

## 基于 16SrRNA 序列探讨龟鳖类的遗传分化和系统发生

郑将臣<sup>1,2</sup>, 万全<sup>3</sup>, 程起群<sup>2\*</sup>, 赵金良<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090; 3. 安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

**摘要:** 用 PCR 和测序的方法, 获得 13 种龟鳖类的线粒体 16SrRNA 基因片段序列, 结合 NCBI 收录的 47 种龟鳖的线粒体 16SrRNA 基因序列, 分析龟鳖类的遗传分化和系统发生。结果表明, 对 60 条序列进行比对后得到 480 bp 的一致序列, 其中, 可变位点 229 个, 总变异率为 47.7%; 简约信息位点 186 个, 插入/缺失 80 个。腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)4 种碱基的平均含量分别为 33.6%、24.3%、18.5%、23.7%, 转换与颠换比为 1.95。7 种闭壳龟种间的遗传距离为 0.004~0.063, 平均为 0.03; 潮龟科 17 个属间的遗传距离为 0.053~0.120, 平均为 0.091; 曲颈龟亚目 8 个科间(不包括平胸龟)的遗传距离为 0.071~0.259, 平均为 0.169。龟科是陆龟科与潮龟科的姐妹群, 潮龟科与陆龟科的亲缘关系比龟科与陆龟科的亲缘关系要近; 应将乌龟重新归入拟水龟属, 将锯缘龟纳入闭壳龟属; 闭壳龟属不应拆分为闭壳龟属和盒龟属, 即不将黄缘盒龟和黄额盒龟归入盒龟属。

**关键词:** 龟鳖类; 16SrRNA 基因; 遗传分化; 分子进化; 系统发生

中图分类号: S851.34<sup>+</sup>7.34 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0199-07

## Genetic divergence and phylogeny of turtles inferred from mitochondrial DNA 16SrRNA sequence

ZHENG Jiang-chen<sup>1,2</sup>, WAN Quan<sup>3</sup>, CHENG Qi-qun<sup>2\*</sup>, ZHAO Jin-liang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China; 3. College of Animal Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** In order to investigate the genetic divergence and phylogeny of turtles, mitochondrial DNA 16SrRNA gene segment sequences of 13 turtle individuals were obtained by PCR amplification and sequencing. 16SrRNA sequences of other 47 turtles from NCB were downloaded and its phylogenetic characters were analyzed together with their own 13 sequences. The results were as follows: 480 bp consensus sequences of 16SrRNA were obtained from these 60 sequences after aligned. Twenty hundreds and twenty nine variable sites were detected in all turtle individuals, accounting for 47.7% of total variable sites, with 186 parsim-informative and 80 indels. The average contents of A, T, G, and C were 33.6%, 24.3%, 18.5%, and 23.7%, respectively. The Ts:Tv ratio was 1.95. The K-2-P distances between the seven hinged turtles were 0.004-0.063, with average value 0.03; between 17 genus within Geoemydidae 0.053-0.120, with average 0.091; and between 8 families within Cryptodira (excluding *Platysternon megacephalum*) 0.071-0.259, with average 0.169. The results indicate that family Emydidae is the sister taxon to Geoemydidae plus Testudinidae, and Geoemydidae is closer to

收稿日期: 2010-12-29

基金项目: 农业部科技跨越计划项目(2009-跨-14); 安徽省教育厅项目(KJ2009B067); 中央级公益性科研院所基本科研项目(2008Z02)

作者简介: 郑将臣(1986—), 男, 安徽祁门人, 硕士研究生, 主要从事珍稀水生动物保护研究; \*通信作者, qiquncheng@gmail.com

Testudinidae compared to Emydidae; the taxonomica status of *Chinemys* should be revised, and classified into Genus *Mauremys*, and that *Pyxidea* should be classified into *Cuora*; the results do not support the idea that the genus *Cuora* should be divided into two genera as *Cuora* and *Cistoclemmys*.

