

基于 *CO III* 和 *HNF-1 α* 序列研究龟鳖类的系统进化特征

刘海情 刘楚吾 刘丽*

广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室 湛江 524025

摘要: 用 PCR 扩增和测序的方法, 获得小鳄龟 (*Chelydra serpentina*) 的 *CO III* 和 *HNF-1 α* 序列, 并分别结合 NCBI 中其他龟鳖的同源性序列进行比对分析。比对后得到 757 bp 的 *CO III* 一致序列和 769 bp 的 *HNF-1 α* 一致序列。其中, *CO III* 一致序列含有可变位点 324 个, 序列总变异率为 42.8%, 简约信息位点 230 个; T、C、A、G 的平均含量分别为 27.5%、26.6%、30.8%、15.1%, A + T 含量 (58.3%) 高于 G + C 含量 (41.7%), 转换/颠换比率 (R) 为 2.62。 *HNF-1 α* 一致序列有变异位点 112 个, 变异率为 14.6%, 简约信息位点 67 个; T、C、A、G 的平均含量为 26.1%、23.1%、28.3%、22.6%, A + T 含量为 54.4%, G + C 含量为 45.7%, 转换/颠换比率 (R) 为 1.42。基于 Kimura 双参数模型计算龟鳖类种间、属间、科间遗传距离, 并采用邻接法、最大简约法和最大似然法构建分子系统进化树。结果显示: 基于 *CO III* 序列的淡水龟科 4 个属间的遗传距离为 0.090 ~ 0.153, 平均遗传距离为 0.129; 曲颈龟亚目 5 个科之间的遗传距离为 0.150 ~ 0.207, 平均遗传距离为 0.177; 基于 *HNF-1 α* 序列的龟科 9 属间的遗传距离为 0.003 ~ 0.051, 平均为 0.016; 鳄龟科、龟科、淡水龟科 3 科间的遗传距离为 0.044 ~ 0.067, 平均为 0.053。由遗传距离和构建的系统进化树可知, 淡水龟科与陆龟科具有较近的亲缘关系, 而与龟科的亲缘关系较远; 支持龟科重新划分为两个分支; 鳄龟科和海龟科亲缘关系较近, 大鳄龟 (*Macrochelys temminckii*) 和小鳄龟可能同为一属。

关键词: 龟鳖类; *CO III*; *HNF-1 α* ; 系统进化

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2012)06-92-11

Phylogenetic Characteristics of Turtles Based on *CO III* and *HNF-1 α* Sequence

LIU Hai-Qing LIU Chu-Wu LIU Li*

Fisheries College, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524025, China

Abstract: *CO III* and *HNF-1 α* sequences of *Chelydra serpentina* were obtained by using PCR amplification and sequencing in order to study the phylogenetic relationships of turtles. The homologous sequences of other turtles were downloaded from NCBI, and analyzed together with the sequences of *C. serpentina*. After alignment, 757 bp consensus sequences of *CO III* and 769 bp consensus sequences of *HNF-1 α* were obtained. A total of 324 variable sites were detected in the *CO III* sequence, accounting for 42.8% of total sequences, and there were 230 parsim informative sites. The average contents of T, C, A and G were 27.5%, 26.6%, 30.8%,

基金项目 广东省科技计划农业攻关项目 (No. 2010B020308004);

* 通讯作者, E-mail: zjouliuli@163.com;

第一作者介绍 刘海情, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产经济动物繁殖生物学; E-mail: liuhaiqing4321@163.com。

收稿日期: 2012-06-26, **修回日期:** 2012-09-07

and 15.1% respectively, the content of A + T (58.3%) was bigger than that of G + C (41.7%), and the ratio between transition and transversion was 2.62. In the *HNF-1 α* sequences, we detected 112 variable sites, accounting for 14.6% of total sequences, and 67 parsim informative sites were also found here. The average content was found to be 26.1% in T, 23.1% in C, 28.3% in A and 22.6% in G, the content of A + T and G + C were 54.4% and 45.7%, respectively, and the ratio between transition and transversion was 1.42. Interspecific, intergenus and interfamily genetic distances were calculated based on the kimura-2-parameter model, and the phylogenetic trees were constructed using neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) methods. The results indicated that kimura-2-parameter distances among 4 genus within Bataguridae based on *CO III* sequences ranged from 0.090 to 0.153, with an average of 0.129, the distances among 7 families within Testudines ranged from 0.150 to 0.207, with average value 0.177, and the kimura-2-parameter distances among 11 genus of Emydidae and Bataguridae based on *HNF-1 α* sequences ranged from 0.003 to 0.051, with an average of 0.016, the distance among Chelydridae, Emydidae and Bataguridae were from 0.044 to 0.067 with average value 0.053. According to the genetic distance and phylogenetic trees, Bataguridae is closer to Testudinidae than that of Emydidae to Testudinidae. The data indicate that Emydidae may be redivided into two clades. Chelydridae and Cheloniidae have a close relationship, while *Macrolemys temminckii* and *C. serpentina* may be combined into one genus.

Key words: Turtles; *CO III*; *HNF-1 α* ; Phylogeny

龟鳖目是形态学上最特化的爬行动物之一,最早的化石出现在约 2 亿年前,现存的龟鳖目动物可分为曲颈龟亚目和侧颈龟亚目,共有 14 科,324 种^[1]。基于形态学特征的龟鳖分类和系统进化关系的争论一直存在^[2-4]。随着分子生物学技术在分类及进化关系研究上的应用,很多龟鳖的分类地位得到修订和完善,但是仍有一些争议。Gaffney^[3]利用分支系统学的方法在总科水平上将曲颈龟亚目分为鳖总科、陆龟总科、海龟总科,并且将鳄龟科归为陆龟总科;郑将臣等^[5]采用 *R35*、*RAG2* 两个核基因对部分龟鳖类进行了系统进化研究,认为鳄龟科和海龟总科是姐妹群的关系,并支持淡水龟科与陆龟科的亲缘关系较近而与龟科关系较远的观点;Mcdowell^[6]建议将龟科拆分为龟亚科和淡水龟亚科;而万全等^[7]以及 Gaffney 等^[8]的研究结果都支持将 Mcdowell^[6]定义的龟亚科、淡水龟亚科提升为龟科和淡水龟科。

