

利用非损伤性方法评估神农架保护区 川金丝猴种群遗传多样性

何 丽¹, 张于光², 彭红兰², 李迪强², 李大全^{1,*}

(1. 新疆石河子大学动物科技学院, 石河子 832000;

2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所/国家林业局森林生态环境重点实验室, 北京 100091)

摘要:湖北神农架国家级自然保护区是中国川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 的重要分布区之一, 为了更好地了解神农架川金丝猴种群遗传结构, 并制定有效的保护对策, 采集了该保护区 2 个川金丝猴种群 126 份样品, 其中分布在大龙潭的人工补食种群粪便样品 60 份, 分布在千家坪的一个小种群粪便样品 63 份, 肌肉样品 3 份。通过应用线粒体 DNA (mtDNA) 引物和筛选出的 9 对近缘微卫星位点成功地进行了川金丝猴种群的遗传多样性和遗传结构分析, 同时使用 Y 染色体相关标记方法进行性别鉴定。结果显示: 在 24 份川金丝猴 mtDNA D-loop 区 401 bp 序列中, 共检测出 27 个变异位点, 定义了 20 个单倍型, 单倍型多样性 (h) 为 0.9820, 核苷酸多样性 (π) 为 0.0129; 其中有 9 对微卫星位点能够在 117 份粪便样品 DNA 中稳定扩增, 2 对位点可能偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 3.85, 遗传杂合度 (H_o) 为 0.7450; 多态信息含量 (PIC) 为 0.5950。使用 Y 染色体标记方法, 在 58 个特有的基因型中检测到 18 个雄性和 40 个雌性川金丝猴。微卫星标记和 mtDNA D-loop 区基因序列均表明神农架川金丝猴存在较丰富的遗传多样性, 同时 2 个取样点川金丝猴种群间出现了明显的遗传分化。

关键词:川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*); 神农架国家级自然保护区; 非损伤性; 遗传多样性

Genetic diversity of *Rhinopithecus roxellana* in Shennongjia National Nature Reserve as estimated by non-invasive DNA technology

HE Li¹, ZHANG Yuguang², PENG Honglan², LI Diqiang², LI Daquan^{1,*}

1 College of Animal Science, Shihezi University, Xinjiang 832000, China

2 Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, and the Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellanae*) is an unique primates in china, witch is in severe danger now and is mainly distributed in Shanxi, Hubei, Sichuan and Gansu province. In recent years, since the forest has been cut excessively and human activities have become increasingly frequent, habitat loss and habitat fragmentation have caused the population isolation and differentiation, the reduction of genetic diversity in Sichuan snub-nosed monkey. Hubei Shennongjia National Nature Reserve is one of the major habitating areas for Sichuan snub-nosed monkey in China. In order to understand the genetic structure of the species for effective conservation, a total of 126 samples were collected from two natural populations in the reserved region, including 60 fecal samples from Dalongtan population, and 63 fecal samples plus 3 muscle samples from Qianjiaping population. The genetic structure and diversity of the populations were estimated by analyzing the samples for mitochondrial DNA (mtDNA) gene fragment, and 9 selected microsatellite loci including D6S474, D3S1768, D1S533, D8S505, D15S644, D1S207, D7S1830, D17S1290, D5S820. In addition, sex identification of the samples was performed using Y chromosome-markers. The results of analysis showed that: (1) a total of 20 haplotypes and 27 diversity sites were found in the 24 random samples at a 401 bp region of mtDNA D-loop, with

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD03A1202, 2007BAC03A08-5); 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21404)

收稿日期:2010-02-04; **修订日期:**2010-05-19

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lidaquan37@sohu.com

haplotype diversity value equals to 0.982, and nucleotide diversity was 0.0129. (2) All of 9 microsatellite loci were stably detected in 117 of total fecal DNA preparations and genotyping success rate was 87%, two loci showed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The average effective number of alleles was 3.85, the average observed heterozygosity and polymorphism information content were 0.745 and 0.595, respectively. By using Y chromosome marker techniques, 18 male and 40 female was identified in 58 unique Sichuan snub-nosed monkey genotypes. This sex identification technique is very simple, reliable, and especially applicable for the fecal DNA test. These results indicated a high level of genetic diversity in Sichuan snub-nosed monkey in Shennongjia National Nature Reserve. All the same time, the two populations we have invested showed a significant genetic differentiation. Some protection advices were proposed for the species-source saving and population rejuvenation of Sichuan snub-nosed monkey according to protection genetics and research achievement above.

Key Words: Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*); Shennongjia National Nature Reserve; non-invasive DNA technology; genetic diversity

川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)属于灵长目(Primates)猴科(Cercopithecidae)疣猴亚科(Colobinae)仰鼻猴属(*Rhinopithecus*),是我国特有的灵长类物种,现已被濒危野生动植物国际贸易公约(CITES)和自然资源保护联盟(IUCN)定为濒危物种^[1-2]。川金丝猴主要分布于我国四川西北部、甘肃南部、陕西南部 and 湖北西部神农架山区,其中湖北神农架国家级自然保护区是我国川金丝猴分布的最东端^[3]。

分子生物学方法结合野外种群的非损伤性采样(粪便和毛发等)被广泛用于濒危物种的保护遗传学研究^[4-5],其中微卫星(Microsatellite)DNA因其分布广泛,变异度极高和易于检测而被应用于分子生态学、群体遗传学等研究领域^[6]。同时微卫星DNA多态片断利用PCR扩增获得,对模板DNA的要求相对较低,所以适合于使用非损伤性DNA提取的方法^[7]。在非损伤性取样中,粪便样品是最具有潜在价值的研究材料,不但容易收集,而且其中所含有的遗传物质能够提供动物分子遗传学的信息^[8-9]。

