

3种鸫科鸟类的性别鉴定研究

王东权¹, 刘丽¹, 安博洋¹, 李波^{1,2,3*} (1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 国家林业和草原局野生动植物检测中心, 黑龙江哈尔滨 150040; 3. 国家林业和草原局野生动植物保护与利用工程技术研究中心, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 通过形态学与分子生物学方法对3种鸫科(Turdidae)鸟类赤颈鸫(*Turdus ruficollis*)、红尾鸫(*Turdus naumanni*)、斑鸫(*Turdus eunomus*)进行性别鉴定。以CHD基因性别鉴定为基准,讨论形态学与微卫星性别鉴定的准确率与可行性。结果表明,3种鸫科鸟类中赤颈鸫能够通过形态学进行性别鉴定,其准确率为0.89%;红尾鸫与斑鸫的性别鉴定准确率仅为0.57%和0.38%,无法通过形态学进行有效的性别鉴定。形态学性别鉴定存在局限性,受鸟类年龄、季节、地区的影响明显,并且对个体特征不清晰或个体残缺样本不能进行有效鉴定。此次试验中99只个体仅73只具有完整形态,剩余个体只能通过分子生物学方法进行性别鉴定。微卫星鉴定与CHD基因性别鉴定结果存在不一致的现象,总体准确率仅0.88%,且鉴定错误的12只个体均是将雄性鉴定为雌性,原因可能是该微卫星位点跨物种使用时与性别连锁度降低。相较于微卫星鉴定需要毛细管电泳分型,CHD基因性别鉴定方法只需要对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,该鉴定方法更简便、成本更低。

关键词 鸫科鸟类;性别鉴定;形态学;微卫星;CHD基因

中图分类号 Q953

文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)15-0092-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.15.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Sex Identification of Three Species of Turdidae

WANG Dong-quan, LIU Li, AN Bo-yang et al (College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract The genders of three species of Turdidae birds (*Turdus ruficollis*, *Turdus naumanni*, and *Turdus eunomus*) were identified by morphological and molecular biological methods. Based on the sex identification of CHD gene, the accuracy and feasibility of morphological and microsatellite sex identification were discussed. The results showed that the red necked thrush could be identified by morphology with an accuracy of 0.89%, while the red tailed thrush and spotted thrush with an accuracy of only 0.57% and 0.38%, which could not be identified by morphology. There were limitations in morphological sex identification, which was obviously affected by the age, season and region of birds, and for the individual characteristics were not clear or individual incomplete samples could not be effectively identified. Only 73 of the 99 birds in this experiment had complete morphology, and the rest could only be identified by molecular biological methods. The results of microsatellite identification and sex identification of CHD gene were inconsistent, the overall accuracy was only 0.88%, and the 12 birds identified incorrectly were all male samples identified as female, which might be due to the decrease of sex linkage when the microsatellite site was used across species. Microsatellite identification needed capillary electrophoresis typing. While the CHD gene identification method only needed agarose gel electrophoresis for the amplified products. This method was simpler and cheaper.

Key words Turdidae birds; Sex identification; Morphology; Micro-satellite; CHD gene

鸟类性别鉴定是研究鸟类性比关系、种群结构和行为差异的基础,在鸟类的种群动态与种群保护方面具有重要的意义。鸫科鸟类是世界上分布最广的鸟类之一,除南极和新西兰外,遍布全世界。在我国境内,它们分布广泛、数量众多,是最为常见的鸟类之一^[1]。对鸫科鸟类进行性别鉴定能推测物种生存的现状并预期鸫科鸟类种群数量变化。

