

从线粒体细胞色素 b 基因探讨矮岩羊物种地位的有效性*

周材权 周开亚** 胡锦涛

(西华师范大学珍稀动植物研究所, 四川南充 637002)

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京 210097)

摘要 用采自四川省的岩羊和矮岩羊共 18 个头骨或皮张标本, 分析了线粒体 Cyt b 基因 140 bp 的全序列 (其中一个样品只测到 802 bp 的基因片段)。用 NJ、MP、ML 等系统发育分析法分别重建的系统发育树的拓扑结构完全一致, 均不支持矮岩羊是单系群。结果提示: 所研究的全部样品都属于同一个物种, 即岩羊 *P. nayaur*, 不支持矮岩羊的物种地位。根据基于 17 个样品 Cyt b 基因全序列的系统发育树和遗传变异以及地理分布, 这些岩羊样品聚为 5 支, 根据地理区划和本文分析结果, 四川的岩羊可分为摩天岭、川西、川西北、川西南和川北 5 个种群。基于 17 个样品 Cyt b 基因 137 bp 的编码区, 共定义了岩羊的 16 种单元型, 在 5 个种群间未发现共享的单元型 [动物学报 49 (5): 578~584, 2003]。

关键词 矮岩羊 有效性 Cyt b 基因

The validity of the dwarf bharal (*Pseudois schaeferi*) species status inferred from mitochondrial Cyt b gene*

ZHOU Cai-Quan ZHOU Kai-Ya** HU Jir-Chu

(Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong 637002, Sichuan, China)

(Institute of Genetics Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract We reconstructed a molecular phylogeny of blue sheep (bharal) and dwarf blue sheep using complete sequences of the mitochondrial cytochrome *b* (Cyt *b*) gene. Eighteen individuals of *Pseudois* collected from different localities in Sichuan Province, China, were sequenced by directly sequencing PCR products and phylogenetic trees were reconstructed from a branch-and-bound search of maximum parsimony, maximum likelihood method and the neighbor-joining method. The results did not support the species status of *P. schaeferi*. According to our phylogenetic tree, genetic divergences and the geographic distribution, the blue sheep distributed in Sichuan Province were divided into 5 groups. According to the zoogeography, the 5 groups can be divided into 5 geographic populations, i. e. the Motianling population, the West-Sichuan population, the North-west Sichuan population, the South-west Sichuan population and the North Sichuan population [Acta Zoologica Sinica 49 (5): 578 - 584, 2003].

Key words Dwarf bharal (*Pseudois schaeferi*), Validity, Cyt *b* gene

岩羊属 (*Pseudois* Hodgson, 1846) 隶属于偶蹄目牛科山羊亚科, 分布于从喜马拉雅山脉到内蒙古的高山深谷环境, 包括岩羊 (*P. nayaur*) 和矮岩羊 (*P. schaeferi*) 两种 (Groves, 1978; Corbet *et al.*, 1991; 吴毅等, 1990; Nowak, 1991)。岩

羊含 2 个亚种, 即尼泊尔亚种 *P. n. nayaur* 和四川亚种 *P. n. szechuanensis*, 在国外主要分布在尼泊尔、巴基斯坦、印度、锡金和克什米尔 (Schaller, 1977), 而在我国主要分布在西藏、云南、四川、陕西、甘肃、青海、宁夏、新疆和内蒙

2002-12-28 收稿, 2003-05-20 修回

* 四川省教委青年科学基金 (No. 2002B17) 项目 [This research was funded by a grant from Science Fund for Young Teachers, Sichuan Educational Committee (No. 2002B17)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: kyzhounj@jonline.com

第一作者简介 周材权, 34 岁, 男, 博士。研究方向: 动物生态学和保护生物学。E-mail: drcqzhou@hotmail.com

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

古 (张荣祖, 1997)。矮岩羊是我国特产的珍稀动物, 主要分布于四川巴塘县、白玉县和得荣县, 数量已十分稀少, 巴塘县仅约 70~150 头 (吴毅等, 1990); 另外, 西藏、青海、云南也有少量分布 (张荣祖, 1997)。

