

利用 AFLP 技术分析丹顶鹤的亲缘关系

李淑玲^① 计子娟^② 王宇^②

(^① 东北农业大学成栋学院生物食品系 哈尔滨 150030; ^② 东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要:建立了丹顶鹤 (*Grus japonensis*) AFLP 分析体系,经筛选,利用 28 对选择性扩增引物构建了 5 对丹顶鹤 AFLP 亲缘关系分析图谱,共得到 1 114 个扩增条带,其中多态性条带 551 条,多态性比例为 49.5%。每个引物组合扩增的条带数为 20~66 条,其中,引物 E4M1 扩增的条带最多,为 66 条;引物 E6M1 扩增的条带数最少,为 20 条。经统计分析,计算了各样品间的相似性系数在 0.71~0.88 之间,得到 5 对丹顶鹤的遗传距离,并构建了 UPGMA 聚类图,结果 1 号与 2 号、3 号与 4 号鹤的亲缘关系较近,其余 3 对鹤(自然配对)亲缘关系较远。表明丹顶鹤具有识别亲缘关系的行为机制,丰富了丹顶鹤繁殖行为机制的研究内容,并为深入研究建立合理的散养丹顶鹤繁育体系提出了建议。

关键词:丹顶鹤;AFLP;亲缘关系

中图分类号:Q143 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)05-141-08

Analysis on Relationship of the Red-crowned Cranes by AFLP

LI Shu-Ling^① JI Zi-Juan^② WANG Yu^②

(^①Chengdong College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

^②College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract:The analytical system was constructed for the amplified fragment length polymorphism (AFLP) in Red-crowned Crane (*Grus japonensis*). The 5 couples of Red-crowned Crane were scanned by AFLP marker using the selective 28 primer combinations. The polymorphism and genetic cluster graph were acquired applying 10 individuals belonging to the 5 couples of Red-crowned Crane. A total of 551 polymorphism sites of the total of 1 114 bands were amplified from them. The percentage of polymorphism is 49.5%, each primer couples made 20-66 polymorphism sites. Primer E4M1 made the most, 66 polymorphism sites; and primer E6M1 made the least, 20 polymorphism sites. The similarity coefficient between the 10 Red-crowned Cranes was calculated, which were all in 0.71-0.88. The genetic distance and the UPGMA tree of 5 couples of Red-crowned Crane had been acquired. Cluster analysis showed that No. 1 had close relationship with No. 2; No. 3 had also very close relationship with No. 4; and the other 3 couple cranes had far genetic relationship. These showed that Red-crowned Crane has the behavioral mechanisms to identify the relationship. The study content about breeding behavioral mechanisms of Red-crowned Crane was more abundant, and puts forward some suggestions for studying deeply and founding reasonable breeding system for Semi-captive Red-crowned Crane population.

Key words:Red-crowned Crane (*Grus japonensis*); AFLP; Genetic relationship

基金项目 黑龙江省自然科学基金项目(No. C200921);

第一作者简介 李淑玲,女,教授,博士;研究方向:动物行为与繁殖生态;E-mail: hljshulingli@163.com。

收稿日期:2010-03-30,修回日期:2010-07-02

丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 属于鹤形目鹤科大型涉禽, 国家 I 级保护野生动物。近年来, 虽然丹顶鹤的数量有所增加, 但全球野生数量也仅在 2 700 只左右, 而中国有 1 500 多只^[1-2]。据调查统计, 丹顶鹤最大的繁殖地——扎龙保护区野生种群数量 2008 年仅为 286 只, 而且比 1996~2004 年的 400 只左右^[3]明显减少。因此广泛开展丹顶鹤生物学的研究, 对促进丹顶鹤的保护具有重要的意义。目前, 对丹顶鹤在行为学、生态学方面研究较多, 行为学研究主要集中在繁殖行为及行为节律的研究^[4-8], 生态学研究则较广泛, 如丹顶鹤的生境选择^[9-12]、迁徙^[13-14]及巢址的空间分布格局和巢域方面的研究^[15-16]。而在丹顶鹤繁殖群体的遗传结构和遗传分化等方面的研究较少。仅见于利用 SSR 分子标记^[17]对不同小鹤群遗传变异水平的比较。近年来, 由于 AFLP 标记具有 DNA 用量少、稳定性强、重复性好、多态性丰富等优点, 而被广泛运用于物种的遗传多样性、遗传图谱的构建、特征分子标记等研究^[18], 尤其对濒危物种的保护^[19]显得更加重要。为此, 本研究利用 AFLP 技术对已配对丹顶鹤进行亲缘关系分析, 探讨丹顶鹤繁殖行为机制的遗传基础, 以丰富丹顶鹤繁殖行为机制的研究内容, 为深入研

