

贵州黎平地区沼水蛙的分子鉴定

冯权江¹, 李明², 汪莎莎³, 何婉琴³, 符静³, 熊荣川^{3*}

¹六盘水市第十九中学, 贵州 六盘水

²六盘水市第二十中学, 贵州 六盘水

³六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州 六盘水

收稿日期: 2024年3月27日; 录用日期: 2024年5月17日; 发布日期: 2024年5月24日

摘要

于2015年8月在贵州省黔东南州黎平县德凤镇南泉山采集到2个蛙类标本, 经初步形态鉴定为沼水蛙(*Sylvirana guentheri*), 但之前并没有该物种在黎平县分布的文献记载, 因此有必要使用分子手段对其分类地位进行准确界定。本文对采自贵州黎平县的沼水蛙标本进行DNA提取, 并克隆其线粒体16S rRNA基因片段, 使用分子系统发育学研究方法对其物种进行初步的分子鉴定。结果表明, 黎平采蛙类样本16S rRNA基因序列与31条沼水蛙同源序列聚为一个支持率较高的单系, 支系内序列间平均遗传距离为0.0056, 且对应序列单倍型均在同一个单倍型网络内。自测序列与沼水蛙近模式产地(福建福州)一标本的16S rRNA基因序列遗传距离较小。因此, 初步判断该标本属沼水蛙(*Sylvirana guentheri*)。初步的种群中性检验分析表明, 沼水蛙种群最近可能发生过种群扩张。另外, 本文探讨了较短的同源序列对相关系统发育分析结果的影响。

关键词

沼水蛙, 16S rRNA, 分子鉴定, 黎平, 短序列

Molecular Identification of a *Sylvirana guentheri* Population Distributed in Liping County, Guizhou Province in China

Quanjiang Feng¹, Ming Li², Shasha Wang³, Wanqin He³, Jing Fu³, Rongchuan Xiong^{3*}

¹The Nineteenth Middle School of Liupanshui, Liupanshui Guizhou

²The Twentieth Middle School of Liupanshui, Liupanshui Guizhou

³College of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui Guizhou

Received: Mar. 27th, 2024; accepted: May. 17th, 2024; published: May. 24th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 冯权江, 李明, 汪莎莎, 何婉琴, 符静, 熊荣川. 贵州黎平地区沼水蛙的分子鉴定[J]. 自然科学, 2024, 12(3): 551-560. DOI: 10.12677/ojns.2024.123064

Abstract

In August 2015, two frog specimens were collected from Nanquan Mountain of Defeng Township, Liping County, Qiandongnan Prefecture in Guizhou Province. They were identified as *Sylvirana guentheri* by preliminary morphological identification. However, it was not documented the distribution of this species in Liping County, so it is necessary to use molecular means to accurately define their taxonomic status. In this paper, DNA extraction and cloning of mitochondrial 16S rRNA gene fragment of *Sylvirana guentheri* from Liping County, Guizhou Province were carried out. The preliminary molecular identification of this population was carried out by using the research method of molecular phylogeny. The results showed that the 16S rRNA gene sequences of Liping frogs and the homologous sequences of 31 *Sylvirana guentheri* frogs were clustered into a monophyletic clade with high support rates. The average genetic distance between sequences in the branch was 0.0056, and the corresponding haplotypes were all in the same haplotype network. The genetic distance between the 16S rRNA gene sequence of Liping frogs and the homologous sequence of a sample collected near type locality (Fuzhou, Fujian) was 0.008. Therefore, it is preliminarily determined that this specimen belongs to *Sylvirana guentheri*. The neutrality tests of *S. guentheri* population showed that the population may have expanded recently in history. In addition, the influence of shorter homologous sequences on the results of related phylogenetic analysis was discussed.