鸟类的性别鉴定有多种方法,如生殖腺与泄殖腔镜检查法或传统的形态学鉴定法^[2-3]。前者对鸟类有伤害,可能导致鸟类伤亡^[4];后者可以避免伤害鸟类的同时,减少试验操作。但形态学性别鉴定存在一定的局限性和主观误差,需要鉴定人员有丰富的经验^[5]。随着DNA分子技术的发展,可以设计合成特异性的分子探针来对鸟类进行性别鉴定^[6]。目前常用的鸟类分子生物学性别鉴定方法有EE0.6(0.6-EcoRI-fragment)序列法、微卫星标记和染色体螺旋蛋白基因(chromobox-helicase-DNA, CHD)法。EE0.6序列法^[7-8]是通过鸟类的W染色体特异性片段进行扩增和电泳,根据电泳结

果,雌性个体可以产生一条带,雄性则不产生条带。该方法可能由于操作失误出现假阴性结果。利用微卫星标记对鸟类进行性别鉴定,需要选择与鸟类性别连锁的位点,对其扩增产物进行电泳分型,雌性个体有1个等位基因,雄性个体有2个等位基因,根据基因分型结果对鸟类进行性别鉴定^[9]。CHD基因法是最普遍的一种突胸鸟类性别鉴定方法^[10-11],CHD基因是一段与鸟类性染色体连锁的基因、呈高度保守,并且在突胸类鸟类中普遍存在。特异性扩增的CHD基因琼脂糖凝胶电泳结果与鸟类的性染色体相一致:雌性鸟类由ZW组成为2条带,雄性鸟类由ZZ组成为一条带^[12-13]。通过观察其PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果,能够对鸟类进行快速、准确的性别鉴定^[14]。

鸫科鸟类中存在雌雄单态性和二型性的鸟类^[15],赤颈鸫(*Turdus ruficollis*)、红尾鸫(*Turdus naumanni*)、斑鸫(*Turdus eunomus*)均可通过体色和体型等形态学特征进行性别鉴定^[16-17]。但实践中发现该方法在很多情况下难以鉴定或鉴定准确性难以保证。该研究总结现有文献中3种鸫科鸟类性别鉴定的形态特征,并据此对3种鸫科鸟类进行形态学性别鉴定。同时,利用微卫星与CHD基因从分子水平对所有试验样品进行性别鉴定。以CHD基因性别鉴定结果为标准,讨论3种鸫科鸟类形态学方法和微卫星性别鉴定的准确

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572018BE04)。
作者简介 王东权(1993—),男,河北迁安人,硕士研究生,研究方向:保护遗传学。*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事野生动植物保护研究。
收稿日期 2020-01-06;修回日期 2020-02-14

率和可行性,旨在为这些鸟类的野外研究和种群性别结构分析提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 样品的来源及采集 试验样本均为国家林业和草原局野生动植物检测中心司法鉴定送检死体,送检时间为秋季,其中赤颈鸫 37 只,红尾鸫 50 只,斑鸫 12 只,共计 99 只鸫科鸟类。对 3 种鸫科鸟类分别根据对应物种的形态学鉴定标准进行性别鉴定,并取肌肉样本放置于-20 °C 下保存,用于分子生物学方法进行性别鉴定。

1.2 形态学性别鉴定 总结现有资料中 3 种鸫科鸟类雌雄性别特征差异^[16-20],确定其形态学性别鉴定标准。据此对 3 种鸫科鸟类全部样品进行形态学性别鉴定,通过观察和比较样本与标准的特征,得出鉴定结果。

1.3 分子生物学方法性别鉴定 试验样本经 TNE、SDS、蛋白酶 K 消化后,用 AxyPrep Multisource Genomic DNA Mini-prep Kit(爱思进)DNA 提取试剂盒提取并纯化总 DNA。

