

基于粪便 DNA 的黄河三角洲丹顶鹤越冬种群个体识别及遗传多样性分析

李楠¹ 孙娇² 李东来^{1,3*}

1 辽宁大学生命科学院 沈阳 110036; 2 吉林省民航机场集团有限公司 长春 130000;

3 辽宁大学司法鉴定中心 沈阳 110036

摘要: 丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 为我国一级重点保护野生动物, 被世界自然保护联盟 (IUCN) 列为易危级 (VU) 物种。受自然栖息地不断恶化的影响, 我国野生丹顶鹤种群数量持续处于低位。黄河三角洲作为我国丹顶鹤的重要迁徙停歇地和第二大越冬地, 近些年越冬种群数量持续增加, 了解该种群的遗传背景及多样性水平对于开展其种群遗传保护具有重要意义。本研究采用非损伤性取样方法, 于 2021 年 12 月至 2022 年 2 月在山东黄河三角洲国家级自然保护区采集了 264 份丹顶鹤粪样, 并成功提取 127 份样品的 DNA。选用 7 个微卫星位点和线粒体 Cyt *b* 基因进行个体识别和遗传多样性分析。经微卫星基因分型, 通过个体识别确认 127 份样品来自于 115 只个体。检测到 60 个微卫星等位基因, 有效等位基因数 N_e 在 1.640 ~ 6.414 之间, 平均观测杂合度 H_o 为 0.617, 平均多态信息含量 PIC 为 0.578, 平均期望杂合度 H_e 为 0.628, 其中, 期望杂合度显著低于扎龙保护区种群 ($P < 0.05$)。有 6 个位点偏离哈迪-温伯格平衡, 近交系数为 0.128。基于 Cyt *b* 基因进行线粒体遗传多样性分析, 共成功扩增 53 份序列, 检测到 13 个变异位点和 12 个单倍型, 单倍型多样性 H_d 为 0.756, 核苷酸多样性 P_i 为 0.001 92, 表现为较低水平。微卫星群体遗传结构分析显示, 该种群可分为 4 个亚群, 但遗传分化程度较低, 群体间遗传分化指数 F_{ST} 为 0.020 ~ 0.056。Cyt *b* 单倍型网络图未见明显种内遗传分化。综上, 黄河三角洲丹顶鹤越冬种群的遗传多样性水平较低, 可能反映出该种群的遗传结构相对单一。本文利用粪便 DNA 进行野生丹顶鹤个体识别和遗传多样性研究, 此方法将为进一步开展野生丹顶鹤种群的遗传多样性评估及其他濒危动物的遗传学研究提供新思路。

关键词: 丹顶鹤; 非损伤性采样; 粪便 DNA; 微卫星; 遗传多样性; 个体识别

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2026) 04-564-12

Individual identification and genetic diversity analysis of the wintering population of Red-crowned Cranes (*Grus japonensis*) based on fecal DNA in the Yellow River Delta, China

LI Nan¹ SUN Jiao² LI Dong-Lai^{1,3*}

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31672316, 31911540468);

* 通信作者, E-mail: lidonglai@lnu.edu.cn;

第一作者介绍 李楠, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鸟类学; E-mail: ln991012@163.com。

收稿日期: 2025-05-07, 修回日期: 2025-12-30 DOI: 10.13859/j.cjz.202625087 CSTR: 32109.14.cjz.202625087

1 School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036; 2 Jilin Province Civil Aviation Airport Group Co., Ltd., Changchun 130000; 3 Liaoning University Judicial Authentication Center, Shenyang 110036, China

Abstract: [Objectives] The Red-crowned Crane (*Grus japonensis*) is listed as a National Class I Key Protected Species in China and evaluated as Vulnerable (VU) by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). It has maintained a small wild population in China due to the deterioration of its natural habitats. As an important migratory stopover site and the second-largest wintering ground for this species in China, the Yellow River Delta has witnessed a continuous increase in its wintering population size in recent years. Understanding the genetic characteristics and diversity of this population is crucial for implementing effective conservation strategies. **[Methods]** We employed a non-invasive sampling method to collect 264 fecal samples of Red-crowned Cranes from the Yellow River Delta National Nature Reserve from December 2021 to February 2022 (Fig. 1), and extracted DNA from 127 samples. Individual identification and genetic diversity assessment were conducted based on seven microsatellite loci and the mitochondrial Cyt *b* gene. CERVUS 3.0 was utilized for individual identification and calculation of genetic diversity parameters, including the effective number of alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphism information content (PIC), and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). GenAlEx V6.51b2 was used to quantify private alleles, inbreeding coefficient (F_{is}), probability of identity (PID), and probability of identity among siblings (PIDSib). The population genetic structure was analyzed via Structure 2.3.4, and the genetic differentiation index (F_{ST}) and gene flow (N_m) between populations were calculated. Mitochondrial genetic diversity analysis was performed with DNASP 5.0 to calculate haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (P_i). A median-joining haplotype network was constructed by POPART 1.7. **[Results]** Individual identification confirmed that 127 samples originated from 115 distinct individuals (Fig. 2). A total of 60 microsatellite alleles were detected, with N_e ranging from 1.640 to 6.414. The population exhibited low genetic diversity, with H_o , PIC, and H_e values of 0.617, 0.578, and 0.628, respectively. Its expected heterozygosity was significantly lower than that of the Zhalong population ($P = 0.002$), but not significantly different from those of the Yancheng and Hokkaido wintering populations ($P > 0.05$; Tables 2 and 4). The population showed a high inbreeding coefficient ($F_{is} = 0.128$). Cyt *b* gene sequences were successfully amplified from 53 samples, revealing 13 variable sites and 12 distinct haplotypes. Haplotype diversity ($H_d = 0.756$) and nucleotide diversity ($P_i = 0.001\ 92$) indicated low genetic diversity ($P_i < 0.005$). Microsatellite-based population structure analysis divided the population into four subpopulations, while the genetic differentiation was minimal ($F_{ST} 0.020 \sim 0.056$, $N_m 4.198 \sim 12.329$; Figs. 3 and 4, Table 3). The haplotype network constructed from Cyt *b* sequences showed no significant intraspecific genetic differentiation (Fig. 5). **[Conclusion]** These findings suggest that the wintering population in the Yellow River Delta exhibits low genetic diversity and a relatively homogeneous genetic structure. This study pioneers the use of fecal DNA for individual identification and genetic analysis in wild Red-crowned Cranes, providing a methodological application for genetic diversity assessments for wild Red-crowned Crane populations and other endangered species.

