

大熊猫等 8 种野生哺乳动物蛔虫的线粒体 COX I 和 COX II 基因的亲缘关系分析

牛李丽¹, 陈世界², 汪涛³, 古小彬³, 严玉宝², 余华², 邓家波¹, 严慧娟¹, 余星明¹,
陈维刚¹, 王淑贤³, 杨光友^{3*}

(1. 成都动物园, 成都 610041; 2. 四川出入境检验检疫局, 成都 610041;

3. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘要: 为了探讨寄生于大熊猫、小熊猫、北极熊、棕熊东北亚种、棕熊西藏亚种、黑熊四川亚种、黑猩猩和白眉长臂猿体内蛔虫的分类地位, 采用 PCR 技术扩增了这些野生动物体内寄生蛔虫的线粒体 COX I、COX II 基因序列, 并与 GenBank 中注册的同源性序列进行了分析。序列分析结果显示: 扩增的 8 种野生哺乳动物蛔虫的 COX I、COX II 基因长度均分别为 393 和 582 bp, 其中大熊猫与小熊猫及 4 种熊科动物蛔虫 COX I 和 COX II 基因的相似性分别为 94.8%~95.0% 和 94.9%~95.5%; 黑猩猩和白眉长臂猿蛔虫的 COX I、COX II 基因的相似性分别为 99.8% 和 99.5%。分子系统树(NJ/MP/ML)表明, 寄生在大熊猫、小熊猫和 4 种熊科动物体内的蛔虫均为贝蛔属(*Baylisascaris*)蛔虫; 而黑猩猩和白眉长臂猿体内寄生的蛔虫应为蛔属(*Ascaris*)蛔虫。同时, 分析结果也揭示了蛔虫与宿主之间存在协同进化关系。

关键词: 大熊猫; 野生哺乳动物; 蛔虫; 线粒体; COX I; COX II; 亲缘关系

中图分类号: S852.73

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)10-1645-06

Genetic Relationship of Ascarid Nematodes from Giant Panda and Seven Other Species of Captive Wild Mammals Based on COX I and COX II Genes

NIU Li-li¹, CHEN Shi-jie², WANG Tao³, GU Xiao-bin³, YAN Yu-bao², YU Hua², DENG Jia-bo¹,
YAN Hui-juan¹, YU Xing-ming¹, CHEN Wei-gang¹, WANG Shu-xian³, YANG Guang-you^{3*}

(1. Chengdu Zoological Garden, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu 610041, China; 3. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the taxonomic relationships of ascarid nematodes from *Ailuropoda melanoleuca*, *Ailurus fulgens*, *Ursus maritimus*, *Ursus arctos pruinosus*, *Ursus thibetanus mupinensis*, *Ursus arctos lasiotus*, *Pan troglodytes* and *Hylobates hoolock*. The mitochondrial cytochrome oxidase subunits I (COX I) and II (COX II) were amplified by PCR and sequenced directly. Then, sequence analyses was carried out based on COX I and COX II sequences from ascarid nematodes acquired in our study and 12 homologous sequences from GenBank. The lengths of COX I and COX II in ascarid nematodes from the eight species of captive animals were all 393 bp and 582 bp, respectively. The COX I and COX II of ascarid nematodes from giant panda shared 94.8%-95.0% and 94.9%-95.5% sequence identity with these from *A. fulgens*, *U. maritimus*, *U. arctos pruinosus*, *U. thibetanus mupinensis* and *U. arctos*

收稿日期: 2012-03-21

基金项目: 成都大熊猫繁育研究基金项目(CPF-08005); 科技部公益项目(200910188); 国家质检总局项目(2010IK004)

作者简介: 牛李丽(1962-), 女, 山东淄博人, 学士, 高级兽医师, 从事野生动物疾病临床诊疗与研究, E-mail: niulilu621@yahoo.com.cn; 陈世界为同等贡献的第一作者

* 通讯作者: 杨光友, 教授, 博导, 主要从事动物寄生虫病学研究, E-mail: guangyou1963@yahoo.com.cn

lasiotus, respectively. Additionally, the COX I and COX II genes of ascarid nematodes from *P. troglodytes* shared 99.8% and 99.5% identity with the nematodes from *H. hooloc*, respectively. Phylogenetic analysis showed that ascarid nematodes from *A. melanoleuca*, *A. fulgens* and four Ursids species belonged to the genus *Baylisascaris*, while roundworms from *H. hoolock* and *P. troglodytes* clustered under the genus *Ascaris*. These results showed that a co-evolutionary relationship may link the ascarid nematodes and their corresponding hosts together.

