

中国及其他分布区域野生虎的系统 地理学和遗传起源研究进展

罗述金^{1,2,*}, Jae-heup Kim¹, Warren E. Johnson¹, Dale G. Miquelle³, 黄世强⁴,
潘文石⁵, James L. D. Smith², Stephen J. O'Brien^{1,*}

(1. Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, Maryland 21702, United States of America;

2. Department of Fisheries, Wildlife and Conservation Biology, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, United States of America;

3. Wildlife Conservation Society, Russian Far East Program, Bronx, New York, United States of America;

4. 北京动物园, 北京 100044; 5. 北京大学 生命科学学院, 北京 100871)

摘要: 世界野生虎 (*Panthera tigris*) 传统上被划分为 8 个亚种, 其中 3 个亚种已于 20 世纪灭绝, 而剩余种群的生存仍然受到偷猎、栖息地丧失和片断化的威胁。作为唯一栖息着 4 个现存虎亚种的国家, 中国在世界虎的保护事业中负有重要责任, 然而其野生和圈养虎的分类地位却仍然不确定。最近一项研究 (Luo et al, 2004) 从所有现存野生虎分布地区 (包括中国) 采集了 134 份“基准样品” (即原产野外或有确定地域起源的个体生物样品), 对虎的系统地理学、种群结构以及遗传起源进行了全面分析。所用的分子标记包括四千碱基对的线粒体 DNA、30 个核基因组微卫星位点, 以及 MHC-DRB 基因。研究结果表明, 虽然虎的整体遗传多态性较低, 但是种群分化程度很高, 它们被划分为 6 个, 而不是 5 个现存亚种: (1) 西伯利亚虎 (*P. t. altaica*); (2) 苏门答腊虎 (*P. t. sumatrae*); (3) 孟加拉虎 (*P. t. tigris*); (4) 华南虎 (*P. t. amoyensis*); (5) 印支虎 (*P. t. corbetti*); (6) 新定义的亚种马来虎, 暂命名为 *P. t. Jacksoni*。由于所研究样本量有限, 目前暂定的华南虎亚种还需进一步确定。现有华南虎圈养种群包括遗传关系相距较远的两支: 一支与印支虎 (*P. t. corbetti*) 无异; 而另一支则与其他种群均相距甚远, 可能代表了真正的华南虎 (*P. t. amoyensis*)。利用分子生物学方法对中国动物园中圈养虎的遗传起源调查亟待进行, 以确认该圈养种群整体的遗传独特性或者非独特性。换言之, 这将是确认华南虎是否仍然存在的关键。

关键词: 虎; 系统地理学; 中国; 亚种分化; 遗传起源

中图分类号: Q959.838.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2006) 04–0441–08

Proceedings in Phylogeography and Genetic Ancestry of Tigers (*Panthera tigris*) in China and Across Their Range

LUO Shu-jin^{1,2,*}, Jae-heup Kim¹, Warren E. Johnson¹, Dale G. Miquelle³,
HUANG Shi-qiang⁴, PAN Wen-shi⁵, James L. D. Smith², Stephen J. O'Brien^{1,*}

(1. Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, Maryland 21702, United States of America;

2. Department of Fisheries, Wildlife, and Conservation Biology, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, United States of America;

3. Wildlife Conservation Society, Russian Far East Program, Bronx, New York, United States of America;

4. Beijing Zoo, Beijing 100044, China; 5. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Of eight traditionally classified subspecies of the tiger *Panthera tigris* three have recently gone extinct and poaching, habitat loss and fragmentation continue to threaten its survival. China historically harbors four of the existing subspecies and thus has high conservation priority, yet their status, both in the wild and captivity, remains highly uncertain. A recent molecular survey (Luo et al, 2004) of 134 “voucher specimens” (taken from tigers of verified wild ancestry and geographic origin), from across the full range including China, examined three different types of molecular mark-

* 收稿日期: 2006–01–05; 接受日期: 2006–06–22

* 通讯作者 (Corresponding authors): 罗述金, E-mail: luos@ncicrf.gov; Stephen J. O'Brien, E-mail: obrien@ncicrf.gov

第一作者简介: 罗述金, 女, 美国国家癌症研究所博士研究生, 主要从事保护生物学和分子系统学等研究。

ers; four kilobase-pairs of mitochondrial DNA, 30 nuclear microsatellite loci and the nuclear major histocompatibility complex class II *DRB* gene; to elucidate the genetic structure of tiger populations. The data revealed relatively low genetic variation but nonetheless significant population subdivisions, suggesting six rather than five living subspecies: (1) Amur tiger *P. t. altaica*, (2) South China tiger *P. t. amoyensis*, (3) a refined Indochinese tiger *P. t. corbetti*, (4) a new subspecies Malayan tiger *P. t. jacksoni*, named after the tiger conservationist Peter Jackson, (5) Sumatran tiger *P. t. sumatrae*, and (6) Bengal tiger *P. t. tigris*. Reduced gene flow and genetic drift in isolated populations since the last genetic diminution about 72 000 – 108 000 years ago, as well as the recent anthropogenic range contraction, is likely to have caused these partitions. In particular, the proposed South China tiger lineage is tentative due to limited sampling. It is apparent that current captive South China tigers inherit at least two genetic lineages: one that is unique and distinct from the other subspecies and a second indistinguishable from the northern Indochinese tigers. An explicit genetic assessment of the captive tigers in China is urgently needed to validate the uniqueness or non-uniqueness of the South China tiger, or indeed the survival of *P. t. amoyensis*.

