

# 牦牛的分类学地位及起源研究： mtDNA D-loop 序列的分析

郭松长<sup>1,2</sup> 刘建全<sup>1</sup> 祁得林<sup>1,2</sup> 杨洁<sup>1,2</sup> 赵新全<sup>1\*</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物进化与适应开放实验室, 西宁, 810001) (2 中国科学院研究生院, 北京, 100049)

**摘要:** 牦牛的起源与属级分类学地位至今仍然存在一定的争议。我们测定了家养牦牛和野生牦牛线粒体控制区 (D-loop) 序列, 并以此构建牦牛和牛属、野牛属、水牛属以及非洲水牛属相关种的系统发育树。研究结果表明线粒体 D-loop 区与 Cyt *b* 基因序列在构建牛族的系统发育具有同样重要的价值。系统发育关系显示野牛属的灭绝种草原野牛与现存种美洲野牛先聚合为一单系群, 然后再和牦牛形成一单系分支, 表明牦牛与野牛属的草原野牛、美洲野牛亲缘关系最近, 具有最近共同祖先, 而与牛属的其它亚洲物种亲缘关系较远。因此, 本研究不支持将牦牛独立为牦牛属——*Poephagus*, 牛属与野牛属在分类上也应合并为一个属。基于上述研究结果和化石证据, 我们进一步对牦牛起源的历史背景进行了讨论, 认为牦牛与野牛属的分化是由于第四纪气候变化在欧亚大陆发生的, 野牛通过白令陆桥进入北美; 冰期结束后, 由于欧亚大陆其它地区温度升高, 牦牛只能局限分布在较为寒冷的青藏高原; 而野牛属在北美先后分化为草原野牛和美洲野牛, 前者可能是后者的直接祖先。

**关键词:** 牦牛; 线粒体 DNA; 控制区; 分类学地位; 起源

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2006) 04 - 0325 - 06

## Taxonomic placement and origin of yaks: implications from analyses of mtDNA D-loop fragment sequences

GUO Songchang<sup>1,2</sup>, LIU Jianquan<sup>1</sup>, QI Delin<sup>1,2</sup>, YANG Jie<sup>1,2</sup>, ZHAO Xinquan<sup>1\*</sup>

(1 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biological Evolution and Adaptation, Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001, China)

(2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

**Abstract:** The origin and generic placement of the yak (*Bos grunniens*), a large ungulate endemic to Qinghai-Tibetan Plateau, remains unresolved. 637 bp of mitochondrial DNA control region of both wild and domesticated yaks were sequenced. We found that D-loop region sequences were similarly informative to commonly used cytochrome *b* gene in constructing phylogeny for tribe bovine. Based on the genetic variation of this sequence, we firstly constructed a more discernable phylogeny of Bovini with high support than previous analyses. The analyses suggested that in Bovini, two monophyletic lineages were recovered; one comprising *Bubalus* and the other consisting of all species of *Bos* and *Bison*. Two species of *Bison*, the extinct species *B. priscus* and the extant species *B. bison*, clustered as a monophyletic lineage which is a sister to *Bos grunniens*. These results suggested that yaks are more closely related to North American *Bison* than to other species of *Bos* in Asia, and that yaks and North American bison have a common recent ancestor. Our results did not support a previous suggestion of establishing a monotypic genus (*Poephagus*) to accommodate yaks. Because species of neither *Bos* nor *Bison* clustered as respective monophyletic lineages, these two should be taxonomically treated as one genus. Based on our results and other available fossil evidence, we discuss the historical context regarding the origin of yaks. The divergence between yaks and bison may have occurred in the Eurasia during the Quaternary climatic oscillation, when rising temperature following the ice ages restricted yaks to the cold Qinghai-Tibetan Plateau. Bison migrated to North America through the Bering Land Bridge and differentiated two species. It seems likely that American bison originated directly from extinct steppe bison.

