

# 利用分子生物学技术研究大熊猫的进展\*

于广志 蒋志刚\*\* 曾岩

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

**摘要:** 分子生物学手段为大熊猫研究注入了前所未有的活力,并将大熊猫的研究工作带入一个崭新的阶段。本文着重回顾了最近十几年来分子生物学技术在大熊猫研究中的应用与研究成果。尤其是 PCR、RAPD、RFLP 等技术及新的遗传标记(如微卫星、小卫星等)的出现,使得人们在大熊猫的遗传多样性、分子系统发育及生态学等领域的研究取得的进展。最后,对分子生物学技术在这一领域中的应用前景进行了展望。

**关键词:** 大熊猫;无损伤性取样;分子系统发育

**中图分类号:** Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-114-05

## Advances in the Studies of Giant Panda by Using Molecular Bio-techniques

YU Guang-Zhi JIANG Zhi-Gang ZENG Yan

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Molecular bio-techniques infuse new vigor into the study of the Giant panda. We reviewed the progress in the study by using molecular bio-techniques during the past ten years. Particularly, we focus on the advances in the fields of genetic diversity, molecular phylogeny and ecology of the Giant panda using PCR, RAPD, RFLP, microsatellite and minisatellite technologies. Finally, we discussed prospects of applying molecular biology technology in research and conservation of the species.

**Key words:** Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*); Non-invasive sampling; Molecular phylogeny

作为我国特有的珍稀濒危物种,大熊猫的研究与保护受到了广泛的重视<sup>[1,2]</sup>。迄今,关于大熊猫的研究文献远远超过了1000篇(部)<sup>[3]</sup>。野生大熊猫的种群数量低且呈隔离状分布,种群生存状况相当脆弱<sup>[4]</sup>。研究者希望能在不影响大熊猫生存或损伤个体的情形下,获得相关的生物学数据,从而为大熊猫的保护和管理提供科学依据。近十几年来,PCR、RAPD、RFLP及无损伤取样分析等研究方法的相继出现,将大熊猫这一濒危物种的研究带入一个全新的阶段。本文回顾了近年来分子生物学技术在大熊猫有关研究中的应用,并展望了其应用前景。

### 1 遗传多样性研究

对大熊猫遗传多样性的研究可分为两派。一派认

为大熊猫的遗传多样性低,代表人物主要有方盛国和张亚平;另一派以吕植和潘文石为代表,他们认为与其它食肉动物相比,大熊猫的遗传多样性处于居中水平。方盛国等<sup>[5-8]</sup>先后用DNA指纹图谱对大熊猫的遗传多样性进行了研究。他们发现:五个山系中86只大熊猫的平均等位基因频率为0.2326,平均杂合率为

\* 中国科学院知识创新工程领域前沿项目,创新方向项目(No. KSCX-1-03, KSCX3-IOZ-02)和国家重点基础研究发展规划项目(No. G2000046805)资助;

\*\* 通讯作者; E-mail: jiangzg@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 于广志,女,27岁,博士研究生;研究方向:濒危动物保护。

收稿日期:2002-11-21,修回日期:2003-06-25

76.74%, DNA 指纹图的相似系数为 0.4009, 其近交程度接近于家养动物的  $\pi$  限值(0.3 ~ 0.7), 而高于野生动物的上限值(0.2 ~ 0.13), 因而认为现存大熊猫的物种遗传多样性极度贫乏。他们对秦岭山系及佛坪自然保护区的研究表明: 无论是以秦岭山系为群体遗传单元, 还是以秦岭山系内的佛坪自然保护区三官庙为群体遗传单元, 大熊猫的遗传多样性都极为贫乏。主要表现在群体的杂合率分别仅为 65% 和 63%; 平均等位基因频率高达 0.35 和 0.37。这就意味着秦岭山系的大熊猫群体尚未出现遗传分化。类似的结果也适用于大小秦岭及凉山山系的大熊猫种群。