究丹顶鹤群体内的遗传机制, 调整散养及人工丹顶鹤种群的合理结构奠定理论基础。

1 实验与分析方法

1.1 样本的采集 羽毛样本采自扎龙自然保护区内的散养丹顶鹤, 即经人工繁殖驯化的个体, 自然散放, 采取定时定点人工投食的管理方式, 共有 11 对。由于其中部分鹤已经野化, 所以我们共观察到 7 对散养丹顶鹤, 并采集到其中的 5 对共 10 只的样本。其中 1、2 号和 3、4 号为人工配对的散养丹顶鹤, 5、6 号及 7、8 号和 9、10 号为自然选择配对的散养丹顶鹤。将 10 只鹤的羽毛分别装袋, 置于 -20℃ 保存。

1.2 实验方法 DNA 提取是利用羽毛根部的羽髓进行消化后, 采用酚-氯仿-异戊醇反复抽提的方法^[19]。AFLP 试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 操作方法参照其 *EcoR I / Mse I* 型的说明书, 根据实验的实际情况进行了改动和优化。采用 8 个 *EcoR I* 和 8 个 *Mse I* 选择性引物, 其 DNA 序列见表 1, 共 64 对引物组合进行筛选, 最后挑选出 28 对扩增条带较好的选择性引物组合进行扩增。选择性扩增产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后利用银染法检测^[20-21]。

表 1 AFLP 选择性扩增引物

Table 1 Primer for AFLP selective amplification

<i>EcoR I</i>		<i>Mse I</i>	
编号 No.	序列 Sequence	编号 No.	序列 Sequence
E1	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	M1	5'-GATGAGTCTGAGTAACAA-3'
E2	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'	M2	5'-GATGAGTCTGAGTAACAC-3'
E3	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	M3	5'-GATGAGTCTGAGTAACAG-3'
E4	5'-GACTGCGTACCAATTTCACT-3'	M4	5'-GATGAGTCTGAGTAACAT-3'
E5	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'	M5	5'-GATGAGTCTGAGTAACATA-3'
E6	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	M6	5'-GATGAGTCTGAGTAACATC-3'
E7	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'	M7	5'-GATGAGTCTGAGTAACATG-3'
E8	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'	M8	5'-GATGAGTCTGAGTAACATT-3'

1.3 数据统计与分析 将凝胶上的谱带进行整理和统计, 出现条带记为“1”, 不存在时记为“0”, 只统计清晰易辨的扩增带, 将整个分子标记图谱转化成“1”、“0”信息矩阵。利用

NTSYSpc-2.10e 软件提供的 Jaccard 系数来估计不同物种间的相似性系数, 并用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法对 10 个样品进行聚类分析, 通过 Tree plot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取与质量检测 采用酚-氯仿-异戊醇反复抽提方法制备的丹顶鹤基

因组 DNA ,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。所提取的 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 左右,浓度大于 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$,主带清楚,无降解拖尾,符合 AFLP 实验要求。

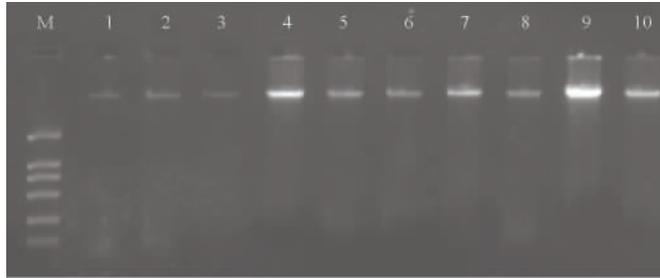


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 The result of DNA agarose gel electrophoresis

