

# 栗背短脚鸭的种群分化与遗传多样性

肖任之<sup>①②</sup> 邹发生<sup>②</sup> 刘志霄<sup>①\*</sup> 王峥臻<sup>②\*</sup>

① 吉首大学生物资源与环境科学学院 吉首 416000; ② 广东省科学院动物研究所,  
广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室 广州 510260

**摘要:** 栗背短脚鸭 (*Hemixos castanonotus*) 是我国南方山区常见的杂食性鸟类。为探明其遗传多样性及分化现状, 采用线粒体 *Cyt b* 基因和 7 个核基因非编码区片段作为分子标记, 对分布于广东、广西、海南、贵州和江西五省 (自治区) 的栗背短脚鸭 11 个地理种群进行了遗传分化及遗传多样性研究。基于所获得的 *Cyt b* 基因 866 bp 和 7 个核基因内含子序列 6 808 bp 进行分析。结果显示, 在 *Cyt b* 基因中, 共检测到 37 个单倍型, 共享单倍型占单倍型总数的 35.6%, 推测这些共享单倍型可能属于祖先单倍型。分子方差分析结果显示, 遗传变异主要来源于种群内部 (79.77%)。Tajima's *D* 和 Fu's *F<sub>s</sub>* 中性检验分析结果均支持栗背短脚鸭种群可能经历过种群扩张现象。基于 7 个核基因内含子联合序列的贝叶斯天际线 (BSP) 分析, 推断其种群在大约 5.3 ~ 3.7 百万年前 (Mya) 和约 0.7 ~ 0.3 百万年前 (Mya) 发生过扩张。基于 *Cyt b* 基因的贝叶斯系统发育分析, 11 个地理种群共分为两支, 一支为海南猴猕岭地理种群, 属指名亚种 (*H. c. castanonotus*), 其他 10 个地理种群聚为另一支, 属 *H. c. canipennis* 亚种, 并且后者尚未形成显著的地理结构, 单倍型网络图分析也获得相似的结果。本研究用分子数据基本支持两个亚种的分化, 对于存在争议的广西南部分布的指名亚种, 其分子数据与形态学亚种归属不一致, 有待更深入研究。

**关键词:** 栗背短脚鸭; 线粒体 *Cyt b* 基因; 核基因; 遗传多样性; 地理种群

**中图分类号:** Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 01-049-18

## Population Differentiation and Genetic Diversity of *Hemixos castanonotus*

XIAO Ren-Zhi<sup>①②</sup> ZOU Fa-Sheng<sup>②</sup> LIU Zhi-Xiao<sup>①\*</sup> WANG Zheng-Zhen<sup>②\*</sup>

① College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000;

② Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academic of Sciences, Guangzhou 510260, China

**Abstract: [Objectives]** This study aims to use molecular markers to investigate the genetic diversity and

**基金项目** 国家自然科学基金重点国际 (地区) 合作与交流项目 (No. 31961123003), 广东省动物志编制项目 (No. 202115) 及广州市科技计划项目 (No. 202103000065);

\* 通讯作者, E-mail: zxlou1965@163.com, wzhenzh@mail2.sysu.edu.cn;

**第一作者简介** 肖任之, 女, 硕士; 研究方向: 动物生态学; E-mail: 1900376813@qq.com.

收稿日期: 2022-12-14, 修回日期: 2023-09-13 DOI: 10.13859/j.cjz.202422319

differentiation of the Chestnut Bulbul (*Hemixos castanonotus*), an omnivorous bulbul commonly found in the southern mountains of China. **[Methods]** In this study, the mitochondrial Cytochrome *b* (Cyt *b*) gene and seven other nuclear gene intron fragments with a concatenated length of 6 808 bp were used as molecular markers to analyze 11 populations from Guangdong, Guangxi, Hainan, Guizhou, and Jiangxi Provinces. We calculated population estimates, built haplotype networks, performed Bayesian analysis, and inspected the correlation between geographic distance and genetic divergence among populations. **[Results]** Based on Cyt *b*, 37 haplotypes were detected, of which 35.6% were presumed to be ancestral. Analysis of molecular variance showed that genetic variation was mainly within populations (79.77%). The results of Tajima's *D* and Fu's *F<sub>s</sub>* neutral analysis supported *H. castanonotus* might have experienced population expansion (Appendix 1). The Bayesian Skyline Plot based on the nuclear genes suggested that *H. castanonotus* might have gone through population expansion between 5.3 to 3.7 Mya and 0.7 to 0.3 Mya (Fig. 5). Bayesian phylogenetic analysis of the Cyt *b* gene showed that the 11 geographic populations were divided into two clades (Fig. 2). The first clade contained only individuals from one population found in Hainan and are ascribed to *H. c. castanonotus*. The second clade contained individuals from the remaining 10 populations, no significant geographical structure was observed, and individuals in this clade are ascribed to *H. c. canipennis*. Haplotype network analysis also displayed similar results to the Bayesian phylogenetic analysis (Fig. 4). **[Conclusion]** Our findings suggest limited differentiation among *H. castanonotus* using the molecular markers studied, possibly due to insufficient isolation among populations or ancestral polymorphism in the markers. Further research is needed to better understand the demographic and evolutionary history of this species. This information is crucial to understand the underlying discrepancy between genetic and morphologic features in the avifauna evolution in southern China.

**Key words:** *Hemixos castanonotus*; Mitochondrial cytochrome *b*; Nuclear gene; Genetic diversity; Geographic population

栗背短脚鹎 (*Hemixos castanonotus*) 隶属于鸟纲 (Aves) 雀形目 (Passeriformes) 鹎科 (Pycnonotidae) 短脚鹎属 (郑光美 2017), 主要栖息于低山丘陵地区的次生阔叶林、林缘灌丛、稀树草坡灌丛, 鸣声清脆响亮, 常成对或成小群活动, 多以植物性食物为食, 也吃昆虫等动物性食物, 属于杂食性鸟类 (赵正阶 2001)。

关于该种的分类, Swinhoe (1870) 认为它是单型种, 郑宝赉 (1985) 认为它归属于灰短脚鹎 (*H. flavala*), 而郑作新 (2002) 则认为栗背短脚鹎是单型种, 另一亚种 (*H. c. canipennis*) 归属灰短脚鹎。当前, 栗背短脚鹎被普遍认为是独立种, 共两个亚种, 即分布于越南北部、海南岛及广西南部的指名亚种 (*H. c.*

*castanonotus*), 以及分布于我国河南南部、云南东南部、贵州、湖北、湖南、安徽、江西、上海、浙江、福建、广东、广西、香港和澳门等地的 *H. c. canipennis* 亚种 (赵正阶 2001, 郑光美 2017, Clements et al. 2021)。当前各名录主要不一致在于指名亚种在广西南部分布的有效性, 有学者认为指名亚种仅分布于海南岛 (赵正阶 2001, Clements et al. 2021, 刘阳等 2021), 另有学者认为其在广西南部也有分布 (周放 2011, 郑光美 2017), 这也是本研究试图解答的问题之一。

栗背短脚鹎两亚种在外形上的主要区别在于指名亚种的背部栗棕色, 覆羽和内侧飞羽具橄榄绿色羽缘; *canipennis* 亚种上体栗褐色、颜色较深, 覆羽和内侧飞羽具灰白色羽缘 (郑

宝贲 1985, 赵正阶 2001, 刘阳等 2021) (图 1)。栗背短脚鸭为广东、广西山区的优势种, 近年来有向北扩增的趋势(郑光美 2005, 2011, 2017, 刘阳等 2021), 关于该物种的研究, 大部分集中在野外生态考察, 如刘鹏(2018)对浙江天童国家森林公园的栗背短脚鸭的鸣声特征研究, 郑钟伟(2014)和孙仁杰(2007)对其生境选择与群落研究, Wu 等(2011)及吴玉春等(2013)虽以栗背短脚鸭为材料探讨了微卫星测序的可行性, 但对该种的种群分化和遗传多样性尚未研究。

栗背短脚鸭在不同的分布区域存在着较为显著的表型分化, 也是划分亚种的重要依据。本研究旨在通过广泛采样, 结合分子数据, 解析物种的种群遗传结构, 探究表型分化的群体历史背景, 探究亚种的分布区及划分与遗传分化的一致性。本研究基于线粒体 *Cyt b* 基因和 7 个核基因内含子序列对栗背短脚鸭 11 个地理种群的遗传分化及遗传多样性进行分析, 通过贝叶斯建树与分析、构建单倍型网络图以及相

关性检验, 解答上述科学问题, 为栗背短脚鸭的遗传多样性保护提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

