

果子狸多态性微卫星位点的筛选及特性分析

王迪* 张丹* 熊梦吟 卜红亮 王大军 姚蒙 李晟 王戎疆†

北京大学生命科学学院, 北京 100871; *同等贡献作者; †通信作者, E-mail: rjwang@pku.edu.cn

摘要 以采自四川平武县老河沟自然保护区的一份果子狸(*Paguma larvata*)组织样品为实验材料, 通过FIASCO法构建微卫星文库, 对250个单克隆进行测序分析, 获得147条含微卫星序列的片段, 微卫星单元重复次数大于10的序列共有42条。据此设计引物42对, 进一步使用21份果子狸样品检测这些引物的扩增能力和扩增序列多态性, 最终得到5个多态性微卫星位点。同时, 对已发表的13个果子狸微卫星位点进行检测, 发现其中5个位点具有多态性。对这10个位点的特性进行分析, 结果显示它们具有较高的多态性(等位基因数为2~11, 观测杂合度为0.286~0.737, 期望杂合度为0.358~0.906); PID和PID-sib值表明, 在约 10^9 个没有亲缘关系的个体或 10^4 个有亲缘关系的个体中, 可能发现一对基因型相同的个体, 由于果子狸野外局域种群规模远低于这个量级, 这10个微卫星位点可用于果子狸的个体识别。

关键词 果子狸; 微卫星标记; 多态性

Development and Characterization of Polymorphic Microsatellite Markers in the Masked Palm Civet (*Paguma Larvata*)

WANG Di*, ZHANG Dan*, XIONG Mengyin, BU Hongliang, WANG Dajun,
YAO Meng, LI Sheng, WANG Rongjiang†

School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871; * These authors contributed equally to this work;
† Corresponding author, E-mail: rjwang@pku.edu.cn

Abstract To provide genetic tools for individual identification of the masked palm civet (*Paguma larvata*) through DNA analysis, we selected a tissue sample from Laohegou Nature Reserve in Sichuan for constructing microsatellite library by FIASCO. Altogether 250 clones were sequenced and 147 sequences were found containing microsatellite motifs, in which there were 42 sequences with >10 motif repeats. Primer pairs were designed based on these 42 sequences. Through tests for amplification and polymorphism using additional 21 samples of masked palm civets, 5 polymorphic microsatellite markers were obtained. In the meantime, 13 microsatellite markers published previously were tested for the masked palm civet, and found 5 of them polymorphic. Collectively, these 10 markers showed relatively high polymorphism (number of alleles was 2–11, observed heterozygosity was 0.286–0.737, and expected heterozygosity was 0.358–0.906). The values of PID and PID-sib indicated that there would be individuals with completely identical genotypes in about 10^9 unrelated individuals or 10^4 related individuals. As the size of wild populations in a particular region was greatly lower than this number, these 10 microsatellite markers were sufficient for individual identification for the masked palm civet.

Key words *Paguma larvata*; microsatellite markers; polymorphism

果子狸(*Paguma larvata*), 又名花面狸, 隶属哺乳纲(Mammalia)、食肉目(Carnivora)、灵猫科(Viverridae), 花面狸属(*Paguma*)。该属为单型属, 属

下仅果子狸一个种。果子狸为全球灵猫科动物中分布范围最广的物种, 广泛分布于东亚、东南亚以及喜马拉雅山脉南麓地区^[1-3]。在中国, 果子狸作为

一种传统的经济动物被广泛养殖^[4]。2003 年 SARS 疫情爆发时,果子狸被确认为 SARS 冠状病毒的中间宿主^[5],受到广泛关注。目前关于果子狸的研究集中在养殖方面,对其野外种群的了解较少^[6-7]。Zhou 等^[8-9]通过对中国中南部地区野生种群的研究,揭示果子狸的食性转换、家域范围和活动节律等行为习性。对于果子狸受威胁状况的评估,多使用间接证据。果子狸倾向于选择森林栖身,由于人类活动造成森林的减少,据此判断果子狸野外种群存在下降趋势,种群生存面临威胁^[10]。目前,果子狸被列入《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》,在《中国物种红色名录》中被评估为“近危(NT)”等级^[11-12]。因此,深入了解果子狸野生种群的状况有助于对其进行合理有效的保护。

