

# 黑龙江省完达山东部林区马鹿种群遗传多样性的微卫星分析\*

田新民<sup>1,2</sup> 张明海<sup>1,\*</sup> 张 辉<sup>1</sup> 杨春文<sup>2</sup> 金志民<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup> 牡丹江师范学院生物系, 黑龙江牡丹江 157012)

**摘 要** 黑龙江省完达山东部林区是东北马鹿(*Cervus elaphus xanthopygus*)种群密度较高的分布区之一,本文对2年冬季采集的167份马鹿粪便进行了7个微卫星座位的个体识别,评价了马鹿种群遗传多样性,并分析近期马鹿数量的急剧下降对种群遗传结构的影响。结果表明:167份粪便DNA分属66只个体,种群平均等位基因数 $9.00 \pm 2.77$ ;平均有效等位基因数 $3.97 \pm 0.99$ ;平均多态信息含量 $0.69 \pm 0.09$ ;平均期望杂合度 $0.74 \pm 0.08$ ;平均观察杂合度 $0.69 \pm 0.08$ 。整个种群显著偏离Hardy-Weinberg平衡,但种群固定系数 $F_{is}$ 为0.060,没有显著偏离零。可见,完达山东部林区马鹿种群遗传多样性较高,数量的急剧下降近期还没有表现在种群遗传结构上。

**关键词** 完达山东部;东北马鹿;遗传多样性;微卫星

中图分类号 Q346.5 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2010)3-0543-06

**Genetic diversity of wapiti population in eastern Wandashan Mountains of Heilongjiang Province, China based on microsatellite analysis.** TIAN Xin-min<sup>1,2</sup>, ZHANG Min-hai<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, YANG Chun-wen<sup>2</sup>, JIN Zhi-min<sup>2</sup>(<sup>1</sup>College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>Department of Biology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157012, Heilongjiang, China). Chinese Journal of Ecology 2010 29(3) 543-548.

**Abstract:** The eastern Wandashan Mountains of Heilongjiang Province is one of the areas with high population density of wapiti (*Cervus elaphus xanthopygus*). In this paper, 167 wapiti fecal samples were collected there in two winters to identify their DNA based on 7 microsatellite loci, aimed to study the genetic diversity of the population, and the effects of the population's dramatic decline in recent years on the population genetic structure. The DNA of the samples was assigned to 66 individuals. The average numbers of the alleles and effective alleles were  $9.00 \pm 2.77$  and  $3.97 \pm 0.99$ , respectively, the average polymorphism information content was  $0.69 \pm 0.09$ , and the average observed and expected heterozygosity values were  $0.69 \pm 0.08$  and  $0.74 \pm 0.08$ , respectively. The population was significantly deviated from Hardy-Weinberg Equilibrium, but the inbreeding coefficient was 0.060, not significantly deviated from zero. It was suggested that the genetic diversity of the population was still higher, and the dramatic decline of the population didn't yet affect the population genetic structure due to time lag.

**Key words:** Eastern Wandashan Mountains; wapiti (*Cervus elephus xanthopygus*); genetic diversity; microsatellite.

20世纪80年代中期出现的野生动物非损伤性取样(noninvasive sampling)得到越来越多的应用

(李明等 2001;魏辅文等 2001),而粪便样品由于其易于收集的特点成为非损伤性取样法中最具有潜在价值的研究材料(魏辅文等 2001)。微卫星DNA(Microsatellite)分子标记具有多态性丰富、易于检测、数量多、片段长度较小等优点(Wan et al., 2004),适合分析像动物粪便这样细胞数量少且具

\* 国家自然科学基金项目(30870309)、黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJN-0501)和美国老虎和犀牛基金资助项目(98210-2-G191)。

\* \* 通讯作者 E-mail: zhangminghai2004@126.com

收稿日期:2009-08-10 接受日期:2009-11-18

有不同程度降解的样品。近年来,粪便微卫星 DNA 分析技术在物种判定( H $\ddot{o}$ ss *et al.* ,1992)、个体识别( Kohn *et al.* ,1999)、数量调查( Zhan *et al.* ,2006)、遗传多样性( 艳丽等,2006;蔡清秀等,2008)、家域( Smith *et al.* ,2006)等领域已得到较为成熟的应用。