Key words: giant panda; wild mammals; ascarid nematodes; mitochondria; cytochrome oxidase subunit I (COX I); cytochrome oxidase subunit II (COX II); genetic relationship

蛔虫是野生哺乳动物体内最常见的一类肠道寄生虫,可导致宿主出现停食、呕吐、腹泻、消瘦、肠道梗阻,甚至死亡。对这些动物蛔虫进行准确的分类鉴定是开展蛔虫病诊断及防控等工作的基础。传统的虫种鉴定主要依赖于形态学和生物学特征,但它们存在较大的局限性,如对幼虫或虫卵不能准确地识别等^[1]。此外,传统的形态学分类方法也很难准确地反映出各宿主体内蛔虫的真实种群关系。随着分子生物学技术的快速发展,寄生虫种类鉴定、群体遗传和系统发育等方面的研究也取得了巨大的进步。线粒体 DNA 作为胞核外遗传物质具有相对分子质量小、结构简单、进化速度快、母性遗传和无组织特异性等特点,是研究寄生虫分子分类、群体遗传和系统进化的一种良好的分子标记^[2-5]。目前,对寄生于大熊猫、小熊猫等动物体内寄生蛔虫的种类与分类地位尚存在一定的争议。为了探讨大熊猫等 8 种野生哺乳动物体内蛔虫的种类与分类地位,本研究对采自大熊猫等 8 种野生动物体内蛔虫的线粒体 COX I、COX II 基因进行了扩增和序列分析,旨在给以形态学为基础的传统分类提供分子水平的佐证。

1 材料与方法

1.1 蛔虫样品

采集自四川某动物园圈养大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*)、小熊猫 (*Ailurus fulgens*)、北极熊 (*Ursus maritimus*)、棕熊西藏亚种 (*Ursus arctos pruinosus*)、黑熊四川亚种 (*Ursus thibetanus*)、棕熊东北亚种 (*Ursus arctos*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 和白眉长臂猿 (*Hylobates hoolock*) 共 8 种动物的蛔虫,参照有关资料对这些样本进行形态学鉴定后^[6-11],保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 虫体总 DNA 的提取

分别剪取各蛔虫成虫约 0.1 g 至研钵研磨,加

入 $270\text{ }\mu\text{L}$ $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 SDS 裂解液和 $30\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 蛋白酶 K, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中消化 24 h。虫体悬液用酚/酚-氯仿 (1:1)/氯仿-异戊醇 (24:1) 提取虫体总 DNA,乙醇沉淀,TE 溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 蛔虫 COX I 和 COX II 基因 PCR 扩增及测序

根据已报道的蛔虫 COX I^[12-13] 和 COX II^[14] 基因序列设计引物,引物序列如下:COX I 引物:P1, $5'\text{-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3}'$; P2, $5'\text{-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3}'$ 。COX II 引物:P3: $5'\text{-CACCAACTCTTAAAAT-TATC-3}'$, P4: $5'\text{-TTTTCTAGT TATATAGATT-GRTTTYAT-3}'$ 。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

扩增体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$: $2\times\text{ Taq PCR MasterMix}$, $25\text{ }\mu\text{L}$; DNA, $2\text{ }\mu\text{L}$; ddH₂O, $21\text{ }\mu\text{L}$; 引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (扩增 COX I) 或 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (扩增 COX II) 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 30 个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳,用紫外透射仪观察结果并拍照。回收纯化 PCR 产物后送大连宝生物工程有限公司测序。

1.4 数据处理

在 GenBank 中搜索其他动物蛔虫的 COX I 和 COX II 基因序列 (表 1)。所有序列使用 BioEdit (Version 6. 0. 7) 进行人工辅助校对,采用 MegAlign 软件中的 ClustalV 方法比较获得 COX I 和 COX II 基因序列间的相似性。