矮岩羊的分类地位一直存有争议。Schaefer (1937) 第一次在四川巴塘县竹巴笼采到一批矮个子岩羊标本, 认为这些体型矮小的岩羊可能是一个未被描记的地方种 (即亚种); Allen (1940) 比较过这些矮岩羊标本后, 认为矮岩羊与岩羊确实有些差异, 但这种差异可能是由于矮岩羊的栖息地食物不足造成的, 应是岩羊四川亚种的不同个体; Haltenorth (1963) 对其进行研究后, 认为它是岩羊的一个亚种 (*P. n. schaeferi*)。直到 1978 年, 澳大利亚学者 Groves 根据其体型、角形、毛被和生境等方面与岩羊 *P. nayaur* 有显著差异, 将它独立成一个种 *P. schaeferi* (Haltenorth, 1963); 吴毅等 (1990) 根据在四川省巴塘县竹巴笼 (矮岩羊的模式产地) 采得的地模标本, 与岩羊标本及 Groves 对矮岩羊模式标本的描述进行了比较, 支持矮岩羊是一个独立物种的观点, 并反对“那些形态上的差异是由于营养的原因”的观点 (Allen, 1940); 蔡昌平等 (1990) 通过对川西白玉县的岩羊和矮岩羊

的生态、形态研究后仍然支持它是一个独立物种。

动物线粒体 DNA 是呈母系遗传, 因其分子小、进化速度快 (Brown, 1981) 等特性而被广泛地用于系统发育研究。线粒体 DNA 上的细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因的进化速度适中, 一个较小的基因片段可包含从种内到种间乃至到科间的进化遗传信息 (Kocher *et al.*, 1989), 在系统进化和分类研究中具有很好的适用性 (Irwin *et al.*, 1991; 王义权等, 1999; 周继亮等, 2001; 曹祥荣等, 2002)。Cyt *b* 也已被用到羊亚科的系统发育关系研究上 (Hassanin *et al.*, 1998)。此外, Hassanin *et al.* (1998) 利用线粒体 Cyt *b* 基因对整个牛科动物的分子系统发育进行了研究, 结果表明, 岩羊属与山羊属 (*Capra*) 和塔尔羊属 (*Hemitragus*) 关系较近而与盘羊属 (*Ovis*) 较远。但没有涉及到矮岩羊的系统地位问题。

本文利用线粒体细胞色素 *b* 基因全序列对岩羊属物种的分类地位和系统发育进行了研究, 并在此研究的基础上, 探讨了岩羊种群的遗传变异。

1 材料与方法

实验所用样品均为头骨或皮张, 具体死亡的时间不详, 标本采到的时间见表 1。

表 1 四川省岩羊属标本的收集日期及地点

Table 1 Date for collection and location of Pseudois specimens in Sichuan Province

种名和代码 Species and code	性别 Sex	采集时间 Collection date	地点 Locality	组织 Tissue
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SP1	雄 ()	1998. 08	不详 (Unknown)	皮 (Skin)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SP2	雄 ()	1998. 06	松潘县 (Songpan County)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SP3	雄 ()	1998. 06	松潘县 (Songpan County)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SP4	雄 ()	1998. 06	松潘县 (Songpan County)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) PW	雌 ()	1998. 05	平武县 (Pingwu County)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) ML *	雄 ()	1993	木里县 (Muli County)	皮 (Skin)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SQ	雌 ()	1999	石渠县 (Shiqu County)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SD	雌 ()	1998	色达县 (Seda County)	皮 (Skin)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) KD ¹	雄 ()	1987	康定县 (Kangding County)	皮 (Skin)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) JC	雌 ()	1998	金川县 (Jinchuan county)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) SM	不详 (Unknown)	1998	石棉县 (Shimian County)	头骨 (Skull)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) REG	不详 (Unknown)	1997	若尔盖 (Ruoergai county)	皮 (Skin)
岩羊 (<i>P. nayaur</i>) WL	雌 ()	1980	汶川县 (Wenchuan County)	头骨 (Skull)
矮岩羊 (<i>P. schaeferi</i>) BT1	雄 ()	1988	巴塘县 (Batang County)	头骨 (Skull)
矮岩羊 (<i>P. schaeferi</i>) BT2	雌 ()	1988	巴塘县 (Batang County)	头骨 (Skull)
矮岩羊 (<i>P. schaeferi</i>) BT3	雌 ()	1987	巴塘县 (Batang County)	皮 (Skin)
矮岩羊 (<i>P. schaeferi</i>) B Y1	雌 ()	1988	白玉县 (Baiyu County)	头骨 (Skull)
矮岩羊 (<i>P. schaeferi</i>) B Y2	雌 ()	1988	白玉县 (Baiyu County)	头骨 (Skull)

