

基于 CHD 基因序列的隼形目 12 种鸟系统发育关系

刘铸^{1 2} 杨春文¹ 田恒久³ 金建丽¹ 金志民¹ 鞠永富²

(¹牡丹江师范学院生物系 牡丹江 157012; ²东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040; ³北京市野生动物救护中心 北京 100029)

摘要: 对 12 个隼形目物种 CHD 基因的一段内含子序列进行比较和分析。CHD-W 和 CHD-Z 基因的多态性存在差异, CHD-W 基因不适合系统发生学的研究。通过对 CHD-Z 基因扩增序列构建的 NJ 和 MP 树 结果显示隼科鸟类与鹰科和鸢科鸟类关系较远, 与传统形态分类和鸟类新的分类系统不一致。在白腹鸢的分类地位上与传统形态学分类不一致, 将白腹鸢归入鹰属一支。NJ 树显示鸢属(黑鸢)与鵟属(毛脚鵟)亲缘关系较近, MP 树显示鵟属(灰脸鵟鹰)与鵟属(毛脚鵟)亲缘关系较近。NJ 和 MP 树都显示雕属(金雕)和鹰雕属(鹰雕)与其他鹰科各属亲缘关系较远。

关键词: 隼形目 CHD 基因 系统发育

Phylogenetic Relationship Among 12 Falconiformes Based on CHD Gene Sequences

Liu Zhu^{1 2} Yang Chunwen¹ Tian Hengjiu³ Jin Jianli¹ Jin Zhimin¹ Ju Yongfu²

(¹ Department of Biology Mudanjiang Teachers' College Mudanjiang 157012;

² College of Wildlife Resources Northeast Forestry University Harbin 150040;

³ Beijing Wildlife Resources and Rehabilitation Center Beijing 100029)

Abstract: In this study, CHD gene intron sequences of 12 species of Falconiformes were compared and analyzed. CHD-W and CHD-Z gene polymorphisms are different and CHD-W gene is not suitable for phylogenetics studies. Based on amplification sequences of the CHD-Z gene, NJ and MP trees were constructed. Falconidae have the distant relationship with Accipitridae and Ciconiidae, which is different with traditional morphological classification and the new classification system of birds. Classification status of *C. spilonotus* is inconsistent with the traditional morphological classification and is classified as *Accipiter*. NJ tree shows *Milvus* (*Milvus migrans*) has close phylogenetic relation with the *Buteo* (*Buteo Lagopus*) but MP tree shows *Butastur* (*Butastur indicus*) has close phylogenetic relation with *Buteo* (*Buteo Lagopus*). NJ and MP trees all show both *Aquila* (*Aquila chrysaetos*) and *Nisaetus* (*Nisaetus nipalensis*) have far phylogenetic relation with *Accipiter*.

Key words: Falconiformes CHD gene Phylogenetic

鸟类的 CHD 基因位于性染色体上, 鸟类的性染色体为 ZW 型, 雄性为 ZZ, 雌性为 ZW。CHD 基因在非平胸鸟类中有两个同源拷贝 CHD-W 和 CHD-Z, 其中 CHD-W 为 W 连锁, CHD-Z 为 Z 连^[1]。1995 年 Griffiths 和 Tiwari 第一个发现了与 W 染色体连锁的 CHD-W 基因, 全称为染色体螺旋蛋白基因(chromobox-helicase-DNA binding gene)^[2]。随后的研究

发现 CHD 基因对非平胸鸟类的系统发生学的研究有着非凡的应用价值^[3]。

隼形目(Falconiformes)包括鹰科(Accipitridae)和隼科(Falconidae)被列为国家一、二级保护动物, 具有重要的保护和研究价值。鸟类系统分类长期以来主要基于生态学、形态特征和行为等方面的研究。近年来, 随着分子生物学技术在鸟类分类研究的应

收稿日期: 2010-01-29

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C200626), 牡丹江师范学院青年一般项目(QY200901)

