

黑颈鹤 (*Grus nigricollis*) 越冬 亚群之间的隔离与交流

李来兴

中国科学院西北高原生物研究所

2018年8月16日

呼和浩特

主要内容

- 问题的提出
- 研究方法
- 主要结论
- 讨论

问题的提出

- 局部种群的理解
- 科研数据的解读
- 观察结果的分析
- 保护实践的总结

-----存在重大误区

需要对黑颈鹤种群的亚群之间的基因交流状况作出基本判断或分析

研究方法

- 种群规模评估
 - 种群田间异步统计方法
- 亚群交流分析
 - 遗传结构分析
 - 肠道微生物群落比较方法

-----种群田间异步统计方法

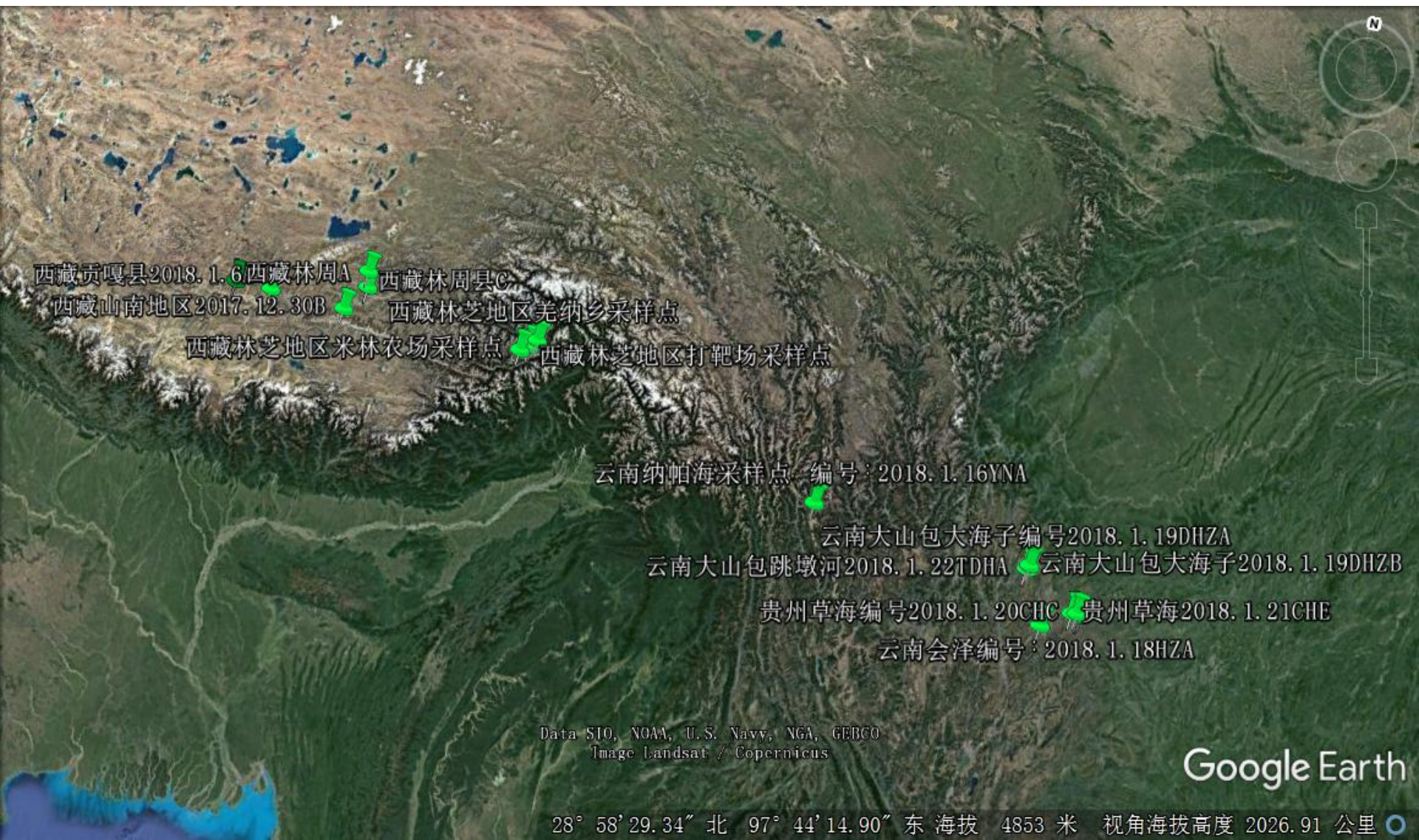
-----遗传结构分析方法

-----肠道微生物群落比较方法

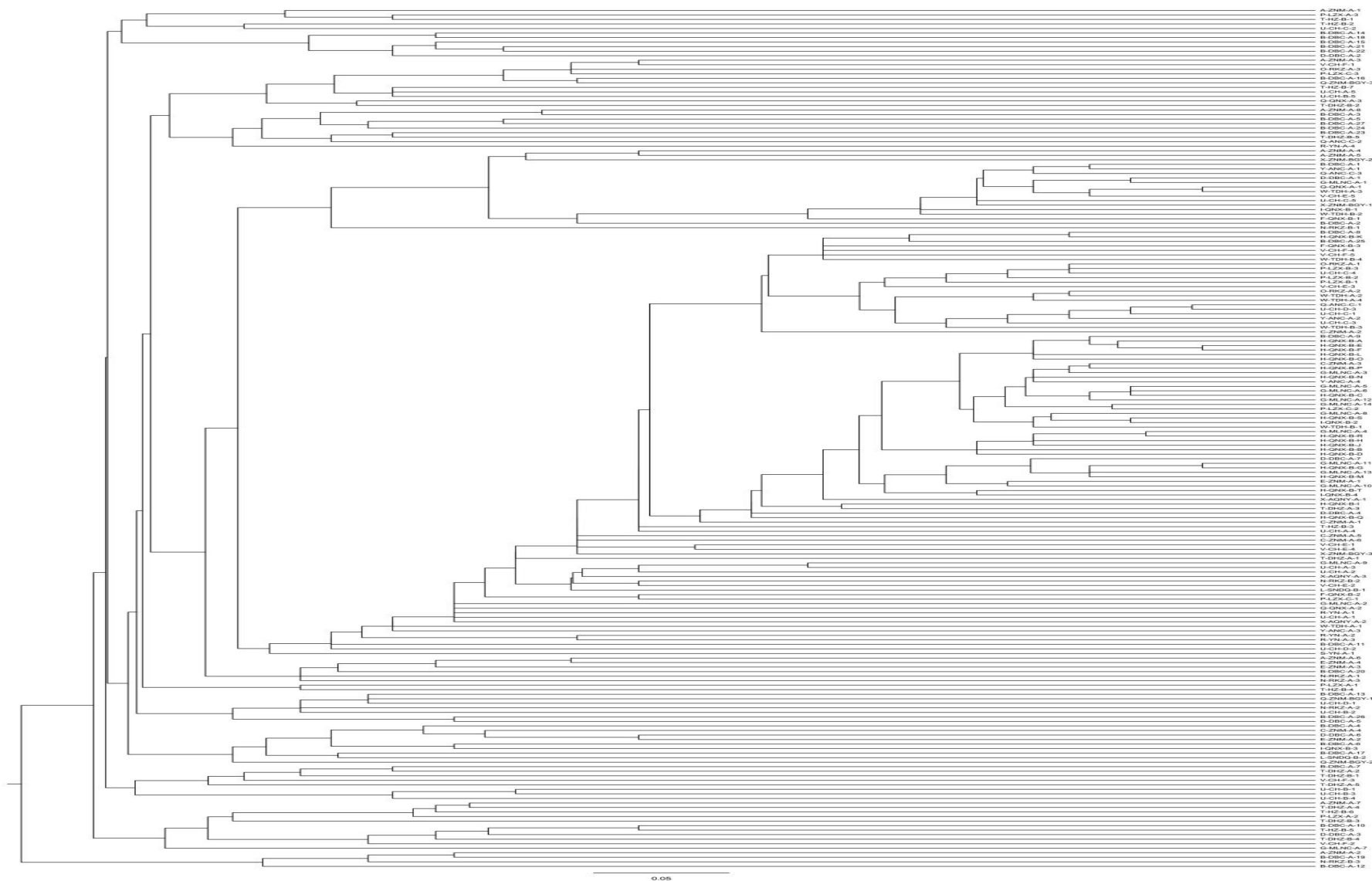
研究结果

- 黑颈鹤种群规模评估
- 黑颈鹤越冬亚群分布
- 黑颈鹤越冬亚群遗传树状图分析
- 黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落关系树状图分析

