

基于线粒体 *Cytb* 基因全序列探讨两爪鳖和山瑞鳖的系统进化关系

李小三, 汪 玲, 周 科, 聂刘旺*

(安徽师范大学 生命科学学院, 中国安徽 芜湖 241000)

摘要: 采用 PCR 方法对两爪鳖(*Carettochelys insculpta*)和山瑞鳖(*Palea steindachneri*) mtDNA 的细胞色素 b 基因(*Cytb*)进行了扩增和测序, 并结合 GenBank 中已公布的其它 15 种龟鳖类和两种鳄类的同源序列, 进行了序列变异比较和系统发生分析. 以凯门鳄和扬子鳄为外群, 采用邻接 (neighbor joining, NJ) 法、最大简约 (maximum likelihood, ML)法和最大似然(maximum parsimony, MP)法重建分子系统树. 结果均支持将龟鳖目分为 3 支: 侧颈龟科 (Pelomedusidae) (非洲侧颈龟 *Pelomedusa subrufa*), 两爪鳖科 (Carettochelyidae) (两爪鳖 *Carettochelys insculpta*) 和一支由其它 15 种现生龟鳖类组成的进化支. 在这里两爪鳖科被认为可能代表一新的亚目; 而山瑞鳖聚于鳖科(Trionychidae)中, 与中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)最先聚成一支, 再依次与马来鳖(*Dogania subplana*)、非洲鳖 (*Trionyx triunguis*)、印度箱鳖(*Lissemys punctata*)聚成一组.

关键词: 两爪鳖; 山瑞鳖; *Cytb*; 系统进化

中图分类号: Q959.6⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)05-0413-06

The Phylogenetic Relation of *Carettochelys insculpta* and *Palea steindachneri* Based on the Sequence Analysis of Mitochondrial *Cytb* Gene

LI Xiao-san, WANG Ling, ZHOU ke, NIE Liu-wang*

(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: The complete sequences of Cytochrome *b* (*Cytb*) genes in *Carettochelys insculpta* and *Palea steindachneri* were amplified using PCR technology. Meanwhile, the homologous sequences of other 15 turtle species were obtained from the GenBank. Based on these data, the sequence variation and the phylogenetic relationship of these groups were analyzed. Employing *Caiman crocodilus* and *Alligator sinensis* as outgroups, the phylogenetic trees were reconstructed using neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) methods. All of the three methods suggest the earliest phylogenetic tree splits separating into three basal branches: the Pelomedusidae (*P. subrufa*), the Carettochelyidae (*C. insculpta*) and an assemblage of 15 cryptodiran turtle species. It suggested that *C. insculpta* may be a representation of distinct suborder. In the Trionychidae, *Palea steindachne* and *Pelodiscus sinensis* firstly gather into one clade, and then form a group with *Dogania subplana*, *Trionyx triunguis* and *Lissemys punctata*.

收稿日期: 2010-04-06; 修回日期: 2010-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970351; 30770296); 安徽省科学与技术后备人选基金项目(2006-2); 安徽省重点实验室基金项目

作者简介: 李小三(1983-), 男, 安徽庐江人, 硕士研究生, 主要从事动物细胞与分子生物学研究; *通讯作者: 聂刘旺(1962-), 男, 安徽芜湖人, 安徽师范大学教授, 博士生导师, 主要从事爬行动物的遗传学、动物性别决定的分子机制和性别人工控制, Tel: 0553-3861474, E-mail: lwnie@mail.ahnu.edu.cn.

Key words: *Carettochelys insculpta*; *Palea steindachneri*; *Cyt b*; Phylogenetic evolution

(*Life Science Research*, 2010, 14(5): 413~418)

