

# 基于线粒体 ND2 基因全序列探讨陕西红碱淖湿地繁殖鸥类的系统发育地位

杨超<sup>①</sup> 汪青雄<sup>①</sup> 黄原<sup>②</sup> 肖红<sup>①\*</sup>

① 陕西省动物研究所 西安 710032; ② 陕西师范大学生命科学学院 西安 710062

**摘要:** 本文对采自陕西红碱淖湿地繁殖的遗鸥(*Larus relictus*)、棕头鸥(*L. brunnicephalus*)、普通燕鸥(*Sterna hirundo*)和鸥嘴噪鸥(*Gelochlidon nilotica*)线粒体ND2基因全序列进行了测定和分析。联合已知该基因全序列的其他44种鸟类,重建了48种鸟类51个体之间的系统发育关系,并确定了4种鸥在系统发育中的地位。结果表明,4种鸥ND2基因全长均为1 041 bp;ML、MP和Bayes树拓扑结构大致相同,支持遗鸥划归为黑头鸥族(Black-headed species),棕头鸥划归为面具鸥族(Masked species),棕头鸥较为原始;普通燕鸥和鸥嘴噪鸥均隶属于黑帽族(Black cap species),鸥嘴噪鸥较为原始,处于分支底部,普通燕鸥与黑枕燕鸥(*S. sumatrana*)及与北极燕鸥(*S. paradisaea*)、南美燕鸥(*S. hirundinacea*)、南极燕鸥(*S. vittata*)聚类分支亲缘关系较近,但未能明确其具体分类地位;由于样品缺乏,鸥科(Laridae)、燕鸥科(Sternidae)和剪嘴鸥科(Rynchopidae)拓扑结构未能正确解析。

**关键词:** 遗鸥; 棕头鸥; 普通燕鸥; 鸥嘴噪鸥; 系统发育地位

中图分类号: Q951 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2013)04-605-14

## Phylogenetic Status of Breeding Gulls in Hongjiannao Wetland Based on Complete Sequences of the Mitochondrial ND2 Gene

YANG Chao<sup>①</sup> WANG Qing-Xiong<sup>①</sup> HUANG Yuan<sup>②</sup> XIAO Hong<sup>①\*</sup>

① Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032

② School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** In order to reconstruct a phylogenetic relationship and explore their phylogenetic status of four gulls, the complete mitochondrial ND2 gene sequences of *Larus relictus*, *L. brunnicephalus*, *Sterna hirundo* and *Gelochlidon nilotica*, were amplified and analyzed by comparing with other 44 gull species as the outgroups. The results showed that the entire mitochondrial ND2 gene sequences of four gulls were all 1 041 bp in length. The topologies of phylogenetic trees reconstructed based on ML, MP and Bayes methods were similar, suggesting that *L. relictus* belonged to the Black-headed species. *L. brunnicephalus* is more primitive and should be classified into the Masked species. Our results also suggest that *S. hirundo* should be clustered to Black cap species with *G. nilotica* as the sister, and the *G. nilotica* is more primitive and located in the root of tree. *S. hirundo* is most related to *S. sumatrana* and the branch: *S. paradisaea*, *S. hirundinacea*, *S. vittata*, showing a

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 31272292),陕西省科学院重点项目(No. 2011K-02),陕西省科学院青年基金项目(No. 2012K-26);

\* 通讯作者, E-mail: xh4500@163.com;

第一作者介绍 杨超,男,研究实习员;研究方向:鸟类系统学;E-mail: tianhouone@yahoo.com.cn。

收稿日期:2012-12-21,修回日期:2013-05-27

polyphyletic relationship. The specific status of *S. hirundo* is not clear. The relationship of Laridae, Sternidae, and Rynchopidae can not be determined owing to the lack of samples.

**Key words:** *Larus relictus*; *L. brunnicephalus*; *Sterna hirundo*; *Gelochlidon nilotica*; Phylogenetic relationship

红碱淖作为我国荒漠-半荒漠地区重要的湿地之一,是我国候鸟迁徙路线上水鸟重要的繁殖地与停歇地。该地区鸟类记录为79种,隶属于8目14科。其中,分布有鸥类4属10种(肖红等2010),而在此繁殖的仅有4种,分别为遗鸥(*Larus relictus*)、棕头鸥(*L. brunnicephalus*)、普通燕鸥(*Sterna hirundo*)和鸥嘴噪鸥(*Gelochlidon nilotica*)。遗鸥与棕头鸥常常混巢,有时也见遗鸥与鸥嘴噪鸥混巢(汪青雄等2011)。

遗鸥为全球濒危物种、我国I重点级保护野生动物,目前红碱淖为遗鸥种群主要繁殖地(肖红等2008)。其分类地位先后经历了从地中海鸥(*L. audouinii*)新亚种到未发现的新种(Lönnberg 1931),再到棕头鸥的变型(Dement'yev et al. 1951),最后到其可能为渔鸥(*L. ichthyaetus*)和棕头鸥的杂交型(Vaurie 1962)。宏观生态角度已从外型特征、行为和生境等对遗鸥和棕头鸥的分类做了详细阐述(张荫荪等1994,何芬奇等1998)。但从分子角度出发,遗鸥与棕头鸥的亲缘关系究竟如何?在系统发育中都处于何地位?目前国内未见报道。

对于燕鸥类(Terns)进化历史的研究仍缺乏一个系统化标准(Bridge et al. 2005)。普通燕鸥和鸥嘴噪鸥外型相似,均隶属于燕鸥科。鸥嘴噪鸥与遗鸥为伴生种(He et al. 1992),在巢址选择上与遗鸥存在竞争排挤现象,具有种群优势的遗鸥占据岛的中央,鸥嘴噪鸥则被迫营巢于岛的四周,二者也见混巢现象。普通燕鸥巢址距遗鸥较远且不与其混巢,即不存在排挤现象(汪青雄等2010)。普通燕鸥和鸥嘴噪鸥处于系统分类何种地位?二者与遗鸥的亲缘关系是否与表观生态学结论一致?

NADH脱氢酶第二亚基(NADH dehydrogenase subunit 2, ND2)是线粒体电子传

递链复合体的组分之一。与线粒体其他基因相比,其具有更快的进化速率(Near et al. 2003)。已有学者将ND2基因应用于鸟类分子学研究(Dimcheff et al. 2002, Marks et al. 2004, 涂剑锋等2009, 胡丽娜等2011),结果均显示ND2基因具有良好的分子标记特性。基于目前鸟类的相关研究主要集中在鸡形目(Galliformes)、雀形目(Passeriformes)、鸽形目(Columbiformes)和雁形目(Anseriformes),未见鸻形目(Charadriiformes)鸟类特别是鸥类ND2基因的相关研究。

本研究测定了红碱淖湿地繁殖的4种鸥类线粒体ND2基因全序列,结合GenBank收录的47条相关鸟类ND2基因全序列,用三种方法(ML、MP和Bayes)重建48种鸟类51个体的系统发育关系,旨在揭示4种鸥类在系统进化中所处地位,从分子角度分析宏观生态学方法记录的伴生种、混巢等现象,也为构建稳定的红碱淖湿地鸥类谱系基因组学提供更多基础数据资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集及基因组DNA提取

遗鸥、棕头鸥、鸥嘴噪鸥和普通燕鸥标本各1号(自然死亡幼体),2010年6月采自陕西红碱淖湿地,浸泡于100%乙醇中充分脱水,-20℃冰柜中保存。其凭证标本(Y101、Z01、A01、X01)现保存于陕西省动物研究所标本室。采用传统的酚-氯仿提取法对基因组DNA进行提取(杨辉等2011)。1%的琼脂糖凝胶电泳检测。提取的DNA均分成3份置于-20℃冰箱中备用。