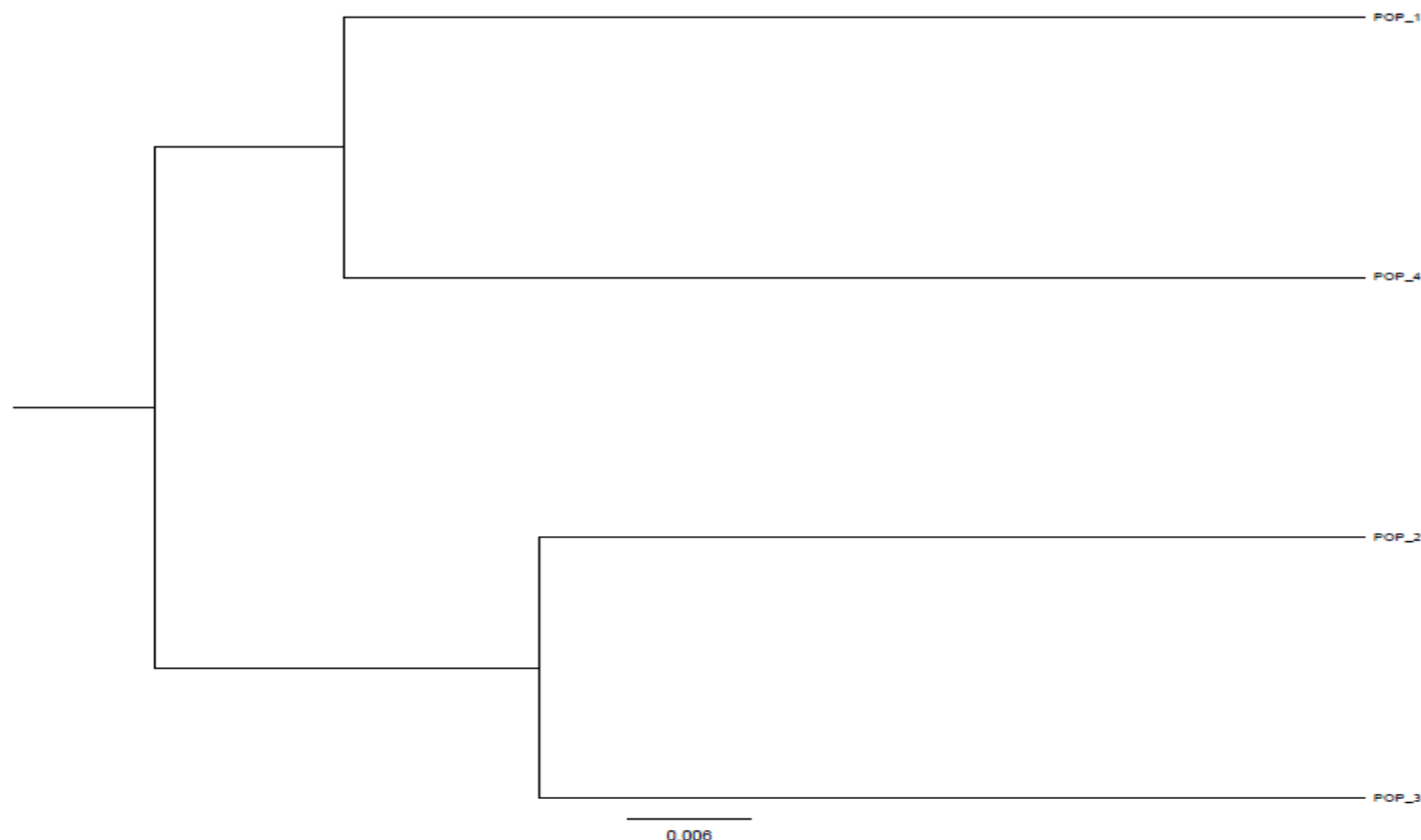
-----黑颈鹤越冬亚群分布



-----黑颈鹤越冬亚群之间遗传距离分析



-----黑颈鹤越冬亚群之间遗传距离分析



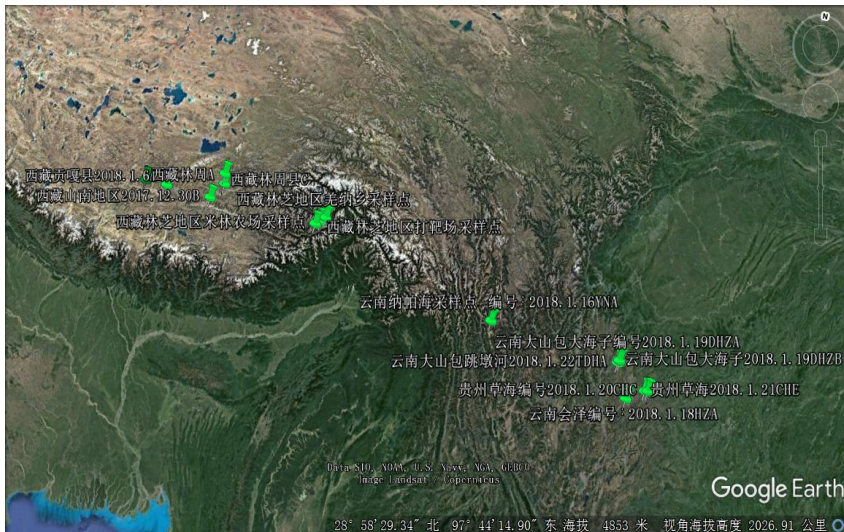
POP1为西藏自治区黑颈鹤种群， **POP2**为云南省黑颈鹤种群，
POP3为贵州省草海黑颈鹤种群， **POP4**为米林县黑颈鹤种群。

大尺度聚类分析的结果，不出预料地显示出项目评价区越冬黑颈鹤亚群，与西藏越冬群类缘关系较近而与云贵越冬群类缘关系较远。而当每个样本进行比较时，给我们给出了几方面的提示。首先是一个日喀则的亚群，代表了黑颈鹤最早的越冬群，而后分化出了分别在拉萨地区和贵州草海越冬的两个亚群。最后一个大类，代表了几乎整个黑颈鹤越冬栖息地的越冬亚群，它们聚成了一个大类，包括了在评价区分布的所有3个黑颈鹤越冬亚群，

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较

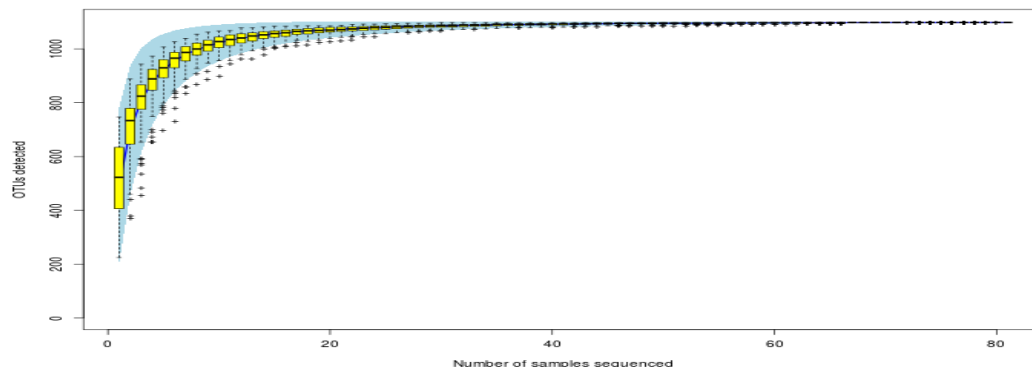
- 基于第二代高通量测序技术，不经过分离培养微生物，直接对样本中微生物的**DNA**进行测定。不断更新的生物信息学分析方法，不仅可以让科研工作者获得准确的不同环境中微生物群落的组成信息和多样性信息，还可以根据不同的实验设计，比较不同空间或/和时间上微生物结构发生的变化，寻找变化规律；与环境因子的关联性分析、共表达网络分析、功能基因预测等深入的数据挖掘为进一步认知和理解环境微生物群落提供了有力的研究工具。
- **16S rRNA**基因普遍存在于原核细胞，在细菌基因组中位于核糖体小亚基（约**1540 bp**），该区域兼顾保守性和高变性，含有**10**个保守区域(**Conserved Regions**)和**9**个高变区域(**Variable Regions**)，保守区可用于设计引物进行目的片段的扩增，而通过对高变区的分析可以辨别细菌种类。因此，**16S rRNA**基因被认为是最适于细菌系统发育学研究和物种分类鉴定。目前用于二代测序的区域主要有**V3区**，**V6区**，**V1区**，**V3-V4区**、和**V4-V5区**等。