Key words: Red-crowned Crane, *Grus japonensis*; Non-invasive sampling; Fecal DNA; Microsatellite; Genetic diversity; Individual identification

丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 属鹤形目 (Gruiformes) 鹤科 (Gruidae), 是我国一级重点保护野生动物, 被世界自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 列为易危级物种。丹顶鹤种群分为岛屿种群和大陆种群, 其中, 岛屿种群分布在日本北海道附近, 不迁徙; 大陆迁徙种群主要在中国东北和俄罗斯远东地区繁殖, 在中国东部沿海和朝鲜半岛三八线附近越冬, 在中国的越冬地主要为江苏盐城、山东黄河三角洲和辽宁辽河口三个国家级自然保护区 (Su and Zou 2012, 林远锋等 2021a, b)。其中, 黄河三角洲自然保护区于 1987 年记录到丹顶鹤越冬个体, 2016 年记录到越冬个体数量 137 只, 2021 年记录到越冬个体数量约 340 只, 已成为国内第二大丹顶鹤越冬地。

近几年, 我国越冬丹顶鹤种群数量略有增长, 但其越冬栖息地质量依然不容乐观, 野生种群恢复仍面临严峻威胁 (Li et al. 2020, Wang et al. 2020)。遗传多样性是物种适应环境变化和维持长期生存能力的基础, 能够反映种群内基因变异的丰富程度, 在濒危物种保护中至关重要 (Nei et al. 1975)。基于中性遗传标记的研究使得对许多濒危物种的遗传检测成为可能, 其在种间及种内遗传分化和多样性研究中都得到了大量应用 (Kirk and Freeland 2011)。线粒体 DNA (mtDNA) 具有母系遗传特征, 其中, *Cyt b* 基因进化速率适中, 可以反映种内及种间较强进化信息, 是鉴定物种遗传分化和系统发育的常用分子标记 (Tamura et al. 2013)。而微卫星标记因其高度多态性和便捷的检测方法, 在分析遗传结构和遗传多样性方面具有明显优势 (Mihailova 2021)。结合多个微卫星位点数据还可以精准识别个体, 为开展个体水平的生态学研究提供条件。

长期以来, 濒危物种的保护遗传学研究面临着组织或血液等遗传样品难以获取的难题。非损伤性采样 (non-invasive sampling) 无需干扰和捕获动物即可获取样品 (Morin et al.

1993), 实验材料包括羽毛、粪便及卵壳等, 极大促进了濒危动物的种群遗传学研究。其中, 粪便样品包含排便个体肠壁脱落上皮细胞的 DNA (Kohn and Wayne 1997), 具有可获得性高、无干扰性、含有多元遗传信息等优点, 已被成功用于大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) (何流洋等 2023)、林麝 (*Moschus berezovskii*) (王喆等 2024) 等哺乳动物的研究。但鸟类的消化道较短, 排便速度快, 肠道上皮细胞脱落较少, 其粪便常被认为不易于提取 DNA (刘刚等 2021)。另外, 从粪便中提取的靶 DNA 存在含量低、易降解等问题, 其中的酶和细菌也可能影响后续聚合酶链式反应 (PCR)。在微卫星基因分型过程中, 这些因素可能会导致基因分型错误, 从而影响实验结果 (Taberlet et al. 1999)。特别是对于分布在湿地环境的水鸟, 粪便中 DNA 被污染和降解的可能性更大。尽管有研究成功把粪样样品用于松鸡 (*Tetrao urogallus*) (Haider et al. 2025)、大鸨 (*Otis tarda*) (Broderick et al. 2003) 等鸟类的遗传分析研究, 对于典型的湿地涉禽——鹤类的研究还未见有报道。

本研究基于文献选择 7 个微卫星位点, 对黄河三角洲丹顶鹤越冬种群进行个体鉴定, 以探讨非损伤性采样结合微卫星标记用于个体识别的可行性; 并结合线粒体分子标记展开遗传多样性分析, 探究该种群的遗传多样性水平和群体遗传结构, 为丹顶鹤的遗传管理提供科学资料。

1 实验方法

1.1 研究地点

本研究样品采集于山东省东营市山东黄河三角洲国家级自然保护区 (37°35' ~ 38°12' N, 118°33' ~ 119°20' E)。该保护区是中国三大河口三角洲之一, 是黄河携带泥沙淤积形成的新生河口湿地, 属暖温带季风型大陆性气候, 年平均气温在 11.7 ~ 12.6 °C 之间。该保护区大面积的翅碱蓬 (*Suaeda salsa*) 滩涂湿地和河口生