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1~10 为 10 只丹顶鹤个体。

M. DL2000 DNA marker; 1-10 denotes 10 Red-crowned Cranes.

2.2 酶切连接和预扩增 采用 *EcoR* I /*Mse* I 两种限制性内切酶对基因组 DNA 进行双酶切,再使用双链接头,即 *EcoR* I 接头 (5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3', 3'-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5') 和 *Mse* I 接头 (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3', 3'-TA CTC AGG ACT CAT-5') 与基因组 DNA 的酶切片段相连接,形成扩增反应的模板。利用 *EcoR* I 预扩增引物 (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3') 和 *Mse* I 预扩增引

物 (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3') 将预扩增产物进行预扩增,其体系的 PCR 反应参数为:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 80 s,25 个循环。预扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 2)。可看出预扩增产物条带呈弥散状(smear)分布,分子量大小在 250~750 bp 之间,能为选择性扩增提供理想模板。将预扩增产物稀释 20 倍作为选择性扩增模板。

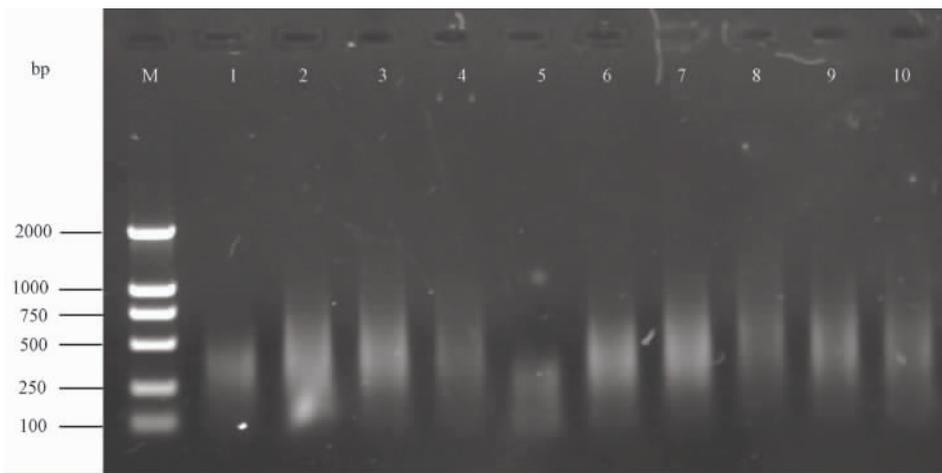


图 2 预扩增产物检测结果

Fig.2 The result of pre-amplification products

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1~10 为 10 只丹顶鹤个体。

M. DL2000 DNA marker; 1-10 denotes 10 Red-crowned Cranes.

2.3 选择性扩增反应体系及条件 选择性扩增反应体系的 PCR 反应参数为:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,65℃ 退火 30 s(每循环降低 0.7℃),72℃ 延伸 80 s,12 个循环;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 80 s,24 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min;4℃ 保存。该反应体系使用了降落 PCR(touch down PCR),针对 *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物序列筛选出最佳退火温度,获得了最佳扩增效果。使用鼎国 AFLP 试剂盒(*EcoR* I/*Mse* I 型),采用 25 μ l 的扩增体系,包括预扩增稀释样品 2 μ l、10 \times PCR buffer 2.5 μ l、dNTPs (10 mmol/L) 1 μ l、*EcoR* I 引物 (20 μ mol/L) 1 μ l、*Mse* I 引物 (20 μ mol/L) 1 μ l、*Taq* 酶 0.3 μ l、ddH₂O 17.2 μ l。

