

致谢

三年的硕士研究生生活即将结束，在这美丽的西子湖畔，我要感谢三年里所有指导、关心、帮助过我的老师、同学和朋友们。

本论文是在我的导师方盛国教授悉心指导下完成的。从论文设计、实验研究、到论文撰写的每一环节都凝聚着导师的心血和智慧。导师严谨求是的治学风格、兢兢业业的敬业精神、对科学前沿的敏锐洞察以及宽厚包容的胸襟、正直善良的为人给我留下了深刻的印象，使我深受裨益。三年来，导师指导我的学业，传授我做人的道理，关心我的生活，我的成长处处凝结着导师的心血，这些将激励我在科研道路上不断奋发向上。在论文完成之际，谨向恩师致以最诚挚的谢意和最衷心的祝愿！

其次要特别感谢中国科学院动物研究所李明研究员在论文期间给予我悉心的指导！

感谢本实验室里朝夕相处的老师和同学，他们是席咏梅、万秋红、葛云法、蒋萍萍、徐艳春、吴华、章金涛、吴海龙、贺培建、何陆平、曾长军、张蓓、林岁羽、许强华、朱亮、潘慧娟、陈笑、Chris Wood、饶刚、郑桦锐、杨菲、郎秋蕾、陈浩、杜波、许黎美、曹丽荣、戴捷以及其他一些同学，他们在实验工作以及学习、生活中给予我很多关心和帮助，大家共同创造了良好的环境和融洽的气氛，使我度过一段难忘的时光。

还要感谢植物系统进化研究室的邱英雄、陈士超、孔航辉给予我学业上的指导和启迪！

致谢本实验室徐艳春博士后提供黄羊样品！

最后，感谢我的家人和女儿海豚给我精神上的慰藉，使我顺利完成毕业论文！

本项目由国家林业局保护司研究基金资助。

浙江大学生命科学学院

濒危野生动物保护遗传和繁殖生物学教育部重点实验室

国家濒危野生动植物种质基因保护中心

王 江

2004年5月

原羚属(*Artiodactyla*, *Bovidae*, *Antilopinae*, *Procapra*)及羚羊亚科属间系统发育关系研究

摘要

本文对 3 个四川藏原羚(*Procapra picticaudata*)、2 个斑羚 (*Capricornis crispus*) 和 5 个鬣羚 (*Nemorhaedus caudatus*), 以及 3 个内蒙古黄羊(*Procapra gutturosa*)进行了细胞色素 b 基因全序列 (1140bp) 测定。利用这些测序结果, 并结合从 Genbank 获取的牛科其它 31 个种, 进行了同源比较, 以分析它们碱基组成变异情况及核苷酸序列差异。

用简约法 (MP) 邻近法 (NJ) 和似然法 (ML) 构建分子系统树。结果表明:

1. 黄羊和藏原羚的序列差异为 3.78%, 颠换数目近乎为 0, 其突变远未饱和; 原羚属属内黄羊和藏原羚为同属不同种, 单系发生; 根据序列差异值 2%/百万年的细胞色素 b 分子钟, 推测黄羊和藏原羚分歧时间大约为 1~2 百万年。

2. 原羚属与羚羊亚科赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等并系发生, 起源于共同祖先、为羚羊亚科下的姊妹群。原羚属为羚羊亚科独立属; 羚羊亚科组成属间除印度羚属和羚羊属 (仅 NJ、ML 树) 单系起源外, 其余为并系起源。根据序列差异值 2%/百万年的细胞色素 b 分子钟, 原羚属与赛加羚羊属的分歧时间大约在 5.7~6.3 百万年之间、与犬羚属的分歧时间大约在 6.1~7.2 百万年之间、与羚羊属的分歧时间大约在 6.4~7.1 百万年之间、与跳羚属的分歧时间大约在 6.2~6.8 百万年之间。此外, 原羚属与亲缘关系较远的岛羚属、藏羚属和山羚属之间的分歧时间大约在 7~8 百万年。

关键词: 羚羊亚科; 原羚属; 细胞色素 b; 系统发育树

**A Molecular phylogenetic study on the relationships inter
species in *Procapra* and inter genus in
Antilopinae(Artiodactyla, Bovidae)**

ABSTRACT

Thirteen samples total DNA was extracted and Cyt b complete gene was sequenced from three muscle samples of Mongolian gazella from Mongolian ; three dried skin samples of Tibetan gazelle, five dried skin samples of Serow and two dried skin samples of Goral from Sichuan in China. By comparing the Cyt b complete gene of three samples of Tibetan gazelle, three samples of Mongolian gazella, a sample of Serow, a sample of Goral and 31 species(33 samples) from Genbank in the family Bovidae, the divergences, base composition and base substitutions among these sequences were analyzed.

The phylogenetic trees constructed by most parsimonious(MP), neighbor-joining(NJ) and (ML) methods. Our study demonstrate:

(1) The Mongolian gazella(*Procapra gutturosa*) and Tibetan gazelle(*Procapra picticaudata*) have the close affinity. They occupied a basal position in the Antilopinae. They belong to a single genus, *Procapra*. The *Procapra* is monophyletic in all analyses (MP, NJ and ML phylogenetic trees). The divergences of Mongolian gazella and Tibetan gazelle sequences were 3.78%. Their Saturation Level is more lower. In accordances to the Cyt b molecular clock (2%/million year) , we postulated the approximate divergence time is 1~2 million years between the Mongolian gazelle and Tibetan gazelle.

(2) The *Procapra* and the *Madoqua*, the *Saiga*, the *Antidorcas* are Paraphyletic. They are sister group in the Antilopinae. The *Procapra* is a single genus in the

Antilopinae. Except for the *Antelope* and the *Gazella*, the component *Genera* of Antilopinae are never monophyletic, they are Paraphyletic. The divergence times with clades was postulated in accordances to the Cyt b molecular clock (2%/million year), which estimated an approximate divergence time between the *Procapra* and the *Saiga* of 5.7~6.3 million years, the *Procapra* and the *Madoqua* of 6.1~7.2 million years, the *Procapra* and the *Gazella* of Antilopinae of 6.4~7.1 million years, the *Procapra* and the *Antidorcas* of 6.2~6.8 million years, the *Procapra* and others Genus (*Neotragus*, *Oreotragus*, *Pantholops*) of Antilopinae of 7~8 million years.

Key word: Antilopinae; *Procapra*; Cytochrome b; phylogenetic tree

第一部分 前言

1. 原羚属物种的生物学研究概况

原羚属 (*Procapra*) 动物包括普氏原羚 (*P.przewalskii*)、黄羊 (*P.gutturosa*) 和藏原羚 (*P.picticaudata*)。分布于中国、蒙古、锡金和俄罗斯, 其中普氏原羚为我国特有种, 目前仅栖息于青海湖地区 (蒋志刚等, 2003)。原羚属隶属于牛科羚羊亚科, 其地理分布呈现明显的系统替代现象 (王宗炜等, 1963)。黄羊是东蒙草原的典型代表; 普氏原羚是荒漠与高原过渡地带种类; 而藏原羚则生活于青藏高原的草甸。

1.1 生态学研究

对黄羊的生态学研究已有较多报道。张自学等 (1995) 和金昆等 (1997) 报道了黄羊在中国和世界分布历史的变迁及其种群数量变化。孙静萍等 (1996)、高中信等 (1996a, 1996b) 和 关中明等 (1999) 详细报道了黄羊的集群行为、社群行为、迁徙行为和黄羊对栖息生境的选择。高中信等 (1995) 对黄羊的食性作了研究。李俊生等 (2000a) 评价了黄羊的主要饲料植物和食物营养质量, 并就呼伦贝尔草原地区黄羊肾脏重量和肾脏中心脂肪指数的变化进行了研究, 初步评价了不同年龄、不同性别组以及不同季节黄羊体况的差异 (李俊生等, 2001a)。赵肯堂 (1982) 根据黄羊角年环外形特征、牙龄生长状况和磨损程度, 报道了黄羊年龄的鉴定方法。姜兆文等 (1995) 利用显微鉴定的方法, 对赵肯堂 (1982) 的黄羊年龄鉴定方法作了校正。肖前柱等 (1982) 和姜兆文等 (1993) 根据两种不同的年龄鉴定方法, 分别对黄羊种群结构、种群年龄结构、性比及种群动态趋势作了预测, 并编制了黄羊的静态生命表。

从1994年开始, 蒋志刚等利用航片、GM卫星照片、GIS模型、生境适宜度模型、种群生存力模型等系统地监测了青海湖地区普氏原羚种群动态。并就人类活动、土地覆盖变化以及草地初级生产对普氏原羚种群生存力的影响; 普氏原羚栖息地选择、生境适宜度和活动规律; 普氏原羚生境中的食物网; 普氏原羚采食对策及其与绵羊的食物竞争问题; 狼捕食对普氏原羚生存的影响; 草原围栏与普氏原羚保护、草原生物多样性保护及普氏原羚社群行为和群体结构的时空动态等等, 进行了系统研究 (蒋志刚等, 2003)。

第一部分 前言

1. 原羚属物种的生物学研究概况

原羚属 (*Procapra*) 动物包括普氏原羚 (*P.przewalskii*)、黄羊 (*P.gutturosa*) 和藏原羚 (*P.picticaudata*)。分布于中国、蒙古、锡金和俄罗斯, 其中普氏原羚为我国特有种, 目前仅栖息于青海湖地区 (蒋志刚等, 2003)。原羚属隶属于牛科羚羊亚科, 其地理分布呈现明显的系统替代现象 (王宗炜等, 1963)。黄羊是东蒙草原的典型代表; 普氏原羚是荒漠与高原过渡地带种类; 而藏原羚则生活于青藏高原的草甸。

1.1 生态学研究

对黄羊的生态学研究已有较多报道。张自学等 (1995) 和金昆等 (1997) 报道了黄羊在中国和世界分布历史的变迁及其种群数量变化。孙静萍等 (1996)、高中信等 (1996a, 1996b) 和 关中明等 (1999) 详细报道了黄羊的集群行为、社群行为、迁徙行为和黄羊对栖息生境的选择。高中信等 (1995) 对黄羊的食性作了研究。李俊生等 (2000a) 评价了黄羊的主要饲料植物和食物营养质量, 并就呼伦贝尔草原地区黄羊肾脏重量和肾脏中心脂肪指数的变化进行了研究, 初步评价了不同年龄、不同性别组以及不同季节黄羊体况的差异 (李俊生等, 2001a)。赵肯堂 (1982) 根据黄羊角年环外形特征、牙龄生长状况和磨损程度, 报道了黄羊年龄的鉴定方法。姜兆文等 (1995) 利用显微鉴定的方法, 对赵肯堂 (1982) 的黄羊年龄鉴定方法作了校正。肖前柱等 (1982) 和姜兆文等 (1993) 根据两种不同的年龄鉴定方法, 分别对黄羊种群结构、种群年龄结构、性比及种群动态趋势作了预测, 并编制了黄羊的静态生命表。

从1994年开始, 蒋志刚等利用航片、GM卫星照片、GIS模型、生境适宜度模型、种群生存力模型等系统地监测了青海湖地区普氏原羚种群动态。并就人类活动、土地覆盖变化以及草地初级生产对普氏原羚种群生存力的影响; 普氏原羚栖息地选择、生境适宜度和活动规律; 普氏原羚生境中的食物网; 普氏原羚采食对策及其与绵羊的食物竞争问题; 狼捕食对普氏原羚生存的影响; 草原围栏与普氏原羚保护、草原生物多样性保护及普氏原羚社群行为和群体结构的时空动态等等, 进行了系统研究 (蒋志刚等, 2003)。

迄今,有关藏原羚的生态学研究报道较少,鲁庆彬(2003)作了一简要的形态特征和数量分布描述,张洪茂等(2002)利用数量化理论作过川西北藏原羚夏季生境选择的研究,认为藏原羚的最适摄食生境为隐蔽条件较好,离水源较近的草甸草原。

1.2 生理生化及分子生物学研究

东北林业大学的学者对黄羊的胃肠消化道器官作了较为详尽的报道。李俊生等(2001b)研究了黄羊消化道内7个部位(瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃、小肠、盲肠和直肠)食物粒径分布规律。马建章等(2001)从51副黄羊消化道形态结构特征得出黄羊属于混饲者。邹琦等(1999)通过石蜡切片法对成年健康黄羊胃肠进行了组织形态学观察。李俊生等(2000b)对51头黄羊胃形态结构特征作了系统研究。沈明华(2002)对普氏原羚的10项血液生理生化指标进行测定,发现普氏原羚红细胞、红细胞压积、血红蛋白显著地高于低海拔地区的绵羊和山羊;但其它大部分指标同黑羚羊、绵羊和山羊基本相近。

在基因水平上,此属物种的研究较少。Gatesy(1997)通过形态学和rDNA数据藏原羚作了属间系统发育关系探讨,Kuznetsova(2002)通过12S rRNA和16S rRNA数据对黄羊作过属级间系统发育关系分析。Gatesy认为原羚属(仅藏原羚)应归属于羚羊亚科羚羊族(Antilopini)。而Kuznetsova的结果与经典分类较为相悖,认为原羚属(仅黄羊)与羚羊亚科岛羚族(Neotragini)犬羚属(*Madoqua*)亲缘关系最近,它们聚为单系群。Lei等(2003a)通过12S rRNA和16S rRNA数据得出普氏原羚不是藏原羚的一个亚种,普氏原羚与黄羊的分类亲缘关系较与藏原羚的亲缘关系近;黄羊不能成为独立属。另外,Lei等(2003b)分析了29个来自四个种群普氏原羚线粒体DNA D-loop控制区序列,测定了孤立普氏原羚种群间遗传差异,探讨了普氏原羚分子地理系统学,提出保护进化显著单元。

1.3 系统学研究

原羚属属级和属内各物种的分类进化地位历来争论较多(Groves, 1967)。Sokolov(1953)根据眶下凹窝退化过渡特征认为原羚属(*Procapra*)虽然与羚羊属(*Gazella*)有明显差异,但只是亚属差异,鹅喉羚(*G. subgutturosa*)为二者的中间类型,原羚属应为羚羊属的亚属。绝大多数学者基于它们头骨、角形、毛色和

迄今,有关藏原羚的生态学研究报道较少,鲁庆彬(2003)作了一简要的形态特征和数量分布描述,张洪茂等(2002)利用数量化理论作过川西北藏原羚夏季生境选择的研究,认为藏原羚的最适摄食生境为隐蔽条件较好,离水源较近的草甸草原。

1.2 生理生化及分子生物学研究

东北林业大学的学者对黄羊的胃肠消化道器官作了较为详尽的报道。李俊生等(2001b)研究了黄羊消化道内7个部位(瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃、小肠、盲肠和直肠)食物粒径分布规律。马建章等(2001)从51副黄羊消化道形态结构特征得出黄羊属于混饲者。邹琦等(1999)通过石蜡切片法对成年健康黄羊胃肠进行了组织形态学观察。李俊生等(2000b)对51头黄羊胃形态结构特征作了系统研究。沈明华(2002)对普氏原羚的10项血液生理生化指标进行测定,发现普氏原羚红细胞、红细胞压积、血红蛋白显著地高于低海拔地区的绵羊和山羊;但其它大部分指标同黑羚羊、绵羊和山羊基本相近。

在基因水平上,此属物种的研究较少。Gatesy(1997)通过形态学和rDNA数据藏原羚作了属间系统发育关系探讨,Kuznetsova(2002)通过12S rRNA和16S rRNA数据对黄羊作过属级间系统发育关系分析。Gatesy认为原羚属(仅藏原羚)应归属于羚羊亚科羚羊族(Antilopini)。而Kuznetsova的结果与经典分类较为相悖,认为原羚属(仅黄羊)与羚羊亚科岛羚族(Neotragini)犬羚属(*Madoqua*)亲缘关系最近,它们聚为单系群。Lei等(2003a)通过12S rRNA和16S rRNA数据得出普氏原羚不是藏原羚的一个亚种,普氏原羚与黄羊的分类亲缘关系较与藏原羚的亲缘关系近;黄羊不能成为独立属。另外,Lei等(2003b)分析了29个来自四个种群普氏原羚线粒体DNA D-loop控制区序列,测定了孤立普氏原羚种群间遗传差异,探讨了普氏原羚分子地理系统学,提出保护进化显著单元。

1.3 系统学研究

原羚属属级和属内各物种的分类进化地位历来争论较多(Groves, 1967)。Sokolov(1953)根据眶下凹窝退化过渡特征认为原羚属(*Procapra*)虽然与羚羊属(*Gazella*)有明显差异,但只是亚属差异,鹅喉羚(*G. subgutturosa*)为二者的中间类型,原羚属应为羚羊属的亚属。绝大多数学者基于它们头骨、角形、毛色和

齿系特征,认为原羚属物种为非典型羚羊,它们应作为独立属—原羚属,并认为原羚属包含三个种即藏原羚、普氏原羚和黄羊(刘明玉等,2000; Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979)。但有人根据黄羊与普氏原羚及藏原羚之间的形态差异较大,将黄羊列为黄羊属(*Prodorcas*),将普氏原羚和藏原羚列为原羚属(Pocock, 1918; 刘明玉等, 2000; Groves, 2000),且认为黄羊属是介于原羚属和羚羊属的中间类型。Allen (1940)、Ellerman 和Morrison-Scott (1951)以及Kleischmidt (1961)曾一度将普氏原羚划为是藏原羚的一个亚种。Pousargues(引自Groves, 1967)则认为普氏原羚是藏原羚和鹅喉羚的杂交种。但Groves (1967)对比研究了有关动物标本馆馆藏的普氏原羚标本的形态特征,确定普氏原羚为一个独立的种。另外,根据普氏原羚与藏原羚在青藏高原同域分布,人们普遍认为普氏原羚与藏原羚的分类亲缘关系较普氏原羚与黄羊的亲缘关系近(蒋志刚等, 2003)。

2.研究的目的和意义

根据原羚属属内各物种和羚羊亚科各属间形态分类地位的混乱,分子数据在属级分类上的争议和属内背景资料的缺乏之现状。本文利用进化速度较快、序列长度高度保守和易于同源比对的线粒体DNA (mtDNA) 细胞色素b (Cytochrome b) 基因这一分子标记 (Irwin, 1991; Hassanin, 1999),对原羚属属内物种及羚羊亚科各属之间发育关系进行研究。

期望通过本研究,阐明原羚属及羚羊亚科各属物种之间的系统发育关系,这对于日后羚羊亚科分类地位确定,重建牛科羚羊亚科系统发育树具有重要的理论意义。

齿系特征,认为原羚属物种为非典型羚羊,它们应作为独立属—原羚属,并认为原羚属包含三个种即藏原羚、普氏原羚和黄羊(刘明玉等,2000; Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979)。但有人根据黄羊与普氏原羚及藏原羚之间的形态差异较大,将黄羊列为黄羊属(*Prodorcas*),将普氏原羚和藏原羚列为原羚属(Pocock, 1918; 刘明玉等, 2000; Groves, 2000),且认为黄羊属是介于原羚属和羚羊属的中间类型。Allen (1940)、Ellerman 和Morrison-Scott (1951)以及Kleischmidt (1961)曾一度将普氏原羚划为是藏原羚的一个亚种。Pousargues(引自Groves, 1967)则认为普氏原羚是藏原羚和鹅喉羚的杂交种。但Groves (1967)对比研究了有关动物标本馆馆藏的普氏原羚标本的形态特征,确定普氏原羚为一个独立的种。另外,根据普氏原羚与藏原羚在青藏高原同域分布,人们普遍认为普氏原羚与藏原羚的分类亲缘关系较普氏原羚与黄羊的亲缘关系近(蒋志刚等, 2003)。

2.研究的目的和意义

根据原羚属属内各物种和羚羊亚科各属间形态分类地位的混乱,分子数据在属级分类上的争议和属内背景资料的缺乏之现状。本文利用进化速度较快、序列长度高度保守和易于同源比对的线粒体DNA (mtDNA) 细胞色素b (Cytochrome b) 基因这一分子标记 (Irwin, 1991; Hassanin, 1999),对原羚属属内物种及羚羊亚科各属之间发育关系进行研究。