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较 采样策略



每个越冬群平行采集**3**份黑颈鹤新鲜粪便颗粒；越冬地采集到**82**组样本。

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较



Specaccum物种累积曲线

横坐标：样本量；

纵坐标：抽样后的OTU数目

- 关于Alpha多样性分析

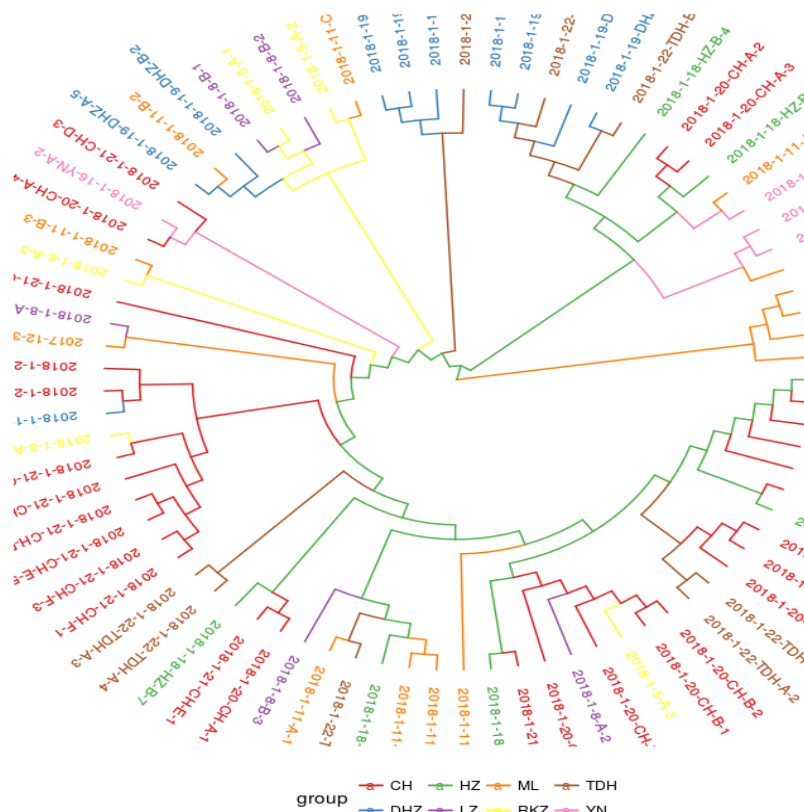
黑颈鹤肠道微生物群落Alpha多样性分析结果，无论采用主坐标分析（Principal Coordinate Analysis, PCoA），还是稀释性曲线（rarefaction curve）、香农-维纳指数（Shannon-Wiener Index）等等，结果都相当一致：只要采样得当，只需要少量样品，就可满足其肠道微生物群落中物种多样性测试的需要。这一结论，尽管在本专题研究中，仅能说明采样和测试及研究方法的准确性，对群落之间的关系分析作用不明显。但可以预见的是，黑颈鹤肠道微生物群落Alpha多样性分析方法，对在以后的黑颈鹤对环境适应性研究和种群恢复和保护研究中，将发挥很大的作用。

