结果是一致的。

本文研究发现牦牛、野牦牛在牛亚科中与美洲野牛属的美洲野牛间的序列差异百分比最小, Kimura 双参数遗传距离最近,而与牛属中的普通牛、瘤牛的序列差异百分比比较大,遗传距离较远,系统发育分析时牦牛与美洲野牛聚为一类,说明牦牛与美洲野牛遗传相似性较高、亲缘关系较近,而与牛属中的普通牛、瘤牛遗传相似性较低、亲缘关系较远,与 Olsen 根据形态学特征^[1,9]、李齐发等根据 *MHC-DRB3* 基因第 2 外显子序列^[10]和线粒体细胞色素 b 基因序列^[11]、Hassanin 等根据乳铁蛋白、线粒体 DNA 序列^[29]的研究结果是一致的,结合古生物学、形态学、分子生物学的证据,支持将牦牛、野牦牛划分为牛亚科中的一个独立属——牦牛属(*Poephagus*)的观点^[1,3,10-11]。

参考文献:

- [1] OLSEN S J. Fossil ancestry of the yak, its cultural significance and domestication in Tibet[J]. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1990, 142: 73-100.
- [2] 《中国牦牛学》编写委员会. 中国牦牛学[M]. 成都:四川科学技术出版社,1989.
- [3] 李齐发,赵兴波,刘红林,等. 牦牛分类地位研究概述[J]. 动物分类学报,2006,31(3):520-524.
- [4] WIENER G, HAN J L, LONG R J. The yak [M]. 2nd ed. Bangkok: The Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.
- [5] LINNAEUS C. Systema naturae sive regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis [M]. 12th ed. SYSTEMA NAT. ED., Holmiae, Laurentii Salvii, 1766.
- [6] GRAY J E. List of the specimens of mammalia in the collection of the british museum[M]. London: Trustees of the British Museum, 1843.
- [7] CORBET G B. The mammals of the palaeartic region: a taxonomic review[M]. London and Ithaca: British Museum (Nat. Hist.), 1978.
- [8] 冯祚建,蔡桂全,郑昌琳. 西藏哺乳类[M]. 北京:科学出版社,1986.
- [9] OLSEN S J. Confused yak taxonomy and evidence of domestication[J]. Illinois State Museum Scientific Papers, 1991, 23: 387-393.
- [10] 李齐发,李艳华,赵兴波,等. 牛亚科 *MHC-DRB3* 基因 exon2 的序列变异分析[J]. 农业生物技术学报, 2005,13(4):441-446.
- [11] 李齐发,李隐侠,赵兴波,等. 牦牛线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列测定及其起源、分类地位研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(11):1 118-1 123.
- [12] LYDEKKER R. Wild oxen, sheep and goats of all lands, living and extinct [M]. London: Rowland Ward, 1898.
- [13] RITZ L R, GLOWATZKI-MULLIS M-L, MACHUGH D E, et al. Phylogenetic analysis of the tribe *Bovini* using microsatellites[J]. Animal Genetics, 2000, 31: 178-185.
- [14] 樊宝良,李 宁,吴常信. 依据乳蛋白基因序列构建反刍动物种系发育树的研究[J]. 遗传学报,2000,27(6):485-497.
- [15] GRAY M W, BURGER G, LANG B E. Mitochondri-

- al evolution[J]. *Science*, 1999, 283: 1 476-1 481.
- [16] SACCONI C, GISSI C, LANAVE C, et al. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview [J]. *Gene*, 2000, 261(1): 153-159.
- [17] HILLIS D M, MORITZ C, MABLE B K. *Molecular Systematics* [M]. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Association, 1996.
- [18] 赖松家, 王 玲, 刘益平, 等. 中国部分牦牛品种线粒体 DNA 遗传多态性研究[J]. *遗传学报*, 2005, 32(5): 463-470.
- [19] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular Cloning: A laboratory manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [20] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [21] 《驯养动物的进化》翻译组. 驯养动物的进化[M]. 南京: 南京大学出版社, 1991.
- [22] GROVES C P. Systematic relationships in the *Bovini* (*Artiodactyla*; *Bovidae*) [J]. *Zeitschrift fuer Zoologische Systematik and Evolutionsforschung*, 1981, 19(4): 264-278.
- [23] Geraads D. Phylogenetic analysis of the tribe *Bovini* (*Mammalia*; *Artiodactyl*) [J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1992, 104: 193-207.
- [24] 王 玲. 中国牦牛线粒体 DNA 多态性及遗传分化研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2004.
- [25] MIYAMOTO M M, TANHAUSER S M, LAIPIS P J. Systematic relationship in the artiodactyls tribe *Bovini* (*family Bovidae*), as determined from mitochondrial DNA sequences [J]. *Systematic Zoology*, 1989, 38: 342-349.
- [26] KRAUS F, JARECKI L, MIYAMOTO M M, et al. Mispairing and compensational changes during the evolution of mitochondrial ribosomal RNA [J]. *Molecular and Biological Evolution*, 1992, 9(4): 770-774.
- [27] WARD T J, BIELAWSKI J P, DAVIS S K, et al. Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap [J]. *Animal Conservation*, 1999, 2: 51-57.
- [28] HASSANIN A, DOUZERY E J P. Evolutionary affinities of the enigmatic saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) in the context of the molecular phylogeny of *Bovidae* [J]. *Proceedings of Royal Society London*, 1999, 266(1 422): 893-900.
- [29] HASSANIN A, ROPIQUET A. Molecular phylogeny of the tribe *Bovini* (*Bovidae*, *Bovinae*) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937 [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33(3): 896-907.
- [30] JANECEK L L, HONEYCUTT R L, ADKINS R M, et al. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily *Bovinae* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 6: 107-119.
- [31] VERKAAR E L, NIJMAN I J, BEEKE M, et al. Maternal and paternal lineages in cross-breeding bovine species. Has Wisent a hybrid origin? [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21: 1 165-1 170.