境为丹顶鹤迁徙和越冬提供了重要的栖息地，前期研究发现该保护区越冬丹顶鹤主要取食翅碱蓬滩涂的天津厚蟹（*Helice tridentata sinensis*）等滩涂蟹类，夜间有集群夜宿的习性。

1.2 样品采集和 DNA 提取

本研究于 2021 年 12 月至 2022 年 2 月，在山东黄河三角洲国家级自然保护区黄河北岸区域开展丹顶鹤粪便样品的采集工作。首先在保护区内进行调研，确定滩涂上丹顶鹤觅食地 2 处与潮上滩夜宿地 1 处观察点，利用双筒望远镜（8 × 42，广州博冠光电科技有限公司）和单筒望远镜[尼康 MONARCH 82ED-S，20 ~ 60 倍，尼康映像仪器销售（中国）有限公司]对丹顶鹤进行连续监控，待其飞离后，沿着丹顶鹤足迹寻找粪便，在区域内用一次性塑料勺集中采集新鲜粪便样品（图 1）。采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒（DP328，天根生化科技公司）提取丹顶鹤粪便全基因组 DNA，并使用琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.3 物种鉴定

野外采集时，根据周围丹顶鹤的脚印痕迹以及粪便形状来分辨。由于丹顶鹤主要取食螃蟹等动物性食物，其粪便多为滩状，无固定的形状结构（图 1）。为了排除其他鹤类，如白鹤（*Leucogeranus leucogeranus*）的影响，样品通过线粒体 Cyt b 基因扩增进行物种鉴定，扩增引物序列为 F: 5'-AGG TTG GCG GTT AGG

GTT C-3'，R: 5'-CTA CTA CTA GCY GCA CAC TA-3'（Y 为简并碱基，代表 C 或 T）。PCR 反应体系为 25 μl，含有 12.5 μl 2 × Taq PCR MasterMix、0.75 μl 正反向引物（10 μmol/L）和 50 ng 模板 DNA，ddH₂O 补足体系。PCR 反应条件为，94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，30 个循环；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测条带位置后送北京擎科生物技术公司进行双向测序。利用 DNASTAR 软件包的 SeqMan 对测得序列进行人工校对并拼接，在 NCBI 中采用 BLAST 比对法将测序序列与已知同源序列进行比对，确定样本的来源物种。

1.4 基因分型及遗传多样性分析

根据文献记录（Hasegawa et al. 2000，Sun et al. 2021），筛选出 7 对微卫星引物用于丹顶鹤粪样的基因分型（表 1），每个引物 5'端使用荧光（FAM、HEX、TAMRA）进行标记。PCR 扩增体系为 25 μl，12.5 μl 2 × Taq PCR MasterMix、正反向引物 0.75 μl（10 μmol/L）、DNA 50 ng、dd H₂O 补足体系。反应条件为，94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，相应温度退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，30 个循环；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，将出现单一明亮条带的样品送至北京擎科生物技术公司进行一代短串联重复序列（short tandem repeat，STR）基因分型。采用 CERVUS 3.0 软件（Kalinowski et al.



图 1 采集环境（左）及丹顶鹤（*Grus japonensis*）粪便样品（右）

Fig. 1 Sampling environment (left) and fecal samples of Red-crowned Crane (right)

表 1 微卫星引物信息

Table 1 Information of microsatellite primers

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	重复碱基 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature (°C)
GJ1430	F: GGTTTGTAGGTCGCCCATTA R: AGGTGGGCAAAATGAGATTG	(TGC)TGG(TGC) ₆₄	60
Gj-M13	F: TCTGCATGCGTCCTGCCTCCAAGA R: TGCCTTGACACAGGCAGGTGAAATG	(AC) ₁₀	60
GJ2298	F: GCCTGTTGCAAGAACACAGA R: GGAGAAGTGAAGGGGAAGGT	(CTG) ₁₄	60
Gj-M11a	F: TGGGGTGCAAGTTCAAATAAGCG R: TCTGCATCCAAAAAGGACATGC	(CA) ₁₂	60
Gj-M15	F: TCTACCAGATATCATCAGAGCTTGC R: TGCGAATGAACAGATGGCCCCAAGA	(CA) ₁₃	60
Lia20751	F: GGTCCCTTCCAACCAAAA R: TAGCCTCTACGAAAACAG	(TATTC) ₂₄	56
Lia29562	F: AATCCACCCAAATTAGAGCAAG R: GGAAATGAAGGTCCAAAGAGAG	(ATA) ₁₄	60

2007) 计算所有样本 7 个微卫星位点的遗传多样性参数, 包括有效等位基因数 (effective number of allele, N_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_E)、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。使用 GenAlEx V6.51b2 计算稀有等位基因数 (private allele) 及近交系数 (inbreeding coefficient, F_{IS})。采用 Mann-Whitney U 检验将本研究所得遗传参数与不同地区丹顶鹤种群的遗传参数进行两组间比较, 显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

1.5 个体识别

本研究使用 GenAlEx V6.51b2 计算 2 个不同个体基因型相同的概率 (the probability of identity, PID) 和 2 个同胞关系个体基因型相同的概率 (the probability of identity for siblings, PID_{sib}), PID 小于 0.001, 且 PID_{sib} 小于 0.01 时, 符合个体精确识别的要求 (Waits et al. 2001)。使用软件 CERVUS 3.0 查找数据中所匹配的基因型, 以进行个体识别。不同样品来自同一个体的判断原则是: 所有基因座位上的基因型都相同或者只有一个座位上的一个等位

