

一例中华穿山甲孕期激素监测和双胞胎卵型鉴定*

燕洪美^{1, 2} 许学林² 安富宇² 王 凯²
夏彦玲¹ 华 彦²

(1. 东北林业大学 野生动物与自然保护地学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 广东省森林培育与保护利用重点实验室 / 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要 2020 年 8 月, 广东省野生动物监测救护中心救护的一只成体雌性中华穿山甲 *Manis pentadactyla*, 在人工饲养条件下自然受孕, 妊娠约 11 周后产出无生命体征的双胞胎。在合圈前及孕期, 收集雌性的粪便, 采用酶联免疫法 (Elisa), 测定激素促黄体素、促卵泡素、催乳素、孕激素、睾酮和雌二醇的含量。结果发现, 雌二醇水平在妊娠第 7 周达到最高 (1 050.14 pmol/L); 促黄体素水平在妊娠第 4 周达到最高 (53.95 mIU/mL); 促卵泡素水平在妊娠第 5 周达到最高 (26.08 mIU/mL); 孕激素含量在妊娠第 2 周达到最高 (22.57 ng/mL) 后波动性下降; 睾酮水平呈波动变化, 但在合圈前后无明显差异; 催乳素水平在流产当天最低 (797.15 mIU/L)。两胚胎体重分别为 25.4 g 和 18.3 g, 总长分别为 15.8 cm 和 13.6 cm; 头部、躯干、尾部和四肢均分化良好, 但有差异, 鳞片覆盖背部、尾部和部分四肢; 四爪形状良好, 未角质化; 眼部未发育完全; 唇和舌头具备形态; 肋骨具备明显轮廓; 可看到部分肠道形状。利用微卫星标记技术鉴定其为异卵双胞胎。

关键词 人工饲养; 中华穿山甲; 双胞胎; 异卵

中图分类号: S718.6 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2022) 03-0018-07

A Case of Surveillance of Hormones during Pregnancy and Identification of Twins in Captive Chinese Pangolin

YAN Hongmei^{1, 2} XU Xuelin² AN Fuyu² WANG Kai²
XIA Yanling¹ HUA Yan²

(1. College of Wildlife and Natural Reserve, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract In August 2020, an adult female Chinese pangolin (*Manis pentadactyla*) was pregnant, and gave birth to inanimate twins after 11 weeks of gestation, which was rescued by Guangdong Wildlife Monitoring and Rescue Center. The levels of estradiol, testosterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, progesterone and prolactin in the feces of female pangolin were determined by enzyme linked immunosorbent assay. The results showed that estradiol levels peaked at 1 050.14 pmol/L after mating seven weeks; luteinizing hormone levels peaked at 53.95 mIU/mL after mating four weeks; follicle stimulating hormone levels peaked at

* 基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2022KJCX008), 国家林业和草原局项目“穿山甲收容救护及其繁育技术研究”。

第一作者: 燕洪美 (1996—), 女, 在读硕士, 研究方向为畜牧学, E-mail: 15604614312@163.com。

许学林 (1995—), 女, 主要从事特种经济动物饲养研究, E-mail: xuelin_x@163.com。

通信作者: 华彦 (1979—), 男, 副教授, 主要从事濒危野生动物保护研究, E-mail: wildlife530@163.com。

夏彦玲 (1974—), 女, 副教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖, E-mail: xiayanling1974@163.com。

26.08 mIU/mL after mating five weeks; the progesterone content reached the peak at 22.57 ng/mL after mating two weeks and the volatility decreased; testosterone levels have been fluctuated, no significant different at before and after mating; prolactin reached its lowest point on the day of abortion (797.15 mIU/L). The stillbirth had well differentiated, and the morphological measurements showed that their weights were 25.4 g and 18.3 g, and their total lengths were 15.8 cm and 13.6 cm, respectively. Head, trunk, tail and limbs all morphological, with scales covering excepted head and parts of limbs. The claws bent and soft. Their eyes hypoplasia, lips and tongue well developed. The ribs and bowel shape clearly seen. They were identified as fraternal twins using microsatellite marker technology. This case provides reference materials for both the developmental biology and artificial breeding of Chinese pangolins.

