

中国黑冠长臂猿的遗传多样性 及其分子系统学研究*

——非损伤取样 DNA 序列分析

宿兵^① P. Kressirer^③ K. Monda^③ 王文^① 蒋学龙^②
王应祥^② D. S. Woodruff^③ 张亚平^①

(^①中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室;

^②中国科学院昆明动物研究所兽类学研究室, 昆明 650223; ^③美国加利福尼亚大学生物系, 加利福尼亚)

摘要 采用非损伤性 DNA 基因分型技术 (Noninvasive DNA genotyping), 对我国珍稀灵长类动物黑冠长臂猿 11 个个体的线粒体 DNA (mtDNA) 控制区 159bp 的片段进行了序列分析。在所得到的 159bp 的 DNA 序列中, 发现 39 个核苷酸位点存在变异 (24.5%)。DNA 一级序列数据显示, 中国黑冠长臂猿拥有丰富的线粒体 DNA 序列变异。采用 PAUP3.1.1 (简约法) 和 PHYLIP3.51a (最大似然法) 数据分析软件对序列数据进行聚类分析后, 得到了中国黑冠长臂猿的分子系统树, 并且两种分析方法给出了同样的分支结构, 由线粒体 DNA 得到的分子系统树证实了形态学研究报道的中国黑冠长臂猿 3 个新亚种, 同时 DNA 序列数据揭示长期以来被作为亚种的海南黑长臂猿 (*H. ? hainanus*) 可能是一个独立的种。根据分子系统树, 结合形态学方面的资料, 提出对中国黑冠长臂猿新的分类观点, 即现生的中国黑冠长臂猿应为 3 个种 (*H. concolor*; *H. leucogenys*; *H. hainanus*), 其中 *H. concolor* 含 3 个亚种 (*H. c. concolor*, *H. c. jingdongensis*, *H. c. furvogaster*)。同时, 针对该类珍稀动物保护, 提出将上述黑冠长臂猿的种和亚种作为不同的进化显著性单元 (Evolutionarily Significant Units, ESU) 进行保护和遗传管理, 以保存各类群在进化历史中积累的遗传变异及其进化潜力。此外, 通过将非损伤性 DNA 分型技术应用于珍稀动物的遗传学分析, 为我国保护遗传学的研究提供一种新的研究手段。

关键词 黑冠长臂猿 非损伤性 DNA 基因分型 分子系统树 进化显著性单元

长臂猿, 又称小猿 (*Hylobates* spp.) 分布于东南亚热带雨林地带^[1]。长臂猿仅有一个属 (*Hylobates*), 4 个亚属, 其中黑冠长臂猿亚属 (*Nomascus*) 内种级和亚种级的分类关系一直充满争议, 众说纷纭。部分学者认为存在 1 个种 (*H. concolor*), 6 个亚种 (*H. c. concolor*; *H. c. lu*;

1995-07-11 收稿, 1996-08-28 收修改稿

* 中国科学院生物多样性世界银行贷款及 The John D and Catherine MacArthur Foundation 和中国科学院昆明动物研究所所长基金资助项目

H. c. hainanus; *H. c. leucogenys*; *H. c. siki*; *H. c. gabrellae*); 而另一部分学者则认为存在3个种(*H. concolor*; *H. leucogenys*; *H. gabriellae*), 8个亚种(*H. c. concolor*; *H. c. furogaster*; *H. c. hainanus*; *H. c. jingdongensis*; *H. c. nasutus*; *H. c. lu*; *H. g. gabriellar*; *H. g. siki*)^[2-4]. 在中国境内, 黑冠长臂猿仅分布于云南省和海南省, 包括白颊长臂猿(*H. leucogenys*) (云南南部)、黑长臂猿指名亚种(*H. c. concolor*) (云南南部和中部)、黑长臂猿景东亚种(*H. c. jingdongensis*) (云南中部无量山区)、黑长臂猿棕腹亚种(*H. c. furogaster*) (云南西南部)和海南黑长臂猿(*H. ? hainanus*). 长期以来对黑冠长臂猿的分类主要是基于对行为学、形态学和细胞遗传学等方面的研究. 由于能够得到的特征信息量的限制, 常常有相互矛盾的结果, Garza和Woodruff等^[5]对3个黑冠长臂猿亚种细胞色素b基因序列的初步研究表明, 黑冠长臂猿亚属内存在丰富的遗传多样性, 有必要在分子水平重新构建种和亚种级的分类和遗传分化关系.

