

# 雪豹的微卫星 DNA 遗传多样性

周芸芸<sup>①②</sup> 朵海瑞<sup>③</sup> 薛亚东<sup>②</sup> 李迪强<sup>②</sup> 冯金朝<sup>①</sup> 张于光<sup>②\*</sup>

① 中央民族大学生命与环境科学学院 北京 100081; 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; ③ 北京林业大学自然保护区学院 北京 100083

**摘要:** 利用微卫星 DNA 标记, 对来自青海囊谦县、治多县以及甘肃阿克塞县 3 个地区的 36 份雪豹 (*Panthera uncia*) 粪便 DNA 样品进行了遗传多样性研究。结果显示, 在 8 个微卫星位点上共检测到 57 个等位基因, 有效等位基因数为 2.190 ~ 5.488, 平均每个位点的等位基因数为 7.130, 基因频率分布不均匀; 期望杂合度为 0.543 ~ 0.847, 平均 0.759; 多态信息含量为 0.458 ~ 0.829, 平均 0.722; 表明这 8 个微卫星位点均为高度多态性位点, 有较丰富的遗传多样性。3 个样地雪豹居群之间的遗传距离与地理距离相关, 地理距离最近的青海省囊谦县和治多县的雪豹居群遗传距离最小。根据雪豹平均遗传分化度  $F_{st}$  (0.053)、平均基因流 (4.488) 以及 STRUCTURE 聚类分析结果 (当  $K = 1$  时,  $\ln P(D)$  值最大), 推测 3 个居群间虽然有一定的遗传距离, 但均来自同一个种群, 暂无分化现象。

**关键词:** 雪豹; 粪便 DNA; 微卫星 DNA 标记; 遗传多样性; 遗传结构

**中图分类号:** Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 02-161-08

## Genetic Diversity Analysis of Microsatellite DNA in Snow Leopard (*Panthera uncia*)

ZHOU Yun-Yun<sup>①</sup> DUO Hai-Rui<sup>③</sup> XUE Ya-Dong<sup>②</sup> LI Di-Qiang<sup>②</sup> FENG Jin-Chao<sup>①</sup>  
ZHANG Yu-Guang<sup>②\*</sup>

① College of Life and Environment Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081; 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; ③ College of Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083

**Abstract:** The snow leopard (*Panthera uncia*) is a globally endangered and threatened species, and study on this species has been hampered due to its unique ecological characteristics and remote habitat. In the present study, putative snow leopard scats were collected from areas including Nangqian (Qinghai), Zhiduo (Qinghai) and Akesai (Gansu). A total of 36 snow leopard individuals, which were identified by mitochondrial DNA fragment (Cyt *b*) and microsatellite DNA markers, were used to analyze the genetic diversity and genetic structure by 8 microsatellite DNA loci (Table 1). All the data were analyzed by the softwares including

**基金项目** 自然保护区生物标本资源共享平台项目 (No. 2005DKA21404) ;

\*通讯作者, E-mail: yugzhang@sina.com.cn;

**第一作者介绍** 周芸芸, 女, 博士研究生; 研究方向: 分子生态学; E-mail: zyycici@163.com。

收稿日期: 2014-05-15, 修回日期: 2014-10-13 DOI: 10.13859/j.cjz.201502001

GenAlex, GENEPOP, POPGENE, FSTAT, MIGRATE and STRUCTURE. The index of genetic diversity on 8 microsatellite loci observed in 3 snow leopards' groups was showed in Table 2. A total of 57 alleles were detected, and the mean number of alleles ( $A$ ) was 7.130. The effective number of alleles ( $N_e$ ) ranged from 2.190 to 5.488, with uneven allelic frequency distribution. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged from 0.543 to 0.847, with an average value of 0.759. And the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.458 to 0.829, with an average value of 0.722. All above data indicate that the selected microsatellite DNA markers are highly polymorphic loci with relatively rich genetic diversity in these snow leopard groups. Genetic distances are correlated with geographical distances among populations: the genetic distance of two snow leopards' groups in Qinghai is closer than that between Qinghai groups and Akesai (Gansu) group. The index of  $F_{st}$  (0.053), the index of  $N_m$  (4.488) and the result from the Structure software (Fig. 1) showed that such 3 snow leopards' groups have not been divided and should be viewed as one population.

