

白鹭脱落羽毛的微卫星个体识别研究

管 昊¹, 林清贤^{1,2}, 周晓平^{1,2*}, 方文珍^{1,2}, 陈小麟^{1,2*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 厦门大学 环境与生态学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 利用鹭科鸟类已有微卫星引物进行跨种扩增筛选, 获得 12 对可用于白鹭(*Egretta garzetta*)的微卫星引物, 结合非损伤采集的脱落羽毛样品, 在物种分子鉴定和性别分子鉴定的基础上, 建立适用于羽毛样品个体识别分析的微卫星基因分型技术体系. 在中国沿海的 3 个白鹭繁殖种群的 181 样品中, 19 个羽毛样品由于 DNA 质量较差未能有效鉴定物种. 119 个羽毛样品成功地鉴定为白鹭个体, 物种鉴定结果可重复率达 93.8%. 性别鉴定结果可重复率 94.1%, 119 个白鹭羽毛样品当中的 28.57% 为雄性. 基因分型得到各个位点的等位基因数 7~22 个, 观察杂合度和期望杂合度分别为 0.623~0.875 和 0.779~0.918, 没有位点偏离哈迪-温伯格平衡, 基因分型错误率为 1.2%. 个体识别分析发现其中的 2 个样品为相同基因型, 为重复采集自同一个体脱落的不同羽毛. 本研究结果将为深入研究白鹭种群遗传结构、扩散模式等保护遗传学问题奠定了基础, 并且能够为其他鹭科鸟类的脱落羽毛的物种鉴定、性别鉴定、个体识别提供参考.

关键词: 白鹭; 羽毛; 微卫星; 个体识别; 基因分型

中图分类号: Q 953; Q 959.7

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2013)05-0710-08

动物种群遗传学研究的关键之一就是每个个体进行个体识别, 建立个体标签库^[1]. 利用脱落羽毛、毛发或粪便等非损伤性采集的样品进行基因分型和个体识别, 不仅样品采集过程不会对动物造成伤害, 而且可简化采样过程, 有利于迅速收集到大量的样品, 因此在鸟类等不易捕捉动物的种群遗传研究中日益受到广泛应用^[2-4].

白鹭(*Egretta garzetta*)属于鸛形目(Ciconiiformes), 鹭科(Ardeidae), 鹭亚科(Ardeinae)的白鹭属(*Egretta*)^[5], 是广泛分布于全球各地淡水或咸水湿地的涉禽. 数十年来, 由于其对于生态环境的指示作用, 白鹭被广泛应用于生态毒理学、环境监测等方面的研究, 如 Chokri 等观测分析了白鹭在突尼斯 Sfax 盐沼地的营巢地址选择与繁殖成功率相关关系^[6]; Malic 等研究了白鹭羽毛在巴基斯坦不同地区中的多氯联苯醚含量及其影响^[7]. 对于白鹭繁殖生态学方面的研究也较多, 如在福建厦门、湖南花盐溪等地白鹭种群的繁

殖习性研究^[8-11]. 也有一些学者进行了白鹭遗传学方面的研究, 如江杉等研究了扩增性别基因片段的鹭类性别鉴定方法^[12], 林清贤等研究了包括白鹭在内的中国 6 种白色羽鹭科鸟类的分类系统归属^[13], Li 等研究了白鹭等鹭科鸟类的组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因特点^[14]. 近年来, 微卫星(microsatellite)标记逐渐被应用于鸟类种群遗传学研究. 微卫星是指基因组中由短的重复单元(一般为 1~6 个碱基)组成的 DNA 串联重复序列, 或称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)^[15]. 鹭科鸟类的微卫星标记研究报道如黄嘴白鹭(*Egretta eulophotes*)^[16-17]及棕颈鹭(*Egretta rufescens*)^[18-19]. 但是, 目前对于白鹭种群的遗传学研究方面如微卫星标记、个体识别、亲缘关系鉴定等尚处于空白阶段.

在野外, 白鹭经常和池鹭(*Ardeola bacchus*)、牛背鹭(*Bubulcus ibis*)、黄嘴白鹭、大白鹭(*Ardea alba*)等鹭科鸟类混群营巢^[20], 这些鹭类物种的白色羽毛在外形上难以区分. 另一方面, 世界上 50% 鸟类物种的雌雄外部形态是相似的, 这些物种很难通过外形特征区分不同性别^[21], 白鹭也是如此. 目前, 新兴的分子生物学技术, 如限制性片段长度多态性聚合酶链反应(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、多重 PCR 等分子生物学技术为物种鉴定和性别鉴定提供了准确的新方法^[22-23].