Key words: Tigers; Phylogeography; China; Subspecies; Genetic ancestry

虎 (*Panthera tigris*) 是世界上最大的猫科动物,也是世界野生动物保护领域最引人注目的焦点之一。虎的分布曾遍及亚洲大部分地区(图1)。然而,由于栖息地丧失、片断化和捕猎,野生虎的种群数量已由20世纪初期大约十万只急剧减少至当前的不足七千只(图1; Nowell & Jackson, 1996; Dinerstein et al, 1997; Kitchener & Dugmore, 2000)。

如何保护现存的虎种群已经成为各个国家在其野生动物保护事业中面临的巨大挑战和重要目标。

与其他许多物种一样,虎根据地域分布被划分为亚种,即自然状态下的地理隔绝种群(图1)。通常认定的8个亚种中,巴厘虎(*P. t. balica*)、里海虎(*P. t. virgata*)和爪哇虎(*P. t. sondaica*)分别于20世纪40、70和80年代绝灭(Nowell &

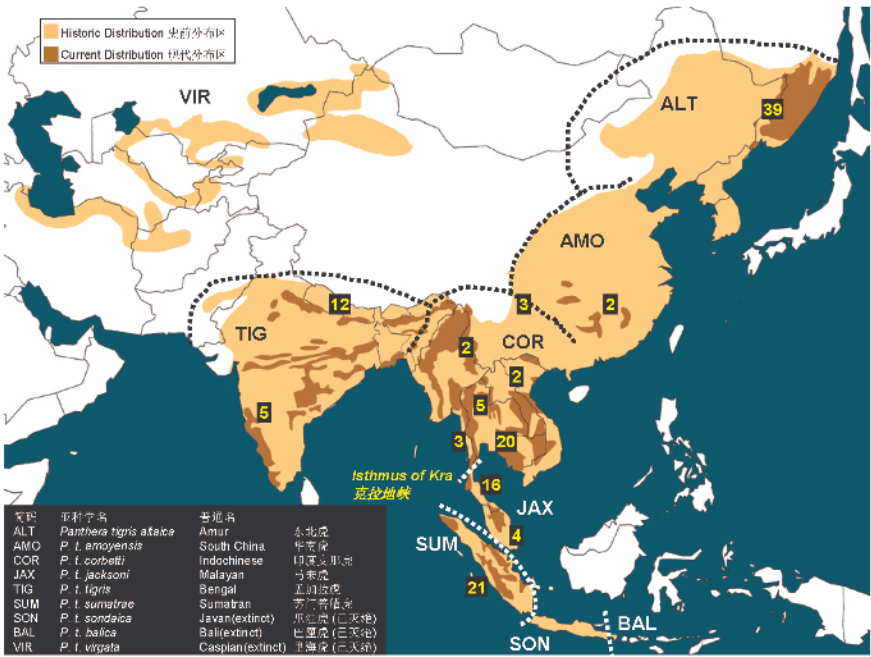


图1 世界虎的历史和现代的地理分布,各亚种名称和分布沿用了本研究的重新定义。地图上标明亚种名称(三字母简码,TIG,ALT等),以及样品来源地点及个采集点的样本量。虚线表明各个虎亚种的大致地理分界。以克拉地峡为界,传统定义的印度支那虎被分为北印度支那虎(*P. t. corbetti*)和马来虎(*P. t. jacksoni*) (引自 Luo et al, 2004 图1)。
Fig. 1 Historic and current geographic distribution of tigers corresponding to the traditional and the newly defined subspecies designation. Geographic origin of samples and sample size from each location are indicated. Three-letter codes (TIG, ALT, etc.) are indicated subspecies abbreviations. Dotted lines are approximate boundaries between tiger subspecies studied here. The Isthmus of Kra divides the traditional Indochinese tiger into the northern Indochinese tiger *P. t. corbetti* and the Malayan tiger *P. t. jacksoni*. [Modified from Fig. 1 in Luo et al (2004)].

Jackson, 1996)。其余的 5 个亚种中, 大约 3 200 至 4 500 只的印度虎, 又称孟加拉虎 (*P. t. tigris*), 现存于孟加拉、不丹、中国西部、印度、缅甸西部和尼泊尔 (Seidensticker et al, 1999); 不足 500 只的西伯利亚虎, 又称东北虎 (*P. t. altaica*), 分布于俄罗斯东部、中国东北和韩国 (Matyushkin et al, 1999; Miquelle & Pikunov, 2003); 华南虎 (*P. t. amoyensis*) 仅存于中国华南地区, 现有圈养个体大约 50 只, 而其野生种群存在的可能性已经很小 (Tilson et al, 2004); 苏门答腊虎 (*P. t. sumatrae*) 分布于印度尼西亚的苏门答腊岛, 估计野外还存在 400—500 只 (Seidensticker et al, 1999); 印支虎分布于柬埔寨、中国西南、老挝、马来西亚、缅甸东部、泰国和越南, 现存大约 1 200—1 800 只 (Seidensticker et al, 1999)。

一个亚种的划分和定名需要对该亚种所有个体具有的遗传特征进行客观准确的描述。这些特征应当是该亚种特有而不与同种其他亚种种群共享的遗传属性。因此, Avise & Ball (1990) 以及本研究基于多个相对独立的遗传特征的一致性定义为亚种。这些遗传指标可以是形态学或分子生物学的特征, 或两者兼有。然而, 以往用传统的形态学研究方法, 例如体型、头骨、毛色、斑纹等指标来鉴别虎亚种得出的结果往往模棱两可 (Kitchener, 1999; Herrington, 1987; Mazak, 1981)。早期的分子生物学研究也未能成功地确认能够鉴定虎亚种的遗传学指标 (Wentzel et al, 1999; Hendrickson et al, 2000; Cracraft et al, 1998)。因此, 我们认为亚种鉴定指标的缺乏在很大程度上可能阻碍了保护计划的实施。人工繁殖计划很可能无意地将两个不同的亚种杂交, 又有可能将遗传上相似的群体误认为是两个不同的亚种。