分别以猫弓首蛔虫 (*Toxocara cati*) (AJ920057) 和侏鸬鹚小头对盲囊线虫 (*Contracaecum microcephalum*) (EF513517) 作为系统发育分析的外类群,利用 MEGA4. 0 软件分析其碱基组成及序列变异性,并在默认参数下构建 NJ 树,进行 1 000 次循环检验;使用 PAUP * 4. 010b 软件和启

发式搜索 (Heuristic search), 采用二等分再连接 (TBR) 方法构建 MP 树, 并进行 1 000 次自引导法检验; 利用 PHYLML v. 3. 0. 1 软件, 采用 SPR 法,

以 NJ 树作为引导树, 构建 ML 树, 并进行重复 1 000 次自引导法检验。

表 1 从 GenBank 中选取的用于 COX I 和 COX II 基因分析比较的序列

Table 1 The relative information of COX I and COX II gene sequences from GenBank used for sequence analysis

虫种名 Species	宿主 Host	采集地 Location	登录号/来源 GenBank accession No./References	
			COX I	COX II
<i>Baylisascaris schroederi</i>	大熊猫	中国	EU628682/本次测定	FJ890506/本次测定
	北极熊	中国	EU628683/本次测定	FJ890507/本次测定
	棕熊西藏亚种	中国	EU628684/本次测定	FJ890512/本次测定
<i>B. transfuga</i>	棕熊东北亚种	中国	EU628685/本次测定	FJ890513/本次测定
	黑熊四川亚种	中国	EU740387/本次测定	FJ890511/本次测定
	美洲黑熊	美国		AF179909/Nadler, <i>et al</i>
<i>B. columnaris</i>	獾	美国		FJ357429/ Dangoudoubiyam, <i>et al</i>
<i>B. procyonis</i>	浣熊	美国		AF179908/ Nadler, <i>et al</i>
<i>B. ailuri</i>	小熊猫	中国	EU628686/本次测定	FJ890508/本次测定
<i>Ascaris sp.</i>	黑猩猩	中国	EU628688/本次测定	FJ890509/本次测定
<i>Ascaris sp.</i>	白眉长臂猿	中国	EU628687/本次测定	FJ890510/本次测定
<i>A. suum</i>	猪	日本	X54253/Okimoto, <i>et al</i>	X54253/Okimoto, <i>et al</i>
<i>A. lumbricoides</i>	人	中国	AJ968324/Peng, <i>et al</i>	
		美国		AF179907/Nadler, <i>et al</i>
<i>Toxocara cati</i>	猫	英国	AJ920057/ Li, <i>et al</i>	
<i>T. tanuki</i>	狸	日本	AB1446546/Sato, <i>et al</i>	
<i>T. malaysiensis</i>	猫	中国广州	AJ920058/Li, <i>et al</i>	
		中国湖南		AM412316/Li, <i>et al</i>
<i>Anisakis simplex</i>		韩国	AY994157/Kim, <i>et al</i>	
<i>Contraecum microcephalum</i>	侏鸬鹚	意大利		EF513517/Mattiucci, <i>et al</i>

2 结果

2.1 大熊猫等 8 种野生哺乳动物蛔虫线粒体 COX I 基因序列的碱基组成、相似性和分歧度

大熊猫、小熊猫和 4 种熊科动物蛔虫的 COX I 基因序列长度均为 393 bp, 包含 351 个保守位点和 42 个变异位点, 其 A、T、C、G 含量分别为 17.8%~19.1%、46.3%~47.8%、9.4%~10.2% 和 23.2%~26.2%; 转换/颠换之比平均为 20.0。相似性分析发现大熊猫与小熊猫及 4 种熊科动物蛔虫 COX

I 基因的序列相似性为 94.8%~95.0%, 而小熊猫、北极熊、棕熊西藏亚种、棕熊东北亚种和黑熊四川亚种寄生蛔虫的 COX I 基因序列之间的相似性却很高, 其值为 99.8%~100.0%。分歧度方面, 大熊猫与小熊猫及 4 种熊科动物蛔虫 COX I 基因序列的分歧度为 5.2~5.5, 而小熊猫、棕熊西藏亚种、棕熊东北亚种和黑熊四川亚种寄生蛔虫 COX I 基因序列之间的分歧度较小, 仅为 0.0~0.2。