目前,金丝猴微卫星遗传标记已经有一些报道,潘登^[10]等人用研究猕猴(*Macaca mulatta*)的位点研究了岷山、秦岭和神农架3个主要栖息地川金丝猴的微卫星多态,虽然均检测到了多态性,但遗传多样性水平并不高于其他濒危动物;Pan等人^[11]进一步应用mtDNA控制区补充研究了不同分布区川金丝猴遗传多样性,发现神农架川金丝猴遗传多样性仍然表现较其它样地低,但川金丝猴整体遗传多样性水平上升。同时李义明等对神农架川金丝猴生境选择的行为生态学和营养生态学进行了系统的研究^[12],但针对神农架川金丝猴孤立种群的遗传结构研究还尚未见报道,神农架川金丝猴猴群大小一般比四川、陕西等分布区的猴群要小,主要的因素是栖息地破碎化阻隔了猴群的游走范围、采食和繁殖,限制了一些大猴群的形成。这些小种群有效种群数量少且存在隔离,面临着遗传多样性丧失、近亲繁殖增加和近交衰退的压力,将损害整个神农架川金丝猴种群的长期进化潜力和生存力。尤其是神农架人工补食这种小种群的遗传多样性维持问题需要进行深入研究,对该地区川金丝猴种群数量和结构仍然基于野外调查和监测的结果。本研究筛选出9对微卫星位点,并选取特异性线粒体引物和Y-染色体引物,采用粪便取样法,对神农架国家级自然保护区2个川金丝猴种群遗传多样性进行分析。试图获得更多适合川金丝猴种群研究的多态性位点,了解该分布区川金丝猴种群间的遗传分化和基因交流程度,为进一步深入研究神农架川金丝猴人工补食种群对整个神农架川金丝猴造成的影响及建立科学有效的保护措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究区自然概况

神农架自然保护区位于湖北省西北部,东经110°03'05"—110°33'50",北纬31°21'20"—31°36'20",总面积70467hm²^[13]。该区植被类型十分丰富,以巴山冷杉(*Abies fargesii*)、华山松(*Pinus armandii*)、白皮松(*P. bungeana*)等为优势种组成的群落最具特色^[14]。杨敬元等人2005年4月—2006年4月对神农架自然保护区

内金丝猴种群数量进行了调查,发现现有川金丝猴 3 大种群,即金猴岭、大龙潭和千家坪种群,其中大龙潭是唯一分布有人工补食的种群^[15]。本研究样品来源于大龙潭人工补食种群和一个千家坪小种群,采集分布位置如图 1。

1.2 样品的采集和 DNA 提取

本研究运用非损伤性取样方法,分别于 2006 年、2008 年采集了神农架国家级自然保护区川金丝猴肌肉和粪便样品 126 份,其中大龙潭人工补食种群粪便样品 60 份,千家坪小种群粪便样品 63 份及肌肉样品 3 份。为避免交叉污染,取样时均带一次性无菌薄膜手套,剥取粪便表层,分别以 75% 的酒精浸泡和保存在含有 12 mL 硅胶的 15 mL 试管中,室温保存。

肌肉 DNA 的提取参照饶刚等人酚/氯仿抽提 DNA 方法^[16],粪便样品 DNA 的提取使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Germany, Qiagen 公司)提取试剂盒,参照厂商提供的说明书进行优化。本研究所使用的 3 份肌肉样品来源于 2008 初雪灾冰冻致死的川金丝猴,作为筛选微卫星位点和阳性对照使用。

1.3 线粒体 DNA (mtDNA) 遗传结构分析

参考有关文献^[17],选取引物对 GH (5'-AACTGGCATTCTATTTAACTAC-3') 和 GL (5'-ATTGATTTCACG-GAGGATGCT-3') 扩增总基因组 DNA,扩增产物大小为 401 bp 左右。PCR 扩增反应体系为 50 μ L,含有 1.0 mmol/L 的 dNTP, 1.5 $\times$ PCR buffer, 0.75 U 的 HotMasterTM Taq (Eppendorf), 5 μ g 的 BSA, 1.2 mmol/L 的引物和 5.0 μ L 模板 DNA。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 50 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, PrepEaseTM PCR (USB Corporation, USA) 试剂盒纯化 PCR 产物,然后进行测序,测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。单倍型多样性 (h)、核苷酸多样性 (π) 和变异位点信息由 DNASP (Version 4.10.8) 软件计算;利用 MEGA (version 4.0) 软件构建单倍型的系统发生树,构树时选用川金丝猴近缘种滇金丝猴 (*R. bieti*) 的同源序列 (GenBank 登录号: DQ661665) 作为外群,以获取系统树的根。

1.4 微卫星引物的筛选

本研究选取了潘登^[10]等实验中的 8 对位点,以及查阅相关文献^[18-24]和 NCBI 数据库得到 16 对猕猴的微卫星位点信息和引物序列,引物选取主要以分布广、分型多、核心序列重复率高为标准,具体位点信息见表 1。先用 3 只川金丝猴肌肉样品提出的 DNA 进行试验,然后把成功扩增的位点对粪便样品提出的 DNA 进行检测,选取具有多态性的引物,以进行川金丝猴的个体识别和遗传多样性分析。

1.5 微卫星基因分型和遗传多样性分析

利用成功筛选出的微卫星位点对所采集的 123 份粪便样品 DNA 进行 PCR 扩增,扩增在 PE-9700 型扩增仪上完成。每次扩增过程中使用肌肉 DNA 样品作阳性参照,在不同的引物 5' 端前分别带上 6-FAM 或 HEX 荧光标记,PCR 反应总体积为 10 μ L,含有 0.2 mmol/L 的 dNTP、1 $\times$ PCR buffer, 0.25 U 的 HotMasterTM Taq (Eppendorf), 1 μ g 的 BSA, 0.24 mmol/L 的引物和 1 μ L 模板 DNA。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52—59 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。所有粪便 DNA 扩增均设置 3 个重复,PCR 产物在 ABI 3730 测序仪上分型分析,并用 GeneMarker (Version 1.71; Applied Biosystems) 软件判读等位基因大小。至少在 2 个独立的 PCR 反应中观察到才被接受为等位基因,2 个或 3 个重复分析结果不一致样品放弃。

