

# 大熊猫和北极熊基因组微卫星分布特征比较分析

李午佼<sup>1#</sup>, 李玉芝<sup>1,2#</sup>, 杜联明<sup>1</sup>, 黄杰<sup>1</sup>, 沈咏梅<sup>3</sup>, 张修月<sup>1</sup>, 岳碧松<sup>1\*</sup>

(1. 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 四川大学生命科学院, 成都 610064;

2. 成都中医药大学药学院, 成都 610075; 3. 四川好医生攀西药业有限责任公司, 四川西昌 615000)

**摘要:** 本研究比较分析了大熊猫和北极熊全基因组序列中的 1~6 碱基重复的完美型微卫星序列的分布特征, 通过微卫星序列搜索和统计软件 MSDB 分析分别得到 855 018 和 936 238 个微卫星序列, 其长度总和分别是 14 919 240 bp 和 18 434 348 bp; 分别占基因组大小的 0.64% 和 0.79%, 大熊猫和北极熊基因组总丰度分别是 371.8 个/Mb 和 405.6 个/Mb, 二者基因组中微卫星都是单碱基重复的最多, 其次是二碱基、四碱基、三碱基和五碱基, 六碱基重复类型的数量最少。大熊猫和北极熊含量最丰富的重复拷贝类别主要有 A、AC、AG、AAAT、AAAG、AT 和 C 等。本研究为后续开发和筛选大量高质量的熊科物种微卫星标记提供了数据支持。

**关键词:** 大熊猫; 北极熊; 基因组; 微卫星

中图分类号: Q959.8; R857.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2014)06-0874-05

## Comparative Analysis of Microsatellite Sequences Distribution in the Genome of Giant Panda and Polar Bear

LI Wujiao<sup>1#</sup>, LI Yuzhi<sup>1,2#</sup>, DU Lianming<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>, SHEN Yongmei<sup>3</sup>, ZHANG Xiuyue<sup>1</sup>, YUE Bisong<sup>1\*</sup>

(1. Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. Gooddoctor Paremaceutical Group, Xichang, Sichuan Province 615000, China)

**Abstract:** In this study, the distribution of microsatellite sequences in the whole genome of giant panda well as polar bear were analyzed and compared. A total of 855 018 and 936 238 perfect microsatellite sequences with 1~6 bp nucleotide motifs were identified from giant panda and polar bear, respectively. The total length of microsatellites was 14 919 240 bp (0.65% of the genome size) in giant panda, and 18 434 348 bp (0.79% of the genome size) in polar bear. The abundance of microsatellites was 405.6 no./Mbp in polar bear, and 371.81 no./Mbp in giant panda. Among of which, mononucleotide repeats (accounting for 48.56%) was the most abundant, followed by the dinucleotide, tetranucleotide, trinucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide repeats. A, AC, AG, AAAT, AAAG, AT and C were the most abundant repeat units shared by the two genomes. This study can provide a basis for developing and screening a large number of high-quality microsatellite markers for bear family.

**Key words:** giant panda; polar bear; genome; microsatellite sequences

微卫星 (Microsatellite), 又称为简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 是指由 1~6 个核苷酸为基本组成单元的 DNA 串联重复序列, 广泛存在于真核生物和原核生物基因组中。相对于其他分子标记而言, 微卫星标记具有分布广泛、选择中性、共显性遗传、多态性高、实验结果稳定可靠等优点, 是当前种内变异研究中分辨率较高、揭示力较强的细胞核 DNA 标记, 倍受研究者们的青睐, 广泛应用于珍稀濒危动物保护和研究的各个领域, 如种群遗传

多样性评估和遗传结构分析 (Shen *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2010)、亲子鉴定和遗传谱系建立 (David *et al.*, 2006; Muniz *et al.*, 2011)、遗传图谱构建和基因定位 (Massault *et al.*, 2010)、个体识别和野外种群数量估计 (Brinkman *et al.*, 2010) 等多个领域。

