

从 12S rRNA 基因序列研究中国蛙科 24 种的进化关系*

江建平 周开亚

(南京师范大学生物多样性与分子进化研究室, 南京 210097)

摘要 测定了中国蛙科动物 24 种和蟾蜍科的中华大蟾蜍线粒体 12S rRNA 基因长约 400bp 片段的序列。采用邻接法, 对其数据的系统发生分析表明 24 种可分成 3 个支系: 第一个支系包括棘腹蛙、合江棘蛙、棘胸蛙、大头蛙、虎纹蛙、倭蛙、泽陆蛙共 7 种, 其中 3 种棘蛙组成一个单系; 第二个支系由 3 种湍蛙, 即戴云湍蛙、华南湍蛙和武夷湍蛙组成, 应属于湍蛙亚科; 第三支系包含余下的 14 种蛙, 其中 5 种林蛙和 4 种臭蛙分别组成一个单系; 2 种侧褶蛙先聚合后, 再与弹琴水蛙聚合, 2 种粗皮蛙首先聚合在一起, 再与由林蛙组成的单系群聚合。第三支系首先与第二支系相聚, 然后它们与第一支系形成姐妹群, 即由蛙亚科的 7 个物种组成的第一支系, 不与蛙亚科另 14 个物种组成的第三支系直接聚合, 表明第一支系的物种可能不属于蛙亚科。此外, 分子证据提示把陆蛙属、大头蛙属、虎纹蛙属、棘蛙属、臭蛙属、粗皮蛙属和侧褶蛙属从原来的蛙属分出有其合理性。

关键词 蛙科 分子系统学 mtDNA 12S rRNA 基因

蛙科 Ranidae 是两栖动物中最大的科之一, 目前已知约 50 属 630 余种, 广布于全球, 仅南美洲南部和澳洲大部没有分布。我国现有蛙科动物近 100 种, 分隶于 3 个亚科, 20 个属 (亚属), 广泛分布于全国各地 (费梁等, 1990)。毫无疑问, 弄清中国现有蛙科属、种间的进化关系, 对于探讨其分类系统具有重要意义, 同时也是进一步研究世界蛙科系统关系的重要基础。

近年, 我国学者费梁等 (1990) 对蛙科的中国属、种分类系统作了较大的变动, 由此引起国内同行的关注。Dubois (1992) 对蛙总科 (Ranoidea) 提出一个建议性的分类系统, 重点是针对蛙科和蛙属, 但受到了 Inger (1996) 等学者的比较严厉的评议。不同学者对属级划分的分歧主要源于他们掌握的标准和依据的形态学性状不同。这样就很有必要采用分子手段研究蛙科属、种间的关系 (Inger, 1996)。

随着 DNA 测序技术的发展, 核酸 (DNA 和 RNA) 序列已成为系统发生研究中越来越重要的资料。Hay 等 (1995) 和 Hedges 等 (1993) 已经证明线粒体 12S 核糖体 RNA (rRNA) 基因对于研究两栖动物的系统发育是有用的。Sumida 等 (1998) 利用

线粒体 12S rRNA 基因序列探讨了日本塘蛙 (Pond frog) 3 种 (亚种) 的进化关系。本文作者从 12S rRNA 基因部分片段的序列, 分析中国蛙科动物间的进化关系, 进而探讨它们的系统关系及有关类群的系统学问题。

2 材料和方法

2.1 标本材料

共采集 24 种蛙科动物, 1 种蟾蜍科动物, 见表 1。

2.2 总 DNA 的提取

采用 SDS/蛋白酶 K 裂解, 酚氯仿抽提法从保存于 75% 的酒精或 -20℃ 冻存的腿部肌肉提取总 DNA。

2.3 DNA 扩增与测序

应用通用引物 L1091 (5'-GCT TCA AAC TGG GAT TAG ATA CCC CAC TAT-3'), H1478 (5'-TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTG T-3') (Kocher *et al.* 1989) 扩增和测定线粒体 12S rRNA 基因序列约 400 碱基对。L 和 H 分别代表轻链和重链, 编号与人 mtDNA 序列相对应 (Anderson *et al.*, 1981)。