马鹿(*Cervus elephus*)为国家Ⅱ级重点保护的鹿科野生动物,分布于黑龙江省境内的马鹿为东北亚种(*C. e. xanthopygus*)。30 年来,黑龙江省曾被认为是马鹿资源比较丰富的地区,其广泛分布于大小兴安岭、张广才岭、老爷岭、完达山等地区( 陈化鹏等,1997)。但近 2 年野外观察发现,除完达山地区野生马鹿数量相对较多外,其他分布区其数量稀少,活动痕迹较难发现。完达山地区是黑龙江省马鹿密度最高分布区( 许庆翔等,2000),但近年来由于人类活动( 姜广顺等,2005)、偷猎( 刘群秀等,2007)等原因,种群数量呈急剧下降趋势( 张明海和刘群秀,2008)。刘群秀(2006)应用漩涡模型对未来 100 年种群动态及灭绝概率做出预测,认为该地区马鹿种群平均灭绝时间约为 55 年,灭绝概率为 100%。

目前,对完达山地区马鹿种群的研究主要集中在宏观尺度上( 姜广顺等,2005;周绍春等,2006;刘群秀等,2007;李言阔等,2008),种群遗传方面的研究刚刚开始深入开展,主要有应用微卫星分子标记对野生东北马鹿进行个体识别( 尹君等,2007);基于具有母系遗传特征的 mtDNA 序列分析技术,评价马鹿种群遗传多样性( 刘艳华和张明海,2007);利用 SRY 性别鉴定技术确定野生东北马鹿性别( 田新民等,2008)。因此,本文拟利用具有双亲遗传特征的微卫星分子标记,通过非损伤性样品——粪便,在个体识别的基础上对完达山东部林区马鹿种群遗传多样性进行评价,为制定科学、有效的保护管理措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2006 年 2—3 月与 2007 年 1 月 2 次冬季期间,对完达山东部的迎春林业局五泡林场( 46°27'N—46°38'N,127°04'E—127°16'E)155.6 km<sup>2</sup> 的整个区域进行了野外马鹿粪便采集。取样时沿雪地上新鲜足迹链寻找马鹿粪便,发现后取数粒装入封口袋内, GPS 定位。再择另一条新鲜足迹链跟踪取样。共收集马鹿粪便 210 份( 2006 年 120 份、2007 年 90 份),粪便样品 -20℃ 冷冻保存。

1.2 DNA 提取

粪便样品的 DNA 提取使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit( Qiagen, Germany )试剂盒,按照操作手册进行。通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取是否成功及基因组 DNA 的纯度, -20℃ 保存。

1.3 微卫星座位选择

对 Kuehn 等( 2003 )在巴伐利亚马鹿研究中使用的 19 对微卫星引物进行筛选,选择能够成功扩增东北马鹿基因组 DNA 的座位,并利用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染技术进行多态性检验,具体步骤见田新民( 2008 )。为了提高个体识别中微卫星座位联合区分率,本文选择等位基因数 >4 的座位,最后只有 CSSM19 符合条件。并采用了尹君等( 2007 )使用的东北马鹿多态性较高的 6 个座位。最终,使用这 7 个微卫星座位进行马鹿遗传多样性分析。对每一微卫星座位的单侧引物 5'端进行荧光标记( FAM、HEX、TAMARA)。引物详细信息见表 1。

1.4 PCR 扩增

扩增体系: Ex Taq HS 0.25 U ( Takara ), dNTP、Buffer 与 BSA ( 0.02 g · ml<sup>-1</sup> )各 1 μl, 5'端荧光标记及非标记引物( 10 mmol · L<sup>-1</sup> )各 0.25 μl, DNA 1.5 μl, 最后加水至 10 μl。扩增条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 30 s, 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。取 4 μl 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。所有样品重复扩增 3 次。