大熊猫 *Ailuropoda melanoleuca* 是中国保护动物中的旗舰物种, 也是世界上最珍贵和极濒危的物种之一 (IUCN, 2000)。据 2004 年第三次大熊猫调查, 评估的野外大熊猫数量仅有 1600 只。为了更加有

收稿日期: 2014-04-13 接受日期: 2014-05-15

作者简介: 李午佼, 男, 主要研究方向为基因组学 # 并列第一作者

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bsyue@scu.edu.cn

效的保护大熊猫这个珍稀濒危物种,利用微卫星标记在大熊猫保护遗传学研究方面已经开展了大量的工作,包括遗传多样性分析、个体识别、亲子鉴定和种群遗传结构评估等。大熊猫微卫星标记的筛选工作开始于 1995 年(张亚平等, 1995),迄今为止共筛选了 100 个左右的微卫星序列(张亚平等, 1995; 曹玫等, 2001; Lu *et al.*, 2001; 沈富军等, 2005; Shen *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Li YZ *et al.*, 2010),但是对大熊猫基因组中微卫星序列的种类、数量、丰度等分布特征的研究却未见报道。

北极熊 *Ursus maritimus* 是目前基因组已公布的和大熊猫亲缘关系最近的物种,它和大熊猫是目前已知熊科中仅有的已公布全基因组序列的物种,而且它们的全基因组序列都是 scaffold 水平(Li RQ *et al.*, 2010; Li B *et al.*, 2011)。棕熊基因组虽有文章发表,但只是线粒体基因组和 5% ~ 10% 的核基因组(Miller *et al.*, 2012),美洲黑熊也没有提供下载基因组的链接。全球的北极熊数目约 20 000 ~ 25 000 只(Obbard, 2010)。由于全球气候变暖,海洋冰川融化,对北极熊的捕食活动造成的不良影响正加剧,最近 45 年来北极熊种群数减少了 30% 以上(Brandt *et al.*, 2014)。前人已开展很多北极熊微卫星研究相关的工作,Paetkau 等(1995)利用 8 个高变异的(GT)<sub>n</sub> 研究 4 个加拿大北极熊种群的关系,从美洲黑熊中开发的一些微卫星标记可以用于所有的熊科物种(Paetkau & Strobeck, 1998),Poissant 和 Davis(2011)从北极熊中筛选出了 10 个微卫星标记,在其他熊中也具有较好的多态性。2014 年 Brandt 等通过 454 测序筛选到 19 个微卫星标记(Brandt *et al.*, 2014)。目前,北极熊基因组中微卫星序列的种类、数量、丰度等分布特征的研究也未见报道。

本研究中,利用已经开发好的微卫星搜索软件,扫描大熊猫和北极熊的全基因组,搜索和输出微卫星序列,进一步对它们的微卫星序列进行统计和比较分析,旨在阐明大熊猫和北极熊在基因组水平上的微卫星重复序列的种类、数量、丰度等分布特征的差异,以期深化对熊科基因组的认识 and 了解,为后续开发和筛选大量高质量的熊科物种微卫星标记提供数据支持。

## 1 研究方法

### 1.1 基因组序列

大熊猫基因组下载自 Ensembl 数据库([ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-73/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-73/fasta/ailuropoda_melanoleuca/dna/Ailuropoda_melanoleuca.ailMel.1.73.dna.toplevel.fa.gz)

[ftp://ftp.genomics.org.cn/pub/G10K/Ursus\\_maritimus/assembly/Ursus\\_maritimus.scaf.fa.gz](ftp://ftp.genomics.org.cn/pub/G10K/Ursus_maritimus/assembly/Ursus_maritimus.scaf.fa.gz), 大小约为 2.3 Gb,后者基因组比前者约大 9 Mb。