线粒体DNA作为一种母系遗传的生物大分子, 是研究物种内遗传多样性及种上系统分类关系的有力工具^[6-9]. D环区(或称控制区)是线粒体DNA中的非编码区, 分子进化速度比编码区快, 是研究种和种下水平分子系统的良好指标^[9]. PCR技术的迅速发展已使人们能从毛发、皮张甚至排泄物这些以前认为不能利用的标本中获取大量有用的遗传信息^[10-12]. 非损伤性取样DNA基因分型技术(Noninvasive DNA genotyping)(包括DNA序列分析和微卫星DNA分析等)已日益在分子进化和保护遗传学(Conservation genetics)领域得到广泛的应用^[5, 11, 13].

本文采用非损伤性取样DNA序列分析技术, 利用来自活体动物的毛发和标本馆中储存多年的皮张样品对分布于中国境内的黑冠长臂猿进行线粒体DNA控制区片段的一级序列分析, 以期为中国黑冠长臂猿类群的遗传多样性以及种和亚种水平的遗传分化关系提供分子水平的独立证据. 同时, 鉴于中国黑冠长臂猿作为国家一级保护动物目前已处于极度濒危的状态, 本研究中所提供的遗传学资料将有助于该类群保护策略的制定, 尤其是将对在珍稀动物保护中极为重要的遗传管理提供依据.

1 材料和方法

1.1 样品采集

本实验中共收集了中国黑冠长臂猿11个个体的样品, 代表5个不同的类群. 样品包括两种类型: (1)由活体动物采集的新鲜毛发样品, (2)从昆明动物研究所标本库采集的旧皮张样品(存放期8~30 a). 样品背景资料见表1.

1.2 DNA的提取

毛发样品: 每个个体取1~3根毛发, 用酒精和蒸馏水冲洗毛根部分. 用经灭菌处理的小剪刀剪下约5 mm长的一段; 放入盛有200 μ L Chelex溶液(Bio-Rad公司产品)的小离心管中消化, 方法参照Walsh等^[14]. 经分离后的上清液即作为下一步PCR扩增的模板.

皮张样品: DNA提取同毛发的方法相似, 只是在Chelex处理前先要经蛋白酶K消化.

1.3 线粒体DNA控制区片段PCR扩增和序列分析

本实验中PCR扩增的目标片段为长臂猿线粒体DNA控制区中的约200bp的一段. 扩增引物为长臂猿线粒体DNA控制区特异引物(由Kressirer, P设计):

D182: 5' AAC ACA ACA TGC TTA CAA GC3'

D380: 5' GTT GGT GAT TTC ACG GAG GA3'

每一样品的扩增体积为 25 μ L, 内含 10 mmol/L Tris(pH8.3), 50 mmol/L KCl, 0.01% Triton X-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 1.2 μ mmol/L 的引物, 1.0 unit Taq 酶以及 10 μ L 模板溶液. 扩增条件为: 92°C 预变性 3 min, 接下来进行 40 个循环(55°C 1 min, 74°C 30 s, 94°C 30 s), 最后在 72°C 保温 5 min. 扩增得到的 PCR 产物经用 GeneClean II 试剂盒提纯后, 即直接作为序列分析的模板. 序列分析仅为手动式, 以放射性同位素 S³⁵ 作为标记物. 序列分析引物为 D182, 采用美国 USB 公司的 Sequenase 2.0 测序试剂盒.