*: 1999 年采集于一村民家里, 1993 年死亡, 现保存于绵阳师范专科学校生物系 (The animal died in 1993 and the specimen was collected in 1999. It is deposited in Mianyang Teacher's College)

1: 只测到了 L14724—H15568 之间 802 bp 的序列 (Partial Sequence of 802 bp obtained from primer L14724 to H15568)

1.1 样品的处理和基因组 DNA 提取 (周材权等, 2000)

1.1.1 样品的处理 样品取自骨或皮 (0.5 ~ 1.0 g), 先用肥皂粉水洗净表面, 再用 ddH₂O 洗 3 次, 然后用 5% 的 H₂O₂ 浸泡 30 min, 再用 ddH₂O 洗 3 次。80 °C 烘干后, 紫外灯下双面照射各 20 min, 用铜研钵粉碎后倒入 1.5 ml Ependorff 离心管中, 加入 1 ml 0.5 mol/L EDTA 脱钙 72 h (皮为 36 h), 开始需轻轻摇匀以使骨粉与溶液充分混合, 并在中间更换 EDTA 2 次 (皮为 1 次), 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。

1.1.2 组织消化及基因组 DNA 提取 抽提缓冲液 500 μl (10 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0, 1% SDS) 和 5 μl 蛋白酶 K (20 mg/μl), 加入到以上已处理好的 Ependorff 离心管中, 在 65 °C 温育 4 h。用标准的苯酚-氯仿法进行基因组 DNA 抽提。

1.2 DNA 的 PCR 扩增、PCR 产物的纯化及序列测定

所有样品的 Cyt b 基因全序列是由 3 个片断分别测序, 然后拼接而成, 中间 1 对特异性引物扩增片断的首尾两段至少重叠了 40 bp, 这样可以检验所测得的不同片断序列的准确性。所用引物序列见表 2。

表 2 用于扩增岩羊线粒体 Cyt b 基因序列的寡核苷酸引物
Table 2 Oligonucleotide primers used to generate mitochondrial Cyt b gene sequences of blue sheep

引物名 Name of primer *	序列 Sequence
L14724	5-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3
H15149	5-AAACTGCAGCCCT- CAGAATGATATTTGTCCTCA-3
L15104	5-AATCATTTCTCTATTTCGCAAC-3
H15568	5-AGGATTGCGTATGCAAATAGG-3
L15513	5-CTAGGAGACCCTGACAATA-3
H15917	5-CGGAATTCATTTTTGGTTTACAAG-3

*: L 和 H 及其后面的数字分别表示线粒体 DNA 轻链和重链 3 端的位置, 数字编号是按人类的序列系统 (Anderson *et al.*, 1981) [Names identify the DNA strand (L or H) and the position of the 3' end of the oligonucleotide corresponding to the position of human sequence (Anderson *et al.*, 1981)]

PCR 反应体积为 30 μl, 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1% TritonX-100, 1 U *Taq* 酶, 4 种

dNTP 各 150 μmol/L, 两个引物各 4 pmol/μl, DNA 模板约 100 ng。PCR 反应在 PE 2400 (Perkin Elmers) 或 PTC-200 型 (MJ Research) PCR 仪上进行。循环参数为: 95 °C 预变性 5 min, 然后进入 30 个循环: 95 °C 40 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min; 循环结束后在 72 °C 延伸 7 min, 然后于 4 °C 保存。

PCR 产物用 WizardTM PCR Prep DNA Kit (Promega) 纯化。序列测定在 ABI 310 型遗传分析仪 (Perkin Elmers) 上进行。

1.3 线粒体基因的序列变异分析

所有测得并经拼接的 DNA 序列以及外系群的相应序列, 一并录入电脑, 用 CLUSTAL X 1.8 多序列对位排列程序 (Thompson, 1999) 进行对位排列, 并辅以人工校对。用 MEGA 软件统计变异位点数和简约信息位点数。

1.4 系统发育关系及序列变异

用 DNA 变异、转换以及颠换与 DNA 的 ML 距离之间的散点图来估计序列碱基转换饱和的程度, 如果饱和, DNA 替换率将不会随着 DNA 的 ML 距离的增加呈现增加, 而是减少。用密码子的饱和程度来估计以这些序列推导的系统发育的可靠性 (Tan *et al.*, 1995)。