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970380, 31000963, 31272333); 福建省自然科学基金项目(2010Y2007, 2011J01247, 2012J01149); 河南省科技计划项目(102102110180)

* 通信作者: xpzhou@xmu.edu.cn, xlchen@xmu.edu.cn

针对前文所述问题,本研究利用在鹭科鸟类巢区内非损伤性采集的自然脱落白色羽毛,应用分子生物学技术对羽毛样本进行物种鉴定,并对鉴定为白鹭物种的羽毛样本进一步进行性别鉴定,然后,利用微卫星分型技术对白鹭物种的全部羽毛样本进行个体识别,由此建立白鹭脱落羽毛的物种鉴定、性别鉴定、个体识别的方法体系,为白鹭及其他鹭科鸟类的种群遗传结构、迁移模式、分子行为生态等保护遗传学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

肌肉组织样品:引物筛选所用的 20 个肌肉组织样品分别来自福建省厦门市(8 只白鹭雏鸟)、漳州市(7 只白鹭雏鸟)和泉州市(5 只白鹭雏鸟),20 只白鹭雏鸟均为 2008—2010 年白鹭繁殖期间的野外死亡个体。

羽毛组织样品:种群遗传研究所用的 181 支羽毛的组织样品分别来自广西防城港、福建厦门和浙江舟山的 3 个繁殖种群(表 1)。采样时间为 2009—2010 年的白鹭繁殖期,拾取白鹭自然脱落于巢下的整支白色飞羽,分别用塑料袋收纳密封,带回实验室-20℃保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

肌肉组织基因组提取参照周晓平等的酚-三氯甲烷抽提法^[24]。取 2 μL 在 1%(质量分数,下同)的琼脂糖凝胶电泳检测,使用 ND-1000 分光仪器测定其 OD 值和浓度,-20℃保存备用。

羽毛样品基因组提取参照 Rudnick 等的方法^[25]。将羽毛剪碎,加入裂解缓冲液、SDS 和蛋白酶 K 55℃过夜消化,用乙酸铵去除杂质,酚-三氯甲烷抽提,异丙醇沉淀 DNA,75%(体积分数)乙醇洗涤,TE 溶解后使用 ND-1000 分光仪器测定其 OD 值和浓度,-20℃

保存备用。

1.2.2 微卫星引物筛选

选取黄嘴白鹭^[16-17]和棕颈鹭^[18-19]多态性较高的 19 个 4~5 碱基微卫星位点的引物进行 PCR 筛选,PCR 反应体系为:1 μL PCR 缓冲液,1.2 μL dNTP 混合液(2.5 mmol/L),0.2 μL 正向引物(20 mol/L),0.2 μL 反向引物(20 mol/L),0.1 μL *Taq* 酶(5 U/L),0.4 μL 基因组 DNA,15.9 μL ddH₂O 94℃预变性 3 min,30 个循环:94℃30 s,退火 55℃30 s,72℃30 s;最后 72℃延伸 5 min。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,如果扩增出预期大小的单一条带,则进行 8%(质量分数,下同)聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染观察条带,对预期大小的条带进行回收纯化和克隆测序以确认其是否为目标微卫星序列。总计筛选得到 12 对较理想的微卫星引物(表 2)。

1.2.3 物种鉴定

白鹭在广西巫头村繁殖地与大白鹭、池鹭混群营巢^[20];在厦门猫屿,白鹭与池鹭混群营巢;在舟山馒头山,白鹭与黄嘴白鹭混群营巢^[26]。在采集的脱落羽毛中,为了准确地鉴别及挑选出白鹭物种的羽毛,本研究采取了多重 PCR 鉴定方法。

物种特异的多重 PCR 鉴定参考 Huang 的方法^[27],即用一组引物 ND6F、GluR 先后与引物 EER、EGR 组合,通过 2 次鉴定,达到区分黄嘴白鹭和白鹭的目的(表 3)。利用该方法,对浙江馒头山羽毛样品进行了鉴定;其余地点并无黄嘴白鹭的观测记录,则采用引物 ND6F、GluR 与 EGR 组合,区分白鹭与其他鹭科鸟类。所有扩增反应重复一次,在结果不确定的情况下重复 2 次。