**Key words:** Snow leopard (*Panthera uncia*); Fecal DNA; Microsatellite DNA marker; Genetic diversity; Genetic structure

雪豹 (*Panthera uncia*) 隶属食肉目 (Carnivora) 猫科 (Felidae) 豹属, 是国际关注的濒危物种 (Jackson et al. 2005)。雪豹仅分布在中亚高山地区, 目前我国雪豹数量大约有 2 000 ~ 2 500 只, 约占全球总数的 1/2 (Riordan et al. 2010), 其中青藏高原是我国雪豹的重要分布区 (Schaller et al. 1988, McCarthy et al. 2003)。由于雪豹活动于人迹罕至的高海拔地区、行为隐蔽, 其种群数量、分布区域以及生存状态等相关研究还较少, 且大都缺少直接、定量的研究数据 (McCarthy 2000, Sunquist et al. 2002, Ale et al. 2007, McCarthy et al. 2008, Xu et al. 2010)。

基于非损伤性采样的微卫星 DNA 遗传标记等分子生物学方法已被广泛应用于濒危物种的保护遗传学相关研究 (张于光等 2004, Waits et al. 2005, Schwartz et al. 2007, Narum et al. 2008)。许多研究者已成功通过粪便 DNA 进行野生动物物种鉴定、性别确定、种群数量调查和保护管理单元的确定等研究 (Waits et al. 2005, Saito et al. 2008, 何丽等 2010, Chang et al. 2012, 杨帆等 2012)。目前, 国内外已有研究者用粪便 DNA 对雪豹进行了物种鉴定和个体识别等初步探索, 并证明了其可行性 (Waits et al. 2007, Janečka et al. 2008, 张于光

等 2009, Janečka et al. 2011, Koiralaab et al. 2012, Rodgers et al. 2013, 周芸芸等, 2014)。

本研究将对来自青藏高原的青海囊谦县、治多县和甘肃党河南山地区3个地区的雪豹粪便DNA, 利用筛选的微卫星DNA多态性位点进行雪豹种群遗传多样性研究, 试图了解研究区域雪豹的遗传多样性现状, 为雪豹种群研究和制定保护政策提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

研究材料来自于青海三江源国家级自然保护区的囊谦县、治多县和甘肃省阿克塞县的 3 个区域, 36 份样品是已经鉴定为不同雪豹个体的 DNA 样本, 其中囊谦县样品 7 份、治多县样品 15 份、甘肃省阿克塞县样品 14 份 (周芸芸等 2014)。

### 1.2 微卫星 PCR 扩增及分型

参照 Waits 等 (2007) 和 Janečka 等 (2008) 扩增筛选的微卫星引物, 本研究筛选出 8 对具有高度多态性的微卫星引物 (表 1) 进行雪豹样品的微卫星 DNA 基因分型分析, 分别选用 FAM 和 HEX 对单侧引物 5' 端进行荧光标记。PCR 扩增体系和反应条件见周芸芸等 (2014)。所有粪便 DNA 设置 3 次 PCR 扩增重复, PCR

表 1 8 个微卫星位点信息

Table 1 The information of the 8 microsatellite loci

位点 Loci	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	片段长度 (bp) Size	位点的染色体位置 Locus chromosome position	退火温度 (°C) Annealing temperature
FCA077	F: GGCACCTATAACTACCAGTGTGA R: ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG	141 - 147	C2	53
FCA100	F: TAGATTGAACCCAAAGAAAAAGA R: ATTTTCAGTCCTTCTGTCCC	112 - 120	A1 <sup>a</sup>	52
FCA126	F: GCCCCTGATACCCTGAATG R: CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	143 - 163	B1 <sup>d</sup>	54
FCA132	F: ATCAAGGCCAACTGTCCG R: GATGCCTCATTAGAAAAATGGC	164 - 172	D3	50
FCA171	F: CGGCACCTACAGACGGAC R: AGTAGCTTAGCAGCCAAGCG	101 - 109	A3 <sup>c</sup>	52
FCA187	F: CCAACTGAACCACCCAGG R: TGGATGGTTGTATTCTTCCTCA	162 - 170	B4	52
FCA229	F: CAAACTGACAAGCTTAGAGGGC R: GCAGAAGTCCAATCTCAAAGTC	158 - 168	A1	52
FCA275	F: TTGGCTGCCAGTTTTAGTT R: ACGAAGGGGCAGGACTATCT	121 - 133	B2	52

位点染色体位置指微卫星位点在猫科动物的染色体位置, 染色体具体描述见 Waits 等 (2007)。

Locus chromosome position is the specific Feline chromosome the SSR belonged to, and chromosome names were delineated via Waits et al. (2007).