用 MEGA 2.0 软件包 (Kumar *et al.*, 2001) 的 NJ (Neighbor Joining) 法和 PHYLIP 3.57c 软件包 (Felsenstein, 1993) 中的最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 和最大简约法 (Maximum Parsimony, MP), 以 GenBank 中 *Capra hircus*, *C. cylindricornis*, *Ovis aries*, *Hemitragus jemlahicus* 的相应序列 (登录号分别是 AB004075、AF034737、AF034730 和 AF034733) 做外系群, 重建系统发育树, 系统树中各节点的支持率是用序列数据集 1 000 个复制品的自引导值 (Bootstrap value) 表示 (Felsenstein, 1985)。用 NJ 法构树时, 采用 Kimura 的双参数距离矩阵。

遗传变异采用 Dna SP 3.50 (Rozas *et al.*, 1999) 软件进行分析, 用 Jukes and Cantor's 遗传距离表示。

2 结 果

2.1 Cyt b 基因全序列及变异

所测得的 18 个个体中, 除编号为康定 8709 的序列未测完 (只测到上游和中间共 802 bp) 外, 所有序列均为 1 140 bp, 且以起始密码子 ATG 开始, 中间没有插入/缺失或终止密码子, 以终止密码子

AGA 结束。根据牛科线粒体 Cyt *b* 基因的判断标准 (Hassanin *et al.*, 1998), 我们所测到的序列都是线粒体 Cyt *b* 基因的序列, A + T 约为 56%, 比 G + C 略多。这些序列全部存入 GenBank, 检索号为 AF398351 ~ AF398368。

岩羊属各样品 Cyt *b* 基因的各位密码子及总的平均碱基组成列于表 3。在第二密码子上, 特别是在第三位密码子上, 其 G 的含量较低, 分别为 13.9% 和 4.6%, 第二位的 T 含量较高 (41.2%), 而第三位的 A 较高 (42.9%)。然而, 这种碱基组成的偏好并不干扰成对比较, 因为在每一个位点上任意两个样品间的变异模式并无显著差异, 这一点可以从很低的标准差值 (表 3) 和 χ^2 检验结果得到证明 ($\chi^2 = 10.781$)。

用 Dna SP 3.50 软件对岩羊的遗传变异进行分析, 所有 18 个个体的 802 bp 中, 定义了 17 个单元型, 个体间 Cyt *b* 基因的遗传歧异为 0% ~ 3.07%; 基于 17 个样品 Cyt *b* 基因编码区的全序列, 定义了 16 种单元型, 其中 *P. schaeferi* BT1 和 *P. schaeferi* BT3 共享一个单元型; 单元型多样性为 0.993 ± 0.023 , $\Pi(t) = 0.02164 \pm 0.00162$, $\Pi(t)(JC) = 0.02201$, $\lambda = 0.02471$, 总变异数为 $\lambda = 95.00$, 多态位点数 $S = 93$, 其中, 简约信息位点 54 个。

2.2 系统发育关系及矮岩羊的系统地位

根据 3 种系统发育分析方法分别重建的系统发育树的拓扑结构十分一致, 本文仅显示了用 ML 法重建的系统发育树 (图 1)。从图 1 可以看出, 所有的矮岩羊样品没有单独聚为一支, 与岩羊样品形成姊妹群关系, 因此, 结果不支持矮岩羊为一独立物种 (或亚种)。

从图 1 可以看出, 在所有样品中, 来自巴塘的岩羊样品与松潘和平武的岩羊样品聚为一支, 然而, 由于该支的 bootstrap 值 (53%) 很低, 所以它们应该是两个单独的分支, 这在仅用 17 个个体的 Cyt *b* 基因全序列采用 NJ 法, 去除自引导值低于 50% 的结点后所得到的压缩树 (图 2) 中可以明显地看到。

