



美姑脊蛇*Achalinus meiguensis*线粒体基因组全序列及系统发育地位研究

王广力^①, 何舜平^②, 黄松^③, 何苗^①, 赵尔宓^{①④*}

① 四川大学生命科学学院, 成都 610064;

② 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;

③ 黄山学院生命与环境科学学院, 黄山 245041;

④ 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041

* 联系人, E-mail: zem006@163.com

2008-10-21 收稿, 2009-03-13 接受

摘要 报道了美姑脊蛇*Achalinus meiguensis*线粒体基因组全序列. 美姑脊蛇线粒体全序列长17239 bp, 由22个tRNA, 2个rRNA和13个蛋白质基因及2个非编码的控制区或D-loop组成, 存在着基因重排现象. 对已报道蛇类线粒体基因组全序列进行比对分析后, 发现一些蛇类线粒体基因组进化规律: 双控制区现象在爬行动物进化历史中独立地发生, 有不同的演化历史; tRNA假基因是在真蛇下目(Caenophidia)中进化形成的; TΨC臂的相对较短(一般少于5 bp)和缺失“DHU”臂造成蛇类tRNA较短. 通过MP和BI分析确定美姑脊蛇系统发育位置应该位于瘰螈蛇*Acrochordus granulatus*和其他真蛇下目蛇类之间, 而不应该属于游蛇科Colubridae或者眼镜蛇科Elapidae. 由于美姑脊蛇与真蛇下目中蝰科Viperidae、游蛇科以及眼镜蛇科之间的单系性都被统计检验拒绝($P < 0.01$), 由此认为美姑脊蛇所在的闪皮蛇亚科(Subfamily, Xenodermatinae)应该提升到科或者更高的分类阶元. 依据系统发育统计检验结果, 我们选择Bayesian树来进行分歧时间的估算. 原蛇下目与真蛇下目的分化时间为109.50 Mya; 而瘰螈蛇与其他真蛇下目种类的分化时间为106.18 Mya; 美姑脊蛇的分化时间在103 Mya; 蝰科与眼镜蛇科和游蛇科构成的单系群的分化时间发生在96.06 Mya.

关键词
美姑脊蛇
线粒体全序列
系统发育
分化时间

在不同动物类群中, 线粒体基因组在基因结构和基因排列方式等方面均显示了极大的多样性, 这种多样性可能反映了真核细胞不同的进化路线^[1]. 就目前的研究而言, 线粒体基因组是一个能够从基因组水平上来分析动物系统发生的分子标记, 可以从线粒体基因组序列信息、基因组成及基因排列方式等进行多方位的分子进化研究. 因而线粒体基因组全序列成为研究动物分子系统发生最有力的证据之一^[1]. 蛇的线粒体基因组大体构造与其他脊椎动物相似, 2个rRNA, 22个左右的tRNA和13个左右的蛋白编码基因, 至少一个非编码区(control region), 但是蛇类线粒体全序列在其组成、结构与功能等方面又有着一些与众不同的特点, 如紧凑的基因结构、双控制区、缩短的tRNA以及较快的进化速度等^[2~5].

脊蛇属Genus *Achalinus* Peters, 1869 在分类上隶属于游蛇科Family Colubridae, 闪皮蛇亚科Subfamily Xenodermatinae^[6,7]. 该属的模式种是黑脊蛇(*Achalinus spinalis*). 脊蛇属蛇类已知有9种, 除1种外, 在中国均有分布, 其中5种是中国特有种. 美姑脊蛇(*Achalinus meiguensis* Hu and Zhao, 1966)是中国的特产蛇类, 区别于其他脊蛇的主要形态特征是具鼻间鳞和一枚极小的眶后鳞^[8]. 目前仅见于四川的美姑、安县、洪雅、峨眉、宝兴、汶川、卧龙、屏山等以及云南省水富县, 已报道的分布海拔在1500~3000 m之

与不同的特点, 如紧凑的基因结构、双控制区、缩短的tRNA以及较快的进化速度等^[2~5]. 脊蛇属Genus *Achalinus* Peters, 1869 在分类上隶属于游蛇科Family Colubridae, 闪皮蛇亚科Subfamily Xenodermatinae^[6,7]. 该属的模式种是黑脊蛇(*Achalinus spinalis*). 脊蛇属蛇类已知有9种, 除1种外, 在中国均有分布, 其中5种是中国特有种. 美姑脊蛇(*Achalinus meiguensis* Hu and Zhao, 1966)是中国的特产蛇类, 区别于其他脊蛇的主要形态特征是具鼻间鳞和一枚极小的眶后鳞^[8]. 目前仅见于四川的美姑、安县、洪雅、峨眉、宝兴、汶川、卧龙、屏山等以及云南省水富县, 已报道的分布海拔在1500~3000 m之

间^[7,9]。由于分布的局限性及生境的特殊性,关于美姑脊蛇研究的文献很少,而且这些研究大多为形态描述,对其生态学或者分子生物学研究尚未见报道。

本文首次报道美姑脊蛇的线粒体基因组全序列,并通过与蛇类已有的线粒体基因组全序列比较,探讨蛇类线粒体基因组全序列的结构及进化等特点。闪皮蛇亚科及脊蛇属的系统发生研究中存在基因少、支持率低等问题,本文使用线粒体基因组全序列来进行系统分析,试图更好地解决它们的系统关系。

1 材料与方法

(i) 基因组DNA的提取。美姑脊蛇采自四川省安县千佛山自然保护区,实验材料用 95%的酒精保存,标本用 6%福尔马林溶液固定,并保存于四川大学。DNA的提取参照标准酚-氯仿法进行^[10],所提取的DNA置于-20℃保存备用。

(ii) 引物设计。首先,使用蛇类编码基因通用引物^[11-15]扩增出美姑脊蛇的ND1, ND2, ND4 和Cyt b片段。然后与从GenBank中下载的阿尔卡链蛇(*Dinodon semicarinatus*, NC_001945)、冲绳烙铁头(*Ovophis okinavensis*, NC_007397)、瘰螈蛇(*Acrochordus granulatus*, NC_007400)和球蟒(*Python regius*, NC_007399)等线粒体基因组全序列进行排列比对,选取保守性较高的区域,设计了可以覆盖美姑脊蛇线粒体基因组全序列的 11 对PCR 引物(表 1)。

(iii) PCR 扩增和序列测序。PCR 反应体系大概含有约 50 ng 的模板 DNA, 10×缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 各 2 μL, 引物(10 pmol/L)各 2.5 μL, *Taq* 聚合酶 2.0 U, 最后补足灭菌双蒸水至终体积。PCR 反应条件

为: 95℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 48~58℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72℃延伸 8 min。为防止污染,所有 PCR 反应都设立空白对照组; 扩增产物使用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测,用 BioStar Glass-milk DNA 纯化试剂盒(加拿大)回收,纯化后的线粒体基因使用 ABI3730 测序仪(美国)测序。为保证所测序列的可靠性,每一样品均进行双向测序。