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较

- **Beta多样性分析**

Beta 多样性是对不同样本/不同组间样本的微生物群落构成进行比较分析。可以用OTUs的丰度信息进行样本间距离计算，也可以用OTUs之间的系统发生关系进行计算。**UniFrac**^[10]是用于比较生物群落的一种距离度量，它在计算过程中包含了遗传距离（**phylogenetic distances**）的信息，根据构建的进化树枝的长度计量两个不同环境样品之间的差异。**UniFrac** 分析分为**Weighted Unifrac** 和**Unweighted Unifrac** 两种度量方法，两者之间差异在于是否计入不同环境样品的序列相对丰度。**Weighted Unifrac** 算法在计算树枝长度时将序列的丰度信息进行加权计算，因此**Unweighted Unifrac** 可以检测样品间变化的存在，而**Weighted Unifrac** 可以更进一步定量的检测样品间不同谱系上发生的变异。基于OTU丰度信息表计算**Unifrac**距离（**Unweighted Unifrac**）和**Weighted Unifrac**距离。距离矩阵可用于后续得**Beta**多样性分析和可视化统计分析，从中发现不同样品（组）间的差异。

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较



- 树状图可以通过树枝结构比较直观地描述和比较多个样品间的相似性和差异关系。基于距离矩阵，使用UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) 聚类方法进行分析构建进化树，结果如下图所示。

