

黑麂 (*Muntiacus crinifrons*) 3 个种群的遗传多样性

鲍毅新, 程宏毅, 周襄武, 陈 良, 胡知渊, 葛宝明

(浙江师范大学生态研究所, 浙江金华 321004)

摘要: 黑麂, 为我国特有动物, 被公认为目前世界上最珍稀的鹿科动物之一。为了更好地保护黑麂这一珍稀的濒危野生动物, 基于黑麂线粒体控制区序列对遂昌分布中心的 3 个黑麂种群的遗传多样性和基因流进行了研究。结果显示, 3 个种群的 36 个个体中有 13 个变异位点, 占分析序列长度的 2.71%, 且这 13 个变异位点皆为碱基置换, 并未出现碱基插入或缺失的现象, 并由此定义了 12 个单倍型。遗传多样性检测结果显示遂昌种群具有最高的遗传多样性, 应予以优先保护。从 Tajima's D 和 Fu and Li's D 值的估算结果来看, 这 3 个黑麂种群相对于中性进化的歧异度并没有明显的偏离 ($P > 0.1$), 没有明显的证据显示这 3 个黑麂种群间存在很强的平衡选择。3 个种群间基因流 N_m 均大于 1, 这 3 个黑麂种群间存在着较为丰富的基因流。3 个黑麂种群单倍型间的序列差异为 0.009, 这表明这 3 个黑麂种群的单倍型未出现分化。

关键词: 黑麂; 遂昌分布中心; 线粒体 DNA; 遗传多样性; 基因流

文章编号: 1000-0933(2008)08-4030-07 中图分类号: Q953; Q959.843 文献标识码: A

Genetic diversity of three populations of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*)

BAO Yi-Xin, CHENG Hong-Yi, ZHOU Xiang-Wu, CHEN Liang, HU Zhi-Yuan, GE Bao-Ming

Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 4030 ~ 4036.

Abstract: Black muntjac are currently threatened by habitat loss, fragmentation and human hunting, which has led to the extinction of three subspecies in the wild. In order to design effective conservation strategies for the black muntjac, we have investigated genetic diversity and gene flow in the black muntjac populations by analyzing about 480 base pairs of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region in 36 individuals sampled from Suichang, Songyang and Longquan. Black muntjac exhibited high mtDNA diversity with thirteen variable sites and twelve haplotypes identified. Neither the estimate of Tajima's D nor that of Fu and Li's D deviated significantly from the neutral selection hypothesis ($P > 0.1$) for three populations, showing no evidence of strong selective sweeps or balancing selection. Although there appears to be reasonably high gene flow among the three populations, these data single out the Suichang population as being highly genetically distinct and worthy of separate conservation consideration. Therefore, it is recommended that a breeding program for the Suichang population be established.

Key Words: Black muntjac (*Muntiacus crinifrons*); the center of Suichang; Mitochondrial DNA; genetic diversity; gene flow

黑麂, 属偶蹄目 (Artiodactyla) 鹿科 (Cervidae) 麂属 (*Muntiacus*), Selater 于 1885 年将其定名, 是中国的特

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370219)

收稿日期: 2007-04-19; 修订日期: 2008-04-09

作者简介: 鲍毅新 (1958 ~), 男, 浙江建德人, 教授, 主要从事动物生态学研究. E-mail: sky90@zjnu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation (No. 30370219)

Received date: 2007-04-19; **Accepted date:** 2008-04-09

Biography: BAO Yi-Xin, Professor, mainly engaged in wild life ecology. E-mail: sky90@zjnu.cn

有动物,无亚种分化,是典型的亚热带山地森林动物。

100 多年前,黑麂曾以皖浙和浙江遂昌为中心,广泛分布于浙江、安徽、江西、福建等省。近几十年来,山区的开发,过量采伐森林等人为活动影响的加剧,使黑麂的栖息地受到严重破坏,分布区面积不断缩小,现存种群的分布区处于 $27.5 \sim 31^{\circ}\text{N}$, $117 \sim 121.5^{\circ}\text{E}$ 之间,面积约 7.65 万 km^2 。在以上的分布区内有 2 个分布中心,一是皖浙分布中心,包括九华山和黄山,东至浙江的天目山,南至开化的石耳山一带;二是浙江西南的遂昌分布中心,包括牛头山和白云山一带。由于大量捕杀和栖息地的大量丧失,黑麂数量逐年下降,1987 年估计为 $5\,000 \sim 6\,000$ 头^[1]。1999~2000 年鲍毅新^[2]对浙江省黑麂资源进行专项调查,估计全省黑麂资源量为 $3\,500 \sim 4\,000$ 头。为拯救该物种,我国政府将其列为 I 级保护动物,濒危野生动植物物种国际贸易公约(CITES)和国际自然与自然资源保护联盟(IUCN)名录也分别将黑麂列入附录 I 和易危(Vulnerable, VU)级。因此,为了更好的保护该珍稀物种,必须对现存的黑麂种群的遗传结构进行研究。