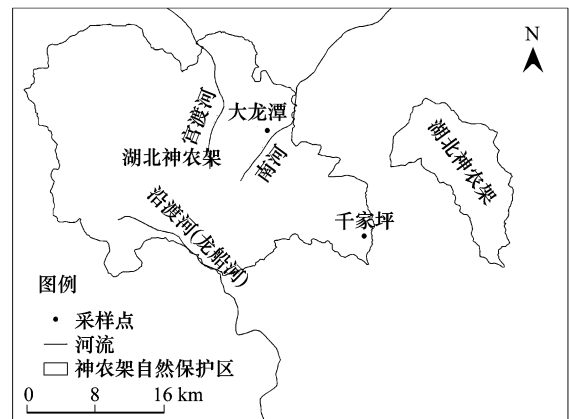


图 1 湖北神农架国家级自然保护区川金丝猴取样点

Fig. 1 The sampling sites of *Rhinopithecus roxellana* in Hubei Shennongjia National Nature Reserve

表 1 24 对微卫星位点的引物信息
Table 1 The primer information of the 24 microsatellites loci

位点 Locus	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5' to 3')	片段长度 Size (bp)	引物来源 Primer origin
P1	D6S474	(GATA) ... (GATA) ₄ GAT(GATA) ₁₃ AAA(GATA) ₂	F:TGTACAAAAGCCTATTTAGTCAGG R:TCATGTGAGCCAATTCTCT	151—167 [10]
P2	D3S1768	(GATA) ₁₂ ... (GATA)GATG(GATA) ... (GATA)	F:GCTTGCTGCCAAAGATTAGA R:CACTGTGATTGCTGTTGGA	186—206 [10]
P3	D1S533	(GATA)TA(GATA)CAGA(GATA) ₂ ... (GATA) ₂ GAAA(GATA) ₁₃	F:CATCCCCCCCCAAAAATATA R:TTGCTAATCAAATAACAATGGG	193—225 [10]
P4	D11S2002	(GATA)GAT(GATA) ₁₂	F:CATGGCCCTTCTTTTCATAG R:AATGAGGTCTTACTTTGTTGCC	224—252 [10]
P5	D7S794	(ATCT)4ATC(ATCT) ₁₁ ATC(ATCT) ₃ ... (ATCT)	F:GCCAATTCTCCTAACAATCC R:TATGCCCATGTGTTAGGGTT	168 [10]
P6	D8S505	(TC) ₁₈ (AC) ₂₂	F:AGCCTGCTATTTGTAGATAATGTTT R:AGTGCTAAGTCCAGACCA	203—213 [19]
P7	D15S644	(GGAA) ... (GGAA) ₁₁ ... (GGAA)	F:CCTTCATTGGCAGACTCACT R:GCAGACACCAAGATGATAACG	203—204 [10]
P8	D1S207	(CA) ₂₆	F:CACTTCTCCTTGAATCGCTT R:GCAAGTCCTGTCCAAGTCT	142—170 [20]
P9	D7S1830	(GATA) ₃ GAT(GATA) ₁₃	F:GTACATGATGGGCTGTCTC R:GATACATACTGCCAATAAATCACA	200—228 [10]
P10	D17S1290	(GATA) ₃ ... (GATA) ₂ TATA(GATA)TATA(GATA) TATA(GATA) ₁₂	F:GCCAACAGAGCAAGACTGTC R:GGAAACAGTTAAATGGCCAA	170—210 [10]
P11	D5S820	(GATA) ₆ GATG(GATA) ₁₂	F:ATTGCATGGCAACTCTTCTC R:GTTCTTCAGGGAAACAGAACC	190—218 [21]
P12	D6S493	(TATC) ... (TATC)TN(TATC) ₁₁ ... (TATC)	F:ATCCCAACTCTTAAATGGGC R:TTCCATGGCAGAAATGTTT	236—237 [18]
P13	D10S1432	(TATC) ₃ ATC(TATC) ₉ ATC(TATC) ₂	F:CAGTGGACACTAAACACAATCC R:TAGATTATCTAAATGGTGGATTTCC	157—185 [20]
P14	D20S206	(TCTA)2TTTN(TCTA)TCA(TCTA) ₁₀ ... (TCTA) ₃ (TCTA)TCA(TCTA) ₂	F:TCCATTATTCCCCTCAAACA R:GGTTTGCCATTCAGTTGAGA	163—164 [22]
P15	D2S1326	(ATCT) ₂ ATC(ATCT) ₈ ATT(ATCT) ₉ ATC(ATCT)	F:AGACAGTCAAGAATAACTGCCC R:CTGTGGCTCAAAAGCTGAAT	233—268 [24]
P16	D5S1457	(GATA) ₁₄	F:TAGTTCTGGGCATGTCTGT R:TGCTTGGCACACTTCAGG	97—127 [19]
P17	D7S1826	(TCTA) ₁₀ TCA(TCTA) ₂ TC(TCTA)TCA(TCTA)	F:TATTTCTCCTGTCATCTC R:TTCCCAAAGTCTGCAATC	113 [20]
P18	D11S1366	(TATC) ₂ TG(TATC) ₉ TA(TATC) ₂ ... (TATC) ₁₂	F:GCTACAATGATAGGGAAATAATAGA R:GGTGGATCCTTTGCTATTT	241—242 [20]
P19	D18S851	(TCTA) ... (TCTA) ₂ ... (TCTA) ₁₀	F:CTGTCTCTAGGCTCATTTAGC R:TTATGAAGCACTGATGCCAA	253—254 [20]
P20	D8S1106	(GATA) ... (GATA) ₂ GAT(GATA) ₁₁	F:TTGTTTACCCCTGCATCACT R:TTCTCAGAAATTGCTCATAGTGC	131—150 [23]
P21	D18S72	(CA) ₁₇ CG(CA) ₄	F:GCTAGATGACCCAGTTCCC R:CAAGAGAGCCCTTTGGTTT	193—203 [21]
P22	D6S276	(CA)2TA(CA) ₁₂ TATA(CA) ₃	F:TCAATCAAATCATCCCAGAAAG R:CCTTCTTTGCAGACTGTCACC	119—145 [24]
P23	D2S367	(CA)A(CA) ₂₁	F:TTCTTTGCTCTAAGGGTCAC R:AGCTTCTTCTTCACAGGTGT	137—165 [22]
P24	D11S1984	(GGAA) ... (GGAA) ₁₁	F:GGGTGACAGAGCAAAATTCT R:ACACCTGGATCTTGGACTCA	170—202 [22]