**Key words :** turtle; 16SrRNA gene; genetic divergence; molecular evolution; phylogeny

全世界现生龟鳖类动物有14科324种<sup>[1]</sup>。龟鳖目(Testudines)是形态学上最特化的爬行动物之一,其基于形态学特征的分类和系统进化关系一直存有争论<sup>[1-4]</sup>。随着分子生物学技术的发展,很多龟鳖的分类得到修订,但是仍有一些争议<sup>[5]</sup>,一些学者认为潮龟科(又称淡水龟科<sup>[6-7]</sup>)闭壳龟属应该拆分成2个属,即闭壳龟属和盒龟属(*Cistoclemmys*),其中黄缘盒龟和黄额盒龟应归入盒龟属<sup>[3-4]</sup>;有些学者认为应将黄缘盒龟和黄额盒龟归入闭壳龟属,不应该将闭壳龟属分成2个属<sup>[5,8-9]</sup>。Spinks等<sup>[10]</sup>建议将乌龟(*Chinemys reevesii*)重新归入拟水龟属, Honda等<sup>[11]</sup>认为锯缘龟(*Pyxidea mouhotii*)应重新归入闭壳龟属<sup>[10]</sup>。另外,潮龟科、陆龟科以及龟科之间的进化关系也存在争议<sup>[10]</sup>。

线粒体DNA具有分子结构简单、母系遗传、进化速率快、缺少重组等特点,线粒体16SrRNA基因进化速率慢,且比较保守,适合于种以上水平的分子分类研究<sup>[11]</sup>。目前,国内外已有较多有关龟鳖目分子分类的研究<sup>[4-5,8-10,12-20]</sup>,但用16SrRNA基因作为标记探讨龟鳖类遗传分化和系统发生的报道较少。笔者测定13种龟的类线粒体16SrRNA部分序列,并结合NCBI上47种龟鳖类的线粒体16SrRNA序列,分析龟鳖类的遗传分化和系统发生,以期为龟鳖类动物的分类提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

在安徽省长江水生动物保护中心采集13种龟的样品,每种龟各取1个个体的肌肉组织于-20℃冰箱备用。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增和测序

基因组DNA采用标准的酚/氯仿法提取<sup>[21]</sup>,略

作修改。16SrRNA基因扩增采用通用引物16SA和16SB<sup>[22]</sup>,其序列分别为5'-GCCTGTTTATCAAA AACAT-3'和5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'。PCR反应体系50 μL,包括10×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 5 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L)2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各2 μL, *Taq*酶2.5 U,模板DNA 40 ng。反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,50℃退火45 s,72℃延伸60 s,35个循环;最后72℃延伸7 min。PCR产物经割胶纯化后在ABI3730型DNA测序仪上双向测序,测序引物仍为16SA和16SB。

#### 1.2.2 13种龟鳖类16SrRNA基因序列分析

对所测得的序列进行拼接,再用Clustal X 1.83<sup>[23]</sup>、DnaSP5.0、MEGA4.1<sup>[24]</sup>等软件对序列进行比对,计算其多态位点数、简约信息位点数、碱基组成和转换/颠换比率,并基于Kimura双参数模型(kimura-2-parameter, K-2-P)<sup>[25]</sup>计算种、属、科间的遗传距离。

#### 1.2.3 龟鳖类16SrRNA序列的系统发生分析

首先用2种方法检测60条序列的饱和程度:一种是基于转换和颠换与K-2-P的作图分析<sup>[25]</sup>;另一种是运用指数 $I_{ss}$ 检测<sup>[26]</sup>。2种检测均用DAMBE软件<sup>[27]</sup>完成。结合本研究获得的13种龟鳖类16SrRNA序列和在NCBI下载的47种龟鳖类16SrRNA序列,进行系统发生分析。在MEGA软件上,基于Kimura双参数遗传距离模型,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建分子系统树,将序列中的转换和颠换位点均视为信息位点,并对所有位点的一致性加权,对于序列中的插入与缺失位点成对删除。采用Bootstrap法来检验分子系统树各节点的置信值。重复1 000次。

