

基于 DNA 条形码分析大鸨繁殖期动物性食物

刘刚^① 李皓^② 吴自有^③ 李惠鑫^① 文菀玉^① 周景英^④
魏秀宏^④ 岳伟^④ 白洁^④ 钱英^④ 龚明昊^{①*}

① 中国林业科学研究院湿地研究所, 湿地生态功能与恢复北京市重点实验室 北京 100091; ② 北京林业大学自然保护区学院 北京 100083; ③ 天科院环境科技发展(天津)有限公司 天津 300456; ④ 内蒙古图牧吉国家级自然保护区 乌兰浩特 137600

摘要: 动物性食物是满足繁殖期大鸨 (*Otis tarda*) 能量和营养需求的重要来源, 然而由于传统食性分析手段的局限性, 大鸨繁殖期的动物性食物组成目前还不清楚, 不同繁殖地大鸨的食性差异还有待研究。高通量测序应用于食性分析, 具有工作量小、数据量大和分类精度高的优点。基于粪便取样, 利用高通量测序技术, 对内蒙古图牧吉国家级自然保护区靠山核心区和马鞍山片区繁殖期大鸨的动物性食物种类和组成进行分析, 并比较食物多样性的空间差异。物种累计曲线表明, 研究中的最小采样强度 ($n = 11$) 能够使 MOTUs 的检测限达到平台期。在 24 份大鸨粪便中, 共发现 29 种不同动物性食物的 DNA 序列, 均来源于无脊椎动物, 以节肢动物门的鞘翅目占比最高 (44.83%)。按照科水平分类, 以金龟科占比最高 (24.14%), 其次为蝗科 (13.79%)、芫菁科 (10.34%) 和蓟马科 (6.89%)。马鞍山片区大鸨对食物的取食频率和粪便中被检测到其所取食食物种数均显著高于靠山核心区, 食物多样性也显著高于后者, 大鸨食性表现出一定空间差异。本研究为深入研究大鸨食性与栖息地选择的关系, 以及了解大鸨繁殖期的觅食对策奠定了基础, 为保护部门有效保护和恢复大鸨栖息地提供了食性水平的参考依据, 同时为分子食性分析方法用于其他动物的觅食生态学研究提供了示范。

关键词: 大鸨; DNA 条形码; 食性分析; 非损伤性取样; 高通量测序; 食性多样性

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 03-405-12

Animal Derived Diet of Great Bustard in the Breeding Season Based on DNA Barcoding

LIU Gang^① LI Hao^② WU Zi-You^③ LI Hui-Xin^① WEN Wan-Yu^① ZHOU Jing-Ying^④
WEI Xiu-Hong^④ YUE Wei^④ BAI Jie^④ QIAN Ying^④ GONG Ming-Hao^{①*}

① *Institute of Wetland Research, Chinese Academy of Forestry, Beijing Key Laboratory of Wetland Services and Restoration, Beijing 100091;*

② *College of Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083;* ③ *Tianke Institute of Environmental Science and Technology*

Development (Tianjin) Co., Ltd, Tianjin 300456; ④ *Tumuji National Nature Reserve, Wulanhaote 137600, China*

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (No. CAFYBB2018QB010), 中国林业科学研究院中青年专家“走出去”计划项目 (No. CAFYBB2017ZF006);

* 通讯作者, E-mail: gongmh2005@hotmail.com;

第一作者介绍 刘刚, 男, 副研究员; 研究方向: 动物生态学; E-mail: gangl@caf.ac.cn。

收稿日期: 2020-07-12, 修回日期: 2021-02-01 DOI: 10.13859/j.cjz.202103011

Abstract: Animal items consumed are important energy and nutrition resources for the Great Bustard (*Otis tarda*) during the breeding period. However, due to limitations of traditional diet analysis methods, the animal derived diet is still unclear, and the diet difference between different breeding sites is not well explored. The high-throughput sequencing (HTS) has offered major advantages over traditional methods in diet analysis, such as low work cost, big dataset and taxa assignment at a high fine scale level. Based on fecal sampling, we applied the HTS approach to identify animal items consumed by the Great Bustard in two core areas of Tumuji Nature Reserve (Kaoshan and Maanshan) during the breeding season, and compared the spatial variation in diet diversity. The diet diversity was estimated by Simpson and Shannon index, and the diet difference was compared between Kaoshan and Maanshan using ANOSIM test and nonmetric multi-dimensional scaling analysis (NMDS). The minimum sampling intensity ($n = 11$) is sufficient to make the detection limit of MOTUs reach the plateau (Fig. 1). Of 24 fecal samples, 29 unique prey DNA (Table 1) were discovered, corresponding to invertebrate species, with the prey group of the Coleoptera (the Arthropoda) accounting for the highest proportion (44.83%). Below the order level, the family Scarabaeidae accounted for the highest (24.14%), followed by Acridiidae (13.79%), Meloidae (10.34%) and Thripidae (6.89%). The consuming frequency of a given dietary species and the number of prey per individual in Maanshan were both significantly higher than that in Kaoshan, as well as the diet diversity index (Fig. 2). The diet of Great Bustard was different between two key breeding sites (Fig. 3). This study facilitates investigating the relationship between diet and habitat selection, as well as understanding of foraging strategies during the breeding period. By providing dietary reference data, it could help the conservation managers to effectively protect and restore the habitats of Great Bustard. Meanwhile, the basic framework could be applied in studying the feeding ecology of other species using the HTS method.