遗传多样性信息对野生动物的管理与保护有十分重要的意义。种群遗传多样性的水平、分布及地理差异等信息有助于了解物种的演化历史、种群变化、基因交流和隔离等情况,对制定科学的保护策略和管理方法有指导作用^[13]。本研究组已经测定了果子狸的线粒体基因组^[14]。Patou 等^[15]对线粒体 *Cytb* 基因和控制区(control region)的序列分析表明,中国果子狸种群的遗传多样性较低。微卫星标记(microsatellite marker)比线粒体基因具有更丰富的多态性,也是野生动物遗传学分析常用的分子标记之一^[16]。Chen 等^[17]利用山西和广西的果子狸样品,通过筛选得到 6 个微卫星位点。Patou 等^[15]利用这些位点分析四川和湖北的野外种群的遗传多样性,结果表明野外种群的遗传变异水平较低。Inoue 等^[18]利用中国台湾和日本的果子狸样品,通过筛选得到 7 个微卫星位点。

本研究组建立了基于毛发陷阱的针对中小型食肉动物的非损伤性采样技术^[19],可以在野外环境中有效地收集果子狸的毛发样品,用于遗传分析^[19]。本文基于微卫星位点高多态性的特点,通过对野外收集的果子狸毛发样品进行微卫星多位点分析,实现个体识别,从而对果子狸野外种群的数量和密度进行可靠的评估。实现这一目标需要足够数目的微卫星位点。测试结果表明,Chen 等^[17]设计的 6 对引物中,有 4 对可以在本研究的样品中获得稳定的多态性标记,Inoue 等^[18]设计的 7 对引物中只有 1 对可用。本文拟利用 FIASCO 法,开发一些新的多态性微卫星标记,从而为果子狸的个体识别提供技术

支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 DNA 提取

本研究共采集 22 份果子狸的样品(表 1),用于微卫星位点的筛选,其中 20 份为毛发样品,包括北京动物园 3 份、湖北饲养场 10 份、四川宜宾饲养场 3 份和四川平武老河沟自然保护区 4 份;另外两份为组织样品,采自老河沟自然保护区的死亡个体。

使用 TransGen EasyPure Genomic DNA Kit(TransGen Biotech Co., Ltd) 提取基因组 DNA, DNA 溶液存于-20℃备用。

1.2 实验方法

本研究使用 FIASCO 法(fast isolation by AFLP sequences containing repeats)^[20]构建果子狸微卫星文库,进行多态性位点的引物开发。

1.2.1 微卫星文库构建

以取自四川老河沟自然保护区的 1 份果子狸组织样品作为材料,利用限制性内切酶 *Rsa* I 消化基因组 DNA, 25 μL 反应体系含 0.5 μg DNA、5U *Rsa* I (NEB)和 2.5 μL 10× Cutsmart buffer, 37℃酶切 2 小时。将酶切后的基因组 DNA 与接头 SuperSNX24 (Glenn and Schable 2005)进行连接, 10 μL 反应体系含 400U T4 DNA Ligase (TAKARA)、2 μL T4 DNA Ligase buffer、2 μL 50 μmol/L 接头和 5 μL 酶切基因组 DNA, 室温放置过夜。以连有接头的 DNA 片段为模板,用 SuperSNX24 引物进行 PCR 扩增,反应条件如下: 95℃预变性 4 分钟; 94℃变性 30 秒, 60℃退火 30 秒, 72℃延伸 20 秒, 共 20 个循环; 最后 72℃延伸 10 分钟。

将 PCR 产物与生物素标记的(AC)₈ 探针混合, 95℃预变性 5 分钟,使体系从 70℃缓慢降至 50℃,每次降温 0.5℃,每个温度状态下保持 5 秒,50℃保温 10 分钟,再从 50℃降温至 40℃,每次降温 0.5℃,

