

微卫星分子标记在濒危动物 保护遗传学研究中的应用

黄磊^{1,2} 王义权^{1*}

1(厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

2(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 微卫星 DNA 广泛分布于真核生物基因组中, 具有多态性高、共显性遗传、选择中性、易于操作等特点, 是一种极具应用价值的分子遗传标记。近年来在濒危动物保护遗传学研究中得到越来越多的应用。微卫星 DNA 高度多态性提供的高分辨率遗传信息, 使其不仅适合个体水平的亲子鉴定与交配系统研究, 而且已成为种群遗传结构与多样性分析的有效分子标记。微卫星分析所需的 DNA 量极少, 用非损伤性方法获取的极少量样品或陈旧样品就能用于有效分析, 方便了濒危动物野外调查工作的开展, 并且可以利用年代久远的馆藏历史标本揭示种群的重要历史进程。另外, 某些微卫星 DNA 大小在近缘物种间可相互区分, 这使得部分物种的 DNA 分子鉴别将更为简便。但微卫星分子标记的座位筛选和特异引物开发耗时费力, 一定程度上限制了其广泛应用。针对不同的研究目的选择合适的分子标记方法将有助于更好的揭示问题本质。

关键词: 微卫星 DNA, 濒危动物, 交配系统, 遗传结构, 进化历史

中图分类号: Q16 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2004)05-0528-06

The application of microsatellite DNA markers in conservation genetics of endangered animals

HUANG Lei, WANG Yi-Quan*

1 School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005

2 College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097

Abstract: Microsatellite DNA is widely dispersed in eukaryotic genomes with the characters of high polymorphism, high abundance, codominance, selective neutrality, and easy manipulation. Therefore, it has been increasingly applied to studies of conservation genetics of endangered animals in recent years. The polymorphism of microsatellite DNA is so high that it can provide excellent resolution not only for kinship and mating system studies at the individual level, but also for genetic structure research at the population level. The DNA template needed for microsatellite analysis is very low and has no special demands, so that small samples obtained with noninvasive method and from old specimen can be analyzed effectively. Therefore, the approach not only makes investigation of endangered animals surviving in the wild more convenient and exact, but also can make use of the rare specimens preserved in museums to reveal important evolutionary history for some species. Furthermore, some microsatellite fragments' sizes can be discriminated among related species, which makes it possible to identify species more conveniently with only fragment analysis. However, application of microsatellite DNA markers also has its own shortcomings, and appropriate molecular makers should be adopted for a given issue according to different research purposes.

Key words: microsatellite DNA, endangered animals, mating system, genetic structure, evolutionary history

微卫星 DNA (microsatellite DNA), 又称简单重复序列 (simple sequence repeats , SSR) 或短串联重复序列 (short tandem repeats , STR) , 广泛分布于真核生物的基因组中。重复单元数目差异及重复程度不同可造成微卫星 DNA 片段长度的差异 (Ashley & Dow , 1994) , 正是这种差异使得同一基因座位在特定物种的群体中能有很多等位基因 , 呈现出较高的多态性。另一方面 , 微卫星 DNA 等位基因间的多态性一般仅在重复单元数目上有差异 , 而微卫星 DNA 两侧 , 即重复单元的两翼序列却通常较保守。因而在某一微卫星等位基因被分离鉴定后 , 可根据其侧翼保守序列的信息来设计该微卫星座位特异的寡核苷酸引物 , 用 PCR 技术对该基因座位的所有等位基因实施扩增 , 得到含不同重复单元数目的等位基因片段 , 再经电泳分离 , 通过比较扩增片段长短的差异 , 来检测群体中该基因座位上等位基因的多样性和在种群内的分布。虽然目前对微卫星 DNA 在生物体内的作用和进化的机制尚不十分清楚 , 但由于其多态性高、共显性遗传、选择中性、易于操作等优点 , 自发现以后 (Tautz , 1989 ; Weber & May , 1989) , 很快发展为一种极具价值的遗传标记 , 并广泛应用于个体间亲缘关系鉴定、种群遗传分析、遗传疾病诊断、基因定位、遗传作图等研究领域 (张云武等 , 2001) 。近年来 , 随着对濒危动物保护遗传学研究的日益重视和加强 , 微卫星分子标记在该领域也得到越来越多的应用。本文主要就微卫星分子标记在濒危动物遗传保护工作中的亲子鉴定与交配系统研究、种群遗传结构分析、辅助种群调查、物种进化历史揭示等方面的应用进行介绍。

