

石俊松, 田存锋, 许继国, 等. 应用线粒体基因序列分析虎的进化关系[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 13-17.

应用线粒体基因序列分析虎的进化关系

石俊松, 田存锋, 许继国, 张秀娟, 李 莉, 张守全

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究华南虎 *Panthera tigris amoyensis*、东北虎 *P. tigris altaica* 和孟加拉虎 *P. tigris tigris* 之间的进化关系。【方法】采用 PCR 扩增结合质粒测序的方法, 获得东北虎、孟加拉虎和华南虎线粒体 DNA *CO I* 基因 750 bp 序列、*CO III* 基因 737 bp 的序列和 *ND4* 基因 561 bp 的序列。使用 DNASTar 和 DNAssit 软件对这些序列进行碱基组成、序列间的转换/颠换值、遗传距离等分析。选择家猫 *Felis catus*、猎豹 *Acinonyx jubatus* 及云豹 *Neofelis nebulosa* 的 mtDNA 作为外群, 利用 Mega 4.0 采用邻接法重建华南虎、东北虎、孟加拉虎的进化关系树。【结果和结论】研究发现东北虎、孟加拉虎和华南虎线粒体 DNA *CO I*、*CO III* 和 *ND4* 基因变异位点较少, 且华南虎同孟加拉虎、东北虎的遗传距离要大于孟加拉虎和东北虎的遗传距离; 构建了华南虎、东北虎、孟加拉虎的 *CO I*、*CO III* 和 *ND4* 基因的基因树, 通过对基因树分析可以得东北虎和孟加拉均是由华南虎进化而来的结论。

关键词: 虎; 线粒体基因; 系统进化树

中图分类号: Q959.838.08

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)02-0013-05

Applications of mitochondrial genes to an analysis of the phylogenetic relationship among tigers

SHI Junsong, TIAN Cunfeng, XU Jiguo, ZHANG Xiujuan, LI Li, ZHANG Shouquan

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the phylogenetic relationship of South China tiger, *Panthera tigris amoyensis*, Siberian tiger, *P. tigris altaica* and Bengal tiger, *P. tigris tigris*. 【Method】The fragment sequences of three mitochondrial genes were achieved by sequencing the PCR clones. These included *CO I* 750 bp, *CO III* 737 bp and *ND4* 561 bp based on the three gene sequences analyses with the DNASTar software and the DNAssit software. Their base substitutions, Kimura 2-parameter distances and the percentage differences among three tiger subspecies were obtained. At the same time, the three genes sequences had fewer mutation sites. In addition, the Kimura 2-parameter distances of tiger subspecies was studied, selecting the mtDNAs of cat, *Felis catus*, leopard, *Acinonyx jubatus* and clouded leopard, *Neofelis nebulosa* as outgroup. The Mega 4.0 was used to reconstruct the evolutionary relationship of South China tiger, Siberian tiger, Bengal tiger with a neighbor-joining method. 【Result and conclusion】The results of the Kimura 2-parameter distances of tiger subspecies indicates that Siberian tiger is closer to Bengal tiger than to South China tiger. The results of the *CO I*, *CO III* and *ND4* genes show that Siberian tigers and Bengal tigers evolve from South China tigers.

Key words: tiger; mitochondrial gene; the phylogenetic tree

收稿日期: 2013-06-13 优先出版时间: 2014-01-03

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0828.013.html>

作者简介: 石俊松(1981—), 男, 硕士研究生, E-mail: junsongstone@126.com; 通信作者: 张守全(1964—), 男, 教授, E-mail: sqzhang@scau.edu.cn

基金项目: 973 计划项目(2010CB945001, 2011CB944202)

虎属于哺乳纲、食肉目、猫科、豹属、虎种,一般虎被分为8个亚种,现仅存5个亚种.在这仅存的5个亚种中,华南虎 *Panthera tigris amoyensis*、东北虎 *P. tigris altaica* 和孟加拉虎 *P. tigris tigris* 也濒临灭绝,尤其是华南虎.为了成功地保护物种,除了要保护其栖息地和最大限度地增加种群数量外,还必须保护其遗传多样性.遗传多样性贫乏的物种,在环境中将十分脆弱,因而其进化前景暗淡^[1].