**Key words:** D-loop; Mitochondrial DNA; Origin; Taxonomic placement; Yak (*Bos grunniens*)

基金项目: 国家基础研究规划项目课题资助 (20005CB422005)

作者简介: 郭松长 (1976 -), 男, 博士研究生, 主要从事动物分子生态学研究。

收稿日期: 2006 - 03 - 16; 修回日期: 2006 - 08 - 08

\* 通讯作者, correspondence author, E-mail: xqzhao@nwipb.ac.cn

牦牛 (*Bos grunniens*) 是牛亚科动物中的稀有种, 包括两种类型: 野牦牛和家牦牛。关于牦牛的属级分类学地位一直存在争议, 根据 Simpson 等 (1945)、Ansell (1971) 及 Vaughan 等 (1978) 的研究, 牛族 (Bovini) 包括 4 个属, 即牛属 (*Bos*)、野牛属 (*Bison*)、水牛属 (*Boselaphus*) 以及非洲水牛属 (*Syncerus*)。Linnaeus (1766) 将野牦牛置于牛属中; 这一观点也得到了 Bohlken (1958, 1961) 的支持, 他们还认为牛属物种 (含牦牛) 是单系发生群, 较早就已经与野牛属分离, 各自进化为现代的各物种。但是, 根据头盖骨形态学分析, Groves (1981) 认为牦牛与野牛属亲缘关系较近, 而与其它牛属物种的亲缘关系较远; Olsen (1990) 进一步指出牦牛的前颌骨、上颌骨和鼻骨之间的形态特征组合不同于牛属、野牛属, 应将其独立为牦牛属 (*Poephagus*)。

Miyamoto 等 (1989) 根据部分线粒体 DNA 序列 (16S、12S rRNA, 3 个 tRNA 基因与部分 D-loop 序列)、Wall 等 (1992) 利用核糖体 DNA (rDNA) 限制性内切酶切位点图谱建立了牛族的系统发育关系, 认为该族中存在两支——野牛属—牛属支与水牛属—非洲水牛属支, 但牛属、野牛属均不是单系群。基于线粒体 CO II 基因序列的分析, Janeček 等 (1996) 进一步发现野牛属—牛属为一单系群, 但两个属的物种各自并不成为单系群; 同时, 他们的研究结果还表明非洲水牛属与水牛属为一单系群。Hassanin 和 Douzery (1999) 根据 Cyt *b* 基因序列构建了牛科动物的系统发育, 牛族仍然获得了两个分支, 即野牛属—牛属支和水牛属—非洲水牛属支; Hassanin 和 Ropiquet (2004) 进一步利用 3 套 DNA 序列 (Lactoferrin 基因启动子、Cyt *b* 基因及 CO II 基因) 探讨了牛族的系统发育与已灭绝的柬埔寨野牛 (*Kouprey*, *B. sauveli*) 的系统位置及分类学地位, 结果显示野牛属—牛属支、水牛属—非洲水牛属均为单系群, 牦牛与美洲野牛 (American bison, *Bison*) 的亲缘关系较近。这些研究均不支持将牦牛列入牛属的观点 (Linnaeus, 1776; Bohlken, 1958, 1961), 表明应该把该物种作为野牛属成员, 或独立为一个单型属 (Olsen, 1990), 或者是作为一个广义牛属 (包括野牛属与牛属) 的成员。然而, 在这些利用分子证据建立的系统发育树中, 关键分支的支持率均不是很高; 特别是他们的研究结果显示牛族的水牛支与野牛属—牛属支的亲缘关系没有得到很好的支持

(Janeček, 1996; Hassanin and Douzery, 1999; Hassanin and Ropiquet, 2004), 从而暗示牛族可能不是一单系发生群。