Keywords

Sylvirana guentheri, 16S rRNA, Molecular Identification, Liping, Shorter Homologous Sequences

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

沼水蛙(*Sylvirana guentheri*)属无尾目(Anura)蛙科(Ranidae),新种描述时,2个模式标本采自“Amoy”、1个模式标本采自“China”[1],后来进一步明确模式产地为厦门(“Amoy”)[2],归属广义蛙属(*Rana guentheri* Boulenger, 1882)。之后,沼水蛙的分类地位及归属一直是两栖动物分类学的热点问题之一,先后经历蛙属水蛙亚属 *Rana (Hylorana) guentheri* [3]、水蛙属 *Hylarana guentheri* [4]、水蛙属水蛙亚属 *Hylarana (Hylarana) guentheri* [5]、蛙属肱腺蛙亚属 *Rana (Sylvirana) guentheri* [6]、水蛙属肱腺蛙亚属 *Hylarana (Sylvirana) guentheri* [7]的多次改隶。2012年,费梁等将沼水蛙单独归为沼蛙属 *Boulengerana guentheri* [8]。最新基于线粒体基因、核基因及形态特征的整合系统发育将沼水蛙确定归属为肱腺蛙属 *Sylvirana guentheri* [9]。

沼水蛙主要分布在我国北纬 31°以南各省(区) [7],在越南、老挝也有分布[7]。据记载,沼水蛙在贵州主要分布在东部和南部地区,例如黔东南(雷山、榕江、雷山)、铜仁(印江、德江、江口、松桃),遵义(仁怀、桐梓、绥阳、赤水)、黔南(贵定、荔波、罗甸、三都)及黔西南(望谟)等[7],贵阳和毕节(毕节、大方、金沙)也有分布记载[7],然而,至今仍然没有黎平地区是否有沼水蛙分布文献记载。另外,有关贵州地区沼水蛙的研究报道,多基于形态学研究,基于分子标记的系统发育研究相对较少[10]。熊荣川等[11]基于线粒体 COI 基因,专题研究了贵州高原分布沼水蛙的系统发育地位,发现贵州高原对于沼水蛙内部

种群分化有明显的隔离作用, 暗示在贵州地区开展基于分子标记的沼水蛙系统发育学研究, 具有一定的理论意义。

本研究于 2015 年 8 月在贵州省黔东南州黎平县德凤镇南泉山采集到 2 个蛙类标本, 经初步形态鉴定为沼水蛙(*Sylvirana guentheri*), 但之前并没有该物种在黎平地区分布的文献记载, 因此有必要使用分子手段对其分类地位进行准确界定。本文对采自贵州黎平县的沼水蛙标本进行 DNA 提取, 并克隆其线粒体 16S rRNA 基因片段(以下简称 16S 序列), 使用分子系统发育学研究方法对其物种进行初步的分子鉴定。

2. 材料与方法

2.1. 标本信息

沼水蛙(*Sylvirana guentheri*)标本为 2015 年 8 月采自贵州省黔东南州黎平县德凤镇南泉山的 2 号标本(LPSLP2015081906, LPSLP2015081705), 保存于六盘水师范学院动物标本馆。

2.2. 总 DNA 提取及目的基因片段的扩增

分子样品制备、DNA 提取及目的基因片段的 PCR 扩增方法参照本课题组之前的研究[12]。所扩增目的序列对应沼水蛙(*Sylvirana guentheri*)线粒体基因组(Genbank 索取号 MN248533) 2151~2696 bp 区间位置, 对应阔褶水蛙 16S rRNA 全基因(Genbank 索取号 MN241431) 874~1419 bp 区间位置。

2.3. 参考基因序列下载及数据集构建

本研究使用标本的 16S 序列与 Genbank 中相关参考序列合并为数据集, 构建系统发育树, 分析自测序列与已知序列的系统发育关系对其物种归属进行分子鉴定。首先, 将所测得的 2 条沼水蛙 16S 基因序列经过上传 GenBank 进行搜索比对(megablast), 各下载 Genbank 中的 100 条参考序列, 经过序列号去重, 得到 101 条初始参考数列, 与 2 条自测序列一起构成数据集 A1。根据双重单系法[13], 筛选出与自测序列亲缘关系较近的同源基因序列, 构成数据集 B1; 其中第一重单系内序列构成数据集 C1 用于后续种群遗传学分析。

