

基于线粒体 Cyt *b* 基因鸭亚科部分鸟类的系统进化与黑鸬的分类地位初探*

张保卫^① 常青^② 朱立峰^② 魏辅文^{①**}

(^①中国科学院动物研究所 北京 100080; ^②南京师范大学生命遗传资源研究所 南京 210097)

摘要: 鉴于黑鸬的分类归属一直未能有定论,本文中通过分析线粒体细胞色素 *b* 基因的序列,并重建鸭亚科的系统发生,在此基础上探讨黑鸬的分类归属。在重建的系统树中,鸭亚科物种之间表现为平行枝的关系;鸭亚科物种间的序列分歧在属内与两个属间之间变化不明显,提示鸭亚科的物种可能是来自于一个快速辐射演化事件的群体。对细胞色素 *b* 基因的序列分析结果以及重建的分子系统进化树提示,将黑鸬独立为 *Dupetor* 属是不适合的,因而我们支持 Bock 的观点,将黑鸬置于苇鸬属之内。

关键词: 黑鸬;分类;细胞色素 *b* 基因

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-105-04

Phylogeny of Botaurinae and Classification of Black Bittern Based on Analyses of Mitochondrial Cytochrome *b* Gene

ZHANG Bao-Wei^① CHANG Qing^② ZHU Li-Feng^② WEI Fu-Wen^①

(^① Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;

^② Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: There is still controversy on the classification of black bittern. In present study, we elucidated the its phylogenetic relationship within subfamily Botaurinae based on analysis of mitochondrial Cytochrome *b* gene sequences. The results showed that there was the parallel branches relationships among the species of Botaurinae based on phylogeny trees and no obvious divergence between inter-genera and intra-genera, which suggested that all species within Botaurinae possibly originated from a rapid radiation event. The results also indicated that black bittern should be put in *Ixobrychus* genus, instead of *Dupetor* genus, which was consistent with Bock's opinion.

Key words: Botaurinae; Black bittern; Taxonomy; Phylogeny

黑鸬 (*Dupetor faviacollis* 或 *Ixobrychus flavicollis*) 是中等体型的涉禽,隶属于鹮形目 (Ciconiiformes), 鹭科 (Ardeidae), 鸭亚科 (Botaurinae)^[1]。对于黑鸬究竟应该属于哪一个属这一问题一直未有定论。1790 年 Latham 定名时将其归入 *Ardea* (鹭属)。自 Heine 和 Reichenow (1890) 将黑鸬定为一新属——黑鸬属 (*Dupetor*) 后, *Dupetor* 属一度被广泛接受。该属以嘴峰相对较长 (> 70 mm), 翅长超过 170 mm 而与苇鸬属 (*Ixobrychus*) 内的物种相区别^[2]。Bock (1956) 认为尽管黑鸬比苇鸬属其它物种大得多, 但其它特征却一致, 在分类上体形大小应该为次要的分类依据, 黑鸬的体形和羽色并未与

苇鸬属的物种构成属间的分化, 因此将黑鸬归入 *Ixobrychus* 属^[3]。Panye 和 Risley 根据骨骼学性状对鹭科鸟类进行数值分类研究时也认为, 从骨骼学结构上来看, 黑鸬仍然是典型的苇鸬属的物种, 它与苇鸬属中其它物种间的一些小的差异, 也多为蓝苇鸬 (*Ixobrychus*

* 国家杰出青年基金资助项目 (No: 30125006);

** 通讯作者;

第一作者介绍 张保卫, 男, 27 岁, 博士研究生; 研究方向: 分子系统学。

收稿日期: 2004-02-15, 修回日期: 2004-07-10

sturnii) 共有^[4]。因此,将 *Dupetor* 属并入 *Ixobrychus* 属的观点不久得到了一些分类学家的认同^[5-8]。国内学者也曾将黑鸬归为 *Dupetor* 属^[9,10]。近年来,尽管有学者根据 *Dupetor* 属和 *Ixobrychus* 属在体均具条纹,且都栖息于芦苇丛中的特点,采纳了上述观点^[11-13],但目前仍有学者将黑鸬归为 *Dupetor* 属^[11,14-20]。本文从分子生物学角度对黑鸬的分类归属问题进行了探讨。