作者简介: 刘铸, 男, 在读博士, 研究方向: 动物保护及分子生物学研究; E-mail: liuzhu590@sohu.com

用,利用分子生物学技术对猛禽的系统发育已经有了一些报道,Sibley 等^[4]根据 DNA-DNA 杂交研究的结果建立了鸟类新的分类系统,将鹞形目分为鹞亚目和鹞亚目两类,鹰科和隼科都属于鹞亚目。王翔等^[5]利用猛禽类 15 种鸟类线粒体 tRNA 基因序列及二级结构的比较发现隼形目鹰科更接近于鸱鸃科而不是隼科。由于目前利用分子生物学构建的隼形目系统关系存在争议,可见只有利用多种方法、多个位点的分子生物学方法研究才能更加科学的探讨系统发育关系。分子进化研究显示内含子比外显子在诸多方面适合系统发育和分子钟的研究^[6]。因此本研究首次对 12 个隼形目物种 CHD 基因的一段内

含子序列进行比较和分析,结合前人在形态学、核型研究及分子进化方面的研究成果,对隼形目物种间的系统发育关系进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

样本来自北京市野生动物救护中心和牡丹江师范学院生物系标本室。由于对 CHD-Z 基因进行测序研究,所以对试验的 3 种隼形目鸟类和东方白鹞(外群)各取 1 只雌性样本进行研究。取样方式为采取非损伤性取样,收集脱落的羽毛和拔取标本羽毛^[7]。其余隼形目鸟类和军舰金刚鸚鵡(外群)CHD 相应序列搜取于 GenBank,详情见表 1。

表 1 本研究所检测的 14 种鸟类(包括外群)名称、分类及采集地点

目/科	属	物种	采集地点
隼形目(Falcoiformes) 鹰科(Accipitridae)	鵟属(<i>Butastur</i>)	灰脸鵟鹰(<i>Butastur indicus</i>)	北京
	鵟属(<i>Buteo</i>)	毛脚鵟(<i>Buteo Lagopus</i>)	牡丹江
	鹰属(<i>Accipiter</i>)	苍鹰(<i>Accipiter gentiles</i>)	GenBank: AB112952(CHD-Z) AB112944(CHD-W)
		雀鹰(<i>Accipiter nisus</i>)	GenBank: AB112953(CHD-Z) AB112945(CHD-W)
	雕属(<i>Aquila</i>)	金雕(<i>Aquila chrysaetos</i>)	GenBank: AB112951(CHD-Z) AB112943(CHD-W)
	鹞属(<i>Circus</i>)	白腹鹞(<i>Circus spilonotus</i>)	GenBank: AB122954(CHD-Z) AB112946(CHD-W)
	鸢属(<i>Milvus</i>)	黑鸢(<i>Milvus migrans</i>)	GenBank: AB112957(CHD-Z) AB112949(CHD-W)
	鹰雕属(<i>Nisaetus</i>)	鹰雕(<i>Nisaetus nipalensis</i>)	GenBank: AB112958(CHD-Z) AB112950(CHD-W)
隼科(Falconidae)	隼属(<i>Falco</i>)	猎隼(<i>Falco cherrug</i>)	北京
		灰背隼(<i>Falco columbarius</i>)	GenBank: AF526000(CHD-Z)
		游隼(<i>Falco peregrinus</i>)	GenBank: AB112955(CHD-Z) AB112947(CHD-W)
		红隼(<i>Falco tinnunculus</i>)	GenBank: AB112956(CHD-Z) AB112948(CHD-W)
鹞形目(Ciconiiformes) 鹞科(Ciconiidae)	鹞属(<i>Ciconia</i>)	东方白鹞(<i>Ciconia boyciana</i>)	牡丹江
鸚鵡形目(Psittaciformes) 鸚鵡科(Psittacidae)	金刚鸚鵡属(<i>Ara</i>)	军舰金刚鸚鵡(<i>Ara militaris</i>)	GenBank: DQ331021

