

# 贵州凤岗地区华西雨蛙的分子鉴定

李明<sup>1</sup>, 熊荣川<sup>2\*</sup>, 田霞<sup>2</sup>, 严佳乐<sup>2</sup>, 范志艳<sup>2</sup>, 朱楚玉<sup>2</sup>, 袁丽娟<sup>2</sup>, 黄珊珊<sup>2</sup>

<sup>1</sup>六盘水市第二十中学, 贵州 六盘水

<sup>2</sup>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: 2025年3月17日; 录用日期: 2025年5月2日; 发布日期: 2025年5月12日

## 摘要

华西雨蛙(*Hyla annectans*)首次发现于印度, 在中国广泛分布, 因此无论是物种还是亚种都一直是两栖动物多样性的研究热点, 理清相关分类单元的分类地位有赖于更丰富的种群样本和研究手段。本研究于2019年5月在贵州省遵义市凤岗县进化镇采集到2个蛙类标本, 经初步形态鉴定为华西雨蛙, 但之前并没有该物种在凤岗县分布的文献记载。因此对标本进行DNA提取, 并PCR扩增其线粒体16S rRNA基因片段, 使用分子系统发育学方法对其进行分子鉴定。结果表明, 凤岗所采蛙类样本16S rRNA基因序列与7条华西雨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0.0109, 且对应序列单倍型均在同一个单倍型网络内。自测序列与华西雨蛙兴义种群标本的16S rRNA基因序列遗传距离较小。因此, 初步判断该标本属华西雨蛙(*Hyla annectans*)。种群中性检验分析, 没有检测到华西雨蛙在较近的历史上有种群扩张的证据。另外, 本文探讨了相距较远的印度种群同源序列对相关系统发育分析结果的影响。

## 关键词

华西雨蛙, 16S rRNA, 分子鉴定, 凤岗

## Molecular Identification of a *Hyla annectans* Population Distributed in Fenggang County, Guizhou Province in China

Ming Li<sup>1</sup>, Rongchuan Xiong<sup>2\*</sup>, Xia Tian<sup>2</sup>, Jiale Yan<sup>2</sup>, Zhiyan Fan<sup>2</sup>, Chuyu Zhu<sup>2</sup>, Lijuan Yuan<sup>2</sup>, Shanshan Huang<sup>2</sup>

\*通讯作者。

文章引用: 李明, 熊荣川, 田霞, 严佳乐, 范志艳, 朱楚玉, 袁丽娟, 黄珊珊. 贵州凤岗地区华西雨蛙的分子鉴定[J]. 自然科学, 2025, 13(3): 486-493. DOI: 10.12677/ojns.2025.133051

<sup>1</sup>The Twentieth Middle School of Liupanshui, Liupanshui Guizhou

<sup>2</sup>College of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui Guizhou

Received: Mar. 17<sup>th</sup>, 2025; accepted: May 2<sup>nd</sup>, 2025; published: May 12<sup>th</sup>, 2025

## Abstract

*Hyla annectans* was first discovered in India and is widely distributed in China. Therefore, both the species and its subspecies have always been research hotspots for amphibian diversity. Clarifying the taxonomic status of related taxonomic units relies on richer population samples and research methods. In May 2019, two frog specimens were collected in Jinhua Town, Fenggang County, Zunyi City, Guizhou Province. Preliminary morphological identification indicated that they were *Hyla annectans*, but there was no previous literature record of this species distributed in Fenggang County. Therefore, DNA extraction was performed on the specimens, and their mitochondrial 16S rRNA gene fragments were amplified by PCR. Molecular phylogenetic methods were used for molecular identification. The results showed that the 16S rRNA gene sequence of the specimens collected in Fenggang clustered with seven homologous sequences of *Hyla annectans* into a highly supported monophyletic clade. The average genetic distance between sequences within the clade was 0.0109, and the corresponding haplotypes were all within the same haplotype network. The genetic distance between the self-tested sequence and the 16S rRNA gene sequence of the Xingyi population of *Hyla annectans* was relatively small. Therefore, it is preliminarily determined that the specimen belongs to *Hyla annectans*. Population neutrality test analysis did not detect evidence of population expansion in *Hyla annectans* in recent history. In addition, this article discussed the impact of homologous sequences from distant Indian populations on the results of related phylogenetic analysis.

