

海南坡鹿的起源、进化及保护

张琼¹ 曾治高¹ 孙丽凤^{1,2} 宋延龄^{1*}

(1 中国科学院动物研究所, 中国科学院动物生态与保护生物学重点实验室, 北京 100101)

(2 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 坡鹿是世界濒危物种, 三个亚种分布在东南亚大陆, 仅海南坡鹿种群分布在中国海南岛。2003 年, 国际社会的专家和学者提出了将海南坡鹿引入泰国亚种原分布区, 重建已经绝灭野生种群的建议。在此种情况下, 明确海南坡鹿的起源、与其它亚种间的系统发生关系、以及遗传多样性水平对有效保护坡鹿具有重要意义。本研究以线粒体 DNA D-loop 区 490 bp 基因片段为分子标记, 比较分析了海南坡鹿、泰国亚种和缅甸亚种共 35 个样本的序列差异。我们所测的样本中, 总共发现 4 种单倍型。所有 21 个海南坡鹿样品共享 1 种单倍型。利用最大似然法 (ML)、最大简约法 (MP)、邻接法 (NJ) 和贝叶斯法 (Bayesian) 构建的系统进化树表明海南坡鹿种群与泰国亚种的关系较近。但是, 二者也发生一定程度的遗传分化。海南坡鹿与泰国亚种的遗传距离均值为 0.026。我们推测海南坡鹿可能是在更新世冰期 (69 万年前) 通过陆桥由东南亚大陆迁入中国海南岛。我们的结论说明海南坡鹿的遗传多样性很低, 并且已独立进化很长时间。因此, 我们不支持将海南坡鹿引入泰国亚种的原分布区, 重建已经绝灭的野生种群的设想和建议。我们建议将海南坡鹿与泰国亚种分别作为两个独立的进化显著单元 (ESUs) 进行管理。

关键词: 海南坡鹿; 系统进化; 起源; 遗传多样性; 保护

中图分类号: Q346

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2009) 04 - 0365 - 07

The origin and phylogenetics of Hainan Eld's deer and implications for Eld's deer conservation

ZHANG Qiong¹, ZENG Zhigao¹, SUN Lifeng^{1,2}, SONG Yanling^{1*}

(1 Academic Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2 College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Eld's deer (*Cervus eldi*), a highly endangered cervid, includes three subspecies (*C. e. eldi*, *C. e. siamensis* and *C. e. thamin*) that distribute in Southeast Asia and one separated population of *C. e. siamensis* occurs in Hainan Island of China named Hainan Eld's deer. The endangered subspecies *C. e. siamensis* has been extinct in wild in Thailand over several decades. Recently, a conservation program has been launched in Thailand to establish wild population of *C. e. siamensis* from captive breeding deer in the zoo. Hainan Eld's deer has been considered as supplement resource for the reestablish deer population. In this study, we analyzed variation in the mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop sequences of 35 Eld's deer samples, including two Eld's deer subspecies (*C. e. siamensis* and *C. e. thamin*) and Hainan Eld's deer to address the following questions: (1) where did the Hainan Eld's deer originate from; (2) the relationship between Hainan Eld's deer and subspecies *C. e. siamensis*, and (3) the genetic diversity of Hainan Eld's deer population. Four haplotypes were observed in all samples, all the samples of Hainan Eld's deer shared an identical haplotype. We constructed phylogenetic trees by Maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), Neighbour-Joining (NJ) and Bayesian method using the results of this study with sequences data provided by GenBank together. The Hainan Eld's deer and *C. e. siamensis* were clustered together by MP and NJ method, however, some genetic differentiation was detected between the Hainan Eld's deer and *C. e. siamensis*. The average genetic distance is 0.026 between the Hainan Eld's deer and *C. e. siamensis*. Our results suggest that Eld's deer could distribute via land bridge from the South-east Asian mainland to the Hainan Island during the Pleistocene (0.69 Mya) when the sea level of Beibu Gulf seacoast went down in glacier age. Our results indicate a long-term historical isolation of Hainan Eld's deer population from its original resource. Therefore, we do not recommend using Hainan Eld's deer as supplement of *C. e. siamensis*. We recommend *C. e. hainanus* and *C. e. siamensis* should be both managed as evolutionarily significant units (ESUs).