1 亲子鉴定及交配系统研究

许多濒危动物在野外生存的个体数量已相当稀少 , 为保护这些珍稀物种不至于灭绝 , 对其进行人工饲养和繁殖是一种有效的途径。但实行人工繁殖后面临的新问题是种群过小所导致的近交衰退。为避免后代中可能存在的近亲交配 , 建立可靠的遗传谱系和制定科学的繁殖策略 , 需要确定那些未知的亲子关系 (张亚平等 , 1995) 。另一方面 , 由于许多动物中存在复杂的繁殖策略 , 对交配系统的研究将有助于遗传资源保护工作的有效开展。微卫星高度的变异性使其在一个座位上可形成很多个等位基因 , 在群体中表现出丰富的多态性 , 使得多个微卫星座

位上的基因型在两个同种个体间几乎不可能相同 (同卵双生除外) 。而真核生物基因组中众多的微卫星座位则可为研究者提供高分辨率的遗传信息 (Jarne & Lagoda , 1996) , 因而微卫星十分适用于个体水平的亲子鉴定与交配系统等研究。

张亚平等 (1995) 用筛选的 10 个微卫星座位成功地对大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 进行了亲子鉴定 , 并澄清了 2 组未知的父子关系 , 为饲养大熊猫遗传谱系的建立奠定了基础 ; 张于光等 (2003) 用家猫 (*Felis catus*) 和苏门答腊虎 (*Panthera tigris sumatrae*) 的 10 对微卫星引物鉴定了东北虎 (*Panthera tigris sibirica*) 中 7 个父子关系不清的后代 , 发现多雄一雌的交配中 , 主要还是那些繁殖力较强的雄兽在起作用 , 这一结果为日后制定科学的繁殖策略提供了可靠依据。Davis 等 (2001) 用 5 个微卫星座位对 22 头雌性密河鳄 (*Alligator mississippiensis*) 及巢中的卵进行基因分型 , 发现卵与守巢雌鳄的基因型相符合 , 但存在一雌多雄及一雄多雌的多重繁殖现象。Crim 等 (2002) 在对棱皮龟 (*Dermochelys coriacea*) 的研究中也发现少量一雌多雄及一雄多雌的繁殖现象 , 推测其作为一种繁殖策略 , 可增加后代的遗传多样性和适应能力 , 并增加了有效种群的大小 (Sugg & Chesser , 1994) 。然而 , 目前还有许多人工繁殖的濒危野生动物在这方面仍缺乏研究 , 如我国的扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 、朱鹮 (*Crested ibis*) 等。

2 种群遗传结构分析

遗传结构及其影响因素的研究是探讨生物适应意义、物种形成及进化机制的基础 , 同时也是保护生物学研究的核心之一 (盛岩等 , 2002) 。微卫星 DNA 因其所具有的特点 , 现已成为种群遗传结构研究中最有效的分子标记之一。

濒危动物多是典型的小种群 , 易发生遗传漂变而导致多样性丢失 , 因此濒危动物保护的关键是保护物种的遗传多样性或进化潜力 , 制定切实有效的保护策略必须建立在对濒危物种遗传多样性充分了解的基础上。黄磊和王义权 (2004) 用 8 个微卫星座位对扬子鳄野生对照群体、宣州 F_1 代与 F_2 代饲养群体共 39 个个体进行了研究 , 结果显示扬子鳄野生群体与饲养群体无明显的遗传差异 , 应作为一个整体进行保护 , 两者的遗传多样性都明显偏低且水平相当 , 由此推测目前扬子鳄饲养种群遗传多样性

贫乏的主要原因是近数十年来野生种群的严重衰退,而奠基者效应对饲养种群的遗传多样性并无明显影响。Anna 和 Eric (2001) 用 10 个微卫星座位对南非境内非洲象 (*Loxodonta africana africana*) 研究发现, Addo 种群因受到瓶颈效应以及随后的遗传漂变作用的严重影响, 目前遗传多样性水平已很低; 而 Kruger 种群在经历瓶颈之后个体数量恢复较快, 且与其他种群有较明显的基因交流, 其多样性水平相对较高, 但仍低于乌干达境内的非洲象种群。北大西洋的露脊鲸 (*Eubalaena glacialis*) 种群数量已由 11 世纪的 12 000 头降至本世纪的约 300 头, Waldick 等 (2002) 用 13 个微卫星座位对其研究发现, 现有露脊鲸的遗传多样性水平明显低于其近缘物种 *Eubalaena australis* 稀有的低频等位基因暗示该种群的遗传变异性一直在减少。