Key words: Great Bustard, *Otis tarda*; DNA barcoding; Diet analysis; Noninvasive sampling; High-throughput sequencing; Diet diversity

食物是动物生存繁殖所需营养和能量的来源, 食物关系反映了物种间的基本关系 (Thébault et al. 2005)。食性研究是动物生态学的重要内容之一, 是了解动物与环境关系及捕食者与猎物关系的前提, 同时为有效保护和管理野生动物提供科学支撑 (Williams et al. 2000)。食物是影响动物繁殖成功率和存活率的限制性因子, 研究动物繁殖期的食性对了解动物的繁殖生物学特征及种群动态变化至关重要 (Ruffino et al. 2014)。随着全球气候变化和人为干扰对动物栖息地的影响日益加剧 (Segan et al. 2016), 觅食地逐渐减少, 食物资源出现短缺, 导致动物营养应激、致死甚至区域性灭绝 (Naug 2009, Fan et al. 2020)。

根据是否对动物造成损伤, 分析动物食性

的方法, 可分为损伤性取样和非损伤性取样 (郑荣泉等 2004)。损伤性取样主要指胃内容物分析法, 操作简便, 但对动物造成损伤甚至死亡, 且由于食物残渣过于细腻而难以检测。非损伤性取样技术发展较快, 觅食行为观察法具有简单易行的特点, 但不适宜于夜行性或行踪隐秘的物种; 粪便显微分析法对动物无伤害, 但对操作人员的鉴定技术具有较高要求, 且消化过细的食物残渣难以通过形态学特征直接鉴定; 植物烷烃指纹法和近红外反射光谱法多用于家畜的食物消化分析 (Glasser et al. 2008)。稳定同位素技术是新近发展的动物食性分析方法, 在解构食物网方面具有优势, 但无法确定动物具体取食的种类 (Carreon-Martinez et al. 2010, 王玄等 2015)。随着高通量测序技术的发展,

其独特的优势令越来越多的研究者深入探索食性相关的生态学问题 (Pompanon et al. 2012, Oehm et al. 2017)。高通量测序应用于食性分析, 具有工作量小、数据量大、分类精度高的优点 (Gong et al. 2019), 而且其较高的灵敏度, 特别适宜于根据粪便进行非损伤取样的食性分析 (刘刚等 2018)。

大鸨 (*Otis tarda*) 隶属于鸨形目鸨科, 在 IUCN 红色名录中被列为易危 (VU) 级别 (BirdLife International 2017)。大鸨有 2 个地理亚种, 指名亚种 *O. t. tarda* 主要分布于伊比利亚半岛至西伯利亚中部地区, 数量约为 4.5 万至 5.1 万只 (Alonso et al. 2010); 而分布于南西伯利亚、蒙古和中国东北部的亚种 *O. t. dybowskii*, 据估计仅有约 1 456 ~ 2 187 只, 占大鸨物种数量的 3% (Liu et al. 2017), 且种群数量处于持续下降态势, 受胁程度高, 保护形势极其严峻 (万冬梅等 2010, 吴逸群等 2013, Collar et al. 2017)。历史上大鸨东方亚种在我国的繁殖地和越冬地分布均较广 (蒋劲松 2004, 田秀华等 2006, 高行宜等 2007), 但近些年来由于栖息地退化和人为干扰等因素导致其在我国的分布区严重退缩, 种群数量锐减, 形成了多个存在明显隔离的小种群 (田秀华等 2001, 万冬梅等 2010, Kessler 2015, Liu et al. 2017)。

大鸨是杂食性鸟类, 繁殖期兼食植物性和动物性食物 (万冬梅 2002), 然而针对繁殖期的食性研究相对较少。据粪便显微形态学和行为学观察, 大鸨在繁殖期取食的动物性食物主要包括鞘翅目、直翅目和鳞翅目昆虫 (赵匠等 2007)。草原是否火烧对大鸨繁殖期的觅食具有较大影响, 在火烧地, 大鸨多取食植物性食物, 而在非火烧地则倾向于动物性食物 (万冬梅 2002, 万冬梅等 2004, 赵匠等 2005)。动物性食物对于满足大鸨的食物需求至关重要, 但栖息地质量的变化会影响食物的丰富度和可获得性, 进而会改变大鸨的觅食行为, 比如, 越冬期大鸨对农田遗落农作物种子的依赖度越来越高 (Liu et al. 2018)。然而大鸨在繁殖期具体取

食动物性食物的种类, 以及不同栖息地大鸨的食性是否存在差异, 与栖息地质量的相关性等目前还不清楚。这将导致保护野生大鸨种群和开展栖息地恢复时缺乏科学指导, 也无法为大鸨的人工繁育和救护提供科学支撑。

本研究以在内蒙古图牧吉国家级自然保护区靠山核心区和马鞍山片区繁殖的大鸨为研究对象, 利用粪便 DNA 取样, 结合 DNA 条形码和高通量测序技术对动物性食物种类及组成进行分析。探讨大鸨繁殖区微生物境对大鸨食物多样性和食性差异的影响, 为研究大鸨和草原无脊椎动物的相互关系奠定基础, 同时为大鸨繁殖地和觅食地的保护提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 研究区概况

内蒙古图牧吉国家级自然保护区 (以下简称“图牧吉”) 地处内蒙古自治区兴安盟扎赉特旗境内 (东经 122°44'13" ~ 123°10'24", 北纬 46°11'03" ~ 46°33'30"), 为松嫩平原西侧生物多样性十分丰富的重要湿地, 总面积为 76 210 hm²。保护区以保护大鸨 *dybowskii* 亚种等 13 种国家一级保护鸟类和 47 种国家 II 级保护鸟类为主, 丰富的草原和湿地生态系统类型为动物提供了觅食和栖息环境。图牧吉是大鸨重要的栖息地, 2013 至 2015 年大鸨繁殖种群的数量分别为 125 只、132 只和 119 只 (图牧吉国家级自然保护区 2015), 被中国野生动物保护协会命名为“中国大鸨之乡”。

1.2 粪便采集和 DNA 提取

2016 年 5 月 25 日至 6 月 10 日, 在图牧吉靠山核心区和马鞍山片区采集大鸨的粪便样品, 两地相距 25 km, 样品采集时间保持同步。粪便的新鲜程度是决定粪便 DNA 质量的关键, 直接影响 DNA 提取、PCR 和测序的效果 (Oehm et al. 2017)。因此, 在野外观察单独活动的大鸨 (以避免个体混淆), 待其自然离开后, 快速到达活动地点, 寻找表面黏液较为新鲜且湿润的粪便, 装于自封袋中, 保存于移动冰盒 (-4 °C)。