微卫星性别鉴定选择近缘物种乌鸫(*Turdus merula*)的微卫星位点 Ase50§^[9],采用引物 6F/6R^[9]对所有样本进行 PCR 扩增。反应体系为 10 μL:ExTaq 酶(5 U/μL)5.0 μL,去离子水 3.5 μL,模板 DNA(20 ng/μL)1.0 μL,上、下游引物(10 pmol/μL)0.1 μL,BSA 0.2 μL。PCR 反应条件如下:预变性 94 °C 3 min;变性 94 °C 30 s,退火 54 °C 45 s,延伸 72 °C 45 s,20 个循环;变性 94 °C 30 s,退火 60 °C 45 s,延伸 72 °C 45 s,15 个循环;72 °C 10 min。将 PCR 扩增产物送至上海生工生物科技有限公司,利用 ABI3130 测序仪进行毛细管电泳分型。雌性个体等位基因为 1 个,雄性个体等位基因为 2 个^[14]。通过微卫星分型结果对鸫科鸟类进行性别鉴定。

CHD 基因法利用 P2/P8^[21]引物进行扩增。反应体系(10 μL):Easy Taq Mix(5 U/μL)5.0 μL,去离子水 2.2 μL,模板 DNA(10 pmol/μL)2.0 μL,上、下游引物(10 pmol/μL)0.4 μL。PCR 反应条件如下:预变性 94 °C 3 min;变性 94 °C 30 s,退火 49 °C 45 s,延伸 72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 7 min。扩增产物在 2%的琼脂糖凝胶上 100 V 电压下电泳 45 min,然后在凝胶成像分析仪中拍照。观察扩增条带,雌性为 CHD-Z 与 CHD-W 2 条条带,雄性为 CHD-Z 1 条条带,以此来对个体进行性别判定。

1.4 数据分析 以 CHD 基因性别鉴定结果为标准,按照公式^[20](1)、(2)、(3)分别计算每种鉴定方法的准确率(A)、雌性鉴定准确率(A_F)、雄性鉴定准确率(A_M)。

$$A = (N_F + N_M) / N_T \tag{1}$$

$$A_F = N_F / N_{F0} \tag{2}$$

$$A_M = N_M / N_{M0} \tag{3}$$

式中,N_F、N_M、N_T分别为雌性鉴定正确个数,雄性鉴定正确个数和样本总数,N_{F0}和 N_{M0}分别为用于性别鉴定的雌性个体数和雄性个体数。

2 结果与分析

2.1 形态鉴定 经文献分析得到 3 种鸫科鸟类的形态学性别鉴定标准(表 1),据此对 99 只鸫科鸟类进行性别鉴定。在鉴定过程中发现 26 个个体有残缺,其中赤颈鸫 2 只,红尾鸫 20 只,斑鸫 4 只,这些样本无法通过形态学进行性别鉴定。其余 73 个个体可进行形态学性别鉴定,结果发现 35 只赤颈鸫雌性 18 只、雄性 17 只;30 只红尾鸫雌性 22 只、雄性 8 只;8 只斑鸫雌、雄各 4 只。

表 1 3 种鸫科鸟类的形态学鉴定标准

Table 1 The morphological identification standards of three species of Turdidae

物种 Species	雄性 Male	雌性 Female
赤颈鸫 <i>Turdus ruficollis</i>	眉纹红棕色;喉、上胸栗红色	白色或无眉纹;喉、胸白有棕栗色斑
红尾鸫 <i>Turdus naumanni</i>	面部浅黄色或橙色;眉纹锈红色;横向喉纹较少,下半身红褐色较多	面部很少有或没有橙色羽毛;眉纹灰白色;横向喉纹较多,下身红褐色较少
斑鸫 <i>Turdus eunomus</i>	头部黑褐色,近于黑色;黑色胸带完整;背部褐色,有大量红棕色	头部黑褐色;黑色胸带浅且中断;背部褐色,无或很少红棕色

2.2 微卫星鉴定 经微卫星电泳分型,结果有 9 个等位基因,其基因频率分别为 282(0.020)、284(0.101)、286(0.348)、288(0.237)、290(0.126)、292(0.136)、294(0.020)、296(0.005)、302(0.005)。电泳结果中雌性个体等位基因为 1,基因型为纯合;雄性个体等位基因数为 2,基因型为杂合(图 1)。据此得出 3 种鸫科鸟类性别鉴定结果:37 只赤颈鸫雌性 20 只,雄性 17 只;50 只红尾鸫雌性 31 只,雄性 19 只;12 只斑鸫样本雌性 5 只,雄性 7 只。