美洲野牛系广泛分布于北美地区的野牛属现存物种, 包括森林野牛 (*B. bison athabascae*) 与平原野牛 (*B. bison bison*) 两个亚种 (Boyd, 2003); 而草原野牛 (*B. priscus*) 是一种已灭绝、外形与美洲野牛相似的大型野牛属动物, 曾广泛分布于全北区。关于美洲野牛的进化存在多种假说, van Zyll de Jong (1986, 1993) 认为美洲野牛系草原野牛进化而来, 这也是较为流行的观点之一。尽管已有的分子系统进化研究表明牦牛与美洲野牛之间的亲缘关系较近 (Hassanin and Ropiquet, 2004), 来自化石与分子标记资料也表明牦牛与野牛的分化可能发生于 180 万年前 (Flerow, 1980; Hassanin and Ropiquet, 2004), 但美洲野牛、草原野牛以及牦牛三者之间的关系如何仍不清楚。

相对于细胞色素 *b* (Cyt *b*)、12S rRNA 等线粒体编码基因多用于探讨动物种以上分类等级的系统发育关系 (如 Kuznetsov, 2002; Hassanin and Ropiquet, 2004), mtDNA 控制区 (D-loop) 主要是用于种以下的种群遗传、谱系关系和谱系地理学 (Phylogeography) 的研究 (如 Troy *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2002; Savolainen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006)。由于利用 Cyt *b* 建立的牛亚科或牛族部分物种的系统发育关系没有得到很好地分别, 而灭绝种草原野牛又未获得 Cyt *b* 的全序列, 因而牛族的系统发育以及现存种与灭绝种之间的亲缘关系仍需要进一步从其它分子片段进行深入研究。本研究尝试利用变异速率较快的 D-loop 区构建牛族的系统发育树, 在此基础上探讨牦牛、美洲野牛以及灭绝种草原野牛之间的系统关系, 为牦牛的分类地位及起源提供分子遗传学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

牛亚科动物的分族采用 Simpson (1945) 和 Vaughan 等 (1978) 根据形态所做的分类标准进行划分。我们在本研究中使用 2 头家牦牛的肌肉组织和 1 头野牦牛的皮张组织作为实验材料, 其中家牦牛分别采自青海玉树县和西藏日喀则, 野牦牛采自可可西里地区。其余物种的 D-loop 序列下载于 GenBank, 各基因序列号见表 1。

表 1 研究物种, DNA 序列以及其 GenBank 登录号

Table 1 Species, DNA fragments and their accession numbers in GenBank

分类 Taxon	种名 Species	登录号 Accession number D-loop
Bovidae, <i>Capra</i>	野山羊 <i>Capra aegagrus</i>	AB110591
Bovidae, <i>Capra</i>	山羊 <i>Capra hircus</i>	DQ121611
Bovidae, Bovinae	美洲野牛 <i>Bison bison</i>	U12948, U12959
Bovini, <i>Bison</i>	欧洲野牛 <i>B. bonasus</i>	AF083356
	草原野牛 <i>B. priscus</i>	AY748659, AY748663
Bovini, <i>Bos</i>	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	L27714, L27733
	家牛 <i>B. taurus</i>	AY378117, AF409056
	大额牛 <i>B. frontalis</i>	AF405068
	印度野牛 <i>B. gaurus</i>	AF485067
	野牦牛 <i>B. grunniens</i>	DQ139204*
	家牦牛 <i>B. grunniens</i>	DQ139009*, DQ139176*
	爪哇野牛 <i>B. javanicus-Banteng</i>	AF162490
	原始牛 <i>B. primigenius</i>	AF162488
Bovini, <i>Bubalus</i>	印度水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	AF475239, AF475170
Boselaphini, <i>Boselaphus</i>	蓝牛 <i>Boselaphus tragocamelus</i>	AJ235316

\* 为本次新测序列

\* Sequences produced during this study

## 1.2 基因组 DNA 提取

洗净的毛皮、肌肉组织约 50 mg 于液氮中研磨成粉末后转移至 1.5 ml Eppendorf 管中, 总 DNA 提取参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克等, 1998) 并略作改动。DNA 溶液以紫外分光光度计进行浓度与纯度测定, 并稀释到终浓度 100 ng/ $\mu$ l, -20 °C 保存备用。