Key words captivity; *Manis pentadactyla*; twins; dizygotic

穿山甲隶属于哺乳纲 Mammalia 鳞甲目 Pholidota 鲛鲤科 Manidae 鲛鲤属 *Manis*, 是全世界受非法贸易威胁最大的哺乳类之一^[1-4]。目前, 由于栖息地的碎片化和资源过度利用等导致主要分布于中国的中华穿山甲 *Manis pentadactyla* 野外种群数量急剧下降, 濒临灭绝^[5-7]。2017 年濒危野生动植物国际贸易公约 (CITES) 已将全球现存的 8 种穿山甲纳入附录 I 中, 禁止有关穿山甲的任何贸易。2020 年, 中国将中华穿山甲升为国家一级保护动物, 并移出《药典》^[2]。因此, 亟需进行迁地保护、人工繁育等工作, 然后野化放归实现种群复壮。

穿山甲发情鉴定主要依靠对动物生殖器形状和分泌物的观察^[8], 根据发情期的特征进行判断。妊娠鉴定主要通过 B 超等手段进行判断^[9]。但是这些方法对于穿山甲发情和妊娠鉴定并不准确或无法进行长期监测。因此对没有明显外在发情特征的穿山甲发情判定及妊娠期的监测, 最有效的途径就是分析其体内激素水平的变化。血液样品可以直接准确反映动物体内激素水平的变化^[10], 但对穿山甲连续采集血液, 不仅会导致其产生应激, 也对其正常的生理、行为产生影响。近年来研究表明粪便中的激素含量与血液中的激素含量有明显的相关性^[11], 因此可通过粪便激素水平监测穿山甲的生理状态。

穿山甲通常为单胎单只, 偶有双胞胎。Zhang 等^[12]报道吴诗宝曾在野外拍摄到两只幼崽骑在一只雌性马来穿山甲 *Manis javanica* 尾巴上, 及猎人曾见到两只同等大小的中华穿山甲幼崽骑在雌性穿山甲背上, 表明它们生下了双胞胎, 但无其他证据进行佐证^[8]。人工饲养条件下仅见 1 例马来穿山甲产下双胞胎^[13], 但并未对胚胎进行形态测

量与卵型鉴定。本研究对一例在人工饲养条件下受孕的雌性中华穿山甲合圈前及孕期粪便中激素含量进行了监测, 并对流产的双胞胎胚胎进行测量及卵型鉴定, 为中华穿山甲繁殖生理研究和人工繁育工作提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究穿山甲个体为 2019 年 12 月广东省野生动物监测救护中心救护的非法贸易个体, 来源地点不详。根据明显的形态特征进行判断, 确定其为中华穿山甲。救护时动物体重为 3.82 kg, 救护两周后, 动物正常采食、活动, 体况恢复正常。饲养 6 个月后, 动物体重达到 6.35 kg, 确定雌雄兽遗传距离较远后, 于 2020 年 6 月 11 日将人工饲养雄性中华穿山甲个体转移到雌性笼舍内开始合圈饲养, 6 月 24 日移出雄性个体。雌性个体流产日期为 2020 年 8 月 22 日, 幼兽产出时已经无生命特征, 脐带与母体分离, 母兽无明显受伤。

1.2 粪便收集及激素测定

合圈前, 5 月 1 日至 20 日每周收集雌性穿山甲粪便, 5~7 天采集一次, 合圈期间 (6 月 11 日—6 月 24 日) 动物每次排便均进行收集, 合圈结束后进入妊娠期, 妊娠至流产期间 (6 月 25 日—8 月 25 日) 每 3~5 天收集一次粪便。使用无菌棉签取粪便未被污染部分装入采样管中, 标记动物编号和日期, 收集完成后及时置于 -20℃ 冰箱内保存。共收集并检测 27 份粪便。

将粪便于室温下解冻, 剔除稻草等杂物, 置于研钵中, 充分研磨并混匀。准确称取研磨好的粪便 1.5 g 左右, 装入 15 mL 离心管中, 加入 10 mL

90% 的甲醇溶液，震荡 1 min，使其混合均匀，在恒温水浴振荡器中萃取 20 min 后，2 000 rpm 室温离心 20 min，取 1 mL 上清液分装待测。同时准确称取 10 g 研磨好的粪便，105℃烘干称重，测定粪便中干物质的含量。

