

豊岡の飼育下および野外のコウノトリの遺伝的多様性と繁殖計画への示唆

* 内藤和明¹・西海 功²・大迫義人¹

Genetic diversity of the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*, kept in Toyooka and its implication to the breeding program

* Kazuaki Naito¹, Isao Nishiumi² and Yoshito Ohsako¹

¹ Institute of Natural and Environmental Sciences, University of Hyogo/Prefectural Park of Oriental White Stork, Hyogo, 128, Shounji, Toyooka, Hyogo Pref. 668-0814, Japan

² Division of Vertebrates, Department of Zoology, National Museum of Nature and Science, Tokyo, 4-1-4, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki Pref. 305-0005, Japan

* E-mail: kaznait@stork.u-hyogo.ac.jp

Abstract Genotyping of 12 microsatellite loci was performed for 31 individuals kept in Toyooka, in captivity and once in captivity then released into the wild. Mean number of alleles per locus was 5.08 and mean expected heterozygosity was 0.608. The fixation index was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium expectation, except for one locus. Genetic distances between individuals forming a breeding pair were relatively long, indicating that current breeding scheme that founders belonging to the same mitochondrial haplotype should not form breeding pairs works effectively. Based on these results, the possibility of the future use of microsatellite analysis to the breeding program was discussed.

Key words Breeding program, *Ciconia boyciana*, Genetic management, Microsatellite DNA

はじめに

遺伝的多様性を保全することは絶滅危惧種を保全する上で最も重要な課題のひとつである。個体の再導入や野

¹ 兵庫県立大学自然・環境科学研究所／兵庫県立コウノトリの郷公園

668-0814 兵庫県豊岡市祥雲寺128

² 国立科学博物館動物研究部脊椎動物研究グループ
305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1

* E-mail: kaznait@stork.u-hyogo.ac.jp

生個体群への補強的導入を行うためには、飼育個体群に十分な遺伝的多様性を確保しておく必要がある。しかし、創設個体の数が少ない、遺伝的多様性の情報が十分でない、適切な繁殖計画が立てられていないなどの理由があると、飼育下での遺伝的多様性を確保することはしばしば困難になる。

野生個体群が一旦絶滅した後、飼育下での繁殖が軌道に乗り、かつての生息地への再導入を実現したものとして、豊岡盆地におけるコウノトリ *Ciconia boyciana* の再導入は国内で最も進んだ取り組みである。この取り組みを支えているのは兵庫県立コウノトリの郷公園（以下郷公園）を始めとする施設で維持されている飼育集団の存在であるが、その創設個体はほぼ全てが中国で飼育されていた個体かロシアで捕獲された野生個体であり、全体の遺伝子資源は今なお限られている。一方で、郷公園においては1989年に最初の飼育下での繁殖に成功してから20年以上が経過し、現在は飼育下3世代の個体を含む90個体以上が飼育されている。加えて、2005年からはかつての生息地である豊岡盆地への再導入を実施しているので、野外での巣立ち個体を含めて60個体以上が生息するに至っている。すなわち、飼育下と野外を合わせると150個体以上となり、全体を視野に入れた長期的な視点に立った遺伝的多様性の維持管理が課題となっている。

コウノトリの遺伝的多様性については、これまで、ミトコンドリアDNAのDループのハプロタイプに着目した研究が行われている（Yamamoto et al. 2000; Murata et al. 2004）。一連の研究の中で、豊岡盆地の各地で保存されているコウノトリの剥製のハプロタイプが特定され、かつて豊岡盆地に生息していた個体群中には複数のハプロタイプが存在したことが明らかになっている。また、中国大陸からは見付かっていない型と、中国大陸と日本で共通して確認された型があることが明らかにされている。また、日本の野生個体群が絶滅する直前の時期の個体から得られたサンプルのハプロタイプは全て同一であり、その時期に既に遺伝的多様性が失われていたことが示唆されている。

