

齿缘摄龟线粒体基因组全序列与系统进化

蒋钦杨^① 沈夏霜^① 黄 钧^{①*} 钟瑞鹏^② 郭亚芬^{①*} 黄艳华^①
唐一波^① 严雪瑜^①

① 广西大学动物科学技术学院 南宁 530004; ② 钦州市中意龟鳖养殖场 钦州 535000

摘要: 采用常规 PCR 扩增并测序获得了齿缘摄龟 (*Cyclemys dentata*) 线粒体 DNA (mtDNA) 全序列, 并研究了其基因组结构特点; 根据 20 种龟的线粒体基因组重链蛋白编码基因序列, 分别利用最大简约法 (MP)、最大似然法 (ML) 和贝叶斯法 (Bayesian) 构建系统进化树, 探讨这些龟鳖物种之间的系统进化关系。结果显示, 齿缘摄龟线粒体基因组全序列长为 16 489 bp (GenBank 登录号为 JX455823), A + T 含量为 61.51%, 编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白质编码基因, 2 个 rRNA, 22 个 tRNA 和 1 个控制区 (D-loop), 基因组成与其他龟鳖类动物相似; 非编码区 D-loop 长 973 bp, 包含 1 个中央保守区 (CD), 2 个扩展终止结合序列区 (ETASs), 3 个保守盒 (CSBs); 构建的 MP 树、ML 树和 Bayesian 树的拓扑结构相似, 闭壳龟属 7 种龟聚为一枝, 拟水龟属 6 种龟聚为一枝, 齿缘摄龟与黑桥摄龟聚在一枝, 3 种进化树均支持这些龟鳖物种现有的分类学地位。

关键词: 齿缘摄龟; 线粒体全基因组; 系统进化关系

中图分类号: Q951 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2014)04-536-10

The Complete Mitochondrial Genome of *Cyclemys dentata* and Phylogenetic Relationships among 20 Species of Turtles

JIANG Qin-Yang^① SHEN Xia-Shuang^① HUANG Jun^{①*} ZHONG Rui-Peng^②
GUO Ya-Fen^{①*} HUANG Yan-Hua^① TANG Yi-Bo^① YAN Xue-Yu^①

① College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004;

② Zhongyi Turtles Farm in Qinzhou City, Qinzhou 535000, China

Abstract: In this study, the mitochondrial (mt) genome of *Cyclemys dentata* was firstly obtained; the relationship among 20 turtles was then analyzed based on mitochondrial DNA (mtDNA). According to the mtDNA sequence of *C. atripons* which had been published in GenBank (No. EF067858), sixteen PCR primers were designed to amplify the mtDNA sequence of the *C. dentata* (Table 1). These PCR products were inserted into the pMD-18T cloning vectors respectively, the restructured vectors were then sequenced, and these sequencing fragments were spliced by Lasergene 7.0 software. The structure and gene order of *C. dentata* mtDNA were determined by referring to *C. atripons* mtDNA, and using tRNAscan-SE 1.21 to predicted tRNAs. Based on 20 turtles' mtDNA heavy chain protein-coding genes sequences, three phylogenetic trees were constructed by Maximum parsimony (MP), Maximum-likelihood (ML) and Bayesian methods using three

基金项目 广西水产畜牧兽医局专项项目 (桂渔牧财[2011]52 号, 桂渔牧财[2012]30 号);

* 通讯作者, E-mail: hj1351@163.com, guoyafen@163.com;