Genbank 中下载的同源序列中 KR827771、KR827772、KR827773 长度较短, 相较其它 540 bp 左右的同源序列, 短约 26%~28%, 为探究类似较短同源序列对系统发育分析结果的影响, 分别在数据集 A1、B1、C1 中删除以上 3 条序列, 构成对应的数据集 A2、B2、C2。

2.4. 系统发育分析

进行系统发育分析时, 不预先设定外群, 构建一棵无根系统发育树。用集成于 MEGAX [14]中的 MUSCLE 程序对序列进行比对, 辅以人工校对, 修剪不整齐的片段部分。使用 MEGA 软件构建最大简约树(Maximum Parsimony Tree, MP tree), 以及基于 p-distance 方法构建显示支系长度的邻接树(Neighbor-Joining Tree, NJ tree); 在 Phylosuite 软件包[15]中, 使用 ModelFinder [16]筛选适合该数据集序列演化的最优模型以供 IQ-TREE [17]和 MrBayes [18]两个软件进行最大似然法分析和贝叶斯分析。使用 MrBayes3.2 构建贝叶斯树时, 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 1×10^7 代, 3 条热链、1 条冷链。每 1000 代对系统树进行抽样, 当分离频率平均标准差值(Average standard deviation of split frequencies)小于 0.01 时停止抽样。将前 25% 的系统发育树舍弃后, 根据剩余的样本构建一致树(consensus tree)并计算相关参数。使用 IQ-TREE 构建 ML 树时, 运行 5000 次超快自举检验(ultrafast bootstrapping)估算结点支持率。

为探究较短同源序列对系统发育分析结果的影响, 对比分析在数据集 A1、B1、C1 中删除 3 条短序

列与删除前的系统发育树结构是否一致。同时,使用 SPSS 软件中的对照样本 T 检验方法,分析删除短序列前后的系统发育树中各关键节点支持率是否存在显著差异。

另外,使用 R 语言程序包 *haplotypes*, 分析数据集 C 的单倍型类型并绘制单倍型网络。

2.5. 种群动态分析

基于数据集 C,使用 R 语言程序包 *haplotypes*, 分析单倍型类型并绘制单倍型网络。使用进行 R 语言程序包 *pegas* [19]绘制单倍型歧点分布图并进行 R2 中性检验(Ramos-Onsins-Rozas Test of Neutrality, R2 test), 利用 DnaSP v5 [20]软件对沼水蛙群体进行 Tajima'sD 和 Fu'sFs 中性检测。

2.6. 遗传距离计算

基于 16S 基因数据集,使用 MEGAX 软件计算序列间的遗传距离,模型设置为 Kimura 2-parameter。基于具体序列的支系及物种归属对遗传距离进行分类。

3. 结果

3.1. PCR 扩增及测序结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增到 550 bp 左右的基因片段(GenBank 索取号:LC705201- LC705202)。序列碱基组成存在明显的偏向性: AT 含量较高(A: 29.82%, T: 24.68%); GC 含量较低(G: 20.55%, C: 24.95%)。

3.2. 支系分化

基于不同的系统发育分析方法(ML, BI, NJ, MP)对数据集 A1 构建的系统发育树中(图 1), 自测序列与 31 条沼水蛙 16S 基因序列(表 1)聚为一个支持率较高的单系 N02 (表 2)。该沼水蛙支系进一步与 *Humerana humeralis*, *Humerana miopus* 构成一个支持率较高的第二重单系 N01。沼水蛙支系内部没有明显的支系分化。*Humerana humeralis* 支系(N04)支持率较高, 同时其内部进一步分化为两个支持率较高的支系(N05、N06)。数据集 B1 构建的系统发育树基本与 A1 一致(图 1, 表 2)。数据集 A2 构建的系统发育树基本与 A1 一致; 数据集 B2 构建的系统发育树基本与 B1 一致。使用 SPSS 软件中的对照样本 T 检验方法, 分析删除短序列前后的系统发育树中各关键节点(图 1, N01-N07)支持率差异性, 发现删除短序列前后, 各节点支持率没有显著变化($t = 1.75, df = 43, P < 0.087$)。