基因存在差异。

1.6 群体遗传结构分析

采用 Structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) 软件分析丹顶鹤群体遗传结构, 对个体基因型进行随机抽样, 判断个体属于哪个群体。将 K 值估计范围设置为 2 ~ 6, 每个 K 值重复 10 次进行抽样。在 STRUCTURESELECTOR 网站 (<https://lmme.ac.cn/StructureSelector/>) 中计算最适 K 值 (Li and Liu 2018), 使用 pophelper 包导出 Q 矩阵 (Francis 2017)。用 GenAlEx V6.51b2 进行二维主坐标分析, 并绘制主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 散点图, 进一步验证群体分析结果, 并计算不同亚群间、群体间遗传分化指数 (F_{ST}) 与基因流值 (N_m) (Peakall and Smouse 2012)。 $F_{ST} < 0.05$ 表明遗传分化程度低; $0.05 \leq F_{ST} < 0.15$ 代表遗传分化程度中等; $F_{ST} \geq 0.15$ 则表明遗传分化显著。 $N_m < 1$ 为低基因流, 表明基因交流受限; $1 \leq N_m < 4$ 为中等基因流; $N_m \geq 4$ 为高基因流, 代表基因交流非常充分 (Todou et al. 2013)。

1.7 线粒体遗传多样性分析

用 MEGA 6.0 软件进行序列比对 (Tamura

et al. 2013)。采用 DNASP 5.0 软件计算种群内多态信息位点数(number of polymorphic sites)、简约信息位点(parsimony informative sites)、单一变异位点(singleton variable sites)、单倍型数量(numbers of haplotypes)、单倍型多样性(haplotype diversity, H_d)与核苷酸多样性(nucleotide diversity, P_i) (Librado and Rozas 2009)。使用 POPART 1.7 软件中的 Median Joining 法绘制单倍型网络图,用于分析不同单倍型之间的进化关系(Bandelt et al. 1999)。

2 结果

2.1 物种鉴定及个体识别

在黄河三角洲采集的粪便样品中,共鉴定出丹顶鹤粪便样本 264 份,提取粪便 DNA 样本,有 127 份可多次(大于或等于 3 次)重复进行 PCR 有效扩增。对基因分型结果进行比对和校正,按照多态性信息含量大小依次增加用于丹顶鹤个体识别的微卫星位点数量,当微卫星位点数量达到 6 时,2 个不同个体基因型相同的概率(PID)为 1.0×10^{-5} ,2 个同胞关系个体基因型相同的概率(PIDSib)为 8.8×10^{-3} ,当微卫星位点数达到 7 时,PID 值下降为 4.1×10^{-6} ,PIDSib 值下降为 5.8×10^{-3} (图 2)。基于 7 个微卫星位点的基因分型结果,从 127 份丹顶鹤粪便样品中成功鉴定出 115 只个体,重复

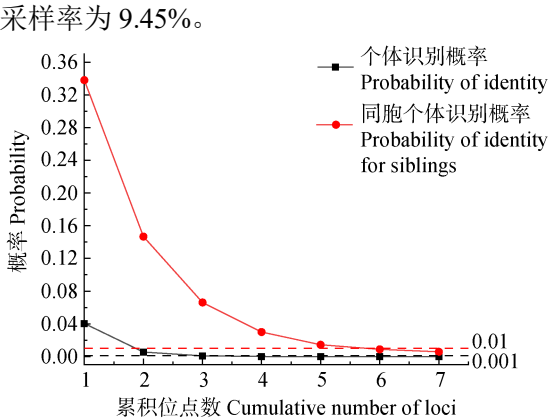


图 2 7 个微卫星位点的个体识别概率比较
Fig. 2 Comparison of probability of identity across 7 microsatellite loci

虚线为阈值线,分别为 0.01 和 0.001。
The dashed lines represent the threshold values at 0.01 and 0.001.

2.2 微卫星的遗传多样性分析

7 个微卫星位点共检测到 60 个等位基因,有效等位基因数 N_e 在 1.640~6.414 之间。各微卫星位点的观测杂合度(H_o)为 0.277~0.881,期望杂合度(H_e)为 0.392~0.848,多态信息含量(PIC)为 0.354~0.828,平均观测杂合度、平均期望杂合度和平均多态性信息含量分别为 0.617、0.628 和 0.578。7 个位点有 5 个极显著偏离哈迪-温伯格平衡,1 个显著偏离哈迪-温伯格平衡(表 2)。近交系数 F_{IS} 为 0.128。

表 2 丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 7 个微卫星位点的遗传多样性参数

位点 Locus	等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Effective number of allele	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 Polymorphism information content	哈迪-温伯格平衡 Hardy-Weinberg equilibrium	无效等位基因频率 Null allele frequency estimate
Gj-M13	6	2.770	0.881	0.642	0.568	***	-0.180 9
Lia29562	14	6.414	0.552	0.848	0.828	NS	0.202 7
GJ2298	12	3.336	0.780	0.703	0.654	***	-0.075 7
GJ-M11a	7	3.064	0.379	0.677	0.617	***	0.281 9
GJ-M15	8	3.097	0.864	0.680	0.623	***	-0.156 1
Lia20751	6	1.827	0.587	0.455	0.404	***	-0.157 2
GJ1430	7	1.640	0.277	0.392	0.354	*	0.167 6

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS. 无显著性 No statistical significance

