

大头蛙和脆皮大头蛙线粒体3个基因的测定及两栖类亲缘关系研究

张际峰^{1,2} 聂刘旺¹ 王洋¹ 郝培应²

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000; 2. 淮南师范学院化学生物系, 淮南 232001)

摘要: 现存的两栖类系统发生关系一直存在争议, 特别是3个目间的亲缘关系。本文设计了5对引物, 扩增和测定了大头蛙和脆皮大头蛙线粒体12S和16S rRNA基因和Cytb基因的全序列。在对所测序列进行分析的同时, 基于3个基因全序列的相加数据, 运用MEGA 3.1和PHYLP 3.64软件中的NJ法、MP法和ML法, 对两栖类17个物种, 以鱼类非洲肺鱼为外群, 重建出3个树形完全一致的分子系统树。研究结果显示: 现存两栖类中无尾目和有尾目为姐妹群关系, 并推断有尾目内小鲵科和隐鳃鲵科亲缘关系较近。此外, 在研究两栖类系统发生关系方面, 作者分析前人研究中产生两种不同观点的可能原因, 同时总结了在此类研究中产生偏差的几种影响因素。

关键词: 两栖类; 大头蛙; 12S和16S rRNA基因; Cytb基因; 系统关系

中图分类号: Q781; Q959.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)06-0822-07

现存两栖类可分为体形迥异的3个目, 分别为蚓螈目(Gymnophiona)、有尾目(Caudata)和无尾目(Anura), 共包括40个科^[1-3]。两栖类的体型特征及其在生物进化过程中的重要地位, 吸引了国内外许多学者从形态学、分子生物学等方面来研究两栖类的起源、3个目及各科间的系统发生关系^[3-6]。

与一些学者所持的多起源观点^[7-9]相反, 被更广泛接受的观点认为两栖类为单系起源^[10-13]。同时现存两栖类3个目的系统发生关系仍然存在争议^[6, 14], 主要有两种观点: 一种认为有尾目和无尾目的亲缘关系较近^[11, 12], 另一种认为有尾目和蚓螈目为姐妹群关系^[5, 15]。此外, 在有尾目内小鲵科、蝾螈科和隐鳃鲵科三者的系统关系也没有统一意见^[13]。

大头蛙属动物 *Limnonectes* (Ranidae) 主要分布于中国和印尼、菲律宾等东南亚国家, 目前已发现50多种, 我国仅分布有大头蛙(*Limnonectes kuhlii*)、福建大头蛙(*Limnonectes fujianensis*)和脆皮大头蛙(*Limnonectes fragilis*) 3种^[16, 17]。本文对其中亲缘关系较远的大头蛙和脆皮大头蛙^[17]的线粒体2个rRNA基因及Cytb三个基因的全序列进行了测定, 同时选取已测定的两栖类15个代表物种, 采用3种方法构建分子系统树, 试图重现它们的系统发生关系, 为两栖动物亲缘关系的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大头蛙采自云南省思茅地区, 编号为20[#], 雌性; 脆皮大头蛙采自海南吊罗山, 编号为5[#], 雄性。

1.2 总DNA的提取和检测 选用新鲜的蛙腿部肌肉, 采用SDS/蛋白酶裂解, 酚氯仿提取总DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 引物设计和PCR扩增 参照泽陆蛙(*Fijer-varya limnocharis*)^[18]和黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)^[19]的线粒体DNA全序列(GenBank登录号分别为NC_005055和AB043889, 以下同), 运用Oligo 6.0软件设计可覆盖大头蛙和脆皮大头蛙线粒体12S和16S rRNA及Cytb三个基因全序列的引物5对, 并使相邻产物间有120 bp左右重叠区。考虑到当前的测序能力, 对PCR产物长度超过1000bp的序列, 再设计半巢式PCR引物B_{半巢}和E_{半巢}(表1), 以保证序列的特异性和准确性。

PCR扩增反应体积为25 μL, 模板DNA 1 μL(含10—100 ng); PCR循环退火温度: 50—58℃。凝胶电泳检测结果。

1.4 纯化、测序和序列拼接 PCR产物经纯化试剂盒(V—gene DNA 凝胶回收试剂盒)纯化后, 委托

收稿日期: 2006-05-08; 修订日期: 2007-02-26

基金项目: 淮南师范学院青年教师科研启动基金(2005); 淮南师范学院青年教师自然科学基金(2006LKQ03); 安徽省教育厅青年教师资助项目(2007jql163)和国家自然科学基金(No. 30370211)资助

通讯作者: 张际峰(1979—), 男, 汉族, 安徽来安人; 淮南师范学院讲师, 硕士; 主要从事动物分类研究。E-mail: jifengzhang2007@sina.com