利用 *GeneMarker*(Version 1.71; *Applied Biosystems*) 软件阅读等位基因大小,至少在 2 次重复中都出现 2 个等位基因判为杂合体,在 3 次重复中都或仅一个等位基因出现判为纯合体。考虑到等位基因丢失、错误读取和假等位基因的存在,杂合体中的一个等位基因扩增失败被称为等位基因丢失,假等位基因的定义是峰值

被错认为等位基因,但在其它反应中没有重复。在分析中我们把所有位点相同或者一个等位基因不同的样品判为同一个个体^[25-26]。对于所有位点的个体识别概率 $P(ID)$ 用 GIMLET1.3.3 进行计算。

$$P(ID) = \sum p_{i4} + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

式中, p_i 和 p_j 表示第 i 个和第 j 个等位基因的频率。

利用软件 GENEPOP (version 3.4) 检验各个位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,同时计算有效等位基因数 (N_e)、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和多态信息含量 (PIC),对获得的微卫星标记的基因型数据计算 F_{st} 统计量 (F_{st}) 和 Nei 氏遗传距离。

1.6 粪便样品的性别鉴定

根据灵长类动物的特异性引物^[27] (AmelA 5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3', AmelB 5'-ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG-3') 进行性别鉴定,扩增产物为 106—112 bp,PCR 条件与上述微卫星条件相同,退火温度 58℃,每个扩增设置 3 个重复,并有 1 个雄性、1 个雌性阳性对照和阴性对照(陕西省楼观台野生动物救护站提供)。同样对引物 5' 端前带上 6-FAM 荧光标记的 PCR 产物在 ABI 3730 测序仪上分型分析,并用 GeneMarker (Version 1.71; Applied Biosystems) 软件阅读等位基因大小。同时出现 X 等位基因 (106 bp) 和 Y 等位基因 (112 bp) 的样品被判定为雄性,只出现 X 等位基因 (106 bp) 被判定为雌性。

2 结果

2.1 线粒体 DNA 遗传多样性分析

对采集的 123 份粪便样品和 3 份肌肉样品进行 mtDNA D-loop 区部分序列 PCR 扩增。由于受到粪便样品 DNA 降解迅速等原因的约束,2 个种群粪便样品共成功扩增 45 个,对照微卫星个体识别结果,排除来源于同一个体的可能,共得到线粒体分析用序列:大龙潭小种群 8 个、千家坪小种群 16 个。

经肌肉和粪便样品 mtDNA D-loop 区遗传多样性分析发现,24 个川金丝猴样品的 mtDNA D-loop 序列 401 bp 中包含 27 个变异位点,并由此定义了 20 个单倍型(单倍型序列在 GenBank 数据库中的登录号为: EU790492、EU815061、EU825925—EU825942),2 个种群之间没有共享单倍型(表 2)。单倍型多样性 (h) 为 0.9820,核苷酸多样性 (π) 为 0.0129,千家坪这一小种群 ($h = 0.9830$, $\pi = 0.00972$) 遗传多样性表现比大龙潭人工补食种群 ($h = 0.8930$, $\pi = 0.00846$) 高,以线粒体控制区得到的 $F_{st} = 0.4782$ 。对这 2 个川金丝猴种群的 20 个单倍型采用邻接法构建系统发生树(NJ 树)(图 2),发现单倍型没有形成明显的族群,其中 QJ2 与 DL 种群遗传关系比较密切。

2.2 筛选微卫星位点

所使用的 24 对引物中有 11 对 (45.83%) (P1—P11) 能够成功在川金丝猴肌肉提出的 DNA 样品中扩增。利用筛选到的 11 对微卫星引物,对采集的 123 份粪便样品进行扩增,结果有 117 份样品能够在 9 个位点成功扩增 (95.1%) (P1、P2、P3、P6、P7、P8、P9、P10、P11),其中选取潘登^[10]等实验中的 8 对位点在川金丝猴肌肉 DNA 样品中都能够成功扩增,但在粪便样品扩增时,P4 因为目的片段较长,在粪便样品中不能扩增,P5 在粪便样品中扩增不稳定。在猕猴中选取的 16 对等位基因数较高的微卫星位点,仅有 3 对 (P6、P8、P11) 能在川金丝猴粪便 DNA 样

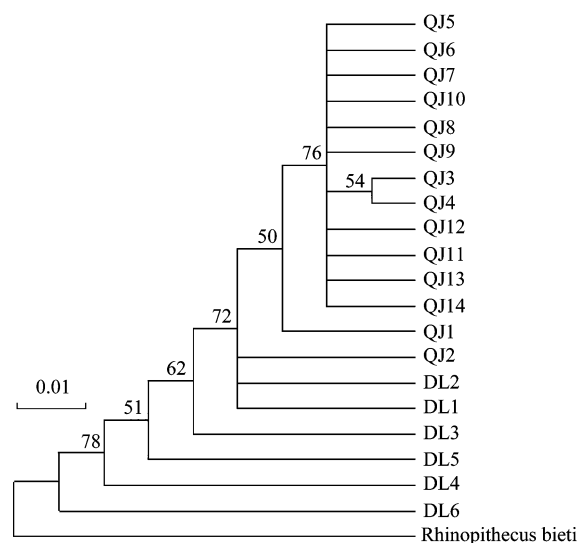


图 2 用邻接法构建的川金丝猴 mtDNA D-loop 区单倍型系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic relationship of the *Rhinopithecus roxellana* mtDNA D-loop haplotypes constructed by the neighbor-joining method

分支上方的数字为经 bootstrap 检测的自引导值,重复次数为 1000 次;以滇金丝猴的同源序列为外群 (GenBank 登录号: DQ661665)

品中成功稳定的扩增。

表 2 川金丝猴 mtDNA D-loop 区部分序列的变异位点、单倍型及分布频率
Table 2 Variable sites and haplotypes distribution of mtDNA D-loop fragment region for *Rhinopithecus roxellana*