## 1.3 D-loop 部分序列的扩增及测序

采用 Primer premier 5.0 (Premier Biosoft) 自行设计引物, 由上海生工生物工程有限公司合成, 序列为: YDF 5' - GTAAAGAGCCTCACCAGTAT - 3' 及 YDR 5' - TCCTGTAGCCATTGACTAT - 3'。采用 30  $\mu$ l 扩增体系, 内含引物各 3 pM, 模板 DNA 0.4  $\mu$ l, dNTPs (Takara) 1.5 pM, 10  $\times$  Buffer (Takara) 3  $\mu$ l 及 Ex Taq 聚合酶 (Takara) 0.75 U。PCR 在 Tpersonal thermocycler (Biometra) 上进行, 循环参数为: 94 °C 预变性 4 min, 34 次循环, 包括 94 °C 变性 60 s; 50.1 °C 退火 60 s; 72 °C 延伸 60 s; 最后 72 °C 充分延伸 4 min, 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其片断大小及亮度。PCR 产物用试剂盒纯化 (中科开瑞, 上海)。纯化后的产物以相同引物及 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 进行测序反应, 纯化后在 Megabase 500 自动测序仪 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 上进行测序,

正反两条链相互重叠大于 90%。

## 1.4 DNA 序列数据的处理

序列经 Clustal X (1.8) (Thompson *et al.*, 1997) 软件排序, 再适当手动校对。以 Dna SP3.0 (Rozas and Rozas, 1999) 进行多态位点分析, 并在 Modeltest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) 上进行模型测试, 最后采用 PAUP \* 4.0b10 (Swofford, 2000) 进行系统发育分析。采用启发式搜索 (Heuristic search), 以最大简约法 (Maximum Parsimony, MP)、最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 重建系统发生树, MP 树各节点的置信度以自举检验分析 Bootstrap 进行 1 000 次重复; 在 ML 树中则为 200 次重复。此外, 本研究还采用 Mrbayes 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2004) 以 Bayesian 法构建系统发生树 (参数为: nst = 6, rates = gamma, ngen = 5 000 000, nchains = 6, printfreq = 1 000, samplefreq = 100)。

## 2 结果与分析

牦牛 D-loop 区全长 892 bp 左右。本实验所测为牦牛线粒体 D-Loop 区部分碱基序列, 长度为 637 bp, 与 GenBank 下载序列 (表 1) 排序后得到 605 bp 可比较序列, 其中可分析长度为 480 bp (空位作为缺失处理), 包括 190 个突变位点, 其中简约信息位点 161 个, 为总长的 39.58%。以野山羊

(*Capra aegagrus*) 和山羊 (*C. hircus*) 为外群构建了牛族包括灭绝种草原野牛在内的 11 个种 18 个个体以及蓝牛羚族 (*Boselaphini*) 中蓝牛 (*Boselaphus tragocamelus*) 的系统发育树, 如图 1。启发式搜索得到 1 个最简约树,  $CI = 0.675$ ,  $RI = 0.76$ ,  $Length = 553$ ; 采用最适模型 (GTR + I) 构建最大似然树,  $-\ln L = 3211.22$ 。