表 1 用于开发微卫星引物的果子狸样品信息
Table 1 Sample information of the masked palm civets used to screen microsatellite markers

| 来源地 | 类型 | 数量 |
|-------------|------|----|
| 北京动物园 | 毛发样品 | 3 |
| 湖北神农架养殖场 | 毛发样品 | 10 |
| 四川宜宾养殖场 | 毛发样品 | 3 |
| 四川平武县老河沟保护区 | 毛发样品 | 4 |
| 四川平武县老河沟保护区 | 组织样品 | 2 |

每个温度状态下保持5秒,最后15℃保温10分钟,得到杂交产物。加入已平衡好的链霉素和素包被的磁珠(Promega),混匀,室温下水平摇床150 rpm振荡1小时,用磁力架固定住磁珠,弃上清液,反复清洗后,置于95℃下,加入200 μ L 1×TE,轻摇5分钟,用磁力架固定住磁珠,取出上清液,即为富集的微卫星片段。以2倍体积无水乙醇沉淀DNA,晾干后加入25 μ L ddH₂O溶解。

以富集后的微卫星片段为模板,用SuperSNX-24引物进行PCR扩增,反应条件同前。PCR产物用琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收100~800 bp的条带。将回收的片段连接至质粒pEASY-T1(全式金)进行转化,涂板培养,即完成构建微卫星文库。挑取单菌落,培养后送样至睿博兴科(Ruibiotech Co., Ltd),利用Sanger测序技术进行菌液测序。

1.2.2 微卫星引物的设计与筛选

对获得的序列进行分析,删去重复序列,然后利用软件SSR Hunter^[21]筛选出包含微卫星的序列;选择微卫星单元重复次数大于10的序列,利用软件Primer Premier 5.0(Premier Biosoft International, Palo Alto, CA)进行引物设计并合成。另取3份样品(均来自老河沟自然保护区,2份毛发样品和1份组织样品),测试所设计的引物是否能够进行有效扩增。PCR反应条件如下:95℃预变性4分钟;94℃变性30秒,根据引物的熔解温度 T_m 确定退火温度,退火30秒,72℃延伸20秒,共35个循环;72℃终延伸10分钟。

对能够成功扩增的引物,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳来检验是否能扩增出多态性位点。该步骤使用12份样品,包括3份北京动物园样品、7份湖北样品和两份老河沟自然保护区样品。PCR反应条件同上一步。不能在所有样品中扩增,以及只能扩增出单一一位点条带的引物将被淘汰。最后,在21份样品(全部样品中去掉用于构建微卫星文库的样品)中检测引物的可用性。在引物的5'端加上荧光标记(FAM或HEX)进行PCR扩增,反应条件同上一步,产物用ABI 3730XL DNA分析仪进行毛细管电泳,选择GeneScanTM 500 LIZTM (Applied Biosystem)作为内标,通过软件GENEMARKER 2.4.2^[22]读取目标微卫星位点的片段长度。

1.2.3 数据统计

利用软件CERVUS ver. 3.0.7^[23]对微卫星位点的等位基因数、观测杂合度(observed heterogeneity,

H_o)、期望杂合度(expected heterogeneity, H_e)和多态性信息容量(polymorphic information content, PIC)进行分析。利用软件GENEPOP V4.2^[24-25],进行Hardy-Weinberg平衡(HWE)检测和连锁不平衡现象检测。利用软件MICROCHECKER v2.2.3^[26],进行无效等位基因检测。为避免多次检验过程中产生的统计偏差,我们通过顺序Bonferroni修正(sequential Bonferroni correction),对统计检验结果进行显著性判别。为确保现有引物能够满足个体识别的需要,根据21份样品的基因分型信息,利用软件GenALEx v6.5^[27],计算两个个体基因型一致的概率(probability of identity, PID)和一对同胞具有相同基因型的概率(probability of identity for sibling, PID-sib)。