种群 Population	单倍型 Haplotype	变异位点 Variation position	千家坪种群 QJ(<i>n</i> = 16)	大龙潭种群 DL(<i>n</i> = 8)
		[1 2223333] [122222334 5555666795 0128999] [6803489128 0123089424 6147458]		
千家坪 Qianjiaping	QJ1	ATGTATATT ATTCTGTATC GGACTAT	1	
	QJ2	 C..... .. A.. A	1	
	QJ3	 C..... AAG.. CA	2	
	QJ4	 C..... AAG... A	1	
	QJ5	T..... .. AAG... A	2	
	QJ6	 AAG... A	1	
	QJ7	 AAG. A. A	1	
	QJ8	 T..... AAG... A	1	
	QJ9	 C. T..... AAG... A	1	
	QJ10	 T.... AG AAG... A	1	
	QJ11	 A... C. AAG.. CA	1	
	QJ12	 AAG.. CA	1	
	QJ13	 AAG.. C.	1	
	QJ14	 AAG....	1	
大龙潭 Dalongtan	DL1	 CA		3
	DL2	 G.. .. CA		1
	DL3	. ACCC—GCC. CA		1
	DL4	. ACCC..... .. CA		1
	DL5	. AC. C..... .. CA		1
	DL6	. A. . C.... G CC... .. CA		1

上方数字表示单倍型相应碱基的位置,圆点表示与第一种单倍型(QJ1)有相同的碱基组成,横线表示缺失

2.3 个体识别、性别鉴定和微卫星位点遗传多样性分析

对成功扩增的 117 份样品进行基因分型分析,大龙潭和千家坪小种群基因分型成功率分别为 85% 和 89%。如果容忍 1 个位点 1 个等位基因的不同(主要为 2 个碱基重复的位点),总共检测到 58 个特有基因型:大龙潭有 25 个,千家坪为 33 个。使用 Y 染色体标记方法,在大龙潭检测到 11 个雄性和 14 个雌性川金丝猴(1:1.3),千家坪检测到 7 个雄性和 26 个雌性川金丝猴(1:3.7)。

9 个微卫星位点在大龙潭和千家坪小种群均表现出不同程度的多态性,各个位点等位基因的频率见表 3。从表 3 可以看出,9 个微卫星位点的平均杂合度在 0.115—1.000 之间变动,其中位点 P6 的基因杂合度最大,位点 P2 的基因杂合度最小,平均为 0.75。多态性信息含量值(PIC)介于 0.165—0.860 之间,P9 最大,P2 最小,平均为 0.60。其中 P3、P6、P8、P9、P10 和 P11 平均 PIC 在 0.5 以上,为高度多态位点;P1 和 P7 平均 PIC 在 0.375—0.484 之间,为中度多态位点;P2 平均 PIC 在 0.25 以下,为低度多态位点。经 Hardy-Weinberg 平衡检验,除 P2、P7 这 2 个位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$),其他 7 个位点均未偏离。9 个位点无偏随机识别概率 $P(ID)$ 为 $1.048e-03$,累计个体鉴别力为 0.99999935。等位基因数和杂合度在大龙潭人工补食种群中都表现的比千家坪小种群低。

神农架大龙潭和千家坪 2 个小种群各位点遗传分化值(F_{st})见表 3,平均值达到 0.0734($P < 0.01$),*Nei* 氏遗传距离为 0.1992。表明这 2 个川金丝猴小种群间已经出现了显著的遗传分化现象。为证明这一结果,本研究进一步用 STRUCTURE 软件对微卫星数据进行贝叶斯聚类分析(图 3)。分支 1(红色部分)的主要组成

来源于大龙潭人工补食种群,分支 2(绿色部分)和分支 3(蓝色部分)的主要组成来源于千家坪小种群,三大分支的分布情况显示千家坪和大龙潭种群仍然存在一定的基因交流。

表 3 2 个川金丝猴群体 9 个位点的遗传信息
Table 3 The genetic information of nine loci in two *Rhinopithecus roxellana* populations

位点 Loci		有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)		期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)		观察杂合度 Observed heterozygosity (H_o)		多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)		遗传分化系数 F-statistics (F_{st})
		DL	QJ	DL	QJ	DL	QJ	DL	QJ	
P1	D6S474	2	3	0.53	0.56	0.50	0.80	0.43	0.47	0.0046
P2	D3S1768	1	1	0.10	0.11	0.11	0.12	0.10	0.23	0.0636
P3	D1S533	3	3	0.54	0.61	1.00	1.00	0.60	0.64	0.0245
P6	D8S505	7	7	0.81	0.78	1.00	1.00	0.79	0.88	0.0013
P7	D15S644	2	3	0.42	0.44	0.77	0.50	0.40	0.46	0.0874
P8	D1S207	4	5	0.60	0.66	1.00	1.00	0.72	0.75	0.0160
P9	D7S1830	6	7	0.79	0.81	0.93	0.98	0.82	0.90	0.1059
P10	D17S1290	5	5	0.48	0.66	0.64	0.73	0.75	0.78	0.1761
P11	D5S820	3	3	0.62	0.62	0.50	0.80	0.50	0.56	0.1316
各群体平均值 Average of all population		3.6	4.1	0.54	0.58	0.72	0.77	0.56	0.63	0.0734
全部位点平均值 Average of all loci		3.85		0.56		0.75		0.60		

3 讨论

3.1 PCR 扩增与基因分型

由于重复序列和包含引物位点的侧翼序列在物种间具有保守性,一个物种的微卫星引物可以用来检测近缘种同源位点的多态性^[28]。本研究选取的猕猴微卫星位点在川金丝猴样品中能成功扩增,也证实了这一点。研究中选择潘登^[10]等实验中的 8 对微卫星位点在川金丝猴肌肉样品中都能够成功扩增,但在粪便样品中扩增时,D11S2002 和 D7S794 分别出现扩增失败和扩增不稳

定的现象,正如 Buchan^[29]指出等位基因的长度与扩增成功率呈现明显的负相关,对于粪便样品宜选用片段长度较短的位点。在猕猴中选取的 16 对微卫星引物有 3 对(D5S820,D8S505,D1S207)能够成功稳定的扩增,这为今后川金丝猴种群遗传学研究补充了更多的多态性位点。在位点 D3S1768,潘登^[10]等检出了很好的多态,与本实验的结果不一致。可能是由于本实验采集的样品是孤立的 2 个小种群,已经在群内发生了近亲交配,导致此位点丧失了遗传多样性。而潘登等采集的实验样品来自川金丝猴各不同分布区,群间可以检出多态。研究中线粒体引物扩增成功率远低于微卫星引物,这可能是由于川金丝猴粪便样品在野外暴露的时间过长、受到雨水冲刷,使得粪便 DNA 降解严重,由于低浓度的模板和抑制物对 Taq 酶活性的影响而导致 PCR 扩增失败,因此,野外时间过长的粪便样品不宜用于较长目的片段基因的分析。