地理与生态障碍能够限制种群间基因流动并导致种内遗传多样性水平下降, 而合适的栖息地将有利于新等位基因的扩散。对于那些呈数个群体分布的濒危动物, 各群体间的遗传多样性程度可能随遗传漂变而不同, 并受群体大小和栖息地容量的影响 (Hébert *et al.*, 2000)。因此了解遗传多样性在时间和空间上的分布及其原因, 并确定相应的进化显著单元 (evolution significant unit, ESU), 对濒危动物的保护有着重要意义。

微卫星作为一种高度多态性的分子标记, 能够有效地用于物种系统地理研究中趋异尺度的衡量和种群分化的研究 (Koskinen *et al.*, 2002)。Davis 等 (2002) 用 8 个微卫星座位对密河鳄研究发现, 佛罗里达和乔治亚南部的 6 个群体遗传差异很小, 德克萨斯和路易斯安那的 6 个群体也无明显差异, 分别被定义为 FL/GA 和 TX/LA 种群; 将二者与南卡罗来那及阿拉巴马的密河鳄比较, 三者表现出较明显的遗传分化, 支持北美地区密河鳄呈东西向地理分化的观点。Ciofi 和 Bruford (1999) 用 10 个微卫星座位对科莫多巨蜥 (*Varanus komodoensis*) 研究发现, 不同种群间表现出明显的遗传分化, Rinca 与 Flores 岛上的种群都保持了较高的遗传多样性, 二者虽有地理隔离, 但具有很高的遗传相似性, 并伴有基因流; Komodo 岛上的种群则表现出明显的遗传分化, 特殊的等位基因使其在该物种的遗传多样性保持中显得十分重要; 而 Gili Motang 岛上的种群较小, 低水平的基因交流与遗传变异使其易受随机因素的影响。

Koskinen 等 (2002) 用 17 个微卫星座位对欧洲河鱒 (*Thymallus thymallus*) 进行了系统地理分析, 发现北欧的河鱒来自 2 个不同的更新世生物种避难所 (pleistocene refugia), 将分布于瑞典、挪威、丹麦、德国以及斯洛文尼亚的河鱒归为一群; 而分布于欧洲西北部及中部的河鱒可能源于其南部祖先; 两种种群间存在明显的遗传分化, 暗示虽有水文地理的联系, 但两个种群间可能已存在生殖隔离。

3 辅助种群调查

掌握濒危动物野生种群的个体数量、性别比例以及某些大型动物的个体活动范围等数据, 对保护工作的开展有着实际意义。但某些动物具有特殊生活习性或栖息地特征, 传统的调查方法常难以奏效; 而基于 PCR 特异扩增原理的微卫星分析所需的模板 DNA 量极少, 对间接采集得到的某些动物样品如毛发、粪便等也可进行有效分析, 在获得足够信息的情况下可以区分每一个体, 这就使得调查工作更加便捷和准确。

Taberlet 等 (1997) 用微卫星分子标记对比利牛斯棕熊 (*Ursus arctos*) 的粪便进行了严格分析, 并结合野外观察发现, 现有种群由 3 只成年雄性、1 只雌性个体及 1 只幼仔组成, 推测该群体数量若不及时补充很可能灭绝, 而人为引入雌性个体对现有遗传资源的保护及多样性的增加将有积极意义。澳洲北部的毛鼻袋熊 (*Lasiorhinus krefftii*) 由于营洞穴生活及夜行性特点, 对其繁殖及分布状况了解甚少。Taylor 等 (1997) 用 12 个微卫星座位对目前仅知的一个种群进行了研究, 并得到其中 58 个个体的微卫星数据, 发现该种群中的同性个体间的亲缘关系较异性间更为密切, 因此推测该种群中发生近交的几率较小。类似的微卫星分子标记技术辅助野生种群的调查, 对定性和定量分析种群大小, 制定科学有效的保护方案是十分有益的。

4 种群动态和物种进化历史揭示

有效种群大小受到种群个体数量的影响, 种群大小的剧烈变化将导致遗传结构的迅速改变, 如果忽略这些过程, 将使我们对种群现有遗传结构及种群进化过程产生错误的理解 (Estoup & Anges, 1998)。同时, 有效种群大小决定了种群内的遗传多样性水平, 确定不同条件下的有效种群大小, 对防

