



云南玉溪绿孔雀遗传多样性分析： 与圈养种群的比较

刘思霞^{1#} 张馨元^{1#} 晏鸣霄² 杜焯瑜³ 杨金城¹
 李广龙⁴ 官文渊⁵ 杨守庄^{6*} 徐艳春^{1,7*}

- (1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨, 150040;
2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 勐腊, 666303;
3. 浙江大学生命科学院, 杭州, 310058;
4. 国家林业和草原局林产工业设计院, 北京, 100010;
5. 衢州越鸟农业发展有限公司, 衢州, 324000;
6. 秦皇岛野生动物园, 秦皇岛, 066100;
7. 国家林业和草原局野生动物保护与利用工程技术研究中心, 哈尔滨, 150040)

稿件运行过程

收稿日期: 2022-02-25
 修回日期: 2022-04-07
 发表日期: 2022-11-10



关键词: 绿孔雀;
 遗传多样性;
 遗传结构;
 近交

Key words: Green peafowl (*Pavo muticus*);
 Genetic diversity;
 Genetic structure;
 Inbreeding

中图分类号: Q953
 文献标识码: A
 文章编号:
 2310-1490 (2022) 04-0943-12
 DOI: 10.12375/ysdwxb.20220409

摘要:

绿孔雀 (*Pavo muticus*) 是备受关注的濒危物种。我国南方曾广泛分布的云南亚种 (*P. m. imperator*) 目前收缩到中部、南部和西部的局部地区, 近年来陆续开展了野外种群调查, 但遗传多样性的分析和评估尚未开展。本研究利用从玉溪市新平和峨山交界处采集的野外绿孔雀自然脱落的羽毛, 采用 11 对微卫星标记分析遗传多样性和结构, 并与国内主要圈养种群 (建群者来自瑞丽地区和其他未确定的地点) 进行比较。结果表明: 该野生种群的遗传多样性较低, 受到近交的影响, 遗传多样性进一步丢失的风险较高。遗传结构上, 该野生种群和圈养种群的个体被划分为 3 个亚群, 野生种群作为独立的 1 个亚群, 在遗传上有别于圈养种群所含的 2 个遗传谱系, 说明云南省分布的绿孔雀有着显著而复杂的地理分化。当前需要开展系统的谱系地理学研究, 以加强族群之间的基因交流为目标, 通过生态廊道或个体转移等方式增加遗传交流的机会, 扭转遗传多样性随近交的深化而不断丢失的趋势。

Genetic Diversity Analysis of Green Peafowl in Yuxi, Yunnan, China: A Comparison with Captive Population

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金项目 (2572020DR10); 绿孔雀抢救专项基金项目 (2131101006); 高等学校学科创新引智计划项目 (B20088)

第一作者简介: 刘思霞, 女, 25 岁, 硕士研究生; 主要从事动物学研究。E-mail: 18236079953@163.com

#共同第一作者: 刘思霞; 张馨元

***通讯作者:** 杨守庄, E-mail: 1036944633@qq.com; 徐艳春, E-mail: xu_daniel@163.com

LIU Sixia^{1#} ZHANG Xinyuan^{1#} YAN Mingxiao² DU Hanyu³
YANG Jincheng¹ LI Guanglong⁴ GUAN Wenyuan⁵
YANG Shouzhuang^{6*} XU Yanchun^{1,7*}

(1. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;

2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, 666303, China;

3. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China;

4. Planning and Design Institute of Forest Products Industry, National Forestry and Grassland Administration, Beijing, 100010, China;

5. Quzhou Yueniao Agricultural Development Co., Ltd., Quzhou, 324000, China;

6. Qinhuangdao Wildlife Park, Qinhuangdao, 066100, China;

7. National Forestry and Grassland Administration Research Center of Engineering Technology for Wildlife Conservation and Utilization, Harbin, 150040, China)

Abstract: The green peafowl (*Pavo muticus*) is an endangered species that has attracted much attention of the world. The subspecies of *P. m. imperator*, which was once widely distributed in southern China, is now restricted to the central, southern and western regions of Yunnan Province. In recent years, field population surveys have been conducted successively, but analysis and evaluation of genetic diversity have not yet been carried out. In this study, the genetic diversity and structure of a wild population in the junction region of Xinping and Eshan in Yuxi City were analyzed by using shed feathers collected during field survey and 11 microsatellite markers. Genetic diversity of this population was also compared with the main captive population in China which were derived from wild ancestors in Ruili, Yunnan and other undetermined locations. The results showed that the genetic diversity of the wild population was markedly low due to local inbreeding and is risky of further loss. In terms of genetic structure, individuals of the wild and the captive population were sorted into three subgroups. The wild population was substantially distinct from the two subgroups contained in the captive population. Such divergence demonstrates that the green peafowl of Yunnan Province might have significant and complex geographical differentiation. These results suggest the primal necessity to carry out systematic phylogeographic studies to clarify genetic relationships among geographic populations and to identify evolutionary significant units. The population management of Yuxi population ought to target genetic exchange among local colonies to increase the opportunities of genetic communication by means of ecological corridors or individual transfer etc., so as to reverse the trend that genetic diversity loses with progressive inbreeding.

绿孔雀 (*Pavo muticus*) 是一种大型鸡形目 (Galliformes) 鸟类, 曾在中国南方^[1-2] 和东南亚^[3] 广泛分布, 并在世界各地成为民族文化的重要载体。绿孔雀被分为 3 个亚种, 即原产于马来西亚和爪哇的指名亚种 (*P. m. muticus*), 分布于印度东北部至缅甸西北部的印度亚种 (*P. m. spicifer*) 和分布于印支地区的云南亚种 (*P. m. imperator*)^[4]。在过去的半个多世纪里, 由于狩猎^[5-6]、栖息地退化和丧失^[5,7] 以及人类干扰^[8-9], 所有分布区的绿孔雀种群数量都显著下降, 2009 年绿孔雀被 IUCN 濒危物种红色名录列为濒危 (EN) 级 (<https://www.iucnredlist.org/species/22679440/131749282>)。