使用上海优选生物科技有限公司生产酶联免疫分析试剂盒，按照说明书，检测粪便样本中雌二醇（E2）、睾酮（T）、促黄体素（LH）、促卵泡素（FSH）、催乳素（PRL）和孕激素（PROG）含量。

1.3 双胞胎形态指标测量

测量和记录胚胎的形态学指标：体重、体长、头体长、前第三指爪长、后第三趾爪长、背鳞列数、背鳞行数、尾鳞列数和尾鳞行数等。流产双胞胎体型较大的记为 Z1(取中华穿山甲拼音首字母)，体型较小的个体记为 Z2。

1.4 双胞胎的卵型鉴定

微卫星 DNA（Short Tandem Repeat，STR）是广泛存在于基因组内的一种串联重复序列。微卫星标记具有丰富的多态性和一定保守性的特点，成为

快速、简便地个体识别的首选标记^[14-15]。本研究使用肌肉组织用于双胞胎卵型的鉴定。选择 10 个已报道的马来穿山甲 STR 位点进行鉴定^[16]（表 1）。

聚合酶链反应（PCR）体系为 25 μL，正向引物用荧光染料标记。PCR 条件如下：92℃ 3 min；30 个循环（92℃ 30 s；引物特异性退火 72℃ 30 s）；最后 72℃ 5 min。所得 PCR 产物在 ABI 3100 自动测序仪上进行毛细管电泳，并使用 Genemapper 3.7 分析片段大小和基因型。

基于 10 个位点，两个体具有相同的多位点基因型的概率为 0.000 37，这表明 10 个位点的集合足以识别个体（PIsib<0.01），10 个位点均一致时，同卵概率为 99.963%^[17]。如果所有位点的所有等位基因均相同，则判定为同卵双胞胎。如果只发现一个等位基因的一个错配，则重新提取 DNA，如果它仍然不同，判定双胞胎为异卵。如果等位基因在两个或两个以上的位置上存在差异，则认为该双胞胎为异卵双胞胎^[14]。

表 1 用于穿山甲卵型鉴定的 STR 序列
Table 1 The sequence of STR used in zygosity diagnosis of pangolin