近年来研究表明,遗传多样性的丧失对物种生存带来直接的不利影响^[3~5],可以使物种更加容易灭绝^[6~9]。濒危物种遗传多样性的丧失,主要与物种数量的下降和遗传漂变有关^[10]。任何物种,只有具备了一定的遗传多样性才能抵御自然界中的各种压力,否则,灭绝将是不可避免的^[10]。从广泛分布于我国南方地区,到目前成小种群栖息于安徽、浙江、江西和福建 4 省的片断化生境中,野生种群数量逐年减少。小种群容易发生遗传漂变,使得基因频率一代代发生随机性变化,导致基因结构趋向同质化,影响种群的进化动力。此外,小种群造成近交的机会增大,更易形成同质基因后代。物种的遗传多样性、遗传变异水平和种群遗传结构是其进化历史、分布格局、迁移方式和繁育方式等各种不同因素综合作用的结果。在进行黑麂种源保存和种群复壮前,有必要对现存种群内遗传多样性进行研究,以了解其对环境的适应性和进化潜力,并为制定有效保护策略和保护计划提供理论参考。

因此,本研究基于线粒体 DNA 控制区的遗传变异对黑麂分布的遂昌中心的 3 个种群的遗传多样性和遗传结构进行研究,分别是遂昌种群,松阳种群和龙泉种群,以期了解该分布中心的黑麂种群间的遗传分化和基因交流程度。

1 研究方法

1.1 研究区自然概况

遂昌分布中心,位于浙江西南部,地处浙、闽、赣三省交界处,包括牛头山和白云山一带。由于该中心植被良好,干扰少,已经成为我国黑麂最大种群的集中分布区之一。其中的九龙山自然保护区所在的遂昌县黑麂数量约为 769 头左右^[2]。该地区属中亚热带湿润季风区,受夏季风影响较大,一年中气候有明显的季节性变化。植被资源十分丰富,植被发育良好,地带性植被均是常绿阔叶林,以青冈(*Cyclobalanopsis glauca*)为优势种组成的群落最具特色。区内动物区系属东洋界,华中区东部丘陵平原亚界。

1.2 种群遗传结构和基因流测定

1.2.1 样品的采集

在 3 个黑麂种群所在区域采用样带法进行黑麂粪便样品的收集,同时收集黑麂的组织样品(肌肉、皮毛样品等)。本研究共采集 36 个黑麂个体的肌肉、皮毛组织和粪便样品共 36 份,其中遂昌种群 22 份、松阳种群 10 份、龙泉种群 4 份(表 1),对于粪便样品采用分子生物学手段进行个体鉴别,以排除来源于同一个体的可能。

1.2.2 DNA 的提取、扩增及测序

总的基因组 DNA 提取自黑麂组织、粪便样品,采用蛋白酶 K、酚/氯仿提取法^[11]。线粒体 DNA 控制区片断的扩增引物根据 Genbank 中黑麂线粒体 DNA 全序列设计(登录号:AY239042),两条引物分别为:MuntCR1 (5' TCT ATT TAA ACT ATT CCC TGA TGC 3'), MuntCR2 (5' GTG AGA TGG CCC TGA AGA AAG AAC 3')。两个引物分别位于控制区一侧编码 tRNA 脯氨酸的基因区域(15414~15437)和线粒体控制区的保守区域(15904~15927)。

表 1 黑麂样品信息总表

Table 1 Summary information on the samples of Black Muntjac used in this study

采样地点 Sampling Site	样品数 No. of individuals	样品类型 Tissue sample	观察资料 Observations	采样时间 Sampling year
浙江遂昌 Suichang of Zhejiang	1	肌肉 Muscl	野生 wildness	2002
	3	皮毛 Skin	野生 wildness	2000
	18	粪便 Faecal	野生 wildness	2005
浙江松阳 Songyang of Zhejiang	1	肌肉 Muscl	野生 wildness	2004
	3	皮毛 Skin	野生 wildness	2004
	6	粪便 Faecal	野生 wildness	2004
浙江龙泉 Longquan of Zhejiang	4	粪便 Faecal	野生 wildness	2004