于 2007 至 2015 年通过网捕法采集广东、广西、海南、贵州和江西五个省(自治区)的 11 个地理种群, 共 92 份栗背短脚鸭样本(表 1)。首先, 参考赵正阶(2001)对栗背短脚鸭亚种的形态描述, 对所采集样本的亚种类型进行初步判定。然后, 采集个体的肌肉或内脏组织 5~10 g 置于装有无水乙醇的无菌冻存管中, 带回实验室后于 -80 °C 冰箱中保存。

### 1.2 DNA 提取

取 10~25 mg 肌肉或内脏组织, 使用血液/组织基因组 DNA 提取试剂盒(凯杰企业管理上海有限公司)按说明书步骤提取栗背短脚鸭样本的总 DNA, 提取到的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测浓度及纯度, 后稀释分管并置于 -20 °C 冰箱保存。

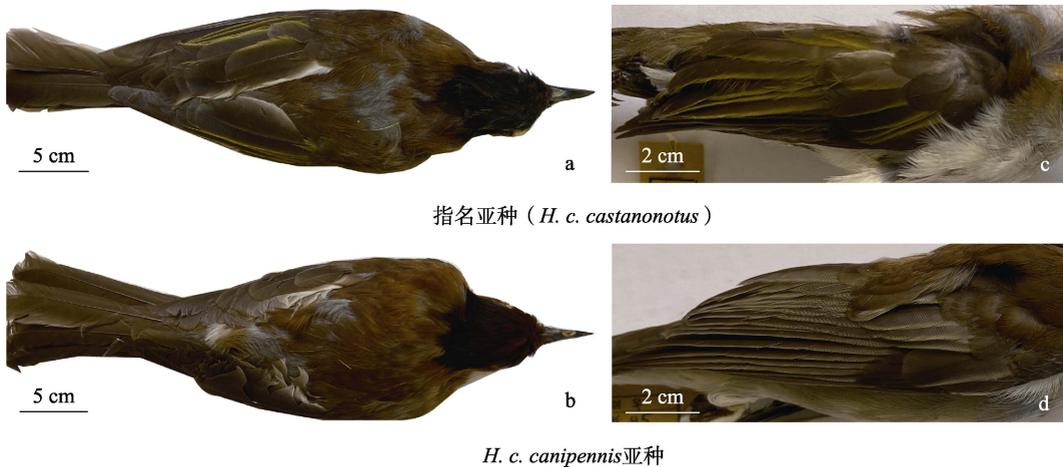


图 1 栗背短脚鸭两亚种的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of two subspecies of *Hemixos castanonotus*

a. 栗背短脚鸭指名亚种俯视图(标本编号: S06509); b. 栗背短脚鸭 *canipennis* 亚种俯视图(标本编号: S00128); c. 指名亚种羽翼局部图(次级飞羽具橄榄绿色羽缘); d. *canipennis* 亚种羽翼局部图(次级飞羽具灰白色羽缘)。

a. Top view of *H. c. castanonotus* (No. S06509); b. Top view of *H. c. canipennis* (No. S00128); c. Partial image of the wing of *H. c. castanonotus* (secondary flight feathers with olive green feather margins); d. Partial image of the wing of *H. c. canipennis* (secondary flight feathers with grayish white margins).

表 1 栗背短脚鹀不同地理种群样本采集信息

Table 1 Sampling information of different geographical populations of *Hemixos Castanonotus*

采样地 Location of sampling	经纬度 Longitude and Latitude	样本量 Number of sample (ind)	亚种 Subspecies
广东车八岭国家级自然保护区 Guangdong Chebaling National Nature Reserve	114°15'36" E 24°43'30" N	10	
广东南岭国家级自然保护区 Guangdong Nanling National Nature Reserve	112°55'58" E 24°44'08" N	13	
广东鼎湖山国家级自然保护区 Guangdong Dinghushan National Nature Reserve	112°32'16" E 23°10'04" N	11	
广东同乐大山省级自然保护区 Guangdong Tongle Mountain Provincial Nature Reserve	111°25'01" E 23°10'47" N	3	
广西来宾市金秀瑶族自治县 Jinxiu Yao Autonomous County, Laibin City, Guangxi	110°13'55" E 24°09'10" N	29	<i>canipennis</i> 亚种 <i>H. c. canipennis</i>
广西百色市那坡县 Napo County, Baise City, Guangxi	105°42'46" E 23°20'02" N	2	
广西南宁市江南区 Jiangnan District, Nanning City, Guangxi	108°23'49" E 22°47'09" N	11	
贵州茂兰国家级自然保护区 Guizhou Maolan National Nature Reserve	107°56'52" E 25°14'20" N	3	
江西岩泉国家森林公园 Jiangxi Yanquan National Forest Park	116°54'18" E 27°03'39" N	2	
广西防城港市防城区 Fangcheng District, Fangchenggang City, Guangxi	107°57'18" E 21°48'18" N	5	指名亚种
海南猴猕岭省级自然保护区 Hainan Houmiling Provincial Nature Reserve	108°58'48" E 18°53'34" N	3	<i>H. c. castanonotus</i>

### 1.3 引物设计与筛选

使用鸟类 *Cyt b* 基因扩增通用引物 *Cytb-L* 和 *Cytb-H* (表 2) (Amer et al. 2013) 扩增线粒体 *Cyt b* 基因。根据目标物种的近缘种红耳鹀 (*Pycnonotus jocosus*) 全基因组序列, 使用软件 Primer Premier 6.0 (<http://www.premierbiosoft.com/>) 基于其中内含子序列或基因间隔区序列设计核基因内含子扩增引物。核基因内含子扩增引物合成后以栗背短脚鹀 DNA 进行 PCR 反应。反应产物由广州天一辉远基因科技有限公司进行纯化及双向测序。

对测序结果用 DNASTar 5.0 软件包中的 SeqMan 程序检查序列质量, 筛选出能够得到多态性较高且稳定获得 PCR 条带的基因片段作为目标片段。共筛选出 7 对核基因非编码序列的扩增引物, 分别为 *Ano3* (氯离子通道蛋白 3, Anoctamin 3) 基因的 *ano3-1* 位点、*Bag3* (B 细胞淋巴瘤 2 结合抗凋亡蛋白, Bcl-2 associated athanogene) 基因的 *bag3-1* 位点、*Cog5* (保守

寡聚高尔基复合体亚基 5, conserved oligomeric Golgi complex subunit 5) 基因的 *cog5-1* 位点、*Tgfb2* (转化生长因子  $\beta$  受体 2, TGF-beta receptor type-2) 基因的 *tgfb2-2* 位点、*Fez2* (成束和延伸蛋白  $\zeta$  2, fasciculation and elongation protein zeta 2) 基因的 *fez2-3* 位点、*Macf1* (微管微丝交联因子 1, microtubule-actin cross-linking factor 1) 基因的 *macf1-5* 位点以及 *Tek* (受体酪氨酸激酶, receptor protein-tyrosine kinase) 基因的 *tek-2* 位点 (表 2)。

### 1.4 PCR 扩增和测序

PCR 反应总体系为 20  $\mu$ l, 包括 PCR Mix (北京康润诚业生物科技有限公司) 10  $\mu$ l, 上下游引物 (5  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ l, DNA 模板 1.0  $\mu$ l (1  $\mu$ mol/L), 无菌双蒸水补齐至 20  $\mu$ l。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 (温度依据引物而定) 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 确定 PCR 产物为目的

表 2 本研究用的引物信息

Table 2 Information of primers used in this study

位点 Locus	引物名称 Name of primer	引物序列 (5' - 3') Sequence of primer	退火温度 (°C) Annealing temperature	扩增片段长度 (bp) Product length
Cyt <i>b</i>	Cytb-L	TGATGAAACTT(C/T)GGATCCCT	53.3	979
	Cytb-H	GAGGCTAGTTGGCCAATGAT		
ano3-1	ano3-1F	GCCATTTCATGGTGATACTGT	53.4	914
	ano3-1R	CCTCTTAGAAGTCTGTGTTGA		
bag3-1	bag3-1F	AGAGATGAGTGTCCAGTCA	52.8	1 076
	bag3-1R	GGATGCTCAGTCAGAATGT		
cog5-1	cog5-1F	GCTCTGACTGGTAATAACCTA	52.7	1 475
	cog5-1R	GATGCCAGCCAAGTGATT		
tgfbr2-2	tgfbr2-2F	GACTCCACTTCAACCTCTG	54.3	1 026
	tgfbr2-2R	TCTTATGTCCATCCTGCTTAG		
fez2-3	fez2-3F	TGGCAGCCTTAGGTGTTA	53	1 081
	fez2-3R	GATACAACGAGACATCACATC		
macf1-5	macf1-5F	GGCTCGGATTTGGTTCTG	54.5	1 377
	macf1-5R	CACCTCCATCCTGTTCTCT		
tek-2	tek-2F	CTGCTGAACCTACAGAAGAT	52	1 008
	tek-2R	TGCCACAATCAAGGAACAT		