(iv) 序列分析。获得的序列用Blast软件与GeneBank数据库的序列比对,以及用Clustal X 1.83 软件^[16]与已发表的近缘物种的线粒体基因组全序列进行比对,编码蛋白序列的准确起止位置根据脊椎动物线粒体基因组起止密码子确定,并使用Sequin (Version5135)软件确定了 13 个蛋白质基因的位置和DAMBE软件来计算序列的碱基组成和密码子使用频率。通过tRNA Scan-SE软件^[17]定位了 21 个tRNA基因,通过Clustal X 1.83 软件与 4 种蛇线粒体基因组全序列进行比对,定位了剩余的一个tRNA-Ser (AGC)和 2 个rRNA基因,并且对其余的基因位置进行了修正和确定。tRNA 的二级结构用RNAstructure4.5 (<http://rna.chem.rochester.edu/rnastructure.htm>)软件推测。

(v) 系统发育分析。从GenBank 上下载 16 种蛇的线粒体基因组全序列(表 2),在 13 个编码基因中,由于ND6 在轻链编码,在核苷酸和氨基酸组成上与其他 12 个编码基因差异明显,因而在构建系统发生序列矩阵时该基因被排除^[20,22,28,29]。为了考察蛇亚目的单系性,我们分别选择两栖类、龟类、鳄鱼类、鸟类、蜥蜴等类群的代表种作外类群(表 2)。

系统发育分析分别采用最大简约法(maximum

表 1 美姑脊蛇线粒体基因组全序列测定所使用的引物

引物编号	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')	退火温度/℃	测序长度/bp
E39734/E39735	TAATCTCCGTGCCAGCGAC	CTTCACAGGGTCTTCTGGTCTT	58	1776
E45266/E45267	GCCTGCCCAAGTGAACATT	GCGTTCTAGGAGGGTGAGG	55	779
E46268/E45269	TCCGTACGACCAACTCAT	TGCTCAGGCTATTAGTCAGTG	52	1654
E40978/E40979	CTTCTACAGTAAGGTCAGC	TTAGTCAGTTGCCAAAGCC	50	1847
E40980/E40981	TGGACATTGACAGACGAGC	TATGCGGTGGTCTACTTC	49	1260
E54599/E54600	CGATCCCTCTACCTAATAGAAGAAGT	GGAGTAGGAGGATGATTCTAGGTCAA	48	2393
E42227/E42228	ACCCACGCCCTAATACTCA	ATGTGGCTGATAGAGGAG	52	1919
E42229/E42230	CATCTCTGACTACCAAAAGC	GTCCAATGTCTCCGATACG	51	1435
E42046/E42047	CAACGAACAAGACATCCG	TCCACCAGGTTGAGATGTT	52	1398
E42231/E45098	CATCTACGCTCTATCCC	ATGGTAGTCAGGTGAAAGG	48	995
E45099/E42232	CCACTGGTTACTCTCAAG	GTGATTAGTTTGGCTTATGG	50	1020

表 2 本研究所用的线粒体基因组序列

物种名称	GenBank 登录号	来源及出处
<i>Acrochordus granulatus</i>	NC_007400	[18]
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	NC_009768	[5]
<i>Boa constrictor</i>	NC_007398	[18]
<i>Cylindrophis ruffus</i>	NC_007401	[18]
<i>Deinagkistrodon acutus</i>	NC_010223	Yan J, et al. 未发表
<i>Dinodon semicarinatus</i>	NC_001945	[3]
<i>Enhydris plumbea</i>	NC_010200	Yan J, et al. 未发表
<i>Eunectes notaeus</i>	AM236347	[19]
<i>Leptotyphlops dulcis</i>	NC_005961	[20]
<i>Naja naja</i>	NC_010225	Yan J, et al. 未发表
<i>Ovophis okinavensis</i>	NC_007397	[18]
<i>Pantherophis guttatus guttatus</i>	AM236349	[19]
<i>Pantherophis slowinskii</i>	NC_009769	[5]
<i>Python regius</i>	NC_007399	[18]
<i>Ramphotyphlops braminus</i>	NC_010196	Yan J, et al. 未发表
<i>Xenopeltis unicolor</i>	NC_007402	[18]
<i>Pelomedusa subrufa</i>	NC_001947	[21]
<i>Dogania subplana</i>	NC_002780	Farajallah A, et al. 未发表
<i>Iguana iguana</i>	NC_002793	[22]
<i>Sceloporus occidentalis</i>	NC_005960	[20]
<i>Rhineura floridana</i>	NC_006282	[23]
<i>Geocalamus acutus</i>	NC_006285	[23]
<i>Corvus frugilegus</i>	NC_002069	[24]
<i>Vidua chalybeata</i>	NC_000880	[25]
<i>Smithornis sharpei</i>	NC_000879	[25]
<i>Acanthisitta chloris</i>	NC_003128	[26]
<i>Alligator sinensis</i>	NC_004448	Wu X, et al. 未发表
<i>Gavialis gangeticus</i>	NC_008241	已投稿
<i>Xenopus laevis</i>	NC_001573	[27]
<i>Achalinus meiguensis</i>	本研究	

parsimony, MP)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)进行分析. MP分析在PAUP*4b10 软件[30]中完成. 分析选择启发式搜索(heuristic search)、树二等分再连接选项(tree-bisection reconnection, TBR)和 100 次随机加入序列(addition sequence replicates)等参数进行搜索最大简约树. 所有位点均作无序特征处理, 分析前排除所有无信息位点. 检验MP 树中各节点可信度采用非参数自展法(non-parametric bootstrap)重复检测, 参数设定: nreps = 1000, search = heuristic, conlevel = 50, addseq = random, swap = TBR.

贝叶斯分析采用MrBayes3.1.2 软件[31], 以后验概率(posterior probability, PP)来表示各分支的可信度. 替代模型根据MODELTEST v.3.7 软件[32]中等级似然率(hLRT)和AIC检验标准来选择替代模型. 起始树设为随机树, 马尔科夫链的蒙特卡洛方法设置为 4 条链同时运行 3×10^6 代, 3 条热链 1 条冷链. 每 100 代对系

统树进行抽样, 最终得到 30001 棵系统发育树, 重复一次以确保MCMC的收敛. 将运行过程中所得的冷链对数似然值(log-likelihood scores)与相应的代数进行作图, 找到对数似然值达到饱和的位置, 到达饱和前的数据被作为老化样本(burnin samples)而舍弃. 在舍弃老化样本后, 根据剩余的样本构建一致树(consensus tree)并计算相关参数.