2.4 选择性扩增引物筛选和结果 将 *EcoR* I 和 *Mse* I 的 64 对引物进行筛选,筛选出多态性和清晰度较高的引物 28 对,然后利用这 28 对引物对 10 个丹顶鹤样本进行选择性的扩增,所有引物扩增的统计结果见表 3。共获得 1 114 条带,其中多态性条带 551 条,多态性比例为 49.5%。每个引物组合扩增的条带数为 20 ~ 66 条。引物 E4M1 扩增的条带最多,为 66 条;引物 E6M1 扩增的条带数最少,为 20 条。每个引物组合产生的多态性条带为 11 ~ 43 条,引物组合 E4M1 扩增的多态性条带最多,为 43 条;引物组合 E8M6 扩增的条带数最少,为 11 条。图 3、图 4 为引物 E1M3、E1M4 和引物 E1M2、E3M8 得到的丹顶鹤 AFLP 图谱。

表 3 28 对引物组合的扩增条带统计结果

Table 3 The amplification results of 28 primer combinations

名称 Name	引物组合 Primer combination	总条带数 Total bands number	多态性条带数 Polymorphic bands number	多态性百分比 Polymorphic percentage (%)
E1M1	E-AAC/M-CAA	50	12	24.00
E1M2	E-AAC/M-CAC	54	12	22.22
E1M3	E-AAC/M-CAG	62	28	45.16
E1M4	E-AAC/M-CAT	51	26	50.98
E1M5	E-AAC/M-CTA	54	38	70.37
E2M5	E-AAG/M-CTA	46	22	47.83
E2M6	E-AAG/M-CTC	35	21	60.00
E3M2	E-ACA/M-CAC	44	19	43.18
E3M3	E-ACA/M-CAG	29	12	41.38
E3M8	E-ACA/M-CTT	52	25	48.08
E4M1	E-ACT/M-CAA	66	43	65.15
E4M2	E-ACT/M-CAC	38	12	31.58
E4M3	E-ACT/M-CAG	30	14	46.67
E4M5	E-ACT/M-CTA	41	17	41.46
E4M6	E-ACT/M-CTC	34	20	58.82
E5M5	E-ACC/M-CTA	28	12	42.86
E5M6	E-ACC/M-CTC	27	13	48.15
E6M1	E-ACG/M-CAA	20	14	70.00
E6M2	E-ACG/M-CAC	34	30	88.24
E6M5	E-ACG/M-CTA	30	23	76.67
E6M8	E-ACG/M-CTT	24	19	79.17
E7M1	E-AGC/M-CAA	27	14	51.85
E7M2	E-AGC/M-CAC	28	17	60.71
E8M1	E-AGG/M-CAA	49	22	44.90
E8M2	E-AGG/M-CAC	37	15	40.54
E8M4	E-AGG/M-CAT	41	21	51.22
E8M5	E-AGG/M-CTA	47	19	40.43
E8M6	E-AGG/M-CTC	36	11	30.56