2004 年 12 月, 一项前后长达二十余年, 旨在以分子遗传学手段研究现存虎的种群结构和亚种鉴别的课题划上了句号, 其结果发表于 *PLoS Biology* 杂志上 (Luo et al, 2004)。在这一结果中, 我们和其他 15 位作者, 包括国际保护联盟 (IUCN) 猫科动物专家组成员和多位长年致力于虎的行为学、生态学研究 and 保护前沿的专家, 共同地从所有现存野生虎分布地区 (包括中国) 采集了 134 份“基准样品” (即原产野外或诞生于圈养环境, 但可直接追溯到野外诞生父母的遗传起源的个体生物样品) 进行了全面地分析。我们选用了 3 种独立的分子标

记: (1) 四千个碱基对的线粒体 DNA 序列; (2) 30 个核基因组微卫星位点; (3) 遗传多样性很高的 FLA-DRB 基因序列 (在虎的 MHC 中与免疫系统有关的基因)。使用不同的分析方法都得到了一致的结果, 并且在大多数情况下均有很高的统计学支持: 因此, 我们对现代虎的进化历史、遗传演变和种群结构等都有了新的认识, 这项研究对中国保护虎的工作将具有重要的启示。中国是全世界上唯一拥有 4 个虎亚种 (包括东北虎、华南虎、印支虎和孟加拉虎 (Lu & Sheng, 1986) 自然分布的国家。因此, 中国在世界虎的保护事业中具有重要的责任。然而, 由于在 20 世纪 60—70 年代全国范围内对虎豹大规模的狩猎行动, 再加上栖息地的丧失和片断化, 可捕食猎物的减少, 使中国野生虎的种群数量急剧下降, 濒临灭绝 (Lu & Sheng, 1986; Tan, 1987; Tilson, 2004)。当前中国虎种群, 尤其是华南虎的生存希望几乎完全落在人工圈养种群上。然而, 由于以往对虎亚种定义的模糊和亚种之间 (例如华南虎和印支虎, 印支虎和孟加拉虎, 华南虎和东北虎等) 地理界限本身的不确定 (Mazak, 1996; Nowell & Jackson, 1996), 我们无法确知圈养种群里是否有不同自然种群的杂交, 而导致繁殖和管理的困难。为今后进一步对圈养个体亚种鉴定和野外研究工作的开展, 本文将对中国虎的圈养种群结构和野生虎遗传起源概况进行初步分析, 以便建立客观精确的分子生物学鉴定体系。

1 世界现存虎亚种的重新定义

我们从 100 份血液、组织及陈旧毛皮样品中成功地提取出 DNA 并扩增出总长为 4078 碱基对的线粒体序列片段, 其中总共发现 54 个变异位点和 25 个线粒体单倍型。我们从 113 份样品中成功获得 30 个微卫星位点的基因型。对未能成功扩增出 20 个微卫星位点以上的样品, 我们没有纳入最后的分析。对线粒体 DNA 单倍型序列 (图 2) 和微卫星基因型数据 (图 3) 进行多种系统发育分析法均得到一致的拓扑结构, 证明虎之间存在着一定程度的地理隔离和种群分化。我们的数据支持 3 种传统意义上的亚种: (1) 西伯利亚虎或东北虎 (*P. t. altaica*), 该亚种只有一个线粒体单倍型, 其微卫星的基因型也为单系; (2) 苏门答腊虎 (*P. t. sumatrae*), 8 个线粒体单倍型以及微卫星的基因型均为单系; (3) 孟加拉虎 (*P. t. tigris*), 5 个线粒体

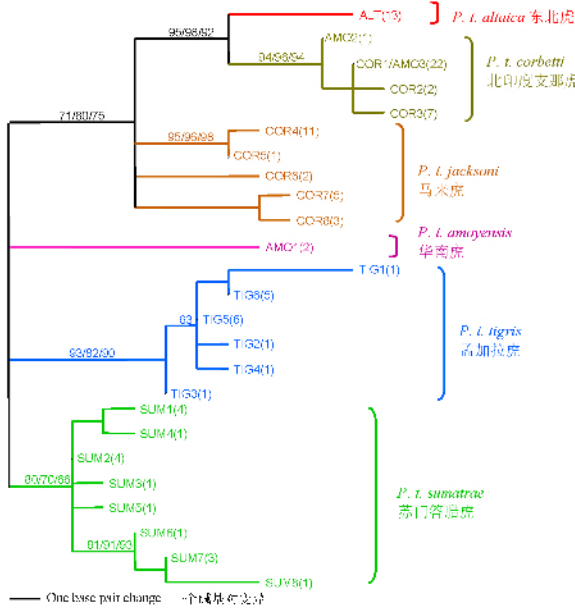


图2 利用最大进化法 (MP) 和总长 4078 碱基对的虎线粒体单倍型序列构建系统发生树。同色的分枝代表属于同一亚种的单倍型。分枝上标记的置信度分别来自 MP, 最小进化法 (ME) 和最大似然法 (ML) 的分析, 只有置信度超过 70% 的标明于此。扩号内的数字代表本研究中共有该单倍型的个体数。来自苏州动物园的三只指名华南虎的线粒体单倍型, 即 AMO2 和 COR1/AMO3, 与其他印度支那虎相近或相同; 而重庆动物园的两只华南虎的 AMO1 单倍型与其他亚种迥异, 暂定为 *P. t. amoyensis* 的特定谱系。(引自 Luo et al, 2004 图 3a)。Fig. 2 Phylogenetic relationships based on maximum parsimony (MP) algorithm among the tiger mtDNA haplotypes from the combined 4 078 bp mitochondrial sequence. Branches of the same color represent haplotypes of the same subspecies. Numbers above branches represent bootstrap support from 100 replicates using the MP method, followed by bootstrap values using the ME-ML analyses (only those over 70% are indicated). Numbers in parentheses represent numbers of individuals sharing the same haplotype. Note that three tigers from the Suzhou Zoos were represented by the haplotype AMO2 and COR1/AMO3, which were shared by other Indochinese tigers. Two tigers from the Chongqing Zoo were represented by the distinct AMO1, tentatively designated as the *P. t. amoyensis* lineage [Modified from Fig. 3a in Luo et al (2004)].