1.2.4 性别鉴定

由于白鹭和黄嘴白鹭的 P2/P8 扩增序列保守区域高度一致^[28],本研究参照 Wang 和 Huang^[28-29]的方法,利用黄嘴白鹭性别鉴定的引物进行实验。引物 P8-n: 5'-ATGAGGAATTGTGCAAAACAG-3', ZW-n:

表 1 羽毛样品采集信息
Tab. 1 Information of feather sampling

采集地名	地理坐标	时间	羽毛样品数量/支
广西防城港巫头村(WTC)	21°31'00"N,108°00'30"E	2010	65
福建厦门猫屿(MY)	24°31'04"N,118°03'42"E	2009	59
浙江舟山馒头山(MTS)	30°13'57"N,121°53'50" E	2009	57

表 2 用于白鹭个体识别的微卫星引物序列

Tab.2 Sequences of microsatellite primers for the individual identification of little egret			
引物名称	来源物种	引物序列(5'-3')	基因库接收号
Ae01	<i>Egretta eulophotes</i>	F:CATCTTGCAGCCTCTAGCAACT R:AGTACACTTCTCCACCAGCAGC	FJ900138
Ae05	<i>E. eulophotes</i>	F:TGCCTTTTCAAATAGAACCCAAC R:TCGTATGCAACTGGGGAGATAG	FJ900140
Ae24	<i>E. eulophotes</i>	F:TGCTTTGAGAAGGAGAGTGCTG R:TTACCTGCAAACCAATTAAGCGT	FJ900143
Ae26	<i>E. eulophotes</i>	F:TACAGCTGGGTATTGGACCTGA R:AGAGGCCATTTTCAAAGAAGGTG	FJ900145
Ae36	<i>E. eulophotes</i>	F:TCTGAGTAAACAGGCAGTTGGG R:ATGGAACAAGCTGCACAACATC	FJ900150
Ae37	<i>E. eulophotes</i>	F:TGAGCAAGCCGTACTACAGCAA R:GGCTACTTTAAAGATGACACGGGA	FJ900151
Ae44	<i>E. eulophotes</i>	F:TACTGGGCTATGACCTCACTGG R:TGCAGCACTCCTTTCTCATCTT	FJ900154
Ae47	<i>E. eulophotes</i>	F:GATCAGGTCAGGCTGCAA R:GCAACCTCTAAGCAAGCAC	FJ900155
Ae51	<i>E. eulophotes</i>	F:GTTATCCCATGTGCAGGACCT R:CATCTCACTCAACTTGCGTTATAG	JF433926
Gatg	<i>E. eulophotes</i>	F:CCTGTAGGAGCCAAAAGCCTAAT R:TCCCTTACATTAAGGCCAACTCA	FJ900141
Er44	<i>Egretta. rufescens</i>	F:GAGGGCGAGAACTTGAGG R:CAAAGCAACAAAACATTTCAGC	HM368086
Er46	<i>E. rufescens</i>	F:AGGGAAAGAAAGAGAGGGAC R:TGCTACCACTTTGAAACAGAC	HM368083

表 3 物种分子鉴定所用引物

Tab.3 Primers used for the species molecular identification			
引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段大小/bp	引物特异性
ND6F	CCATAGTAAGGGGACGGATT		Common
GluR	AGCCAAGCAGGAAGTCTATG	101	Common
EER	AGGGAAGAGCATATGGATGTGTT	278	<i>E. eulophotes</i>
EGR	GGTTCATCGGAGAAGGGTATGTAG	302	<i>E. garzetta</i>

注:扩增片段大小是指所引物组合分别以 ND6F 为正向引物所扩增的结果.

5'-CACTTCCATTAAAGCTGATCTG-3', CHD-W 特异引物;5'-TAGGTGGGTGCCAGGTGT-3'.

230 bp 的 ZW 条带. 两条带相差较大,因而可以在琼脂糖凝胶电泳图直接鉴定性别(图 1).