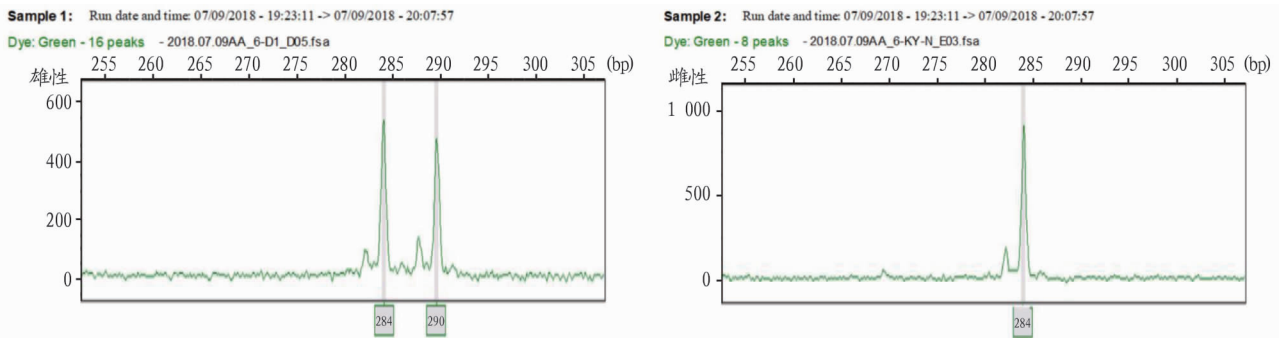
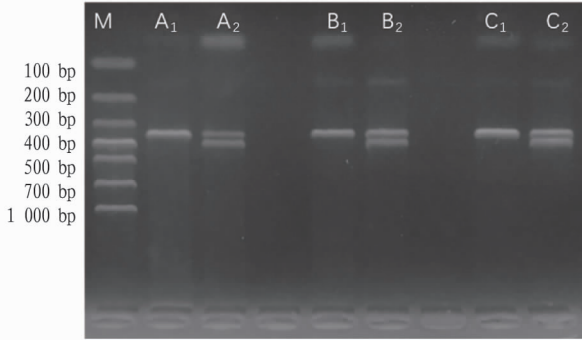


图 1 红尾鸫雌雄个体毛细管电泳结果

Fig. 1 Capillary electrophoresis results of male and female individuals of *Turdus naumanni*

2.3 CHD 基因鉴定 从 *CHD* 基因性别鉴定电泳结果(图2)可以看出,3种鸫科鸟类的雄性个体都是1条条带(*CHD-Z*,约350 bp),而雌性个体则是2条条带(*CHD-Z*与*CHD-W*,分别约350和400 bp)。99个个体的PCR产物电泳检验后均得到清晰的性别鉴定结果,其中37只赤颈鸫雌性18只、雄性19只;50只红尾鸫雌性24只、雄性26只;12只斑鸫样本雌性2只、雄性10只。



注:M. Maker; A₁与A₂、B₁与B₂、C₁与C₂分别为赤颈鸫、红尾鸫、斑鸫的雄性个体

Note: M. Maker. A₁ and A₂, B₁ and B₂, C₁ and C₂ were male and female individuals of *Turdus ruficollis*, *Turdus naumanni* and *Turdus eunomus* respectively

图2 P2/P8引物对鸫科鸟类样本的性别鉴定结果

Fig. 2 Sex identification results of Turdidae birds with P2/P8 primers

3 数据处理

以 *CHD* 基因鉴定结果为标准,计算得到鸫科鸟类形态学性别鉴定与微卫星性别鉴定的准确率(表2)。由表2可知,赤颈鸫的准确率最高,达到0.89%;红尾鸫次之,为0.57%;斑鸫的准确率最低,仅为0.38%。微卫星性别鉴定的准确率都较高:赤颈鸫最高,为0.95%,红尾鸫次之,为0.86%,斑鸫准确率最低,为0.75%。微卫星鉴定结果中所有雌性个体准确率为1.00%,仅12只雄性鉴定结果出现误差,导致准确率下降,但微卫星性别鉴定准确率较高,不低于0.70%。