单倍型以及微卫星的基因型也聚成单系。至于传统的印支虎亚种中则存在着两支遗传关系很远的种群。这两种群之间的距离与其他亚种之间的 (比如孟加拉虎和西伯利亚虎之间) 相似。统计学分析支持将传统的印支虎分为两个种群, 一个种群分布于东南亚原印支虎的北部印度支那半岛分布区域 (*P. t. corbetti* I), 而另一种群地处南端的马来半岛 (*P. t. corbetti* II 或 *P. t. jacksoni*), 两者以马来半岛与印度支那之间的克拉地峡 (Isthmus of Kra) 为地理分界。

华南虎 (*P. t. amoyensis*) 的样品有 5 份, 于

1994 年前后采集于两个动物园 (图 4)。目前华南虎圈养种群是由野外捕获的 6 只个体经数十年繁衍而成。我们的样品数量尽管不多, 但基本是中国动物园协会华南虎谱系中有代表性的 (Traylor-Holzer, personal communication)。然而, 分析表明, 这 5 只确认的华南虎代表了遗传关系相距甚远的两支。来自苏州动物园的两个体 (Pti-217, 218) 的线粒体 DNA 单倍型 (COR1/AMO3) 与其他北部印支虎 (*P. t. corbetti* I), 包括来自越南 ($n = 2$)、柬埔寨 ($n = 14$) 和泰国北部 ($n = 5$) 的个体的单倍型完全相同, 使该单倍型成为印支虎中最普遍的一型。来自苏州动物园的第三只华南虎 (Pti-222) 的线粒体单倍型 AMO2 和以上共有单倍型 COR1/AMO3 极其接近 (图 2), 可判定该个体的母系起源 (由于线粒体 DNA 只由母系遗传) 也为印支虎 (*P. t. corbetti* I) 种群。与苏州动物园个体相反, 重庆动物园的两个体 (Pti-219, Pti-220) 的单倍型 AMO1 与其他种群均相距甚远, 形成独立的一支 (图 2)。将每个个体的 30 个微卫星位点的基因型 (微卫星由母系和父系共同遗传) 综合起来分析得到的结果与线粒体 DNA 一致。苏州动物园个体 (Pti-217, 218, 222) 的微卫星基因型仍然与印支虎种群很接近, 而重庆动物园的个体 (Pti-219, 220) 同样独立成为一支 (图 3)。由此可见, 如果能得到更多动物个体样品分析的支持, 重庆动物园所代表的很可能是现存唯一的一支华南虎 (*P. t. amoyensis*) 谱系。

基于我们的分析结果, 作为保护和管理的单位, 现代虎的种群不是 5 个亚种, 而应当被划分为 6 个 (图 1): (1) 西伯利亚虎 (*P. t. altaica*); (2) 苏门答腊虎 (*P. t. sumatrae*); (3) 孟加拉虎 (*P. t. tigris*); (4) 华南虎 (*P. t. amoyensis*); (5) 北印度支那虎 (*P. t. corbetti* I), 保留原名 (*P. t. corbetti*); (6) 马来虎 (*P. t. corbetti* II 或 *P. t. jacksoni*]。Luo et al (2004) 提议将马来虎的学名定为 *P. t. jacksoni*, 以表达对世界保护联盟 I-UCN 猫科动物专家组前主席 Peter Jackson 先生在为世界虎的生存和保护孜孜不倦奋斗四十余年的敬意。华南虎在此被确认为独立的亚种, 然而其代表仅为重庆动物园的两个个体。由于我们目前样本量有限, 在中国动物园协会谱系中的所有华南虎个体的遗传起源和独特性没有得到证实以前, 其亚种的认定只是一个暂时的结论。