除本文测定的上述4种鸥类外,其他47条涉及的鸻形目鸟类线粒体ND2基因全序列下载自GenBank,序列信息见表1。

表1 物种及GenBank登录号

Table 1 Species and their GenBank accession numbers

科 Family	属 Genus	种名 Species	GenBank 号
鸥科 Laridae	鸥属 <i>Larus</i>	遗鸥 <i>L. relictus</i>	本文 Y101
		棕头鸥 <i>L. brunnicephalus</i>	本文 Z01
		棕头鸥 <i>L. brunnicephalus</i>	JX155863
		银鸥 <i>L. argentatus</i>	FN543388
		环嘴鸥 <i>L. delawarensis</i>	AY631363
		美国银鸥 <i>L. smithsonianus</i>	FN543389
		黄脚银鸥 <i>L. cachinnans</i>	FN543396
		黑嘴鸥 <i>L. saundersi</i>	JQ071443
		小黑背鸥 <i>L. fuscus</i>	FN543399
		黑背鸥 <i>L. dominicanus</i>	FN543397
燕鸥科 Sternidae	海鸥属 <i>Larus</i>	海鸥 <i>L. canus</i>	FN543371
		短嘴海鸥 <i>L. brachyrhynchus</i>	FN543357
		笑鸥 <i>L. atricilla</i>	EU166931
		三趾鸥 <i>R. tridactyla</i>	DQ385093
		鸥嘴噪鸥 <i>G. nilotica</i>	本文 X01
		鸥嘴噪鸥 <i>G. nilotica</i>	AY631383
		普通燕鸥 <i>S. hirundo</i>	本文 A01
		普通燕鸥 <i>S. hirundo</i>	AY631378
		弗氏燕鸥 <i>S. forsteri</i>	AY631376
		南美燕鸥 <i>S. hirundinacea</i>	AY631379
浮鸥属 Chlidonias	北极燕鸥 <i>S. paradisaea</i>	北极燕鸥 <i>S. paradisaea</i>	AY631384
		黑枕燕鸥 <i>S. sumatrana</i>	AY631387
		南极燕鸥 <i>S. vittata</i>	AY631390
		白额燕鸥 <i>S. albifrons</i>	AY631366
		南美白额燕鸥 <i>S. superciliaris</i>	AY631388
		眼斑燕鸥 <i>S. nereis</i>	AY631382
		乌燕鸥 <i>S. fuscata</i>	AY631377
		褐翅燕鸥 <i>S. anaethetus</i>	AY631368
		白腰燕鸥 <i>S. aleutica</i>	AY631391
		白翅浮鸥 <i>C. leucopterus</i>	AY631360
凤头燕鸥属 Thalasseus	须浮鸥 <i>C. hybridus</i>	须浮鸥 <i>C. hybridus</i>	AY631359
		小凤头燕鸥 <i>T. bengalensis</i>	AY631370
		大凤头燕鸥 <i>T. bergii</i>	AY631371
		黄嘴凤头燕鸥 <i>T. eurygnatha</i>	DQ385095
		白嘴端凤头燕鸥 <i>T. sandvicensis</i>	AY631375
		丽色凤头燕鸥 <i>T. elegans</i>	AY631374
		王凤头燕鸥 <i>T. maxima</i>	AY631381
		玄燕鸥 <i>A. minutus</i>	AY631356
		白顶玄燕鸥 <i>A. stolidus</i>	AY631357
		白燕鸥 <i>G. alba</i>	AY631362
海雀科 Alcidae	巨鸥属 <i>Hydroprogne</i>	红嘴巨燕鸥 <i>H. caspia</i>	AY631372
		扁嘴海雀属 <i>Synthliboramphus</i>	AP009042
		海鸚属 <i>Fratercula</i>	DQ385092
		海鸽属 <i>Cephus</i>	EU372680
		海鸦属 <i>Uria</i>	JQ435061
剪嘴鸥科 Rhynchospididae	剪嘴鸥属 <i>Rhynchosops</i>	厚嘴海鸦 <i>U. lomvia</i>	JQ435083
		黑剪嘴鸥 <i>R. niger</i>	DQ385094
贼鸥科 Stercorariidae	贼鸥属 <i>Catharacta</i>	大贼鸥 <i>C. skua</i>	DQ385091

续表 1

科 Family	属 Genus	种名 Species	GenBank 号
鞘嘴鸥科 Chionidae	鞘嘴鸥属 <i>Chionis</i>	黑脸鞘嘴鸥 <i>C. minor</i>	DQ385085
石鸻科 Burhinidae	石鸻属 <i>Burhinus</i>	灌木石鸻 <i>B. grallarius</i>	DQ385083
蛎鹬科 Haematopodidae	蛎鹬属 <i>Haematopus</i>	南美蛎鹬 <i>H. ater</i>	AY074886

**1.2 PCR 扩增及测序** 参考文献 (Sorenson et al. 1999, Sorenson 2003) 提供的鸟类线粒体通用引物序列,自行设计一条上游引物 (L5143H: 5'-GAACCTACACRRRAGAGATCAAAAC-3') 和一条下游引物 (H6313H: 5'-ACTCTTR TTTAAGGCTTGAGGC-3') 用于扩增 4 种鸥类 *ND2* 基因,兼并位点 (degenerate sites) 说明: A, G = R。Sub-PCR 反应程序在白洁等 (2012) 基础上进行适当修改: 95℃ 预变性, 4 min; 95℃ 45 s, 53℃ 60 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 7 min, 4℃ 保温。Sub-PCR 反应体系 25 μl: 10 × PCR Buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μl, 10 μmol/L 引物各 2.0 μl, 5 U/μl *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μl, 基因组 DNA (模板) 1 μl, 然后加 ddH<sub>2</sub>O 补足。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 0.8% 琼脂糖凝胶回收产物条带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 进行纯化后交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成测序。

**1.3 序列拼接、注释和分析** 序列拼接和注释使用 Staden Package 2.0 (Bonfield et al. 1995) 软件, 通过与已发表的棕头鸥线粒体基因组全序列 (GenBank 登录号: JX155863; 杨超等 2012) 进行比对确定 4 种鸥线粒体 *ND2* 基因全序列位置。找出起始密码子和终止密码子, 并保证所有序列均能顺利翻译成蛋白序列, 即不存在框内终止密码子。所有序列用 ClustalX 2.0 (Larkin et al. 2007) 和 MAFFT (Katoh et al. 2008) 两种软件进行多重序列比对 (默认参数)。使用 MEGA 4.1 (Kumar et al. 2008) 统计 *ND2* 基因碱基组成、密码子使用频率。依据已建立的系统树, 按系统树得到的分支情况将 48 种鸟类 51 个体划分成 7 科 [两外群灌木石鸻 (*Burhinus grallarius*) 与南美蛎鹬

