

# 基于线粒体 Cyt *b* 和核基因 *ZFY* 探讨羊族物种之间的系统发生关系

朱睦楠 周材权\* 何娅 黄燕 路迪 曾小华

( 西华师范大学生命科学学院珍稀动植物研究所, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川省环境科学与生物多样性保护重点实验室, 四川 南充 637009 )

**摘要:** 为了阐明羊族物种之间的系统发生关系并解决岩羊属中矮岩羊物种的有效性问题, 本文测定了来自金沙江河谷地区栖息于林线以上岩羊和林线以下矮岩羊共 226 份粪便 DNA 样品的线粒体 Cyt *b* 基因全序列 (1 140 bp) 和核基因 *ZFY* 部分序列 (612 bp), 结合从 GenBank 中检索到的羊族物种同源 DNA 序列进行比较, 利用最大简约法和最大似然法构建分子系统发育树, 根据获得的拓扑结构初步探讨它们的系统进化关系。结果表明, 绵羊属的绵羊与山羊属、塔尔羊属、岩羊属各物种亲缘关系最远, 喜马拉雅塔尔羊和岩羊属、山羊属的亲缘关系最近。在进化树的岩羊属这一分支中, 金沙江河谷地带岩羊和矮岩羊与内蒙古、青海、四川其它地理种群的岩羊聚为一支, 同时分布在这一区域的部分岩羊和矮岩羊在 Cyt *b* 基因和 *ZFY* 基因单倍型上存在共享现象。历史上的气候事件可能造成金沙江河谷地带岩羊和矮岩羊种群之间相互迁移, 偏雄性扩散促进了各地理种群之间的基因交流。因此不支持矮岩羊为独立的物种, 建议将金沙江河谷地带的岩羊和矮岩羊都划分到岩羊四川亚种 (*Pseudois nayaur szechuanensis*)。由于它们的形态和生态上存在一定的分化, 建议将林线以下矮岩羊作为一个独立的管理单元进行保护与管理。

**关键词:** Cyt *b*; *ZFY*; 系统进化; 偏雄性扩散; 四川亚种

中图分类号: Q346.3

文献标识码: A

文章编号: 1000–1050 (2014) 04–0366–08

## Exploring the phylogenetic relationships among species of tribe caprini based on mitochondrial Cyt *b* and nuclear gene *ZFY*

ZHU Munan, ZHOU Caiquan\*, HE Ya, HUANG Yan, LU Di, ZENG Xiaohua

( Institute of Rare Animals and Plants, College of Life Sciences, China West Normal University, Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resource Conservation, Ministry of Education; Sichuan Provincial Key Laboratory of Environmental Science and Biodiversity Conservation, Nanchong 637009, China )

**Abstract:** To explore the phylogenetic relationships among tribe caprini and the species validity of *Pseudois schaeferi* in *Pseudois*, the total sequence of mitochondrial Cyt *b* (1140 bp) and partial sequence of the nuclear gene *ZFY* (612 bp) were detected in 226 fecal DNA samples of *Pseudois nayaur* and *Pseudois schaeferi* living above and below the forest line, respectively, in the valley area of the Jinsha River. These sequences were compared to the homologous DNA sequences of the tribe caprini retrieved from GenBank, then we reconstructed phylogenetic tree using maximum parsimony, maximum likelihood methods, primarily to investigate the phylogenetic relationship among these species based on obtained topological structure. The results showed that the kinship was the farthest between *Ovis* and other genera including *Capra*, *Pseudois* and *Hemitragus*. *Hemitragus jelahicus* was the nearest relative between *Pseudois* and *Capra*. *Pseudois nayaur* and the *Pseudois schaeferi* living in the valley area of Jinsha River are classified as the same branches as the *Pseudois nayaur* living in Inner Mongolia, Qinghai and Sichuan. They share the same haplotypes of Cyt *b* and *ZFY* with some *Pseudois nayaur* and *Pseudois schaeferi* living in the valley area of Jinsha River. The climatic events in history might lead to the intermigration of

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30570275); 四川省青年科技基金资助项目 (06ZQ026—025); 四川省教育厅预研资助项目 (2005C011); 四川省重点学科重点资助项目 (SZD0420)

**作者简介:** 朱睦楠 (1986–), 男, 硕士研究生, 主要从事脊椎动物保护与利用研究。

**收稿日期:** 2013–10–11; **修回日期:** 2014–06–23

\* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: drcqzhou1@163.com

*Pseudois nayaur* and *Pseudois schaeferi* living in the valley area of Jinsha River, and male-biased dispersal promoted the gene exchanges among different geographic populations. Thus, *Pseudois schaeferi* should not be classified as an independent species, we advise that *Pseudois nayaur* and *Pseudois schaeferi* living in the valley area of Jinsha River be classified as *Pseudois nayaur szechuanensis*. The dwarf *Pseudois nayaur* should be managed independently due to the distinctive evolutionary characteristics in morphology and ecology.