期望通过本研究,阐明原羚属及羚羊亚科各属物种之间的系统发育关系,这对于日后羚羊亚科分类地位确定,重建牛科羚羊亚科系统发育树具有重要的理论意义。

第二部分 材料与方法

1. 材料

1.1 样品

自四川省和内蒙古采集到藏原羚 (*P.picticaudata*)、斑羚 (*Nemorhaedus caudatus*)、鬣羚 (*Capricornis crispus*) 和黄羊 (*P.gutturosa*) 样品 13 份, 其中, 藏原羚 3 份、斑羚 2 份、鬣羚 5 份、黄羊 3 份。采集地点、时间和样品类型见表 1。

表 1 样品信息一览

Table 1. Summary information on the samples used in this study

物种	样品数	采样地点	样品类型	观察资料	采样时间
Species	No. of samples	Sampling Site	Tissue sample	Observations	Sampling year
藏原羚	3	四川木里	皮肤	野生	1999
鬣羚	1	四川青川	皮肤	野生	1999
	4	四川木里	皮肤	野生	1999
斑羚	1	四川木里	皮肤	野生	1999
	1	四川稻城	皮肤	野生	1999
黄羊	3	内蒙古满洲里	肌肉	野生	1994

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、EX Taq DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司; 其它常规试剂为进口分析纯, 购自上海生工生物工程公司; PCR 引物由上海生工生物工程公司合成; 测序由上海生工生物工程公司和上海博亚生物技术有限公司完成。

1.3 主要的仪器设备

PTC-200 PCR 扩增仪(MJ Research 公司); PE 9600 PCR 扩增仪(PE 公司); 5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf); 5810R 高速冷冻离心机(Eppendorf); Gel Doc 2000 凝胶成像系统(Bio-Rad); BS 200S 电子天平(Sartorius); Power PAC 300 电泳仪(Bio-Rad); Ultra Freeze 超低温冰箱(Heto); SBD-50 Bio 恒温水浴摇床(Heto); Thermomixer comfort 5355 (Eppendorf); Venticell 111R 烘箱(MMM); Incucell 111R 培养箱(MMM); 3310pH Meter (Jenway); SS-325 灭菌柜(Tomy); DNA mini 真空干燥系统(Heto); SmartSpec 3000 紫外分光光度计(Bio-Rad)。

2. 方法

2.1 DNA 提取

2.1.1 肌肉样品总 DNA 的提取

- (1) 取少量肌肉样品，液氮下碾碎，然后加入 370 μ l 的 TNE 缓冲液 (0.1M NaCl; 10Mm Tris-Hcl, PH 7.5; 1mM EDTA, PH 8.0), 100 μ l 的 10% SDS, 10 μ l 的 10mg/ml 蛋白酶 K, 20 μ l 的 1mol/L 的 DTT, 混匀后放入 56 $^{\circ}$ C 下消化至透明。
- (2) 4000rpm/min 离心 5 分钟，取上清。
- (3) 加入等体积的酚，在自动混匀器上混匀 10 分钟，10000rpm/min 离心 10 分钟，取上清。
- (4) 加入等体积的酚：氯仿：异戊醇 (25: 24: 1)，在自动混匀器上混匀 10 分钟，10000rpm/min 离心 10 分钟，取上清。
- (5) 重复以上步骤。
- (6) 加入氯仿：异戊醇 (24: 1)，在自动混匀器上混匀 10 分钟，10000rpm/min 离心 10 分钟，取上清。
- (7) 在上清中加入 1/10 体积的 3M NaAc 和 2 倍体积的冰无水乙醇，混匀后放入 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 分钟。
- (8) 12 000rpm/min 离心 10 分钟，弃无水乙醇，再用冷的 70% 乙醇洗涤沉淀。
- (9) 真空干燥，加入 100 μ l TE 溶解沉淀。
- (10) 紫外分光光度计测定浓度和纯度后，冻存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

2.1.2 皮肤样品总 DNA 的提取

- (1) 用消毒后的镊子和剪刀反复刮皮肤表面，然后剪一小块放入 1.5ml 离心管中，用 TNE 缓冲液在振荡器上高速冲洗 2 到 3 次。
- (2) 加入 500 μ l TNE 缓冲液浸泡 24 小时。
- (3) 用消毒后的剪刀剪碎。
- (4) 其它步骤与上同。

2.2. PCR 扩增

PCR 引物使用曹丽荣等 (2003) 改进后的牛科物种 *cyt-b* 基因全序列特异性引物，引物序列为：L14724 5' -GATATGAAAAACCATCGTTG-3' 和 H15915 5' -CCTTCTCTGGTTTACAAGAC-3'

2.1 DNA 提取

2.1.1 肌肉样品总 DNA 的提取

- (1) 取少量肌肉样品，液氮下碾碎，然后加入 370 μ l 的 TNE 缓冲液 (0.1M NaCl; 10Mm Tris-Hcl, PH 7.5; 1mM EDTA, PH 8.0), 100 μ l 的 10% SDS, 10 μ l 的 10mg/ml 蛋白酶 K, 20 μ l 的 1mol/L 的 DTT, 混匀后放入 56 $^{\circ}$ C 下消化至透明。
- (2) 4000rpm/min 离心 5 分钟，取上清。
- (3) 加入等体积的酚，在自动混匀器上混匀 10 分钟，10000rpm/min 离心 10 分钟，取上清。
- (4) 加入等体积的酚：氯仿：异戊醇 (25: 24: 1)，在自动混匀器上混匀 10 分钟，10000rpm/min 离心 10 分钟，取上清。
- (5) 重复以上步骤。
- (6) 加入氯仿：异戊醇 (24: 1)，在自动混匀器上混匀 10 分钟，10000rpm/min 离心 10 分钟，取上清。
- (7) 在上清中加入 1/10 体积的 3M NaAc 和 2 倍体积的冰无水乙醇，混匀后放入 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 分钟。
- (8) 12 000rpm/min 离心 10 分钟，弃无水乙醇，再用冷的 70% 乙醇洗涤沉淀。
- (9) 真空干燥，加入 100 μ l TE 溶解沉淀。
- (10) 紫外分光光度计测定浓度和纯度后，冻存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

2.1.2 皮肤样品总 DNA 的提取

- (1) 用消毒后的镊子和剪刀反复刮皮肤表面，然后剪一小块放入 1.5ml 离心管中，用 TNE 缓冲液在振荡器上高速冲洗 2 到 3 次。
- (2) 加入 500 μ l TNE 缓冲液浸泡 24 小时。
- (3) 用消毒后的剪刀剪碎。
- (4) 其它步骤与上同。

2.2. PCR 扩增

PCR 引物使用曹丽荣等 (2003) 改进后的牛科物种 *cyt-b* 基因全序列特异性引物，引物序列为：L14724 5' -GATATGAAAAACCATCGTTG-3' 和 H15915 5' -CCTTCTCTGGTTTACAAGAC-3'

所有 PCR 扩增都在 PTC-200 型 DNA 扩增仪上进行。反应总体积为 50 μ l, 其中 100ng 模板 DNA, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 150 μ M dNTP, 100 μ g/ml BSA, 0.3 μ M 引物, 1.25 单位的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶。反应体系在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后进入如下循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 42 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 循环次数为 35, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。

2.3 DNA 克隆

2.3.1 PCR 产物的纯化

PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化, 操作步骤参照说明书进行。

2.3.2 感受态细胞的制备

- A. 取 JM109 菌株储存液 100 μ l, 加入含 10ml LB 培养基的 100ml 锥形瓶中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养过夜。
- B. 取振荡培养的菌液 1ml, 加入含 100ml LB 培养基的 1L 锥形瓶中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养, 至 OD600 0.3-0.4。
- C. 菌液倒入无菌的 50ml 离心管中, 冰浴 10min, 1500g 4 $^{\circ}$ C 离心 8 分钟。
- D. 取出离心管, 置于冰上, 去上清, 每管加入 10ml 预冷的 CaCl₂ 溶液 (60mmol CaCl₂, 10mmol pipes PH 7.0, 15% 甘油), 用枪头轻轻吹打沉淀, 使细胞分散重悬。1500g 4 $^{\circ}$ C 离心 8 分钟。
- E. 去上清, 加入 10ml 预冷的 CaCl₂ 溶液, 冰浴 30 分钟。
- F. 1500g 4 $^{\circ}$ C 离心 8 分钟。
- G. 去上清, 加入 2ml 预冷的 CaCl₂ 溶液重悬细胞, 以 100 μ l 分装于-20 $^{\circ}$ C 预冷的 1.5ml 离心管中, 置于超低温冰箱中保存。

2.3.3 连接

连接反应体系如下:

Solution I	5 μ l
pMD-18T Vector	1 μ l
PCR 纯化产物	1 μ l
dH ₂ O	3 μ l

以上溶液混匀后于 16 $^{\circ}$ C 连接 1 小时。

所有 PCR 扩增都在 PTC-200 型 DNA 扩增仪上进行。反应总体积为 50 μ l, 其中 100ng 模板 DNA, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 150 μ M dNTP, 100 μ g/ml BSA, 0.3 μ M 引物, 1.25 单位的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶。反应体系在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后进入如下循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 42 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 循环次数为 35, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。

2.3 DNA 克隆

2.3.1 PCR 产物的纯化

PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化, 操作步骤参照说明书进行。

2.3.2 感受态细胞的制备

- A. 取 JM109 菌株储存液 100 μ l, 加入含 10ml LB 培养基的 100ml 锥形瓶中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养过夜。
- B. 取振荡培养的菌液 1ml, 加入含 100ml LB 培养基的 1L 锥形瓶中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养, 至 OD600 0.3-0.4。
- C. 菌液倒入无菌的 50ml 离心管中, 冰浴 10min, 1500g 4 $^{\circ}$ C 离心 8 分钟。
- D. 取出离心管, 置于冰上, 去上清, 每管加入 10ml 预冷的 CaCl₂ 溶液 (60mmol CaCl₂, 10mmol pipes PH 7.0, 15% 甘油), 用枪头轻轻吹打沉淀, 使细胞分散重悬。1500g 4 $^{\circ}$ C 离心 8 分钟。
- E. 去上清, 加入 10ml 预冷的 CaCl₂ 溶液, 冰浴 30 分钟。
- F. 1500g 4 $^{\circ}$ C 离心 8 分钟。
- G. 去上清, 加入 2ml 预冷的 CaCl₂ 溶液重悬细胞, 以 100 μ l 分装于-20 $^{\circ}$ C 预冷的 1.5ml 离心管中, 置于超低温冰箱中保存。

2.3.3 连接

连接反应体系如下:

Solution I	5 μ l
pMD-18T Vector	1 μ l
PCR 纯化产物	1 μ l
dH ₂ O	3 μ l

以上溶液混匀后于 16 $^{\circ}$ C 连接 1 小时。

2.3.4 转化

- A. 分别取 X-gal (50mg/ml) 20 μ l, IPTG(0.1M)100 μ l 涂布 LB 平板 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素)。
- B. 在连接反应管中加入 100 μ l 感受态细胞, 轻旋混匀, 冰浴 30 分钟。
- C. 42 $^{\circ}$ C 热激 90 秒。
- D. 将管迅速转移到冰上冷却 2 分钟。
- E. 每管加入 400 μ l SOC 培养基, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养 1 小时。
- F. 室温 4000rpm/min 离心 5 分钟, 吸弃 400 μ l 上清。
- G. 吸取余下的转化物, 涂布上述平板。
- H. 37 $^{\circ}$ C 正向放置培养 1 小时。
- I. 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

2.3.5 筛选

选择白色菌落, 挑至含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养 4 小时。

2.3.6 鉴定

取上述菌液 1 μ l 进行 PCR 检测, 反应条件如前所述。

2.4 测序

取鉴定正确的菌液, 加入 10ml LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养过夜。然后取 1ml 菌液, 送交上海生工生物工程有限公司, 用通用引物 (M13+/M13-) 进行双向测序。DNA 自动测序仪型号为 ABI PRISM 377-96。

2.5 DNA 序列数据处理分析

搜寻 GeneBank 上所有羚羊亚科物种 Cyt b 基因全序列, 结合本次羚羊亚科原羚属藏原羚和黄羊全部测序结果 (各 3 个), 对羚羊亚科原羚属属内物种及羚羊亚科各属之间发育关系进行研究分析。另取本次羊亚科斑羚 (*Nemorhaedus caudatus*) 和鬣羚 (*Capricornis crispus*) 测序结果 (各 1 个) 及来自 GeneBank 的牛科其它亚科物种作为外群对照。共使有 33 个物种, 41 个个体, 分析物种出处详见表 2。同时根据牛亚科处于牛科系统分类的基础地位 (Gatesy, 1997; Matthee, 2001; Reza, 2000), 定义牛 (*Bos taurus*) 外群为根 (root)。

用 Megalign 软件 (DNASTar Inc. 1996) 对测定序列和从 GeneBank 中下载的

2.3.4 转化

- A. 分别取 X-gal (50mg/ml) 20 μ l, IPTG(0.1M)100 μ l 涂布 LB 平板 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素)。
- B. 在连接反应管中加入 100 μ l 感受态细胞, 轻旋混匀, 冰浴 30 分钟。
- C. 42 $^{\circ}$ C 热激 90 秒。
- D. 将管迅速转移到冰上冷却 2 分钟。
- E. 每管加入 400 μ l SOC 培养基, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养 1 小时。
- F. 室温 4000rpm/min 离心 5 分钟, 吸弃 400 μ l 上清。
- G. 吸取余下的转化物, 涂布上述平板。
- H. 37 $^{\circ}$ C 正向放置培养 1 小时。
- I. 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

2.3.5 筛选

选择白色菌落, 挑至含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养 4 小时。

2.3.6 鉴定

取上述菌液 1 μ l 进行 PCR 检测, 反应条件如前所述。

2.4 测序

取鉴定正确的菌液, 加入 10ml LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm/min 振荡培养过夜。然后取 1ml 菌液, 送交上海生工生物工程有限公司, 用通用引物 (M13+/M13-) 进行双向测序。DNA 自动测序仪型号为 ABI PRISM 377-96。

2.5 DNA 序列数据处理分析

搜寻 GeneBank 上所有羚羊亚科物种 Cyt b 基因全序列, 结合本次羚羊亚科原羚属藏原羚和黄羊全部测序结果 (各 3 个), 对羚羊亚科原羚属属内物种及羚羊亚科各属之间发育关系进行研究分析。另取本次羊亚科斑羚 (*Nemorhaedus caudatus*) 和鬣羚 (*Capricornis crispus*) 测序结果 (各 1 个) 及来自 GeneBank 的牛科其它亚科物种作为外群对照。共使有 33 个物种, 41 个个体, 分析物种出处详见表 2。同时根据牛亚科处于牛科系统分类的基础地位 (Gatesy, 1997; Matthee, 2001; Reza, 2000), 定义牛 (*Bos taurus*) 外群为根 (root)。

用 Megalign 软件 (DNASTar Inc. 1996) 对测定序列和从 GeneBank 中下载的

同源序列进行排序。用 ClustalX1.8 软件 (Thompson, 1997) 进行 Cyt b 基因全序列的比对。用 MEGA2.1 (Kumar *et al.*, 2001) 软件计算不同序列间的碱基替代数、变异位点、简约信息位点数、转换颠换百分比、转换/颠换比率和 Kimura (1980) 两参数 (2-parameter) 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。基因突变是否饱和采用转换颠换散点分析 (Birungi, 2001)。使用 PAUP4.0b8 软件 (Swofford, 1998) 构建邻近(NJ)树、开启式功能搜寻最简约 (MP) 树和 TBR 法搜寻最大似然 (ML) 树。依据所获得转换/颠换平均比率, MP 和 ML 树采取加权 (Weighting) 系数 (吕宝忠等译, 2002)。系统简约信息分析使用步长 (Tree length), 一致性指数 (consistency index, CI)、保留指数 (retention index, RI)、同型指数 (homoplasy index, HI) 和重复衡量一致性指数 (rescaled consistency index, RCI) 评估。NJ 和 MP 系统树各分枝的置信度由 1000 次自举 (Bootstrap) 重复检测; ML 系统树分枝置信度由 100 次自举重复检测。依据分歧时间的计算公式 $D=2 \alpha t$ (Li *et al.*, 1981), 以牛科动物已校正的 Cyt b 分子钟, 细胞色素 b 全序列平均进化速度为 2%/百万年 (Birungi, 2001; Kikkawa, 1997; Matthee *et al.*, 1999) 计算分歧时间。

第三部分 结果和讨论

得到牛科 4 个物种 13 个个体细胞色素 *b* 基因的全序列, ClustalX1.8 软件排序比对具体分布位置见图一。

1. 细胞色素 *b* 基因碱基序列组成、变异位点及序列差异

经对位排列后, 41 个个体 Cytb 基因序列中, 共有 1140 个碱基位点。其中有 568 个核酸变异位点, 435 个简约信息位点。A、T、C、G 碱基平均含量为 31.4%、26.6%、28.7%、13.3%, 密码子第三位点 G 碱基含量为 6.1%; 原羚属黄羊和藏原羚 6 条基因序列中, A、T、C、G 碱基平均含量为 31.5%、27.3%、28.0%、13.2%, 密码子第三位点 G 碱基含量为 5.0%。原羚属种内和种间及相关物种基因序列差异百分比显示出: 原羚属种内和种间均有较高的遗传相似性, 黄羊种内序列差异值为 1.26%~1.91%, 平均为 1.51%; 藏原羚种内序列差异值为 0.18%~0.9%, 平均为 0.6%; 属内二者种间序列差异平均值为 3.78%。原羚属种间序列差异平均值 (3.78%) 与犬羚属种间序列差异平均值 (2.28%) 较近; 同比而言, 羚羊亚科羚羊属、小岩羚属属内种间序列差异值较大分别为 9.35%、8.84%。原羚属与羚羊亚科其它属级序列差异百分比显示出: 原羚属与赛加羚羊属、跳羚属同源相似性较高, 序列差异平均值分别为 12.06%、13.14%; 与岛羚属同源相似性最小, 差异值为 14.93%。羚羊亚科内属间相互比对差异平均值为 11.09%~17.38%, 印度羚属与羚羊属差异最小为 11.09%; 犬羚属与岛羚属差异最大为 17.38%。原羚属黄羊和藏原羚与羚羊亚科其它属物种对比发现: 黄羊和藏原羚与赛加羚羊差异最小, 差异值分别为 12.34%和 11.75%; 黄羊、藏原羚分别与岛羚及山羚相距最远, 差异值分别为 15.29%和 14.93%。作为外群的牛和内群各种之间序列差异值为 15.64~19.65%, 平均 17.39%; 与原羚属平均差异值为 16.5%。详见表 3。

2. 细胞色素 *b* 基因序列核酸变异方式

41 个个体, 33 个物种间核苷酸碱基的变异存在很大的差异: 平均替换数为 151 个, 在密码子的第三位点中存在 95 个变异, 占总变异位点的 62.91%; T $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ G 的转换数分别为 87 个和 30 个, A $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ T、T $\leftrightarrow$ G 和

第三部分 结果和讨论

得到牛科 4 个物种 13 个个体细胞色素 *b* 基因的全序列, ClustalX1.8 软件排序比对具体分布位置见图一。

1. 细胞色素 *b* 基因碱基序列组成、变异位点及序列差异

经对位排列后, 41 个个体 Cytb 基因序列中, 共有 1140 个碱基位点。其中有 568 个核酸变异位点, 435 个简约信息位点。A、T、C、G 碱基平均含量为 31.4%、26.6%、28.7%、13.3%, 密码子第三位点 G 碱基含量为 6.1%; 原羚属黄羊和藏原羚 6 条基因序列中, A、T、C、G 碱基平均含量为 31.5%、27.3%、28.0%、13.2%, 密码子第三位点 G 碱基含量为 5.0%。原羚属种内和种间及相关物种基因序列差异百分比显示出: 原羚属种内和种间均有较高的遗传相似性, 黄羊种内序列差异值为 1.26%~1.91%, 平均为 1.51%; 藏原羚种内序列差异值为 0.18%~0.9%, 平均为 0.6%; 属内二者种间序列差异平均值为 3.78%。原羚属种间序列差异平均值 (3.78%) 与犬羚属种间序列差异平均值 (2.28%) 较近; 同比而言, 羚羊亚科羚羊属、小岩羚属属内种间序列差异值较大分别为 9.35%、8.84%。原羚属与羚羊亚科其它属级序列差异百分比显示出: 原羚属与赛加羚羊属、跳羚属同源相似性较高, 序列差异平均值分别为 12.06%、13.14%; 与岛羚属同源相似性最小, 差异值为 14.93%。羚羊亚科内属间相互比对差异平均值为 11.09%~17.38%, 印度羚属与羚羊属差异最小为 11.09%; 犬羚属与岛羚属差异最大为 17.38%。原羚属黄羊和藏原羚与羚羊亚科其它属物种对比发现: 黄羊和藏原羚与赛加羚羊差异最小, 差异值分别为 12.34%和 11.75%; 黄羊、藏原羚分别与岛羚及山羚相距最远, 差异值分别为 15.29%和 14.93%。作为外群的牛和内群各种之间序列差异值为 15.64~19.65%, 平均 17.39%; 与原羚属平均差异值为 16.5%。详见表 3。