日本の飼育集団の繁殖計画を立てる際にもハプロタイプの情報が活用されてきた。すなわちペア形成の方針を検討する際に、ハプロタイプが同一の個体同士をペアに

することは避けることとされた。これは、ハプロタイプが同一の個体は野生下では地理的に近い生息地に由来していた可能性があり、これらでペアリングをした場合に近交弱勢が生じることが懸念されたためである (Yamamoto 2011)。この考え方は、創設個体同士のペアリングを検討するには合理的と思われる。しかし、ミトコンドリア DNA は母系遺伝し、同一の遺伝子型が母個体から子個体に受け継がれる一方、父方の遺伝子型は反映しないため、飼育下での世代を重ねると祖先の生物地理学的背景を直接示すものではなくなる。したがって、飼育下で世代を経た場合には別の遺伝的な指標も必要となる。

現在、広範な種で実際に活用され、かつ比較的簡便に利用できる遺伝マーカーとしてマイクロサテライト DNA がある。一般的に、マイクロサテライトは、進化的に中立である、多型性に富む、共有性であるといった、扱いやすい特徴を備えている。本研究では、集団の遺伝的多様性の程度を明らかにし、今後の繁殖計画への応用の可能性を探るために豊岡におけるコウノトリの飼育集団をマイクロサテライトマーカーを用いて解析した。

材料と方法

解析対象個体は計31個体で、現在も豊岡で飼育されて

いる18個体、およびかつて郷公園で飼育され、後に野外に放鳥された13個体からなる (一部の個体は既に死亡)。飼育集団の遺伝的多様性の全体をできるだけ把握できるように、家系情報を基に解析個体を選定したため、この中には9つの繁殖ペアが含まれている。

それぞれの個体から血液サンプルを採取し、DNA の抽出まで -20°C で保存した。市販のキット (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences) を用い、マニュアルの記載にしたがって DNA の抽出を行った。コウノトリおよび近縁種であるシユバシコウ *Ciconia ciconia* およびアメリカトキコウ *Mycteria americana* のために開発されたプライマー (Shephard et al. 2009; Tomasulo-Seccomandi et al. 2003; Wang et al. 2011)、および独自に開発したプライマーを用いて、マイクロサテライト計12遺伝子座について解析を行った。ただしアメリカトキコウで開発されたプライマーについては、アニーリング温度を変更するために、GenBank に登録されたシークエンスデータを参照してプライマー配列を再設計して使用した。使用したプライマーの配列、アニーリング温度等を Table 1 に示した。

サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied BioSystems) を用いて、94°C 9分のプレヒート後、94°C 30秒、アニーリング温度で30秒、72°C で30秒の

Table 1. Twelve microsatellite primer pairs used in this study. *Ta*: annealing temperature.

Locus	Primers	Repeat motif	<i>Ta</i> (°C)
cb504V2	F: CAGAATGCACTACCTTGCAGA R: TTGAGGTGTGGAGGACAGG	(TC) ₁₃	60
Cc01 ^a	F: CACAAACATCAGCAAGGACAG R: TTCTTGCAITTTGCTCCAGTG	(TTCT) ₁₆ *	60
Cc04 ^a	F: GCTGAAATGTCTGTCCCTGA R: AATCCCCTATTGCGTCACA	(TCCTA) ₁₈ *	60
Cc06 ^a	F: GAACAGCAATATCGCATCTACA R: CTCGCTGTCTCCTCTGTCTCT	(TG) ₁₃	60
Wsu14 ^b	F: TGGCTAAGCAACCTCCAAA R: GGTCAGGCAAATTCGTGTC	(AAGG) ₇	60
Wsu17 ^b	F: TGGAACATTTCTAGGCAAGCTG R: GGGTTTAATCTGCAAGGAAGG	(AAGG) ₉ + (AAAG) ₅	60
Cbo108 ^c	F: CCCAGGTCACAAATTATACG R: GAGCCTCACAAAGTTCCCTG	(AT) ₇ (GT) ₁₂	55
Cbo109 ^c	F: GTGGTGTAGTCCAGTTTATG R: ATAACACATGAATGACCTGG	(GT) ₁₅	55
Cbo121 ^c	F: CCACAATGGCAATTTTTCAC R: GTTCTCCCAGAGGCTTGCTC	(TG) ₁₇ TT(AT) ₄	55
Cbo133 ^c	F: GGACAAAAGGCGATTCTAGC R: TTGAGCCAAACATCCGACAC	(AC) ₁₉ *	55
Cbo151 ^c	F: AATCTGGTCTTGGTCCTTTC R: GGTTTTACCTCTGACACTG	(GT) ₁₄	55
Cbo168 ^c	F: GGGTGCAGTTGAATTAGAC R: AATATTTGGTTTGGTAAAC	(AC) ₁₉ *	55

^a Referred from Shephard et al. 2009, but *Ta* are different from the original ones.