表 1 本研究中黑冠长臂猿样品的背景资料

样品编号	产地	样品种类	采样时间
1. 白颊长臂猿-1(<i>H. leucogenys</i> -1)	云南河口	新鲜毛发	1994
2. 白颊长臂猿-2(<i>H. leucogenys</i> -2)	云南河口	新鲜毛发	1994
3. 黑长臂猿景东亚种-1(<i>H. concolor. jingdongensis</i> -1)	云南无量山	皮张	1964
4. 黑长臂猿景东亚种-2(<i>H. concolor. jingdongensis</i> -2)	云南无量山	皮张	1964
5. 黑长臂猿景东亚种-3(<i>H. concolor. jingdongensis</i> -3)	云南无量山	皮张	1964
6. 黑长臂猿景东亚种-4(<i>H. concolor. jingdongensis</i> -4)	云南无量山	皮张	1964
7. 黑长臂猿沧源亚种(<i>H. concolor. furogaster</i>)	云南沧源	皮张	1983
8. 黑长臂猿指名亚种-1(<i>H. concolor. concolor</i> -1)	云南建水	皮张	1987
9. 黑长臂猿指名亚种-2(<i>H. concolor. concolor</i> -2)	云南绿春	皮张	1972
10. 黑长臂猿指名亚种-3(<i>H. concolor. concolor</i> -3)	云南建水	皮张	1989
11. 海南黑长臂(<i>H. ? . hainanus</i>)	海南省	新鲜毛发	1992

1.4 DNA 序列数据的处理

本文采用 PAUP3.1.1^[15] 和 PHYLIP3.5 la^[13] 数据处理软件, 对所提到的 DNA 一级序列数据进行聚类分析. 简约分析采用启发式搜索算法(Heuristic search), DNA 序列被随机地加入分析, 共 100 次循环. 简约系统树各分支的置信度由 Bootstrap 计算方式检验, 共 100 个循环^[13], 并由此得到一个多数原则合意树(Major-rule consensus tree). DNA 序列变异中转换(Transition)和颠换(Transversion)赋予同等加权. 聚类分析中采用合趾猿(*Hylobates syndactylus*)的相应序列作为外群序列(Woodruff 等, 未发表数据).

2 结果和讨论

本实验中共得到了 11 个黑冠长臂猿, 每个个体 159bp 的序列. 序列数据见图 1. 黑冠长臂猿个体间没有发现序列缺失或插入. 当将合趾猿的相应序列纳入排序时, 出现两段缺失或插入. 在所得到的 159bp DNA 序列中, 有 39 个碱基存在变异(24.5%), 显示黑冠长臂猿类群中存在丰富的序列变异. 个体间序列差异比较结果见表 2.

系统树的寻找基于最大简约法则, 即在所有可能的序列替换中以最少的步骤作为建立聚类关系的基础, 从而寻找出树长(tree length)最短的系统树, 即所谓的最简约树. 启发式计算

(Heuristic method)给出了唯一的一个简约树(图 2(a)). Bootstrap 计算给出了同样的结果. 各聚类关系的置信度最低为 53%, 最高为 86%. 另外, 由最大似然法也得到一个分子系统树, 其分支形式同图 2(a)的简约树完全一致.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
H. synd	TCATCAGCAGTATCAACCGATAAGCTCAAACCATAACGTTCCACTACGTAGGGCATGGCACATTTCATTCATTTATCG								
H. c. leu1	TCAACACGCATATCAACCGATAAAGACAGTNCATGCC-----GGGCATGGCACATTAATNGTNTATTG								
H. c. leu2	TCAACACGGCGTATCAACCGATAAAGACAGTCCACCTC-----GGACATGGCACATTAATCGTTCATTC								
H. c. jin1	TCAACATGCGTATCAACCGACAAAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTCCATTC								
H. c. jin2	TCAACATGCGTATCAACCGACAAAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTCCATTC								
H. c. jin3	TNAACATGCGTATCAACCGACAAAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTCCATTC								
H. c. jin4	TCAACACGCATATNAACCGATAAAGTTAATCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTCCATTC								
H. c. fur	TCAACATGCGTATCAACCGACAAAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTTCATTC								
H. c. con1	CCAACATGCGTATCAACCGACAAAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTTCATTC								
H. c. con2	TCAACATGCGTATCAACCGACAAAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTTCATTC								
H. c. con3	TTAANATGCGTATNAACCGACAGAGTTAGTCCACCGC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTTCATTC								
H. c. hain	TCAACATGAGTATCAACCGATAAAGACAAATCCATCCC-----GGACATGGCACATTAAGCTGTTCACCG								