产物利用 ABI 3730 测序仪进行分型分析, 并用 GeneMarker (Version1.71) 软件读取等位基因大小, 采用 Bellemain 等 (2005) 微卫星基因分型的标准确定杂合位点与纯合位点。

### 1.3 数据统计与分析

利用 Micro-checker V2.2.3 软件 (Oosterhout et al. 2004) 检验每个位点的无效等位基因频率 (null allele frequency)。利用软件 GenAlex (Version 6.5) (Peakall et al. 2012) 和 GENEPOP (Version4.0) (Rousset 2008) 计算微卫星的等位基因数 (number of allele)、等位基因频率 (allelic frequency)、有效等位基因数 (number of effective allele)、观察杂合度 (observed heterozygosity)、期望杂合度 (expected heterozygosity)、多态信息含量 (polymorphic information content), 并检验各个位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。Nei's 遗传距离用 POPGENE3.2 软件 (Yeh et al. 2000) 计算。

所有群体内各个亚群体的固定系数 (fixation index resulting from comparing subpopulations to the total population,  $F_{st}$ ) 由 FSTAT (Version 2.9.3.2) (Goudet 2002) 计算。用 MIGRATE 2.1.3 软件包 (Beerli et al. 2001) 来计算基因流  $N_m$ 。

利用 Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) 分析种群遗传结构, 采用常用的贝叶斯聚类分析法。本研究假定 1~5 个组, 即遗传独特的种群数 (population clusters, K) 设置为 1~5, 每个 K 值重复运算 10 次, 马尔科夫链长度和舍弃值分别为 1 000 000 和 100 000, 取概率对数值 (lnP(D)) 最高时对应的 K 值。

## 2 结果

### 2.1 遗传多样性分析

8 对微卫星引物在 3 个雪豹居群中共检测到 57 个等位基因, 平均每个位点的等位基因数为 7.13, 各位点在不同居群中的等位基因范围为 4~8 (表 2)。其中 FCA77 和 FCA275 位点

表 2 3 个雪豹居群 8 个位点的遗传信息

Table 2 The genetic information of 8 microsatellite loci observed in 3 *Panthera uncia*'s groups

位点 Locus	等位基因数 Number of allele			期望杂合度 Expected heterozygosity			观察杂合度 Observed heterozygosity			多态信息含量 Polymorphic information content		
	ZD	NQ	AKS	ZD	NQ	AKS	ZD	NQ	AKS	ZD	NQ	AKS
FCA275	8	8	7	0.784	0.847	0.781	0.615	1.000	1.000	0.754	0.829	0.751
FCA229	6	4	6	0.818	0.700	0.772	0.800	1.000	0.615	0.783	0.645	0.743
FCA126	4	6	6	0.660	0.776	0.788	1.000	1.000	0.857	0.597	0.744	0.756
FCA100	5	6	6	0.756	0.806	0.799	1.000	0.714	0.769	0.718	0.778	0.768
FCA77	5	6	7	0.699	0.806	0.740	0.857	1.000	0.636	0.657	0.777	0.715
FCA132	7	6	6	0.793	0.755	0.801	1.000	1.000	0.857	0.763	0.717	0.773
FCA187	4	4	6	0.543	0.684	0.796	0.714	0.714	0.714	0.458	0.626	0.765
FCA171	6	5	6	0.811	0.722	0.769	1.000	0.667	0.692	0.783	0.680	0.739
各群体平均值 Average in a group	5.625	5.625	6.250	0.733	0.762	0.781	0.873	0.887	0.768	0.689	0.725	0.751
全部位点 平均值 Average in all	5.830			0.759			0.843			0.722		

ZD. 青海省治多县; NQ. 青海省囊谦县; AKS. 甘肃省阿克塞县。

ZD. Zhiduo Country, Qinghai Province; NQ. Nangqian Country, Qinghai Province; AKS. Akesai Country, Gansu Province.