(*Haematopus ater*) 合并], 用 MEGA 4.1 计算各科内和科间的遗传距离等。

**1.4 系统发育分析** 结合 MrMTgui (Nuin 2008) 和 Modeltest 3.7 (Posada 2003) 软件, 估算出数据集最优模型: TVM + I + G。在 PAUP \* 4.0 b10 (Swofford 2002) 软件中, 利用最优数据模型采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建 ML 树。同样在 PAUP \* 4.0 b10 软件中利用二等分 (tree bisection reconnection, TBR) 的分支交换算法, 进行启发式搜索, 构建最大简约 (maximum parsimony, MP) 树, 1 000 次重复自举检验。通过 MrBayes 3.1.2 (Ronquist et al. 2003) 软件, 利用 TVM + I + G 最优模型, 进行贝叶斯法 (Bayes inference, BI) 分析, 参数如下: 起始树随机选取、方法为马尔科夫链的蒙特卡洛 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC)、舍去运算开始前 2 500 个老化样本, 对剩余树构建合一树, 即 BI 树。

在 PAUP \* 4.0 b10 中执行 KH (Kishino-Hasegawa) 和 SH (Shimodaira-Hasegawa) 检验系统树之间差异程度; 分歧和分支支持度利用 TreeRot. v3 (Sorenson et al. 2007) 和 PAUP \* 4.0 b10 软件计算衰退/支持指数 (partitioned bremer support indices, PBS) 来衡量。

## 2 结果与分析

**2.1 序列特征分析** 经比对和手工调整, 51 条 *ND2* 基因全序列无碱基插入和缺失。除大贼鸥和黑剪嘴鸥起始密码子为 ATA, 黑脸鞘嘴鸥为 GTG 外, 其余 48 个体均以 ATG 为起始密码子。终止密码子使用情况为: 50 个体以 TAG 终止, 三趾鸥则以 TAA 终止。MEGA 软件统计结果为: *ND2* 基因共有 1 041 个位点, 统计了保守位点 (conserved sites)、变异位点 (variable sites)、自裔位点

(singleton sites) 等参数信息,见表2。A、T、C、G碱基的平均含量为32.2%、25.7%、31.8%、10.3%,碱基组成存在一定程度偏斜。

碱基替换类型主要为转换和颠换,并且转换数明显高于颠换。TC转换(80)高于AG转换(37)。四种颠换值中,比重较大的为TA颠换(10)和CA颠换(17)。碱基替换大多都发生在密码子第三位点,其转换和颠换数为81和24。第二位点最为保守,发生在此的转换和颠换数仅为9和1。可见密码子第三位点碱基替换速率最快,加之颠换大多发生于此,故存在较为明显的碱基偏倚现象。

密码子使用情况统计显示(数据未列出),包括相对同义密码子(relative synonymous codon usage, RSCU)使用中,频率较高的密码子是第三位为C和A的密码子。这正与密码子第三位C和A的碱基含量较高,发生颠换数最多相对应,说明密码子的摆动性主要发生在第三位点。

## 2.2 物种间遗传距离分析

在MEGA 4.1中以K2P模型计算各科内和科间的遗传距离,采用空位成对删除方法,以转换加颠换的替换方式计算相对遗传距离。

依据系统树结果将所选取的48种鸟类51个体的线粒体ND2基因全序列分成7个科:Group 1(鸥科)、Group 2(燕鸥科)、Group 3(剪嘴鸥科)、Group 4(贼鸥科)、Group 5(鞘嘴鸥科)、Group 6(海雀科)、Group 7(外群)。7科内遗传距离,Group 1为0.049、Group 2为0.122、Group 6为0.142、Group 7为0.244,Group 3、Group 4、Group 5即剪嘴鸥科、贼鸥科和鞘嘴鸥科,仅各选取一个物种,故遗传距离为n/c。7科的总体平均遗传距离为0.166;科间遗传距离见表3。

将科间遗传距离作为系统发育分析时的参考。鞘嘴鸥科与其他各科之间的距离偏大,在0.232~0.256之间。外群与其他各科之间的遗传距离在0.220~0.251之间。海雀科与燕鸥科、剪嘴鸥科和贼鸥科之间遗传距离在0.174~0.198。燕鸥科与鸥科、剪嘴鸥科和贼鸥科之间的遗传距离在0.186~0.195之间。从结果来看,鸥科仅与燕鸥科亲缘关系较近,海雀科与燕鸥科、剪嘴鸥科和贼鸥科亲缘关系较近,鞘嘴鸥科与其他科亲缘关系都比较远。由于系统发育树得到的各科间分支支持度普遍不高,故本研究采用科间遗传距离作为研究科间关系的参考。由此推算在构建的系统发生树

表2 序列数据集分析统计

Table 2 Summary of properties of the ingroup datasets

统计 Statistics	全序列 Complete sequence	密码子第一位点 1st sites	密码子第二位点 2st sites	密码子第三位点 3st sites
长度 Length (bp)	1 041	347	347	347
保守位点 Conserved sites (bp)	488(46.9%)	195(56.2%)	276(79.5%)	17(4.9%)
变异位点 Variable sites (bp)	553(53.1%)	152(43.8%)	71(20.5%)	330(95.1%)
简约信息位点 (bp) Pi: parsimony-informative sites	447(42.9%)	107(30.8%)	43(12.4%)	297(85.6%)
自裔位点 Singleton sites (bp)	106(10.2%)	45(13.0%)	28(8.1%)	33(9.5%)
A + T 含量百分比(A + T)(%)	57.9	56.7	56.5	60.4
相同碱基 Identical pairs (ii)	892	313	337	242
转换 Transitional pairs (tr)	117	27	9	81
颠换 Transversional pairs (tv)	32	7	1	24
转换颠换比 R(tr/tv)	3.6	3.8	5.3	3.4

括号内为位点数占各项总长度的百分比。Within parentheses are the site percentages in every sums.

表 3 七科间 ND2 基因全序列遗传距离

Table 3 Kimura 2-parameter distance (below diagonal) for ND2 nucleotide sequences of seven families

科 Family	鸥科 Laridae	燕鸥科 Sternidae	剪嘴鸥科 Rhynchospidae	贼鸥科 Stercorariidae	鞘嘴鸥科 Chionidiidae	海雀科 Alcidae	外群 Outgroup
鸥科 Laridae	n/c						
燕鸥科 Sternidae	0.186	n/c					
剪嘴鸥科 Rhynchospidae	0.206	0.195	n/c				
贼鸥科 Stercorariidae	0.208	0.188	0.205	n/c			
鞘嘴鸥科 Chionidiidae	0.256	0.245	0.252	0.249	n/c		
海雀科 Alcidae	0.201	0.187	0.198	0.174	0.236	n/c	
外群 Outgroup	0.242	0.240	0.251	0.222	0.232	0.220	n/c

n/c 表示单一物种遗传距离。n/c indicates single species genetic distances.