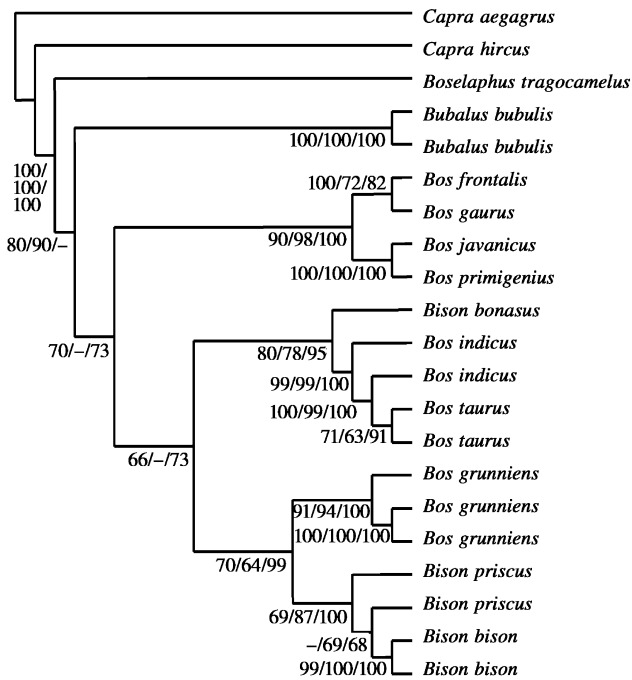


图 1 基于 D-loop 部分序列的牛亚科 12 个种系统发育树。节点数值依次为 MP、ML 自举检验分析的支持率以及贝叶斯后验概率。

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree for 12 species of Bovinae based on D-loop sequence variations. Numbers on each branch indicate bootstrap percentages obtained by MP, ML, and posterior Bayesian probabilities respectively.

从图 1 可知, 蓝牛羚族的蓝牛羚作为牛族的姊妹支, 获得了较高的支持率, 该节点的 MP、ML bootstrap 及 Bayesian 后验概率均为 100%。牛族分支中所有物种组成一个单系群, 获得了很好的统计支持, 其 MP、ML bootstrap 支持率分别为 80% 和 91%, 贝叶斯后验概率则高达 100%。从图 1 可知: 牛族中水牛属最早分化出来, 形成一个独立的分支; 另一支则由野牛属与牛属的物种组成。在野牛属—牛属分支上, 牛属的 4 个物种大额牛 (*B. frontalis*)、印度野牛 (*B. gaurus*)、爪哇野牛 (*B. javanicus*) 和原始牛 (*B. primigenius*) 组成一个亚分支, 其余为野牛属、牛属物种的姊妹群, 该分支的 MP、ML 及 Bayesian 支持率分别为 90%、98% 和 100%。另一亚分支上, 瘤牛 (*B. indicus*)、

家牛 (*B. taurus*) 和欧洲野牛 (*B. bonasus*) 组成一个单系群, 与 Hassanin 和 Ropiquet (2004) 的研究结果相符, 且瘤牛的一个个体和家牛结合在一起; 而牦牛、草原野牛和美洲野牛结合成单系群, 其中牦牛为独立分支, 草原野牛与美洲野牛为另一分支, 且草原野牛的一个个体和美洲野牛聚成的分支结合在一起, 并得到较高统计支持。

### 3 讨论

#### 3.1 牛族的系统发育及牦牛的分类学地位与起源

我们构建的系统发育树显示牛族中水牛属最早分化出来, 然后是牛属—欧洲野牛与牦牛—美洲野牛支的分歧。在该系统发育树中, 欧洲野牛与瘤牛、家牛的亲缘关系最近, 而美洲野牛与牦牛之间亲缘关系较近, 以上研究结果与前人的结论基本一致 (Bohlken, 1958, 1961; Groves 1981; Miyamoto *et al.*, 1989; Wall *et al.*, 1992; Ritz *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000; Boyd, 2003; Hassanin and Ropiquet, 2004)。综合这些研究结果, 由于野牛属、牛属均不是单系, 但野牛属和牛属共同构成单系群, 因此, 将这两个属合并为一个属可能更为合理; 同时, 我们的研究结果也不支持将牦牛作为一个独立属 (Olsen, 1990) 的分类意见。系统发育分析中, 牛族作为一个单系群, 获得了较高的统计支持, 但牛族以外仅有一个类群参与分析, 因此, 该族在牛亚科更多类群参与的分析中是否仍保持为单系还值得进一步研究。