### 1.2 数据分析

利用本实验室开发的微卫星搜索及统计软件 MSDB(2.4 版本),此软件是第一个采用数据库技术来存储和分析 SSR,容易获取和统计特定微卫星(Du *et al.*, 2013)。从下载得到的大熊猫和北极熊基因组序列中搜索完美型的 1~6 碱基重复类型,最小重复次数分别是 12、7、5、4、4 和 4。同时,利用自编的 perl 脚本将可循环的 SSR 序列及其互补的 SSR 序列合并为一类,如 ACT 重复拷贝类别,可以与之合并为一类的重复拷贝类别是 TGA、CTA、GAT、TAC 和 ATG。

## 2 结果

### 2.1 大熊猫和北极熊各重复类型微卫星分布特征

大熊猫和北极熊基因组中微卫星总数分别为 855 018 个和 936 238 个,长度总和分别是 14 919 240 bp 和 18 434 348 bp。相比大熊猫,北极熊微卫星数目多了 81 220 个,微卫星总长多了 3.5 Mb(3 515 108 bp)(表 1)。大熊猫基因组中微卫星平均丰度为 371.8 个/Mb,平均密度是 6488.01 bp/Mb,而北极熊基因组中微卫星的平均丰度为 405.6 个/Mb,平均密度是 7985.72 bp/Mb,北极熊的这两组数据都高于大熊猫。

大熊猫和北极熊基因组中各重复类型微卫星的分布特征很相似,占基因组比例也接近,两个物种都是单碱基重复类型最丰富,其数目占总数目的一半左右,二碱基重复类型占了 26% 左右,三碱基重复类型不到总数的 5%,四碱基重复类型所占比例都在 18% 左右,五碱基微卫星数目占总数的 3% 不到,六碱基重复类型丰度最低,不到总数的 1%,四碱基重复类型的数目远高于三碱基重复类型。同时,北极熊中各重复类型 SSR 的数目和丰度都高于大熊猫。

### 2.2 SSR 各碱基类型的不同重复次数比较

大熊猫基因组中 SSR 各碱基类型中,数目最多的是单碱基重复 12 次的,其次是四碱基重复 4 次的,然后是单碱基重复 13 次;北极熊的情况类似,只是四碱基重复 4 次的数目少于单碱基重复 13 次的数量,北

极熊基因组中四碱基重复 4 次的 SSR 数目和二碱基 重复 7 次的 SSR 数量都低于大熊猫(表 2)。

表 1 不同重复类型微卫星在大熊猫和北极熊基因组中的分布特征  
Table 1 Distribution of SSR for different repeat types in genomic sequence of giant panda and polar bear

SSR 重复类型	大熊猫				北极熊			
	SSR 数目	SSR 分布频率 (个/Mb)	占总数的比例 (%)	平均长度 (bp)	SSR 数目	SSR 分布频率 (个/Mb)	占总数的比例 (%)	平均长度 (bp)
单碱基	415 188	180.56	48.56	14.85	437 971	189.73	46.78	15.13
二碱基	223 747	97.30	26.17	18.88	248 390	107.60	26.53	21.66
三碱基	35 912	15.62	4.20	17.71	43 956	19.04	4.70	21.81
四碱基	154 672	67.26	18.09	20.73	174 554	75.62	18.64	25.46
五碱基	23 162	10.07	2.71	26.98	26 685	11.56	2.85	32.62
六碱基	2337	1.02	0.27	26.4	4682	2.03	0.50	32.76
SSR 总数	855 018				936 238			
SSR 总长度	14 919 240 bp				18 434 348 bp			
SSR 总 GC 含量	21.69%				23.21%			
SSR 平均丰度	371.8 个/Mb				405.6 个/Mb			
SSR 平均密度	6488.01 bp/Mb				7985.72 bp/Mb			
基因组大小(bp)	2 299 509 015				2 308 415 131			
SSR 总长度占基因组大小比例	0.64%				0.79%			

表 2 SSR 各碱基类型的不同重复次数比较  
Table 2 Comparison of different repeat numbers of SSR types