中, 鞘嘴鸥科鸟类应位于树的根部, 海雀科与鸥类之间遗传距离数值分析, 其很可能处于系统树的特殊位置。

### 2.3 分子系统树构建

**2.3.1 似然性分析** 利用似然性分析方法所构建的 ML 树见图 1。起始树通过随机添加序列方式获得。

各科间拓扑结构如下: 鸥科聚类的小支先和剪嘴鸥科互为姐妹群后再与燕鸥科汇聚到一起; [(鸥科, 剪嘴鸥科), 燕鸥科] (注: 圆括号代表其内物种优先汇聚为一支, 方括号代表圆括号汇聚的分支再与其内物种聚类, 后文同此意) 聚类的大支再与海雀科互为姐妹群构成系统树的骨架, 之后向树的根部依次添加贼鸥科、外群; 值得注意的是鞘嘴鸥科位置落在了选取的两个外群之间。科内拓扑结构为: 遗鸥并未处于系统树的顶端, 反而是与绝大多数鸥科鸟类汇聚的分支聚类在一起; 棕头鸥所处位置位于鸥科分支的底部; 遗鸥与笑鸥亲缘关系较与棕头鸥要近; 三趾鸥位于鸥科分支最根部, 较为古老; 普通燕鸥与黑枕燕鸥聚类为一支, 位于燕鸥科分支顶部; 鸥嘴噪鸥与红嘴巨燕鸥亲缘关系最近, 互为姐妹群位于燕鸥科分支的中部; 白

燕鸥位于燕鸥科最底部, 最为原始。

**2.3.2 最简约法** 通常认为转换与颠换比值小于临界值 2.0 时, 在系统发育分析时需赋予特殊的加权值 (Knight et al. 1993)。本研究数据集转换/颠换比的平均值  $R = 3.6$ , 说明 51 个体 ND2 基因序列碱基替代还没有达到饱和, 故在构建 MP 树时不需加权。

拓扑结果如图 2 所示。与 ML 树相比, 最简约 MP 树中玄燕鸥和白顶玄燕鸥的姊妹群并未像 ML 树中那样与燕鸥科鸟类汇聚, 而是与鸥科鸟类聚类在一起, 但分支支持度并不高, 为 11。普通燕鸥与 [北极燕鸥, (南美燕鸥, 南极燕鸥)] 的分支聚类后再与黑枕燕鸥汇聚到一起。黑剪嘴鸥与鸥科和燕鸥科聚类的姐妹群汇聚到一起, 而 ML 树中黑剪嘴鸥则是先与鸥科聚类后组成姊妹群再与燕鸥科汇聚。扁嘴海雀在所选取的海雀科 5 种鸟类组成分支的位置较 ML 树有所下降, 处于海雀科分支的最底部, 并不是像 ML 树中那样与崖海鸦和厚嘴海鸦组成分支汇聚到一起。MP 树中遗鸥、棕头鸥和鸥嘴噪鸥所处分支地位与 ML 树结果相同。

**2.3.3 贝叶斯推论法** BI 树拓扑结构(图 3)与 MP、ML 树均不同的是总共发生三处并列支

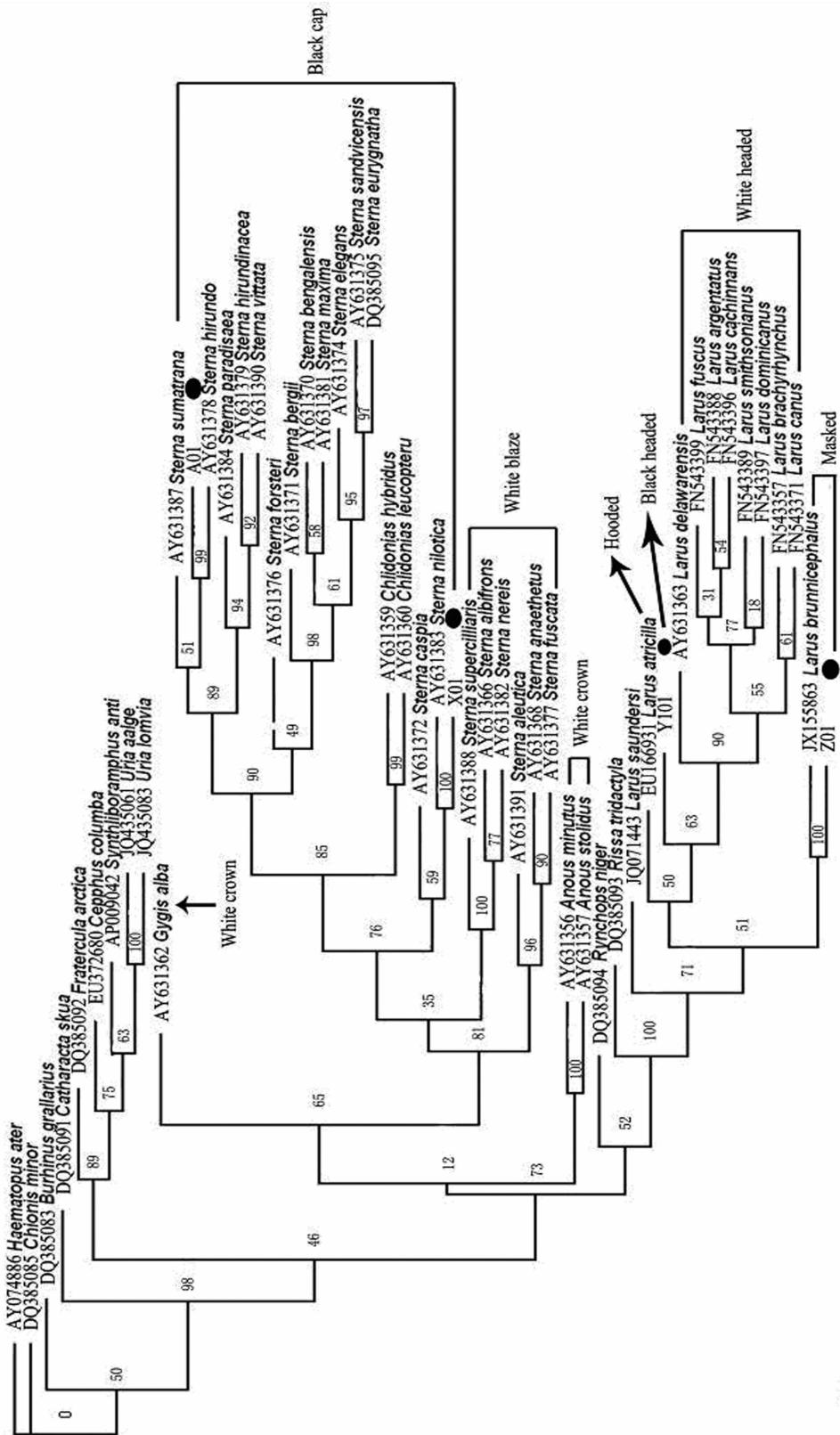


图1 基于最大似然重建的系统发育树

**Fig. 1 Phylogenetic tree based on maximum likelihood inference method**

节点数字代表自举值，数字串代表 GenBank 登录号，圆点标注本文所测物种，标尺为分支长度单位，箭头所指为分类学意义的簇。Numbers on nodes are bootstrap values and numstrings are GenBank accession numbers, dots are labeled the sequenced species in this article, scale is the branch length unit, and arrow pointings are races in taxonomy.