草原野牛曾广泛分布于全北区, 引起包括草原野牛在内的大型动物灭绝的主要原因可能与人类活动及气候变化有关 (Alroy, 2001; Guthrie, 2003; Brook and Bowman, 2004; Shapiro *et al.*, 2004)。美洲野牛系分布于北美地区的野牛属现存物种, 关于其进化存在多种理论 (COSEWIC, 2004), 较为一致的观点是: 草原野牛曾至少两次通过白令陆桥进入北美地区——分别发生于伊里诺冰期 (始于约 60 万年前) 与威斯康星冰期 (约 9 万年前), 在气候变化、地理隔离等因素作用下, 进入北美的草原野牛发生分化并演化成现今美洲野牛的两个亚种 (van Zyll de Jong, 1986, 1993)。我们以 D-loop 区序列构建的包括灭绝种草原野牛在内的牛族 11 个物种的系统发育树显示草原野牛的一个个体与美洲野牛结合在一起, 表明美洲野牛有可能起源于草原野牛, 与 van Zyll de Jong (1986, 1993) 的观点相符。

化石记录表明牦牛的祖先——原始牦牛曾广泛分布于内蒙古、中国北部、东西伯利亚、阿拉斯加和中亚北部 (Weiner, 2003)。来自化石及分子标记的资料表明牦牛与野牛的分化发生于 180 万年前 (Flerow, 1980; Hassanin and Ropiquet, 2004), 晚于牦牛与其它物种的分化时间。我们以 D-loop 部分序列构建的系统发育树显示牦牛、草原野牛及美洲野牛具有最近共同祖先, 与上述研究结果相符。第四纪的欧亚大陆气候反复波动, 造成物种分布在不同的冰川 (或冰期) 避难所, 或者气候变化造成物种占据不同的生态位, 进而发生物种分化 (Hewitt, 1996)。牦牛和野牛之间的分化可能发生在欧亚大陆, 与气温下降、冰川发育形成不同的生态位有关。第三纪以后, 由于受第四纪冰川的作用, 致使牦牛的近祖向南迁移而进入现在的青藏高原地带, 演化为现今野牦牛的分布区域, 并在欧亚大陆的东北部灭绝 (蔡立, 1992)。

### 3.2 D-loop 区序列在高级分类单位系统发育分析中的意义

Cyt *b*、12S rRNA 等线粒体编码基因变异较慢, 常用于动物种以上分类等级的系统发育关系重建; 而 D-loop 区序列因变异较快, 主要用于种下水平的谱系关系和谱系地理学研究。Hassanin 和 Ropiquet (2004) 利用 Cyt *b* 序列构建的牛亚科部分物种的系统树中, 欧洲野牛—家牛—瘤牛支的 MP bootstrap 支持率、Bayesian 后验概率分别为 70% 和 92%; 而以 D-loop 构建的系统树则分别达到了 80% 和 95%。此外, 仅以 Cyt *b* 构建的系统发育树中, 牛族的单系关系未能得到支持 (Hassanin and Douzery, 1999)。而我们以 D-loop 区部分序列得到的系统发育关系显示: (1) 蓝牛羚族的蓝牛羚作为牛族的姊妹支获得了有力支持; (2) 尽管没有更多牛族以外的类群参与分析, 系统发育分析表明水牛属与牛属、野牛属形成单系群 (MP、ML bootstrap 支持率及 Bayesian 后验概率分别达 80%、91% 和 100%), 是牛族的自然成员, 这与形态上的证据相吻合 (Simpson *et al.*, 1945; Ansell, 1971)。基于以上结果, 我们认为线粒体控制区与 Cyt *b* 基因序列在构建牛族的系统发育具有同样重要的价值, 能构建分辨率更高的系统进化树。

近年来, 动物分类学家越来越重视获得灭绝动物的 DNA 信息, 并以此来解决一些仅用形态学信息、历史记录及现存物种 DNA 无法解决的分化与进化问题。迄今为止, 已经对十几种灭绝动物的