Key words: Conservation; Genetic diversity; Hainan Eld's deer; Origin; Phylogenetics

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670241)

作者简介: 张琼 (1976 -), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事动物生态和保护遗传学研究。

收稿日期: 2009 - 07 - 09; 修回日期: 2009 - 10 - 14

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: songyl@ioz.ac.cn

坡鹿 (*Cervus eldi*), 又名泽鹿、眉角鹿, 属偶蹄目, 反刍亚目, 鹿科, 鹿亚科。坡鹿历史上曾广泛分布于东南亚大陆 (图 1)。由于生境丧失与破碎化, 以及人类对土地的过度开发利用, 坡鹿种群数量急剧下降 (McShea *et al.*, 1999; Bhumpakphan *et al.*, 2003; Dang and Thuy, 2003; Johnson *et al.*, 2003; Singh, 2003; Weiler, 2003; Zeng *et al.*, 2005)。目前, 该物种被《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 列为附录一物种, 被世界自然保护联盟 (IUCN) 列为濒危物种。传统分类学认为该物种共分为 3 个亚种 (Whitehead, 1972; 图 1)。其中, 缅甸亚种 (*C. e. thamin*) 数量最多, 曾经广泛分布于泰国和缅甸, 数据表明目前仅在缅甸有分布, 大约 2 200 头 (Aung, 1994), 其分布范围仍在日益缩小 (McShea *et al.*, 1999), IUCN 将其列为受胁物种; 印度亚种 (*C. e. eldi*), 曾经广泛分布于印度和缅甸的边境区域, 目前该亚种仅剩约 180 头, 分布于印度不足 20 km² 的面积上 (Singh, 2003); 泰国亚种 (*C. e. siamensis*) 的历史分布最广泛, 其分布区包括泰国、越南、老挝和柬埔寨, 但其野生种群早在 20 世纪 50 年代就已灭绝, 目前的圈养种群数量也不足 300 头, 其中 7~8 头分布在越南 (Dang and Thuy, 2003), 30~42 头分布在老挝 (Vongkhamheng and Phirasack, 2002^{*}; Malavon and Saythongdam, 2003), 大约 200 头分布于柬埔寨 (Weiler, 2003)。印度亚种和泰国亚种都濒于灭绝, IUCN 将其列为濒危物种。

此外, 在中国海南岛也有坡鹿的分布, 有些学者认为该区域的坡鹿隶属泰国亚种, 但我国科学家依据其体型小、角叉较不发达等形态特征认为它是独立的亚种——海南亚种 (*C. e. hainanus*) (徐龙辉, 1983)。根据地方志的记载, 海南坡鹿曾广泛分布在海南岛海拔 200 m 以下的地区 (余斯绵等, 1984)。但是, 自明清以来, 海南岛移民潮导致坡鹿的分布区逐渐向西退缩, 人口增加导致狩猎压力增高, 这些因素导致种群数量急剧减少 (Zeng *et al.*, 2005)。1972 年 IUCN 将分布于海南岛的坡鹿列为濒危种 (Goodwin and Holloway, 1972)。1989 年 1 月 14 日由中国农业部、林业部发布的《国家重点保护野生动物名录》将海南坡鹿列为国家一级保护动物。CITES 将海南坡鹿列为附录一物种。1976 年, 为了保护当时仅存的 26 只坡鹿, 建立大

田国家级坡鹿自然保护区, 实施就地保护。1990 年开始实施迁地保护, 在海南岛内重建海南坡鹿种群, 目前海南坡鹿种群已超过 1 000 只 (袁喜才等, 2001), 成为我国物种保护工作中最成功的范例之一。