经过反应及染色成像后,雌性有 230 和 136 bp 2 条带分别对应于 ZW 和 W 染色体,而雄性只有一条

1.2.5 基因分型

采用本研究筛选获得的 12 对引物,一共 12 个多

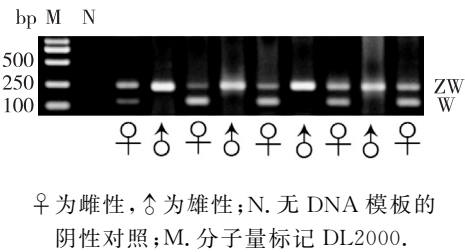


图 1 白鹭性别分子鉴定的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of sex molecular identification for *E. garzetta*

态微卫星位点(表 2)进行基因分型. PCR 反应体系为: 2 μ L PCR 缓冲液, 1.2 μ L dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L), 0.2 μ L 正向引物(20 mol/L), 0.2 μ L 反向引物(20 mol/L), 0.1 μ L *Taq* 酶(5 U/L), 1.5 μ L 羽毛提取的基因组 DNA, 14.8 μ L ddH₂O. PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 40 s(位点 Ae24 和 Ae44 的退火温度分别为 56 $^{\circ}$ C 和 55 $^{\circ}$ C, 其余位点的退火温度为 58 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min. 1.5% 琼脂糖胶电泳及 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染观察.

1.2.6 数据分析

等位基因数、种群平均等位基因数、观察杂合度、奈氏无偏差杂合度、期望杂合度和近交系数 FIS 使用 GenAlEx6.41 软件进行分析^[30]. 空等位基因、多态信息含量使用 CERVUS 3.0^[31] 软件进行分析, 哈迪-温伯格平衡和连锁不平衡使用 GENEPOP 4.0.7^[32] 软件进行检测, 条带和等位基因丢失使用 MICRO-CHECKER 2.2.3^[33] 软件进行检测.

个体识别使用 CERVUS 3.0^[31] 软件对基因型进行一致性鉴定. 对于基因型错配一个或两个位点的样品重新 PCR 和基因分型, 以排除基因分型错误和/或等位基因丢失所造成的影响. 同时也统计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 siblings, PID-sibs), 确保能够有效区分亲缘关系较近的个体.

2 结 果

在 181 个羽毛样品中, 19 个样品由于 DNA 质量较差, 未能有效鉴定物种. 162 个高质量 DNA 羽毛样品的物种鉴定结果表明, 119 个羽毛样品为白鹭物种, 占羽毛样品总数的 73.4%(表 4). 119 个羽毛样品当

中, 雄性占比 28.57%, 雌性占比 71.43%, 性别鉴定可重复性达到 94.1%.

表 4 羽毛样品的物种分子鉴定结果
Tab. 4 Species molecular identification results of feather samples

地点	时间	样品数	高质量 DNA 样品数	物种为白鹭的样品数
WTC	2010	65	57	38
MY	2009	59	51	43
MTS	2009	57	54	38

通过 MICRO-CHECKER 检测, 119 个白鹭样品的基因分型结果没有明显条带或等位基因丢失. 所有的位点在 3 个种群都有多态性. 总计等位基因数从 Ae01 或 Ae46 最低的 7 个到 Er46 最高的 22 个(表 5), 平均每个位点的等位基因数为 11.564. 观察杂合度范围从 Ae51 的 0.623 到 Ae24 的 0.875, 期望杂合度范围从 Ae47 的 0.779 到 Er46 的 0.918. 位点平均空等位基因频率从 Ae36 的 0.049 4 到 Ae05 的 0.128 4. 哈迪温伯格检验经 FDR 校正后, 在广西巫头村种群有 2 个位点 Ae05 和 Ae24 杂合不足($p < 0.01$); 在厦门猫屿种群有 2 个位点 Ae05 和 Er44 偏离平衡($p < 0.05$), Ae05 杂合不足; 在浙江馒头山有一个位点 Ae01 偏离平衡($p < 0.01$), 有 2 个位点 Ae01 和 Ae26 杂合不足. 3 个种群 12 个位点的全局检验均未偏离平衡($p > 0.05$).

在 3 个种群 12 个位点的连锁不平衡检测中, 有 17 对引物组合显示连锁(表 6). 在这些连锁的位点中, 只有 Ae01~Ae47、Ae24~Ae36、Ae36~Er46 出现了 2 次, 其余均为 1 次, 即仅在 1 个或 2 个种群出现, 所以可以认为这些位点在物理位置上是不连锁的. 12 个位点的平均每个反应基因分型的错误率是 0.012(范围: 0~0.02), 每个等位基因的错误率为 0.004 3(范围: 0~0.01).