线粒体 DNA (mitochondrion DNA, mtDNA) 具有结构简单、母性遗传、缺乏重组、进化速率相对较快等特点^[9],已广泛应用于进化遗传学、系统发生学等研究领域^[10-14]。和 mtDNA 相比,核基因组 DNA 碱基位点变异同质性更

高、碱基替代速率距阵更均匀、进化速率更慢,是一种解决久远分歧的较好的标记^[15]。虽然国内外应用 mtDNA 和核基因对龟鳖类进行分子分类的研究较多^[5,7,16-21],但是目前利用细胞色素 C 氧化酶亚基 III (cytochrome c oxidase subunit 3, *CO III*) 和肝细胞核因子-1 α (hepatocyte nuclear factor 1-alpha, *HNF-1 α*) 基因探讨龟鳖类遗传分化和系统进化地位的报道却较少。*CO III* 是线粒体基因,进化速率较快,适于属、种阶元的系统发育研究;*HNF-1 α* 是核基因,进化速率较慢,在重建科及科以上阶元等亲缘关系较远类群间的系统进化关系时,能构建出可靠性较高的系统发育树^[14]。因此,本研究利用 *CO III* 和 *HNF-1 α* 基因,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,为解决龟鳖分类上的争议提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料 小鳄龟 (*Chelydra serpentina*) 样品采自广东省炜杰龟鳖养殖场,取其尾部肌肉于无水酒精中 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照 Sambrook

等^[22]及卢圣栋^[23]的方法,利用苯酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA,并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后 4℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及序列测定 *CO* III 基因扩增采用引物 L1、H1^[24], L1: 5'-GCCTCTACCTACAAGAAAAC-3', H1: 5'-GAARAATCGAATTGAGAATGG-3'。 *HNF-1 α* 基因扩增采用引物 HNFAL-F、HNFAL-R^[14], HNFAL-F: 5'-GCAGCCCTCTACACCTGGTA-3', HNFAL-R: 5'-CAATATCCCCTGACCAGCAT-3'。

PCR 扩增总体系为 25.0 μ l, 其中 PCR Buffer (10 \times) 2.5 μ l, dNTP (2 mmol/L) 2.0 μ l, 正、反向引物 (5 μ mol/L) 各 1.0 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.15 μ l, DNA 模板 (100 ng/ μ l) 1.0 μ l, 双蒸水 17.35 μ l。反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ (*CO* III)、59℃ (*HNF-1 α*) 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪记录结果, 再用纯化试剂盒纯化。PCR 产物纯化后与 PMD-19T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 最后筛选出的阳性克隆由上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 DNA 序列数据处理及分析 利用 Contig-Express^[25] 对所测得的序列进行拼接, 再利用 MEGA5.0^[26] 对所测序列以及通过 NCBI 中 BLAST 所得同源序列进行比对分析, 计算其碱基组成、变异位点、简约信息位点数和转换/颠换比率等遗传信息, 并基于 Kimura 双参数模型 (Kimura-2-parameter, K-2-P)^[27] 计算种、属、科间的遗传距离。

1.2.4 系统进化树的构建 为了判断序列是否适合用于系统进化分析, 运用 2 种方法检测序列的饱和度。一种是基于转换和颠换与 K-2-P 的作图分析^[27]; 另一种是运用 Iss 指数检测^[28]。采用邻接 (neighbor joining, NJ) 法、最大简约 (maximum parsimony, MP) 法和最大似然 (maximum likelihood, ML) 法构建分子系统树。3 种树均用 MEGA5.0 软件构建, 采用 Bootstrap 检验分子系统树各节点的置信值 (3 种树均重

复 1 000 次)。

2 结果与分析

2.1 序列组成分析 经 PCR 扩增及序列测定, 得到了小鳄龟的 *CO* III 基因序列 (793 bp) 和 *HNF-1 α* 基因序列 (976 bp)。序列均已提交 GenBank 数据库, 登录号见表 1。从 NCBI 上下下载其他龟鳖类的 *CO* III 序列和 *HNF-1 α* 序列进行分析 (表 1)。经比对后, 得到 757 bp 的 *CO* III 一致序列, 其中, 可变位点 324 个, 保守位点 430 个, 序列总变异率为 42.8%, 简约信息位点 230 个, 单变异多态位点 94 个; T、C、A、G 的平均含量为 27.5%、26.6%、30.8%、15.1%, A + T 含量 (58.3%) 高于 G + C 含量 (41.7%); 在 324 个可变位点中, 转换数为 76, 颠换数为 29, 转换/颠换比率 (R) 为 2.62。得到 *HNF-1 α* 的一致序列为 769 bp, 变异位点 112 个, 保守位点 655 个, 变异率为 14.6%, 简约信息位点 67 个, 单变异多态位点 45 个; T、C、A、G 的平均含量为 26.1%、23.1%、28.3%、22.6%, A + T 含量为 54.4%, G + C 含量为 45.7%。在 112 个可变位点中, 转换数为 15, 颠换数为 11, 转换/颠换比率 (R) 为 1.42。

2.2 遗传距离分析 采用 MEGA5.0 计算各种间、属间、科间的 K-2-P 遗传距离。其中基于 *CO* III 序列 23 种龟间的遗传距离见表 2。淡水龟科 4 个属间的遗传距离为 0.090 ~ 0.153, 平均遗传距离为 0.129 (表 3); 曲颈龟亚目 5 个科之间的遗传距离为 0.150 ~ 0.207, 平均遗传距离为 0.177 (表 4)。从表 4 可知, 鳄龟科与海龟科间的遗传距离小于鳄龟科与其他各科之间的遗传距离, 淡水龟科与陆龟科的遗传距离比淡水龟科与其他科间的遗传距离都要小, 说明鳄龟科与海龟科以及淡水龟科与陆龟科的亲缘关系较近。