止近亲繁殖和保持种群遗传多样性将有一定的意义 (Simberloff *et al.*, 1988)。有效种群大小的波动表现为遗传变异量和等位基因频率的改变(盛岩等, 2002)。微卫星序列一般较短,即使已部分降解的 DNA 样品,也能作为模板用于微卫星片段的扩增,并具有很好的重复性,使得微卫星标记可以从年代久远的馆藏的历史标本中获取相应 DNA 中的遗传信息。通过分析这些陈旧 DNA 并与现存种群的遗传组成比较,有助于推测种群历史上经历过的变动或预测将来的种群动态变化,以及揭示种群的重要历史进程 (Rooney *et al.*, 1999)。

弓头鲸 (*Balaena mysticetus*) 的白令海峡-楚克奇-波弗特海种群曾一度因捕猎而数量剧减,有人推测其遗传多样性也因此大量丧失。Rooney 等 (1999) 通过对 20 个微卫星座位分析却发现,该种群遗传多样性水平与有效种群大小普遍较高,杂合度过度 (heterozygosity excess) 检验和等位基因频率分布 (allele frequency distribution) 检验也提示这一种群在近期内受到过瓶颈效应影响的可能性很小。黑足雪貂 (*Mustela nigripes*) 在 20 世纪经历了明显的瓶颈效应, Wisely 等 (2002) 用 24 个微卫星座位对其在瓶颈效应之前的 2 个历史种群及正经历瓶颈效应的 1 个种群比较研究发现, 3 个种群已表现出较明显的遗传分化, 正经历瓶颈效应的黑足雪貂种群遗传多样性水平要低于其近缘物种西伯利亚臭鼬 (*Mustela eversmanni*) ; 分化明显的多个种群之中发生局部种群灭绝, 以及剩余种群受到瓶颈效应的影响, 可能是黑足雪貂遗传多样性降低的主要原因。

5 近缘物种及杂交个体鉴别

某些近缘物种及种间杂交个体在形态上十分相似, 给分类鉴定工作带来了困难。通过使用一些分子遗传学手段如 DNA 分子标记技术, 能提高鉴定的准确性 (王义权等, 1998, 1999)。某些微卫星 DNA 大小在近缘物种间可相互区分, 这使得部分物种的 DNA 分子鉴定更为简便 (Valsecchi *et al.*, 1996)。

暹罗鳄 (*Crocodylus siamensis*) 是淡水鳄中十分濒危的一种, 将人工饲养的部分暹罗鳄进行野外放归是目前遗传保护工作的一项重要任务。但目前许多饲养群体中存在暹罗鳄与古巴鳄 (*C. rhombifer*) 及湾鳄 (*C. porosus*) 的种间杂交, 且杂交后代在形态上难以区分。Fitzsimmons 等 (2002) 用微卫星标记

结合 mtDNA 分析对 103 只暹罗鳄、古巴鳄及湾鳄个体进行研究, 成功鉴定出 4 个种间杂交个体, 发现其中 2 个最初的形态鉴定有误, 有 1 个险些作为纯种暹罗鳄准备野放。这一发现有效地避免了种间杂交个体对野放群体中暹罗鳄种质的影响。

6 结语

微卫星分子标记因其众多优点而在濒危动物遗传保护研究中得到越来越多的应用, 并极大地提高了保护工作的有效性。但是微卫星分子标记在使用上仍有其不足之处。微卫星分子标记是基于基因组中特定座位的 PCR 扩增分析, 虽然有研究发现微卫星 DNA 侧翼序列在近缘物种间具有一定的保守性 (Moore *et al.*, 1991; Primmer *et al.*, 1996), 然而对一些珍稀物种, 在缺乏相关近缘物种微卫星序列信息参考的情况下, 仍需要进行微卫星座位的筛选和特异引物的开发, 工作繁琐且耗时费力, 限制了其广泛应用。相比之下, 同样基于 PCR 原理的 RAPD 分子标记技术, 可以在对研究对象的遗传信息并不了解的情况下, 使用一套通用的寡核苷酸引物进行快速简便的多座位分析。Wu 等 (2002) 用 RAPD 分子标记对 2 个独立的扬子鳄饲养群体进行了研究, 发现二者的遗传多样性水平都非常低, 但并未表现出明显的分化差异。