在非损伤性研究中,存在较多的等位基因丢失和假等位基因现象,这些可能是由于非目标 DNA、目标 DNA 质量和数量较低、以及 PCR 抑制等造成的^[30]。一般认为 PCR 重复的次数越多,结果越可靠,误判率越低。本研究通过至少 3 次重复 PCR,得到有效读数次数 3 次,正确判断等位基因,尽量降低错误等位基因的产生,2 个种群粪便样品在 9 对引物中基因分型成功率分别达到 85% 和 89%,与其它的非损伤性研究基本一致^[31]。

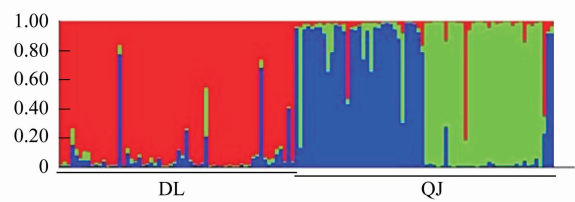


图 3 STRUCTURE 软件推断 2 个川金丝猴种群分化分布情况
Fig.3 Proportion of membership of two *Rhinopithecus roxellana* populations inferred clusters obtained from STRUCTURE

3.2 种群遗传多样性

本研究 9 个微卫星位点匹配修正后获得 58 个独立的基因型, Waits 指出利用基因分型对于种群遗传的研究, 要求无偏随机识别概率 $P(ID)$ 低于或等于 0.01^[32], 本研究选用的位点识别概率 $P(ID)$ 为 $1.048 \times 10^{-3} < 0.01$, 满足种群遗传多样性研究的基本要求。经 Hardy-Weinberg 平衡检验得知: 除 D3S1768, D15S644 这 2 个位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$), 其余位点都未偏离, 可能的原因在于: (1) Hardy-Weinberg 平衡适用于随机交配的大种群, 不适合于小种群; (2) 存在无效等位基因的现象; (3) 杂合度缺乏导致偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

平均杂和度 (He) 是度量种群遗传变异程度的一个最适参数, 多态信息含量 (PIC) 是衡量片断多态性的较好指标^[33], 本研究所使用的 9 个微卫星位点所获得的数据来看, 神农架川金丝猴种群平均多态信息含量 (PIC) 为 0.5950 ($PIC > 0.5$), 表现为高度多态。观察杂合度 ($Ho = 0.75$) 比潘登等^[10]对川金丝猴所做的微卫星研究结果中神农架川金丝猴 ($Ho = 0.55$) 要高, 同时线粒体高变区情况类似 ($h = 0.982, \pi = 0.0129$), 明显高于孟加拉蜂猴 (*Nycticebus bengalensis*) 和倭蜂猴 (*Nycticebus pygmaeus*)^[34], 表明神农架川金丝猴存在着丰富的遗传多样性。由于目前 D8S505、D1S207、D5S820 没有川金丝猴的类似研究报道, 所以无法进行比较, 但其余 6 个微卫星位点在潘登等人^[10]的研究中有过报道, 利用这 6 个位点获得的实验数据将神农架川金丝猴种群与岷山和秦岭种群比较, 发现神农架种群遗传多样性仍然表现的较岷山和秦岭低 (表 4), 应予以优先保护。

表 4 神农架保护区川金丝猴与岷山、秦岭种群 6 个位点遗传信息比较

Table 4 Comparison of six loci genetic information between Minshan populations, Qingling populations and Shennongjia Nature Reserve of *Rhinopithecus roxellana* populations

位点 Loci	岷山群体 Minshan populations			秦岭群体 Qingling populations			神农架群体 Shennongjia populations		
	Ne	He	Ho	Ne	He	Ho	Ne	He	Ho
D1S533	6	0.80	0.88	6	0.77	0.55	3	0.58	1.00
D7S1830	6	0.41	0.80	6	0.58	0.80	6	0.80	0.95
D17S1290	5	0.78	0.82	5	0.67	0.92	5	0.57	0.69
D6S474	4	0.70	0.59	6	0.78	0.83	2	0.55	0.65
D15S644	7	0.85	0.81	6	0.75	0.67	3	0.43	0.64
D3S1768	6	0.82	0.88	5	0.49	0.33	1	0.11	0.12
全部位点平均值 Average of all loci	5.7	0.73	0.80	5.7	0.67	0.68	3.3	0.51	0.67

Ne : Effective number of alleles; He : Expected heterozygosity; Ho : Observed heterozygosity

微卫星和线粒体两种分子标记均显示大龙潭人工补食种群遗传多样性要低于千家坪这一小种群 (表 2 和表 3), 24 个神农架川金丝猴 401 bp mtDNA D-loop 区中检测出 27 个变异位点, 其中大龙潭 (13 个) 占整个神农架种群的 48.1%, 表明大龙潭人工补食种群是整个神农架种群遗传多样性的重要组成部分, 它的丧失将对整个神农架种群的遗传多样性构成直接的威胁。目前大龙潭川金丝猴平均核苷酸多样性 π 值虽然很低 ($\pi = 0.00846$), 但还在哺乳动物个体的平均核苷酸多样性范围 (0.3%—4%) 之间, 说明大龙潭这一人工补食的小种群, 目前仍然满足保种最低要求的有效种群数。

本研究首次使用一对 Y 染色体微卫星标记引物, 成功对川金丝猴进行了性别鉴定, 结果显示川金丝猴大龙潭人工补食种群雌雄比例为 1.3:1, 而千家坪小种群检测到雌雄比例为 $> 3:1$, 造成这种雌雄比例的原因有很多, 大龙潭人工补食种群据报道存在一个全雄单元^[35], 但由于野外取样很难获得全群粪便样本, 上述雌雄比例并不能完全意义上代表一个野生川金丝猴种群的雌雄数量比。针对野生灵长类性别鉴定, 该方法科学可靠、简便易行, 对 DNA 要求低, 特别适合于粪便 DNA 的分析, 打破了利用染色体和性激素进行性别鉴定的常规分析方法, 为川金丝猴今后大范围的种群性别鉴定开辟了一条新的途径。