2.3 群体遗传结构分析

基于贝叶斯算法构建聚类图, K 为 4 时得到最佳种群聚类, 即种群内存在一定程度分化, 由 4 个亚群组成, 编号为 Pop1 ~ Pop4 (图 3)。基于遗传距离对样品进行了主坐标分析, 显示 4 个亚群的个体相互混合 (图 4), 亚群之间存在一定的基因流。计算不同亚群间遗传分化指数 (F_{ST}) 与基因流值 (N_m) (表 3), 其中 Pop2 与 Pop4 亚群之间 F_{ST} 值为 0.056, 为中等程度遗传分化 ($0.05 \leq F_{ST} < 0.15$), 其余亚群群体间遗传分化指数较小 ($F_{ST} < 0.05$), 基因流值较大 ($N_m > 4$), 说明基因交流充分, 遗传分化程度较低。在 7 个微卫星位点上共检测到 18 个稀有等位基因, 集中在 GJ2298、Lia29562

和 Gj-M13 三个位点上, 其中 Pop1 和 Pop2 各有 5 个稀有等位基因, Pop4 有 8 个稀有等位基因, 进一步印证了亚群间存在基因交流。

2.4 基于 Cyt b 基因片段的遗传多样性分析

成功对 53 份丹顶鹤样品的 Cyt b 基因片段进行测序及分析, 序列长度为 792 bp, 检测到 13 个突变位点, 其中包括 7 个单一变异位点, 6 个简约信息位点。单倍型多样性 H_d 为 0.756, 核苷酸多样性 P_i 为 0.001 92。共定义 12 种单倍型, 绘制单倍型网络图 (图 5), 未见显著分化格局。其中单倍型 Hap_1 和 Hap_2 占比最高 (共 67.92%), 并处于网络图中间位置, 推测为比较原始的祖先单倍型, 出现一个并未检测到的节点, 代表一个理论上存在的过渡单倍型。

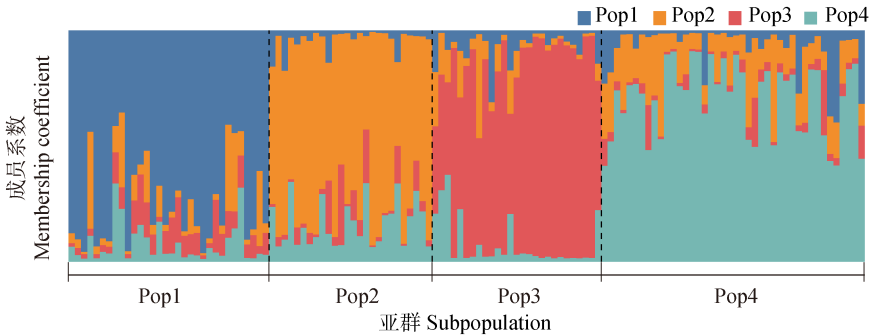


图 3 贝叶斯聚类结果 ($K = 4$)

Fig. 3 Genetic structure inferred by Bayesian clustering analysis ($K = 4$)

图中每个垂直条形代表一个个体, 不同颜色的比例表示其隶属于各个亚群的概率。
Each vertical bar represents one individual, with the colored segments showing the estimated probability of belonging to each genetic subpopulation.

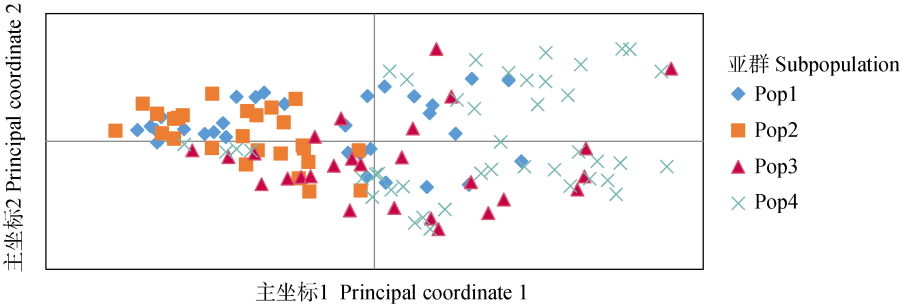


图 4 黄河三角洲 4 个丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 亚群的主坐标分析结果

Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) of the four Red-crowned Crane subpopulations from the Yellow River Delta

表 3 黄河三角洲 4 个丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 亚群之间的遗传分化和基因流值

Table 3 Genetic differentiation and gene flow estimates among four Red-crowned Crane subpopulations from the Yellow River Delta

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4
Pop1	0.000	10.861	7.817	5.775
Pop2	0.023	0.000	6.540	4.198
Pop3	0.031	0.037	0.000	12.329
Pop4	0.041	0.056	0.020	0.000

对角线及以下为群体间遗传分化指数 (F_{ST})；对角线上为基因流值 (N_m)。Pop1 ~ Pop4 表示 4 个亚群。
Values on and below the diagonal are the genetic differentiation indices (F_{ST}); above the diagonal are the gene flow (N_m) values; Pop1 ~ Pop4 represent four subpopulations.