条带后, 送至广州天一辉远基因科技有限公司进行纯化及双向测序。

### 1.5 序列比对与分析

用 DNASTAR 5.0 软件包中的 SeqMan 程序对所得序列进行处理, 结合峰图进行人工校对, 以确保每一个位点准确。将序列通过 NCBI 的 Blast 进行比对分析, 验证所得的序列均为目的基因。使用 Mega 11 软件 (Tamura et al. 2021) 对基因序列进行多重序列比对与修剪, 使每个基因的片段集等长, 对修剪后的线粒体 Cyt *b* 基因进行蛋白质翻译检查, 确保蛋白质编码基因能正确翻译, 计算各基因序列的碱基组成、核苷酸最优替代模型和基于 Kimura 2-Parameter 模型 (Kimura 1980) 的群体间遗传距离。根据各种群的采样地经纬度以及基于 Cyt *b* 基因的种群间遗传距离, 运用 R 语言的 “geosphere” 包中的 “dism” 函数计算地理距离, 利用 “vegan” 包中的 “mantel” 函数检验栗背短脚鸭 11 个地理种群基于 Cyt *b* 基因的遗传距离与地理距离的相关性。

运用群体遗传分析软件 DnaSP v6 (Rozas et al. 2017) 的 PHASE 程序分离单倍型; 分析

多态性位点数 (singleton polymorphic sites,  $s$ )、单倍型数量 (number of haplotypes,  $h$ )、单倍型多样性 (haplotype diversity,  $H_d$ )、核苷酸多样性 (nucleotide diversity,  $\pi$ )、分离位点数 (Watterson's  $\theta_w$ ,  $\theta_w$ )、平均核苷酸差异 (average number of nucleotide differences,  $k$ )、中性检验 Tajima's  $D$  值 (Tajima 1989) 与 Fu's  $F_s$  值 (Fu 1997)。运用 Arlequin 3.5 软件 (Excoffier et al. 2010) 对 11 个群体数据进行分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)。

以绿翅短脚鸭 (*Ixos mcclllandii*)、灰短脚鸭 (*H. flavala*) 和白喉冠鸭 (*Alophoixus pallidus*) 为外群, 利用 BEAST 1.10.4 (Suchard et al. 2018) 软件包基于贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 分别构建基于线粒体 Cyt *b* 基因和基于 7 个核基因内含子联合序列的系统发育树, 马尔可夫链蒙特卡罗算法 (Monte Carlo Markov chain, MCMC) 迭代 1 000 万次, 每 1 000 次抽样一次, 单独重复运行 3 次, 通过 Tracer v1.7.2 (<http://beast.community/tracer>) 计算参数的有效样本大小 (effective sample size, ESS) 来评估收敛性, 确保所有指标参数都大

于 200。使用软件附带程序 TreeAnnotator v1.10.4 舍弃前 10%结果作为老化 (burn in = 0.1)，通过 FigTree v1.4.3 查看最大可信进化分枝 (maximum clade credibility, MCC) 树，使用贝叶斯后验概率 (posterior probability) 评估各节点的支持率。使用 BEAST v2.6.7 软件进行种群动态的贝叶斯天际线 (Bayesian skyline plot, BSP) 分析 (Stadler et al. 2013)，采用雀形目斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*) (Nam et al. 2010) 的核基因碱基替代速率 ( $2.21 \times 10^{-9}$  位点/年)，碱基替换模型选择 GTR 模型，伽马类别计数 (Gamma category count) 设为 4，选择溯祖贝叶斯天际线 (Coalescent Bayesian skyline) 模型，马尔科夫链的长度为 100 000 000；最后在 Tracer v1.7.2 软件中构图，设置最年轻采样种群时间 (age of youngest tip) 为 2 015，估算栗背短脚鹀种群的有效历史种群大小。利用软件 PopART (Leigh et al. 2015) 中的最小间距网状图 (minimum spanning networks, MSN) 方法构建单倍型网络图，对网络图进行人工调整。

## 2 结果

### 2.1 形态学鉴定

所采集的 11 个地理种群栗背短脚鹀的形态学判定结果为：海南猴猕岭种群和广西防城港种群属于指名亚种，而其余 9 个地理种群属

于 *canipennis* 亚种。

### 2.2 序列特征分析

92 份样本的 8 个目的基因扩增实验中，部分个体的个别基因无法得到单一且良好的序列结果，共获得线粒体 Cyt *b* 基因序列 90 条，GenBank 登录号 OQ603511 ~ OQ603600。外群绿翅短脚鹀 (OQ616946)、灰短脚鹀 (OQ616947) 和白喉冠鹀 (OQ616945) Cyt *b* 基因序列各 1 条。核基因内含子序列 ano3-1 87 条，bag3-1 78 条，cog5-1 80 条，tgfbr2-2 75 条，fez2-3 85 条，macf1-5 79 条，以及 tek-2 77 条。

经多重比对、剪切后最终获得栗背短脚鹀线粒体 Cyt *b* 基因及 7 个核基因内含子序列有效序列长度 7 674 bp (表 3)。核基因 macf1-5 内含子序列 A + T 含量与 G + C 含量基本相似，其余基因片段均存在明显 A/T 碱基偏向，其中 ano3-1 的 A + T 含量最高，达到 66.51%(表 3)。

### 2.3 遗传多样性分析

分析栗背短脚鹀 11 个地理种群的遗传多样性水平，在 Cyt *b* 基因的 90 条基因中，共检测到 37 个单倍型，多态性位点 44 个。其中，贵州茂兰国家级自然保护区种群的 3 个样本由于只有一个单倍型，无法计算遗传多样性指数；广西来宾市金秀瑶族自治县种群的单倍型多样性、核苷酸多样性、分离位点数和平均核苷酸差异均最高 (附录 1)。7 个核基因 (附录 2) 由于非编码区变异性强，序列完整度较线粒体

表 3 栗背短脚鹀的基因序列特征信息

Table 3 Genetic sequence characteristics of *Hemixos castanonotus*

位点 Locus	长度 Length (bp)	碱基含量 Base content (%)					
		T	C	A	G	A + T	G + C
Cyt <i>b</i>	866	23.25	33.85	28.12	14.78	51.37	48.63
ano3-1	802	31.66	15.94	34.86	17.55	66.51	33.49
bag3-1	657	32.66	19.36	25.67	22.31	58.33	41.67
cog5-1	1 342	30.85	17.47	34.40	17.29	65.25	34.75
tgfbr2-2	877	28.82	19.22	33.18	18.78	62.00	38.00
fez2-3	964	37.73	14.68	28.20	19.40	65.92	34.08
macf1-5	1 250	24.90	23.97	23.54	27.59	48.44	51.56
tek-2	916	33.22	17.88	29.97	18.93	63.19	36.81

Cyt *b* 基因低,使得个别地理种群中基因的遗传多样性指数无法计算。计算各地理种群的线粒体基因与核基因的核苷酸多样性平均值,广东鼎湖山国家级自然保护区种群最高(0.014 0),贵州茂兰国家级自然保护区种群最低(0.004 8);计算各地理种群的线粒体基因与核基因的单倍型多样性平均值,广西来宾市金秀瑶族自治县种群最高(0.955 6),广西防城港市防城区种群最低(0.786 0)。

## 2.4 系统发育分析

基于线粒体基因 Cyt *b* 的贝叶斯系统发育树中(图 2),包括外群灰短脚鸭在内的栗背短脚鸭种群分为两支(后验概率 = 1.00),一支为海南猴猕岭省级自然保护区种群及灰短脚鸭,其余 10 个地理种群交错混杂组成另一支,没有出现明显的地理结构和遗传谱系结构。大部分分支的后验概率不高,尤其是除海南猴猕岭省级自然保护区种群外的 10 个地理种群组成的次级分支中,大多后验概率都低于 0.1,说明这些种群间亲缘关系相近,系统发育分析无法明确定义他们之间的关系。广西防城港市防城区种群虽然根据表型鉴定为指名亚种,但在贝叶斯系统发育树中与其他 9 个地理种群聚类。

92 份栗背短脚鸭样本,共 31 份同时扩增出 7 个核基因内含子序列,将这 31 份样本的 7 个核基因内含子序列进行联合序列分析,基于 7 个核基因内含子联合序列分离单倍型后构建的贝叶斯系统发育树中(图 3),这 31 个栗背短脚鸭样本及外群样本灰短脚鸭聚为一支,各地理种群单倍型杂乱地构成许多小的分支,没有形成明显的地理种群结构,进一步表明栗背短脚鸭种群之间的分化不显著。

## 2.5 单倍型分析

11 个地理种群的 90 份栗背短脚鸭样本的线粒体 Cyt *b* 基因中,共检测到 37 个单倍型(Hap4~Hap40),以白喉冠鸭(Hap1)、绿翅短脚鸭(Hap2)和灰短脚鸭(Hap3)为外群,用 PopART 构建单倍型网络图,Hap9 处于网络