具有最多的等位基因数量, 均检测到 8 个等位基因。各等位基因分布频率不平衡, 频率高的等位基因相对比较集中, 少数等位基因频率低, 如 FCA132 位点中的两个低频率等位基因 170 bp、172 bp, 频率分别仅为 0.067、0.077, 且这两个低频率等位基因未在青海囊谦县居群中出现。3 个雪豹居群在这 8 个微卫星位点上的有效等位基因数为 2.190 ~ 6.545, 平均 4.376; 期望杂合度为 0.543 ~ 0.847, 观察杂合度为 0.615 ~ 1.000, 平均值分别为 0.759 和 0.843; 多态信息含量都达到了高度多态, 在 0.597 ~ 0.829 之间。具体遗传信息见表 2。

在 Hardy-Weinberg 平衡检测中, 甘肃阿克塞群体在位点 FCA229、FCA100、FCA187 和 FCA77 的平衡检测中具有显著的偏离 ( $P < 0.05$ ); 青海治多县群体的位点 FCA126 具有显著的偏离 ( $P < 0.05$ ); 青海囊谦县群体的位点 FCA100 具有显著的偏离 ( $P < 0.05$ ); 将所有雪豹个体作为一个整体, 在位点 FCA126、FCA100、FCA77、FCA187 的检测中存在显著的偏离 (表 3)。

## 2.2 遗传结构分析

3 个雪豹居群, 甘肃阿克塞居群与位于青海囊谦县居群和治多县居群的遗传距离分别为 0.315 和 0.306, 遗传相似性分别是 0.730 和 0.737, 青海省囊谦县居群与治多县居群间遗传距离和遗传相似性分别为 0.306 和 0.755。雪豹的平均遗传分化度  $F_{st}$  为 0.053, 平均基因流为 4.488。Structure 软件对 3 个雪豹居群 8 个微卫星位点的遗传结构进行分析, 当  $K = 1$  时,  $\ln P(D)$  (后验概率的自然对数) 值最大 (图 1)。

## 3 讨论

微卫星位点大多位于核基因的非编码区, 属于中性遗传标记, 呈双亲遗传, 近年来的研究表明, 使用微卫星 DNA 分子标记能真实反映濒危物种遗传多样性的现状和地理分布格局 (Zhang et al. 2003, Wan et al. 2004)。应用粪便 DNA 进行微卫星的个体识别与遗传多样性分析, 缺陷是会出现微卫星位点上等位基因的缺失和错误等位基因。在个体同一性认定时会因为一个或几个等位基因而被错误地排除, 有研究已表明基因型的错误可使种群大小的估计比实际种群数量高出 2 倍 (Waits et al. 2000)。

表 3 8 个微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡检测  
Table 3 The test of Hardy-Weinberg equilibrium of 8 microsatellites loci

位点 Loci	甘肃阿克塞县 Akesai in Gansu	青海治多县 Zhiduo in Qinghai	青海囊谦县 Nangqian in Qinghai	整体 Total
FCA275	0.833	0.734	0.781	0.114
FCA229	0.038*	0.437	0.710	0.579
FCA126	0.171	0.035*	0.423	0.017*
FCA100	0.028*	0.147	0.035*	0.040*
FCA77	0.023*	0.123	0.246	0.025*
FCA132	0.801	0.428	0.098	0.107
FCA187	0.019*	0.780	0.358	0.016*
FCA171	0.169	0.098	0.393	0.470

\*表示  $P < 0.05$ , 差异显著。\* Stands for  $P < 0.05$ , indicates significant differences.