动物线粒体上的细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因被认为是探讨近缘种间和种内遗传分化程度的良好指标^[21],在系统进化和分类学研究中有较强的适用性,已经在多种脊椎动物类群中都得到了有效应用^[22-24]。因此,本文通过比较鸭亚科鸟类 Cyt *b* 基因序列变异,并在此基础上探讨鸭亚科的系统发生,尝试使用分子系统学的手段来探讨黑鸬的分类归属问题。

1 材料与方 法

1.1 标本材料 采集鸭类样品 4 种共 7 个个体,采集地如下:黄苇鸭 (*Ixobrychus sinensis*), 采自江苏江宁 (1 个体);黑鸬 (*I. flavicollis*), 采自安徽宁国 (1, 指明亚种)、江苏南京 (1, 指明亚种);栗苇鸭 (*I. cinnamomeus*), 采自江苏南京 (2);大麻鸭 (*Botaurus stellaris*), 采自江苏苏州 (2, 指明亚种)。研究中其它物种的同源区序列来自 GenBank, 其序列登陆号如下:美洲麻鸭 (*Botaurus lentiginosus*), AF193833; 姬苇鸭 (*Ixobrychus exilis*), AF193832; 波斑鹭 (*Zebrius undulatus*), AF193834; 栗虎鹭 (*Tigrisoma lineatum*), AF193831; 船嘴鹭 (*Cochlearius cochlearius*), AF193832。

1.2 总 DNA 的提取 取 -20℃ 保存的肌肉样品 0.05 g, 参照 Sambrook 等的方法提取 DNA^[25]。

1.3 Cyt *b* 基因的扩增 根据已知鹭科鸟类线粒体 Cyt *b* 基因及相邻基因序列, 设计并合成 Cyt *b* 4 条扩增引物: Lb1 (5'-aac cta cct agg atc ctt cgc c-3')、Lb2 (5'-cca tga ggg caa ata tcc ttc tga gg-3')、Lcyth (5'-cct aat aac aca aat cct aac cgg-3')、Hb4 (5'-tct ttc gtt tac aag acc aat g-3'), L 和 H 分别代表轻链和重链。

PCR 反应总体积为 30 μ l, 含 10 \times Buffer 3.0 μ l, 1.5 mmol MgCl₂ 2.0 μ l, 2 mmol dNTP 2.0 μ l, *Taq* 酶 (Promega 公司, 5 U/ μ l) 0.2 μ l, 引物各 1.0 μ l (10 pmol/L), 模板 DNA 2.0 μ l, 加纯水将体积补至 30 μ l。PCR 反应的循环参数为: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 100 s, 33 个循环, 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, EB 染色, 紫外凝胶成像仪扫描检测。

1.4 DNA 序列的测定 使用试剂盒 (华舜公司) 纯化

PCR 产物, 纯化后用 PE 公司 ABI 310 型遗传分析仪及配套的 BigDyeTM 试剂盒进行双向测序。

1.5 DNA 序列分析及系统进化树构建 测序结果以及来自 GenBank 的同源序列使用 Clustal W 软件 (version 1.81) 进行对位排列^[26], 并辅以人工校对。按照 Kimura 双参数法 (kimura-2-parameter), 用 MEGA 2.1 软件分析每个各核苷酸位点的替换数、序列间的转换、颠换数, 并选用 Kimura-2-Parameter 模型计算物种间 DNA 序列间遗传距离差^[27]。参照 Sheldon 等对鹭科的分子系统学的研究结果, 选用栗虎鹭和船嘴鹭为外群^[28]。使用 Modeltest 3.06 对序列数据检验, 以找出最优运算模型^[29]。使用 PAUP 4.0 软件包, 经渐进式搜索 (heuristic research method), 以最大简约法 (maximum-parsimony, MP)、最大似然法 (maximum-likelihood, ML) 重建系统进化树以及以距离矩阵邻接法 (neighbor-Joining, NJ) 建系统发生树^[30]。在 MP 树、NJ 树中分枝处的置信度采用 1 000 次自引导法重复检测, 在 ML 树中则为 200 次。