(vi) 系统发育树检测. 系统发育树构建完毕后, 采用Shimodaira-Hasegawa (SH)检测[33]判断不同构树方法所构成的系统发育树之间是否收敛; 而从一系列相互竞争的拓扑树或系统发育假设中选择最优的系统发育树时, Shimodaira-Hasegawa检测和approximately unbiased (AU)检测[34]两种统计检验同时被采用, 前者包含在PAUP*4.0b10 软件中, 后者则通过CONSEL 0.1f 软件[35]完成, 并且所有统计检验都是基于同一核苷酸替代模型, 即GTR + G + I模型(根据等级似然率和

AIC选择标准选择最适合的替代模型)。

(vii) 美姑脊蛇分化时间. 为了检验是否偏离分子钟, 将有分子钟约束的ML树与不受分子钟约束的ML树的似然对数值进行比较^[36]; 如果两者差异显著, 则分子钟被拒绝. 对数似然比检验表明, 不同谱系联合线粒体蛋白编码基因数据($\chi^2 = 1443.035$, $df = 28$, $P < 0.001$)序列的分子钟假设被拒绝, 不宜采用全局分子钟(global clock)来估算分支时间。

因此本研究采用松散分子钟约束的Bayesian方法^[37]和罚分似然法^[38]估算分支之间的分歧时间. 这两种方法都放宽了对严格分子钟中系统发育类群间相同的、稳定的替代速率的约束, 而是允许数个分子钟及分化时间校正. Bayesian方法在MULTIDISTRIBUTE软件^[39]中执行, 并将不同基因、不同进化谱系的进化速率的差异进行整合. 这一分子钟估算方法的运算过程可以分为两步: 第一步, 从数据和基于F84+G进化替代模型获得的稳定拓扑结构的系统树中, 运行ESTBRANCHES来估计分支的枝长. 这一过程允许位点进化速率按照分散的 γ 分布而变异, 这一分布依照4种替代形式速率的方差-协方差数据矩阵计算^[40,41]. F84+G进化替代模型中的参数用PAML软件的BASEML程序^[42]来估计. 第二步, 用MULTI-DIVTIME^[39]估算分化事件的时间及标准差, 并且通过Markov chain Monte Carlo方法来估算95%水平的置信区间. Markov链运行100000代, 在舍弃初始的300000次循环的代数后, 每100代抽样一次. 在运行MCMC之前, 我们先对根节(tree root)年龄、根节速率以及分支自主相关速率的平均值及标准误等参数进行预设: 以300 Mya前(标准误SD = 50 Mya)作为根节到顶端分化时间的期望值($rttm = 300$), 但不节点分化时间进行限定; 每位点每百万年0.002655的替换($SD = 0.002655$)作为tree root节点的进化速率($rtrate = 0.002655$; $rtratesd = 0.002655$); 系统树上沿着衍生枝, 控制每百万年速率与分支自主相关程度尺度的参数设置为0.0361 ($brownmean = 0.0361$, $brownsd = 0.0361$). 根节到顶端的分化时间最大可能值设置为350 Mya ($bigtime = 350$). 为检测Markov chain Monte Carlo的收敛性, 这一过程以不同的起始树至少运行2次。

MULTIDIVTIME程序允许对标定点进行最大、最小时间尺度的限定. 本研究采用两个校正点: (1) 蛇类和蜥蜴类分化时间大约在130~150 Mya^[43];

(2) *Acanthisitta chloris*, *Corvus frugilegus*和*Vidua chalybeata*的分化时间最少82 Mya^[44].

罚分似然法在R8S软件^[45]中执行, 该方法通过最优树的枝长来推算分支之间的分化时间, 采用Powell和TN方法进行优化, 最佳平滑值由交叉验证法(Cross-validation)获得. 同时, 分子钟的分化时间校正也采用以上两个标定点。

2 结果与分析

2.1 美姑脊蛇 mtDNA 结构

美姑脊蛇线粒体基因组序列全长为17239 bp, 为一环形的双链DNA (图1). 与大多数蛇类的基因组组成及顺序相同^[3], 美姑脊蛇线粒体基因组由13个蛋白编码基因, 22个tRNA基因和2个rRNA基因(16S rRNA和12S rRNA)组成. 其中主链(majority-strand), 即H-链编码了29个基因, 而次链(minority-strand), L-链包含了8个基因. 另外将在tRNA-Ile和tRNA-leu间以及tRNA-Pro和tRNA-Phe间区域的1062和1063 bp确定为两个非编码区(non-coding region), 即控制区(control region, CR).

(i) 蛋白编码基因. 在13个蛋白质编码基因

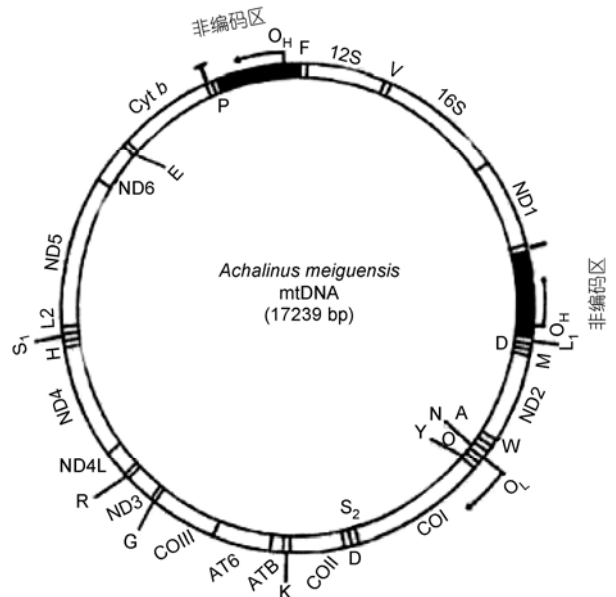


图1 美姑脊蛇(*Acalinus meiguensis*)线粒体基因组基因构成

tRNA 基因以相应氨基酸的单个大写字母表示. 其他基因的缩写分别为: ND1~6 为 NADH 脱氢酶亚基 1~6; CO I~III 为细胞色素氧化酶亚基 I~III; ATP6~8 为腺苷三磷酸酶亚基 6~8; Cyt b 为细胞色素 b. O_H 和 O_L 分别表示重链和轻链的复制起点

中,除 ND6 定位在轻链外,其他均定位在重链上. 这些基因都没有内含子,有些与其他基因有少许重叠(表 3). 细胞色素氧化酶亚基 II 和 III(CO II, CO III), ND4, ND4L, ND5, ATPase 6 和 Cyt *b* 等蛋白编码基因以 ATG 为起始密码子, CO I 和 ATPase 8 以 GTG 为起始密码子, ND1, ND2, ND6 和 ND3 则分别以 ATA 和 ATT 为起始密码子,这与其他蛇亚目种类对起始密码子的选择无显著差异. 终止密码子包括 4 个 TAA 和 4 个 AGG, 某些蛋白编码基因如 ND1, ND2, CO III, ND3, Cyt *b* 等则使用了非标准终止密码子,即不完全终止密码子 T.

美姑脊蛇线粒体基因组 13 个蛋白编码基因的密码子使用情况如表 4. 对于氨基酸四重简并的位点,碱基 C 出现的频率最高,其次是 T 或 A. 而两重简并的位点,碱基 C 出现的频率稍高于 T. 除了氨基酸 Arg 密码子外,碱基 G 在其他密码子第三位上都是最

少的,这种低 G 偏倚现象在脊椎动物中很普遍. 在美姑脊蛇蛋白编码基因中, C 的含量最高,平均为 32.8%; G 的含量最低,平均仅为 13.7%, 蛋白质编码基因密码子的第一、第二和第三位点的 A + T 的平均百分含量(50.7%, 57.8%, 52.2%)均高于 G + C 含量,其中第二位点占的比例最高(57.8%). 这一点与线粒体基因组有高 AT 偏向性的特征是吻合的.