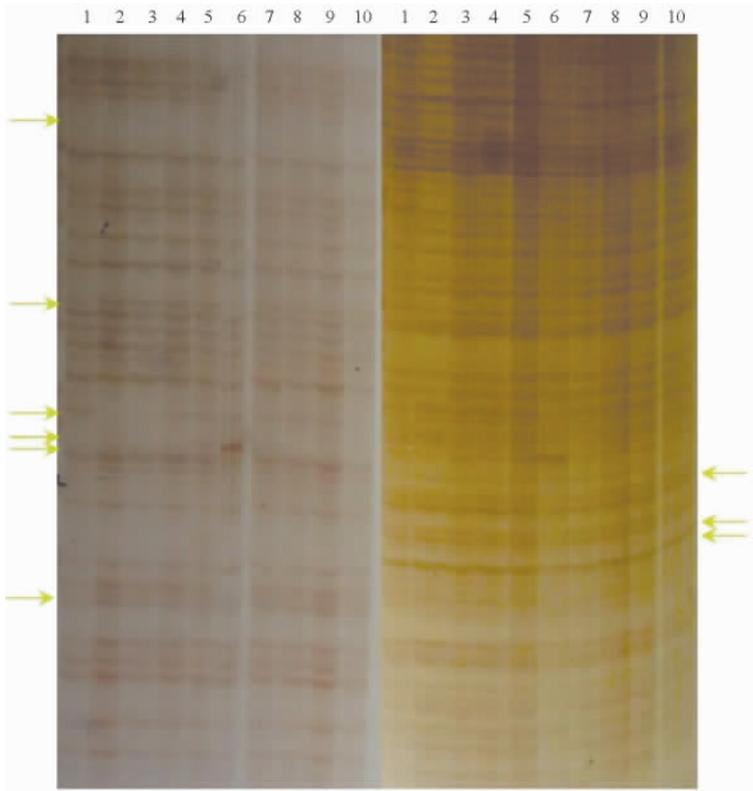


图3 引物 E1M3 和 E1M4 得到的 10 只丹顶鹤 AFLP 图谱

Fig. 3 The AFLP fingerprinting profile of the 10 Red-crowned Cranes with primer E1M3 and E1M4

左为引物 E1M3 AFLP 图谱; 右为引物 E1M4 AFLP 图谱; 箭头所示为扩增的差异片段; 1~10 为 10 只丹顶鹤个体。

Left is the AFLP fingerprinting profile of the 10 Red-crowned Cranes with primer E1M3; Right is the AFLP fingerprinting profile of the 10 Red-crowned Cranes with primer E1M4; The arrows express amplified differential fragments; 1 - 10 denotes 10 Red-crowned Cranes.

2.4 聚类分析 把选择性扩增的结果输入 NTSYSpc-2.10e 软件中计算了 10 只丹顶鹤的 Jaccard 相似性系数(表 4),并据此绘制聚类图(图 5)。10 只丹顶鹤间的遗传相似性系数在 0.71~0.88 之间,3 号与 4 号的相似性系数为 0.88,亲缘关系较近。1 号与 10 号的相似性系数为 0.71,亲缘关系较远。

3 讨论

利用 AFLP 分子标记,构建了丹顶鹤亲缘关系分析体系,共得到 1 114 个扩增条带,成功地对 5 对鹤的亲缘关系进行了鉴定。表明 AFLP 技术应用于丹顶鹤基因组分析可获得良好的效果。

经遗传相似系数及聚类分析,自然选择配

对的丹顶鹤遗传相似系数为 0.78~0.82,亲缘关系较远;人工组合配对的丹顶鹤遗传相似系数为 0.85~0.88,亲缘关系相对较近。表明丹顶鹤具有识别亲属、甚至远亲和近亲的行为机制,以达到较大的适合度,利于丹顶鹤的生存与发展。早在 19 世纪中叶,达尔文就认为亲本配子间存在差异,对生物个体的适应性是有利的。很多不同类群的动物都能够识别亲缘关系的远近,并表现出行为上的差异。如 Los Greenberg 于 1979 年研究的一种拉西洛苏小型蜂 (*Lasioglossum zephrum*)^[22],结果发现,防卫者让“入侵者”进入蜂巢内的可能性与它们之间的遗传关系有关,亲缘关系较近的比较容易接受,而亲缘关系较远的或毫无亲缘关系的则比较容易拒之巢外。鸟类也具有识别亲缘和