基于 *HNF-1 α* 序列 19 种龟间的遗传距离见表 5。龟科 9 属间的遗传距离为 0.003 ~ 0.051, 平均为 0.016 (表 6); 鳄龟科、龟科、淡水龟科 3 科间的遗传距离为 0.044 ~ 0.067, 平均为 0.053 (表 7)。从表 6 可知, 箱龟属、拟龟属、

表 1 龟鳖 *CO III* 和 *HNF-1 α* 序列在 GenBank 中的登录号Table 1 The accession number of *CO III* and *HNF-1 α* sequence of turtles in GenBank

种类 Species	<i>CO III</i>	种类 Species	<i>HNF-1α</i>
陆龟科 Testudinidae		淡水龟科 Bataguridae	
扁陆龟属 <i>Malacochersus</i>		拟水龟属 <i>Mauremys</i>	
扁陆龟 <i>M. tornieri</i>	DQ080042	黄喉拟水龟 <i>M. mutica</i>	EF011277
陆龟属 <i>Testudo</i>		闭壳龟属 <i>Cuora</i>	
缘翅陆龟 <i>T. marginata</i>	DQ080047	金头闭壳龟 <i>C. aurocapitata</i>	EF011280
欧洲陆龟 <i>T. graeca</i>	DQ080050	三线闭壳龟 <i>C. trifasciata</i>	EF011298
印支陆龟属 <i>Indotestudo</i>		百色闭壳龟 <i>C. mccordi</i>	EF011287
西里贝斯陆 <i>I. forstenii</i>	DQ080044	鳄龟科 Chelydridae	
缅甸陆龟 <i>I. elongate</i>	DQ656607	大鳄龟属 <i>Macrolemys</i>	
土陆龟属 <i>Geochelone</i>		大鳄龟 <i>M. temminckii</i>	GU085612
豹纹陆龟 <i>G. pardalis</i>	DQ080041	鳄龟属 <i>Chelydra</i>	
加拉巴哥象龟 <i>G. nigra</i>	JN999704	小鳄龟 <i>C. serpentina</i>	JQ920373 *
凹甲陆龟属 <i>Manouria</i>		龟科 Emydidae	
靴脚陆龟 <i>M. emys</i>	DQ080040	箱龟属 <i>Terrapene</i>	
淡水龟科 Bataguridae		锦箱龟 <i>T. ornata</i>	FJ770657
眼斑龟属 <i>Sacalia</i>		三趾箱龟 <i>T. carolina triunguis</i>	FJ770655
眼斑龟 <i>S. bealei</i>	GU183364	拟龟属 <i>Emydoidea</i>	
四眼斑龟 <i>S. quadriocellata</i>	EF088646	布氏拟龟 <i>E. blandingii</i>	EU787090
齿缘摄龟属 <i>Cyclemys</i>		水龟属 <i>Clemmys</i>	
黑桥摄龟 <i>C. atripons</i>	EF067858	斑点水龟 <i>C. guttata</i>	EU787083
拟水龟属 <i>Mauremys</i>		石斑龟属 <i>Actinemys</i>	
草龟 <i>M. reevesii</i>	FJ469674	石斑龟 <i>A. marmorata</i>	EU787114
日本石龟 <i>M. japonica</i>	GU938833	木雕龟属 <i>Glyptemys</i>	
闭壳龟属 <i>Cuora</i>		牟氏水龟 <i>G. mühlenbergii</i>	EU787085
安布闭壳龟 <i>C. amboinensis</i>	FJ763736	木雕水龟 <i>G. insculpta</i>	EU787084
黄额闭壳龟 <i>C. galbinifrons</i>	EU809939	地图龟属 <i>Graptemys</i>	
鳄龟科 Chelydridae		伪地图龟 <i>G. pseudogeographica</i>	EU787082
大鳄龟属 <i>Macrolemys</i>		沃希托地图龟 <i>G. ouachitensis</i>	FJ770642
大鳄龟 <i>M. temminckii</i>	EF071948	地理图龟 <i>G. geographica</i>	FJ770641
鳄龟属 <i>Chelydra</i>		锦龟属 <i>Chrysemys</i>	
小鳄龟 <i>C. serpentina</i>	JQ920371 *	锦龟 <i>C. picta</i>	FJ770627
海龟科 Cheloniidae		钻纹龟属 <i>Malaclemys</i>	
海龟属 <i>Chelonia</i>		钻纹龟 <i>M. terrapin</i>	FJ770645
绿海龟 <i>C. mydas</i>	AB012104	红耳龟属 <i>Trachemys</i>	
玳瑁属 <i>Eretmochelys</i>		黄肚红耳龟 <i>T. scripta</i>	FJ770663
玳瑁 <i>E. imbricate</i>	DQ533485		
蠍龟属 <i>Caretta</i>			
蠍龟 <i>C. caretta</i>	FR694649		
丽龟属 <i>Lepidochelys</i>			
太平洋丽龟 <i>L. olivacea</i>	AM258984		
动胸龟科 Kinosternidae			
动胸龟属 <i>Kinosternon</i>			
白唇动胸龟 <i>K. leucostomum</i>	FJ915117		
鳖科 Trionychidae			
山瑞鳖属 <i>Palea</i>			
山瑞鳖 <i>P. steindachneri</i>	FJ541030		

* 为本实验所获得序列; 龟鳖类分类地位均依据国际龟类动物分类工作组 2009 年修订的分类系统^[1]。

* means the sequences obtained in this study; Classification status of turtles based on the classification system revised by Turtle Taxonomy Working Group in 2009.