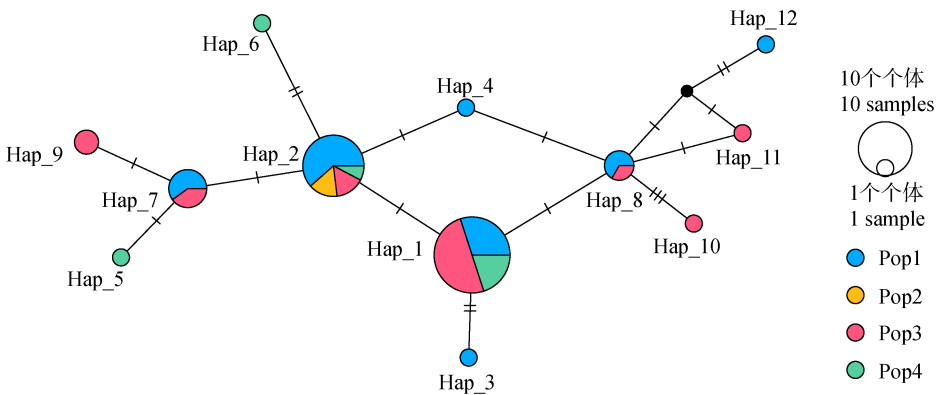


图 5 黄河三角洲丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 的 Cyt *b* 基因单倍型网络图

Fig. 5 Haplotype network of the Cyt *b* gene in Red-crowned Cranes from the Yellow River Delta

黑点表示未检测到的单倍型，单倍型连线之间的线段数表示变异次数，Pop1 ~ Pop4 表示 4 个亚群。
Black dots represent undetected haplotypes; the number of line segments between connected haplotypes indicates the number of mutations; Pop1 ~ Pop4 represent four subgroups.

3 讨论

许多濒危物种数量稀少、活动隐秘、不易获取遗传样本。因此，在濒危野生动物的分子生态学研究，研究者面临的首要难题就是获取足够样本量的遗传样本材料。非损伤性采样可以在不直接接触动物的情况下收集到不同类型的样品进行遗传信息分析。但使用粪便 DNA 进行基因分型检测中，粪样 DNA 质量低而引起的分型错误是限制该方法应用的重要因素 (Schultz et al. 2022)。研究表明，等位基因缺失受到样本类型和提取试剂盒效果的影响，样本的新鲜程度也会影响基因分型成功率

(Sittenthaler et al. 2021)，在本研究中，我们结合形态特征，尽量采集新鲜粪便样本以提高基因分型成功率和 DNA 质量。

本研究选择了 7 个可稳定扩增的微卫星位点，对 127 份丹顶鹤样品进行识别，共鉴定出 115 只个体。丹顶鹤为迁徙鸟类，其个体识别及种群动态监测主要依赖传统调查和卫星追踪技术。通过非损伤性采样确定样本的个体来源，能够有效提高研究效率，在个体识别、种群大小评估、个体水平取食生态学研究以及野化放归种群监测中具有重要科学意义。

遗传多样性水平决定了物种是否能够长期生存、适应多变环境。单倍型多样性 H_d 和核苷

酸多样性 P_i 是衡量种群 mtDNA 遗传变异程度和群体遗传分化的重要指标, 其中单倍型多样性反映了群体内单倍型数目及其分布均匀度, 侧重短期内的基因型变化, 核苷酸多样性则反映任意两条序列间平均每个位点的核苷酸差异, 主要体现长期累积的突变历史 (范平等 2025)。Grant 和 Bowen (1998) 认为, $H_d > 0.5$ 为高单倍型多样性, $P_i > 0.005$ 为高核苷酸多样性。本研究结果显示, 黄河三角洲丹顶鹤越冬种群的 H_d 为 0.756, P_i 为 0.001 92, 呈现出高单倍型多样性和低核苷酸多样性的特点。在以往研究中, 白鹤俄罗斯东部繁殖种群核苷酸多样性为 0.006 0 (Ponomarev et al. 2004), 沙丘鹤 (*Antigone canadensis*) 核苷酸多样性为 0.008 7 $\pm$ 0.005 5 (Phymer et al. 2001), 与这两种鹤类相比, 我国黄河三角洲丹顶鹤越冬种群呈现出较低的核苷酸多样性水平。

观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量都是衡量遗传多样性水平的重要指标 (Nei et al. 1975)。多态性信息含量 (PIC) 值越高表明群体遗传多样性越高, 同时反映了微卫星位点在某群体中的多样性水平, PIC 大于等于 0.5 说明基因座是高度多态性, PIC 介于 0.2 至 0.5 之间则为中度多态性, 当 PIC 小于等于 0.2 时为低度多态性 (Botstein et al. 1980)。本研究所选择的微卫星位点 PIC 均大于 0.25, 表现为中度或高度多态性。黄河三角洲丹顶鹤越冬种群的平均观测杂合度为 0.617, 平均期望杂合度为 0.628, 平均多态性信息含量为 0.578, 期望杂

合度大于观测杂合度, 即存在杂合子缺失的现象, 可能与无效等位基因存在、种群近交水平较高 ($F_{IS} = 0.128$) 等因素有关。在之前的研究中, 应用 6 个位点计算江苏盐城保护区丹顶鹤越冬种群的遗传多样性参数, 期望杂合度和多态信息含量分别为 0.768 和 0.721 (Sun et al. 2021); 扎龙保护区丹顶鹤野生、散养和圈养小种群的期望杂合度在 0.800 ~ 0.833 之间 (邹红菲等 2007); Hasegawa 等 (2000) 应用 7 个微卫星位点计算丹顶鹤北海道种群期望杂合度为 0.482。我国黄河三角洲丹顶鹤越冬种群的期望杂合度 ($H_E = 0.628$) 显著低于扎龙种群 ($U = 2.000$, $P = 0.002$, $r = 0.750$), 与盐城越冬种群 ($U = 8.500$, $P = 0.074$, $r = 0.496$) 及日本北海道种群 ($U = 8.000$, $P = 0.123$, $r = 0.428$) 无显著差异 (表 4)。综合来看, 黄河三角洲丹顶鹤越冬种群的遗传多样性处于较低水平, 这与线粒体 Cyt *b* 基因序列的研究结果一致。

微卫星为中性突变, 不受选择压力的影响, 在理想的群体中, 群体内各位点的基因型分布频率应符合哈迪-温伯格平衡。本研究中有 6 个位点偏离哈迪-温伯格平衡, 导致此现象的原因可能是无效等位基因的存在引起了等位基因频率改变, 或是群体内存在非随机交配、基因突变、自然选择等 (Salanti et al. 2005)。此外也可能是采样导致的偏差, 黄河三角洲丹顶鹤越冬种群可能存在以家庭群为单位活动的情况, 如果恰好采集了亲缘关系较近的多个个体, 可能会导致位点偏离哈迪-温伯格平衡 (Liu et al.