## Keywords

*Hyla annectans*, 16S rRNA, Molecular Identification, Fenggang

Copyright © 2025 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

华西雨蛙(*Hyla annectans*)属无尾目(Anura)雨蛙科(Hylidae)两栖动物,首次发现于印度东部 Meghalaya 地区[1],在中国分布于贵州、湖南、湖北、广西、重庆、四川、云南等省[2]。根据其形态特征和地理分布区将中国境内华西雨蛙分为5个亚种[3],即分布于云南贡山县等地贡山亚种 *Hyla annectans gongshanensis*,分布于湖南桑植县等地武陵亚种 *Hyla annectans wulingensis*,分布于四川盆地西缘山区川西亚种(*Hyla annectans chuanxiensis*),分布于云南景东至四川西昌一带景东亚种(*Hyla annectans jingdongensis*),分布于云南腾冲、泸水地区腾冲亚种(*Hyla annectans tengchongensis*)。有学者认为中国分布华西雨蛙与印度种群形态差异明显,且相距较远,建议将中国分布的种群提升为种(*Hyla gongshanensis*) [4]。贵州绥阳、印江、江口、贵定、安顺、六盘水等多地有华西雨蛙分布[2]。

本研究于2019年5月在贵州省遵义市凤岗县进化镇采集到2个蛙类标本,经初步形态鉴定为华西雨蛙,但之前并没有该物种在凤岗地区分布的文献记载,因此有必要使用分子鉴定方法对其分类地位进行准确界定。本文对采自贵州凤岗县的华西雨蛙标本进行DNA提取,PCR扩增其线粒体16S rRNA基因片

段(以下简称 16S 序列), 搜索同源序列构建系统发育树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

2 号华西雨蛙标本(LPSFG2019050307, LPSFG2019050308)于 2019 年 5 月采自贵州省遵义市凤岗县进化镇, 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[5]。所扩增目的序列对应华西雨蛙(*Hyla annectans*)线粒体基因组(Genbank 索取号 KM271781) 4708-5270 bp 区间位置, 对应华西雨蛙 16S rRNA 全基因(Genbank 索取号 KM271781) 874-1436 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 中相关同源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 条华西雨蛙 16S 序列经过上传 GenBank 进行搜索比对, 按照数据库中同源参考序列与自测序列比对的 bit score 值从高到低进行排序, 并计算前 100 条参考序列 bit score 值的总和为“百序列总 bit score 值”, 设“百序列总 bit score 值”最高的自测序列为“最优自测序列”。D624、D626 的“百序列总 bit score 值”分别为 83,832, 83,948, 选定 D626 为最优序列。将 D626 上传 GenBank 进行搜索比对, 下载 Genbank 中的 100 条参考序列, 与 2 条自测序列一起构成数据集 A1。根据双重单系法[6], 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, 未入选 B1 数据集的序列作为外群序列集(Outgroup); 其中华西雨蛙序列构成数据集 C1 用于后续种群遗传学分析。为探索印度种群同源序列对分子鉴定的影响, 在以上数据集中分别删除印度同源序列(OQ079503), 分别构建数据集 A2、B2 及 C2。

### 2.4. 系统发育分析

参照本课题组之前的研究[7], 基于数据集 A1、B1、A2、B2 构建贝叶斯树(Bayesian Inference Tree, BI tree)、最大简约树(Maximum Parsimony Tree, MP tree)以及邻接树(Neighbor-Joining Tree, NJ tree)。使用 Mega12 构建最大似然树(Maximum Likelihood Tree, ML tree)[8], 并计算序列间的遗传距离。使用 R 语言程序包 pegas, 对删除印度同源序列前后, 支系间遗传距离进行曼特尔检验(Mantel Test)及配对样本 t 检验(paired Student's t-test), 当统计分析 P 值小于 0.05 时, 认为差异具有统计学意义。