	9	10	11	12	13	14	15
H. synd	TACATATTAATCCAATCCACAACTCAACTCAC--TTCCATA--ATAATCTATTTTCAGATAGGAGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. leu1	TGCATAACATGTGCATATGCCAAATCAACTCACACTCCATACAAAGTAATCTATTTTCAGATAGGGGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. leu2	TACATAACATGCCACTTCCAAATCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGGGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. jin1	TACATAACATGATACATCCAAACTCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGAGTCCCTTGTCAGGAT						
H. c. jin2	TACATAACATGATACATCCAAACTCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGAGTCCCTTGTCAGGAT						
H. c. jin3	TACATAACATGATACATCCAAACTCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGAGTCCCTTGTCAGGAT						
H. c. jin4	TACATAACATGCTACATCCAAACTCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGAGTCCCTTGTCAGGAT						
H. c. fur	TACATAACATGCTGCATCCAAATCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGGGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. con1	TACATAACATGCTATATCCAAATCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGGGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. con2	TACATAACATGCTATATCCAAATCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGGGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. con3	CACATAGTATGCTATATCCAAATCAACTCACACTCCATACGAGTAATCTATTTTCAGATAGGGGTCCCTTGCCCGAGCAT						
H. c. hain	TACATAACACACCCTCCGAATCAACTCACACTCCATACAAAGTAATCTATTTTCAGATAGGAAATCCCTTGCCCGAGCAT						

图 1 中国黑冠长臂猿线粒体 DNA 控制区 159bp 序列

短线为缺失序列, A, T, G, C 分别代表腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶四种碱基, N 表示不能判定的序列, H. synd 为作为外群的合趾猿 (*H. syndactylus*) 的相应序列

表 2 中国黑冠长臂猿线粒体 DNA 片段序列差异比较^{a)}

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>H. syndactylus</i>	-	10	12	18	18	17	18	18	17	18	17	12
2. <i>H. leucogenys</i> -1	17	-	8	14	14	14	14	15	10	13	18	17
3. <i>H. leucogenys</i> -2	19	1	-	9	9	8	9	11	8	9	13	16
4. <i>H. c. jingdongensis</i> -1	19	5	6	-	0	9	0	11	7	4	13	17
5. <i>H. c. jingdongensis</i> -2	18	4	5	1	-	9	0	11	7	4	13	17
6. <i>H. c. jingdongensis</i> -3	18	4	5	1	0	-	4	9	11	7	12	17
7. <i>H. c. jingdongensis</i> -4	17	3	4	2	1	1	-	13	15	12	17	17
8. <i>H. c. furvogaster</i>	17	3	4	2	1	1	0	-	8	5	8	18
9. <i>H. c. concolor</i> -1	17	3	4	2	1	1	0	0	-	5	6	21
10. <i>H. c. concolor</i> -2	17	3	4	2	1	1	0	0	0	-	7	18
11. <i>H. c. concolor</i> -3	18	2	4	2	1	1	0	0	0	0	-	23
12. <i>H. ? hainanus</i>	16	1	0	6	5	5	4	4	4	4	4	-

a) 对角线以上为转换, 对角线以下为颠换; 缺失、插入及不确定序列不纳入计算

正如我们在序言中提到的那样, 对于 *Nomascus* 亚属中种和亚种级的分类关系各家看法不一. 就中国黑长臂猿来说, 有些学者认为仅有一种 (*H. concolor*), 3 个亚种, 即指名亚种 (*H. concolor. concolor*), 白颊亚种 (*H. concolor. leucogenys*) 和海南亚种 (*H. concolor. hainanus*); 另一些学者则认为存在 2 个种 (*H. concolor* 和 *H. leucogenys*), 其中 *H. concolor* 又包括 4 个亚种 (*H. c. concolor*, *H. c. hainanus*, *H. c. jingdongensis*, *H. c. furvogaster*)^[2,4]. 我们线粒体 DNA 控制区 DNA 序列的数据为上述问题提供了分子水平的独立证据. 首先, 我们得到的分子系统树支持马世来和王应祥^[4]提出的分布于云南省绿春、建水 (*H. c. concolor*),