表 2 23 种龟 COIII 基因序列的 Kimura 双参数遗传距离
Table 2 Kimura-2-parameter distances between COIII gene sequences of 23 turtles species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1																							
2	0.111																						
3	0.157	0.150																					
4	0.167	0.157	0.097																				
5	0.162	0.148	0.149	0.148																			
6	0.178	0.178	0.069	0.097	0.153																		
7	0.166	0.159	0.156	0.144	0.113	0.178																	
8	0.177	0.176	0.145	0.137	0.146	0.147	0.146																
9	0.184	0.191	0.190	0.166	0.133	0.191	0.154	0.159															
10	0.175	0.186	0.145	0.146	0.106	0.178	0.112	0.131	0.130														
11	0.178	0.162	0.093	0.100	0.169	0.085	0.173	0.169	0.216	0.189													
12	0.177	0.164	0.156	0.125	0.157	0.152	0.148	0.047	0.147	0.126	0.173												
13	0.173	0.166	0.164	0.138	0.085	0.170	0.111	0.143	0.130	0.063	0.178	0.123											
14	0.185	0.181	0.166	0.162	0.149	0.178	0.161	0.132	0.156	0.151	0.191	0.112	0.148										
15	0.183	0.173	0.151	0.143	0.157	0.144	0.152	0.086	0.165	0.141	0.181	0.085	0.140	0.119									
16	0.194	0.182	0.161	0.154	0.155	0.157	0.171	0.094	0.162	0.150	0.192	0.097	0.152	0.124	0.089								
17	0.197	0.217	0.198	0.191	0.197	0.199	0.208	0.218	0.206	0.181	0.216	0.196	0.188	0.192	0.199	0.210							
18	0.192	0.188	0.173	0.169	0.156	0.185	0.168	0.139	0.164	0.158	0.199	0.116	0.155	0.005	0.126	0.130	0.199						
19	0.195	0.175	0.159	0.145	0.119	0.169	0.117	0.144	0.149	0.092	0.176	0.118	0.099	0.155	0.146	0.156	0.190	0.159					
20	0.189	0.164	0.157	0.136	0.119	0.168	0.122	0.135	0.143	0.095	0.174	0.113	0.095	0.146	0.136	0.148	0.192	0.153	0.040				
21	0.183	0.163	0.164	0.146	0.132	0.184	0.112	0.134	0.145	0.116	0.181	0.130	0.121	0.173	0.153	0.164	0.208	0.176	0.108	0.113			
22	0.194	0.160	0.169	0.169	0.143	0.172	0.157	0.153	0.182	0.156	0.176	0.137	0.153	0.113	0.147	0.137	0.202	0.119	0.135	0.141	0.155		
23	0.208	0.200	0.190	0.197	0.170	0.195	0.210	0.214	0.235	0.186	0.211	0.230	0.190	0.221	0.226	0.228	0.227	0.195	0.193	0.202	0.211		

1. 小鳄龟; 2. 大鳄龟; 3. 玳瑁; 4. 绿海龟; 5. 加拉巴哥象龟; 6. 鳞龟; 7. 豹纹陆龟; 8. 草龟; 9. 靴脚陆龟; 10. 缘翘陆龟; 11. 太平洋丽龟; 12. 日本石龟; 13. 欧洲陆龟; 14. 眼斑龟; 15. 安布闭壳龟; 16. 黄额闭壳龟; 17. 白唇动胸龟; 18. 四眼斑龟; 19. 西里贝斯陆龟; 20. 缅甸陆龟; 21. 扁陆龟; 22. 黑桥摄龟; 23. 山瑞鳖。

1. *Chelydra serpentina*; 2. *Macrochelys temminckii*; 3. *Eretmochelys imbricate*; 4. *Chelonia mydas*; 5. *Geochelone nigra*; 6. *Caretta caretta*; 7. *G. pardalis*; 8. *Maremys reevesii*; 9. *Manouria emys*; 10. *Testudo marginata*; 11. *Lepidochelys olivacea*; 12. *Maremys japonica*; 13. *T. graeca*; 14. *Sacalia bedleri*; 15. *Cuora amboinensis*; 16. *C. galbinifrons*; 17. *Kinosternon leucostomum*; 18. *S. quadricellata*; 19. *Indotestudo forsteri*; 20. *I. elongate*; 21. *Malacochersus tornieri*; 22. *Cyclemys atripons*; 23. *Palea steindachneri*.

表 5 19 种龟类 *HNF-1 α* 基因序列的 Kimura 双参数遗传距离
 Table 5 Kimura-2-parameter distances between *HNF-1 α* gene sequences of 19 turtles species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1																		
2	0.012																	
3	0.065	0.067																
4	0.044	0.044	0.046															
5	0.047	0.047	0.046	0.006														
6	0.044	0.044	0.043	0.009	0.009													
7	0.046	0.046	0.044	0.013	0.013	0.007												
8	0.046	0.046	0.041	0.013	0.013	0.007	0.003											
9	0.049	0.049	0.044	0.013	0.013	0.007	0.012	0.012										
10	0.066	0.067	0.007	0.046	0.046	0.043	0.044	0.043	0.044									
11	0.049	0.049	0.044	0.013	0.013	0.007	0.012	0.012	0.003	0.044								
12	0.049	0.046	0.043	0.016	0.016	0.013	0.018	0.018	0.018	0.043	0.018							
13	0.071	0.072	0.027	0.049	0.049	0.046	0.050	0.050	0.050	0.026	0.050	0.046						
14	0.049	0.046	0.041	0.016	0.016	0.013	0.018	0.018	0.018	0.041	0.018	0.007	0.044					
15	0.052	0.052	0.046	0.024	0.024	0.021	0.026	0.026	0.024	0.046	0.024	0.015	0.049	0.010				
16	0.049	0.046	0.043	0.016	0.016	0.013	0.018	0.018	0.018	0.043	0.018	0.000	0.046	0.007	0.015			
17	0.047	0.044	0.040	0.015	0.015	0.012	0.016	0.016	0.016	0.039	0.016	0.006	0.043	0.004	0.012	0.006		
18	0.050	0.047	0.044	0.018	0.018	0.015	0.019	0.019	0.019	0.044	0.019	0.001	0.047	0.009	0.016	0.001	0.007	
19	0.063	0.063	0.003	0.043	0.043	0.039	0.041	0.038	0.041	0.004	0.041	0.039	0.024	0.038	0.043	0.039	0.036	0.041