Table 1. The sequence information of the dataset B in this study

表 1. 本研究中数据集 B 的序列信息

序号	Genbank 索取号	单倍型	序列长度(bp)	标本号	采集地	数据来源
1	LC705201	Hp01	550	LPSLP2015081906	贵州黎平	本研究
2	LC705202	Hp02	540	LPSLP2015081705	贵州黎平	本研究
3	AB859216	Hp03	547	LPS13008	四川泸州	[21]
4	AF206476	Hp04	538	ROM_12573	越南	[22]
5	AF206494	Hp05	536	ROM_25908	越南	[22]
6	AF285215	Hp06	547	TZ829	越南	Genbank
7	AF315151	Hp07	537	未知	广东广州	[23]
8	AY322287	Hp08	537	VUB 0693	越南	[24]

续表

9	DQ283265	Hp06	533	AMNH_A161190	越南	[25]
10	DQ283267	Hp06	533	AMNH_A163942	越南	[25]
11	DQ360001	Hp10	528	SCUMH002	海南三亚	[24]
12	EU754860	Hp11	534	ZFMK_86372	越南	[26]
13	KF185060	Hp12	533	HNNU_060435	福建福州	[27]
14	KR827771	无	393	294D	越南	[28]
15	KR827772	无	400	2007.6264	越南	[28]
16	KR827773	无	389	2007.625	越南	[28]
17	KU840580	Hp10	537	0005H	海南	[29]
18	KU840582	Hp06	537	AMS171666	越南	[29]
19	KX269219	Hp10	528	SCUMH002CJ	海南三亚	[30]
20	MN248533	Hp13	546	LC2018092202	四川绵阳	[31]
21	MT921853	Hp14	537	未知	未知	Genbank
22	OM387048	Hp09	540	USNM:Herp:595512	越南	Genbank
23	OM387049	Hp09	540	USNM:Herp:595513	越南	Genbank
24	OM387060	Hp10	540	USNM:Herp:595514	越南	Genbank
25	OM387064	Hp15	540	USNM:Herp:595515	越南	Genbank
26	OM387067	Hp15	540	USNM:Herp:595516	越南	Genbank
27	OM387070	Hp10	540	USNM:Herp:595517	越南	Genbank
28	OM387094	Hp08	540	USNM:Herp:595518	越南	Genbank
29	OM387095	Hp08	540	USNM:Herp:595519	越南	Genbank
30	OM387103	Hp09	540	USNM:Herp:595520	越南	Genbank
31	OM387104	Hp09	540	USNM:Herp:595521	越南	Genbank
32	OM387165	Hp16	528	USNM:Herp:595522	越南	Genbank
33	OM387166	Hp17	528	USNM:Herp:595523	越南	Genbank

3.3. 遗传距离

两条自测序列与近模式产地沼水蛙同源序列(KF185060)的遗传距离均为 0.008。沼水蛙支系(N02)内部序列间平均遗传距离为 0.0056 (0.0000~0.0171), 支系 N05 内部两条序列间遗传距离为 0.0019, 支系 N06 内部序列间平均遗传距离为 0.0069 (0.0037~0.0100)。支系 N02 与 N05 间的平均遗传距离为 0.0899 (0.0812~0.1207), 与 N06 间的平均遗传距离为 0.0865 (0.0747~0.1197), 与 N07 间的平均遗传距离为 0.0743 (0.0687~0.1019)。支系 N05 与 N06 间的平均遗传距离为 0.0196 (0.0132~0.0248), 与 N07 间的平均遗传距离为 0.0847 (0.0835~0.0859)。支系 N06 与 N07 间的平均遗传距离为 0.0819 (0.0769~0.0857)。

3.4. 种群动态

数据集 C1 因为含有 3 条较短的同源序列(表 1, KR827771-3), 无法使用 R 语言程序包 haplotypes 分析单倍型。基于去掉 3 条序列后数据集 C2, 分析得到 17 个单倍型, 其单倍型网络(表 1, 图 2)表明自测