图的中心,是 8 个地理种群(广东车八岭国家级自然保护区、广东南岭国家级自然保护区、广东鼎湖山国家级自然保护区、广东同乐大山省级自然保护区、广西来宾市金秀瑶族自治县、广西南宁市江南区、贵州茂兰国家级自然保护区及广西防城港市防城区)的共享单倍型,占单倍型总数的 35.6%,其余单倍型以一步或者多步突变分别与主要的单倍型(Hap9)相连,呈现出明显的“星状”拓扑结构(图 4)。海南的 Hap35、Hap36 和 Hap37 这 3 个单倍型为单独的地理分支,其他 10 个不同种群的单倍型未呈现明显地理分支,没有表现出显著的地理系谱结构。7 个核基因内含子序列的地理种群单倍型网络图由于共享单倍型较少,网络结构复杂,均没有表现出显著的地理系谱结构。

## 2.6 种群间分化及遗传距离分析

基于栗背短脚鸭 Cyt *b* 基因的分子方差分析结果显示,种群内遗传变异水平占 79.77%,种群间遗传变异水平占 20.23%。用 Mega 11 软件计算 11 个地理种群间的遗传距离,为 0.000 226~0.007 360,海南猴猕岭省级自然保护区种群与广西来宾市金秀瑶族自治县种群的遗传距离最远,为 0.007 360,广西防城港市防城区种群与贵州茂兰国家级自然保护区种群之间的遗传距离最近,为 0.000 226。海南猴猕岭省级自然保护区种群与其他种群的遗传距离整体较远,都大于或等于 0.005 668。遗传距离分析表明,各地理种群之间的遗传距离都明显低于 2%,说明未产生种的分化,为同一物种,且除海南猴猕岭省级自然保护区种群之外,其余 10 个地理种群的遗传距离没有与地理距离显著相关( $P > 0.1$ ),没有形成明显的地理分布格局(表 4)。

## 2.7 种群历史扩张分析

各种群的中性检验值(Tajima's  $D$  值或 Fu's  $F_s$  值)见附录 1 及 2,除部分地理种群或由于采样不充分导致数值计算为正值外,该值整体呈负值,拒绝中性假设,推断栗背短脚鸭的种群数量曾发生过扩张。基于 7 个核基因

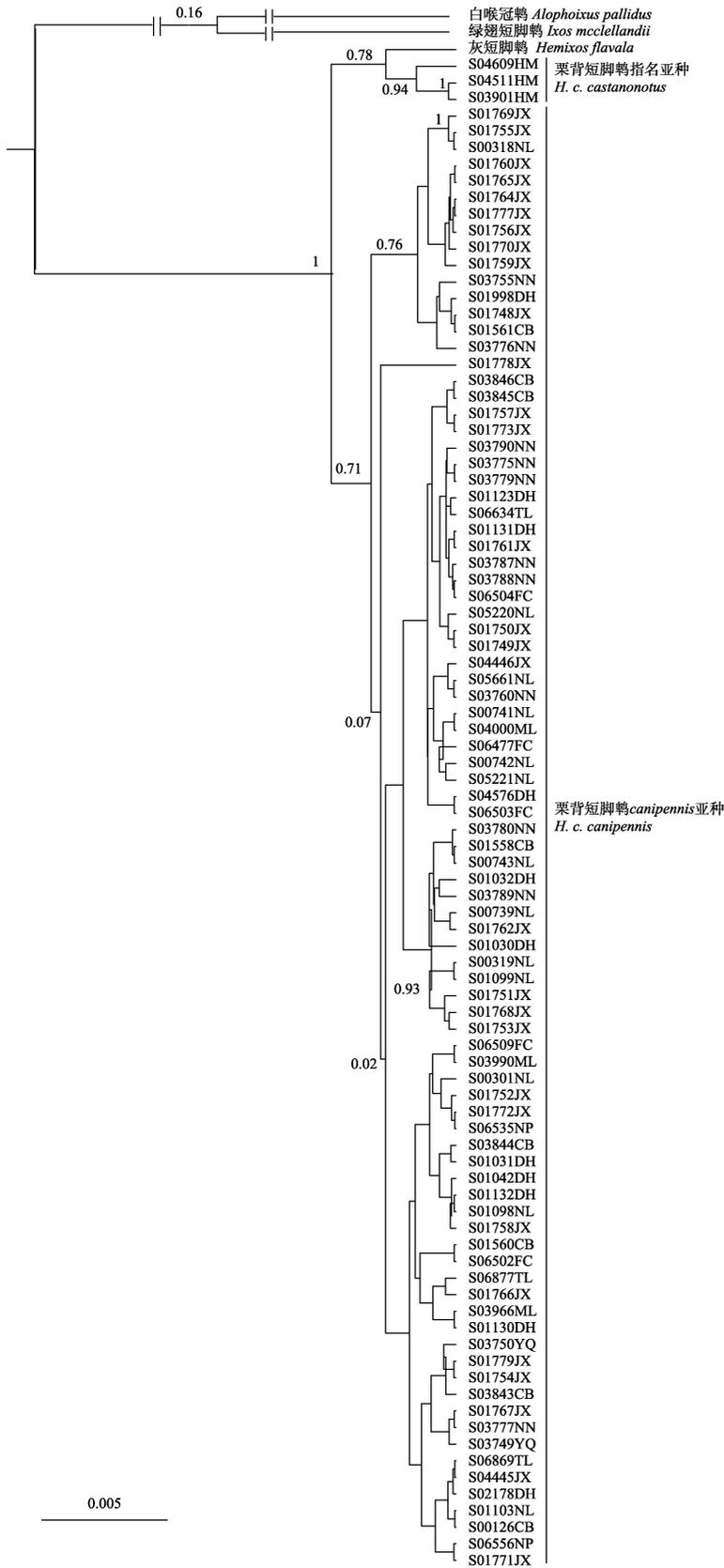


图 2 基于线粒体 Cyt b 基因的栗背短脚鸭贝叶斯系统发育树

Fig. 2 Bayesian phylogenetic tree of *Hemixos castanonotus* based on mitochondrial Cyt b gene

“S\*\*\*\*\*”表示样本编号，后两位字母表示种群，CB. 广东车八岭国家级自然保护区；NL. 广东南岭国家级自然保护区；DH. 广东鼎湖山国家级自然保护区；TL. 广东同乐大山区省级自然保护区；JX. 广西来宾市金秀瑶族自治县；NP. 广西百色市那坡县；NN. 广西南宁市江南区；ML. 贵州茂兰国家级自然保护区；YQ. 江西岩泉国家森林公园；FC. 广西防城港市防城区；HM. 海南猴猕岭省级自然保护区；分支上的数字为贝叶斯后验概率（P），仅显示  $P \geq 0.02$  的部分，标尺表示序列之间的差异度。

“S\*\*\*\*\*” denotes the sample number, the last two letters denote the population. CB. Guangdong Chebaling National Nature Reserve; NL. Guangdong Nanling National Nature Reserve; DH. Guangdong Dinghushan National Nature Reserve; TL. Guangdong Tongle Mountain Provincial Nature Reserve; JX. Jinxiu Yao Autonomous County, Laibin City, Guangxi; NP. Napo County, Baize City, Guangxi; NN. Jiannan District, Nanning City, Guangxi; ML. Guizhou Maolan National Nature Reserve; YQ. Jiangxi Yanquan National Forest Park; FC. Fangcheng District, Fangchenggang City, Guangxi; HM. Hainan Houming Provincial Nature Reserve. The number on the branch is Bayesian posterior probability, showing only the part of  $P \geq 0.02$ , and the scale indicates the difference between the sequence.