大熊猫			北极熊		
SSR 数目	Motif 长度	重复次数	SSR 数目	Motif 长度	重复次数
91 161	1	12	94 200	1	12
82 127	4	4	82 782	1	13
80 301	1	13	79 145	4	4
72 913	2	7	72 698	2	7
67 705	1	14	70 662	1	14
57 802	1	15	58 303	1	15
40 494	2	8	41 210	2	8
36 689	1	16	40 872	1	16
29 957	4	5	25 804	4	5
28 133	2	9	25 070	1	17

表 3 SSR 中 GC 含量  
Table 3 GC content of SSR

GC 含量	SSR 频率	
	大熊猫	北极熊
0	0.587313	0.571419
16%	0.001179	0.001826
20%	0.015149	0.015404
25%	0.070139	0.071249
33%	0.020429	0.024705
40%	0.00309	0.002924
50%	0.260541	0.264806
60%	0.001594	0.001596
66%	0.009236	0.010984
75%	0.006798	0.00728
80%	0.000949	0.000788
83%	0.000172	0.000152
100%	0.023412	0.026866

2.3 大熊猫和北极熊 SSR 重复次数分布

大熊猫基因组中, SSR 重复次数最高的是 (GAGAA)<sub>976</sub>, 其次是 (TCCCT)<sub>561</sub> 和 (GAAGG)<sub>509</sub>, 都是五碱基重复。北极熊基因组中, SSR 重复次数最高的是 (CTTTT)<sub>753</sub>, 其次是 (AT)<sub>741</sub> 和 (GTCAGG)<sub>465</sub>, 二者差异较明显。

2.4 大熊猫和北极熊 SSR 的 GC 含量

大熊猫基因组 SSR 中, 总 GC 含量为 21.69% (表 1), 北极熊基因组 SSR 中总 GC 含量为 23.21%, GC 含量为 0 的 SSR 出现次数最多, 其次是 GC 含量为 50%、25% 和 100% 的 SSR, 其频率分别为 0.26、0.07 和 0.23, GC 含量为 83% 的微卫星频率最低(表 3)。

2.5 大熊猫和北极熊重复拷贝类别分析

大熊猫有 320 种重复拷贝类别, 而北极熊有 350

种, 其中 A、AC、AG、AAAT 和 AAAG 类型出现次数最多, 而 C、CG 出现次数较少, 大熊猫和北极熊微卫星中的重复拷贝类别分布特征相似, 排名前十的重复拷贝类别中大部分都相同(表 4)。

2.6 各重复拷贝类别的数量和相应的比例

单碱基重复类型中, 大熊猫基因组中 A 重复拷贝类别数量最多为 396 134 个, 占 95.1%, 北极熊的情况也类似(表 5), 二碱基重复类型中, 大熊猫基因组中以 AC 重复拷贝类别的数量最多, 为 101 299 个, 占有二碱基微卫星序列总数的 45.27%, 其次是 AG 和 AT, 分别为 99 531 (44.48%) 和 22 470 (10.04%), 北极熊基因组中的规律也相似。三碱

表 4 出现次数最多的 10 种重复拷贝类别  
Table 4 The ten SSR repeat units occurs most frequently

大熊猫		北极熊	
SSR 核心重复类型	SSR 出现次数	SSR 核心重复类型	SSR 个数
A	396 134	A	413 551
AC	101 286	AC	112 089
AG	99 531	AG	108 563
AAAT	65 006	AAAT	72 812
AAAG	25 877	AAAG	28 074
AT	22 470	AT	27 179
C	19 054	C	24 420
AAAC	11 917	AAGG	14 256
AAGG	11 808	AAAC	13 084
AAT	10 692	AAC	11 432

基重复类型中,大熊猫以 AAT 最多,而北极熊以 AAC 最多。五碱基重复类型中,大熊猫和北极熊都是以 AAACA 最多。四碱基重复类型和六碱基重复类型中,大熊猫和北极熊的前 3 种重复类型也有所不同(表 5)。