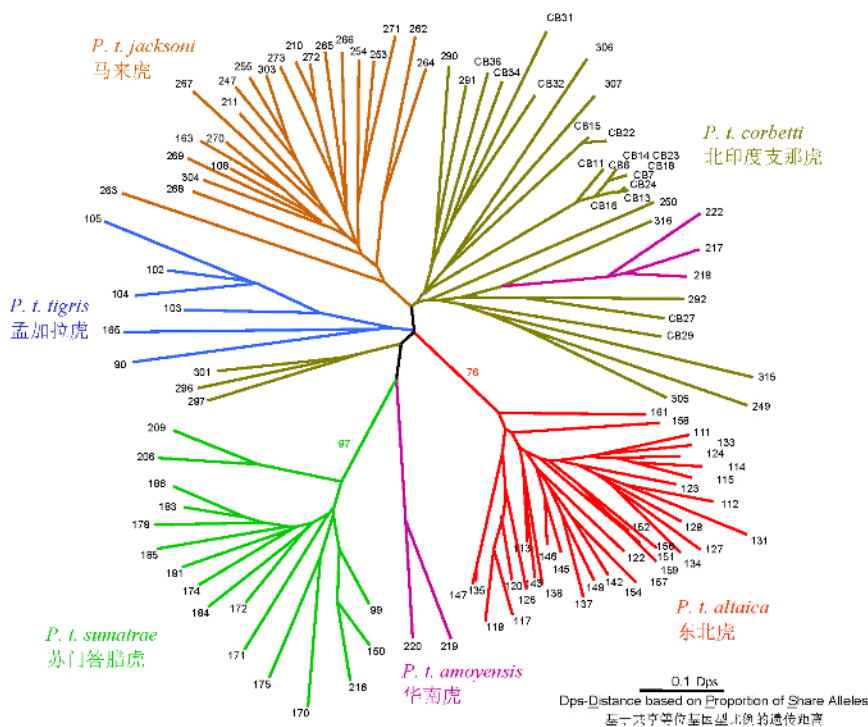


图 3 利用邻接法 (NJ) 和 30 个微卫星座位的基因型构建的系统发生树。同色的分枝代表属于原指名为同一亚种的虎个体。置信度超过 50% 的分枝点上标记其置信度。来自中国动物园的五只指名华南虎实际代表了两支遗传起源不同的谱系 (引自 Luo et al, 2004 图 4)。

Fig. 3 Phylogenetic relationships among the individual tigers from composite microsatellite genotypes of 30 loci with neighbor-joining algorithm. Branches of the same color represent tiger individuals of the same named subspecies. Bootstrap values over 50% are shown on the divergence node. Note the disjunction between the five South China tigers from two different zoos in China [Adapted from Fig. 4 in Luo et al (2004)].

2 现存虎亚种的遗传多样性

对虎线粒体 DNA 遗传多样性进行定量分析并与其他猫科动物比较结果表明, 虎的整体遗传多样性水平比较低 (Luo et al, 2004; Wentzel et al, 1999)。四个亚种 [(孟加拉虎 (*P. t. tigris*)、苏门答腊虎 (*P. t. sumatrae*)、印支虎 (*P. t. corbetti*) 和马来虎 (*P. t. jacksoni*)] 具有中等程度的核苷酸多态性。而我们分析的 13 只西伯利亚虎 (*P. t. altaica*) 只有一个线粒体 DNA 单倍型, 没有多态性, 而且该单倍型与印支虎最接近, 由此可见, 该亚种可能是最近两万年间虎的种群随第四纪冰川后退而向北扩张时, 由单一母系繁衍而成的结果 (Luo et al, 2004)。在 20 世纪 20 年代由于人类捕猎俄罗斯远东地区的野生虎, 其数量曾经急剧下降至 20 到 30 只, 该“瓶颈”效应可能进一步降低了该亚种的遗传多样性 (Russello et al, 2004; Kaplanov, 1948)。目前包括中国东北地区在内, 野生西伯利亚虎的总数大约 500 只, 据我们所知, 尚

未有报告表明西伯利亚虎因为近亲繁殖压力造成种群生活力的下降 (Hensleigh et al, 1987)。至于华南虎, 由于我们只能确认两只华南虎, 样本量过小, 无法对其种群遗传多样性进行有意义的估计。在微卫星基因型的分析中, 虎的遗传多样性与其他若干种猫科动物, 如美洲豹、金钱豹、美洲狮、非洲猎豹等基本相当。

3 猫科动物的演化及现代虎的起源

现代猫科动物的祖先起源于大约一千一百万年前中新世晚期, 随后逐渐演化为食肉目动物中适应性最强、分布最广的一支, 遍布世界除澳洲与南北两极之外各大洲 (O'Brien & Johnson 2005; Johnson et al, 2006)。37 种现代猫科动物从系统进化关系上可划分为 8 个主要分支, 而虎所在的分支 *Panthera*, 包括豹、狮、美洲豹、雪豹、美洲狮及云豹, 为最早分化出来的一支 (Johnson et al, 2006)。距今最早的虎化石发现于两百万年前, 当前的中国北部和爪哇岛上, 表明在上新世末期和更新世早期,

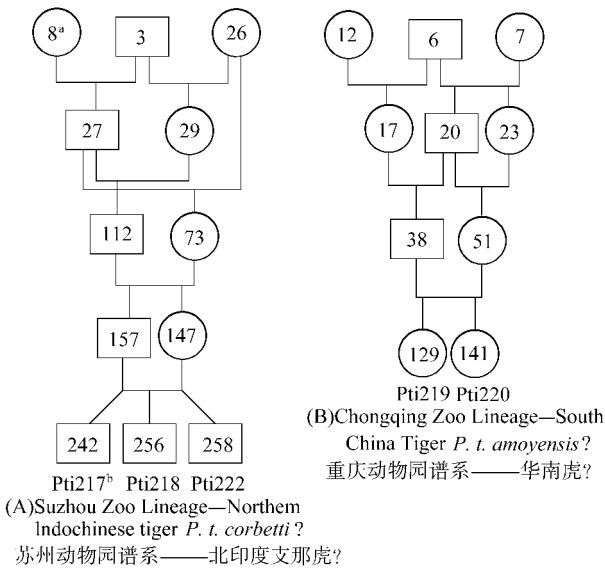


图 4 本研究所用华南虎样品的来源。(A) 从遗传起源和系统发育关系上判断来自苏州动物园谱系的三只虎个体 (Pti 217, 218 和 222) 与北印度支那虎 (*P. t. corbetti*) 没有区别。(B) 来自重庆动物园谱系的两只虎个体 (Pti 219 和 220) 与其他亚种迥异, 暂定其代表了华南虎 (*P. t. amoyensis*) 的独立分支。a. 对应于中国动物园协会华南虎谱系号。b. 对应于美国国家癌症研究所遗传多样性实验室样品编号。□ - 雄性; ○ - 雌性。

Fig. 4 Origins of South China tigers used in this study. (A) Three tigers (Pti 217, 218 and 222) were derived from the Suzhou Zoo lineage and genetically indistinguishable from the northern Indochinese tiger (*P. t. corbetti*). (B) Two tigers (Pti 219 and 220) were derived from the Chongqing Zoo lineage and genetically distinct from other subspecies, tentatively recognized as a unique South China tiger lineage (*P. t. amoyensis*). a. Chinese zoo stud book number. b. ID of the animals at the Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute. □-Male; ○-Female.