2 结 果

2.1 序列结果与分析 测序得到黑鸬、黄苇鸭、栗苇鸭、大麻鸭的 Cyt *b* 基因 1 041 bp 的序列片段, 相同物种的不同个体间未发现序列差异。序列已提交 GenBank, 序列登陆号为 AY465748-AY465751。结合来自 GenBank 的鹭科另外 5 个物种——姬苇鸭、美洲麻鸭、波斑鹭、栗虎鹭、船嘴鹭的同源区序列后进行对位排列, 共发现 347 个变异位点, 包含简约信息位点 260 个。物种间序列的碱基替换情况和序列差异百分比统计见表 1。鸭亚科物种间的序列差异为 8.7% ~ 12.5%, 内群与外群间序列差异变化为 12.5% ~ 16.4%。物种间序列变异情况为转换多于颠换。*R* 值 (转换与颠换数之比) 的平均值为 2.1。序列中发生在 A/T 和 A/C 间的颠换要明显高于 T/G 和 G/C 间的颠换。T、C、A、G 的平均含量分别为 24.9%、34.4%、28.3%、12.4%, 其中 A + T 的含量 (53.2%) 大于 G + C 的含量 (46.8%)。

2.2 重建系统进化树 参考 Sheldon 等对鹭科系统学的研究结果^[28], 选用栗虎鹭、船嘴鹭作为外群, 分别以 NJ 法、ML 法和 MP 法重建了鹭科 9 个物种的系统进化树 (图 1: A、B、C)。在重建的分子系统树中, 研究中涉及的鸭亚科 6 个种聚成一支, 但在不同的建树方法中, 其拓扑结构有所差异。在系统树中, 这一支与波斑鹭互为姐妹群, 它们相聚后, 再向上与船嘴鹭、栗虎鹭相聚。在 NJ 树和 MP 树中, 黑鸬与黄苇鸭、栗苇鸭相聚为一支, 大麻鸭、美洲麻鸭和姬苇鸭聚为一支; 在 ML 树中, 黑鸬与黄苇鸭、栗苇鸭、大麻鸭相聚为一支, 美洲麻