1999-02-23 收稿, 2000-02-20 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (39970094)

第一作者简介 江建平, 男, 31 岁, 博士, 副研究员。研究方向: 两栖爬行类分子系统学。现工作单位: 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041。E-mail: jjplxz@163.net

表 1 本研究检测的物种*

Table 1 Species examined in the present study

科属 Family & genus	种名 Species name	代码 Code	采样地点 Locality
蛙科 Ranidae			
林蛙属 <i>Rana</i>	中国林蛙 <i>R. chensinensis</i>	Rchen	黑龙江牡丹江 (Mudanjiang, Heilongjiang)
	黑龙江林蛙 <i>R. amurensis</i>	Ramu	黑龙江牡丹江 (Mudanjiang, Heilongjiang)
	镇海林蛙 <i>R. zhenhaiensis</i>	Rzhen	浙江镇海 (Zhenhai, Zhejiang)
	峨眉林蛙 <i>R. omeimontis</i>	Romei	四川峨眉山 (Emei Mt., Sichuan)
	昭觉林蛙 <i>R. chaochiaoensis</i>	Rchao	四川木里 (Muli, Sichuan)
侧褶蛙属 <i>Pelophylax</i>	黑斑侧褶蛙 <i>P. nigromaculata</i>	Pnigro	安徽霍丘 (Huoqiu, Anhui)
	湖北侧褶蛙 <i>P. hubeiensis</i>	Phubei	安徽霍丘 (Huoqiu, Anhui)
水蛙属 <i>Hylarana</i>	弹琴水蛙 <i>H. adenopleura</i>	Haden	福建南靖 (Nanjing, Fujian)
陆蛙属 <i>Fejervarya</i>	泽陆蛙 <i>F. limnocharis</i>	Flim	江苏南京 (Nanjing, Jiangsu)
虎纹蛙属 <i>Hoplobatrachus</i>	虎纹蛙 <i>H. rugulosus</i>	Hrug	海南海口 (Haikou, Hainan)
粗皮蛙属 <i>Rugosa</i>	东北粗皮蛙 <i>R. emeljanovi</i>	Reme	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
	天台粗皮蛙 <i>R. tientaiensis</i>	Rtien	浙江天目山 (Tianmu Mt., Zhejiang)
臭蛙属 <i>Odorrana</i>	绿臭蛙 <i>O. margaratae</i>	Omar	四川瓦屋山 (Wawu Mt., Sichuan)
	大绿臭蛙 <i>O. livida</i>	Oliv	四川合江 (Hejiang, Sichuan)
	花臭蛙 <i>O. schmackeri</i>	Osch	四川峨眉山 (Emei Mt., Sichuan)
	合江臭蛙 <i>O. hejiangensis</i>	Ohej	四川合江 (Hejiang, Sichuan)
大头蛙属 <i>Limnonectes</i>	福建大头蛙 <i>L. fujianensis</i>	Lfuj	福建南靖 (Nanjing, Fujian)
棘蛙属 <i>Paa</i>	棘腹蛙 <i>P. boulengeri</i>	Pbou	四川瓦屋山 (Wawu Mt., Sichuan)
	棘胸蛙 <i>P. spinosa</i>	Pspin	浙江天目山 (Tianmu Mt., Zhejiang)
	合江棘蛙 <i>P. robertingeri</i>	Prob	四川合江 (Hejiang, Sichuan)
倭蛙属 <i>Nanorana</i>	倭蛙 <i>N. pleskei</i>	Nple	四川松潘 (Songpan, Sichuan)
湍蛙属 <i>Amolops</i>	戴云湍蛙 <i>A. daiyunensis</i>	Adai	福建南靖 (Nanjing, Fujian)
	华南湍蛙 <i>A. ricketti</i>	Arick	四川合江 (Hejiang, Sichuan)
	武夷湍蛙 <i>A. wuyiensis</i>	Awuyi	安徽黄山 (Huangshan, Anhui)
蟾蜍科 Bufonidae			
蟾蜍属 <i>Bufo</i>	中华大蟾蜍 <i>B. g. gargarizans</i>	Bgar	江苏南京 (Nanjing, Jiangsu)