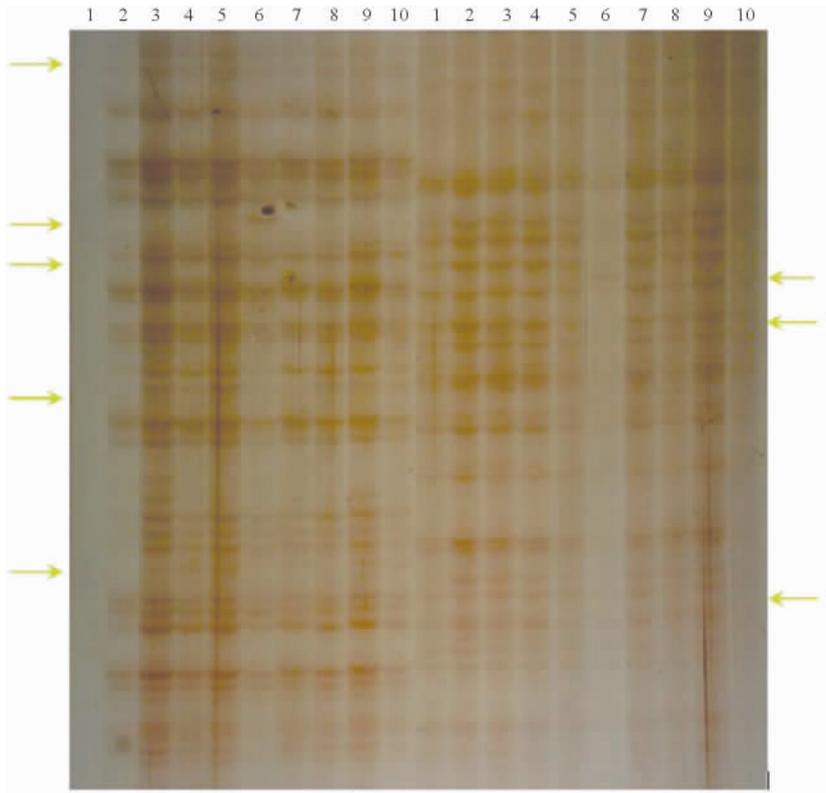


图 4 引物 E1M2 和 E3M8 得到的 10 只丹顶鹤 AFLP 图谱

Fig. 4 The AFLP fingerprinting profile of the 10 Red-crowned Cranes with primer E1M2 and E3M8
 左为引物 E1M2 的 AFLP 图谱; 右为引物 E3M8 的 AFLP 图谱; 箭头所示为扩增的差异片段; 1 ~ 10 为 10 只丹顶鹤个体。

Left is the AFLP fingerprinting profile of the 10 Red-crowned Cranes with primer E1M2; Right is the AFLP fingerprinting profile of the 10 Red-crowned Cranes with primer E3M8; The arrows express amplified differential fragments;

1 - 10 denotes 10 Red-crowned Cranes.

表 4 10 只丹顶鹤的相似性系数

Table 4 The similarity coefficient of 10 Red-crowned Cranes

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000 000 0									
2	0.853 987 7	1.000 000 0								
3	0.823 529 4	0.858 351 0	1.000 000 0							
4	0.804 780 9	0.837 398 4	0.880 313 2	1.000 000 0						
5	0.783 289 8	0.825 526 9	0.834 994 5	0.842 482 1	1.000 000 0					
6	0.756 756 8	0.778 436 0	0.768 799 1	0.738 351 3	0.776 137 8	1.000 000 0				
7	0.788 957 1	0.819 277 1	0.802 904 6	0.804 597 7	0.801 624 1	0.793 020 5	1.000 000 0			
8	0.777 636 6	0.796 875 0	0.806 553 9	0.814 064 4	0.801 176 5	0.751 798 6	0.823 863 6	1.000 000 0		
9	0.786 476 9	0.802 301 3	0.837 185 9	0.834 070 8	0.837 053 6	0.756 453 4	0.806 079 7	0.848 849 9	1.000 000 0	
10	0.716 755 3	0.744 755 2	0.749 718 2	0.749 360 6	0.755 784 1	0.725 609 8	0.762 589 9	0.805 243 4	0.779 326 4	1.000 000 0