至于海南坡鹿种群何时、何种原因、通过何种方式进入中国海南岛, 至今还没有明确的结论。有学者认为海南坡鹿是从东南亚大陆迁移到海南岛 (Bhumpakphan *et al.*, 2003)。据明万历《琼州府志》卷 3 记载, 宋元年间因战乱, 越南占城人驾船迁来海南岛, 散居在海岸一带。海南坡鹿可能是这个时候被带到海南岛的吗? 由于在全球范围内坡鹿的生存状态都受到绝灭的威胁, 因此国际社会一直致力于该物种的保护和栖息地恢复。我国在海南坡鹿保护工作中取得的成就, 给坡鹿的保护 (尤其是泰国亚种) 带来非常光明的前景。在 2003 年的“坡鹿保护和栖息地恢复”的国际研讨会上, 国际社会的专家和学者提出将海南坡鹿引入坡鹿泰国亚种的原分布区、重建已经绝灭的野生种群的建议 (Pukazhenthil *et al.*, 2003)。据此, 我们关心的问题是: 1) 海南坡鹿是由哪一个坡鹿亚种演化而来? 是何时通过何种方式来到海南岛? 2) 海南坡鹿种群的遗传多样性水平如何? 3) 能否将海南坡鹿引入泰国, 重建泰国亚种的野生种群?

1 材料和方法

1.1 样本的采集

本研究共采集海南岛 6 个种群 (一个源种群——大田种群和五个迁地种群) 共 21 个坡鹿血液样本, 2 个泰国亚种的血液样本, 12 个缅甸亚种的血液样本。此外, 从 GenBank 中获得印度亚种 (本研究中用 EL 表示) 5 个序列, 泰国亚种 6 个序列和缅甸亚种 10 个序列 (登录号 AY137080 - AY137125) 做比较分析, 同时还下载麋鹿 (*Elaphurus davidianus*, 登录号 AF291894) 同源序列作为外群 (表 1, 图 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取及线粒体 DNA D-loop 区序列测定

血液样本中 DNA 抽提采用经典的酚-氯仿抽提方法 (Sambrook *et al.*, 1989)。线粒体 DNA 控制区的 PCR 扩增引物为 (Cerv. tPro: 5' - CCAC-

* Vongkhamheng C, Phirasack S. 2002. Laos trip report April 15 - May 3, 2002. Pp 4. Smithsonian Institution.

表 1 采集样品信息
Table 1 Information on Samples

样本 Samples	命名 Name	采集地 Sampling location	采集时间 Sampling time	样本量 Sample size
海南坡鹿 Hainan Eld's deer	D	大田自然保护区 Datian Nature Reserve	1998	11
		邦溪自然保护区 Bangxi Nature Reserve	2003	2
		甘什岭自然保护区 Ganshiling Nature Reserve	1998	2
		枫木鹿场 Fengmu Deer Farm	2003	2
		金牛岭公园 Jinniuling Park	2003	2
		文昌保护站 Wenchang Reserve Station	2003	2
泰国亚种 <i>C. e. siamensis</i>	N	泰国 Thailand	2008	2
缅甸亚种 <i>C. e. thamin</i>	JE	泰国 Thailand	2008	12

YATCAACACCCAAAGC - 3', Cerv. CRH: 5' - GCCCTGAARAAAGAACCAGATG - 3') (Balakrishnan *et al.* 2003)。PCR 反应在 MBS Satellite PCR 仪上进行, 反应体系为 30 μ L, 其中包含 60 ~ 90 ng 的基因组 DNA, 每个引物 0.3 μ M, 200 μ M dNTP, 1.5 mM Mg^{2+} , 0.3 U *Taq* polymerase (Promega)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化, 利用 ABI BigDye 在 ABI 377 Genetic Analyzer 进行序列测定。

1.2.2 数据分析

利用 CLUSTAL X 程序 (Thompson *et al.*, 1997) 对测定的序列及从 GenBank 下载的序列 (登录号 AY137080 - AY137125) 进行对位排列。使用 Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007) 软件计算所有成对单倍型间的距离。序列间变异情况由 DnaSP4.0 软件进行分析。最适的 DNA 替代模型用等级似然率检验法 (hLRT) 由 MODELTEST 3.7 (Posada and Crandall, 1998) 和 PAUP* 4b10 (Swofford, 1998) 软件选出。基于鹿亚科动物系统发育分析研究 (Randi *et al.*, 2001), 麋鹿被选做外群 (序列在 GenBank 登录号为 AF291894)。用 PAUP* 4b10 (Swofford, 1998) 软件构建最大似然树 (Maximum likelihood, ML)。用 MEGA (Tamura *et*