表 4 不同丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 种群的遗传学参数

Table 4 Genetic parameters of different Red-crowned Crane populations

遗传参数 Genetic parameter	黄河三角洲越冬种群 (本研究) Yellow River Delta wintering population (This study)	盐城越冬种群 Yancheng wintering population Sun et al. 2021	扎龙保护区种群 Zhalong Nature Reserve population 邹红菲等 2007			北海道种群 Hokkaido population Hasegawa et al. 2000
			野生 Wild	散养 Non-migratory	圈养 Captive	
观测杂合度 Observed heterozygosity, H_o	0.617	0.654	1.000	1.000	1.000	0.474
期望杂合度 Expected heterozygosity, H_E	0.628	0.768	0.833	0.800	0.810	0.482

2013)。如果群体内长期存在哈迪-温伯格平衡偏离,群体内的等位基因多样性会逐渐降低,纯合子比例上升,进而导致种群的遗传多样性降低和种群衰退(Wills 2007)。

群体间遗传分化指数(F_{ST})和基因流(N_m)是评估种群遗传结构的重要参数。黄河三角洲丹顶鹤越冬种群可以划分为4个亚群,群体间遗传分化指数(F_{ST})范围为0.020~0.056,基因流(N_m)值范围为4.198~12.329,亚群之间的遗传分化程度较低,存在较大的基因交流。主坐标分析结果进一步证实,4个亚群间个体存在交叉混合,仅Pop2和Pop4之间的遗传分化相对较大。稀有等位基因在各亚群内不均衡分布,但集中在3个位点上,这与亚群间整体存在弱遗传结构和高基因交流的结果一致。导致此现象的原因可能是,(1)丹顶鹤种群对越冬地和繁殖地相对忠诚,黄河三角洲越冬的丹顶鹤主要来自某一个繁殖地;(2)黄河三角洲丹顶鹤越冬种群由多个家庭群组成,亲缘关系较近,基因交流比较充分。此外,丹顶鹤越冬种群单倍型网络图上并未呈现出明显的种内遗传分化,各亚群没有聚类现象,推测可能是由于进化速率不同,线粒体尚未呈现出相应的遗传结构变化。

综上所述,黄河三角洲丹顶鹤越冬种群遗传多样性较低,微卫星多数位点偏离哈迪-温伯格平衡,种群内部分为4个亚群,但遗传分化程度较低。导致遗传多样性偏低的原因可能与近期种群历史事件有关,例如奠基者效应或近交压力限制了遗传变异的积累(Hunter and Gibbs 2006)。建议加强黄河三角洲湿地栖息地修复与核心觅食区保护工作,避免栖息地破碎化带来的影响,确保生存资源足以支撑种群持续增长,同时,还需加强对迁徙通道上其他位点的保护,促进亚群间的自然扩散和基因交流。后续研究可优化采样策略,并利用分子标记开展亲缘关系分析,以厘清不同地区越冬种群的遗传结构,进一步为我国野生丹顶鹤种群的恢复和保护提供科学依据。

参 考 文 献

- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37–48.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314–331.
- Broderick D, Idaghdour Y, Korrida A, et al. 2003. Gene flow in great bustard populations across the Strait of Gibraltar as elucidated from excremental PCR and mtDNA sequencing. *Conservation Genetics*, 4(6): 793–800.
- Francis R M. 2017. pophelper: An R package and web app to analyse and visualize population structure. *Molecular Ecology Resources*, 17(1): 27–32.
- Grant W, Bowen B. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5): 415–426.
- Haider M, Skubski M, Lentner R, et al. 2025. Efficiency in conservation: comparable genetic and population data from one and two noninvasive sampling rounds in *Tetrao urogallus* (Western Capercaillie). *Ornithological Applications*, 127(3): duaf031.
- Hasegawa O, Ishibashi Y, Abe S. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the red-crowned crane *Grus japonensis*. *Molecular Ecology*, 9(10): 1677–1678.
- Hunter M L Jr, Gibbs J P. 2006. *Fundamentals of Conservation Biology*. 3rd ed. Malden: Blackwell Publishing, 100–102.
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099–1106.
- Kirk H, Freeland J R. 2011. Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6): 3966–3988.
- Kohn M H, Wayne R K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(6): 223–227.