上海博亚生物公司进行双向测序(ABI-3730 测序仪)。序列经测序峰分析软件 Chromas 1.62 仔细校对后人工拼接。

表 1 扩增大头蛙和脆皮大头蛙 2 个 rRNA 基因、Cytb 基因全序列和部分 tRNA 基因所用引物情况

Tab. 1 Amplification and sequencing primers utilized for 2 rRNA genes, Cytb gene and segmental tRNA genes of <i>L. kuhlii</i> and <i>L. fragilis</i>		
引物名称和序列(5'→3')	目的基因	长度(bp)
Primers and sequences	Genes	Length
A1: GTCTGCTTTTATAGCTTAAAC	tRNA ^{Phe}	912(Lk)
A2*: GAAGAGGCTGACGGCGGTGTGT	& 12S rRNA ^à	908(Lf)
B1: TTAATAAGGCCTGGACGTGT	2 个 rRNA ^à	1154(Lk)
B2: TGATTATGCTACCTTGCACG	& tRNA ^{Val}	1153(Lf)
C1*: CGCCTGTTTACCAAAACAT	16S rRNA ^à	598(Lk)
C2*: CCGGTCTGAACCTCAGATCACGT	16S rRNA ^à	592(Lf)
D1: CTGGGGATAACAGCGCAATC	16S rRNA ^à	344(Lk)
D2: GAGGGCTTAGGTCTCTTGCAT	& tRNA ^{Leu(UUR)} ^à	341(Lf)
E1: ACTACAGAAACATGGCACC	Cytb 全序列	1167(Lk)
E2: CTGCGTAAGAAATTAATTTGAG		1164(Lf)
B _{半巢} : GGAGCCAACCGTCTCTGTGG	与 B2 扩增	737(Lk)
	B1, B2 的产物	736(Lf)
E _{半巢} : ATCGCTGGCGCCAGCATAATC	与 E2 扩增	603(Lk)
	E1, E2 的产物	600(Lf)

* 表示该引物为通用引物: H1478^[20], - 表示该引物引自 Simon 等^[21]; 注有上标“à”的基因表示为部分基因, Lk 代表大头蛙; Lf 代表脆皮大头蛙

* An asterisk denotes the primer roots in the general primer“H1478”, and the origins of the primer labeled“-” is Simon *et al.*; The gene labeled“à” represents segmental gene; Lk: *L. kuhlii*, Lf: *L. fragilis*

1.5 序列定位、分析与数据统计 通过与黑斑蛙、泽陆蛙的 mtDNA 比较及分析软件 Sequin 3.0 和 tRNA Scan SE 1.21 定位两种蛙的 2 个 rRNA、Cytb 和部分 tRNA 基因。用 MEGA 3.1 软件统计序列总长、碱基含量等信息。

选取已测定的两栖类无尾目内黑眶蟾蜍 *Bifomelanostictus* (NC.005794)、中国雨蛙 *Hyla chinensis* (AY458593)、斑腿树蛙 *Polypedates megacephalus* (AY458598)、黑斑蛙 *R. nigromaculate* 和泽陆蛙 *F. limnocharis*, 有尾目卢氏小默螈 *Mertensiella luschni* (AF154053)、墨西哥蝾螈 *Ambystoma mexicanum* (AY659991)、中国大鲵 *Andrias davidianus* (AJ492192)、日本大鲵 *Andrias japonicus* (AB208679) 和新疆北鲵 *Ranodon sibiricus* (AJ419960)、蚓螈目沟盲游蚓 *Typhlonectes natans* (AF154051)、版纳鱼螈 *Ichthyophis bannanicus* (AY458594) 和印度蚓螈 *Uraeotyphlus cf. oxyurus* (NC.006305)、爬行类密河鳄 *Alliga-*

tor mississippiensis (Y13113) 和石龙子 *Eumeces egregius* (AB016606) 共 15 个物种的相应序列, 结合本文的实验结果, 以非洲肺鱼 *Protopterus dolloi* (NC.001708) 为外群, 共 18 条序列, 经软件分析, 计算碱基含量和各类单元间序列差异百分比, 同时采用 NJ、MP 和 ML 法分别推演系统发生关系。在利用 MEGA 3.1 软件时, NJ 法中选用 Kimura 2-parameter 模型对核苷酸序列进行分析, MP 法搜寻选项 CNI 中 level= 2, 在处理 gap 区时, 均删除成对缺失数据(pairwise deletion)。ML 法运用 PHYLIP 3.64 分析软件处理(dnaml 程序中选择转换/颠换率为 2:1)。系统树中分支的置信水平均用自举检验(Bootstrap test), 重复次数均为 1000 次, 其他未提及的程序设置为系统默认值。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物

4 对引物 A1, A2; B1, B2; C1, C2 和 D1, D2 分别扩增 4 段 PCR 产物, 经拼接得大头蛙和脆皮大头蛙 mtDNA 序列片段长度分别为 2698 bp 和 2687 bp, 该片段包括 12S 和 16S rRNA 基因、tRNA^{Phe} 和 tRNA^{Val} 4 个基因全序列及 tRNA^{Leu(UUR)} 部分基因。E1, E2 引物扩增出 2 种蛙 mtDNA 序列长度分别为 1167 bp 和 1164 bp, 其中包括线粒体 Cytb 基因全序列。大头蛙和脆皮大头蛙这些的基因序列已提交 GenBank, 检索号分别为 AY899241 和 AY899242。