表 1 60 种龟鳖及其 16SrRNA 序列号

Table 1 60 turtle individuals and their mtDNA 16SrRNA accession numbers

亚目	科	属	种	登录号	亚目	科	属	种	登录号
曲颈龟亚目	鳄龟科	大鳄龟属	大鳄龟	NC009260	曲颈龟亚目		马来龟属	马来龟	EU030208
		鳄龟属	蛇鳄龟	HQ123498*			鼻龟属	红头鼻龟	EU930742
	海龟科	玳瑁属	玳瑁	DQ533485				冕鼻龟	EU930749
		海龟属	绿海龟	AB012104				墨西哥鼻龟	HQ123494*
		蠵龟属	蠵龟	FJ009021			地龟属	地龟	EU030203
	棱皮龟科	棱皮龟属	棱皮龟	FJ039914			巨龟属	马来巨龟	EU030210
			龟科	锦龟属		锦龟	NC002073.3	斑点池龟属	斑点池龟
			箱龟属	卡罗来纳箱龟		EU930758	沼龟属	缅甸沼龟	EU030209
			彩龟属	红耳彩龟		HQ123497*	草龟属	草龟	EU030204
	平胸龟科	平胸龟属	平胸龟	HQ123496*		粗颈龟属	粗颈龟	EU030214	
	潮龟科	闭壳龟属	三线闭壳龟	AB090060		印度棱背龟	GQ398140		
			潘氏闭壳龟	AB090059		史密斯棱背龟	EU030211		
			周氏闭壳龟	AB090061		红圈棱背龟	EU030213		
			安布闭壳龟	HQ123491*		淡水龟	EU030199		
			金头闭壳龟	HQ123490*		三线棱背龟	GQ398143		
			黄额盒龟	EU930739		缅甸棱背龟	EU030207		
			黄缘盒龟	HQ123492*		咸水龟	EU030200		
			锯缘龟	DQ659152					
			拟水龟属	安南拟水龟		AB090069	穴陆龟属	佛州地鼠陆龟	AF020886
			日本拟水龟	AB090070	蛛陆龟属	蛛陆龟	AF020887		
			里海拟水龟	EU930742	土陆龟属	印度星龟	HM040949		
			地中海拟水龟	EU930743	陆龟属	印度星龟	NC007699		
			希腊拟水龟	EU930744	印支陆龟属	缅甸陆龟	HQ123500*		
			黄喉拟水龟	NC009330	凹甲陆龟属	凹甲陆龟	HQ123499*		
			乌龟	HQ123493*					
			齿缘龟属	黑桥摄龟	NC010970	两爪鳖科	两爪鳖属	两爪鳖	HQ123495*
			黑龟属	印度黑龟	HM040951	鳖科	华鳖属	中华鳖	NC006132
	眼斑龟属	四眼斑龟	NC011819		山瑞鳖属	山瑞鳖	FJ541030		
	东方龟属	锯齿东方龟	EU940741		缘板鳖属	南亚缘板鳖	EF050073		
	果龟属	果龟	AB090065	侧颈龟亚目	蛇颈龟科	<i>Mesoclemmys</i>	何氏蟾头龟	AY283252	
						长颈龟属	西氏长颈龟	HQ123502*	
					侧颈龟科	侧颈龟属	钢盔侧颈龟	HQ123501*	

\*为本研究所获得的序列；龟鳖类分类地位均依据国际龟类动物分类工作组(Turtle Taxonomy Working Group)2009年修订的分类系统。

## 2 结果与分析

### 2.1 16SrRNA PCR 扩增及序列分析

13 种龟的 16SrRNA 基因长度为 500 ~ 600 bp，扩增结果稳定清晰。序列经比对后，获得一致序列长 558 bp，其中有变异位点 200 个，总变异率为 35.8%；简约信息位点(parsim-informative sites)123 个，单变异多态位点(singleton sites)76 个，43 个转换 (transition)，27 个颠换(transversion)，转换/颠换比率 1.59。A、T、G、C 的平均含量分别为 32.1%、24.6%、19.2%、24.0%。A+T 的含量为 56.7%，高于 G+C 的含量(43.2%)。所有序列均提交到 NCBI 数据库。

### 2.2 系统发生分析

将从 NCBI 下载的 47 种龟鳖类的 16SrRNA 序列与本试验获得的 13 种龟鳖类的 16SrRNA 序列一并分析(表 1)，共 60 条序列比对后得到 480 bp 的一致序列，其中有 229 个变异位点，总变异率为 47.7%；简约信息位点 186 个，单变异多态位点 42 个，插入与缺失位点 80 个，转换位点为 35 个，颠换位点为 18 个，转换与颠换比率为 1.95。碱基 A、T、G、C 的平均含量分别为 33.6%、24.3%、18.5%、23.7%。A+T 的含量为 57.9%，高于 G+C 的含量 42.2%。基于 K-2-P 模型的各遗传距离见表 2 ~ 5(两两之间的平均遗传距离)。7 种闭壳龟种间的遗

传距离为 0.004~0.063, 平均为 0.03(表 3); 黄缘盒龟、黄额盒龟与闭壳龟属间的遗传距离分别为 0.025 和 0.046(表 3); 潮龟科 17 个属间的遗传距离