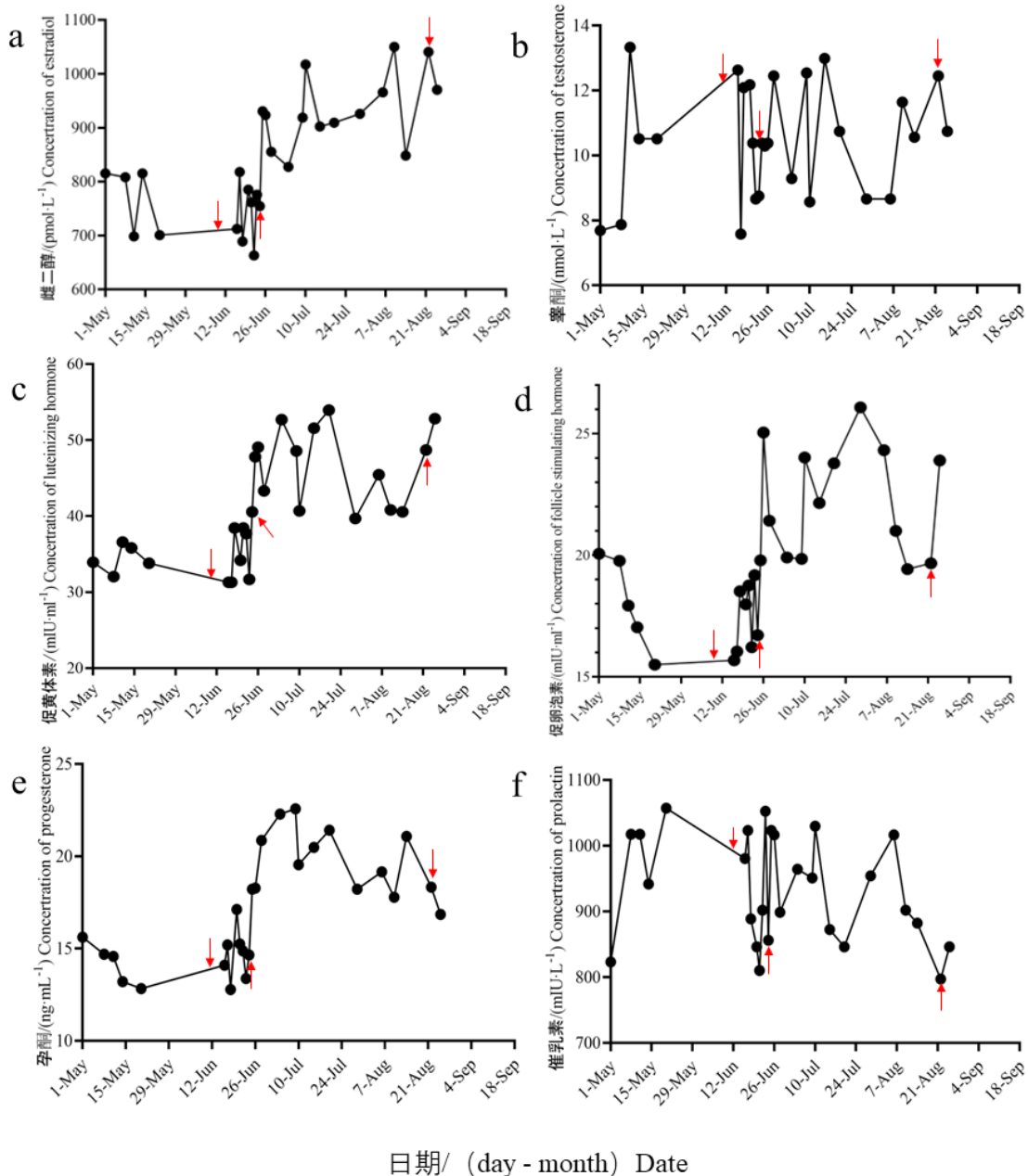
STR 位点 Short tandem repeat locus	引物序列 Primer Sequence (5'-3')	重复部分 Repeat motif	退火温度 /℃ Annealing temperature
MJA06	F: CTGGCAGATTCCATCTTGCT R: GGATGATGAAATACGGCTGAA	(CA)n	55
MJA09	F: TCTGCATAAGGTTGAAGAGCAA R: GACAAGGCAGTGTGCTGAA	(GT)n	55
MJA10	F: CTAGGGTTGGGTCCTTCCTC R: CTCAGGTGCTTTGGACTTAGG	(CA)n	56
MJA11	F: CTCACCGTGACAGCAGAGAC R: GCTTATCCTGGTTTCAATCATTC	(CA)n	49
MJA18	F: GATCCTCGAAACCAAGCAG R: AGGCTCTAGGCTTCGTCCTT	(CA)n	50
MJA21	F: GAACCTGGGTTGGGGTAACT R: GCAGGGTTTCTCAACTTTGG	(CA)n	52
MJA22	F: GGATGTGGGTATCCTTGTGG R: CCTCTCAGTGGGTGGGAGTA	(CA)n	53
MJA26	F: TGTGAAAGCAGAATGCAAAAG R: ACTTGCTGAAGTGGACACC	(GT)n	50
MJA27	F: GGTGACTTTGGGCAATTCAT R: CCCTCTTTGGAGGCATCATA	(GT)n	52
MJA30	F: GAAGCCCTAACCCCAGTCTC R: CCTGGAGCAGTAAGGGAACA	(GT)n	52

2 结果与分析

2.1 生殖激素变化

检测雌性穿山甲粪便中的激素发现：合圈前和合圈期间各激素浓度变化不大，基本维持在同一水平，妊娠至流产期间各激素水平变化较为明显。雌二醇含量在合圈前和合圈期间呈现波动性变化，维持在 $663.108 \sim 17.92$ pmol/L，在开始

妊娠后则出现上升趋势，维持在 $827.30 \sim 1\,050.14$ pmol/L，在妊娠第7周达到最高（ $1\,050.14$ pmol/L）（图1a）；交配后睾酮激素含量无明显变化，在 $7.58 \sim 13.33$ nmol/L 间波动性变化（图1b）；促黄体素含量在合圈前和合圈期间维持在 $31.29 \sim 40.55$ mIU/mL，开始妊娠后含量持续升高，维持在 $39.68 \sim 53.95$ mIU/mL，妊娠第4周达到最高（ 53.95 mIU/mL）后出现下降趋势（图



注：图上的箭头依次代表合圈开始时间（6月11日）和结束时间（6月24日），以及流产（8月22日）。Note: the arrows on the picture represent the beginning (11-Jun) and the end of the pairing (24-Jun), and the abortion (22-Aug).