2. 细胞色素 *b* 基因序列核酸变异方式

41 个个体, 33 个物种间核苷酸碱基的变异存在很大的差异: 平均替换数为 151 个, 在密码子的第三位点中存在 95 个变异, 占总变异位点的 62.91%; T $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ G 的转换数分别为 87 个和 30 个, A $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ T、T $\leftrightarrow$ G 和

C $\leftrightarrow$ G 的颠换数分别为 20、10、2 和 2 个。原羚属黄羊和藏原羚平均替换数为 43 个,在密码子的第三位点中存在 29 个变异,占总变异位点的 67.4%; T $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ G 的转换数分别为 28 个和 14 个, A $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ T、T $\leftrightarrow$ G 和 C $\leftrightarrow$ G 的颠换数分别为 1、0、0 和 0 个。黄羊和藏原羚种内平均替换数分别为 17 和 7 个,在密码子的第三位点中存在 15 和 6 个,分别占总变异位点的 88.2%和 85.7%,且均为转换。表 3 显示出:黄羊和藏原羚种内转换与颠换比值(Ts/Tv)近乎为无穷大(分别为 17/0 和 7/0),二者种间 Ts/Tv 为 43 (43/1)。原羚属与羚羊亚科其它属间转换颠换比值(Ts/Tv)在 2.76~11.37:1 之间(106~141 ts, 12~43tv)。羚羊亚科属间转换颠换比值在 2.5~11.4:1 之间(103~165 ts, 12~53tv)。原羚属物种与外群牛转换颠换比值为 2.92:1 (140ts, 48tv)。

3.细胞色素 *b* 基因转换颠换散点饱和性分析

取羚羊亚科及外群牛作散点饱和性分析,羚羊亚科属内、属间,羚羊亚科与外群的序列差异及转换(ts)、颠换(tv)数散点饱和图见图 2(a、b、c)。结果发现:原羚属及羚羊亚科属内、属间随着序列差异比提高,其碱基替换数均伴有线性提高,但羚羊亚科各属内、属间突变均未达到饱和。在羚羊亚科与外群的饱和分析比较中,所有颠换位点和转换位点中仅有第三转换位点(ts3)存在有饱和现象,但羚羊亚科与外群突变仍未完全达到饱和临界。

4.细胞色素 *b* 基因全序列分子系统树构建

基于 41 条 33 个牛科物种全序列(568 个核酸变异位点,435 个简约信息位点)获取最大简约 MP 树(开启搜寻)和 NJ 树,4 倍加权的 MP 树和 NJ 树(根据 Ts/Tv 接近于 4,采用 4 倍加权,自举引导值 1000 次),最大似然(ML)树(TBR (tree-bisection-reconnection)法搜寻,100 次自举重复检测);MP 树和 NJ 树基本相似,发现 3 棵 MP 树(步长(length)=2507, CI=0.307, RI=0.499, HI=0.693, RCI=0.153,树略)。4 倍加权 MP 树(步长=9350, CI=0.280, RI=0.429, HI=0.720, RCI=0.120)和 NJ 树见图 3,图 4;4 倍加权 ML 树见图 5。除羚羊亚科藏羚属系统支持略有不同外,ML 树相似于 MP 和 NJ 树。结果显示:原羚属属内黄羊和藏原羚及犬羚属内物种单系发生(Monophyly);原羚属与赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等并系发生(Paraphyly),原羚属隶属于羚羊亚科;在 3 种树羚羊亚科组

C $\leftrightarrow$ G 的颠换数分别为 20、10、2 和 2 个。原羚属黄羊和藏原羚平均替换数为 43 个,在密码子的第三位点中存在 29 个变异,占总变异位点的 67.4%; T $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ G 的转换数分别为 28 个和 14 个, A $\leftrightarrow$ C、A $\leftrightarrow$ T、T $\leftrightarrow$ G 和 C $\leftrightarrow$ G 的颠换数分别为 1、0、0 和 0 个。黄羊和藏原羚种内平均替换数分别为 17 和 7 个,在密码子的第三位点中存在 15 和 6 个,分别占总变异位点的 88.2%和 85.7%,且均为转换。表 3 显示出:黄羊和藏原羚种内转换与颠换比值(Ts/Tv)近乎为无穷大(分别为 17/0 和 7/0),二者种间 Ts/Tv 为 43 (43/1)。原羚属与羚羊亚科其它属间转换颠换比值(Ts/Tv)在 2.76~11.37:1 之间(106~141 ts, 12~43tv)。羚羊亚科属间转换颠换比值在 2.5~11.4:1 之间(103~165 ts, 12~53tv)。原羚属物种与外群牛转换颠换比值为 2.92:1 (140ts, 48tv)。

3.细胞色素 *b* 基因转换颠换散点饱和性分析

取羚羊亚科及外群牛作散点饱和性分析,羚羊亚科属内、属间,羚羊亚科与外群的序列差异及转换(ts)、颠换(tv)数散点饱和图见图 2(a、b、c)。结果发现:原羚属及羚羊亚科属内、属间随着序列差异比提高,其碱基替换数均伴有线性提高,但羚羊亚科各属内、属间突变均未达到饱和。在羚羊亚科与外群的饱和分析比较中,所有颠换位点和转换位点中仅有第三转换位点(ts3)存在有饱和现象,但羚羊亚科与外群突变仍未完全达到饱和临界。

4.细胞色素 *b* 基因全序列分子系统树构建

基于 41 条 33 个牛科物种全序列(568 个核酸变异位点,435 个简约信息位点)获取最大简约 MP 树(开启搜寻)和 NJ 树,4 倍加权的 MP 树和 NJ 树(根据 Ts/Tv 接近于 4,采用 4 倍加权,自举引导值 1000 次),最大似然(ML)树(TBR (tree-bisection-reconnection)法搜寻,100 次自举重复检测);MP 树和 NJ 树基本相似,发现 3 棵 MP 树(步长(length)=2507, CI=0.307, RI=0.499, HI=0.693, RCI=0.153,树略)。4 倍加权 MP 树(步长=9350, CI=0.280, RI=0.429, HI=0.720, RCI=0.120)和 NJ 树见图 3,图 4;4 倍加权 ML 树见图 5。除羚羊亚科藏羚属系统支持略有不同外,ML 树相似于 MP 和 NJ 树。结果显示:原羚属属内黄羊和藏原羚及犬羚属内物种单系发生(Monophyly);原羚属与赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等并系发生(Paraphyly),原羚属隶属于羚羊亚科;在 3 种树羚羊亚科组

成属间基本上没有单系起源，而多为并系起源。

5. 讨 论

5.1 黄羊与藏原羚系统发育关系

随着分歧时间增加，其物种亲缘关系变远，同源基因序列差异值会增加，颠换变化也随之增加 (Irwin, 1991)。黄羊与藏原羚细胞色素 b 基因序列遗传差异值 3.78%，颠换数目近乎为 0，充分显示黄羊和藏原羚有着较之其他牛科物种更近的亲缘关系。根据牛科狷羚亚科角马属 (*Connochaetes*) (Matthee, 1999)、小苇羚亚科水羚属 (*Kobus*) (Birungi, 2001) 和犬羚属属内物种遗传差异较小时，与同亚科属外物种的遗传差异就较大的现象 (属内遗传差异值为 2.05%、0.3%、2.28%；属外物种遗传差异值分别为 11.53%~19.21%、7.7%~14.7%、12.3%~17.89)。利用黄羊和藏原羚与同亚科其它物种序列遗传差异值 (属内 3.78% 遗传差异值，属外物种遗传差异值 12.06~14.93%) 现象及结合分子系统树高举信支持黄羊和藏原羚同系发生，原羚属与羚羊亚科其它相近属并系发生 (图 3、图 4 和图 5) 现象。我们赞成把黄羊和藏原羚列为同一属不同种，此属为独立属 (原羚属 *Procapra*) 观点 (Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979)。

所有牛科 41 个个体不同的物种间转换的差异与颠换差异呈现正相关，种间转换颠换比值最低为 2.4，所有数值均大于转换颠换比的临界值 2.0 (Knight, 1993)，表现出高的转换偏奇 (bias)，这与牛科、马羚亚科小羚羊 (Bettine, 2001) 和食肉目犬科 (Masuda et al., 1994) 的研究结果基本一致。随着进化时间的增加，颠换的积累，哺乳动物的 mtDNA 转换偏奇会下降，转换颠换比值 (Ts/Tv) 趋向于稳定临界，饱和性会增加 (Hedges, 1991; Zhang, 1993)。通过本研究中黄羊与藏原羚的转换颠换比值 (43/1)。羚羊亚科属间种间转换与颠换比值 (Ts/Tv) 在 2.5~11.4，羚羊亚科与外群转换颠换值 (2.4~3.5) 及饱和散点图线性化 (图 2 a、b、c)。说明牛科各物种间 Cytb 基因序列的突变未达到饱和状态，尤其是黄羊与藏原羚之间 Cytb 基因序列的突变远未饱和，随着进化时间推移，它们的遗传差异的增加，转换可能趋向于饱和。根据黄羊和藏原羚转换远未饱和现象，我们选择牛科动物已校正的细胞色素 b 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟 (Birungi, 2001)，推测黄羊和藏原羚的分歧时间大约在 1~2 百万年。

5.2 原羚属系统发育关系

成属间基本上没有单系起源，而多为并系起源。

5. 讨 论

5.1 黄羊与藏原羚系统发育关系

随着分歧时间增加，其物种亲缘关系变远，同源基因序列差异值会增加，颠换变化也随之增加 (Irwin, 1991)。黄羊与藏原羚细胞色素 b 基因序列遗传差异值 3.78%，颠换数目近乎为 0，充分显示黄羊和藏原羚有着较之其他牛科物种更近的亲缘关系。根据牛科狷羚亚科角马属 (*Connochaetes*) (Matthee, 1999)、小苇羚亚科水羚属 (*Kobus*) (Birungi, 2001) 和犬羚属属内物种遗传差异较小时，与同亚科属外物种的遗传差异就较大的现象 (属内遗传差异值为 2.05%、0.3%、2.28%；属外物种遗传差异值分别为 11.53%~19.21%、7.7%~14.7%、12.3%~17.89)。利用黄羊和藏原羚与同亚科其它物种序列遗传差异值 (属内 3.78% 遗传差异值，属外物种遗传差异值 12.06~14.93%) 现象及结合分子系统树高举信支持黄羊和藏原羚同系发生，原羚属与羚羊亚科其它相近属并系发生 (图 3、图 4 和图 5) 现象。我们赞成把黄羊和藏原羚列为同一属不同种，此属为独立属 (原羚属 *Procapra*) 观点 (Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979)。

所有牛科 41 个个体不同的物种间转换的差异与颠换差异呈现正相关，种间转换颠换比值最低为 2.4，所有数值均大于转换颠换比的临界值 2.0 (Knight, 1993)，表现出高的转换偏奇 (bias)，这与牛科、马羚亚科小羚羊 (Bettine, 2001) 和食肉目犬科 (Masuda et al., 1994) 的研究结果基本一致。随着进化时间的增加，颠换的积累，哺乳动物的 mtDNA 转换偏奇会下降，转换颠换比值 (Ts/Tv) 趋向于稳定临界，饱和性会增加 (Hedges, 1991; Zhang, 1993)。通过本研究中黄羊与藏原羚的转换颠换比值 (43/1)。羚羊亚科属间种间转换与颠换比值 (Ts/Tv) 在 2.5~11.4，羚羊亚科与外群转换颠换值 (2.4~3.5) 及饱和散点图线性化 (图 2 a、b、c)。说明牛科各物种间 Cytb 基因序列的突变未达到饱和状态，尤其是黄羊与藏原羚之间 Cytb 基因序列的突变远未饱和，随着进化时间推移，它们的遗传差异的增加，转换可能趋向于饱和。根据黄羊和藏原羚转换远未饱和现象，我们选择牛科动物已校正的细胞色素 b 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟 (Birungi, 2001)，推测黄羊和藏原羚的分歧时间大约在 1~2 百万年。

5.2 原羚属系统发育关系

成属间基本上没有单系起源，而多为并系起源。

5. 讨 论

5.1 黄羊与藏原羚系统发育关系

随着分歧时间增加，其物种亲缘关系变远，同源基因序列差异值会增加，颠换变化也随之增加 (Irwin, 1991)。黄羊与藏原羚细胞色素 b 基因序列遗传差异值 3.78%，颠换数目近乎为 0，充分显示黄羊和藏原羚有着较之其他牛科物种更近的亲缘关系。根据牛科狷羚亚科角马属 (*Connochaetes*) (Matthee, 1999)、小苇羚亚科水羚属 (*Kobus*) (Birungi, 2001) 和犬羚属属内物种遗传差异较小时，与同亚科属外物种的遗传差异就较大的现象 (属内遗传差异值为 2.05%、0.3%、2.28%；属外物种遗传差异值分别为 11.53%~19.21%、7.7%~14.7%、12.3%~17.89)。利用黄羊和藏原羚与同亚科其它物种序列遗传差异值 (属内 3.78% 遗传差异值，属外物种遗传差异值 12.06~14.93%) 现象及结合分子系统树高举信支持黄羊和藏原羚同系发生，原羚属与羚羊亚科其它相近属并系发生 (图 3、图 4 和图 5) 现象。我们赞成把黄羊和藏原羚列为同一属不同种，此属为独立属 (原羚属 *Procapra*) 观点 (Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979)。

所有牛科 41 个个体不同的物种间转换的差异与颠换差异呈现正相关，种间转换颠换比值最低为 2.4，所有数值均大于转换颠换比的临界值 2.0 (Knight, 1993)，表现出高的转换偏奇 (bias)，这与牛科、马羚亚科小羚羊 (Bettine, 2001) 和食肉目犬科 (Masuda et al., 1994) 的研究结果基本一致。随着进化时间的增加，颠换的积累，哺乳动物的 mtDNA 转换偏奇会下降，转换颠换比值 (Ts/Tv) 趋向于稳定临界，饱和性会增加 (Hedges, 1991; Zhang, 1993)。通过本研究中黄羊与藏原羚的转换颠换比值 (43/1)。羚羊亚科属间种间转换与颠换比值 (Ts/Tv) 在 2.5~11.4，羚羊亚科与外群转换颠换值 (2.4~3.5) 及饱和散点图线性化 (图 2 a、b、c)。说明牛科各物种间 Cytb 基因序列的突变未达到饱和状态，尤其是黄羊与藏原羚之间 Cytb 基因序列的突变远未饱和，随着进化时间推移，它们的遗传差异的增加，转换可能趋向于饱和。根据黄羊和藏原羚转换远未饱和现象，我们选择牛科动物已校正的细胞色素 b 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟 (Birungi, 2001)，推测黄羊和藏原羚的分歧时间大约在 1~2 百万年。

5.2 原羚属系统发育关系

仅管同比原羚属与羚羊亚科赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属物种基因序列具有较高的同源相似性，但它们的序列差异均大于 12%；此外进化系统树也不举信支持原羚属与赛加羚羊属、犬羚属聚为单系。所以我们的结果既不支持 Kuznetsova (2002) 从 12S rRNA 和 16S rRNA 认为原羚属与犬羚属具有单系姐妹群关系的假设；也不支持原羚属与羚羊属亲缘关系更近 (Tikhonov, 1995)，原羚属与赛加羚羊属亲缘关系较近 (Groves, 2000) 的观点；而仅赞成原羚属归属于羚羊亚科 (Gatesy, 1997) 的观点。原羚属与赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等是并系发生，起源于共同祖先、互为羚羊亚科下姊妹群。根据细胞色素 b 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟，推测原羚属与赛加羚羊属的分歧时间大约在 5.7~6.3 百万年、原羚属与犬羚属的分歧时间大约在 6.1~7.2 百万年、原羚属与羚羊属的分歧时间大约在 6.4~7.1 百万年、原羚属与跳羚属的分歧时间大约在 6.2~6.8 百万年；而和关系较远的岛羚属、藏羚属、山羚属分歧时间大约在 7~8 百万年。

通过系统树我们发现，基于细胞色素 b 基因全序列数据分析所得到的羚羊亚科基因进化树，与传统分类不太相符合。主要是羚羊亚科岛羚属、山羚属、藏羚属三属的分类地位，山羚属与马羚亚科小羚羊属聚为一支；岛羚属在 MP、NJ 树上单列为一支，ML 树上显示出岛羚属应是其它聚类群的基础分支 (图 5)；藏羚属应隶属于羊亚科，为羊亚科的基础进化支。为得出羚羊亚科真实的物种系统进化树，下一步研究工作应选择多个分子遗传标记 (包括线粒体和核基因) 结合传统形态分类构建羚羊亚科系统进化树。

表 2 所用物种和登录号

Table 2 The list of bovid Taxa and Accession Numbers

Species(物种)	Subfamily(亚科)	Genbank accession numbers(登录号)	Genus 属
<i>Gazella dama ruficollis</i> (苍羚)	Antilopinae	AF025954	羚羊属
<i>Gazella granti</i> (格氏羚)	Antilopinae	AF034723	羚羊属
<i>Gazella subgutturosa</i> (鹅喉羚)	Antilopinae	AF036282	羚羊属
<i>Antilope cervicapra</i> (印度羚)	Antilopinae	AF022058	印度羚属
<i>Litocranius walleri</i> (长颈羚)	Antilopinae	AF249974	长颈羚属
<i>Saiga tatarica</i> (赛加羚羊)	Antilopinae	AF064487	赛加羚属
<i>Madoqua guentheri</i> (冈氏犬羚)	Antilopinae	AF022071	犬羚属
<i>Madoqua kirkii</i> (柯氏羚)	Antilopinae	AF022070	犬羚属
<i>Antidorcas marsupialis</i> (跳羚)	Antilopinae	AF022054	跳羚属
<i>Raphicerus campestris</i> (小岩羚)	Antilopinae	AF0220068	小岩羚属
<i>Raphicerus sharpei</i> (沙氏岩羚)	Antilopinae	AF022050	小岩羚属
<i>Raphicerus melanotis</i> (黑耳岩羚)	Antilopinae	AF022053	小岩羚属
<i>Ourebia ourebi</i> (侏羚)	Antilopinae	AF320574	侏羚属
<i>Neotragus moschatus</i> (岛羚)	Antilopinae	AJ222683	岛羚属
<i>Neotragus moschatus livingstonianus</i> (岛羚)	Antilopinae	AF022069	岛羚属
<i>Neotragus moschatus zuluensis</i> (岛羚)	Antilopinae	AF022051	岛羚属
<i>Oreotragus oreotragus</i> (山羚)	Antilopinae	AF022052	山羚属
<i>Pantholops hodgsoni</i> (藏羚)	Antilopinae	AF034724	藏羚属
<i>Capra caucasica</i> (高加索山羊)	Caprinae	AF034738	山羊属
<i>Capra cylindricornis</i> (东山羊)	Caprinae	AF034737	山羊属
<i>Capra sibirica</i> (亚洲山羊)	Caprinae	AF034734	山羊属
<i>Pseudois nayaur</i> (岩羊)	Caprinae	AF500196	岩羊属
<i>Ammotragus lervia</i> (羴羊)	Caprinae	AF034731	羴羊属
<i>Capricornis crispus</i> (斑羚)	Caprinae	D32191	斑羚属
<i>Nemorhaedus caudatus</i> (羴羚)	Caprinae	U17861	羴羚属
<i>Ovis aries</i> (土耳其盘羊)	Caprinae	NC001941	盘羊属
<i>Kobus ellipsiprymnus</i> (水羚)	Reduncinae	AF022059	水羚属
<i>Pelea capreolus</i> (短角羚)	Peleinae	AF022055	短角羚属
<i>Aepyceros melampus</i> (黑斑羚)	Aepycerotinae	AF022056	黑斑羚属
<i>Alcelaphus buselaphus</i> (麋羚)	Alcelaphinae	AF016640	麋羚属
<i>Cephalophus maxwellii</i> (麦氏小羚羊)	Cephalophinae	AF153894	小羚羊属
<i>Addax nasomaculatus</i> (旋角羚)	Hippotraginae	AF034722	旋角羚属
<i>Bos taurus</i> (原牛)	Bovinae	NC001567	牛属
Bosh1(黄羊)	Antilopinae	本文	原羚属
Bosh2(黄羊)	Antilopinae	本文	原羚属
Bosh4(黄羊)	Antilopinae	本文	原羚属
Bosyl(藏原羚)	Antilopinae	本文	原羚属
Bosy2(藏原羚)	Antilopinae	本文	原羚属
Bosy3(藏原羚)	Antilopinae	本文	原羚属
Bosb8(羴羚)	Caprinae	本文	羴羚属
Bosbl(斑羚)	Caprinae	本文	斑羚属