张亚平和 Ryder<sup>[9,10]</sup> 从 40 只大熊猫的 21 个创立者中共检出 9 种线粒体单倍型。在这 9 种单倍型中, 318 个碱基对的 D-环区序列中仅 3 个位点出现了转换, 2 个位点出现缺失或插入且未检出碱基颠换的存在。棕熊、亚洲黑熊及北极熊的 *cyt-b* 基因都存在有一定数量的序列变异, 而马来熊的却没有, 这就表明马来熊的遗传多样性比这三种熊都低。事实上, 马来熊线粒体 DNA 的 D-环相应区域内最高的序列变异高达 8 次置换, 这远远高于大熊猫的 3 次置换。因此, 大熊猫群体遗传分化程度较马来熊更低<sup>[11]</sup>。根据较完整的北美棕熊和北极熊的化石记录及同一区域内基因序列变异率的高低, 借助于分子钟可推测出大熊猫群体的分化大约发生在晚更新世。1997 年, 张亚平等<sup>[12]</sup> 对线粒体 D-环区和 tRNA 基因的分析亦表明: 与已有的棕熊、亚洲黑熊、北极熊及马来熊的群体遗传多样性<sup>[11]</sup> 相比, 大熊猫的遗传变异很低, 并且不同居群中没有明显的基因隔离。他们推测: 现存的大熊猫的祖先可能在更新世晚期受到“瓶颈效应”的影响, 虽然在那以后, 其遗传多样性又恢复到某种水平, 但其多样性依然很低。

2001 年, 吕植等人<sup>[13]</sup> 用 4 个遗传学指标(线粒体 DNA、线粒体 DNA 的 D-环序列、核 DNA 多位点指纹图谱、微卫星 DNA 的多样性)对岷山、邛崃及秦岭山系中的 3 个大熊猫种群的遗传多样性进行了比较。在对线粒体 DNA D-环区 268 个碱基对的测序分析中, 他们从 36 只大熊猫个体中共检出 17 种基因型。这些基因型同大熊猫的地理分布没有显著的相关性。并利用限制性内切酶和家猫的微卫星序列探针(FC28, FC29), 对秦岭和邛崃山系 18 个个体的分析发现, 大熊猫种群的杂合率处在 27.7% 到 46.5% 之间。与其它食肉动物种群相比, 大熊猫的遗传多样性水平处于中等。

1998 年, 丁波等<sup>[14]</sup> 成功地从大熊猫的气味标记物中提取了遗传物质——线粒体 DNA 的 D-环、*cyt-b* 和 Thr-tRNA 的基因片段, 并用 PCR 进行了扩增, 从而为大

熊猫遗传多样性研究提供了一种简捷有效的方法。1994 年, 张思仲和周荣家利用人的一对 SRY 基因(性别决定基因)引物对大熊猫的 SRY 基因进行了扩增与克隆, 并绘制了大熊猫基因片段的限制酶图谱<sup>[15]</sup>, 结果发现大熊猫的 SRY 基因与人的 SRY 基因具有高度的同源性。获得的大熊猫 SRY 基因可用于野外大熊猫的性别鉴定, 对那些以小群体方式存在的野生大熊猫来说尤为重要。因为性比影响着种群的发展动态, 性比失调极易造成物种的局部灭绝。以上研究结果表明, 现有大熊猫的遗传多样性不高, 但存在着广泛的个体间遗传变异, 大熊猫群体内和群体间的遗传多样性水平趋近。

以上实验利用不同的遗传标记和手段, 测定了多个大熊猫种群中的不同个体。实验结果虽有差异, 但结论的分歧主要缘自于对结果做出的解释不同。对大熊猫遗传多样性高低的争议主要是因为研究者在比较遗传多样性时所选的参照对象不同。以核 DNA 指纹图谱的种群杂合率为例, 张亚平等计算的大熊猫种群的平均杂合率为 76.74%, 而吕植等的计算结果为 0.277 ~ 0.465。但由于后者比较时的参考动物是猫科动物而非前者的熊类动物, 因而得出与前者完全不同的结论。这种差异同时还与研究者判定遗传多样性高低时的依据标准有关。

## 2 分子系统学研究

有关大熊猫起源及其与其它物种亲缘关系的确定一直困扰着研究人员<sup>[4,16]</sup>。1965 年, Zuckerkandl 和 Pauling<sup>[17]</sup> 最先提出将基因型特征用于分类学与系统学研究。所谓的基因型特征是基因产物的分子结构特征。具体地说就是某些蛋白分子及其编码的 DNA 和 RNA 的一级结构特征。他们认为核酸和蛋白分子包含有系统发生信息, 可以用于系统学研究。从严格意义上讲, 只有基因本身的结构(碱基序列)特征才算是基因型特征, 基因产物只有在能对应于基因结构的情况下才能称作基因型特征, 所以最好将可用于分类和谱系分析的生物分子, 包括蛋白质、DNA 和 RNA 以及其它生物分子的特征总称为分子特征<sup>[18]</sup>。