防止近亲交配的本能,而且表现出不同的行为方式^[23],而丹顶鹤避免近亲交配的方式是,进入繁殖期后,将其幼鹤逐出繁殖领域。在自然

状态下,从未发现丹顶鹤同胞兄弟姐妹之间进行配对繁殖^[1]。张文东等^[24]在对灰叶猴(*Presbytis phayrei*)的研究中发现,在排卵时,本

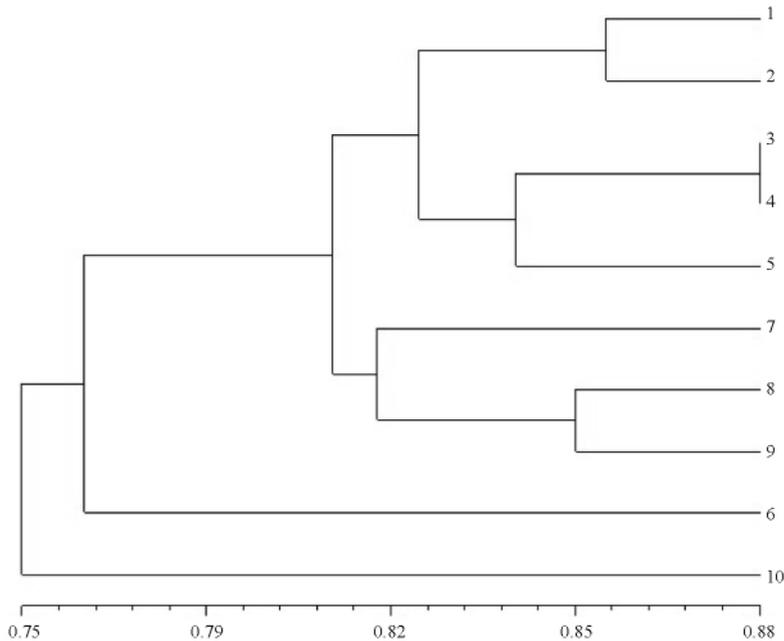


图 5 10 只丹顶鹤的聚类分析图

Fig. 5 The cluster analysis of 10 Red-crowned Cranes

1 ~ 10 为 10 只丹顶鹤个体。1 - 10 denotes 10 Red-crowned Cranes.

应愿意与雄性个体接近的雌猴,在亲缘关系近的雄猴旁边活动的机会却下降,表现出回避雄猴的倾向。在野外,后代的外迁可有效地避免近亲繁殖。但在人工饲养条件下后代个体难以外迁。在狭小的空间内,它在其排卵时减少在雄猴附近活动的机会,可能是一种适应性回避。丹顶鹤在性选择时,通过 4 个阶段鸣声特性进行配偶识别与选择^[4]。Klenova 等^[25]也确定了丹顶鹤的二重声具有配偶识别的作用,并进行了验证^[26]。

人工繁育的丹顶鹤通过人工驯化而散放,并逐渐适应野生生活,最终达到野化,是实现扩大野生丹顶鹤种群数量的有效途径之一。因此,建立合理的散养丹顶鹤的繁育体系尤为重要。基于本实验结果,自然选择配对的丹顶鹤更有利于优良基因的交流,以增加物种的遗传多样性,更有利于丹顶鹤种群的生存与发展。而散养丹顶鹤来源于人工繁育、驯化,由于习惯依赖于人工投喂,很难被野生异性选择为配偶;而且,人工繁育的优良的丹顶鹤必须经过驯化才能实现散放,最终达到野化,以有效地扩大野

生丹顶鹤种群数量,因此,建议每年进行人工繁育的鹤卵中要有一定比例的野生鹤卵,使人工繁育的优良丹顶鹤成熟后能够按照自然选择和遗传机制选择规律的要求选择配偶,有效地实现基因交流,形成优良的散养丹顶鹤繁育体系。至于多大的比例才能达到“一夫一妻”婚配体制的合理要求,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李淑玲. 丹顶鹤的行为与鸣声研究. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 2006, 1-2.
- [2] 董科, 吕士成, Terry H. 江苏盐城国家级珍禽自然保护区丹顶鹤的承载力. 生态学报, 2005, 25(10): 2608 - 2615.
- [3] 吴铁宇, 陈冰卓, 仇福臣, 等. 扎龙保护区野生丹顶鹤种群现状及保护对策. 黑龙江环境通报, 2008, 32(3): 6-7, 11.
- [4] 李淑玲, 包军, 王文峰, 等. 丹顶鹤性活动的声行为研究. 生态学报, 2004, 24(3): 503 - 509.
- [5] 计子娟, 李淑玲, 马建华, 等. 散养与野生丹顶鹤孵卵期行为比较. 动物学杂志, 2008, 43(6): 62 - 67.
- [6] 刘振生, 吴建平, 李晓民, 等. 扎龙自然保护区丹顶鹤繁殖期的个体行为. 东北林业大学学报, 2001, 29(6):