历史上, 绿孔雀在中国的分布很广, 包括湖南、湖北、四川、广西、广东、云南和西藏等地理范围^[10], 而今仅在云南省西部、中部和南部的 22 个县有所分布^[5]。1993 年, 实地调查记录的种群总数量在 800~1 100 只^[11], 此后下降到大约 500 只^[12], 最新调查为 235~280 只^[13]。我国境内的绿孔雀栖息地, 除了占种群数量 60% 以上的双柏和新平外, 近 60% 的分布区域都在过去的 30 年里相继消失, 而双柏和新平 2 个地区也面临着栖息地破碎化的风险^[5,14]。本研究借助云南省玉溪市新平和峨山交界处的羽毛样本, 分析该种群的遗传多样性, 为深入了解绿孔雀种群状况, 制定保护计划提供基本信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018—2019 年, 在云南省玉溪市新平与峨山交界处的野外调查中, 从自然栖息地共收集到 29 份羽毛样品 (图 1)。每份样品单独包装在一个纸质信封里, 标明收集地点和时间。羽毛样本编码为 YBD01~YBD29, 4 °C 保存, 命名为 YBD 种群。另外, 选择 9 只纯种绿孔雀 (编码 GP01~GP09) 和 6 只纯种蓝孔雀 (编码 BP01~BP06) 作为参考, 以鉴定羽毛所属物种。为了研究 YBD 种群与中国现有圈养种群之间的遗传关系, 从不同的养殖机构共采集了 33 份绿孔雀样品, 其中 16 只是从中国云南瑞丽捕获的野生绿孔雀的后代, 其余个体的地理来源不明。所有样品均为羽毛样品, 编码为 CAP01~CAP33。

1.2 DNA 提取

从每根羽毛上切下约 5 mg 的羽枝, 放入离心管中。向试管中加入约 1 000 μ L 2% SDS 溶液, 把羽毛没

入液面以下, 在 65 °C 的水浴中孵育 30 min。将羽毛样品转移到另一个含有 75% 乙醇的烧杯中漂洗 30 min, 再转移到含有 20 mL ddH₂O 的 50 mL 烧杯中, 振荡洗涤约 30 min。清洗干净的羽毛样品放在滤纸上自然干燥, 移入 1.5 mL 离心管中, 剪成小块备用。DNA 的提取按照 Volo 等^[15] 的方法, 消化时间为 2 d, 异丙醇沉淀冷冻 12 h, 冷冻离心 16 000 r/min 30 min。使用 Nanodrop 2000 C (Thermo Scientific, USA) 测定 DNA 的浓度, 并稀释至 ~15 ng/ μ L 用于 PCR 扩增。

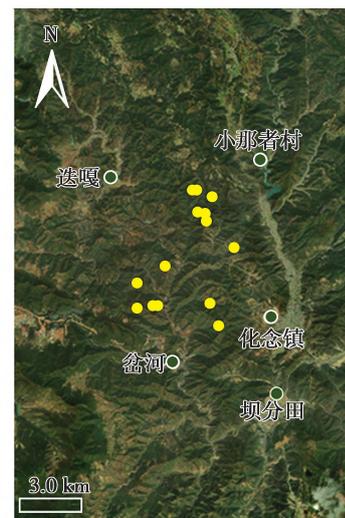


图 1 云南省玉溪市新平与峨山交界处孔雀羽毛的收集地点

Fig. 1 Geographic location of the collected feather samples in the juncture of Xinping and Eshan of Yuxi City, Yunnan Province, China

1.3 *Cyt b* 基因片段的扩增和测序

Cyt b 基因 PCR 扩增引物参考 Verma 等^[16] 使用的鸟类常用扩增引物 mcb398 (5'-TACCATGAGGACAAATATCATTCTG-3') 和 mcb869 (5'-CCTCCTAGTTTGTTAGGGATTGATCG-3')。采用 50 μ L 的 PCR 反应体系: DNA (~45 ng) 3 μ L, 上下游引物各 1 μ L (10 pmol/ μ L), 2 \times Easy Taq[®] PCR SuperMix (全式金生物技术有限公司) 25 μ L 和 ddH₂O 20 μ L。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 °C 终延伸 7 min, 4 °C 保存。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上 80 V 电泳 40 min, 用 AxyPrep[™] DNA Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收, 采用 Sanger 法双向测序, 用 DNASTAR 软件包上的 SeqMan Pro 对序列进行拼接^[17]。

1.4 微卫星的分型

参考 Du 等^[18] 的方法, 选择 PC3、PC19、PC25、

PC36、PC41、PC46、PC67、PC125、PC142、PC148、PC151、PC201、PC236、PC281^[19]、MCW0069 和 MCW0098^[20] 16 个微卫星位点对野生和圈养种群的样本分型, 上游引物的 5' 端用 FAM(蓝色)、JOE(绿色)和 TAMRA(黑色)3 种荧光素标记。PCR 反应体系均为 15 μL : DNA (~45 ng) 3 μL , 上、下游引物 (10 pmol/ μL) 各 1 μL , 2 \times Easy Taq[®] PCR SuperMix (全式金生物技术有限公司) 5 μL 和 ddH₂O 5 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s + T_a $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s + 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物在 3100x Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) 上电泳分离, 用 GeneMarker[®] 收集片段信号^[21]。为避免基因分型错误, 每个个体进行 3 次基因分型。

1.5 羽毛样品的母系物种鉴定

使用 MEGA 5.05 中的 Clustal W 程序^[22], 比较野外羽毛样品和已知绿孔雀、蓝孔雀的线粒体 *Cyt b* 基因序列, 确认它们的同源性, 用 EditSeq^[17] 将所有序列修剪到 421 bp。根据 Dinh 等^[23] 的建议, 用 MEGA 5.05^[22] 和 Kimura 2-parameter (K2P) 模型计算每个待测羽毛样本与已知纯种绿孔雀和蓝孔雀样本之间的遗传距离, 同时计算已知绿孔雀种内两两个体间的遗传距离 (intra-d) 与绿孔雀、蓝孔雀种间两两个体间的遗传距离 (inter-d), 这些遗传距离用于确定每个样本的母体物种起源。使用 IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. New York, USA) 检验每个羽毛样品与 2 组已知孔雀个体的遗传距离落入 intra-d 还是 inter-d 的范围 (95% 置信区间), 从而确定其所属物种; 用 MEGA 5.05 基于 K2P 距离构建系统发育树, 用 iTOL v4.4.2 (<https://itol.embl.de/>) 进行可视化。