表2 形态学与微卫星性别鉴定准确率

Table 2 Accuracy rate of morphological and microsatellite sex identification %

鉴定方法 Identification methods	物种 Species	雌性准确率 Female accuracy rate	雄性准确率 Male accuracy rate	总准确率 Overall accuracy rate
形态鉴定 Morphologi- cal identification (73只)	赤颈鸫	0.94	0.84	0.89
	红尾鸫	0.80	0.33	0.57
	斑鸫	0.00	0.43	0.38
微卫星鉴定 Microsat- ellite identification (99只)	赤颈鸫	1.00	0.89	0.95
	红尾鸫	1.00	0.73	0.86
	斑鸫	1.00	0.70	0.75

4 讨论

自1995年 *CHD* 基因被应用于鸟类性别鉴定以来, *CHD* 基因已成为突胸鸟类性别鉴定最重要的分子标记,也是目前鸟类性别鉴定应用最广泛的方法之一^[22]。田秀华等^[12]和刘铸等^[13]通过 *CHD* 基因对东方白鹳(*Ciconia boyciana*)及7种

鹤形目鸟类进行有效的性别鉴定;沈玮等^[23]通过 *CHD* 基因对帝企鹅(*Aptenodytes forsteri*)进行性别鉴定,并对该方法进行分析讨论;张延君^[24]对疣鼻天鹅(*Cygnus olor*)成功进行性别鉴定,并做了引物优化。苏倡等^[25]对6种来自柳莺科(Phylloscopidae)、鸫科(Motacillidae)、岩鹳科(Prunellidae)的雀形目鸟类的 *CHD* 基因性别鉴定方法做了有效性评估。此外,利用 *CHD* 基因对白鹭(*Egretta garzetta*)、鸽子(*Columba*)、鸡(*Gallus gallus domesticus*)等多种鸟类都进行了有效的性别鉴定^[26-28]。该研究发现, *CHD* 基因的通用引物 P2/P8 可以对3种鸫科鸟类进行准确、有效的性别鉴定。

该研究的99只鸫科鸟类均为司法鉴定送检的尸体,由于个体残缺等原因导致26只无法进行形态学性别鉴定。保存完好的73个个体的形态学性别鉴定结果显示,3种鸫科鸟类中赤颈鸫雌雄性别鉴定准确率都较高(>80%)。红尾鸫的形态学鉴定结果整体偏低,且雌性的鉴定准确率明显高于雄性的。这主要是由于该研究中红尾鸫形态学性别鉴定结果偏向雌性,导致雌性准确率偏高,雄性准确率偏低。斑鸫形态学性别鉴定整体准确率最低,其雌雄鉴定准确率为0和0.43%,推测是由于形态学特征不能对斑鸫进行有效的性别鉴定的同时,鉴定样本数量过少(斑鸫为8只)。综上所述,该研究中仅赤颈鸫能通过形态学进行有效的性别鉴定,红尾鸫与斑鸫不能通过形态学进行性别鉴定。由于鸟类形态特征受鸟类年龄,季节以及生存环境影响很大^[29],该试验所有样本均为秋季送检的冷冻样本,死亡时间可能为换羽的时期^[30],所以红尾鸫与斑鸫的形态学鉴定准确率偏低。运输与冷冻保存等人为因素也对鸟类的形态特征造成一定程度的破坏,降低了形态学鉴定的准确性^[31]。此外,也存在个体形态特征缺失或雌雄特征之间重叠的情况^[32],很难准确进行性别鉴别。推测可能是由于鸟类种间杂交导致个别鸫科鸟类形态学特征为杂交亲本中间型^[19,33],所以特征比较模糊难以鉴定,这就要求鉴定人员有丰富的经验^[2],而且需要多人参与鉴定以减少主观性带来的偏差^[16]。