在野外使用移动冰盒运输粪便样品，运回实验室后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。在靠山和马鞍山分别采集 11 份和 13 份大鸨粪便样品。大鸨的粪便尺寸明显大于同域分布的其他鸟类，在野外易于区分。此外，根据大鸨线粒体基因组（GenBank 登录号 FJ751803）设计了大鸨物种鉴定引物 Otdloop-F（5'-CCC CAT AGA CAT ATT ATG CAT TC-3'）和 Otdloop-R（5'-GGA AAG AAT GGG CCT GAA GCT AGT-3'）（Liu et al. 2017），通过 PCR 扩增和测序以及与大鸨线粒体基因组的比对，验证了所采集的粪便均来自于大鸨。

采用粪便 DNA 提取试剂盒（QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN）提取粪便 DNA。对提取的粪便 DNA 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，使用 NanoDrop 2000（Thermo Scientific）测定浓度和纯度，至达到实验要求后（浓度 50 mg/L ； A_{260}/A_{280} $1.8 \sim 2.0$ ），保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 PCR 扩增和高通量测序

以粪便 DNA 为模板，使用无脊椎动物线粒体 16S rDNA 基因引物 16SMAV-F：（5'-CCA ACA TCG AGG TCR YAA-3'）和 16SMAV-R：（5'-ART TAC YNT AGG GAT AAC AG-3'）（De Barba et al. 2014）进行扩增，引物为兼并引物，其中，R 为 A 或 G，Y 为 C 或 T，N 为 A、C、G 或 T。采用混样池测序方法，在正反向引物的 5' 端加上用于区分个体的 6 碱基寡核苷酸标签，以便在混样测序后，能通过标签将各条序列归属到对应样品。每个寡核苷酸标签的碱基差异大于 3 个（Coissac 2012）。采用 $10\text{ }\mu\text{l}$ PCR 体系：Biomed $2 \times \text{Taq}$ PCR MasterMix $5\text{ }\mu\text{l}$ ，正反向引物各 $0.3\text{ }\mu\text{l}$ （ $0.3\text{ }\mu\text{mol/L}$ ），粪便 DNA $2.5\text{ }\mu\text{l}$ （ 50 ng ）， 10 g/L 牛血清白蛋白（BSA, Takara） $0.1\text{ }\mu\text{l}$ ，去离子水补充至 $10\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为： $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min ； $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s ， $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1.5 min ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ，35 个循环； $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。

将 PCR 产物各取 $5\text{ }\mu\text{l}$ 等量混合，共计

$120\text{ }\mu\text{l}$ 样品，采用 Illumina MiSeq（PE150）高通量测序平台进行建库和扩增子测序，测序在苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.4 数据分析

将高通量测序得到的原始 reads 使用 OBITools 软件（<http://metabarcoding.org/obitools>）进行分析，对 reads 进行正反向拼接，然后使用 ngsfilter 程序对引物和标签进行识别，并去除低质量或低频的 reads（去除小于 10 bp 的片段，去除 counts 数小于 5 的序列）。使用 ecoPCR 程序（Ficetola et al. 2010）提取公共数据库 NCBI（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）、EMBL（<https://www.embl.org/>）和 DDBJ（<https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>）中与 16SMAV 引物相关的序列，将本实验获得的序列与数据库提取序列进行比对。一致性不低于 99% 时，判定该序列归属于对应的无脊椎动物物种；若序列一致性小于 99% 但不低于 98%，则判定为属水平；若序列一致性小于 98% 且大于 85%，则判定为对应的科以上分类阶元（Burgar et al. 2014）。需要注意的是，如果被数据库中多条序列比中，且一致性相当，则归为上一级甚至更上一级的分类阶元。将每一条特异的序列，使用 USEARCH 方法（Edgar et al. 2015）归属为分子可操作分类单元（molecular operational taxonomic units, MOTUs）。

为判断取样量和测序深度是否充分，运用 R 软件程序包 Vegan 中的 specaccum 函数作物种累计曲线。本研究采用食性研究中两个常用的标准化指数来反映动物对食物的取食偏好，某种食物被取食的频率，即含有某种食物 MOTU 的粪便数占粪便样品数的百分比；粪便中被检测到的食物 MOTUs 数目，即某个粪便样品中检测到的 MOTU 数量。 α 多样性指数在食性差异研究中，常被用来描述组间食物的多样性，包括 Simpson 指数和 Shannon 指数（Spellerberg et al. 2003）。通过 R 软件程序包 Vegan（Oksanen et al. 2012），进行计算。经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布（Shapiro-Wilk

检验, $P > 0.05$) 的数据采用独立样本 t 检验进行分析, 不符合正态分布 ($P < 0.05$) 的数据采用 Wilcoxon Signed Ranks 检验进行分析。为比较靠山和马鞍山之间食物组成差异和重叠度, 采用 R 软件程序包 Vegan 的 ANOSIM 函数, 对食物差异性进行统计检验, 设置 permutations 为 999。为了更直观地展现食物组成差异, 基于 Bray-Curtis 距离矩阵, 运用 R 软件程序包 vegan 和 permute 进行非度量多维标度分析 (nonmetric multi-dimensional scaling, NMDS) (Minchin 1987), 食物组成相近的个体在二维 NMDS 图上更加接近, 而食物组成差异较大的个体距离较远。Stress 值是衡量 NMDS 拟合优度的一个统计量, 当该值小于 0.2 时 (Clarke et al. 2001), 表明拟合良好。R 软件采用 3.3.3 版本, 统计检验采用 SPSS 18.0。