* 属级分类阶元依据费梁等 (1990) [Generic taxa follow Fei *et al.* (1990)]

两条互补链均测定序列, 轻链用银染测序技术测定, 重链用本室的 ABI 310 基因分析仪测定。银染测序试剂盒购自 Promega 公司, BigDye 试剂盒购自 PE Applied Biosystems。

2.4 序列分析

用 Clustal W 程序 (Thompson *et al.*, 1994) 对测定的序列进行对位排列。用分子进化遗传分析软件 MEGA (Kumar *et al.*, 1993) 分析各物种间 DNA 序列差异, 根据 Tamura 距离 (Tamura, 1992) 采用邻接法 (neighbor-joining method, N-J) (Saitou *et al.*, 1987) 推演系统发生关系。在重建系统树时, 去除两两对位序列中的缺失 (gaps), 用中华大蟾

蜍 12S rRNA 基因有关片段的序列作为外群比较, 同时应用自举检验 (bootstrap test, Felsenstein, 1985) 估计系统树中结点的置信值。

3 结果与分析

3.1 物种间 DNA 序列差异

12S rRNA 序列用 Clustal W 软件进行对位排列, 共有 411bp, 其中有 219 个可变核苷酸位点。序列已存入 GenBank (accession numbers AF 205541-205565)。序列的差异数和碱基替换情况统计于表 2。在外群和内群之间, 核苷酸变异值是 20.3% (中华大蟾蜍对大绿臭蛙) 到 27.6% (中华

表 2 本文研究的蛙科 24 种、蟾蜍科 1 种 12S rRNA 基因序列转换/颠换数 (上三角) 和序列差异率 (下三角)。成对比较时去除缺失 (gaps)