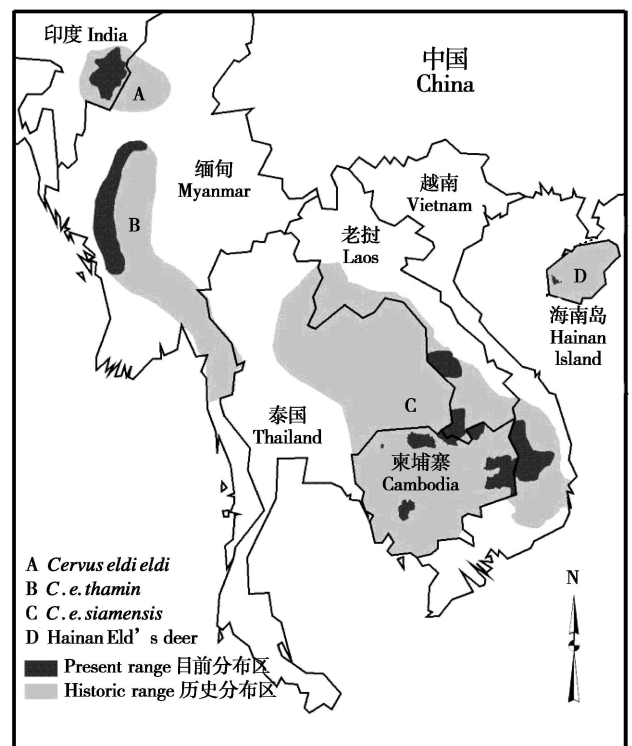


图 1 坡鹿分布图

Fig. 1 Distribution ranges of Eld's deer in the world

al., 2007) 软件构建邻接树 (Neighbour-Joining, NJ) 和最大简约树 (maximum parsimony, MP)。当用 MP 和 ML 方法构建系统发育树后, 自展重抽样

分析 (bootstrap analysis; Felsenstein, 1985) 被用来确定树上各分枝的可靠性 (1000 次重复), 一般认为, 重抽样值 (BS) 大于 70 说明该分枝的可靠性较高 (Hills and Bull, 1993)。应用 MrBayes 3.1.2 软件对序列数据进行贝叶斯分析 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), 各分枝的支持度使用贝叶斯后验概率表示, 一般认为, 大于 90% 的后验概率表明分枝得到显著支持 (Shaffer *et al.*, 1997)。本研究还使用 NETWORK4510 程序 (Bandelt *et al.*, 1999; <http://www.fluxus-engineering.com>) 以 Median-joining network (MJN) 法构建单倍型之间的网络关系图。

2 结果

2.1 线粒体 DNA D-loop 序列及其差异

从 35 个坡鹿样本中扩增并测定出 490 bp 的线粒体 DNA D-loop 区的基因片段序列, 序列数据已经被投递到 GenBank (登录号为 FJ851215 - FJ851239)。使用程序 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 对所有可比较的序列进行对位排列后得到 452 bp 的同源区序列。在此序列片段中共发现 42 个多态位点, 没有插入和缺失。26 个简约信息位点, 16 个单突变位点。在海南坡鹿种群中, 所有 21 个序列完全相同。

我们所测的 35 个样本中, 总共发现 4 种单倍型。所有 21 个海南坡鹿样品 (包括源种群和迁地种群) 共享 1 种单倍型, 标记为 D13; 2 个泰国亚种 DNA 样品共享 1 种单倍型, 标记为 N1; 12 个缅甸亚种 DNA 样品共有 2 种单倍型, 分别标记为 JE2、JE29; 其余单倍型均引自 Balakrishnan 等 (2003) 所发表文献。根据我们的数据和已有的文献提供的数据, 坡鹿总共有 15 种单倍型。

2.2 系统进化树

等级似然比率检验 (hLRT) 结果表明, 坡鹿线粒体 DNA 控制区序列的最适替代模型为 HKY + G, 符合 gamma 分布。基于我们的序列数据和从 GenBank 中下载的序列数据, 构建了最大似然树 (ML)、最大简约树 (MP)、邻接树 (NJ) 和贝叶斯树。四种不同方法构建的系统树得到的结果基本一致 (图 2), 缅甸亚种的 10 种单倍型与印度亚种的一种单倍型聚在一起, MP 树和 NJ 树将海南坡鹿与泰国亚种聚在一起, 但重抽样值 (BS) 小于 70, ML 树和贝叶斯树均显示海南坡鹿为单独一个分枝。所有单倍型间遗传距离的均值为 0.027, 海