PCR 扩增反应总体积 50 μ l, 其中 100 ng 模板 DNA, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 150 μ mol/L dNTP, 100 μ g/ml BSA, 0.3 μ mol/L 引物, 1.25 单位的 *Taq* DNA 聚合酶。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 38 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化后, 经过连接、转化和筛选, 用通用引物 (M13 +) 进行单向测序。测序在 ABI PRISM 377-96 上完成。每一 PCR 产物做 2~3 个克隆。

1.2.3 数据分析

序列结果用 Clustal X 软件^[12]进行 DNA 序列排列, 并辅以人工校对。用 MEGA2.1 软件^[13]进行序列比较和变异检测, 确定变异位和单倍型。用 DnaSP3.51 软件^[14]计算核苷酸多样性 (Nucleotide diversity, π)、单倍型多样性 (haplotype diversity, h) 和核苷酸歧异度 (Pairwise divergence)。用分子变异分析软件 (Analysis of molecular variance, AMOVA)^[15]计算遗传变异在种群内和种群间的分布及 F_{st} 值, 并用排列测验法 (Permutation test) 检验 F_{st} 显著性 (重复次数为 1 000)。分子变异分析在软件 ARLEQUIN 2.0^[16]上完成。种群间基因流用 N_m 来估计:

$$N_m = (1/F_{ST} - 1)/2$$

2 结果

2.1 遗传多样性检测结果

经线粒体 DNA 控制区基因 480bp 片断 (15434~15913) 遗传多样性分析发现, 36 个黑麂个体样品的线粒体 DNA 控制区基因 480bp 片断中包含 13 个变异位点, 占分析序列长度的 2.71%, 且这 13 个变异位点皆为碱基置换, 并未出现碱基插入或缺失的现象, 并由此定义了 12 个单倍型 (Haplotype) (表 2)。其中, 遂昌黑麂种群有 7 个单倍型 (SJ1~SJ7)、松阳黑麂种群有 4 个单倍型 (SJ1、SR1~SR3)、龙泉黑麂种群有 2 个单倍型 (LF1~LF2)。并发现, 遂昌黑麂种群的 1 个单倍型 (SJ1) 与松阳黑麂种群共享 (表 2)。

经过对 36 个黑麂个体样品的线粒体 DNA 控制区基因 480bp 片断和 12 个单倍型的序列 (表 3) 分析, 发现在 3 个黑麂种群中, 遂昌黑麂种群具有较高的遗传多样性, 表现在碱基差异数 (1~11 个)、核苷酸歧异度 (0.2~2.1%), 核苷酸多样性 (0.00883 $\pm$ 0.00154)。其他 2 个种群的遗传多样性依次为: 龙泉黑麂种群、松阳黑麂种群。从 Tajima's D 和 Fu and Li's D 值的估算结果来看, 这 3 个黑麂种群相对于中性进化的歧异度并没有明显的偏离 ($P>0.1$), 没有明显的证据显示这 3 个黑麂种群间存在很强的平衡选择 (表 3)。

2.2 分子变异分析和基因流

使用 ARLEQUIN 2.0 软件分析表明, 3 个种群间基因流 N_m 均大于 1, 这 3 个黑麂种群间存在着较为丰富的基因流 (表 4)。3 个黑麂种群单倍型间的序列差异为 0.009。这表明这 3 个黑麂种群的单倍型未出现分化 (表 5)。

3 讨论

黑麂栖息于高山密林中, 非常警觉, 普通的非损伤性取样, 如采集血液、少量活体组织等也十分困难。因

表 2 36 个黑鹿个体线粒体 DNA 控制区基因片断序列的变异位点、单倍型及其分布频率
Table 2 Mitochondrial DNA control region haplotype defined and distribution for black muntjac