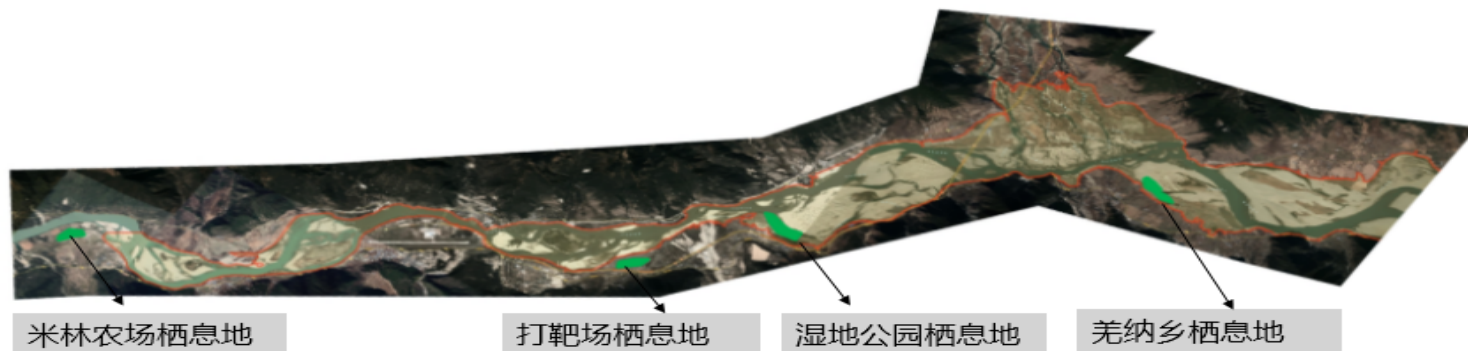
基Unweighted Unifrac距离的UPGMA聚类树

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较

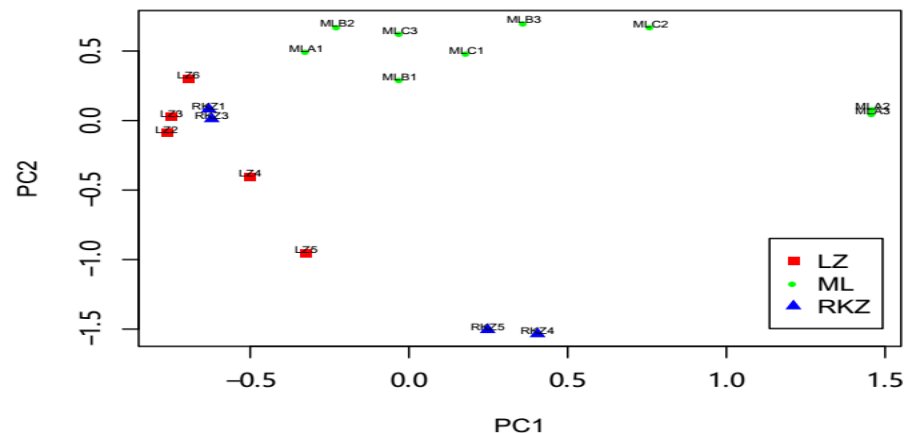
分析结论不明确的原因分析

本次利用肠道微生物群落比较分析不同黑颈鹤越冬亚群之间的类缘关系，在国内外尚属首次，完全是一种方法论上的创新。就本专题而言，照搬生物群落学比较方面的方法，出现与预期结果不符的情况，是一种必然，故而需要改进。其次，采集策略仅考虑本专题目标，未与测试和分析专业人员讨论、存在三维编号（田间、实验室和制图的编号不一致）、同一地点不同时间的采样在编号、保存和分析时出现混淆、对数据或结果有不同理解的分析人员，对所谓的“坏”数据的选择性剔除标准不一致，等，可能均会导致前述的分析结果的不明朗或不明确。

-----黑颈鹤越冬亚群肠道微生物群落相似性比较 剔除一些干扰后的主坐标分析 (PCoA)