2 结果

经过酶切、连接、预扩增、磁珠富集和质粒转化等过程,我们构建了果子狸微卫星文库。共检测250个单克隆,成功测序203条,去除重复后剩余序列170条,其中含微卫星序列的片段有147条,微卫星单元重复次数大于10的序列共有42条,据此设计引物42对。

利用这42对引物,对3份果子狸样品进行PCR扩增,结果表明均能扩增出目的片段。用这42对引物对12份样品进行扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示,有21对引物可以扩增得到多态性条带,其他引物或者无法在全部12份样品中扩增,或者只能得到单一一位点的条带。进一步地,在21份果子狸样品中检验这21对引物的可用性,毛细管电泳结果显示,一些引物扩增获得的多态性片段的长度差不是微卫星单元的整数倍,可能不是标准的微卫星位点,因此淘汰这些引物,最终得到5对具有多态性的微卫星引物(PL008、PL010、PL022、PL036和PL057),如表2所示。同时,我们对已发表的果子狸微卫星引物^[17-18]进行检测,结果表明其中5对可在本研究的21份果子狸样品中稳定扩增,从而得到多态性条带(表2)。

对21份果子狸样品的检测结果(表2)显示,10个微卫星位点的等位基因数目为2~11, H_o 为0.286~0.737, H_e 为0.358~0.906。PL022, PL057, PC14, PC55, PC58和PLAMST-26位点具有高度多态性($PIC > 0.5$),其余位点具有中度多态性($0.25 < PIC < 0.5$)。通过HWE检测发现,10个微卫星位点均没有

表 2 果子狸多态性卫星位点的扩增引物
Table 2 Primers for polymorphic microsatellite markers of the masked palm civet

| 引物 | 引物序列(5'-3') | 重复单元 | 产物长度/bp | $T_m/^{\circ}\text{C}$ | 等位基因数 | H_o | H_e | PIC | HWE* | Fnull | GenBank 序列号或来源 |
|---------------|-----------------------------|------|---------|------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|-------------------------|
| PL008 | F: CATGCGAGCCAAATTCATACG | AC | 128~138 | 50 | 3 | 0.286 | 0.501 | 0.390 | 0.0552 | 0.1363 | MT201794 |
| | R: GTGGGAGCTACGTGCAAAA | | | | | | | | | | |
| PL010 | F: AACCGGCTGCATCCCAATCC | AC | 175~191 | 52 | 5 | 0.571 | 0.525 | 0.473 | 0.5428 | -0.0390 | MT201795 |
| | R: TCCTGGCTCTGCTGTCACT | | | | | | | | | | |
| PL022 | F: TTAAAGAGCCACTGAGTGAAAG | CT | 105~129 | 52 | 5 | 0.619 | 0.695 | 0.623 | 0.2125 | 0.0351 | MT201796 |
| | R: TGTTCACCTGTTGAGGCTAGAG | | | | | | | | | | |
| PL036 | F: ATACACCGCTTCCATAGCACATA | AC | 366~368 | 52 | 2 | 0.350 | 0.358 | 0.288 | 1.0000 | -0.0009 | MT201797 |
| | R: AGTGGCATCTCAGCCTTTTCAT | | | | | | | | | | |
| PL057 | F: TGAAAGCCCGATTGGTGAAA | AC | 262~272 | 52 | 6 | 0.737 | 0.737 | 0.732 | 0.0393 | 0.0172 | MT201798 |
| | R: AGAAACCCCAAGGGAACACG | | | | | | | | | | |
| PC14 | F: CCTCCTACGTGTAAGATT | TG | 200~212 | 50 | 6 | 0.524 | 0.807 | 0.755 | 0.0187 | 0.1477 | Chen 等 ^[17] |
| | R: AGAGCAGCCCTGATGAAG | | | | | | | | | | |
| PC55 | F: TAAGTAGCCACTTGAAA | CA | 181~191 | 50 | 4 | 0.667 | 0.627 | 0.541 | 0.2874 | -0.0338 | Chen 等 ^[17] |
| | R: GCTGACGACATAGATAA | | | | | | | | | | |
| PC119 | F: GACAGGGACACGGATACA | AC | 112~118 | 55 | 4 | 0.333 | 0.368 | 0.331 | 0.6497 | 0.0192 | Chen 等 ^[17] |
| | R: ACTGGAATAGAAGGACGG | | | | | | | | | | |
| PC58 | F: GTCAGGGCAGAAAGAGTT | GT | 138~152 | 52 | 8 | 0.524 | 0.861 | 0.820 | 0.0300 | 0.1719 | Chen 等 ^[17] |
| | R: GTTAGCAAAGCCTACGTCATGGAA | | | | | | | | | | |
| PLA MST-26 | F: TCTCTCTCTCTCACACACACAC | AC | 256~276 | 55 | 11 | 0.684 | 0.906 | 0.871 | 0.1131 | 0.1052 | Inoue 等 ^[18] |
| | R: CATTGAGTCACCTGTGATCC | | | | | | | | | | |