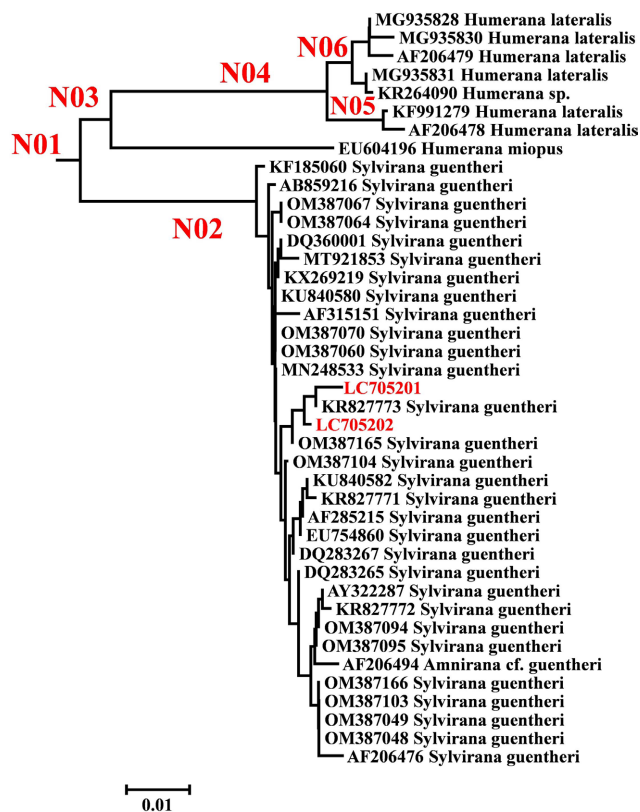


Figure 1. The neighbor-joining tree based on the 16S dataset and the clade support rates under different phylogenetical analysis
图 1. 基于 16S 序列数据集构建的邻接树及相关支系在不同方法构建的系统发育树中的支持率

Table 2. The node support values for the phylogenetic trees in this study
表 2. 本研究系统发育树中个节点支持率

数据集	系统发育树	N01	N02	N03	N04	N05	N06
A1	BI	100	100	96.5	100	100	94.2
A1	ML	100	99	94	100	100	98
A1	NJ	90.8	100	70.8	100	99.6	88.8
A1	MP	79.1	99.5	86.3	100	100	87.1
B1	BI	NA	100	100	100	100	98.7
B1	ML	NA	100	100	100	100	95
B1	NJ	NA	100	100	100	99.7	77.4
B1	MP	NA	100	100	100	100	92.1
A2	BI	100	100	97.3	100	100	94
A2	ML	100	99	94	100	100	98
A2	NJ	90.6	100	69.3	100	99.2	85.3
A2	MP	68	99.4	88.1	100	100	87.6
B2	BI	NA	100	100	100	100	98.6
B2	ML	NA	100	100	100	100	95
B2	NJ	NA	100	100	100	99.8	72.2
B2	MP	NA	100	100	100	99.9	76.3

序列在同一单倍型分支上, 与越南同源序列(Hp16)关系最近。采自福建福州的近模式产地序列单倍型(Hp12)并非古老单倍型, 与四川泸州种群关系较近。Hp10为一古老单倍型, 向外发出8个分支, 包含有越南、海南的5条同源序列。

单倍型歧点分布图呈不完整单峰型(图3), 数据集C1经中性检验 Tajima's D (-1.41883, $P > 0.1$)和 Fu's Fs D (-2.07012, $0.10 > P > 0.05$)均为负值, 但不显著, R2 检验值为 0.03805321 ($P < 0.05$)。数据集C2, 经中性检验 Tajima's D (-1.52901, $P > 0.1$)和 Fu's Fs (-2.12379, $0.10 > P > 0.05$)均为负值, 但不显著, R2 检验值为 0.04185298 ($P < 0.05$)。数据集C1和C2的中性检验结果基本一直, 虽然 Tajima's D 和 Fu's Fs D 值皆为负数, 但不显著, 即不支持沼水蛙种群在较近的历史上可能有种群扩张; R2 检验则相反, 表现出显著偏离中性假说, 这种矛盾与单倍型歧点分布图不完整的单峰形态契合。考虑对于小样本种群, R2 检验优于 Fu's Fs 检验[32], 沼水蛙种群历史上可能有种群扩张。