图1 雌性穿山甲粪便中雌二醇 (a)、睾酮 (b)、促黄体素 (c)、促卵泡素 (d)、孕酮 (e) 和催乳素 (f) 的含量变化
Fig. 1 Changes of estradiol (a), testosterone (b), luteinizing hormone (c), follicle stimulating hormone (d), progesterone (e) and prolactin (f) in the feces of female pangolin

1c); 促卵泡素含量在合圈期间波动性变化, 维持在 15.50 ~ 20.06 mIU/mL, 开始妊娠后大幅度上升, 维持在 19.43~26.08 mIU/mL, 在妊娠第 5 周达到最高 (26.08 mIU/mL) 后开始出现下降 (图 1d); 孕酮含量在合圈期间波动性变化, 维持在 12.78~15.62 ng/mL, 开始妊娠后大幅度升高, 维持在 16.85~22.57 ng/mL, 在妊娠第 2 周达到最高后 (22.57 ng/mL), 呈现波动性变化, 但整体表现为下降趋势 (图 1e); 交配前后催乳素含量无明显变化, 在 797.15~1057.04 mIU/L 间波动性变化, 在妊娠第 6 周开始出现大幅度的下降趋势, 并在 8 月 22 日 (流产当天) 降至最低点 (797.15 mIU/L) (图 1f)。

2.2 双胞胎的形态特征

双胞胎体型存在差异, Z1 总长 15.8 cm, 体重 25.4 g; Z2 总长 13.6 cm, 体重 18.3 g。两个个体背部甲片与尾部甲片行列数相同; Z1、Z2 前爪长差异较大, 后爪长度接近 (表 2)。

两胚胎头部具备基本形态, 无鳞片覆盖; 尾部发育较好, 鳞片基本覆盖完全; 身体躯干背部发育较好, 鳞片覆盖完全; 四肢具备形态, 部分覆盖鳞片, 四爪形状良好, 未角质化; 可看到未发育完全的眼; 唇部初步具备形态, 舌头发育成型; 胸腔可看到明显的肋骨轮廓; 腹腔可看到部分肠道形态 (图 2)。

2.3 双胞胎的卵型

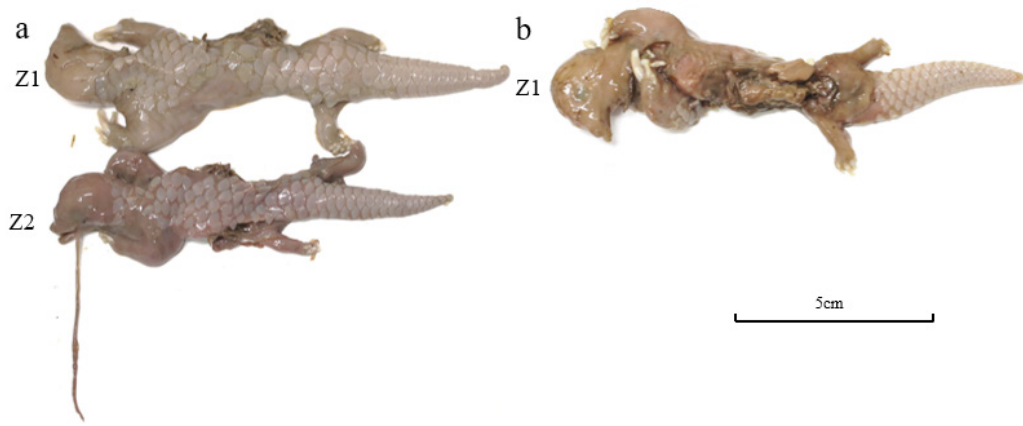
通过比较 10 个微卫星位点上双胞胎基因型的一致性, 进行双胞胎卵型鉴定。在检测的 10 个