1. 小鳄龟; 2. 大鳄龟; 3. 三线闭壳龟; 4. 牟氏水龟; 5. 木雕水龟; 6. 布氏拟龟; 7. 斑点水龟; 8. 石斑龟; 9. 锦箱龟; 10. 金头闭壳龟; 11. 三趾箱龟; 12. 伪地图龟; 13. 黄喉拟水龟; 14. 钻纹龟; 15. 黄肚红耳龟; 16. 沃希托地图龟; 17. 锦龟; 18. 地理图龟; 19. 百色闭壳龟。

1. *Chelydra serpentina*; 2. *Macrochelys temminckii*; 3. *Cuora trifasciata*; 4. *Glyptemys muhlenbergii*; 5. *G. insculpta*; 6. *Emydoidea blandingii*; 7. *Clemmys guttata*; 8. *Actinemys marmorata*; 9. *Terrapene ornate*; 10. *Cuora aurocapitata*; 11. *T. carolina triunguis*; 12. *Graptemys pseudogeographica*; 13. *Mauremys mutica*; 14. *Malaclemys terrapin*; 15. *Trachemys scripta*; 16. *G. ouachitensis*; 17. *Chrysemys picta*; 18. *G. geographica*; 19. *Cuora mccordi*.

表 3 基于 *CO* III 序列淡水龟科 4 属间的

Kimura 双参数遗传距离

Table 3 Kimura-2-parameter distances among 4 genus within Bataguridae based on *CO* III sequences

属 Genus	拟水龟属 <i>Mauremys</i>	眼斑龟属 <i>Sacalia</i>	闭壳龟属 <i>Cuora</i>
拟水龟属 <i>Mauremys</i>			
眼斑龟属 <i>Sacalia</i>	0.135		
闭壳龟属 <i>Cuora</i>	0.090	0.125	
齿缘摄龟属 <i>Cyclernys</i>	0.153	0.116	0.142

水龟属、石斑龟属、木雕龟属 5 属和地图龟属、锦龟属、钻纹龟属、红耳龟属 4 属之间产生了较明显的遗传分化,前者与后者之间的遗传距离明显大于龟科各属间的平均遗传距离,这说明龟科各属并不是单系起源的。

表 6 基于 *HNF-1α* 序列龟科和淡水龟科 11 属间的 Kimura 双参数遗传距离

Table 6 Kimura-2-parameter distances among 11 genus of Emydidae and Bataguridae based on *HNF-1α* sequences

属 Genus	闭壳龟属 <i>Cuora</i>	木雕龟属 <i>Glyptemys</i>	拟龟属 <i>Emydoidea</i>	水龟属 <i>Clemmys</i>	石斑龟属 <i>Actinemys</i>	箱龟属 <i>Terrapene</i>	地图龟属 <i>Graptemys</i>	拟水龟属 <i>Mauremys</i>	钻纹龟属 <i>Malaclemys</i>	红耳龟属 <i>Trachemys</i>
闭壳龟属 <i>Cuora</i>										
木雕龟属 <i>Glyptemys</i>	0.046									
拟龟属 <i>Emydoidea</i>	0.043	0.008								
水龟属 <i>Clemmys</i>	0.045	0.013	0.007							
石斑龟属 <i>Actinemys</i>	0.042	0.013	0.007	0.003						
箱龟属 <i>Terrapene</i>	0.045	0.013	0.007	0.011	0.011					
地图龟属 <i>Graptemys</i>	0.047	0.019	0.016	0.020	0.020	0.020				
拟水龟属 <i>Mauremys</i>	0.027	0.048	0.045	0.049	0.049	0.049	0.048			
钻纹龟属 <i>Malaclemys</i>	0.045	0.018	0.016	0.020	0.020	0.020	0.008	0.046		
红耳龟属 <i>Trachemys</i>	0.049	0.026	0.023	0.027	0.027	0.026	0.015	0.051	0.010	
锦龟属 <i>Chrysemys</i>	0.046	0.020	0.017	0.021	0.021	0.021	0.009	0.048	0.007	0.014

表 7 基于 *HNF-1α* 序列龟鳖目 3 科间的

Kimura 双参数遗传距离

Table 7 Kimura-2-parameter distances among 3 families within Testudines based on *HNF-1α* sequences

科 Family	鳄龟科 <i>Chelydridae</i>	淡水龟科 <i>Bataguridae</i>
鳄龟科 <i>Chelydridae</i>		
淡水龟科 <i>Bataguridae</i>	0.047	
龟科 <i>Emydidae</i>	0.044	0.067

2.3 系统发生分析与系统进化树的构建 2 种检验方法的检测结果都显示, *CO* III 和 *HNF-1α* 序列的碱基转换及颠换均未达到替代饱和,

表 4 基于 *CO* III 序列龟鳖目 5 科间的

Kimura 双参数遗传距离

Table 4 Kimura-2-parameter distances among 5 families within Testudines based on *CO* III sequences

科 Family	鳄龟科 <i>Chelydridae</i>	海龟科 <i>Cheloniidae</i>	陆龟科 <i>Testudinidae</i>	淡水龟科 <i>Bataguridae</i>
鳄龟科 <i>Chelydridae</i>				
海龟科 <i>Cheloniidae</i>	0.166			
陆龟科 <i>Testudinidae</i>	0.174	0.166		
淡水龟科 <i>Bataguridae</i>	0.181	0.164	0.150	
动胸龟科 <i>Kinosternidae</i>	0.207	0.201	0.196	0.202

其中基于转换和颠换与遗传距离的线性关系分析 *CO* III 及 *HNF-1α* 序列碱基替代饱和的结果,分别显示碱基转换和颠换在 K-2-P 遗传距离小于 0.322 0 和 0.097 2 的范围内均未达到替代饱和(图 1)。Iss 指数检测结果显示, *CO* III 和 *HNF-1α* 序列在 *t* 检验下, *P* = 0.000 0, Iss 值分别为 0.170 5 和 0.036 9, 极端对称树临界值 Iss. c 分别为 0.751 4 和 0.741 1, 极端非对称树临界值 Iss. c 分别为 0.496 1 和 0.509 8, 均显示 Iss < Iss. c, 表明两种序列的碱基替代均未饱和, 因此可用于构建系统进化树。