1.6 个体识别

羽毛样本在野外捡拾, 可能存在同一个体多次重复, 因此在正式的种群分析之前, 需进行个体识别以确定真实样本量 (鸟类数量)。首先, 用 Micro-Checker v2.2.3^[24] 检测各个微卫星分型结果的无效等位基因的概率, 据此矫正等位基因和基因型频率, 用于进一步种群遗传分析。用 Gimlet Software v1.3.1^[25] 计算多位点的累积个体识别概率 (cumulative probability of identity, $P_{(ID)}$), 即 2 个无关个体或同胞之间在多个微卫星位点上基因型完全一致的可能性^[26]。为了消除种群结构的影响, 计算修正基因型相似概率 ($P_{(ID)biased}$); 考虑到样本中存在血缘关系的可能, 还计算了同胞或

亲子之间基因型相似概率 ($P_{(ID)sibs}$), 作为个体识别的最低可信度。最后, 用 Cervus 3.0 确认被鉴定为同一个体的多个样品是否在所有位点的基因型完全相同, 或者是符合最低接受标准: 仅在 1 个位点相差 1 个等位基因^[27]。

1.7 遗传多样性及种群遗传结构分析

使用 Popgene 1.32 计算观察等位基因数 (N_s)、有效等位基因数 (N_e)、观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e); 用 Cervus 3.0 计算 YBD 种群和 CAP 种群的每个微卫星位点的多态信息含量 (PIC); 用 Popgene 1.32 计算 2 个种群的种群近交系数 (fixation indices of subpopulation, F_{IS})、每个位点的遗传分化指数 (F_{ST})、基因流 (N_m , $N_m = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$)、Nei 氏遗传距离和遗传相似度, 并进行哈迪-温伯格平衡 (H-W) 检验。为了推断 YBD 和 CAP 种群之间的遗传分化程度, 用 Arlequin 3.5^[28] 计算 2 个群体之间的遗传分化指数 F_{ST} , 使用 STRUCTURE 2.3.1 分析种群的遗传结构^[29]。最佳 K 值 (理论种群数量) 和种群遗传结构图形结果使用在线软件 (<http://clumpak.tau.ac.il/>) 生成。

2 结果与分析

2.1 羽毛样品的母系物种鉴定

作为参考种群的已知绿孔雀 (GP) 和蓝孔雀 (BP) 的种间遗传距离 (inter-d) 为 3.43% ~ 3.68%, 95% 的置信区间为 [3.41% ~ 3.61%]; 参考绿孔雀种群种内遗传距离 (intra-d) 为 0 ~ 0.72%, 95% 的置信区间为 [0.26% ~ 0.46%]。羽毛样品和已知绿孔雀之间的 K2P 距离为 0.120 ~ 0.602, 均落入 intra-d 的 95% 的置信区间, 而与蓝孔雀的 K2P 距离在 3.531% ~ 3.788%, 落入 inter-d 的 95% 的置信区间, 且在 intra-d 的 95% 的置信区间之外 (表 1)。系统发育树显示 29 个羽毛样品都与绿孔雀聚为一支 (图 2), Bootstrap 支持度为 0.493 ~ 1.000。结果表明, 所有的羽毛样品的母系均为绿孔雀。

2.2 羽毛样本的个体识别

Micro-Checker 在 PC36、PC67、PC125、MCW0069 和 MCW0098 这 5 个位点检测到无效等位基因。为了保证个体识别结果的可靠性, 后续分析中把这 5 个位点舍去, 保留未检测到无效等位基因的其余 11 个位点, 即 PC46、PC148、PC151、PC142、PC19、PC236、PC41、PC25、PC281、PC201 和 PC3。图 3 显示,

累积 $P_{(ID)}$ 值随着位点数的增加而下降。分子生态
 学研究中常以 $P_{(ID)}$ 值在 0.001 0 ~ 0.000 1 为同一
 性认定标准, 即累积 $P_{(ID)}$ 达到 0.001 0 或 0.000 1
 以下时, 如果这 2 个样品具有不同的基因型, 则可
 判定为来自不同的个体^[30]。本研究数据显示, 当
 微卫星位点数达到 8 个时, $P_{(ID)sibs}$ 的联合 $P_{(ID)}$ 达到

0.000 963, 而对于相同的 8 个位点, $P_{(ID)biased}$ 的联合
 $P_{(ID)}$ 达到 0.000 000 036 49。当位点更多时, 累积
 $P_{(ID)}$ 会进一步下降, 增加基因型错配的机会, 影响个
 体识别结果的准确性^[30] (图 3)。同时考虑到绿孔雀在
 野外的稀有性, 数值小于 0.001 0 的联合 $P_{(ID)}$ 足以可
 靠地识别个体。

表 1 以 421 bp 的 *Cyt b* 基因序列估算的羽毛样品 YBD01 ~ 29 与纯种绿孔雀 (GP) 和蓝孔雀 (BP) 之间的 K2P 遗传距离

Tab. 1 The K2P genetic distance between the each of feather samples YBD01-29 and the reference samples of
 green (GP) and blue peafowl (BP) as inferred from 421 bp sequence of *Cyt b* gene

样本编号 Sample ID	K2P 遗传距离/% (平均值 ± 标准差) K2P distances (mean ± SD)		根据 95% 的置信区间判断遗传距离落在 inter-d 或 intra-d The 95% CI where the K2P difference between inter-d and intra-d distances fell in	t 值 t value	P 值 P value
	To BP	To GP			
YBD01	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD02	To BP	3.531 ± 0.001	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.278	intra-d		
YBD03	To BP	3.531 ± 0.001	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.278	intra-d		
YBD04	To BP	3.531 ± 0.002	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.279	intra-d		
YBD05	To BP	3.788 ± 0.000	inter-d	56.530	0.000
	To GP	0.359 ± 0.279	intra-d		
YBD06	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD07	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD08	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD09	To BP	3.549 ± 0.000	inter-d	56.518	0.000
	To GP	0.121 ± 0.279	intra-d		
YBD10	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD11	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	47.595	0.000
	To GP	0.602 ± 0.283	intra-d		
YBD12	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	47.595	0.000
	To GP	0.602 ± 0.283	intra-d		
YBD13	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		