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 取1根飞羽的羽髓及羽根样本在消化前加入10 μL 1 mol/L DTT以破坏二硫键。用酚-氯仿法对样本基因组DNA进行提取。提取产物的含量和纯度均在蛋白质核酸分析仪DU640(Beckman公司)上进行检测。样品用TE调整DNA终浓度至100 ng/ μL 样品保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 PCR扩增 反应体系为10 μL 含200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , Primer 2 pmol, *Taq* DNA polymerase 0.5 U(大连宝生物) 模板为100 ng。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) 30个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ /7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。所运用的两对引物:2550F(5'-GTTACTGATTCGTCT ACGAGA-3')和2718R(5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTT-3')。

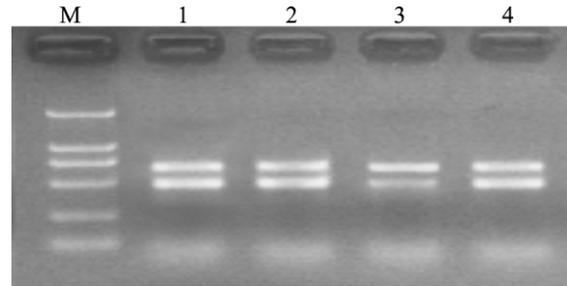
1.2.3 电泳、测序 取10 μL PCR扩增产物,在3%的琼脂糖凝胶上电泳30 min,用凝胶成像仪(Vilber Lourmat公司)进行拍照记录结果。对试验的3种猛禽及东方白鸛雌性CHD-Z基因的扩增产物进行纯化、测序分析。

1.2.4 统计分析 使用EditSeq(DNASTAR软件包)进行序列编辑,并进行手工校正,再利用Clustal W[®]软件分别对CHD-Z基因进行序列聚类比对。用DnaSP 4.10软件包区分单元型和计算所获序列的核苷酸多态性(Nucleotide diversity, π)。利用MEGA 3.0计算基础数据,再用MEGA 3.0中带有bootstrap检测值的邻接法(Neighbor-joining, NJ)和最大简约法(Maximum-parsimony, MP)方法构建系统树,系统树各分支的置信度由1000次自举法检测。

2 结果

2.1 CHD-W和CHD-Z基因扩增序列确定

根据所选取引物的位置,估计扩增片段的大小(包括引物序列),CHD-Z扩增片段600 bp左右,CHD-W扩增片段为450 bp左右,所有种类PCR产物条带大小与预计相符(图1)。所测序列经过拼接校对,在NCBI网站上运行BLASTn程序,结果显示所测序列与非平胸鸟类的CHD基因有很高的同源性,因此可以确定序列为CHD基因序列。



1.东方白鸛; 2.灰脸鵟鹰; 3.毛脚鵟; 4.猎隼

图1 3种隼形目鸟类和东方白鸛CHD-W和CHD-Z基因扩增产物电泳检测结果

2.2 CHD-W和CHD-Z基因扩增序列组成和变异

从GenBank下载苍鹰、雀鹰、金雕、白腹鸛、黑鸛、鹰雕、游隼和红隼8种隼形目鸟类CHD-W基因扩增相应序列,CHD-W基因扩增相应序列平均大小为414 bp,其中A、T、G和C的平均含量分别为31.6%、34.1%、19.5%和14.8%。A+T含量较高,为65.7%,而G+C含量只有34.3%。突变总数42个,转换数与颠换数的比值(R)为1.3, π 为0.03868,其主要突变发生在隼科与鹰科之间,共获得7个单元型,金雕和鹰雕共用同一单元型。隼形目CHD-W扩增片段用作系统分化片段过小(图1),并且对隼形目鸟类的CHD-W基因测序分析(未发表)及资料显示CHD-W基因片段在近缘种间非常保守^[1]不适合进化关系分析,因此未对试验样本进行测序分析。从GenBank下载8种隼形目鸟类CHD-Z基因扩增相应序列, π 为0.07366,获得8个单元型,适合进化关系分析,因此对试验样本进行测序分析。

12种隼形目鸟类的CHD-Z基因扩增序列平均大小为629 bp,其中A、T、G和C的平均含量分别为31.1%、31.4%、21.0%和16.5%。A+T含量较高,为62.5%,而G+C含量只有37.5%。突变总数134个,转换数与颠换数的比值(R)为1.3, π 为0.08007。共获得12个单元型。

