

基于分子粪便学的地栖鸟类物种多样性调查方法的建立与应用

杜飞飞^{①②} 王彬^⑤ 孟庆玉^③ 彭波^③ 胥池^④ 侯羨^{②*} 杨志松^④
詹祥江^② 李莉^{①*} 林蓁蓁^②

① 河南师范大学生命科学学院 新乡 453007; ② 中国科学院动物研究所动物生态与保护生物学院重点实验室 北京 100101;
③ 四川小寨子沟国家级自然保护区管理处 北川 622750; ④ 四川省大熊猫科学研究院 成都 610000; ⑤ 西华师范大学西南
野生动植物资源保护教育部重点实验室 南充 637009

摘要: 地栖鸟类的物种多样性是衡量陆地生态系统健康状况的重要指标, 对生物多样性保护策略的制定具有重要指导意义。然而, 由于地栖鸟类警觉性高且栖息地复杂, 传统的调查方法在野外调查中常因个体难以直接被观察而降低物种多样性评估的准确性。相比之下, 基于分子粪便学的调查方法无需直接观察动物个体, 仅通过粪便 DNA 分析即可实现准确的物种鉴定。然而, 目前学界尚无严格质控的分子粪便学调查流程, 限制了其相关应用。本研究以四川小寨子沟国家级自然保护区的鸡形目鸟类为对象, 旨在建立一套基于分子粪便学的地栖鸟类物种多样性调查方法。研究团队于 2021 至 2023 年基于样线法开展野外调查, 调查区域达保护区总面积的 27.7%, 调查区域植被类型以常绿阔叶林和常绿阔叶林为主, 海拔范围为 1 438 ~ 3 810 m。调查期间共采集鸟类粪便样本 116 份, 采用 *COI* 和 *Cyt b* 分子标记进行物种鉴定, 并从样品采集到数据分析进行全过程质控和流程优化。结果表明: 1) 粪便的新鲜程度与物种鉴定成功率之间存在显著的正相关关系; 2) 使用鸟类粪便 DNA 进行物种鉴定的最低浓度阈值为 3 mg/L; 3) *COI* 基因序列的种间遗传距离为种内遗传距离的 23 倍, 符合“10 × 规则”(即种间遗传距离达到种内遗传距离的 10 倍以上可用于物种鉴定), 且系统发育树显示所有物种均形成独立聚类, 表明该流程能够有效区分不同的鸟类物种; 4) 成功提取并鉴定 87 份粪便样本(成功率 75%), 识别出 10 种鸟类, 其中包括 6 种鸡形目鸟类。本研究系统分析了鸟类粪便新鲜程度与物种鉴定成功率的关系, 并综合多因素优化物种鉴定流程, 提高物种鉴定成功率。本研究构建的标准化分子粪便学调查方法, 为自然保护地核心区的鸟类多样性监测提供了技术支持, 并可用于生物多样性评估与保护管理。

关键词: 地栖鸟类; 分子粪便学; 物种多样性调查; 小寨子沟自然保护区

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 06-943-17

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2023YFF1304800), 四川小寨子沟国家级自然保护区 2019 年重点生态功能区转移支付资金科学研究项目 (No. 5107262020000124), 中国科学院国际伙伴计划项目 (No. 073GJHZ2023091GC);

* 通讯作者, E-mail: houxian@ioz.ac.cn, lizzie406@163.com;

第一作者简介 杜飞飞, 女, 硕士研究生; 研究方向: 进化遗传学; E-mail: dufeifei@ioz.ac.cn。

收稿日期: 2025-03-03, 修回日期: 2025-07-16 DOI: 10.13859/j.cjz.202525045 CSTR: 32109.14.cjz.25045

Development and Application of a Survey Method for Terrestrial Bird Species Diversity Based on Molecular Scatology

DU Fei-Fei^{①②} WANG Bin^⑤ MENG Qing-Yu^③ PENG Bo^③ XU Chi^④ HOU Xian^{②*}
YANG Zhi-Song^④ ZHAN Xiang-Jiang^② LI Li^{①*} LIN Zhen-Zhen^②

① College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007; ② Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; ③ Sichuan Xiaozhaizigou National Nature Reserve Administrative Bureau, Beichuan 622750; ④ Sichuan Academy of Giant Panda, Chengdu 610000; ⑤ Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education), China West Normal University, Nanchong 637009, China

Abstract: [Objectives] The species diversity of terrestrial birds serves as a crucial indicator for assessing terrestrial ecosystem health and holds significant implications for formulating biodiversity conservation strategies. However, due to the high vigilance of terrestrial birds and the complexity of their habitats, conventional species diversity survey methods often have low accuracy because individuals are difficult to be observed directly in field surveys. In contrast, the survey methods based on molecular scatology do not require direct sighting and allow accurate species identification through fecal DNA analysis. However, the lack of standardized and quality-controlled procedure limits its application in species diversity research. This study aims to establish a species diversity survey protocol for terrestrial birds based on molecular scatology, covering the entire process from fecal sample collection to data analysis. **[Methods]** This study focused on the birds of Galliformes in the Xiaozhaizigou National Nature Reserve, Sichuan Province. Field surveys were conducted from 2021 to 2023 via the line transect method, covering 27.7% of the total area of the reserve. The surveyed areas were predominantly evergreen coniferous and broad-leaved forests, with elevations ranging from 1 438 to 3 810 m (Fig. 1). During the survey period, a total of 116 avian fecal samples were collected. Species were identified based on the molecular markers *COI* and *Cyt b*. The species identification protocol was optimized by integrating several key steps to enhance the success rate of species identification. These steps included selecting the freshness of samples, extracting avian DNA, and determining the minimum DNA concentration threshold required for identification. The Cochran-Armitage trend test was employed to examine the correlation between fecal sample freshness and species identification success rate. **[Results]** 1) The success rate of species identification in fresh and semi-fresh avian fecal samples was high (fresh: 100%; semi-fresh: 84.4%), whereas that in the old samples significantly decreased to 45.8%. The Cochran-Armitage trend test revealed a positive correlation between fecal sample freshness and species identification success rate ($\chi^2 = 21.227$, $df = 1$, $P < 0.001$). 2) The minimum DNA concentration threshold for species identification using avian feces was 3 mg/L. DNA re-extraction is recommended in the case of the DNA concentration below this value. 3) The intraspecies genetic distances based on the *COI* gene sequence ranged from 0.001 7 for *Tragopan temminckii* to 0.012 7 for *Lophophorus lhuysii*, with a mean of 0.007 7. In contrast, the interspecies genetic distances varied from 0.125 (between *Tetraophasis obscurus* and *Pucrasia macrolopha*) to 0.250 (between *Chrysolophus pictus* and *Tragopan temminckii*), with an average of 0.177. The interspecies genetic distance was 23 times greater than the intraspecies genetic distance, meeting the “10 × rule”, which

states that an interspecies genetic distance greater than 10 times the intraspecies genetic distance can be used to differentiate species (Table 2). Furthermore, the phylogenetic analysis revealed that all species formed monophyletic groups, demonstrating that the established protocol can effectively distinguish bird species (Fig. 3). Ultimately, this study successfully identified 87 samples (75% success rate), encompassing 10 bird species, including 6 species of Galliformes (Table 1), and established a species diversity survey protocol based on avian molecular scatology (Fig. 4). **[Conclusion]** This study analyzes the relationship between the avian fecal freshness and species identification success rate, and optimizes the species identification protocol through a combination of multiple steps to improve identification success rate. The standardized survey protocol based on molecular scatology provides technical support for bird species diversity monitoring in nature reserves, and can be applied to biodiversity assessment and conservation management.