**Key words:** Cyt *b*; Male-biased dispersal; Phylogeny; *Pseudois nayaur szechuanensis*; ZFY

偶蹄目牛科羊亚科中的岩羊属、绵羊属和山羊属之间的系统起源问题一直存在着争议。李军祥 (1999) 通过染色体核型分析认为岩羊 (*Pseudois nayaur*) 和绵羊 (*Ovis aries*) 是由山羊 (*Capra hircus*) 进化而来, 但李志农 (1993) 认为山羊的野生祖先之一是岩羊。常宏 (1995) 发现岩羊和绵羊核型一致, 认为它们是近缘种。曹丽荣等 (2003) 根据线粒体 Cyt *b* 全序列的结果认为岩羊和山羊比绵羊、盘羊有着更近的亲缘关系。关于岩羊属、绵羊属、山羊属和塔尔羊属之间系统发生关系的问题目前尚无详细报道。

另外, 岩羊属中的矮岩羊的分类地位也一直存在着争议。Grove (1978) 运用形态比较的方法将矮岩羊划分为独立的种——*P. schaeferi*。但是近年来, Feng 等 (2001) 通过线粒体控制区和 Y 染色体上 ZFY 内含子部分碱基序列以及曹丽荣等 (2003) 利用线粒体 Cyt *b* 全序列分析, 都认为矮岩羊为岩羊的一个亚种; 周材权等 (2003)、Zeng 等 (2008) 分别利用线粒体 Cyt *b* 和控制区序列分析都不支持矮岩羊作为独立的种或亚种。然而在上述的研究中, 都没有把分布在相邻区域内的林线以上岩羊和林线以下矮岩羊一起进行对比研究, 因此, 上述研究结果中的遗传差异到底是物种内还是物种间的差异, 均需要进一步的深入分析。

以线粒体 DNA 和 Y 染色体上的基因作为遗传标记研究动物类群系统进化 (Irwin *et al.*, 1991; Cathey *et al.*, 1998), 它们既体现出各自独立遗传的一面又能体现出相互补充的一面。本文对金沙江河谷地区分布在林线以上的岩羊及分布在林线以下的矮岩羊线粒体 Cyt *b* 基因全序列和核基因 ZFY 部分序列进行测序, 所得序列与山羊属、绵羊属、塔尔羊属下各物种进行同源序列比较分析, 探讨这四属的系统起源进化和亲缘关系。同时根据这两个分子标记来进一步讨论岩羊属的矮岩羊物种有效性问题以及金沙江河谷地区分布的岩羊和矮岩羊的分类地位。

## 1 研究方法

### 1.1 样品收集和粪便 DNA 提取

2011 年 7 - 10 月沿金沙江河谷地带共收集到岩羊、矮岩羊新鲜粪便 226 份, 其中海拔 4 200 - 4 700 m 云南白马雪山自然保护区曲宗贡 (北纬 28°20', 东经 99°02') 岩羊粪便 45 份, 海拔 2 700 - 3 200 m 罗尼神山 (北纬 28°17', 东经 99°16') 矮岩羊粪便 60 份; 海拔 4 100 - 4 600 m 四川巴塘县措普沟 (北纬 30°30', 东经 99°33') 岩羊粪便 55 份, 海拔 2 600 - 3 100 m 四川竹巴笼自然保护区矮岩羊粪便 66 份。每份粪便样品分别保存在含有 5 mL 无水乙醇的 10 mL 试管中密封, 温室保存。利用 Qiagen Stool DNA 试剂盒 (Qiagen, Valencia, California, USA) 提取粪便样品 DNA, 4°C 保存。

### 1.2 引物设计与 PCR 扩增

#### 1.2.1 Cyt *b* 扩增

利用 Primer Primer v5.0 软件基于岩羊和矮岩羊近缘物种序列自主设计引物。Cyt *b* 基因全序列由 2 个片段分开测序后再拼接。第一个片段设计的引物为 (Cyt *b* - F1: 5' - TCTACCTCCTTGTCTTTC - 3', Cyt *b* - R1: 5' - CTATGAATGCTGTGGCTA - 3'); 第二个片段设计的引物为 (Cyt *b* - F2: 5' - CTATGGCTGAATTATCCG - 3', Cyt *b* - R2: 5' - AAGTGGGAAGTCTGTGTT - 3')。扩增反应体系为 50  $\mu$ L 体系。其中包括 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 250  $\mu$ mol/L dNTPs, 1 U Taq 酶 (Tiangen, Beijing), 0.2  $\mu$ mol/L 引物, 1  $\mu$ g 小牛血清, 约为 15 ng 的 DNA。反应程序: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 58°C 复性 30 s, 72°C 延伸 1 min, 进行 40 个循环。PCR 扩增产物分别为 1 100 bp 和 500 bp 左右, 直接 4°C 保存。

#### 1.2.2 ZFY 扩增

第一次扩增:

参考羊亚科动物 ZFY 通用引物: 正向引物为

(2F2F: 5' AAG ACC TGA TTC CAG GCA GTA 3')。反向引物为 (UEA-ZFYR 5' CTT CTT ATT GGT AGT GTA ATC ACA A) (Lawson *et al.*, 2002)。扩增反应体系为 50  $\mu$ L 体系。其中包括 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 250  $\mu$ mol/L dNTPs, 1U Taq 酶 (Tiagen, Beijing), 0.2  $\mu$ mol/L 引物, 1  $\mu$ g 小牛血清, 约为 15 ng 的 DNA。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 49 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 40 个循环。PCR 产物大小约为 1 000 bp, 直接 4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 第二次扩增:

利用 Primer Primer v5.0 软件根据羊亚科其他物种已知序列自主设计而成, 扩增引物: ZFY-PA: 5' ATT CCG TAA AGG TGT TGT 3'; ZTY-PB: 5' AAG ATC AGT TGT CAT CTC 3'。除 DNA 模板用 ZFY 第一次扩增产物 1 $\mu$ L, 及退火温度为 57 $^{\circ}$ C 外, 其余反应条件和过程均与第一次扩增一致。PCR 产物大小约为 650 bp, 直接 4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.3 PCR 产物纯化与目的片段的测序

为了保证 Cyt *b* 和 ZFY 序列扩增的准确性, PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 将未能扩增的样品进行重复实验一次。PCR 产物纯化

试剂盒 (上海生工) 纯化产物, 然后将 PCR 产物送到上海 Invitrogen 公司进行测序。

#### 1.4 数据处理

将所测 DNA 序列在 Genbank 数据库中进行 BLAST 比较, 以确保粪便样品与目标物种一致。测得的序列用 Seqman 和 EdiSeq (DNASTAR, Lasergene v 7.1) 软件进行拼接和校正。用 Clustal X 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) 软件结合从 GenBank 上检索到的山羊属、绵羊属、塔尔羊属下各物种序列 (表 1) 及其它地理种群的岩羊序列 (表 2) 分析对比, 用 MEGA v 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) 的 Kimura 双参数模型 (Kimura *et al.*, 1980) 计算单元型之间的遗传距离。利用 PAUP v 4.0b 软件 (Swofford *et al.*, 2000) 完成对系统发生树的构建。最佳 DNA 进化替代模型由 Modeltest 3.06 (Posada *et al.*, 1998) 得出: 基于 Cyt *b* 标记基因的最佳模型选择 Akaike information criterion (AIC) 的 TVM + I + G 和 ZFY 标记基因最佳模型 AIC 中的 HKY + I。以牛 (*Bos taurus*) 作为外群, 采用最大简约法 (Maximum parsimony) 和最大似然法 (Maximum likelihood) 构建单元型之间的系统发生树。MP 和 ML 以启发式搜索, 聚类树中节点处的置信度用 1 000 次自举法 (Bootstrap) 来完成。

表 1 本文中涉及到的各物种 Cyt *b* 和 ZFY 序列

Table 1 The sequences of Cyt *b* and ZFY different species

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
	Cyt <i>b</i>	ZFY
东高加索羴羊 <i>Capra cylindricornis</i>	AF034737 (1)	AY082497 (4)
捻角山羊 <i>C. falconeri</i>	AB044309 (2)	AY082499 (4)
山羊 <i>C. hircus</i>	AB044308 (2)	AY082496 (4)
北山羊 <i>C. ibex</i>	AF034735 (3)	AY082501 (4)
云山羊 <i>C. nubiana</i>	AF034740 (1)	A 08 502 (4)
野山羊 <i>C. aegagrus</i>	DQ514541 (4)	AY082495 (4)
绵羊 <i>Ovis aries</i>	FR873153 (5)	AF241272 (6)
喜马拉雅塔尔羊 <i>Hemitragus jemlahicus</i>	AF034733 (1)	AY082510 (4)
牛 <i>Bos taurus</i>	EU807948 (1)	AF241271 (6)
岩羊 <i>Pseudois nayaur</i>	KC309399, KC309400 (7)	KC503913 (7)
矮岩羊 <i>P. sceaferi</i>	KC309402, KC309403 (7)	KC503913 (7)

(1) Hassanin *et al.* (1998) (2) Mannen *et al.* (2001) (3) Manceau *et al.* (1999a) (4) Pidancier *et al.* (2006) (5) Barbanera *et al.* (2012) (6) Lawson *et al.* (2002) (7) 新样品 (New samples)

## 2 结果

### 2.1 Cyt *b* 和 ZFY 序列

从所收集的岩羊和矮岩羊 226 份粪便样品中成

功扩增出 169 份线粒体 Cyt *b* 基因序列和 46 份 ZFY 基因序列。从所测的样品中, 经拼接和去掉不明确的片段得到线粒体 Cyt *b* 基因全序列为 1 140 bp; 部分 ZFY 基因序列为 612 bp, 将所有 DNA 序列在

表 2 其它岩羊地理种群的 Cyt b 序列信息

Table 2 The Cyt b gene sequences of other geographic populations of *Pseudois nayaur*

地理种群 Geographic group	采样地点 Geographic origin	单倍型编号 Haplotypes	GenBank 登录号 GenBank accession no.
内蒙古 Neimenggu	阿拉善左旗 Alxa Zuoqi	ALS	EU571713 (1)
宁夏 Ningxia	西夏区 Xixia District	XX	EU571712 (1)
	平罗县 Pingluo County	PL	JQ406567 (1)
	贺兰山 Helan Mountain	HLS	AF493575 (1)
四川 Sichuan	阿坝地区 Aba County	AB	JQ406566 (1)
	木里县 Muli County	ML	AF398368 (2)
	石渠县 Shiqu County	SQ	AF398367 (2)
	石棉县 Shimian County	SM	AF398366 (2)
青海 Qinghai	玛多县 Maduo County	MD1/MD2/MD3	JQ406556 - JQ406558 (1)
	玉树县 Yushu County	YS	AF475608 (3)