2 结果

2.1 动物性食物组成

在 24 份粪便中共获得 483 320 条 reads, 经过数据筛选后获得有效数据 403 223 条 reads, 其中, 靠山和马鞍山片区的样品分别获得 202 988 和 200 235 条 reads。共得到 48 种 DNA 序列, 其中, 19 种未成功比对, 29 种比对到了门及以下分类阶元, 占 60.41%。基于 29 种食物的 MOTUs, 其中, 靠山核心区的大鸨取食 22 种, 马鞍山的大鸨取食 28 种。物种累计曲线表明, 研究中的最小采样强度 ($n = 11$) 能够使 MOTUs 的检测限达到平台期 (图 1), 为后续相关研究提供了采样标准。大鸨繁殖期动物性食物主要为鞘翅目、缨翅目和直翅目昆虫, 其中, 鞘翅目占比最高, 达 44.83% (表 1)。蛛形纲的寄螨目和蜘蛛目以及唇足纲的蜈蚣目, 均有 1 种被大鸨取食 (表 1)。除节肢动物门外, 环节动物门的寡毛纲也是大鸨的食物之一 (表 1)。大鸨取食的动物性食物包括 11 科以及 8 个未知科, 以金龟科占比最高 (24.14%), 其次为蝗科 (13.79%)、芫菁科 (10.34%) 和蓟马科 (6.89%); 属水平上, 包括 7 个已知属

和 21 个未知属。种水平上, 有 3 个 MOTUs 鉴定到种水平, 分别是中华蚱蜢 (*Acrida cinerea*)、亚洲小车蝗 (*Oedaleus decorus asiaticus*) 和一角甲 (*Notoxus monoceros*)。

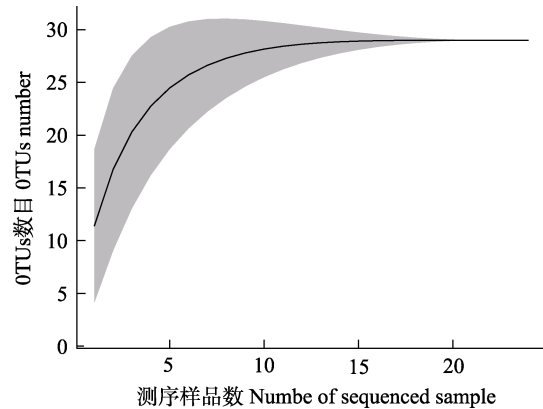


图 1 大鸨粪便样品中被检测食物物种累计曲线

Fig. 1 Dietary prey accumulation curve in fecal samples for Asian Great Bustard

图中灰色区域表示 95% 置信区间。

The gray area indicates the 95% confidence interval.

2.2 食性空间差异

靠山和马鞍山大鸨对动物性食物的平均取食频率分别为 $33.86\% \pm 5.68\%$ 和 $43.77\% \pm 4.49\%$, 存在显著差异 ($Z = -2.28$, $P < 0.05$) (图 2), 表明分布于马鞍山片区的大鸨种群中有更多的个体取食动物性食物。蜉蝣科、芫菁科和蓟马科昆虫的被取食频率在靠山和马鞍山大鸨繁殖群中均为 100% (表 1), 表明这三种食物可能在两个核心区具有较高的可获得性, 但也可能大鸨喜食该类食物。马鞍山片区大鸨的动物性食物 MOTUs 数目 (12.69 ± 1.12) 显著比靠山种群 (9.36 ± 0.76) 高 ($t = -2.36$, $P < 0.05$) (图 2), 表明在马鞍山片区繁殖的大鸨具有较宽的食物选择空间。

靠山和马鞍山大鸨食物的 Simpson 指数分别为 0.24 ± 0.06 和 0.44 ± 0.07 , 存在显著差异 ($t = -2.14$, $P < 0.05$), 表明马鞍山片区的食物分布相对均匀, 食物可获得性较高; Shannon

表 1 繁殖期图牧吉保护区大鸨的动物性食物组成及每种食物被取食频率

Table 1 Invertebrate diet composition of Asian Great Bustard in Kaoshan and Maanshan core area during the breeding season, and the sequence identity score and the consumed proportion of a given food

序列 ID Sequence ID	分类鉴定 Taxonomic identification							一致性 Identity	食物被取食频率 Average consumed proportion of a given food (%)	
	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	靠山		马鞍山	
							Kaoshan (n = 11)		Maanshan (n = 13)	
MAV01	节肢动物 Arthropoda	蛛形纲 Arachnida	蜱螨目 Arachnoidea	蜱科 Ixodoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	100.00	100.00	
MAV02	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	1.00	45.45	53.85	
MAV03	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	38.46	
MAV04	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	63.64	53.85	
MAV05	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	30.77	
MAV06	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	9.09	23.08	
MAV07	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	30.77	
MAV08	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	金龟科 Scarabaeoidea	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	38.46	
MAV09	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	鳃金龟科 Melolonthidae	未知 Unknown	未知 Unknown	1.00	9.09	23.08	
MAV10	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	30.77	
MAV11	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	蚁形甲科 Anthicidae	蚁形甲属 <i>Anthicus</i>	一角甲 <i>Notoxus Monoceros</i>	1.00	45.45	0.00	
MAV12	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	芫菁科 Meloidae	沟芫菁属 <i>Hycleus</i>	未知 Unknown	0.98	100.00	100.00	
MAV13	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	芫菁科 Meloidae	沟芫菁属 <i>Hycleus</i>	未知 Unknown	0.98	54.55	38.46	
MAV14	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	鞘翅目 Coleoptera	芫菁科 Meloidae	斑蝥属 <i>Mylabris</i>	未知 Unknown	0.98	36.36	53.85	
MAV15	节肢动物 Arthropoda	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	36.36	30.77	
MAV16	节肢动物 Arthropoda	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	45.45	30.77	
MAV17	环节动物 Annelida	寡毛纲 Oligochaeta	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.86	36.36	61.54	
MAV18	节肢动物 Arthropoda	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.98	27.27	23.08	
MAV19	节肢动物 Arthropoda	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	36.36	69.23	
MAV20	节肢动物 Arthropoda	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	30.77	
MAV21	节肢动物 Arthropoda	唇足纲 Chilopoda	蜈蚣目 Scolopendromopha	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	0.00	46.15	
MAV22	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	缨翅目 Thysanoptera	蓟马科 Thripidae	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	100.00	100.00	