两爪鳖(*Carettochelys insculpta*)又名猪鼻龟(Pig-nosed Turtle), 隶属龟鳖目(Testudinata), 是两爪鳖科(Carettochelyidae)唯一的现存物种^[1]. 主要分布于澳大利亚北部, 伊里安查亚南部和新几内亚南部. 两爪鳖背甲较圆, 呈深灰色, 近边缘处有一排白色的斑点. 背部边缘略带锯齿, 由于外缘骨骼发育良好, 结构完整, 故而没有像鳖那样的裙边. 也没有像其它龟类所具有盾片, 代之以连续并且略带皱褶的皮肤. 背甲中央具脊棱. 背甲的骨板中, 椎板(neural plate)的数目以及它们与肋板(costal costal)的关联差异很大^[2,3]. 腹甲白色, 骨化完全, 共9枚盾片, 盾片之间并不完全骨化, 具软骨组织. 腹甲具坚硬骨板^[4]. 头部无法缩入壳内. 鼻子丰厚多肉, 并且很长, 形同猪鼻. 四肢特化为鳍状, 也不能缩入壳中. 在每一侧前肢的近中点处都有两枚明显的爪甲. 两爪鳖因奇特形态极具观赏价值, 使其在宠物市场上炙手可热. 目前野生种已很稀少. 2004年世界自然基金会将其列入世界十大濒危物种(排名第4). 目前上海、广西等地都有引进养殖. 山瑞鳖(*Palea steindachneri*), 隶属龟鳖目, 曲颈龟亚目(Cryptodira), 鳖科(Trionychidae), 山瑞鳖属(*Palea*)^[1]. 分布范围较广. 形态与中华鳖相似, 主要区别是颈基部两侧及背甲前缘有粗大疣粒, 个体较中华鳖大. 头背皮肤光滑, 头前部瘦削, 吻突出, 形成吻突等特点, 背盘呈椭圆形, 背、腹甲骨板不发达, 表面覆以柔软的革质皮肤, 周边有较厚的裙边. 头部前端突出, 形成吻突, 前端有鼻孔, 眼小而瞳孔圆、颈长、肢扁平, 均具五指、趾, 内侧三趾具爪, 指、趾间蹼发达. 仅头、颈可缩入壳内. 由于山瑞鳖有较高食用价值和药用价值, 人为捕猎十分严重, 致使目前野生数量已很少. 山瑞鳖已被列为国家二级保护动物. 但是山瑞鳖的养殖技术已经成熟, 现在很多地方已经规模饲养.

迄今, 关于两爪鳖的系统学位置存在较多的争议. 形态学分析认为, 两爪鳖科(Carettochelyidae)和鳖科(Trionychidae)构成姐妹群与其它所有曲颈龟类聚在一起, 共同形成曲颈龟亚目^[5]. 然而, 两爪鳖10片外缘缘板骨骼发育良好, 结构完整, 并没有像鳖那样的裙边; 鳖类中大部分

物种的头颈均能缩入壳内, 而两爪鳖的头部并不能缩入壳内. 近年来, 利用分子生物学的研究方法对龟鳖类系统学的研究日益受到关注, 采用不同的分子数据和分析方法对两爪鳖所进行的分析得到了不同的结果. Fujita等采用RNA指纹蛋白35(R35)数据分析, 支持两爪鳖科和鳖科构成姐妹群与其它所有曲颈龟类聚在一起, 共同形成曲颈龟亚目的观点^[6]. Krenz等对核重组激活基因(RAG-1)进行了测序, 并联合2个线粒体基因进行了系统分析, 最大简约法的分析结果将龟鳖目分为3支: 猪鼻鳖(两爪鳖科)、鳖(鳖科)和一支由其它所有现生龟类组成的进化支; 而最大似然法和贝叶斯法分析, 则认为两爪鳖科和鳖科在传统的位置上构成姐妹群与其它所有的曲颈龟类聚在一起, 共同形成曲颈龟亚目^[7]. 山瑞鳖与鳖科中的中华鳖、马来鳖等亲缘关系的远近也一直有争议. Meylan等形态学数据分析认为中华鳖与马来鳖的亲缘关系最近, 其次是山瑞鳖、非洲鳖, 它们同属于鳖亚科(Trionychinae)^[8]. Engstrom等基于线粒体基因和核基因的部分序列数据分析, 结果显示马来鳖与山瑞鳖聚为一支, 再与中华鳖形成姐妹群^[9].