Key words: Terrestrial bird; Molecular scatology; Species diversity survey; Xiaozhaizigou National Nature Reserve

地栖鸟类 (terrestrial birds) 是指主要在地面活动的鸟类, 其觅食、活动、筑巢等行为主要依赖地面, 而非栖息于树木或空中飞行 (Del-Hoyo et al. 1994, Gill 1995)。典型的地栖鸟类常见于鸡形目 (Galliformes) 和鸨形目 (Otidiformes) 等类群, 它们能够适应多种栖息环境, 如草地、灌丛、湿地及林下等 (Voskamp et al. 2017)。为适应地面生活, 这些鸟类通常具备强健的腿部等形态特征, 而飞行能力相对较弱, 一般只进行短距离的飞行 (MacArthur 1971)。地栖鸟类对环境变化较为敏感, 其地理分布的变化是响应气候变化的重要指标之一 (La Sorte et al. 2014)。同时, 它们可作为生物指示物种, 用于监测环境污染 (Mansfield et al. 2024) 和评估陆地生态系统的健康状况 (Aghababayan 2024)。此外, 地栖鸟类还能够揭示人类农业活动对湿地生态的影响, 以及由此造成的湿地保护价值的损失 (Robledano et al. 2010)。由于气候变化和人类活动的影响, 全球多个地区地栖鸟类均处于分布区缩减和种群数量下降状态 (Dvorak et al. 2012, Shaw et al. 2016, Whitehead et al. 2018)。例如, 英国伯温特殊保护区的调查显示, 1983 至 2002 年间, 多种地栖鸟类数量大幅下降, 柳雷鸟 (*Lagopus lagopus*) 和黑琴鸡 (*Lyrurus tetrrix*) 分别减少 54% 和 78%, 栖息地缩小至原来的 62% 和 72%,

这些变化主要由栖息地退化和管理措施减少引起, 导致灌木林转为灌木丛和森林, 从而影响了鸟类的生存环境 (Warren et al. 2014)。因此, 准确掌握地栖鸟类物种多样性信息, 有助于快速识别受威胁物种、监测栖息地环境变化以及评估陆地生态系统健康, 从而为物种与栖息地保护提供科学依据, 并为应对气候变化提供支持 (Canterbury et al. 2000, Sutherland et al. 2004)。

常用的物种调查方法包括样线法、样点法、红外相机调查法和网捕法等 (李晟等 2014, Mere Roncal et al. 2019, 肖治术等 2019)。然而, 对于地栖鸟类的多样性调查, 这些方法均存在一定局限性。地栖鸟类具有较高的警觉性, 使用样线法和样点法时, 鸟类可能会因被惊扰而迅速逃离 (吴颢林等 2023)。红外相机调查法应用广泛, 在开阔生境具有良好的效果, 但在植被茂密的隐蔽生境中, 其拍摄效果可能受到植被遮挡的影响 (肖治术等 2019)。这些局限性不仅可能降低物种调查的准确性, 还可能影响地栖鸟类保护工作的效率。

基于 DNA 条形码的非损伤性取样法 (non-invasive genetic sampling) 为地栖鸟类物种多样性的精准调查提供了新的可能性 (Waits et al. 2005)。非损伤性取样是在不捕获、不触及甚至在未亲眼见到动物的情况下收集其遗留

物,例如粪便、食物残渣、脱落的羽毛和尿液等样品。通过从非损伤性样品中获得遗传信息并进行 DNA 条形码分析,可以实现物种的精准鉴定(Hebert et al. 2003, Taberlet et al. 2007)。在各种非损伤性样品中,粪便样品最易被发现和收集,不干扰动物且 DNA 含量较高,是非损伤性取样中最具有潜在价值的研究材料(单磊等 2018)。然而,鸟类粪便中含有尿酸盐等杂质,且 DNA 易降解,这些因素限制了其利用率。

与其他动物(如哺乳动物)不同,鸟类通过泄殖腔排泄,粪便通常伴随着尿液(Gill 1995),而尿酸盐的存在使得从鸟类粪便中提取 DNA 变得特别具有挑战性(Eriksson et al. 2017)。同时,尿酸盐作为强 PCR 抑制剂,严重干扰 PCR 反应,可能导致扩增失败(Segelbacher et al. 2001, Ramón-Laca et al. 2018)。此外,鸟类粪便中还含有尿素、多糖及胆盐等,这些物质不仅影响 DNA 提取效率,还会抑制 PCR 反应的特异性(Monteiro et al. 1997)。因此,目前从鸟类粪便中有效提取合格 DNA 样品仍面临较大挑战,基于鸟类粪便的物种多样性调查研究也较少。

利用鸟类粪便样本进行物种鉴定的另一个难题是缺乏鸟类粪便新鲜程度与物种鉴定成功率之间关系的研究。尽管粪便新鲜程度被认为是决定其 DNA 质量的关键因素之一(严丽君等 2023),但在野外研究中,采集到新鲜的粪便十分困难。粪便暴露在野外环境中, DNA 易受核酸酶作用而降解,且降解程度随时间的延长而加剧,进一步影响了 DNA 提取和 PCR 扩增效果(Frantzen et al. 1998)。在其他物种的研究中,已有一些关于粪便新鲜程度与 DNA 质量关系的研究。例如,在美洲黑熊(*Ursus americanus*)的研究中,已经建立了粪便新鲜程度与 DNA 提取质量以及后续分子生物学研究之间的关系体系(Owen-Ramos et al. 2022),这一研究为食肉目动物研究提供了宝贵的经验。然而,鸟类粪便的相关研究匮乏,研究人员在采集鸟类粪便样本时难以采取具有针对性

的策略,往往需全面采集以确保所有样本都能够被鉴定,这导致调查成本升高而且效率降低。因此,明确野外鸟类粪便新鲜程度与物种鉴定成功率之间的关系至关重要。

鸡形目鸟类是典型的地栖鸟类,体型较大且飞行能力较弱,易受捕猎和栖息地退化的威胁,多个物种已被列为重点保护动物(McGowan et al. 2012)。对鸡形目鸟类多样性进行调查,有助于了解其种群健康状况和栖息地偏好,从而为保护工作提供科学依据,具有重要的生态学和保护生物学意义(张正旺等 2003)。横断山脉是全球鸡形目鸟类重要分布区,也是中国鸡形目鸟类的特化和分化中心,该区域对于鸡形目鸟类的保护具有重要意义(Cai et al. 2018)。四川小寨子沟国家级自然保护区(以下简称“小寨子沟保护区”)位于横断山脉的岷山山系,具有显著的立体气候,植被类型多样且呈带状分布(罗辅燕 2005),生态系统在全球范围内具有突出的代表性和典型性。小寨子沟保护区特殊的地理位置、气候条件和丰富的植被类型为鸡形目鸟类提供了理想的生存和繁殖环境,孕育了丰富的珍稀、濒危、特有鸡形目鸟类(周友兵等 2004)。因此,本研究选择小寨子沟保护区的鸡形目鸟类作为研究对象,通过采集粪便样本,探索基于鸟类粪便的物种多样性调查流程。本研究旨在建立一套基于地栖鸟类分子粪便学的物种多样性调查方法,以提高自然保护区的地栖鸟类物种多样性监测能力,并推动鸟类粪便在鸟类监测与保护中的应用。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

小寨子沟保护区位于四川省绵阳市北川县(103°45'~104°05' E, 31°50'~33°10' N),地处横断山脉东坡,四川盆地西北缘,是全球生物多样性热点区(Myers et al. 2000)。该区属北亚热带湿润季风气候,海拔范围 1 160~4 769 m,地形复杂,植被垂直分布明显(陈光升等 2005)。

保护区始建于 1979 年, 2013 年升为以保护大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*)、川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 和中华扭角羚 (*Budorcas tibetanus*) 等珍稀濒危野生动物及森林生态系统为主的国家级自然保护区。此外, 小寨子沟保护区位于横断山区, 该区域是中国鸟类特有种的重要分布中心之一(雷富民等 2002)。

小寨子沟保护区的鸡形目鸟类资源丰富, 根据调查资料显示(周友兵等 2004), 该保护区共分布有 12 种鸡形目鸟类。其中, 国家一级重点保护野生动物 3 种: 斑尾榛鸡 (*Tetrastes sewerzowi*)、红喉雉鹑 (*Tetraophasis obscurus*) 和绿尾虹雉 (*Lophophorus lhuysii*); 国家二级重点保护野生动物 7 种: 雪鹑 (*Lerwa lerwa*)、

藏雪鸡 (*Tetraogallus tibetanus*)、血雉 (*Ithaginis cruentus*)、红腹角雉 (*Tragopan temminckii*)、勺鸡 (*Pucrasia macrolopha*)、红腹锦鸡 (*Chrysolophus pictus*) 和蓝马鸡 (*Crossoptilon auritum*); 此外还包括“三有”野生动物灰胸竹鸡 (*Bambusicola thoracica*) 和环颈雉 (*Phasianus colchicus*)。

1.2 样品采集与保存

调查人员利用 ArcGIS 10.7 将保护区划分为 195 个 $1 \text{ km} \times 1 \text{ km}$ 的网格作为调查单元, 结合海拔梯度、植被类型和历史分布信息进行分层抽样。调查队于 2021 年 9 至 12 月、2022 年 1 至 5 月和 2023 年 9 至 12 月共开展了 3 次野外调查(图 1)。