1.5 基因分型

根据琼脂糖凝胶电泳的条带亮度初步判断 PCR 扩增产物浓度,并将所有产物稀释成近似相同

表 1 微卫星引物序列  
Tab. 1 Microsatellite primer sequences

座位	引物序列 ( 5'-3' )	等位基因长度 ( bp )	重复单位	退火温度 ( ℃ )
T507 <sup>1</sup>	F aggcagatgcttcacatc R tgtggagcaacctcacat	146 ~ 184 ( 7 )	TAGA	57
CSSM19 <sup>2</sup>	F ttgtcagcaactcttltgtaattt R tgttttaagccacccaattatttg	133 ~ 169 ( 7 )	GT	56
T530 <sup>3</sup>	F gtctccacagcagctctatg R gcattctttagaactccaactg	254 ~ 296 ( 8 )	TAGA	56
T501 <sup>1</sup>	F ctctctcattattaccctgtgaa R acatgctttgaccaagacc	240 ~ 264 ( 6 )	TAGA	55
C143 <sup>1</sup>	F aaggagctcttcagtttgaga R gggtctgtcttltgtgtgtg	159 ~ 167 ( 3 )	CATC	54
T123 <sup>2</sup>	F gtttcttggcacatctct R ctgtctgtgtgtgtgtgtg	150 ~ 174 ( 7 )	TAGA	55
T156 <sup>3</sup>	F tcttctgacctgtgtcttg R gatgaatacccgcttctgtg	145 ~ 197 ( 8 )	TAGA	57

<sup>1</sup>FAM, <sup>2</sup>HEX, <sup>3</sup>TAMARA.

浓度。7 个座位分成 2 个检测体系:T507、CSSM19 和 T530 座位,T501、C143、T123 和 T156 座位。将混合好的 PCR 产物在全自动序列测定仪上分析 3  $\mu$ l PCR 产物混合液与 15  $\mu$ l 甲酰胺和 0.5  $\mu$ l ILS-600 内标(Promage)混合,在 95  $^{\circ}$ C 下变性 5 min,扩增产物片段大小的检测采用 POP4 液体胶在 ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer 上进行。电泳数据通过 Genemapper 3.0 转换成片段大小数据,并打印。按照 David 等(1998)的方法进行等位基因和基因型的判别。

微卫星基因分型采用 Bellemain 等(2005)依据的标准:粪便样品重复扩增 3 次后,仅出现 1 个等位基因的,认为是纯合子;总是出现 2 个不同的等位基因时判定为杂合子。重复扩增 3 次后,若只能判定出 1 个等位基因确实存在时(即每次扩增都能得到这个等位基因,但是另一个等位基因不是每次都出现时),则再增加一次扩增之后根据待确定的那个等位基因出现的频次来判定,若待确定的等位基因出现 2 次以上则判定为杂合子;若待确定的等位基因只出现 1 次则判定为纯合子(艳丽等 2006)。

## 1.6 数据分析

利用软件 Excel Microsatellite Tool kit,寻找数据中相匹配的基因型。判断不同样品来自于同一个体的原则是:1)所有座位上的基因型都相同;2)只有一个座位上的 1 个等位基因存在差异(Bellemain *et al.* 2005)。所有样品基因型匹配后,使用此程序计算种群等位基因频率(allele frequencies)、期望杂合度(expected heterozygosity  $H_e$ )、表观杂合度(observed heterozygosity  $H_o$ )、等位基因数( $A$ )和多态信息含量(polymorphism information contents  $PIC$ )。有效等位基因数(effective number of allele  $N_e$ )通过公式计算(洪艳云 2004)。软件 Cervus 3.0 计算 7 个座位的联合  $P(ID)$  值,它是指无亲缘关系或同胞个体之间具有相同基因型的概率。软件 FSTAT 2.9.3.2 计算种群偏离 Hardy-Weiberg 的系数( $F_{is}$ )。软件 Genepop 4.0 测算总体和各个座位是否符合 Hardy-Weiberg 平衡,概率检验中使用马可夫链法(Markov chain),参数均设为 5000 dememorization、100 batch 和 5000 iteration(吴海龙 2006)。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 的提取