线粒体基因组具有母性遗传、结构简单、缺乏重组、进化速率相对较快等特点^[10], 已广泛应用于种群遗传学、系统发生学、分子进化研究^[11]. *Cyt b*基因是线粒体基因组的基因之一, 在进化上较为保守, 通常被用于分子进化和系统发生的研究. 本研究通过测定两爪鳖和山瑞鳖线粒体DNA(mtDNA) *Cyt b*基因的全长, 并结合龟鳖目中其它15个物种的mtDNA *Cyt b*基因同源序列进行序列分析和系统进化树的构建, 以期重建两爪鳖和山瑞鳖的系统进化关系, 为这两物种的资源保护和利用提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料和基因组DNA的提取

两爪鳖(2♀, 1♂)和山瑞鳖(1♀, 1♂)均购于广西省龙舟市. 采用蛋白酶K和苯酚/氯仿法提取基因组DNA, 置于4℃保存备用.

1.2 PCR扩增

用于扩增两爪鳖和山瑞鳖mtDNA *Cyt b*基因

的引物为 L1: 5' AACCACCGTTGTATTCAACTA 3'和 H1: 5' CAATCTTTGGTTTACAAGACC 3'.

PCR 反应体系为 25 μ L, 加入顺序如下: 17.8 μ L ddH₂O; 2.5 μ L Buffer; 2.0 μ L Mg²⁺; 1.5 μ L dNTP; 0.5 μ L 模板; 引物 0.2 μ L; 0.35 μ L Taq 聚合酶; 10 μ L 矿物油. PCR 扩增循环参数为: 97 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 51.7~54.0 $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像扫描仪纪录结果后于 -20 $^{\circ}$ C 保存.

PCR 扩增产物经纯化试剂盒 (V-gene DNA 凝胶回收试剂盒) 纯化后, 委托上海生工生物技术有限公司进行双向测序.

1.3 DNA 序列数据处理及分析

所得序列采用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 程序进行拼接. 用 BioEdit 进行序列合并, 用

Clustalx1.8 软件作多序列比对后, 用 DNASP4 和 MEGA4.1^[12]软件基于 Kimura-2-Parameter (K2P) 计算不同序列间的可变位点、简约信息位点、转换/颠换比值、遗传距离及各碱基含量包括计算不同序列间的变异位点、单倍型、转换/颠换数等数据.

1.4 系统进化树的构建

同 GenBank 中龟鳖类其它 15 个物种的同源序列进行比对分析(表 1), 根据 Modeltest 3.7 检验序列数据并估算出最优模型. 以凯门鳄(*Caiman crocodilus* GenBank 序列号: NC_002744) 和扬子鳄(*Alligator sinensis* GenBank 序列号: AF511507) 为外群, 用 PAUP*4.0b10 软件中的邻接法 (Neighbor joining, NJ), 最大简约法 (maximum parsimony method, MP) 和最大似然法 (maximum likelihood method, ML) 重建系统关系.

表 1 17 种龟鳖类动物 mtDNA *Cyt b* 基因 4 种碱基组成
Table 1 The base composition of mitochondrial DNA *Cyt b* gene of 17 species of turtles

Organism	Latin name	GenBank Accession	A	G	C	T	Total
Pig-nose turtle	<i>Carettochelys insculpta</i>	FJ862792	33.7	10.3	31.1	24.9	1 140
Wattle-necked softshell turtle	<i>Palea steindachneri</i>	FJ541030	32.7	10.4	29.6	27.3	1 140
Malayan softshell turtle	<i>Dogania subplana</i>	DQ080040	33.5	10.6	31.0	24.9	1 140
Chinese softshell turtle	<i>Pelodiscus sinensis</i>	AY687385	33.3	10.7	28.4	27.5	1 146
Bibron's giant softshell turtle	<i>Trionyx triunguis</i>	AB477345	32.5	12.2	32.0	23.3	1 144
Indian flapshell turtle	<i>Lissemys punctata</i>	NC_012414	33.2	11.1	28.6	27.2	1 140
Keeled box turtle	<i>Pyxidea mouhotii</i>	DQ659152	30.1	12.0	31.1	26.8	1 144
Egyptian tortoise	<i>Testudo kleinmanni</i>	DQ080048	31.3	11.7	30.9	26.1	1 144
Marginated tortoise	<i>Testudo marginata</i>	DQ080047	31.7	11.3	30.3	26.7	1 144
Spur-thighed tortoise	<i>Testudo graeca</i>	DQ080049	31.4	11.5	30.6	26.6	1 144
Black bridged leaf turtle	<i>Cyclemys atripons</i>	EF067858	30.2	12.2	29.8	27.8	1 144
Leopard tortoise	<i>Gechelone pardalis</i>	DQ080041	32.8	10.4	31.0	25.8	1 144
Asian yellow pond turtle	<i>Mauremys mutica</i>	DQ453753	30.3	11.6	32.0	26.2	1 147
Chinese three-keeled pound turtle	<i>Chinemys reevesii</i>	AY676201	30.0	12.1	31.4	26.5	1 143
Golden-headed box Turtle	<i>Cuora aurorcapitata</i>	AY874540	29.5	11.9	32.1	26.6	1 137
Alligator snapping Turtle	<i>Macrolemys temminckii</i>	EF071948	31.9	11.8	29.8	26.6	1 182
African side-necked turtle	<i>Pelomedusa subrufa</i>	AF039066	30.4	11.4	31.8	26.4	1 143