(ii) RNA 基因. 美姑脊蛇含有的 22 个 tRNA 基因,可以满足线粒体蛋白质翻译中所有密码子的需要,其长度为 49 bp (tRNA-Cys)~73 bp (tRNA-Leu, tRNA-Asn). 其中 tRNA-Glu, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser, Gln, Pro 由 L-链编码,其余由 H-链编码. H-链编码的 tRNA 基因散布于蛋白质基因和 rRNA 基因之间,相邻基因间隔 1~30 个碱基或紧密相连,甚至也发生重叠. 一般说来,脊椎动物的线粒体 tRNA-Met, His, Leu(CUN)等序列保守性最高,可达 80%以上,而

表 3 美姑脊蛇线粒体蛋白编码基因

基因/区域	起始位置	终止位置	间隔(+)/重叠(-)	起始密码子	终止密码子	序列长/bp	氨基酸(aa)	编码链 ^{a)}
ND1	2545	3493		ATA	T++	949	318	H
ND2	4826	5849		ATA	T++	1024	341	H
COI	6210	7810	+1	GTG	AGG	1601	533	H
COII	7936	8622	+4	ATG	AGG	687	229	H
ATPase 8	8686	8853		GTG	TAA	168	56	H
ATPase 6	8844	9518	-10	ATG	TAA	675	225	H
COIII	9518	10301	-1	ATG	T++	783	261	H
ND3	10362	10704		ATT	T++	343	114	H
ND4L	10769	11059		ATG	TAA	291	97	H
ND4	11059	12411	-1	ATG	AGG	1353	451	H
ND5	12604	14352	+1	ATG	TAA	1749	583	H
ND6	14348	14851	-5	ATA	AGG	504	167	L
CYT <i>b</i>	14924	16040	+1	ATG	T++	1117	372	H

a) H, 重链; L, 轻链

表 4 美姑脊蛇蛋白质编码基因碱基使用^{a)}

物种	基因	T%	C%	A%	G%	(A+T)1%	(A+T)2%	(A+T)3%
美姑脊蛇 <i>Achalinus meiguensis</i>	ND1	25.4	32.0	29.1	13.5	52.4	55.8	55.3
	ND2	22.0	35.6	29.7	12.7	57.1	51.3	46.6
	CO1	25.7	30.0	25.3	18.9	49.8	55.3	48.2
	CO2	22.2	32.7	28.3	16.7	41.7	59.9	50.2
	ATP8	19.6	31.0	35.1	14.3	50.0	53.6	60.7
	ATP6	25.2	35.5	27.4	11.9	48.5	59.2	50.4
	CO3	25.4	31.8	24.7	18.1	45.8	59.7	44.8
	ND3	23.0	35.6	26.2	15.2	42.6	48.2	57.1
	ND4L	24.8	32.1	28.3	14.8	52.6	62.9	43.8
	ND4	23.1	34.8	29.1	12.9	46.1	51.9	58.7
	ND5	24.0	33.4	30.7	11.9	57.9	58.0	48.0
	ND6	17.0	28.1	51.3	3.7	61.3	76.5	67.1
	Cyt <i>b</i>	26.4	33.8	26.8	13.1	52.9	58.7	47.9
	平均	23.4	32.8	30.2	13.7	50.7	57.8	52.2

a) (A + T) 1%, (A + T) 2%, (A + T) 3%分别指蛋白质编码基因密码子的第一、第二和第三位点的 A + T 的百分含量

tRNA-Ser (AGY)的变异最大, 同源性只有 54%~64%。Mt-tRNA 可形成典型的三叶草形二级结构, 一般含有 7 个碱基的氨基酸接受臂, 5 个碱基的 TΨC 臂, 反密码子臂及 4 个碱基的双氢尿嘧啶(DHU)臂, 各臂碱基对存在高比例的错配。

美姑脊蛇线粒体基因组包含了两条 rRNA 基因, 分别是 16S rRNA 和 12S rRNA。其位置与其他蛇类相同。16S rRNA 和 12S rRNA 基因序列分别为 1486 和 933 bp, 这两个基因 A + T 含量分别为 56.6%和 51.1%, 均高于各自 G + C 含量(43.4%和 48.9%)。

(iii) 非编码区。至今为止, 蛇亚目中已测的 mtDNA 全序列, 除 *Leptotyphlops dulcis*, *Ramphotyphlops braminus* 和 *Typhlops murius* 有一个控制区外, 其余种类都有两个完全复制的控制区^[5]。美姑脊蛇也有两个控制区, 占全序列的 12.4%, 这个区域富含 AT (A + T 为 62.5%)。由于缺少编码序列所具有的碱基约束性, 控制区被认为是线粒体基因组中变异最大的部分^[46]。但是在所有脊椎动物线粒体控制区也存在若干共同的保守区, 如重链复制起点以及重链和轻链转录的驱动子^[47]。控制区通常分为 3 个区域: 终止序列区、中央序列区和保守序列区^[48]。这 3 个区域中, 碱基 T 的含量变化不大, 保持在 35.4%~37.8%之间; 碱基 A 的平均含量在终止序列区(30.2%)和保守序列区(28.9%)稍高于中央保守区(27.2%); 而碱基 G 的含量最低, 在 7.6%~11.8%之间, 这与整个线粒体基因组序列相似。

2.2 系统发育关系

最大简约分析产生了 1 个最简约的系统发育树, 树长为 52912, CI = 0.3203, RI = 0.4361。图 2 显示了 50%主要合意树。简约分析支持蛇亚目为一个单系群, 支持率为 100%。钩盲蛇和细盲蛇形成姊妹群, 支持率为 100%, 处于基部。其他蛇类可以分为两个主要分支: 分支 I 包括美姑脊蛇(*Achalinus meiguensis*)、瘰鳞蛇(*Acrochordus granulatus*)、黄水蚺(*Eunectes notaeus*)、球蟒(*Python regius*)、闪鳞蛇(*Xenopeltis unicolor*)、红尾筒蛇(*Cylindrophis ruffus*)和巨蚺(*Boa constrictor*), 支持率仅为 43%; 分支 II 包括玉米蛇(*Pantherophis guttatus*)、*Pantherophis slowinskii*、半棱链蛇(*Dinodon semicarinatus*)、冲绳烙铁头(*Ovophis okinavensis*)、铅色水蛇(*Enhydryis plumbea*)、印度眼镜蛇(*Naja naja*)、尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)和食鱼蝮(*Agkistrodon piscivorus*), 支持率为 100%。在分支

I 中, 黄水蚺和巨蚺有最近共同祖先(BP = 100%), 它们与由闪鳞蛇、球蟒和红尾筒蛇组成的单系群(BP = 80%)构成姊妹群, 支持率为 98%。这个类群再和由美姑脊蛇与瘰鳞蛇组成的亚枝互为姊妹群关系。在分支 II 中, 蝰科形成一单系群, 与由眼镜蛇科和游蛇科的种类构成姊妹群。游蛇科铅色水蛇与眼镜蛇科的印度眼镜蛇有最近共同祖先, 但支持率仅为 49%。