种群 Population	单倍型 Haplotype	变异位点 Variation position	遂昌黑鹿 SJ (n = 22)	松阳黑鹿 SR (n = 10)	龙泉黑鹿 LF (n = 4)
		[122 222 333 344 4] [915 678 228 802 3] [063 923 365 789 3]			
遂昌 Suichang	SJ1	TATGTGTTCA ACC T	4	1	
	SJ2	. . . C	2		
	SJ3	. . . C G	1		
	SJ4	. . . C . C T .	1		
	SJ5	 G . . T G	9		
	SJ6	 G	1		
	SJ7	CGC CAC . A . G . T .	4		
松阳 Songyang	SR1	. G . C . . . G . . .		3	
	SR2	. . . C T G		2	
	SR3	. . . C T . .		4	
龙泉 Longquan	LF1	. . C CA . C . . TT .			1
	LF2	C A . . . G			3

数字表示单倍型的变异位点,圆点表示与第一个单倍型(SJ1)有相同的碱基组成,SJ、SR 和 LF 分别是遂昌黑鹿、松阳黑鹿和龙泉黑鹿种群的缩写 Numbers(vertical) showing the variation positions among black muntjac haplotype. The haplotypes designations SJ, SR and LF are abbreviations for the population introduced from the Suichang, Songyang and Longquan

表 3 3 个黑鹿种群线粒体 DNA 的遗传多样性参数
Table 3 Measures of mitochondrial DNA diversity observed in the three populations of the black muntjac

种群 Population	总数 Total	遂昌 Suichang	松阳 Songyang	龙泉 Longquan
样品数 n	36	22	10	4
单倍型数 No. of haplotype	12	7	4	2
碱基差异数 No. of bp differences	1 - 13	1 - 11	2 - 6	9
核苷酸歧异度(%) % pairwise divergence *	0.2 - 2.1	0.2 - 2.1	0.4 - 0.8	1.9
单倍型多样性 Haplotype diversity + (h)	0.8950 ± 0.028	0.7879 ± 0.065	0.7778 ± 0.091	0.5000 ± 0.265
核苷酸多样性 Nucleotide diversity * + (π)	0.00875 ± 0.00103	0.00883 ± 0.00154	0.00495 ± 0.00066	0.00938 ± 0.00497
D _T	1.0369 ^a	1.3997 ^a	0.5010 ^a	-0.8294 ^a
D _F	1.2369 ^a	1.4373 ^b	0.7749 ^a	-0.8294 ^a

D_T: Tajima's D^[17]; D_F: Fu and Li's D^[18]; * 距离估算采用 kimura 2-parameter 模型^[19] Estimated using kimura 2-parameter distance^[19]; + 完全排除位点缺失的可能 Site with any missing information were completely excluded; a: P > 0.1, 无显著差异 Not significant; b: P < 0.05, 有显著差异 Statistical significant

此,寻找简便安全的 DNA 提取途径对黑鹿的遗传结构进行分析显得极为重要。与其他材料相比,粪便样品更易收集。在 20 世纪 90 年代初,国外研究者就已经开始探索从粪便样品中提取 DNA,并且也取得了良好的结果^[21,21]。近年来国内外许多学者采用了从粪便中提取 DNA 的方法,通过对粪便 DNA 中多种遗传标记的识别,进行了动物分子遗传学、种群生态学和行为生态学等多方面的研究^[22~27]。本研究采用实验室常用试剂,较为简便和快速的对黑鹿肌肉、皮张和粪便样品的 DNA 进行了提取,所得 DNA 用于 PCR 扩增,电泳和测序结果显示 DNA 质量良好,未受粪便中 *Taq* DNA 聚合酶活性抑制剂和细菌基因组等背景 DNA 影响,解决了这一关键性的问题,可为黑鹿的基因流程度、亲缘关系、父权鉴定、性比、种群数量及系统地理学等方面的研究提供大量的可供分析的实验材料。鉴别采自野外的粪便样品来自黑鹿,而非其近源物种,且不属于同一个个体是十分重要的。在遂昌分布中心,鹿科动物种类分布较少,除了黑鹿外,还有小麂,毛冠鹿及梅花鹿,这几个种类的粪便在野外通过其外观即可进行分辨。而所采得的粪便是否属于同一黑鹿个体,则采用微卫星多态性位