因此, 所有岩羊样品可分为 5 个大支。

3 讨论

对于一些陈旧的组织材料, 通过 PCR 扩增所获得的 DNA 片段经常会被污染, 特别是采用通用引物扩增时, 尤其如此, 因为这些通用引物可以扩增出所有脊椎动物的相应序列。在本实验中, 作者使用通用引物对从陈旧标本的皮张或头骨中提取的 DNA 进行扩增, 当将扩增片段进行测序后, 发现其中一些片段不是目的动物的基因片段, 这就是外源 DNA 污染的结果。为了保证所测的序列是目的片段, 作者设计了一对扩增岩羊属物种 Cyt *b* 基因的特异性内部引物 (L15104 和 H15568), 该对引物的产物的两端分别与其上下游两对通用引物的产物重叠了至少 40 bp, 这样通过比较这些重叠的部分便可以确定通用引物的产物是否是目的片段。

本文的研究结果不支持矮岩羊作为一个独立物种的地位。矮岩羊的系统分类地位一直存有争议, 本文利用矮岩羊的 3 个地模标本 (吴毅等, 1990) 以及分布在四川白玉县的矮岩羊标本 (蔡昌平等, 1990) 与不同地方的多个岩羊标本进行了线粒体 Cyt *b* 基因全部编码区的序列测定及系统发育和遗传变异分析, 结果发现各样品间的变异不是种间变异, 不支持矮岩羊是一个物种 (或亚种)。

表 3 17 个岩羊样品 Cyt *b* 基因的碱基组成 (平均百分数及标准差)

Table 3 Base composition of Cyt *b* gene for all 17 samples of the *Pseudois nayaur* (mean percentage and standard error)

核苷酸 (Nucleotide)	总体 (Total)	密码子碱基位点 (Position of codon)		
		第一位点 (First)	第二位点 (Second)	第三位点 (Third)
A	31.5 \pm 0.25	31.2 \pm 0.20	20.4 \pm 0.12	42.9 \pm 0.68
T	24.9 \pm 0.22	21.1 \pm 0.19	41.2 \pm 0.15	12.6 \pm 0.63
G	30.1 \pm 0.27	25.9 \pm 0.23	24.5 \pm 0.12	39.9 \pm 0.79
C	13.5 \pm 0.15	21.8 \pm 0.19	13.9 \pm 0.15	4.6 \pm 0.34
核苷酸组成偏差指数 (Compositional bias index)	0.15	0.09	0.22	0.136

核苷酸组成偏差指数 $C = (2/3) \sum (c_i - 0.25)$, 其中 c_i 是密码子第 i 位碱基的频率 (Irwin *et al.*, 1991)

Compositional bias index is calculated as $C = (2/3) \sum (c_i - 0.25)$ where C is the compositional bias index and c_i the frequency of the i th base (Irwin *et al.*, 1991)

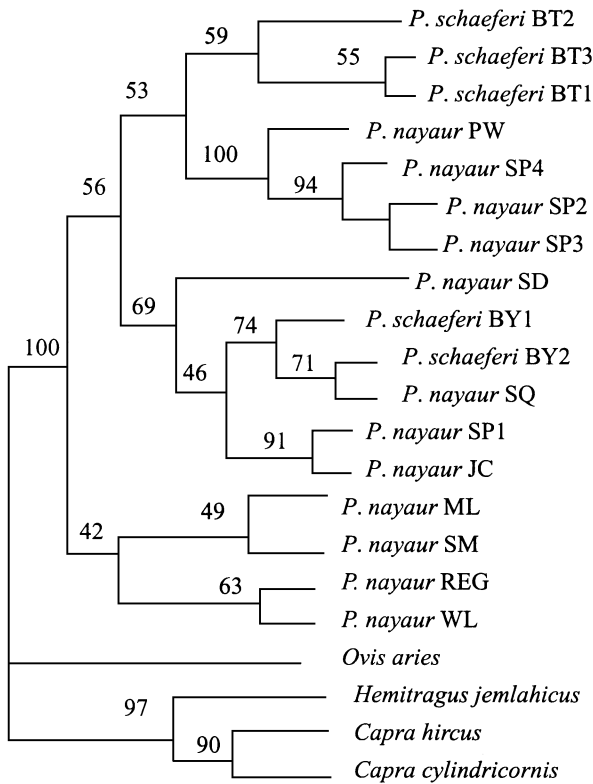


图 1 基于 Cyt b 基因全序列用 ML 法重建的系统发育一致树 (1 000 复制品)

Fig. 1 Strict consensus tree based on Cyt b gene complete sequence obtained from maximum likelihood methods. The numbers are the bootstrap values calculated for 1 000 replicates