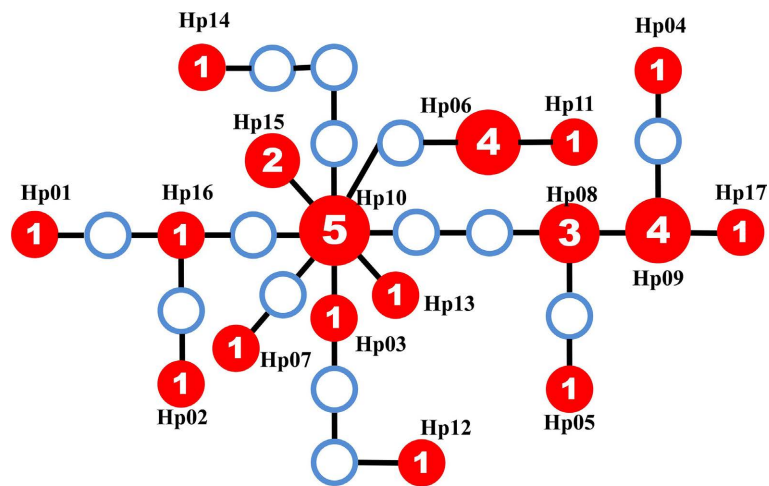


Figure 2. The haplotype network based on the dataset C1. The numbers in the haplotypes means the number of the sequences under it

图 2. 基于数据集 C1 构建的单倍型网络图。单倍型内数字, 代表该单倍型所含有的序列数目

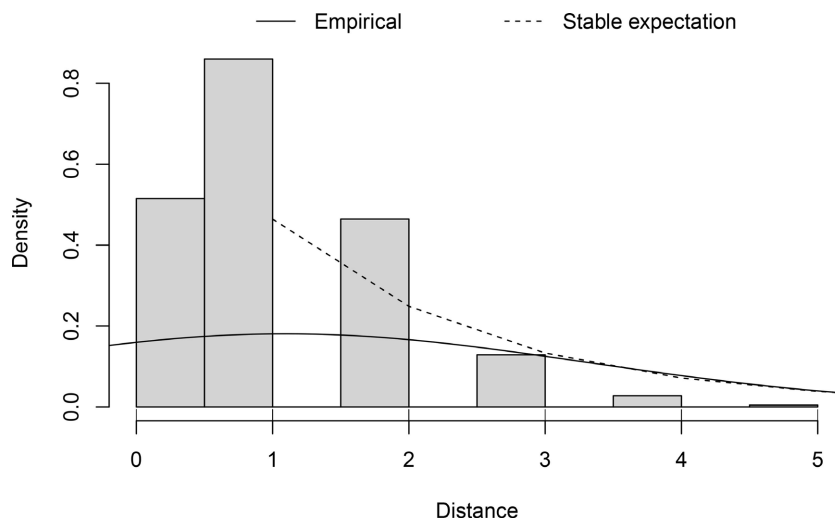


Figure 3. Mismatch distribution of the 16S haplotypes from the *S. guentheri* samples

图 3. 沼水蛙 16S 序列单倍型歧点分布图

4. 讨论

4.1. 沼水蛙黎平种群的分子鉴定

本文使用分子系统发育学研究方法,对采自贵州黎平县的沼水蛙标本进行初步的分子鉴定。结果表明,黎平蛙类样本 16S rRNA 基因序列与 31 条沼水蛙同源序列聚为一个支持率较高的单系(图 1),支系内序列间平均遗传距离为 0.0056,且对应单倍均在同一个单倍型网络内。同时,自测序列与沼水蛙近模式产地(福建福州)一标本的 16S rRNA 基因序列遗传距离较小(<1%)。因此,初步判断该标本属沼水蛙(*Sylvirana guentheri*)。