注: A=腺嘌呤; T=胸腺嘧啶; G=鸟嘌呤; C=胞嘧啶. 除序列总计外, 均用百分比表示.

Notes: A=adenine; T=thymine; G=guanine; C=cytosine. All values in Percentage (%) except total.

2 结 果

2.1 核苷酸组成及序列变异

经 PCR 扩增, 得到两爪鳖和山瑞鳖的线粒体 *Cyt b* 基因全序列, 序列长度均为 1 140 bp. 与 GenBank 上其它 15 种龟鳖类同源序列及扬子鳄和凯门鳄的同源序列进行分析比对, 对位排列共有 1 189 个位点, 出现可变位点 682 个, 保守位点 473 个, 简约信息位点 469 个, 序列变异度

为 57.3%, 碱基替代主要发生在密码子第 3 位点上, 转换/颠换比为 1.1.

两爪鳖 *Cyt b* 基因碱基组成为 T: 24.9%, C: 31.1%, A: 33.7%, G: 10.3%; 山瑞鳖 *Cyt b* 基因碱基组成为 T: 27.3%, C: 29.6%, A: 32.7%, G: 10.4%. 分析比较它们与其它龟鳖类动物 *Cyt b* 基因序列 4 种碱基的组成情况, 结果表明两爪鳖和山瑞鳖 *Cyt b* 基因序列的碱基组成与所选取物种都很相近(表 1). *Cyt b* 基因全序列 A 含量最高,

A+T 含量明显高于 C+G 含量, 与其他文献报道的龟鳖类线粒体基因组成的结果一致. 密码子第 1 位点上各碱基频率相差不大, 密码子第 2 位点上 T 的含量明显高于其他位点. 氨基酸组成上, 两爪鳖和山瑞鳖 *Cyt b* 基因均编码氨基酸 379 个.

2.2 碱基替换和遗传距离分析

不同物种序列间的碱基替换情况和基于 Kimura-2-parameter 模型校正后的遗传距离见表 2. 物种间序列位点变异表现为转换多于颠换, R (转换/颠换数) 平均值为 1.90. 在脊椎动物中转换率往往高于颠换率, Simon 等^[13]认为, 在任何给定的分类阶元中, 亲缘关系接近的物种间总是有更高的转换差异比率, 这是分歧较近的物种间编码区 DNA 序列较多发生同义突变的结果. 对

于分歧时间较远的物种, 由于物种间转换已达到饱和, 碱基替换的形式由以转换为主变为以颠换为主. 碱基替换方面, C 和 T 之间的替换率最高, *Cyt b* 基因密码子第 3 位点的替换频率明显高于前 2 个位点, 这是因为密码子第 3 位点发生的碱基替换多为同义替换, 受到的自然选择压力很小, 突变后易固定. 转换的发生主要以 C-T 为主.

采用 Mega 4.1 计算各龟鳖(包括外群)间的 K2P 距离. 内群 17 个物种中, 最大和最小遗传距离分别为 0.34 和 0.08, 平均距离为 0.27. 其中同科种间的遗传距离最小, 如埃及陆龟 (*Testudo kleinmanni*) 与 蹠缘陆龟 (*Testudo marginata*) 遗传距离为 0.08; 外群和内群之间遗传距离从 0.38 至 0.49.