注: Bosh1、Bosh2、Bosh4 分别代表黄羊三个个体, Bosyl、Bosy2、Bosy3 分别代表藏原羚三个个体, Bosbl 代表一个斑羚个体, Bosb8 代表一个羴羚个体 (Bosh1,Bosh2,Bosh4 denote three Mongolian gazella samples; Bosyl,Bosy2,Bosy3 denote three Tibetan gazella samples; Bosbl denotes a Goral samples; Bosb8 denotes a Serow samples)

浙江大学硕士学位论文

Codes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		73.8	108.11	116.14	125.19	121.18	136.21	137.20	110.29	133.26	136.29	141.20	131.26	137.26	159.23	151.23	157.28	165.27	130.18	159.12	163.16
2 7 12		106.73	111.16	128.23	127.20	127.23	129.22	130.22	126.22	128.22	131.22	141.33	136.33		126.25	117.24	148.30	137.29	108.20	153.16	161.14
3 10 17	10.46		103.15	107.24	129.21	122.26	120.25	125.25	117.25	120.25	122.25	139.33	138.33		117.26	138.26	132.31	136.30	121.23	120.18	130.15
4 11 13	11.41	10.44		128.21	118.18	131.21	133.20	128.20	120.20	123.20	130.20	139.30	142.30		117.25	165.25	152.32	160.31	145.22	131.10	142.28
5 12 12	13.26	11.16	13.95		122.26	128.25	126.24	128.24	123.24	125.24	131.24	155.37	151.37		145.27	144.27	148.32	153.31	136.24	133.12	150.10
6 12 14	12.84	13.17	11.85	13		116.26	116.25	116.25	106.25	108.25	113.25	125.27	129.27		118.24	122.24	164.29	134.30	140.23	111.11	116.11
7 15 11	13.15	13	13.58	13.35	12.34		13.1	11.1	10.1	12.1	12.1	131.30	124.30		114.29	128.29	128.28	131.27	132.13	125.12	132.10
8 13 15	13.27	12.68	13.1	13.11	12.34	1.26		22.0	15.0	18.0	18.0	131.29	133.29		119.30	133.22	129.27	140.26	135.12	128.11	135.09
9 13 18	13.34	13.13	12.85	13.36	12.31	1.35	1.91		38.0	40.0	42.10	130.29	129.29		121.30	128.22	135.27	134.26	137.12	129.11	135.09
10 13 11	12.93	12.15	12.28	12.91	11.15	3.6	3.99	3.32		2.0	8.0	117.29	111.29		119.30	124.22	117.27	133.26	137.12	113.11	121.09
11 13 11	13.16	12.68	12.5	13.14	11.67	3.79	1.18	3.51	0.18		10.0	117.29	114.29		121.30	127.22	120.27	135.26	140.12	116.11	121.09
12 14 1	13.39	12.9	13.18	13.59	12.12	3.79	4.18	3.7	0.72	0.9		122.29	116.29		124.30	122.22	120.27	133.26	140.12	118.11	129.09
13 13 18	15.24	15.12	14.8	16.86	13.33	14.1	14.31	14	12.86	12.86	13.31		26.0		132.32	150.26	133.31	156.30	163.29	138.52	116.52
14 14 26	14.78	14.88	15.15	16.5	13.68	13.54	14.23	13.88	12.3	12.53	12.75	2.28			126.32	146.26	135.31	154.30	156.29	141.52	149.52
15 14 18	13.24	12.55	12.15	15.07	12.16	12.53	13.68	13.3	13.08	13.3	13.53	14.13	13.85		137.29	138.35	154.36	130.28	137.51	142.51	
16 15 17	15.09	14.28	16.86	15.07	12.8	13.26	13.73	13.16	12.82	13.04	12.59	15.43	15.08	14.58		79.7	97.12	142.20	149.40	152.12	
17 16 25	15.82	14.32	16.19	15.83	11.64	13.87	13.68	13.33	12.66	12.88	12.88	14.14	14.55	15.1	7.54		94.13	131.25	144.48	148.50	
18 16 16	16.35	14.57	16.81	16.21	14.16	14.14	14.61	14.03	13.92	14.15	13.92	16.34	16.22	16.64	9.6	9.38		147.22	145.49	143.47	
19 12 17	11.17	12.58	14.66	14.26	14.3	12.79	12.92	13.14	13.14	13.37	13.37	16.84	16.23	13.89	14.22	13.7	14.78		15.41	160.39	
20 14 15	17.48	14.75	15.26	15.38	13.33	14.88	14.92	14.92	13.55	13.76	14.01	16.7	16.94	16.47	16.59	16.86	16.97	16.93		9.2	
21 17 18	17.99	15.35	15.78	15.75	13.78	15.05	15.29	15.29	14.02	14.25	14.71	17.42	17.66	16.95	17.04	17.32	16.63	17.14	0.99		
22 18 15	18.69	17.45	17.05	16.91	14.11	15.72	15.97	15.73	15.26	15.5	15.73	17.65	17.89	17.66	17.18	17.94	17.8	18.02	2.93	3.1	
23 19 1	18.28	15.64	17.7	16.85	17.76	16.26	17.1	16.5	16.15	16.39	16.82	17.95	18.08	17.48	17.53	18.22	18.85	18.07	16.06	16.56	
24 15 18	16.8	15.86	14.87	15.41	14.47	13.12	13.2	13.2	13.31	13.54	13.54	16.54	16.66	15.98	15.91	15.87	16.22	15.02	15.35	15.72	
25 15 19	16.46	14.53	14.36	15.6	14.88	15.17	15.42	14.72	14.37	14.6	13.91	17.89	18.02	17.2	15.01	16.04	16.62	16.59	13.93	14.06	
26 15 13	14.66	15.82	15.17	15.81	13.93	15.15	15.82	15.04	13.89	14.12	14.58	16.7	16.16	15.42	16.68	16.82	17.23	15.86	15.33	15.17	
27 16 16	15.51	17.02	16.5	15.29	14.93	13.36	14.05	13.26	14.06	14.28	14.28	17.33	17.09	17.27	17.44	16.08	16.93	15.68	15.65	15.55	
28 17 1	16.55	17.26	17.2	16.12	15.38	14.93	15.54	14.73	14.84	15.07	15.07	17.07	16.83	18.37	17.91	17.26	18.37	16.01	15.82	15.88	
29 17 18	16.55	18.99	15.41	15.39	14.91	15.43	15.92	15.09	14.86	15.09	15.33	17.79	17.31	18.22	16.6	16.32	17.66	16.76	16.45	16.6	
30 16	15.04	15.71	16.38	15.76	13.8	15.55	15.8	14.74	15.09	15.33	15.8	16.97	17.21	18	16.18	15.73	17.54	14.74	14.94	15.08	
31 15 14	15.6	15.46	15.16	14.83	12.87	14.39	14.63	13.82	13.37	13.6	13.82	15.55	15.2	16.41	14.25	13.77	16.31	16.01	14.67	15.04	
32 15 18	14.8	15	14.82	16.25	14.22	14.63	14.64	14.62	14.64	14.87	15.1	15.89	15.78	15.15	16.25	16.57	16.8	15.79	15.38	15.97	
33 15 17	18.74	19.24	15.72	15.19	15.13	15.86	16.87	15.52	14.99	15.17	15.87	17.75	17.99	15.91	17.25	18.06	18.32	16.14	15.1	15.35	
34 18 11	18.11	18.94	17.65	18.26	15.96	15.87	15.65	18.23	18.24	16.48	16.48	19.04	19.79	18.09	18.14	17.49	18.24	18.06	17.26	17.11	
35 19 11	19.61	18.44	17.77	18.89	15.96	15.87	15.63	16	16.48	16.72	16.96	20.05	20.56	17.6	18.26	18.22	18.73	18.18	17.75	17.89	
36 16 12	15.94	16.25	15.71	16.42	15.35	16.09	16.69	16.23	16.33	16.57	16.69	16.11	15.96	17.57	16.3	17.73	16.2	17.08	16.18	16.09	
37 15 13	16.12	11.82	15.2	15.53	14.49	15.46	15.82	15.47	15.12	15.35	15.59	15.5	15.73	16	14.99	15.4	16.96	14.67	15.39	16	
38 15 11	14.99	14.72	14.64	16.02	14.28	14.2	14.14	14.09	13.62	13.75	13.62	14.8	14.57	14.87	14.33	14.65	15.83	15.75	13.87	14.23	
39 15 17	16.84	14	15.76	17.84	15.4	15.15	15.63	15.52	14.34	14.58	14.58	16.18	15.71	15.6	16.26	16.35	16.21	15.59	16.53	16.91	
40 15 13	16.77	15.94	15.85	15.27	14.95	16.05	16.06	16.18	15.59	15.82	16.06	15.64	13.87	13.51	15.69	16.83	16.81	16.69	15.23	15.49	
41 15 11	16.68	16.27	16.8	15.97	15.8	15.07	14.85	14.73	14.62	14.85	15.32	16.21	16.21	15.51	16.87	16.11	16.85	16.54	15.86	15.53	

(接下表)

(续表)

22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
170/13	170/51	144/32	153/28	137/42	148/39	156/41	155/41	144/39	130/41	134/40	133/45	169/42	174/42	141/43	139/37	141/32	142/37	148/32	137/44
165/18	157/51	159/32	157/30	123/44	136/41	145/43	145/43	130/41	135/43	126/42	143/48	174/44	179/44	137/44	145/39	136/34	153/39	157/34	148/42
150/19	126/52	141/38	132/33	135/45	150/44	152/44	147/47	135/44	130/47	126/45	134/51	168/48	163/48	135/50	129/40	130/38	117/42	148/33	138/48
153/41	153/49	135/34	136/28	133/40	151/37	157/39	137/39	150/37	132/41	129/40	136/43	159/42	160/42	135/44	137/37	132/34	141/39	149/32	149/42
150/13	143/49	137/39	145/32	134/46	135/39	145/39	134/41	141/39	130/39	147/39	133/43	166/42	173/42	143/44	138/39	146/37	167/37	133/41	140/42
119/42	148/54	125/40	136/33	122/37	130/40	133/42	128/42	119/36	104/42	119/43	128/44	139/43	139/43	129/45	127/38	127/36	136/40	143/27	132/48
136/43	136/49	123/30	145/28	130/42	116/37	130/39	139/37	141/37	127/37	131/36	140/41	141/40	141/40	141/42	142/35	129/32	142/30	148/34	134/38
140/32	147/48	121/29	149/27	137/41	125/36	139/38	146/36	144/36	131/36	132/35	141/40	140/39	139/39	149/41	147/34	133/31	149/29	150/33	133/37
137/42	146/48	121/29	141/27	130/41	115/36	130/38	136/36	132/36	122/36	131/35	137/40	146/39	144/39	144/41	143/34	129/31	148/29	151/33	131/37
132/42	136/48	123/29	137/27	117/41	125/38	131/38	134/36	136/36	117/36	132/35	130/40	146/39	149/39	145/41	139/34	123/31	134/29	141/33	130/37
134/42	139/48	125/29	139/27	120/41	127/36	134/38	136/36	139/36	120/36	135/35	133/40	149/39	152/39	148/41	141/34	125/31	137/29	147/33	132/37
137/42	142/48	125/29	131/27	125/41	127/36	134/38	139/36	144/36	122/36	138/35	141/40	149/39	154/39	149/41	144/34	123/31	137/29	150/33	138/37
148/53	146/59	144/44	162/42	138/52	149/49	144/51	152/51	145/49	128/49	131/50	147/55	167/50	179/50	132/52	135/42	127/42	140/44	138/40	130/54
15/33	147/59	146/44	163/42	136/52	146/49	141/51	146/51	147/49	125/49	130/50	150/55	176/50	184/50	130/52	137/42	124/42	135/44	141/40	130/54
149/52	142/58	141/41	157/39	124/51	154/43	166/43	162/45	162/43	142/45	131/42	134/48	160/47	154/47	152/49	144/39	135/35	135/43	136/41	124/53
155/41	147/53	144/37	139/32	148/42	160/39	163/41	150/39	149/39	124/39	147/38	151/45	165/42	166/42	141/44	136/35	133/30	149/37	144/35	146/47
156/19	151/56	141/40	147/36	142/48	141/42	152/44	144/42	137/42	115/42	148/41	157/49	154/45	162/45	157/45	136/40	133/33	146/40	152/40	132/52
153/50	159/55	144/41	153/37	150/47	152/41	166/43	160/41	159/41	145/41	149/42	151/48	164/44	169/44	143/42	154/39	148/32	146/39	151/41	143/49
163/42	158/48	140/31	160/29	140/41	143/36	145/38	155/36	132/36	145/38	143/37	145/42	167/39	168/39	156/39	136/31	150/29	144/33	159/31	145/43
32/1	139/44	129/45	122/37	139/36	139/39	137/41	147/41	131/39	124/43	133/42	124/48	152/44	158/44	140/44	134/41	115/43	143/45	131/43	128/53
36/3	147/42	136/43	126/35	143/33	141/37	142/39	150/39	135/37	130/41	140/42	129/45	156/42	162/42	141/42	144/39	121/41	149/43	133/43	126/51
	148/45	128/46	135/38	147/37	146/40	147/42	158/42	145/40	132/44	136/43	123/49	155/45	158/45	147/45	148/42	120/44	162/47	144/44	137/54
17/01		153/48	169/45	148/53	155/45	148/45	140/48	143/48	145/50	127/51	147/54	166/49	152/51	173/51	150/50	136/43	143/43	162/45	155/58
15/34	17/59		128/23	144/43	160/38	157/40	140/40	143/38	143/42	145/41	140/47	151/41	158/43	151/43	132/36	130/38	158/36	139/38	137/45
15/19	18/84	13/26		149/32	143/31	151/33	136/33	132/31	135/36	147/32	149/38	162/37	170/37	130/39	145/31	146/29	156/31	149/31	154/39
16/14	17/65	16/43	15/45		125/37	135/39	145/39	136/34	147/43	128/42	135/43	160/42	160/42	132/42	138/39	144/35	140/35	139/37	141/44
16/35	17/61	17/34	15/26	14/16		44/2	90/4	98/6	109/12	110/13	120/16	134/15	141/15	115/13	126/14	135/25	145/29	154/29	128/39
16/56	17/01	17/31	16/18	15/29	4/08		92/6	97/8	120/14	117/15	127/19	142/18	146/18	122/15	126/16	128/27	144/31	149/31	128/41
17/53	16/5	15/75	14/88	16/12	8/29	8/59		90/8	116/14	125/15	127/19	132/18	142/18	142/15	133/16	126/25	144/31	149/31	124/41
16/23	16/74	15/89	14/32	14/99	9/12	9/21	8/57		100/14	114/15	115/19	121/18	130/18	120/15	120/14	127/25	138/29	154/29	123/43
15/48	17/08	16/2	14/98	16/67	10/68	11/77	11/43	10/02		106/18	124/21	117/20	130/20	128/18	124/19	124/29	133/33	146/36	130/43
15/72	15/65	16/33	15/72	14/91	10/78	11/65	12/32	11/31	10/86		97/7	118/12	110/8	119/19	119/15	121/24	136/28	141/32	120/38
15/09	17/64	16/4	16/37	15/6	11/97	12/74	12/74	11/73	12/72	9/11		131/15	116/11	141/22	128/21	139/27	151/33	143/36	136/43
17/61	18/8	16/81	17/47	17/77	13/11	14/01	13/09	12/18	11/94	11/45	12/88		41/4	153/19	138/20	153/30	166/32	159/35	141/44
17/86	17/79	17/64	18/09	17/77	13/68	14/36	14/01	12/97	13/07	10/39	11/13	3/97		167/19	146/20	161/28	169/32	173/32	149/42
16/89	19/65	17/03	14/83	15/26	11/22	12/09	13/8	11/87	12/75	12/06	14/31	15/05	16/25		113/20	133/30	139/35	129/37	129/42
16/68	17/56	14/74	15/49	15/53	12/33	12/53	13/1	11/77	12/51	11/76	13/05	13/87	14/57	11/61		12/23	137/27	136/31	131/43
14/43	15/72	14/51	15/4	15/69	14/04	13/56	13/24	13/35	13/43	12/69	14/6	16/1	16/61	14/33	12/58		131/25	128/31	126/39
18/33	16/31	17	16/45	15/34	15/28	15/37	15/37	14/69	14/68	14/36	16/18	17/41	17/65	15/22	14/37	13/7		142/29	145/39
16/54	18/22	15/54	15/85	15/43	16/11	15/85	15/85	16/11	15/92	15/24	15/88	17/01	18/02	14/5	14/67	13/98	15/04		126/32
16/8	18/7	16/05	16/96	16/3	14/6	14/81	14/16	14/56	15/14	13/81	15/72	16/3	16/8	15/03	15/25	14/48	16/12	13/85	

Table 3 Percentage divergence(below diagonal) and numbers of transitions/tranversions(above diagonal) for complete cytochrome b sequences in 33 species(41 samples) of Bovidae

表 3 牛科 33 个种 (41 个样本) Cyt b 基因全序列差异百分比 (下三角) 和转换数/颠换数 (上三角)

No	1~41	denote	Gazella.dama.ruficollis	Gazella.granti	Gazella.subgutturosa				
Antilope.cervicapra			Litocranius.walleri	Saiga.tatarica	bosh2	bosh4	bosh1	bosyl	
bosy3	bosy2		Madoqua.guentheri	Madoqua.kirkii			Antidorcas.marsupialis		
Raphicerus.campestris			Raphicerus.sharpei	Raphicerus.melanotis			Ourebia.ourebi		
Neotragus.moschatus			Neotragus.moschatus.zul	Neotragus.moschatus.liv			Bos.taurus		
Kobus.ellipsiprymnus			Pelea.capeolus	Aepyceros.melampus	Capra.caucasica	Capra.hircus			
Capra.sibirica			Pseudois.nayaur	Ammotragus.lervia	Capricornis.crispus	bosb8			
Nemorhaedus.caudatus	bosb1		Ovis.aries	Pantholops.hodgsoni	Addax.nasomaculatus				
Alcelaphus.buselaphus			Cephalophus.maxwellii	Oreotragus.oreotragus					