2.3 遗传距离

利用MEGA 3.0计算CHD-Z基因在12种隼形目鸟类之间Kimura-2参数校正的遗传距离,结果见表2。

2.4 系统发育重建

基于CHD-Z基因扩增序列数据,在Kimura-2模

型的基础上,利用分析软件 MEGA 3.0 分别采用 NJ 和 MP 构建分子系统树,见图 2、图 3。Bootstrap 1 000 次重复检测分子系统树的置信度,DNA 序列

变异中的转换和颠换赋予相同的权值。东方白鹳和军舰金刚鹦鹉相应序列作为双外群。

表 2 12 种隼形目鸟类 CHD-Z 基因 Kimura-2 参数校正的遗传距离

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1											
2	0.021										
3	0.022	0.026									
4	0.036	0.038	0.038								
5	0.031	0.040	0.037	0.033							
6	0.028	0.029	0.029	0.026	0.017						
7	0.031	0.033	0.033	0.024	0.031	0.021					
8	0.033	0.035	0.035	0.019	0.028	0.021	0.019				
9	0.155	0.168	0.159	0.160	0.143	0.143	0.155	0.151			
10	0.159	0.172	0.163	0.164	0.147	0.147	0.159	0.159	0.007		
11	0.152	0.168	0.159	0.159	0.143	0.143	0.155	0.151	0.017	0.017	
12	0.144	0.157	0.149	0.147	0.133	0.133	0.147	0.141	0.022	0.026	0.022

1. 苍鹰; 2. 白腹鸢; 3. 雀鹰; 4. 黑鸢; 5. 金雕; 6. 鹰雕; 7. 灰脸鵟鹰; 8. 毛脚鹞; 9. 游隼; 10. 猎隼; 11. 灰背隼; 12. 花彩角鸮

3 讨论

3.1 CHD 基因的多态性

1995 年发现 CHD 基因,最初认为与性别决定有关,但近些年的研究显示 CHD 基因不是鸟类性别决定基因,但是 CHD 基因在鸟类性别分子鉴定中却发挥着巨大的作用^[10]。以往的研究显示鸟类 CHD-W 基因种内无多态性,CHD-W 和 CHD-Z 基因的多态性存在差异,差异在近 10 倍左右^[11],对鹤形目研究也存在类似结果(未发表)。本研究显示 CHD-W 和 CHD-Z 基因的多态性存在明显差异,差异在近 2 倍左右,研究显示主要由于隼科与鹰科亲缘关系较远造成 CHD-W 序列多态性偏高。本研究扩增的是 CHD-W 上的一段内含子序列,如果研究其外显子,多态性将更低。可见 CHD-W 基因过于保守,不适合系统发生学的研究。然而,与其对应的片段大小不同的 CHD-Z 基因的多态性却较丰富,多态性满足种间系统发生学的研究,很多科学家把它应用于非平胸鸟类的系统发生学的研究中。甚至一些科学家用这种标记对同种鸟类的不同种群进行研究^[12]。

两基因多态性存在悬殊差异的机制目前有不同

看法,一些研究认为 Z 染色体经历了雄性生殖系的三分之二的时间,因此可能比 W 染色体产生更多的变异^[13];一些研究认为 CHD-W 的多态性低是由于背景选择(background selection)和选择扫荡(selective sweep)的原因^[14,15];更多的研究显示以上两种机制很难达到 10 倍差异,认为主要是选择作用于 W 染色体的结果^[11]。

3.2 12 种隼形目鸟类的系统关系

通过对 CHD-Z 基因扩增序列构建的 NJ 和 MP 树看出,两种方法的分析结果基本相似。系统树中置信度都较高,因此显现出 12 种隼形目鸟类明确的系统关系。目前对隼科的系统发育存在诸多争议:形态学和行为学上认为隼形目包括鹰科和隼科^[16,17];核型分析显示鹰科鸟类具有与其他鸟类截然不同的核型,而隼科总体上属于正常核型^[18];基于线粒体 12S rDNA 基因作为分子标记发现隼科与鸮形目关系更近,而结合线粒体 CO I 基因部分序列共同分析则强烈支持隼科归入隼形目,与传统的分类观点一致^[19];基于线粒体 tRNA 基因全序列和二级结构都表现出隼科与其他猛禽物种关系较远^[5]。图 2、图 3 显示隼科物种(游隼、