学名后物种代码含义同表 1 (The meaning of the species code after each academic name is the same as that in the Table 1)

由于样品采集的困难，很多学者常常使用很少量的个体来探讨分子系统学的问题，对于一些珍稀动物尤其如此。但是这种分析所得到的样品间的遗传差异到底是种间差异还是种内差异，是很难说清楚的。曹丽荣等 (2003) 曾用同样的方法分析了岩羊和矮岩羊的进化关系，认为矮岩羊和岩羊的分化已经达到亚种的水平。本文利用来自不同地方的样品，发现原来认为是一个独立物种的矮岩羊样品和岩羊样品之间的变异属于种内变异，从本文分析结果来看，矮岩羊更可能是一个有遗传分化的地理种群或生态型。造成这种差异的主要原因可能是曹丽荣等所用标本太少，特别是来自四川不同地区的岩羊标本太少。

结合本文的研究结果与四川省的动物地理区划 (胡锦矗等, 1984)，四川的岩羊大致可划分为 5 个种群 (图 3)，即川西北种群、川西种群、川北种

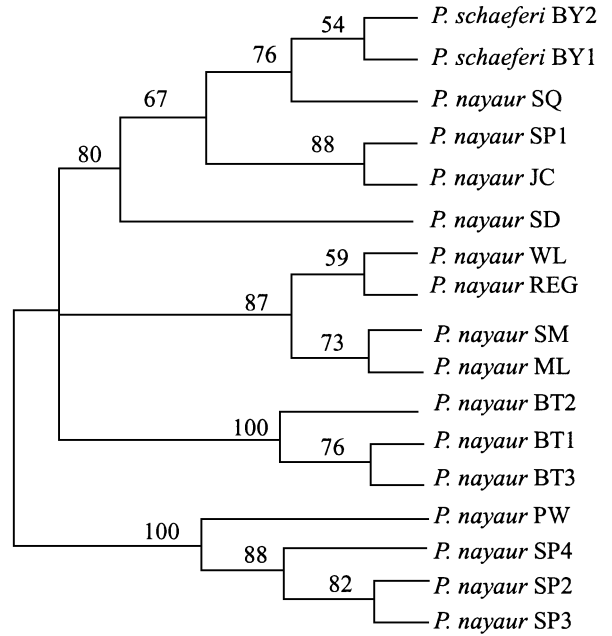


图 2 基于 17 个个体的 Cyt b 基因全序列经过 1 000 次复制后的 NJ 无根压缩树 (bootstrap 值小于 50 % 的结点被去除)

Fig. 2 Unrooted NJ condensed tree of Cyt b gene based on complete sequence of 17 individuals. The numbers are the bootstrap values calculated for 1 000 replicates (nodes which the bootstrap value below 50 % were removed)

学名后物种代码的含义同表 1 (The meaning of the species code after each academic name is the same as that in the Table 1)

群、川西南种群和摩天岭种群，这 5 个种群与四川的各大山系或水系的分布相一致。只是摩天岭种群和川北种群在本文中被划分为两块，根据地形及生态特征，它们可能被划开更为合理。

在所分析的样品中，“松潘 9801”收集自松潘县一个老乡家，其产地不清楚。根据图 1，我们推测它可能是来源于金川康定一带。

岩羊的遗传变异比较高。从表 4 可见，各种群间的遗传差异比较大，只是川西种群和川西北种群间的遗传差异稍小，这两者间的地理距离也最近。种群内的差异比较低，但川北、摩天岭以及川西南种群内的差异较大，这可能是与这些种群内样品的地理位置相隔太远，要进行遗传交流比较困难有关。岩羊的这种种群间比较大的遗传差异，可能是长期地理隔离造成的。近年来，随着人类社会经济的发展，各种各样的工地建设，如水库、公路的建设，使其栖息地岛屿化，人为地阻隔了不同种群间的遗传交流。如果这种情况不能得到有效控制，由

于各种群间不能进行遗传交流, 而种群数量不断地下降, 势必会造成种群内的近亲交配, 最终导致现有遗传多样性的丢失。

表 4 根据 1 137 bp 的蛋白编码区所计算出的四川岩羊种群间的 Cyt *b* 基因的核苷酸变异 (用 Jukes and Cantor 's 遗传距离表示)