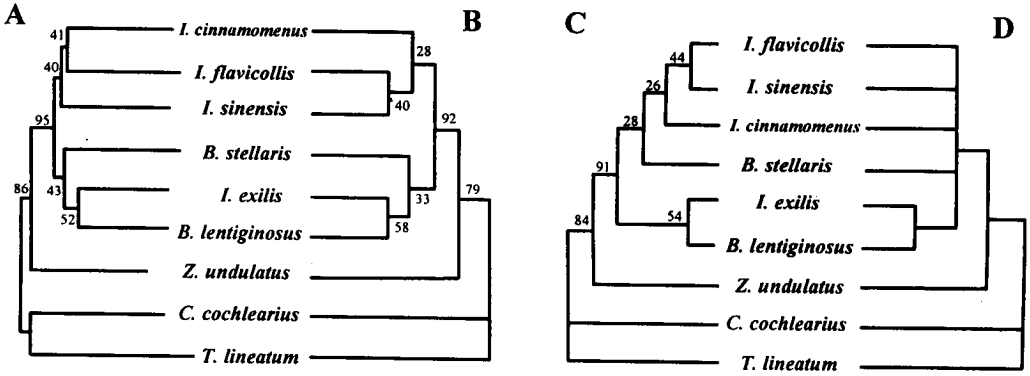


图 1 鸢科 9 个种的分子系统树

A. 邻接树; B. 最大似然树; C. 最大简约树; D. 50%—一致性分析树。

NJ 树和 MP 树中分支处的自引导值来自 1 000 次重复检测的, 而 ML 树中为 200 次, 选取栗虎鸢、船嘴鸢作为外群

表 1 鸢科 9 种鸟的 Cyt b 基因序列碱基替代情况(转换/颠换数, 上三角)和序列间差异百分比(下三角)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>I. flavicollis</i>		91/19	89/18	86/27	86/30	89/31	94/36	106/47	95/61
2. <i>I. cinnamomus</i>	10.6		89/25	82/32	77/39	85/36	89/41	88/52	93/70
3. <i>I. sinensis</i>	10.3	11.0		89/25	82/24	81/29	89/38	91/47	98/61
4. <i>I. exilis</i>	10.9	11.0	11.0		62/29	84/30	80/35	84/46	90/64
5. <i>B. lentiginosus</i>	11.1	11.1	10.2	8.7		80/19	84/40	92/51	95/76
6. <i>B. stellaris</i>	12.5	11.6	10.6	11.0	9.5		91/41	91/56	100/70
7. <i>Z. undulatus</i>	12.5	12.5	12.2	11.0	11.9	12.7		86/53	86/59
8. <i>C. cochlearius</i>	14.7	13.4	13.3	12.5	13.6	14.1	13.4		95/52
9. <i>T. lineatum</i>	15.0	15.7	15.3	14.8	16.4	16.3	13.9	14.1	

鸢和姬鸢聚为一支。在不同的系统树中, 美洲麻鸢总与姬鸢相聚。鸢亚科物种之间在系统树中的聚合处都未能取得较好的自引导值的支持(均小于 50), 仅在美洲麻鸢与姬鸢相聚的节点处得到了高的自引导值(52~58)。因而, 对上述系统树进行 50%—一致性分析中, 鸢亚科物种在系统树中的分析呈平行状的分枝(图 1:D)。

3 讨论

研究中鸢亚科在鸢科系统发生中的地位与前人的研究结果一致^[28, 31], 但鸢亚科 6 个种间的系统关系与建立在形态学分析基础上的分类体系并不吻合^[12, 14]。在重建的分子系统树中, 分支节点处均未能得到有力的自引导值的支持。因而在对系统树进行 50%—一致性分析中, 亚科物种之间在系统树中多表现为平行枝的关系(图 1: D)。鸢亚科的 6 个物种之间的序列差异比较接近, 若遵循将鸢亚科分为苇鸢属和麻鸢属两属的观点, 则鸢亚科物种属内序列差异为 9.5%~11.0%, 属

间为 8.7%~12.5%, 物种间序列差异在两个属内及属间的变化无明显差异。以上的结果提示, 鸢亚科可能是从一个原始物种快速辐射演化出的群体, 由于在分歧时间上彼此接近, 所以系统学分析结果未能出现典型的树状结构^[32]。若按照细胞色素 b 基因在鹤类中的分歧速率为每百万年 0.7%~1.7%来计算^[33], 则鸢亚科的物种在系统演化中的分歧可能至少已经已有 500 万年的时间, 可能发生在第三纪的中新世与上新世之间。

如果将黑鸢单独成一个属, 则它在系统进化中应该是一个单系, 所以在鸢亚科内至少应该与苇鸢属和麻鸢属之中的一个属表现为姐妹群的关系。在重建的系统发生树中, 这两种情况均未能出现, 加之鸢亚科内的物种之间聚合情况未能与传统的分类体系吻合, 因而再将黑鸢作为一个属显然是不适合的。考虑到在系统树中, 尽管未得到较高的自检验置的支持, 黑鸢总与苇鸢属的物种相聚合(图 1: A~C)。所以, 我们倾向与支持 Bock (1956) 的观点, 认为将黑鸢置于苇鸢属可能

比较合适。这与此前通过分析线粒体 12S rRNA 基因序列对鹭科鸟类系统学研究中有关黑鸬的分类评价是一致的^[31]。鉴于文中分析结果这只是对 Cyt *b* 单个基因序列结果的分析,所以要明确苇鸭属与麻鸭属在系统进化上是否是单系、以及鸭亚科是否为一个快速辐射演化出的群体,可能还需要更加完整的取样,以及更多的序列证据来支持。