续表 1

序列 ID Sequence ID	分类鉴定 Taxonomic identification							一致性 Identity	食物被取食频率 Average consumed proportion of a given food (%)	
	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	靠山 Kaoshan (n = 11)		马鞍山 Maanshan (n = 13)	
MAV23	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	缨翅目 Thysanoptera	蓟马科 Thripidae	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	36.36	30.77	
MAV24	节肢动物 Arthropoda	蛛形纲 Arachnida	蜘蛛目 Araneae	狼蛛总科 Lycosidae	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	18.18	30.77	
MAV25	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	直翅目 Orthoptera	蝗科 Acrididae	未知 Unknown	未知 Unknown	1.00	27.27	61.54	
MAV26	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	直翅目 Orthoptera	蝗科 Acrididae	剑角蝗属 <i>Acrida</i>	中华蚱蜢 <i>A. cinerea</i>	1.00	27.27	38.46	
MAV27	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	直翅目 Orthoptera	斑翅蝗科 Oedipodidae	小车蝗属 <i>Oedaleus</i>	亚洲小车蝗 <i>O. decorus asiaticus</i>	1.00	36.36	30.77	
MAV28	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	直翅目 Orthoptera	蝗科 Acrididae	未知 Unknown	未知 Unknown	0.97	72.73	46.15	
MAV29	节肢动物 Arthropoda	昆虫纲 Insecta	直翅目 Orthoptera	锥头蝗科 Pyrgomorphidae	负蝗属 <i>Atractomorpha</i>	未知 Unknown	0.97	18.18	23.08	

一致性表示该种食物的 DNA 条形码序列与数据库比对的序列相似度百分比，1 表示完全相同。

Identity indicates the similarity by blasting a consumed food DNA barcoding sequence against sequences from the public database, 1 means 100% identical.

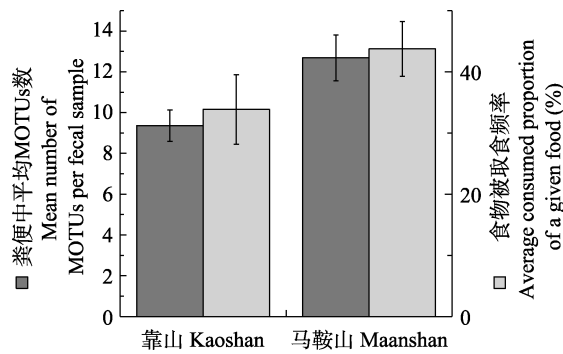


图 2 大鸨粪便中平均 MOTUs 数和食物被取食频率
Fig. 2 The mean number of MOTUs per fecal sample and the average consumed proportion of a given dietary species

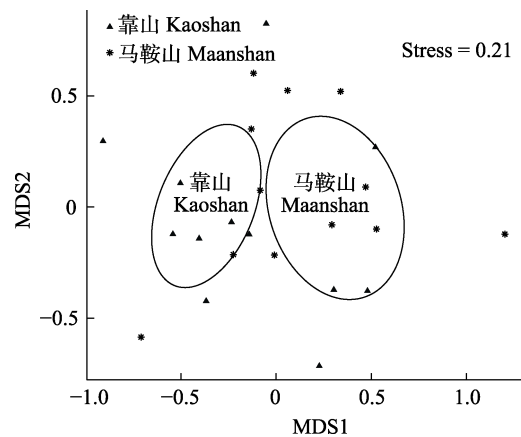


图 3 在 MOTUs 水平上的非度量多维标度图
Fig. 3 Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) plot of MOTUs

指数也表明，靠山大鸨的食物多样性低于马鞍山 ($t = -2.46, P < 0.05$)，与 Simpson 指数相符。在 29 种 MOTUs 中，靠山和马鞍山大鸨共同取食的占 22 种，达 78.57%。基于 MOTUs 水平上的 NMDS 分析，stress 为 0.21，表明

NMDS 拟合的效果基本达到理想水平，靠山和马鞍山大鸨食性存在一定程度的分化 (图 3)。根据 ANOSIM 分析靠山和马鞍山大鸨的食物组成差异，发现组间差异处于边缘显著水平

($R = 0.09$, $P = 0.053$), 进一步支持 NMDS 分析的结果。

3 讨论

3.1 大鸨繁殖期动物性食物组成

通过非损伤性粪便取样, 并结合 DNA 条形码和高通量测序技术, 发现繁殖期大鸨的动物性食物以节肢动物门为主。除检测到鞘翅目和直翅目外, 还发现缨翅目、寄螨目、蜘蛛目和蜈蚣目占有相当比例, 但并未检测到此前研究所发现的鳞翅目昆虫(赵匠等 2007), 这可能由于取食的蛾类幼虫较少或者被消化程度较高, 导致粪便中有限的 DNA 片段未被提取或测序。大鸨繁殖期的具体动物性食物组成, 至少包括 11 个科, 在种水平上的鉴定率为 13.8%。另外, 近 40% 的序列无法鉴定到门分类阶元, 表明扩增子测序的比对效率取决于数据库的质量, 若要提升食性分析效率, 则需要围绕动物的觅食地构建食源 DNA 数据库(Valentini et al. 2010)。对偶食性食物, 基于高通量测序技术的食性分析方法也可能捕获到该种食物的相应序列, 这对于在种级分类水平上研究物种内或物种间的食性差异非常重要。值得注意的是, reads 数所占数据量的比例是否与该种食物被取食比例一致, 还受到很多因素影响(Deagle et al. 2013, Matthieu et al. 2013)。本研究并未采用 reads 数来判断大鸨对食物的偏好, 而是使用食物被取食频率指标, 因为 reads 数较多的食物, 有可能被偶尔取食, 而 reads 数较少的却有可能是主要食物或喜食食物(Pompanon et al. 2012)。再者, reads 数多寡还与 PCR 扩增、测序灵敏度等技术因素相关