Bayesian 分析方法所揭示的蛇类系统发育关系与最大简约分析结果相似(图 3)。蛇亚目构成一个单系群, 得到高的后验概率支持(PP = 1.00)。不同于最大简约树, 基于形态学划分的盲蛇下目 (Scoleophidia)、原蛇下目 (Henophidia) 和真蛇下目 (Caenophidia)^[49,50]各自形成单系群, 瘰鳞蛇处于真蛇下目的基部, 其次是美姑脊蛇, 它与蝰科、眼镜蛇科和游蛇科组成的单系群互为姊妹群, 后验概率为 1.00。无论是最大简约分析, 还是 Bayesian 分析, 两种系统发育分析方法都较好地解决了蛇类下目间的系统发育关系。

2.3 分子钟估算

依据系统发育统计检验结果(表 5), 我们选择 Bayesian 树来进行分歧时间的估算。如材料和方法中所阐述, 树中分支节点的分歧时间的估算是在松散分子钟约束下, 采用 Bayesian 方法分析完成的。估算出蛇亚目的分化时间在 128.03 Mya, 其 95%置信区间为 124.32~131.60 (C2, 表 6, 图 4)。原蛇下目与真蛇下目的分化时间为 109.50 Mya, 其 95%置信区间为 106.07~113.71 (C3, 表 6, 图 4); 而瘰鳞蛇与其他真蛇下目种类的分化时间为 106.18 Mya, 其 95%置信区间为 103.17~110.22 (C4, 表 6, 图 4); 美姑脊蛇的分化时间在 103 Mya (C5, 表 6, 图 4); 蝰科与眼镜蛇科和游蛇科构成的单系群的分化时间发生在 96.06 Mya (C6, 表 6, 图 4), 这与蝰科的化石记录一致。

3 讨论

3.1 蛇类线粒体基因组进化特点

在已测出全序的 17 种蛇中, 除了属于盲蛇下目 *Leptotyphlops dulcis*, *Ramphotyphlops braminus* 和 *Typhlops murius* 有单一的控制区, 其他种类都具有双控制区, 并且控制区加倍事件发生约为 128 Mya (95%置信区间: 124.32~131.60)。这与 Dong 等人^[18]的观点不一致。由于控制区加倍事件不仅仅在蛇亚目

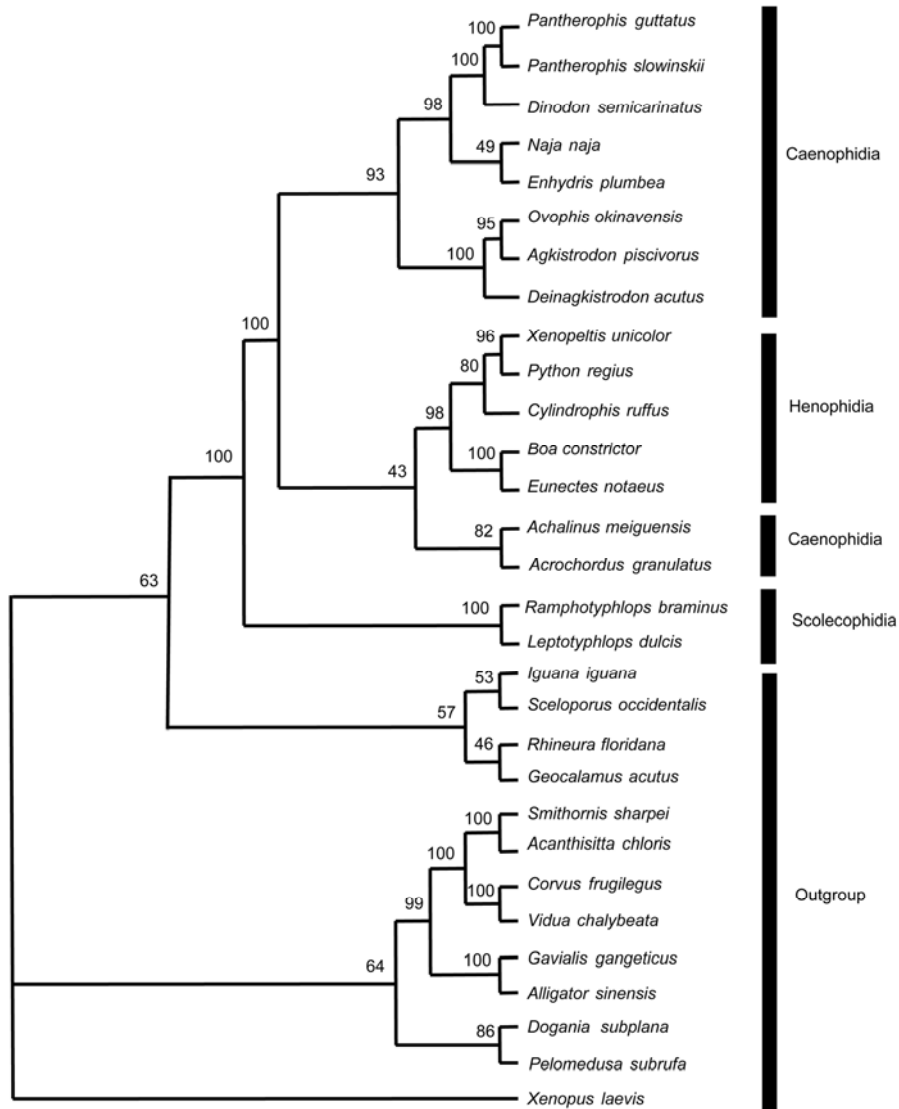


图 2 采用 PAUP*4.0b10 软件的最大简约法所构建的最大简约一致树

基于 13 个线粒体蛋白编码基因序列的联合数据. Tree length = 52912, CI = 0.3203, RI = 0.4361. 节点处的数值代表 1000 次重复抽样所得的自展支持率

种类存在, 而且在蜥蜴和龟等其他爬行动物也出现过^[51~53]. 因此, 这个事件在爬行动物进化历史中独立地发生, 有不同的演化历史.

在有些蛇类的第二个控制区(CR II)侧翼含有一个 Apro (tRNA-pseudo)假基因^[2,3,5,18,19]. 通过序列比较发现, 假基因仅出现在大多数的真蛇下目种类中, 在盲蛇下目、原蛇下目以及真蛇下目中较原始的类群如瘰鳞蛇中未发现这个假基因. 据此推测, tRNA假基因是在真蛇下目中进化形成的, 这个事件发生在 96 Mya (95%置信区间: 95.03~98.91), 在游蛇科和蝰

科分化之前. 美姑脊蛇没有发现 Apro 假基因, 因此可以进一步说明美姑脊蛇可能是真蛇下目中较原始的类群, 可能与瘰鳞蛇有更近的系统发育关系.