^b Referred from Tomasulo-Seccomandi et al. 2003, but primer sequences were re-designed by the present authors, according to the original sequences registered in GenBank.

^c Referred from Wang et al. 2011.

* indicates a imperfect repeat motif.

パターンを30サイクル、最後に72°Cで7分処理する PCR 反応を行った。反応液は総量 10 μ L とし、その組成は、10 ng のサンプル DNA、2 pmol/ μ L の蛍光ラベルされたプライマー、0.25 U の Taq ポリメラーゼ (Ampli TaqGold, Applied Biosystems)、10 mM の Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM の KCl、1.5 mM MgCl₂、200 mM の dNTP、および 0.001% の gelatin である。

PCR 産物の断片サイズはオートシーケンサー (ABI 310 genetic analyzer) を用いて特定した。サイズマーカーとして GeneScan 600 LIZ internal ladder (Applied Biosystems) を使用した。マイクロサテライトの多型のパターンは、GeneMapper™ Analysis 4.0 software (Applied BioSystems) を用いて解析した。結果の統計的処理には GenAlEx 6.41 software (Peakall and Smouse 2006) を使用し、ハーディ・ワインバーグ平衡からのヘテロ接合度のずれを χ 二乗検定 (ボンフェローニの補正を伴う) により検定した。個体間の全組み合わせについて Codom-Genotypic distance method に基づく遺伝的距離を算出した後 (Peakall and Smouse 2006)、多次元尺度法 (SPSS ver. 15) を用いて遺伝的距離のパターンを視覚化した。

結果

使用したマイクロサテライト12遺伝子座の解析結果を Table 2 に示した。遺伝子座当たりの対立遺伝子の数は、最大13 (Cc04)、最小2 (Cbo133) で、平均5.08であった。ヘテロ接合度の期待値は、最大0.87 (Cc04)、最小0.29 (Cbo133) で、平均0.60、観察値は、最大0.900 (Cc04)、最小0.226 (Cbo133) で、平均0.628であった。

いずれの遺伝子座においても、ハーディ・ワインバーグ平衡からの有意なヘテロ接合度のずれは確認されなかった。

中国の野生個体群 (n=23) での解析結果 (Wang et al. 2011) が存在する6遺伝子座について比較したところ、対立遺伝子の数は全ての遺伝子座において同数あるいは中国の野生個体群の方が多かった。この違いは日本の飼育個体群の創設個体の数が限られていることを反映していると思われるが、対立遺伝子数の平均値は中国の野生個体群で6.2に対して本研究でのサンプル集団では5.0であり際立った違いではなかった。ヘテロ接合度の期待値の平均は、中国の野生個体群で0.72に対して本研究でのサンプル集団では0.60であった。

個体間の遺伝的距離を視覚化して Fig 1 に示した。個体の分布パターンから読み取れる特徴として、Fig の右下の互いに近い位置に、J0275, J0294, J0296, J0405, J273, J0408 の6個体がプロットされ、相対的にまとまったグループを形成していた。これらのうち、J0294と J0296は G ペア (成立したペアに付けられている固有の名称。以下同様) の、J273と J0275は N ペアの、J0405と J0408は W ペアの子供であった。なお、W ペアのメス個体は N ペアの子供であるので、J0294, J0296以外の4個体は血縁関係にある。一方、J0294, J0296の親個体である G ペアは雌雄ともに中国で飼育されていた個体を導入したものである。N ペアのオス個体が同様に中国で飼育されていた個体を導入したものであるという点で共通しているが、これらの個体の血縁関係の有無は明らかでない。

解析対象とした個体のうちペアになっている個体を Fig 1 の中で実線で繋いで示した。既に述べたように、飼育下ではハプロタイプが同じ個体同士をペアにしない方針で繁殖計画が立てられている。放鳥個体を起源として形

Table 2. Characterization of 12 microsatellite loci. *Ho*, observed heterozygosity; *He*, expected heterozygosity; *F*, Fixation Index.