STR 位点中, 双胎个体 Z1 与 Z2 仅有 4 个位点的基因型结果表现一致, 在其余 6 个位点的基因型均表现出差异, 表明该双胞胎为异卵双胞胎 (表 3)。

表 2 中华穿山甲流产双胞胎形态学测量指标

Table 2 Measurement of the morphological index of the Chinese pangolin's cubs

指标 Index	样本编号 Sample number	
	Z1	Z2
体重 /g Body mass	25.4	18.3
总长 /cm Total length	15.8	13.6
头体长 /cm Length of head and body	11.1	9.2
前肢第三爪长 /cm Length of the middle claw of fore limb	1.3	0.8
后肢第三爪长 /cm Length of the middle claw of hind limb	0.4	0.3
身体中部背鳞列数 Number of dorsal scales in the middle of the body	7	7
背鳞行数 Number of rows of scales body	15	15
尾鳞行数 Number of tail scales	19	19
尾巴一侧鳞片列数 Number of the scales on the edge of one side of the tail	3	3



注: 图 2a: Z1、Z2 胚胎背侧; 图 2b: Z1 胚胎腹侧。Notes: Figure 2a is dorsal side of Z1 and Z2 embryos and Figure 2b is ventral side of Z1 embryos.

图 2 中华穿山甲流产的双胞胎 Fig.2 The twins stillbirths of the Chinese pangolin

表 3 中华穿山甲双胞胎基因型
Table 3 The Genotype of Chinese pangolin twins

基因 Gene	体型较大个体 Z1		体型较小个体 Z2	
	位点 1 Locus1	位点 2 Locus2	位点 1 Locus1	位点 2 Locus2
MJA06	189	195	189	195
MJA09	170	180	180	184
MJA10	194	213	213	234
MJA11	180	180	167	180
MJA18	152	157	98	152
MJA21	186	196	196	204
MJA22	163	163	163	163
MJA26	197	197	197	197
MJA27	208	208	208	212
MJA30	207	220	207	220

3 讨论

迄今为止，关于穿山甲繁殖双胞胎的相关报道较少。穿山甲通常为单胎单只，过去几十年报道了约 30 例野外与人工饲养穿山甲自行分娩产仔案例，及 9 例解剖案例，都为单胎^[12, 18-25]。

这些报道表明穿山甲可能产出双胞胎。但在人工饲养条件下，还未有报道。仅有 Yan 等^[13]报道了 2016—2020 年 10 只马来穿山甲在野外交配后，怀孕 29 次，在人工饲养条件下产仔，仅一例产下双胞胎，其中一只幼崽出生当天死亡，但并未对其进行相关研究。由此可见，穿山甲产双胞胎的几率不高，但值得研究积累相关资料和养护经验，提高人工繁育效率。

不同生理时期动物激素的水平能够反应动物的生理状态，因此通过激素水平可以了解动物的繁殖生理提供参考。非损伤取样广泛应用于野生动物性激素检测等研究，目前普遍倾向于使用易于收集和保存的粪便进行测定^[26-28]。研究表明血浆与粪便性激素有较强的相关性，并且有些激素在粪便中的含量与血液含量呈正比^[29-30]。Chin 等^[31]研究表明穿山甲交配前血清中孕酮含量在 2.97~18.50 ng/mL，交配后三周直至分娩期间孕酮含量维持在 28.5~55.0 ng/mL。与本研究孕酮水平变化趋势相似。本研究表明在中华穿山甲受孕后，粪便中雌二醇、促黄体生成素、促卵泡素和孕酮水平明显上升，催乳素和睾酮则变化不大。并且流产前孕激素最先出现波动性的下降趋势后，促黄体素、促卵泡素和催乳素陆续出现下降趋势，