为了制定有效的繁殖对策,以最大限度地保存圈养虎群体的遗传多样性,必须首先弄清起源群体的遗传结构,这是任一圈养动物繁殖中迫切需要解决的问题.由于虎类是一个比较年轻的类群,亚种间基因进化较保守,单一基因的信息量尚不足以解决该类群的系统发育问题,增加新的DNA序列的研究是解决问题的关键之一.同时,采用多基因序列数据也是由基因树到物种树的必然要求.近年来,人们开始注意线粒体DNA(mtDNA)在系统进化研究中的作用,同时人们已经把它们用于猫科动物的系统进化研究^[2-3].哺乳动物的线粒体DNA是双链环状DNA,能够独立复制,不与组蛋白结合,另外,线粒体DNA所具有的线粒体基因组复制与表达所需的多种酶则由核基因编码,因此,线粒体是一个半自主性细胞器^[4].White等^[5]研究发现线粒体DNA没有内含子,缺乏有效的基因修复系统,极易发生突变,与核DNA相比,mtDNA具有母系遗传、拷贝数多、突变率高和极少发生重组等特性,是研究分子生态学、系统进化和群体遗传学的一个关键工具;其中mtDNA高突变率和极少发生重组的特性,使得较短时间内积累的变异可以连续而忠实地遗传下去,通过分析这些变异的分布范围与频率等信息,从而可以更好地研究种群关系及系统进化.

郑涛^[6]利用中国产13种猫科动物的12SrRNA基因(约371 bp)和Cytb部分序列(约355 bp)进行了分析,其构建的进化树显示了云豹、豹、雪豹和虎具有较近的亲缘关系,支持将它们同归于豹属的观点.Luo等^[3]对134份虎样本的4 kb mtDNA序列进行了分析,提出现存的虎有6个亚种:东北虎、北印支虎、华南虎、马来虎、苏门答腊虎和孟加拉虎.张文平等^[7]利用线粒体DNA的D-loop区及ND5部分序列构建了东北虎、孟加拉虎和华南虎的系统进化树.韦鹄^[8]利用mtDNA的ND5基因研究了华南虎的遗传多样性.本文主要利用mtDNA COI基因、COIII基因和ND4基因部分序列来构建东北虎、孟加拉虎和华南虎的系统进化树,探讨3种虎的进化关系,也为虎的物种树的建立提供一些依据.

1 材料与方法

1.1 材料来源和 mtDNA 提取

本试验采集了广西熊虎山庄东北虎和孟加拉虎的血液样品,每种取3~4个个体,其中东北虎个体编号为Pta01、Pta02、Pta03和Pta04,孟加拉虎编号为Ptt01、Ptt02、Ptt03和Ptt04.将虎麻醉后从尾部静脉采全血10 mL,按V(血液):V(ACD抗凝剂)=6:1的比例混匀抗凝,于-80℃条件保存备用.华南虎肌肉组织样来自广州动物园自然死亡的1头华南虎,编号为Pts01.

线粒体DNA的提取结合了DNA总基因组和质粒DNA的提取方法,并对常规酚-氯仿抽提法改进.所得的mtDNA溶于TE缓冲液中,-20℃条件保存备用.

1.2 PCR 扩增

根据从NCBI GenBank上搜索得到的家猫 *Felis catus* (NC_001700)、猎豹 *Acinonyx jubatus* (NC_005212,)、云豹 *Neofelis nebulosa* (NC_008450)的mtDNA全序列,利用DNAssist 1.0比对,选取序列的保守区,利用Primer premier 5.0软件设计引物,并由Oligo检验,最后由上海生工生物工程技术有限公司合成.COI引物序列为:F-GCTCGAACCTCTGTCTT-TAG,R-CCAAAACCGGGTAGGATTAA;COIII引物序列为:F-GCCTATGTTTTTACCCTGCT,R-CTACGTCTACG-AAGTGTCAG;ND4引物序列为:F-GGCAATCAAAA-CAGAGCG,R-GGAAGTTAGTCCCGTGGG.

PCR扩增条件:25 μL反应体系含50 ng基因组模板,1×PCR缓冲液,8 μmol/L引物,200 μmol/L dNTP,1.5 mmol/L Mg²⁺,1 U Taq DNA聚合酶.94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,35个循环;72℃延伸50 s,72℃后延伸5 min,4℃条件下保存产物.