### 2.5. 种群动态分析

基于数据集 C1, 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 绘制单倍型歧点分布图并进行  $R_2$  中性检验(Ramos-Onsins-Rozas Test of Neutrality、 $R_2$  test)[9], 利用 DnaSP v5 软件对华西雨蛙群体进行 Tajima's  $D$  和 Fu's  $F_s$  中性检测[10]。

## 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 560 bp 左右的基因片段(DNA 序列编号: D624, D626)。2 条 A、T、G、C 含量分别为 30.2%、25.9%、20.2%、23.8%。

### 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 A 构建的系统发育树中(图 1), 自测序列与 7 条华西雨蛙 16S 基因序列(表 1)聚为一个单系 N01(表 2)。该华西雨蛙支系进一步与中国雨蛙(*Hyla chinensis*)、三港雨蛙(*Hyla sanchiangensis*)构成一个支持率较高的第二重单系 N04。华西雨蛙支系内部没有明显的支系分化。中国雨蛙支系(N02)、三港雨蛙支系(N03)支持率较高, 其中, 三港雨蛙支系与华西雨蛙支系聚在一起。

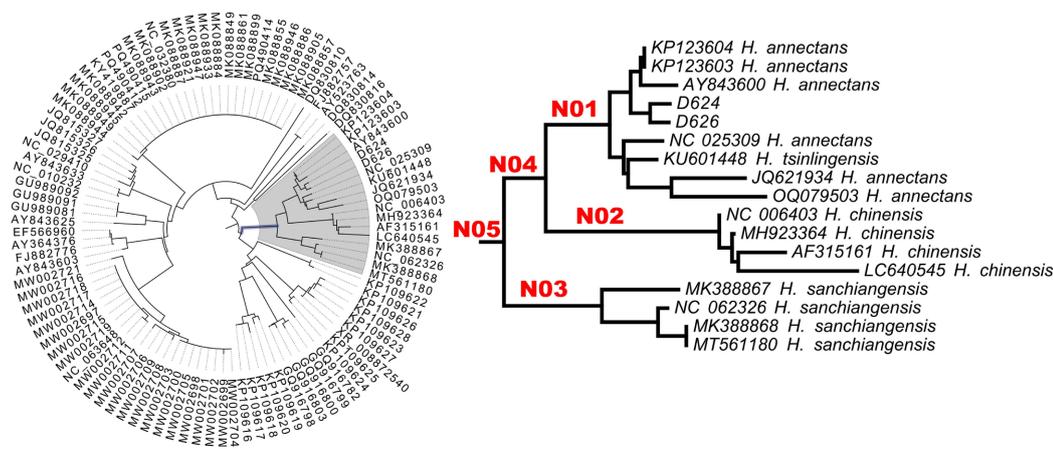
**Table 1.** The sequence information of *Hyla annectans* in this study

**表 1.** 本研究中华西雨蛙序列信息

序号	Genbank 索取号	标本号	单倍型	采集地	数据来源
1	AY843600	ROM_40304	Hap1	越南	[11]
2	D624	LPSFG2019050307	Hap2	贵州省遵义市凤冈县	本研究
3	D626	LPSFG2019050308	Hap2	贵州省遵义市凤冈县	本研究
4	JQ621934	未知	Hap3	未知	Genbank
5	KP123604	LPSXY2014062501	Hap4	贵州省兴义市	[5]
6	KP123603	LPSXY2014062308	Hap4	贵州省兴义市	[5]
7	KU601448	原文未告知	Hap5	安徽省安庆市岳西县	[12]
8	NC_025309	剪趾取样	Hap6	云南省曲靖市	[13]
9	OQ079503	WT133/5611	Hap7	印度	[14]