表 5 大熊猫和北极熊基因组中 6 种重复类型中常见的 3 种 SSR  
Table 5 The three common SSRs of six different repeat types in genomic sequence of giant panda and polar bear

SSR 类型	大熊猫	北极熊
单碱基重复类型	A(396 134) 95.41%	A(413 551) 94.42%
	C(19 054) 4.59%	C(24 420) 5.58%
二碱基重复类型	AC(101 286) 45.27%	AC(112 089) 45.13%
	AG(99 531) 44.48%	AG(108 563) 43.71%
	AT(22 470) 10.04%	AT(27 179) 10.94%
三碱基重复类型	AAT(10 692) 29.77%	AAC(11 432) 26.01%
	AAC(10 480) 29.18%	AAT(11 391) 25.91%
	AAG(3463) 9.64%	AAG(6845) 15.58%
四碱基重复类型	AAAT(65 006) 42.03%	AAAT(72 812) 41.71%
	AAAG(25 877) 16.73%	AAAG(28 074) 16.08%
	AAAC(11 917) 7.70%	AAGG(14 256) 8.17%
五碱基重复类型	AAACA(7353) 31.75%	AAACA(8369) 31.36%
	AAAGA(4798) 20.72%	AAATA(6353) 23.81%
	AAATA(4697) 20.28%	AAAGA(5003) 18.75%
六碱基重复类型	AAACAA(501) 21.4%	AAACAA(700) 14.95%
	AAAGAA(222) 9.4%	AACCCT(563) 12.02%
	AGAGGG(176) 7.5%	AGATAT(556) 11.88%

注:括号内数字表示该重复拷贝类别出现的次数,后面的百分数是该重复拷贝类别占所在重复类型的百分比

Note: number in parenthesis indicates occurrence number of the repeat type, the following percentage means the percentage of the repeat type in all repeat types

### 3 讨论

本研究中的重复序列含量表明,大熊猫(0.64%)和北极熊(0.79%)相近,它们的微卫星占基因组比例与河豚(0.77%)(崔建洲等,2006)相近。各重复类型中,单碱基重复类型所占比例最高,其次是二碱基

重复类型和四碱基重复类型,两个物种中微卫星的 GC 含量也一致,总体来说,北极熊的微卫星密度、丰度、总数和 GC 含量等均高于大熊猫。

前人研究表明不同物种的基因组微卫星分布规律不同。秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (Katti *et al.*, 2001) 和红原鸡 *Gallus gallus* (黄杰等, 2012) 等物种的基因组微卫星序列中,是以单碱基数量最多。然而,在一些其他物种的基因组中,如果蝇 *Drosophila melanogaster* (Schug *et al.*, 1998)、中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (高焕等, 2004)、蜜蜂 *Apis mellifera* (魏朝明等, 2007), 出现了二碱基为优势重复类型的情况。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Katti *et al.*, 2001)、丝状真菌 *Neurospora crassa* (Li *et al.*, 2005) 和二斑叶螨 *Tetranychus urticae* (汪自立等, 2013) 基因组中占主导地位的微卫星重复类型是三碱基。由此可见,同一物种的不同微卫星重复类型的丰度差异较大;不同物种的优势微卫星重复类型不一样。微卫星用于遗传标记研究表明,与二碱基、三碱基微卫星相比较,四碱基微卫星是更精确和可靠的微卫星遗传标记 (Archie *et al.*, 2003)。因此开发大熊猫四碱基多态性微卫星标记对开展大熊猫种群遗传多样性和结构分析、亲子鉴定、连锁图谱构建、个体识别及数量调查等研究具有极其重要的意义。根据大熊猫四碱基微卫星序列数据分析结果,四碱基微卫星的数量为 154 672 个,占总数的 18.09%,数量仅次于单碱基和二碱基;四碱基微卫星共有 32 种重复拷贝类别,大量的四碱基微卫星序列数量以及多样化的四碱基重复类别为开发大熊猫四碱基微卫星标记提供了充足的基础数据。并且,四碱基重复次数分布范围广泛,从 4 次到 463 次都有分布,其中适合多态性标记开发的重复次数分布于 10~22 次的四碱基微卫星共有 3228 个,为开发适合设计引物的大熊猫四碱基微卫星序列数据库,以及为筛选大量高质量的大熊猫四碱基微卫星遗传标记提供了重要的数据保障和信息支持。