(1) 李楠楠等 (2012) (2) 周材权等 (2003) (3) 曹丽荣等 (2004)

Genbank 中进行 BLAST 比对, 所有序列都来自岩羊或矮岩羊, 包括成功扩增出线粒体 Cyt b 基因的云南白马雪山自然保护区岩羊样品 26 份、罗尼神山矮岩羊样品 45 份, 四川巴塘措普沟岩羊样品 50 份、竹巴笼自然保护区矮岩羊样品 48 份。在所有

线粒体 Cyt b 中, 共定义了 4 个单倍型 (措普沟单倍型 P1, 竹巴笼单倍型 P2, 罗尼神山单倍型 P3, 曲宗贡单倍型 P2、P4), 含有 29 个多态位点, 20 个简约信息位点。ZFY 单倍型仅一种 (4 个地理种群单倍型为 Py)。

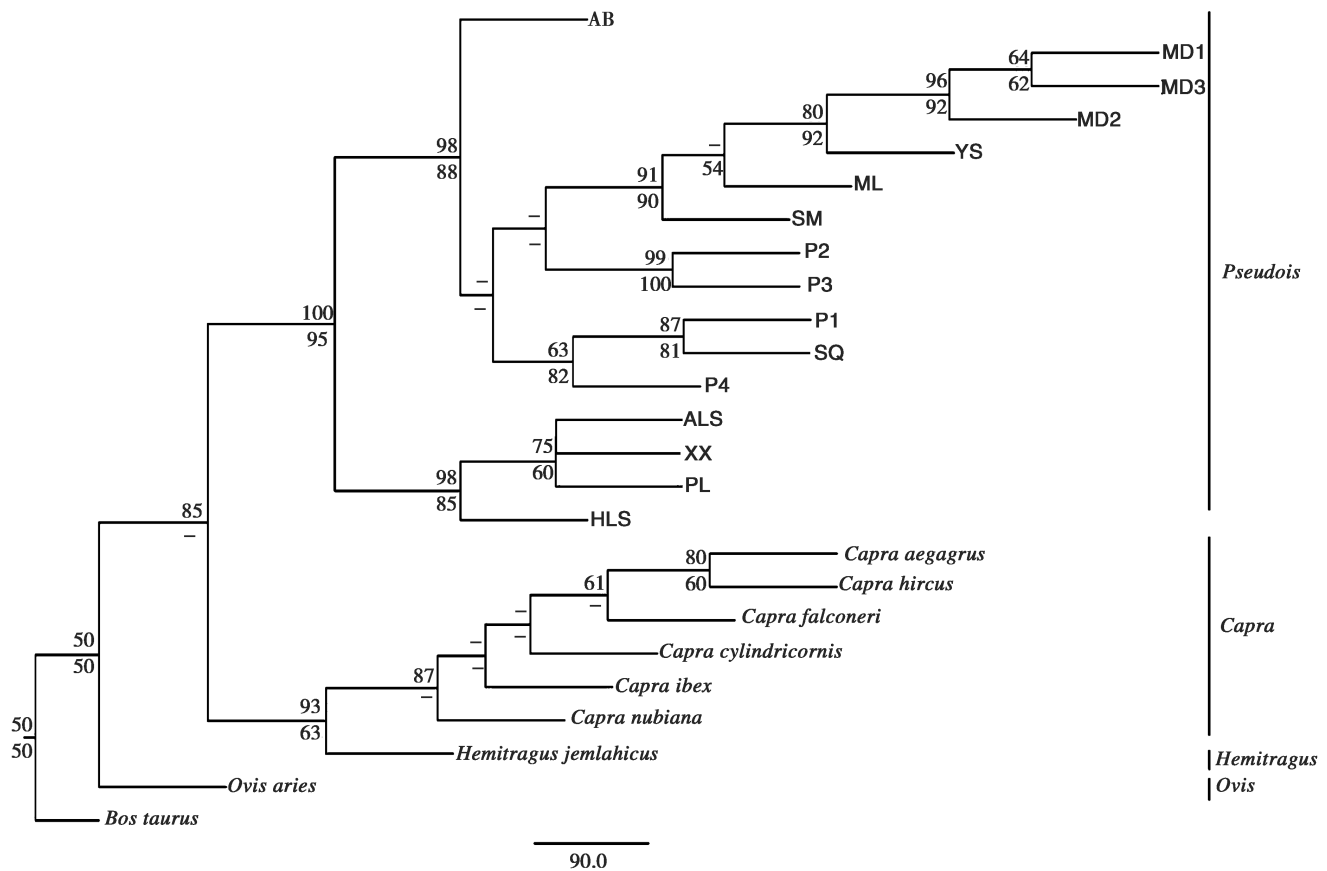


图 1 基于 1140 bp Cyt b 利用 ML 和 MP 分析构建的进化树, 牛 (*Bos taurus*) 作为外群, 节点值分别对应 ML (线上) 和 MP (线下) 的 bootstrap 值, - 表示小于 50 bootstrap

