

Molecular Identification of a *Rana hanluica* Population Distributed in Youyang County, Chongqing City in China

Sijin Zhu, Xilin Zhang, Shuang Zhang, Rong Zhang, Shan Liu, Rongchuan Xiong

Minghu Laboratory, College of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui Guizhou

Email: xiongrongchuan@126.com

Received: Dec. 18th, 2017; accepted: Dec. 28th, 2017; published: Jan. 4th, 2018

Abstract

In September 17th, 2014, a frog specimen was collected from Youyang County, Chongqing City in China and identified as *Rana hanluica* morphologically. However, the *Rana hanluica* frogs are usually recorded in the Hunan province, Jiangxi province, Guizhou province and Guangxi province in most scientific documentation, and there is no distribution record in Chongqing City. So, it needs further species delimitation based on molecular biological methods. Then DNA extraction and PCR experiments were conducted with the tissue of the specimen to amplify the mitochondrial 16S rRNA gene for further phylogenetic analysis and molecular identification. The results showed that the 16S rRNA gene sequence from the frog specimen in Youyang was clustered into a monophyletic group with 3 homologous sequences of *Rana hanluica*. And the target sequence shared the same haplotype with a sequence from the type locality of *Rana hanluica*. Therefore, the Youyang frog specimen was preliminary identified as *Rana hanluica*. This is a new record of amphibians in Chongqing city. We also discussed the validation of some *Rana* species in this study.

Keywords

Rana hanluica, 16S rRNA, Molecular Identification, Chongqing

重庆酉阳分布寒露林蛙的分子鉴定

朱思瑾, 张细林, 张爽, 张蓉, 刘珊, 熊荣川

六盘水师范学院生物科学与技术学院明湖实验室, 贵州 六盘水

Email: xiongrongchuan@126.com

收稿日期：2017年12月18日；录用日期：2017年12月28日；发布日期：2018年1月4日

摘要

于2014年9月17日在重庆市酉阳县中采集到一蛙科标本，经初步形态鉴定为寒露林蛙。然而，之前文献记载寒露林蛙主要分布在湖南、江西、贵州、广西等地，尚无在重庆分布的记载，因此有必要使用分子生物学研究方法做进一步的物种鉴定。对该标本的肌肉样本进行DNA提取及PCR实验，扩增线粒体16S rRNA基因并进行系统发育分析及分子鉴定。结果表明，酉阳蛙类样本16S rRNA基因序列与3条寒露林蛙16S基因序列聚为一个单系，且与寒露林蛙模式产地湖南双牌一标本的16S rRNA基因序列共享同一个单倍型。因此，初步判断该标本属寒露林蛙(*Rana hanluica*)，为重庆市两栖动物一新纪录。本文还对部分林蛙类物种的有效性进行了讨论。

关键词

寒露林蛙，16S rRNA，分子鉴定，重庆

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

寒露林蛙(*Rana hanluica*)属无尾目(Anura)蛙科(Ranidae)林蛙属(*Rana*)，因其繁殖季节在中国农历二十四节气中的寒露节前后而得名，模式产地为湖南双牌[1]，是我国特有的一种蛙类[2]。近年来，陆续在江西齐云山[3]，湖南南岳衡山[4]、莽山[5]，贵州雷公山[6]、梵净山[7]以及广西猫儿山[8]等地报道了寒露林蛙的分布，说明该物种的确切分布范围还需要进一步研究确定。本研究于2014年9月17日在重庆市酉阳县境内采集到一蛙科标本，经初步形态鉴定为寒露林蛙(*Rana hanluica*)，但之前并没有该物种在重庆境内分布的文献记载，因此有必要使用分子手段对其分类地位进行准确界定。本文对采自重庆市酉阳县的寒露林蛙标本进行DNA提取，并克隆其线粒体16S rRNA基因片段(以下简称16S基因)，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

寒露林蛙(*Rana hanluica*)标本(图1)为2014年9月17日采自重庆市酉阳县青华林场的一号雌性标本(标本号：LPSYY2014091704)，保存于六盘水师范学院动物标本馆。