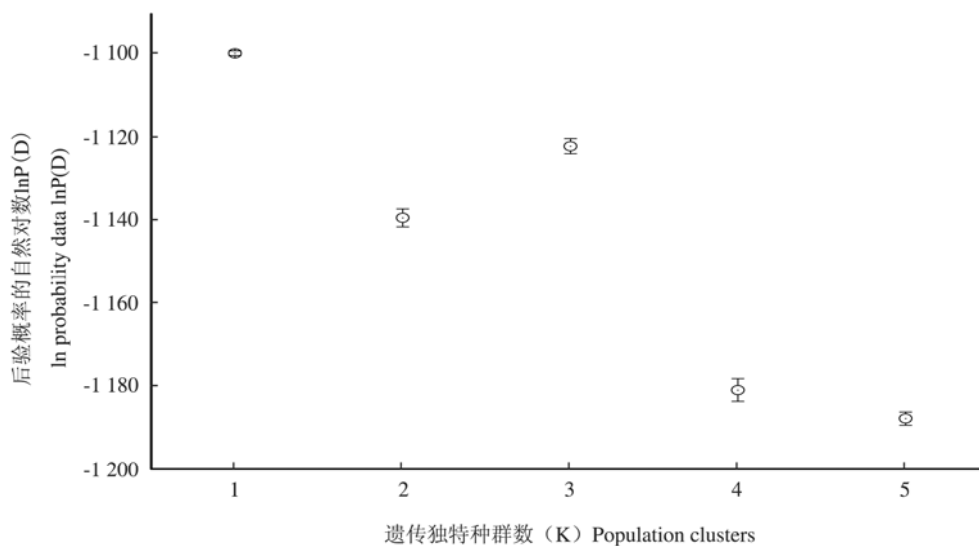


图1 后验概率自然对数 (lnP(D)) 与遗传独特种群数 (K) 的散点图 (平均值 ± 标准差)

Fig. 1 Scatter plot of ln probability data (lnP(D)) and population clusters (K) (Mean ± SD)

本研究参照 Bellemain 等 (2005) 微卫星基因分型的标准: 粪便样品重复扩增 3 次后, 仅出现 1 个等位基因的, 认为是纯合位点, 出现 2 个不同的等位基因时判定为杂合位点。实验中所有样品的每一引物都有 3 次 PCR 扩增重复, 只有在 2 次或 2 次以上都有相同结果才会得以确定, 尽可能减少实验误差。无效等位基因检测显示, 8 个微卫星位点在样本中未发现无效等位基因。

根据微卫星选择标准, 每个微卫星标记至

少应有 4 个等位基因才能更好的用于遗传多样性评估 (Barker 1994), 本研究所选用的 8 个微卫星位点获得 57 个等位基因位点, 每个位点检测到 6 ~ 8 个等位基因, 符合以上要求。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 (田新民等 2010)。本研究中雪豹的有效等位基因数为 2.190 ~ 5.488, 较实际等位基因数小。低频率的等位基因可能随着遗传

漂变和近亲交配,在未来种群发展中存在较大的等位基因丢失风险,进而导致基因减少、杂合性降低,使种群的生存力不断下降。这些频率低的稀有等位基因是进化过程中所积累的遗传变异,能增加对生活环境的适应能力,但是又会因为各种原因存在丢失的风险,这也是保持物种遗传多样性的重要方面。

杂合度能反应各群体在多个座位上的遗传变异,是度量群体遗传多样性的最适参数之一。本研究中,期望杂合度为0.543~0.847,平均期望杂合度为0.759。与Waits等(2007)在雪豹微卫星位点研究中的结果相当;与尼泊尔(0.579)(Karmacharya et al. 2011)、蒙古国(0.51)(Janečka et al. 2011)分布的雪豹相比,期望杂合度略高;较一些珍稀濒危的肉食类动物,如墨西哥灰狼(*Canis lupus*)(0.13)(Hedrick et al. 1997)、亚洲狮(*Panthera leo*)(0.15)(Menotti-Raymond et al. 1995)、阿拉斯加棕熊(*Ursus arctos*)(0.27)(Paetkau et al. 1998)、印度豹(*P. pardus*)(0.39)(Menotti-Raymond et al. 1995)等比较,期望杂合度指数高。本研究中雪豹的平均多态信息含量(PIC)为0.722,表现为高度多态(Botstein et al. 1980),高于圈养的猎豹(*Acinonyx jubatus*)(0.699)(孙强等 2010)、东北虎(*P. tigris altaica*)(0.558,张于光等 2009; 0.714,吴云良等 2011)。

Hardy-Weinberg 平衡是建立在没有个体迁入、迁出和自然种群的随机交配假设基础之上,但是由于雪豹的活动范围较大,其日活动距离为3~10 km(马鸣等 2006),本研究中出现的偏离 Hardy-Weinberg 平衡现象,可能是因为采样点范围内存在一定的迁入和迁出,不符合理想种群的前提导致的。