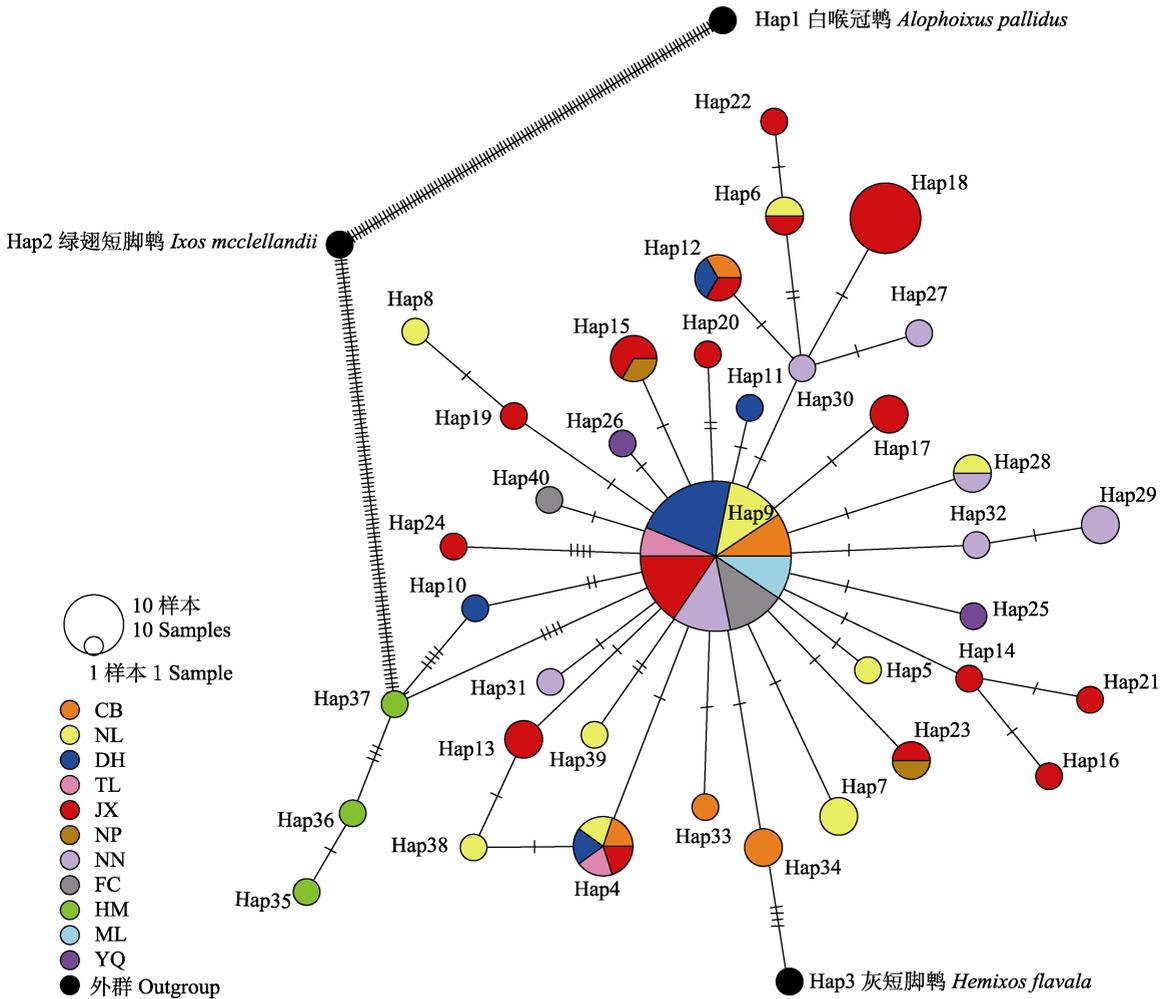


图 4 基于栗背短脚鸭 *Cyt b* 基因的单倍型网络图

Fig. 4 Haplotype network based on *Cyt b* gene of *Hemixos castanonotus*

“Hap”表示单倍型，其后的序号为单倍型的序号；连线上的竖线表示从一个单倍型到与其相连的单倍型需要经历的碱基替换数，一个竖线表示一个替换；英文字母为种群的简写代码，CB. 广东车八岭国家级自然保护区；NL. 广东南岭国家级自然保护区；DH. 广东鼎湖山国家级自然保护区；TL. 广东同乐大山省级自然保护区；JX. 广西来宾市金秀瑶族自治县；NP. 广西百色市那坡县；NN. 广西南宁市江南区；ML. 贵州茂兰国家级自然保护区；YQ. 江西岩泉国家森林公园；FC. 广西防城港市防城区；HM. 海南猴猕岭省级自然保护区。

“Hap” indicates the haplotype, subsequent numbers mean haplotype number. The vertical line on the line represents the number of base substitutions that need to be made from a haplotype to the haplotype connected to it, and one vertical line represents one substitution. The English letters are the shorthand codes for the population, CB. Guangdong Chebaling National Nature Reserve; NL. Guangdong Nanling National Nature Reserve; DH. Guangdong Dinghushan National Nature Reserve; TL. Guangdong Tongle Mountain Provincial Nature Reserve; JX. Jinxiu Yao Autonomous County, Laibin City, Guangxi; NP. Napo County, Baise City, Guangxi; NN. Jiangnan District, Nanning City, Guangxi; ML. Guizhou Maolan National Nature Reserve; YQ. Jiangxi Yanquan National Forest Park; FC. Fangcheng District, Fangchenggang City, Guangxi; HM. Hainan Houmiling Provincial Nature Reserve.

内含子联合序列的贝叶斯天际线分析估计种群扩张历史及有效种群大小，显示栗背短脚鸭种

群在大约 5.3 ~ 3.7 百万年前 (Mya) 和 0.7 ~ 0.3 百万年前 (Mya) 存在扩张现象 (图 5)。

表 4 基于栗背短脚鸭 *Cyt b* 基因的 11 个地理种群间遗传距离Table 4 Genetic distance among 11 geographic populations of *Hemixos castanonotus* based on *Cyt b* gene

	CB	NL	DH	TL	JX	NP	NN	ML	YQ	FC
NL	0.002 002									
DH	0.001 388	0.001 788								
TL	0.001 131	0.001 479	0.000 925							
JX	0.002 410	0.002 742	0.002 210	0.002 029						
NP	0.001 979	0.002 350	0.001 748	0.001 507	0.002 694					
NN	0.001 825	0.002 200	0.001 608	0.001 405	0.002 566	0.002 160				
ML	0.000 848	0.001 218	0.000 617	0.000 377	0.001 677	0.001 130	0.001 028			
YQ	0.001 979	0.002 350	0.001 748	0.001 507	0.002 811	0.002 262	0.002 160	0.001 130		
FC	0.001 074	0.001 444	0.000 843	0.000 603	0.001 904	0.001 356	0.001 254	0.000 260	0.001 356	
HM	0.006 523	0.006 896	0.006 221	0.006 048	0.007 360	0.006 809	0.006 705	0.005 668	0.006 809	0.005 896

表中英文字母为种群缩写代码, CB. 广东车八岭国家级自然保护区; NL. 广东南岭国家级自然保护区; DH. 广东鼎湖山国家级自然保护区; TL. 广东同乐大山省级自然保护区; JX. 广西来宾市金秀瑶族自治县; NP. 广西百色市那坡县; NN. 广西南宁市江南区; ML. 贵州茂兰国家级自然保护区; YQ. 江西岩泉国家森林公园; FC. 广西防城港市防城区; HM. 海南猴猕岭省级自然保护区。

The English letters in the table are shorthand codes for the population, CB. Guangdong Chebaling National Nature Reserve; NL. Guangdong Nanling National Nature Reserve; DH. Guangdong Dinghushan National Nature Reserve; TL. Guangdong Tongle Mountain Provincial Nature Reserve; JX. Jinxiu Yao Autonomous County, Laibin City, Guangxi; NP. Napo County, Baise City, Guangxi; NN. Jiangnan District, Nanning City, Guangxi; ML. Guizhou Maolan National Nature Reserve; YQ. Jiangxi Yanquan National Forest Park; FC. Fangcheng District, Fangchenggang City, Guangxi; HM. Hainan Houmiling Provincial Nature Reserve.

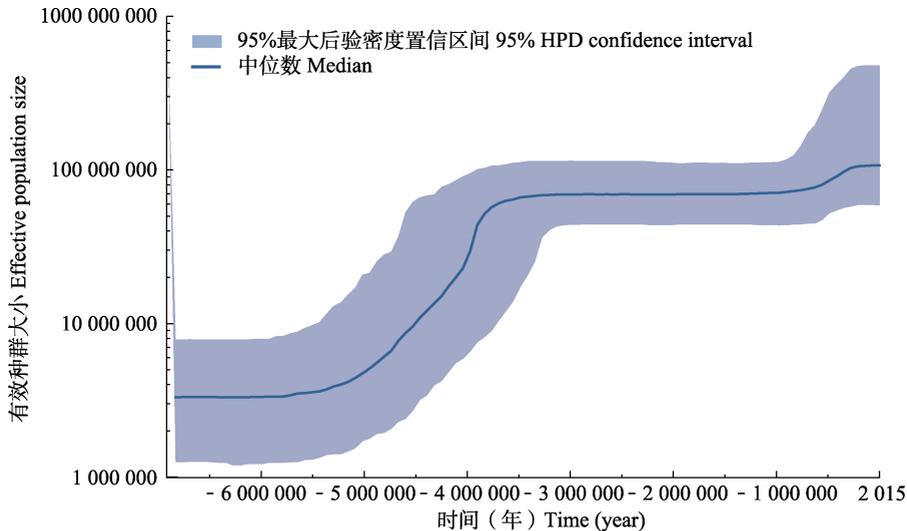


图 5 基于栗背短脚鸭 7 个核基因内含子联合序列的贝叶斯天际线分析

Fig. 5 Bayesian skyline analysis based on joint sequence of 7 nuclear gene introns of *Hemixos castanonotus*