在白鹭羽毛样品的个体识别中, 发现 1 对基因型完全一致的样品. 基因型一致的样品必然是来自同一个体, 因为这些个体在 12 个位点上基因型都一致的几率极低($PID = 6.41 \times 10^{-21}$, 单个位点值 0.011 1~0.091 0). 另外, 更为保守的同胞关系计算中, $PID-Sib = 4.4 \times 10^{-7}$, 表明即使同胞个体基因型一致的概率也是非常低的. 而且, 由于这 2 个基因型一致的羽毛样品采集于同一地点, 而且其性别相同, 因此, 可以推断这 2 个样品是重复采样自同一个体脱落的不同羽毛.

表 5 白鹭 12 个多态微卫星位点的特征

Tab. 5 Characterization of 12 microsatellite loci for *E. garzetta*

位点	重复序列	克隆片段大小/bp	等位基因数	H_0	H_E
Ae01	Imperfect ¹	229	7	0.667	0.793
Ae05	(CCAT) ₈	199	12	0.625	0.884
Ae24	(GATG) ₇ (GATA) ₈	257	9	0.875	0.844
Ae26	(GATG) ₁₃	246	11	0.677	0.839
Ae36	(TGGA) ₁₁	194	10	0.792	0.852
Ae37	(GTCT) ₅	137	13	0.75	0.866
Ae44	(GATG) ₁₅	228	14	0.627	0.889
Ae47	(GGAT) ₁₃	171	7	0.667	0.779
Ae51	(TGTC) ₅	275	11	0.623	0.843
Er44	(TATC) ₁₂ (CTAC) ₆	380	8	0.75	0.842
Er46	Imperfect ²	190	22	0.833	0.918
Gatg	(GGAT) ₁₁	132	8	0.667	0.859

注: H_0 . 观察杂合度, H_E . 期望杂合度; 1. (CTAT)₆(CTAC)₃T(TATC)₇; 2. (ATGG)₅... (ATGG)₄... (GGAT)₇... (GATG)₄(GGAT)₄AGATG(GGAT)₆.

表 6 各白鹭种群的连锁位点

Tab. 6 Linked alleles in three populations of *E. garzetta*

地名	连锁位点
WTC	Ae01~Ae47*, Ae24~Ae36*, Ae36~Ae37, Ae37~Ae51, Ae51~Er44
MY	Ae05~Er44, Ae24~Ae44, Ae26~Ae44, Ae36~Er46*, Ae37~Er44
MTS	Ae01~Ae47*, Ae05~Er46, Ae24~Ae36*, Ae24~Ae44, Ae26~Ae51, Ae36~Er46*, Ae37~Er46

注: * 为出现重复的连锁位点.

3 讨 论

3.1 物种鉴定

本研究利用物种特异的多重 PCR 鉴定法对脱落羽毛进行物种鉴定. 物种特异多重 PCR 鉴定方法只需设计物种特异的引物, 扩增出物种特异的 DNA 片段, 经简单的琼脂糖凝胶电泳成像即可进行物种鉴定, 具有快速、准确和经济的优点^[27]. 该方法通常是利用线粒体的某段基因, 如 Cyt b^[34], COI^[35] 和 16 S^[36] 等. 在线粒体基因当中, DNA 控制区是非编码基因, 具有较高的突变积累和种间变异, 近年来已被广泛应用于物种鉴定^[37-39]. 本实验针对自然脱落羽毛样品进行物种鉴定, 自然脱落羽毛的 DNA 不仅含量较少且质量较差, 因为羽毛从鸟类身体脱落后在环境中受雨水、温度、光照等影响, 导致脱落羽毛 DNA 发生降解^[40], 杂

质较多影响 PCR 反应效率^[41], 容易出现扩增失败或非特异性扩增的情况. 为提高扩增成功率、鉴定成功率及鉴定准确性, 本实验过程中的所有扩增反应都至少重复 1 次, 并且进行了重复鉴定, 对所有样品鉴定了 2 次, 对于部分结果不确定的样品鉴定了 3 次. 实验结果为: 扩增成功率达 89.5%, 物种鉴定结果可重复率(2 次鉴定结果一致比例)达 93.8%, 因此, 绝大部分脱落羽毛样品能够通过物种鉴定而用于后续的实验.