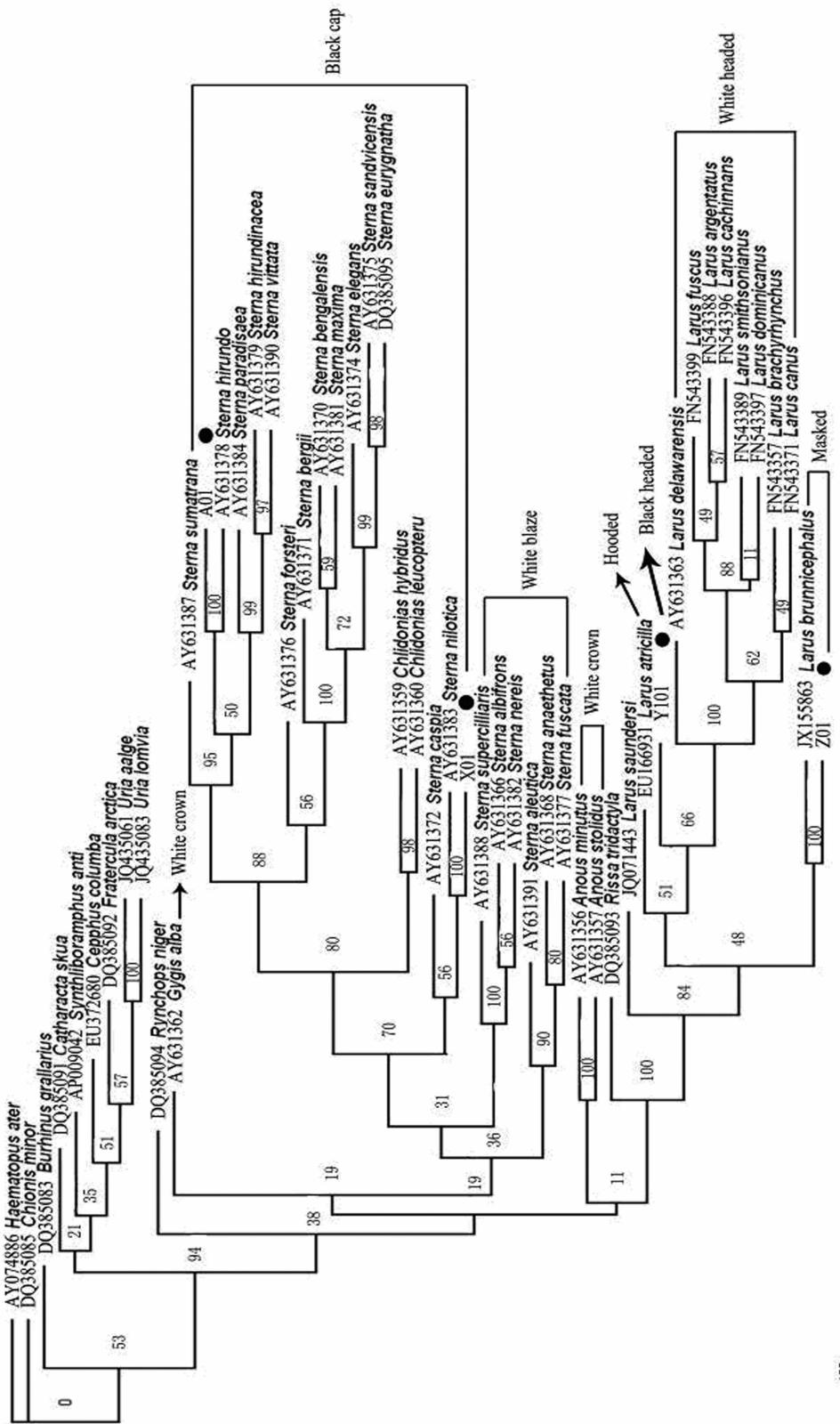


图 2 基于最大简约法重建的系统发育树  
Figure 2 Phylogenetic tree based on Maximum parsimony inference method

节点数字代表自举值，数字串代表 GenBank 登录号，圆点标注本文所测物种，标尺为分支长度单位，箭头所指为分类学意义的族。  
Numbers on nodes are bootstrap values and numstrings are GenBank accession numbers, dots are labeled the sequenced species in this article, scale is the branch length unit, and arrow pointings are races in taxonomy.

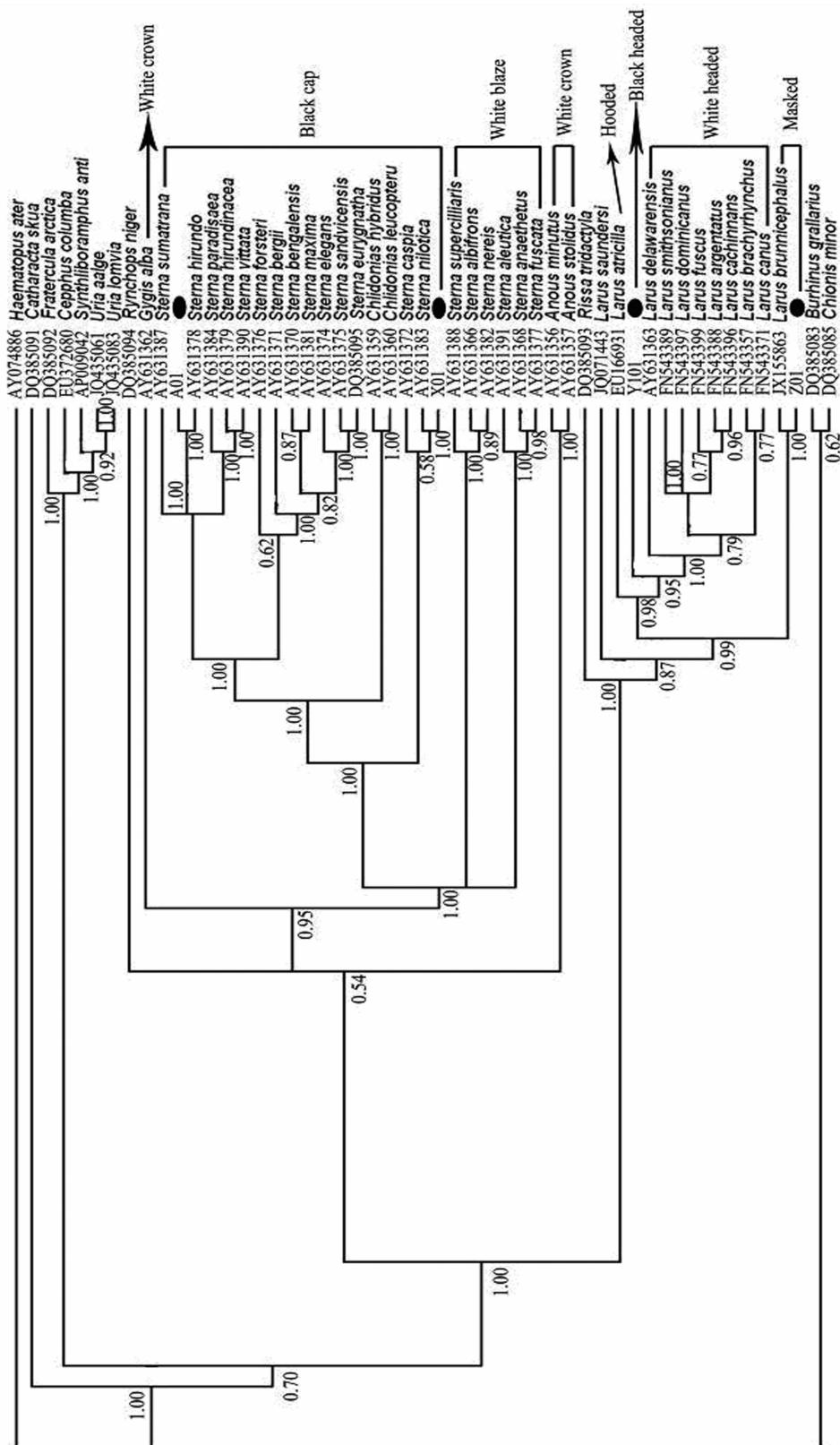


图3 基于贝叶斯法重建的系统发育树  
Fig.3 Phylogenetic tree based on Bayes inference method

节点数字代表自举值，数字串代表GenBank登录号，圆点标注本文所测物种，标尺为分支长度单位，箭头所指为分类学意义的簇。  
Numbers on nodes are bootstrap values and numstrings are GenBank accession numbers, dots are labeled the sequenced species in this article, scale is the branch length unit, and arrow pointings are races in taxonomy.