### 3 讨论

#### 3.1 遗传多样性、遗传分化与遗传距离分析

遗传多样性是保护生物学的核心内容之一, 对遗传多样性的研究可以揭示物种或种

群的进化历史, 一个种群或物种遗传多样性越高、或遗传变异越丰富, 对环境变化的适应能力就越强(刘阳 2012)。单倍型多样性 ( $H_d$ ) 和核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 是评价群体多态性和遗传分化的重要指标, 单倍型多样性 ( $H_d$ ) 以 0.5

为临界值,分为低类别(0~0.5)和高类别(0.5~1.0)(Grant et al. 1998),核苷酸多样性( $\pi$ )可划分为高(0.008~0.010)、中(0.005~0.007)、低(0.001~0.004)3个类别(李斌强等 2022)。本研究中栗背短脚鸭 11 个地理种群 8 个基因具有高单倍型多样性( $H_d \geq 0.7860$ )和中等偏高的核苷酸多样性(0.0048  $\leq \pi \leq 0.0140$ ),表明栗背短脚鸭种群经历了长期积累遗传分化,具有较长的进化历史,遗传资源丰富。分子方差分析显示遗传变异主要来源于种群内部(79.77%),未能体现出较为明显的遗传分化。

遗传距离是用基因频率的函数表示的群体间的遗传差异,种群间遗传距离的范围是 0~0.05(王家玉 1983)。有研究表明,现东亚雀形目鸟类种内遗传距离大致(77.8%)在 0~0.02 之间(陈熙 2018),本研究的栗背短脚鸭 11 个地理种群之间的遗传距离都明显低于 0.02,说明未产生种的分化,为同一物种。海南猴猕岭的栗背短脚鸭种群与其他大陆种群的遗传距离最大(0.005 668~0.007 360),推测是由于大陆与海岛之间的阻隔使得二者间基因交流少以及海南岛独特而复杂的生境(雷富民等 2021)导致的,而大陆的 10 个地理种群之间遗传距离较小,且没有与地理距离呈正相关,推测这些地理种群之间存在不同程度的基因交流。

### 3.2 系统发育与亚种分化

基于样本外形特征,采集到的栗背短脚鸭广西防城港市防城区和海南猴猕岭省级自然保护区地理种群为指名亚种,支持栗背短脚鸭指名亚种在广西南部有分布的说法;但基于线粒体 Cyt *b* 基因的栗背短脚鸭贝叶斯系统发育和单倍型网络图均显示,海南猴猕岭地理种群形成了单独的分支,而剩余 10 个大陆地理种群之间并没有形成显著的谱系结构,表明广西多个地理种群采集到的栗背短脚鸭应都属于 *canipennis* 亚种。广西防城港市防城区种群具有类似于指名亚种表型,而线粒体基因型与华南其他群体相似,形态学分析和分子发育分析

的结果并不一致。这一现象可能由多重原因造成:(1)不完全谱系分选(incomplete lineage sorting, ILS)使得共同祖先的遗传多态性在快速物种形成事件中持续存在(Feng et al. 2022);

(2)由于海南岛与广西之间的直线距离较近,而栗背短脚鸭为飞行能力较好、个体较大的鸟类,可以通行,两个亚种间可能发生杂交,这在其他热带鸟类中也常见报道(Weir et al. 2015);(3)由选择导致的亚种分化下的表型趋同(Stern 2013),例如曾有研究报道东南白足鼠(*Peromyscus polionotus*)的多个岛屿亚种毛色趋同案例(Steiner et al. 2009)。

在基于线粒体基因与基于核基因内含子联合序列的发育树中,灰短脚鸭与栗背短脚鸭聚在一起,单倍型网络图也显示灰短脚鸭与栗背短脚鸭以较少的步数相接。吴玉春等(2013)基于线粒体 *ND2* 基因对栗背短脚鸭与灰短脚鸭类群的研究中,云南西双版纳的灰短脚鸭种群中个别个体兼具栗背短脚鸭和灰短脚鸭两个谱系的序列变异特征,这也体现了灰短脚鸭与栗背短脚鸭的亲缘关系相近。Birdtree(<https://birdtree.org/>)利用带指导树的放松分子树估计这两个物种的分化时间为 4.52 百万年前(Mya)(Jetz et al. 2012, 2014),与本研究基于栗背短脚鸭的贝叶斯天际线所估算的时间点较为接近,推测这两个物种可能在历史上存在过或现存有一定程度的基因流。另外,根据常用的 2% 原则(Lovette 2004),基于 Cyt *b* 基因栗背短脚鸭指名亚种与 *canipennis* 亚种间分化相当于 0.22 百万年前(Mya),稍晚于贝叶斯天际线所估算的第二次扩张时间。根据栗背短脚鸭与近缘种灰短脚鸭的系统发生关系(Shakya et al. 2017)与分布情况(Clements et al. 2021),推测栗背短脚鸭种群与灰短脚鸭分化后,由我国西南部向东扩散,之后在华南地区发生活跃的种群间迁移与混合,而上新世的气候变化(陆钧等 2006, Burke et al. 2018)和第四纪冰川运动(Hewitt 2000, 董路等 2011)或许对栗背短脚鸭种群的扩张发挥了某种程度上的作用。推

测在第四纪冰期变化中, 栗背短脚鹬再次发生扩张并扩散到海南岛。本研究通过种群遗传学方法掌握了栗背短脚鹬历史种群大小的动态与时间节点, 后续研究将继续探索该物种与亚种在这些历史时间节点发生扩散与广泛适应的生态学与分子机制, 展望华南森林鸟类在当下气候变化中的应对策略。

**致谢** 感谢广东省科学院动物研究所标本馆与中山大学生物博物馆为本研究提供了馆藏标本及相关信息。广东省科学院动物研究所鸟类生态与进化研究组的老师、同学及其他同志为本研究积累了许多标本和相关数据, 并予以多方面的支持与帮助, 感谢 Alexandra Ashley Grossi 博士协助英文摘要的修改, 谨此一并予以衷心感谢。

## 参 考 文 献

- Amer S A M, Ahmed M M, Shobrak M. 2013. Efficient newly designed primers for the amplification and sequencing of bird mitochondrial genomes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(3): 577–581.
- Burke K D, Williams J W, Chandler M A, et al. 2018. Pliocene and Eocene provide best analogs for near-future climates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(52): 13288–13293.
- Clements J F, Schulenberg T S, Iliff M J, et al. 2021. The eBird/Clements checklist of Birds of the World: v2021. [EB/OL]. [2022-10-05]. <https://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>.
- Excoffier L, Lischer H E L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564–567.
- Feng S H, Bai M, Rivas-González I, et al. 2022. Incomplete lineage sorting and phenotypic evolution in marsupials. *Cell*, 185(10): 1646–1660.
- Fu Y X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915–925.
- Grant W S, Bowen B W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity*, 89(5): 415–426.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789): 907–913.
- Jetz W, Thomas G H, Joy J B, et al. 2012. The global diversity of birds in space and time. *Nature*, 491(7424): 444–448.
- Jetz W, Thomas G H, Joy J B, et al. 2014. Global distribution and conservation of evolutionary distinctness in birds. *Current Biology*, 24(9): 919–930.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120.
- Leigh J W, Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116.
- Lovette I J. 2004. Mitochondrial dating and mixed support for the “2% rule” in birds. *The Auk*, 121(1): 1–6.
- Nam K, Mugal C, Nabholz B, et al. 2010. Molecular evolution of genes in avian genomes. *Genome Biology*, 11(6): 68.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J C, et al. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12): 3299–3302.
- Shakya S B, Sheldon F H. 2017. The phylogeny of the world’s bulbuls (Pycnonotidae) inferred using a supermatrix approach. *Ibis*, 159(3): 498–509.
- Stadler T, Kühnert D, Bonhoeffer S, et al. 2013. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1): 228–233.
- Steiner C C, Römler H, Boettger L M, et al. 2009. The genetic basis of phenotypic convergence in beach mice: Similar pigment patterns but different genes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(1): 35–45.
- Stern D L. 2013. The genetic causes of convergent evolution. *Nature Reviews Genetics*, 14(1): 751–764.
- Suchard M A, Lemey P, Baele G, et al. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus*