电泳、血清学、免疫学以及 DNA 杂交方法对大熊猫的研究结果一致表明, 大熊猫与熊科的关系更近一些<sup>[19-22]</sup>。有研究认为: 大熊猫在系统发育上与小熊猫较为亲近<sup>[23,24]</sup>。就系统发生来看, 有研究认为浣熊科首先脱离与熊科的共同始祖。不久, 小熊猫即与浣熊科主谱系离异; 最重要的是, 大熊猫与熊的血缘关系更亲于浣熊<sup>[25]</sup>, 这说明大熊猫与小熊猫的主谱系是不同

的。1990年,王希成等<sup>[26]</sup>利用兔抗大熊猫 IgG 免疫扩散和微量免疫电泳的方法对大熊猫的分类地位予以确定。结果发现:大熊猫与熊的亲缘关系较近而与小熊猫的较远。Hashimoto 等<sup>[27]</sup>通过测定基因表达产物—— $\alpha$ -血红蛋白和 $\beta$ -血红蛋白的氨基酸序列来分析大熊猫及其近缘种之间的亲缘关系。研究结果与王希成等的研究结果一致。

现在人们逐渐将研究重心转移到基因图谱与基因序列的分析上来。分子标记技术所提供的遗传多样性信息相当多,而且分子数据提供的共同比较尺度及分子数据有望区分同源性和相似性。通过对 rDNA 间隔区限制性位点变异性的研究,结合最大相似性和简约性方法,研究者建立了大熊猫及其亲缘物种之间的分子系统树。就 rDNA 的 RFLPs 产物分析结果而言,在亲缘关系上大熊猫更接近于熊类,而不是小熊猫<sup>[28]</sup>。林峰等<sup>[29]</sup>用 PCR 和 Southern-blotting 杂交法对包括大熊猫在内的几种动物 RAPD 的产物进行了分析,结果与前面的结论相同。Ledje 和 Arnason<sup>[30,31]</sup>利用线粒体 12S rRNA 的全基因序列重建了食肉目动物的系统发育关系。研究认为食肉动物在相对较短的时期内就发生了多歧分化。大熊猫在亲缘关系上与熊更接近,而小熊猫属一科。同年两人又根据食肉目犬科动物 *cyt b* 基因的全序列测定结果,推测出食肉类动物的 5 个支系[犬科,小熊猫科,鼬超科,熊科(含大熊猫)及鳍足目]在相对较短的时间内就产生了进化隔离。遗传距离计算表明进化分离发生在 4 500 万年前。1994 年,张亚平和 Ryder<sup>[32,33]</sup>对熊超科 8 个科动物的线粒体 DNA 的 D-环、*cyt b*、12S rRNA、tRNA-Pro 和 tRNA-Thr 基因序列及线粒体 DNA 的全序列分析发现:海狗科、浣熊科及鼬科有共同的祖先,而与熊科没有共同的祖先;小熊猫科既不与熊科也不与浣熊科接近;大熊猫科与熊科关系较近。这一结果不支持二歧分支起源假说。总之,就亲缘关系而言,大熊猫和熊科关系较近,可能是由共同的支系进化而来的;而小熊猫和熊科是由不同支系演化而来的,所以与小熊猫的亲缘关系较远。

### 3 生态学研究

这些新方法也逐渐被应用于大熊猫的生态学研究中来。对野生大熊猫开展大范围的种群数量调查是非常困难的。这种困难不仅表现在调查时所消耗的巨大的人力、物力和财力上<sup>[34]</sup>,而且表现在调查时允许捕获和运输的濒危动物数量上<sup>[35]</sup>。因而,人们越来越倾向于借助无损取样法对大熊猫进行研究。

近年来,人们发现可以借助 SRY 基因确定大熊猫

的性别<sup>[15]</sup>,从而确定种群的性比。1996 年,方盛国等<sup>[36]</sup>从不同时间段内收集到的大熊猫毛发和粪便中提取遗传物质,并进行 DNA 指纹分析以确定一定区域内的大熊猫数量。研究结果表明,同一领域内不同时间段内收集到的毛发与粪便得到的 DNA 指纹是一致的。同样,冯文和等<sup>[37]</sup>应用寡核苷酸探针 LZf-1 和 F2Z.g.p96060801,从野生大熊猫粪便中提取 DNA 进行指纹图谱分析,对大熊猫野生种群的个体数量和家系进行了确认并获得了满意的结果。因此,在不同自然保护区、山系或行政区划内进行大面积的大熊猫种群数量调查时,可将传统的调查方法与 DNA 指纹鉴定法结合起来使用。