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed with Cyt b gene (1 140 bp) using Maximum Likelihood and Maximum Parsimony analyses. *Bos taurus* was used as an out-group. Nodes are numbered with bootstrap of ML (above the line) and MP (below the line) respectively. A ‘-’ indicates that the value is less than 50 bootstrap

羊族各物种基于线粒体 Cyt *b* 基因序列的 Kimura 双参数距离中, 金沙江岩羊与矮岩羊之间的遗传距离为 0.022 - 0.015; 山羊属各物种之间的遗传距离为 0.054 - 0.033。基于 *ZFY* 基因序列的 Kimura 双参数距离中, 金沙江岩羊与矮岩羊之间的遗传距离为 0; 山羊属各物种之间的遗传距离为 0.007 - 0.002。

## 2.2 羊族四属的系统发育关系及岩羊和矮岩羊之间的关系

经 MP 和 ML 两种系统发育树比较发现, 基于线粒体和性染色体遗传标记所构成的系统进化树拓扑结构基本相似 (图 1, 图 2), 都由两个主要分

支构成: 山羊属、岩羊属和塔尔羊属聚为一支, 绵羊属单独为一支。塔尔羊属在母系系统进化树 (Cyt *b*) 中 (图 1) 和山羊属聚为一支, 但是在父系系统进化树 (*ZFY*) 中却和岩羊属聚为一支。在岩羊属中, 来自内蒙古、青海、四川其它地理种群的岩羊与金沙江河谷地带的岩羊和矮岩羊聚为一支。在所收集的这些粪便样品中, 云南白马雪山自然保护区曲宗贡的部分岩羊样品和四川巴塘县竹巴笼全部矮岩羊样品在 Cyt *b* 单倍型上完全共享, 在金沙江河谷地带全部采样地点的岩羊和矮岩羊种群在 *ZFY* 单倍型上都完全共享。

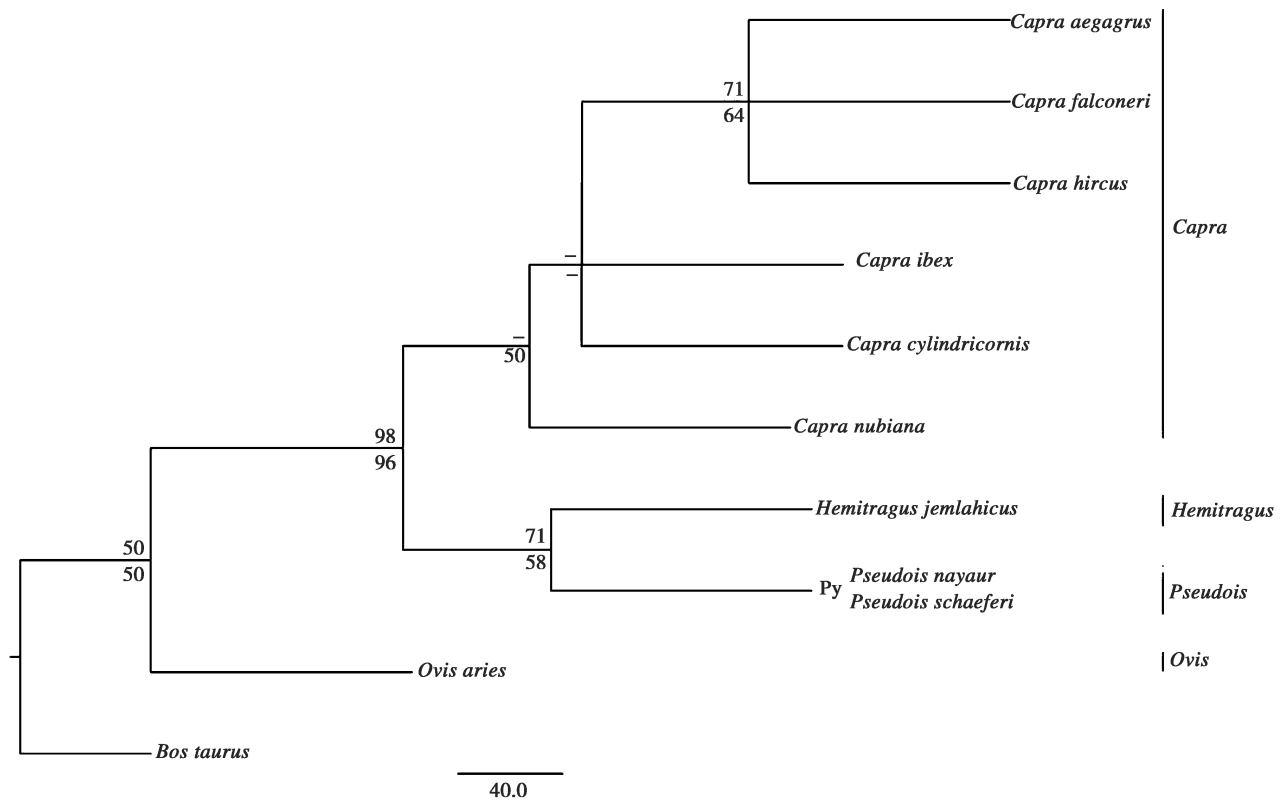


图 2 基于 612 bp *ZFY* 利用 ML 和 MP 分析构建的进化树, 牛 (*Bos taurus*) 作为外群, 节点值分别对应 ML (线上) 和 MP (线下), - 表示小于 50 bootstrap