2.2 大头蛙和脆皮大头蛙的基因序列分析

2 个 rRNA 基因全序列分析 大头蛙 mtDNA 序列中, 12S rRNA 基因序列全长 928 bp, 其中 A+T 含量为 54.5%, 16S rRNA 基因序列全长 1586 bp, 其 A+T 含量为 59.5%, 2 个 rRNA 基因全序列相加数据的 GC 偏斜(GC-skew)为 0.14; 而脆皮大头蛙 mtDNA 序列中, 12S 和 16S rRNA 基因序列全长分别 924 bp 和 1579 bp, A+T 含量分别为 53.3% 和 58.5%, 均低于大头蛙, 2 个 rRNA 基因全序列 GC 偏斜为 -0.16。大头蛙和脆皮大头蛙间各基因转换(ni)/颠换(inv)值及序列差异情况(表 2)。

Cytb 基因全序列分析 大头蛙的 Cytb 基因序列全长 1143 bp, 它们编码了 381 个氨基酸, A+T 含量为 57%; 脆皮大头蛙的 Cytb 基因序列全长 1140 bp, 编码了 380 个氨基酸, A+T 含量为 56.6%。它们的起始密码子均为 ATG, 终止密码子均为 TAA。两者的核苷酸序列差异集中体现在第三位密码子上, 而第二位密码子间的差异最小, 两种蛙该基因的氨基酸序列差异值为 9.40%, 其他具体信息(表 2)。

表2 本研究中蛙科4个代表物种线粒体3个基因的差异性
Tab. 2 Diversity of mitochondrial protein coding gene(*Cytb*) and two rRNA genes among 4 frogs

Species	12S rRNA		16S rRNA		Cytb				
	nt(%)	ni/ nv	nt(%)	ni/ nv	nt(%)	1st ni/ nv	2nd ni/ nv	3rd ni/ nv	aa(%)
Lk/ Lf	14. 09	78/ 39	16. 96	141/ 96	23. 01	33/ 9	6/ 5	103/ 66	9. 40
Lk/ Rn	23. 35	112/ 70	24. 94	169/ 163	31. 47	28/ 34	12/ 10	113/ 93	16. 30
Lk/ Fl	24. 48	109/ 82	23. 03	150/ 161	34. 33	45/ 22	11/ 14	110/ 107	16. 97
Lf/ Rn	24. 26	127/ 59	25. 75	178/ 162	29. 46	27/ 31	7/ 9	112/ 89	15. 37
Lf/ Fl	24. 39	116/ 73	23. 56	162/ 154	35. 30	46/ 19	11/ 13	131/ 93	16. 03
Rn/ Fl	23. 54	112/ 72	26. 06	179/ 166	33. 26	35/ 25	8/ 14	125/ 94	16. 97

注: MEGA 软件处理序列间差异性选用模式: 核苷酸数据为 Kimura 2-parameter 模型; 氨基酸数据为 p-distance 模型。Lk 表示 *L. kuhlii*, Lf 为 *L. fragilis*, Rn 为 *R. nigromaculate* 和 Fl 为 *F. limnocharis*; nt% 一核苷酸序列差异性, aa% 一氨基酸序列差异性, ni/ nv 一核苷酸的转换与颠换比
Note: Models of pairwise distances by the MEGA software analyzed, Nucleotide: Kimura 2-parameter; Amino: p-distance. Lk: *L. kuhlii*, Lf: *L. fragilis*, Rn: *R. nigromaculate* and Fl: *F. limnocharis*; nt%: percent nucleotide sequence differences; aa%: percent amino acid sequence differences

在编码这些氨基酸的碱基中,这两种蛙的第二位密码子同样表现出对碱基 T 的偏好^[22]。大头蛙第二位密码子中 T 含量为 41. 5%, 脆皮大头蛙该密码子中 T 的含量为 40. 3%。在它们编码的氨基酸的利用上,亮氨酸(Leu)的利用频率最高(大头蛙为 15%, 脆皮大头蛙为 14. 47%), 胱氨酸(Cys)的利用率最低,均为 0. 79%。

tRNA 基因分析 本研究在扩增 2 个 rRNA 基因全序列时,同时获得了其上游的 tRNA^{Phe} 基因、2 个 rRNA 基因之间的 tRNA^{Val} 基因,及下游的 tRNA^{Leu(UUR)} 部分基因。大头蛙编码 tRNA^{Phe} 和 tRNA^{Val} 基因的 DNA 序列全长分别为 69 bp 和 68 bp, 和长度为 42 bp 的 tRNA^{Leu(UUR)} 部分基因;脆皮大头蛙编码 tRNA^{Phe} 和 tRNA^{Val} 基因的 DNA 序列全长均为 69 bp, 还有长度为 41 bp 的 tRNA^{Leu(UUR)} 部分基因。两种蛙的 tRNA^{Phe} 和 tRNA^{Val} 基因序列均能折叠成典型的三叶草型二级结构,且它们的序列同源性为 91. 3% 和 76. 8%。