第一作者介绍 蒋钦杨, 男, 副教授; 研究方向: 动物遗传育种; E-mail: jiangqinyang@126.com。

收稿日期: 2013-11-20, 修回日期: 2014-03-19

programs, respectively. The results indicated that the total length of mtDNA of *C. dentata* was 16 489 bp (GenBank No. JX455823), similar to other turtles' mitochondrial genome. It encoded 37 genes, consisting of 13 protein-coding genes, 2 ribosomal RNA genes (12S rRNA and 16S rRNA), 22 transfer RNA genes (tRNAs) and a control region (D-loop) (Fig. 1, Table 2). The bases composition of *C. dentata* mt genome was the same as that of *C. atripons*. Its A + T content was 61.51%, A + T contents of 13 protein-coding genes were from 57.89% to 67.86%, and their GC contents were low (Table 3). The average length of 20 turtles' mt genomes was 16 692.5 bp, including 34.1% A, 27.0% T, 26.0% C and 12.9% G (Table 4). O_L sequence was 36 bp in length; it could fold into a hairpin secondary structure which contained a 10 bp arm and an 8-base ring (Fig. 2). The D-loop of *C. dentata* mtDNA contained a central domain (CD), two extended termination associated sequences (ETASs) and three conserved sequence blocks (CSBs) (Fig. 3). From the Fig. 4, we knew that the MP, ML and Bayesian trees had analogical topologies, seven species of genus *Cuora* clustered into a branch, six species of genus *Mauremys* clustered into another branch, and the *C. dentata* clustered together with the *C. atripons*. The analysis results of three phylogenetic trees supported the existing classification of these turtles.

Key words: *Cyclemys dentata*; Mitochondrial genome; Phylogenetic relationships

线粒体 DNA 是动物细胞核外的遗传物质, 具有分子量小、进化速度快和母系遗传等特性, 是研究物种起源和分化的可靠分子标记 (于晓丽等 2008)。动物线粒体 DNA 是闭合环状的双链 DNA, 大小 15 ~ 20 kb, 一般包含 13 个蛋白质编码基因、2 个核糖体 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因和 1 个非编码区 (D-loop)。线粒体基因组全序列被广泛应用于动物高阶元的系统发育研究 (Ren et al. 2009)。

全世界现存龟鳖类 442 种, 分属于侧颈龟亚目 (Pleurodira) 和曲颈龟亚目 (Cryptodira) 两大类群, 其中海龟有 7 种, 淡水龟 435 种 (van Dijk et al. 2012)。龟鳖类物种多样性丰富, 其物种分类学研究有许多报道 (如 Caccone et al. 2004, Spinks et al. 2004, 毕亭亭等 2011)。齿缘摄龟 (*Cyclemys dentata*), 俗称亚洲叶龟, 在分类学上属曲颈龟亚目地龟科 (Geoemydidae) 齿缘龟属 (中国动物志数据库 <http://www.kiz.ac.cn/zyfw/kxsjk/dwsjk/>)。齿缘摄龟主要分布于马来西亚半岛、新加坡、苏门答腊岛、爪哇岛、婆罗德岛、菲律宾群岛、越南以及中国的云南、广西等区域。目前很多种类龟鳖的线粒体基因组全序列已被公布, 但齿缘摄龟线粒体基因全序列尚未见有文献报到。因此, 本文测定了齿缘摄龟的线粒体基因组全序

列, 分析了其结构特点, 通过构建分子系统发育树探讨了齿缘摄龟与其他龟鳖类物种的系统进化关系。本文结果可为该物种的资源保护及分子遗传学提供基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取 广西壮族自治区钦州市中意龟鳖养殖场为本实验提供实验研究用齿缘摄龟样品, 样品原产地广西龙州县, 取自然死亡的齿缘摄龟后腿肌肉组织, 采用 TIANGEN 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技北京有限公司) 提取总 DNA, -40℃ 保存备用。

1.2 线粒体 DNA 测序引物设计与合成 参照 GenBank 中公布的黑桥摄龟 (*C. atripons*) 线粒体基因组全序列 (EF067858), 设计了 16 对特异性 PCR 扩增引物, 相邻 PCR 产物片段之间前后重叠 50 bp 以上。引物送上海生工生物工程股份有限公司进行合成, 引物序列详见表 1。

1.3 PCR 扩增及片段克隆 PCR 扩增反应体系: Premix Taq (TAKARA, 大连宝生物公司) 7.5 μ l, DNA 模板 1.0 μ l (约 50 ng), 上下游引物各 (10 μ mol/L) 1.0 μ l, 补足 ddH₂O 至 15 μ l。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 53.0℃ ~ 56.0℃ 退火 30 s, 72℃

表 1 齿缘摄龟 mtDNA 序列 PCR 扩增引物
Table 1 PCR amplification primers of the *Cyclemys dentata* mtDNA