南坡鹿与泰国亚种 N1 的遗传距离为 0.03, 与 N92 的遗传距离为 0.025, 与 N83 的遗传距离为 0.023。Network 的结果显示海南坡鹿与泰国亚种的 N1 单倍型发生了 13 次突变, 与 N92 发生了 11 次突变, 与 N83 发生了 10 次突变 (图 3)。

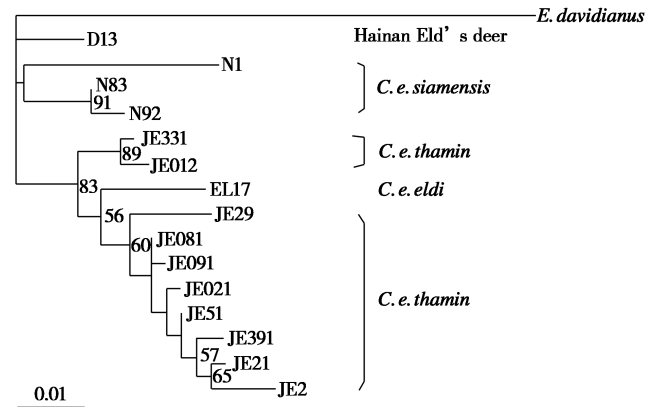


图 2 利用最大似然法构建的线粒体 D-loop 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of D-loop sequences constructed by Maximum likelihood (ML)

3 讨论

3.1 海南坡鹿的起源与进化

我们的研究表明海南坡鹿与泰国亚种的亲缘关系较其与缅甸亚种、印度亚种更近。但是, 海南坡鹿的单倍型与目前泰国亚种的三种单倍型之间存在较大的遗传距离, 表明二者已发生了一定程度的遗传分化。Balakrishnan 等 (2003) 的研究也得到相似的结论。海南坡鹿与泰国亚种在形态上具有明显的差异 (表 2)。此外, 根据地质史的研究, 我国的海南岛与大陆的分离发生在大约 100 万年以前 (汪啸风等, 1991) 的更新世。由于在中国大陆地区从来没有发现海南坡鹿的化石, 因此有学者认为这种动物是来自与海南岛隔海相望的东南亚大陆。虽然, 至今我们仍然不知道海南坡鹿最早出现在海南岛的具体时间, 但是在海南三亚地区发现的石器时代晚期和更新世早期、距今约 1 万年前的“三亚落笔洞”遗址中, 中国研究古脊椎动物的科学家发现了一块疑似海南坡鹿的鹿角化石 (郝思德和黄万波, 1998)。这个发现说明, 至少在 1 万年以前, 海南坡鹿可能已经生活在海南岛了。因此, 形态差异和化石记录都表明海南坡鹿已独立进化了很长时间。

根据鹿科动物线粒体控制区的碱基替代率为每百万年 3.6% (Polziehn and Strobeck, 2002)。我们推测海南坡鹿和泽鹿泰国亚种的分化大约发生在