为 0.053~0.120, 平均为 0.091(表 5); 曲颈龟亚目 8 个科间(不包括平胸龟)的遗传距离为 0.071~0.259, 平均为 0.169(表 4)。

表 2 13 种龟类 16SrRNA 基因片段序列的 Kimura 双参数遗传距离和转换/颠换数

Table 2 Kimura-2-parameter distances and transition/transversion between 16SrRNA gene fragments sequences of 13 turtles

	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>13</sub>
T <sub>1</sub>		14/1	7/0	16/7	36/9	37/17	33/9	43/19	45/18	43/23	54/41	42/38	58/34
T <sub>2</sub>	0.029		13/1	21/8	39/9	35/19	33/10	46/22	44/21	39/26	61/42	40/40	59/37
T <sub>3</sub>	0.013	0.027		21/7	38/10	37/17	36/9	40/20	44/19	42/24	59/42	43/39	57/35
T <sub>4</sub>	0.044	0.057	0.055		35/13	36/22	32/12	35/19	41/20	41/27	53/46	38/43	58/36
T <sub>5</sub>	0.091	0.097	0.097	0.097		45/25	37/12	43/24	48/24	45/27	61/42	46/40	55/36
T <sub>6</sub>	0.110	0.109	0.110	0.118	0.145		40/18	43/30	42/26	44/30	60/46	52/41	60/38
T <sub>7</sub>	0.084	0.086	0.091	0.089	0.099	0.119		41/22	36/22	34/19	56/45	38/33	54/32
T <sub>8</sub>	0.128	0.141	0.123	0.109	0.138	0.151	0.130		40/22	45/31	57/42	47/42	57/44
T <sub>9</sub>	0.130	0.134	0.130	0.125	0.150	0.140	0.118	0.126		43/29	61/40	43/42	52/42
T <sub>10</sub>	0.136	0.133	0.136	0.140	0.149	0.153	0.107	0.158	0.149		58/51	45/34	56/33
T <sub>11</sub>	0.209	0.229	0.224	0.218	0.229	0.237	0.224	0.218	0.224	0.244		44/45	50/46
T <sub>12</sub>	0.173	0.172	0.177	0.174	0.187	0.205	0.152	0.194	0.185	0.170	0.197		44/31
T <sub>13</sub>	0.199	0.209	0.199	0.204	0.196	0.213	0.184	0.219	0.202	0.191	0.210	0.158	

T<sub>1</sub> 金头闭壳龟; T<sub>2</sub> 安布闭壳龟; T<sub>3</sub> 黄缘盒龟; T<sub>4</sub> 乌龟; T<sub>5</sub> 墨西哥鼻龟; T<sub>6</sub> 缅甸陆龟; T<sub>7</sub> 凹甲陆龟; T<sub>8</sub> 平胸龟; T<sub>9</sub> 红耳彩龟; T<sub>10</sub> 蛇鳄龟; T<sub>11</sub> 两爪鳖; T<sub>12</sub> 西氏长颈龟; T<sub>13</sub> 钢盔侧颈龟。对角线左下部分为遗传距离, 右上部分为转换/颠换数。

表 3 7 种闭壳龟种间的 Kimura 双参数遗传距离

Table 3 Kimura-2-parameter distances between 7 species within genus *Cuora*

闭壳龟	周氏闭壳龟	金头闭壳龟	三线闭壳龟	潘氏闭壳龟	安布闭壳龟	黄缘盒龟
金头闭壳龟	0.009					
三线闭壳龟	0.018	0.009				
潘氏闭壳龟	0.013	0.004	0.013			
安布闭壳龟	0.044	0.039	0.048	0.044		
黄缘盒龟	0.027	0.018	0.022	0.022	0.034	
黄额盒龟	0.046	0.036	0.041	0.041	0.063	0.039

表 4 龟鳖目 11 个科间的 Kimura 双参数遗传距离

Table 4 Kimura-2-parameter distances between 11 families within Testudines

	潮龟科	陆龟科	龟科	棱皮龟科	海龟科	鳄龟科	平胸龟科	鳖科	两爪鳖科	侧颈龟科
陆龟科	0.126									
龟科	0.143	0.151								
棱皮龟科	0.123	0.134	0.097							
海龟科	0.122	0.137	0.112	0.071						
鳄龟科	0.158	0.164	0.151	0.134	0.127					
平胸龟科	0.159	0.171	0.162	0.147	0.156	0.192				
鳖科	0.192	0.207	0.189	0.186	0.176	0.195	0.242			
两爪鳖科	0.221	0.221	0.248	0.243	0.230	0.259	0.238	0.237		
侧颈龟科	0.210	0.198	0.207	0.214	0.197	0.208	0.251	0.242	0.205	
蛇颈龟科	0.185	0.188	0.203	0.180	0.178	0.189	0.235	0.212	0.206	0.181

