

# 中国圈养梅花鹿的遗传多样性和遗传结构

吴华<sup>①②</sup> 胡杰<sup>①③</sup> 方盛国<sup>①\*</sup> 孔令禄<sup>④</sup> 贾放<sup>④</sup>

(①浙江大学国家濒危野生动植物种质基因保护中心 杭州 310029; ②浙江师范大学化学与生命科学学院 金华 321004;

③西华师范大学生命科学学院 南充 637002; ④四川省中药材公司鹿场 都江堰 611830)

**摘要:** 东北梅花鹿 (*Cervus nippon hortulorum*) 的野生种群已濒临灭绝,但其圈养种群遍布全国各地,是我国圈养梅花鹿的主要品种(亚种)。为了探讨圈养梅花鹿种群作为东北梅花鹿野外放归项目资源种群的可行性,测定了来自9个圈养种群45只梅花鹿个体的线粒体DNA控制区的部分序列,以此分析我国圈养梅花鹿种群的遗传多样性和遗传结构。结果表明,我国圈养梅花鹿种群的遗传多样性并不贫乏,种群之间并没有发生显著的遗传分化。因此,东北地区的圈养梅花鹿种群可以作为野外放归项目的资源种群,而野外放归项目的建群者应来源于东北地区的多个圈养种群。

**关键词:** 圈养梅花鹿 线粒体DNA控制区 遗传多样性 遗传结构 野外放归

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2006)04-41-07

## Genetic Diversity and Genetic Structure of Domestic Sika Deer in China

WU Hua<sup>①②</sup> HU Jie<sup>①③</sup> FANG Sheng-Guo<sup>①</sup> KONG Ling-Lu<sup>④</sup> JIA Fang<sup>④</sup>

(① *State Conservation Center for Gene Resources of Endangered Wildlife, Zhejiang University, Hangzhou 310029;*

② *College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004;*

③ *College of Life Sciences, Chinese West Normal University, Nanchong 637002;*

④ *Deer Farm, Sichuan Chinese Traditional Medicine Materials Corporation, Dujiangyan 611830, China*)

**Abstract:** Northeast Sika Deer (*Cervus nippon hortulorum*), the main subspecies of domestic Sika Deer in China, is currently facing the threatening of extinction in the wild, however, the breeding centers of northeast Sika Deer distributed in all over the country. In order to design effective reintroduction strategies for this subspecies, we have investigated the genetic diversity and genetic structure of the domestic Chinese Sika Deer populations by analyzing part of the sequence of mitochondrial DNA control region in 45 individuals sampled from 9 domestic populations. The domestic populations of Chinese Sika Deer exhibited evident genetic diversity relative to the other subspecies of Sika Deer (*C. nippon*), but no strong genetic structure difference was found among different populations. These results indicate that the domestic population of northeast Sika Deer in northeast China can be used as the founders of reintroduction project, and that the founders of reintroduction project should come from several domestic populations of northeast Sika Deer from northeast China.

**Key words:** Domestic Sika Deer; Mitochondrial DNA control region; Genetic diversity; Genetic structure; Reintroduction

基金项目 浙江省自然科学基金(No. M303142);

\* 通讯作者, E-mail: sfgang@mail.hz.zj.cn;

第一作者介绍 吴华 男 博士 副教授; 研究方向: 分子生态学; E-mail: wuhua@ioz.ac.cn.