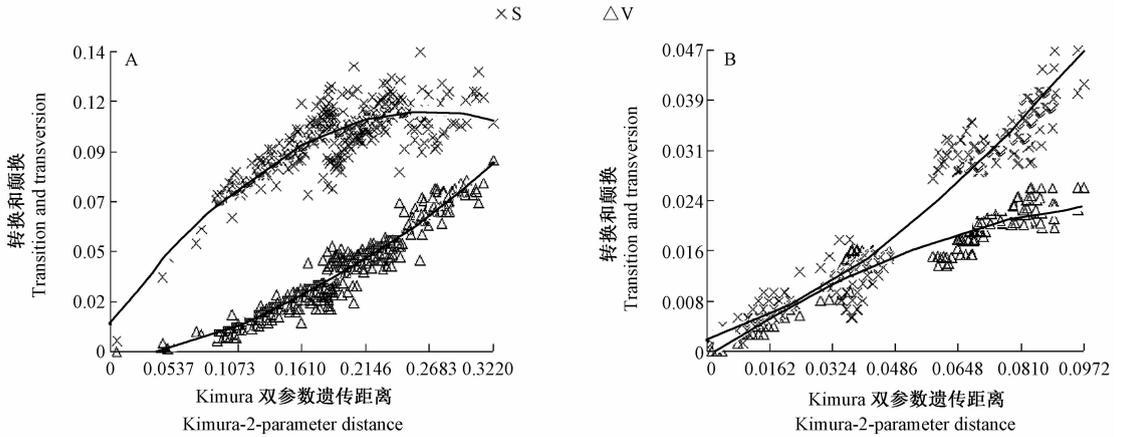


图 1 基于转换和颠换对 Kimura 双参数遗传距离检测 *CO III* 和 *HNF-1 α* 序列的饱和程度

Fig. 1 Saturation test of *CO III* and *HNF-1 α* by using transitional and transversonal variation against K-2-P distances between pairs of taxa

A. *CO III* 序列的饱和度检测; B. *HNF-1 α* 序列的饱和度检测; S. 转换; V. 颠换。

A. Saturation test figure of *CO III* sequence; B. Saturation test figure of *HNF-1 α* sequence; S. Transition; V. Transversion.

利用 NJ 法、MP 法、ML 法构建的系统进化树的拓扑结构基本一致,只是在置信度上略有差异(图 2)。基于 *CO III* 和 *HNF-1 α* 序列构建的分子系统树显示,根据传统形态学方法划分的各科成员均聚在一起,并且有较高的支持率,表明基于 *CO III* 和 *HNF-1 α* 序列构建的分子系统树可信度较高。其中基于 *CO III* 序列的系统进化树显示,陆龟科和淡水龟科聚为一大支,构成姐妹群;鳄龟科则和海龟科聚在一起,表明两者之间的亲缘关系较近;鳖科位于系统树的最底部,推测其可能是曲颈龟亚目中分化较早的科之一。基于 *HNF-1 α* 序列的系统进化树显示,龟科首先和鳄龟科聚在一起,然后再与淡水龟科聚集,表明龟科与淡水龟科亲缘关系较远,这与传统形态学分类研究结果相冲突。

3 讨论

3.1 龟科、淡水龟科、陆龟科的系统发生关系

龟科、淡水龟科、陆龟科三者之间的关系一直以来是龟鳖目动物系统进化研究领域争论的热点。本研究所构建的系统进化树显示,龟科首先和鳄龟科聚为一支,然后再与淡水龟科聚在一起(图 2),说明龟科与淡水龟科的遗传距离较远;从遗传距离上来看(表 7),淡水龟科与鳄

龟科的距离为 0.047,小于淡水龟科和龟科之间的距离(0.067),从侧面验证了淡水龟科和龟科之间已经达到了科水平的分化,因此本研究支持将龟亚科、淡水龟亚科提升为龟科、淡水龟科。这与万全等^[7]基于 12S rRNA 基因序列对龟鳖类进行系统发生研究的结果以及郑将臣等^[19]利用 16S rRNA 基因片段的研究结果一致。另外,有学者通过形态学性状^[6]和染色体性状^[29]研究证明,陆龟科来源于淡水龟科的祖先而不是龟科的祖先;本研究所构建的系统发育树以及遗传距离的计算结果也支持这一观点。

3.2 龟科属间的系统进化关系 本文根据箱龟属等龟科中的 9 个属构建的系统发育树(图 3)可以看出,9 个属明显地分为两支,箱龟属等 5 个属聚为一支,地图龟属等 4 个属聚为另一支。另外,基于 Kimura 双参数遗传距离,可以得知箱龟属等 5 属之间的平均遗传距离为 0.010,地图龟属等 4 属之间的平均遗传距离为 0.011,而前者与后者之间(把这 9 属当作 2 个属看待)的遗传距离则为 0.022(表 6),明显大于龟科各属间的距离,而小于龟科与淡水龟科、鳄龟科间的平均距离(0.053),因此建议将已从龟亚科提升而来的龟科再次分为 2 个亚科。