使用电子游标卡尺(精确到0.1 mm)对该标本26个形态性状进行量度：头体长(62.20 mm)，头长(21.90 mm)，头宽(20.26 mm)，吻长(8.94 mm)，眼径(5.36)，上眼睑宽(3.73 mm)，上眼睑长(6.94 mm)，眼间距(4.42 mm)，鼻间距(5.16 mm)，鼻吻距(3.96 mm)，鼻眼距(5.45 mm)，前眼角距(8.72 mm)，后眼角距(12.70 mm)，鼓膜径(4.06 mm)，鼓膜-眼距(1.81 mm)，前臂及手长(24.21)，手长(14.06 mm)，股长(32.88 mm)，胫长(36.95)，胫宽(8.11 mm)，跗足长(49.02)，足长(33.65 mm)，外掌突长(2.98 mm)，外掌突宽(1.53 mm)，内蹠突长(2.62 mm)，内蹠突宽(1.52 mm)。



Figure 1. Dorsum view, venter view and lateral view of the specimen in this study

图 1. 本研究所用标本的背面(左上)、腹面(右上)及侧面照(下)

2.2. 总 DNA 提取及目的基因片段的扩增

取标本腿部新鲜肌肉组织适量, 90%酒精固定后, 使用动物组织 DNA 提取试剂盒(FOREGENE, DE-05011: 250 Preps)提取总 DNA, -20°C 保存备用。扩增引物 P7/P8 为脊椎动物通用的线粒体 16S rRNA 基因片段扩增引物[9]。所扩增目的序列对应峨眉林蛙 *Rana omeimontis* 线粒体基因组(Genbank 索取号 KU246050) 2169-2704 bp 区间位置, 对应峨眉林蛙 16S rRNA 全基因(Genbank 索取号 KU246050) 885-1420 bp 区间位置。

PCR 反应条件: 反应体积为 50 ul, 其中北京全式金公司配备反应缓冲液 $2 \times$ EasyTaq PCR SuperMix 25 ul, 总 DNA 模板 2 ul(含 10~100 ng), 上、下游引物各 2 ul(10 uM), 用 ddH₂O 补足 50 ul。扩增 PCR 反应程序为 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 40 s, 52°C 退火 40 s, 72°C 延伸 40 s, 循环次数为 35 次; 72°C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送测序公司测序。

2.3. 参考基因序列下载及系统发育分析

将所测得的寒露林蛙 16S 基因序列经过上传 GenBank 进行搜索比对(megablast)获得 100 条初步的参考序列, 与待定基因序列一起构成数据集 A。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 MUSCLE [10]程序对序列进行比对, 辅以人工校对。在 MEGA7 [11]中筛选最适合该数据集序列演化模型以供最大似然法(Maximum likelihood, ML)分析和贝叶斯分析(Bayesian inference methods)。根据 BIC 标准, 适合本数据集的模型 K2+G+I。使用 MEGA7 构建最大似然树(Maximum likelihood tree, ML tree), 相应地设置模型为 Kimura 2-parameter model(K2), 在位点间速率变异模式(Rates among Sites)设置为 Gamma distributed with Invariant sites (G+I)。最大似然树支持率大于 70%表明该支系关系得到充分解决, 在 50% - 70%之间为中度支持, 否则视为未解决。使用 Mrbayes 3.2 [12]构建贝叶斯树(Bayesian inference

tree, BI tree)。贝叶斯树支持率大于 95%表明该支系关系得到充分解决, 在 75%~95%之间为中度支持, 否则视为未解决。使用 MEGA7[11]软件构建邻接树(Neighbor-Joining Tree, NJ tree)和最大简约树(Maximum Parsimony Tree, MP tree), 自举检验支持率大于 70%表明该支系关系得到充分解决, 在 50%~70%之间为中度支持, 否则视为未解决。

2.4. 单倍型网络构建

根据双重单系法[13] [14], 在数据集构建的系统发育树上, 以自测序列(MG461221)为起点向根部回溯两个单系中间节点, 从而得到包含自测序列及其近缘物种同源基因序列构成数据集 B。对数据集 B 进一步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 MUSCLE [10]程序对序列进行比对, 辅以人工校对。在 MEGA7 [11]中筛选最适合该数据集序列演化模型以供最大似然法(Maximum likelihood, ML)分析。根据 BIC 标准, 适合本数据集的模型 K2+G。使用 MEGA7 构建最大似然树(Maximum likelihood tree, ML tree), 相应地设置模型为 Kimura 2-parameter model (K2), 在位点间速率变异模式(Rates among Sites)设置为 Gamma distributed(G)。最大似然树支持率大于 70%表明该支系关系得到充分解决, 在 50%~70%之间为中度支持, 否则视为未解决。

另外, 使用 R 语言程序包 haplotypes [15], 分析数据集 B 的单倍型类型并绘制单倍型网络。设置简约上限(parsimony limit)时, 默认值为 0.95, 考虑到要将不同的物种划分到独立的网络中去, 本研究中简约上限设置为 0.97。