收稿日期: 2005-11-22, 修回日期: 2006-05-20

在更新世地质历史时期,梅花鹿(*Cervus nippon*)曾广泛分布于我国的东北、华北、华中、华南、西南和青藏区的东部<sup>[1]</sup>。进入全新世后,尤其是近半个世纪以来,由于受到不断增强的人类经济活动的影响,梅花鹿种群数量和栖息地面积急剧减少,并不断被分割隔离<sup>[1,2]</sup>。至20世纪40年代,梅花鹿山西亚种(*C. nippon grassianus*)、华北亚种(*C. n. mandarinus*)和台湾亚种(*C. n. taiouanus*)先后在野外灭绝,东北亚种(*C. n. hortulorum*)、华南亚种(*C. n. kopschi*)和四川亚种(*C. n. sichuanicus*),仅幸存于黑龙江、吉林、江西、浙江、安徽、四川和甘肃等省狭窄的区域内,种群数量不足1500只<sup>[1,2]</sup>。近年来,国家主管部门通过实施梅花鹿栖息地的修复和保护工程,使四川亚种和华南亚种分别在四川的若尔盖、江西的桃红岭和浙江的清凉峰及其周边地区得到一定程度的恢复<sup>[3-9]</sup>。然而,尽管有东北梅花鹿野生种群被发现<sup>[10]</sup>,但在东北梅花鹿的分布区内,已很难发现其活动痕迹,其野生种群已濒临灭绝的边缘<sup>[2,11]</sup>。

要使一个物种的野生种群得到恢复,主要有就地保护和迁地保护两种措施<sup>[12]</sup>。目前,就地保护仍然是保护濒危物种最有效的措施。然而,当物种生境大面积破碎,各隔离小种群无法自然维持其长期续存时,实施迁地保护和野外放归是其最终的必然选择<sup>[13]</sup>。野外放归的建群者可以来源于亲缘关系相近的野生种群,也可以来源于圈养种群<sup>[14,15]</sup>。然而,近来的研究表明,我国梅花鹿的野生种群已发生显著的遗传分化<sup>[16,17]</sup>,已不能为东北梅花鹿野生种群的复壮和在历史分布区重建东北梅花鹿的野生种群提供个体来源<sup>[18]</sup>。值得庆幸的是,我国早在公元前1600年就开始饲养东北梅花鹿。现在,不同养殖规模的东北梅花鹿种群遍布全国各地,种群数量达到35万只左右<sup>[2]</sup>。这为东北梅花鹿野生种群的复壮和在历史分布区重建东北梅花鹿野生种群提供了很大的资源种群。由于

资源种群的遗传多样性现状和遗传结构模式是影响物种野外放归项目成败的关键因素之一<sup>[19,20]</sup>。因此,必须搞清楚两个问题:我国的圈养梅花鹿在经过不断的分群饲养(种群瓶颈)之后,遗传多样性有没有丧失?圈养种群之间是否因为人工选择和遗传漂变的作用而发生遗传分化?动物的线粒体DNA呈母系遗传,无重组发生,且碱基替换速率较快,特别是控制区的进化速率是其他区段的5~10倍,在物种的遗传多样性和遗传结构研究中得到广泛应用<sup>[21,22]</sup>。因此,本研究测定了9个东北梅花鹿圈养种群45个个体的线粒体DNA控制区的部分序列,初步探讨了我国圈养梅花鹿的遗传多样性现状和遗传结构模式,为国家主管部门制定合理的东北梅花鹿野外放归计划提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和DNA提取

分别从黑龙江、吉林、辽宁、四川和浙江采集到东北梅花鹿的血液、毛发和皮张样品45份(表1),其中5份来自辽宁西丰鹿场(西丰种群,XF),4份来自辽宁西丰林场鹿场(西丰林场种群,XFL),5份来自吉林龙潭山鹿场(龙潭山种群,LTS),3份来自吉林松花湖鹿场(松花湖种群,SHH),4份来自黑龙江兴凯湖鹿场(兴凯湖种群,XKH),11份来自四川中药材公司鹿场(都江堰种群,DJY),7份来自四川成都动物园(成都种群,CHD),3份来自浙江嵊州动物园(嵊州种群,SHZ),3份来自浙江新昌特种经济动物养殖场(新昌种群,XCH)。这些采样种群中,西丰种群、西丰林场种群、龙潭山种群、松花湖种群和兴凯湖种群都是采用纯种繁育的方法在梅花鹿东北亚种的基础上先后培育出来的,而都江堰种群、成都种群、嵊州种群和新昌种群的建群者均来源于这些种群。用标准的蛋白酶K消化和酚/氯仿抽提的方法<sup>[23]</sup>提取血液、毛发和皮张样品。为避免污染,所有操作都设阴性对照。