表 2 17 种龟类和 2 种鳄的 *Cyt b* 基因碱基替代(转换/颠换, 上三角)和模型校正后的遗传距离(转换+颠换, Kumura-2-parameter 模型, 下三角)

Table 2 Numbers of transitions/transversions (upper triangle) and genetic distance (transitions+transversions, Kumura-2-parameter, lower triangle) of 17 turtles and 2 crocodiles *Cyt b* gene

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		5.92	4.84	5.30	2.94	3.12	2.79	3.15	1.86	0.99	1.33	1.27	1.15	1.21	0.89	0.89	0.87	0.99
2	0.07	4.48	3.93	4.39	2.60	2.76	2.71	3.05	1.64	0.95	1.11	1.16	0.98	1.01	0.87	0.85	0.76	0.86
3	0.11		3.93	6.50	2.91	3.12	2.81	3.66	1.71	0.92	1.16	1.18	1.02	0.99	1.00	0.89	0.82	1.00
4	0.11	0.08		5.01	2.60	2.84	2.49	2.99	1.89	1.13	1.27	1.37	1.15	1.12	1.00	0.98	0.75	1.90
5	0.15	0.15	0.15		3.26	3.07	2.98	3.38	2.08	1.18	1.36	1.17	1.13	1.01	1.01	1.04	0.85	0.95
6	0.18	0.18	0.18	0.2		40.0	5.98	4.59	2.01	1.08	1.11	1.24	0.94	1.19	0.85	0.86	0.72	0.88
7	0.19	0.19	0.19	0.19	0.07		6.06	4.73	2.13	1.18	1.10	1.24	1.03	1.16	0.91	0.90	0.79	0.93
8	0.2	0.2	0.19	0.21	0.1	0.1		4.84	1.81	1.07	1.11	1.30	1.14	1.16	0.95	1.01	0.86	0.90
9	0.18	0.19	0.17	0.17	0.14	0.14	0.15		1.96	1.00	1.31	1.37	1.02	1.10	0.80	1.03	0.80	0.92
10	0.2	0.19	0.2	0.21	0.2	0.22	0.2	0.2		0.95	1.30	1.19	0.96	1.18	1.03	1.03	0.81	0.96
11	0.24	0.24	0.25	0.25	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23		0.84	0.99	0.83	0.92	0.97	0.88	0.73	0.79
12	0.25	0.24	0.25	0.26	0.24	0.25	0.23	0.26	0.25	0.25		3.19	3.13	1.92	1.19	1.00	0.82	0.91
13	0.26	0.26	0.28	0.25	0.28	0.28	0.27	0.28	0.25	0.25	0.15		2.70	1.78	1.11	0.91	0.77	1.02
14	0.26	0.26	0.27	0.26	0.26	0.28	0.27	0.26	0.25	0.25	0.16	0.15		1.77	0.90	0.88	0.82	0.90
15	0.26	0.25	0.26	0.25	0.26	0.26	0.25	0.26	0.26	0.24	0.18	0.18	0.18		1.34	0.85	0.73	0.82
16	0.27	0.29	0.27	0.29	0.27	0.28	0.29	0.27	0.27	0.25	0.24	0.24	0.21	0.23		0.91	0.77	0.89
17	0.32	0.32	0.33	0.34	0.32	0.33	0.34	0.35	0.34	0.32	0.34	0.34	0.32	0.33	0.33		0.84	0.98
18	0.43	0.41	0.4	0.41	0.38	0.4	0.39	0.4	0.4	0.38	0.4	0.38	0.39	0.4	0.41	0.44		2.05
19	0.46	0.45	0.43	0.44	0.43	0.44	0.43	0.44	0.44	0.41	0.44	0.44	0.44	0.43	0.46	0.49	0.24	