序号 No.	引物序列 (5'→3') Primers sequence	预计长度 (bp) Estimate length	退火温度 (°C) Annealing temperature
CM1-F23	CATGGCACTGAAGTTGCCAAG	1 209	56
CM1-R1232	TTTCGTCTTTCCCTTGCGGTA		
CM2-F1155	CCCACCATAAACCAATTA AAC	1 121	55
CM2-R2276	GTTTTATTTTACTCCGAGGTCG		
CM3-F2171	TAAGACGAGAAGACCCTGTGGAAC	1 275	55
CM3-R3446	AGGAAGAATAAGGCGAATGGG		
CM4-F3378	GCACCATTGATTTAACCGAA	1 129	55
CM4-R4507	ATTATTCATCCTAGATGGGCGA		
CM5-F4459	GGGGACTAAATCAAACCCAAC	1 287	55
CM5-R5746	TATACTGTTTCATCCTGTGCCCCG		
CM6-F5628	GTACCCTTAATAATTGGAGCGC	1 278	56
CM6-R6906	TTCTTGGGTTTGTACATGGGC		
CM7-F6856	TAGAATGATTACATGGCTGTCCACC	1 219	56
CM7-R8075	TTGCTTAGGGTTGGGAAGATGAT		
CM8-F7966	CCAATATAAACCCATGAACCTG	1 265	55
CM8-R9231	TATACACCGTCAGCGATTGTG		
CM9-F9134	CCAACCGAAACCAAACTATTC	1 176	55
CM9-R10310	CTATGGGTTAATGCGGTAGGT		
CM10-F10159	GCTGGCATAGGCTTATCATT	1 150	55
CM10-R11309	TGGCTGAGAACCATCATAGG		
CM11-F11145	CTAACACGAACAGAATGAGCA	1 160	55
CM11-R12305	TTCTGTTCGTCCTCGTCATC		
CM12-F12235	GCCAACAACATACTTCAACTT	1 256	55
CM12-R13491	TTTCATACCAGGATAGGTCG		
CM13-F13400	CCAACTCATTAGCCTACTTCA	1 228	55
CM13-R14628	TTGGCCTCATGGTAAGACAT		
CM14-F14527	CATCGGTCGAGGACTTTACTAC	1 278	55
CM14-R15805	GGGTTGCTTATCTCTCGTGAT		
CM15-F15587	TATGTATTATCGTGCATTCAT	720	55
CM15-R16306	GTGTCAGTTTAGTTGCTCTC		
CM16-F16306	GAGAGCAACTAACTGACACA	269	56
CM16-R74	AGTAAGGCTAGGACCAAAATCT		

延伸 90 s, 35 个循环; 72℃ 后延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 每个 PCR 产物的阳性单克隆菌液分别选择 6 个菌样, 平分为两组 (3 个/组), 分别送至上海捷瑞生物工程有限公司和深圳华大生物有限公司进行测序, 保证测序结果一致。若存在差异, 再挑相同的阳性单克隆菌液送测序验证。

1.4 序列拼接、分析及系统进化研究 DNA 测序结果用 Seqman 7.0 (Lasergene 7.0) 和 NCBI 中的 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行序列拼接。齿缘摄电线粒体基因组结构分析采用 MegAlign 7.0 (Lasergene 7.0) 和 BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 参照黑桥摄电线粒体确定基因组结构及碱基组成; 采用 tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 对 tRNA 进行预测分析。根据 Sbisà 等 (1997) 和 Zhang 等 (2008) 对 mtDNA 控制区序列结构进行分析。比较研究 20 种龟之间的分子遗传关系, 根据它们线粒体基因组重链上 12 个蛋白编码基因的碱基序列, 分别采用 PAUP* 4.0 软件的最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建 MP 树, 采用 PHYLIP-3.69 软件的最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建 ML 树, 采用 MrBayes 3.2.2 软件贝叶斯法 (Bayesian) 构建 Bayesian 树, 各种方法均设置 1 000 次重复运算, 计算模型等其他设置使用软件的默认参数, 建树时选择陆龟科 (Testudinidae) 凹甲陆龟 (*Manouria impressa*) 作为外群。

2 结果与分析

2.1 齿缘摄电线粒体基因组组成与结构 齿缘摄电线粒体基因组 (mtDNA) 序列全长为 16 489 bp, 提交 GenBank 获登录号 JX455823。齿缘摄电线粒体基因组包含 37 个基因 (图 1), 包括 22 个转运 RNA 基因 (tRNA), 2 个核糖体 RNA 基因 (16S rRNA 和 12S rRNA), 13 个蛋白质编码基因, 以及 1 个控制区 (D-loop) 和轻