表 1 东北梅花鹿圈养种群样品的数量与采集地点

Table 1 Number and site of samples of the domestic Northeast Sika Deer populations

种群 Population	样品数 No. of sample	采样地点 Sampled site	样品类型 Tissue sample	采样时间(年份) Sampled year
吉林龙潭山 LTS	5	吉林龙潭山鹿场	血液	2002
吉林松花湖 SHH	3	吉林松花湖鹿场	血液	2002
辽宁西丰 XF	4	辽宁西丰鹿场	血液	2002
辽宁西丰林场 XFL	5	辽宁西丰林场鹿场	血液	2002
黑龙江兴凯湖 XKH	4	黑龙江兴凯湖鹿场	血液	2002
四川成都 CHD	7	四川成都动物园	毛发	2001
四川都江堰 DJY	11	四川中药材公司鹿场	血液	2001
浙江新昌 XCH	3	浙江新昌特种经济动物养殖场	血液	2001
浙江嵊州 SHZ	3	浙江嵊州动物园	皮张	2003

**1.2 DNA 扩增和序列测定** 用于扩增梅花鹿线粒体 DNA 控制区 5'端序列的引物为 sikaCR1 (5'-GCC CCA CTA TCA ACA CCC-3') 和 sikaCR4 (5'-GCG GGT TGC TGG TTT CAC-3')<sup>[17]</sup>。所有 PCR 扩增都在 PTC-200 型 DNA 扩增仪(MJ Research Inc.)上进行。反应总体积为 50  $\mu$ l, 其中约 100 ng 模板 DNA, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 150  $\mu$ mol/L dNTP, 100  $\mu$ g/ml BSA, 0.3  $\mu$ mol/L 引物, 1.25 U 的 TaKaRa EX Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)。反应体系在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进入如下循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环次数为 38。循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TaKaRa)纯化后, 送交上海生工生物工程有限公司, 用引物 sikaCR1 和 sikaCR4 进行双向测序。测序用 Prism<sup>TM</sup> BigDye Terminator Ready Reaction 试剂盒(Applied Biosystem Inc.), 在 PTC-200 型 DNA 扩增仪(MJ Research Inc.)和 ABI PRISM 377-96 型 DNA 全自动测序仪(MJ Research Inc.)上进行。

**1.3 数据分析** 序列结果用 Clustal X 软件<sup>[24]</sup>进行 DNA 序列排列, 并辅以人工校对。用 MEGA3.1 软件<sup>[25]</sup>进行序列比较和变异检测, 确定变异位点和单倍型。用 DnaSP4.10.4 软件<sup>[26]</sup>计算核苷酸多样性(nucleotide diversity,  $\pi$ ) 单倍型多样性(haplotype diversity,  $h$ )。用邻接法(neighbour-joining, NJ)构建单倍型的系统发生

树。NJ 分析在 MEGA 3.1<sup>[25]</sup>上进行, 通过自引导获得系统树分支的置信值(重复次数为 1 000)。构树时用梅花鹿的近缘种马鹿(*C. elaphus*)的同源序列<sup>[27]</sup>作为外群, 以获取系统树的根。为了描述单倍型的系统进化和地理进化关系, 用软件 Network 4.1.1<sup>[28]</sup>绘制了单倍型的最小跨度网络图(minimum spanning network, MSN)。