210 份粪便 DNA 提取中发现,很多 DNA 发黄,

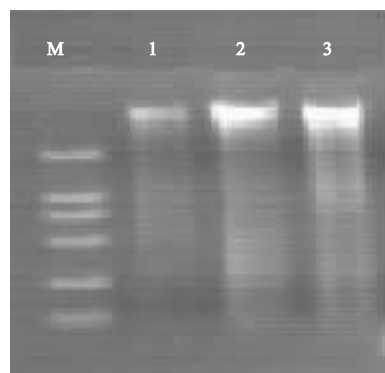


图 1 粪便 DNA 的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of extracted fecal DNA

M 为分子量标记(DL-2000),1、2、3 为基因组 DNA。

不能获得扩增产物。以提高样品利用率为目的,对发黄样品选择其他粪粒做第二次 DNA 提取。最后,使用了 2006 年的 90 份和 2007 年的 77 份,共 167 份 DNA 进行了分析。图 1 为编号 81、83L 和 242W 粪便 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果。

### 2.2 个体识别

167 份 DNA PCR 扩增中,座位扩增成功率:T507、CSSM19、T530 98.8%;C143、T156 98.2%;T123 97.6%;T501 97.0%,扩增成功率较高,主要与样品 DNA 的筛选有关。有 10 个样品未获得全部基因型,根据这些样品的基因型、采集地点、性别和粪粒尺度也进行了个体识别。对马鹿的分析显示,这些微卫星座位的联合区分率很高,即使是出现双胞胎的情况,判断错误的概率  $P_{sib}$  也只有 0.19%(表 2)。个体识别的结果为 2006 年 90 份样品中鉴定出 39 个独特的基因型(个体),2007 年 77 份样品中鉴定出 36 个独特基因型,2 年的 167 份样品分属 66 只个体。在 2006 年的个体中只有 9 只个体在 2007 年重复出现。

### 2.3 种群遗传多样性

通过 66 只个体基因型数据统计指出,种群平均等位基因数为  $9.00 \pm 2.77$  个,有效等位基因数平均为  $3.97 \pm 0.99$  个,各座位的有效等位基因数比实际观察到的要小很多,差异极其显著( $P < 0.01$ )。单个微卫星座位的  $PIC$  在 0.53 ~ 0.78,平均值为  $0.69 \pm 0.09$ ,7 个座位皆为高度多态性座位。期望杂合度变化范围为 0.61 ~ 0.81,平均为  $0.74 \pm 0.08$ ;平均表观杂合度为  $0.69 \pm 0.08$ ,二者之间并无明显差异( $P = 0.37$ )。在 Hardy-Weiberg 平衡检验中发现,有 5 个座位(CSSM19、T530、C143、T501 和

表 2 研究种群内 7 个微卫星座位的遗传指数  
Tab. 2 Characteristics of seven microsatellite loci in the study population

Locus	A	$N_e$	$H_o$	$H_e$	P	$F_{is}$	PIC	$P_{ID}$	$P_{sib}$
T507	11	3.40	0.68	0.71	0.121	0.042	0.68	0.12	0.43
CSSM19	9	4.56	0.53	0.79	0.000	0.328	0.75	0.08	0.38
T530	10	4.32	0.77	0.77	0.048	0.002	0.74	0.09	0.39
C143	5	2.52	0.74	0.61	0.000	-0.225	0.53	0.23	0.51
T501	6	3.02	0.70	0.67	0.000	-0.034	0.62	0.16	0.46
T123	9	5.06	0.71	0.81	0.026	0.126	0.78	0.07	0.37
T156	13	4.91	0.72	0.80	0.135	0.010	0.77	0.07	0.37
All	9	3.97	0.69	0.74	0.007	0.060	0.70	1.3E-7	0.19%