续表 1

样本编号 Sample ID	K2P 遗传距离/% (平均值 ± 标准差) K2P distances(mean ± SD)		根据 95% 的置信区间判断遗传距离落在 inter-d 或 intra-d The 95% CI where the K2P difference between inter-d and intra-d distances fell in	t 值 t value	P 值 P value
	To BP	To GP			
YBD14	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD15	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD16	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD17	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD18	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD19	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD20	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD21	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD22	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD23	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD24	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD25	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD26	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD27	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD28	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		
YBD29	To BP	3.531 ± 0.000	inter-d	56.505	0.000
	To GP	0.120 ± 0.277	intra-d		

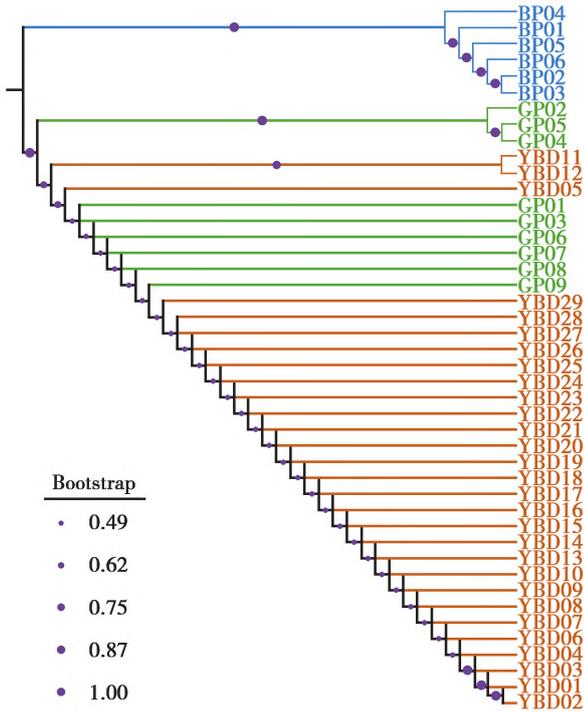


图2 基于 *Cyt b* 基因 421 bp 序列的 K2P 遗传距离所做的 NJ 系统发育树显示羽毛样品(橙色)、纯种绿孔雀(绿色)和纯种蓝孔雀(蓝色)的关系

Fig. 2 The NJ tree of feather samples (orange) and reference samples of the green (green) and blue peafowl (blue) based on K2P genetic distance inferred from 421 bp sequence of *Cyt b* gene

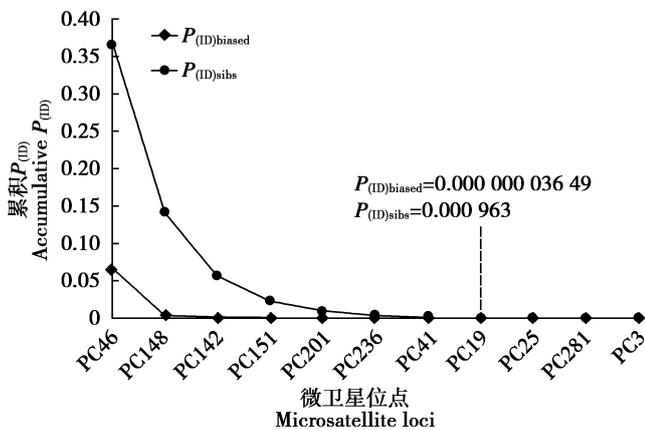


图3 微卫星位点累积 $P_{(ID)}$ 的变化趋势

Fig. 3 The declining trend of cumulative probability of identity ($P_{(ID)}$) with addition of microsatellite loci

用 8 个微卫星位点通过 Cervus 软件进行个体识别, 结果显示羽毛样本中 YBD10 和 YBD25、YBD11 和 YBD27、YBD23 和 YBD24 在 8 个位点上基因型相同, 或者仅在 1 个位点上只有 1 个等位基因不同, 其余样品显示 1 个以上等位基因的错配(附录 1)。最后, 确定野外绿孔雀样本为 26 只。

2.3 YBD 和 CAP 种群的遗传多样性

利用 Popgene 检测了 YBD 种群和 CAP 种群在 11 个微卫星位点的种群遗传学参数。YBD 种群的 N_a 为 2~8 个, 平均为 (4.727 ± 2.328) 个; CAP 种群的 N_a 为 2~6 个, 平均为 (4.091 ± 1.300) 个; YBD 种群和 CAP 种群之间等位基因频率差异为 0~0.846。2 个种群之间 N_a 在 PC46 上差异最大, YBD 种群有 8 个等位基因, 而 CAP 种群只有 4 个。总的来说, N_a 在 YBD 种群中比在 CAP 种群中更多(表 2)。

表 3 显示, YBD 种群中 N_e 的数量为 1.039~5.240, 平均为 (2.768 ± 1.294) , 而 CAP 种群 N_e 的数量为 1.095~3.828, 平均为 (2.434 ± 0.818) 。在 2 个种群中, 所有位点的 N_a 都显著大于 N_e , 表明 2 个种群都面临遗传多样性丧失的风险。YBD 种群的平均 H_o 和平均 H_e 分别为 (0.258 ± 0.164) 和 (0.546 ± 0.251) ; CAP 种群平均 H_o 和平均 H_e 分别为 (0.479 ± 0.228) 和 (0.531 ± 0.201) 。哈迪-温伯格平衡(H-W)检验表明, YBD 种群中有 2 个位点(PC3 和 PC25)处于平衡状态($P > 0.05$), 其余 9 个位点显著偏离平衡状态($P < 0.05$); 相比之下, CAP 种群中有 7 个位点处于平衡状态($P > 0.05$), 其余 4 个位点(PC201、PC236、PC148 和 PC151)表现出显著偏离($P < 0.05$)。这 11 个位点在 YBD 和 CAP 种群中的平均 PIC 分别为 (0.493 ± 0.242) 和 (0.489 ± 0.177) 。YBD 种群的 F_{IS} 在 0.720 (PC236) ~ -0.405 (PC25), 平均值为 (0.456 ± 0.357) , 2 个位点的 $F_{IS} < 0$, 9 个位点的 $F_{IS} > 0$, 表明存在近亲繁殖的趋势; CAP 种群的 F_{IS} 在 0.441 (PC151) ~ -0.199 (PC25), 平均值为 (0.102 ± 0.217) , 5 个位点的 $F_{IS} < 0$, 6 个位点的 $F_{IS} > 0$, 表明近亲繁殖趋势不明显(表 4)。