1.3 产物的回收和测序

PCR产物经凝胶电泳检测后,由DNA胶回收试剂盒(上海生工)回收纯化,并与pMD18-T载体(TaKaRa公司)连接,然后转化JM109感受态细胞后,经蓝白筛选,送阳性克隆的菌液到上海英骏生物科技有限公司测序.

1.4 序列分析及构建进化树

所有测得的序列比对(Sequence alignment)使用DNASar软件包的EditSeq、SeqMan、Megaligh等软件进行编辑,并进行人工校对,以确保序列的准确性.然后用DNAssit分析各物种间各个序列间的差异,单倍型多样性.用DNASar等计算序列的碱基组成及

序列间的转换/颠换值、遗传距离,并计算序列的碱基组成百分率等。

选择家猫、猎豹及云豹的 mtDNA 作为外群,利用 Mega 4.0 采用邻接法 (Neighbour-joining, NJ) 重建华南虎、东北虎、孟加拉虎的进化关系树,系统树中节点的自助置信水平 (Bootstrap confidence level, BCL) 应用自引导估计,共 1 000 次循环。

2 结果

2.1 华南虎、孟加拉虎和东北虎的 mtDNA 序列

通过测序,共得到 25 个序列,其中 *CO I* 基因 8 个个体 (东北虎 3 个、孟加拉虎 4 个、华南虎 1 个) 各 755 bp (NCBI GenBank 登录号: FJ422123, FJ422145, FJ455122, FJ455124, FJ455125, FJ461529 ~ 461531); *CO III* 基因 8 个个体 (东北虎 4 个、孟加拉虎 4 个) 各 742 bp, 华南虎 1 个个体 737 bp (NCBI GenBank 登录号:

FJ461532 ~ 461534, FJ465508 ~ 465511, FJ469625); *ND4* 基因 8 个个体 (东北虎 3 个、孟加拉虎 4 个、华南虎 1 个) 各 561 bp (NCBI GenBank 登录号: FJ608583 ~ 608585, FJ694968 ~ 694972)。

2.2 序列差异及分析

2.2.1 *CO I* 基因 通过 DNAssist 软件对这些序列的优化及比对,发现 3 只东北虎中出现 3 种线粒体 *CO I* 单倍型,共有 2 个变异位点;4 只孟加拉虎出现 2 种线粒体 *CO I* 单倍型,只有 1 个变异位点。

由序列比对可知,8 个个体的序列共检测到多态位点 13 个,占分析位点总数 (750 bp) 的 1.73%, 2 核苷酸间的变异位点 13 个,无 3 核苷酸间的变异位点。因此,3 个虎亚种的 mtDNA *CO I* 基因序列变异主要有转换和颠换 2 种类型,无转换与颠换共存的现象。东北虎、孟加拉虎、华南虎和云豹的序列两两碱基替换情况和遗传距离列于表 1。

表 1 东北虎、孟加拉虎、华南虎和云豹的 *CO I* 序列间的转换/颠换 (上三角) 和遗传距离 (下三角)

Tab.1 Numbers of transition/transversion (upper-right matrix) and genetic distances (Kimura 2-parameter model, lower-left matrix) for *CO I* sequences of Siberian tiger, Bengal tiger, South China tiger and clouded leopard

样品编号	Pta02	Pta04	Pta01	Ptt04	Ptt02	Ptt01	Ptt03	Pts01	云豹
Pta02		1/0	1/1	6/0	5/0	5/0	5/0	11/0	98/5
Pta04	0.001 3		0/1	5/0	4/0	4/0	4/0	10/0	99/5
Pta01	0.002 7	0.001 3		5/1	4/1	4/1	4/1	10/1	99/6
Ptt04	0.008 0	0.006 7	0.008 0		1/0	1/0	1/0	7/0	96/5
Ptt02	0.006 7	0.005 3	0.006 7	0.001 3		0/0	0/0	6/0	95/5
Ptt01	0.006 7	0.005 3	0.006 7	0.001 3	0.000 0		0/0	6/0	95/5
Ptt03	0.006 7	0.005 3	0.006 7	0.001 3	0.000 0	0.000 0		6/0	95/5
Pts01	0.014 8	0.013 4	0.014 8	0.009 4	0.008 0	0.008 0	0.008 0		93/5
云豹	0.158 1	0.159 9	0.161 5	0.154 5	0.152 7	0.152 7	0.152 7	0.149 2	