虎的分布至少遍及亚洲大部分地区 (Hemmer, 1987)。然而第四纪更新世时期的冰川期和间冰期的频繁更替导致地质和气候变化剧烈, 促使物种迁徙或演化, 某物种的地理分布在一定时期内可能经历“瓶颈”效应, 迅速减小为很少, 甚至单一的种群, 而后在条件适宜时则重新扩张 (Hemmer, 1987; Kitchener, 1999; Kitchener & Dugmore, 2000)。因此, 虎作为一个物种的起源时间和现代虎最近共同祖先的起源时间是不同的概念。

我们用“线性树”的原理 (Takezaki et al, 1995) 对现代虎线粒体 DNA 单倍型的起源时间进行了估算。化石记录一般认为金钱豹和虎的种间分化时间大约为二百万年前 (Hemmer, 1987; O'Brien et al, 1987; Wayne et al, 1991)。以此时间推算, 每年每个核苷酸位点的突变几率为 2.29×10^{-8} , 即在我们分析的四千碱基对的片段中大约每

一万四千年发生一个碱基对的突变。以此突变率推算, 当前虎的线粒体 DNA 多样性大约是七万二千年的积累 (95% 置信区间为 39 000—104 000 年之间)。如果采用更早的化石校正年代三百万年为虎豹分化时间 (Turner & Anton, 1997), 每年每个核苷酸位点的突变几率则为 1.53×10^{-8} , 即在我们分析的片段中大约每两万年发生一个碱基对的突变。以此突变率推算, 当前虎的线粒体 DNA 多样性大约是十万八千年的积累 (96% 置信区间为 59 000—157 000 年之间)。通过不同的校正和计算表明, 史前虎的种群曾经在大约七万二千到十万八千年前经历过一次种群数量减少的“瓶颈”时期, 遗传多样性降低至零, 现代虎由该小种群逐渐繁衍过来, 在演化过程中由于地理隔绝、遗传漂移、岛屿效应等形成了当前的多样性和亚种的分布格局。根据地质记录, 苏门答腊岛的 TOBA 火山大约七万三千五百年前有过一次毁灭性的爆发。这是在第四纪后期最近一百万年之内地球上最大的一次火山爆发记录, 随后的气候影响可能波及至当时亚洲的大部分地区 (Rampino & Self, 1992), 也可能直接导致了史前虎种群的减少。以前的研究也有证据表明 TOBA 火山的爆发与更新世末期人类进化中所经历的一次种群减少的“瓶颈”效应 (Ambrose, 1998), 以及亚洲象进化过程中的一次主要的北迁事件 (Fleischer et al, 2001) 都可能相关。我们的研究结果同时支持北印度支那以及中国南部部分地区即北印支虎分布区为现代虎辐射中心的观点 (Luo et al, 2004)。

4 虎亚种定义的保护生物学意义

尽管对亚种概念的明确定义尚存争议, 但是亚种已被广泛应用于许多珍稀物种包括老虎在内的保护和繁殖管理上。许多野生动物保护组织和公约都明确以特定亚种作为保护的单位。世界上多个圈养虎繁殖计划均以在有限的空间里维系和扩大一个或若干纯种的虎亚种为目标 (Maguire & Lacy, 1990; Foose, 1987)。从这点来说, 理解亚种在进化生物学上的意义以及建立一套客观准确的亚种定义和鉴定体系, 也是至关重要的。

遗传学家 Stephen O'Brien 与著名的进化生物学家 Ernst Mayr 于 1991 年共同提出了关于生物亚种定义的原则 (O'Brien & Mayr, 1991)。在这篇发表于美国《科学》周刊的文章里, 亚种被定义为“一定地理范围内分布的与同种的其他亚单元在分类学上

有差异的种群的组合。”属于同亚种的个体与其他的亚种相比，具有特定的地理分布或栖息地，一系列形态学或分子生物学的遗传特征，以及特定的自然历史。亚种与种不同，亚种之间可实现生殖繁育，在自然状况下时常也会与邻近的亚种杂交。然而每个地理分隔的亚种都在不断地适应其特定的生态环境，随着时间的推移，积累的适应性特征逐渐增多，与其他的亚种的分化也就逐渐增大。正如达尔文在 1886 年的《物种起源》中所述，每一个亚种都具有最终演变成为种的可能。尽管我们无法预知哪一个特定亚种将具有这样的可能性，但是我们有充分的理由对亚种进行保护，因为这是保护种群在漫长的进化过程中对特定生态环境的遗传适应特征的表现。

我们的结果支持大多数现存虎的亚种和现有命名，但也揭示出一些通认的亚种中存在着进一步的种群亚结构。在设计圈养动物的繁殖和管理的策略，或者在维系扩大野外种群及人为促进种群间交流时这些自然存在的亚结构是应给予考虑的。具体的说，马来半岛的虎种群，与当前动物园圈养系统里分开繁育管理的其他各亚种（西伯利亚虎，苏门答腊虎等）之间的遗传差异相当。因此原本归为一个亚种的印支虎，除非在圈养条件下个体数量极少，近亲繁殖已经成为影响种群健康的情况下，建议应当作为两个亚种即马来虎和北部印支虎来管理。