典型的脊椎动物线粒体 tRNA 基因的长度为 59~75 bp^[54]. 本研究中美姑脊蛇 tRNA 最短的 49 bp (tRNA-Cys), 最长的 73 bp (tRNA-Leu, tRNA-Asn), 明显短于一般脊椎动物. Kumazawa 等人^[2,3]认为, TΨC 臂的缩短和缺失是造成该现象的主要原因, 我们通过研究发现, 除了 TΨC 臂的相对较短(一般少于 5 bp)外, 与其他脊椎动物一样, 缺失“DHU”臂^[48,55], 从而

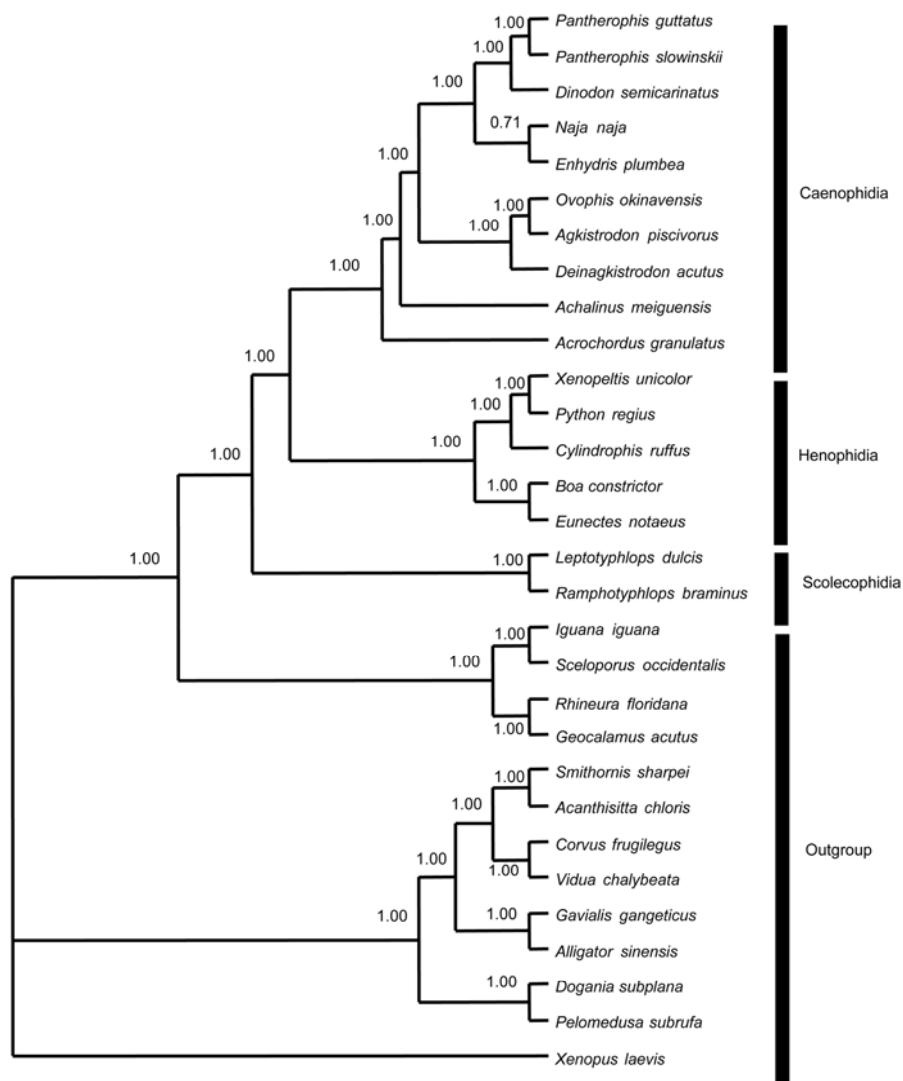


图3 采用 GTR+G+I 进化模型进行 Bayesian 分析所得的 50%多数一致树
基于 13 个线粒体蛋白编码基因序列的联合数据。节点处的数值为该节点的后验概率

表5 基于联合数据矩阵的蛇亚目各种系统发育假设的统计检验结果^{a)}

	-lnL	ΔlnL	SH	AU	wSH	KH
Bayesian	206092.92554	best		0.98	1.0	0.94
ML	206098.11317	5.16	0.80	0.062	0.218	0.06
MP	206127.33654	34.411	0.12	0.02*	0.049*	0.018*
<i>Acrochordus granulatus</i> , <i>A. meiguensis</i>	206113.35875	20.433	0.27	0.08	0.10	0.06
<i>A. meiguensis</i> , Caenophidia	206204.73579	111.81	0.00*	<0.01*	0*	0*
<i>A. meiguensis</i> , Henophidia	206142.72538	49.799	0.01*	<0.01*	<0.01*	0*
<i>A. meiguensis</i> , Scolecophidia	206178.70643	85.781	0.00*	<0.01*	<0.01*	0*
<i>A. meiguensis</i> , <i>Naja naja</i>	206130.47735	37.552	0.10	<0.01*	0.035*	0.01*

a) *, 数据比较差异显著 ($P < 0.05$)

表 6 基于联合数据矩阵的 Bayesian 松散分子钟估算的分歧时间以及 95%置信区间

节点	后验分歧时间			PL
	时间/Mya	SD	95%CI	
C1	148.50804	1.43164	(144.70950, 149.96130)	149.29
C2	128.02298	1.84106	(124.32289, 131.59667)	136.60
C3	109.49212	1.94583	(106.07292, 133.70649)	110.89
C4	106.17837	1.79985	(103.16504, 110.22145)	105.52
C5	102.99953	1.70577	(100.17461, 106.87422)	100.88
C6	96.05575	1.05125	(95.03028, 98.91085)	98.24
C7	88.93544	2.23792	(84.08853, 93.06151)	95.00
C8	65.78173	5.75942	(53.01370, 75.50340)	67.61
C9	20.07852	5.41546	(9.76417, 30.36626)	27.29
C10	82.74693	3.28289	(75.46274, 88.28126)	82.00
C11	64.00465	6.09093	(50.63093, 74.51996)	62.11
C12	51.56585	6.39901	(37.69466, 62.62928)	56.63
C13	102.62786	2.72198	(97.16197, 107.82987)	99.46
C14	78.53894	6.09655	(64.99476, 88.80835)	77.19
C15	96.13243	3.54611	(88.54137, 102.42330)	99.46
C16	86.70014	4.28593	(76.95398, 93.96931)	83.37
C17	123.80419	1.94522	(119.94754, 127.61041)	129.03