注: 1: 锯缘摄龟; 2: 金头闭壳龟; 3: 黄喉拟水龟; 4: 乌龟; 5: 白腹摄龟; 6: 埃及陆龟; 7: 蹠缘陆龟; 8: 欧洲陆龟; 9: 豹龟; 10: 大鳄龟; 11: 两爪鳖; 12: 山瑞鳖; 13: 中华鳖; 14: 马来鳖; 15: 非洲鳖; 16: 印度箱鳖; 17: 非洲侧颈龟; 18: 凯门鳄; 19: 扬子鳄.
Notes: 1: *Pyxidea mouhotii*; 2: *Cuora aurocapitata*; 3: *Mauremys mutica*; 4: *Chinemys reevesii*; 5: *Cyclemys atripons*; 6: *Testudo kleinmanni*; 7: *Testudo marginata*; 8: *Testudo graeca*; 9: *Gechelone pardalis*; 10: *Macrochelys temminckii*; 11: *Carettochelys sculpta*; 12: *Palea steindachneri*; 13: *Pelodiscus sinensis*; 14: *Dogania subplana*; 15: *Trionyx triunguis*; 16: *Lissemys punctata*; 17: *Pelomedusa subrufa*; 18: *Caiman crocodilus*; 19: *Alligator sinensis*.

2.3 分子系统树的构建

采用 PAUP* 4.0b 10 软件, 邻接(NJ)法、最大简约(MP)法、最大似然(ML)法构建系统进化树的拓扑结构完全一致(图 1、2、3). 结果将龟

鳖目分为 3 支: 侧颈龟科(非洲侧颈龟), 两爪鳖科(两爪鳖)和一支其它 15 个物种聚成; 在鳖科, 山瑞鳖与中华鳖亲缘关系最近, 3 种树上两者都首先聚在一起. 然后, 依次为马来鳖、非洲鳖、

印度箱鳖. 3 种树所反映的信息一致, 仅在支持率上大小是略有差异(图 1、2、3).

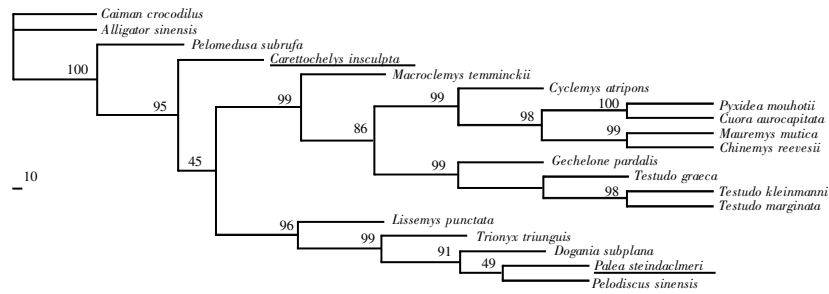


图 1 基于线粒体 *Cyt b* 序列构建的 NJ 树

各分支上数字为对应节点的 Bootstrap 支持率(1 000 次重复).

Fig.1 The NJ tree based on mitochondrial *Cyt b* gene sequence data

Numbers on each node are bootstrap values of 1 000 replicates.

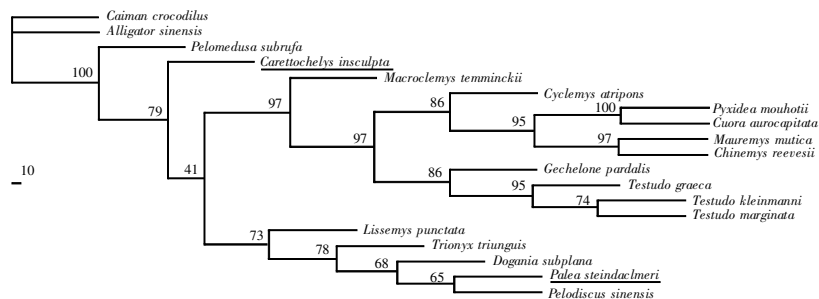


图 2 基于线粒体 *Cyt b* 序列构建的 MP 树

各分支上数字为对应节点的 Bootstrap 支持率(1 000 次重复).

Fig.2 The MP tree based on mitochondrial *Cyt b* gene sequence data

Numbers on each node are bootstrap values of 1 000 replicates.