节肢动物是动物界最大的一门, 而保护区昆虫中, 鞘翅目昆虫种数和所占比例最大, 共有 29 科 159 种, 分别占保护区昆虫总种数的 23.97%, 总种数的 26.27%。大鸨的动物性食物中鞘翅目昆虫占 44.83%, 蝉科、金龟子科、芫菁科和蝗科的被取食频率均大于 60%, 说明大鸨繁殖期倾向于选择它们作为食物, 表明其食性选择受食物可获得性的影响。选择资源量丰

富的食物意味着捕食容易, 即在觅食过程以最小的能量投入获取最大的收益。食物的营养价值存在物种差异, 体型较大的鞘翅目昆虫(甲虫类)的脂肪含量比其他类群高, 也反映出大鸨选择脂肪含量高营养价值好的食物。食物资源变化影响动物的繁殖期时间, 大鸨的繁殖期正是草原无脊椎动物多样性和生物量最高的时期。动物通过将繁殖期与食物量的峰值时期同步化, 并在短时间内通过进食高脂肪高蛋白的食物, 用于繁殖行为的能量消耗, 也为秋季迁徙和越冬储备脂肪(McKinnon et al. 2012), 这是迁徙性动物普遍采用的一种繁殖对策(Smith et al. 2005, Chenchouni et al. 2015)。

食物资源是衡量物种生存状况的重要指标(Frincke-Craig et al. 2015), 在分类精度更高的 MOTUs 水平, 本研究证实大鸨的取食范围较广, 表现为泛食性觅食策略。捕食者对食物的选择对维持捕食者-猎物种群动态平衡具有重要意义, 或对较低层级食物网结构产生影响(Peckarsky et al. 2008)。在满足食物需求的同时, 发现大鸨还取食一些其他捕食者避而远之的食物, 如芫菁科昆虫。芫菁科昆虫体内的斑蝥素, 毒性很强, 不过大鸨进化出了对斑蝥素的耐受性, 并利用这类天然食物来抵抗细菌和寄生虫感染, 提升体况和求偶成功率(Bravo et al. 2014), 同时表明大鸨对芫菁科昆虫种群动态的作用可能是其他捕食者无法替代的。然而, 大鸨每天究竟能取食大量的昆虫, 大鸨是否存在食物短缺甚至营养应激, 以及大鸨种群数量是否大到能够显著降低局域害虫密度, 还有待于进一步研究。

3.2 大鸨食物多样性影响因素

食物是评价栖息地适宜性的关键因素, 食物多样性也因此与栖息地变化紧密关联(Machin et al. 2017)。草地开垦对大鸨赖以生存和繁殖的草地生态系统破坏严重(Bai et al. 2004), 与草地关联的物种多样性随之下降, 捕食者-猎物的营养级关系趋于简单, 导致较高营养级的捕食者的食物多样性更易受到影响(Kauhala et al. 2014)。靠山核心区大鸨的食物多样性低于马鞍

山, 我们推测食物多样性的空间差异, 可能与草地结构变化有关。历史上靠山区域广布草地, 然而, 大面积开垦及农药化肥滥用导致草地被严重侵蚀, 自然植被退化, 进而影响昆虫群落的繁殖和昆虫多样性。相对于靠山, 马鞍山片区大面积草地开垦的强度较弱, 客观上大鸨的繁殖地及草地植被受到保护, 昆虫群落的演替和繁衍受到的干扰较小。靠山繁殖地食物多样性偏低但人为干扰小(管护站长期监测和围栏防护), 部分大鸨选择在此筑巢繁殖, 可能是在食物和干扰因素间作出的行为响应。动物通常选择人为干扰较低的地方繁殖, 有利于减少能量消耗, 降低觅食风险和投入更多的时间抚育后代(Chen et al. 2011), 不过也可能与动物对干扰耐受性的个性有关(Arroyo et al. 2017)。

栖息地破碎化和丧失导致物种多样性水平下降, 甚至物种的局部灭绝, 破坏食物网结构的动态平衡(Andrén 1994, Valladares et al. 2010)。草地中各个营养级的物种相互关联, 与植物联系密切的昆虫更易受到影响(朱慧 2012)。对图牧吉自然保护区景观格局的分析结果显示, 自然景观破碎化较为严重, 草地尤为突出, 人类活动也较为频繁(苏德苏日古格 2011, 孙冉 2013), 导致植被盖度下降与昆虫密度降低, 不仅影响大鸨的营巢和隐蔽, 也可能增加大鸨育雏期间的觅食难度。草地土壤特性的变化, 导致土壤动物的密度和群落多样性降低(Schon et al. 2012), 进一步影响捕食者的种群动态。大鸨食物中占有相当比例的金龟科, 其物种数、群落数和生物量与放牧强度呈显著负相关(刘新民 2011)。气候变化是草地退化的主要威胁因子之一(Yang et al. 2015), 导致昆虫生物量变化, 并引发食虫鸟的繁殖生物学特征发生改变(Visser et al. 2006), 甚至导致物种间生态交互作用消失(Valiente-Banuet et al. 2015)。气候变化对大鸨越冬区分布有显著影响(Mi et al. 2016), 但是对繁殖期大鸨的影响还不清楚。

本研究表明, 在小尺度空间, 动物的食物多样性存在差异, 这可能是动物对食物可获得

性差异的响应, 因此, 食性研究也应作为对物种保护对策和栖息地适宜性评价的重要依据。同时, 提示在制定大鸨保护对策时, 栖息地保护和恢复是亟需考虑的问题。靠山核心区能为大鸨提供的食物量受繁殖地面积的制约, 可承载的大鸨数量有限, 建议恢复草地植被, 扩大大鸨繁殖地的选择范围。同时, 采用生态补偿制度, 加快推进退耕还草措施。另外, 马鞍山片区在 2014 年功能区调整后, 很大一部分已不属于保护区的行政管护范围。尽管保护区在每年的繁殖季, 仍然对马鞍山片区进行驻点监测和巡护, 但是遇到在保护区外放牧、采草药、捡蛋、摄影等干扰大鸨繁殖的行为甚至偷猎事件时, 保护区监管部门在执法上比较被动。建议对保护区的功能区划进行调整, 将马鞍山片区尽快重新纳入自然保护区范围内, 这不仅有利于保护大鸨, 而且对该地区的生物多样性保护具有重要意义。