点检测进行鉴别。

遗传多样性对物种的生存具有重要的意义。研究表明,遗传多样性的丧失对物种生存带来直接的不利影响,遗传多样性的丧失可以使物种更加容易灭绝。遗传多样性也是评价一个物种进化潜力高低,抵制自然界各种生存压力的能力强弱的重要遗传学指标^[6~8,10],是针对濒危物种制定有效保护策略和保护计划的最为重要的科学依据之一。本文对遂昌分布中心的遂昌、松阳和龙泉 3 个黑麂种群的 36 个个体样品进行研究,共发现 12 个线粒体 DNA 单倍型,13 个变异位点,占分析序列长度的 2.71% (13/480),没有出现碱基插入和缺失现象,说明序列的突变都是发生在近期^[28],所以这段分析的序列也不会出现突变饱和的现象。在遗传多样性检测后,发现 3 个黑麂种群中遂昌黑麂种群的 1 个单倍型(SJ1)与松阳黑麂种群共享(表 2),导致这种结果的原因,可能是虽然这 2 个种群间存在影响黑麂个体迁移的障碍,但这是由于近几十年来人类大量砍伐森林等行为,造成黑麂栖息地的不断片断化所引起的。从遗传角度来说,其种群的隔离时间并不长,还没有造成明显的遗传差异。种群间的分化水平(F_{st})和基因流(N_m)检测数据也得到同样的结果(表 4)。在 3 个黑麂种群中,遂昌黑麂种群具有较高的遗传多样性。2002~2003 年郑祥等^[29,30]对浙江九龙山和古田山保护区内的黑麂分布和种群密度进行调查,研究表明九龙山自然保护区内黑麂资源量为(404 ± 38)头。遂昌黑麂种群在线粒体 DNA 检测中显示了最高的遗传多样性,其高度的多态性应是维持遂昌黑麂种群世代发展的主要原因之一。

表 4 黑麂的遗传结构参数

Table 4 Population parameters for black muntjac			
种群 Population	遂昌 SJ	松阳 SR	龙泉 LF
遂昌	—	2.188606	3.462279
松阳	0.18597 *	—	1.101435
龙泉	0.12619 *	0.31222 *	—

* 无显著差异(Not significant) ($P > 0.05$); 对角线上方为个体迁移率(N_m),对角线下方为 F_{st} 值 Above the diagonal: migration rates (N_m); Below the diagonal: F_{st} values based on haplotypic frequencies

表 5 核苷酸序列差异

Table 5 Nucleotide sequence difference													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	平均 Average
SJ1													0.009
SJ2	0.002												
SJ3	0.004	0.002											
SJ4	0.006	0.004	0.006										
SJ5	0.006	0.008	0.006	0.008									
SJ6	0.002	0.004	0.002	0.008	0.004								
SJ7	0.019	0.017	0.019	0.013	0.021	0.021							
SR1	0.006	0.004	0.006	0.008	0.008	0.008	0.017						
SR2	0.006	0.004	0.002	0.004	0.004	0.004	0.017	0.008					
SR3	0.004	0.002	0.004	0.006	0.011	0.006	0.019	0.006	0.006				
LF1	0.013	0.011	0.013	0.011	0.015	0.015	0.015	0.015	0.011	0.008			
LF2	0.006	0.008	0.006	0.013	0.008	0.004	0.017	0.013	0.008	0.010	0.019		

距离估算采用 kimura 2-parameter 模型^[19] Estimated using kimura 2-parameter distance^[19]

将黑麂种群的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)与其他 4 种珍稀鹿科动物,狍(*Capreolus capreolus*)、草原鹿(*Ozotoceros bezoarticus*)、坡鹿(*Cervus eldi*)和梅花鹿(*Cervus nippon*)进行比较,发现黑麂的 h (0.8950 ± 0.028)和 π (0.00875 ± 0.00103)均较低,最高的为草原鹿($h = 0.99, \pi = 0.011 \sim 0.025$)^[31],其他依次为梅花鹿($h = 0.98, \pi = 0.014 \sim 0.022$)^[32],狍($h = 0.97, \pi = 0.0097$)^[33],坡鹿($h = 0.89, \pi = 0.022$)^[34]。以往的研究表明^[35],黑麂更倾向于选择针阔混交林、植被盖度较高、海拔 1000 m 以上的高山为栖息地,这使黑麂相对于其他鹿科动物,其栖息地更加狭窄,这可能就是引起以上结果的原因。因为栖息地海拔越高的动物,冬季将面临食物不足的威胁,并且当生态限制因子发生巨大变化时,其种群将遭受更大的灾难^[1]。12 个单倍型间最