Paetkau 和 Strobeck (1998) 研究表明熊科的一些微卫星标记是通用的,本研究鉴定了大熊猫和北极熊的基因组微卫星,可以较好地推动熊科微卫星标记的筛选工作。前人研究并未以四碱基微卫星标记的开发为重点,二碱基微卫星的标记在北极熊和其他熊科动物报道较多,四碱基微卫星稳定性高于二碱基微卫星。北极熊四碱基的微卫星比大熊猫的约多两万个,大熊猫基因组序列为 2.4 G,存在 0.1 Gb

的区域没有被测到,现有的 scaffold 中还有 54.2 Mb 的 gap 序列(Li R *et al.*, 2010),因此,一些四碱基重复微卫星可能没有在大熊猫基因组中发现,可以尝试用北极熊基因组中存在的四碱基微卫星标记,设计引物,研究是否在大熊猫基因组中出现,反之亦然,如此更多的微卫星标记将被开发出来。同时,鉴定大熊猫和北极熊基因组中的共线性区域或者保守区域,从中来筛选共同拥有的微卫星标记,这些微卫星标记很有可能为熊科各物种共同拥有,将为熊科的微卫星开发提供良好的数据支撑。

#### 4 参考文献

- 曹玫, 杨玉华, 王喜忠, 等. 2001. 大熊猫基因组微卫星 DNA 的分离与序列分析[J]. 应用与环境生物学报, 7(3): 277-280.
- 崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 2006. 红鳍东方鲀基因组微卫星特征分析[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 36(2): 249-254.
- 高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 2004. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组微卫星特征分析[J]. 海洋与湖沼, 35(5): 424-431.
- 黄杰, 杜联明, 李玉芝, 等. 2012. 红原鸡全基因组中微卫星分布规律研究[J]. 四川动物, 31(3): 358-363.
- 沈富军, Watts P, 张志和, 等. 2005. Dynal 磁珠富集大熊猫微卫星标记[J]. 遗传学报, 32(5): 457-462.
- 汪自立, 黄杰, 杜联明, 等. 2013. 二斑叶螨和肩突硬蜱基因组微卫星分布规律研究[J]. 四川动物, 32(4): 481-486.
- 魏朝明, 孔光耀, 廉振民, 等. 2007. 蜜蜂全基因组中微卫星的丰度及其分布[J]. 昆虫知识, 44(4): 501-504.
- 张亚平, 王文, 宿兵, 等. 1995. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用[J]. 动物学研究, 16(4): 301-306.
- Archie E, C Moss, S Alberts. 2003. Characterization of tetranucleotide microsatellite loci in the African Savannah Elephant (*Loxodonta africana africana*) [J]. Molecular Ecology Notes, 3(2): 244-246.
- Brandt J, Van Coeverden de Groot P, Zhao K, *et al.* 2014. Development of nineteen polymorphic microsatellite loci in the threatened polar bear (*Ursus maritimus*) using next generation sequencing[J]. Conservation Genetics Resources, 6(1): 59-61.
- Brinkman TJ, Person DK, Schwartz MK, *et al.* 2010. Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets[J]. Conservation Genetics Resources, 2(1): 115-118.
- David VA, S Sun, Z Zhang, *et al.* 2006. Parentage assessment among captive giant pandas in China[M]// Wildt DE, Zhang AJ, Zhang HM, *et al.* Giant pandas: biology, veterinary medicine and management. Cambridge: Cambridge University Press; 245-273.
- Du LM, Li YZ, Zhang XY, *et al.* 2013. MSDB: a user-friendly program for reporting distribution and building databases of microsatellites from genome sequences[J]. Journal of Heredity, 104(1): 154-157.
- Dubey S, Shine R. 2010. Restricted dispersal and genetic diversity in populations of an endangered montane lizard (*Eulamprus leuraensis*, Scincidae)[J]. Molecular ecology, 19(5): 886-897.
- IUCN. 2000. IUCN Red List of Threatened Species [EB]. <http://www.iucnredlist.org>.
- Katti MV, Ranjekar PK, Gupta VS. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences[J]. Molecular Biology and Evolution, 18(7): 1161-1167.
- Li CY, Li JB, Zhou XG, *et al.* 2005. Frequency and Distribution of Microsatellites in the Genome of Filamentous Fungus, *Neurospora crassa* [J]. Agricultural Sciences in China, 4(2): 118-124.