2.4 种群遗传分化与遗传结构分析

11 个位点遗传分化指数 F_{ST} 的平均值为 0.138。根据 Wright 的分类标准^[26], 3 个位点(PC41、PC25 和 PC236)遗传分化程度较大($F_{ST} > 0.150$), 6 个位点(PC281、PC46、PC151、PC201、PC19 和 PC148)处于中度分化状态($0.050 < F_{ST} < 0.150$), 2 个位点(PC3 和 PC142)处于低度分化状态($F_{ST} < 0.050$)。2 个种群间每个微卫星座位的基因流(N_m)为 0.373~7.566, 平均为 1.564(表 4); 2 个种群之间的 F_{ST} 为 0.223, 表明种群间有较大程度的遗传分化。YBD 种群与 CAP 种群 Nei 氏遗传距离为 0.452, 遗传相似度为 0.637。

表 2 11 个微卫星位点在 YBD 和 CAP 种群中的等位基因和等位基因频率
 Tab. 2 Alleles and allele frequencies of 11 microsatellites in the YBD and CAP populations

种群 Populations	等位基因编号 Alleles number	等位基因频率 Allele frequencies										
		PC3	PC142	PC281	PC148	PC201	PC151	PC46	PC19	PC41	PC25	PC236
YBD	1	0	0.020	0.039	0.438	0	0	0.019	0.096	0.039	0.289	0
	2	0.981	0.140	0.173	0.063	0.308	0.346	0.039	0.231	0.615	0.711	0.039
	3	0.019	0.440	0.789	0.083	0.596	0.269	0.173	0.404	0.039	0	0.039
	4	—	0.040	—	0.021	0	0.154	0.250	0.269	0.308	0	0.846
	5	—	0.060	—	0	0.096	0.019	0.115	—	0	—	0
	6	—	0.140	—	0.083	—	0.039	0.269	—	—	—	0.077
	7	—	0.160	—	0.104	—	0.096	0.096	—	—	—	0
	8	—	—	—	0.208	—	0.039	0.039	—	—	—	—
	9	—	—	—	0	—	0.039	0	—	—	—	—
CAP	1	0.076	0	0.046	0	0.136	0.015	0	0.333	0	0	0.030
	2	0.864	0.318	0	0	0.197	0.152	0	0.152	0.076	0.182	0
	3	0.061	0.424	0.955	0	0.333	0.591	0	0.515	0.455	0.727	0
	4	—	0.182	—	0.015	0.303	0.167	0	0	0.439	0.091	0
	5	—	0.061	—	0.152	0.030	0.015	0.394	—	0.030	—	0.258
	6	—	0.015	—	0.136	—	0.061	0.273	—	—	—	0.621
	7	—	0	—	0.530	—	0	0	—	—	—	0.091
	8	—	—	—	0.136	—	0	0.303	—	—	—	—
	9	—	—	—	0.030	—	0	0.030	—	—	—	—

表 3 YBD 和 CAP 种群在 11 个微卫星位点上的种群遗传学参数

Tab. 3 Population genetic parameters of 11 microsatellite loci in YBD and CAP populations of green peafowl

种群 Population	位点 Locus	种群遗传学参数 Population genetic parameters					
		N_a /个	N_e	H-W	H_o	H_e	PIC
YBD	PC3	2	1.039	NS	0.039	0.039	0.037
	PC201	3	2.177	**	0.192	0.551	0.465
	PC236	4	1.380	*	0.077	0.281	0.262
	PC281	3	1.531	*	0.115	0.354	0.308
	PC25	2	1.696	NS	0.577	0.419	0.326
	PC41	4	2.099	*	0.231	0.534	0.449
	PC19	4	3.355	**	0.423	0.716	0.648
	PC142	7	3.788	*	0.320	0.751	0.705
	PC46	8	5.240	*	0.423	0.825	0.783
	PC148	7	3.790	**	0.208	0.752	0.705
	PC151	8	4.347	**	0.231	0.785	0.737
平均值 Mean		4.727 ± 2.328	2.768 ± 1.294		0.258 ± 0.164	0.546 ± 0.251	0.493 ± 0.242

续表 3

种群 Population	位点 Locus	种群遗传学参数 Population genetic parameters					
		N_a /个	N_e	H-W	H_o	H_e	PIC
CAP	PC3	3	1.324	NS	0.152	0.248	0.231
	PC201	5	3.828	*	0.758	0.750	0.693
	PC236	4	2.167	**	0.394	0.547	0.479
	PC281	2	1.095	NS	0.091	0.088	0.083
	PC25	3	1.754	NS	0.515	0.436	0.385
	PC41	4	2.461	NS	0.576	0.603	0.509
	PC19	3	2.503	NS	0.455	0.610	0.524
	PC142	5	3.143	NS	0.788	0.692	0.624
	PC46	4	3.103	NS	0.697	0.688	0.612
	PC148	6	2.920	*	0.515	0.668	0.620
	PC151	6	2.475	*	0.333	0.605	0.556
平均值 Mean		4.091 ± 1.300	2.434 ± 0.818		0.479 ± 0.228	0.531 ± 0.201	0.489 ± 0.177

注: N_a 为等位基因数; N_e 为有效等位基因数; H_o 为观测杂合度; H_e 为期望杂合度; PIC 为多态信息含量; H-W 为哈德-温伯格平衡; * 表示显著性差异 ($P < 0.05$); ** 表示极显著差异 ($P < 0.01$); NS 表示无显著性差异