- Evolution, 4(1): 16.
- Swinhoe R. 1870. Zoological notes of a journey from Canton to Peking and Kalgan. *Proceedings of the Zoological Society*, 1870(2): 427–451.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Weir J T, Faccio M S, Pulido-Santaacruz P, et al. 2015. Hybridization in headwater regions, and the role of rivers as drivers of speciation in Amazonian birds. *Evolution*, 69(7): 1823–1834.
- Wu Y C, Zou F S, Yu D M, et al. 2011. Development and cross-amplification of 16 polymorphic microsatellite markers in the Chestnut Bulbul *Hemixos castanonotus*. *Conservation Genetics Resources*, 3(1): 99–101.
- 陈熙. 2018. 东亚雀形目鸟类 DNA 条形码研究. 昆明: 西南林业大学硕士学位论文, 1–2.
- 董路, 张雁云. 2011. 鸟类分子系统地理学研究进展. *生态学报*, 31(14): 4082–4093.
- 雷富民, 宋刚, 蔡天龙, 等. 2021. 中国鸟类生物地理学研究回顾与展望. *动物学杂志*, 56(2): 265–289.
- 李斌强, 詹昊峰, 何小涛, 等. 2022. 海南陂贵州雷公山小种群遗传多样性分析. *野生动物学报*, 43(2): 403–411.
- 刘鹏. 2018. 浙江天童国家森林公园栗背短脚鸭 (*Hemixos castanonotus*) 鸣声特征研究. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 6–76.
- 刘阳. 2012. 中华鳖形态、遗传与生长分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 1–6.
- 刘阳, 陈水华. 2021. 中国鸟类观察手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 356–357.
- 陆钧, 陈木宏. 2006. 新生代主要全球气候事件研究进展. *热带海洋学报*, 25(6): 72–79.
- 孙仁杰. 2007. 广西底定自然保护区鹎科鸟类群落研究. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 1–6.
- 王家玉. 1983. 分子群体遗传学与进化论. 北京: 中国农业出版社, 169–180.
- 吴玉春, 张燕华, 车先丽, 等. 2013. 栗背短脚鸭分类地位的初步研究 // 浙江省科学技术协会. 第十二届全国鸟类学术研讨会暨第十届海峡两岸鸟类学术研讨会论文集摘要集, 51.
- 赵正阶. 2001. 中国鸟类志. 长春: 吉林科学技术出版社, 114–115.
- 郑宝裘. 1985. 中国动物志: 鸟纲 第八卷 雀形目 (阔嘴鸟科和平鸟科). 北京: 科学出版社, 274–277.
- 郑光美. 2005. 中国鸟类分类与分布名录. 北京: 科学出版社, 181.
- 郑光美. 2011. 中国鸟类分类与分布名录. 2 版. 北京: 科学出版社, 188.
- 郑光美. 2017. 中国鸟类分类与分布名录. 3 版. 北京: 科学出版社, 237.
- 郑钟伟. 2014. 梅花山自然保护区秋季鸟类群落及鹎类生境分布. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 3–55.
- 郑作新. 2002. 中国鸟类系统检索. 3 版. 北京: 科学出版社, 159–160.
- 周放. 2011. 广西陆生脊椎动物分布名录. 北京: 中国林业出版社, 119.

附录 1 栗背短脚鸭各地理种群 Cyt b 基因 (886 bp) 遗传多样性指数

Appendix 1 Genetic diversity index of Cyt b gene (886 bp) in various geographical populations of *Hemixos castanonotus*

种群 Population	样本量 Number of sample (ind)	多态性位点数 Singleton polymorphic sites (s)	单倍型数量 Number of haplotypes (h)	单倍型多样性 Haplotype diversity ( $H_d$ )	核苷酸多样性 Nucleotide diversity ( $\pi$ )	分离位点数 Waterson's $\theta_w$ ( $\theta_w$ )	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide differences ( $k$ )	Tajima's $D$	Fu's $F_s$
广东车八岭国家级自然保护区 Guangdong Chebaling National Nature Reserve	8	5	5	0.800	0.001 50	0.001 70	1.333	- 0.379 44	- 0.705
广东南岭国家级自然保护区 Guangdong Nanling National Nature Reserve	13	12	9	0.874	0.002 28	0.003 55	2.018	- 1.206 04	- 2.495
广东鼎湖山国家级自然保护区 Guangdong Dinghushan National Nature Reserve	11	6	5	0.589	0.001 17	0.001 86	1.039	- 1.142 80	- 0.894
广东同乐大山省级自然保护区 Guangdong Tongle Mountain Provincial Nature Reserve	3	1	2	0.533	0.000 60	0.000 49	0.533	0.850 57	0.625
广西来宾市金秀瑶族自治县 Jinxiu Yao Autonomous County, Laibin City, Guangxi	29	21	16	0.900	0.002 88	0.005 12	2.555	- 1.369 89	- 5.654
广西百色市那坡县 Napo County, Baise City, Guangxi	2	2	2	0.667	0.001 50	0.001 23	1.333	1.893 06	1.530
广西南宁市江南区 Jiangnan District, Nanning City, Guangxi	11	6	7	0.831	0.001 76	0.001 86	1.558	- 0.164 72	- 1.793
贵州茂兰国家级自然保护区 Guizhou Maolan National Nature Reserve	3	—	1	—	—	—	—	—	—
江西岩泉国家森林公园 Jiangxi Yanquan National Forest Park	2	2	2	0.667	0.001 50	0.001 23	1.333	1.893 06	1.530
广西防城港市防城区 Fangcheng District, Fangchenggang City, Guangxi	5	1	2	0.356	0.000 40	0.000 40	0.356	0.014 99	0.417
海南猴猕岭省级自然保护区 Hainan Houmiling Provincial Nature Reserve	3	4	3	0.800	0.002 41	0.001 98	2.133	1.180 59	1.141
合计 Total	90	44	37	0.860	0.002 39	0.008 61	2.116	- 2.145 99	- 33.646

贵州茂兰国家级自然保护区种群的 3 个样本由于只有 1 个单倍型, 无法计算遗传多样性指数, 故用“—”表示。

Since there is only one haplotype in the 3 samples from Guizhou Maolan National Nature Reserve, the genetic diversity index cannot be calculated, so it is represented by “—”.

附录 2 栗背短脚鸭各地理种群 7 种核 DNA 内含子序列的遗传多样性指数

Appendix 2 Genetic diversity index of 7 intron fragments in each geographical population of *Hemixos castanonotus*

种群 Population	样本量 Number of sample	多态性位点数 Singleton polymorphic sites ( <i>s</i> )	单倍型数量 Number of haplotypes ( <i>h</i> )	单倍型多样性 Haplotype diversity ( $H_d$ )	核苷酸多样性 Nucleotide diversity ( $\pi$ )	分离位点数 Watterson's $\theta_w$ ( $\theta_w$ )	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide differences ( <i>k</i> )	Tajima's <i>D</i>	Fu's $F_s$
ano3-1 (802 bp)									
CB	10	13	10	0.905	0.005 40	0.004 57	4.332	0.660 55	- 1.358
NL	12	17	13	0.855	0.006 08	0.005 68	4.873	0.252 64	- 2.798
DH	9	10	9	0.706	0.003 24	0.003 63	2.601	- 0.379 08	- 2.628
TL	4	8	5	0.857	0.003 30	0.003 85	2.643	- 0.693 61	- 0.552
JX	29	27	30	0.854	0.004 87	0.007 27	3.904	- 1.066 31	- 20.708
NP	2	9	4	1.000	0.007 07	0.006 12	5.667	1.535 98	- 0.361
NN	11	13	9	0.784	0.003 48	0.004 45	2.792	- 0.768 71	- 1.723
ML	3	3	3	0.600	0.001 25	0.001 64	1.000	- 1.233 11	- 0.189
YQ	2	7	3	0.833	0.004 57	0.004 76	3.667	- 0.389 21	1.031
FC	5	13	7	0.911	0.005 82	0.005 73	4.667	0.070 66	- 0.904
HM	3	9	3	0.733	0.003 99	0.004 91	3.200	- 1.120 62	1.949
合计 Total	87	37	68	0.844	0.004 98	0.007 90	3.996	- 1.071 06	- 32.976
bag3-1 (657 bp)									
CB	7	31	12	0.978	0.013 43	0.011 48	8.824	- 0.529 80	- 3.083
NL	10	28	15	0.974	0.010 56	0.012 01	6.937	- 0.472 39	- 4.571
DH	9	31	13	0.967	0.014 69	0.013 72	9.654	0.024 98	- 1.739
TL	3	11	5	0.933	0.007 71	0.007 33	5.067	0.312 78	- 0.327
JX	29	83	39	0.987	0.018 40	0.027 29	12.093	- 1.212 43	- 14.421
NP	2	18	4	1.000	0.015 73	0.014 94	10.333	0.536 41	0.372
NN	8	29	14	0.983	0.011 38	0.013 30	7.475	- 0.716 51	- 5.376
ML	3	8	3	0.733	0.005 89	0.005 33	3.867	0.610 82	2.360
YQ	1	—	1	—	—	—	—	—	—
FC	5	19	10	1.000	0.011 47	0.010 22	7.533	0.308 27	- 4.370
HM	1	—	1	—	—	—	—	—	—
合计 Total	78	105	114	0.995	0.014 81	0.028 42	9.730	- 1.678 77	- 33.441
cog5-1 (1 342 bp)									
CB	10	35	16	0.963	0.006 27	0.007 35	8.411	- 0.583 42	- 4.879
NL	12	31	13	0.967	0.006 10	0.007 18	8.190	- 0.472 76	- 5.306
DH	10	35	18	0.989	0.005 85	0.007 35	7.853	- 0.896 00	- 8.926
TL	3	22	4	0.867	0.008 15	0.007 18	10.933	0.845 00	2.776
JX	25	56	38	0.989	0.006 58	0.009 32	8.833	- 1.019 37	- 23.219
NP	1	—	1	—	—	—	—	—	—
NN	9	26	16	0.987	0.005 19	0.005 63	6.967	- 0.311 56	- 7.715
ML	3	9	4	0.867	0.003 83	0.002 94	5.133	1.800 79	1.229
YQ	2	15	3	0.833	0.006 83	0.006 10	9.167	1.223 87	2.479
FC	3	12	3	0.733	0.004 62	0.003 92	6.200	1.093 32	3.500
HM	2	10	4	1.000	0.004 22	0.004 06	5.667	0.389 10	- 0.361
合计 Total	80	91	109	0.991	0.006 44	0.012 00	8.647	- 1.510 80	- 131.930