从表 1 中可以看出:虎亚种间的 Kimura 2-parameter 遗传距离范围为 0.001 3 ~ 0.014 8, 变异程度较大,亚种之间距离最小的为东北虎和孟加拉虎,最大的为东北虎同华南虎;东北虎个体之间的遗传距离和孟加拉虎个体之间遗传距离均小于亚种之间的遗传距离。云豹和虎亚种之间的距离范围是 0.149 2 ~ 0.161 5, 其中和华南虎最小,和东北虎最大。

2.2.2 *CO III* 基因 对 4 个东北虎个体、1 个华南虎个体和 4 个孟加拉虎个体的 mtDNA 进行了克隆测序,得到了这 9 个个体各 737 bp 的序列。通过 DNAssist 软件对这些序列的优化及比对,发现 4 只东北虎中只有 1 种线粒体 *CO III* 基因单倍型,4 只孟加拉虎也只有 1 种线粒体 *CO III* 基因单倍型。可见在虎中线粒体 *CO III* 基因个体差异极小。

位点 4 个,约占分析位点总数 (737 bp) 的 0.54%, 2 核苷酸间的变异位点 4 个,无 3 核苷酸间的变异位点。因此,3 个虎亚种的 mtDNA *CO III* 基因序列变异主要有转换和颠换 2 种类型,无插入/缺失和转换与颠换共存的现象。东北虎、孟加拉虎、华南虎和云豹的序列两两碱基替换情况和遗传距离列于表 2。

从表 2 中可以看出:虎亚种间的 Kimura 2-parameter 遗传距离范围为 0.000 0 ~ 0.005 5, 变异程度较大,遗传距离最大为东北虎和华南虎,而东北虎和孟加拉虎、华南虎和孟加拉虎之间的遗传距离是一样的 ($D = 0.002 7$)。东北虎个体之间、孟加拉虎个体之间遗传距离均为 0。云豹和虎亚种之间的遗传距离范围是 0.118 1 ~ 0.124 9, 变异程度较小,其中和华南虎遗传距离最小,和东北虎遗传距离最大。

由序列比对可知,9 个个体的序列共检测到多态

表 2 东北虎、孟加拉虎、华南虎和云豹的 *CO III* 序列间的转换/颠换(上三角)和遗传距离(下三角)

Tab. 2 Numbers of transition/transversion (upper-right matrix) and genetic distances (Kimura 2-parameter model, lower-left matrix) for *CO III* sequences of Siberian tiger, Bengal tiger, South China tiger and clouded leopard

样品编号	Pta01	Pta02	Pta03	Pta04	Ptt01	Ptt02	Ptt03	Ptt04	Pts01	云豹
Pta01		0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	3/1	80/2
Pta02	0.000 0		0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	3/1	80/2
Pta03	0.000 0	0.000 0		0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	3/1	80/2
Pta04	0.000 0	0.000 0	0.000 0		1/1	1/1	1/1	1/1	3/1	80/2
Ptt01	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.002 7		0/0	0/0	0/0	2/0	79/1
Ptt02	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.000 0		0/0	0/0	2/0	79/1
Ptt03	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.000 0	0.000 0		0/0	2/0	79/1
Ptt04	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.000 0	0.000 0	0.000 0		2/0	79/1
Pts01	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.002 7	0.002 7	0.002 7	0.002 7		76/1
云豹	0.124 9	0.124 9	0.124 9	0.124 9	0.121 6	0.121 6	0.121 6	0.121 6	0.118 1	

2.2.3 *ND4* 基因 对 3 个东北虎个体、1 个华南虎个体和 4 个孟加拉虎个体的 mtDNA 进行了克隆测序,得到了这 8 个个体的各 561 bp 的序列. 通过 DNAsist 软件对这些序列的优化及比对,发现 3 只东北虎只有 1 种线粒体 *ND4* 单倍型;4 只孟加拉虎有 2 种线粒体 *ND4* 单倍型,总共有 1 个变异位点.

由序列比对可知,8 个个体的序列共检测到多

态位点 3 个,约占分析位点总数(561 bp)的 0.53%,2 核苷酸间的变异位点 3 个,无 3 核苷酸间的变异位点. 因此,3 个虎亚种的 mtDNA *ND4* 区序列变异主要有转换和颠换 2 种类型,无缺失/插入、转换与颠换共存的现象. 东北虎、孟加拉虎、华南虎和云豹的序列两两碱基替换情况和遗传距离列于表 3.