### 4 在人工繁育中的应用

如何通过人为安排配种,增加迁地种群的有效种群数量并降低近交系数是管理迁地保护种群时迫切需要解决的问题<sup>[39]</sup>。大熊猫在圈养条件下的性行为能力相对低下\*。相应地,人们便采用了人工授精与自然交配相结合的方法来提高其受孕率,这就同时带来了大熊猫谱系难以确定的难题。遗传标记可解决这一问题。遗传标记是指任何一种简单的遗传特性,可用于追踪染色体上某一节段或某一基因在家系中的传递。它在个体之间的表现不同,通过这种差别可在一个家系中进行追踪<sup>[38]</sup>。微卫星标记具有这种优点。绝大多数微卫星座位遵循严格的孟德尔遗传方式,根据这种规律对大熊猫个体进行亲缘鉴定,并建立个体间的谱系关系。张亚平等<sup>[40,41]</sup>和方盛国等<sup>[42]</sup>分别利用 PCR 技术对从毛发中获得的大熊猫微卫星 DNA 位点进行了扩增,并研究了不同个体间的亲缘关系。方盛国<sup>[43]</sup>通过从毛发、血液、精液、粪便及其它样品中提取 DNA 进行指纹分析,进而进行大熊猫的亲缘鉴定。这一方法的熟练应用及推广将有助于避免圈养条件下大熊猫的近亲繁殖。因为繁育系统不仅影响种群的遗传结构,而且影响种群的总遗传多样性。此外,这一方法的应用还将为大熊猫的谱系建立提供充分的遗传学依据。

### 5 系统地理学研究

目前,我国正在实施大熊猫栖息地保护工程,主要是在大熊猫分布区建立保护区和走廊带<sup>[44]</sup>。然而,栖息地保护与连通必须考虑到现有大熊猫种群之间的关系。方盛国、冯文和等<sup>[5-8]</sup>对不同山系大熊猫个体的

\* 彭建军. 2001. 圈养大熊猫发情行为受抑制的原因探讨. 博士学位论文. 北京:中国科学院动物研究所

DNA 图谱研究发现:不同山系的大熊猫已产生了遗传分化,形成了“秦岭山系”、“岷山山系-邛崃山山系”和“凉山-小相岭山系”三个遗传类群,后两个山系内大熊猫的亲缘关系较近。吕植等<sup>[13]</sup>研究发现秦岭山系的大熊猫种群比岷山及邛崃山系种群的特异性要高。此外,岷江虽然将岷山与邛崃山系的大熊猫种群在地理分布上隔离开来,但大熊猫种群间的基因交流并未受阻。类似的研究将为正在进行的栖息地保护提供遗传方面的证据,以避免特有基因或遗传多样性丢失现象发生。

## 6 展 望

分子生物学技术在大熊猫生物学研究中的普及解决了一些传统研究方法所不能解决的难题。分子生物学技术将在大熊猫的研究中发挥越来越大的作用,主要表现在:

(1) 重构分子进化树。用分子进化来研究系统学具有传统方法所不可比拟的优势,其一是分子进化速率相对于形态进化速率恒定;其二是分子特征数目多<sup>[18]</sup>。对大熊猫及其近缘物种开展古分子系统学方面的研究,从而利用分子特征数据和简约性原则建立起分子系统学。

(2) 应用地理信息系统技术,结合分子生物学研究手段,在野外采集大熊猫的粪便、毛发和标记样品,能比较客观地确定大熊猫的巢域大小。此外,借助于无损取样的方法和分子生物学技术可以研究野外大熊猫的种群结构。最后,利用多年积累的数据,研究大熊猫的种群动态。

(3) 全国大熊猫的普查中,可利用分子生物学方法建立大熊猫的谱系。一方面,这种谱系是一种重要的基础资料积累,一旦建立这种谱系,将来有助于研究这种动物的繁育制度和种群遗传多样性;另一方面,建立大熊猫的谱系,将有利于圈养大熊猫种群的管理,减缓圈养大熊猫的近交衰退。