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed with *ZFY* gene (612 bp) using Maximum Likelihood and Maximum Parsimony analyses. *Bos taurus* was used as an out-group. Nodes are numbered with bootstrap of ML (above the line) and MP (below the line) respectively. A '-' indicates that the value is less than 50 bootstrap

## 3 讨论

### 3.1 利用粪便样品获取较大片段分子序列的可行性

由于食草动物粪便中存在大量植物多糖和其它杂质, 容易引起 DNA 降解和对 PCR 反应有抑制作用 (赵健元等, 2008)。在利用粪便 DNA 扩增线

粒体基因时, 采取分段扩增比直接扩增 Cyt *b* 全序列效果好, 再将分段序列拼接以达到提高获取目的片段的效率和准确性。

针对粪便 DNA 中获取核基因片段, Zeng 等 (2009) 认为核基因的拷贝数远低于线粒体基因拷贝数, 加上其它背景 DNA 的干扰, 造成动物核基因浓度偏低, 直接扩增 *ZFY* 基因内含子较大片段

是很难实现的。为了解决这一难题，本文以粪便 DNA 为模板，先以引物 (2F2F, UEA-ZFYR) 参与 PCR 反应，退火温度降低到 49°C 有利于复性。将 PCR 产物作为模板，后以引物 (ZFY-PA, ZFY-PB) 参与 PCR 反应，退火温度升高到 57°C 有利于提高产物特异性，产物经过凝胶电泳后如果能观察到大约 650 bp 的目的条带说明扩增成功，未能扩增出的样品进行重复实验一次，如果依然未能扩出则可放弃。

通过两次扩增的方法，可以将目的片段拷贝数逐次放大，这样利用所获取的较大片段分子序列作为评估种群的遗传结构，为制定物种保护方案提供有效的依据，同时获取的 ZFY 片段能为物种间线粒体基因作为遗传标记的母系遗传分子系统发生关系提供父系遗传的对比和补充。

### 3.2 羊族四属的系统进化关系

根据 Cyt *b* 和 ZFY 分子遗传标记构建的系统发育树结果都支持羊族的 4 个属主要分为两大分支：山羊属、岩羊属和塔尔羊属聚为一支，绵羊属单独为一支，因此绵羊属的物种与其它 3 个属各物种亲缘关系最远。岩羊属、山羊属和塔尔羊属之间的亲缘关系存在分歧：(1) 基于 Cyt *b* 构建的系统发育树表明，山羊属和塔尔羊属聚为一支，但是基于 ZFY 构建的系统发育树上岩羊属和塔尔羊属聚为一支。对共同祖先多态性的选择保留和各物种祖先之间偶然的杂交现象都可以解释导致喜马拉雅塔尔羊 (*Hemitragus jelahicus*) 在羊族母系和父系进化树的划分差异。从羊族母系和父系进化树上共同显示岩羊属、山羊属和塔尔羊属的喜马拉雅塔尔羊都存在一个共同的祖先。另外，最近的研究表明杂交在动物进化上同样扮演着重要的角色 (Allendorf *et al.*, 2001; Hosken *et al.*, 2002)。山羊属的祖先最早出现在中亚地区 (Cregut-Bonnoure, 1992)，岩羊属的祖先最早发源于青藏高原 (Deng *et al.*, 2011)，它们之间的栖息地可能存在交叉重叠。推测喜马拉雅塔尔羊可能是生活在同一区域的山羊属祖先和岩羊属祖先偶然杂交而保留下来的后代。Ropiquet 等 (2005) 利用线粒体基因 (Cytochrome oxidase 2, Cytochrome *b*, 12S rRNA) 和核基因 (Protein Kinase C *iota*) 构建的系统发育树认为塔尔羊属为多系起源：喜马拉雅塔尔羊和山羊 (*Capra*) 相关联；巨角塔尔羊 (*H. hylocrius*) 和绵羊 (*Ovis*) 互

为姊妹群；阿拉伯塔尔羊 (*H. jayakari*) 和蛮羊 (*Ammotragus lervia*) 划分在同一支。由于从 GenBank 上未能获得关于塔尔羊属另外两个物种 ZFY 分子数据，因此无法比较塔尔羊属这两个标记基因间渐渗速率大小。根据上述推测，喜马拉雅塔尔羊和岩羊属、山羊属亲缘关系平行或位于这两者之间都有可能存在。