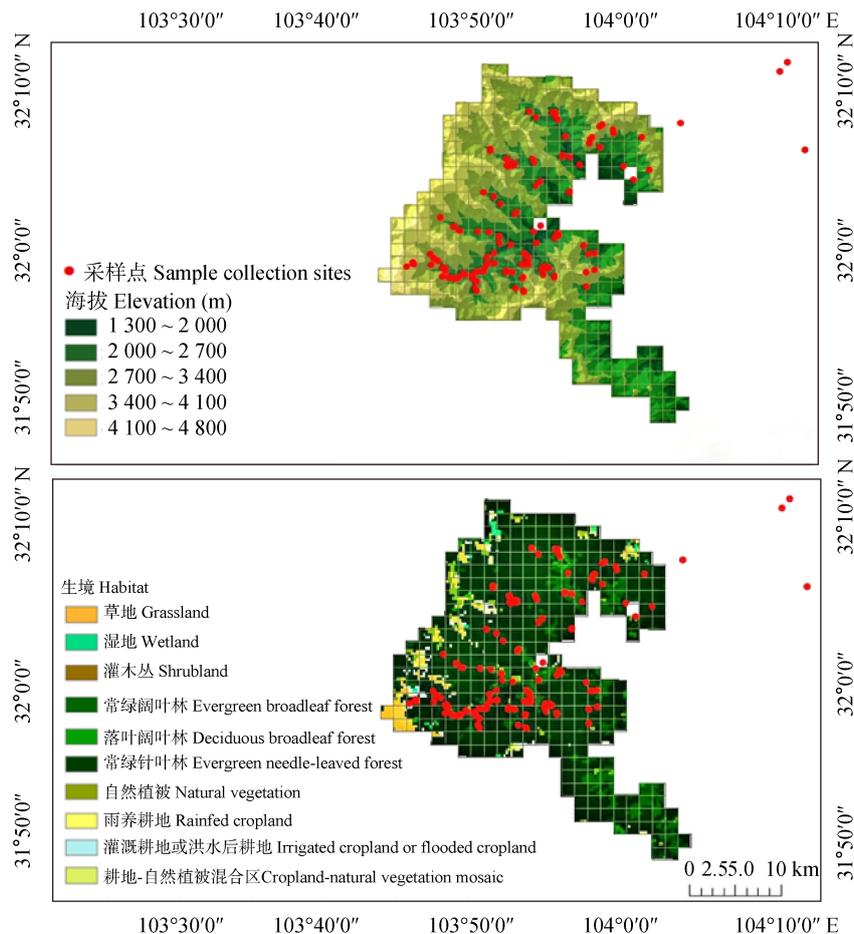


图 1 小寨子沟保护区不同海拔(上)与生境(下)的样品采集点分布

Fig. 1 Distribution of sample collection sites at different elevations (top) and in different habitats (bottom) in Xiaozhaizigou National Nature Reserve

本研究使用评级系统来描述收集到粪便的新鲜程度,并在采集时根据粪便状态为每个样品进行了新鲜程度评分:1-新鲜,2-半新鲜,3-陈旧。具体划分标准如下:当粪便表面湿润,伴有尿液残留,颜色较深时,描述为新鲜;当粪便开始变硬,但仍保持一定湿润度,且颜色逐渐发白时,描述为半新鲜;当粪便中的水分几乎完全蒸发,变得干燥硬化,并且由于尿酸盐结晶的形成,表面明显发白,描述为陈旧(图2)。最后采用 SPSS Statistics 27 软件进行 Cochran-Armitage 趋势检验探究粪便新鲜程度与物种鉴定成功率之间的相关性。

野外条件下,粪便的保存是影响鸟类粪便 DNA 质量的重要因素(Whittier et al. 1999)。为了获得高质量的 DNA,研究人员通常在实验室使用液氮或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}/-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存粪便(Michaud et al. 2011),但液氮或冰箱储存条件增加了野外工作的难度,特别是小寨子沟保护区位于岷山山系高山峡谷地区,地形条件复杂,携带冷冻设备十分困难。近年来,使用乙醇保存粪便的方法逐渐得到认可,研究表明无水乙醇保存的粪便样品在 8 个月后提取的 DNA 几乎无降解(李娜等 2006),且具有低成本、易获取和便于携带等优点(单磊等 2018)。因此,本研究选择无水乙醇作为粪便保存方案。

在确定了样品新鲜程度的判断方法和粪便保存方案后,调查队员开始沿样线以 2 km/h 的速度行进并搜索样品,采集设定网格内(图1)的粪便样品,同时采集羽毛作为辅助数据来源。根据粪便的干燥程度判断新鲜程度,同时根据

粪便形状和大小等特征推测其物种来源。采集时佩戴口罩和一次性乳胶手套,使用无菌棉签将鸟类粪便样品转移到离心管中,并加入体积为粪便两倍以上的水乙醇,密封保存(李娜等 2006,单磊等 2018)。羽毛样品完整存放在干燥信封中,常温下封存(Segelbacher 2002)。野外调查过程中详细记录样品采集日期、地理坐标、样品类别,以及海拔、坡度、植被类型等生境信息。样品带回实验室后,转移到 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 样品处理、DNA 提取与物种鉴定

1.3.1 DNA 提取、扩增 在提取前使用 PBS 浸泡洗涤粪便样本去除乙醇及粪便表面杂质(如泥土等),使用无菌棉签去除残留的植物组织等杂质。由于尿酸盐通常以白色结晶形式存在,避免粪便样本中的任何白色部分进入 DNA 提取过程。

粪便和羽毛样品分别使用 Qiagen 试剂盒(QIAamp Fast DNA Stool Kit, DNeasy Blood & Tissue Kit)进行 DNA 提取。利用分光光度计(NanoDrop2000, Thermo Scientific)检测 DNA 的浓度和纯度,通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 PCR 扩增实验与测序 采用两类鸟类 DNA 条形码通用引物进行 PCR 扩增实验。首先扩增线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因(cytochrome c oxidase I, COI),该基因具有较高的适用性和广泛的数据库支持,已广泛应用于鸟类的物种鉴定(Parejo-Farnés et al. 2018)。为了进一步提高扩增成功率,本研究还选择了细胞色素 b 基因(cytochrome b, Cyt b)



图2 粪便新鲜程度的示例图

Fig. 2 Examples of feces freshness levels

为备选基因, *Cyt b* 基因能够为近缘物种间的区分提供有效的支持 (Parson et al. 2000)。COI 基因引物扩增片段长度 226 bp, COI F (COI-K_Bird_F): 5'-CCC CAG ACA TAG CAT TYC C-3' (简并碱基 Y 代表 C/T), COI R (COI-K_Bird_R): 5'-TTG TGA TAG TGG TGG GGT TTT AT-3'; *Cyt b* 基因引物扩增片段长度 358 bp, *Cyt L* (*Cyt b*-L14816): 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3', *Cyt H* (*Cyt b*-H15173): 5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3'。

PCR 反应体系为 20 μ l, 包括 4 μ l DNA 模板 (浓度为 0~169.4 mg/L), 2 μ l 的上游和下游引物 (浓度为 10 mg/L), 10 μ l Multiplex PCR Master Mix 酶 (Qiagen) 和 0.2 g/L 的牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)。COI 基因 PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。*Cyt b* 基因 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 46 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 5 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 53 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 由北京擎科生物科技有限公司使用 ABI 3730 测序仪进行序列测定, 测序引物与扩增引物相同。

1.3.3 数据分析与物种鉴定 利用 Chromas V2.6.5 软件查看测序峰图并进行人工校正, 随后使用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 BLAST 程序检索测序片段在 GenBank 数据库中的匹配序列, 选择相似度不低于 98% 的序列作为参考序列 (秦啼等 2020, Pulgarín-R et al. 2021), 并结合 IUCN 受威胁物种红色名录 (<https://www.iucnredlist.org>) 和《中国鸟类分类与分布名录》(第 4 版, 郑光美 2023) 的物种分布范围确定物种。使用 MEGA 11 (Tamura et al. 2021) 软件的 Clustal W 功能比对校对好的序列, 利用 Kimura 2-parameter (K2P) (Kimura 1980) 双参数替

代模型计算种内和种间遗传距离。最后, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建单倍型分子系统进化树, 并进行 1 000 次自展分支检验。