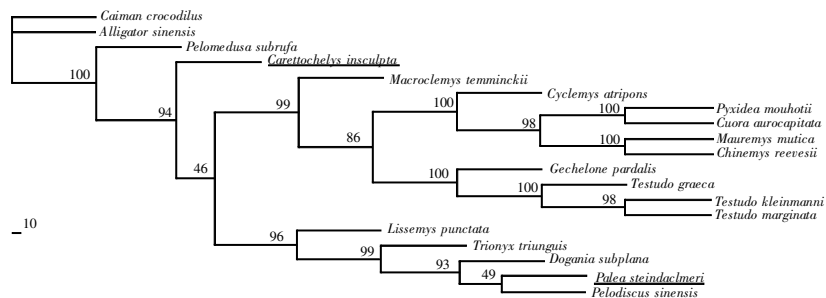


图 3 基于线粒体 *Cyt b* 序列构建的 ML 树

各分支上数字为对应节点的 Bootstrap 支持率(100 次重复).

Fig.3 The ML tree based on mitochondrial *Cyt b* gene sequence data

Numbers on each node are bootstrap values of 100 replicates.

3 讨论

两爪鳖作为两爪鳖科现存的唯一物种, 其分类地位一直具有很大的争议性. Shaffer 等^[2]利用形态学数据分析认为两爪鳖科(Carettochelyidae)和鳖科(Trionychidae)构成姐妹群与其它所有曲颈龟类聚在一起, 共同形成曲颈龟亚目. Fujita^[3]采用 RNA 指纹蛋白 35(R35)进行数据分析, 结果与 Shaffer 的观点一致, 也支持两爪鳖科和鳖

科构成姐妹群. 然而, 在形态上, 两爪鳖与其他鳖类却具有明显的差异: 两爪鳖的背甲并不像其他鳖类那样, 覆盖柔软的革质皮肤, 而是类似龟类, 具有坚硬的外缘骨骼; 腹甲骨化完全, 具有 9 枚相间的骨板, 这也类似龟类的腹甲构造, 而其余鳖类的腹甲中骨板并不完全连接. 这些特征提示, 两爪鳖科(Carettochelyidae)和鳖科(Trionychidae)可能不是简单的姐妹群关系. 在我们用 3 种方法(NJ、MP、ML)构建的系统树中, 均具有

一致的拓扑结构,认为龟鳖目最早分开成为3个基部分支:侧颈龟科(非洲侧颈龟),两爪鳖科(两爪鳖)和一支由其它15种现生龟类组成的进化支,并在3种分析中都得到了很好的支持率(见图1、2、3)。这一结果与Krenz等利用龟鳖目的24个物种的核重组激活基因(RAG-1)的90%以上的序列以及2个线粒体基因进行的最大简约法分析结果是一致的^[4]。基于上述的分析,我们认为两爪鳖所代表的两爪鳖科与鳖科之间并不是姐妹群关系,它在分类上应该处于侧颈龟亚目与包括鳖科在内的曲颈龟亚目之间,因此建议将它的分类地位上升到亚目水平。

在鳖科,Meylan等根据形态学数据分析认为中华鳖与马来鳖的亲缘关系最近,其次是山瑞鳖、非洲鳖,它们同属于鳖亚科(Trionychinae),印度箱鳖位于盘鳖亚科(Cyclanorbinae)内^[5]。Engstrom等基于线粒体基因和核基因的部分序列数据分析,结果显示马来鳖与山瑞鳖聚为一支,再与中华鳖形成姐妹群^[6]。我们数据分析显示:山瑞鳖先与中华鳖构成姐妹群,再依次与马来鳖、非洲鳖、印度箱鳖聚集。在这5种鳖中山瑞鳖与中华鳖关系最近,这也与陈合格等利用12S rRNA和16S rRNA分析所得结果一致^[14]。

在脊椎动物的系统进化研究中,Cyt b基因已经得到广泛应用(牦牛 *Plephagus mutus*;梅花鹿 *Cervus nippon*;双峰驼 *Camelus bactrianus*,江豚 *Neophocaena phocaenoides* 等)^[15-18]。本研究较好的阐明了两爪鳖和山瑞鳖的系统进化地位,但是由于Cyt b基因序列较短,能提供的信息有限。今后还需要多种分子标记结合分析,以及更多的形态学、解剖学等多方面研究的证实,才能得到更准确的结论。