系:第一处是较 ML、MP 树,美国银鸥和黑背鸥并未互为姐妹群,而是与[小黑背鸥,(银鸥,黄脚银鸥)]的分支形成三分支的并系;第二处是黑枕燕鸥、普通燕鸥和[北极燕鸥,(南美燕鸥,南极燕鸥)]的分支形成三分支的并系;第三处是玄燕鸥和白顶玄燕鸥首先汇聚为一支,其余 25 种燕鸥科鸟类汇聚为一大支,这两支最后与黑剪嘴鸥一分支组成三分支的并列支系。BI 树中涉及遗鸥、棕头鸥和鸥嘴噪鸥所处分支地位与 ML、MP 树拓扑结构相同。

**2.4 系统树差异程度和支持度检测** 通过执行 SH 和 KH 测试对 ML 法、MP 法和贝叶斯法所构建的三种系统发育树进行了评估,结果显示 SH 和 KH 检验的  $P$  值最小为 0.198,最大值为 0.871,均大于临界值 0.05,故三种方法构建的系统发育树无显著差异。

PBS 值统计结果:ML、MP 树分别共有节点 48 个,除节点 14 和 15,43,44,46 数值不同外,两种系统树各节点 PBS 值均相等;BI 树共有节点 42 个,节点变少主要是由于 BI 树拓扑结构中三处形成三分支并系的原因。统计结果(表 4)可以看出,三种树 PBS 最大值均为 37,且均未出现负值。贡献度方面倾向于 BI 略大于 MP 略大于 ML,但总体来说三种系统树 PBS 值检测差异不明显。

### 3 讨 论

#### 3.1 鸥科分类及遗鸥和棕头鸥系统分类地位

目前,国内外学者普遍采用的分类系统将鸥类归入鸻形目(Ericson et al. 2003, Slack et al. 2007, Diaz et al. 2011)。分类阶元目下水平分析,统一将鸥类划分成五大类,即鸥类(Gulls)、

表 4 48 种鸟类 ND2 基因 PBS 值分析结果

Table 4 Analysis results of PBS values of mitochondrial ND2 gene in 48 avian species

节点 Node	最大似然树 Maximum likelihood tree	最大简约树 Maximum parsimony tree	贝叶斯树 Bayes tree	节点 Node	最大似然树 Maximum likelihood tree	最大简约树 Maximum parsimony tree	贝叶斯树 Bayes tree
1	21	21	0	25	2	2	2
2	0	0	21	26	2	2	15
3	0	0	0	27	15	15	1
4	1	1	1	28	1	1	3
5	0	0	0	29	3	3	6
6	3	3	3	30	6	6	13
7	1	1	14	31	13	13	6
8	14	14	4	32	1	0	8
9	4	4	3	33	6	6	7
10	3	3	4	34	8	8	4
11	4	4	9	35	7	7	2
12	8	8	37	36	4	4	0
13	37	37	37	37	0	0	0
14	0	27	27	38	2	2	1
15	27	0	4	39	0	0	26
16	4	4	6	40	0	0	0
17	6	6	0	41	1	1	0
18	0	0	37	42	26	26	2
19	37	37	17	43	0	5	
20	17	17	0	44	0	4	
21	0	0	13	45	2	2	
22	13	13	5	46	1	0	
23	5	5	6	47	13	13	
24	6	6	2	48	0	0	

燕鸥类(Terns)、剪嘴鸥类(Skimmers)、贼鸥类(Skuas)和鞘嘴鸥类(Sheathbills)(Peters 1934, Sibley et al. 1990, Thomas et al. 2004),这一点已经得到证实(Chu 1998, Paton et al. 2003)。我国目前采用的鸟类分类系统则把鸥类和海雀类归入鸻形目,分别成科,为鸥科、燕鸥科、剪嘴鸥科、鞘嘴鸥科(Chionididae)、贼鸥科(Stercorariidae)、海雀科(Alcidae)(郑光美2002, 2011)。

利用3种不同建树方法对48种鸟类系统发育关系重建的结果表明,鸥科物种形成的分支体系并非单系群。有学者将鸥科划分成4大族:白头鸥族(White-headed species)、黑头鸥族、面具鸥族和巾头鸥族(Hooded species)(Crochet et al. 2000)。Pons et al. 2005也对鸥科分类进行了较详细补充。本研究支持将鸥科分成4大族,白头鸥族包括海鸥、短鼻海鸥、黑背鸥、小黑背鸥、银鸥、美国银鸥、黄脚银鸥和环嘴鸥;巾头鸥族包括笑鸥;黑头鸥族包括遗鸥;面具鸥族包括棕头鸥。

拓扑结构中体现白头鸥族处于系统树顶端,遗鸥所在黑头鸥族则次之,而面具鸥族棕头鸥处于4大族分支的根部,最为古老。系统树分析结果已显示,遗鸥和棕头鸥分别隶属于不同的族群,并且二者之间亲缘关系较远,不支持遗鸥可能为棕头鸥的变型假说,亦不支持棕头鸥可能为遗鸥祖先的假说。Pons等(2005)和杨超等(2012)的报道也持上述观点。在Pons等(2005)的研究中以[地中海鸥(遗鸥、白眼鸥 *L. leucophthalmus*、白领鸥 *L. hemprichii*、渔鸥)]的聚类方式体现遗鸥、地中海鸥和渔鸥这3种鸥的亲缘关系,而在杨超等2012的研究中则以[渔鸥(遗鸥、白领鸥、地中海鸥)]方式聚类。由于涉及遗鸥分类假说的相关物种(地中海鸥和渔鸥)ND2基因全序列暂时还未被收录,局限于取样不全面的原因,遗鸥、渔鸥和地中海鸥之间的关系还有待于进一步研究。但可以肯定的是,遗鸥与地中海鸥和渔鸥之间存在较近的亲缘关系。

### 3.2 燕鸥科分类及普通燕鸥和鸥嘴噪鸥系统分类地位

根据我国目前采用的世界鸟类分类系统(郑光美2002),将燕鸥科分成10属44种。依据该分类系统,本研究涉及ND2基因全序列数据涵盖燕鸥科7属27种鸟类。Bridge等(2005)利用头部繁殖羽的外部形态特征,将燕鸥类分成黑帽(Black cap)、前额带白斑的黑帽(Black cap with a white blaze on the forehead,简称白斑族)、白冠(White crown)3个大族,并且研究结果显示,黑帽族鸟类位于系统树的顶端,处于进化的较晚时期,白斑族(White blaze)居中,白冠族鸟类最早分出,位于系统树的根部,较为原始。从三种系统树的拓扑结构看,黑帽族大支包含燕鸥属、凤头燕鸥属、浮鸥属、噪鸥属和巨鸥属。本文白斑族所包含的6种燕鸥属鸟类在Bridge等(2005)和Tavares等(2008)结论中分属于燕鸥科的 *Sternula* 和 *Onychoprion*两个属(国外采用),但是仅从系统树的聚类情况看,白斑族6种燕鸥属鸟类的确与黑帽族其他燕鸥属鸟类亲缘关系较远。弗氏燕鸥与凤头燕鸥属汇聚为一支。Efe等(2009)在利用多基因系统发育和DNA条形码研究白嘴端凤头燕鸥亚种问题的结论中显示,白顶燕鸥(*S. trudeau*)和弗氏燕鸥互为姊妹群之后与凤头燕鸥属汇聚。而Bridge等(2005)的结论中白顶燕鸥和弗氏燕鸥互为姊妹群之后则与燕鸥属大支汇聚。本文倾向于支持弗氏燕鸥与凤头燕鸥属起源关系更近,但系统树分支支持度并不高(最高BI树0.62)。