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

bosh2      ATGACCAATATCCGAAAAGCCACCCACTTATAAAAATTGTAAATAACGCATTTATTGAC
bosh4      ATGACCAATATCCGAAAACCCACCCACTTATAAAAATTGTAAATAACGCATTTATTGAC
bosh1      ATGACCAATATCCGAAAACCCACCCACTTATAAAAATTGTAAACAACGCATTTATTGAC
bosy1      ATGACCAATATCCGAAAACCCACCCACTCATAAAAATTGTAAATAACGCATTTATTGAC
bosy3      ATGACCAATATCCGAAAACCCACCCACTCATAAAAATTGTAAATAACGCATTTATTGAC
bosy2      ATGACCAATATCCGAAAACCCACCCACTCATAAAAATTGTAAATAACGCATTTATTGAC
bosb1      ATGACCAACATCCAAAAAECTACCCACTAATAAAAATCGTAAATAATGCATTTATTGAC
bosb2      ATGACCAACATCCGAAAACCTACCCACTAATAAAAATCGTAAATAATGCATTTATTGAC
bosb10     ATGACCAACATTCGAAAAACTACCCACTAATAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGAC
bosb4      ATGACCAACATTCGAAAAACTACCCACTAATAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGAC
bosb8      ATGACCAACATTCGAAAAACTACCCACTAATAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGAC
bosb9      ATGACCAACATTCGAAAAACTACCCACTAATAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGAC
bosb12     ATGACCAACATTCGAAAAACTACTCACTAATAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGAC

```

***** ** * **** * *** **** ***** ***** ** *** * *****

```

bosh2      CTTCAGCCCCATCAAAACATTTTCATCATGGTGAAACTTTGGCTCCCTCTTAGGCATCTGC
bosh4      CTTCAGCCCCATCAAAACATTTTCATCATGGTGAAACTTTGGCTCCCTCTTAGGCATCTGC
bosh1      CTTCAGCCCCATCAAAACATTTTCATCATGATGAAACTTTGGCTCCCTCTTAGGCATCTGC
bosy1      CTCCCAGCCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTTGGCTCCCTCTTAGGCATCTGC
bosy3      CTCCCAGCCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTTGGCTCCCTCTTAGGCATCTGC
bosy2      CTCCCAGCCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTTGGCTCCCTCTTAGGCATTTGC
bosb1      CTCCCAACCCACCAAAACATCTCATTGTGGTGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC
bosb2      CTCCCAACCCACCAAAACATCTCATTGTGGTGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC
bosb10     CTCCCAACCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC
bosb4      CTCCCAACCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC
bosb8      CTCCCAACCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC
bosb9      CTCCCAACCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC
bosb12     CTCCCAACCCCATCAAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCTTGGGCATCTGC

```

** *** ***** ***** **** ** ** ***** ***** * ***** **

```

bosh2      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACAGCCGACACAGCA
bosh4      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTGTTCTAGCAACACACTACACAGCCGACACAGCA
bosh1      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACAGCCGACACAGCA
bosy1      CTAATCCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACAGCCGACACGGCA
bosy3      CTAATCCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACAGCCGACACGGCA
bosy2      CTAATCCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACAGCCGACACGGCA
bosb1      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTATTTCATCCGACACAACA
bosb2      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTATTTCATCCGACACAACA
bosb10     CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACATTATACATCCGACACAACA
bosb4      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACATTATACATCCGACACAACA
bosb8      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACATTATACATCCGACACAACA
bosb9      CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACATTATACATCCGACACAACA
bosb12     CTAATTCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACATTATACATCCGACACAACA

```

***** ** ***** ** ** ***** **

bosh2 ACAGCATTCTCCTCCGTCACCCATATCTGTCGAGACGTTAACTATGGCTGAATCATCCGA
 bosh4 ACAGCATTCTCCTCCGTCACCCATATCTGTCGAGACGTTAACTATGGCTGAATCATCCGA
 bosh1 ACAGCATTCTCCTCCGTCACCCATATCTGTCGAGACGTTAACTATGGCTGAATCATCCGA
 bosy1 ACAGCATTCTCCTCCGTCACCCATATCTGTCGAGACGTTAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosy3 ACAGCATTCTCCTCCGTCACCCATATCTGTCGAGACGTTAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosy2 ACAGCATTCTCCTCCGTCACCCATATCTGTCGAGACGTTAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb1 ACAGCATTTTCTTCTGTAACACACATCTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb2 ACAGCATTTTCTTCTGTAACACACATCTGCCGAGACGTAAATTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb10 ACAGCATTCTCTTCTGTAACACACATTTGCCGAGATGTAAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb4 ACAGCATTCTCTTCTGTAACACATATTTGCCGAGATGTAAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb8 ACAGCATTCTCTTCCGTAACACATATTTGCCGGGATGTAAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb9 ACAGCATTCTCTTCTGTAACACATATTTGCCGGGATGTAAACTATGGCTGAATTATCCGA
 bosb12 ACAGCATTCTCTTCTGTAACACACATTTGCCGAGATGTAAACTATGGCTGGATTATCCGA

***** ** ** ** **

bosh2 TATATACATGCAAATGGAGCTTCAATATTCTTTATTTGCTTATTTATACAGTAGGACGA
 bosh4 TATATACATGCAAATGGAGCTTCAATATTCTTTATTTGCTTATTTATACAGTAGGACGA
 bosh1 TATATACATGCAAATGGAGCTTCAATATTCTTTATTTGCTTATTTATACAGTAGGACGA
 bosy1 TATATACATGCAAATGGAGCTTCAATATTCTTTATCTGCTTATTTATACAGTAGGACGA
 bosy3 TATATACATGCAAATGGAGCTTCAATATTCTTTATCTGCTTATTTATACAGTAGGACGA
 bosy2 TATATACATGCAAATGGAGCTTCAATATTCTTTATTTGCTTATTTATACAGTAGGACGA
 bosb1 TACATACAGCAAACGGAGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA
 bosb2 TACATACAGCAAACGGAGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA
 bosb10 TACATGCACGCAAACGGGGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA
 bosb4 TACATGCACGCAAACGGGGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA
 bosb8 TACATGCACGCAAACGGGGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA
 bosb9 TACATGCACGCAAACGGGGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA
 bosb12 TACATGCACGCAAACGGGGCATCAATATTTTCATCTGCCTATTCATACAGTAGGACGA

** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** *****

bosh2 GGCCTATATTATGGATCATACACTTTCCTCGAAACATGAAATGTTGGAGTAATCCTTCTA
 bosh4 GGCCTATATTATGGATCATACACTTTCCTCGAAACATGAAATGTTGGAGTAATCCTTCTA
 bosh1 GGCCTATATTATGGATCATACACTTTCCTCGAAACATGAAATGTTGGAGTAATCCTTCTA
 bosy1 GGCCTATATTATGGATCATACACTTTCCTCGAAACATGAAATGTTGGAGTAGTCTTCTA
 bosy3 GGCCTATATTATGGATCATACACTTTCCTCGAAACATGAAATGTTGGAGTAGTCTTCTA
 bosy2 GGCCTATATTATGGATCATACACTTTCCTCGAAACATGAAATGTTGGAGTAGTCTTCTA
 bosb1 GGCCTATACTACGGATCATACACTTTCCTCAGAGACATGAAATATGGGGTAATCCTTCTA
 bosb2 GGCCTATACTACGGATCATACACTTTCCTCAGAGACATGAAATATGGGGTAATCCTTCTA
 bosb10 GGCTTATACTATGGATCATACACTTTCCTTAGAAACATGAAATATGGAGTAATTCCTCTA
 bosb4 GGCTTATACTATGGATCATACACTTTCCTTAGAAACATGAAATATGGAGTAATTCCTCTA
 bosb8 GGCTTATACTATGGATCATACACTTTCCTTAGAAACATGAAATATGGAGTAATTCCTCTA
 bosb9 GGCTTATACTATGGATCATACACTTTCCTTAGAAACATGAAATATGGAGTAATTCCTCTA

```

bosb12      GGCTTATACTATGGATCATACACTTTCTTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATTCTCCTA
              *** ** ** ***** ** ***** **** ** * **
bosb2        TTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGATATGTCTTACCATGAGGACAAATATCCTTC
bosb4        TTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGATATGTCTTACCATGAGGACAAATATCCTTC
bosb1        TTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGATATGTCTTACCATGAGGACAAATATCCTTC
bosy1        TTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGATATGTCTTACCATGAGGACAAATATCCTTC
bosy3        TTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGATATGTCTTACCATGAGGACAAATATCCTTC
bosy2        TTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGATATGTCTTACCATGAGGACAAATATCCTTC
bosb1        CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATGGGTTACGTCTACCATGAGGACAAATATCATTTC
bosb2        CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATGGGTTACGTCTACCATGAGGACAAATATCATTTC
bosb10       CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATAGGTTATGTCTTACCATGGGACAAATATCATTTC
bosb4        CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATAGGTTATGTCTTACCATGGGACAAATATCATTTC
bosb8        CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATAGGTTATGTCTTACCATGGGACAAATATCATTTC
bosb9        CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATAGGTTATGTCTTACCATGGGACAAATATCATTTC
bosb12       CTCACAACAATAGCTACAGCATTTCATAGGTTACGTCTTACCATGGGACAAATATCATTTC
              ** ***** ***** ** ** ** ** ***** ***** *****
bosb2        TGAGGAGCAACAGTCATCACTAATCTTCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAATCTA
bosb4        TGAGGAGCAACAGTCATCACTAATCTTCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAACCTA
bosb1        TGAGGAGCAACAGTCATCACTAATCTTCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAACCTA
bosy1        TGAGGAGCAACAGTCATCACTAATCTTCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAACCTA
bosy3        TGAGGAGCAACAGTCATCACTAATCTTCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAACCTA
bosy2        TGAGGAGCAACAGTCATCACTAATCTTCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAACCTA
bosb1        TGAGGGGCCACAGTCATCACAATCTCCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAAGCCTA
bosb2        TGAGGGGCCACAGTCATCACAATCTCCTCTCAGCAATTCATATATTGGCACAAGCCTA
bosb10       TGAGGGGCCACGGTCATCACTAATCTCCTCTCAGCAATCCATATATTGGCACAACCTA
bosb4        TGAGGGGCCACGGTCATCACTAATCTCCTCTCAGCAATCCATATATTGGCACAACCTA
bosb8        TGAGGGGCCACGGTCATCACTAATCTCCTCTCAGCAATCCATATATTGGCACAACCTA
bosb9        TGAGGGGCCACGGTCATCACTAATCTCCTCTCAGCAATCCATATATTGGCACAACCTA
bosb12       TGAGGGGCCACGGTCATCACTAATCTCCTCTCAGCAATCCATATATCGGCACAACCTA
              ***** ** ** ***** ***** ***** ***** *****
bosb2        GTTGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGATAAAGCAACCCTAACCCGATTCTTCGCC
bosb4        GTTGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGATAAAGCAACCCTAACCCGATTCTTCGCC
bosb1        GTTGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGATAAAGCAACCCTAACCCGATTCTTCGCC
bosy1        GTTGAATGAATCTGAGGGGGTTCTCAGTAGATAAAGCAACCCTAACCCGATTTTTCGCC
bosy3        GTTGAATGAATCTGAGGGGGTTCTCAGTAGATAAAGCAACCCTAACCCGATTTTTCGCC
bosy2        GTTGAATGAATCTGAGGGGGTTCTCAGTAGATAAAGCAACCCTAACCCGATTTTTCGCC
bosb1        GTCGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACTCTACCCGATTCTTCGCC
bosb2        GTCGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACTCTACCCGATTCTTCGCC
bosb10       GTCGAATGAGTCTGAGGGGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACCCTCACACGATTTTTCGCC
bosb4        GTCGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACCCTCACACGATTTTTCGCC
bosb8        GTCGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACCCTCACACGATTTTTCGCC

```

```

bosb9      GTCGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACCCTCACACGATTTTTTGCC
bosb12     GTCGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCCGTAGACAAAGCCACCCTCACACGATTTTTTGCC
            ** ***** ***** ** ***** ***** ***** ** ** ** ***** ** **

bosb2      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCTACAGTACACCTCCTATTTCTC
bosb4      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCTACAGTACACCTCCTATTTCTT
bosb1      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCTACAGTACACCTCCTATTTCTC
bosy1      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCCACAGTACACCTCCTATTTCTC
bosy3      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCCACAGTACACCTCCTATTTCTC
bosy2      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCCACAGTACACCTCCTATTTCTC
bosb1      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCTATAGTCCACCTACTTTCTCTC
bosb2      TTCCACTTTATCCTTCCATTTCATTCATTGCGGCTCTTGCTATAGTCCACCTACTTTCTCTC
bosb10     TTCCACTTTATCCTTCCCTTTTATCATTATAGCCCTCGCCATAGTACATCTACTCTTCTCTC
bosb4      TTCCACTTTATCCTTCCCTTTTATCATTATAGCCCTCGCCATAGTACATCTACTCTTCTCTC
bosb8      TTCCACTTTATCCTTCCCTTTTATCATTATAGCCCTCGCCATAGTACATCTACTCTTCTCTC
bosb9      TTCCACTTTATCCTTCCCTTTTATCATTATAGCCCTCGCCATAGTACATCTACTCTTCTCTC
bosb12     TTCCACTTTATCCTTCCCTTTTATCATTATAGCCCTCGCCATAGTACATCTACTCTTCTCTC
            ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *****

bosb2      CATGAAACAGGATCCAACAATCCACAGGAATTCATCAGATGCAGACAAAATTCGGTTT
bosb4      CATGAAACAGGATCCAACAATCCACAGGAATTCATCAGATGCAGACAAAATTCGGTTT
bosb1      CATGAAACAGGATCCAACAATCCACAGGAATTCATCAGATGCAGACAAAATTCGGTTT
bosy1      CATGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTCATCAGATGCAGACAAAATTCATT
bosy3      CATGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTCATCAGATGCAGACAAAATTCATT
bosy2      CATGAAACAGGATCCAGCAACCCACAGGAATTCATCAGATGTAGACAAAATTCATT
bosb1      CATGAGACAGGATCCAACAACCCACAGGTATCCCATCAGACATAGACAAAATCCCATTT
bosb2      CATGAGACAGGATCCAACAACCCACAGGTATCCCATCAGACATAGACAAAATCCCATTT
bosb10     CACGAAACAGGATCTAACAACCCACAGGAATTCATCAGACTCAGACAAAATCCCATTT
bosb4      CACGAAACAGGATCTAACAACCCACAGGAATTCATCAGACTCAGACAAAATCCCATTT
bosb8      CACGAAACAGGATCTAACAACCCACAGGAATTCATCAGACTCAGACAAAATCCCATTT
bosb9      CACGAAACAGGATCTAACAACCCACAGGAATTCATCAGACTCAGACAAAATCCCATTT
bosb12     CACGAAACAGGATCTAACAACCCACAGGAATTCATCAGACTCAGACAAAATCCCATTT
            ** ** ***** * ** ***** ** ***** ***** ** **

bosb2      CACCCCTATTACACCATTAAGACATCCTAGGCGGCCTACTACTAATCTTAGCCCTCATA
bosb4      CACCCCTATTACACCATCAAAGACATCCTAGGCGGCCTACTACTAATCTTAGCCCTCATA
bosb1      CACCCCTACTACACCATTAAGATATCCTAGGCGGCCTACTACTAATCTTAGCCCTCATA
bosy1      CACCCCTACTACACCATCAAAGACATCTTAGGCGGCCTACTACTAATCTTAGCCCTCATA
bosy3      CACCCCTACTACACCATCAAAGACATCTTAGGCGGCCTACTACTAATCTTAGCCCTCATA
bosy2      CACCCCTACTACACCATCAAAGACATCTTAGGCGGCCTACTACTAATCTTAGCCCTCATA
bosb1      CACCCCTATTATACAATCAAAGATATTCTAGGCGCTATACTACTAATCCTACCCCTATA
bosb2      CACCCCTATTATACAATCAAAGATATTCTAGGCGCTATACTACTAATCCTACCCCTATA
bosb10     CACCCCTACTATACAATTAAGATGTTCTAGGCGCTATACTACTAATCCTACCTCATG
bosb4      CACCCCTACTATACAATTAAGATGTTCTAGGCGCCATACTACTAATCCTACCTCATG

```

```

bosb8      CACCCCTACTATACAATTAAGATGTTCTAGGCGCCATACTACTAATCCTCATCCTCATG
bosb9      CACCCCTACTATACAATTAAGATGTTCTAGGCGCCATACTACTAATCCTCATCCTCATG
bosb12     CACCCCTACTATACAATTAAGATGTTCTAGGCGCCATACTGCTAATCCTCATCCTCATG
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
bosb2      CTCCTAGTTCTATTTCGCACCAGACCTACTCGGAGACCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosb4      CTCCTAGTTCTATTTCGCACCAGACCTACTCGGAGACCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosb1      CTCCTAGTTCTATTTCGCACCAGACCTACTCGGAGACCCGAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosy1      CTCCTAGTTCTATTTCGCACCAGACCTACTCGGAGACCCGAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosy3      CTCCTAGTTCTATTTCGCACCAGACCTACTCGGAGACCCGAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosy2      CTCCTAGTTCTATTTCGCACCAGACCTACTCGGAGACCCGAGACAACCTATAQCCAGCAAAT
bosb1      TTACTAGTATTATTTCACACCCGACTTACTTGGAGACCCAGACAATTATACTCCAGCAAAT
bosb2      TTACTAGTATTATTTCACACCCGACTTACTTGGAGACCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAC
bosb10     CTACTAGTGCTATTTCACACCCGACCTATTTGGAGATCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosb4      CTACTAGTGCTATTTCACACCCGACCTACTTGGAGATCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosb8      CTACTAGTGCTATTTCACACCCGACCTACTTGGAGATCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosb9      CTACTAGTGCTATTTCACACCCGACCTACTTGGAGATCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
bosb12     CTACTAGTGCTATTTCACACCCGACCTACTTGGAGATCCAGACAACCTATACTCCAGCAAAT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bosb2      CCACTAAATACACCCCCACACATTAACCCGAATGATATTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosb4      CCACTAAATACGCCCCACACATTAACCCGAATGATATTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosb1      CCACTAAATACACCCCCACACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosy1      CCACTAAACACACCCCCACACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosy3      CCACTAAACACACCCCCACACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosy2      CCACTAAACACACCCCCACACATTAACCCGAATGATATTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosb1      CCACTCAGCACACCCCTCACATTAACCCGAATGATACTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosb2      CCACTCAGCACACCCCTCACATTAACCCGAATGATATTTCTATTTCGCATATGCAATC
bosb10     CCACTCAACACACCCCTCACATTAAGCCCGAGTGATATTTCTATTTCGCATACGCAATC
bosb4      CCACTCAACACACCCCTCACATTAAGCCCGAGTGATATTTCTATTTCGCATACGCAATC
bosb8      CCACTTAACACACCCCTCACATTAAGCCCGAGTGATACTTCTATTTCGCATACGCAATC
bosb9      CCACTCAACACACCCCTCACATTAAGCCCGAGTGATACTTCTATTTCGCATACGCAATC
bosb12     CCACTCAACACACCCCTCACATTAAGCCCGAGTGATACTTCTATTTCGCATACGCAATC
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bosb2      CTCCGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGCGTCTTAGCCCTAGTTCTCTCAATCCTAATT
bosb4      CTCCGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGCGTCTTAGCCCTAGTTCTCTCAATCCTAATT
bosb1      CTCCGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGCGTCTTAGCCCTAGTTCTCTCAATCCTAATT
bosy1      CTCCGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGCGTCTTGGCCCTAGTTCTTTCAATCCTAATT
bosy3      CTCCGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGCGTCTTGGCCCTAGTTCTTTCAATCCTAATT
bosy2      CTCCGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGCGTCTTAGCCCTAGTTCTTTCAATCCTAATT
bosb1      TTACGATCAATCCCCAATAAACTAGGCGGAGTCCTAGCCCTGGTCTCTCAATTTTAATT
bosb2      TTACGATCAATCCCCAATAAACTAGGCGGAGTCCTAGCCCTGGTCTCTCAATTTTAATT
bosb10     CTACGATCAATCCCCAATAAACTAGGTGGAGTCCTGGCCCTAGTCTCTCAATCCTAATC

```