3.2 性别鉴定

性别鉴定是鸟类种群研究的基础工作, Wang 等建立分子生物学手段对鹭科鸟类 10 个物种(黄嘴白鹭、白鹭等)的血液及肌肉组织个体进行了准确的性别鉴定^[28], Huang 等进一步改进该方法以应用于非损伤性采集的粪便样品的性别检测, 鉴定结果可重复率达 97.7%^[29]. 本实验参照 Wang 和 Huang 的方法对白鹭脱落羽毛进行性别鉴定, 性别鉴定结果可重复率达

到94.1%,说明绝大部分脱落羽毛样品能够通过该方法的性别鉴定而用于后续的实验。羽毛性别鉴定可重复率也受脱落羽毛DNA含量较少且质量较差的影响,因此,和物种鉴定一样,性别鉴定过程也应当采取重复扩增和鉴定以提高性别鉴定可重复率。本实验检测到雌性的白鹭个体较多,推测是因为在白鹭巢下收集脱落羽毛样品时,采集到雌性个体的概率会更高。研究表明,在白鹭的孵化期,孵卵由双亲合作完成,但以雌鸟为主,雌鸟卧巢时,雄鸟在巢址附近保护或外出觅食^[8]。

3.3 个体识别

个体分子识别技术是分子生态学研究的基本实验手段。本研究采用非损伤性取样的遗传分析技术,利用12个微卫星位点对3个繁殖种群的118个白鹭个体进行了个体识别,所有位点都具较高多态性($PIC > 0.5$),基因分型错误率为1.2%,总体错误率相对较低^[42-43],因此,这些位点可用于白鹭的后续研究,如种群结构、扩散模式、亲缘鉴定等。本研究通过非损伤性采集自然脱落羽毛获取DNA,为白鹭种群遗传学研究的带来了便利,但是,样品当中可能出现重复采样自同一个体脱落的不同羽毛,即羽毛样品之间的基因型出现相互一致,发生这种情况时,对于基因型一致的羽毛样品可以再通过分析其采集地及性别的一致性加以排除。微卫星分型结果容易受到技术手段的影响^[44-45],近年来微卫星分型主要是采用银染法和荧光分型法两种方法^[46-48]。本研究中采用的是银染法(硝酸银染色法)。在分析材料和微卫星位点较少的情况下,银染法比荧光分型法经济,而且普通引物比荧光标记引物更适宜长期保存使用。今后,若研究需要对大批量的样品进行微卫星分型检测,则应采用荧光分型法以提高工作效率。

总之,本研究建立了一套应用于白鹭自然脱落羽毛非损伤性取样样品的物种鉴定、性别鉴定及个体识别的方法,能够有效地鉴定潜在一致或重复的基因型,甚至是鉴定同胞关系的个体,为今后深入开展白鹭种群遗传结构、扩散模式等保护遗传学研究提供了基础,并且为其他鹭科鸟类物种的相关研究提供了参考。

参考文献:

- [1] Gillespie J H. Population genetics: a concise guide[M]. New York: Johns Hopkins University Press, 2004: 174-187.
- [2] Perry G H, Marioni J C, Melsted P, et al. Genomic-scale capture and sequencing of endogenous DNA from feces[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(24): 5332-5344.
- [3] Rudnick J A, Katzner T E, Bragin E A, et al. A non-invasive genetic evaluation of population size, natal philopatry, and roosting behavior of non-breeding eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*) in central Asia[J]. Conservation Genetics, 2007, 9(3): 667-676.
- [4] Broquet T, Ménard N, Petit E. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates[J]. Conservation Genetics, 2007, 8(1): 249-260.
- [5] 陈小麟, 方文珍, 林清贤, 等. 福建省滨海湿地水鸟[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 67-93.
- [6] Chokri M A, Selmi S. Factors affecting colony size and reproductive success of little egret in the Sfax Salina, Tunisia[J]. Waterbirds, 2011, 34(2): 234-238.
- [7] Malik R N, Moeckel C, Jones K C, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in feathers of colonial waterbird species from Pakistan[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(10): 3044-3050.
- [8] 伍烈, 陈小麟, 胡慧娟, 等. 厦门白鹭自然保护区大屿岛鹭类繁殖的空间分布[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(4): 979-983.
- [9] 王博, 陈小麟, 林清贤, 等. 厦门鹭类集群营巢地分布及其生境特性的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(5): 734-737.
- [10] 韩庆, 梁瑜, 何超. 湖南花岩溪白鹭繁殖习性研究[J]. 四川动物, 2008, 27(4): 594-598.
- [11] 魏国安, 陈小麟, 胡慧娟, 等. 厦门鸡屿岛白鹭几种繁殖活动的观察[J]. 动物学研究, 2003, 24(5): 343-347.
- [12] 江杉, 陈小麟. 扩增性别基因片段的鹭类性别鉴定方法的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊): 152-155.
- [13] 林清贤, 周晓平, 方文珍, 等. 中国6种白色羽鹭科鸟类的系统归属研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2010, 49(1): 83-86.
- [14] Li L, Zhou X, Chen X. Characterization and evolution of MHC class II B genes in ardeid birds[J]. Journal of Molecular Evolution, 2011, 72(5): 474-483.
- [15] Goldstein D B, Linares A R, Cavalli-Sforza L L, et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci[J]. Genetics, 1995, 139(1): 463-471.
- [16] Dai Y, Zhou X, Fang W, et al. Development and cross-species transferability of twenty-three microsatellite markers from the vulnerable Chinese egret (*Egretta euphotes*) using 454 sequencing[J/OL]. Conservation Genetics Resources, 2013, [2013-04-25]. <http://link.springer.com/article/10.1007/S12686-013-9962-0>.
- [17] Huang X, Zhou X, Chen M, et al. Isolation and character-