3. 结果

3.1. PCR 扩增及测序结果

经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 引物 P7/P8 扩增到 550 bp 左右的基因片段(GenBank 索取号:MG461221)。序列碱基组成存在明显的偏向性: AT 含量较高(A: 28.5%, T: 25.6%); GC 含量较低(G: 20.9%, C: 24.9%)。

3.2. 支系分化

将所测得寒露林蛙 16S 基因序列提交 Genbank 进行搜索比对, 其与 Genbank 中的已有寒露林蛙序列(HQ228158)相似度最高, 下载搜索得到的 100 条同源序列与待鉴定目标序列构成 16S 序列数据集 A。基于不同的分析方法(ML、BI、NJ、MP)对该数据集构建的系统发育树, 都支持本研究的自测序列(MG461221)与 3 条寒露林蛙 16S 基因序列聚为一个单系(图 2, 寒露林蛙支系, 序列基本信息见表 1), 然而该支系与其它支系(非寒露林蛙支系)的聚类关系在各种方法构建的系统发育树间差异较大, 且支持率较低。

3.3. 单倍型网络图

基于数据集 B 构建的单倍网络在将简约上限设置为默认值 0.95 时, 只能得到两个独立的单倍型网络, 考虑到数据集 B 包含了 8 个名义物种, 而通常每个单倍型网络对应一个物种。所以, 根据系统发育树的主要支系分化的拓扑结构, 将简约上限设置 0.97, 以得到更多的相互独立的单倍型网络(4 个单倍型网络分别为 Net01、Net02、Net03、Net04, 图 3)。

4. 讨论

4.1. 物种鉴定及省级新纪录

本研究成功扩增了重庆市酉阳县一林蛙标本的线粒体 16S rRNA 基因部分序列, 经过基于不同推断方法的系统发育分析, 其与 3 条寒露林蛙同源序列以较高的支持率聚为一个独立支系, 最大似然率、贝

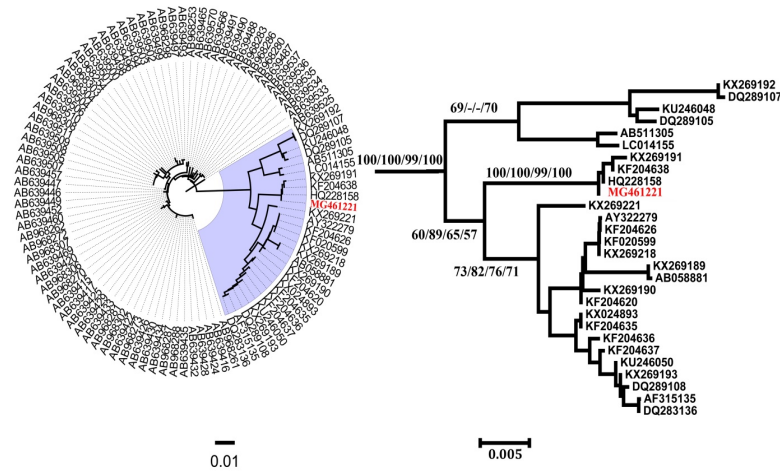


Figure 2. The neighbor-joining tree (ring topology) based on the dataset A and the *Rana hanluica* clade with support rates under different analysis (ML bootstrap/Bayesian posterior probability/MP bootstrap/NJ bootstrap)

图 2. 基于数据集 A 构建的邻接树(环形树)及寒露林蛙支系在不同方法构建的系统发育树中的支持率(最大似然率/贝叶斯后验概率/最大简约法自举检验支持率/邻接法自举检验支持率)



Figure 3. The haplotype network based on the dataset B. Net01 is the haplotype network for *Rana omeimontis*, *Rana longicrus*, *Rana jiemuxiensis*, *Rana culaiensis*, *Rana zhenhaiensis* and Net02, Net03, Net04 for *Rana hanluica*, *Rana japonica*, *Rana chaochiaoensis* respectively

图 3. 基于数据集 B 构建的单倍型网络图。Net01 为峨眉林蛙、长肢林蛙、借母溪林蛙、徂徕林蛙、镇海林蛙组成的单倍型网络，Net02 为寒露林蛙单倍型网络，Net03 为日本林蛙单倍型网络，Net04 为昭觉林蛙单倍型网络