A : 等位基因数 ;  $N_e$  : 有效等位基因数 ;  $H_o$  : 表观杂合度 ;  $H_e$  : 期望杂合度 ; P : Hardy-Weinberg 平衡检验的概率值 ;  $F_{is}$  : 固定系数 ; PIC : 多态信息含量 ;  $P_{ID}$  : 无亲缘关系个体基因型相似概率 ;  $P_{sib}$  : 双胞胎基因型相似概率。

T123)显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ,整个种群也显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ,但固定系数  $F_{is}$  为 0.060 ,没有显著偏离零(表 2)。

3 讨 论

按照研究方法中正确基因型的判别标准 ,对所有座位的等位基因丢失和假等位基因进行分析 ,在所有的 PCR 扩增中 7 个座位的等位基因丢失率平均为 0.034 ,假等位基因出现率平均为 0.023。与 Valière 等(2007)8 次 PCR 扩增检测的马鹿粪便 DNA 基因型错误率分析中平均假等位基因出现率 0.020 接近 ,相比平均等位基因丢失率 0.190 ,本实验出现的等位基因丢失率较低 ,这可能与对纯合体重复 PCR 扩增检测次数较少有关。

在室内实验分析过程中 ,出现了较低的基因型错误率 ,可能与野外冬季雪地搜集的粪便样品较新鲜、PCR 扩增体系中特异高效的热启动 DNA 聚合酶 (Hotstar DNA polymerase)和 BSA 的使用以及引物的选择有关。Hedmark 等(2004)指出 ,在对 21 个粪便分析时扩增 3 次可以得到所有座位正确的基因型 ,与组织样品扩增成功率和等位基因丢失率相同 ,粪便样品能够出现这样好的结果在很大程度上由于 3 个关键因素 :1)粪便非常新鲜或在雪地上采集 ;2)在 DNA 提取抑制物的去除和在 PCR 扩增中 BSA 的使用 ;3)特异高效的 DNA 聚合酶 (Hotstar DNA polymerase)的使用。由于 DNA 聚合酶具有滑动性 ,扩增时会造成滑动 (stutter)现象 ,即在扩增过程中有少量的产物比模板 DNA 少 1 个至几个重复单位。这种现象多发生在重复单位为 1 或 2 个碱基的微卫

星座位上 ,在 3 个以上重复的座位上则很轻微或没有。本研究使用的 7 个座位中有 6 个座位的重复单元为 4 个碱基 ,避免了 2 个等位基因十分接近时严重的滑动使等位基因大小判读错误现象的出现。

在没有个体迁入、迁出和随机交配的一个理想种群中 ,获得的遗传数据通常都符合 Hardy-Weinberg 平衡。本研究平衡检验发现 ,有 5 个座位 (CSSM19、T530、C143、T501 和 T123)显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ,整个种群也显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。Ardren 等(1999)指出 ,在濒危物种种群遗传学研究中经常会遇到不符合孟德尔遗传规律的现象 ,究其原因主要有种群亚结构、近亲繁殖和无效等位基因等导致的杂合度不足 (Lade *et al.* , 1996 ;吴华等 2008)。完达山林区没有任何地理障碍阻隔个体间的迁移和基因交流 ,种群内不可能存在亚结构。固定系数  $F_{is}$  是评价种群是否发生近亲繁殖的一个重要参数 ,马鹿种群固定系数  $F_{is}$  为 0.0602 ,没有显著偏离零 ,可以认为完达山东部林区马鹿种群还没有达到近亲繁殖状态。 $F_{is}$  为正值 ,表明存在无效等位基因 (Pemberton *et al.* ,1995 ;吴华等 2008)。在引用近缘种微卫星引物时 ,经常会由于微卫星侧翼序列突变导致出现类似现象 (Ardren *et al.* ,1999 ;Harper *et al.* ,2003)。但是 ,这种影响的可能性很小 (Goodman *et al.* ,2001 ;田秀华等 ,2006)。通常 ,马鹿具有较大的活动范围 ,特别是在食物资源贫乏的冬季时期 ,在 155.6 km<sup>2</sup> 的取样范围内马鹿个体定会存在一定的迁入和迁出。因此 ,笔者认为整个种群显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ,是由于种群较大的迁入和迁出而不符合理想种群的