## 2 结果

**2.1 遗传多样性** 在 45 只梅花鹿线粒体 DNA 控制区 5'端的 484 bp 的序列中, 共发现 49 个变异位点, 定义了 14 种单倍型(haplotype)(表 2)。其中, 西丰种群有 2 种单倍型( $n_2$  和  $n_7$ ), 西丰林场种群有 3 种单倍型( $n_1$ 、 $n_2$  和  $n_9$ ), 龙潭山种群有 2 种单倍型( $n_1$  和  $n_2$ ), 松花湖种群有 2 种单倍型( $n_1$  和  $n_2$ ), 兴凯湖种群有 3 种单倍型( $n_1$ 、 $n_7$  和  $n_8$ ), 都江堰种群有 7 种单倍型( $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_{12}$ 、 $n_{13}$  和  $n_{14}$ ), 成都种群有 4 种单倍型( $n_5$ 、 $n_8$ 、 $n_{10}$  和  $n_{11}$ ), 嵊州种群有 2 种单倍型( $n_1$  和  $n_2$ ), 新昌种群有 1 种单倍型( $n_1$ )(表 3)。而且  $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_5$  和  $n_7$  是东北梅花鹿种群中最常见的单倍型,  $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_6$ 、 $n_8$ 、 $n_9$ 、 $n_{10}$ 、 $n_{11}$ 、 $n_{12}$ 、 $n_{13}$  和  $n_{14}$  是东北梅花鹿种群中稀有的单倍型。单倍型之间的序列差异在 0.002 和 0.068 之间(不计插入和缺失), 平均为 0.031。

在东北梅花鹿的各圈养种群中, 兴凯湖种群具有最高的单倍型多样性和核苷酸多样性( $h = 0.833 \pm 0.222$ ,  $\pi = 0.03724$ ), 其次, 都江堰种群具有较高的单倍型多样性和核苷酸多样性

( $h = 0.818 \pm 0.119$ ,  $\pi = 0.03392$ ), 而新昌种群具有最低的单倍型多样性和核苷酸多样性( $h = 0$ ,  $\pi = 0$ )(表 4)。当把所有圈养种群合并为

一个单一种群时, 单倍型多样性为  $0.889 \pm 0.020$ , 核苷酸多样性为  $0.03173$ (表 4)。

表 2 45 个梅花鹿个体线粒体 DNA 控制区序列的变异位点及其定义的单倍型

Table 2 Variation positions and haplotypes of mtDNA control region identified for 45 individuals of Sika Deer

单倍型 Haplotype	变异位点 Variation position				
	1111111	1111222222	2222222223	3333333333	3444444444
	5571234556	7899001122	2223445891	4455577799	912235678
	2824101274	6458086904	6890017211	4925607912	781751084
n1	ATAAATCAGA	GATAGGTACG	TCATGTCTCT	TTTCAACTCA	GATTAGGAA
n2	.....	.....	.....	..C..G...G	.G.....C.
n3	.....C.GA.	A..GAACGTA	C.....TCTC	CC..T.GTCTG	A...C...T
n4	.....GA.	A..GAACGTA	C.....TCT.	CC..T.GTCTG	A...C...T
n5	.CG...GA.	..GAACGTA	C.....TCT.	CC..T.GTCTG	A..CC.A.T
n6	.....GA.	..GAACGTA	C.....TCT.	.C..T.GTCTG	A...C....
n7	.....GAG	A.CG.AC.TA	C.....TCT.	..C...TCTG	AG..CA...
n8	.....GA.	..GAACGTA	C.....TCT.	CC..T.GTCTG	A...C....
n9	...G...GA.	..GAACGTA	CT...TCT.	CC..T.GTCTG	A...C...T
n10	...G..GA.	..GAACGTA	C..G..CTCT.	CC..TGGTCTG	A...C...T
n11	.....A.	..GAACGTA	..G..CTCT.	.C..TGGTCTG	A...C...T
n12	.....TGAG	..G.AC.TA	...CA.TCT.	.C...GTCTG	A...C...T
n13	G....TGA.	..G.AC.TA	...CA.TCT.	.C...GTCTG	A.C.C...T
n14	.....TGA.	.G.G.AC.TA	...CA.TCT.	.C...GTCTG	A...C...T

n1 ~ n14 表示单倍型的编号, 数字表示单倍型的变异位点, 圆点表示与第一个单倍型(n1)有相同的碱基组成。

Labels n1 - n14 represents the number of haplotypes. Numbers (vertical) show the variation positions among Sika Deer haplotypes. Dots indicate that nucleotide of the haplotype is the same as that of the first haplotype (n1).