DNA 进行了研究, 并取得了丰硕的成果 (Hanni *et al.*, 1994; Hoss and Paabo, 1996; Westerman *et al.*, 1999)。然而, 灭绝种往往较难扩增和测序较长的 DNA 序列, 而哺乳动物线粒体 D-loop 区相对较短, 能较为容易地扩增和测序 (Krings *et al.*, 1997, 1999; Ovchinnikov *et al.*, 2000), 且具有更快突变速率与更高的解析力, 对研究灭绝动物与野牛现存种之间的系统发育与进化关系具有重要的应用前景。在本研究中, 我们根据 D-loop 区部分序列构建的系统发育树, 推测草原野牛可能是美洲野牛的直接祖先, 为草原野牛的系统发育关系提供了初步的分子遗传学证据。

### 参考文献:

- Alroy J. 2001. A multispecies overkill simulation of the end-Pleistocene megafaunal mass extinction. *Science*, **292** (5523): 1893 - 1896.
- Ansell W F H. 1971. Family Artiodactyla. In: Meester J, Setzer H W eds. *The Mammals of African: An Identification Manual*, Part 2. 15. Washington D C: Smithsonian Institution Press, 1 - 93.
- Bohlken H. 1958. Vergleichende Untersuchungen an Wildrindern (Tribus Bovini Simpson, 1954). *Zool Jahrb*, **68**: 113 - 202.
- Bohlken H. 1961. Haustiere und Zoologische Systematik. *Z Tier Zuchtungsbiol*, **76**: 107 - 113.
- Boyd D P. 2003. Conservation of North American Bison: Status and Recommendation. *Calgary Alberta*, 27 - 28.
- Brook B W, Bowman D. 2004. The uncertain blitzkrieg of Pleistocene megafauna. *J Biogeogr*, **31** (4): 517.
- COSEWIC. 2004. Assessment and status report on the plains bison *Bison bison* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa.
- Flerow C C. 1980. Zur geographischen verbreitung der gattung poephagus im pleistozan und holozan. *Quartarpalaontolog*, **4**: 123 - 126.
- Groves C P. 1981. Systematic relationships in the Bovini (Artiodactyla, Bovidae). *Z Zool Syst Evolutionforsch*, **19**: 264 - 278.
- Guthrie R D. 2003. Rapid body size decline in Alaskan Pleistocene horses before extinction. *Nature*, **426**: 169 - 171.
- Hanni C, Laudet V, Stehelin D, Taberlet P. 1994. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 12336 - 12340.
- Hassanin A, Douzery E J P. 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol Phylogenet Evol*, **13** (2): 227 - 243.
- Hassanin A, Ropiquet A. 2004. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937. *Mol Phylogenet Evol*, **33**: 896 - 907.
- Hewitt G M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc*, **58**: 247 - 276.
- Hoss M, Paabo S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res*, **21**: 3913 - 3914.
- Huelsenbeck J P, Ronquist F. 2001. MrBAYES: Bayesian inference of