大的核苷酸序列差异为 2.1%, D-loop 区核苷酸取代率为 6.3%/百万年^[36],可推算这些单倍型于 33 万年前开始出现分歧,处于第四纪冰期的更新世晚期。这个时期,全球气候处于不断波动的冰期和间冰期,对物种的形成、扩散和遗传结构都产生了十分重大的影响。Tajima's *D* 和 Fu and Li's *D* 值检测结果表明这 3 个黑麂种群相对于中性进化的歧异度并没有明显的偏离($P > 0.1$),即在冰期和间冰期也未产生过种群迅速扩张的现象。黑麂这种独特的生态学特征,也使其种群在交替出现的冰河期遭受了比其他鹿科动物更大的打击^[37]。

一个种群与其他种群间界限的清晰程度,有赖于他们间的基因流的水平。基因流的强弱不仅影响着群体的遗传多样性水平和群体的有效大小,选择或漂移还会造成群体遗传结构的重新分配。对于一个异质种群来说,若各局部种群间没有或只存在很小的基因流时,则局部种群越小遗传多样性丧失得越快,局部种群间的遗传分化也越大。当 $N_m < 1$ 时,种群间可能由于遗传漂变而产生分化^[38],黑麂线粒体 DNA 控制区基因片段检测结果显示,属于遂昌分布中心的遂昌黑麂种群、松阳黑麂种群和龙泉黑麂种群间 N_m 值均大于 1,说明这 3 个黑麂种群间存在着较为丰富的基因流,其中,龙泉种群与松阳种群间 N_m 为 1.101435,存在着可能由于遗传漂变而产生分化的危险。

加强黑麂栖息地保护和修复工作的同时,对基因流强度较高的斑块应重点加以保护,逐渐恢复片断化黑麂种群的大小,将能有效的保护黑麂种群的遗传多样性。在基因流强度较低的斑块间人为建立廊道,供种群间个体迁移所用;有计划的恢复一些对基因流有重大影响的栖息地。对于无法恢复或者建立廊道的片断化栖息地,可以根据等位基因的差异程度,采用人工引种,人为的增加种群间的基因交流,增大物种的遗传多样性,也可以在残留种群间保留一些作为基因流踏脚石的个体或小种群,在景观水平上形成斑块种群,将能更有效地保护黑麂种群。

References:

- [1] Sheng H L. The black muntjac — A species endemic to china. *Zoological Research*, 1987,22:45—48.
- [2] Bao Y X. The survey of black muntjac in Zhejiang Province. In: *Forestry nature source wildlife*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2002. 318—324.
- [3] David P. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity*, 1998,80:531—537.
- [4] Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, *et al.* Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 1998,392:491—494.
- [5] Soule M E, Hillis L S. No need to isolate genetics. *Science*, 1998,282:1658—1659.
- [6] Frankham R. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 1995,29:305—327.
- [7] Frankham R. Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology*, 1998, 12:665—675.
- [8] Frankham R, Ralls K. Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature*, 1998, 392:441—442.
- [9] Hedrick P W, Lacy R C, Allendorf F W, *et al.* Direction in conservation biology: comments on Caughley. *Conservation Biology*, 1995,10:1312—1320.
- [10] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 78—104.
- [11] Cheng H Y, Bao Y X, Zheng R Q, *et al.* Black Muntjac Faecal DNA Extraction Techniques in PCR Reaction. *Ecologic Science*, 2006,25(2): 158—161.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997,25:4876—4882.
- [13] Kumar S, Tamura K, Ingrid B, *et al.* MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. 2001, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- [14] Rozas J, Rozas R. DnaSP Version3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 1999, 15:174—175.
- [15] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M, *et al.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1992, 131:479—491.
- [16] Schneider S, Roessli D, Excoffier L, *et al.* ARLEQUIN, a Software for Population Genetics Data Analysis, Version 2.000. 2000, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- [17] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 1989,123:585—595.
- [18] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 1993, 133: 693—709.
- [19] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16:111—120.