表 3 东北虎、孟加拉虎、华南虎和云豹的 *ND4* 序列间的转换/颠换(上三角)和遗传距离(下三角)

Tab. 3 Numbers of transition/transversion (upper-right matrix) and genetic distances (Kimura 2-parameter model, lower-left matrix) for *ND4* sequences of Siberian tiger, Bengal tiger, South China tiger and clouded leopard

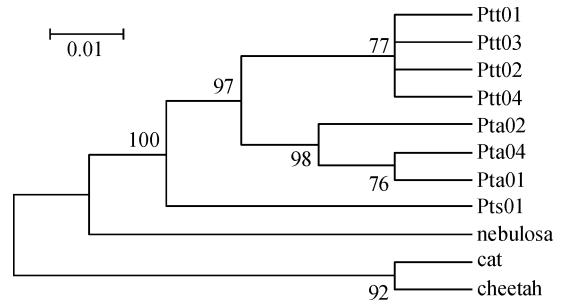
样品编号	Pta04	Pta02	Pta01	Ptt03	Ptt01	Ptt02	Ptt04	Pts01	云豹
Pta04		0/0	0/0	1/0	1/0	0/0	2/0	2/0	65/6
Pta02	0.000 0		0/0	1/0	1/0	0/0	2/0	2/0	65/6
Pta01	0.000 0	0.000 0		1/0	1/0	0/0	2/0	2/0	65/6
Ptt03	0.001 8	0.001 8	0.001 8		0/0	1/0	1/0	3/0	66/6
Ptt01	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.000 0		1/0	1/0	3/0	66/6
Ptt02	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 8	0.001 8		2/0	2/0	65/6
Ptt04	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.001 8	0.001 8	0.003 6		4/0	67/6
Pts01	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.005 4	0.005 4	0.003 6	0.003 6		65/6
云豹	0.144 2	0.144 2	0.144 2	0.146 6	0.146 6	0.144 2	0.144 2	0.144 2	

从表 3 可看出:虎亚种间的 Kimura 2-parameter 遗传距离范围为 0.000 0~0.005 4,变异程度较小;华南虎和孟加拉虎 2 个个体的遗传距离最大,和其他个体的遗传距离一样;而东北虎个体之间的遗传距离为 0.云豹和虎亚种之间的遗传距离范围是 0.144 2~0.146 6,变异程度较小,其中和孟加拉虎 2 个个体最大,和其他个体的遗传距离一样.

2.3 系统进化树的构建

利用 Mega 4.0 软件,基于 Kimura 两参数距离采用邻接法(NJ 法)来构建系统进化树,以云豹作为外群比较,同时引进家猫和猎豹的同区域序列作对照.从图 1~3 中可以看出该拓扑结构分为 3 个支系,东北虎同孟加拉虎聚在一起,自助置信水平为 99%;然

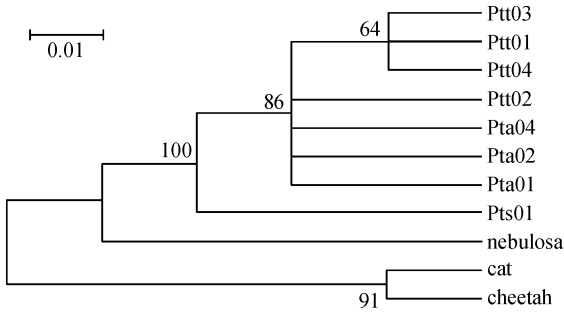
后再与华南虎的支系聚合.



分支上的数字为 1 000 次重复抽样分析得到的支持百分数.

图 1 基于 *CO I* 基因构建的系统进化树

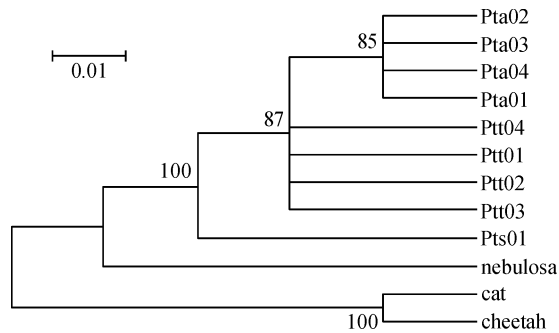
Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic trees with the Kimura-2 parameter model based on the *CO I* gene



分支上的数字为 1 000 次重复抽样分析得到的支持百分数.