### 3.3. 遗传距离

保留印度华西雨蛙 16S 同源序列(OQ079503), 华西雨蛙支系(N01)内部序列间平均遗传距离为 0.0109 (0.0000~0.0217); 去掉印度同源序列, 华西雨蛙支系内部序列间平均遗传距离为 0.0081 (0.0000~0.0143)。华西雨蛙支系与中国雨蛙支系间遗传距离较近(表 3), 外群与三港雨蛙支系的遗传距离高于华西雨蛙及中国雨蛙支系(表 3)。经 Mantel 检验, 删除印度同源序列前后, 支系间遗传距离最小值( $z = 0.01003264$ ,  $p = 0.101$ )、最大值( $z = 0.02451536$ ,  $p = 0.073$ )及平均值( $z = 0.01734283$ ,  $p = 0.083$ )均无显著差异。经配对样本 t 检验, 删除印度同源序列前后, 支系间遗传距离最小值( $t = 1$ ,  $df = 9$ ,  $p = 0.3434$ )、最大值( $t = 1.5467$ ,  $df = 9$ ,  $p = 0.1563$ )及平均值( $t = 0.82314$ ,  $df = 9$ ,  $p = 0.4317$ )均无显著差异。



**Figure 1.** Separating the homologous sequences of focal sequences (D624, D626) with the double monophyletic analysis  
**图 1.** 双重单系法提取目标序列(D624, D626)的同源序列

**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
A1	BI	76	100	100	96	100
A1	ML	59	100	97	91	92
A1	NJ	75	100	97	72	99
A1	MP	47	100	91	NA	88
B1	BI	72	100	100	100	NA
B1	ML	40	100	100	100	NA
B1	NJ	83	100	100	100	NA
B1	MP	71	99	100	100	NA
A2	BI	73	100	99	90	99
A2	ML	75	99	93	62	80
A2	NJ	87	99	97	69	99
A2	MP	68	99	90	54	78
B2	BI	78	100	100	100	NA
B2	ML	65	99	99	99	NA
B2	NJ	88	99	100	100	NA
B2	MP	68	98	99	99	NA

**Table 3.** Genetic distance information table of 16S sequences between and within clades in this study  
**表 3.** 本研究中支系间及支系内 16S 序列遗传距离信息表

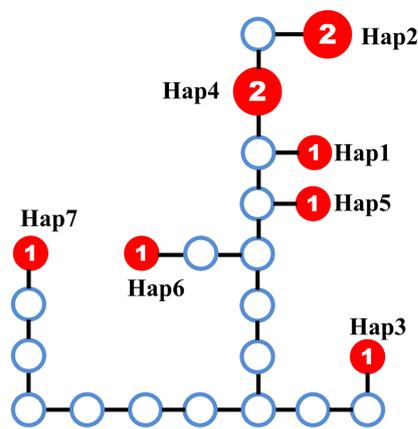
比较支系组合	最小值	最大值	平均值	保留 OQ079503		
				最小值	最大值	平均值
				去掉 OQ079503		
N01 VS N02	0.0219	0.0434	0.0328	0.0219	0.0425	0.0324
N01 VS N03	0.0291	0.0393	0.0328	0.0291	0.0357	0.0324
N01 VS Outgroup	0.0465	0.0784	0.0647	0.0465	0.0781	0.0644
N02 VS N03	0.0320	0.0444	0.0380	0.0320	0.0444	0.0380
N02 VS Outgroup	0.0540	0.0888	0.0731	0.0540	0.0888	0.0739
N03 VS Outgroup	0.0519	0.0726	0.0646	0.0501	0.0728	0.0652
N01 VS N01	0.0000	0.0217	0.0109	0.0000	0.0143	0.0081
N02 VS N02	0.0018	0.0155	0.0086	0.0018	0.0155	0.0086
N03 VS N03	0.0000	0.0142	0.0083	0.0000	0.0142	0.0083
Outgroup VS Outgroup	0.0000	0.0870	0.0472	0.0000	0.0870	0.0472

### 3.4. 种群动态

基于数据集 C1, 分析得到 7 个单倍型, 其单倍型网络(表 1, 图 2)表明自测序列在同一单倍型分支上, 与贵州兴义同源序列(Hap4)关系最近。采自印度的华西雨蛙 16S 同源序列单倍型(Hap7)与其他种群单倍型分隔较远。