本研究的3个雪豹居群间虽然有一定的遗传分化,但是从理论值上来说,若 $N_m > 1$ ,基因流就可以防止种群分化的发生(Keller et al. 2004),因此,目前3个雪豹居群能抵挡种群分化的发生。Structure 软件计算的结果也支持这一结论,群体类别值K为1时,lnP(D)值最

大,且当K为2、3、4、5时,3个雪豹居群等位基因分布比例显示,没有明显的分群现象,推断该3个地区的雪豹可能来自同一个种群。在雪豹 mtDNA 分析结果中,3个雪豹群体有共享单倍型,且两两地区间也有共享单倍型(周芸芸等 2014),与3个雪豹居群可能来自于同一个雪豹种群的结论一致。雪豹居群间的遗传距离与地理位置相关,甘肃省阿克塞雪豹居群与青海省治多县和囊谦县的2个居群之间具有较大的种群遗传距离,地理距离最近的位于青海省的两个居群遗传距离最小。一般来说,种群遗传学认为空间距离、地理障碍等通常是阻碍基因交流、导致分化的重要因素(Hewitt et al. 2004)。因此,推测3个区域间的地理距离和空间上的人为及自然障碍可能影响了雪豹的基因交流。目前由于人类活动干扰不断加大,导致雪豹生境片段化,将可能会加重阻碍雪豹居群之间基因交流。因此需要加强对雪豹分布区间生境廊道的建设和保护。

## 参 考 文 献

- Ale S B, Yonzon P, Thapa K. 2007. Recovery of snow leopard *Uncia uncia* in Sagarmatha (Mount Everest) National Park, Nepal. *Oryx*, 41(1): 89–92.
- Barker J S F. 1994. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds // Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Ontario, 21: 501–508.
- Berli P, Felsenstein J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in N subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8): 4563–4568.
- Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D, et al. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 19(1): 150–161.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length

- polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314–331.
- Chang Z F, Luo M F, Liu Z J, et al. 2012. Human influence on the population decline and loss of genetic diversity in a small and isolated population of Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *Genetica*, 140(4/6): 105–114.
- Goudet J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Ver.2.9.3.2). [EB/OL]. [2013-03-05]. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Hedrick P W, Miller P S, Geffen E, et al. 1997. Genetic evaluation of three captive Mexican wolf lineages. *Zoo Biology*, 16(1): 47–69.
- Hewitt G M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 359(1442): 183–195.
- Jackson R M, Jerry D R, Rinchen W, et al. 2005. *Surveying Snow Leopard Populations with Emphasis on Camera Trapping: A Handbook*. Sonoma, California: The Snow Leopard Conservancy, 73.
- Janečka J E, Jackson R, Zhang Y Q, et al. 2008. Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. *Animal Conservation*, 11(5): 401–411.
- Janečka J E, Munkhtsog B, Jackson R M, et al. 2011. Comparison of noninvasive genetic and camera-trapping techniques for surveying snow leopards. *Journal of Mammalogy*, 92(4): 771–783.
- Karmacharya D B, Thapa K, Shrestha R, et al. 2011. Noninvasive genetic population survey of snow leopards (*Panthera uncia*) in Kangchenjunga conservation area, Shey Phoksundo National Park and surrounding buffer zones of Nepal. *BMC Research Notes*, 4(1): 516.
- Keller I, Nentwig W, Largiadèr C R. 2004. Recent habitat fragmentation due to roads can lead to significant genetic differentiation in an abundant flightless ground beetle. *Molecular Ecology*, 13(10): 2983–2994.
- Koiralaab RK, Aryal A, Amiotd C, et al. 2012. Genetic identification of carnivore scat: implication of dietary information for human-carnivore conflict in the Annapurna Conservation Area, Nepal. *Zoology and Ecology*, 22(3/4): 137–143.
- McCarthy K P, Fuller T K, Ming M, et al. 2008. Assessing estimators of Snow Leopard abundance. *The Journal of Wildlife Management*, 72(8): 1826–1833.
- McCarthy T M. 2000. *Ecology and Conservation of Snow Leopards, Gobi Brown Bears, and Wild Bactrian Camels in Mongolia*. Massachusetts: University of Massachusetts Amherst, 3–30.
- McCarthy T M, Chapron G. 2003. *Snow Leopard Survival Strategy*. Seattle: International Snow Leopard Trust and Snow Leopard Network, 29–46.
- Menotti-Raymond M, O'Brien S J. 1995. Hypervariable genomic variation to reconstruct the natural history of populations: lessons from the big cats. *Electrophoresis*, 16(1): 1771–1774.
- Narum S R, Banks M, Beacham T D, et al. 2008. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, 17(15): 3464–3477.
- Oosterhout C V, Hutchinson W F, Wills D P M, et al. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 535–538.
- Paetkau D, Waits L P, Clarkson P L, et al. 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*, 12(2): 418–429.
- Peakall R, Smouse P E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update. *Bioinformatics*, 28(19): 2537–2539.
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945–959.
- Riordan P, Kun S. 2010. *Snow leopard survey of Taxkurgan Nature Reserve 2009: Report to Snow Leopard Conservation Grants Program*. Wildlife Conservation Research Unit, Beijing Forestry University, 2.
- Rodgers T W, Janečka J E. 2013. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. *European Journal of Wildlife Research*, 59(1): 1–16.
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1): 103–106.