黑猩猩和白眉长臂猿蛔虫 COX I 基因序列长度也均为 393 bp, 包含 392 个保守位点, 其 A、T、C、

G 的平均含量分别为 19.1%、47.7%、10.1% 和 23.2%；其中 C-G 转换值为 1，而其余转换值均为 0。黑猩猩和白眉长臂猿寄生蛔虫 COX I 基因的序列相似性为 99.8%，分歧度为 0.2。

2.2 大熊猫等 8 种野生哺乳动物蛔虫线粒体 COX II 基因序列的碱基组成、相似性和分歧度

大熊猫、小熊猫和 4 种熊科动物蛔虫的 COX II 基因序列长度均为 582 bp，包含 568 个保守位点和 14 个变异位点，其 A、T、C、G 含量分别为 18.4%~18.7%、43.5%~44.2%、9.6%~10.3% 和 27.3%~27.8%；转换/颠换之比平均为 5.3。相似性分析发现大熊猫与小熊猫及 4 种熊科动物蛔虫 COX II 基因的序列相似性为 94.9%~95.5%，而小熊猫、北极熊、棕熊西藏亚种、棕熊东北亚种和黑熊四川亚种寄生蛔虫的 COX II 基因序列之间的相似性却很高，其值为 96.9%~100.0%。从分歧度来看，大熊猫与小熊猫及 4 种熊科动物蛔虫 COX II 基因序列的分歧度为 4.6~5.4，而小熊猫、棕熊西藏亚种、棕

熊东北亚种和黑熊四川亚种寄生蛔虫 COX II 基因序列之间的分歧度则较小，仅为 0.0~3.2。

黑猩猩和白眉长臂猿蛔虫 COX II 基因序列长度也均为 582 bp。整个序列包含 579 个保守位点，其 A、T、C、G 的平均含量分别为 20.9%、46.2%、9.6% 和 23.3%；其中 A-G 转换值为 2，G-A 转换值为 1，而其余转换值均为 0。黑猩猩和白眉长臂猿寄生蛔虫 COX II 基因的序列相似性为 99.5%，分歧度为 0.5。

2.3 基于蛔虫 COX I 基因构建的分子系统树

以猫弓首蛔虫(AJ920057)为外类群，构建进化树(图 1)。从进化树中可见，来源于小熊猫、北极熊、棕熊西藏亚种和棕熊东北亚种的蛔虫先聚类，然后与来自黑熊四川亚种的蛔虫聚类，再同美洲黑熊和狸体内寄生蛔虫聚类，最后同大熊猫内寄生蛔虫聚类，它们共同构成一独立支系；黑猩猩和白眉长臂猿体内的蛔虫与人蛔虫和猪蛔虫则聚类形成蛔属支系；而弓首属蛔虫聚类形成另一个独立支系。