2.3 18 个物种的相应序列分析及系统进化树构建

从 3 个基因的碱基含量看,无尾目和蚓螈目的 GC 含量高于有尾目;在 18 个物种所编码蛋白质的 *Cytb* 基因的 3 个密码子 AT 含量变化上,第二位密码子碱基 AT 含量变化比较平和,而第三位密码子 AT 含量变化较大,范围为 46. 4%—81. 1% (图 1)。而不同分类单元间的遗传距离变化范围情况可见图 2。

在收集到的 18 个物种中,将每个物种线粒体基因中的 2 个 rRNA 基因和 *Cytb* 基因序列相加、排列和比对后,共获得 3860 个位点,其中多变位点 2473 个,简约信息位点 2050 个。

基于 3 基因序列相加后的核苷酸序列合并数据,采用 NJ 法、MP 法和 ML 法进行建树分析,得到树形一致的系统树 3 个,我们将它组合成便于对照的一个图(图 3),在图下表中,统计出不同建树方法在树结点处产生的自引导值(Bootstrap confidence level, BCL)。

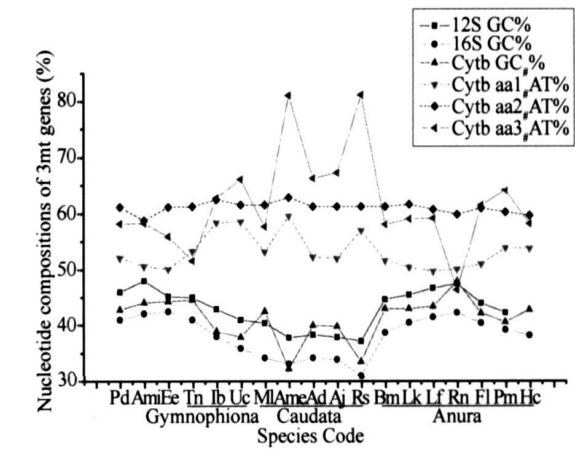


图1 本研究 18 个物种的 2 个 rRNA 基因和 *Cytb* 基因的 GC 含量变化及 *Cytb* 基因 3 个不同编码位置 AT 含量变化
Fig. 1 Nucleotide compositions for mitochondrial *Cytb* and two rRNA genes of 18 species in this study

图中缩写“12S GC%”表示 12S rRNA 基因的 GC 含量;“*Cytb* aal[#] AT%”表示 *Cytb* 基因第一位密码子位置的 AT 含量
Abbreviations: 12S GC%, GC base composition(%) of 12S rRNA gene; *Cytb* aal[#] AT%, AT base component(%) of at 1st codon position of *Cytb* gene
Pd: *P. dolloi*; Ami: *A. mississippiensis*; Ee: *E. egregius*; Tn: *T. natanus*; Ib: *I. Bannanicus*; Uc: *U. f. oxyurus*; Ml: *M. luschari*; Ame: *A. mexicanum*; Ad: *A. davidianus*; Aj: *A. japonicus*; Rs: *R. sibiricus*; Bm: *B. melanostidus*; Lk: *L. kuhlii*; Lf: *L. fragilis*; Rn: *R. nigromaculate*; Fl: *F. limnocharis*; Pm: *P. megaephalus*; Hc: *H. Chinensis*

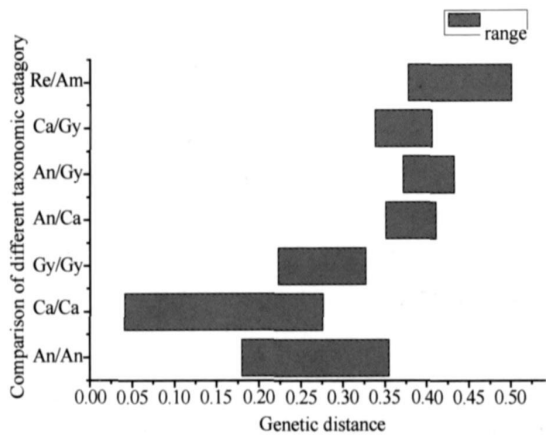


图2 两栖类和爬行类中不同分类阶元内部及之间的遗传距离变化范围

Fig. 2 Genetic distances among and within main lineages of amphibians and reptiles in the present study

利用 MEGA 3.1 软件对线粒体 2 个 rRNA 基因和 Cytb 基因合并数据分析时,核苷酸数据处理选用 Kimura 2-parameter 模型,对 gap 区处理选用成对删除的方法

Based on a data set combining Cytb + two rRNA genes, using MEGA 3.1 software analyzed (Kimura 2 parameter model; Gaps/Missing data: Pairwise deletion)