4.2. 短序列影响

本研究从 Genbank 中下载了 31 条沼水蛙同源序列,其中 3 条序列(KR827771, KR827772, KR827773)长度较短(表 1),相较其它同源序列短约 26%~28%,为探究类似较短同源序列对系统发育分析结果的影响,本文分别在数据集 A1、B1、C1 中删除以上 3 条序列,构成对应的数据集 A2、B2、C2。结果表明,A2、B2、C2 构建的系统发育树结构与没有删除的短序列的对应数据集基本相似。部分节点支持率有差异,但通过对照样本 T 检验,删除前后各关键节点支持率没有显著变化。然后,使用 R 语言程序包 haplotypes,对数据集 C 分析进行单倍型分析时,因为存在短序列而不能顺利构建单倍型网络。在种群动态分析时,删除前后单倍型歧点分布图基本一致,中性检验中, Tajima's D, Fu's Fs D 值以及 R2 检验值都更加偏离 0。因此,短序列的存在可能对于系统发育树的构建设没有较强影响,但分析种群结构及其动态过程存在一定的影响。然后,这种影响的普遍性依赖今后的更多个案分析论证。

5. 结论

本研究使用线粒体 16S rRNA 基因序列作为分子标记,经过 Genbank 搜索比对同源序列,构建系统发育树、单倍型网络并计算遗传距离,初步鉴定所采集标本为沼水蛙(*Sylvirana guentheri*),为贵州黎平地区该物种的分布新记录。同时,研究发现,较短的同源序列对系统发育分析没有显著影响,但会影响基因单倍型网络的构建。

致 谢

感谢六盘水师范学院明湖实验室陈梦、黄影同学在实验室工作方面提供的帮助。

基金项目

国家自然科学基金(31360512);贵州省科技厅自然科学基金(黔科合 J 字 LKLS[2013]06 号);六盘水师范学院科技创新团队项目(LPSSYKJTD201602);国家级大学生创新创业训练计划项目(2020-2510)。

参考文献

- [1] Boulenger, G.A. (1882) Catalogue of the Batrachia Salientia s. Ecaudata in the Collection of the British Museum. Trustees of the British Museum, London, 495.
- [2] Gee, N.G. and Boring, A.M. (1930) A Check List of Chinese Amphibia with Notes on Geographical Distribution. Yenching University, Beijing.
- [3] Boulenger, G.A. (1920) A Monograph of the South Asian, Papuan, Melanesian and Australian Frogs of the Genus *Rana*. *Records of the Indian Museum*, **20**, 1-226. <https://doi.org/10.26515/rzsi/v20/i1/1920/163533>
- [4] Deckert, K. (1938) Beiträge zur Osteologie und Systematik ranider Froschlurche. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin*, **1938**, 127-184.
- [5] 费梁, 叶昌媛, 黄永昭. 中国两栖动物检索[M]. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1990: 364.