图 2 基于 *CO III* 基因构建的系统进化树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic trees with the Kimura-2 parameter model based on the *CO III* gene



分支上的数字为 1 000 次重复抽样分析得到的支持百分数.

图 3 基于 *ND4* 基因构建的系统进化树

Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic trees with the Kimura-2 parameter model based on the *ND4* gene

3 讨论

3.1 3 个基因的保守性及在进化关系中的应用

在基因序列方面,3 个基因序列呈现较多的一致性.3 个基因序列都富含 A、T,而 G 的含量都是最少的.张方等^[9]认为脊椎动物线粒体基因组遗传密码的使用存在偏倚性,密码子的第 3 位碱基为 A 和 C 的比例明显高于 G 和 T,其中 A 的比例最高,G 最低.

从种内的单倍体个数来看,3 个基因单倍体个数都较少,呈现保守性,且种间多态性位点也较少,在位点的突变中也全部是转换和颠换,而且以转换为主,多为无义突变.衡量一个群体 mtDNA 的遗传多样性的指标有 2 个:单倍型多样度和核苷酸多样性.这 2 个指标的值越大,群体的多样性程度越高,遗传多样性越丰富,反之群体的多样性程度越低,遗传多样性越贫乏.因此一方面说明这 3 个基因比较保守,另一方面也说明 3 种虎的遗传多样性较低.

从遗传距离上看,不论个体还是亚种间,3 个基因呈现的遗传距离均较低,亚种间最高的为 *CO I* 基因,其最高遗传距离才为 0.014 8. Nei^[10]认为地理种群之间的遗传距离在 0.00~0.05,亚种间的遗传距离约为 0.05 或更大.然而有许多例外,在有些情况

下,亚种间的遗传距离可能与地理种群间的遗传距离一样小.由于亚种分类可能受到人为因素的影响,在分类学实践中亚种形态分化的标准以约 75% 的个体呈现不同为界限;另一方面,形态学变化和分子歧异之间既存在相关性,又存在独立性^[11],在分子水平研究亚种的亲缘关系时,得到的遗传距离可能会大于或小于 Nei^[10]估算的亚种间的遗传距离.例如, Ball 等^[12]对红翅黑鹇 *Agelaius phoeniceus* 的研究和 Carr 等^[13]对维基尼亚鹿 *Odocoileus virginianus* 的研究都表明种群间 mtDNA 差异程度较小,最大的分别为 0.008 和 0.016. Ashley 等^[14]对黑犀牛 *Diceros bicornis* 2 亚种的研究也证实了这一点,2 亚种之间的遗传距离仅为 0.002 9.吴平等^[15]利用 RFLP 和 PCR-RFLP 技术研究东北虎和华南虎线粒体 DNA 多态性,结果显示东北虎和华南虎的遗传距离只有 0.001 35.

3.2 从 3 个基因的序列片段构建的进化树看虎的进化关系

本研究结果可以看出华南虎和东北虎、孟加拉虎的遗传距离要大于东北虎和孟加拉虎之间的遗传距离,而以云豹为外群构建的进化树中也可以看出,3 个基因序列片段构建的进化树拓扑结构相近,均是东北虎和孟加拉虎先合为一枝,然后与华南虎汇合;且相同的亚种都聚在各自的树枝上,个体间的遗传差异较小,内群的平均遗传距离均小于外群的遗传距离,所以能够很好地区分和 3 个亚种间的关系. Kimball 等^[16]研究表明,置信度大于 70% 的进化枝是比较可信的,而本文构建的基因树除基于 *CO III* 基因构建的系统进化树有 1 支为 64% 外,其余均大于 70%,因此构建的基因树是可信的.从 *CO I*、*CO III* 和 *ND4* 基因构建的系统进化树我们可以得出东北虎和孟加拉虎均是由华南虎进化而来的结论.而谭邦杰^[17]从地理位置上、张文平^[1]从线粒体 DNA D-loop 区和 *ND5* 基因构建的进化树也均说明了 3 种虎的进化由来,鉴于现存华南虎的数量及华南虎在虎进化史上的地位,需要我们在华南虎的保护上作出更多的努力.