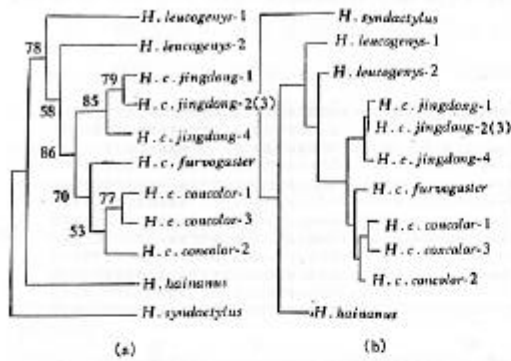


图 2

(a) 由 PAUP3.1.1 Bootstrap 计算方法所得到的反映 11 个黑冠长臂猿聚类关系的多数原则合意树 (Major-rule consensus tree), 也是最简约树; 树长 (tree length) 为 78, Consistency index = 0.782. 树长为 79 的次简约树有 11 个. 由最大似然法得到的分子系统树同图 2(a) 的分支结构一致. 分支上的数字代表经 Bootstrap 运算 100 次而给出的置信度. (b) 同图 2(a) 的树相同, 显示同碱基代换数成比例的各分支的长度

景东 (*H. c. jingdongensis*) 和沧源 (*H. c. furvogaster*) 的 3 个亚种. 在分子系统树上, 这 3 个亚种被分开, 聚在不同的分支群中. 景东亚种首先从共同祖先那里分化出来, 然后是棕腹亚种, 最后是指名亚种, 另外, 从分子系统树上我们可以很清楚地看到, 白颊长臂猿 (*H. leucogenys*) 先于海南黑长臂猿同云南黑长臂猿的 3 个亚种聚在一起. 根据传统的形态分类观点, 海南黑长臂猿一向被划为黑长臂猿类群中的 1 个亚种. 因此, 假如我们认为海南类群是一亚种, 那么白颊类群就应是 1 个亚种. 然而, 对分布于云南和越南的长臂猿的野外考察发现白颊类群和黑长臂猿类群存在同域分布的现象, 并且两者在一些形态特征上有明显的区别, 因此形态学家普遍认为白颊类群应是一个独立的种^[2-4]. 由此看来, 如果我们确立白颊类群种的地位. 那么, 海南长臂猿就应由原来的亚种提升到种的分类地位, 综上所述, 我们倾向于将中国黑冠长臂猿分为 3 个种 (*H. concolor*; *H. leucogenys*; *H. hainanus*), 在

H. concolor 中又有 3 个亚种 (*H. c. concolor*; *H. c. jingdongensis*; *H. c. furvogaster*), 当然, 上述分类方法还需要更多分子水平数据的进一步验证. 另一方面, 我们的序列数据还给出了另一个有趣的结果. 从分子系统树上我们可以看到, 两个白颊个体并未聚在一起. 2 个个体间的序列差异为 9 个核苷酸位点, 其中包括一个颠换. 这种现象表明, 白颊类群内可能存在丰富的序列变异和群体间的遗传分化, 值得进行进一步的研究.

随着保护遗传学的发展, 一个新的概念逐渐受到越来越多的生态学家和进化生物学家的广泛重视, 即所谓的进化显著性单元 (Evolutionarily Significant Units, ESU)^[16]. 其含义为基于系统学的研究所作的一种定性的标准, 它将由于进化历史事件而造成差异的不同群体区别开来^[17]. 在分子水平上, 人们将在线粒体 DNA 水平上互为单系群 (Monophyletic group) 并且在核基因水平上存在显著的基因频率差异的群体定义为不同的进化显著性单元. 进化显著性单元的引入为生物多样性的科学保护提供了一种量化的指标. 我们对黑冠长臂猿的 DNA 一级序列的初步研究提示可能存在 5 个进化显著性单元, 即上文所述的 3 个种和 2 个亚种. 从保护和遗传管理的角度, 我们建议将它们分开管理, 避免杂交, 以保存进化历史的遗产和各类群自身的进化潜力.