说明: *表示 Hardy-Weinberg 平衡检测 p 值, Hardy-Weinberg 平衡检验中引入博洛尼修正, 即 $p>0.005$ 时为差异不显著; Fnull 表示无效等位基因频率。

显著偏离 HWE ($p < 0.01$)。10 个微卫星位点的无效等位基因频率都小于 0.2^[28]。此外, 连锁分析也表明两两位点间不存在连锁不平衡现象。PID 计算结果表明, PID 和 PID-sib 的值分别为 6.1×10^{-9} 和 5.6×10^{-4} 。

3 讨论

本研究利用 FIASCO 方法构建了果子狸的微卫星文库, 并从中筛选得到 5 个多态性微卫星位点。有研究表明, 以二碱基为重复单元的微卫星序列普遍存在于生物体中, 其中(AC)是哺乳动物中频率最高的微卫星重复单元^[29]。本研究选择重复单元为(AC)的微卫星位点为目标, 从 147 条微卫星序列中筛选得到 5 个微卫星位点, 比例达到 3.4%。

通过对已发表的果子狸微卫星引物的试验, 得到 5 对可用微卫星引物, 加上本研究新开发的 5 对引物, 这 10 对引物所能扩增的微卫星位点的 PID 和 PID-sib 值可以分别达到 6.1×10^{-9} 和 5.6×10^{-4} , 即在约 10^9 个无亲缘关系个体中可能发现一对基因型相同的个体, 或在约 10^4 个有亲缘关系的个体中可能发现一对基因型相同的个体。一般来说, 在一定区域内(如一个保护区)果子狸野外种群的规模(种群内的个体数量)远小于此量级^[2,6], 因此这些引物足够用于野外种群的个体识别。

目前, 越来越多的研究依靠非损伤性取样的方式获得动物的遗传样品, 例如通过毛发和粪便来获取 DNA 样品^[30-31]。这类取样方法获得的 DNA 样品质量普遍较差, 在微卫星引物开发过程中应考虑这个问题。本研究新开发的引物以及从原有引物中选出的引物所能扩增的目的片段都低于 400 bp, 多数在 100~200 bp 之间, 可以保证在 DNA 模板较差的情况下, 也能对微卫星位点进行有效的扩增。

通过对果子狸野外和圈养种群的遗传分析, 可以更深入地了解其种群来源、数量动态和遗传交流等情况, 有助于建立科学的保护和管理策略, 同时为认识以野生动物为宿主的病原传播模式和防疫监管提供有用的信息。