- ization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*; Aves)[J]. Conservation Genetics, 2010, 11(3): 1211-1214.
- [18] Hill A, Green M C. Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the reddish egret, *Egretta rufescens* [J]. Conservation Genetics Resources, 2011, 3 (1): 13-15.
- [19] Hill A, Green C, Palacios E. Genetic diversity and population structure of North America's rarest heron, the reddish egret (*Egretta rufescens*)[J]. Conservation Genetics, 2011, 13(2): 535-543.
- [20] 叶芬, 黄乘明, 李汉华. 广西防城 7 种鹭类混群繁殖的空间生态位研究[J]. 四川动物, 2008(3): 31-36.
- [21] Ellegren H, Sheldon B C. New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds[J]. Trends in Ecology & Evolution, 1997, 12(7): 255-259.
- [22] Bataille M, Crainic K, Leterreux M, et al. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation[J]. Forensic Science International, 1999, 99(3): 165-170.
- [23] Dalmaso A, Fontanella E, Piatti P, et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs[J]. Molecular and Cellular Probes, 2004, 18 (2): 81-87.
- [24] 周晓平. 13 种鹭科 (Aves: Ardeidae) 鸟类系统关系及黄嘴白鹭遗传多样性的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008: 58-72.
- [25] Rudnick J A, Katzner T E, Bragin E A, et al. Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7 (5): 757-762.
- [26] 梁斌, 陈水华, 王忠德. 浙江五峙山列岛黄嘴白鹭的巢位选择研究[J]. 生物多样性, 2007, 15(1): 92-96.
- [27] Huang X, Zhou X, Lin Q, et al. A novel multiplex PCR assay for species identification in the Chinese egret (*Egretta eulophotes*) and little egret (*E. garzetta*)[J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4 (1): 31-33.
- [28] Wang Z, Zhou X, Lin Q, et al. New primers for sex identification in the Chinese egret and other ardeid species [J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11 (1): 176-179.
- [29] Huang X, Zhou X, Lin Q, et al. An efficient molecular sexing of the vulnerable Chinese egret from faeces samples[J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4 (2): 391-393.
- [30] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6 (1): 288-295.
- [31] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [32] Rousset F. genepop007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux[J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(1): 103-106.
- [33] van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M, et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 535-538.
- [34] Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, et al. Species identification by means of the cytochrome b gene[J]. International Journal of Legal Medicine, 2000, 114 (1): 23-28.
- [35] Wallman J F, Donnellan S C. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia[J]. Forensic Science International, 2001, 120(1): 60-67.
- [36] Crocetti G R, Hugenholtz P, Bond P L, et al. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1175-1182.
- [37] Hiss R, Norris D, Dietrich C, et al. Molecular taxonomy using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes[J]. Insect Molecular Biology, 1994, 3(3): 171-182.
- [38] Alcaide M, López L, Tanferna A, et al. Simultaneous analysis of multiple PCR amplicons enhances capillary SSCP discrimination of MHC alleles[J]. Electrophoresis, 2010, 31(8): 1353-1356.
- [39] 黄勋和. 基于微卫星技术研究的黄嘴白鹭种群遗传结构与扩散模式[D]. 厦门: 厦门大学, 2011: 78-92.
- [40] Isabel Miño C, Nassif Del Lama S. Molted feathers as a source of DNA for genetic studies in waterbird populations[J]. Waterbirds, 2009, 32(2): 322-329.
- [41] Segelbacher G. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples[J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(3): 367-369.
- [42] Hoffman J, Amos W. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion[J]. Molecular Ecology, 2005, 14 (2): 599-612.
- [43] Charmantier A, Reale D. How do misassigned paternities affect the estimation of heritability in the wild[J]. Mo-