Locus	No. of alleles	Size range (bp)	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>
cb504V2	4	242–252	0.800	0.673	–0.188 ns
Cc01	5	199–263	0.677	0.735	0.079 ns
Cc04	13	235–288	0.900	0.891	–0.011 ns
Cc06	3	199–203	0.452	0.447	–0.010 ns
Wsu14	3	135–143	0.516	0.469	–0.101 ns
Wsu17	3	238–318	0.419	0.489	0.143 ns
Cbo108	5 (6)	139–149	0.774	0.684 (0.807)	–0.132 ns
Cbo109	4 (6)	178–188	0.467	0.473 (0.738)	0.013 ns
Cbo121	7 (8)	157–172	0.806	0.805 (0.851)	–0.002 ns
Cbo133	2 (4)	160–161	0.226	0.292 (0.492)	0.226 ns
Cbo151	6 (6)	135–148	0.655	0.617 (0.673)	–0.063 ns
Cbo168	6 (7)	142–156	0.839	0.721 (0.771)	–0.163 ns
Mean	5.08 (6.17)		0.628	0.608 (0.722)	–0.017

Number of alleles and expected heterozygosity of Chinese wild population (n=23) referred from Wang et al. (2011) were shown in the parentheses.

* Chi-square test, p<0.05.

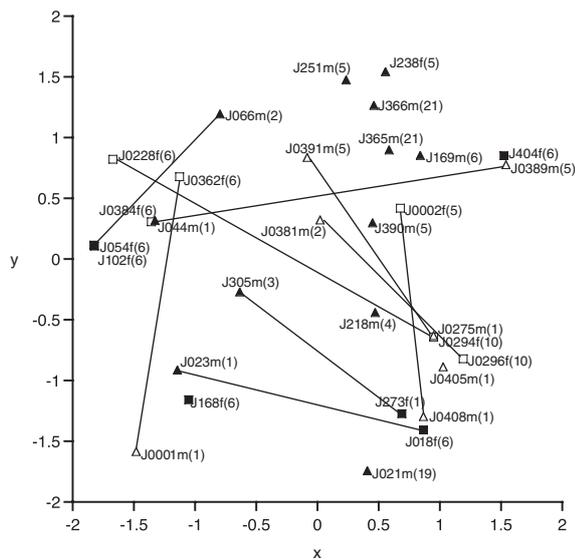


Fig. 1. Genetic relations of individuals indicated by the multidimensional scaling based on the genetic distance calculated by 12 microsatellite loci. Closed square, captive female; open square, wild female; closed triangle, captive male; open triangle wild male. Individual code is shown by "J" plus 3-digit numbers for a captive individual, and "J" plus 4-digit numbers for reintroduced one. Sex of individuals is shown by f (female) or m (male). Numbers in parentheses indicate mitochondrial haplotype code. Breeding pairs are indicated by solid lines connected together.

成された野外の個体群においても、近交弱勢が生じる危険性をできるだけ低下させるように、放鳥個体のハプロタイプの組合せに留意してきた。その結果、野外でペアを形成した個体も含め、全てのペアはハプロタイプが異なる個体の組合せとなっている (Fig 1 で個体名の後ろに括弧で示されたハプロタイプ番号を参照)。ペアを形成している個体は Fig 上で互いに比較的離れた場所にプロットされた。すなわち、マイクロサテライト遺伝子座のタイピングに基づく遺伝的距離で見ても、遺伝的に離れた個体によってペアが形成されていた。

考 察

本研究で明らかになった豊岡におけるコウノトリ個体群の遺伝的多様性は、対立遺伝子の数で比較すると中国における野生個体群での結果よりも少なかったが、その違いは1.23倍程度であった。世界におけるコウノトリの推定生息個体数は約3,000個体と言われており (Delany and Scott 2006)、野生個体群には一定程度の遺伝的多様性が存在しているものと思われる。これは、コウノトリと同様に日本で再導入が進められているトキの場合と大きく異なっている。現存するトキの全ての個体は1981年に中国で再発見された2ペアに由来すると考えられてお