参考文献(References):

- [1] 周婷,赵尔宓. 龟类分类图鉴[M]. 北京:中国农业出版社(ZHOU Ting, ZHAO Er-mi. Turtle Classification Field Guide [M]. Beijing: China Agriculture Press), 2004.
- [2] LONGMAN H A. Herpetological notes. Part I. Systematic. Including the description of one new species[J]. Memoirs of the Queensland Museum, 1913, 2(2): 39-45.
- [3] WAITE E R. The osteology of the New Guinea turtle (*Carettochelys insculpta*, Ramsay) [J]. Records of the Australian Museum, 1905, 6(2): 110-118.
- [4] PRITCHARD P C H. Encyclopedia of Turtles[M]. New Jersey: Tropical Fish Hobbyist Publications, 1979.
- [5] SHAFFER H B, MEYLAN P, MCKNIGHT M L. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches[J]. Systems Biology, 1997, 46(2): 235-268.
- [6] FUJITA M K, ENGSTROM T N, STARKEY D E, et al. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 31(3): 1031-1040.
- [7] KRENZ J G, NAYLOR G J P, SHAFFER H B, et al. Molecular phylogenetics and evolution of turtles[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 37(1): 178-191.
- [8] MEYLAN P A. The phylogenetic relationships of soft-shelled turtles (family Trionychidae) [J]. Bulletin of the American Museum of Natural History, 1987, 186(43): 1-101.
- [9] ENGSTROM T N, SHAFFER H B, MCORD W P. Multiple data sets, high homoplasy, and the phylogeny of softshell turtles (testudines: trionychidae) [J]. Society of Systematic Biologists, 2004, 53(5): 693-710.
- [10] BOORE J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [11] NAXDI F, SPINSANTI G, BOORE J L, et al. Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic[J]. Science, 2003, 299(16): 1887-1889.
- [12] KIMRA M. A simple method for estimating evolutionary rate of basesubstitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(7): 111-120.
- [13] SIMON C, FRATI F, BECHENBACH A, et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651-701.
- [14] 陈合格,刘文彬,张轩杰. 中华鳖与砂鳖线粒体DNA 12S rRNA 基因序列的比较分析和分子鉴定标记[J]. 水产学报(CHEN He-ge, LIU Wen-bin, ZHANG Xuan-jie. Comparative analysis of mitochondrial DNA 12S rRNA region between Pelodiscus sinensis and Pelodiscus axenaria and their molecular marker for identification[J]. Journal of Fisheries of China), 2005, 29(3): 318-322.
- [15] 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[J]. 畜牧兽医学报(LI Qi-fa, LI Yin-xia, ZHAO Xing-bo, et al. Sequencing d-loop region of mitochondrial DNA in yak and study on its taxonomic status in boviniae[J]. Journal of Veterinary Research), 2008, 39(1): 1-61.
- [16] 李明,王小明,盛和林,等. 4种鹿属动物的线粒体DNA 差异和系统进化关系研究[J]. 动物学报(LI Ming, WANG Xiao-ming, SHENG He-lin, et al. Mitochondrial DNA divergence and phylogeny of four species of the genus cervus[J]. Animal Science), 1999, 45(1): 99-1051.
- [17] 张勇,张会斌,刘志虎. 基于线粒体细胞色素b基因序列的阿尔金山野生双峰驼分子系统发育研究[J]. 浙江大学学报(ZHANG Yong, ZHANG Hui-bing, LIU Zhi-hu. Molecular phylogeny of Altun Mountain wild Camelus bactrianus revealed by partial cytochrome b gene sequences of mitochondrial DNA[J]. Zhejiang University Technology), 2008, 35(1): 87-911.
- [18] 孙希福,高天翔,窦存银,等. 江豚线粒体Cyt b和D-loop 片段序列分析及其分子系统学研究[J]. 南方水产(SUN Xi-fu, GAO Tian-xiang, DOU Cun-yin, et al. Sequence analysis of m itochondral Cyt b gene, D-loop and molecular phylogeny of Neophocaena phocaenoides[J]. South China Fisheries Science), 2009, 5(5): 24-31.