2 结果

2.1 物种鉴定结果

本研究在小寨子沟保护区开展样线调查, 共覆盖网格 54 个, 约占保护区总面积的 27.7%, 海拔范围为 1 438 ~ 3 810 m, 共收集样品 140 份, 包括 116 份鸟类粪便和 24 份羽毛样品, 通过 DNA 提取、PCR 扩增、序列测定及比对等一系列流程对采集样品进行物种鉴定, 成功鉴定到 6 种鸡形目鸟类、2 种雀形目鸟类、1 种啄木鸟目鸟类和 1 种鹑形目鸟类 (表 1)。

在 116 份粪便样品中, 使用 COI 引物成功鉴定 72 份样品, 鉴定出 4 目 4 科 9 种; 对失败样品使用 *Cyt b* 引物重新扩增, 成功鉴定 15 份, 鉴定出 3 种鸡形目鸟类, 最终两类引物共鉴定出 4 目 4 科 9 种鸟类。对于 24 份羽毛样品, 使用 COI 引物鉴定 21 份, 鉴定出 3 目 4 科 6 种; 使用 *Cyt b* 引物重新扩增, 将 1 份样品成功鉴定为白喉噪鹛 (*Garrulax albobularis*)。

此外, 在所有采集的粪便样品中, 有 51 份由调查人员根据粪便形态进行了物种预判, 占样品总数的 44.0%。有 35 份同时有经验判断和分子鉴定结果, 其中 23 份一致, 经验判断的准确率为 65.7%, 表明利用分子粪便学进行准确的物种鉴定十分必要。

2.2 种内与种间遗传距离及系统发育树的构建

基于 COI 基因序列, 采用 Kimura 双参数模型, 使用 MEGA 11 计算鸡形目鸟类的种内和种间遗传距离。种内遗传距离介于 0.001 7 到 0.012 7 之间, 平均为 0.007 7; 种间遗传距离介于 0.125 到 0.250 之间, 平均为 0.177。其中, 红喉雉鹑与勺鸡的种间遗传距离最小, 红腹锦鸡与红腹角雉的种间遗传距离最大 (表 2)。种间平均遗传距离 (0.177) 约为种内平均遗传距离 (0.007 7) 的 23 倍。

表 1 鸟类物种鉴定结果

Table 1 Identification results of bird species

目 Order	科 Family	种 Species	样品数量 Sample size	《IUCN 受威胁物种红色名录》受威胁等级 Class of IUCN Red List of Threatened Species	《中国脊椎动物红色名录》受威胁等级 Threatened Categories of China's Red List of Vertebrates	保护级别 Protection class		
鸡形目 Galliformes	雉科 Phasianidae	红喉雉鹑 <i>Tetraophasis obscurus</i>	1	LC	VU	I		
		血雉 <i>Ithaginis cruentus</i>	7	LC	NT	II		
		红腹角雉 <i>Tragopan temminckii</i>	71	LC	NT	II		
		勺鸡 <i>Pucrasia macrolopha</i>	12	LC	LC	II		
		绿尾虹雉 <i>Lophophorus lhuysii</i>	3	VU	EN	I		
		红腹锦鸡 <i>Chrysolophus pictus</i>	11	LC	NT	II		
		鸬鹚形目 Pelecaniformes	鹭科 Ardeidae	池鹭 <i>Ardeola bacchus</i>	1	LC	LC	*
		啄木鸟目 Piciformes	拟啄木鸟科 Megalaimidae	大拟啄木鸟 <i>Psilopogon virens</i>	1	LC	LC	*
雀形目 Passeriformes	鸦科 Corvidae	星鸦 <i>Nucifraga caryocatactes</i>	1	LC	LC	*		
	噪鹛科 Leiothrichidae	白喉噪鹛 <i>Garrulax albogularis</i>	1	LC	LC	*		

LC. 无危; VU. 易危; NT. 近危; EN. 濒危; I、II 分别为国家一级和二级重点保护野生动物; *为“三有”野生动物。

LC. Least concern; VU. Vulnerable; NT. Near threatened; EN. Endangered; I. National first-class key protected wildlife; II. National second-class key protected wildlife; *. Nationally protected wildlife of ecological, scientific, and social significance.

表 2 鸡形目物种 COI 基因序列的遗传距离

Table 2 Genetic distances between the studied birds of Galliformes based on COI sequences

物种 Species	红腹角雉 <i>Tragopan temminckii</i>	勺鸡 <i>P. macrolopha</i>	血雉 <i>I. cruentus</i>	红腹锦鸡 <i>C. pictus</i>	绿尾虹雉 <i>L. lhuysii</i>	红喉雉鹑 <i>Tetraophasis obscurus</i>
红腹角雉 <i>Tragopan temminckii</i>						
勺鸡 <i>Pucrasia macrolopha</i>	0.208					
血雉 <i>Ithaginis cruentus</i>	0.211	0.144				
红腹锦鸡 <i>Chrysolophus pictus</i>	0.250	0.125	0.208			
绿尾虹雉 <i>Lophophorus lhuysii</i>	0.170	0.155	0.162	0.209		
红喉雉鹑 <i>Tetraophasis obscurus</i>	0.186	0.126	0.175	0.169	0.164	

基于鸟类 COI 基因序列, 构建了单倍型邻接系统进化树 (图 3)。同一种鸡形目鸟类的所有个体都聚为一支, 且同一属内、科内及目内的不同种类也能很好地聚类, 形成了独立的进化分支。

2.3 粪便新鲜程度对物种鉴定成功率的影响
对不同新鲜程度的粪便样本进行物种鉴定

成功率的统计分析显示, 新鲜粪便样品物种鉴定成功率为 100%; 半新鲜粪便鉴定成功率为 84.4%; 而陈旧粪便鉴定成功率则显著下降至 45.8%。Cochran-Armitage 趋势检验分析表明, 粪便的新鲜程度与物种鉴定成功率之间存在显著的正相关关系 ($\chi^2 = 21.227, df = 1, P < 0.001$)。

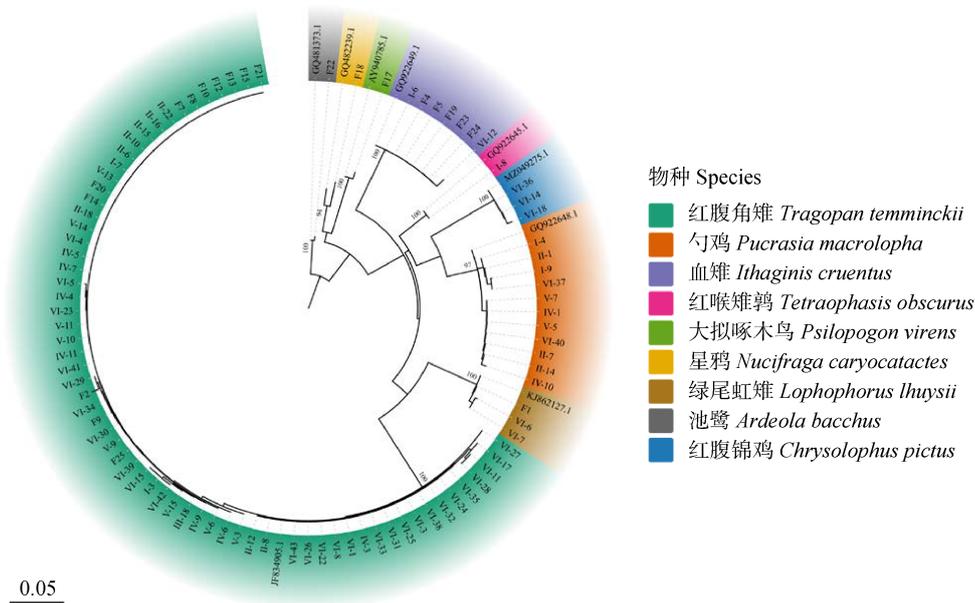


图3 基于 COI 序列构建的鸡形目鸟类系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree reconstructed based on COI sequences of the studied birds of Galliformes

各分支上的数字为分支 bootstrap 支持值。Bootstrap values for every species are showed.