续附录 2

种群 Population	样本量 Number of sample	多态性 位点数 Singleton polymorphic sites (s)	单倍型 数量 Number of haplotypes (h)	单倍型 多样性 Haplotype diversity ( $H_d$ )	核苷酸 多样性 Nucleotide diversity ( $\pi$ )	分离位点数 Watterson's $\theta_w$ ( $\theta_w$ )	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide differences (k)	Tajima's $D$	Fu's $F_s$
tgfbr2-2 (877 bp)									
CB	8	50	8	0.908	0.020 79	0.017 18	18.233	0.693 49	4.825
NL	13	76	16	0.969	0.022 66	0.022 71	19.871	- 0.008 89	1.015
DH	6	136	7	0.924	0.053 89	0.051 35	47.258	- 0.041 89	7.949
TL	2	18	3	0.833	0.013 49	0.011 20	11.833	2.098 30	2.909
JX	27	93	29	0.976	0.020 91	0.023 27	18.335	- 0.423 69	- 1.452
NP	2	26	2	0.667	0.019 76	0.016 17	17.333	2.291 33	7.090
NN	6	50	7	0.924	0.018 78	0.018 88	16.470	- 0.024 19	3.462
ML	3	4	4	0.867	0.002 20	0.002 00	1.933	0.561 68	- 0.561
YQ	1	—	1	—	—	—	—	—	—
FC	5	34	5	0.667	0.012 34	0.013 70	10.822	- 0.480 41	3.923
HM	2	12	3	0.833	0.008 93	0.007 46	7.833	1.984 42	2.220
合计 Total	75	227	81	0.990	0.024 12	0.046 35	21.151	- 1.695 35	- 25.187
fez2-3 (964 bp)									
CB	10	49	17	0.979	0.013 44	0.014 33	12.958	- 0.248 54	- 3.988
NL	11	48	16	0.970	0.010 65	0.013 66	10.264	- 0.868 52	- 2.825
DH	11	57	20	0.991	0.011 92	0.016 22	11.494	- 1.151 24	- 7.934
TL	2	12	3	0.833	0.007 09	0.006 79	6.833	0.443 58	1.999
JX	27	76	49	0.997	0.011 60	0.017 30	11.184	- 1.209 76	- 33.126
NP	2	15	3	0.833	0.010 20	0.008 49	9.833	2.052 33	2.596
NN	10	57	16	0.979	0.015 45	0.016 67	14.895	- 0.359 85	- 2.189
ML	3	11	5	0.933	0.005 67	0.005 00	5.467	0.814 93	- 0.196
YQ	1	—	1	—	—	—	—	—	—
FC	5	25	9	0.978	0.011 43	0.009 17	11.022	1.177 11	- 1.401
HM	3	8	4	0.900	0.004 36	0.003 63	4.200	1.171 70	0.851
合计 Total	85	152	133	0.996	0.012 42	0.027 61	11.975	- 1.806 98	- 33.601
macf1-5 (1 250 bp)									
CB	10	68	18	0.989	0.010 70	0.015 33	13.374	- 1.311 86	- 5.360
NL	8	43	16	1.000	0.008 33	0.010 37	10.408	- 0.828 69	- 8.117
DH	8	34	13	0.967	0.007 95	0.008 20	9.933	- 0.127 27	- 2.619
TL	3	16	4	0.867	0.006 56	0.005 61	8.200	1.052 64	2.160
JX	26	85	48	0.996	0.009 23	0.015 05	11.535	- 1.411 62	- 39.905
NP	2	22	4	1.000	0.011 07	0.009 60	13.833	1.569 77	0.706
NN	9	64	14	0.974	0.013 03	0.014 89	16.288	- 0.573 99	- 0.941
ML	3	17	5	0.933	0.006 67	0.005 96	8.333	0.739 88	0.515
YQ	2	23	3	0.833	0.012 13	0.010 04	15.167	2.148 92	3.338
FC	5	26	10	1.000	0.007 25	0.007 35	9.067	- 0.064 34	- 3.774
HM	3	24	6	1.000	0.008 64	0.008 41	10.800	0.172 99	- 0.840
合计 Total	79	191	141	0.998	0.010 26	0.027 11	12.827	- 2.081 27	- 200.820

续附录 2

种群 Population	样本量 Number of sample	多态性 位点数 Singleton polymorphic sites (s)	单倍型 数量 Number of haplotypes (h)	单倍型 多样性 Haplotype diversity ( $H_d$ )	核苷酸 多样性 Nucleotide diversity ( $\pi$ )	分离位点数 Watterson's $\theta_w$ ( $\theta_w$ )	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide differences (k)	Tajima's $D$	Fu's $F_s$
tek-2 (916 bp)									
CB	9	34	12	0.941	0.011 88	0.010 79	10.882	0.281 39	- 0.450
NL	10	28	13	0.947	0.009 79	0.008 62	8.963	0.377 47	- 1.309
DH	9	38	9	0.876	0.013 29	0.012 06	12.176	0.301 06	2.611
TL	3	18	3	0.800	0.010 48	0.008 61	9.600	1.354 42	4.708
JX	24	52	19	0.946	0.013 64	0.012 79	12.494	- 0.034 48	0.822
NP	2	13	3	0.833	0.007 46	0.007 74	6.833	- 0.367 49	1.999
NN	8	44	9	0.933	0.012 65	0.014 48	11.592	- 0.691 71	1.732
ML	3	12	3	0.733	0.007 21	0.005 74	6.600	0.973 53	3.664
YQ	2	9	3	0.833	0.006 37	0.005 36	5.833	1.873 89	1.747
FC	4	7	4	0.643	0.002 11	0.002 95	1.929	- 1.359 29	0.081
HM	3	13	2	0.233	0.007 57	0.006 22	6.933	1.331 48	6.639
合计 Total	77	82	57	0.945	0.012 60	0.015 95	11.545	- 0.908 06	- 16.334

附录中种群的英文字母为简写代码, CB. 广东车八岭国家级自然保护区; NL. 广东南岭国家级自然保护区; DH. 广东鼎湖山国家级自然保护区; TL. 广东同乐大山区省级自然保护区; JX. 广西来宾市金秀瑶族自治县; NP. 广西百色市那坡县; NN. 广西南宁市江南区; ML. 贵州茂兰国家级自然保护区; YQ. 江西岩泉国家森林公园; FC. 广西防城港市防城区; HM. 海南猴猕岭省级自然保护区。个别基因的地理种群由于样本量较少无法计算遗传多样性指数, 用“—”表示。

The English letters of the populations in the appendix are shorthand codes, CB. Guangdong Chebaling National Nature Reserve; NL. Guangdong Nanling National Nature Reserve; DH. Guangdong Dinghushan National Nature Reserve; TL. Guangdong Tongle Mountain Provincial Nature Reserve; JX. Jinxiu Yao Autonomous County, Laibin City, Guangxi; NP. Napo County, Baise City, Guangxi; NN. Jiangnan District, Nanning City, Guangxi; ML. Guizhou Maolan National Nature Reserve; YQ. Jiangxi Yanquan National Forest Park; FC. Fangcheng District, Fangchenggang City, Guangxi; HM. Hainan Houmiling Provincial Nature Reserve. The geographical population of individual genes cannot calculate the genetic diversity index due to the small sample size, which is represented by “—”.