红隼灰、背隼和猎隼) 在系统树中首先组成单系群分化出来, 鸟类是 NJ 和 MP 树显示隼科物种间的关系相同, 4 个物种在系统树中的位置接近。说明隼科与其他隼形目物种关系较远, 与基于线粒体 tRNA 基因全序列和二级结构的系统发育结果一

致, 与其它分类结果不同。文隴英等^[20]认为性二态可以作为形态分类的一个标准, 隼科鸟类是隼形目中惟一性二态鸟类, 在这一点上支持本研究结果。

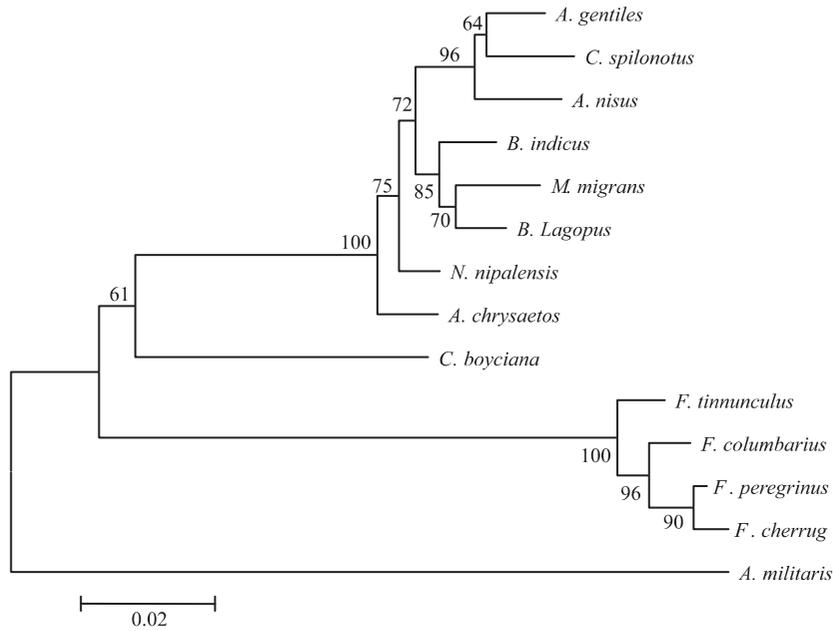


图 2 12 种隼形目鸟类 CHD-Z 基因扩增产物 NJ 树(支上数字为置信度)

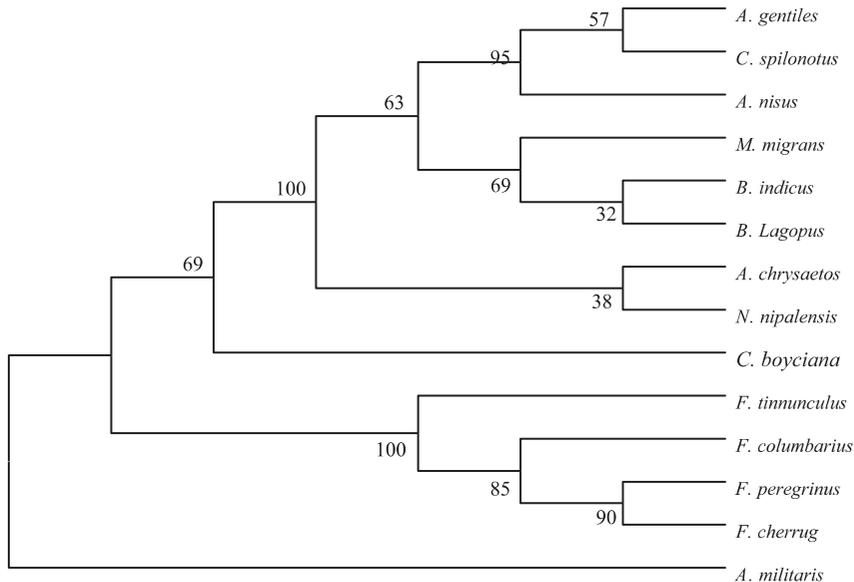


图 3 12 种隼形目鸟 CHD-Z 基因扩增产物 MP 树(支上数字为置信度)