在我国, 黑冠长臂猿主要分布于海南岛和云南南部, 由于人类的活动和生态环境的严重破坏, 我国的长臂猿目前处于极度濒危的状况之中. 除白颊类群外, 其余的在野外已很难见到. 其保护已迫在眉睫. 保护遗传学自 70 年代发展以来, 在生物多样性的保护尤其是珍稀动物的野生和圈养群体的保护及遗传管理中发挥着日益重要的作用. 同时, 其研究方法和技术手段也日新月异, 特别是非损伤性 DNA 分型技术的出现使有关研究手段产生了革命性的突破.

它大大简化了采样和DNA提取的方法和费用,使从野生动物群体中获得大量遗传学数据成为可能,从而能更真实地反映该类物种的遗传背景,为保护策略的制定提供重要的遗传学资料和依据。同时也使科学研究同保护的观念相一致,即不再因研究需要而伤害研究对象。至今,此方法已在若干大型珍稀动物的保护遗传学研究中得到应用^[5,11,18]。因此,希望通过本文的工作将非损伤性DNA分型技术引进国内,为国内生物多样性及保护遗传学的研究提供一种新的手段。

致谢 此文献给已故的施立明院士。在实验分析和论文完成过程中得到 Mundy 博士、Gagneux 博士、Field 博士、Srikwan 博士、Lynam 博士和 Uy 技术员以及昆明动物研究所的刘爱华教授、朱春玲技术员等的诸多帮助,一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Groves C P. Systematics and phylogeny of gibbons. In: D Rumbaugh eds. *Gibbon and Siamang*. New York: Academic Press, 1972. 1~89
- 2 Groves C P, 王应祥. The gibbons of the subgenus *Nomaseus*. *动物学研究*, 1990, 11:147~154
- 3 Dao Van Tien. On the north Indochinese gibbons (*Hylobates concolor*) in north Vietnam. *Journal of Human Evolution*, 1983, 12:367~372
- 4 马世来, 王应祥. 中国南部及邻近地区长臂猿的分类、分布和三个新亚种的描述. *动物学研究*, 1986, 7:394~410
- 5 Garza J C, Woodruff D S. A phylogenetic study of the gibbons (*Hylobates*) using DNA obtained noninvasively from hair. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1992, 1:202~210
- 6 Avise J C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos Trans R Soc. London, B*, 1986, 312:328~334
- 7 Moritz C, Dowling T E, Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Ecol Syst*, 1987, 18:269~292
- 8 Harrison R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol*, 1989, 4:6~11
- 9 Hillis D M, Moritz C. An overview of application of molecular systematics. In: Hillis D M, Moritz C. eds. *Molecular Systematics*. Sinauer Sunderland MA, 1990. 502~515
- 10 Higuchi R, Von Beroldingen C H. DNA typing from single hairs. *Nature*, 1988, 332:543~546
- 11 Morin P A, Moore J J. Kin selection social structure, gene flow, and the evolution of Chimpanzees. *Science*, 1994, 265:1193~1201
- 12 Pabbo, S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:1939~1943
- 13 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrapping. *Evolution*, 1985, 39:783~791
- 14 Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Techniques*, 1991, 10:506~513
- 15 Swofford D L. PAUP: Phylogenetic inference using parsimony, Version 3.1.1. Champaign: Illinois Natural History Survey, 1991
- 16 Ryder O A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol Evol*, 1986, 1:9~10
- 17 Moritz C. Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. *Trends Ecol Evol*, 1994, 9:373~375
- 18 Zhang Y P, Ryder O A. Noninvasive giant panda paternity exclusion. *Zoo Biology*, 1994, 13:569~573