Note: N_a is the observed number of alleles. N_e is the effective number of alleles. H_o is observed heterozygosity. H_e is expected heterozygosity. PIC is polymorphism information content. H-W is Hardy-Weinberg equilibrium. * stands for significant difference ($P < 0.05$). ** stands for extremely significant difference ($P < 0.01$). NS stands for no significant difference

表 4 YBD 和 CAP 绿孔雀种群的 11 个微卫星位点的 F 检验结果

Tab. 4 F tests of 11 microsatellite loci for YBD and CAP green peafowl populations

位点 Locus	种群 Population	F_{IS}	F_{ST}	N_m	位点 Locus	种群 Population	F_{IS}	F_{ST}	N_m
PC3	YBD	-0.020	0.036	6.670	PC46	YBD	0.477	0.078	2.949
	CAP	0.381				CAP	-0.029		
PC142	YBD	0.565	0.032	7.566	PC19	YBD	0.397	0.054	4.418
	CAP	-0.156				CAP	0.243		
PC281	YBD	0.667	0.062	3.765	PC41	YBD	0.559	0.178	1.154
	CAP	-0.048				CAP	0.030		
PC148	YBD	0.717	0.106	2.100	PC25	YBD	-0.405	0.349	0.466
	CAP	0.217				CAP	-0.199		
PC201	YBD	0.644	0.071	3.262	PC236	YBD	0.720	0.401	0.373
	CAP	-0.026				CAP	0.269		
PC151	YBD	0.700	0.054	4.418	平均值 Mean	YBD	0.456 ± 0.357	0.138	1.564
	CAP	0.441			CAP	0.102 ± 0.217			

在进行种群遗传结构分析时, 预设 K 值 (理论种群数) 为 2~4, 每个 K 值重复运算 10 次, $K = 3$ 时的 ΔK 最大, 表明本研究中所有参试个体可划分为 3 个种群 (图 4): CAP 种群可划分为 2 个亚群 (红色和

绿色), 而 YBD 种群为单一亚群 (蓝色), 2 个 CAP 亚群的遗传成分占比很小。这说明 CAP 种群可能由来自不同地理区域的祖先发展而来, 而 2 个亚群之间的基因交流十分有限。同时, CAP 种群的祖先并非来自

YBD 种群。

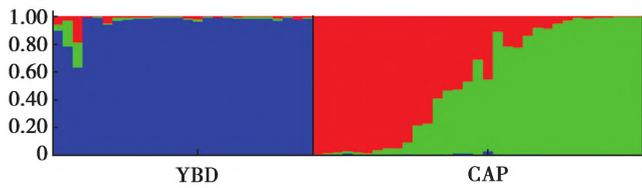


图4 YBD 和 CAP 种群的 STRUCTURE 分析 ($K=3$)

Fig. 4 STRUCTURE analysis of YBD and CAP populations ($K=3$)

3 讨论

3.1 羽毛样品的物种鉴定和个体识别

云南省各地蓝孔雀的养殖比较多,有研究怀疑养殖的蓝孔雀发生逃逸,并在野外建立了种群^[13,31],因此,首先需要鉴定羽毛是否来自绿孔雀。物种鉴定采用母系遗传的线粒体 DNA,如果母系来源于蓝孔雀,排除在后续研究;母系属于绿孔雀的样品,仍需采用核 DNA 鉴定其核基因组是否来自绿孔雀。*Cyt b* 基因片段鉴定母系物种是野生动物法医学鉴定的标准遗传标记^[18]。鉴定时以转换(transition, Ts)为碱基替换模式计算 K2P 遗传距离,以种间和种内的 K2P 距离范围为参照^[23],考察羽毛样品与已知纯种绿孔雀和蓝孔雀之间的距离,落在种内还是种间的范围内,95% 的可信度确定其属于绿孔雀还是蓝孔雀;同时也用 K2P 遗传距离构建 NJ 系统发育树,通过 Bootstrap 再次考察其属于哪个物种,本研究 2 种方法都一致支持所有羽毛样本的母系来源均为绿孔雀(表 1,图 2)。

核基因的鉴定中,高质量 DNA 正常分型的 16 个位点^[18],有 5 个检测到无效等位基因,说明从角化的羽翎获得的 DNA 质量较低,对核基因的分型质量有明显的影 响。采用 11 个分析正常的位点计算累积 $P_{(10)}$,随着位点的增加,累积 $P_{(10)}$ 下降的速度(图 3),选定 8 个位点即可满足个体识别可靠性的评估,又能减少分型误差带来的影响。最终以极高的可信度从 29 份样品中鉴定了 26 个个体。

3.2 YBD 种群的遗传多样性

YBD 种群的 N_a 为 2~8 个,平均为 4.727 个,说明表观上含有的遗传变异较多,但是 N_e 平均值只有 2.768,大多数位点(9/11)都显著偏离 H-W,这意味着强烈的遗传漂变和非随机交配将拉高遗传多样性丢失的风险。相比而言,CAP 种群的 N_a 为 2~6 个,平均为 4.091 个, N_e 平均为 2.434,均明显地低于 YBD 种群,11 个位点中有 7 个处于 H-W 状态,表明遗传多样性丢失的风险小于 YBD 种群。

2 个种群的杂合度都不高,CAP 种群的 H_o 平均为 0.479,而 YBD 种群的 H_o 只有 0.258,说明遗传多样性很低;2 个种群的 H_e 都高于各自的 H_o ,表明杂合度低于预期主要源自近交。种群近交系数(F_{IS})进一步印证这一点,YBD 种群的近交程度(平均 0.456)明显高于 CAP 种群(平均 0.102)。绿孔雀野外种群以小规模家族群为主^[11,32],YBD 种群很可能因为生境中的隔离因素导致族群间的基因交流困难,繁殖以局部近交为主。STRUCTURE 分析显示,YBD 种群内部没有发生显著的遗传分化(图 4)。种群历史上的基因交流是比较频繁而有效的,表现出来的近交并非是生境中景观异质性形成长期的隔离,而是近期才出现的。

3.3 YBD 种群与 CAP 种群的遗传关系

STRUCTURE 分析表明(图 4),CAP 种群包含 2 个遗传谱系,一个是以秦皇岛野生动物园饲养的绿孔雀为代表,最初建群者来自瑞丽地区;另一个谱系的建群者来源地没有可靠的记录。瑞丽地区、玉溪地区和 CAP 种群中的第 2 个谱系的绿孔雀之间有着极其明显的遗传分化,预示着整个云南种群的内部可能遗传结构非常复杂,甚至有着深度的分化。