本研究支持Bridge等(2005)将燕鸥划分为3大族的结论,并且普通燕鸥和鸥嘴噪鸥均隶属于黑帽族(图2)。3种不同建树方法所重建的48种鸟类系统发育关系,结合上述学者研究综合考虑,普通燕鸥处于燕鸥科分支的顶部,所在燕鸥属与凤头燕鸥属亲缘关系较近(Jackson et al. 2012)。虽不能准确解析普通燕鸥在黑枕燕鸥和[北极燕鸥,(南美燕鸥,南极燕鸥)]之间的明确地位,但多种结果显示,普通燕鸥、黑枕燕鸥和[北极燕鸥,(南美燕鸥,南极燕鸥)]均能稳定地聚类在

一起,只是在分支的添加顺序上略有不同,但足以说明其亲缘关系较近。3种系统树拓扑结构均显示鸥嘴噪鸥和红嘴巨燕鸥汇聚到一起,并且位于黑帽族燕鸥鸟类分支底部。可见,鸥嘴噪鸥比普通燕鸥较早分化,更为古老。与普通燕鸥相比,鸥嘴噪鸥与遗鸥具有更近的亲缘关系。

### 3.3 鸥科-燕鸥科-剪嘴鸥科拓扑关系 3 种不

同方法重建的关于鸥科-燕鸥科-剪嘴鸥科之间的拓扑结构各不相同(图 4A)。利用最大简约法构建的 MP 树中 3 科之间的关系为 [剪嘴鸥科, (鸥科, 燕鸥科)], 这一结论与利用 DNA 杂交手段建立的鸟类新分类系统 (Sibley et al. 1988) 相一致, 近些年也有学者得出同样的结论 (Ericson et al. 2003, Livezey et al. 2007, Livezey 2010)(图 4B~D)。利用最大似然法构

建 ML 树中,上述 3 科之间的拓扑结构为 [ 燕鸥科(鸥科, 剪嘴鸥科) ]。利用贝叶斯推论法得到的 3 科结果为第 3 种拓扑类型 [ 鸥科, (燕鸥科, 剪嘴鸥科) ], 同 Fain 等 (2007) 的结果 (图 4E)。也有学者得到类似结论 (图 4F) (Paton et al. 2003)。还有一种情况, 鸥科首先与贼鸥科汇聚, 然后依次添加燕鸥科和剪嘴鸥科 (图 4G) (Chu 1995)。

关于这 3 科的准确定位, 目前还没有一个明确的结论, Paton 等 (2006) 利用 12 902 bp 线粒体基因序列所构建的系统树结果与其 2003 年利用核基因构建的系统树相比, 仅在鸥科-燕鸥科-剪嘴鸥科之间的关系上有所不同。参考遗传距离分析, 倾向于支持 [ 剪嘴鸥科, (鸥科, 燕鸥科) ] 的拓扑结构。但本研究关于这 3 科的情况得出了 3 种不同的系统发育树, 可能由

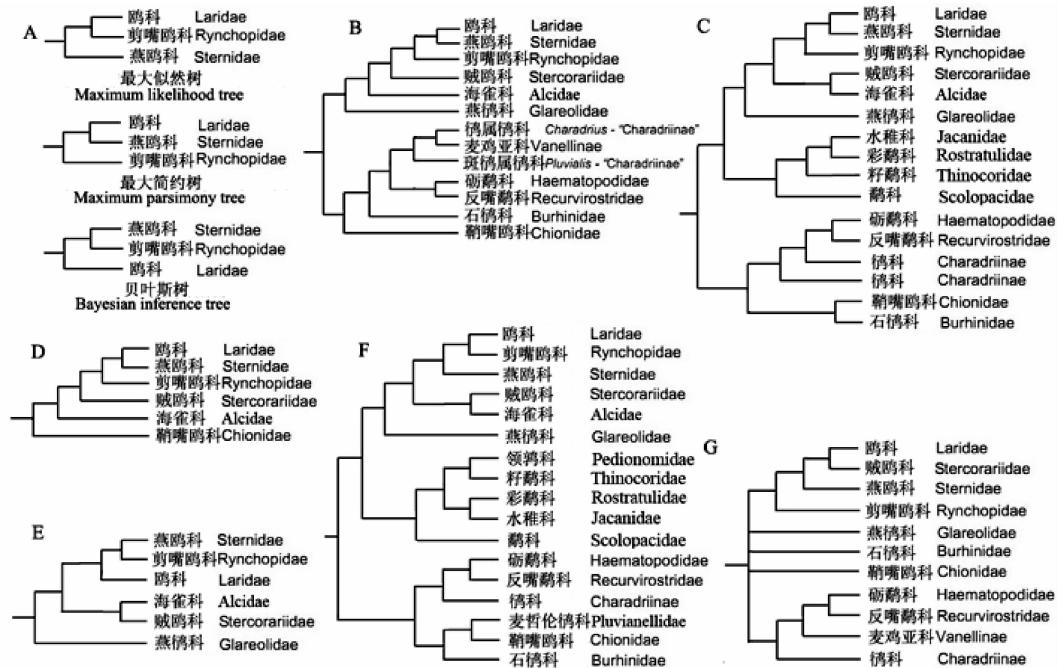


图 4 鸥科-燕鸥科-尖嘴鸥科之间几种典型的系统发育树

#### Fig. 4 Several typical phylogenetic relationship trees in Laridae-Sternidae-Rynchopidae

A. 本文的3种树；B. DNA杂交树(Sibley et al. 1990)；C. 联合重组激活基因I和肌红蛋白基因内含子II构建核基因树(Ericson et al. 2003)；D. 最大简约树中限制性一致树(部分)(Livezey et al. 2007)；E. 最大似然树(Fain et al. 2007)；F. 重组激活基因I构建核基因树(Paton et al. 2003)；G. 简约分析树(Chu 1995)。

A. Three trees in this article; B. DNA-DNA hybridisation tree; C. RAG-1 and myoglobin intron II tree; D. Segment of strict consensus tree of all MPTs; E. Maximum likelihood tree; F. RAG-1 tree; G. Parsimony analysis tree.

于剪嘴鸥科样品取样物种太少(1只)导致建树过程中存在长枝吸引问题。或是单一遗传标记所含信息有限,所构建的系统发育树仅是该基因的基因树,而并非物种树。虽然本文采用的是ND2基因全序列,但多基因数据联合或是全线粒体基因组包含更加全面的物种信息,所构建的系统发育树能提供更为可靠的系统发育关系。这一问题有待更进一步研究。