前提假设导致的。

遗传多样性是指种内基因的变化,包括种内显著不同种群和同一种群内不同个体之间的遗传变异,是物种进化的潜力。本实验选用的7个微卫星座位在马鹿种群中检测出丰富的遗传多样性水平,平均等位基因数( $A$ )为 $9.00 \pm 2.77$ ,平均期望杂合度( $H_e$ )为 $0.738 \pm 0.076$ ,均高于吴华等(2008)对比研究中使用的遗传多样性较高的鹿科动物:白尾鹿 *Odocoileus virginianus* ( $H_e = 0.67 - 0.74$ , DeYoung *et al.*, 2003)、马鹿 *Cervus elaphus* ( $H_e = 0.71$ , Goodman *et al.*, 2001)和狍 *Capreolus capreolus* ( $H_e = 0.50 - 1.0$ , Fickel & Reinsch, 2000)。说明,近期马鹿种群数量的急剧下降还没有表现在种群遗传水平上。

有效等位基因数是群体在随机交配时基因在后代能够固定的等位基因数,有效等位基因数与实际等位基因数之间的差距可以粗略地显示等位基因的丢失风险。本实验7个微卫星座位的有效等位基因数( $N_e$ )为 $2.517 \sim 5.057$ 个,平均为 $3.97 \pm 0.99$ 个,其有效等位基因数与实际等位基因数( $A$ )具有极显著差异( $P < 0.01$ ),说明马鹿的基因频率分布处于不稳定状态。研究发现,7个座位的等位基因频率分布中,低频率基因占较大比例,群体内的这些稀有等位基因也可能是3~4次重复PCR扩增没能完全排除基因型错误导致的。在小种群中,由于遗传漂变使得高频率的等位基因容易被固定,而那些频率低的稀有等位基因被消除,在未来种群发展中存在较大的等位基因丢失风险。稀有基因是进化的结果,是遗传多样性保护的重要内容。因此,建议在完达山东部地区建立自然保护区,加强该地区马鹿的保护,防止种群数量继续减少。

## 参考文献

蔡清秀,林柳,潘文婧,等. 2008. 勐养保护区亚洲象微卫星位点筛选及种群遗传多样性分析. 兽类学报, **28** (2): 126-134.

陈化鹏,吴建平,张明海. 1997. 黑龙江省马鹿. 哈尔滨: 东北林业大学出版社.

洪艳云. 2004. SSR在普氏原羚个体识别和分子保护遗传学中的应用(硕士学位论文). 长沙: 湖南农业大学.

姜广顺,张明海,马建章. 2005. 黑龙江省完达山地区马鹿生境破碎化及其影响因子. 生态学报, **25** (7): 1691-

1708.

李明,魏辅文,饶刚,等. 2001. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. 动物学报, **47** (3): 338-342.

李言阔,张明海,蒋志刚. 2008. 基于生境可获得性的完达山地区马鹿冬季生境选择. 生态学报, **28** (10): 4619-4628.

刘群秀,马建章,谢绪昌,等. 2007. 黑龙江完达山东部林区偷猎对野生马鹿种群的影. 野生动物, **28** (2): 7-10.

刘群秀. 2006. 黑龙江省完达山林区马鹿种群生存力分析(硕士学位论文). 哈尔滨: 东北林业大学.

刘艳华,张明海. 2007. 基于粪便DNA分析技术的东北马鹿种群遗传学研究. 野生动物, **28** (4): 3-5.

田新民,张明海,罗理扬. 2008. 通过粪便确定野生马鹿性别的试验. 东北林业大学学报, **36** (3): 68-69.

田新民. 2008. 黑龙江省完达山地区马鹿分子生态学初步研究(硕士学位论文). 哈尔滨: 东北林业大学.

田秀华,刘铸,白素英. 2006. 大鸨东方亚种遗传多样性的微卫星分析. 动物学报, **53** (3): 569-574.

魏辅文,饶刚,李明,等. 2001. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望. 兽类学报, **21** (2): 143-152.