```

bosb4      CTACGATCAATTCCCAATAAACTAGGTGGAGTCCTGGCCCTAGTCCTCTCAATCCTAATC
bosb8      CTACGATCAATTCCCAATAAACTAGGTGGAGTCCTGGCCCTAGTCCTCTCAATCCTAATC
bosb9      CTACGATCAATTCCCAATAAACTAGGTGGAGTCCTGGCCCTAGTCCTCTCAATCCTAATC
bosb12     CTACGATCAATTCCCAATAAACTAGGTGGAGTCCTGGCCCTAGTCCTCTCAATCCTAATC
           * ***** ** ***** ** *** * ***** ** ** ***** ****

bosh2      CTAGTTCTTATACCCCTGCTCCACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTCGACCAATC
bosh4      CTAGTTCTTATACCCCTGCTCCACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTCGACCAATC
bosh1      CTAGTTCTTATACCCCTGCTCCACACATCCAGACAACGAAGCATAATATTCGACCAATC
bosy1      CTAATCCTTATACCCCTACTTCACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTCGACCAATC
bosy3      CTAATCCTTATACCCCTACTTCACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTCGACCAATC
bosy2      CTAATCCTTATACCCCTACTTCACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTCGACCAATC
bosb1      CTAGCAATTGTACCTCTCCTCCACACATCCAAACAACGAAGCATGATATTCGACCAATC
bosb2      CTAGTAATTGTACCCCTCCTCCACACATCCAAACAACGAAGCATGATATTCGACCAATC
bosb10     TTAGGGCTCGTACCCTTCTCCACACATCCAAACAACGAAGTATAATATTCGACCAATC
bosb4      TTAGCGCTCGTACCCTTCTCCACACATCCAAACAACGAAGTATAATATTCGACCAATC
bosb8      TTAGCGCTCGTACCCTTCTCCACACATCCAAACAACGAAGTATAATATTCGACCAATC
bosb9      TTAGCGCTCGTACCCTTCTCCACACATCCAAACAACGAAGTATAATATTCGACCAATC
bosb12     TTAGCACTCGTACCTTTCTCCACACATCCAAACAACGAAGTATAATATTCGACCAATC
           **      * ***** * ** ***** ***** ** *****

bosh2      AGCCAAATGCTTATTCTGAATTCTAGTAGCAGATCTACTAACAACATGAATCGGGGGA
bosh4      AGCCAAATGCTTATTCTGAATTCTAGTAGCAGATCTACTAACAACATGAATCGGAGGA
bosh1      AGCCAAATGCTTATTCTGAATTCTAGTAGCAGATCTACTAACAACATGAATCGGGGGA
bosy1      AGCCAAATGCTTATTCTGAATTCTAGTAGCAGACCTACTAACAACATGAATCGGGGGA
bosy3      AGCCAAATGCTTATTCTGAATTCTAGTAGCAGACCTACTAACAACATGAATCGGGGGA
bosy2      AGCCAAATGCTTATTCTGAATTTAGTAGCAGACCTACTAACAACATGAATCGGGGGA
bosb1      AGCCAAATGCTTATTCTGAACCTAGTAGCAGATTTACTAGCACTCAGATGAATTGGAGGA
bosb2      AGCCAAATGCTTATTCTGAACCTAGTAGCAGATTTACTAGCACTCAGATGAATTGGAGGA
bosb10     AGCCAAATGTATGTTCTGAATCCTAGTAGCAGACTTACTAACAACATGAATGGAGGA
bosb4      AGCCAAATGTATGTTCTGAATCCTAGTGGCAGACTTACTAACAACATGAATGGAGGA
bosb8      AGCCAAATGTATGTTCTGAATCCTAGTGGCAGACTTACTAACAACATGAATGGAGGA
bosb9      AGCCAAATGTATGTTCTGAATCCTAGTGGCAGACTTACTAACAACATGAATGGAGGA
bosb12     AGCCAAATGTATGTTCTGAATCCTAGTGGCAGACTTACTAACAACATGAATGGAGGA
           ***** * ***** ***** ***** ***** ***** ** ***

bosh2      CAACCAGTTGAACACCCATATATTATTATCGGACAACCTAGCGTCTATCATATATTCCTA
bosh4      CAACCAGTTGAACACCCATATATTATTATCGGACAACCTAGCGTCCATCATATATTCCTA
bosh1      CAACCAGTTGAACACCCATATACTATTATTGGACAGCTAGCGTCTATCATATATTCCTA
bosy1      CAACCAGTTGAACACCCATATATTATTATCGGACAACCTAGCATCTATCATATATTCCTA
bosy3      CAACCAGTTGAACACCCATATATTATTATCGGACAACCTAGCATCTATCATATATTCCTA
bosy2      CAACCAGTTGAACACCCATATATTATTATCGGACAACCTAGCATCTATCATATATTCCTA
bosb1      CAACCAGTCGAATATCCCTACATTATCATTGGACAACCTGGCTCCATCATATATTCCTC
bosb2      CAACCAGTCGAATATCCCTATATTATTATTGGACAACCTGGCTCCATCATATATTCCTC

```

```

bosb10    CAACCAGTCGACCAACCCTACATCATTATTGGACAACCTAGCATCCATCATATATTTTCCTT
bosb4     CAACCAGTCGACCAACCCTACATCATTATTGGACAACCTAGCATCCATCATATATTTTCCTT
bosb8     CAACCAGTCGACCAACCCTACATCATTATTGGACAACCTAGCATCTATCATATATTTTCCTC
bosb9     CAACCAGTCGACCAACCCTACATCATTATTGGACAACCTAGCATCTATCATATATTTTCCTC
bosb12    CAACCAGTCGACCAACCCTACATCATTATTGGACAACCTAGCATCTATCATATATTTTCCTT
          ***** ** * ** ** * ** ** ***** ** ** ** *****
          *