lecular Ecology,2005,14(9):2839-2850.

[44] Cummings S M,Mcmullan M,Joyce D A,et al. Solutions for PCR,cloning and sequencing errors in population genetic analysis[J]. Conservation Genetics,2009,11(3):1095-1097.

[45] Pompanon F,Bonin A,Bellemain E,et al. Genotyping errors;causes,consequences and solutions[J]. Nature Reviews Genetics,2005,6(11):847-859.

[46] Creste S,Neto A T,Figueira A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2001,19(4):299-306.

[47] Yannic G,Sermier R,Aebischer A,et al. Description of microsatellite markers and genotyping performances using feathers and buccal swabs for the Ivory gull (*Pagophila eburnea*) [J]. Molecular Ecology Resources,2011,11(5):877-889.

[48] Luttikhuizen P C,Bol A,Witte H,et al. Novel and cross-species microsatellite markers for parentage analysis in Sanderling *Calidris alba* [J]. Journal of Ornithology,2011,152(3):807-810.

Microsatellite Individual Identification for Moulded Feathers in *Egretta garzetta*

GUAN Hao¹,LIN Qing-xian^{1,2},ZHOU Xiao-ping^{1,2*},FANG Wen-zhen^{1,2},CHEN Xiao-lin^{1,2*}
(1. School of Life Sciences,Xiamen University,2. Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems,College of the Environment & Ecology,Xiamen University,Xiamen 361102,China)

Abstract: Little egret(*Egretta garzetta*) is a worldwidely distributed waterbird which inhabits fresh or saline wetlands and recently is threatened by wetland degradation and loss. As egrets and herons mostly nest on canopy trees, and nestlings are often difficult to access for sampling, noninvasive collection of naturally molted feathers of these ardeid birds can provide an important source of DNA in conservation genetic analyses. However, the *E. garzetta* in a heronry were often mixed with cattle egret (*Bubulcus ibis*), Chinese pond-heron (*Ardeola bacchus*), great egret (*Ardea alba*) and Chinese egret (*Egretta eulophotes*), and the molted feathers of *E. garzetta* were difficult to distinguish from those of other colonial ardeid species due to their same white color, similar feather size and morphological appearance. Moreover, sex identification and individual identification of adult *E. garzetta* is difficult because adults are sexually monomorphic and similar in their exterior characteristics. Therefore, reliable species identification, sex identification and individual identification method of the molted feathers of *E. garzetta* through the molecular markers has become more urgent and valuable. Here, 12 microsatellite loci with high polymorphism were obtained for little egret by cross-species amplification, and microsatellite genotyping technique for individual identification of little egret molted feathers were established after the species identification and sex identification of these molted feathers. Among 181 molted feather samples from three breeding populations of *E. garzetta* along the coastline of China, 19 feather samples could not be identified for species because of their low DNA quality. 119 feather samples were successfully identified as the species of little egret and the repeat proportion of species identification was 93.8%. The repeat proportion of sex identification was 94.1% and 28.57% of 119 feather samples were identified as male. Basing on the genotyping, the number of alleles ranges from 7 to 22 per locus, and the observed and expected heterozygosity ranged from 0.623 to 0.875 and 0.779 to 0.918, respectively. No locus deviated significantly from Hardy-Weiberg equilibrium. The error rate of genotyping was 1.2%. In individual identification of molted feather, 2 samples shared the same genotypes, indicating that these two feathers were repeatedly collected from one individual. These results will provide a groundwork for further studies on the conservation genetics such as genetic structure and dispersal pattern of population in little egret, and give a reference for species identification, sex identification and individual identification of molted feathers in other ardeids.

Key words: *Egretta garzetta*; feather; microsatellite; individual identification; genotyping