致谢 感谢北京林业大学胡德夫教授“濒危物种非损伤研究技术实验室”提供实验条件, 感谢普林斯顿大学曹青博士在食性分析过程给予的大力支持。同时感谢田晶星、咎志军、李淋苇、赵晨扬在样品采集过程付出了辛勤劳动。特别感谢审稿专家提出的宝贵意见。

参 考 文 献

- Alonso J C, Palacín C. 2010. The world status and population trends of the great bustard (*Otis tarda*): 2010 update. *Chinese Birds*, 1(2): 141–147.
- Andrén H. 1994. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: A review. *Oikos*, 71(3): 355–366.
- Arroyo B, Mougeot F, Bretagnolle V. 2017. Individual variation in behavioural responsiveness to humans leads to differences in breeding success and long-term population phenotypic changes. *Ecology Letters*, 20(3): 317–325.
- Bai Y, Han X, Wu J, et al. 2004. Ecosystem stability and compensatory effects in the Inner Mongolia grassland. *Nature*, 431(7005): 181–184.
- BirdLife International. 2017. *Otis tarda*. The IUCN Red List of

- Threatened Species 2017: e.T22691900A119044104. [DB/OL]. [2020-03-20]. <https://dx.doi.org/10.2305>.
- Bravo C, Bautista L M, Garcíaparis M, et al. 2014. Males of a strongly polygynous species consume more poisonous food than females. *PLoS One*, 9(10): e111057.
- Burgar J M, Murray D C, Craig M D, et al. 2014. Who's for dinner? High-throughput sequencing reveals bat dietary differentiation in a biodiversity hotspot where prey taxonomy is largely undescribed. *Molecular Ecology*, 23(15): 3605–3617.
- Carreon-Martinez L, Heath D. 2010. Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. *Molecular Ecology*, 19(1): 25–27.
- Chen J N, Liu N F, Yan C, et al. 2011. Plasticity in nest site selection of Black Redstart (*Phoenicurus ochruros*): a response to human disturbance. *Journal of Ornithology*, 152(3): 603–608.
- Chenchouni H, Bachir A S, Alrashidi M. 2015. Trophic niche and feeding strategy of the White Stork (*Ciconia ciconia*) during different phases of the breeding season. *Avian Biology Research*, 8(1): 1–13.
- Clarke K R, Warwick R M. 2001. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Plymouth, UK: Primer-E Ltd.
- Coissac E. 2012. *OligoTag: A program for designing sets of tags for next-generation seq. Data oroduction and analysis in population genomics*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Collar N J, Baral H S, Batbayar N, et al. 2017. Averting the extinction of bustards in Asia. *Forktail*, 33: 1–26.
- De Barba M, Miquel C, Boyer F, et al. 2014. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources*, 14(2): 306–323.
- Deagle B E, Thomas A C, Shaffer A K, et al. 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: which counts count? *Molecular Ecology Resources*, 13(4): 620–633.
- Edgar R C, Flyvbjerg H. 2015. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31(21): 3476–3482.
- Fan Y G, Zhou L Z, Cheng L, et al. 2020. Foraging behavior of the Greater White-fronted Goose (*Anser albifrons*) wintering at Shengjin Lake: diet shifts and habitat use. *Avian Research*, 11(1): 1–9.
- Ficetola G F, Coissac E, Zundel S, et al. 2010. An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11: 434–436.
- Frincke-Craig M, Brown J L, Briggs C W, et al. 2015. Relationships between plumage coloration, diet diversity, and winter body condition in the Lesser Goldfinch. *Journal of Ornithology*, 156(1): 143–151.
- Glasser T, Landau S, Ungar E D, et al. 2008. A fecal near-infrared reflectance spectroscopy-aided methodology to determine goat dietary composition in a Mediterranean shrubland. *Journal of Animal Science*, 86(6): 1345–1356.
- Gong M, Ning Y, Han M, et al. 2019. A comparison of next-generation sequencing with clone sequencing in the diet analysis of Asian great bustard. *Conservation Genetics Resources*, 11: 15–17.
- Kauhala K, Ihalainen A. 2014. Impact of landscape and habitat diversity on the diversity of diets of two omnivorous carnivores. *Acta Theriologica*, 59(1): 1–12.
- Kessler A. 2015. *Asian Great Bustards: from conservationbiology to sustainable grassland development*. Arizona State University. PhD dissertation.
- Liu G, Hu X, Shafer A B A, et al. 2017. Genetic structure and population history of wintering Asian Great Bustard (*Otis tarda dybowskii*) in China: implications for conservation. *Journal of Ornithology*, 158(3): 761–772.
- Liu G, Shafer A B A, Hu X, et al. 2018. Meta - barcoding insights into the spatial and temporal dietary patterns of the threatened Asian Great Bustard (*Otis tarda dybowskii*) with potential implications for diverging migratory strategies. *Ecology & Evolution*, 8(3): 1736–1745.
- Machin P, Fernández-Elipe J, Flinks H, et al. 2017. Habitat selection, diet and food availability of European Golden Plover *Pluvialis apricaria* chicks in Swedish Lapland. *Ibis*, 159: 657–672.
- Matthieu L, Yang J Y, Meyer C P, et al. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 34(1): 1–14.
- McKinnon L, Picotin M, Bolduc E, et al. 2012. Timing of breeding, peak food availability, and effects of mismatch on. *Canadian Journal of Zoology*, 90(8): 961–971.
- Mi C, Falk H, Guo Y. 2016. Climate envelope predictions indicate an enlarged suitable wintering distribution for Great Bustards (*Otis*