bosh2     CTTATTCTAGTACTAATACCAGTAGCCAGTACTATCGAAAATAACCTTCTAAAATGAAGA
bosh4     CTTATTCTAGTACTAATACCAGTAGCCAGTACTATCGAAAATAACCTTCTAAAATGAAGA
bosh1     CTTATTCTAGTACTAATACCAGTAGCCAGTACTATCGAAAATAACCTTCTAAAATGAAGA
bosy1     CTTATTCTAGTACTAATACCAGTAGCCAGTACTATCGAAAATAACCTTCTAAAATGAAGA
bosy3     CTTATTCTAGTACTAATACCAGTAGCCAGTACTATCGAAAATAACCTTCTAAAATGAAGA
bosy2     CTTATTCTAGTACTAATACCAGTAGCCAGTACTATCGAAAATAACCTTCTAAAATGAAGA
bosb1     ATTATCCTAGTACTAATACCAGTAGCTGGCACCATCGAAAACAATCTCCTAAAATGAAGA
bosb2     ATTATCCTAGTACTAATACCAGTAGCTGGCACCATCGAAAACAATCTCCTAAAATGAAGA
bosb10    ATTATCCTAGTACTACTACCAGTAGCTAGCACCATCGAAAATAACCTCCTGAAATGAAGA
bosb4     ATTATCCTAGTACTACTACCAGTAGCTAGCACCATCGAAAATAACCTCCTGAAATGAAGA
bosb8     ATTATCCTAGTACTACTACCAGTAGCTAGCACCATCGAAAATAACCTCCTGAAATGAAGA
bosb9     ATTATCCTAGTACTACTACCAGTAGCTAGCACCATCGAAAATAACCTCCTGAAATGAAGA
bosb12    ATCATCCTAGTACTACTACCAGTAGCTAGCACCATCGAAAATAACCTTCTGAAATGAAGA
          * ** ***** ***** * ** ***** ** ** ** *****

```

图 1 细胞色素 *b* 基因排序结果

Fig. 1 alignment result of Cytb gene

图 1 注: Bosh1、Bosh2、Bosh4 分别代表黄羊三个个体, Bosy1、Bosy、2Bosy3 分别代表藏原羚三个个体, Bosb1、Bosb2 代表二个斑羚个体, Bosb4、Bosb8、Bosb9、Bosb10、Bosb12 代表五个鬣羚个体

Fig.1 Note: Bosh1,Bosh2,Bosh4 denote three Mongolian gazella samples; Bosy1,Bosy2,Bosy3 denote three Tibetan gazella samples; Bosb1, Bosb2 denotes two Goral samples; Bosb4,Bosb8,Bosb9,Bosb10,Bosb12 denotes five Serow samples

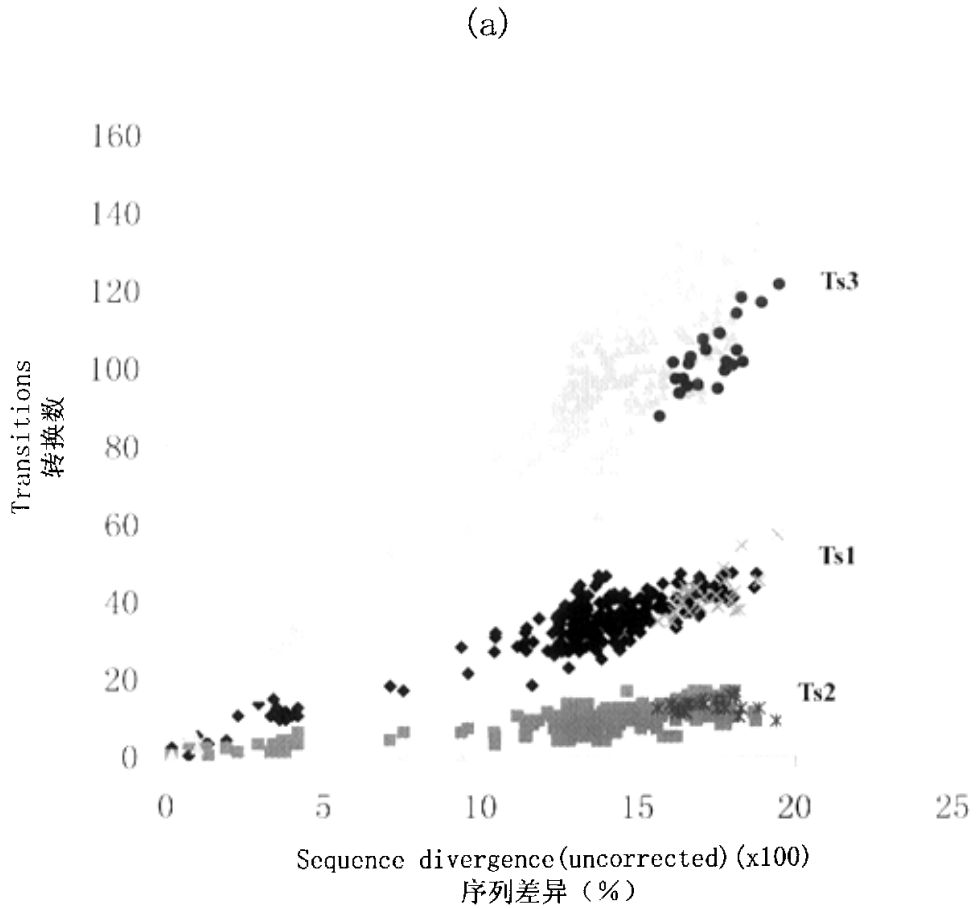


图 2. 羚羊亚科细胞色素 b 基因核酸替换方式图。(a) 原羚属, 羚羊亚科和外群比较 (牛) 序列差异核酸转换图 (第一 ts1、第二 ts2、第三 ts3 密码子)。●、×、* 表示羚羊亚科与外群比较;

Fig.2. Patterns of nucleotide substitutions among cytochrome b sequences of the *Antilopinae*. (a) Transitionsa(ts) at first,second,and third codon positions(ts1,ts2,ts3) against uncorrected sequence divergence(x100) with the genera(*procapra*),between the genera of the *Antilopinae* and comparisons with the outgroups(*bos taurus*). “●、×、*”indicated the Antilopinae comparisons with the outgroups(*bos taurus*).

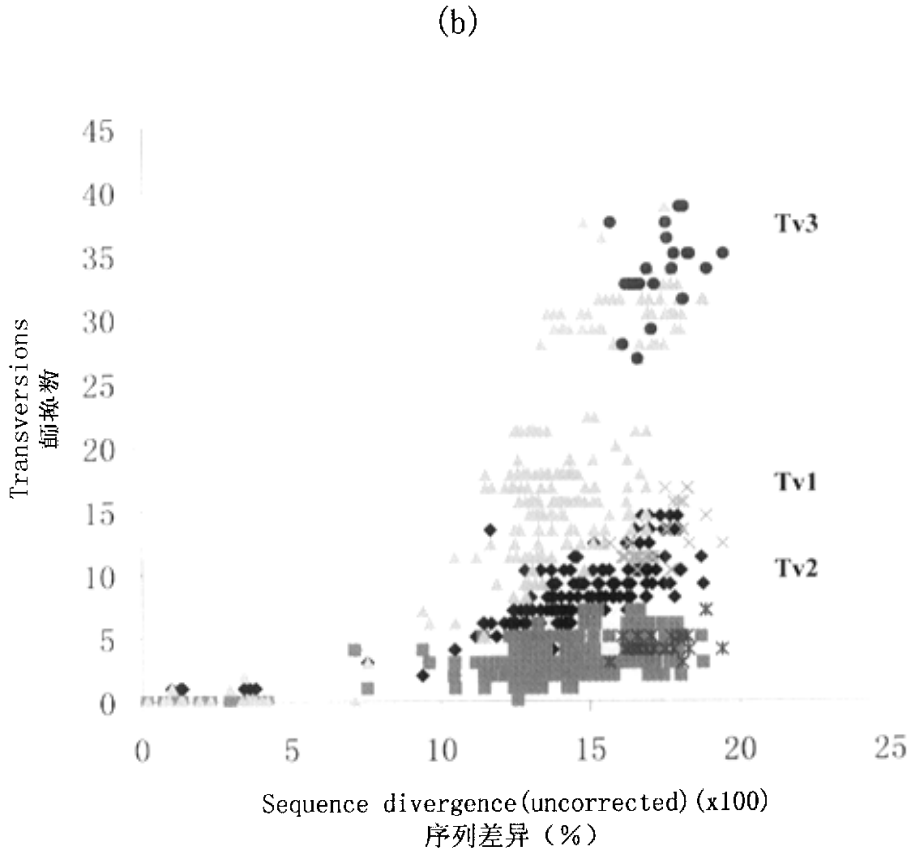


图 2. 羚羊亚科细胞色素 b 基因核酸替换方式图。(b) 原羚属, 羚羊亚科和外群比较 (牛) 序列差异核酸颠换图 (第一 tv1、第二 tv2、第三 tv3 密码子)。“●、×、*”表示羚羊亚科与外群比较。

Fig.2. Patterns of nucleotide substitutions among cytochrome b sequences of the *Antilopinae*. (b) Transversions(tv) at first,second,and third codon positions(tv1,tv2,tv3) against uncorrected sequence divergence(x100) with the genera (*procapra*),between the genera of the *Antilopinae* and comparisons with the outgroups(*bos taurus*). “●、×、*”indicated the Antilopinae comparisons with the outgroups(*bos taurus*).

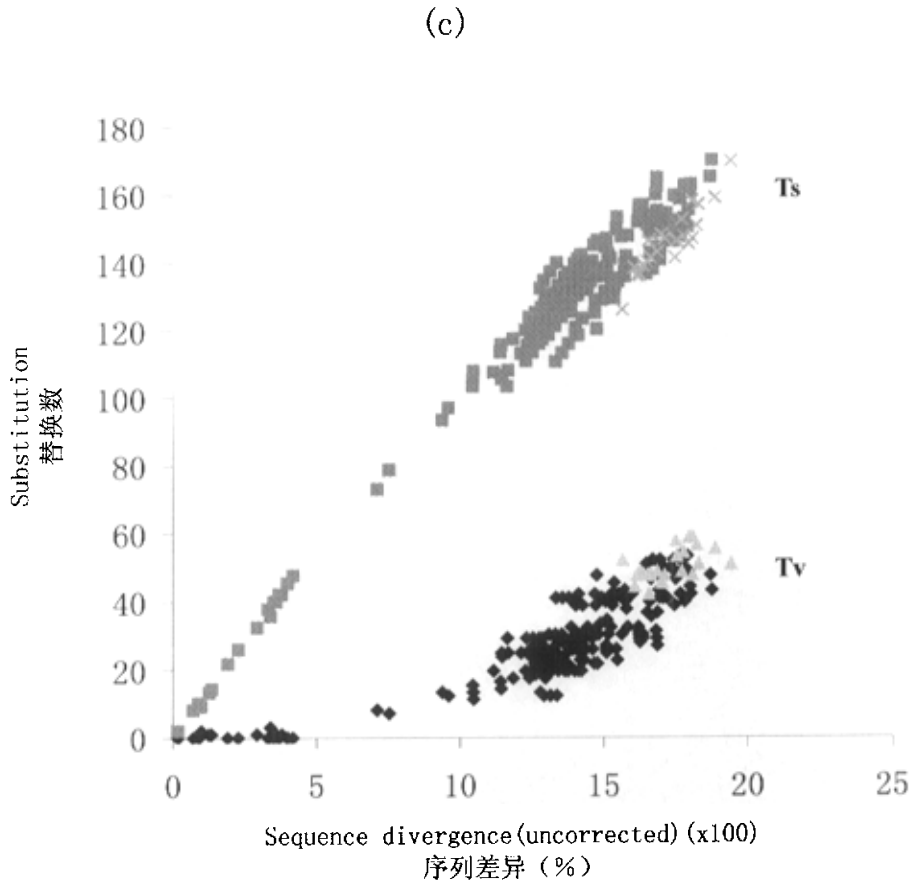


图 2. 羚羊亚科细胞色素 b 基因核酸替换方式图。(c) 原羚属，羚羊亚科和外群比较（牛）
序列差异核酸替换图（替换 ts、颠换 tv）。“×、△”表示羚羊亚科与外群比较

Fig.2. Patterns of nucleotide substitutions among cytochrome b sequences of the *Antilopinae*. (c) Substitutions at transitionsa(ts) and transversions(tv) against uncorrected sequence divergence(x100) with the genera(*procapra*),between the genera of the *Antilopinae* and comparisons with the outgroups(*bos taurus*). “×、△” indicated the *Antilopinae* comparisons with the outgroups(*bos taurus*).

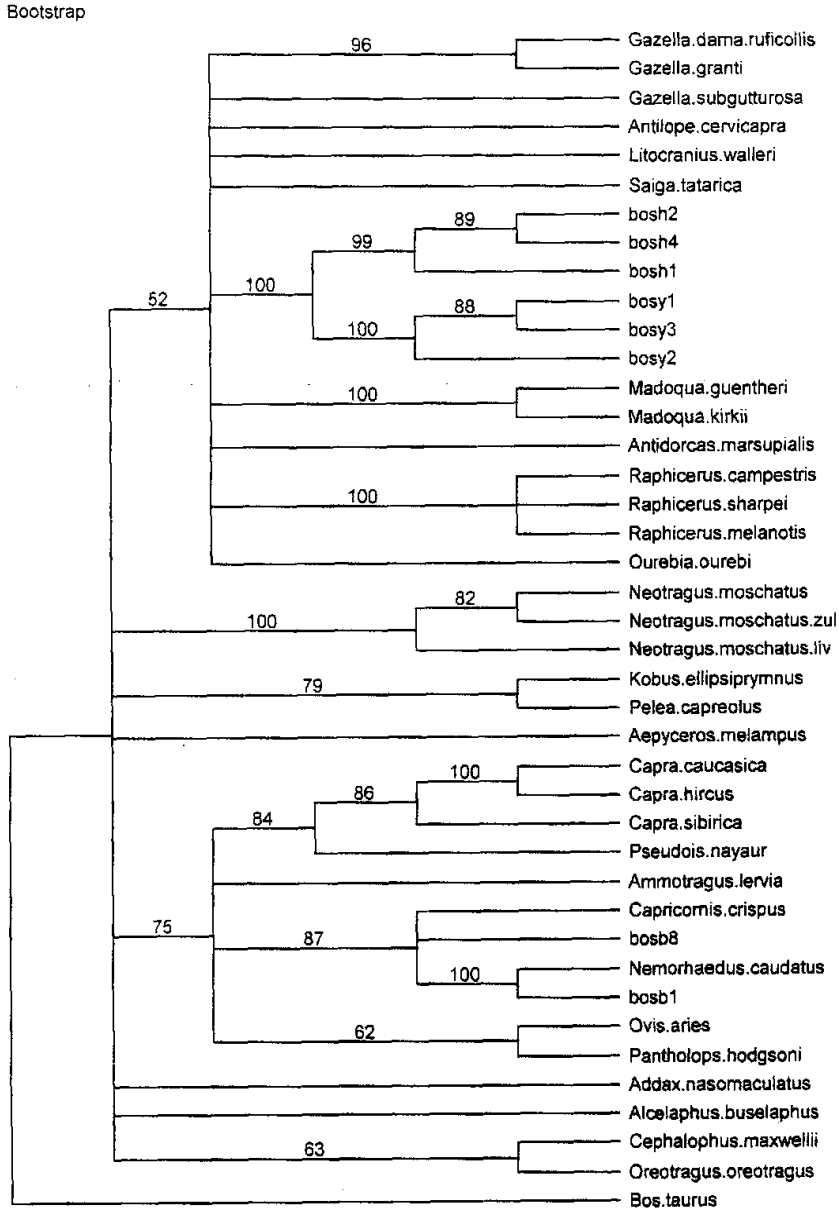


图 3 基于 Cyt b 基因序列构建的牛科动物简约 (MP) (4 倍加权) 系统进化树

Fig.3 most parsimonious (four times weighting) tree based on the cytochrome b sequences data set for Bovidae

图中数字为自引导值, 去掉自引导值低于 50% 的结点。Bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 见表 1 注释 (Numbers on the tree represent bootstrap value, bootstrap values < 50% were removed. Bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 are noted in Table 1)

Bootstrap

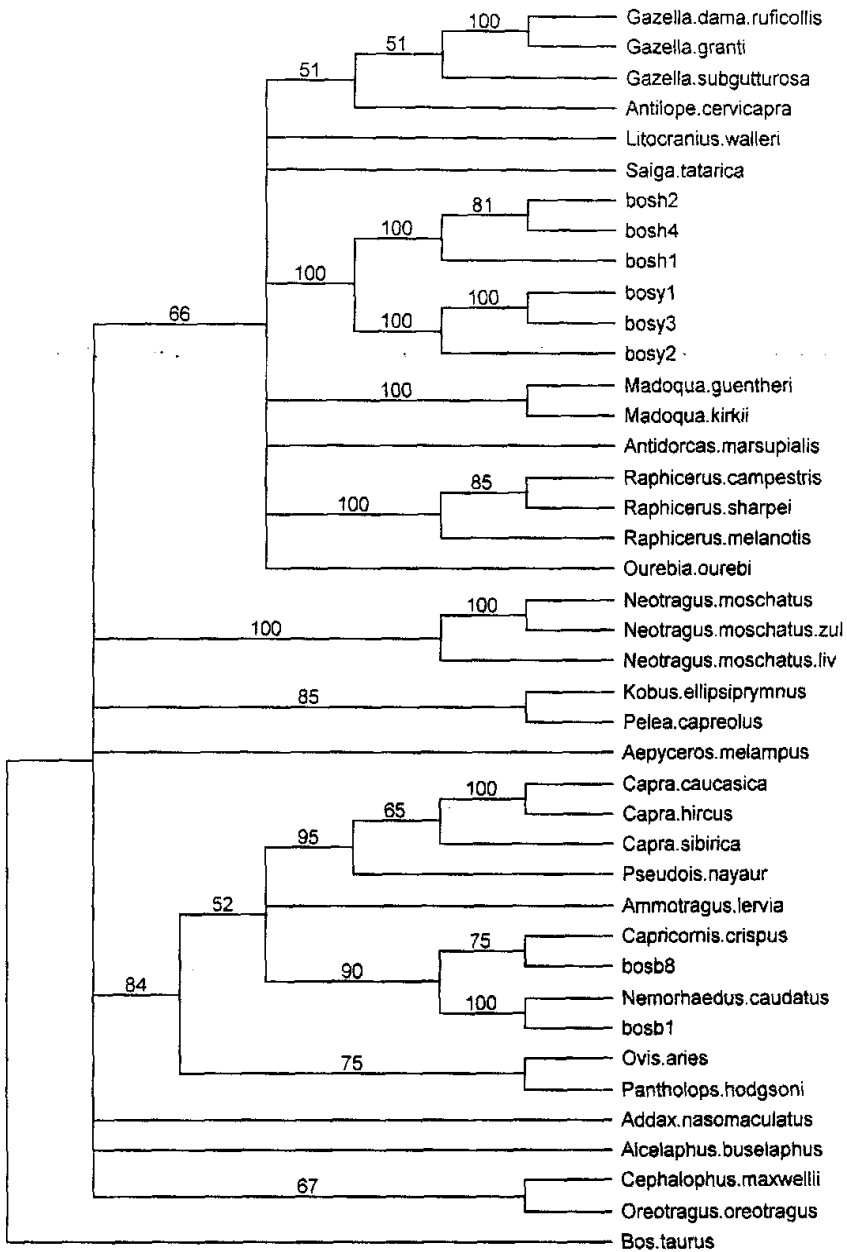


图 4 基于 Cyt b 基因序列构建的牛科动物邻近 (N J) 系统进化树

Fig.4 Neighbor-joining tree based on the cytochrome b sequences date set for Bovidae

图中数字为自引导值, 去掉自引导值低于 50% 的结点。Bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 见表 1 注释 (Numbers on the tree represent bootstrap value, bootstrap values < 50% were removed. Bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 are noted in Table 1)

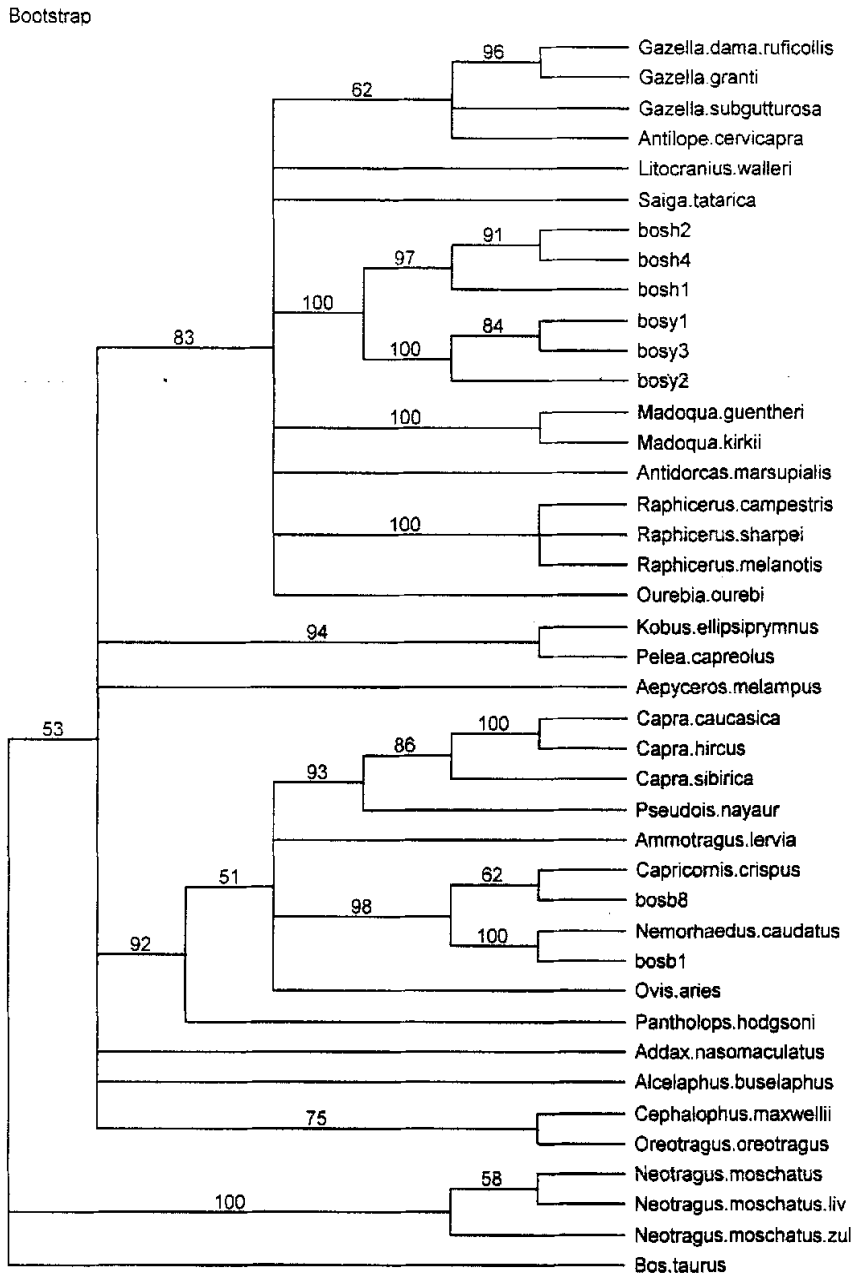


图 5 基于 Cyt b 基因序列构建的牛科动物最大似然 (ML) (4 倍加权) 系统进化树
Fig.5 Maximum-likelihood tree based on the cytochrome b sequences date set for Bovidae
(four times weighting)

图中数字为自引导值, 去掉自引导值低于 50% 的结点。Bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 见表 1 注释 (Numbers on the tree represent bootstrap value, bootstrap values < 50% were removed. Bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 are noted in Table 1)

第四部分 结论与展望

根据以上的分析和讨论，我们可以得到如下的结论：

1. 通过对线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因全序列分析，我们赞成：黄羊和藏原羚列为同一属不同种，此属为独立属（原羚属 *Procapra*）。
2. 根据黄羊和藏原羚转换远未饱和现象，我们选择牛科动物已校正的细胞色素 *b* 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟，从分子水平上推测：推测黄羊和藏原羚的分歧时间大约在 1~2 百万年。
3. 原羚属与赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等是并系发生，起源于共同祖先、为羚羊亚科下姊妹群。根据细胞色素 *b* 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟，推测原羚属与赛加羚羊属的分歧时间大约在 5.7~6.3 百万年、原羚属与犬羚属的分歧时间大约在 6.1~7.2 百万年、原羚属与羚羊属的分歧时间大约在 6.4~7.1 百万年、原羚属与跳羚属的分歧时间大约在 6.2~6.8 百万年；而和关系较远的岛羚属、藏羚属、山羚属分歧时间大约在 7~8 百万年。
4. 我们的细胞色素 *b* 基因全序列数据分析羚羊亚科所得到的基因进化树，与传统分类不太相符合。主要是羚羊亚科岛羚属、山羚属、藏羚属三属的分类地位，山羚属与马羚亚科小羚羊属聚为一支；岛羚属在 MP、NJ 树上单列为一支，ML 树上显示出岛羚属应是其它聚类群的基础分支；藏羚属应隶属于羊亚科，为羊亚科的基础进化支。基于羚羊亚科 Cytb 基因进化树与传统分类地位的差异，深入的研究还有待于充实和完善，选用不同的遗传标记（包括线粒体和核基因），同时结合古化石、形态、行为、细胞和生态等多方面的资料共同探讨分析，才可能得出羚羊亚科真实的物种系统进化树。
5. 由于普氏原羚样本的欠缺，使本次原羚属属内物种系统起源分析产生遗憾。获取普氏原羚样本，与黄羊和藏原羚共同进行分子水平分析，将有助于准确的阐述原羚属的系统起源，从整体上理解牛科动物的进化历程，丰富和完善牛科动物的进化内容。

参考文献

1. Allen G. Natural history of central Asia. Vol . 2 , The mammal of China and Mongolia. New York : American Museum of Natural History , 1940. 1 208~1 278.
2. Bettine J v V, Terence J R. 2001 Retrial of four adaptive lineages in Duiker Antelope:evidence from mitochondrial DNA sequences and fluorescence in situ hybridization[J]. Mol Phy Evol, 20(3):409-425.
3. Birungi J , Arctander P. 2001 Molecular systematics and phylogenetics of the reduncini (Artiodactyla: Bovidae) inferred from the analysis of mitochondrial cytochrome b gene sequences [J]. J Mammal Evol, 8 (2): 125-147.
4. Ellerman J R , Morrison-Scott T. 1951 Checklist of Palaearctic and Indian Mammals. London.
5. Gatesy J, Amato G, Vrba E S, Schaller G, DeSalle R A. 1997 cladistic analysis of mitochondrial ribosomal DNA from the Bovidae[J]. Mol Phylogenet Evol, 7: 303-319.
6. Groves C. On the gazelles of the genus *Procapra* Hodgson, 1846[J]. Z. Saugetierk, 1967, 32: 144-149.
7. Groves C P. Phylogenetic relationships within recent Antilopini (Bovidae) [A]. In: Vrba S and Shaller G, eds., pp. Antelopes, Deer, and Relatives[C], Yale University Press, New Haven and London, 2000. 223-233.
8. Hassanin A , Douzery E J. 1999 The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene[J]. Mol Phylogenet Evol, 13 (2): 227-243.
9. Hassanin A, Lecointre G, Tillier S. 1998 The “evolutionary signal” of homoplasy in protein-coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny[J]. C R Acad Sci III Sci Vie, 321 (7): 611-620.
10. Hassanin A, Pasquet E , Vigne J D. 1998 Molecular systematics of the subfamily

- Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as determined from cytochrome b sequences[J].
J Mammal Evol, 5 (3): 217-236.
11. Hedges S B, Bezy R L, Maxson L R. 1991 Phylogenetic relationships and biogeography of xantuslid lizards, inferred from mitochondrial DNA sequences[J].
Mol Bio Evol, 8:767-780.
12. Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. 1991 Evolution of cytochrome b gene of mammals[J]. J Mol Evol, 32:128~144.
13. Kikkawa, Y, H. Yonekawa, H. Suzuki and T. Amano 1997 Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoas based on variations in the mitochondrial gene for cytochrome *b*. Anim Genet, 28:195~201.
14. Kleinchmidt A. 1961 ber die groe mongolische Kropfgazelle (*Procapra gutturosa* , Pallas 1777) . *Stuttgarter Beitræge zur Naturkunde* , 79 : 1~24.
15. Knight A , Mindell DP. 1993 Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of fea's viper[J]. Syst Biol, 42(1):18-31.
16. Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. Phylogenetic and molecular evolutionary analysis were conducted using MEGA version 2.0.2001.
17. Kuznetsova M V, Kholodova M V. 2002 Molecular Support for the Placement of *Saiga* and *Procapra* in Antilopinae (Artiodactyla, Bovidae) [J]. J Mam Evol, 9(4):271-280.
18. Lei R , Hu Z , Jiang Z , *et al* . 2003b Phylogeography and genetic diversity of the critically endangered Przewalski' s gazelle[J] . Animal Conservation , 6 (4) :361-367.
19. Lei R , Jiang Z , Hu Z , *et al* . 2003a Phylogenetic relationships of Chinese antelopes (sub family Antilopinae) based on mitochondrial Ribosomal RNA gene sequences[J]. Journal of Zoology (London) , 261 (3) :227-237.
20. Li, W.H., T. Gokobori and M .Nei 1981 Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. Nature , 292:237~239.
21. Masuda R, Yoshida M C. 1994 A molecular phylogeny of the family

- Mustelidae(Mammalia,Carnivora),based on comparison of mitochondrial cytochrome b nucleotide sequence[J]. Zoo Sci, 11:605-612.
22. Matthee C A , Davis S K. 2001 Molecular insights into the evolution of the family Bovidae: a nuclear DNA perspective[J]. Mol Biol Evol, 18 (7): 1220-1230.
23. Matthee C A , Robinson T J. 1999 Cytochrome b phylogeny of the family bovidae: resolution within the alcelaphini, antilopini, neotragini, and tragelaphini[J]. Mol . Phylogenet Evol, 12 (1): 31-46.
24. Pocock R. 1918 On some external characters of ruminant artiodactyla , part II . Annual and Magazine of Natural History , 9 (2) : 125~144.
25. Reza S M , Moran C. 2000 Conservation within artiodactyls of an AATA interrupt in the IGF-I microsatellite for 19-35 million years[J]. Mol Biol Evol, 17: 665-669.
26. Simpson G G. 1945 The principles of classification and a classification of mammals[J]. Bull Amer Mus Nat Hist, 85: 1-350.
27. Sokolov I I. 1953 Experience of the natural classification of bovids (Bovidae) [J]. Proc of Zool Muz XIV, Moscow.
28. Sokolov V E. 1979 Systematic of Mammals[M]. Moscow: Moscow Univ. Press.
29. Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4,Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
30. Thompson J D, Gibson T J, Plewiniak F. 1997 The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [CP] . Nucleic Acids Research, 24: 4876-4882.
31. Tikhonov A N, Bischof L. 1995 Phylogenetic relationships of the Antilopinae based on cranial morphology and mitochondrial DNA sequences[J]. Abstr 2d Europ Congr Mammal, Southampton, p 62.
32. Zhang Y P, Oliver A R. 1993 Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 90:9557-9561.

33. 曹丽荣, 王小明, 方盛国. 2003 从细胞色素 b 基因序列差异分析岩羊和矮岩羊的系统进化关系. 动物学报, 49 (2): 198~204.
34. 高中信, 关东明, 金昆. 1996a 春季和初夏季节黄羊集群的初步研究. 兽类学报, 16(2): 176~181.
35. 高中信, 金昆, 关东明等. 1996b 黄羊生态研究. 东北林业大学学报, 24 (2): 37~42.
36. 高中信, 金昆, 马建章等. 1995 呼伦贝尔草原冬季黄羊食性研究. 兽类学报, 15 (4): 203~208.