2.4 基于鸟类粪便样品的物种多样性调查方法

本研究综合多因素优化物种鉴定流程，提高了物种鉴定成功率，并建立了严格质控的地栖鸟类物种多样性调查方法（图 4）。在本研究中，所有成功完成物种鉴定的粪便样品的 DNA 浓度均不低于 3 mg/L，而低于此浓度的样品未能成功鉴定。因此，建议将 3 mg/L 作为 DNA 浓度的临界值。若 DNA 浓度低于 3 mg/L，需重新提取 DNA；若 DNA 浓度大于或等于 3 mg/L，则进入 PCR 扩增实验阶段。

PCR 扩增实验阶段首先使用 COI 基因引物进行扩增。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测，再进行序列测定。对于扩增失败的 DNA 样品，使用 Cyt b 基因引物再进行扩增，琼脂糖凝胶电泳检测后序列测定；若仍未扩增成功，则放弃该样品。在本研究的 116 份粪便样品中，72 份通过 COI 引物成功扩增，15 份通过 Cyt b 引物成功扩增。

PCR 扩增产物进行 Sanger 序列测定后，进

行人工校对和序列比对，若对比相似度达到 98% 及以上，判定该粪便样品物种与参考序列物种一致。同时若 COI 基因序列相似度低于 98%，则使用 Cyt b 基因进行扩增，并依据后者的相似度进行判定。

3 讨论

3.1 基于分子粪便学的地栖鸟类物种多样性调查方法的建立

野生动物粪便作为一种常用的非损伤性样品类型，在动物遗传学、生态学和保护生物学等研究中得到了广泛应用（Beja-Pereira et al. 2009）。与其他非损伤性样品（如尿液、毛发）相比，粪便样品外形特征明显，易于发现和采集，并且由于动物排便具有节律性，所有个体都会持续性地进行排便，可提供充足的样本来源（单磊等 2018）。粪便中含有肠道脱落细胞，这些细胞中的 DNA 足以提供排泄个体的遗传信息（Albaugh et al. 1992）。因此，研究人员

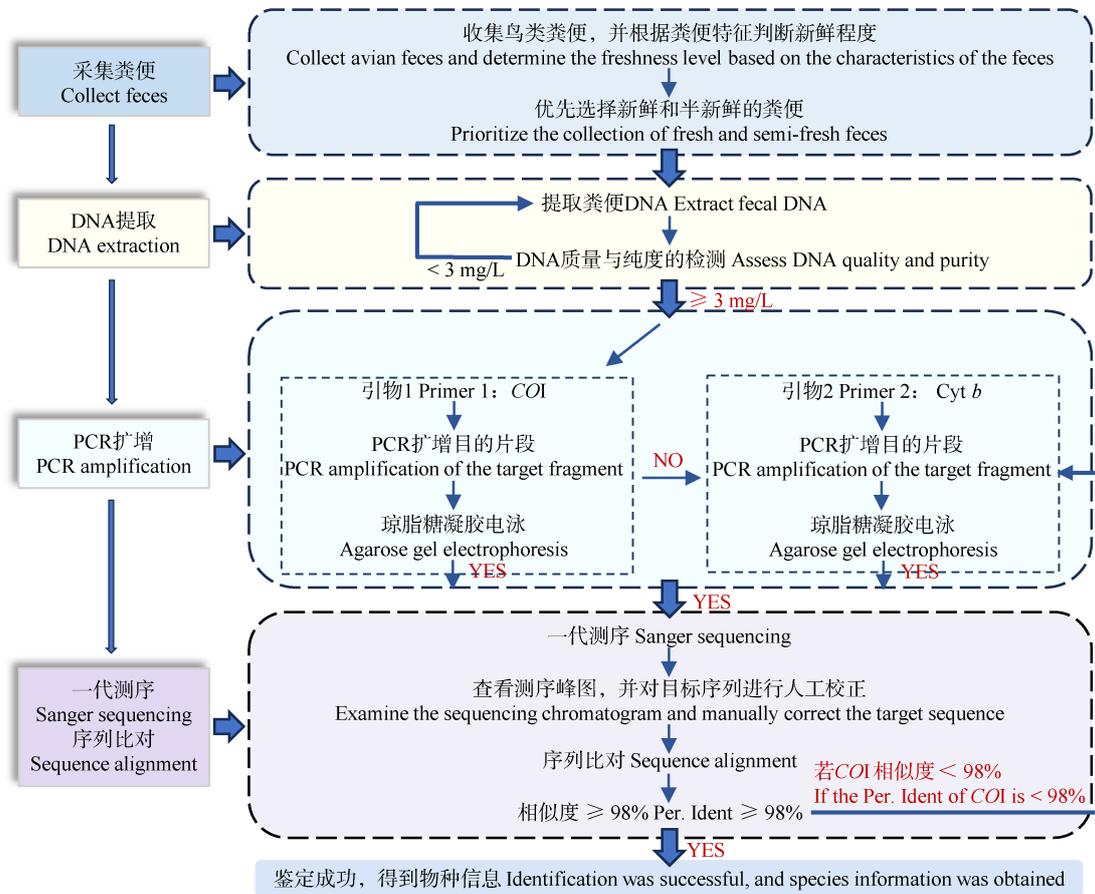


图 4 基于分子粪便学的地栖鸟类物种多样性调查方法

Fig. 4 Protocol of terrestrial bird species diversity survey based on molecular scatology

已利用粪便样品对多个动物类群开展研究，例如：哺乳类 (Zhan et al. 2006, Lu et al. 2023)、鸟类 (Oehm et al. 2011)、昆虫类 (Rytönen et al. 2019) 和两栖类 (Abdul-Patah et al. 2014)。其中，哺乳类和鸟类的相关研究较为丰富 (魏辅文 2001)。然而，鸟类粪便样品的利用频率明显低于哺乳动物 (王戎疆 2001)。这主要受到以下几个因素制约：1) DNA 易降解：鸟类胃肠道酸性环境较强，同时存在丰富的微生物群落 (Duke 1997)。这些微生物能产生分解 DNA 的酶，显著加速 DNA 的降解 (Garcia-Mazcorro et al. 2021)；2) 特殊排泄生理结构：由于鸟类特殊的排泄生理结构，鸟粪由尿液和粪便共同组成，尿液中含有高浓度的尿酸，它

以尿酸盐的形式析出并随尿液排出，与粪便混合在一起 (Gill 1995)。尿酸盐在低温保存或高速离心条件下易形成结晶，这些结晶会干扰 DNA 提取过程，导致提取失败或 DNA 量较少 (Munch et al. 2019)；3) 野外环境因素对粪便 DNA 的降解有显著影响。当粪便暴露于野外环境，粪便中的微生物及环境微生物都能产生分解 DNA 的酶，从而降解粪便中的 DNA。这一降解过程受温度、湿度等环境因素影响，并随暴露时间延长而加剧 (Frantzen et al. 1998, Hájková et al. 2006, Brinkman et al. 2010)。

尽管研究人员可针对单一影响进行克服 (Green et al. 2012, Hou et al. 2021, Edwards et al. 2023)，例如通过规定粪便样本采集的现

场条件，在一定环境温度条件下进行采样，从而减少环境因素的影响 (Fablet et al. 2024)。然而，仅凭克服单一因素并不能完全确保 DNA 提取效率及后续分析 (如 PCR 及测序结果) 的可靠性。目前缺乏基于从鸟类粪便采集到数据产出的质控流程。本研究以鸡形目鸟类物种多样性调查为例，建立鸟类粪便应用的技术流程，确保每个环节的质量控制。

本研究从样品采集、处理到 DNA 浓度分析方面进行了质控。首先，样品采集部分，不同新鲜程度对粪便 DNA 质量影响很大，然而目前关于鸟类粪便新鲜程度与 DNA 提取成功率之间关系的研究尚不充分，因此尚未形成有效措施来提高采样效率。Smith 等 (2023) 将粪便的新鲜程度分为“湿” (新鲜) 和“干燥” (不新鲜) 两类。然而在野外采样时，很多样本处于湿与干之间的过渡状态，使得单一的“湿”或“干燥”标准可能无法准确评估其新鲜度。为了更加全面地评估粪便的新鲜程度，本文引入了“半新鲜”这一概念，用于描述开始变硬但仍保持一定湿润度、颜色逐渐发白的粪便样本。通过这一细化的分类标准，研究发现鸟类粪便新鲜程度与物种鉴定成功率之间呈显著的线性关系。因此在采集鸟类粪便时，建议依据形态特征判断其新鲜程度。这一方法有助于筛选出更合适的样本，从而提高物种鉴定成功率。需说明的是，该评估方法是一种基于形态观察的野外实用方法，而非精确的测定工具。尽管如此，该标准在样本筛选中仍具有实际价值，可依据新鲜程度对样本进行优先级排序，尤其在样本数量超过分析所需时。未来研究应建立更为客观、量化的判断标准，以进一步提高粪便新鲜程度判断的准确性。

其次，在样本处理环节，面临的主要挑战是鸟类粪便中复杂成分的干扰。鸟类粪便常混杂有尿酸盐、植物残余等生物成分，还混杂有泥土、沙粒等非生物杂质 (Gill 1995)。本研究对提取前的粪便样品进行了预处理以降低杂质的干扰。具体是在提取前使用 PBS 对样品进