(4) 利用分子生物学技术,通过扩增粪便中寄生生物基因片断,可检测出寄生虫的发生情况<sup>[45]</sup>。因此,若将这种方法运用到大熊猫的兽医学研究中,必定会提高大熊猫的存活率。

同时,分子生物学也有其不可避免的弊端,如在分子系统学研究中分子特征难于区分同源特征与同功特征,也不容易确定祖征和衍征<sup>[18]</sup>。此外,在进行分析时,PCR 所扩增的如果是不表达的基因间隔区或者内含子序列,那么这种基因多态的代表性及保护意义都值得商榷。最后,非损伤性取样获得的 DNA 样品保存难、

浓度低、易污染等特点也使得分子技术的应用前景大打折扣<sup>[46]</sup>。只有将分子水平的研究与传统的研究手段结合起来,才能得到更有价值的生物学数据。

## 参 考 文 献

- [1] O'Brien S, Pan W S, Lu Z. Panda, people and policy. *Nature*, 1994, **369**: 179 ~ 180.
- [2] Peng J J, Jiang Z G, Hu J C. Status and conservation of giant panda. *Folia Zoologica*, 2001, **50**: 81 ~ 88.
- [3] 彭建军,石红艳.大熊猫生理生化及细胞遗传研究与进展. *动物学杂志*, 1997, **32**(3): 54 ~ 58.
- [4] 胡锦涛.大熊猫的系统地位与种群生态学的研究与进展. *动物学研究*, 2000, **1**(1): 28 ~ 34.
- [5] 方盛国,冯文和,张安居等.凉山与小相岭山系大熊猫遗传多样性的比较分析. *兽类学报*, 1997, **17**(4): 248 ~ 252.
- [6] 方盛国,冯文和,张安居等. F2ZGP96060801 探针用于秦岭山系大熊猫的遗传多样性分析. 见:成都动物园等编. '97 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集. 成都:四川科学出版社, 1997. 134 ~ 136.
- [7] 方盛国,冯文和,张安居等.大熊猫遗传多样性研究. 见:成都动物园等编. '97 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集. 成都:四川科学出版社, 1997. 141 ~ 146.
- [8] 方盛国,冯文和,张安居等.用 DNA 指纹对大相岭大熊猫的数量和遗传多样性的分析. *四川大学学报(自然科学版)*, 1999, **36**(3): 627 ~ 630.
- [9] Zhang Y P, Ryder O A. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 9557 ~ 9561.
- [10] Zhang Y P, Ryder O A. Phylogenetic relationships of bears inferred from mitochondrial endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Folia Primatol*, 1993, **60**: 7 ~ 17.
- [11] 胡志昂,张亚平主编.中国动植物的遗传多样性.杭州:浙江技术出版社, 1997. 14.
- [12] Zhang Y P, Ryder O A, Fan Z Y, et al. Sequence variation and genetic diversity in the giant panda. *Science in China Series C Life Science*, 1997, **40**(2): 210 ~ 216.
- [13] Lu Z, Johnson W E, Menotti-Raymond M, et al. Patterns of genetic diversity in remaining giant panda populations. *Conserv Biol*, 2001, **15**(6): 1596 ~ 1607.
- [14] 丁波, Ryder Oliver A. 张亚平等. 大熊猫气味标记 DNA 的制备和序列分析. *动物学研究*, 1998, **19**(5): 344 ~ 349.
- [15] 张思仲,周荣家.大熊猫 SRY 基因的 PCR 扩增和克隆. *遗传学报*, 1994, **21**(4): 281 ~ 286.
- [16] 胡锦涛,魏辅文.八十年代大熊猫的研究与进展. 见:胡锦涛主编.大熊猫生物学研究与进展.成都:四川科