### 3.3 金沙江河谷地带岩羊和矮岩羊的分类地位

Allen (1940) 在野外通过长期的观察发现矮岩羊主要生活在林线以下，森林和林线以上未发现其分布。Groves (1978) 通过形态学的方法比较矮岩羊和岩羊，确认矮岩羊为岩羊属中的一个新物种——*P. schaeferi*。本研究根据母系分子遗传标记发现：云南曲宗贡的部分岩羊和四川竹巴笼的矮岩羊在线粒体 Cyt *b* 单倍型上有共享现象。造成近缘种间 mtDNA 共享主要有两个原因：(1) 对祖先多态性的保留 (Jaramillo-Correa *et al.*, 2008)，这种单倍型的共享在种间是随机分布的；(2) 同域或邻域分布的近缘物种容易产生渐渗 (Petit and Excoffier, 2009)。许多研究表明生活在同一区域或相邻区域的近缘物种，如果线粒体基因发生渐渗共享现象，其核基因标记在这两个近缘物种之间会存在差异 (Melo-Ferreira *et al.*, 2005; Berthier *et al.*, 2006)。以这两种假说解释岩羊和矮岩羊作为近缘物种相对立的证据是：(1) 从 GenBank 上收集的其它地理种群岩羊 Cyt *b* 序列都未能与金沙江的岩羊属动物 Cyt *b* 序列存在共享；(2) Feng 等 (2001) 从中国青海省都兰县、甘肃省肃北县的岩羊以及四川竹巴笼的矮岩羊样品中发现，除一个矮岩羊与岩羊在 ZFY 基因内含子序列相同外，其余样品都有差异。距离跨度较大的地理种群之间经过长期地理隔离，可能是造成 ZFY 基因内含子上积累变异的主要原因。但是对于分布在金沙江流域距离较近的这 4 个地理种群之间没有产生分化，均共享 Py 这一种单倍型。同时根据线粒体 Cyt *b* 基因序列计算的 Kimura 双参数距离，岩羊与矮岩羊之间的遗传距离 (0.022 - 0.015) 远低于山羊属各物种之间的遗传距离 (0.054 - 0.033)。金沙江河谷地带分布的岩羊和矮岩羊是同一个物种。气候事件 (Hewitt, 1996, 2000, 2004) 对金沙江河谷地区的岩羊迁移有显著影响，偏雄性扩散促进了各地理种群之间的基因交流，造成了现今各地理种群之间的分布

格局。

Zeng 等 (2008) 利用线粒体 Cyt *b* 和控制区做分子标记对中国岩羊不同地理种群的研究认为,除了现存的西藏亚种 (*P. n. nayaur*)、四川亚种 (*P. n. szechuanensis*) 外,贺兰山的岩羊很可能成为岩羊的第三个亚种。结合本文通过线粒体 Cyt *b* 构建的系统进化树,建议将金沙江河谷地带的岩羊和矮岩羊划分到四川亚种中。由于它们在形态上和生态上有一定的分化现象,在保护管理中,建议将矮岩羊作为一个独立的管理单元进行保护和管理。

**致谢:** 感谢云南白马雪山自然保护区和四川巴塘县竹芭笼保护区对本研究的大力支持,以及保护站上鲁斤品初、伍家德等同志对收集样品的帮助。

#### 参考文献:

- Allen G H. 1940. The mammals of China and Mongolia. *Natural History of Central Asia*, **11** (2): 1268 - 1275.
- Allendorf F W, Leary R F, Spruell P, Wenburg J K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol*, **16**: 613 - 622.
- Barbanera F, Guerrini M, Beccani C, Foreina G, Anayiotos P, Panayides P. 2012. Conservation of endemic and threatened wildlife: molecular forensic DNA against poaching of the Cypriot mouflon (*Ovis orientalis ophion*, Bovidae). *Forensic Science International: Genetics*, **6**: 671 - 675.
- Berthier P, Excoffier L, Rueli M. 2006. Recurrent replacement of mtDNA and cryptic hybridization between two sibling bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii*. *Proceedings of the Royal Society B*, **273**: 3101 - 3109.
- Cao L R, Wang X M, Fang S G. 2003. A molecular phylogeny of bharal and dwarf blue sheep based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Acta Zoologica Sinica*, **49**: 198 - 204. (in Chinese)
- Cao L R, Wang X M, Rao G, Wan Q H, Fang S G. 2004. The phylogenetic relationship among goat, sheep and bharal based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Acta Theriologica Sinica*, **24** (2): 109 - 114. (in Chinese)
- Cathey J C, Bickham J W, Patton J C. 1998. Introgressive hybridization and nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in North American deer. *Evolution*, **52**: 1224 - 1229.
- Chang H. 1995. Compendium of Livestock Genetic Resources. Beijing: China Agriculture Press, 67 - 68. (in Chinese)
- Cregut-Bonnoure E. 1992. Dynamics of bovid migration in Western Europe during the middle and late Pleistocene. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, **153**: 177 - 185.
- Deng T, Wang X M, Fortelius M, Li Q, Wang Y J, Tseng Z T, Takeuchi G E, Saylor J K, Säilä L, Xie G P. 2011. Out of Tibet: pliocene woolly rhino suggests High-Plateau Origin of Ice Age Megaherbivores. *Science*, **333**: 1285 - 1288.
- Feng J, Lajia C, Taylor D J, Webster M S. 2001. Genetic distinctiveness of endangered dwarf blue sheep (*Pseudois nayaur schaeferi*): evidence from mitochondrial control region and Y-linked ZFY intron sequences. *Journal of Heredity*, **92**: 9 - 15.
- Groves C P. 1978. The taxonomic status of the dwarf blue sheep (Artiodactyla: Bovidae). *Saugetierk Mitt*, **26**: 177 - 183.
- Hassanin A, Pasquet A, Vigne J D. 1998. Molecular systematics of the subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as determined from cytochrome *b* sequences. *J Mammal Evol*, **5**: 217 - 236.
- Hewitt G M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **359**: 183 - 195.
- Hewitt G M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**: 907 - 913.
- Hewitt G M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and Speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**: 247 - 276.
- Hosken D J, Balloux F. 2002. Thirty years of evolution in Darwin's Wnches. *Trends Ecol Evol*, **17**: 447 - 448.
- Irwin D M, Koehler T D, Wilson A C. 1991. Evolution of cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol*, **32**: 128 - 144.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111 - 120.
- Lawson L J, Hewitt G M. 2002. Comparison of substitution rates in ZFX and ZFY introns of sheep and goat related species supports the hypothesis of male-biased mutation rates. *Journal of Molecular Evolution*, **54**: 54 - 61.
- Li J X. 1999. The chromosome of blue sheep research. *Gansu Animal and Veterinary Sciences*, **29** (11): 5632 - 5640. (in Chinese)
- Li N N, Liu Z S, Wang Z H, Huang L. 2012. Genetic diversity based on cytochrome *b* gene analysis of different geographic populations of blue sheep in China. *Acta Ecologica Sinica*, **32** (8): 2381 - 2389. (in Chinese)
- Liu G K, Zhou C Q, Yang Z S, Long S, Pan L, Zeng G W, Li K J, Tang L. 2010. Comparative study on group characteristics of dwarf blue sheep (*Pseudois schaeferi*) in spring and winter. *Acta Ecologica Sinica*, **30** (9): 2484 - 2490. (in Chinese)
- Mannen H, Nagata Y, Tsujii S. 2001. Mitochondrial DNA reveal that domestic goat (*Capra hircus*) are genetically affected by two subspecies of bezoar (*Capra aegagurus*). *Biochem Genet*, **39**: 145 - 154.
- Manceau V, Crampe J P, Boursot P, Taberlet P. 1999 a. Identification of evolutionary significant units in the Spanish wild goat, *Capra pyrenaica* (Mammalia, Artiodactyla). *Anim Conserv*, **2**: 33 - 39.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves P C. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare

- species in northern Iberia. *Molecular Ecology*, **14**: 2459 - 2464.
- Petit R J, Excoffier L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*, **24**: 386 - 393.
- Pidancier N, Jordan S, Luikart G, Taberlet P. 2006. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**: 739 - 749.
- Posada D, Crandall K A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817 - 818.
- Ropiquet A, Hassanin A. 2005. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**: 154 - 168.
- Swofford D L. 2000. PAUP, phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596 - 1599.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876 - 4882.
- Wang Y, Wang X M. 2003. Population ecology of dwarf blue sheep (*Pseudois schaeferi*). *Biodiversity Science*, **11** (1): 59 - 62.
- Zeng B, Xu L, Yue B S, Li Z J, Zou F D. 2008. Molecular phylogeography and genetic differentiation of blue sheep *Pseudois nayaur szechuanensis* and *Pseudois schaeferi* in China. *Molecular Phylogenetics Evolution*, **48**: 387 - 395.
- Zhao J Y, Li J H. 2008. Analysis of factors affecting DNA extracting from mammalian faecal samples. *Journal of Biology*, **25** (3): 5 - 8. (in Chinese)
- Zhou C Q, Zhou K Y, Hu J C. 2003. The validity of the dwarf bharal (*Pseudois schaeferi*) species status inferred from mitochondrial Cyt *b* gene. *Acta Zoologica Sinica*, **49**: 578 - 584. (in Chinese)
- 常宏. 1995. 家畜遗传资源学纲要. 北京: 中国农业出版社, 67 - 68.
- 曹丽荣, 王小明, 饶刚, 万秋红, 方盛国. 2004. 从细胞色素 *b* 基因全序列分析岩羊和山羊、绵羊的系统发生关系. 兽类学报, **24** (2): 109 - 114.
- 曹丽荣, 王小明, 方盛国. 2003. 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. 动物学报, **49**: 198 - 204.
- 李军祥. 1999. 岩羊染色体核型研究. 甘肃畜牧兽医, **29** (4): 13 - 15.
- 李楠楠, 刘振生, 王正寰, 黄丽红. 2012. 基于细胞色素 *b* 基因的中国岩羊不同地理种群遗传差异分析. 生态学报, **32** (8): 2381 - 2389.
- 李志农. 1993. 中国养羊学. 北京: 农业出版社.
- 刘国库, 周材权, 杨志松, 龙帅, 潘立, 曾国伟, 李开俊, 唐伦. 2010. 冬春季矮岩羊集群特征比较. 生态学报, **30** (9): 2484 - 2490.
- 王涪, 王小明. 2003. 矮岩羊种群生态的初步研究. 生物多样性, **11** (1): 59 - 62.
- 赵健元, 李进华. 2008. 对影响哺乳动物粪便 DNA 提取相关因素的探讨. 生物学杂志, **25** (3): 5 - 8.
- 周材权, 周开亚, 胡锦鑫. 2003. 从线粒体细胞色素 *b* 基因探讨矮岩羊物种地位的有效性. 动物学报, **49**: 578 - 584.