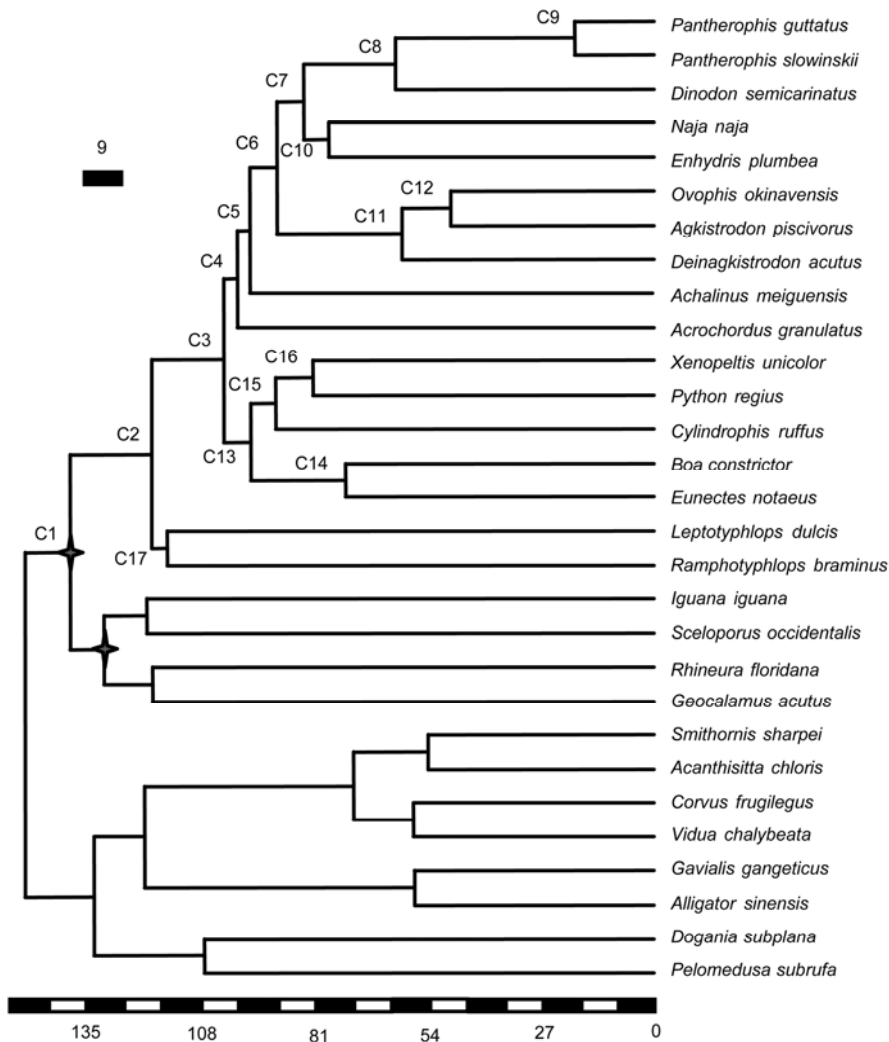


图 4 采用 Bayesian 分析基于松散分子钟方法估算蛇亚目种类的分化时间
★表示用于分子钟校正的标定信息

形成二叶草结构,也是造成蛇类tRNA短的重要原因。类似现象还出现在鳄类等爬行动物中^[56~58]。

3.2 系统发育分析

基于传统形态学研究,蛇类被划分为3类:盲蛇下目(Scolecophidia)、原蛇下目(Henophidia)和真蛇下目(Caenophidia)^[49,50]。我们的BI分析结果有力支持了这3个类群的单系性,并且支持盲蛇下目最先分化出来,原蛇下目和真蛇下目互为姊妹群。

在真蛇下目中,瘰螈蛇(*Acrochordus granulatus*)是一种分化较早的蛇类,这一点已经得到普遍的认可^[59~63]。有关脊蛇的系统发育位置却存在很大的争议,脊蛇最初被归类到游蛇科(Colubridae)闪皮蛇亚科(Xenodermatinae)脊蛇属(*Achalinus*)。近年来,闪皮蛇亚科被认为是真蛇下目(Caenophidia)中较原始的种类,分化时间仅次于瘰螈蛇类^[62,64,65]。Kraus等人^[59]根据闪皮蛇亚科形态学特征以及与瘰螈蛇类之间的关系,建议将其归入瘰螈蛇超科("Acrochordoidea")。Vidal

等^[65]则把闪皮蛇亚科提升为闪皮蛇超科("Xenodermatoidea")。Lawson等人^[66]基于*Oxyrhabdium leporinum*的Cyt b和C-mos基因片段,认为闪皮蛇亚科(Xenodermatinae)应归于眼镜蛇科(Elapidae)。从我们的系统发育关系来看,不支持美姑脊蛇归属于游蛇(*Achalinus rufescens*)科或者眼镜蛇科(表5, $P < 0.01$);也不支持与瘰螈蛇有更近的系统发育关系,但是所有统计检验都不拒绝美姑脊蛇和瘰螈蛇构成姊妹群(表5, $P > 0.05$)。基于ND4基因序列分析,Vidal等人^[62]认为瘰螈蛇、棕脊蛇*Achalinus rufescens*和*Xenodermus javanicus*聚类在一起,但节点并没有得到强烈支持。由于测全序的蛇种类有限,目前的研究无法准确判断瘰螈蛇和美姑脊蛇之间的系统发育关系。最后,由于美姑脊蛇与真蛇下目中蝰科、游蛇科以及眼镜蛇科之间的单系性都被统计检验拒绝(表5, $P < 0.01$),因此,我们认为美姑脊蛇所在的闪皮蛇亚科应该提升到科或者更高的分类阶元。

参考文献

- 1 Saccone C, Lanave C, Pesole G, et al. Influence of base composition on quantitative estimates of gene evolution. *Methods Enzymol*, 1999, 183: 570—583^[DOI]
- 2 Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, et al. Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: Highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(9): 1242—1254
- 3 Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, et al. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*, 1998, 150(1): 313—329
- 4 Jiang Z J. Evolutionary patterns in snake mitochondrial genomes. Doctor dissertation. Baton Rouge: Louisiana State University, 2006
- 5 Jiang Z J, Castoe T A, Austin C C, et al. Comparative mitochondrial genomics of snakes: Extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region. *BMC Evol Biol*, 2007, 7(1): 123^[DOI]
- 6 Peters W C H. Über neue Gattungen und neue oder weniger bekannte Arten von Amphibien (Eremias, Dicrodon, Euprepes, Lygosoma, Typhlops, Eryx, Rhynchonyx, Elapomorphus, Achalinus, Coronella, Dromicus, Xenopholis, Anoplodipsas, Spilotes, Tropidonotus). Berlin: Monatsber. K. Preuss. Akad. Wiss., 1869. 432—447
- 7 赵尔宓, 黄美华, 宗愉, 等. 中国动物志, 爬行纲 (第3卷 蛇亚目). 北京: 科学出版社, 1998
- 8 胡淑琴, 赵尔宓. 四川爬行动物三新种. *动物分类学报*, 1996, 3(2): 158—164
- 9 寇治通, 王晓佳. 云南省蛇类一新记录——美姑脊蛇. *四川动物*, 2003, 22(4): 263, 267
- 10 Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T E. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- 11 Palumbi S R. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis D M, Moritz C, Mable B K, eds. *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 205—320
- 12 Queiroz A, Lawson R, Lemos-Espinal J A. Phylogenetic relationships of North American garter snakes (*Thamnophis*) based on four mitochondrial genes: How much DNA sequence is enough? *Mol Phylogenet Evol*, 2002, 22(2): 315—329^[DOI]
- 13 谢佳蓉. 台湾产标蛇属之亲缘地理. 硕士学位论文. 台北: 中山大学, 2006
- 14 Arévalo E, Davis S K, Sites J W. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico. *Syst Biol*, 1994, 43: 387—418
- 15 Burbrink F T, Lawson R, Slowinski J B. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): A critique of the subspecies concept. *Evolution*, 2000, 54(6): 2107—2118