- 学技术出版社, 1990. 2~3.
- [17] Zuckerhandl E, Pauling L. Molecules and documents of evolutionary history. *J Theor Biol*, 1965, **8**: 366~367.
- [18] 张昉. 生物进化. 北京: 北京大学出版社, 1998. 152~154.
- [19] 陈丽蓉, 肖能. 大熊猫与各种动物的血清学研究. 北京大学学报(自), 1982, **18**(1): 79~88.
- [20] 潘文石, 李放, 王新生等. 大熊猫与各种动物亲缘关系的免疫化学研究. 兽类学报, 1982, **2**(1): 8.
- [21] 唐旭译(O'Brien S J 著). 大熊猫的祖先. 科学, 1988, **40**(3): 34~40.
- [22] Sarich V M. The giant panda is a bear. *Nature*, 1973, **245** (5422): 218~220.
- [23] 冯文和, 何光昕等. 大熊猫与几种肉食类动物血清蛋白及乳酸脱氢酶同工酶的比较研究. 四川大学学报(自然科学版), 1984, **21**(4): 85~90.
- [24] Wurster-Hill D H, Bush M. The interrelationship of chromosome banding patterns in the Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) Hybrid bear (*Ursus middendorfi* × *Thalartos maritimus*), and other carnivores. *Cytogenet Cell Genet*, 1980, **27**: 147~154.
- [25] O'Brien B. The ancestry of the giant panda. *Sci Am*, 1989, **257**(5): 102~107.
- [26] 王希成, 陈显川, 蒋五玲等. 应用兔抗大熊猫免疫球蛋白 G 血清探讨大熊猫的分类地位. 兽类学报, 1989, **9** (2): 94~97.
- [27] Hashimoto T, Otaka E, Adachi J, et al. The giant panda is closer to a bear, judged by alpha- and beta-hemoglobin sequences. *J Mol Evol*, 1993, **36**(3): 282~289.
- [28] Lan H, Wang W. Phylogenetic relationships among giant panda and related species based on restriction site variations in rDNA spacers. *Zool Res*, 1998, **19**(5): 337~343.
- [29] 林峰, 杨玉华, 张一珍等. 应用 RAPD 对大熊猫分类地位的初步研究. 兽类学报, 1997, **17**(3): 161~164.
- [30] Ledje C, Arnason U. Phylogenetic relationships within caniform carnivores based on analyses of the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Mol Evol*, 1996, **43**(6): 641~649.
- [31] Ledje C, Arnason U. Phylogenetic analyses of complete cytochrome b genes of the order Carnivora with particular emphasis on the Carniformia. *J Mol Evol*, 1996, **42**(2): 135~144.
- [32] Zhang Y P, Ryder O A. Phylogenetic relationships of bears (the Ursidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 1994, **3**(4): 351~359.
- [33] 张亚平, Ryder O A. 熊总科的分子系统学. 遗传学报, 1997, **24**(1): 15~22.
- [34] 魏辅文, 饶刚, 李明等. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望. 兽类学报, 2001, **21**(2): 143~152.
- [35] Kohn Michael H, Wayne Robert K. Facts from feces revisited. *Trends Ecol Evol*, 1997, **12**(6): 223~227.
- [36] 方盛国, 陈贵权, 冯文和等. DNA 指纹应用到大熊猫的野外种群调查. 兽类学报, 1996, **16**(4): 246~249.
- [37] 冯文和, 方盛国, 张安居等. 大熊猫种群数量调查法的研究与应用. 见: 成都动物园等编. '97 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集. 成都: 四川科学出版社, 1997. 124~130.
- [38] 王亚馥, 戴灼华主编. 遗传学. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [39] 蒋志刚. 物种的迁地保护. 见: 蒋志刚主编. 保护生物学. 杭州: 浙江科学出版社, 1997. 157.
- [40] Zhang Y P, Ryder O A, Zhao Q G, et al. Non-invasive giant panda paternity exclusion. *Zoo Biol*, 1994, **13**(6): 569~573.
- [41] 张亚平, 王文, 宿兵等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. 动物学研究, 1995, **16**: 301~306.
- [42] 方盛国, 冯文和, 张安居等. DNA 指纹运用到人工繁育的大熊猫子代中亲仔鉴定. 四川大学学报(自然科学版), 1994, **31**(3): 389~395.
- [43] 方盛国, 冯文和, 张安居等. 大熊猫亲本鉴定的 DNA 指纹分析. 兽类学报, 1997, **17**(2): 92~99.
- [44] 范志勇, 宋延龄. 自然保护区体系在中国的重要性及大熊猫保护对策. 见: 李渤生, 詹志勇主编. 绿满亚洲——第一届东亚地区国家公园与保护区会议暨 CNPPA/IUCN 第 41 届工作会议论文集. 北京: 中国环境出版社, 1994. 737~742.
- [45] Sidransky D, Tokino T, Hamilton S R, et al. Identification of ras mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science*, 1992, **256**: 102~105.
- [46] 王戎疆. 粪便 DNA 分析技术在动物生态学中的应用. 动物学报, 2001, **47**(6): 699~703.