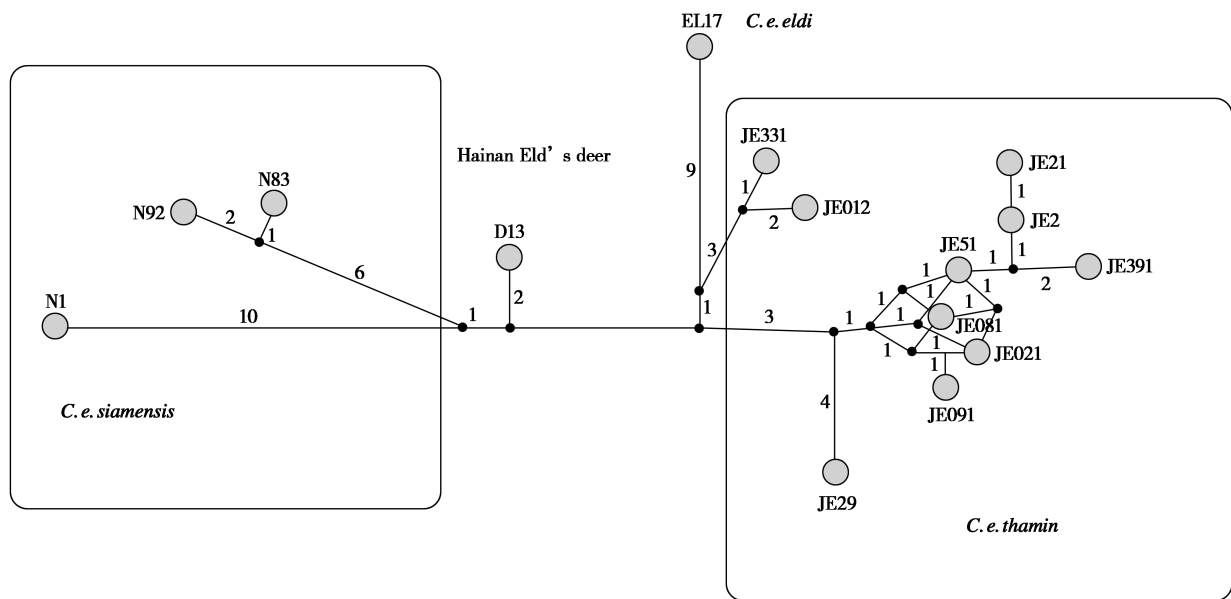


图3 使用 Median-joining 法建立的 D-loop 序列 15 种单倍型的 Network 示意图. 其中每条线代表一个突变, 线上的数字代表突变次数. 圆圈代表不同的单倍型. 线上的黑点代表本研究样本中未观察到的单倍型

Fig. 3 Median-joining network of the observed 15 haplotypes of mtDNA D-loop sequences. Each line represents a mutational step. The numbers on the line represent nucleotide variations between two haplotypes. The circles represent the haplotype. Black dots on each line indicate unobserved haplotypes in the samples.

表2 海南坡鹿与泽鹿泰国亚种在形态学方面的差异

Table 2 Morphological differentiation between Hainan Eld's deer and *Cervus eldi siamensis*

形态特征 Morphological characteristic	海南坡鹿 Hainan Eld's deer	泰国亚种 <i>C. e. siamensis</i>
体重 Body weight	< 100 kg	> 100 kg
毛色与斑点 Pelage color	红棕色 Rufous	黄褐色 Brown
斑点 Spot	脊中线两侧和臀部有明显的白色斑点 White spots on the flanks	没有白色斑点 No white spots
角型 Antler shape	只有眉枝和主干, 角的末端呈圆锥状 There is no forking at the end of antler, and the end of antler is coniform.	除了眉枝和主干外, 在主干上还生有较短的叉, 角的末端扁平状 There is forking at the end of antler, and the end of antler is flat

69 万年前; 在泰国发现了有 35 万年历史的泽鹿泰国亚种的牙齿化石 (Ginsburg *et al.*, 1982)。这两个时间都晚于海南岛与中国大陆的分离。南海沿岸的北部湾较浅, 全年基本都在 50 m 以内 (唐世林等, 2007); 冰期时, 海平面下降至少 80 m。因此, 海南坡鹿可能是在更新世冰期时通过陆桥由东南亚大陆的越南、老挝、柬埔寨等国家来到中国海南岛。这几个国家都是泰国亚种的主要分布国, 显然, 这一推测与我们得到的海南坡鹿是由泰国亚种分化而来, 并且已独立进化了很长时间的结论相吻合。

3.2 海南坡鹿的遗传多样性

本研究通过对海南坡鹿一个源种群和 5 个迁地种群共 21 个个体 mtDNA D-loop 的序列分析, 结果表明生活在海南岛的坡鹿种群共享 1 种单倍型, 说明海南坡鹿种群的遗传多样性水平极低。Pang 等 (2003) 通过对海南大田国家级自然保护区的 55 个个体的 mtDNA D-loop 序列进行分析, 结果表明所有个体仅有 1 种单倍型。Zhang 等 (2008) 利用 10 个微卫星位点对海南坡鹿 3 个种群 (一个源种群和两个迁地种群) 的遗传多样性进行分析, 结果表明 3 个种群的遗传多样性水平均较低, 期望杂合度 (H_e) 平均约为 0.3。这些结果说明虽然在就地保护和迁地保护的措施下, 海南坡鹿种群数量已迅