Re: Reptiles; Am: Amphibians; Ca: Order Caudata; Gy: Order

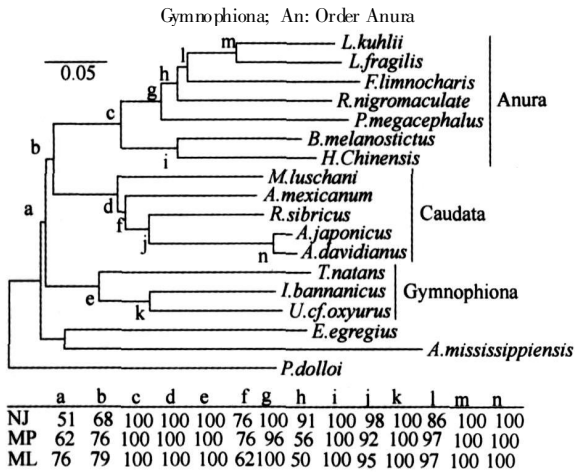


图3 基于线粒体 2 个 rRNA 基因和 Cytb 基因的全序列的合并数据,采用 NJ、MP 和 ML 法对本研究中两栖类 17 个物种及外群非洲肺鱼进行系统树重建的组合树图

Fig. 3 Phylogenetic relationships of frogs, salamanders, and caecilians inferred from a data set that combines two rRNA and Cytb genes, P.

dolloi was used as a outgroup

图中估计枝长的树形是由 NJ 法产生的,树结点上的字母分别代表树图下表中三种方法建树 1000 次自验后所得的自验值,树图中未显示爬行类一支的自验值,3 种方法均支持无尾目与有尾目为姐妹群关系

The data set was subjected to NJ, MP, and ML analyses. Branches with letters have bootstrap confidence level given below the tree for NJ, MP, and ML methods, support values of reptile branch is not shown, and every tree built based on 1000 replications. Branch lengths were estimated by using NJ inference. A frog-salamander clade is supported by NJ, MP, and ML analyses

系统树可分为 4 大支,两栖类 3 个目分别形成 3 支,其中无尾目和有尾目两大支先形成姐妹群关系(NJ、MP 和 ML 法对应的 BCL 分别为 68%、76% 和 79%),再与蚓螈目聚在一起(BCL 分别为 51%、62% 和 76%);爬行类密河鳄与石龙子两个物种形成第四支。

在无尾目一大支内,4 种蛙科动物和树蛙以很高的自检置信度聚为一支,再与雨蛙、蟾蜍一支形成姐妹群(BCL 均为 100%),这与传统分类观点一致^[1,2](蛙科内大头蛙与脆皮大头蛙聚为一小支,其属于大头蛙属;蛙科 4 种与树蛙同属于参差型亚目,而雨蛙和蟾蜍属于前凹型亚目,系统树已将其分成 2 支);有尾目内中国大鲵、日本大鲵与新疆北鲵先聚为一支(BCL 分别为 98%、92% 和 95%,表明隐鳃鲵科和小鲵科亲缘关系较近),再先后与墨西哥蝾螈、卢氏小蝾螈聚在一起;蚓螈目一支内,版纳鱼螈和印度蚓螈形成姐妹群,再与沼盲游螈聚在一起,它们的 BCL 均为 100%。

3 讨论

在现存两栖类三个目间的系统关系问题上,许多形态学证据暗示无尾目与有尾目有着更紧密的亲缘关系,从而排斥蚓螈目(包括形态学证据为理论基础的“蛙类假说”)^[10,23,25],而一些来自两栖类化石及其他形态学的证据却支持有尾目与蚓螈目为姐妹群的观点^[7,14,26]。

当有限的化石记录和形态学证据在解决 3 个目的系统关系问题上没有统一的结论时,学者们把目光转向了已经成熟的分子手段,期待运用分子系统学研究两栖类的系统发生会得出一个科学而满意的结论。

近年来,随着两栖类线粒体基因序列被测定的物种数目不断增加,利用线粒体不同基因(蛋白质编码基因、tRNA 基因、rRNA 基因或全序列)和不同方法(NJ、MP、ML 和 BA 法)来推演三个目系统发生关系的研究时有报道。概括其研究结果,仍各自支持上述两种观点,但本文分析认为,其中一些研究结果表现出一定的局限性,如 Feller & Hedges^[5]运用 12S 和 16S rRNA 基因全序列研究两栖类 3 个目 9 个物种的系统发生关系(选择 3 种脊椎动物为外群),结果排斥无尾目而支持有尾目与蚓螈目为姐妹群关系;Zardoya & Meyer^[27]基于相同的基因全序列研究两栖类 9 个相同的物种与其他脊椎动物的 19 个物种的系统关系(选择硬骨鱼类为外群),结果却支持

有尾目与无尾目亲缘关系更近的观点。本文作者也用相同的数据(只选择 2 个 rRNA 基因)对所涉及两栖类 15 个物种进行系统树的重建(本文未显示结果),在只选择 *P. dolloi* 作为外群时, NJ 法结果支持有尾目与蚓螈目为姐妹群关系(BCL= 50%);而如只选择爬行类两个物种为外群, NJ 法结果支持无尾目与有尾目为姐妹群(BCL= 86%)。这表明上述两篇文章所得相对立结论,分析其可能原因为外群选择的差异^[3, 27],这一说法具有一定的科学依据。这表明在只用较为保守的 rRNA 基因分析两栖类目间系统关系时,外群选择对结果的影响尤为显著。