参考文献:

[1] 张文平. 华南虎、东北虎、孟加拉虎的 D-loop、ND5、16SrRNA、CytB 序列及其在系统进化研究的应用[D]. 成都:四川大学,2005.
 [2] WARREN E, JOHNSON S, O' BRIEN J. Phylogenetic reconstruction of the felidae using 16S rRNA and NADH25 mitochondrial[J]. *Genes J Mol Evol*, 1997, 44(1): S98-S116.

(下转第 46 页)

- of soluble P in soil water extracts determined by ion chromatography, colorimetric, and inductively coupled plasma techniques in ppb range [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 2001, 32(13/14): 2241-2253.
- [10] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统软件(版本号: 8.01, 著作权登记号: 2003SR1788) [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] SIMONIS A D. Effect of pH and solvent/soil ratio on extraction of phosphorus from soils by various extracting solutions [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1996, 27(5/6/7/8): 935-958.
- [12] CHAPMAN P J, EDWARDS A C, SHAND C A. The phosphorus composition of soil solutions and soil leachates: Influence of soil: solution ratio [J]. *Euro J Soil Sci*, 1997, 48(4): 703-710.
- [13] HYLANDER L D, SVENSSON H, SIMAN G. Different methods for determination of plant available soil phosphorus [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1996, 27(5/6/7/8): 1501-1512.
- [14] VAN ERP P J, HOUBA V J G, BEUSICHEM M L V. One hundredth molar calcium chloride extraction procedure: Part I: A review of soil chemical, analytical, and plant nutritional aspects [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1998, 29(11/12/13/14): 1603-1623.
- [15] 王永强, 刘泽菊. 磷钼杂多酸-孔雀绿分光光度法测定水中微量磷 [J]. *陕西化工*, 1999, 28(2): 34-37.
- [16] 张英, 韩权, 阎宏涛. 测定痕量磷的激光热透镜光谱法-钼蓝法与孔雀绿法的比较 [J]. *分析测试学报*, 2001, 20(5): 24-27.
- [17] 张红琴, 许生杰. 碱性染料杂多酸多元配合物显色反应的研究 [J]. *分析化学*, 1990, 18(8): 710-714.

【责任编辑 周志红】

(上接第 17 页)

- [3] LUO S J, KIM J H, JOHNSON W E, et al. Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*) [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(12): 2275-2293.
- [4] 陈诗书, 汤雪明. 医学细胞与分子生物学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1996.
- [5] WHITE D J, WOLFF J N, PIERSON M, et al. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(23): 4925-4942.
- [6] 郑涛. 云豹线粒体 DNA 全序列及中国 13 种猫科动物的系统发生关系分析 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2006.
- [7] 张文平, 张志和, 沈富军, 等. 华南虎、东北虎、孟加拉虎的 D-loop 和 ND5 序列及其在系统进化分析中的应用 [J]. *四川动物*, 2005, 24(1): 22-26.
- [8] 韦鹏. 圈养华南虎线粒体基因 NADH 脱氢酶亚基 5 序列多态性研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [9] 张方, 米志勇. 动物线粒体 DNA 的分子生物学研究进展 [J]. *生物工程进展*, 1998, 18(3): 25-31.
- [10] NEI M. *Molecular evolutionary genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [11] WILSON A C, CARLSON S S, WHITE T J. *Biochemical evolution* [J]. *Annu Rev Biochem*, 1977, 46(1): 573-639.
- [12] BALL R M, FREEMAN S, JAMES F C, et al. Phylogeographic population structure of red-winged blackbirds assessed by mitochondrial DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(5): 1558-1562.
- [13] CARR S M, BALLINGER S W, DERR J N, et al. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in west texas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(24): 9576-9580.
- [14] ASHLEY M V, MELNICK D J, WESTERN D. Conservation genetics of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*): I: Evidence from the mitochondrial DNA of three populations [J]. *Conservation Biology*, 1990, 4(1): 71-77.
- [15] 吴平, 周开亚, 王亚明. 用 RFLP 和 PCR2RFLP 技术研究东北虎和华南虎线粒体 DNA 多态性 [J]. *生物多样性*, 1997, 5(3): 173-178.
- [16] KIMBALL R T, BRAUN E L, ZWARTJES P W. A molecular phylogeny of the pheasants and part-ridges suggests that these lineages are not monophyletic [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 11(1): 38-54.
- [17] 谭邦杰. 虎在中国的分布 [J]. *中国动物园年刊*, 1986(1985/1986): 165-170.

【责任编辑 柴 焰】