参 考 文 献

- [1] Howard R, Moore A. A Complete Checklist of the Birds of the World. London: Christopher Helm Press, 2003.
- [2] 郑作新. 中国鸟类系统检索(第二版增订本). 北京: 科学出版社, 1966, 9~11.
- [3] Bock W J. A generic review of the family Ardeidae (Aves). *Am Mus Novit*, 1956, **1779**: 1~49.
- [4] Panye R B, Risley C J. Systematics and evolutionary relationships among the herons (Ardeidae). *Misc Publ Univ Mich Mus Zool*, 1976, **150**: 1~115.
- [5] Hancock J, Elliott H, Gillmor R. The Herons of the World. London: London Editions Limited Press, 1978.
- [6] Sibley C G, Monroe B L, Jr. Distribution and Taxonomy of Birds of the World. New Haven: Yale University Press, 1990, 310~311.
- [7] Hoyo J del, Elliot A, Sargatal J. Handbook of the Birds of World Vol.1. Barcelona: Edicions Press, 1992.
- [8] Clements J F. Birds of the World: A Checklist (5th Edition). Vista: Ibis Publishing Company Press, 2000, 21~22.
- [9] 郑作新. 中国鸟类分布名录. 北京: 科学出版社, 1955, 20~21.
- [10] 杨岚. 云南鸟类志(上卷, 非雀形目). 昆明: 云南科技出版社, 1995, 112~113.
- [11] 郑作新, 徐延恭, 赵正阶等. 中国动物志鸟纲 第一卷. 北京: 科学出版社, 1997, 117~151.
- [12] 赵正阶. 中国鸟类志. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001, 118~125.
- [13] 郑光美. 世界鸟类分类与分布名录. 北京: 科学出版社, 2002, 11~18.
- [14] Soothill E, Soothill R. Wading Birds of the World. Hong Kong: Blandford Press, 1982, 71~72.
- [15] de Schauensee R M. The Birds of China. Washington: Smithsonian Institution Press, 1984, 131.
- [16] King F B, Dickinson E C. A Field Guide to the Birds of South-East Asia. London: Collins Press, 1986, 47~51.
- [17] Monroe B L, Sibley C G. A World Checklist of Birds. New Haven and London: Yale University Press, 1993, 130.
- [18] 中国野生动物保护协会主编, 钱燕文执行主编. 中国鸟类图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社, 1995, 16~24.
- [19] 约翰·马敬能, 卡伦·菲利普斯, 何芬奇. 中国鸟类野外手册. 长沙: 湖南教育出版社, 2000, 210~218.
- [20] 高玮. 鸟类分类学. 台中市: 中台科学技术出版社, 2000, 118~125.
- [21] Irwin D M, Koehler T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* in mammals. *J Mol Evol*, 1991, **32**: 128~144.
- [22] 王义权, 周开亚, 徐璐珊等. 几种游蛇的 Cyt *b* 基因片断序列分析及其演化关系. *动物学报*, 1999, **45**(3): 332~338.
- [23] 李明, 王小明, 盛和林等. 四种鹿属动物的线粒体 DNA 差异和系统进化关系研究. *动物学报*, 1999, **45**(1): 99~105.
- [24] 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然等. 毛冠鹿与 3 种麝属动物的线粒体细胞色素 *b* 的系统进化研究. *动物学报*, 2002, **48**(1): 44~49.
- [25] Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [26] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 4637~4680.
- [27] Kimura S, Tamamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona: Arizona State University Press, 2001.
- [28] Sheldon F H, Jones C E, McCracken K G. Relative patterns and rates of evolution in heron nuclear and mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol*, 2000, **17**: 437~450.
- [29] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, **14**(9): 817~818.
- [30] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods (Version 4.0). Sunderland, MA: Sinauer, 1998.
- [31] 常青, 张保卫, 金宏等. 从 12S rRNA 基因推测鹭科 13 种鸟类的系统发生关系. *动物学报*, 2003, **49**(2): 205~210.
- [32] Waits L P, Sullivan J, O'Brien S J, et al. Rapid radiation events in the family Ursidae indicated by likelihood phylogenetic estimation from multiple fragments of mtDNA. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, **13**(1): 82~92.
- [33] Krajewski C, King G D. Molecular divergence and phylogeny: rates and patterns of cytochrome *b* evolution in Cranes. *Mol Biol Evol*, 1996, **13**(1): 21~30.