表 3 东北梅花鹿圈养种群线粒体 DNA 单倍型在种群中的分布频率

Table 3 Distribution of mtDNA haplotypes of the domestic Northeast Sika Deer populations

单倍型 Haplotype	XF (n = 4)	XFL (n = 5)	LTS (n = 5)	SHH (n = 3)	XKH (n = 4)	DJY (n = 11)	CHD (n = 7)	SHZ (n = 3)	XCH (n = 3)	单系 Cluster
n1		3	3	2	2			1	3	I
n2	1	1	2	1				2		I
n3						1				III
n4						1				III
n5						5	4			III
n6						1				III
n7	3							1		II
n8					1		1			III
n9		1								III
n10							1			III
n11							1			III
n12						1				II
n13						1				II
n14						1				II

表 4 东北梅花鹿的遗传多样性参数

Table 4 Measures of mitochondrial DNA diversity observed in the domestic populations of Northeast Sika Deer

种群 Population	样品数 No. of sample	单倍型数量 No. of haplotype	单倍型多样性 ( $h$ ) Haplotype diversity	核苷酸多样性 ( $\pi$ ) Nucleotide diversity
总数 Total	45	14	0.889 ± 0.020	0.031 73
XF	4	2	0.500 ± 0.265	0.024 34
XFL	5	3	0.700 ± 0.218	0.023 01
LTS	5	2	0.600 ± 0.175	0.005 31
SHH	3	2	0.667 ± 0.314	0.005 90
XKF	4	3	0.833 ± 0.222	0.037 24
DJY	11	7	0.818 ± 0.119	0.033 92
CHD	7	4	0.714 ± 0.181	0.008 22
SHZ	3	2	0.667 ± 0.314	0.005 90
XCH	3	1	0.000 ± 0.000	0.000 00

**2.2 遗传结构** 依据所获得的线粒体 DNA 控制区单倍型序列,进行系统进化分析表明,单倍型 n1 ~ n2、n7、n12 ~ n14 和单倍型 n3 ~ n6、n8 ~ n11 分别组成 3 个不同的单系(图 1)。单系 I、单系 II 和单系 III 内部单倍型之间的序列差异分别是 0.011、0.017 和 0.011,这 3 个单系之间的平均序列差异分别为 0.059、0.053 和 0.027。这表明 3 个单系内部、单系 II 和单系 III 之间没有发生显著的遗传分化,而单系 I 和单系 II、单系 III 之间已发生显著的遗传分化。这种单倍型之间的系统进化关系从它们的最小跨度网络图得到了进一步的证明(图 2),即单倍型 n1 ~ n2 与单倍型 n3 ~ n14 之间具有较远的亲缘关系。从图 1 和图 2 还可以看出,n1 和 n2 这 2 种单倍型是最原始的单倍型,n6、n7 和 n8 这 3 种单倍型是较原始的单倍型,其他单倍型都是由这 5 种单倍型进化而来的。而且,14 种单倍型的最小跨度网络图还表明,东北梅花鹿在进化过程中,还出现过 6 种中间过渡类型的单倍型。

### 3 讨论

从整体上看,相对于梅花鹿的其他亚种,东北梅花鹿圈养种群的遗传多样性并不贫乏(东北梅花鹿: $h = 0.889$ ,  $\pi = 0.031 73$ ; 日本梅花鹿: $h = 0.980$ ,  $\pi = 0.014 - 0.022$ ; 四川梅花鹿: $h = 0.758$ ,  $\pi = 0.001 86$ ; 江西梅花鹿: $h = 0.818$ ,  $\pi = 0.002 71$ ; 浙江梅花鹿: $h = 0.848$ ,  $\pi = 0.004 32$ )<sup>[17, 29, 30]</sup>,甚至在 MHC I 类基因位点,东北梅花鹿的遗传多样性显著的高于其他梅花