- [6] Dubois, A. (1992) Notes sur la classification des Ranidae (*Amphibiens anoures*). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, **61**, 305-352. <https://doi.org/10.3406/linly.1992.11011>
- [7] 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 田婉淑, 江建平, 钟盛先, 李健, 王宜生. 《中国动物志》两栖纲(下卷)无尾目蛙科[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1246-1251.
- [8] 费梁, 叶昌媛, 江建平. 中国两栖动物及其分布彩色图鉴[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2012: 620.
- [9] Oliver, L.A., Prendini, E., Kraus, F. and Raxworthy, C.J. (2015) Systematics and Biogeography of the Hylarana Frog (Anura: Ranidae) Radiation across Tropical Australasia, Southeast Asia, and Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **90**, 176-192. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.05.001>
- [10] Che, J., Chen, H.M., Yang, J.X., Jin, J.Q., Jiang, K., Yuan, Z.Y., Murphy, R.W. and Zhang, Y.P. (2012) Universal COI Primers for DNA Barcoding Amphibians. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 247-258. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03090.x>
- [11] 熊荣川, 田应洲, 李松, 陈红, 于振. 贵州高原分布沼水蛙系统发育地位的初步研究[J]. 六盘水师范学院学报, 2014, 26(4): 55-59.
- [12] 熊荣川, 李明, 田应洲, 李松, 陈红. 贵州兴义华西雨蛙的分子鉴定[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(19): 4865-4867.
- [13] 熊荣川, 田应洲, 李松, 陈红, 于振. 威宁中华蟾蜍的分子鉴定[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(12): 32-36.
- [14] 熊荣川, 田应洲, 李松, 陈红. 泸县沼水蛙 16SrRNA 基因克隆与系统发育分析[J]. 六盘水师范学院学报, 2013, 25(5): 38-42.
- [15] Chen, L., Murphy, R.W., Lathrop, A., Ngo, A., Orlov, N.L., Ho, C.T. and Somorjai, I.L.M. (2005) Taxonomic Chaos in Asian Ranid Frogs: An Initial Phylogenetic Resolution. *The Herpetological Journal*, **15**, 231-243.
- [16] Jiang, J.P. and Zhou, K.Y. (2005) Phylogenetic Relationships among Chinese Ranids Inferred from Sequence Data Set of 12S and 16S rDNA. *The Herpetological Journal*, **15**, 1-8.
- [17] Che, J., Pang, J., Zhao, H., Wu, G.-F., Zhao, E.-M. and Zhang, Y.-P. (2007) Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) Inferred from Mitochondrial and Nuclear Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.032>
- [18] Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F., De Sa, R.O., Channing, A., Wilkinson, M. and Donnellan, S.C. (2006) The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of natural History*, **2006**, 1-291. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)297\[0001:TATOL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)297[0001:TATOL]2.0.CO;2)
- [19] Ziegler, T. (2009) Larval Morphology in Four Species of Hylarana from Vietnam and Thailand with Comments on the Taxonomy of *H. nigrovittata* Sensu Latu (Anura: Ranidae). *Zootaxa*, **2051**, 1-25. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2051.1.1>
- [20] Chen, X.H., Chen, Z., Jiang, J.P., Qiao, L., Lu, Y.Q., Zhou, K.Y., Zheng, G.M., Zhai, X.F. and Liu, J.X. (2013) Molecular Phylogeny and Diversification of the Genus *Odorrana* (Amphibia, Anura, Ranidae) Inferred from Two Mitochondrial Genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 1196-1202. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.023>
- [21] Grosjean, S., Ohler, A., Chuaynkern, Y., Cruaud, C. and Hassanin, A. (2015) Improving Biodiversity Assessment of Anuran Amphibians Using DNA Barcoding of Tadpoles. Case Studies from Southeast Asia. *Comptes Rendus Biologies*, **338**, 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2015.03.015>
- [22] Goutte, S., Dubois, A., Howard, S.D., Marquez, R., Rowley, J.J., Dehling, J.M., Grandcolas, P., Rongchuan, X. and Legendre, F. (2016) Environmental Constraints and Call Evolution in Torrent-Dwelling Frogs. *Evolution*, **70**, 811-826. <https://doi.org/10.1111/evo.12903>
- [23] Yuan, Z.Y., Zhou, W.W., Chen, X., Jr, P.N., Chen, H.M., Jang-Liaw, N.H., Chou, W.H., Matzke, N.J., Iizuka, K. and Min, M.S. (2016) Spatiotemporal Diversification of the True Frogs (Genus *Rana*): A Historical Framework for a Widely Studied Group of Model Organisms. *Systematic Biology*, **65**, 824-842. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw055>
- [24] Jiang, L., Wu, B., Luo, J., Xu, Z. and Huang, N. (2020) Characterization of Complete Mitochondrial Genome of *Hylarana guentheri* (Anura: Ranidae) and Its Phylogenetic Implication. *Mitochondrial DNA Part B*, **5**, 616-618. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1711216>
- [25] Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- [26] Zhang, D., Gao, F., Jakovlić, I., Zou, H., Zhang, J., Li, W.X. and Wang, G.T. (2020) PhyloSuite: An Integrated and Scalable Desktop Platform for Streamlined Molecular Sequence Data Management and Evolutionary Phylogenetics Studies. *Molecular Ecology Resources*, **20**, 348-355. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13096>
- [27] Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A. and Jermini, L.S. (2017) ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nature Methods*, **14**, 587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

- [28] Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A. and Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **32**, 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- [29] Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. and Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, **61**, 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- [30] Paradis, E. (2010) pegas: An R Package for Population Genetics with an Integrated-Modular Approach. *Bioinformatics*, **26**, 419-420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- [31] Librado, P. and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- [32] Ramos-Onsins, S.E. and Rozas, J. (2002) Statistical Properties of New Neutrality Tests against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092-2100. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004034>