以 *CHD* 基因鉴定结果为基准,微卫星性别鉴定方法的整体准确率较高,仅12只雄性鸟类鉴定结果出现错误。推测可能是因为微卫星基因座来自鸫物种^[9],与该试验的3种鸫科鸟类性别连锁程度降低,或是受到个体杂交与变异的影响,导致杂合样本鉴定结果为纯合^[34]。3种鸫科鸟类中斑鸫微卫星性别鉴定总准确率最低,为0.75,依然能够对鸫科鸟类进行有效的性别鉴定,但应该注意存在雄性个体鉴定出现假雌性的情况,所以在对鉴定结果准确率要求较高或鉴定样品中雄性比例较高时,推荐联合其他鉴定方法共同对鸫科鸟类进行性别鉴定。

一种鸟类性别鉴定方法是否有实际应用价值主要取决于鉴定结果的准确率与鉴定的成功率。鉴定的准确率能表明鉴定方法是否有效可行,而鉴定成功率则表明鉴定方法能否普遍应用^[26]。在实际应用中,鸫科鸟类形态学性别鉴定简便,但影响形态学性别鉴定准确率和成功率的因素很多,容易出现偏差。若对鉴定准确率要求较高,推荐使用 *CHD*

基因对鸫科鸟类进行性别鉴定。

参考文献

- [1] 徐怀亮,熊伟,姚永芳,等.基于线粒体 CoI 基因的鸫亚科 14 种鸟类的系统进化[J].东北林业大学学报,2010,38(10):75-78.
- [2] CERIT H, AVANUS K, 李亨. 鸟类性别鉴别方法的研究进展[J]. 中国家禽,2008,30(18):30-33.
- [3] 李刚,杨水云,周航,等. 鸟类性别鉴定技术研究进展[J]. 动物学杂志,2003,38(5):106-108.
- [4] DIVERS S J. Endoscopic sex identification in chelonians and birds(*Psittacines*, *Passerines*, and *Raptors*) [J]. *Veterinary clinics of North America exotic animal practice*, 2015, 18(3):541-554.
- [5] LEE M Y, HONG Y J, PARK S K, et al. Application of two complementary molecular sexing methods for East Asian bird species [J]. *Genes & genomics*, 2008, 30(4):365-372.
- [6] 胡锐颖,李仲逵,丁小燕. 鸟类性别决定机制及性别鉴定的研究进展[J]. 遗传,2005,27(2):297-301.
- [7] BAO W B, MUSA H H, LUAN D Q, et al. Molecular method of sex identification in Siberian White crane (*Grus eucoeranus*) [J]. *Journal of applied animal research*, 2009, 35(2):169-172.
- [8] 包文斌,胡飞,徐琪,等. 鸟类性别鉴定的分子生物学方法[J]. 中国畜牧兽医,2007,34(10):33-36.
- [9] SIMEONI M, DAWSON D A, GENTLE L K, et al. Characterization of 38 microsatellite loci in the European blackbird, *Turdus merula* (Turdidae, A-VALS) [J]. *Molecular ecology resources*, 2009, 9(6):1520-1526.
- [10] VALADAN R, NEJATOLLAHI F, EHSANI-NORI H, et al. Avian gametologs as molecular tags for sex identification in birds of prey of Iran [J]. *Zoo biology*, 2017, 36(4):289-293.
- [11] 霍雅鹏,万冬梅. 鸟类性别鉴定的方法及性比研究的进展[J]. 辽宁大学学报(自然科学版),2008,35(4):358-362.
- [12] 田秀华,刘铸,何相宝,等. 7 种鸫形目鸟类性别的分子鉴定[J]. 动物学杂志,2006,41(5):62-67.
- [13] 刘铸,田秀华,白素英. 一种准确简便的东方白鹡鸰性别分子鉴定方法[J]. 野生动物,2006,27(3):50-53.
- [14] 孟莉. 纯色山鹡鸰 (*Prinia inornata*) 和黄腹山鹡鸰 (*P. flaviventris*) 性别的分子鉴定和鸣声差异分析[D]. 上海:华东师范大学,2010.
- [15] 江波. 鸫属九种鸟类线粒体基因组全序列比较及系统发生关系[D]. 兰州:兰州大学,2018.
- [16] 黑龙江中央站黑嘴松鸡国家级自然保护区管理局. 嫩江常见雀形目鸟类性别和年龄简易判别手册[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2018:48-50.