5 关于华南虎的疑问

对原分布中国南部和印度支那半岛北部一带野生虎遗传归属的最终划分，在很大程度上相当困难。因为 *P. t. corbetti* 和 *P. t. amoyensis* 的地理界限原本就不甚清楚（Mazak, 1996; Nowell & Jackson, 1996），而现存华南虎基本上是一个本身地理起源尚存有疑问的圈养种群。苏州动物园的三只华南虎代表（Pti-217, 218 和 222）在遗传起源上与分布于印度支那半岛北部的印支虎无异，这可能是在圈养管理中无意中将印支虎归于华南虎，也有可能是印支虎分布的地域实际上比以往所知的更加偏北而进入中国。由此可见，利用分子生物学方法对中国动物园中圈养虎的遗传起源调查亟待进行，以确认华南虎圈养种群总体的遗传独特性（当前华南虎的独特性仅有重庆动物园的个体 Pti-219 和 220 所代表）或者非独特性。现有中国所有动物

园中大约有 50 只谱系华南虎。我们建议采用 Luo et al（2004）中所提供的可区分印支虎和华南虎的分子标记对每一个体进行鉴定。换言之，这将是确认华南虎是否仍然存在的关键。

6 结 语

综上所述，在虎的系统发生学、分类学和保护生物学上还有许多重要的问题尚待回答。例如：本文所揭示的分子生物学上亚种之间的区别是否有形态学证据的支持？从分子生物学的角度来看，最近灭绝的三个亚种（巴厘虎、里海虎和爪哇虎）是否也与现存亚种一样存在着明显的区别？全世界数以千计的圈养虎中，有多少是代表了自然种群的遗传起源？动物园中不同亚种之间杂交的情况如何？中国的华南虎是独特的种群还是存在着不同遗传起源的个体的杂交？我们的研究已经为这些问题的解答提供了技术上的可行性支持。我们期望在将来能从更精确的水平上对虎的亚种的特征进行描述，实现对这引人注目的物种更有效的管理和保护。我们将尽最大的可能鼓励、支持和推动这一重要目标的实现。

致谢：我们对历年来参与这项研究，提供生物样品、学术和技术支持和帮助的所有合作者、单位和个人致以衷心的感谢！这项研究得益于中国动物园协会、国家林业局野生动植物保护司、东南亚动物园协会、柬埔寨野生救援组织以及许多国家政府和组织的大力支持，使样品的采集和出入境等过程得以顺利进行；在研究和撰稿过程中又得到以下人员提供的许多学术和技术上的支持与帮助：Joelle van der Walt, Janice Martenson, Naoya Yuhki, Olga Uphyrkina, John M Goodrich, Howard B. Quigley, Ronald Tilson, Kathy Traylor-Holzer, Gerald Brady, Paolo Martelli, Vellayan Subramaniam, Charles McDougal, Sun Hean, Ullas K Karanth, Melvin Sunquist, Agostinho Antunes, Eduardo Eizirik, Gila Kahila Bar-Gal, Colm O'hUigin, Al Roca, Victor David, Marilyn Menotti-Raymond, Stanley Cevario, Carlos Driscoll, John Page, Guo-Kui Pei 等；美国明尼苏达动物园 Kathy Traylor-Holzer 提供了本文所用华南虎个体的谱系起源信息；云南大学于黎博士协助完成中文校对。

参考文献:

- Ambrose SH. 1998. Late Pleistocene human population bottlenecks, volcanic winter, and differentiation of modern humans [J]. *J Hum Evolution*, **34**: 623–651.
- Avise JC, Ball RM. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy [A]. In: Futuyama D, Antonovics J. Oxford Surveys in Evolutionary Biology. Vol. 7 [M]. New York: Oxford University Press, 45–67.
- Cracraft J, Felsenstein J, Vaughn J, Helm-Bychowski K. 1998. Sorting out tigers (*Panthera tigris*): Mitochondrial sequences, nuclear inserts, systematics, and conservation genetics [J]. *Anim Conservation*, **1**: 139–150.
- Dinerstein E, Wikramanayake E, Robinson J, Karanth U, Rabinowitz A, et al. 1997. A Framework for Identifying High Priority Areas and Actions for the Conservation of Tigers in the Wild. Part I [M]. Washington DC: World Wildlife Fund-US and Wildlife Conservation Society.
- Foose TJ. 1987. Species survival plans and overall management strategies [A]. In: Tilson RL, Seal US. Tigers of the World: The Biology, Biopolitics, Management and Conservation of an Endangered Species [M]. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 304–316.
- Fleischer RC, Perry EA, Muralidharan K, Stevens EE, Wemmer CM. 2001. Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA [J]. *Evolution*, **55**: 1882–1892.
- Hemmer H. 1987. The phylogeny of the tiger (*Panthera tigris*) [A]. In: Tilson RL, Seal US. Tigers of the World: The Biology, Biopolitics, Management and Conservation of an Endangered Species [M]. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 28–35.
- Hendrickson SL, Mayer GC, Wallen EP, Quigley K. 2000. Genetic variability and geographic structure of three subspecies of tigers (*Panthera tigris*) based on MHC class I variation [J]. *Anim Conservation*, **3**: 135–143.
- Hensleigh, HC, Byers, AP, Post GS, Rendl N, Seal US, Tilson RL. 1987. Evaluation of tiger fertility by sperm penetration assay [A]. In: Tilson RL, Seal US. Tigers of the World: The Biology, Biopolitics, Management and Conservation of an Endangered Species [M]. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 36–47.
- Herrington S. 1987. Subspecies and the conservation of *Panthera tigris* [A]. In: Tilson RL, Seal US. Tigers of the World: the Biology, Biopolitics, Management and Conservation of an Endangered Species [M]. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 51–60.
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ. 2006. The Late Miocene radiation of modern Felidae: A genetic assessment [J]. *Science*, **311**: 73–77.
- Kaplanov LG. 1948. Tigers in Sikhote-Alin. Tiger, Red Deer, and Moose, Materialy k Poznaniyu fauny i Flory SSSR [M]. Moscow: Izd. Mosk. Obschestva Ispytateley Prirody, 18–49.
- Kitchener AC. 1999. Tiger distribution, phenotypic variation and conservation issues [A]. In: Seidensticker J, Christie S, Jackson P. Riding the Tiger: Tiger Conservation in Human-Dominated Landscapes [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 19–39.
- Kitchener AC, Dugmore AJ. 2000. Biogeographical change in the tiger, *Panthera tigris* [J]. *Anim Conservation*, **3**: 113–124.
- Lu H, Sheng H. 1986. Distribution and status of the Chinese tiger [A]. In: Miller SD, Everett DD. Cats of the World: Biology, Conservation and Management [M]. Washington DC: National Wildlife Federation, 1–58.
- Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, van der Walt J, Martenson J, Yuhki N, Miquelle DG, Uphyrkina O, Goodrich JM, Quigley HB, Tilson R, Brady G, Martelli P, Subramaniam V, McDougal C, Hean S, Huang SQ, Pan W, Karanth UK, Sunquist M, Smith JL, O'Brien SJ. 2004. Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*) [J]. *PLoS Biology*, **2** (12): e442.
- Maguire LA, Lacy RC. 1990. Allocating space resources for conservation of endangered subspecies: Partitioning zoo space for tigers [J]. *Conservation Biology*, **4**: 157–166.
- Mazak V. 1981. *Panthera tigris* [J]. *Mammal Species*, **152**: 1–8.
- Mazak V. 1996. Der Tiger [M]. Magdeburg: Westarp Wissenschaften, 228.
- Matyushkin EN, Pikunov DG, Dunishenko YM, Miquelle DG, Nikolaev IG, et al. 1999. Distribution and numbers of Amur tigers in the Russian Far East in the Mid-1990's [A]. In: Aristova AA, Rare Mammal Species of Russia and Neighboring Territories (in Russian) [M]. Moscow: Russian Academy of Sciences Therological Society, 242–271.
- Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton, MK, O'Brien SJ. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*) [J]. *Genomic*, **57**: 9–23.
- Miquelle DG, Pikunov DG. 2003. Status of the Amur tiger and Far Eastern Leopard [A]. In: Newell JP. The Russian Far East: A Reference Guide for Conservation and Development [M]. McKinleyville, California: Daniel and Daniel Publishers, 106–109.
- Nowell K, Jackson P. 1996. Wild Cats: Status Survey and Conservation Action Plan [M]. Gland, Switzerland: IUCN-World Conservation Union, 55–65.
- O'Brien SJ, Collier GE, Benveniste RE, Nash NG, Newman AK, et al. 1987. Setting the molecular clock in Felidae: The great cats *Panthera* [A]. In: Tilson RL, Seal US. Tigers of the World: The Biology, Biopolitics, Management and Conservation of an Endangered Species [M]. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 10–27.
- O'Brien SJ, Johnson WE. 2005. Big cat genomics [J]. *Annu Rev Genom Hum Genet*, **6**: 407–429.
- O'Brien SJ, Mayr E. 1991. Bureaucratic mischief: Recognizing endangered species and subspecies [J]. *Science*, **251**: 1187–1188.
- Rampino MR, Self S. 1992. Volcanic winter and accelerated glaciation following the Toba super-eruption [J]. *Nature*, **359** (6390): 50–52.
- Russello MA, Gladyshev E, Miquelle D, Caccone A. 2004. Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian Far East [J]. *Conservation Genet*, **5** (5): 707–713.
- Seidensticker J, Christie S, Jackson P. 1999. Riding the Tiger: Tiger Conservation in Human-Dominated Landscapes [M]. Cambridge: Cambridge University Press.
- Takezaki N, Rzhetsky A, Nei M. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees [J]. *Mol Biol Evol*, **12** (5): 823–833.
- Tan B. 1987. Status and problems of captive tigers in China [A]. In: Tilson R, Seal U. Tigers of the World: the Biology, Biopolitics, Management, and Conservation of an Endangered Species [M]. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 134–148.
- Tilson R, Defu H, Muntifering J, Nyhus PJ. 2004. Dramatic decline of wild south China tigers *Panthera tigris amoyensis*: Field survey of priority tiger reserves [J]. *Oryx*, **38** (1): 40–47.
- Turner A, Anton M. 1997. The Big Cats and Their Fossil Relatives. An Illustrated Guide to their Evolution and Natural History [M]. New York: Columbia University Press, 234.
- Wayne RK, Van Valkenburgh B, O'Brien SJ. 1991. Molecular distance and divergence time in carnivores and primates [J]. *Mol Biol Evol*, **8** (3): 297–319.
- Wentzel J, Stephens C, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Pecon-Slattery J, Yuhki N, Carrington M, Quigley HB, Miquelle DG, Tilson RL, Manansang J, Brady G, Lu Z, Pan W, Huang SQ, Johnston L, Sunquist M, Karanth KU, O'Brien SJ. 1999. Subspecies of tigers: Molecular assessment using “voucher specimens” of geographically traceable individuals [A]. In: Seidensticker J, Christie S, Jackson P. Riding the Tiger: Tiger Conservation in Human-Dominated Landscapes [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 20–49.