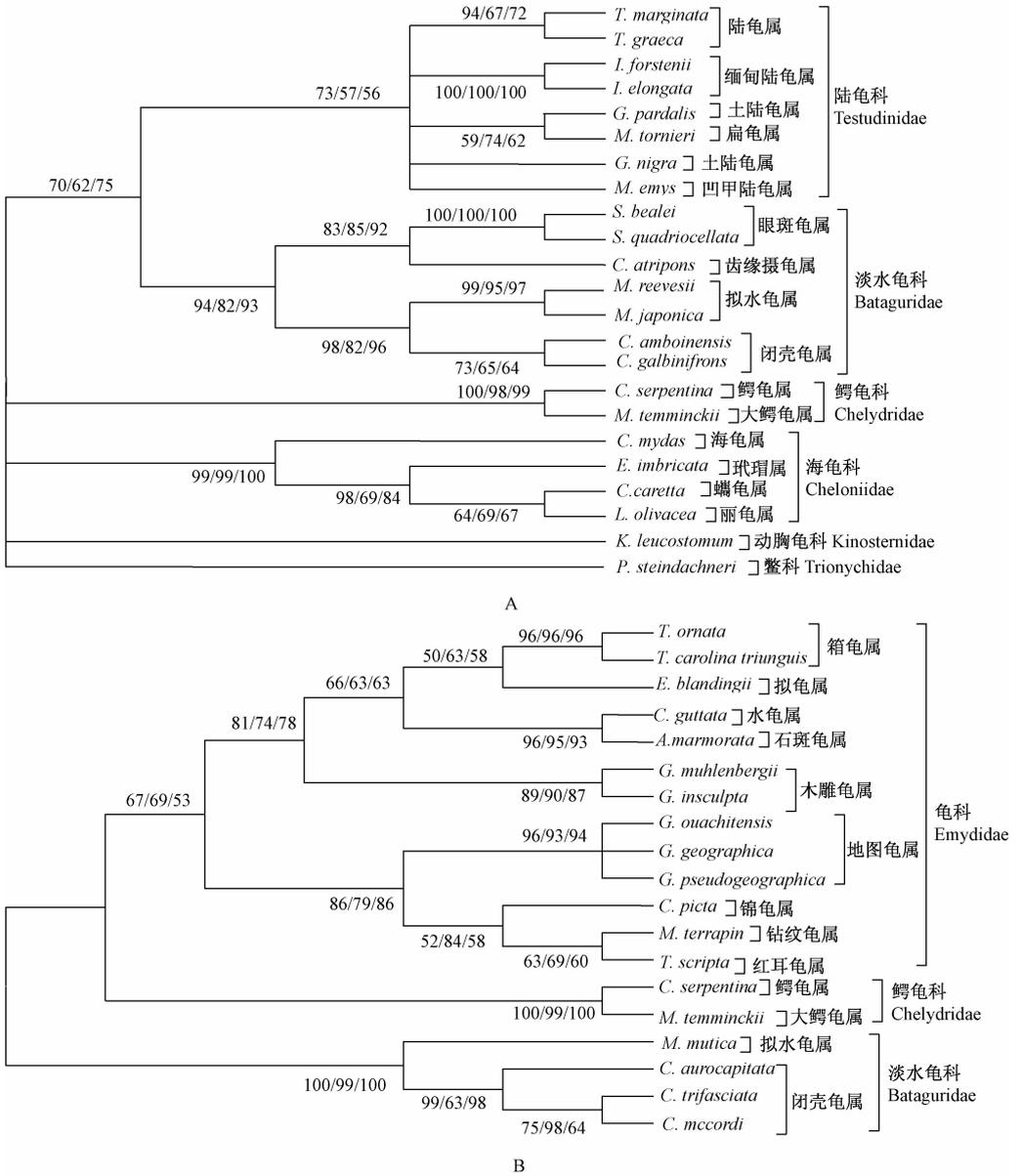


图 2 基于龟鳖类 COIII 序列 (A) 和 HNF-1α 序列 (B) 构建的分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the COIII and HNF-1α sequences of turtles

分支上方的数字为 NJ 树、MP 树、ML 树的节点置信值, 置信值小于 50% 的未显示。

Numbers indicate bootstrap support values of nodes of NJ/MP/ML trees, the values less than 50% were not shown.

Seidel 等^[30]用薄层等电聚焦电泳技术对龟科的肌红蛋白进行了研究, 其结果支持将从龟亚科提升后的龟科再分成龟亚科和鸡龟亚科 2 个亚科, 这一结论和本研究的结果相一致。

3.3 大鳄龟和小鳄龟之间的分类关系 目前, 国内外的学者一致认为大鳄龟和小鳄龟分属于

大鳄龟属和鳄龟属, 且都为所在属的唯一一种, 但本研究基于 CO III 和 HNF-1α 基因序列对其进行研究所得结果对此提出了异议: 大鳄龟和小鳄龟或许同处一属。本文基于 CO III 序列的 Kimura 双参数遗传距离显示, 大鳄龟和小鳄龟之间的遗传距离为 0.111 (表 2), 小于淡水龟

科属间的平均遗传距离(0.129);基于 *HNF-1 α* 序列的遗传距离也表明大鳄龟和小鳄龟间的遗传距离为 0.012(表 5),要小于龟科属间的平均遗传距离(0.016),因此推测大鳄龟和小鳄龟间的分化还没达到属间的水平,可能还属于种间的分化。但是目前还没有足够的依据来支撑它们之间的这种分类关系,还需要利用线粒体全序列等其他更多的分子数据来进一步地验证。

3.4 线粒体基因和核基因在分子系统学上的差异性分析 近年来,随着分子生物学的飞速发展,系统发生学已经在 DNA 水平上得到了广泛的研究,越来越多的线粒体基因和核基因被运用到动物的系统进化及亲缘关系研究领域^[11-12,14,31-32]。线粒体基因具有分子量较小、结构简单、拷贝数多、编码效率高、无组织特异性、严格母系遗传、进化速度较快等特点^[9],适合用于属间及属以下阶元的系统进化分析;和线粒体基因相比,核基因则具有碱基替代速率距阵更均匀、进化速率更慢并且不具替代偏异特征等特点^[15],适合用于科及科以上阶元的系统进化分析。因此,在进行分子系统学研究的过程中,仅仅采用线粒体数据或者核基因数据都具有一定的局限性,可能得到不够准确甚至错误的结论。本研究采用了 *CO III* 和 *HNF-1 α* 两个分子标记,其中,*CO III* 是线粒体呼吸链复合体 IV,即细胞色素 C 氧化酶的一个亚基,由线粒体基因编码合成^[33]; *HNF-1 α* 是 HNFs 家族的主要成员之一,是调控许多肝功能基因表达的重要转录因子,也是一个重要的内含子区域^[34]。本研究中,基于 *CO III* 和 *HNF-1 α* 基因所构建的系统发育树的结果有所差异,这可能是由于这 2 个基因本身不同的特点造成的。但是从这 2 个基因所得到的并不完全一致的结果中,我们能够从两个不同角度综合分析龟鳖类的进化关系,因而得到的结果更具有可靠性。然而,龟鳖类的系统进化关系研究是一项极其复杂和繁重的工作,还需要利用更多的线粒体基因、核基因以及全序列等分子数据来进一步研究和探索。