- Li Y L, Liu J X. 2018. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18(1): 176–177.
- Li D L, Zhang J, Chen L Y, et al. 2020. Burrow ambient temperature influences *Helice* crab activity and availability for migratory Red-crowned Cranes *Grus japonensis*. *Ecology and Evolution*, 10(20): 11523–11534.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Liu Y, Keller I, Heckel G. 2013. Temporal genetic structure and relatedness in the Tufted Duck *Aythya fuligula* suggests limited kin association in winter. *Ibis*, 155(3): 499–507.
- Mihailova Y. 2021. Genetic diversity and structure of 2 indigenous sheep breeds (Kotel and Teteven) in Bulgaria using microsatellite markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1): 576–585.
- Morin P A, Wallis J, Moore J J, et al. 1993. Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. *Primates*, 34(3): 347–356.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1): 1–10.
- Peakall R, Smouse P E. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19): 2537–2539.
- Phymer J M, Fain M G, Austin J E, et al. 2001. Mitochondrial phylogeography, subspecific taxonomy, and conservation genetics of sandhill cranes (*Grus canadensis*; Aves: Gruidae). *Conservation Genetics*, 2(3): 203–218.
- Ponomarev A, Tatarinova T, Bubyakina V, et al. 2004. Variation of mitochondrial DNA D-loop sequences in the endangered Siberian crane *Grus leucogeranus* Pallas. *Conservation Genetics*, 5(6): 847–851.
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945–959.
- Salanti G, Amountza G, Ntzani E E, et al. 2005. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: An empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *European Journal of Human Genetics*, 13(7): 840–848.
- Schultz A J, Strickland K, Cristescu R H, et al. 2022. Testing the effectiveness of genetic monitoring using genetic non-invasive sampling. *Ecology and Evolution*, 12(1): e8459.
- Sittenthaler M, Schöll E M, Leeb C, et al. 2021. Factors influencing genotyping success and genotyping error rate of Eurasian otter (*Lutra lutra*) faeces collected in temperate Central Europe. *European Journal of Wildlife Research*, 67(1): 2.
- Su L Y, Zou H F. 2012. Status, threats and conservation needs for the continental population of the Red-crowned Crane. *Chinese Birds*, 3(3): 147–164.
- Sun C H, Liu H Y, Xu P, et al. 2021. Genetic diversity of wild wintering red-crowned crane (*Grus japonensis*) by microsatellite markers and mitochondrial Cyt B gene sequence in the Yancheng reserve. *Animal Biotechnology*, 32(5): 531–536.
- Taberlet P, Waits L P, Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8): 323–327.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Todou G, Benoit L, Achoundong G, et al. 2013. Genetic diversity of *Dacryodes buettneri* (Engl.) H.J. Lam (Burseraceae), a timber tree in central Africa. *Journal of Agriculture and Environment for International Development*, 107(2): 163–177.
- Waits L P, Luikart G, Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10(1): 249–256.
- Wang G, Wang C, Guo Z R, et al. 2020. Integrating Maxent model and landscape ecology theory for studying spatiotemporal dynamics of habitat: Suggestions for conservation of endangered Red-crowned crane. *Ecological Indicators*, 116: 106472.
- Wills C. 2007. Principles of population genetics, 4th edition. *Journal of Heredity*, 98(4): 382.
- 范平, 温知新, 宋刚. 2025. 气候因子和人类活动对两栖及哺乳动物不同遗传多样性指标的影响. *生物多样性*, 33(8): 25022.
- [Fan P, Wen Z X, Song G. 2025. The effect of climatic factors

- and anthropogenic activities on different genetic diversity indicators of amphibians and mammals. *Biodiversity Science*, 33(8): 25022.]
- 何流洋, 田春洋, 胥池, 等. 2023. 小相岭山系放归大熊猫现状及成效研究. *普洱学院学报*, 39(6): 10–14. [He L Y, Tian C Y, Xu C, et al. 2023. The status and effectiveness of reintroduced giant pandas in the xiaoxiangling mountain range. *Journal of Pu'er University*, 39(6): 10–14.]
- 林远锋, 鲁长虎, 许鹏, 等. 2021a. 1976 年以来丹顶鹤在我国分布变迁及就地保护状况. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 45(6): 200–208. [Lin Y F, Lu C H, Xu P, et al. 2021a. Distribution changes and *in situ* conservation of red-crowned cranes (*Grus japonensis*) in China since 1976. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 45(6): 200–208.]
- 林远锋, 许鹏, 张文文, 等. 2021b. 我国动物园与自然保护区人工圈养丹顶鹤种群现状. *生态与农村环境学报*, 37(5): 668–673. [Lin Y F, Xu P, Zhang W W, et al. 2021. Status of red-crowned cranes (*Grus japonensis*) in captivity in zoos and nature reserves in China. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 37(5): 668–673.]
- 刘刚, 李皓, 吴自有, 等. 2021. 基于 DNA 条形码分析大鸨繁殖期动物性食物. *动物学杂志*, 56(3): 405–416. [Liu G, Li H, Wu Z Y, et al. 2021. Animal derived diet of Great Bustard in the breeding season based on DNA barcoding. *Chinese Journal of Zoology*, 56(3): 405–416.]
- 王喆, 闫利平, 鲁冠杰, 等. 2024. 基于非损伤取样法的林麝微卫星遗传多样性分析. *动物学杂志*, 59(3): 408–417. [Wang Z, Yan L P, Lu G J, et al. 2024. Microsatellite genetic diversity analysis of forest musk deer *Moschus berezovskii* based on noninvasive sampling technology. *Chinese Journal of Zoology*, 59(3): 408–417.]
- 邹红菲, 董海艳, 郑冬. 2007. 扎龙自然保护区丹顶鹤 3 个小群体遗传变异水平的比较. *东北林业大学学报*, 35(5): 57–60. [Zou H F, Dong H Y, Zheng D. 2007. Genetic variation level among three populations of the Red-crowned Crane in Zhalong National Nature Reserve. *Journal of Northeast Forestry University*, 35(5): 57–60.]