吴华,胡杰,万秋红,等. 2008. 梅花鹿的微卫星多态性及种群的遗传结构. 兽类学报, **28** (2): 109-116.

吴海龙. 2006. 黑鹿保护遗传学研究(博士学位论文). 杭州: 浙江大学.

许庆翔,张明海,路秉信. 2000. 黑龙江省野生马鹿种群资源现状研究. 经济动物学报, **4** (1): 57-62.

艳丽,黄炎,张保卫,等. 2006. 卧龙圈养大熊猫遗传多样性现状及预测. 兽类学报, **26** (4): 317-324.

尹君,张明海,谢绪昌. 2007. STR在野生东北马鹿个体识别中的应用. 野生动物, **28** (3): 42-44.

张明海,刘群秀. 2008. 黑龙江省完达山东部林区马鹿冬季环境容纳量估算. 兽类学报, **28** (1): 56-64.

周绍春,张明海,王双玲. 2006. 完达山林区森林采伐和非采伐区马鹿、狍子对冬季生境因子选择的比较. 动物学研究, **27** (6): 575-580.

Ardren WR, Borer S, Thrower F, *et al.* 1999. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Heredity*, **90**: 529-536.

Bellemain E, Swenson JE, Tallmon D. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: Four methods for brown bears. *Conservation Biology*, **19**: 150-161.

David V, Menotti A, Raymond M. 1998. Automated DNA detection with fluorescent technologies. Oxford: IRL Press.

DeYoung RW, Demarais S, Honeycutt RL, *et al.* 2003. Genetic consequences of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) restoration in Mississippi. *Molecular Ecology*, **12**: 3237-3252.

- Fickel J , Reinsch A. 2000. Microsatellite markers for the European roe deer ( *Capreolus capreolus* ). *Molecular Ecology* , **9** : 994–995.
- Goodman SJ , Tamate HB , Wilson R , *et al.* 2001. Bottlenecks , drift and differentiation : The population structure and demographic history of sika deer ( *Cervus nippon* ) in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology* , **11** : 1357–1370.
- Harper GL , Maclean N , Goulson D. 2003. Microsatellite markers to assess the influence of population size , isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular Ecology* , **12** : 3349–3357.
- Hedmark E , Flagstad Ø , Segerström P , *et al.* 2004. DNA-based individual and sex identification from wolverine ( *Gulo gulo* ) faeces and urine. *Conservation Genetics* , **5** : 405–410.
- Höss M , Kohn M , Pääbo S , *et al.* 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* , **359** : 199.
- Kohn MH , York EC , Kamradt DA , *et al.* 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London , Series B* , **266** : 657–663.
- Kuehn R , Schroeder W , Pirchner F , *et al.* 2003. Genetic diversity , gene flow and drift in Bavarian red deer populations ( *Cervus elaphus* ). *Conservation Genetics* , **4** : 157–166.
- Lade JA , Murray ND , Marks CA , *et al.* 1996. Microsatellite differentiation between Philip Island and mainland Australian populations of the red fox ( *Vulpes vulpes* ). *Molecular Ecology* , **5** : 81–87.
- Pemberton JM , Slate J , Bancroft DR , *et al.* 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci : A caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* , **4** : 249–252.
- Smith DA , Hurt A , Adams B , *et al.* 2006. Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Molecular Ecology* , **15** : 387–406.
- Valiere N , Bonenfant C , Toïgo C , *et al.* 2007. Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling : Genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conservation Genetics* , **8** : 69–78.
- Wan QH , Wu H , Fujihara T , *et al.* 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue ? *Electrophoresis* , **25** : 2165–2176.
- Zhan XJ , Li M , Zhang ZJ , *et al.* 2006. Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve. *Current Biology* , **16** : 1–2.

---

作者简介 田新民 ,男 ,1982 年生 ,硕士 ,助教。主要从事野生动物分子生态学方面的研究 ,发表论文 4 篇。E-mail : swxtxm@126.com  
责任编辑 刘丽娟

---