速恢复,但种群遗传多样性水平依然令人担忧。如果我们对海南坡鹿的来源推测正确,海南坡鹿种群历史上经历了一次或者数次奠基者事件;另外,由于生境破坏,非法狩猎导致种群数量急剧下降。由此可见,奠基者效应、瓶颈效应以及遗传漂变导致了海南坡鹿种群遗传多样性水平较低 (Pang *et al.*, 2003; 张琼等, 2007; Zhang *et al.*, 2008)。

3.3 坡鹿的保护建议

基于本研究结果,我们不建议将海南坡鹿引入泰国,重建泰国亚种野生种群。原因如下: 1) 尽管许多文献表明恢复隔离种群间的基因流可以有效的缓解近交衰退现象 (如, Hedrick, 1995; Madsen *et al.*, 1999), 隔离种群之间的基因交流也有可能导致种群遗传多样性全部丧失 (Lacy, 1987), 还可能带入一些外来病原体。海南坡鹿可能已经独立进化了 69 万年, 将其重新引入泰国亚种的栖息地, 重建泰国亚种野生种群存在一定的冒险性。2) 从遗传多样性较高的种群向遗传多样性较低的种群引种, 可能有助于缓解和抵消由于遗传多样性较低导致的近交衰退现象。然而, 虽然海南坡鹿种群数量已迅速恢复, 种群的遗传多样性水平仍然很低。3) 两个遗传分化较大的种群进行杂交可能导致远交衰退 (Rhymer and Simberloff, 1996)。海南坡鹿与泰国亚种之间已发生一定程度的遗传分化, 这种分化水平已导致这两个种群间不适合遗传交换 (Balakrishnan *et al.*, 2003)。因此, 我们不支持国际社会的专家和学者提出的将海南坡鹿引入泽鹿泰国亚种的原分布区、重建已经绝灭的野生种群的设想和建议。如前面所提, 坡鹿来到海南岛之后, 已经独立进化成为一个种群, 不仅在形态上已经与泽鹿泰国亚种有明显的差别, 在遗传上也发生一定程度的分化。把海南坡鹿引入泰国亚种的原分布区存在一定的冒险性, 我们建议将海南坡鹿与泰国亚种分别作为两个独立的进化显著单元 (ESUs) 进行管理, 进行栖息地恢复及重建野生种群。

致谢: 感谢海南大田国家级自然保护区、邦溪自然保护区、甘什岭自然保护区、枫木鹿场、金牛岭公园和文昌自然保护站提供海南坡鹿样本。感谢泰国 Kasetsart 大学的 Worawidh Wajjwalku 博士提供泰国亚种和缅甸亚种的样本。

参考文献:

Aung M. 1994. Field Notes on Thamin in Myanmar. Wildlife and Sanctu-

aries Division, Forest Department, Yangon, Myanmar.