链复制起始区 (rep_origin)。13 个蛋白质编码基因中, 除 *NADH* 脱氢酶亚基基因 *ND6* 位于轻链上外, 其他 12 基因均位于重链上, 包括 *NADH* 脱氢酶亚基基因 *ND1* ~ *ND5* 和 *ND4L*、细胞色素 C 氧化酶亚基基因 *COX1* ~ *COX3*、细胞色素 *b* 基因 *Cyt b*、ATPase 亚基基因 *ATP6* 和 *ATP8*。全部蛋白质编码基因的起始密码子都是 ATG, 但终止密码子不一致, 其中 7 个编码基因 (*ND1*、*ND4*、*ND4L*、*ND6*、*COX2*、*ATP6* 和 *ATP8*) 终止密码子为 TAA, 2 个编码基因 (*COX1* 和 *ND6*) 终止密码子为 AGG, 4 个编码基因 (*ND2*、*ND3*、*COX3* 和 *Cyt b*) 为不完整的终止密码子 T - - (表 2)。

2.2 碱基组成 齿缘摄龟 mtDNA 碱基组成为 A = 34.27%, G = 13.08%, T = 27.24%, C = 25.40%, A + T (61.51%) 含量非常高。齿缘摄龟 mtDNA 碱基组成、蛋白质编码基因的碱基偏好性都与黑桥摄龟相似 (表 3)。齿缘摄龟 mtDNA 包含的 13 个蛋白质编码基因的 A + T 含量在 57.89% ~ 67.86% 之间, 其中, *Cyt b* 的 A + T 含量最低, *ATP8* 的 A + T 含量最高。计算蛋白质编码基因的碱基偏好性, *COX1*、*ND3* 和 *ND4L* 的 AT 偏好性为负值, 其他 10 个基因的 AT 偏好性均为正值, 全部蛋白质编码基因的 GC 偏好性都为负值。

对比分析 20 种龟线粒体基因组发现, 它们的 mtDNA 平均长度为 16 692.5 bp, 核苷酸组成是 A = 34.1%, G = 12.9%, T = 27.0%, C = 26.0% (表 4)。20 种龟 mtDNA 的大小、核苷酸组成比例都存在差异, 其中黄额闭壳龟 (*Cuora galbinifrons*) 的 mtDNA 最长 (17 244 bp), 其他龟的 mtDNA 长度均在 16.5 kb 左右。本文测序获得的齿缘摄龟 mtDNA 大小、核苷酸组成比例与其他物种相近。

2.3 非编码区 齿缘摄龟 mtDNA 的轻链复制起始区 (rep_origin, O_L) 位于 mtDNA 轻链上 WANCY 区域的 tRNA-Asn 和 tRNA-Cys 之间, 长度为 36 bp (表 2, 图 1); 二级结构预测显示, O_L 可形成一个发夹状的二级结构, 包含 1 个 10 碱基对的臂和 1 个 8 碱基的环 (图 2)。

表 2 齿缘摄龟线粒体基因组组成

Table 2 Construction of the *Cyclemys dentata* mitochondrial genome

基因 Gene	起始位置 Origin location	终止位置 Stop location	长度 (bp) Length	起始密码子 Initiation codon	终止密码子 Termination codon
tRNA-Phe	1	70	70		
12S rRNA	71	1036	966		
tRNA-Val	1037	1106	70		
16S rRNA	1107	2705	1 599		
tRNA-Leu	2706	2781	76		
ND1	2782	3750	969	ATG	TAA
tRNA-Ile	3753	3822	70		
tRNA-Gln	3822	3892	71		
tRNA-Met	3892	3960	69		
ND2	3961	5002	1 042	ATG	T - -
tRNA-Trp	5003	5077	75		
tRNA-Ala	5079	5147	69		
tRNA-Asn	5149	5221	73		
rep_origin	5223	5250	28		
tRNA-Cys	5248	5313	66		
tRNA-Tyr	5314	5384	71		
COX1	5386	6933	1 548	ATG	AGG
tRNA-Ser	6925	6995	71		
tRNA-Asp	6998	7067	70		
COX2	7068	7754	687	ATG	TAA
tRNA-Lys	7756	7828	73		
ATP8	7830	7997	168	ATG	TAA
ATP6	7988	8671	684	ATG	TAA
COX3	8671	9454	784	ATG	T - -
tRNA-Gly	9455	9523	69		
ND3	9524	9872	351	ATG	T - -
tRNA-Arg	9873	9942	70		
ND4L	9943	10242	300	ATG	TAA
ND4	10236	11612	1 377	ATG	TAA
tRNA-His	11626	11695	70		
tRNA-Ser	11696	11761	66		
tRNA-Leu	11761	11832	72		
ND5	11833	13638	1 806	ATG	TAA
ND6	13634	14158	525	ATG	AGG
tRNA-Glu	14159	14226	68		
Cyt b	14231	15370	1 150	ATG	T - -
tRNA-Thr	15375	15446	72		
tRNA-Pro	15448	15516	69		
D-loop	15517	16489	973		