- [20] Wasser S K, Houston C S, Koehler, G M, *et al.* Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology*, 1997, 6 : 1091 — 1097.
- [21] Kohn M H, York E C, Karmradt D A, *et al.* Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1999, 266 : 657 — 663.
- [22] Fang S G, Ding Z W, Feng W H, *et al.* A preliminary study on the material resource of DNA in the DNA fingerprinting analysis of giant pandas. *Acta Theriologica Sinica*, 1996, 16 (3) : 166 — 170.
- [23] Zhang B W, Wei F W, Li M, *et al.* A simple protocol for DNA extraction from faeces of the giant panda and lesser panda. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50 (3) : 452 — 458.
- [24] Casulli M T, Manfredi G, La Rosa A R, *et al.* *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of the Italian Alpine region: is there a focus of autochthonous transmission? *International Journal for Parasitology*, 2005, 35 (10) : 1079 — 1083.
- [25] Peter K, Christop H R D, Markus R, *et al.* Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 2005, 109 : 37 — 45.
- [26] Geoffrey N G, Mitta C, Mary D, *et al.* Copro-PCR based detection of *Schistosoma* eggs using mitochondrial DNA markers. *Molecular and Cellular Probes*, 2005, 19 (4) : 250 — 254.
- [27] Mandy E, Christina S, Helmut H, *et al.* Isolation and molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105 (2) : 123 — 129.
- [28] Quinn T W, Wilson A C. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, 37 : 417 — 425.
- [29] Zheng X, Bao Y X, Ge B M, *et al.* Population densities, distribution and conservation of black muntjac in Jiulong Mountain Natural Reserved Area. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2005, 28(3) : 313 — 318.
- [30] Zheng X, Bao Y X, Ge B M, *et al.* The Current Distribution and Conservation Status of Black Muntjac in Gutian Mountain Nature Reserve. *Journal of Natural Resources*, 2005, 20(4) : 508 — 513.
- [31] Gonzalez S, Maldonado J E, Leonard J A, *et al.* Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 1998, 7 : 47 — 56.
- [32] Nagata J, Masuda R, Tamate H B, *et al.* Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in Japanese islands: comparison of mitochondrial d-loop sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1999, 13 : 511 — 519.
- [33] Wiehler J, Tiedemann R. Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region. *Acta Theriologica Supplement*, 1998, 5 : 187 — 197.
- [34] Balakrishnan C N, Monfort S L, Gaur A, *et al.* Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). *Molecular Ecology*, 2003, 12 : 1 — 10.
- [35] Zheng X, Bao Y X, Ge B M, *et al.* Seasonal changes in habitat use of black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) in Zhejiang. *Acta Theriologica Sinica*, 2006, 26(2) : 201 — 205.
- [36] Wu H L, Fang S G. Mitochondrial DNA Genetic Diversity of Black Muntjac (*Muntiacus crinifrons*), An Endangered Species Endemic to China. *Biochemical Genetics*, 2005, 43 : 407 — 416.
- [37] Jiao K Q, Shen Y P. The quaternary glaciations and glacier properties in the Tanggula Range. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2003, 25 (1) : 34 — 42.
- [38] Allendorf F W. Gene flow and genetic differentiation among populations. *Genetics and Conservation*, 1983, 18(3) : 51 — 65.

参考文献:

- [1] 盛和林. 中国特产动物——黑鹿. *动物学杂志*, 1987, 2 : 45 ~ 48.
- [2] 鲍毅新. 浙江黑鹿资源调查研究. 见: *浙江林业自然资源·野生动物卷*. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002. 318 ~ 324.
- [11] 程宏毅, 鲍毅新, 郑荣泉, 等. 黑鹿粪便 DNA 提取及其 PCR 检测. *生态科学*, 2006, 25(2) : 158 ~ 161.
- [22] 方盛国, 丁朝武, 冯文和, 等. 大熊猫 DNA 指纹分析材料的初步研究. *兽类学报*, 1996, 16 (3) : 166 ~ 170.
- [23] 张保卫, 魏辅文, 李明, 等. 大熊猫和小熊猫粪便 DNA 提取的简易方法. *动物学报*, 2004, 50 (3) : 452 ~ 458.
- [29] 郑祥, 鲍毅新, 葛宝明, 等. 九龙山自然保护区黑鹿的种群密度、分布与保护. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 28(3) : 313 ~ 318.
- [30] 郑祥, 鲍毅新, 葛宝明, 等. 古田山自然保护区黑鹿资源分布与保护现状. *自然资源学报*, 2005, 20(4) : 508 ~ 513.
- [35] 郑祥, 鲍毅新, 葛宝明, 等. 黑鹿栖息地利用的季节变化. *兽类学报*, 2006, 26(2) : 201 ~ 205.
- [37] 焦克勤, 沈永平. 唐古拉山地区第四纪冰川作用与冰川特征. *冰川冻土*, 2003, 25(1) : 34 ~ 42.