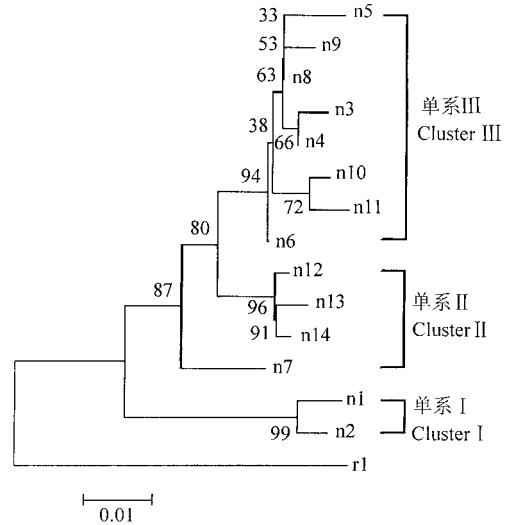


图 1 东北梅花鹿圈养种群 14 种单倍型的分子系统发生关系

Fig.1 Phylogenetic relationship among 14 unique mt DNA control region sequences of the domestic Northeast Sika Deer populations

n1 ~ n14 表示单倍型的编号,r1 表示外群。

Labels n1 - 14 represents the number of haplotypes.

Label r1 represents outgroup.

鹿亚种(吴华等,待发表的数据)。但是,在东北梅花鹿圈养种群内部,各个种群的遗传多样性分布极不平衡(表 4)。兴凯湖、西丰、西丰林场和都江堰种群的核苷酸多态性要明显的高于其他种群。而且,原始单倍型 n1、n2、n6、n7 和 n8 也以不同频率分布在不同的种群中。另外,梅花鹿在不断的分群饲养的过程中,一些中间

过渡类型的单倍型可能由于人工选择和遗传漂变的原因导致丢失(图 2)。

14 种单倍型的分子系统进化树和最小跨度网络图都表明,单倍型 n1 和 n2 与其他单倍型发生了显著的遗传分化(图 1, 2)。但是,除都江堰和成都种群外, n1 和 n2 分布于其他所有圈养种群中(表 3)。而且,来自西丰、西丰林场和兴凯湖种群的 3 个单倍型(n7、n8 和 n9),以及来自于都江堰和成都种群的 10 个单倍型(n3、n4、n5、n6、n8、n10、n11、n12、n13 和 n14)均分散在单系 I 和单系 II 中,并没有形成对应于不同种群的单系。另外,单倍型 n5、n7 和 n8 还分别为都江堰与成都、西丰与兴凯湖、兴凯湖与成都种群共享(表 3)。因此,我们初步认为,我国东北梅花鹿圈养种群之间还存在遗传重叠,并没有发生明显的遗传分化。

一个物种的遗传多样性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,与其适应性和进化潜力密切相关,直接关系到物种保护

和复壮项目的成败<sup>[12, 18]</sup>。因此制定濒危物种野外放归计划的一个主要目标,就是要维持该物种的遗传多样性<sup>[19, 20]</sup>。对野外放归成功物种的长期跟踪检测也表明,遗传多样性和遗传结构在这些物种的放归实验中起着非常重要的作用,它们决定着放归物种能否在野外建立具有自我维持能力的野生种群<sup>[31, 32]</sup>。相对于梅花鹿的其他亚种,东北梅花鹿圈养种群的遗传多样性并不贫乏,而且考虑到东北梅花鹿引到南方以后(四川和浙江)经长期饲养,其特性会逐渐改变,随之遗传特点也会有所改变,以适应南方温热潮湿的环境。因此,我们认为,东北地区的东北梅花鹿圈养种群可以作为野外放归的资源种群。而且在东北梅花鹿的每个圈养种群内部都具有特有的线粒体 DNA 单倍型,这就要求在设施野外放归项目之前,应从东北地区不同圈养种群中选择不同单倍型的个体进行混和饲养,并以这个混和种群作为以后野外放归的资源种群<sup>[33, 34]</sup>。