表 4 20 种龟线粒体基因组的核苷酸组成对比

Table 4 Nucleotides composition comparision of mitochondrial genomes from 20 turtle species									
科 Family	属 Genus	种 Species	登录号 Accessed number	核苷酸所占比例(%) Nucleotides proportion				mtDNA 长度 (bp) Length	
				T	C	A	G		
地龟科 Geoemydidae	闭壳龟属 <i>Cuora</i>	安布闭壳龟 <i>C. amboinensis</i>	FJ763736	26.7	26.4	33.8	13.1	16 708	
		金头闭壳龟 <i>C. aurocapitata</i>	AY874540	27.4	26.0	33.6	13.0	16 890	
		布氏闭壳龟 <i>C. bourreti</i>	JN020145	26.8	26.2	33.9	13.1	16 649	
		黄额闭壳龟 <i>C. galbinifrons</i>	EU809939	27.6	25.8	34.1	12.5	17 244	
		锯缘摄龟 <i>C. mouhotii</i>	DQ659152	27.3	25.8	34.0	12.8	16 837	
		潘氏闭壳龟 <i>C. pani</i>	GQ889364	27.4	25.9	33.7	13.0	16 922	
		安南闭壳龟 <i>C. picturata</i>	JF712890	26.9	26.1	34.0	13.0	16 623	
		齿缘龟属 <i>Cyclemys</i>	黑桥摄龟 <i>C. atripons</i>	EF067858	27.2	25.4	34.4	13.0	16 500
	齿缘摄龟 <i>C. dentata</i>		JX455823	27.2	25.4	34.3	13.1	16 489	
	东方龟属 <i>Heosemys</i>	庙龟 <i>H. annandalii</i>	JF742646	26.7	25.9	35.1	12.3	16 604	
		日本石龟 <i>M. japonica</i>	GU938833	26.5	26.5	34.0	13.0	16 443	
	中华花龟 <i>M. sinensis</i>	FJ871126	26.2	26.8	33.8	13.2	16 461		
		拟水龟属 <i>Mauremys</i>	黄喉拟水龟 <i>M. mutica</i>	DQ453753	26.5	26.5	33.8	13.2	16 609
	乌龟 1 <i>M. reevesii</i> 1		AY676201	26.6	26.4	34.0	12.9	16 576	
	乌龟 2 <i>M. reevesii</i> 2	FJ469674	27.0	26.1	34.1	12.8	16 781		
	大头乌龟 <i>M. megalocephala</i>	HM132059	27.2	25.9	34.1	12.8	16 783		
	果龟属 <i>Notochelys</i>	果龟 <i>N. platynota</i>	HQ853256	28.1	25.3	34.4	12.2	16 981	
		眼斑龟属 <i>Sacalia</i>	眼斑龟 <i>S. bealei</i>	GU183364	26.9	25.9	34.2	13.1	16 561
	四眼斑龟 <i>S. quadriocellata</i>		EF088646	26.9	25.9	34.3	12.9	16 551	
	陆龟科 Testudinidae	凹甲陆龟属 <i>Manouria</i>	凹甲陆龟 <i>M. impressa</i>	EF661586	26.3	26.4	34.2	13.1	16 642
				平均 Mean	27.0	26.0	34.1	12.9	16 692.5