## 参 考 文 献

- Bonfield J K, Smith K F, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23(24): 4992–4999.
- Bridge E S, Jones A W, Baker A J. 2005. A phylogenetic framework for the terns (Sternini) inferred from mtDNA sequences: implications for taxonomy and plumage evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(2): 459–469.
- Chu P C. 1995. Phylogenetic reanalysis of Strauch's osteological data set for the Charadriiformes. *The Condor*, 97(1): 174–196.
- Chu P C. 1998. A phylogeny of the Gulls (Aves: Larinae) inferred from osteological and integumentary characters. *Cladistics*, 14(1): 1–43.
- Crochet P A, Bonhomme F, Lebreton J D. 2000. Molecular phylogeny and plumage evolution in gulls (Larini). *Journal of Evolutionary Biology*, 13(1): 47–57.
- Dement'ev G P, Gladkov N A. 1951. Birds of USSR, Moscow. USSR. 3: 510–528. (in Russian)
- Diaz J I, Cremonte F, Navone G T. 2011. Helminths of the kelp gull, *Larus dominicanus*, from the northern Patagonian coast. *Parasitology Research*, 109(6): 1555–1562.
- Dimcheff D E, Drovetski S V, Mindell D P. 2002. Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24(2): 203–215.
- Efe M A, Tavares E S, Baker A J, et al. 2009. Multigene phylogeny and DNA barcoding indicate that the *Sandwich tern* complex (*Thalasseus sandvicensis*, Laridae, Sternini) comprises two species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1): 263–267.
- Ericson P G, Enwall I, Irestedt M, et al. 2003. Inter-familial relationships of the shorebirds (Aves: Charadriiformes) based on nuclear DNA sequence data. *BMC Evolutionary Biology*, 3(1): 16.
- Fain M G, Houde P. 2007. Multilocus perspectives on the monophyly and phylogeny of the order Charadriiformes (Aves). *BMC Evolutionary Biology*, 7: 35.
- He F Q, Zhang Y S, Wu Y, et al. 1992. The distribution of the Relict Gull *Larus relictus* in Maowusu Desert Inner Mongolia, China. *Forktail*, 7: 151–154.
- Jackson D G, Emslie S D, van Tuinen M. 2012. Genome skimming identifies polymorphism in tern populations and species. *BMC Research Notes*, 5(1): 94.
- Katoh K, Toh H. 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics*, 9(1): 212.
- Knight A, Mindell D P. 1993. Substitution bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogeny position of Feasipper. *BMC Systems Biology*, 42(1): 18–31.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. 2008. MEGA: Abiologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 299–306.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Livezey B C, Zusi R L. 2007. Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy: II -Analysis and discussion. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 149(1): 1–95.
- Livezey B C. 2010. Phylogenetics of modern shorebirds (Charadriiformes) based on phenotypic evidence: analysis and discussion. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 160(3): 567–618.
- Lönnberg E A. 1931. Contribution to the bird fauna of southern Gobi. *Arkiv för Zoologi*, 23(2): 1–18.
- Marks B D, Hackett S J, Capparella A P. 2004. Historical relationships among Neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the Wedgebilled Woodcreeper (Aves: Dendrocaptidae; *Glyptorhynchus spirurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24(1): 153–167.
- Near T J, Pesavento J J, Cheng C H C. 2003. Mitochondrial DNA, morphology, and the phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidei: Channichthyidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28(1): 87–98.
- Nuin P. 2008. MrMTgui: cross-platform interface for ModelTest and MrModeltest. [CP/OL] [2012-5-10]. <http://www.genedrift.org/mogui.php>.
- Paton T A, Baker A J, Groth J G, et al. 2003. RAG-1 sequences resolve phylogenetic relationships within Charadriiform birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(2): 268–278.
- Paton T A, Baker A J. 2006. Sequences from 14 mitochondrial genes provide a well-supported phylogeny of the Charadriiform

- birds congruent with the nuclear RAG-1 tree. Molecular Phylogenetics and Evolution, 39(3): 657–667.
- Peters J L. 1934. Check-list of Birds of the World, Vol. 2. Cambridge: Harvard University Press.
- Pons J M, Hassanin A, Crochet P A. 2005. Phylogenetic relationships within the Laridae (Charadriiformes: Aves) inferred from mitochondrial markers. Molecular Phylogenetics and Evolution, 37(3): 686–699.
- Posada D. 2003. Using Modeltest and PAUP \* to select a model of nucleotide substitution. Current Protocols Bioinformatics, 6. 5. 1–6. 5. 14.
- Ronquist F, Huelsenbeck J P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19(12): 1572–1574.
- Sibley C G, Ahlgren J E, Monroe B L. 1988. A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. Auk, 105(3): 409–423.
- Sibley C G, Monroe B L. 1990. Distribution and Taxonomy of Birds of the world. New Haven: Yale University Press.
- Slack K E, Delsuc F, McLenaghan PA, et al. 2007. Resolving the root of the avian mitogenomic tree by breaking up long branches. Molecular Phylogenetics and Evolution, 42(1): 1–13.
- Sorenson M D, Ast J C, Dimcheff D E, et al. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. Molecular Phylogeny and Evolution, 12(2): 105–114.
- Sorenson M D. 2003. Avian mtDNA primers [DB/OL]. [2010-1-8]. Boston: Boston University, [http://people.bu.edu/msoren/Bird\\_mt.Primers.pdf](http://people.bu.edu/msoren/Bird_mt.Primers.pdf).
- Sorenson M D, Franzosa E A. 2007. TreeRot. v3. Boston, MA: Boston University.
- Swofford D L. 2002. PAUP \*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. (\* and Other Methods). Version 4.0 b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tavares E S, Baker A J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. BMC Evolutionary Biology, 8: 81.
- Thomas G H, Wills M A, Tamas S. 2004. Phylogeny of shorebirds, gulls, and alcids (Aves: Charadrii) from the cytb gene: parsimony, Bayesian Inference, minimum evolution, and quartet puzzling. Molecular Phylogenetics and Evolution, 30(3): 516–526.
- Vaurie C. 1962. The status of *Larus relictus* and of other hooded gulls from central Asia. Auk, 79(3): 303–309.
- 白洁, 黄原. 2012. 基于线粒体 ND2 基因的直翅目部分种类分子系统发育分析. 动物学杂志, 47(4): 1–10.
- 何芬奇, 张荫荪. 1998. 有关棕头鸥和遗鸥两近似种的分类与分布问题研究. 动物分类学报, 23(1): 105–112.
- 胡丽娜, 王星果, 张燕萍, 等. 2011. 珠颈斑鸠线粒体 ND1 和 ND2 基因序列测定与特征分析. 安徽农业科学, 39(18): 11081–11084.
- 涂剑锋, 司方方, 邢秀梅, 等. 2009. 绿头鸭线粒体 ND2 基因全序列测定及其研究. 安徽农业科学, 37(20): 9393–9395.
- 汪青雄, 肖红, 王中强, 等. 2010. 陕西红碱淖普通燕鸥和嘴噪鸥的繁殖生态比较. 动物学杂志, 45(2): 39–45.
- 汪青雄, 肖红, 王中强, 等. 2011. 陕西红碱淖湿地鸥科鸟类组成及分布的研究. 四川动物, 30(2): 239–242.
- 肖红, 王中强, 胡彩娥, 等. 2008. 陕西红碱淖遗鸥繁殖种群及其栖息地现状的研究. 科技导报, 26(4): 54–57.
- 肖红, 汪青雄, 王中强, 等. 2010. 陕西红碱淖湿地水鸟组成及多样性分析. 四川动物, 29(5): 605–608.
- 杨超, 汪青雄, 黄原, 等. 2012. 棕头鸥线粒体基因组全序列测定与分析. 遗传, 34(11): 1434–1446.
- 杨辉, 黄原. 2011. 郑氏比蝠线粒体基因组全序列的测定与分析. 动物学研究, 32(4): 353–362.
- 张荫荪, 何芬奇. 1994. 对遗鸥分类地位问题的进一步论证. 动物分类学报, 19(3): 378–382.
- 郑光美. 2002. 世界鸟类分类与分布名录. 北京: 科学出版社.
- 郑光美. 2011. 中国鸟类分类与分布名录. 2 版. 北京: 科学出版社.