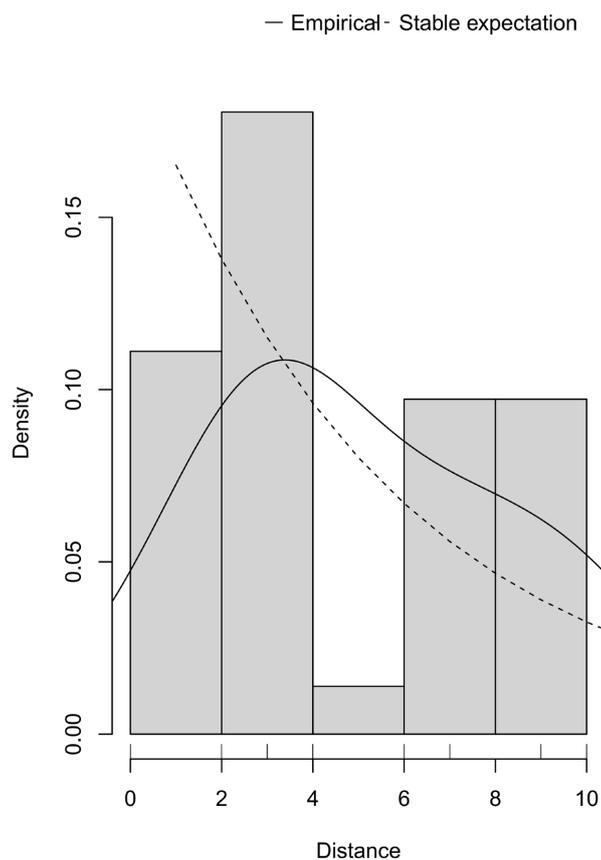
单倍型歧点分布图呈双峰型(图 3), 数据集 C1 经中性检验 Tajima's  $D$  ( $-0.93346$ ,  $p > 0.1$ )和 Fu's  $F_s$  ( $-0.87265$ ,  $p > 0.1$ )均为负值, 但不显著,  $R_2$  检验值为  $0.1249551$  ( $0.10 > p > 0.05$ )。数据集 C2, 经中性检

验 Tajima's  $D$  ( $-0.62172, p > 0.1$ ) 和 Fu's  $F_s$  ( $-0.67320, p > 0.1$ ) 均为负值, 但不显著,  $R_2$  检验值为  $0.1313576$  ( $p > 0.1$ )。数据集 C1 和 C2 的中性检验结果基本一致, 虽然 Tajima's  $D$  和 Fu's  $F_s$  值皆为负数, 但不显著,  $R_2$  检验则也不显著, 与单倍型歧点分布图双峰形态契合, 即不支持华西雨蛙种群在较近的历史上可能有种群扩张。这一结果与之前基于华西雨蛙简化基因组测序的研究结果一致[15]。



**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序列数目



**Figure 3.** Mismatch distribution chart of the 16S haplotypes from the *Hyla annectans* samples

**图 3.** 华西雨蛙 16S 序列单倍型歧点分布图

## 4. 讨论

### 4.1. 华西雨蛙凤岗种群的分子鉴定

本文使用分子系统发育学研究方法,对2号采自贵州凤岗县和华西雨蛙标本进行初步的分子鉴定。结果表明,排除具有一定争议的印度种群同源序列,凤岗蛙类样本线粒体16S rRNA基因序列与6条华西雨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0.0081,且单倍均在同一个单倍型网络内。同时,自测序列与华西雨蛙贵州兴义种群2号标本的16S序列遗传距离较小(0.0037),在单倍型网络上最近。因此,初步判断该标本属华西雨蛙(*Hyla annectans*)。

### 4.2. 印度种群同源序列影响

华西雨蛙虽在中国广泛分布,但最早于印度发现并命名[1],中国分布种群与印度种群形态上有较大差异,且相距较远。据此学者将中国分布的华西雨蛙种群描述为多个亚种,并得到遗传研究方面的证据支持[15],更有学者建议将中国分布的种群提升为种(*Hyla gongshanensis*) [4]。本研究中从Genbank中下载到7条华西雨蛙同源序列,其中OQ079503来自印度样本。为探究类印度种群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,并进行对照系统发育分析。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。通过基于对照样本T检验及Mantel检验,删除前后支系间遗传距离没有显著变化。基于数据集C1、C2的种群动态分析各项参数(单倍型歧点分布图、Tajima's D、Fu's  $F_s$  D、 $R_2$ 检验)也没有质的改变。