3.3 种群遗传结构

微卫星和线粒体序列数据均表明神农架这 2 个小种群间已经出现了明显的遗传分化。微卫星数据得出

种群间遗传分化值($F_{st} = 0.0734$)虽然很小,但是已经达到显著水平($P < 0.01$),线粒体控制区得到的遗传分化参数($F_{st} = 0.4782$)要高于微卫星标记的结果,这可能是由于微卫星出现的无效等位基因所致,也显示出 mtDNA 测序分析法在检测种群遗传分化上更为灵敏。同时 Tajima's D 和 Fu and Li's D 两种中性检验,结果显示均为负值(Tajima's D = -1.08200 & Fu and Li's D = -1.63419),进一步验证这 2 个种群存在遗传分化。造成这种遗传分化的原因可能在于(1)受森林采伐和栖息地破碎化的影响,导致这 2 个小种群迁移至这 2 块样地,发生了明显的种群隔离。(2)大龙潭川金丝猴相比千家坪种群在数量上少^[35-36],是由亲缘关系较近的家庭单元组成。

千家坪和大龙潭小种群 mtDNA D-loop 区片段检测结果显示 $Nm = 0.54545$,表明目前这 2 个小种群间还存在着一定的基因流,微卫星数据进行的贝叶斯聚类分析(图 3)也证明基因交流仍然存在。对于一个异质种群来说,若各局部种群间没有或只存在很小的基因流时,则局部种群越小遗传多样性丧失得越快^[37]。倘若对大龙潭小种群常年进行人工补食,将会导致失去很多与其他种群基因交流的机会,近交概率上升,个体将趋向于亲缘化,致使一些等位基因发生丢失,位点杂合度和多态信息含量降低,局部种群间的遗传分化也会越大。

3.4 保护措施建议

虽然本研究在神农架 2 个川金丝猴小种群中检测到丰富的遗传多样性,但是同样也检测到显著的群体隔离和分化。因此,需要采取有效的措施来维持和增加神农架川金丝猴的遗传多样性。(1)本研究 2 个川金丝猴小种群建议可作为不同管理单元(Management Unit, MU)进行同步保护,分别监测每个种群的动态,以保护不同管理单元中独特的遗传多样性;(2)在神农架国家级自然保护区的尺度上,追踪监测川金丝猴各小种群之间的动态变化,包括其活动规律、种群数量消长的变化趋势、食性特点、繁殖方式及与环境的关系等,建立种群档案;(3)结合“3S”技术和多元统计方法,探寻造成神农架川金丝猴小种群间的隔离因素,减缓或去除这些隔离因素,使不同种群间的基因交流不存在空间障碍。包括有计划的恢复一些对基因流有重大影响的栖息地,提高现有栖息地的适宜性;对新发现的金丝猴栖息地,应汇同属地管理部门,协商将其纳入神农架保护区加以保护;对于无法进行恢复的栖息地,建议在孤立的小种群间创建生态走廊,使种群间基因流得到自由扩散;(4)对大龙潭人工补食种群应制定严格的保护措施,避免人猴共患疾病对整个猴群产生不利的影响。加强这个小种群的日常管理,改善生存环境、提高生殖率,维持这一小种群的遗传稳定性,大龙潭人工补食种群与神农架其他川金丝猴种群关系及对其造成的影响等都有待深入研究。

致谢: 本研究样品的采集得到中国林业科学研究院森林环境与保护研究所苏化龙研究员和马强副研究员的帮助,神农架国家级自然保护区提供大力支持,特此致谢。

References:

- [1] Quan G Q, Xie J B. Research on the Golden Monkey. Shanghai: Shanghai Science & Technology Education Publishing House, 2002.
- [2] Wang S, Feng Z J, Hu J C. China Red Data Book of Endangered Animals. Beijing: Science Publishing House, 1998: 59-65.
- [3] Peng Y Z. China's Golden Monkey. Bulletin of Biology, 1994, 23(6): 1-4.
- [4] Schwartz M K, Luikart G, Waples R S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology and Evolution, 2007, 22: 25-33.
- [5] Waits L P, Paetkau D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. Wildlife Management, 2005, 69(4): 1-14.
- [6] Gyapay G J, Morissette A, Vignal C. The 1993 - 1994 G  n  thon human genetic linkage map. Nature Genetics, 1994, 7: 246-339.
- [7] Zhang Y G, Li D Q, Rao L Q, Xiao Q M, Liu D. Identification of polymorphic microsatellite DNA loci and paternity testing of Amur tigers. Acta Zoologica Sinica, 2003, 49(1): 118-123.
- [8] Li M, Wei F W, Rao G, Fang S G, Feng Z J. Application of noninvasive sampling in conservation genetics. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(3): 338-342.
- [9] Wei F W, Rao G, Li M, Fang S G, Feng Z J. Molecular scatology and its application-reliability, limitation and prospect. Acta Theriologica Sinica, 2001, 21(2): 143-151.