- [17] BRAZIL M. *Birds of East Asia* [M]. Princeton NJ: Princeton University Press, 2009: 189-192.
- [18] 自然之友野鸟会. 北京地区常见野鸟图鉴[M]. 北京:机械工业出版社,2016.
- [19] 常家传,桂千惠子,刘伯文. 东北鸟类图鉴[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995:164-173.
- [20] 柯婉娟,张守栋,马强,等. 基于形态特征判定五种鸫类性别的可靠性[J]. 动物学杂志,2017,52(4):555-564.
- [21] VALENZUELA-GUERRA P, MORALES-MORAGA D, GONZÁLEZ-ACUÑA D, et al. Geographic morphological variation of Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) and sex identification: Using morphometric characters and molecular markers [J]. *Polar biology*, 2013, 36(12):1723-1734.
- [22] 刘铸,白素英,田秀华,等. CHD 基因与非平胸鸟类性别鉴定[J]. 生物技术通报,2006(S1):147-150.
- [23] 沈玮,潘少坤,罗红梅,等. 基于 CHD 基因序列分析的帝企鹅性别鉴定研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(3):1167-1168,1214.
- [24] 张延君. 笼养疣鼻天鹅繁殖期行为时间分配及 CHD 基因法性别鉴定[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2012.
- [25] 苏倡,李显达,邢晓莹,等. 五种基于 CHD 基因的性别鉴定方法对雀形目鸟类有效性的实验评估[J]. 野生动物学报,2019,40(3):643-651.
- [26] 张莉,单达聪,刘彦,等. 通过 CHD 基因快速鉴定鸽子性别方法的研究[J]. 中国畜牧兽医,2016,43(5):1379-1384.
- [27] 吴丽丽,周延宾,蔡思琪,等. 基于 CHD 基因利用 PCR 技术进行鸡早期性别鉴定[J]. 热带农业工程,2016,40(3):13-15.
- [28] 江杉. 鸫科鸟类性别鉴定方法及白鹡鸰和黄嘴白鹡鸰种群性别比例的研究[D]. 厦门:厦门大学,2007.
- [29] 丁志锋. 黄腹山鹡鸰 (*Prinia flaviventris*) 换羽和营巢生态学的研究[D]. 上海:华东师范大学,2008.
- [30] 冯玲. 朱鹀繁殖期羽色变化机制的初步研究[D]. 西安:陕西师范大学,2015.
- [31] 夏晓飞,王莹,曾朝辉,等. 鸟类羽毛鉴定技术和分类研究回顾及展望[J]. 四川动物,2011,30(5):831-834.
- [32] KRIESELL H J, AUBIN T, PLANAS-BIELSA V, et al. Sex identification in King Penguins *Aptenodytes patagonicus* through morphological and acoustic cues [J]. *Ibis*, 2018, 160(4):755-768.
- [33] CLARK C J, FEO T J, BRYAN K B. Courtship displays and sonations of a hybrid male Broad-tailed×Black-chinned Hummingbird [J]. *The Condor*, 2012, 114(2):329-340.
- [34] 张秀华,吴登俊. 利用 SRY 基因和微卫星标记鉴定反当动物性别[J]. 遗传,2006,28(2):133-138.