- Balakrishnan C N, Monfort S L, Gaur A, Singh L, Sorenson M D. 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). *Molecular Ecology*, **12**: 1 - 10.
- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median - joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37 - 48.
- Bhumpakphan N, Sukmasuang R, Chaiyarat R. 2003. Thailand: The crossroad where two Eld's deer subspecies existed. In: Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration, Hkao Khoew Open Zoo, Chonburi, Thailand, 10 - 14.
- Dang N X, Thuy N T. 2003. Status and conservation of Eld's deer (*Cervus eldi*) in Vietnam. In: Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration, Hkao Khoew Open Zoo, Chonburi, Thailand, 27 - 30.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783 - 791.
- Ginsburg L, Ingavat R, Sen S. 1982. A Middle Pleistocene (Loagian) cave fauna in Northern Thailand. *Comptes Rendus de l' Académie des Sciences*, **294**: 295 - 297.
- Goodwin H A, Holloway C. 1972. Red Data Book. Vol. 2: Mammalia. IUCN Switzerland.
- Hedrick P W. 1995. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology*, **9**: 996 - 1007.
- Hills D M, Bull J J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, **42**: 182 - 192.
- Johnson A, Vongkhaheng C, McShea W. 2003. The road to recovery: status of Eld's deer (*Cervus eldi siamensis*) in Lao PDR. In: Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration, Hkao Khoew Open Zoo, Chonburi, Thailand, 7 - 8.
- Lacy R C. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, **1**: 143 - 158.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittsell H. 1999. Restoration of an inbred adder population. *Nature*, **402**: 34 - 35.
- Malavon P D, Saythongdam T. 2003. Study of Eld's deer foraging and habitat in Chonbuly District, Savannakhet Province, Lao PDR. 52. Undergraduate thesis in faculty of Ecology, National University of Laos, Vientiane, Lao PDR.
- McShea W J, Leimgruber P, Aung M, Monfort S L, Wemmer C. 1999. Range collapse of a tropical cervid (*Cervus eldii*) and the extent of remaining habitat in central Myanmar. *Animal Conservation*, **2**: 173 - 183.
- Pang J F, Hoelzel R, Song Y L, Zeng Z G, Zhang Y P. 2003. Lack of mtDNA control region variation in Hainan Eld's deer: Consequence of recent population bottleneck? *Conservation Genetics*, **4**: 109 - 112.
- Polzheim R O, Strobeck C. 2002. A phylogenetic comparison of red deer and wapiti using mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22**: 342 - 356.
- Posada D, Crandall K A. 1998. MODELTEST: testing the model of

- DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817 – 818.
- Pukazhenthil B, Siriaronrat B, Monfort S. 2003. Captive animal husbandry and research in the Eld's deer. In: Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration, Hkao Khoew Open Zoo, Chonburi, Thailand, 36 – 42.
- Randi E, Mucci N, Claro-Hergueta F, Bonnet A, Douzery E J P. 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation*, **4**: 1 – 11.
- Rhymer J M, Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**: 83 – 109.
- Ronquist F, Huelsenbeck J P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572 – 1574.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Shaffer H B, Meylan P, McKnight M L. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology*, **46**: 235 – 268.
- Singh S. 2003. Brow-antlered deer (*Cervus eldi eldi*) in Keibul Lamjao National Park, Manipur, India. In: Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration, Hkao Khoew Open Zoo, Chonburi, Thailand, 19 – 23.
- Swofford D L. 1998. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596 – 1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak 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 Research*, **25**: 4876 – 4882.
- Weiler H. 2003. Conservation status of Eld's deer in Cambodia. In: Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration, Hkao Khoew Open Zoo, Chonburi, Thailand, 15 – 18.
- Whitehead G K. 1972. Deer of the World. New York: Viking Press.
- Zeng Z G, Song Y L, Li J S, Teng L W, Zhang Q, Guo F. 2005. Distribution, status and conservation of Hainan Eld's deer (*Cervus eldi hainanus*) in China. *Folia Zool*, **54**: 249 – 257.
- Zhang Q, Zeng Z G, Ji Y J, Zhang D X, Song Y L. 2008. Microsatellite variation in China's Hainan Eld's deer (*Cervus eldi hainanus*) and implications for their conservation. *Conservation Genetics*, **9**: 507 – 514.
- 汪啸风, 马大铨, 蒋大海主编. 1991. 海南岛地质 (三). 北京: 地质出版社.
- 张琼, 吉亚杰, 曾治高, 宋延龄, 张德兴. 2007. 奠基者效应对海南坡鹿迁地保护种群遗传多样性的影响. *动物学杂志*, **42** (3): 54 – 60.
- 余斯绵, 刘振和, 袁喜才. 1984. 海南坡鹿资源及保护利用. *野生动物*, **5** (5): 9 – 12.
- 郝思德, 黄万波. 1998. 三亚落笔洞遗址. 海口: 南方出版社.
- 袁喜才, 薛成, 云大兴, 王春晓, 李善元. 2001. 海南坡鹿就地保护和迁地保护现状. *野生动物*, **21** (1): 6 – 8.
- 唐世林, 陈楚群, 詹海刚, 许大志, 刘大召. 2007. 南海真光层深度的遥感反演. *热带海洋学报*, **26** (1): 9 – 15.
- 徐龙辉. 1983. 海南岛的鸟兽. 北京: 科学出版社, 398 – 401.