- Saito M, Yamauchi K, Aoi T. 2008. Individual identification of Asiatic black bears using extracted DNA from damaged crops. *Ursus*, 19(2): 162–167.
- Schaller G B, Ren J R, Qiu M J. 1988. Status of the snow Leopard *Panthera uncia* in Qinghai and Gansu Provinces, China. *Biological Conservation*, 45(3): 179–194.
- Schwartz M K, Luikart G, Waples R S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1): 25–33.
- Sunquist M, Sunquist F. 2002. *Wild Cats of the World*. Chicago: University of Chicago Press, 452.
- Waits J L, Leberg P L. 2000. Bases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal Conservation*, 3(3): 191–199.
- Waits L P, Buckley-Beason V A, Johnson W E, et al. 2007. A select panel of polymorphic microsatellite loci for individual identification of snow leopards (*Panthera uncia*). *Molecular Ecology Notes*, 7(2): 311–314.
- Waits L P, Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69(4): 1419–1433.
- Wan Q H, Wu H, Fujihara T, et al. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25(14): 2165–2176.
- Xu F, Ma M, Wu Y Q. 2010. Recovery of snow leopard *Uncia uncia* in Tomur National Nature Reserve of Xinjiang Northwestern China. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(6): 825–827.
- Yeh F C, Yang R, Boyle T J, et al. 2000. POPGENE 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Zhang D X, Hewitt G H. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: Practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3): 563–584.
- 何丽, 张于光, 彭红兰, 等. 2010. 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. *生态学报*, 30(16): 4340–4350.
- 马鸣, 徐峰, Chundawat R S, 等. 2006. 利用自动照相术获得天山雪豹拍摄率与个体数量. *动物学报*, 52(4): 788–793.
- 孙强, 谈智华, 吴锋, 等. 2010. 微卫星技术分析猎豹遗传资源及亲缘关系. *江苏农业学报*, 26(3): 541–545.
- 田新民, 张明海, 张辉, 等. 2010. 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. *生态学杂志*, 29(3): 543–548.
- 吴云良, 包文斌, 张红霞, 等. 2011. 微卫星技术分析东北虎遗传多样性及亲缘关系. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 32(1): 87–91.
- 杨帆, 张立. 2012. 基于线粒体 DNA 的中国亚洲象种群遗传多样性及种群遗传结构. *兽类学报*, 32(2): 90–100.
- 张于光, 何丽, 朵海瑞, 等. 2009. 基于粪便 DNA 的青海雪豹种群遗传结构初步研究. *兽类学报*, 29(3): 310–315.
- 张于光, 李迪强, 肖启明, 等. 2004. 饲养东北虎的微卫星变异研究. *遗传*, 26(5): 620–624.
- 周芸芸, 冯金朝, 朵海瑞, 等. 2014. 基于粪便 DNA 的青藏高原雪豹种群调查和遗传多样性分析. *兽类学报*, 34(2): 138–148.