り、事実、ミトコンドリア DNA のハプロタイプでは2つの型が確認されているに過ぎず (Zhang et al. 2004)、マイクロサテライト DNA においても多型が確認された8遺伝子座において対立遺伝子の数は最大でも3にとどまることが報告されている (Ji et al. 2004)。また、ニュージーランドに生息する地上性の絶滅危惧鳥類フクロウオウム *Strigops habroptilis* では、マイクロサテライト遺伝子座の多様性が極めて低いことが報告されている (Jamieson et al. 2006; Robertson et al. 2009)。これは、生息地が面積が小さい孤立した島などで、長い間個体数が少ない期間が続いたためとされる。コウノトリの遺伝的多様性が相対的に高いのは、野生下での個体数の違いに加えて、コウノトリが繁殖地から越冬地へ長距離を移動する渡り鳥であり、大陸起源と見られる個体が日本にも時折飛来するなど移動範囲が広く遺伝子交流が広域に生じていたことも一因と推測される。飼育下では、マイクロサテライトの遺伝子型を指標とする場合、現状で確認されている全ての遺伝子型をできるだけ維持していくような繁殖計画が求められよう。

近交弱勢は多くの種において、小さく孤立した個体群の存続可能性に影響を与える程度のレベルで一般的に起きている現象である (Keller and Waller 2002)。個体群サイズが小さく孤立した状態に長期間置かれると、有害遺伝子が除去され近交弱勢による影響がほとんど生じなくなることもあるが (Jamieson et al. 2006)、野生下でのそのような例は稀である。飼育下で人為的に有害遺伝子を除去する試みも提案されているがその効果は不確実であり導入すべきでない指摘されている (Boakes et al. 2007; Leberg and Firmin 2007; Witzemberger and Hochkirch 2011)。コウノトリの場合、飼育個体を野外に再導入する可能性が大きく、できるかぎり元々の遺伝子資源を維持したいことから、現実的な方法ではないと思われる。上述したとおり、コウノトリは広範囲を移動する渡り鳥であり、分布範囲もかつては広がったので、一定頻度で遺伝的交流が起きていたと考えられる。また、中国大陸に生息する野生個体群では有害遺伝子が除去されるような強いボトルネックは過去に経験していない可能性がある。現状ではコウノトリにおいて近交弱勢がどの程度生じるかは明らかにされていないが、少ない個体数で遺伝的多様性を維持している飼育下ではその可能性を十分考慮する必要がある。すなわち、飼育集団の繁殖計画を立てるときには個体の血縁関係を考慮し近縁な個体間でのペア形成を避けることが必要と考えられる。

このことに配慮して、飼育個体のペア形成の際にはハプロタイプが同じものをペアにしないという方針でこれ

まで進められてきた。ハプロタイプが集団の遺伝的まとまりをある程度反映しており、同一の型である場合に遺伝的に近い関係にある可能性が考えられたからである。今回、マイクロサテライトの遺伝子型に基づいて個体間の遺伝的距離を算出し、視覚化した結果を基に検証したところ、ペアになっている個体間の遺伝的距離は比較的遠い傾向にあった。すなわち、従来実行されてきたハプロタイプの情報に基づくペア形成の方針はその目的をうまく果たしてきたことが示された。しかしハプロタイプには父系の情報は含まれないので、ハプロタイプが異なる個体同士を繁殖させるにつれて、ハプロタイプの型は遺伝的なまとまりを反映しにくくなる。したがって飼育下2世代目以降の繁殖計画では血統登録書の情報がより重要となってくる。一方、野外集団では将来的には個体識別が困難となり個体の血統関係を記録できなくなる可能性がある。その際にはマイクロサテライトの遺伝子型情報がより重要になるものと思われる。なお、Fig 1からは、ハプロタイプが同一であってもマイクロサテライトの遺伝子型に基づいて個体間の遺伝的距離は離れている個体の組み合わせがあることがわかる。将来的には、ハプロタイプが同一の個体間でペアリングを行うことも検討してよいと思われる。