行浸泡洗涤，去除乙醇及粪便表面杂质，如泥土等外界污染物 (Hart et al. 2015)。在 DNA 提取过程中，尿酸盐的去除是一个关键环节，参考 Eriksson 等 (2017) 的研究，尿酸盐通常呈白色结晶，在样本筛选阶段严格避免采集任何白色部分，以减少尿酸盐的干扰。之后将样本与所选试剂盒特有的缓冲液 (InhibitEX Buffer) 混合，该缓冲液能够去除粪便中的 PCR 抑制剂，从而提高后续 PCR 的成功率。随后，通过快速裂解使 DNA 能够特异性地结合到硅胶膜上，进一步减少尿酸盐等杂质对 DNA 提取的影响。

接下来，基于 116 份鸟类粪便样本的 DNA 浓度分析，本研究确定了适用于当前实验条件的最低 DNA 浓度阈值，即鸟类粪便 DNA 浓度应大于 3 mg/L (总模板量不低于 12 ng)，PCR 能够有效扩增并得到可靠的结果。该结果与先前的研究一致，即尽管理论上只要有一个模板分子就可进行 PCR 反应 (Abed et al. 2002)，但实际操作中有效扩增依赖于一定的模板浓度 (Piggott et al. 2003, Vidya et al. 2005)。然而，所设定的最低 DNA 浓度阈值可能受实验条件差异的影响，例如不同 PCR 体系的设计参数 (如扩增酶的效果、扩增片段长度等) (Dietrich et al. 2013)。因此，尽管本研究提出的阈值具有参考价值，但在实际应用中仍需根据具体实验条件进行适应性调整。

此外，本研究获得的 COI 基因序列遗传距离分析结果显示，种间平均遗传距离显著高于种内平均遗传距离，达到后者的 23 倍，这一差异符合 Hebert 提出的“10 × 规则” (Hebert et al. 2004)，即种间遗传距离达到种内遗传距离 10 倍以上可用于有效区分物种。同时，系统发育分析中所有物种均形成独立聚类，进一步验证了本研究体系中基于 COI 分子标记区分不同鸟类物种的有效性和可靠性。

本研究考虑了环境因素、在粪便 DNA 提取过程中去除杂质并设立最低 DNA 浓度，建立了从样本采集到数据产出的质量控制体系，

明确了粪便新鲜程度、预处理（去除尿酸盐）及 DNA 浓度阈值（大于 3 mg/L）对鸟类粪便 DNA 分析成功率的关键作用。本研究建立的质控体系为鸟类粪便样本的标准化利用提供了技术框架，期望推动鸟类粪便应用领域的发展。

3.2 基于分子粪便学的物种多样性调查和传统调查方法的比较

利用分子粪便学进行地栖鸟类物种多样性调查，能够有效避免对鸟类的干扰和伤害，同时克服了地栖鸟类警觉性高不易观察及其栖息地复杂等调查难点。基于分子粪便学的鸟类物种多样性调查不仅可以准确地鉴定物种，还能够结合采集粪便的地理位置进一步确定不同物种的活动范围、栖息地偏好等生态特征。利用分子粪便学的方法，本研究通过采集小寨子沟保护区鸡形目鸟类的粪便样本，并结合羽毛样品，成功鉴定出 6 种鸡形目鸟类和 4 种其他鸟类。我们将此次调查结果与小寨子沟保护区历史调查数据进行比对（周友兵等 2004），结果显示本次调查鉴定了其中的 6 种，包括国家一级重点保护动物绿尾虹雉和红喉雉鹑，以及 4 种二级重点保护动物。然而，未发现其余 6 种。我们认为造成这种差异的原因有两个：1) 采样空间覆盖度不充分。小寨子沟地形复杂，山地切割剧烈，峡谷众多，坡度一般大于 30°（陈光升等 2005），野外工作难度较大。尽管目前的调查面积已覆盖保护区总面积的 27.7%，调查的最高海拔为 3 810 m，而藏雪鸡主要活动于海拔 3 800~4 000 m 及以上终年积雪高山裸岩地带（武秀云 2002）；雪鹑则栖息在林线与雪线附近的高海拔极端生境中（姚红艳 2017）。本研究调查区域未覆盖此类生境，因此未能采集到这些物种的粪便样本。2) 季节性因素。小寨子沟的雨季主要集中在夏季，其中 6 月是该地区的降雨高峰期。在此期间，降雨量大，导致道路泥泞，不易进入山区，本研究采样时间未能覆盖 6 至 8 月。然而，与历史数据相比，目前得到结果的差异性并非方法本身的局限，很大可能是由于样品采集的覆盖度不足而导致的。

此外，在已调查到的 6 个物种中，绿尾虹雉的检出率最低，仅从 1 份粪便样本中成功鉴定出该物种。这一结果可能与调查范围未能全面覆盖该物种的典型栖息地有关。根据陈俊橙等（2018）的红外相机监测数据，绿尾虹雉在繁殖季主要活动于海拔 3 500~4 100 m 的阳坡草甸与灌丛生境，而本次调查的最高采样点仅达 3 810 m，并未完全覆盖其典型栖息范围。因此，未来研究应重点加强对 3 500 m 以上高海拔区域的监测力度，以提高数据完整性。相比之下，红腹角雉的检出率最高，这可能与调查区域覆盖该物种的主要分布区有关——红腹角雉主要栖息在海拔 1 518~3 543 m 的常绿落叶阔叶林及常绿针叶林（李生强等 2024），从而在调查区域更容易鉴定到该物种。

与传统的调查方法相比，本次调查采用的分子粪便学方法具有以下明显优势：1) 对野生动物影响极小。不同于以往采用枪击、粘网等损伤性手段，本研究通过采集粪便和羽毛等非损伤性样品，有效避免了对动物的伤害，并且对于许多濒危物种，生存状况相当脆弱，已经不允许进行干扰性的取样活动（李明等 2001）。因此，分子粪便学对于野生濒危动物的调查和保护具有重要的现实意义。2) 提供更全面的信息。以往调查主要进行物种名称的统计，而基于粪便分子学的调查方法不仅提高了物种鉴定的准确性，避免了因形态相似导致的误识，还能提供物种的海拔和栖息地分布等详细信息。该方法还能够定量评估物种的多度，区分“优势种”和“稀有种”，为生态系统的稳定性和健康评估提供了有力依据。此外，通过分析粪便 DNA 中的遗传标记，可深入研究野生动物种群的遗传变异、生活史以及种群统计学等方面（魏辅文 2001）。

因此，尽管当前物种检出数量与历史调查结果不一致，但分子粪便学方法仍具有优势。未来在对该地区鸡形目鸟类多样性进行评估时，应优化采样策略，例如延长监测周期、扩大调查范围，并针对地形复杂、难以开展常规

调查的地带，结合多种技术手段进行补充。与此同时，应进一步加强保护区内的红外相机监测工作，并推动粪便 DNA 与红外相机监测、样线调查等手段的协同应用，通过多种方法间的优势互补与结果互证，构建更加系统的综合监测体系，为地栖鸟类保护提供更可靠的科学依据，从而有效提升对这一关键类群的保护成效。

3.3 粪便 DNA 技术在鸟类监测中的应用与前景

鸟类是生物多样性监测的重要指示类群，在全球范围内得到了广泛关注 (Gregory et al. 2003)。我国已开展大量的鸟类调查与监测工作，目前已基本建成全国鸟类多样性观测网络 (徐海根等 2018)。然而，现有监测手段在鸟类数据采集方面仍面临一定的挑战 (孙戈等 2022)。当前鸟类监测主要依赖于专业人员在野外进行直接观察，常用方法包括样线法、样点法和直接计数法 (吴政浩等 2023)。尽管这些方法在过去几十年里为鸟类监测提供了大量数据，但在一些关键方面仍存在局限性，例如难以覆盖到栖息隐蔽的物种，且大部分仅记录鸟类的种类和数量，数据较为单一 (吴颢林等 2023)。另一方面，随着科技的进步，红外相机、无人机、遥感等新兴技术逐渐被引入到鸟类监测中，推动了鸟类监测工作的创新和发展 (吴政浩等 2023)。这些新兴技术也在我国国家公园和保护区的监测工作中得到了不同程度的应用，但也存在一些局限性，尚未完全满足鸟类监测的需求 (Burke et al. 2019)。