(上接第 91 页)

有效磷含量与对照土壤间的差异均达到显著水平。所有绿地土壤的酸碱缓冲曲线均呈反 S 形,污染土壤的酸碱缓冲容量高于对照,对酸碱的敏感性较低。此外,pH 是影响土壤酸碱缓冲能力的关键因素,随着 pH 增加,土壤酸碱缓冲能力随之增加。

参考文献

- [1] ZENG J, LIU X J, SONG L, et al. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition [J]. *Soil biology and biochemistry*, 2016, 92:41-49.
- [2] KEMMITT S J, WRIGHT D, GOULDING K W T, et al. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils [J]. *Soil biology and biochemistry*, 2006, 38(5):898-911.
- [3] ZHANG T A, CHEN H Y H, RUAN H H. Global negative effects of nitrogen deposition on soil microbes [J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(7):1817-1825.
- [4] 李成,任文华,于宝春,等. 城市绿地生态效能研究进展[J]. 安徽农业科学,2016,44(24):173-175,180.
- [5] 席翠玲. 城市园林绿化中的土壤困境探析突围措施[J]. 现代园艺,2016(6):157-158.
- [6] 邢世通,武巍,蔡玉红. 城市园林土壤现状及改良措施[J]. 现代农业科技,2015(12):169,171.
- [7] ALEXANDROVSKAYA E I, ALEXANDROVSKIY A L. History of the cultural layer in Moscow and accumulation of anthropogenic substances in it [J]. *Catena*, 2000, 41:249-259.
- [8] 王文婧,戴万宏. 安徽主要土壤酸碱性及其酸碱缓冲性能研究[J]. 中国农学通报,2012,28(15):67-72.

- [9] 黄平,张佳宝,朱安宁,等. 黄淮海平原典型潮土的酸碱缓冲性能[J]. 中国农业科学,2009,42(7):2392-2396.
- [10] 胡波,王云琦,王玉杰,等. 重庆缙云山酸雨区森林土壤酸碱缓冲机制及影响因素[J]. 水土保持学报,2013,27(5):77-83.
- [11] 井玉丹,林清火,郭滢涛,等. 海南胶园土壤酸碱缓冲性能研究[J]. 热带作物学报,2016,37(2):345-350.
- [12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业科技出版社,1999.
- [13] 成杰民,胡光鲁,潘根兴. 用酸碱滴定曲线拟合参数表征土壤对酸缓冲能力的新方法[J]. 农业环境科学学报,2004,23(3):569-573.
- [14] 徐仁扣. 土壤酸化及其调控研究进展[J]. 土壤,2015,47(2):238-244.
- [15] 王朴,胡红青,丁昭全. 武汉城市园林绿地土壤现状分析[J]. 湖北农业科学,2009,48(1):78-80.
- [16] 项建光,方海兰,杨意,等. 上海典型新建绿地的土壤质量评价[J]. 土壤,2004,36(4):424-429.
- [17] 胡素英,刘豫明. 广州地区园林土壤质量现状分析[J]. 广东农业科学,2003(5):36-38.
- [18] BIASIOLI M, BARBERIS R, AJMONE-MARSAN F. The influence of a large city on some soil properties and metals content [J]. *Science of the total environment*, 2006, 356:154-164.
- [19] 李娜,韩晓增,尤孟阳,等. 土壤团聚体与微生物相互作用研究[J]. 生态环境学报,2013,22(9):1625-1632.
- [20] 李宏图,罗建新,彭德元,等. 绿肥翻压还土的生态效应及其对土壤主要物理性状的影响[J]. 中国农学通报,2013,29(5):172-175.
- [21] NELSON P N, SU N H. Soil pH buffering capacity: A descriptive function and its application to some acidic tropical soils [J]. *Australian journal of soil research*, 2010, 48(3):201-207.
- [22] 蒋胜军,刚刚. 成都平原土壤 pH 缓冲容量的空间变异性特征[J]. 四川农业科技,2017(11):22-25.