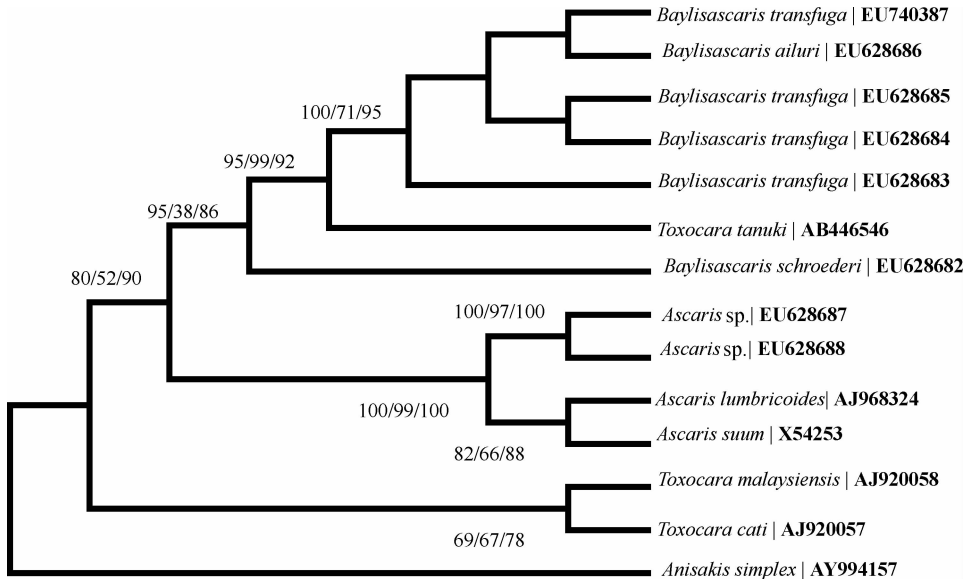


图 1 基于 COX I 基因构建的 NJ/MP/ML 树,各节点数值分别代表 NJ/MP/ML 树 bootstrap 值

Fig. 1 Phylogenetic relationship among *Ascaris* worms from eight species of wild animals. Trees are inferred from NJ/MP/ML based on COX I gene data. Bootstrap values are showed above nodes on the trees

2.4 基于蛔虫 COX II 基因构建的分子系统树

以侏鸬鹚小头对盲囊线虫(EF513517)为外类群，构建进化树(图 2)。进化树显示：小熊猫、黑熊四川亚种和棕熊东北亚种体内的蛔虫先聚类，然后与棕熊西藏亚种体内的蛔虫聚类，再同北极熊内的蛔虫聚类，最后同大熊猫内的蛔虫聚类，共同构成一独立支系；而黑猩猩和白眉长臂猿体内寄生蛔虫则

与人蛔虫和猪蛔虫聚类形成蛔属支系。

3 讨论

3.1 在本研究中，寄生于大熊猫的蛔虫与小熊猫和 4 种熊科动物体内的蛔虫的 COX I 和 COX II 具有较高的相似性，而与弓首属蛔虫和蛔属蛔虫的相似性却较小。进化树显示：大熊猫体内的蛔虫与小熊

猫和 4 种熊科动物体内的蛔虫聚类,但由于大熊猫体内蛔虫与熊科动物体内的蛔虫 COX I 和 COX II 基因序列分歧度较大,故两者在进化树中的位置也有一定距离。因此,本试验结果支持 Sprent^[7]把寄

生于大熊猫的蛔虫从蛔属(*Ascaris*)移入贝蛔属(*Baylisascaris*)的观点,并认为其为一独立的有效种:氏贝蛔虫(*B. schroederi*)。

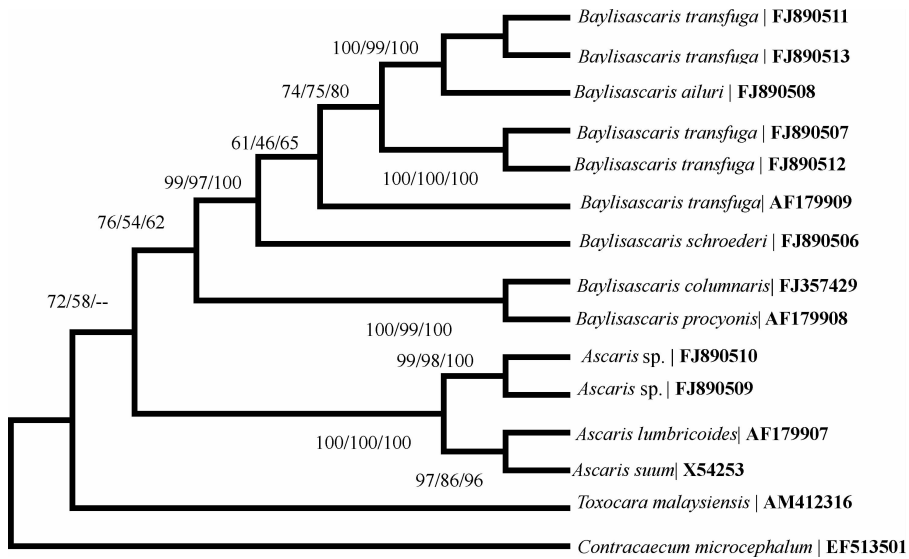


图 2 基于 COX II 基因构建的 NJ/MP/ML 树,各节点数值分别代表 NJ/MP/ML 树 bootstrap 值

Fig. 2 Phylogenetic relationship among *Ascaris* worms from eight species of wild animals. Trees are inferred from NJ/MP/ML based on COX II gene data. Bootstrap values are showed above nodes on the trees