在此背景下，将粪便 DNA 技术引入现有的鸟类多样性评估体系，为解决传统监测方法的局限性提供了新的解决路径。首先，鸟类粪便样品的收集与样线法具有较高的兼容性，两者都是基于预设的样线进行，且样线布设原则基本一致 (董哲含等 2021)。因此，在进行样线调查时，可以进行粪便样品的采集，节省时间和资源，从而提高调查效率。其次，利用鸟类粪便从分子水平进行物种鉴定，能够克服基于形态学鉴定方法的局限性，可准确鉴定外形

相似、体型较小或栖息于密集植被的鸟类，弥补了传统调查方法和红外相机在监测这些鸟类时的不足 (朱淑怡等 2017)。

粪便 DNA 技术还可与其他新兴技术结合，使得鸟类监测与保护工作更加科学和高效。通过将采集到的粪便样本的地理位置与无人机的地理定位信息及遥感数据 (如栖息地类型、气候条件、植被覆盖等) 相结合，可构建更加全面的鸟类生态数据库。基于该数据库，利用 AI 模型分析不同鸟类的栖息模式和分布规律，并预测鸟类在不同环境条件下的栖息地变化趋势，有助于科研人员做出更加前瞻性的保护决策。

此外，粪便 DNA 技术不仅在物种识别方面具有重要作用，还被广泛应用于多个生态学研究领域，包括物种分布区范围的确定、性别鉴定、个体识别、物种数量调查、遗传多样性分析、食性及疾病监测等 (魏辅文等 2001)。基于粪便 DNA 技术，研究人员可以识别不同鸟类，并能够根据粪便的分布特征进行物种分布区的调查和评估。这一方法能够构建占域模型，估算目标物种在研究区域内的真实占据概率，避免因漏检导致的分布低估问题，从而提供更具统计解释力的物种分布信息 (Bailey et al. 2014)。通过基因测序和微卫星多态性等分子遗传学技术对粪便 DNA 进行分析，能够获取线粒体 DNA 及核基因组的遗传变异信息，从而深入探究野生动物的遗传多样性、种群结构及基因流动态等，这些数据对于制定科学的保护管理策略具有重要指导价值，同时能够在无需直接接触动物个体的情况下实现对种群的长期监测 (Rodgers et al. 2013, Pannoni et al. 2022)。粪便 DNA 技术还可通过宏条形码分析揭示鸟类的食性特征，通过对粪便中植物或昆虫等特异性基因片段进行扩增和鉴定，能够准确解析鸟类的食物组成，进而阐明其营养生态位特征 (Rytkönen et al. 2019)。这种广适性使得粪便 DNA 技术成为鸟类生态学研究 and 保护中的重要工具。

总之, 粪便 DNA 技术在鸟类监测中的应用, 不仅能够有效克服传统调查方法的局限性, 还能与新兴监测技术相结合, 形成多层次、多维度的数据支持体系, 有利于鸟类智慧监测体系的建设, 为我国鸟类多样性保护与自然保护地管理提供关键技术支持。

致谢 感谢四川省大熊猫科学研究院雷小军、雷俊、程帅、冉洪健、梁鼎、刘道周、刘显东、王贺东、桂明、伏勇等工作人员对野外调查工作的帮助, 感谢四川小寨子沟国家级自然保护区管理处对本项目研究的大力支持, 感谢中国科学院成都生物研究所戴强研究员在采样计划制定过程中提供的帮助, 感谢中国科学院动物研究所张塔星博士和邢超在项目开展过程中给予的宝贵建议。

参 考 文 献

- Abdul-Patah P, Nur-Syuhada N, Md-Nor S, et al. 2014. Habitat and food resources of otters (*Mustelidae*) in Peninsular Malaysia. *AIP Conference Proceedings*, 1614(1): 693–699.
- Abed R M M, Safi N M D, Köster J, et al. 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1674–1683.
- Aghababayan K. 2024. Birds as potential bioindicators for terrestrial ecosystems. *International Journal of Life Science Research Archive*, 6(1): 1–22.
- Albaugh G P, Iyengar V, Lohani A, et al. 1992. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *International Journal of Cancer*, 52(3): 347–350.
- Bailey L L, MacKenzie D I, Nichols J D. 2014. Advances and applications of occupancy models. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(12): 1269–1279.
- Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves P C, et al. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*, 9(5): 1279–1301.
- Brinkman T J, Schwartz M K, Person D K, et al. 2010. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. *Conservation Genetics*, 11(4): 1547–1552.
- Burke C, Rashman M, Wich S, et al. 2019. Optimizing observing strategies for monitoring animals using drone-mounted thermal infrared cameras. *International Journal of Remote Sensing*, 40(2): 439–467.
- Cai T L, Fjeldså J, Wu Y J, et al. 2018. What makes the Sino-Himalayan mountains the major diversity hotspots for pheasants? *Journal of Biogeography*, 45(3): 640–651.
- Canterbury G E, Martin T E, Petit D R, et al. 2000. Bird communities and habitat as ecological indicators of forest condition in regional monitoring. *Conservation Biology*, 14(2): 544–558.
- Del-Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. 1994. *Handbook of the Birds of the World. Volume 2. New World Vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Dietrich D, Uhl B, Sailer V, et al. 2013. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One*, 8(10): e77771.
- Duke G E. 1997. Gastrointestinal physiology and nutrition in wild birds. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 56(3): 1049–1056.
- Dvorak M, Fessl B, Nemeth E, et al. 2012. Distribution and abundance of Darwin's finches and other land birds on Santa Cruz Island, Galápagos: evidence for declining populations. *Oryx*, 46(1): 78–86.
- Edwards J, Hoffbeck C, West A G, et al. 2023. 16S rRNA gene-based microbiota profiles from diverse avian faeces are largely independent of DNA preservation and extraction method. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1239167.
- Eriksson P, Mourkas E, González-Acuna D, et al. 2017. Evaluation and optimization of microbial DNA extraction from fecal samples of wild Antarctic bird species. *Infection Ecology & Epidemiology*, 7(1): 1386536.
- Fablet L, Pellerin A, Zarzoso-Lacoste D, et al. 2024. Metabarcoding reveals waterbird diet in a French Ramsar wetland: implications for ecosystem management. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (425): 9.
- Frantzen M A J, Silk J B, Ferguson J W H, et al. 1998. Empirical

- evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7(10): 1423–1428.
- Garcia-Mazcorro J F, Alanis-Lopez C, Marroquin-Cardona A G, et al. 2021. Composition and potential function of fecal bacterial microbiota from six bird species. *Birds*, 2(1): 42–59.
- Gill F B. 1995. *Ornithology*. New York: Freeman and Company.
- Green H C, Dick L K, Gilpin B, et al. 2012. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2): 503–510.
- Gregory R D, Noble D G, Field R, et al. 2003. Using birds as indicators of biodiversity. *Ornis Hungarica*, 12(13): 11–24.
- Hájková P, Zemanová B, Bryja J, et al. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Molecular Ecology Notes*, 6(2): 559–562.
- Hart M L, Meyer A, Johnson P J, et al. 2015. Comparative evaluation of DNA extraction methods from feces of multiple host species for downstream next-generation sequencing. *PLoS One*, 10(11): e0143334.
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270(1512): 313–321.
- Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10): e312.
- Hou X, Pan S K, Lin Z Z, et al. 2021. Performance comparison of different microbial DNA extraction methods on bird feces. *Avian Research*, 12(1): 19.
- 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.
- La Sorte F A, Butchart S H M, Jetz W, et al. 2014. Range-wide latitudinal and elevational temperature gradients for the world's terrestrial birds: implications under global climate change. *PLoS One*, 9(5): e98361.
- Lu Q, Cheng C, Xiao L Y, et al. 2023. Food webs reveal coexistence mechanisms and community organization in carnivores. *Current Biology*, 33(4): 647–659.
- MacArthur R. 1971. *Patterns of Terrestrial Bird Communities* // Farner D S, King J R. *Avian Biology*. New York: Academic Press, 189–221.
- Mansfield I, Reynolds S J, Lynch I, et al. 2024. Birds as bioindicators of plastic pollution in terrestrial and freshwater environments: a 30-year review. *Environmental Pollution*, 348: 123790.
- McGowan P J K, Owens L L, Grainger M J. 2012. Galliformes science and species extinctions: what we know and what we need to know. *Animal Biodiversity and Conservation*, 35(2): 321–331.
- Mere Roncal C, Middendorf E, Forsyth A, et al. 2019. Assemblage structure and dynamics of terrestrial birds in the southwest Amazon: a camera-trap case study. *Journal of Field Ornithology*, 90(3): 203–214.
- Michaud C L, Foran D R. 2011. Simplified field preservation of tissues for subsequent DNA analyses. *Journal of Forensic Sciences*, 56(4): 846–852.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, et al. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4): 995–998.
- Munch M M, Chambers L C, Manhart L E, et al. 2019. Optimizing bacterial DNA extraction in urine. *PLoS One*, 14(9): e0222962.
- Myers N, Mittermeier R A, Mittermeier C G, et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853–858.
- Oehm J, Juen A, Nagiller K, et al. 2011. Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Molecular Ecology Resources*, 11(4): 620–628.
- Owen-Ramos J D, Sanchez C J, Blair S, et al. 2022. Use of fecal DNA to estimate black bear density in an urban-wildland interface. *Wildlife Society Bulletin*, 46(4): e1347.
- Pannoni S B, Proffitt K M, Holben W E. 2022. Non-invasive monitoring of multiple wildlife health factors by fecal microbiome analysis. *Ecology and Evolution*, 12(2): e8564.
- Parejo-Farnés C, Albaladejo R G, Camacho C, et al. 2018. From species to individuals: combining barcoding and microsatellite analyses from non-invasive samples in plant ecology studies. *Plant Ecology*, 219(10): 1151–1158.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, et al. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 114(1): 23–28.