长度分别为 57 bp 和 60 bp, 3 个保守盒 CSB1、CSB2 和 CSB3, 长度分别为 18 bp、19 bp 和 19 bp (图 3)。

2.4 系统进化分析 对比分析 19 种 20 个龟的线粒体基因组中位于重链上的 12 个蛋白编码基因碱基序列, 分别采用最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建 MP、ML 和 Bayesian 进化树, 三种方法构建的 3 棵进化树具有相似的拓扑结构(图 4), 在这些龟鳖物种区分上表现出相同的结果, 如锯缘摄龟与其他 6 种闭壳龟聚为一个大枝; 2 种乌龟与日本石龟、中华花

龟、黄喉拟水龟聚为另外一个大枝; 齿缘摄龟和黑桥摄龟聚为一枝, 再与果龟聚类; 眼斑龟和四眼斑龟聚为一枝, 再与庙龟聚类; 凹甲陆龟单独一枝, 位于进化树的最外端。本文研究结果将 20 个龟聚为两大支系, 对应地龟科(Geoemydidae)和陆龟科(Testudinidae)。在地龟科聚类中, 19 个龟分类入 6 个属: 闭壳龟属(*Cuora*)7 个, 拟水龟属(*Mauremys*)6 个, 东方龟属(*Heosemys*)1 个, 果龟属(*Notochelys*)1 个, 齿缘龟属(*Cyclemys*)2 个, 眼斑龟属(*Sacalia*)2 个, 支持这些龟鳖物种现有的分类学地位。



图3 齿缘摄龟 mtDNA D-loop 组成结构图

Fig. 3 Structure map of the *Cyclomys dentata* mtDNA D-loop

3 讨论

龟鳖类动物是一支古老和特化的爬行动物,在脊椎动物的系统演化过程中处于承前启后的重要地位,但关于龟鳖类动物的系统进化关系一直存在不少争论(Fritz et al. 2008, 夏行权等 2012)。形态学上主要根据龟鳖类的甲壳、头颈的形态、斑纹图案等进行区分,但由于这些表观容易受到生活环境等外在条件影响,以及考虑杂交混血和迁徙等因素(Fritz et al. 1997, 1999),仅靠单纯的形态特征来鉴定龟鳖类动物之间的系统进化关系不够可靠。Bramble (1974)根据形态学特征对地科龟具有闭壳结构的 4 个属进行了系统进化关系分析,其认为锯缘龟属、齿缘龟属、闭壳龟属都归于齿缘龟组,与东方龟属具有共同的祖先,与果龟属关系较远。然而, Hirayama (1984)认为闭壳龟属、锯缘摄龟属和齿缘摄龟属不是起源于同一祖先,闭壳龟属与锯缘龟属为姐妹群,两

者与齿缘摄龟属关系较远。分子生物学技术广泛应用于龟鳖类动物分类学领域研究,对形态学分类提供了可靠的辨证(Krenz et al. 2005)。吴平等(1998, 1999)利用线粒体 DNA 16S rRNA 序列研究闭壳龟类的系统进化与分类,结果支持 Hirayama (1984)的观点。刘海情等(2012)利用 *COX III* 和 *HNF-1 α* 基因序列,从线粒体基因和核基因两个不同角度来分析龟鳖类的系统进化关系,其结果支持将龟亚科、淡水龟亚科提升为龟科、淡水龟科,与万全等(2010)和郑将臣等(2011)利用线粒体 DNA 12S rRNA 基因和 16S rRNA 基因对龟鳖类动物系统发生关系的研究结果一致。本文研究根据 20 种龟的线粒体基因组的重链编码蛋白基因序列构建的 3 种系统进化树,具有相似的拓扑结构,分析结果都支持这些龟鳖物种现有的分类学地位,与文献报道的结果一致(van Dijk et al. 2012)。本文结果可为齿缘摄龟的资源保护及分子遗传学提供基础。