- 92 - 95.
- [7] 仇福臣,刘胜龙,蔡勇军. 散放丹顶鹤的繁殖行为. 东北林业大学学报, 2002, 30(6): 92 - 95.
- [8] 周晓禹,刘振生,吴建平,等. 丹顶鹤繁殖期行为时间分配及活动规律. 东北林业大学学报, 2002, 30(1): 60 - 62.
- [9] Zhang H H, Yang Y W. Winter habitat selection of Red-crowned Crane (*Grus japonensis*). *Journal of Forestry Research*, 2000, 11(1): 44 - 46.
- [10] 邹红菲,吴庆明,焦为屹. 扎龙保护区散养与野生丹顶鹤孵化期觅食生境选择比较. 东北林业大学学报, 2007, 35(11): 56 - 59.
- [11] 吕士成,孙明,高志东,等. 盐城国家级自然保护区人工湿地丹顶鹤的分布动态. *湿地科学*, 2006, 4(1): 58 - 62.
- [12] 舒莹,胡远满,冷文芳,等. 黄河三角洲丹顶鹤秋冬季生境选择机制. *生态学杂志*, 2006, 25(8): 954 - 958.
- [13] Higuchi H, Shibaev Y, Minton J, et al. Satellite tracking of the migration of the Red-crowned Crane *Grus japonensis*. *Ecological Research*, 1998, 13(3): 273 - 283.
- [14] 张爱忠,赵和生,李文发. 丹顶鹤的秋季迁徙. *野生动物*, 1995, 85(3): 17 - 18.
- [15] 秦喜文,张树清,李晓峰,等. 扎龙国家级自然保护区丹顶鹤巢址的空间分布格局分析. *湿地科学*, 2009, 7(2): 106 - 111.
- [16] 邹红菲,吴庆明. 扎龙自然保护区丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 巢的内分布型及巢域. *生态学报*, 2009, 29(4): 1710 - 1718.
- [17] 邹红菲,董海艳,郑冬. 扎龙自然保护区丹顶鹤 3 个小组体遗传变异水平的比较. 东北林业大学学报, 2007, 35(5): 57 - 60.
- [18] 徐建荣,韩晓磊,李宁,等. 福寿螺 3 个地理群体遗传多样性的 AFLP 分析. *生态学报*, 2009, 29(8): 4119 - 4126.
- [19] 郑冬,孔瑾. 从动物毛中提取 DNA 研究初探. *野生动物*, 1996, (2): 24 - 26.
- [20] 李升康,熊远著,邓昌彦. 应用分子标记 AFLP 建立不同猪种间遗传关系. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(4): 107 - 110.
- [21] 刘耘,熊家军,杨利国. 2 种方法银染的 AFLP 片段再扩增效果比较及改进. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 182 - 185.
- [22] Raghavendra G: 简素贞译. 合作与冲突: 动物社会的生存策略. 台北: 寰宇出版股份有限公司, 1999.
- [23] 尚玉昌. 动物行为学. 北京: 北京大学出版社, 2005, 189 - 225.
- [24] 张文东,江望高. 雌性竞争和亲缘关系对灰叶猴雌性后代活动的一些影响. *云南大学学报*, 2003, 25(增刊): 157 - 160.
- [25] Klenova A V, Volodin I A, Volodina E V. Duet structure provides information about pair identity in the Red-crowned Crane (*Grus japonensis*). *Journal of Ethology*, 2008, 26(3): 317 - 325.
- [26] Klenova A V, Volodin I A, Volodina E V. Examination of pair-duet stability to promote long-term monitoring of the endangered Red-crowned Crane (*Grus japonensis*). *Journal of Ethology*, 2009, 27(3): 401 - 406.