Table 4 Nucleotide variation of Cyt *b* gene between two blue sheep populations in Sichuan, based on 1 137 bp coding region

	1	2	3	4	5
1 川西种群 (Chuanxi population)	0.0006				
2 川北种群 (Chuanbei population)	0.0228	0.0159			
3 川西北种群 (Chuanxibei population)	0.0191	0.0229	0.0099		
4 摩天岭种群 (Motianling population)	0.0234	0.0309	0.0229	0.0154	
5 川西南种群 (Chuanxinan population)	0.0252	0.0227	0.0253	0.0307	0.0195

对角线上的黑体数字为种群内的遗传变异, 对角线以下为种群间的遗传变异 (Diagonal numbers in bold italics: nucleotide variation within population. Lower left, average sequence variation between two populations)

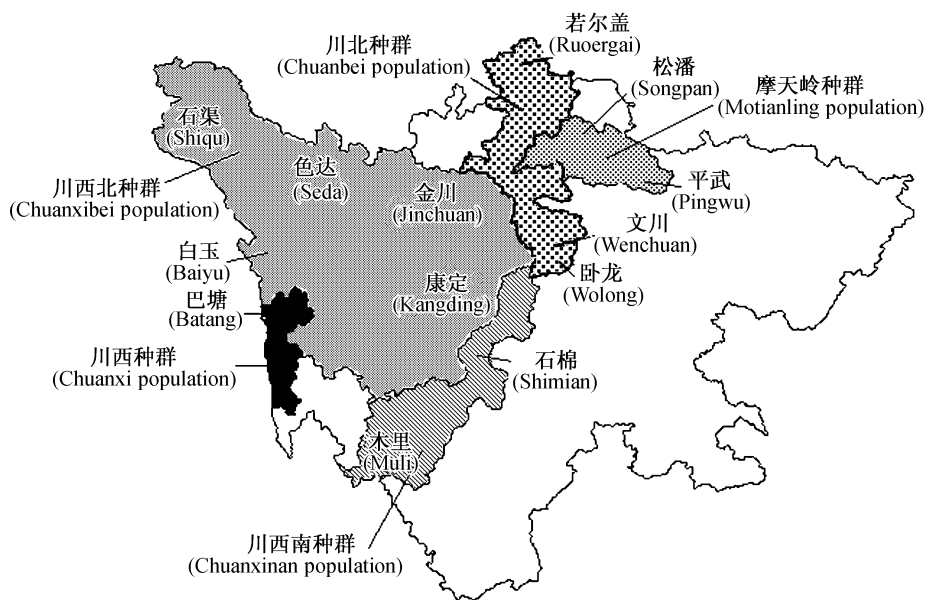


图 3 四川岩羊各种群的分布

Fig. 3 Distribution of blue sheep populations in Sichuan Province

电子地图由四川省林业厅提供 (The base electronic map was provided by the Forestry Department of Sichuan Province)

参考文献 (References)

- Allen, G. H. 1940 The mammals of China and Mongolia. *Natural History of Central Asia* 11 (2): 1 268 ~ 1 275.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. De Bruijin, A. R. Coulson, I. E. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden and I. G. Young 1981 Sequence and organisation of human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457 ~ 465.
- Brown, W. M. 1981 Mechanism of evolution in animal mitochondrial DNA. *Annals of the New York Academy of Science* 361: 119 ~ 134.
- Cai, C. P., J. C. Hu and J. T. Peng 1990 The dwarf blue sheep of Western Sichuan. *Journal of East China Normal University Mammalia Ecology Supplement* 9: 90 ~ 95. [蔡昌平, 胡锦涛, 彭基泰 1990 川西的矮岩羊. 华东师范大学学报 哺乳动物专辑 90 ~ 95.]
- Cao, X. R., F. J. Shu, X. R. Zhang, C. M. Bi, C. J. Li, J. Hu and J. Y. Fang 2002 Phylogenetic relationships of *Elaphodus cephalophus* and three *Muntiacus* species revealed by mitochondrial cytochrome *b* nucleotides sequence. *Acta Zool. Sin.* 48 (1): 44 ~ 49. [曹祥荣, 束琤璋, 张锡然, 毕春明, 李朝军, 胡均, 方笈阳 2002 毛冠鹿与 3 种麝属动物的线粒体细胞色素 *b* 的系统进化分析. 动物学报 48 (1): 44 ~ 49.]