不过 RAPD 易受实验条件影响, 重复性较差, 而 AFLP 分子标记技术集中了 RFLP 与 RAPD 两种标记的优点, 也可在不预先知道基因组信息的情况下, 仅需极少量较好的 DNA 样品即可用于分析, 而且实验结果较稳定可靠。虽然与 RAPD 同为显性标记, 但 AFLP 一次实验可以快速获得多至数百个座位的遗传信息, 并具有较强的多态性分辨能力, 一定程度上弥补了作为显性标记的不足。近年来 AFLP 在植物与农作物研究中已得到广泛应用, 但在动物保护研究中的应用还较少 (李珊和赵桂仿, 2003; 朱伟铨和王义权, 2003)。

此外, 呈母系遗传的线粒体 DNA (mitochondrial DNA) 因在配子形成过程中没有重组和较高的变异性, 其序列多态性分析也已成为保护生物学研究的重要手段, 特别是 mtDNA 控制区 (D-loop) 的进化速率是其他区段的 5 倍 (Cann *et al.*, 1984), 是遗传多样性研究中十分有效的分子标记, 已广泛用于濒危物种的遗传管理与保护、种群结构和进化历史分析

等方面的研究(王静波等, 2001)。

影响种群遗传结构的因素在不同遗传座位的作用不尽相同,如基因流和遗传漂变对遗传座位的作用相同,而选择、突变、遗传模式等对每个座位的影响均不同(盛岩等, 2002),因此在相关研究所用微卫星座位数目有限的情况下,微卫星分子标记的使用效果可能受到影响,而采用几种分子标记进行研究将可以评价不同的因素对遗传结构的影响及程度,同时还能从多个层次反映种群的遗传特征。

随着实验技术的不断改进(Kandpal *et al.*, 1994; Paetkau, 1999)和统计分析方法的发展,微卫星分子标记在使用上也必将日趋便捷和完善。可以预见,微卫星分子标记在以后的濒危动物遗传保护研究中发挥的作用将更加明显。但需要指出的是,针对不同的研究目的选择合适的研究方法,从不同层次进行多方面的探索,才有助于更好地揭示问题的本质。

参考文献

- Anna, M. W. and Eric, H. H. 2001. Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **10**: 2139 – 2149.
- Ashley, M. V. and Dow, B. D. 1994. The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. In: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and DeSell, R. (eds.), *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 185 – 201.
- Cann, R. L., Brown, W. M. and Wilson, A. C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, **106**: 479 – 499.
- Ciofi, C. and Bruford, M. W. 1999. Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology*, **8**: S17 – S30.
- Crim, J. L., Spotila, L. D., Spotila, J. R., O'Connor, M., Reina, R., Williams, C. J. and Paladino, F. V. 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and eolygyny. *Molecular Ecology*, **11**: 2097 – 2106.
- Davis, L. M., Glenn, T. C., Elsey, R. M., Dessauer, H. C. and Sawyer, R. H. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Molecular Ecology*, **10**: 1011 – 1024.
- Davis, L. M., Glenn, T. C., Strickland, D. C., Guillette, L. J., Elsey, R. M., Rhodes, W. E., Dessauer, H. C. and Sawyer, R. H. 2002. Microsatellite DNA analyses support an east-west phylogeographic split of American alligator populations. *Journal of Experimental Zoology*, **294**: 352 – 372.
- Estoup, A. and Angès, B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: Carvalho, G. R. (ed.), *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, Amsterdam, 55 – 86.
- Fitzsimmons, N. N., Buchan, J., Lam, P. V., Polet, G., Hung, T., Thang, N. Q. and Gratten, J. 2002. Identification of purebred *Crocodylus siamensis* for reintroduction in Vietnam. *Journal of Experimental Zoology*, **294**: 373 – 381.
- Huang, L. (黄磊) and Wang, Y. Q. (王义权). 2004. SSR polymorphism of *Alligator sinensis* and conservation strategy of genetic diversity. *Acta Genetica Sinica (遗传学报)*, **31**: 143 – 150. (in Chinese with English abstract)
- Hébert, C., Danzman, R. G., Jones, M. W. and Bernatchez, L. 2000. Hydrography and population genetic structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Mitchell) from eastern Canada. *Molecular Ecology*, **9**: 971 – 982.
- Jarne, P. and Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**: 424 – 429.
- Kandpal, R. P., Kandpal, G. and Weissman, S. M. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA*, **91**: 88 – 92.
- Koskinen, M. T., Nilsson, J., Veselov, A. J., Potutkin, A. G., Ranta, E. and Primmer, C. R. 2002. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity*, **88**: 391 – 401.
- Li, S. (李珊) and Zhao, G. F. (赵桂仿). 2003. AFLP molecular marker and its application. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报)*, **23**: 830 – 836. (in Chinese with English abstract)
- Moore, S. S., Sergeant, L. L. and King, T. J. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, **10**: 654 – 660.
- Paetkau, D. 1999. Microsatellites obtained using strand extension: an enrichment protocol. *Biotechniques*, **26**: 690 – 697.
- Primmer, C. R., Møller, A. P. and Ellegren, H. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, **5**: 365 – 378.