致谢 北京动物园卢雁平高级工程师在样品采集过程中给予支持和协助, 老河沟自然保护区在野外样品采集过程中提供帮助, 四川宜宾和湖北养殖场予以协助; 北京大学生命科学学院孟玉平和李茹两位老师为实验提供支持。在此一并表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] 高耀亭. 中国动物志: 兽纲 食肉目. 北京: 科学出版社, 1987
- [2] 张保良, 苏学良, 高贵昌, 等. 花面狸的分布及种群组成研究. 动物学杂志, 1991, 26(6): 42-45
- [3] 刘少英, 吴毅. 中国兽类图鉴. 福州: 海峡书局, 2019
- [4] 朱开明, 田秀华, 伍南. 果子狸的养殖现状与市场前景. 经济动物学报, 2017, 21(3): 174-176
- [5] Wicker L V, Canfield P J, Higgins D P. Potential pathogens reported in species of the family Viverridae and their implications for human and animal health. Zoonoses and Public Health, 2017, 64: 75-93
- [6] 蒋志刚, 李春旺, 曾岩. 果子狸研究现状. 动物学杂志, 2003, 38(4): 120-122
- [7] 涂飞云, 韩卫杰, 孙志勇, 等. 果子狸研究现状与展望. 南方林业科学, 2016, 44(6): 70-73
- [8] Zhou Y B, Zhang J S, Slade E, et al. Dietary shifts in relation to fruit availability among masked palm civets (*Paguma larvata*) in central China. Journal of Mammalogy, 2008, 89(2): 435-447
- [9] Zhou Y B, Newman C, Palomares F, et al. Spatial organization and activity patterns of the masked palm civet (*Paguma larvata*) in central-south China. Journal of Mammalogy, 2014, 95(3): 534-542
- [10] McCarthy J L, Fuller T K. Records of small carnivores from Bukit Barisan Selatan National Park, southern Sumatra, Indonesia. Small Carnivore Conservation, 2014, 51: 59-63
- [11] 国家林业和草原局. 国家林业局第七号——国家保护的有益的或者具有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录[EB/OL]. (2000-08-01) [2017-03-15]. <http://www.forestry.gov.cn/main/3954/content-959027.html>
- [12] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录. 北京: 高等教育出版社, 2004
- [13] Schwartz M K, Luikart G, Waples R S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology & Evolution, 2007, 22(1): 25-33
- [14] Zhang D, Xu L W, Bu H L, et al. The complete mitochondrial genome of the masked palm civet (*Paguma larvata*, Mammalia, Carnivora). Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(5): 3764-3765
- [15] Patou M L, Chen J, Cosson L, et al. Low genetic diversity in the masked palm civet *Paguma larvata*

- (Viverridae). *Journal of Zoology*, 2009, 278: 218–230
- [16] Jarne P, Lagoda P J L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 1996, 11(10): 424–429
- [17] Chen J P, Andersen D H, Veron G, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the masked palm civet (*Paguma larvata*). *Biochemical Genetics*, 2008, 46(7/8): 392–397
- [18] Inoue T, Kaneko Y, Yamazaki K, et al. Genetic population structure of the masked palm civet *Paguma larvata*, (Carnivora: Viverridae) in Japan, revealed from analysis of newly identified compound microsatellites. *Conservation Genetics*, 2012, 13: 1095–1107
- [19] Bu H L, Hopkins III J B, Zhang D, et al. An evaluation of hair-snaring devices for small-bodied carnivores in southwest China. *Journal of Mammalogy*, 2016, 97(2): 589–598
- [20] Glenn T C, Schable N A. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 2005, 395: 202–222
- [21] 李强, 万建民. 一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发. *遗传*, 2005, 27(5): 808–810
- [22] Holland M M, Parson W. GeneMarker (R) HID: a reliable software tool for the analysis of forensic STR data. *Journal of Forensic Sciences*, 2011, 56(1): 29–35
- [23] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106
- [24] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version-1.2)-population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248–249
- [25] Rousset F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(1): 103–106
- [26] Van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M, et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(3): 535–538
- [27] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537–2539
- [28] Dakin E E, Avise J C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 2004, 93(5): 504–509
- [29] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1): 1–16
- [30] Ferreira C M, Sabino-Marques H, Barbosa S, et al. Genetic non-invasive sampling (gNIS) as a cost-effective tool for monitoring elusive small mammals. *European Journal of Wildlife Research*, 2018, 64: no. 46
- [31] Cheng E, Hodges K E, Sollmann R, et al. Genetic sampling for estimating density of common species. *Ecology and Evolution*. 2017, 7(16): 6210–6219