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

物种名	GenBank 索取号	标本号	采集地	数据来源
<i>Rana hanluica</i>	MG461221	LPSYY2014091704	中国重庆酉阳县	本研究
<i>Rana hanluica</i>	HQ228158	SYNU0700490	中国湖南双牌县	[16]
<i>Rana hanluica</i>	KF204638	SYNU07100427	中国湖南双牌县	Genbank
<i>Rana hanluica</i>	KX269191	KIZGX07112915	中国广西桂林猫儿山	[8]
<i>Rana chaochiaoensis</i>	DQ289105	(未知)	中国云南中甸县	[17]
<i>Rana chaochiaoensis</i>	DQ289107	SCUM0405170CJ	中国四川昭觉县	[18]
<i>Rana chaochiaoensis</i>	KU246048	SM-ZJLW-01	中国四川石棉县	Genbank
<i>Rana chaochiaoensis</i>	KX269192	SCUM0405170CJ	中国四川昭觉县	[8]
<i>Rana culaiensis</i>	KF204620	SYNU07050129	中国山东泰安	[19]
<i>Rana culaiensis</i>	KX269190	KIZ-SD080501	中国山东泰安	[8]
<i>Rana japonica</i>	AB511305	IABHU 17624	日本广岛	[20]
<i>Rana japonica</i>	DQ283136	FMNH_232896	中国四川洪雅县	[21]
<i>Rana japonica</i>	LC014155	(未知)	日本广岛	[22]
<i>Rana jiemuxiensis</i>	KX269221	KIZ-HUN0708013	中国湖南借母溪	[8]
<i>Rana longicrus</i>	AB058881	GenBank	中国台湾台北	[17]
<i>Rana longicrus</i>	KX269189	NMNS15022	中国台湾苗栗县	[8]
<i>Rana omeimontis</i>	AF315135	GenBank	中国四川峨眉山	[17]
<i>Rana omeimontis</i>	DQ289108	GenBank	中国四川洪雅县	[17]
<i>Rana omeimontis</i>	KF204635	SYNU08060314	中国四川峨眉山	[19]
<i>Rana omeimontis</i>	KF204636	SYNU08060315	中国四川峨眉山	[19]
<i>Rana omeimontis</i>	KF204637	SYNU08060317	中国四川峨眉山	[23]
<i>Rana omeimontis</i>	KU246050	YC-EMLW-01	中国四川雅安	Genbank
<i>Rana omeimontis</i>	KX024893	SYNU08060314	中国四川峨眉山	[19]
<i>Rana omeimontis</i>	KX269193	SCUM0405196CJ	中国四川洪雅县	[8]
<i>Rana zhenhaiensis</i>	AY322279	NJNU F97004	中国	[18]
<i>Rana zhenhaiensis</i>	KF020599	SYNU08040100	中国浙江杭州	[16]
<i>Rana zhenhaiensis</i>	KF204626	SYNU08040101	中国浙江杭州	[19]
<i>Rana zhenhaiensis</i>	KX269218	KIZ0803271	中国浙江宁波镇海区	[8]

叶斯后验概率、最大简约法及邻接法自举检验值也都大于 99%，证明该支系的单系性。因此可以初步判断该标本为寒露林蛙(*Rana hanluica*)。

在基于数据集 B 构建单倍型网络过程中，简约上限设置为默认值 0.95 时只能得到两个独立的单倍型网络，考虑该数据集中名义物种较多，提高简约上限以得到更多独立的单倍型网络。在简约上限设置为 0.97 时，得到 4 个单倍型网络，其中峨眉林蛙、长肢林蛙、借母溪林蛙、徂徕林蛙、镇海林蛙仍然相互联结在同一个单倍型网络(Net01)，而此时包含本研究自测序列及 3 条寒露林蛙序列的支系已经独立为单

独的单倍型网络,且自测序列(MG461221)和一条来自寒露林蛙模式产地湖南双牌的序列(HQ228158)共享同一个单倍型,证明本研究的林蛙标本应属寒露林蛙。寒露林蛙之前主要分布于湖南[4] [5] [24]、江西[3]、贵州[6] [7]、广西[8]等地,为重庆市两栖动物新纪录。