37. 关东明, 高中信. 1999 呼伦贝尔草原黄羊日活动节律. 野生动物, 20(1): 18~20.
38. 姜兆文, 马逸清, 高中信. 1993 我国黄羊种群结构及动态趋势的研究. 兽类学报, 13 (1): 16~20.
39. 姜兆文, 马逸清, 高中信等. 1995 黄羊两种年龄鉴定方法的比较研究. 见: 张洁编. 中国兽类生物学研究. 北京: 中国林业出版社, 124~130.
40. 蒋志刚等. 2003 普氏原羚研究概述. 动物学杂志, 38 (6): 129~132.
41. 金昆, 高中信, 关东明等. 1997 世界黄羊分布的历史变迁及种群数量变化. 生态学杂志, 16(5): 38~42.
42. 李俊生, 吴建平, 姜兆文. 2000a 黄羊主要饲料植物和食物营养质量评价. 东北林业大学学报, 28(5): 67~72.
43. 李俊生等. 2000b 黄羊胃的解剖形态学特征. 东北林业大学学报, 28 (6): 67~71.
44. 李俊生等. 2001a 呼伦贝尔草原黄羊体况的初步评价. 兽类学报, 21 (2): 81~87.
45. 李俊生等. 2001b 黄羊消化道内不同大小食物颗粒的分布. 动物学报, 2001 47 (5): 488~494.
46. 刘明玉, 解玉浩, 季达明. 中国脊椎动物大全[M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 2000.807-810.
47. 鲁庆彬. 2003 藏原羚的生物学研究概况. 生物学通报, 38 (10): 24~25.
48. 吕宝忠等译. 2002 分子进化与系统发育. 北京: 高等教育出版社.

49. 马建章等. 2001 黄羊消化道形态和结构的特征. 兽类学报, 21 (1): 14~22.
50. 沈明华. 2002 普氏原羚若干血液生理生化指标测定. 青海畜牧兽医杂志, 32 (3): 11~12.
51. 孙静萍等. 1996 黄羊栖息地研究. 内蒙古环境保护, 8 (3): 24~26.
52. 王宗炜, 王松, 陆长坤, 张荣祖. 1963 中国牛科动物的分类、分布和利用[J]. 生物学通报, (5): 24-30.
53. 肖前柱, 高中信, 王学权. 1982 呼贝伦尔草原黄羊种群年龄结构和性比的研究. 东北林学院学报, (增刊): 69~75.
54. 张洪茂等. 2002 川西北高原藏原羚夏季生境选择. 四川动物, 21 (1): 12~15.
55. 张自学, 孙静萍, 白韶丽等. 1995 黄羊(*Procapra gutturosa*) 在中国分布的变迁及其资源持续利用. 生物多样性, 3(2): 95~98.
56. 赵肯堂. 1982 黄羊的年龄鉴定. 野生动物, 2: 40~44.
57. 邹琦等. 1999 黄羊胃肠组织形态学研究. 东北林业大学学报, 27(4): 57~59.

在读期间撰写和发表的学术论文

1. 王江, 方盛国. 基于 Cyt b 基因探讨羚羊亚科原羚属系统发生关系. 兽类学报 (2004, 待发表)
2. 王江, 董明利, 方盛国等. 安徽铜陵淡水豚自然保护区淡水豚受胁迫因素及保护对策探讨[J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2003, 22 (1): 30~34
3. 于道平, 董明利, 王江. 铜陵江段豚类资源与保护措施的研究[J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2002, 21 (3): 236~241
4. 吴延军, 何伟, 王江. 植物基因工程技术在农业上的应用[J]. 中国农学通报 2002 , 18 (4): 71~74

附录:

安徽铜陵淡水豚自然保护区淡水豚受胁迫因素及保护对策 探讨*

王江^{1,2}, 董明利², 方盛国¹, 于道平², 张西斌²

(1. 浙江大学生命科学院教育部濒危野生动物保护遗传与繁殖重点实验室, 浙江杭州, 310029

2. 安徽铜陵白暨豚养护场, 安徽铜陵, 244000)

摘要: 分析了影响铜陵淡水豚自然保护区淡水豚生存的胁迫因素: 江段渔业资源变化, 渔捕工具的伤害和结构变化, 航运业和噪声的影响, 水利工程及采挖沙的影响, 水体污染等。提出在实现就地和迁地保护白暨豚和长江江豚时应采取如下措施: 应加强江段管理执法力度, 尤其要强化核心区管理; 提高江段渔民自身经济发展能力恢复渔业资源; 做好水生生态影响评价控制工业和生活污水的排放; 注意政府各管理部门的协调一致; 开展半自然和人工饲养下的养护繁殖实验; 同时应加大科技力度、提高保护和科技人员素质、唤醒公众的保护意识。

关键词: 淡水豚; 保护区; 胁迫因素; 保护对策

白暨豚(*Lipotes vexillifer*)是一种古老的淡水豚, 仅分布于我国长江中下游约1600(Km)干流中^[1]。长江江豚(*Neophocaena phocaenoids asiaeorientalis*)是分布于长江中下游的干流、部分支流及部分通江湖泊中的较为广泛的另一种豚类^[2]。多年以来由于此二物种受到来自于水环境不断恶化和人类经济活动不断加剧等诸多因素的影响, 其生存受到严重胁迫, 种群已濒临灭绝。调查结果表明: 白暨豚数量已不足100头^[3]; 江豚数量也已不足2000头^[4,5,6]。同时有关这两种豚类的保护问题也一直受到政府部门及国内外学者的广泛关注, 安徽铜陵淡水豚自然保护区(以下简称铜陵保护区)就是为保护白暨豚和江豚而批准建立的^[3,7,8,9]。

本文作者拟通过1994年~2000年对此保护区的调查数据来分析豚类受胁迫因素, 并据此探讨保护对策。

1 受胁迫因素分析

1.1 渔业资源变化

通过对铜陵保护区长江江段近几年渔获物组成、结构和大小分析发现: 七十

● 收稿日期: 2002-05-08

基金项目: 国家环境保护总局国家级自然保护区基金(环财[2000]038号发); 1997~1999年农业部长江流域淡水豚同步调查提供部分经费

作者简介: 王江(1972-), 男, 工程师, 研究方向: 濒危物种种群生态、保护遗传与繁殖学研究

表 1 铜陵江段渔获物组成比 (%)

Tab.1 compa of fishing catch

时间	地点	青草鲢鳙	鲤鲫	鲚鲴鲂鱼	黄颡鳊等	小型低龄鱼
1995.4	桂家坝	27.3	10.1	41.2	21.4	31.2
	铜陵县	23.2	9.4	50.3	17.1	29.4
1999.4	桂家坝	16.5	12.8	32.4	38.3	53.4
	铜陵县	17.2	7.3	37.5	38.0	48.6
2000.4	桂家坝	15.6	13.7	29.8	40.1	55.1
	铜陵县	16.7	7.2	34.4	41.7	49.7

注：小型化低龄化指 100g/条以下的鱼占总渔获物百分比

年代曾占到渔获物组成 70%的四大家鱼^[10]（青、草、鲢、鳙）已下降到占约 16%，季节性洄游的鲚鲴、鲂鱼比例下降到 30%左右，相应于过去被称为野杂鱼的黄颡、鳊、鳊等上升成为主导渔业，在江段占到 40%左右，另外渔业资源出现低龄化、小型化趋势（有些江段达到 55%、如桂家坝）（表 1）

1.2 渔业捕获工具分析

1.2.1 渔捕工具的伤害

对豚类造成致死的渔捕工具主要是电网和沟具。据铜陵保护区这几年不完全统计：1992 年 10 月和 1995 年 9 月在枞阳县和马鞍山江段分别发现各 1 头被电击致死的白暨豚幼体和成体；1995 年 4 月在吉阳矾对岸望江江段发现 1 头因滚沟致死的江豚成体；1999 年 10 月与 2000 年 4 月分别在梅埂和铜陵县码头发现各 1 头被电击致死的江豚成体；1998 年 9 月在铁板洲发现 1 头因缠绕滚沟而误伤的江豚成体。

1.2.2 渔捕工具结构变化

通过对近几年渔捕工具分析发现（表 2）：传统的渔捕工具扳箴、拖网减少，

表 2 铜陵江段渔捕工具分析 (%)

Tab.2 The fishing gears used in Tongling River

时间	流网	沟具类	扳箴	拖网	断箔	电网
1994.9	24.6	23.8	23.2	21.1	7.3	0
1995.4	19.4	21.7	21.4	17.2	19.1	1.2
1996.4	19.9	17.1	12.0	19.3	21.5	10.2
1997.4	17.5	18.6	8.1	9.2	39.2	7.4
1999.4	17.1	20.4	6.8	0	43.7	11.4
2000.4	20.2	17.2	7.4	1.1	44.2	9.9

滚沟、流网大致与过去相仿，非法渔具断箔、电网具大幅度地提高。

1.3 航运业和噪声的影响

随着经济建设的快速发展,作为黄金水道的长江干流和支流其单位面积上通过的船舶数量及运力都在急剧增加。通过取几个豚类经常活动水区定点、定时计横断面通过的船舶总数量、上行船舶数量及上行船中 40~100Kw 船舶数,计算铜陵江段船只密度得出(表 3):目前铜陵江段的船只平均密度为 62.6 只/h,比十年前的 24.4 只/h^[11]翻一番还多,在通过的最高峰时能达到 107 只/h,其中上行的 40~100Kw 个人运输船占上行船只数的 66.9%,它们的航线正是豚类经常活动水深为 3~9 米的缓流夹堰和洄水区。由于铜陵经济的发展和码头港口的建设,豚类栖息活动场所的成德洲头水域^[8]已逐渐被辟为锚地,三江口水域^[8]夜泊避风和歇息的船只增多;配备高速柴油机和汽油机的船只增多,船速明显比过去提高。

江段船只增多和船速提高对豚类的危害主要体现在:豚类水体生存空间减少;对江段水体环境胁迫因子增大;船舶之间偶发事故增大由此可能造成豚类直接或间接的灾难;深水噪音干扰豚类声呐系统,破坏豚类生活习性和生殖行为等;被船只或螺旋桨击毙、击伤机会增大。

1.4 水利工程及采挖沙的影响

白暨豚和江豚多栖息及活动在缓洄水区,夹堰水区,洲头、洲尾的分叉水区和交汇水区^[11]。水下工程、航道的整治及大桥、港口、码头建设影响河槽结构和稳定性,改变河势和流态,对有机物的集中沉降和鱼卵的孵化繁育有一定不利影响,它们会冲刷和消蚀已有的豚类栖息地,有时也可能产生有利于豚类生活的环境。如三江口自太子矶和拦江矶实行整治后,其下的暗沙洲玉带洲已逐渐消失,破坏了豚类的栖息环境;而同样自铜陵大桥建成后,现在在其下方北岸形成了一个大面积的边滩缓水区,这儿已成为豚类的一个新的重要的栖息环境。

修闸建坝使湖泊在长江生态系统中的功能发生变化,切断了鱼类的洄游通道,使其丧失许多辽阔的天然索饵、肥育场所,不利鱼类的繁殖和生长,引起鱼类资源减少^[10]。据 1999 年春季考察,铜陵江段除秋浦河、九华河、青铜河、土桥河、顺安河外,沿岸的大小湖泊河流均已修建闸坝,江北岸涵闸 126 个,南岸 41 个,江心洲上 18 个。

受经济利益驱使,铜陵江段各类采沙船剧增,主要分布在三江口、余水洲、梅埂、成德洲,这些地方暗沙洲发育充分,水速平缓,形成大面积缓洄水区,浮游动植物、有机物多而集中,是鱼类索饵场所,同时也是豚类索饵场所。采沙将

改变其水文、流态破坏已有的结构和稳定,使豚类丧失固定的索饵场所。虽然国家已明令禁止采沙,但江段仍有偷采现象。

表3 铜陵江段通过船舶数量一览表

Tab.3 The number of vessels through Tongling River

时间	地点	上午 8: 00~9: 00			中午 12: 00~13: 00			下午 16: 00~17: 00			总数量平均
		总数量	上行数量	40~100 Kw 上行数量	总数量	上行数量	40~100 Kw 上行数量	总数量	上行数量	40~100 Kw 上行数量	
1999. 4	三江口	49	26	19	64	41	30	52	31	20	55/h
	成德洲	67	28	21	82	48	35	102	61	38	83.7/h
	太阳洲	30	17	12	55	29	15	43	25	18	42.7/h
2000. 4	三江口	48	27	20	66	35	28	56	30	22	56.7/h
	成德洲	80	38	21	96	50	29	107	58	33	94.3/h
	太阳洲	31	18	14	57	27	22	42	22	12	43.3/h
平均 (只/h)		50.8	25.7	17.8	70.0	38.3	26.5	67.0	37.8	23.8	62.6/h

1.5 水体污染的影响

虽然没有水体污染对豚类影响的直接报道,但水污染能使水质变坏,造成浮游生物资源量减少,鱼虾类减产甚至绝收,引起豚类栖息地索饵困难、被迫进行长距离迁徙;有毒物质和重金属元素如 BHC、DDT、Cu、Pb、Zn、As、Fe 等通过食物链级联放大在豚类体内产生生物富集,形成毒害作用。根据农业部淡水渔业研究中心 1998 年枯水期和铜陵市环境监测站 1997 年、1998 年的水质监测资料评价结果表明,目前铜陵江段水质尚好,属于 β 中污带^[10]。但部分水域受到不同程度的有机物污染和重金属污染,主要是沿江的工业或生活污水污染、运输船只油污及码头船坞货物散场堆积淋溶污染。如 1999 年对铜陵横港硫金矿散场

扩建环评，距南岸 500m 设四个断面测定，结果显示：即便是丰水期，横港水质中的 S 和 Cu 以及淋溶煤场中的 Cu 和 Zn 均超出渔业水质标准。

2 保护对策探讨

2.1 强化就地保护工作

就地保护是拯救物种的一项主要措施，指保护物种栖息地环境资源，维持物种现状。对白暨豚和长江江豚而言，实质是对豚类栖息活动地的鱼类资源强化管理与恢复问题。根据铜陵江段的受胁迫因素，当前就地保护最重要的工作是：

2.1.1 加强江段管理执法力度

尽快把铜陵保护区上升为国家级保护区，增加国家和地方对保护区的投入，制定有关保护区建设、管理和可持续发展的规范标准和政策条例，建立起自然保护区管理和监测体系。颁布《铜陵淡水豚自然保护区保护管理条例》，使管理、采集、研究和监测工作有絮地进行。坚决依法取缔非法渔具断箔、电捕；在豚类栖息活动区严禁使用对豚类可能有伤害的渔具滚沟。

2.1.2 提高江段渔民自身经济发展能力

任何自然保护区都不是孤立存在的，它们与周边社区山水相连、风雨相依。自然保护区与管区内的群众生产生活息息相关，自然资源的管理与保护也离不开群众的配合。铜陵淡水豚自然保护区辖区涉及二市四县，城乡人口近百万，其中有为数众多的专业渔民和副业渔民。能否由保护区、当地政府及邀请科研院所协同进行科技扶贫、资金扶贫、政策扶贫让副业渔民离开水面作业而专司岸上工作，专业渔民变成以捕捞与人工养殖相结合的方式，提高渔民经济生活水平，减轻捕捞强度对环境资源量的压力，恢复渔业资源平衡。

2.1.3 强化核心区管理

自然保护区一般都划分为核心区、缓冲区和试验区，其核心区是物种栖息活动经常区。铜陵淡水豚保护区的核心地带是铜陵大桥至太阳洲，在这一区段豚类活动频繁点设立醒目的限速和禁航浮标或旗帜，让运输船只、尤其是上行的 40~100 马力船只避开豚类活动区域，快速客轮或快艇减低时速，减轻对豚类的意外伤害和噪音干扰；同时设立禁捕标志使豚类的活动基本上不受人为因素干扰。

2.1.4 加强水生生态影响评价

铜陵保护区沿岸分布有两个县城城区和两个市区（铜陵县城、枞阳县城、铜陵市区、贵池市区），它们的工业和生活污水通过通江湖泊或河流排放到长江干流，另外沿江都有较多的水利工程和采沙行业。为此建议若今后建设污染性企业或影响河流流态的水利工程，由保护区或者保护区与当地环境保护局共同完成：对水生生物资源和豚类可能的动态或静态的影响评价后，工程方可上马，减少对生物资源和豚类的不利影响。

2.1.5 管理机制的协调

由于铜陵淡水豚自然保护区牵涉到渔政、港航、水利、环保、水上公安等部门及跨多个地区，其管理上的复杂性与交叉性是一般保护区所没有的，为此设立由省环保局和省渔政局共同业务管理，铜陵市政府协调各部门成立一帶有共同执法权的管委会将可能更大地发挥自然保护区的作用和功能。以避免人力、财力与资源的浪费。

2.2 充分发挥铜陵养护场半自然养护和人工饲养功能，开展养护下的繁殖实验

从长江活捕豚类移入半自然保护区及人工饲养池进行“迁地保护”，建立豚类饲养群体，开展人工或半自然繁殖以延缓和恢复豚类资源，是抢救豚类的根本措施和优先发展项目。保护区下的铜陵养护场(以下称养护场)已具有完备的基础设施：20.6 公顷 (hm^2) 夹江水域，暂养和治疗池，室内豚馆，饵料鱼基地和供电、通讯、水净化设施等。

刘仁俊^[3]等认为若活捕白暨豚，应优先集中建设天鹅洲半自然保护区，这在理论上是可行的，但笔者认为：从 90 年代开始养护场和天鹅洲先后组织了数十次大规模捕豚，除 1995 年天鹅洲捕获一头外均无所获，而实际上要完全捕获野外白暨豚已无可能，即使若再捕获也只能以小群体论，难以构成白暨豚的有效繁殖群体。因此对白暨豚的迁地保护建议改为：就地捕获，就地运输，就地人工饲养，避免由于长途运输而造成的人为伤害，切实保护好白暨豚种源和基因库。

自 1992 年开始养护场先后对长江江豚开展了围捕、圈养、驯化、人工饲养、血常规检验、疾病防治、水质处理等一系列试验，取得了相当的成绩和经验，为大规模养殖长江江豚打下基础。养护场 2001 年根据安徽省水产局下达的批捕文件捕获 6 头（3 ♀、3 ♂）开展繁殖饲养工作，但根据遗传学理论推算和长江江豚种群生存力分析，半自然保护区下，长江江豚饲养群体的最小可存活种群

(MVP) 应为 20 头^[12], 为达到有效保护, 尚要补充豚 14 头。若如此则 1.6Km 长夹江承载力及饵料鱼基地规模将要予以充分重视, 加大建设保证豚类饵料充足和注意改善夹江水质。

2.3 加强科技合作, 提高保护和科技人员素质

自然保护区需要开展的科技研究工作内容比较广泛, 自然科学和社会科学; 生态学、经济学、生物学等多门学科相互交织, 互为补充。科学研究的规模和水准, 决定自然保护区的发展水平, 只有系统和完备的科学研究才能使自然保护区和繁育基地兴旺发达。铜陵养护场应加强与国内外相关机构如中国科学院水生生物研究所、南京师范大学、长江水产研究所等科研单位合作, 必要时可作为它们的试验基地; 同时可以采取请人讲学或派人出去进修、在职攻读学位的形式提高人员素质。

2.4 加大宣传力度, 提高公众保护意识

自然保护区的发展总是与群众相联系, 让群众自觉地保护物种和生物多样性是一项困难的事, 但也是保护机构和政府必须要做的。有效的管理, 必须建立在保护区人们群众的自觉保护基础上, 通过大众媒体、科普杂志、中小学教育等手段深入、持久、广泛地宣传教育, 使人们认识到生态效益和可持续利用的重要性, 了解自然保护和自身利益的关系, 认识到保护自然就是保护自己的生存和发展。

参考文献:

- [1] 陈佩薰, 张先锋, 魏卓, 等. 白暨豚的现状和三峡工程对白暨豚的影响评价及保护对策[J]. 水生生物学报, 1993, 17 (2): 101~111.
- [2] 肖文, 张先锋. 截线抽样法用于鄱阳湖江豚种群数量研究初报[J]. 生物多样性, 2000, 8 (1): 106~111
- [3] 刘仁俊, 张先锋, 王丁, 等. 再论白暨豚和江豚的保护[J]. 长江流域资源与环境, 1996, 5 (3): 220~225.
- [4] 张先锋, 刘仁俊, 赵庆中, 等. 长江中下游江豚种群现状评估[J]. 兽类学报, 1993, 13 (4): 260~270.
- [5] Wang Ding, Liu Renjun, Zhang Xianfeng, et al. Status and conservation of the Yangtze finless porpoise[A]. In: R R Reeves, B D Smith, T Kasuya(eds). (2000). Biology and Conservation of Freshwater cetaceans in Asia[C]. Gland Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2000, 80~85.
- [6] 于道平, 董明利, 王江, 等. 湖口至南京段长江江豚种群现状评估[J]. 兽类学报, 2001, 21 (3): 174~179.
- [7] 华元渝, 张建, 章贤, 等. 白暨豚种群现状、致危因素及保护策略的研究[J]. 长江流域资

- 源与环境, 1995, 4 (1): 45~51.
- [8] 于道平, 王江. 铜陵江段白暨豚生态环境与行为的变化[J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 1999, 18 (3): 227~231.
- [9] 董明利, 于道平, 梁太芹, 等. 建立铜陵淡水豚自然保护区考察研究[J]. 安徽大学学报 (自然科学版), 2000, 24 (4): 98~105.
- [10] 铜陵白暨豚养护场能力建设可行性研究报告 (代项目建议书).
- [11] 华元渝, 吴京燕. 水利工程对白暨豚生态环境的影响[J]. 水科学进展, 1993, 4 (3): 183~189.
- [12] 张先锋, 王克雄. 长江江豚种群生存力分析[J]. 生态学报, 1999, 19 (4): 529~533.

DISCUSSION OF STRESS FACTORS AND CONSERVATION STRATEGY OF ANHUI TONGLING RIVER DOLPHIN NATURE RESERVE

WANG Jiang^{1,2}, DONG Ming-li², FANG Sheng-guo¹, YU Dao-ping², ZHANG Xi-bin²

(1 Key Laboratory for Conversation Genetics and Reproduction Biology on Endangered Wildlife of Ministry of Education, College of Life Sciences Zhejiang University HangZhou 310029)

(2 Tongling Baiji Semi-nature Reserve AnHui TongLing 244000)

Abstract: The stress factors, which affect the fresh water dolphin in Tongling river dolphin nature reserve, are analyzed, such as the changes of the fish sources, the hurt and construction of the fishing tools, the affection of the shipping and noise, the affection of irrigation, excavation and sewerage. The author put forward the conservation strategy for the *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoids asiaeorientalis*, that is combine the protection on the spot and moving, includes that execute the law and manage must be enhanced, especially in the core area; the economical development ability must be improved in the fish men and recovered the fishing source; the industrial and living sewerage must be reduced and estimated the water zoology; the harmony of the department of management must be pay attention; the experiment of propagation, raises and protection on semi-nature and man raise conditions must be done; at the same time the science and technology in the protection must be enlarged, the quality of the staffers must be improve and protection consciousness of all man must be awakened.

Key word: river dolphin; nature reserve; stress factors; conservation strategy