絶滅危惧動物を含む飼育下の集団の繁殖計画では、MK戦略 (minimizing kinship strategy) が最も広く取り入れられている (Witzenberger and Hochkirch 2011)。この方法は、他の個体との血縁度が低い個体を優先的に繁殖に参加させることにより、飼育集団全体の血縁関係が最小になるように繁殖計画を立てることで、集団全体の遺伝的多様性を最大限維持しようとするものである。この方法を実行するには、全個体の血統を記録した詳細な血統登録書の整備が不可欠であり、血統登録書の情報を基に繁殖計画を立てる必要がある。コウノトリでは、国内の飼育個体を全て網羅した血統登録書が1990年から整備されているので、理論的にはMK戦略による繁殖計画を実行することが可能である。ただし、MK戦略に基づいて理論的に繁殖させるべき個体の組み合わせを導きだしたとしても、必ずしもそのペアを成立させられるとは限らない。コウノトリは一般に攻撃的な性質を持つ個体が少なくなく、同居からペア形成に至る技術が未だ確立されていないのが現状であり、どのような個体でも確実にペア形成できる状況にはなっていないためである。また、ペア形成自体の困難さから、一度成立したペアは複数年にわたり維持することが普通であり、数十年以上にわたり繁殖できるほど寿命が長い種であることから、繁殖計画を注意深く決定することが求められる。

繁殖集団が野外からの導入個体のみで構成されている場合など、個体の家系情報が得られていない集団の繁殖計画を立てる際に、遺伝子型の情報を参考にした研究はいくつか見られる (例えば、Russello and Amato 2004; Ramirez et al. 2006)。家系情報が得られる場合には、血統登録書に基づいて繁殖計画を立てることが非常に有効であるが、その場合でも創設個体の系統関係は不明として記載せざるを得ない。すなわち、個体の血統情報に基づく繁殖計画では、創設個体同士には血統関係がなく互いに独立した系統であると仮定されることが通例である。しかし、創設個体の数および相互の遺伝的関係は飼育集団の遺伝子プールの大さを左右する主要な要因であるので (Witzenberger and Hochkirch 2011)、創設個体の遺伝的組成はできる限り明らかにしておくことが望ましい。このような観点から、現在日本に存在する創設個体の遺伝子型を調べておくことが今後必要であろう。また、既に死亡している個体の遺伝子型についても、残された試料を分析するか、あるいは子孫となる個体の遺伝子型を基にして特定しておくことが望まれる。

MK戦略に基づく繁殖計画がもたらす結果として、対立遺伝子の頻度を均質化させることが理論的に予想されている (Saura et al. 2008)。MK戦略は本来、遺伝子資源の喪失を最小限にとどめることを管理目標にしているが、一方で、野外集団の遺伝的組成をそのまま飼育下で保存することを域外保全の目標とすることもできる (Lacy 2000)。この視点に立つと、MK戦略は最適とは言えないことにも留意が必要である。今後、中国大陸におけるコウノトリの野生集団における遺伝的組成が詳細に明らかになれば、それを参照値として飼育集団の遺伝的組成をどのような方法で維持するかを検討することも可能になろう。

飼育集団では個体数が限られているため、世代を重ねるにつれて遺伝的浮動の効果によって遺伝的多様性が減少することが理論的に予測される (Witzenberger and Hochkirch 2011)。したがって、飼育集団の遺伝的多様性を維持するためには、長期的には新たな創設個体を野生集団から導入し、減少した遺伝的多様性を底上げする必要がある。あるいは、コウノトリを飼育している他の施設から個体を導入することも検討しなくてはならない。そのとき、事前に導入候補個体の遺伝子型を特定しておくこと、飼育集団に新規に導入した場合の効果を推定することができる。本研究では豊岡での飼育および野外個体を対象に解析したが、今後は、郷公園に次いで多くの個体を飼育している多摩動物公園 (東京都) を始め、国内の他の施設で飼育されている個体の遺伝的多様性を解析し、郷公園のそれとの違いを把握しておくことが望

まれる。将来的には、国内の飼育集団および野外集団の全体をメタ個体群として捉えた遺伝的多様性の管理計画の構築が望まれる。

謝 辞

血液サンプルの採取等をしていただいた兵庫県立コウノトリの郷公園の三橋陽子獣医師および飼育員各位に心からの謝意を表す。本研究は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C) 22510248 および基盤研究 (B) 24310033の助成を受けて実施されたものである。