- phylogeny. *Bioinformatics*, **17**: 754 – 755.
- Janecek L L, Honeycutt R L, Adkins R M, Davis S K. 1996. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily Bovinae. *Mol Phylogenet Evol*, **6** (1): 107 – 119.
- Krings M, Geisert H, Schmitz R W, Krainitzki H, Paabo S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neanderthal type specimen. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 5581 – 5585.
- Krings M, Stone A, Schmitz R W, Krainitzki H, Stonking M, Paabo S. 1997. Neanderthal DNA sequence and the origin of modern humans. *Cell*, **90**: 19 – 30.
- Kuznetsov G V, Kulikov E E, Petrov N B, Ivanova N V, Lomov A A, Kholodova M V, Poltaraua A B. 2002. Mitochondrial 12S rDNA sequence relationships suggest that the enigmatic Bovid “Linh Duong” *Pseudonovibos spiralis* is closely related to Buffalo. *Mol Phylogenet Evol*, **23** (1): 91 – 94.
- Linnaeus C. 1766. *Systema Naturae*. twelfth ed, part 1, Holmiae, Sal-vii.
- Miyamoto M M, Tanhauser S M, Laipis P J. 1989. Systematic relationships in the Artiodactyl tribe Bovini (family Bovidae), as determined from mitochondrial DNA sequences. *Syst Zool*, **38** (4): 342 – 349.
- Liu Y P, Wu G S, Yao Y G, Miao Y M, Luikart G, Baig M, Beja-Pereira A, Ding Z L, Palanichamy M G, Zhang Y P. 2006. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol*, **38**: 12 – 19.
- Olsen S J. 1990. Fossil ancestry of the yak, its cultural significance and domestication in Tibet. Proceeding of the Academy of Natural sciences of Philadelphia. *Acad Nat Sci Phila*, **1142**: 73 – 100.
- Ovchinnikov I V. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, **404**: 490 – 493.
- Posada D, Crandall K A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817 – 818.
- Ritz L R, Glowateki-Mullis M L, MacHugh D E, Gaillard C. 2000. Phylogenetic analysis of the Tribe Bovini using micorsatellites. *Anim Genet*, **31**: 178 – 185.
- Rozas J, Rozas R. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**: 174 – 175.
- Savolainen P, Zhang Y P, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. 2002. Genetic evidence for an east Asian origin of domestic dogs. *Science*, **298**: 1610 – 1613.
- Shapiro B, Drummond A J, Rambaut A, Wilson M C, Matheus P E, S-her A V, Pybus O G, Gilbert M T P, Barnes I, Binladen J, Willerslev E, Hansen A J, Barishnikov G F, Burns J A, Davydev S, Driver J C, Froese D G, Harington C R, Keddie G, Kosintsev P, Kunz M L, Martin L D, Stephenson R O, Storer J, Tedford R, Zimov S, Cooper A. 2004. Rise and fall of Beringian steppe bison. *Science*, **306**: 1561 – 1565.
- Simpson G G. 1945. Principles of classification and a classification of mammals. *Bull Am Mus Nat Hist*, **85**: 1 – 350.
- Swofford D L. 2000. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewinak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**: 4876 – 4882.
- Troy C S, MacHugh D E, Bailey J F, Magee D A, Loftus R T, Cunningham P, Chamberlain A T, Sykes B C, Bradley D G. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, **401**: 1088 – 1091.
- van Zyll de Jong C G. 1986. A systematic study of recent bison, with particular consideration of the wood bison. *Nat Mus Nat Sci Publ in Nat Sci*, **6**: 1-69.
- van Zyll de Jong C G. 1993. Origin and geographic variation of recent North American bison. Alberta: *Studies in the Arts and Sciences*, **3**: 21 – 35.
- Vaughan T A. 1978. *Mammalogy*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.
- Wall D A, Davis S K, Read B M. 1992. Phylogenetic relationships in the subfamily Bovinae (Mammalia: Artiodactyla) based on ribosomal DNA. *J Mammal*, **73**: 262 – 275.
- Ward T J. 2000. An evaluation of the outcome of interspecific hybridization events coincident with a dramatic demographic decline in North American bison. Ph. D. dissertation, Texas A & M University, College Station, Texas.
- Weiner G, Han J L, Long R J. 2003. *The Yak* (2nd edition). The Regional Office for Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Bangkok, Thailand.
- Westerman M, Spriner M S, Kixon J, Krajewski C. 1999. Molecular relationships of the extinct pig-footed bandicoot *Chaeropus ecaudatus* (Marsupialia: Perameloidea) using 12S rRNA sequences. *J Mamm Evol*, **6**: 271 – 288.
- 蔡立. 1992. 中国牦牛. 北京: 农业出版社, 5 – 254.
- 金冬雁, 黎孟枫译. 1998. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社.