- 16 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876—4882[DOI]
- 17 Lowe T, Eddy S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955—964[DOI]
- 18 Dong S, Kumazawa Y. Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: Phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. *J Mol Evol*, 2005, 61(1): 12—22[DOI]
- 19 Douglas D A, Janke A, Arnason U. A mitogenomic study on the phylogenetic position of snakes. *Zool Scr*, 2006, 35(6): 545—558[DOI]
- 20 Kumazawa Y. Mitochondrial DNA sequences of five Squamates: Phylogenetic affiliation of snakes. *DNA Res*, 2004, 11(2): 137—144[DOI]
- 21 Zardoya R, Meyer A. Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(24): 14226—14231[DOI]
- 22 Janke A, Erpenbeck D, Nilsson M, et al. The mitochondrial genomes of the iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodylus*): Implications for amniote phylogeny. *Proc Biol Sci*, 2001, 268(1467): 623—631[DOI]
- 23 Macey J R, Papenfuss T J, Kuehl J V, et al. Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33(1): 22—31[DOI]
- 24 Harlid A, Arnason U. Analyses of mitochondrial DNA nest ratite birds within the Neognathae: supporting a neotenuous origin of ratite morphological characters. *Proc Biol Sci*, 1999, 266(1416): 305—309[DOI]
- 25 Mindell D P, Sorenson M D, Dimcheff D E, et al. Interordinal relationships of birds and other reptiles based on whole mitochondrial genomes. *Syst Biol*, 1999, 48(1): 138—152[DOI]
- 26 Haring E, Kruckenhauser L, Gamauf A, et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) indicates an early split in the phylogeny of raptors. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(10): 1892—1904
- 27 Roe B A, Ma D P, Wilson R K, et al. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J Biol Chem*, 1985, 260(17): 9759—9774
- 28 Asakawa S, Kumazawa Y, Araki T, et al. Strand-specific nucleotide composition bias in echinoderm and vertebrate mitochondrial genomes. *J Mol Evol*, 1991, 32(6): 511—520[DOI]
- 29 Zardoya R, Meyer A. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Genetics*, 2000, 155(2): 765—775
- 30 Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and Other Methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2002
- 31 Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 2001, 17(8): 754—755[DOI]
- 32 Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817—818[DOI]
- 33 Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(8): 1114—1116
- 34 Shimodaira H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst Biol*, 2002, 51(3): 492—508[DOI]
- 35 Shimodaira H, Hasegawa M. CONSEL: For assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1246—1247[DOI]
- 36 Huelsenbeck J P, Rannala B. Phylogenetic methods come of age: Testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 1997, 276(5310): 227—232[DOI]
- 37 Kishino H, Thorne J L, Bruno W J. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(3): 352—361
- 38 Sanderson M J. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(1): 101—109
- 39 Thorne J L, Kishino H. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Syst Biol*, 2002, 51(5): 689—702[DOI]
- 40 Yang Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol*, 1994, 39(3): 306—314[DOI]
- 41 Rannala B, Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *J Mol Evol*, 1996, 43(3): 304—311[DOI]
- 42 Yang Z. Complexity of the simplest phylogenetic estimation problem. *Proc Biol Sci*, 2000, 267(1439): 109—116[DOI]
- 43 Carroll, Vertebrate paleontology and evolution. New York: W. H. Freeman and Company, 1988

- 44 Cracraft J. Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous-Tertiary mass extinction event. *Proc Biol Sci*, 2001, 268(1466): 459—469^[DOI]
- 45 Sanderson M J. r8s: Inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics*, 2003, 19(2): 301—302^[DOI]
- 46 Saccone C, Lanave C, Pesole G. Time and biosequences. *J Mol Evol*, 1993, 37(2): 154—159^[DOI]
- 47 Clayton D A. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol*, 1992, 141: 217—232^[DOI]
- 48 Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(5806): 457—465^[DOI]
- 49 Hoffstetter. Squamates de type moderne. In: Piveteau J, ed. *Traité de Paléontologie*. Paris: Masson et Cie, 1955. 606—662
- 50 Underwood G A. A contribution to the classification of snakes. London: British Museum (Nature History), 1967
- 51 Kumazawa Y, Endo H. Mitochondrial genome of the Komodo dragon: efficient sequencing method with reptile-oriented primers and novel gene rearrangements. *DNA Res*, 2004, 11(2): 115—125^[DOI]
- 52 Qiao L P, Liu W N, You G P. Complete mitochondrial genome of Chinese big-headed turtle, *Platysternon megacephalum*, with a novel gene organization in vertebrate mtDNA. *Gene*, 2006, 380(1): 14—20
- 53 Parham J F, Feldman C R, Boore J L. The complete mitochondrial genome of the enigmatic bigheaded turtle (*Platysternon*): Description of unusual genomic features and the reconciliation of phylogenetic hypotheses based on mitochondrial and nuclear DNA. *BMC Evol Biol*, 2006, 6: 11^[DOI]
- 54 郑涛. 云豹线粒体 DNA 全序列及中国 13 种猫科动物的系统发生关系研究. 硕士学位论文. 芜湖: 安徽师范大学, 2006
- 55 Frazer-Abel A A, Hagerman P J. Determination of the angle between the acceptor and anticodon stems of a truncated mitochondrial tRNA. *J Mol Biol*, 1999, 285(2): 581—593^[DOI]
- 56 Kumazawa Y, Nishida M. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Mol Biol Evol*, 1995, 112(5): 759—772
- 57 吴孝兵. 扬子鳄保护遗传学及线粒体基因组全序列研究. 博士学位论文. 南京: 南京师范大学, 2001
- 58 吴孝兵, 王义权, 周开亚, 等. 扬子鳄的线粒体全基因组与鳄类系统发生. *科学通报*, 2003, 48(18): 1954—1958
- 59 Kraus F, Brown W M. Phylogenetic relationships of colubroid snakes based on mitochondrial DNA sequences. *Zoolog J Linn Soc*, 1998, 122(3): 455—487^[DOI]
- 60 Vidal N. Colubroid systematics: Evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. *J Toxicol Toxin Rev*, 2002, 21: 21—41
- 61 Vidal N, Hedges S B. Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. *Proc R Soc Lond B (Suppl 4)*, 2004, 271: S226—S229^[DOI]
- 62 Vidal N, Hedges S B. Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. *C R Biol*, 2002, 325(9): 987—995^[DOI]
- 63 Kelly C M R, Barker N P, Villet M H. Phylogenetics of advanced snakes (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. *Syst Biol*, 2003, 52(4): 439—459^[DOI]
- 64 Vidal N, David P. New insights into the early history of snakes inferred from two nuclear genes. *Mol Phylogene Evol*, 2004, 31(2): 783—787^[DOI]
- 65 Vidal N, Delmas A, David P, et al. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *C R Biol*, 2007, 330(2): 182—187^[DOI]
- 66 Lawson R, Slowinski J B, Crother B I, et al. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 37(2): 581—601^[DOI]