Zardoya & Meyer^[13]和 Zhang 等^[28]均利用线粒体全序列的核苷酸数据来研究这 3 个目的系统关系,结果前者支持无尾目和有尾目为姐妹群关系,后者支持有尾目和蚓螈目为姐妹群。而他们研究的无尾目和蚓螈目中只选择了单一的代表物种, Zhang 等^[29]指出他们所得到的系统树中“长枝干扰”(Long-branch attraction, LBA)可能已经发生。此外, Zardoya 等^[30]利用所有蛋白质编码基因(ND6 除外)的氨基酸序列合并数据来研究 36 个脊椎动物的系统关系,其中两栖类三个目只有 3 个代表动物,且无尾目选用的序列是可能存在问题的非洲爪蟾^[5],结果虽支持无尾目和有尾目为姐妹群关系,但这些因素已大大降低了结论的可信度。考虑物种选择的影响因素,刘忠权等^[3]选取 7 种两栖动物+ 9 种其他高等脊椎动物及作为外群 2 种硬骨鱼类,以线粒体 22 个 rRNA 基因的合并数据为基础探讨 3 个目系统关系,结果表明有尾目和蚓螈目为姐妹群(BCL 值中等支持)。从目前 Genbank 上已登陆的 350 余种脊椎动物 mtDNA 全序列分析来看, tRNA 基因具有较高的进化速率,在约有 1/4 发生基因重排的物种中, tRNA 基因是主要的不稳定因素,且它们的发生并不受分类谱系的限制。tRNA 基因本身也常出现重排、tRNA^{Met} 基因重复拷贝、tRNA 假基因,甚至 tRNA 基因部分或全部缺失等现象^[18, 31-32]。因此,本文认为用所有 tRNA 基因的合并数据来研究两栖类系统发生关系潜在着很大的风险。

因此,运用线粒体基因研究两栖类系统发生关系,本文认为主要影响因素有:其一为基因的选择,有基因长度、进化速率和基因所包含的有效信息量(视不同分类阶元的系统关系而定)等方面,长度过短或不考虑基因自身特点(如进化速率、有效信息量等)一味相加获得的较长片断,序列保守性过高和进化速率过快均可能产生错误的结果。其二为物种的

选择,为了避免长枝干扰,选择合适的外群、其他相关谱系及增加两栖类目内每个科的代表物种数目将会使得到的结论更接近真实结果。另外,应该考虑,在分析软件、建树方法及相关参数的选择上的差异对结果的影响。如本文在运用 ML 法构建系统树时,尝试选用转换/颠换率为 1:1 和 3:1,结果仍表明无尾目与有尾目为姐妹群关系(BCL 值分别为 76% 和 58%,该树文中未显示)。

考虑到上述因素的影响, Zhang 等^[29, 33, 34]在分析所测定的两栖类个别线粒体全序列的基础上,先后选择线粒体部分基因的氨基酸序列或核苷酸序列数据,运用不同的建树方法,对两栖类多个物种的系统关系及其起源进行研究,结论与本文观点一致,均一致支持无尾目与有尾目为姐妹群关系。在此基础上,本文增加了有尾目和蚓螈目的物种数目,旨在更合理地分析两栖类 3 个目及有尾目各科间的亲缘关系。

本文利用 3 种不同方法获得一致的系统树,它们支持无尾目与有尾目形成姐妹群观点,同时推断有尾目中隐鳃鲠科和小鲵科亲缘关系较近。但在系统树中无尾目与有尾目形成姐妹群一支的自检值并不太高,而提高 BCL 支持值以期该结论更有说服力,还需要在未来的研究过程中,考虑增加更多、更完整的线粒体或核基因的有用信息,结合形态学、细胞生物学方面的证据,运用更科学的分析手段等因素。

致谢:

复旦大学生命科学学院徐冠兰博士和中国科学院北京动物所华攀玉博士为本文的文献收集工作提供了很多帮助,在此表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Fei L. Atlas of amphibians of China [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press. 1999 [费梁. 中国两栖动物图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社. 1999]
- [2] Fei L, Ye C Y, Jiang J P, et al. An illustrated key to Chinese amphibians [M]. Chengdu: Sichuan Publish House of Science and Technology. 2005 [费梁, 叶昌媛, 江建平, 等. 中国两栖动物检索及图解. 成都: 四川科学技术出版社. 2005]
- [3] Liu Z Q, Wang Y Q, Zhou K Y. Phylogenetic relationships of living amphibians among three orders based on the mitochondrial tRNA genes [J]. Zool Res., 2004, 25(3): 185-190 [刘忠权, 王义权, 周开亚. 用线粒体 tRNA 基因探讨现存两栖动物 3 个目间系统发生关系. 动物学研究, 2004, 25(3): 185-190]
- [4] Hay J M, Ruvinsky I, Hedges S B, et al. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial

- 12S and 16S ribosomal RNA genes [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, **12**: 928—937
- [5] Feller A E, Hedges S B. Molecular evidence for the early history of living amphibians [J]. *Mol. Phylogent. Evol.*, 1998, **9**: 509—516
- [6] Zhou K Y. Molecular phylogenetics of amphibians and reptiles [J]. *Zool Res.*, 2001, **22**(5): 397—405 [周开亚. 两栖爬行动物的分子系统发生. *动物学研究*, 2001, **22**(5): 397—405]
- [7] Carroll R L, Holmes R. The skull and jaw musculature as guides to the ancestry of salamanders [J]. *Zool. J. Linnean Soc.*, 1980, **68**: 1—40
- [8] Smithson T R. The morphology and relationships of the Carboniferous amphibian *Eoherpeton watsoni* Panchen [J]. *Zool. J. Linnean Soc.*, 1985, **85**: 317—410
- [9] Jarvik E. Basic structure and evolution of vertebrates [M]. London: Academic Press. 1980
- [10] Laurin M, Reisz R. A new perspective on tetrapod phylogeny [A]. In: Suemida S S, Martin K L (Eds.), *Amniote origins* [C]. New York: Academic Press. 1997, 9—59
- [11] Duellman W E. Evolutionary relationships of the Amphibia [A]. In: Fritsch B (Eds.), *The evolution of the amphibian auditory system* [C]. New York: Wiley. 1988
- [12] Milner A R. The Paleozoic relatives of lissamphibians [J]. *Hepetol. Monogr.*, 1993, **7**: 8—27
- [13] Zardoya R, Meyer A. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**: 7380—7383
- [14] Carroll R L, Kuntz A, Albright K. Vertebral development and amphibian evolution [J]. *Evol. Dev.*, 1999, **1**: 36—48
- [15] Carroll R L. Vertebrate paleontology and evolution [M]. New York: Freeman. 1988
- [16] Evans B J, Brown R M, McGuire J A, *et al.* Phylogenetics of fanged frogs: testing biogeographical hypotheses at the interface of the Asian and Australian faunal zones [J]. *Syst. Biol.*, 2003, **52**(6): 794—819
- [17] Zhang J F, Nie L W, Peng Q L, *et al.* Relationships among the Chinese group of *Limnodynastes* based on mitochondrial 12S and 16S rRNA sequences [J]. *Acta Zool. Sin.*, 2005, **51**(2): 354—359 [张际峰, 聂刘旺, 彭巧玲, 等. 从线粒体基因探讨中国大头蛙群的分类及其属内地位. *动物学报*, 2005, **51**(2): 354—359]
- [18] Liu Z Q, Wang Y Q, Su B. The mitochondrial genome organization of the rice frog, *Fejervarya limnocharis* (Amphibia: Anura): a new gene order in the vertebrate mtDNA [J]. *Gene*, 2005, **346**: 145—151
- [19] Sumida M, Kanamori Y, Kaneda H, *et al.* Complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata* [J]. *Genes Genet. Syst.*, 2001, **76**(5): 311—325
- [20] Jiang J P, Zhou K Y. Evolutionary relationships among Chinese ranid frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA gene [J]. *Acta Zool. Sin.*, 2001, **47**(1): 38—44 [江建平, 周开亚. 从 12S rRNA 基因序列研究中国蛙科 24 种的进化关系. *动物学报*, 2001, **47**(1): 38—44]
- [21] Simon C, Frati F, Beckenbach 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
- [22] Han D M, Zhou K Y. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of Tokay (Gekko gekko) [J]. *Zool Res.*, 2005, **26**(2): 123—128
- [23] Milner A R. The relationships and origin of living amphibians [A]. In: Benton M J (Eds.), *The phylogeny and classification of the Tetrapods* [C]. Oxford: Clarendon Press. 1988. 59—102
- [24] Benton M J. Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates [J]. *J. Mol. Evol.*, 1990, **30**: 409—424
- [25] Trueb L, R Cloutier. A phylogenetic investigation of the inter- and intrarelationships of the *Lissamphibia* (Amphibia: Temnospondyli) [A]. In: Schultze H P, Trueb L (Eds.), *Origins of the major groups of Tetrapods: controversies and consensus* [C]. New York: Cornell University Press. 1991, 223—313
- [26] Bolt J R. Lissamphibian origins [A]. In: Schultze H P, Trueb L (Eds.), *Origins of the major groups of Tetrapods: Controversies and consensus* [C]. New York: Cornell University Press. 1991, 194—222
- [27] Zardoya R, Meyer A. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibia: Gymnophiona) [J]. *Genetics*, 2000, **155**: 765—775
- [28] Zhang P, Chen Y Q, Zhou H, *et al.* The complete mitochondrial genome of a relic salamander, *Ranodon sibiricus* (Amphibia: Caudata) and implications for amphibian phylogeny [J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2003, **28**: 620—626
- [29] Zhang P, Zhou H, Chen Y Q, *et al.* Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians [J]. *Syst. Biol.*, 2005, **54**(3): 391—400
- [30] Zardoya R, Malaga-Trillo E, Veith M, *et al.* Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of a salamander, *Mertensiella luschni* [J]. *Gene*, 2003, **317**: 17—27
- [31] Saccone C, Giorgi C D, Gissi C, *et al.* Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system [J]. *Gene*, 1999, **238**: 195—209
- [32] Zhong J, Li G, Liu Z Q, *et al.* Gene rearrangement of mitochondrial genome in the vertebrate [J]. *Acta. Genetica Sinica*, 2005, **32**(3): 322—330 [钟婧, 李光, 刘忠权, 等. 脊椎动物线粒体 DNA 的基因重排. *遗传学报*, 2005, **32**(3): 322—330]
- [33] Zhang P, Chen Y Q, Liu Y F, *et al.* The complete mitochondrial genome of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata) [J]. *Gene*, 2003, **311**: 93—98
- [34] Zhang P, Zhou H, Liang D, *et al.* The complete mitochondrial genome of a tree frog, *Polypates megacephalus* (Amphibia: Anura: Rhacophoridae), and a novel gene organization in living amphibians [J]. *Gene*, 2005, **346**: 133—143