- Cao, L. R., X. M. Wang and S. G. Fang 2003 A molecular phylogeny of bharal and dwarf blue sheep based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Acta Zool. Sin.* **49** (2): 198~204. [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** (2): 198~204.]
- Corbet, G. B. and J. E. Hill 1991 A world list of mammalian species (3rd edn). London: Oxford University Press, 165~166.
- Felsenstein, J. 1993 PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Seattle: University of Washington.
- Felsenstein, J. 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783~791.
- Groves, C. 1978 The taxonomic status of the dwarf blue sheep (*Artiodactyla*: Bovidae). *Saugetierk. Mitt.* **26** (3): 177~183.
- Holdenorth, T. 1963 Klassifikation der Säugetiere: Artiodactyla. *Handb. d. Zoologie* **32**: 1~167.
- Hassanin, A., E. Pasquet and J. D. Vigne 1998 Molecular systematics of the subfamily Caprinae (*Artiodactyla*, Bovidae) as determined from cytochrome *b* sequences. *J. Mammal. Evol.* **5** (3): 217~236.
- Hu, J. C. and Y. Z. Wang 1984 Sichuan Fauna Economica (Vol. 2). Chengdu: Sichuan Science & Technology Press, 309. [胡锦涛, 王酉之. 1984. 四川资源动物志 (第二卷). 成都: 四川省科学技术出版社, 309.]
- Irwin, D. M., T. D. Kocher and A. C. Wilson 1991 Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**: 128~144.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, A. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson 1989 Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6196~6200.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei 2001 MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Tempe: Arizona State University.
- Nowak, R. M. 1991 Walker's mammals of the world (5th edn). London: The Johns Hopkins University Press, 711~712.
- Rozas, J. and R. Rozas 1999 DnaSP Version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**: 174~175.
- Schaefer, E. 1937 On the dwarf bharal (*Pseudois spec. nov*) and the large bharal (*P. nahhor* Hodgson) of the Tibet. *Zool. Garten Leipzig* **9** (6): 263~278.
- Schaller, G. B. 1977 Mountain Monarchs: wild sheep and goats of the Himalaya. Chicago: Univ. Chicago Press, 44.
- Tan, A. M. and D. B. Wake 1995 MtDNA phylogeography of the California Newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**: 383~394.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson 1999 CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program, version 1.8.
- Wang, Y. Q., K. Y. Zhou, L. S. Xu., G. Yang and G. J. Xu 1999 The evolutionary relationships of several colubrid snakes suggested by sequences analysis of Cyt *b* gene fragment. *Acta Zool. Sin.* **45** (3): 332~338. [王义权, 周开亚, 徐璐珊, 杨光, 徐国均 1999 几种游蛇的 Cyt *b* 基因片段序列分析及其演化关系. *动物学报* **45** (3): 332~338.]
- Wu, Y., C. G. Yuan, J. C. Hu, J. T. Peng and P. L. Tao 1990 A biological study of dwarf blue sheep. *Acta Theriologica Sinica* **10** (3): 185~188. [吴毅, 袁重桂, 胡锦涛, 彭基泰, 陶沛林 1990 矮岩羊生物学的研究. *兽类学报* **10** (3): 185~188.]
- Zhang, Y. Z. 1997 Distribution of Mammalian Species in China. Beijing: China Forestry Publishing House, 135~136. [张荣祖 1997 中国哺乳动物分布. 北京: 中国林业出版社, 135~136.]
- Zhou, C. Q., K. Y. Zhou and J. C. Hu 2000 PCR analysis of DNA of the skull and skin specimens of *Pseudois*. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)* **23** (3): 147~150. [周材权, 周开亚, 胡锦涛 2000 岩羊属陈旧头骨、皮张标本的 DNA 提取和 PCR 扩增. *南京师范大学学报 (自)* **23** (3): 147~150.]
- Zhou, J. L., Y. P. Zhang, M. H. Huang, Y. J. Chen, X. Q. Chen and G. D. Yao 2001 Phylogenetic relationships among crotalinae based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations. *Acta Zool. Sin.* **47** (4): 361~366. [周继亮, 张亚平, 黄美华, 陈永久, 陈小青, 姚耿东 2001 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育. *动物学报* **47** (4): 361~366.]