表 5 潮龟科 17 个属间的 Kimura 双参数遗传距离

Table 5 Kimura-2-parameter distances between 17 genus within Geoemydidae

	闭壳龟属	拟水龟属	眼斑龟属	齿缘龟属	东方龟属	果龟属	马来龟属	黑龟属
拟水龟属	0.065							
眼斑龟属	0.084	0.075						
齿缘龟属	0.078	0.090	0.083					
东方龟属	0.074	0.070	0.068	0.070				
果龟属	0.076	0.075	0.075	0.070	0.053			
马来龟属	0.084	0.079	0.096	0.091	0.065	0.068		
黑龟属	0.082	0.095	0.098	0.063	0.085	0.090	0.101	
棱背龟属	0.099	0.107	0.111	0.111	0.105	0.107	0.099	0.103
地龟属	0.100	0.092	0.093	0.098	0.088	0.085	0.091	0.098
巨龟属	0.090	0.086	0.093	0.095	0.077	0.087	0.075	0.097
斑点池龟属	0.097	0.099	0.096	0.109	0.080	0.098	0.105	0.106
草龟属	0.099	0.107	0.109	0.100	0.090	0.095	0.093	0.108
沼龟属	0.091	0.094	0.105	0.104	0.096	0.083	0.084	0.093
淡水龟属	0.084	0.088	0.100	0.105	0.089	0.088	0.081	0.096
鼻龟属	0.102	0.107	0.116	0.101	0.099	0.084	0.096	0.098
粗颈龟属	0.113	0.116	0.112	0.111	0.098	0.106	0.101	0.120

  

	棱背龟属	地龟属	巨龟属	斑点池龟属	草龟属	沼龟属	淡水龟属	鼻龟属
地龟属	0.083							
巨龟属	0.087	0.090						
斑点池龟属	0.095	0.098	0.064					
草龟属	0.064	0.082	0.078	0.075				
沼龟属	0.085	0.101	0.085	0.078	0.068			
淡水龟属	0.069	0.086	0.077	0.077	0.059	0.063		
鼻龟属	0.100	0.101	0.102	0.117	0.095	0.101	0.106	
粗颈龟属	0.097	0.101	0.093	0.103	0.083	0.076	0.084	0.112

2 种检验方法的检验结果都显示这些序列的碱基转换和颠换均未达到替代饱和,可用于构建进化树,其中,基于转换和颠换与遗传距离的线性关系分析碱基替代饱和的结果,显示碱基转换和颠换在 K-2-P 遗传距离小于 0.25 的范围内均未达到替代饱和。 $I_{ss}$  的指数检测结果显示,在两尾  $t$  检验下,  $P=0.0000$ ,  $I_{ss}$  值为 0.230, 极端对称树临界值  $I_{ss,c}$  为 0.795, 极端非对称树临界值  $I_{ss,c}$  为 0.760, 则  $I_{ss} < I_{ss,c}$ , 表明碱基替代未饱和。

从邻接树(限于篇幅,邻接树图略)中可以看出,龟鳖目各科成员都独自聚成一支,表明基于 16SrRNA 的邻接树可以将龟鳖类的各科很好地分开。邻接树显示,本文中潮龟科的 17 个属中,除鼻龟属外,其他 16 个属先汇聚成一支,形成 1 个

单系群,而鼻龟属单独聚为另一个单系;黄缘盒龟、黄额盒龟与其他闭壳龟属成员相互嵌在一起,聚成 1 个单支。

### 3 结论与讨论

成功地扩增、测定了 13 种龟线粒体 16SrRNA 的部分序列,与 GenBank 收录的代表序列进行比较,得出如下观点:支持乌龟重新归入拟水龟属的建议;支持将锯缘龟重新归入闭壳龟属的分类学修订;支持将黄缘盒龟和黄额盒龟一并归入闭壳龟属的观点;赞同陆龟科与潮龟科关系近的观点。这些结论与基于线粒体 12SrRNA 的研究分类<sup>[5]</sup>相一致,说明基于 16SrRNA 序列分析龟鳖类的分类是可行的。