SEQUENCE OF THREE MITOCHONDRIAL GENES OF *L. KUHLII* AND *L. FRAGILIS*, AND THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG FROGS, SALAMANDERS AND CAECILIANS

ZHANG Ji-Feng^{1,2}, NIE Li-Wang¹, WANG Yang¹ and HAO Pei-Ying²

(1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000; 2. Department of Chemistry and Biology, Huainan Normal University, Huainan 232001)

Abstract: At the present time, the phylogenetic relationships among three living amphibian orders, 3 families of Caudate are still debated. To test the phylogenetic relationships among these modern amphibians (frogs, salamanders and caecilians), based on the PCR fragments of 5 primers we designed, the complete sequences of mitochondrial 12S rRNA, 16S rRNA and Cytb genes were determined for *L. kuhlui* and *L. fragilis*. In *L. kuhlui* the 12S and 16S rRNAs were 928 and 1586 nt long, respectively. The corresponding genes were 924 and 1579 bp long in *L. fragilis*. The overall A+T content of two rRNAs of *L. kuhlui* was 57.74%, and that of *L. fragilis* was 56.63%. The nucleotide sequence of *L. kuhlui* 12S and 16S rRNAs had 84.15% similarity to the homologous sequence of *L. fragilis*. The Cytb genes began with an ATG start codon and used complete TAA as a stop codon in both sequences of two frogs. The sequences of this gene showed a 23.01% divergence at the nucleotide level and 9.40% divergence at the amino acid level between two frogs. In addition, located upstream and downstream of 12S rRNA genes 4 complete tRNA genes were obtained for the two frogs (two tRNA^{Phe} and two tRNA^{Val} respectively), and all could fold in a canonical cloverleaf secondary structure. Two sequences of *L. kuhlui* and *L. fragilis* including several genes had been deposited in the GenBank database under the accession number AY899241 and AY899242, respectively. When African lungfish (*Protopterus dolloi* NG-001708) was selected as an outgroup, and compared with the same mtDNA fragments of 13 other amphibians (five frogs: *Bufo melanostictus* NG-005794, *Hyla chinensis* AY458593, *Polypedates megacephalus* AY458598, *Rana nigromaculata* AB043889 and *Fejervarya limnocharis* NG-005055; 5 salamanders: *Mertensiella luschni* AF154053, *Ambystoma mexicanum* AY659991, *Andrias davidianus* AJ492192, *Andrias japonicus* AB208679 and *Ranodon sibiricus* AJ419960; 3 caecilians: *Typhlonectes natans* AF154051, *Ichthyophis bannanicus* AY458594 and *Uraeotyphlus cf. oxyurus* NG-006305) and 2 species of reptiles (*Alligator mississippiensis* Y13113 and *Eumeces egregius* AB016606) recorded in the GenBank, we reconstructed phylogenetic trees using MEGA version 3.1 and PHYLIP version 3.64, based on a data set combining two rRNA genes and Cytb genes. The phylogenetic analyses results showed that NJ, MP and ML trees all strongly supported a sister group relationship for frogs and salamanders, and favored a Cryptobranchidae + Hynobiidae clade with high bootstrap support values. The result congruent with the traditional hypothesis (the Batrachia hypothesis), and it was also supported by previous molecular studies based on the data mitochondrial genes (i.e., based on a data set combining 12 proteins and 2 rRNA, and every major amphibian group contained at least two species). In addition, the reason for our result inconsistent with previous works and the shortcomings of phylogenetic analyses based on the different mitochondrial genes, and selected the different species of the major amphibian groups and outgroups were also discussed. So, future researches on the evolutionary and phylogenetic relationships of amphibian will no doubt need more evidence of morphological and fossil data, and a larger molecular data set, including more genes and key species.

Key words: Amphibian; *Limnonectes*; 12S and 16S rRNA genes; Cytb gene; Phylogenetic relationship