- [10] Pan D, Li Y, Hu H X, Meng S J, Men Z M, Fu Y X, Zhang Y P. Microsatellite polymorphisms of Sichuan golden monkeys. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(24): 2850-2855.
- [11] Pan D, Hu H X, Meng S J, Men Z M, Fu Y X, Zhang Y P. A High polymorphism level in *Rhinopithecus roxellana*. International Journal of Primatology, 2009, 30(2): 337-351.
- [12] Zhu Z Q, Song C S. Scientific Survey of the Shennongjia Nature Reserve. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999: 197-215.
- [13] Zhu Z Q, Song C S. Scientific Survey of the Shennongjia Nature Reserve. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999: 87-93.
- [14] Zhu Z Q. Ecological for Golden Monkeys in Shennongjia. Hubei Forestry Science and Technology, 2003, (S1): 46-52.
- [15] Yang J Y, Liao M Y, Yu H L, Yao H. Protection and research status of Golden Monkeys in Shennongjia. World Science Technology & Development, 2008, 30(4): 418-421.
- [16] Rao G, Li M, Niu Y D, Wang J, Wei F W, Fang S G. A new method for DNA extraction from dried skins. Chinese Journal of Zoology, 2001, 36(4): 53-57.
- [17] Liu Z J, Li M, Ren B P, Gou J X, Pan R L, Su Y J, Funk S M, Wei F W. Phylogeography and population structure of the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) inferred from mitochondrial control region DNA sequence analysis. Molecular Ecology, 2007, 4: 294-300.
- [18] Uno H, Alsum P, Zimbric S M L. Colon cancer in aged captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). American Journal of Primatology, 1998, 44(1): 19-27.
- [19] Morin P A, Kanthaswamy S, Smith D G. Simple sequence repeat (SSR) polymorphisms for colony management and population genetics in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Primatol, 1997, 42(3): 199-213.
- [20] Smith D G, Kanthaswamy S, Viray J. Additional highly polymorphic microsatellite (STR) loci for estimating kinship in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Primatol, 2000, 50(1): 1-7.
- [21] Shalini N, James H, Jeffrey R. Nineteen new microsatellite DNA polymorphisms in Pigtailed Macaques (*Macaca nemestrina*). Primates, 2000, 41(3): 343-350.
- [22] Teruki O, Osamu T. Wild Gibbons' Parentage tested by Non-invasive DNA sampling and PCR-amplified Polymorphic Microsatellites. Primates, 2001, 42(1): 67-73.
- [23] Sreetharan K, Jennifer D, Kurushima D G S. Inferring Pongo conservation units: a perspective based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. Primates, 2006, 47: 310-321.
- [24] Andrade M C, Penedo M C, Ward T, Silva V F, Bertolini L R, Roberts J A, Leite J, Cabello P H. Determination of genetic status in a closed colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Primates, 2004, 45: 183-186.
- [25] Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D A. Estimating population size of elusive animals using DNA from hunter-collected feces: comparing four methods for brown bears. Conservation Biology, 2005, 19(1): 150-161.
- [26] Zhan X J, Li M, Zhang Z J, Goossens B, Chen Y, Wang H. Molecular censusing doubles giant Panda population estimate in a key nature reserve. Current Biology, 2006, 16(12): 451-452.
- [27] Brenda J B, Karen E C, Linda V. Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. Conservation Genetics, 2001, 2: 178-181.
- [28] Cai Q X, Lin L, Pan W J, Luo S J, Zhang L. Screening microsatellite DNA markers and genetic variation analysis of wild Asian elephant population in Mengyang Nature Reserve. Acta Theriologica Sinica, 2008, 28(2): 126-134.
- [29] Buchan J C, Archie E A, Van Horn R C, Cynthia J, Moss-Susan C. Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. Molecular Ecology Notes, 2005, 5(3): 680-683.
- [30] Taberlet P, Waits L P, Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology Evolution, 1999, 14: 323-327.
- [31] Broquet T, M nard N, Petit E. Noninvasive population genetic: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conservation Genetics, 2007, 8: 249-260.
- [32] Waits L P, Luikart G, Taberlet P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology, 2001, 10(1): 249-256.
- [33] Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [34] Pan D, Chen J H, Groves C, Wang Y X, Narushima E, Fitch-Snyder H, Crow P, Jingong X, Thanh V N, Ryder O. Mitochondrial control region and population genetic patterns of *Nycticebus bengalensis* and *N. pygmaeus*. International Journal of Primatology, 2007, 28: 791-799.
- [35] Bi S Q, Bi J H, Huang Y, Tie J. Preliminary observation of diurnal activity of a provisioning group of Golden Monkey (*Rhinopithecus roxellana*) in spring on Dalongtan of Shennongjia. Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition), 2008, 37(4): 546-549.
- [36] Su H L, Ma Q, Lin Y H, Chen Q M, Qiao Y G, Tan M F. Survey on population of the Golden Monkey (*Rhinopithecus roxellana*) at Badong

County, Hubei. *Acta Theriologica Sinica*, 2004, 24(1): 84-87.

[37] Allendorf F W. Gene flow and genetic differentiation among populations. *Genetics and Conservation*, 1983, 18(3): 51-65.

参考文献:

- [1] 全国强, 谢家骅. 金丝猴研究. 上海: 上海科技教育出版社, 2002.
- [2] 汪松, 冯祚建, 胡锦矗. 中国濒危动物红皮书. 北京: 科学出版社, 1998: 59-65.
- [3] 彭燕章. 中国金丝猴. *生物学通报*, 1994, 23(6): 1-4.
- [7] 张于光, 李迪强, 饶力群, 肖启明, 刘丹. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用. *动物学报*, 2003, 49(1): 118-123.
- [8] 李明, 魏辅文, 饶刚, 方盛国, 冯祚建. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. *动物学报*, 2001, 47(3): 338-342.
- [9] 魏辅文, 饶刚, 李明, 方盛国, 冯祚建. 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): 143-151.
- [12] 朱兆泉, 宋朝枢. 神农架自然保护区科学考察集. 北京: 中国林业出版社, 1999: 197-215.
- [13] 朱兆泉, 宋朝枢. 神农架自然保护区科学考察集. 北京: 中国林业出版社, 1999: 87-93.
- [14] 朱兆泉. 神农架金丝猴生态学研究. *湖北省林业科技*, 2003, (S1): 46-52.
- [15] 杨敬元, 廖明尧, 余辉亮, 姚辉. 神农架金丝猴保护与研究现状. *世界科技研究与发展*, 2008, 30(4): 418-421.
- [16] 饶刚, 李明, 牛屹东, 王静, 魏辅文, 方盛国. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. *动物学杂志*, 2001, 36(4): 53-57.
- [28] 蔡清秀, 林柳, 潘文婧, 罗述金, 张立. 勤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*, 2008, 28(2): 126-134.
- [35] 毕帅奇, 毕俊怀, 黄英, 铁军. 神农架大龙潭投食点川金丝猴群春季日活动情况的初步观察. *内蒙古师范大学学报*, 2008, 37(4): 546-549.
- [36] 苏化龙, 马强, 林英华, 陈千名, 乔云高, 谭明凤. 湖北省巴东县小神农架地区川金丝猴的种群调查. *兽类学报*, 2004, 24(1): 84-87.