- tarda dybowskii*) in China for the 21st century. *Peerj*, 4(2): e1630.
- Minchin P R. 1987. An evaluation of relative robustness of techniques for ecological ordinations. *Vegetatio*, 69: 89–107.
- Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142(10): 2369–2372.
- Oehm J, Thalinger B, Eisenkölbl S, et al. 2017. Diet analysis in piscivorous birds: What can the addition of molecular tools offer? *Ecology & Evolution*, 7(6): 1984–1995.
- Oksanen J, Blanchet F G, Kindt R, et al. 2012. Vegan: community ecology package. R package version 2.0-5. [R/OL]. [2020-03-30]. <http://vegan.r-forge.rproject.org/>.
- Peckarsky B L, Abrams P A, Bolnick D I, et al. 2008. Revisiting the classics: considering nonconsumptive effects in textbook examples of predator-prey interactions. *Ecology*, 89(9): 2416–2425.
- Pompanon F, Deagle B E, Symondson W O, et al. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8): 1931–1950.
- Ruffino L, Salo P, Koivisto E, et al. 2014. Reproductive responses of birds to experimental food supplementation: a meta-analysis. *Frontiers in Zoology*, 11(80): 1–13.
- Schon N L, Mackay A D, Minor M A. 2012. Vulnerability of soil invertebrate communities to the influences of livestock in three grasslands. *Applied Soil Ecology*, 53(1): 98–107.
- Segan D B, Murray K A, Watson J E M. 2016. A global assessment of current and future biodiversity vulnerability to habitat loss–climate change interactions. *Global Ecology & Conservation*, 5: 12–21.
- Smith R J, Moore F R. 2005. Fat stores of American Redstarts *Setophaga ruticilla* arriving at northerly breeding grounds. *Journal of Avian Biology*, 36(2): 117–126.
- Spellerberg I F, Fedor P J. 2003. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon-Wiener' Index. *Global Ecology & Biogeography*, 12(3): 177–179.
- Thébault E, Loreau M. 2005. Trophic interactions and the relationship between species diversity and ecosystem stability. *American Naturalist*, 166(4): E95.
- Valentini A, Miquel C, Nawaz M A, et al. 2010. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources*, 9(1): 51–60.
- Valiente-Banuet A, Aizen M A, Alcántara J M, et al. 2015. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29(3): 299–307.
- Valladares G, Salvo A, Cagnolo L. 2010. Habitat fragmentation effects on trophic processes of insect - plant food webs. *Conservation Biology*, 20(1): 212–217.
- Visser M E, Holleman L J, Gienapp P. 2006. Shifts in caterpillar biomass phenology due to climate change and its impact on the breeding biology of an insectivorous bird. *Oecologia*, 147(1): 164–172.
- Williams R J, Martinez N D. 2000. Simple rules yield complex food webs. *Nature*, 404(6774): 180–183.
- Yang H J, Wu M Y, Liu W, et al. 2015. Community structure and composition in response to climate change in a temperate steppe. *Global Change Biology*, 17(1): 452–465.
- 高行宜, 杨维康, 乔建芳, 等. 2007. 中国鸨类的分布与现状. 干旱区研究, 24(2): 45–52.
- 蒋劲松. 2004. 中国大鸨资源现状及其保护的研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文.
- 刘刚, 宁宇, 夏晓飞, 等. 2018. 高通量测序技术在野生动物食性分析中的应用. 生态学报, 38(9): 359–368.
- 刘新民. 2011. 内蒙古典型草原家畜粪中的粪金龟子群落特征. 生态学杂志, 30(1): 24–29.
- 苏德苏日古格. 2011. 草原类型自然保护区社会经济活动环境影响评价研究. 呼和浩特: 内蒙古师范大学硕士学位论文.
- 孙冉. 2013. 图牧吉自然保护区景观格局及生态脆弱性评价研究. 长春: 中国科学院研究生院, 东北地理与农业生态研究所硕士学位论文.
- 田秀华, 王进军. 2001. 中国大鸨. 哈尔滨: 东北林业大学出版社.
- 田秀华, 张佰莲. 2006. 中国大鸨研究进展及保护对策. 野生动物学报, 27(3): 32–37.
- 图牧吉国家级自然保护区. 2015. 图牧吉自然保护区监测报告. 兴安盟: 图牧吉国家级自然保护区.
- 万冬梅. 2002. 大鸨繁殖期栖息地选择与濒危机制的研究. 长春: 东北师范大学博士学位论文.
- 万冬梅, 杜杨, 赵匠, 等. 2010. 大鸨的濒危机制及保护对策. 国家林业局. 中国大鸨保护国际研讨会. 北京: 北京林业大学.
- 万冬梅, 赵匠, 高玮, 等. 2004. 大鸨求偶场的选择. 生态学报, 24(11): 2597–2601.
- 王玄, 江红星, 张亚楠. 2015. 稳定同位素分析在鸟类食性及营养级结构中的应用. 生态学报, 35(16): 5556–5569.
- 吴逸群, 刘建文, 吴盈盈, 等. 2013. 中国大鸨的生物学研究进展.

- 四川动物, 32(1): 156–159.
- 赵匠, 万冬梅, 王海涛, 等. 2005. 大鸨繁殖期觅食地的选择. 应用生态学报, 16(3): 501–504.
- 赵匠, 万冬梅, 王海涛, 等. 2007. 图牧吉自然保护区大鸨繁殖期种群数量动态和食性分析. 东北师大学报: 自然科学版, 39(2): 103–105.
- 郑荣泉, 鲍毅新. 2004. 有蹄类食性研究方法及其研究进展. 生态学报, 24(7): 1532–1539.
- 朱慧. 2012. 气候变化和放牧对草地植物与昆虫多样性关系的作用. 长春: 东北师范大学博士学位论文.