a. 潮龟科属间的系统进化关系。本文中潮龟科

17个属的邻接树显示,除鼻龟属外,潮龟科其他16个属先汇聚成一支,形成1个单系群,而鼻龟属单独聚为另一个单系,表明鼻龟属与潮龟科其他属亲缘关系较远;系统树还显示,乌龟(*C. reevesii*)与拟水龟属(*Mauremys*)的日本拟水龟(*M. japonica*)先聚为一支后,再与拟水龟属的其他成员汇聚成单系群,表明乌龟与拟水龟属可能是单系的,拥有共同祖先;乌龟与拟水龟属的遗传距离,接近拟水龟属种间遗传距离,而远小于闭壳龟属间平均遗传距离,所以,笔者支持 Spinks 等<sup>[10]</sup>将乌龟重新归入拟水龟属的建议,与基于 12SrRNA 序列所得的结果一致<sup>[5]</sup>。从邻接树可以看出,锯缘龟(*P. mouhotii*)嵌入闭壳龟属的分支内,构成1个单系;锯缘龟与闭壳龟属间的遗传距离为 0.051,接近拟水龟属种间遗传距离(0.043),远小于潮龟科属间平均遗传距离(0.091),表明这2个属的亲缘关系很近,可能是单系起源,这与 12SrRNA 的研究结果<sup>[5,8,16]</sup>以及 Honda 等<sup>[11]</sup>的观点相同,故笔者支持将锯缘龟重新归入闭壳龟属。

b. 闭壳龟属是否应拆分为2个属。根据本研究结果,7种闭壳龟种间的遗传距离为 0.004~0.063,平均为 0.03,小于潮龟科属间的平均遗传距离(0.091);黄缘盒龟、黄额盒龟与闭壳龟属其他成员的遗传距离分别为 0.025 和 0.046,都远小于潮龟科属间的平均遗传距离(0.091),显示黄缘盒龟、黄额盒龟与闭壳龟属其他成员的遗传差异都还处在种间分化水平,并未达到属间的遗传分化。本文中构建的系统树显示,黄缘盒龟、黄额盒龟与其他闭壳龟属成员相互嵌在一起,聚成1个单支,这显示黄缘盒龟、黄额盒龟与其他闭壳龟属成员可能为单系起源,所以,笔者支持将黄缘盒龟和黄额盒龟一并归入闭壳龟属的观点。这也与文献<sup>[5]</sup>关于 12SrRNA 的研究结果相一致。

c. 潮龟科、陆龟科、龟科的系统进化关系。基于潮龟科、陆龟科和龟科的 16SrRNA 序列重建的邻接树表明,潮龟科与陆龟科汇聚后,再与龟科聚在一起,而潮龟科与陆龟科的遗传距离(0.126)小于龟

科和陆龟科的遗传距离(0.151),提示潮龟科、陆龟科和龟科三者之间,潮龟科与陆龟科之间的亲缘关系较近,而潮龟科与龟科的亲缘关系比与陆龟科要远,因此,笔者支持陆龟科与潮龟科关系近的观点<sup>[1,3,10,13,21-29]</sup>,同时也支持 Gaffney<sup>[29]</sup>将潮龟亚科(Geoemydinae)和龟亚科(Emydinae)提升为潮龟科(Geoemydidae)和龟科(Emydidae)的观点。