然而,系统发育树部分节点支持率有较大变化,使用双重单系法筛选可供分子鉴定的同源序列[5],需确定两重单系,即自测序列与参考同源序列构成的第一重单系作为内群(N01),以此再往系统发育树根部回溯的第二重单系(N05)包括内群,以及与内群亲缘关系最近的姊妹群支系。两重单系需要在基于数据集A的系统发育树得到高支持。本研究中,基于A1数据集构建的4种系统发育树,第一重单系(N01)仅有NJ树高支持(>70%,表2),基于A2数据集构建的4种系统发育树,第一重单系(N01)则有ML树、NJ树的高支持(>70%,表2)以及MP树的近高支持(68%,表2)。对于第二重单系(N05),删除印度种群序列前后没有明显变化,皆为高支持,但删除后部分支持率略有下降。双重单系法中的第一重单系对序列的物种归属的精确确定具有重要作用,在抽样充分的情况下,理论上自测序列应与第一重单系中的其他同源序列属于同一个物种(或分类单元),单系性必须与支系高支持率相一致,且该单系内物种归属具有唯一性,本研究中,删除印度种群同源序列,提高了第一重单系的支持率,更有利于使用双重单系法进行分子鉴定。同时,中国种群与印度种群是否为一个物种存在一定争议,与删除印度种群前后,第一重单系支持度提高相一致,暗示中国种群与印度种群分属不同物种。基于目前Genbank中有关*Hyla annectans*的分子标记(基因片段)仅限线粒体16S rRNA基因片段(OQ079503),进一步确定印度种群的系统发育地位,今后可以补充更多印度种群标本,对此问题进行深入研究。

## 5. 结论

本研究使用16S序列作为分子标记,经过Genbank搜索比对下载同源序列,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华西雨蛙(*Hyla annectans*),为贵州凤岗地区该物种的分布新记录。同时,研究发现,较远的印度种群的同源序列对使用双重单系法进行分子鉴定有一定影响,主要体现在第一重单系的支持率上。

## 致 谢

感谢六盘水师范学院明湖实验室张雨雪、赵文杰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); 六盘水市科技局科技支撑项目(52020-2024-0-2-17); 六盘水师范学院大学生科研项目(LPSSYDXS18026)。

## 参考文献

- [1] Jerdon, T.C. (1870) Notes on Indian Herpetology. *Proceedings of the Asiatic Society of Bengal*, **1870**, 66-85.
- [2] Amphibia China (2025) The Database of Chinese Amphibians. Kunming Institute of Zoology (CAS). <http://www.amphibiachina.org/species/305>
- [3] 叶昌媛, 费梁, 李胜全, 李成. 中国西部华西雨蛙 *Hyla annectans* 的种下分类(两栖纲: 雨蛙科)[J]. 两栖爬行动物学研究, 2000(8): 88-93.
- [4] 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 田婉淑, 江建平, 吴贯夫, 李健, 王宜生. 《中国动物志》两栖纲(中卷)无尾目[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S. and Tamura, K. (2024) MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*, **41**, msae263. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
- [9] 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>
- [10] 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>
- [11] Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. and Wheeler, W.C. (2005) Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference to Hylineae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **294**, 1-240. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:stotff\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:stotff]2.0.co;2)
- [12] Kang, X., Sun, Z., Guo, W., Wu, J., Qian, L., Pan, T., et al. (2016) Sequencing of Complete Mitochondrial Genome for Tsinling Tree Toad (*Hyla tsinlingensis*). *Mitochondrial DNA Part B*, **1**, 466-467. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1186515>
- [13] Ye, L., Zhu, C., Yu, D., Zhang, Y. and Zhang, J. (2014) The Complete Mitochondrial Genome of *Hyla annectans* (Anura: Hylidae). *Mitochondrial DNA Part A*, **27**, 1593-1594. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.958684>
- [14] Raj, P., Vasudevan, K., Agarwal, R.K., Dutta, S.K., et al. (2023) Larval Morphology of Selected Anuran Species from India. *Alytes*, **39**, 1-40.
- [15] 魏世超. 以华西雨蛙为例探究地质和气候事件对物种遗传变异模式的相对作用[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中师范大学, 2018.