目前对鹰科的系统发育也存在一定争议,例如, Sibley 等^[4]根据 DNA-DNA 杂交研究的结果,认为鹰科和隼科同归隼下目,鹤科归鹤下目,都属于鹤亚目。本研究 NJ 和 MP 树均显示鹰科鸟类(苍鹰、雀鹰、金雕、白腹鹞、黑鸢、鹰雕、灰脸鵟鹰、毛脚鵟)与鹤科(东方白鹤)鸟类亲缘关系较近,与传统形态分类和和鸟类新的分类系统不一致。笔者认为以上结果可能是一直以来对隼科鸟类分类地位误判所致,本研究只能显示隼科鸟类与鹰科和鹤科鸟类关系较远,至于隼科鸟类确切分类地位有待进一步研究。NJ 和 MP 树在鹰科系统分化基本一致,但存在一定分歧。在白腹鹞的分类地位上与传统形态学分类不一致,都将白腹鹞归入鹰属一支。NJ 树显示鸢属(黑鸢)与鵟属(毛脚鵟)亲缘关系较近,MP 树显示鵟属(灰脸鵟鹰)与鵟属(毛脚鵟)亲缘关系较近。NJ 和 MP 树都显示雕属(金雕)和鹰雕属(鹰雕)于其他鹰科各属亲缘关系较远。

参考文献

- [1] Lessells K, Mateman C. Molecular sexing of birds. *Nature*, 1996, 383: 761-762.
- [2] Griffiths R, Korn RAM. ACHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*, 1997, 197: 225-229.
- [3] Peters JL, Mc CK, Zhuravlev YN, et al. Phylogenetics of wigeons and allies (Anatidae: Anas): the importance of sampling multiple loci and multiple individuals. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 2005, 35(1): 209-224.
- [4] Sibley CG, Ahlquist JE, Monroe BL. A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *Auk*, 1988, 105(3): 409-423.
- [5] 王翔, 孙毅, 袁晓东, 等. 猛禽类 15 种鸟类线粒体 tRNA 基因序列及二级结构的比较研究. *遗传学报*, 2004, 31(4): 411-419.
- [6] 王宁, 陈润生. 基于内含子和外显子的系统发育分析的比较. *科学通报*, 1999, 44(19): 2095-2102.
- [7] Taberlet P, Waits LP, Luikart G. Noninvasive sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 1999, 14: 323-327.
- [8] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95-98.
- [9] Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London (series B)*, 1996, 263: 1251-1256.
- [10] Griffiths R, Double MC, Orr K. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 1071-1075.
- [11] Montell H, Fridolfsson AK, Ellegren H. Contrasting levels of nucleotide diversity on the avian z and w sex chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, 18(11): 2010-2016.
- [12] Pitra C, Lieckfeldt D, Alonso JC. Population subdivision in Europe's great bustard inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence variation. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1165-1170.
- [13] Ellegren H, Fridolfsson AK. Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nat Genet*, 1997, 17: 182-184.
- [14] Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*, 1993, 134: 1289-1303.
- [15] Stephan W, Wiehe TH, Lenz MW. The effect of strongly selected substitutions on neutral polymorphism: analytical results based on diffusion theory. *Theor Popu Biol*, 1992, 41: 237-254.
- [16] 郑作新. 中国鸟类种和亚种分类名录大全. 北京: 科学出版社, 1994: 278-345.
- [17] 郑作新. 中国鸟类系统检索. 北京: 科学出版社, 2002: 288-303.
- [18] 卞小庄, 李庆伟, 张恒庆. 鸟类核型研究·隼形目 9 种. *动物学杂志*, 1989, 24(4): 11-13.
- [19] Mindell DP. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. New York: Academic Press, 1997: 214-247.
- [20] 文陇英, 阮祿章, 刘西发. 角雉属分类地位的探讨. *动物分类学报*, 2006, 31(3): 467-473.