#### 参考文献:

- [1] Mcdowell S B . Partition of the genus clemmys and related problems in the taxonomy of the aquatic testudinidae[R] . London : Proceedings of the Zoological Society of London , 1964 .
- [2] Bramble D M . Emydid shell kinesis : Biomechanics and evolution[J] . Copeia , 1974(3) : 707-727 .
- [3] Hirayama R . Cladistic analysis of batagurine turtles (Batagurinae : Emydinae : Testudinoidea) : A preliminary result[J] . Studia Geologica Salmanticensia , 1984(1) : 141-157 .
- [4] Yasukawa Y , Hirayama R , Hikida T . Phylogenetic relationships of Geoemydine turtles (Reptilia : Bataguridae) [J] . Curr Herpetol , 2001 , 20(2) : 105-133 .
- [5] 万全, 郑将臣, 程起群, 等. 基于 12SrRNA 序列研究龟鳖类的系统进化特征[J]. 海洋渔业 , 2010 , 32(3) : 264-274 .
- [6] Bour R , Dubois A . Nomenclature ordinale et familiale des tortues (Reptilia) note complementaire[J] . Bull Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon , 1986 , 55 : 87-90 .
- [7] Mccord W P , Iverson J B , Spinks P Q , et al . A new genus of geoemydid turtle from Asia[J] . Hamadryad , 2000 , 25(2) : 20-24 .
- [8] 吴平, 周开亚, 杨群. 用 12SrRNA 基因序列研究潮龟科(Bataguridae)闭壳龟类的进化[J]. 应用与环境生物学报 , 1998 , 4(4) : 374-378 .
- [9] Sites J W , Bickham J W , Pytel B A , et al . Biochemical characters and the reconstruction of turtle phylogenies : Relationships among batagurine genera[J] . Systematic Zoology , 1984 , 33 : 137-158 .
- [10] Spinks P Q , Shaffer H B , Iverson J B , et al . Phylogenetic hypotheses for the turtle family geoemydidae[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution , 2004 , 32 : 164-182 .
- [11] 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[J] . Zoological Science , 2002 ,

- 17 : 1305–1312 .
- [12] Orti G , Petry P , Porto J I , et al . Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas[J] . *Journal of Molecular Evolution* , 1996 , 42 : 169–182 .
- [13] 吴平 , 周开亚 , 杨群 . 亚洲淡水和陆生龟鳖类 12SrRNA 基因片断的序列分析和系统发生研究[J] . *动物学报* , 1999 , 45(3) : 260–267 .
- [14] Cao Y , Sorenson M D , Kumazawa Y , et al . Phylogenetic position of turtles among amniotes : Evidence from mitochondrial and nuclear genes [J] . *Gene* , 2000 , 259 : 139–148 .
- [15] Honda M , Yasukawa Y , Ota H . Phylogeny of the Eurasian freshwater turtles of the genus *Mauremys* gray 1869 (Testudines) , with special reference to a close affinity of *Mauremys japonica* with *Chinemys reevesii* [J] . *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* , 2002 , 40 : 195–200 .
- [16] Stuart B L , Parham J F . Molecular phylogeny of the critically endangered indochinese box turtle (*Cuora galbinifrons*)[J] . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 2004 , 31 : 164–177 .
- [17] Le M , Raxworthy C J , Mccord W P , et al . A molecular phylogeny of tortoises (Testudines : Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes[J] . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 2006 , 40 : 517–531 .
- [18] 张颖 , 聂刘旺 , 宋娇莲 . 缅甸陆龟线粒体全基因组的测序及分析[J] . *动物学报* , 2007 , 53(1) : 151–158 .
- [19] Eugenia N M , Le M , Fitzsimmons N N , et al . Evolutionary relationships of marine turtle : A molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes[J] . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 2008 , 49 : 659–662 .
- [20] 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[J] . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 2010 , 55 : 1189–1194 .
- [21] Sambrook J , Russell D W . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* [M] . 3 ed . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001 : 463–471 .
- [22] Palumbi S R , Martin A , Romano S , et al . *The Simple Fool's Guide to PCR* [M] . Honolulu: Dept Zoology Univ Hawaii , 1991 .
- [23] Thompson J D , Gibson T J , Plewniak F , et al . The CLUSTALX windows interface : Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J] . *Nucleic Acids Research* , 1997 , 25(24) : 4876–4882 .
- [24] Tamura K , Dudley J , Nei M , et al . MEGA4 : Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0 [J] . *Molecular Biology and Evolution* , 2007 , 24 : 1596–1599 .
- [25] Kimura M . A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J] . *Journal of Molecular Evolution* , 1980 , 16 : 111–120 .
- [26] Xia X , Xie Z , Salemi M , et al . An index of substitution saturation and its application[J] . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 2003 , 26 : 1–7 .
- [27] Xia X , Xie Z . DAMBE : Data analysis in molecular biology and evolution[J] . *Journal of Heredity* , 2001 , 92 : 371–373 .
- [28] Gaffney E S , Meylan P A . A Phylogeny of Turtles[M]// Benton M J . *The Phylogeny and Classification of Tetrapods* . Oxford : Clarendon Press , 1988 , 157–219 .
- [29] Shaffer H B , Meylan P , Mcknight M L . Tests of turtle phylogeny : Molecular , morphological and paleontological approaches[J] . *Systematic Biology* , 1997 , 46 : 235–268 .

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