并在流产当天催乳素水平降至最低。高浓度的孕酮作用于子宫，有利于胚胎的稳固，维持受精卵的着床，减少流产。从胚胎发育情况看，两个胚胎均发育不全，不是正常孕期分娩，并且母兽的孕激素最先出现下降趋势，然后促黄体素、促卵泡素和催乳素在流产前陆续出现了下降趋势，可能是幼崽在子宫内死亡后，母兽主动流产。虽然粪便测定激素与体内循环激素水平存在一定的时差，但作为无损伤少干扰的取样测定方法，并且与血清中激素水平变化相似，因此粪便激素可以反应动物的繁殖状态，作为孕期穿山甲监测具有可行性。基于本研究初步结果，中华穿山甲粪便中孕激素、促卵泡素、促黄体素含量在妊娠期间变化较为明显，流产前也有不同程度的下降，推荐作为穿山甲妊娠期生理状态监测的主要指标，有助于判断其怀孕情况并及时给予保育措施。

双胞胎可分为同卵双胞胎与异卵双胞胎两类。同卵双胞胎可能由早期胚胎分裂形成，基因组 DNA 差异较小，表型差异不大；异卵双胞胎是由两个卵子同时或几乎同时受精形成的双胞胎，基因组 DNA 并不完全一致，在表型上可能具有较大差异^[31]。本研究中双胞胎发育程度相近，但体型存在差异，卵型鉴定确定为异卵双胞胎。研究发现马来穿山甲的卵泡发育场所较少，符合单胎单只哺乳动物繁殖解剖学特征，但仍有报道多例马来穿山甲两侧卵巢同时存在黄体，这表明穿山甲虽为单胎动物，但仍有可能一次或较短间隔内排出两个卵子，产生双胞胎。

目前关于穿山甲胚胎发育的研究较少，妊娠期时长也不一致。Zhang 等^[12]报道了 6 种未发育完全的马来穿山甲胚胎形态，但无法确定发育时间。本研究中两胚胎发育时间在 11 周左右，两胚胎的尾巴和背部有甲片覆盖，头部和四肢无甲片；舌头发育成型；甲片及四爪形态良好，均未角质化。本研究中两胚胎的背鳞行数与尾巴一侧鳞片列数，与张富华等^[32]报道的发育完全的中华穿山甲胎儿的数据一致，表明尾部与背部鳞片已经覆盖完全。

当前对于穿山甲繁殖生物学的基础研究多数来自马来穿山甲，中华穿山甲的相关研究相对较少。本文报道的中华穿山甲双胞胎案例表明，穿山甲虽为单胎动物，但可以孕育双胞胎，并且可以在短时间内排出两个卵子。这对穿山甲的繁殖

生理研究提供了基础数据,并对穿山甲的人工饲养与繁育工作提供了参考。

致谢:感谢广东省野生动物监测救护中心的支持,以及在工作上给予的大量协助,在此对他们表示感谢!