4 结论与建议

本研究显示我国云南绿孔雀的地理分化可能非常显著,需要开展系统的谱系地理学研究,厘清各地种群之间的遗传关系,确认进化显著单元。在开展迁地保护时,避免通过再引入打破进化显著单元的独特性。具体到玉溪地区的种群,内部没有显著的遗传分化,遗传多样性水平较低,近期的近交可能导致遗传多样性的进一步丢失。管理上以加强族群之间的基因交流为目标,通过生态廊道的修建,或在不同族群之间进行个体转移,增加遗传交流的机会,扭转遗传多样性随近交的深化而不断丢失的趋势。

致谢:感谢秦皇岛野生动物园和中国科学院西双版纳热带植物园提供研究样品。

参考文献:

- [1] 杨岚. 云南鸟类志:上卷:非雀形目 [M]. 昆明:云南科技出版社,1994.
YANG L. The avifauna of Yunnan China: Vol. 1: non-passeriformes [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1994.
- [2] 何业恒. 中国珍稀鸟类的历史变迁 [M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1994.

- HE Y H. Historical changes of rare birds in China [M]. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 1994.
- [3] STRESEMANN E. The pheasants of the world. Jean Delacour [J]. Quarterly Review of Biology, 1953, 28(3): 303.
- [4] 王方, 汤永晶, 张巧关, 等. 云南省新平县野生绿孔雀种群数量及分布现状 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59(12): 129–133; 144.
- WANG F, TANG Y J, ZHANG Q G, et al. The population and distribution status of wild green peafowl in Xiping County, Yunnan Province [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(12): 129–133; 144.
- [5] KONG D J, WU F, SHAN P F, et al. Status and distribution changes of the endangered green peafowl (*Pavo muticus*) in China over the past three decades (1990s–2017) [J]. Avian Research, 2018, 9(2): 102–110.
- [6] BRICKLE N W, DUCKWORTH J W, TORDOFF A W, et al. The status and conservation of Galliformes in Cambodia, Laos and Vietnam [J]. Biodiversity and Conservation, 2008, 17(6): 1393–1427.
- [7] MCGOWAN P J K, DUCKWORTH J W, WEN X J, et al. A review of the status of the green peafowl *Pavo muticus* and recommendations for future action [J]. Bird Conservation International, 1998, 8(4): 331–348.
- [8] SUKUMAL N, GRAINGER M J, SAVINI T. Lower levels of human disturbance correspond with longer-term persistence of endangered green peafowl *Pavo muticus* populations [J]. Bird Conservation International, 2020, 30(2): 210–219.
- [9] SARIDNIRUN G, SUKUMAL N, GRAINGER M J, et al. Living with human encroachment: status and distribution of green peafowl in Northern Stronghold of Thailand [J]. Global Ecology and Conservation, 2021, 28: e01674.
- [10] 单鹏飞, 董锋, 王洁, 等. 中国绿孔雀及其保护现状 [J]. 西部林业科学, 2021, 50(5): 101–107.
- SHAN P F, DONG F, WANG J, et al. Green peafowl and its conservation status in China [J]. Western Forestry Sciences, 2021, 50(5): 101–107.
- [11] 文贤继, 杨晓君, 韩联宪, 等. 绿孔雀在中国的分布现状调查 [J]. 生物多样性, 1995, 3(1): 46–51.
- WEN X J, YANG X J, HAN L X, et al. Investigations on the current status of the distribution of green peafowl in China [J]. Chinese Biodiversity, 1995, 3(1): 46–51.
- [12] 文云燕, 谢以昌, 李学红. 恐龙河州级自然保护区绿孔雀监测探讨 [J]. 林业调查规划, 2016, 41(4): 69–71.
- WEN Y Y, XIE Y C, LI X H. Monitoring of green peacock in Dinosaur River State Nature Reserve [J]. Forest Inventory and Planning, 2016, 41(4): 69–71.
- [13] 滑荣, 崔多英, 刘佳, 等. 中国绿孔雀种群现状调查 [J]. 野生动物学报, 2018, 39(3): 681–684.
- HUA R, CUI D Y, LIU J, et al. The status and distribution of green peafowl (*Pavo muticus imperator*) in China [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2018, 39(3): 681–684.
- [14] YAN M X, GU B J, ZHANG M X, et al. The range contraction and future conservation of green peafowl (*Pavo muticus*) in China [J]. Sustainability, 2021, 13(21): 11723.
- [15] DE VOLO S B, REYNOLDS R T, DOUGLAS M R, et al. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers [J]. The Condor, 2008, 110(4): 762–766.
- [16] VERMA S K, SINGH L. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application [J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3(1): 28–31.
- [17] BURLAND T G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software [M] // MISENER S, KRAWETZ S A. Bioinformatics methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2000: 71–91.
- [18] DU H Y, ZHANG X Y, DINH T D, et al. Identification of hybrid green peafowl using mitochondrial and nuclear markers [J]. Conservation Genetics Resources, 2020, 12: 669–683.
- [19] HALE M L, PETRIE M, WOLFF K. Polymorphic microsatellite loci in peafowl (*Pavo cristatus*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 528–530.
- [20] 包文斌, 陈国宏, 束婧婷, 等. 孔雀微卫星引物筛选及其遗传多样性分析 [J]. 遗传, 2006, 28(10): 1242–1246.
- BAO W B, CHEN G H, SHU J T, et al. Screening of peafowl microsatellite primers and analysis of genetic diversity [J]. Hereditas, 2006, 28(10): 1242–1246.
- [21] JOHATHAN LIU C S, HULCE D, LI X, et al. GeneMarker[®] genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis [J]. Journal of Biomolecular Techniques, 2011, 22(Suppl. 1): S35–S36.
- [22] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [23] DINH T D, NGATIA J N, CUI L Y, et al. Influence of pairwise genetic distance computation and reference sample size on the reliability of species identification using *Cyt b* and *CO I* gene fragments in a group of native passerines [J]. Forensic Science International: Genetics, 2019, 40: 85–95.
- [24] VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINSON W F, WILLS D P M, et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 535–538.
- [25] VALIÈRE N. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data [J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2: 377–379.
- [26] WRIGHT S. Evolution in Mendelian populations [J]. Bulletin of Mathematical Biology, 1990, 52(1/2): 241–295.
- [27] BELLEMAIN E, SWENSON J E, TALLMON D, et al. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears [J]. Conservation Biology, 2005, 19(1): 150–161.
- [28] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data a-

- analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005, 1: 47–50.
- [29] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945–959.
- [30] WAITS L P, LUIKART G, TABERLET P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(1): 249–256.
- [31] 顾伯健, 王放. 野生绿孔雀生态学及保护生物学研究进展 [J]. *生物多样性*, 2021, 29(11): 1554–1564.
- GU B J, WANG F. A review on the ecology and conservation biology of green peafowl (*Pavo muticus*) [J]. *Biodiversity Science*, 2021, 29(11): 1554–1564.
- [32] LI S H, CUI D Y, HUA R, et al. An estimation of the current population size of green peafowl (*Pavo muticus imperator*) in China [J]. *野生动物学报*, 2020, 41(4): 1080–1084.
- LI S H, CUI D Y, HUA R, et al. An estimation of the current population size of green peafowl (*Pavo muticus imperator*) in China [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2020, 41(4): 1080–1084.

附录1 云南玉溪绿孔雀种群的SSR分型结果

Appendix 1 SSR typing results of green peafowl population in Yuxi, Yunnan

个体 Individual	PC281	PC41	PC46	PC3	PC151	PC201	PC19	PC25	PC142	PC148	PC236	PC36	PC67	PC125	MCW0069	MCW0098
YBD01	112/112	155/155	178/178	207/207	87/87	105/107	134/134	105/107	134/134	181/181	133/133	196/196	182/182	229/229	140/140	239/239
YBD02	112/112	151/155	178/178	207/207	85/91	107/107	132/134	105/107	124/124	181/183	137/137	196/196	182/182	229/229	140/140	257/259
YBD03	112/112	151/151	172/174	207/207	85/95	107/107	128/130	105/107	126/126	181/181	133/133	196/196	182/182	229/229	150/150	239/239
YBD04	112/112	155/155	174/174	207/207	87/91	107/107	130/130	107/107	126/126	197/197	133/133	196/196	182/182	229/229	158/158	239/239
YBD05	112/112	151/151	176/178	207/207	85/85	107/107	132/134	107/107	124/126	181/181	133/137	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD06	112/112	151/153	180/180	207/207	103/103	107/107	132/134	105/107	130/130	?/?	133/133	196/196	182/182	229/229	158/164	239/239
YBD07	112/112	151/151	176/178	207/207	85/85	107/107	134/134	105/107	126/126	183/183	133/137	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD08	112/112	155/155	180/182	207/209	91/91	105/105	132/132	107/107	126/126	201/201	133/133	196/196	182/182	229/229	140/140	239/239
YBD09	112/112	151/153	172/172	207/207	87/87	111/111	132/132	105/107	128/128	181/181	131/131	198/198	182/182	229/229	164/164	257/257
YBD10	110/110	151/151	178/182	207/207	101/101	107/111	132/132	105/107	124/124	199/201	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD11	112/112	151/151	180/180	207/207	85/85	105/107	132/132	105/107	126/132	181/181	133/133	198/198	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD12	110/110	151/155	174/174	207/207	85/97	105/107	130/130	107/107	126/132	199/199	133/133	196/196	182/182	229/229	156/164	239/239
YBD13	112/112	151/155	178/178	207/207	87/87	105/107	134/134	105/107	134/134	181/181	133/133	196/198	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD14	108/110	155/155	172/174	207/207	91/91	105/105	130/134	107/107	134/134	181/181	133/133	196/196	178/178	231/231	164/164	239/239
YBD15	112/112	151/151	170/170	207/207	97/97	107/107	134/134	107/107	?/?	199/201	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	257/257
YBD16	112/112	151/151	176/176	207/207	85/85	105/105	128/130	107/107	126/132	181/181	129/129	196/196	182/182	231/231	164/164	239/239
YBD17	110/110	151/151	174/176	207/207	87/87	107/107	128/128	105/107	124/132	191/197	133/133	196/198	182/182	229/229	140/140	239/239
YBD18	112/112	149/149	176/178	207/207	85/85	111/111	130/130	107/107	126/132	185/185	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	259/259
YBD19	112/112	151/151	166/172	207/207	87/87	105/105	132/134	107/107	122/124	185/185	133/133	196/196	182/182	229/231	164/164	239/239
YBD20	112/112	151/151	174/174	207/207	85/95	107/107	128/130	105/107	126/126	181/181	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	257/257
YBD21	112/112	151/155	174/174	207/207	85/85	107/107	132/132	105/107	126/126	197/199	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD22	112/112	151/151	178/178	207/207	97/97	107/107	132/132	107/107	126/126	201/201	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD23	110/112	155/155	172/174	207/207	87/93	107/107	130/132	105/107	132/132	201/201	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD24	112/112	155/155	172/174	207/207	87/93	107/107	130/132	105/107	132/132	201/201	133/133	198/198	182/182	231/231	164/164	239/239
YBD25	110/110	151/151	178/182	207/207	101/101	107/111	132/132	105/107	124/124	199/201	133/133	196/198	182/182	229/229	164/164	?/?
YBD26	112/112	151/151	172/172	207/207	85/85	105/105	132/132	105/107	126/126	201/201	133/133	196/196	182/182	229/229	156/164	239/239
YBD27	112/112	151/151	180/180	207/207	85/85	105/107	132/132	105/107	?/?	181/181	133/133	196/196	182/182	229/229	164/164	239/239
YBD28	112/112	151/151	178/178	207/207	87/87	107/107	132/134	105/107	126/130	?/?	133/133	196/196	182/182	231/231	164/164	239/239
YBD29	108/110	155/155	172/174	207/207	91/91	105/105	130/132	107/107	134/134	181/181	133/133	196/198	174/174	229/229	140/140	239/239