- Rooney, A. P., Honeycutt, R. L., Davis, S. K. and Derr, J. N. 1999. Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whale from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria. *Journal of Molecular Evolution*, **49**: 682 – 690.
- Sheng, Y. (盛岩), Zheng, W. H. (郑蔚虹), Pei, K. Q. (裴克全) and Ma, K. P. (马克平). 2002. Applications of microsatellites in population biology. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), **26**: 119 – 126. (in Chinese with English abstract)
- Simberloff, D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **19**: 473 – 511.
- Sugg, D. W. and Chesser, R. K. 1994. Effective population size with multiple paternity. *Genetics*, **137**: 1147 – 1155.
- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hannon, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. and Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, **6**: 869 – 876.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, **17**: 6463 – 6471.
- Taylor, A. C., Horsup, A., Johnson, C. N., Sunnucks, P. and Sherwin, B. 1997. Relatedness structure detected by microsatellite analysis and attempted pedigree reconstruction in an endangered marsupial, the northern hairy-nosed wombat (*Lasiorninus krefftii*). *Molecular Ecology*, **6**: 9 – 19.
- Valsecchi, E. and Amos, W. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean population. *Molecular Ecology*, **5**: 151 – 156.
- Waldick, R. C., Kraus, S., Brown, M. and White, B. N. 2002. Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, **11**: 2241 – 2249.
- Wang, J. B. (王静波), Hu, C. L. (胡长龙) and Xu, H. F. (徐宏发). 2001. Applications of mitochondrial DNA variability analysis in zoological conservation biology. *Biodiversity Science* (生物多样性), **9**: 181 – 187. (in Chinese with English abstract)
- Wang, Y. Q. (王义权), Zhou, K. Y. (周开亚), Xu, L. S. (徐珞珊) and Xu, G. J. (徐国钧). 1998. Sequencing of Cytb gene fragments and PCR identification of “JingQian-BaiHuaSe” (*Bungarus parvus*) and its adulterants. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报), **33**: 941 – 947. (in Chinese with English abstract)
- Wang, Y. Q. (王义权), Zhou, K. Y. (周开亚), Xu, L. S. (徐珞珊) and Xu, G. J. (徐国钧). 1999. Authentication of the Chinese crude drug “WuShaoShe” (*Zoocys dhumnades*) and its substitutes by DNA sequence analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报), **34**: 67 – 71. (in Chinese with English abstract)
- Weber, J. L. and May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 388 – 396.
- Wisely, S. M., Buskirk, S. W., Fleming, M. A., McDonald, D. B. and Ostrander, E. A. 2002. Genetic diversity and fitness in black-footed ferrets before and during a bottleneck. *Journal of Heredity*, **93**: 231 – 237.
- Wu, X. B., Wang Y. Q., Zhou, K. Y., Zhu, W. Q., Nie, J. S., Wang, C. L. and Xie, W. S. 2002. Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biological Conservation*, **106**: 435 – 441.
- Zhang, Y. G. (张于光), Li, D. Q. (李迪强), Rao, L. Q. (饶力群), Xiao, Q. M. (肖启明) and Liu, D. (刘丹). 2003. Identification of polymorphic microsatellite DNA loci and paternity testing of Amur tigers. *Acta Zoologica Sinica* (动物学报), **49**: 118 – 123. (in Chinese with English abstract)
- Zhang, Y. P. (张亚平), Wang, W. (王文), Su, B. (宿兵), Ryder, O. A., Fan, Z. Y. (范志勇), Zhang, H. M. (张和民) and He, T. M. (何廷美). 1995. Microsatellite DNAs and kinship identification of giant panda. *Zoological Research* (动物学研究), **16**: 301 – 306. (in Chinese with English abstract)
- Zhang, Y. W. (张云武) and Zhang, Y. P. (张亚平). 2001. Microsatellites and its application. *Zoological Research* (动物学研究), **22**: 315 – 320. (in Chinese with English abstract)
- Zhu, W. Q. (朱伟铨) and Wang, Y. Q. (王义权). 2003. AFLP and its application in zoological research. *Chinese Journal of Zoology* (动物学杂志), **38**(2): 101 – 107. (in Chinese with English abstract)