参考文献

- [1] 唐松元,段文武,黄兴国,等.穿山甲资源现状和人工养殖对策及发展前景[J].湖南林业科技,2012,39(3):75-77.
- [2] HUA YAN,WEI SHI CHAO,BAO HENG, et al. Last chance to prevent the extinction of the Chinese pangolin [J]. Oryx, 2020, 54(6), 760-761.
- [3] 魏辅文,杨奇森,吴毅,等.中国兽类名录[J].2021版.兽类学报,2021,41(5):487-501.
- [4] GAUBERT P, ANTUNES A. Assessing the taxonomic status of the palawan pangolin *Manis culionensis* (Pholidota) using discrete morphological characters [J]. Journal of Mammalogy, 2005, 86(6): 1069-1074.
- [5] 吴诗宝,刘迺发,马广智,等.穿山甲生态学研究概况[J].动物学杂志,2004,39(2):46-52.
- [6] 吴诗宝,马广智,唐玫,等.广东省穿山甲种群数量调查与资源蕴藏量[J].兽类学报,2002,22(4):270-276.
- [7] 胡诗佳,彭建军,于冬梅,等.中华穿山甲的研究及保护现状[J].四川动物,2010,29(4):673-675.
- [8] 张富华.圈养马来穿山甲(*Manis javanica*)繁殖生物学基础研究[D].广州:华南师范大学,2015.
- [9] FANGYIN BAO, SHIBAO WU, CHAO SU, et al. Air temperature changes in a burrow of Chinese pangolin, *Manis pentadactyla*, in winter [J]. Folia Zoologica, 2013, 62(1): 42-47.
- [10] 赵耀,刘志平,韩欢胜.蓝狐发情期及妊娠期血清五种生殖激素含量变化[J].动物学杂志,2020,55(1):5.
- [11] 李静宇.雌性短尾猴粪便性激素测定方法评估及其在生理周期研究中的应用[D].合肥:安徽大学,2020.
- [12] ZHANG FUHUA, WU SHIBAO, YANG LI, et al. Reproductive parameters of the Sunda pangolin, *Manis javanica* [J]. Journal of Vertebrate Biology, 2015, 64(2): 129-135.
- [13] YAN DINGYU, ZENG XIANGYAN, JIA MIAOMIAO, et al. Successful captive breeding of a Malayan pangolin population to the third filial generation [J]. Communications Biology, 2021, 4(1): 1212.
- [14] QIAO MAIJU, ZHOU YINGMIN, THOMAS C, et al. Diagnosing zygoty in giant panda twins using short tandem repeats [J]. Twin Research and Human Genetics, 2018, 21(6): 527-532.
- [15] 杨泽登,兰玲梅,谢平丽,等.同母异父双胞胎亲子鉴定1例[J].法医学杂志,2019,35(2):264-266.
- [16] LUO S J, CAI Q X, DAVID V A, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in pangolins (Mammalia, Pholidota, *Manis* spp.) [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(2): 269-272.
- [17] WAITS L P, LUIKART G, TABERLET P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines [J]. Molecular ecology, 2001, 10(1): 249-256.
- [18] Masui M. Birth of a Chinese pangolin *Manis pentadactyla* at Ueno Zoo, Tokyo [J]. International Zoo Yearbook, 1967, 7(1): 114-116.
- [19] MENZIES J. A preliminary note on the birth and development of a Small - scaled tree pangolin *Manis tricuspis* at Ife University Zoo [J]. International Zoo Yearbook, 1967, 7(1): 114-114.
- [20] 张富华,吴诗宝,杨立,等.一例圈养繁殖马来穿山甲畸形仔兽[J].经济动物学报,2013,17(2):4.
- [21] 余经裕,姜福林,彭建军,等.人工饲养马来穿山甲(*Manis javanica*)全球首例繁殖报道(英文)[J].Agricultural Science & Technology, 2015, 16(10): 2322-2323.
- [22] Y U JINGYU, F JIANG, J PENG, et al. The first birth and survival of cub in captivity of critically endangered Malayan pangolin (*Manis javanica*) [J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(10): 2322.
- [23] MOHAPATRA R, PANDA S, SAHU S. On the gestation period of Indian pangolins (*Manis crassicaudata*) in captivity [J]. Biodiversity Int J, 2018, 2(6): 559-560.
- [24] 张富华,杨立,吴诗宝,等.一例人工圈养繁殖的马来穿山甲胎儿[J].野生动物,2013,34(5):3.
- [25] MAHMOOD T, IRSHAD N, HUSSAIN R, et al. Breeding habits of the Indian pangolin (*Manis crassicaudata*) in Pothohar Plateau, Pakistan [J]. Mammalia, 2016, 80(2): 231-234.
- [26] 石许秀.虎不同生理时期粪便中三种生殖激素水平波动性的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2015.
- [27] 喻月婷.蓝狐粪便中皮质醇激素和 IgA 水平的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2018.
- [28] 李琦.不同饲养时期蓝狐粪便性激素水平变化的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2017.
- [29] HESSTERMANN M, TARI S, HIDGES J. Measurement of fecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae [J]. Reproduction, 1993, 99(1): 243-251.
- [30] BERKELEY E, KIRKPATRICK J, SCHAFFER N, et al. Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) [J]. Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association, 1997, 16(2): 121-132.
- [31] SHIHCHIE C, CHENYEN L, YATING C, et al. Monitoring the gestation period of rescued Formosan pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*) with progesterone radioimmunoassay [J]. Zoo biology, 2012, 31(4): 479-489.
- [32] FUHUA ZHANG, SHIBAO WU, CUIYUN ZOU, et al. A note on captive breeding and reproductive parameters of the Chinese pangolin, *Manis pentadactyla* Linnaeus, 1758 [J]. ZooKeys, 2016, 618(618): 129-144.