3.2 寄生于小熊猫体内的蛔虫与大熊猫、4 种熊科动物和浣熊体内的蛔虫 COX I 和 COX II 具有较高的相似性,而与弓首属蛔虫和蛔属蛔虫的基因序列相似性却很低。进化树显示:小熊猫体内的蛔虫与大熊猫、浣熊和 4 种熊科动物体内的蛔虫聚类。因此,寄生于小熊猫体内的蛔虫应为贝蛔属蛔虫(*Baylisascaris*),而非弓首属蛔虫(*Toxascaris*)^[15]。

3.3 汪溥钦报道称寄生于黑熊四川亚种体内的熊蛔虫(*Toxascaris selenarctis* Wang, 1965)为一新种^[9],而胡洪光等则将寄生在黑熊四川亚种、棕熊西藏亚种、棕熊东北亚种体内的蛔虫鉴定为转移弓蛔虫(*Toxascaris transfuga*)^[16]。国外学者报道,寄生于北极熊和美洲黑熊体内的蛔虫为转移贝蛔虫(*Baylisascaris transfuga*),浣熊体内的蛔虫为浣熊贝蛔虫(*Baylisascaris procyonis*)^[17-21]。本研究结果表明:4 种熊科动物体内寄生蛔虫的 COX I 和 COX II 各自的相似性较高,而与弓首属蛔虫和蛔科蛔属蛔虫的基因序列相似性都较低。进化树也显示:4 种熊科动物和浣熊体内寄生的蛔虫聚类构成一个独立支系。因此,本研究中的棕熊西藏亚种、北极熊、棕熊东北亚种和黑熊四川亚种^[22-25]寄生蛔虫均应属于贝蛔属蛔虫,且均为转移贝蛔虫(*B. transfuga*)。

3.4 有报道称寄生在疣猴、猕猴和狒狒体内的蛔虫均为蛔属蛔虫^[26],而寄生在黑猩猩和猕猴体内的蛔虫均为人蛔虫(*Ascaris lumbricoides*)^[15]。另外, Kalema-Zikusoka 等将大猩猩体内发现的蛔虫卵描述为 *Ascaris lumbricoides-like* 卵^[27]。本研究结果表明:尽管黑猩猩和白眉长臂猿蛔虫的 COX II 与人蛔虫 COX II 基因序列的相似性仅为 90.4% 和 90.5%,但根据 COX I 和 COX II 构建的进化树,寄生于黑猩猩和白眉长臂猿的蛔虫与人蛔虫和猪蛔虫构成一个独立支系,因此,黑猩猩和白眉长臂猿蛔虫均应为蛔属蛔虫(*Ascaris* sp.)。

3.5 从生态学的角度分析,寄生虫与宿主间往往存在协同进化关系^[28]。在本试验中,8 种动物体内蛔虫的 COX I 和 COX II 基因序列分析显示大熊猫、小熊猫、棕熊西藏亚种、北极熊、棕熊东北亚种和黑熊四川亚种体内寄生蛔虫亲缘关系较近,同为贝蛔属蛔虫;而其宿主动物大熊猫、小熊猫也与这 4 种熊科动物具有较近的亲缘关系^[29]。本研究结果显示贝蛔属蛔虫与其宿主之间可能存在协同进化关系。

参考文献:

[1] 李明伟,林瑞庆,曹湛,等. 弓首蛔虫及狮弓蛔虫

- 线粒体基因组 *had4* 基因多态性研究[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(3): 235-250.
- [2] JACOBS D E, ZHU X, GASSER R B, et al. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat[J]. *Acta Trop*, 1997, 68(2): 191-200.
- [3] BOORE J L. Animal mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [4] FEAGIN J E. Mitochondrial genome diversity in parasites[J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30(4): 371-390.
- [5] TSANG W Y, LEMIRE B D. The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1638(2): 91-105.
- [6] 杨光友. 大熊猫寄生虫与寄生虫病研究进展[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 206-208.
- [7] SPRENT J F. Notes on *Ascaris* and *Toxascaris*, with a definition of *Baylisascaris gen. nov.*[J]. *Parasitology*, 1968, 58(1): 185-198.
- [8] 邬捷, 何高志, 胡洪光. 小熊猫弓蛔虫一新种的研究[J]. 四川动物, 1987, 3(2): 1-3.
- [9] 汪溥钦. 福建省蛔类线虫记述[J]. 寄生虫学报, 1965, 2(4): 366-379.
- [10] 杨光友, 王成东. 小熊猫寄生虫与寄生虫病研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2000, 25(3): 36-38.
- [11] 唐仲璋, 唐崇惕. 人畜线虫学[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 92-103.
- [12] 李明伟, 林瑞庆, 邹丰才, 等. 弓首蛔虫线粒体 *cox I* 基因的多态性研究[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(5): 386-390.
- [13] BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54(2): 165-173.
- [14] NADLER S A, HUDSPETH D S. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution[J]. *J Parasitol*, 2000, 86(2): 380-393.
- [15] 施新泉, 周忠勇. 上海动物园蛔类线虫记述[J]. 中国兽医杂志, 1993, 19(10): 19-20.
- [16] 胡洪光, 黄华, 赵观禄, 等. 重庆动物园野生动物寄生虫名录及新种新记录记述[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1993, 14(4): 33-35.
- [17] VERCRUYSE J, KUMAR V, CEULEMANS F, et al. Chemotherapy of helminthiasis among wild mammals. II. *Baylisascaris transfuga* (Rudolphi, 1819) Sprent, 1968 infection of polar bear[J]. *Acta Zool Pathol Antwerp*, 1976, (64): 115-119.
- [18] GAU R J, KUTZ S, ELKIN B T. Parasites in grizzly bears from the central Canadian Arctic [J]. *J Wildl Dis*, 1999, 35(3): 618-621.
- [19] FOSTER G W, CUNNINGHAM M W, KINSELLA J M, et al. Parasitic helminths of black bear cubs (*Ursus americanus*) from Florida[J]. *J Parasitol*, 2004, 90(1): 173-175.
- [20] DUFFY M S, GREAVES T A, BURT M D. Helminths of the black bear, *Ursus americanus*, in New Brunswick[J]. *J Parasitol*, 1994, 80(3): 478-480.
- [21] DIES K H. Helminths recovered from black bears in the Peace River region of northwestern Alberta[J]. *J Wildl Dis*, 1979, 15(1): 49-50.
- [22] 侯万儒, 胡锦涛. 中国熊类资源及其保护现状[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1997, 18(4): 287-291.
- [23] 侯万儒, 陈瑜, 吴夏, 等. 四川黑熊(*Ursus thibetanus mupinensis*)线粒体 NADH 脱氢酶亚基 1 基因(ND1)的序列分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(2): 91-96.
- [24] 陈瑜, 侯万儒, 吴夏, 等. 四川黑熊 NADH 脱氢酶亚基 4 基因的序列分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 318-320.
- [25] YU L, LI Y W, RYDER O A, et al. Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation[J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 198.
- [26] GILLESPIE T R, GREINER E C, CHAPMAN C A. Gastrointestinal parasites of the colobus monkeys of Uganda[J]. *J Parasitol*, 2005, 91(3): 569-573.
- [27] KALEMA-ZIKUSOKA G, ROTHMAN J M, FOX M T. Intestinal parasites and bacteria of mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda[J]. *Primates*, 2005, 46(1): 59-63.
- [28] BROOKS D R. Hennig's parasitological method: a proposed solution [J]. *Syst Zool*, 1981, 30(3): 229-249.
- [29] 林峰, 杨玉华, 张义正, 等. 应用 RAPD 技术对大熊猫分类地位的探讨[J]. 兽类学报, 1997, 17(3): 161-164.