- Piggott M P, Taylor A C. 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology*, 51(4): 341–355.
- Pulgarin-R P C, Olivera-Angel M, Ortíz L, et al. 2021. DNA barcodes of birds from northern Colombia. *Biodiversity Data Journal*, 9: e64842.
- Ramón-Laca A, White D J, Weir J T, et al. 2018. Extraction of DNA from captive-sourced feces and molted feathers provides a novel method for conservation management of New Zealand kiwi (*Apteryx* spp.). *Ecology and Evolution*, 8(6): 3119–3130.
- Robledano F, Esteve M A, Farinós P, et al. 2010. Terrestrial birds as indicators of agricultural-induced changes and associated loss in conservation value of Mediterranean wetlands. *Ecological Indicators*, 10(2): 274–286.
- Rodgers T W, Janečka J E. 2013. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. *European Journal of Wildlife Research*, 59(1): 1–16.
- Rytkönen S, Vesterinen E J, Westerduin C, et al. 2019. From feces to data: a metabarcoding method for analyzing consumed and available prey in a bird-insect food web. *Ecology and Evolution*, 9(1): 631–639.
- Segelbacher G, Steinbruck G. 2001. Bird faeces for sex identification and microsatellite analysis. *Vogelwarte*, 41(2): 139–142.
- Segelbacher G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes*, 2(3): 367–369.
- Shaw J M, Jenkins A R, Allan D G, et al. 2016. Population size and trends of Ludwig's Bustard *Neotis ludwigii* and other large terrestrial birds in the Karoo, South Africa. *Bird Conservation International*, 26(1): 69–86.
- Smith J C, Varriano S, Roach K, et al. 2023. Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* isolated from wild birds in fresh produce environments. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1272916.
- Sutherland W J, Pullin A S, Dolman P M, et al. 2004. The need for evidence-based conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(6): 305–308.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35(3): e14.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Vidya T N C, Sukumar R. 2005. Amplification success and feasibility of using microsatellite loci amplified from dung to population genetic studies of the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Current Science*, 88(3): 489–492.
- Voskamp A, Baker D J, Stephens P A, et al. 2017. Global patterns in the divergence between phylogenetic diversity and species richness in terrestrial birds. *Journal of Biogeography*, 44(4): 709–721.
- Waits L P, Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, 69(4): 1419–1433.
- Warren P, Baines D. 2014. Changes in the abundance and distribution of upland breeding birds in the Berwyn Special Protection Area, North Wales 1983–2002. *Birds in Wales*, 11: 32–42.
- Whitehead S, Hesford N, Baines D. 2018. Changes in the abundance of some ground-nesting birds on moorland in South West Scotland. Research Report to Scottish Land & Estates and Scottish Gamekeepers Association.
- Whittier C A, Dhar A K, Stem C, et al. 1999. Comparison of DNA extraction methods for PCR amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (COII) DNA from primate fecal samples. *Biotechnology Techniques*, 13(11): 771–779.
- Zhan X J, Li M, Zhang Z J, et al. 2006. Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve. *Current Biology*, 16(12): R451–R452.
- 陈光升, 齐代华, 杨远兵, 等. 2005. 四川小寨子沟自然保护区大熊猫生境植物群落结构特征. *广西植物*, 25(4): 305–309.
- 陈俊橙, 贺飞, 彭波, 等. 2018. 四川小寨子沟国家级自然保护区绿尾虹雉的日活动行为特征. *四川动物*, 37(3): 241–250.
- 单磊, 胡义波, 魏辅文. 2018. 粪便 DNA 分析技术在分子生态学研究中的机遇与挑战. *兽类学报*, 38(3): 235–246.
- 董哲含, 斯幸峰, 何兴成, 等. 2021. 鸟类多样性野外调查方法. *Bio-101*, e1010648. [EB/OL]. <https://cn.bio-protocol.org/bio101/>

- e1010648.
- 雷富民, 卢建利, 刘耀, 等. 2002. 中国鸟类特有种及其分布格局. 动物学报, 48(5): 599–610.
- 李晟, 王大军, 肖治术, 等. 2014. 红外相机技术在我国野生动物研究与保护中的应用与前景. 生物多样性, 22(6): 685–695.
- 李明, 魏辅文, 饶刚, 等. 2001. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. 动物学报, 47(3): 338–342.
- 李娜, 李迪强, 王秀磊, 等. 2006. 粪便不同保存方法对动物基因组 DNA 提取效果的影响. 国际遗传学杂志, 29(5): 341–345.
- 李生强, 廖光炯, 孟庆玉, 等. 2024. 四川小寨子沟国家级自然保护区红腹角雉空间分布格局. 四川林业科技, 45(5): 68–75.
- 罗辅燕. 2005. 小寨子沟自然保护区的植被分类. 内江师范学院学报, 20(4): 72–76.
- 秦啼, 王东权, 曲宁新, 等. 2020. 基于粪便 DNA 技术的鸟类物种鉴定体系研究. 野生动物学报, 41(1): 145–151.
- 孙戈, 曾立雄, 钱法文, 等. 2022. 鸟类监测技术现状与发展趋势. 地理信息世界, 29(6): 26–29.
- 王戎疆. 2001. 粪便 DNA 分析技术在动物生态学中的应用. 动物学报, 47(6): 699–703.
- 魏辅文, 饶刚, 李明, 等. 2001. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望. 兽类学报, 21(2): 143–152, 160.
- 吴颢林, 汪慧琳, 张伦然, 等. 2023. 常见鸟类多样性调查方法的比较与应用研究. 陆地生态系统与保护学报, 3(4): 74–86.
- 吴政浩, 丁志锋, 周智鑫, 等. 2023. 中国陆生脊椎动物野外调查的发展现状与文献分析. 生物多样性, 31(3): 198–215.
- 武秀云. 2002. 藏雪鸡的研究概述. 青海科技, 9(1): 25–26.
- 肖治术, 陈立军, 宋相金, 等. 2019. 基于红外相机技术对广东车八岭国家级自然保护区大中型兽类与雉类的编目清查与评估. 生物多样性, 27(3): 237–242.
- 徐海根, 崔鹏, 朱筱佳, 等. 2018. 全国鸟类多样性观测网络 (China BON-Birds) 建设进展. 生态与农村环境学报, 34(1): 1–11.
- 严丽君, 王普, 施启龙, 等. 2023. 动物食性分析在生态学中的应用研究进展——基于 DNA 宏条形码技术. 生态学报, 43(8): 3007–3019.
- 姚红艳. 2017. 雪鹑栖息地选择及与藏雪鸡栖息地的比较. 北京: 北京林业大学硕士学位论文.
- 张正旺, 丁长青, 丁平, 等. 2003. 中国鸡形目鸟类的现状与保护对策. 生物多样性, 11(5): 414–421.
- 郑光美. 2023. 中国鸟类分类与分布名录. 北京: 科学出版社.
- 周友兵, 张君, 张文广, 等. 2004. 四川小寨子沟自然保护区鸟类资源现状与保护. 西华师范大学学报: 自然科学版, 25(1): 68–72.
- 朱淑怡, 段菲, 李晟. 2017. 基于红外相机网络促进我国鸟类多样性监测: 现状、问题与前景. 生物多样性, 25(10): 1114–1122.