4.2. 部分林蛙物种有效性初探

使用最大简约法构建基于数据集 B 的单倍型网络图,结果显示,在简约上限设置为默认值 0.95 时,只能得到两个独立的单倍型网络。将简约上限进一步提高到 0.97 时,得到了更多的独立的单倍型网络,寒露林蛙,昭觉林蛙等都自成一个单独的单倍型网络,然而本研究中的长肢林蛙、徂徕林蛙、镇海林蛙、借母溪林蛙仍然共享同一个单倍型网络。进一步分析显示,该单倍型网络分成三个主要支系:峨眉林蛙单倍型支系,借母溪林蛙支系以及徂徕林蛙、长肢林蛙、镇海林蛙支系。前两者在单倍型网络上相对独立,然而后者中,三个物种的单倍型相互嵌套,因此三者的物种有效性还有待进一步研究。

致 谢

感谢六盘水师范学院生物科学与技术学院田应洲教授、李松教授在野外工作方面提供的帮助;感谢生物科学与技术学院陆珍、杨柳青等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);贵州省教育厅自然科学研究重点项目(黔教合 KY 字[2015]387 号);六盘水师范学院科技创新团队项目(LPSSYKJTD201602);贵州省普通高等学校创新人才团队项目(黔教合人才团队字[2015] 72 号)。

参考文献 (References)

- [1] 沈猷慧,江建平,杨道德. 中国林蛙属(无尾目:蛙科)一新种——寒露林蛙 *Rana hanluica* sp. nov [J]. 动物学报 (Current Zoology), 2007, 53(3): 481-488.
- [2] 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: 365-400.
- [3] 杨道德,刘松,费冬波,等. 江西齐云山自然保护区两栖爬行动物资源调查与区系分析[J]. 动物学杂志, 2008, 43(6): 68-76.
- [4] 莫吉炜,杨道德,刘松. 湖南南岳衡山国家级自然保护区两栖动物资源垂直分布[J]. 四川动物, 2009, 28(1): 145-146.
- [5] 傅祺,杨道德,费冬波,等. 湖南莽山国家级自然保护区两栖动物资源调查与分析[J]. 动物学杂志, 2012, 47(4): 62-67.
- [6] 陈继军,古定豪,侯德华,等. 贵州发现寒露林蛙[J]. 动物学杂志, 2017, 52(1): 155-157.
- [7] 吕敬才,李仕泽,牛克锋,等. 梵净山国家级自然保护区两栖动物多样性及区系组成[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(1): 148-152.
- [8] Yuan, Z.Y., Zhou, W.W., Chen, X., et al. (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>
- [9] Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., et al. (1994) Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- [10] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- [11] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology & Evolution*, **33**, 1870. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- [12] Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., et al. (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>

- [13] 熊荣川, 田应洲, 李松, 等. 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, 李明, 田应洲, 等. 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.
- [15] Aktas, C. (2015) Haplotypes: Haplotype Inference and Statistical Analysis of Genetic Variation. R Package Version 1.0.
- [16] Zhou, Y., Yang, B.T., Li, P.P., *et al.* (2015) Molecular and Morphological Evidence for *Rana kunyuensis* as a Junior Synonym of *Rana coreana* (Anura: Ranidae). *Journal of Herpetology*, **49**, 302-307. <https://doi.org/10.1670/13-111>
- [17] Yang, B.T., Lu, Y.Y. and Li, P.P. (2010) Discussion on Validity of *Rana Maoershanensis* Based on Partial Sequence of 16S rRNA Gene. *Asian Herpetological Research*, **1**, 97-102.
- [18] Che, J., Pang, J.F., Zhao, H., *et al.* (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>
- [19] 周瑜. 中国及东北亚地区林蛙分子系统学及生物地理学研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2014.
- [20] Kurabayashi, A., Yoshikawa, N., Sato, N., *et al.* (2010) Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Endangered Frog *Odorrana ishikawae* (Family Ranidae) and Unexpected Diversity of mt Gene Arrangements in Ranids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 543-553. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.022>
- [21] Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., *et al.* (2006) The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of natural History*, **297**, 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)
- [22] Igawa, T., Komaki, S., Takahara, T., *et al.* (2015) Development and Validation of PCR-RFLP Assay to Identify Three Japanese Brown Frogs of the True Frog Genus *Rana*. *Current Herpetology*, **34**, 89-94. <https://doi.org/10.5358/hsi.34.89>
- [23] 周瑜, 杨宝田. 基于线粒体 Cyt b 和 COI 基因的中国林蛙系统发生关系[J]. 长春师范大学学报, 2014(4): 70-76.
- [24] 杨道德, 熊建利, 冯斌, 等. 湖南阳明山国家级自然保护区两栖爬行动物资源调查[J]. 四川动物, 2009, 28(1): 127-132.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-1724, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: ojs@hanspub.org