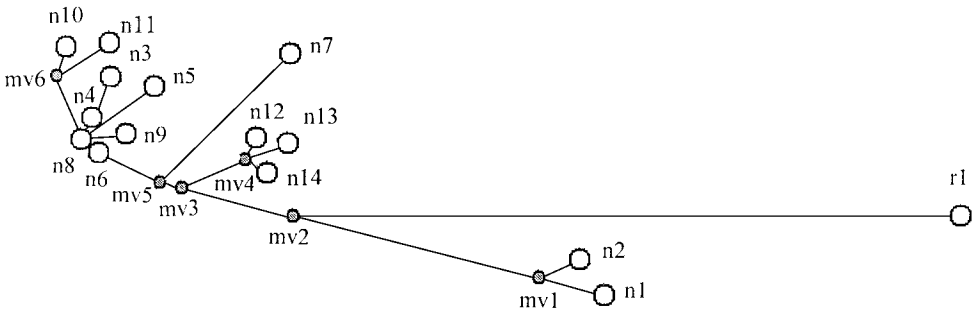


图 2 东北梅花鹿圈养种群 14 种单倍型的最小跨度网络图

Fig. 2 A minimum-spanning network for 14 haplotypes of the domestic Northeast Sika Deer populations

n1 ~ n14 表示单倍型的编号, mv1 ~ mv6 表示中间过渡类型单倍型的编号, r1 表示外群。

Letters and numbers outside circles show different haplotypes, Label r1 represents outgroup.

致谢 导师胡锦矗教授在收集样品的过程中给予了大力支持,在收集样品的过程中,还得到东北林业大学野生动物资源学院徐艳春博士及辽宁西丰鹿场、辽宁西丰林场鹿场、吉林龙潭山鹿场、吉林松花湖鹿场、黑龙江兴凯湖鹿场、四川中药材公司鹿场、四川成都动物园、浙江嵊州动

物园、浙江新昌特种经济动物养殖场的大力支持,在此一并致谢。

参 考 文 献

[ 1 ] 郭延蜀, 郑惠珍. 中国梅花鹿地史分布、种和亚种的划分及演化历史. 兽类学报, 2000, 20(3): 168 ~ 179.