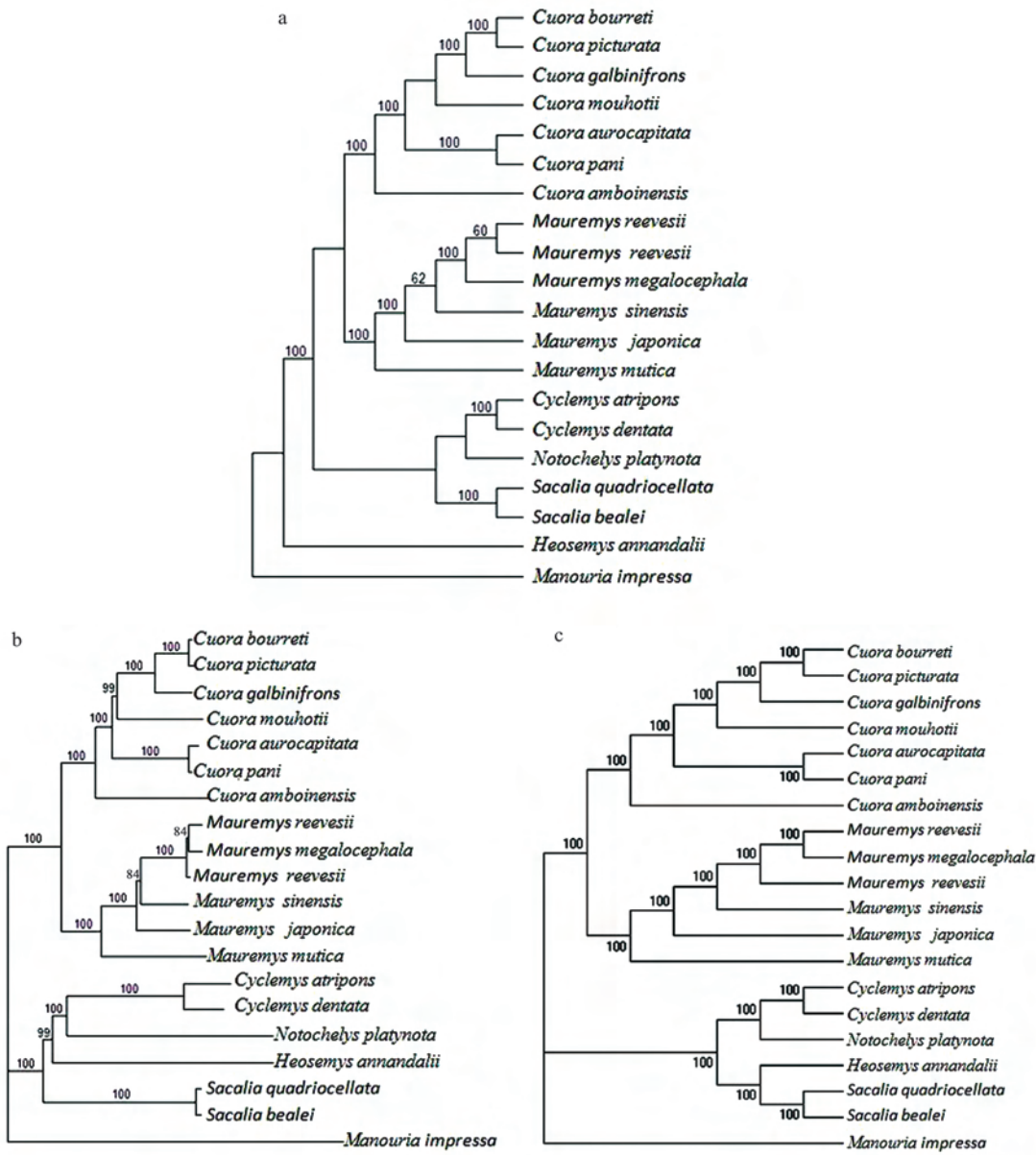


图 4 基于线粒体基因组重链蛋白编码基因序列构建的龟鳖物种进化树
Fig. 4 Three phylogenetic trees of turtles were constructed based on the heavy chain protein-coding genes of mitochondrial genome

a. 最大简约树 (MP); b. 贝叶斯树 (Bayesian); c. 最大似然树 (ML)。枝 (节点) 上数字表示置信度。
a. Maximum parsimony (MP) tree; b. Bayesian tree; c. Maximum likelihood (ML) tree. Numbers above branches were bootstrap proportions.