参 考 文 献

- [1] Rhodin A G J, Parham J F, Van Dijk P P, et al. Turtles of the world: annotated checklist of taxonomy and synonymy, 2009 update, with conservation status summary // A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group, Chelonian Research Monographs. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises. Massachusetts: Chelonian Research Foundation, 2009: 39 - 84.
- [2] Yasukawa Y, Hirayama R, Hikida T. Phylogenetic relationships of geoemydine turtles (Reptilia: Bataguridae). Current Herpetology, 2001, 20(2): 105 - 133.
- [3] Gaffney E S. A phylogeny and classification of the higher categories of turtles. Bulletin of the American Museum of Natural History, 1975, 155(5): 391 - 436.
- [4] Crumly C R. A cladistic analysis of Geochelone using cranial osteology. Journal of Herpetology, 1982, 16(3): 215 - 234.
- [5] 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 基于两个核基因序列研究龟鳖类的系统进化特征. 大连海洋大学学报, 2011, 26(5): 452 - 457.
- [6] Medowell S B. Partition of the genus *Clemmys* and related problems in the taxonomy of the aquatic Testudinidae. Proceedings of the Zoological Society of London, 1964, 143(2): 239 - 279.
- [7] 万全, 郑将臣, 程起群, 等. 基于 12S rRNA 序列研究龟鳖类的系统进化特征. 海洋渔业, 2010, 32(3): 264 - 274.
- [8] Gaffney E S, Meylan P A. A phylogeny of turtles // Benton M J. The Phylogeny and Classification of Tetrapods. Vol. 1. Amphibians, Reptiles, Birds. Systematics Association Special Volume Systematics Association Special Volume 35A. Oxford England: Clarendon Press, 1988: 157 - 219.
- [9] Honda M, Yasukawa Y, Hirayama R, et al. Phylogenetic relationships of the Asian box turtles of the genus *Cuora* sensu lato (Reptilia: Bataguridae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Zoological Science, 2002, 19(11): 1305 - 1312.
- [10] 吴平, 周开亚, 杨群. 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, 1998, 4(4): 374 - 378.
- [11] Spinks P Q, Shaffer H B, Iverson J B, et al. Phylogenetic hypotheses for the turtle family geoemydidae. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 32(1): 164 - 182.

- [12] 李齐发, 李隐侠, 赵兴波, 等. 牦牛线粒体 DNA D-loop 区序列测定及其在牛亚科中分类地位的研究. 畜牧兽医学报, 2008, 39(1): 1-61.
- [13] Barley A J, Spinks P Q, Thomson R C, et al. Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 55(3): 1189-1194.
- [14] Spinks P Q, Shaffer H B. Conservation phylogenetics of the Asian box turtles (Geoemydidae, Cuora): mitochondrial introgression, numts, and inferences from multiple nuclear loci. *Conservation Genetics*, 2007, 8(3): 641-657.
- [15] Bauzer L G, Souza N A, Ward R D, et al. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Molecular Biology*, 2002, 11(4): 315-323.
- [16] 吴平, 周开亚, 杨群. 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. 动物学杂志, 1999, 45(3): 260-267.
- [17] 张艳云, 毕婷婷, 宋娇莲, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因的全长序列探讨闭壳龟类的系统进化. 生物学杂志, 2011, 28(1): 22-26.
- [18] 李小三, 汪玲, 周科, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因全序列探讨两爪鳖和山瑞鳖的系统进化关系. 生命科学研究, 2010, 14(5): 413-418.
- [19] 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 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, 2011, 37(2): 199-205.
- [20] Eugenia N M, Le M, Fitzsimmons N N, et al. Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 49(2): 659-662.
- [21] Wang X Z, Li J B, He S P. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 42(1): 157-170.
- [22] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 1996: 463-469.
- [23] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 61-66.
- [24] 聂刘旺, 宋娇莲, 张颖, 等. 基于线粒体 ND4 基因探讨水龟组系统发生关系. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2007, 30(3): 343-348.
- [25] Guo Q L, Etsuko N M. Vector N T I, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinformatics*, 2004, 5(4): 378-388.
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [27] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [28] Xia X H, Xie Z, Salemi M, et al. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 26(1): 1-7.
- [29] Bickham J W, Carr J L. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of Cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*, 1983, (4): 918-932.
- [30] Seidel M E, Adkins M D. Variation in turtle myoglobins (subfamily Emydinae: Testudines) examined by isoelectric focusing. *Comparative Biochemistry and Physiology: B*, 1989, 94(3): 569-573.
- [31] 徐梅英, 李继姬, 郭宝英, 等. 基于线粒体 DNA 12S rRNA 和 CO III 基因序列研究中国沿海 7 个长蛸 (*Octopus variabilis*) 野生群体的遗传多样性. 海洋与湖沼, 2011, 42(3): 387-396.
- [32] 刘思情, 张家波, 唐琼英, 等. 基于 ND4 和 ND5 基因序列分析的鳅超科鱼类系统发育关系. 动物学研究, 2010, 31(3): 221-229.
- [33] Lucassen M, Koschnick N, Eckerle L G, et al. Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones. *The Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(13): 2462-2471.
- [34] 郑洁, 李进, 于树娜, 等. 肝细胞核因子的研究进展. 医学综述, 2008, 14(4): 491-495.