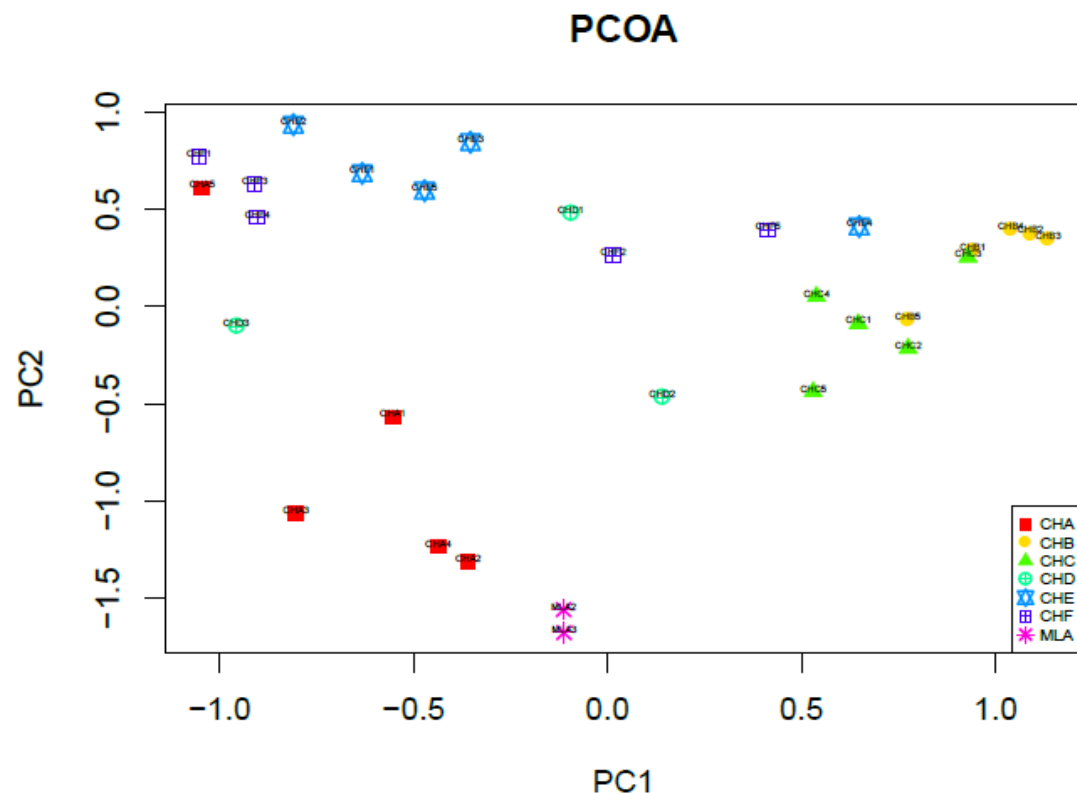
PCOA



米林县3个区域黑颈鹤种群与林周县及日喀则市黑颈鹤种群的PCoA分析

可以看出，米林县仲尼玛公园和农场区域的黑颈鹤种群和林周县与日喀则市的黑颈鹤种群距离较近。而米林县羌纳乡的黑颈鹤种群与上述地区表现出了较大差异。

米林县羌纳乡区域越冬黑颈鹤亚群 与贵州省威宁县草海区域黑颈鹤越冬亚群的主坐标分析图



米林县羌纳乡区域越冬黑颈鹤亚群与贵州省威宁县草海区域黑颈鹤越冬亚群的主坐标分析图

进一步，我们将米林县羌纳乡的黑颈鹤种群与贵州省威宁县草海保护区六个区域的黑颈鹤种群（样本编号为CH）进行比较。如图-6-15所示，米林县羌纳乡的黑颈鹤种群与草海保护区A区域（北 $26^{\circ} 50' 17.0052''$ ，东经 $104^{\circ} 17' 1.8672''$ ）的黑颈鹤种群距离较近。

综上这些研究结果，我们认为，米林县仲尼玛公园和农场区域的黑颈鹤种群与西藏自治区林周县和日喀则市的黑颈鹤种群，具有较为相近的肠道微生物组成。而米林县羌纳乡区域的黑颈鹤种群则表现出与贵州省威宁县草海保护区的黑颈鹤相似的肠道微生物组成。

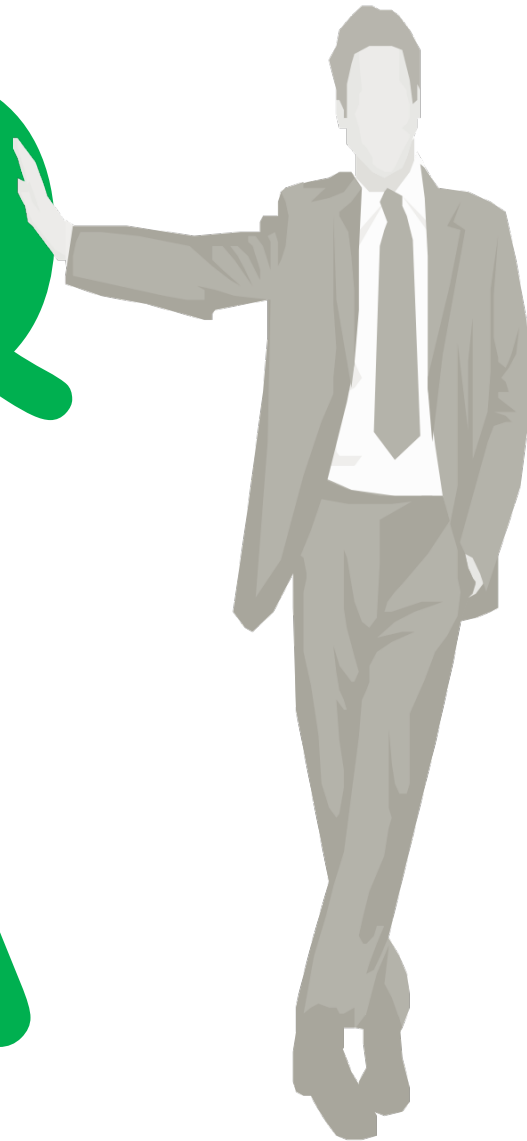
总体结论

湿地公园越冬黑颈鹤亚群与米林农场越冬黑颈鹤亚群很可能来自具有相同或相似的微生物背景栖息地。这两个亚群，可能从日喀则和拉萨河谷越冬的黑颈鹤亚群分离出来不久，虽然它们现在利用的是不同的越冬地，但很可能它们还在利用相同或相近的繁殖地。羌纳乡越冬黑颈鹤亚群虽然与其它两个越冬亚群在利用同一块越冬群（尼洋河河口及其40km以内的重点研究区域），但很可能在繁殖季节，利用的地理位置相对较远的繁殖栖息地，而且和贵州草海C越冬的黑颈鹤亚群，很可能在利用地理位置上相同以及微生物群落背景相近的繁殖栖息地。

Q

&

A



个人信息



作者：李来兴

电话：13897403516

邮箱：lxli@nwipb.cas.cn

单位：中国科学院西北高原
生物研究所

地址：青海省西宁市城西区新宁路23号
810008

Thank
you

End

☎ 13897403516

✉ lxli@nwipb.cas.cn

🌐 <http://nwipb.cas.cn>