Cuora bourreti. 布氏闭壳龟; *Cuora picturata*. 安南闭壳龟; *Cuora galbinifrons*. 黄额闭壳龟; *Cuora mouhotii*. 锯缘摄龟; *Cuora aurocapitata*. 金头闭壳龟; *Cuora pani*. 潘氏闭壳龟; *Cuora amboinensis*. 安布闭壳龟; *Mauremys reevesii*. 乌龟; *Mauremys megaloccephala*. 大头乌龟; *Mauremys sinensis*. 中华花龟; *Mauremys japonica*. 日本石龟; *Mauremys mutica*. 黄喉拟水龟; *Cycllemys atripons*. 黑桥摄龟; *Cycllemys dentata*. 齿缘摄龟; *Notochelys platynota*. 果龟; *Heosemys annandalii*. 庙龟; *Sacalia bealei*. 眼斑龟; *Sacalia quadriocellata*. 四眼斑龟; *Manouria impressa*. 凹甲陆龟。

参 考 文 献

- Bramble D M. 1974. Emydid shell kinesis: biomechanics and evolution. *Copeia*, 1974(3): 707–727.
- Caccone A, Gentile G, Burns C E, et al. 2004. Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, *Galápagos tortoises*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(2): 794–798.
- Fritz U, Gaulke M, Lehr E. 1997. Revision der südasiatischen Dornschildkröten-Gattung *Cyclemys* Bell 1834, mit Beschreibung einer neuen Art. *Salamandra*, 33(3): 183–212.
- Fritz U, Guicking D, Auer M, et al. 2008. Diversity of the Southeast Asian leaf turtle genus *Cyclemys*: how many leaves on its tree of life? *Zoologica Scripta*, 37(4): 367–390.
- Fritz U, Ziegler T. 1999. Contribution to the knowledge of *Cyclemys tcheponeensis* (Bourret, 1939) and the distribution of *Cyclemys* in the Indochinese region (Reptilia: Testudines: Bataguridae). *Revue Francaise d'Aquariologie Herpetologie*, 261–262: 71–78.
- Hirayama R. 1984. Cladistic analysis of batagurine turtles (Batagurinae: Emydidae: Testudinoidea): a preliminary result. *Studia Geologica Salamanticensia*, (Especial 1): 141–157.
- Krenz J G, Naylor G J P, Shaffer H B, et al. 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1): 178–191.
- Ren J F, Shen X, Sun M A, et al. 2009. The complete mitochondrial genome of the clam *Meretrix petechialis* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae). *Mitochondrial DNA*, 20(4): 78–87.
- Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205(1/2): 125–140.
- Spinks P Q, Shaffer H B, Iverson J B, et al. 2004. Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1): 164–182.
- van Dijk P P, Iverson J B, Shaffer H B, et al. (Turtle Taxonomy Working Group). 2012. Turtles of the world, 2012 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status // Rhodin A G J, Pritchard P C H, van Dijk P P, et al. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group: *Chelonian Research Monographs*, (5): 243–328. [R/OL][2013-10-20]. <http://www.iucn-tftsg.org/checklist/>.
- Zhang L, Nie L W, Cao C H, et al. 2008. The complete mitochondrial genome of the Keeled box turtle *Pyxidea mouhotii* and phylogenetic analysis of major turtle groups. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(1): 33–40.
- 毕亭亭, 聂刘旺, 张艳云, 等. 2011. 淡水龟科具闭壳结构龟类分类及系统进化研究进展. *生物学杂志*, 28(2): 80–82.
- 刘海情, 刘楚吾, 刘丽. 2012. 基于 *CO III* 和 *HNF-1α* 序列研究龟鳖类的系统进化特征. *动物学杂志*, 47(6): 92–102.
- 万全, 郑将臣, 程起群, 等. 2010. 基于 12S rRNA 序列研究龟鳖类的系统进化特征. *海洋渔业*, 32(3): 264–275.
- 吴平, 周开亚, 杨群. 1998. 用 12S rRNA 基因序列研究潮龟科 (Bataguridae) 闭壳龟类的进化. *应用与环境生物学报*, 4(4): 374–378.
- 吴平, 周开亚, 杨群. 1999. 亚洲淡水和陆生龟鳖类 12S rRNA 基因片段的序列分析和系统发生研究. *动物学报*, 45(3): 260–267.
- 夏行权, 聂刘旺. 2012. 龟鳖目淡水龟科系统发生关系的研究进展. *动物学杂志*, 47(6): 144–155.
- 于晓丽, 黄原. 2008. 动物线粒体 DNA 重组的研究进展. *动物学杂志*, 43(2): 145–149.
- 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 2011. 基于 16S rRNA 序列探讨龟鳖类的遗传分化和系统发生. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 37(2): 199–205.