摘 要

豊岡で現在飼育されているあるいは過去に飼育されその後豊岡盆地に放鳥された個体を含む31個体について、マイクロサテライトの12遺伝子座をタイピングした。遺伝子座当たりの対立遺伝子数の数は平均5.08、ヘテロ接合度の期待値は平均0.608で、一つの遺伝子座を除き、ハーディ・ワインバーグ平衡からの有意なずれは認められなかった。飼育下および野外でペアを形成している個体間の遺伝的距離は比較的遠く、ミトコンドリアDNAのハプロタイプが同一の個体はペアにしないというこれまでの方針がうまく機能してきたことが示された。これらの結果に基づき、マイクロサテライト遺伝子座の解析結果のコウノトリの繁殖計画への活用の可能性について検討した。

キーワード 繁殖計画, コウノトリ, 遺伝的管理, マイクロサテライトDNA

引用文献

- Boakes EH, Wang J, Amos W (2007) An investigation of inbreeding depression and purging in captive pedigreed populations. *Heredity*, 98: 172–182.
- Delany S, Scott D (2006) *Waterbird Population Estimates*, Fourth edition. Wetlands International, Wageningen, 102 p.
- Jamieson IG, Wallis GP, Briskie JV (2006) Inbreeding and endangered species management: is New Zealand out of step with the rest of the world? *Conservation Biology*, 20: 38–47.
- Ji Y-J, Liu Y-D, Ding C-Q, Zhang D-X (2004) Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 615–617. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00754.x
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17: 230–241. doi: 10.1016/S0169-5347(02)02489-8
- Lacy RC (2000) Should we select genetic alleles in our conservation breeding program? *Zoo Biology*, 19: 279–282.
- Leberg PL, Firmin BD (2007) Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Molecular Ecology*, 17: 334–343. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03433.x
- Murata K, Satou M, Matsushima K, Satake S, Yamamoto Y (2004) Retrospective estimation of genetic diversity of an extinct Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*) population in Japan using mounted specimens and implications for reintroduction programs. *Conservation Genetics*, 5: 553–560. doi: 10.1023/B:COGE.0000041022.71104.1f
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Ramirez O, Altet L, Enseñat C, Vilá C, Sanchez A, Ruiz A (2006) Genetic assessment of the Iberian Wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics* 7:861–878. doi: 10.1007/s10592-006-9123-zu
- Robertson BC, Frauenfelder N, Eason DK, Elliott G, Moorhouse R (2009) Thirty polymorphic microsatellite loci from the critically endangered Kakapo (*Strigops habroptilus*). *Molecular Ecology Resources*, 9: 664–666. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02506.x
- Russello MA, Amato G (2004) Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, 13: 2889–2840.
- Saura M, Pérez-Figueroa A, Fernández J, Toro MA, Caballero A (2008) Preserving population allele frequencies in ex situ conservation programs. *Conservation Biology*, 22: 1277–12787. doi: 10.1111/j.1523-1739.2008.00992.x
- Shephard JM, Galbusera P, Hellemans B, Jusic A, Akhandaf Y (2009) Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics*, 10: 1525–1528. doi: 10.1007/s10592-008-9784-x
- Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL Jr, Del Lama SN, Glenn TC (2003) Development of microsatellite DNA loci from the Wood Stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3: 563–566. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00512.x
- Wang H, Lou X, Zhu Q, Huang Y, Zhou L, Zhang B (2011) Isolation and Characterization of microsatellite DNA markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science*, 28: 606–608.
- Witzenberger KA, Hochkirch A (2011) Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation*, 20: 1843–1861. doi: 10.1007/s10531-011-0074-4
- Yamamoto Y (2011) New haplotypes in the mitochondrial control region of Oriental White Storks, *Ciconia boyciana*. *Reintroduction*, 1: 77–80.
- Yamamoto Y, Murata K, Matsuda H, Hosoda T, Tamura K, Furuyama J (2000) Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Genes and Genetic Systems*, 75: 25–32.
- Zhang B, Fang S-G, Xi Y-M (2004) Low genetic diversity in the endangered Crested Ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. *Bird Conservation International*, 14: 183–190. doi: 10.1017/S0959270904000231

(2012年12月15日受理)