[ 2 ] 盛和林. 中国鹿科动物. 上海: 华东师范大学出版社,

- 1992 :202 ~ 212.
- [ 3 ] 徐宏发,陆厚基,盛和林等.华南梅花鹿的分布和现状.生物多样性,1998 (2) :87 ~ 91.
- [ 4 ] 刘昊,郭延蜀,胡锦矗.四川铁布自然保护区梅花鹿现状.野生动物,1999 20 :6 ~ 7.
- [ 5 ] 江西省桃红岭梅花鹿保护区.江西省桃红岭梅花鹿保护区.北京:中国林业出版社,2000 :70 ~ 93.
- [ 6 ] 郭延蜀,胡锦矗,罗代华等.四川梅花鹿种群的初步研究.华东师范大学学报(哺乳动物生态学专辑),1990 1 :65 ~ 70.
- [ 7 ] 郭延蜀.四川梅花鹿的分布、数量及栖息环境的调查.兽类学报,2000 20(2) :81 ~ 87.
- [ 8 ] 陈征海,朱曦,鲍毅新.浙江梅花鹿资源调查研究.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 :325 ~ 339.
- [ 9 ] 吴海龙,吴孝兵,龚广彬.宁国市万家乡梅花鹿资源现状.动物学杂志,2003 38(5) :54 ~ 57.
- [ 10 ] 李彤,蒋劲松,吴志刚等.吉林省东北虎的调查.兽类学报,2001 21(1) :1 ~ 6.
- [ 11 ] 何敬杰.东北梅花鹿种群现状与生境保护.吉林林业科技,1987 5 :38 ~ 40.
- [ 12 ] Groom M J, Meffe G K, Carroll C R. Principles of Conservation Biology. 3rd. Massachusetts, Sunderland : Sinauer Associates, INC Publishers, 2005.
- [ 13 ] Sanz V, Grajal A. Successful reintroduction of captive-raised Yellow-Shouldered amazon parrots on Margarita island, Venezuela. Conservation Biology, 1998 12 :430 ~ 441.
- [ 14 ] Moseby K E, Bice J K. A trial re-introduction of the greater stick-nest rat (*Leporillus conditor*) in arid South Australia. Ecological Management & Restoration, 2004 5 :118 ~ 124.
- [ 15 ] Ostermann S D, DeForge J R, Edge W D. Captive breeding and reintroduction evaluation criteria : a case study of peninsular bighorn sheep. Conservation Biology, 2001 15 :749 ~ 760.
- [ 16 ] 刘海,杨光,魏辅文等.中国大陆梅花鹿 mtDNA 控制区序列变异及种群遗传结构分析.动物学报,2003 49(1) :53 ~ 60.
- [ 17 ] Wu H, Wan Q H, Fang S G. Two genetically distinct units of the Chinese Sika Deer (*Cervus nippon*): analyses of mitochondrial DNA variation. Biological Conservation, 2004, 119 :183 ~ 190.
- [ 18 ] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge : Cambridge University Press, 2002.
- [ 19 ] Kleiman D G. Reintroduction of captive mammals for conservation. Bioscience, 1989 39 :152 ~ 161.
- [ 20 ] Haig S M, Ballou J D, Derrickson S R. Management options for preserving genetic diversity : reintroduction of guam rails to the wild. Conservation Biology, 1990 4 :290 ~ 300.
- [ 21 ] Zhang D X, Hewitt G M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations : practice, problems and prospects. Molecular Ecology, 2003 12 :563 ~ 584.
- [ 22 ] Wan Q H, Wu H, Fujihara T, et al. Which genetic marker for which conservation genetics issue? Electrophoresis, 2004 25 :2165 ~ 2176.
- [ 23 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning : a Laboratory Manual, second ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 24 ] 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.
- [ 25 ] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3 : Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 2004 5 :150 ~ 163.
- [ 26 ] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguier X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 2003 19 :2496 ~ 2497.
- [ 27 ] Polzehl R O, Strobeck C. Phylogeny of wapiti, red deer, sika deer, and other North American cervids as determined from mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics Evolution, 1998, 10 :249 ~ 258.
- [ 28 ] Bandelt H J, Forster P, Rohlf A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology Evolution, 1999 16 :37 ~ 48.
- [ 29 ] 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 region sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1999 13 :511 ~ 519.
- [ 30 ] 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.
- [ 31 ] Fritts S H, Bangs E E, Fontaine J A, et al. Planning and implementing a reintroduction of wolves to Yellowstone national park and central Idaho. Restoration Ecology, 1997 5 :7 ~ 27.
- [ 32 ] Ostermann S D, DeForge J R, Edge W D. Captive breeding and reintroduction evaluation criteria : a case study of Peninsular bighorn sheep. Conservation Biology, 2001 15 :749 ~ 760.
- [ 33 ] Leonard J A, Vila C, Wayne R K. Legacy lost : genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). Molecular Ecology, 2005 14 :9 ~ 17.
- [ 34 ] Godoy J A, Negro J J, Hiraldo F, et al. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus* L.) as revealed by mitochondrial DNA. Molecular Ecology, 2005 13 :371 ~ 390.