- Li B, Zhang G, Willerslev E, *et al.* 2011. Genomic data from the polar bear (*Ursus maritimus*) [DB]. GigaScience. <http://dx.doi.org/10.5524/100008>
- Li RQ, Fan W, Tian G, *et al.* 2010. The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome[J]. Nature, 463(7279): 311-317.
- Li YZ, Xu X, Shen FJ, *et al.* 2010. Development of new tetranucleotide microsatellite loci and assessment of genetic variation of giant panda in two largest giant panda captive breeding populations[J]. Journal of Zoology, 282(1): 39-46.
- Lu Z, Johnson WE, Menotti-Raymond M, *et al.* 2001. Patterns of genetic diversity in remaining giant panda populations[J]. Conservation Biology, 15(6): 1596-1607.
- Massault C, Hellemans B, Louro B, *et al.* 2010. QTL for body weight, morphometric traits and stress response in European sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. Animal Genetics, 41(4): 337-345.
- Miller W, Schuster SC, Welch AJ, *et al.* 2012. Polar and brown bear genomes reveal ancient admixture and demographic footprints of past climate change[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(36): E2382-E2390.
- Muniz FL, Silveira RD, Campos Z, *et al.* 2011. Multiple paternity in the Black Caiman (*Melanosuchus niger*) population in the Anavilhanas National Park, Brazilian Amazonia[J]. Amphibia-Reptilia, 32(3): 428-434.
- Obbard ME, Thiemann GW, Peacock E, *et al.* 2010. Polar Bears; Proceedings of the 15th Working Meeting of the IUCN/SSC Polar Bear Specialist Group, Copenhagen, Denmark, 29 June-3 July 2009 [M]. Gland, Switzerland: IUCN.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, *et al.* 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears[J]. Molecular Ecology, 4(3): 347-354.
- Paetkau D, Strobeck C. 1998. Ecological genetic studies of bears using microsatellite analysis[J]. Ursus, 10: 299-306.
- Poissant J, Davis C. 2011. Isolation and characterization of ten polar bear (*Ursus maritimus*) microsatellite loci and cross-amplification in other Ursidae[J]. Conservation Genetics Resources, 3(4): 637-639.
- Schug M, Wetterstrand K, Gaudette M, *et al.* 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*[J]. Molecular Ecology, 7(1): 57-70.
- Shen FJ, Watts PC, He W, *et al.* 2007. Di-, tri- and tetranucleotide microsatellite loci for the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*[J]. Molecular Ecology Notes, 7(6): 1268-1270.
- Wu H, Zhan XJ, Zhang ZJ, *et al.* 2009. Thirty-three microsatellite loci for noninvasive genetic studies of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. Conservation Genetics, 10(3): 649-652.
- Zhang HM, Guo Y, Li DS, *et al.* 2009. Sixteen novel microsatellite loci developed for the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. Conservation Genetics, 10(3): 589-592.