Table 2 Numbers of transitions/transversions (upper triangle) and percent of sequences differences (lower triangle) for 12S rRNA gene sequences of 25 species examined in this study with gaps deleted in each pairwise comparison of sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 Bgar		45/34	46/34	49/34	48/33	48/34	49/37	49/34	53/52	52/34	52/33	51/35	49/32	52/44	50/32	50/35	47/35	47/40	44/55	49/30	49/32	46/35	51/38	52/38	46/32
2 Rchen	0.208		0/0	17/5	17/4	28/7	29/14	30/11	49/38	40/25	40/25	42/26	38/25	41/30	40/10	40/20	40/13	29/20	44/46	24/10	25/15	33/13	30/12	31/14	35/15
3 Ramu	0.209	0.000		17/5	17/4	28/7	29/14	30/11	49/39	40/25	40/25	42/26	38/25	41/30	40/10	40/20	40/13	29/20	44/46	24/10	25/15	33/13	30/12	31/14	35/15
4 Rehao	0.217	0.058	0.057		4/1	12/4	19/17	18/14	46/39	40/24	41/24	44/25	37/24	44/28	36/13	32/23	35/16	26/21	48/48	23/13	25/15	25/12	23/15	24/17	30/15
5 Romei	0.211	0.055	0.055	0.013		12/3	18/16	17/13	46/38	41/23	42/23	44/24	38/23	45/27	36/12	32/22	35/15	27/20	47/47	24/12	26/14	26/11	22/14	23/16	31/14
6 Rzhen	0.214	0.092	0.091	0.042	0.039		22/19	22/16	56/40	46/24	47/24	49/25	42/24	45/31	43/15	38/23	42/18	29/23	47/50	31/14	34/13	32/15	27/17	28/19	32/15
7 Phubei	0.225	0.113	0.113	0.094	0.089	0.107		6/7	52/38	44/21	45/21	42/24	38/22	48/33	35/16	32/25	37/16	21/19	45/48	33/16	32/21	30/16	30/18	31/20	33/22
8 Pnigro	0.217	0.108	0.107	0.084	0.078	0.099	0.034		49/39	39/22	41/22	40/23	43/22	46/32	37/13	33/20	39/13	19/16	48/45	35/11	33/16	30/13	31/13	29/15	34/17
9 Flim	0.276	0.231	0.232	0.224	0.221	0.253	0.236	0.231		54/30	52/32	54/33	50/31	51/26	52/35	57/42	54/34	44/41	53/49	50/39	50/44	41/40	43/40	40/40	53/43
10 Phou	0.227	0.172	0.172	0.168	0.168	0.184	0.171	0.160	0.220		4/4	16/8	35/17	41/26	54/21	54/26	51/22	35/27	31/45	34/24	40/28	40/23	36/25	35/27	39/23
11 Prob	0.225	0.173	0.172	0.172	0.172	0.188	0.174	0.166	0.222	0.021		18/6	32/15	37/28	49/21	52/28	46/22	35/29	30/44	32/23	39/27	40/23	36/25	36/27	38/23
12 Pspin	0.225	0.179	0.178	0.180	0.177	0.193	0.172	0.164	0.227	0.063	0.063		32/13	44/28	52/23	47/28	47/24	32/31	31/44	32/25	33/29	41/23	37/27	35/29	40/24
13 Nple	0.214	0.168	0.167	0.161	0.161	0.174	0.158	0.171	0.213	0.136	0.123	0.117		33/28	43/24	43/31	40/25	37/31	33/41	39/22	37/26	45/23	33/29	32/31	36/25
14 Hrug	0.251	0.187	0.186	0.188	0.188	0.199	0.211	0.204	0.200	0.175	0.171	0.187	0.160		46/27	50/36	46/28	41/38	39/48	44/31	47/35	47/30	40/33	41/35	44/37
15 Awu	0.214	0.131	0.131	0.128	0.125	0.151	0.132	0.130	0.227	0.196	0.184	0.194	0.175	0.190		29/12	11/3	40/22	51/45	36/16	38/18	44/11	48/12	47/14	41/16
16 Aclai	0.221	0.157	0.157	0.143	0.141	0.159	0.148	0.138	0.258	0.209	0.210	0.194	0.194	0.223	0.105		29/15	32/29	50/51	39/21	40/22	43/17	49/19	45/21	39/21
17 Arick	0.215	0.140	0.139	0.134	0.131	0.157	0.138	0.136	0.231	0.192	0.179	0.185	0.171	0.193	0.036	0.113		40/24	49/46	31/15	35/17	38/14	40/15	39/17	39/17
18 Haden	0.228	0.129	0.129	0.123	0.123	0.136	0.104	0.091	0.223	0.163	0.169	0.164	0.179	0.206	0.161	0.158	0.167		41/49	27/23	30/25	26/20	26/22	24/24	27/23
19 Lfuj	0.260	0.237	0.236	0.251	0.246	0.254	0.243	0.243	0.267	0.199	0.196	0.196	0.195	0.227	0.250	0.263	0.249	0.235		44/44	40/48	48/47	45/47	42/49	37/49
20 Rtien	0.207	0.089	0.089	0.094	0.094	0.117	0.128	0.120	0.234	0.153	0.146	0.149	0.161	0.196	0.135	0.156	0.120	0.131	0.230		13/8	26/16	24/15	24/17	29/15
21 Reme	0.212	0.105	0.105	0.104	0.104	0.123	0.138	0.128	0.247	0.179	0.175	0.162	0.166	0.215	0.146	0.161	0.136	0.144	0.230	0.055		30/19	27/20	26/22	28/19
22 Omar	0.210	0.121	0.120	0.096	0.096	0.122	0.120	0.112	0.211	0.165	0.166	0.167	0.179	0.200	0.143	0.156	0.136	0.120	0.248	0.109	0.127		20/9	21/11	29/12
23 Osch	0.232	0.110	0.109	0.099	0.094	0.114	0.124	0.114	0.217	0.159	0.160	0.165	0.161	0.190	0.154	0.175	0.142	0.125	0.240	0.101	0.122	0.075		3/4	29/12
24 Ohej	0.234	0.118	0.117	0.106	0.101	0.122	0.132	0.114	0.209	0.161	0.165	0.165	0.164	0.197	0.157	0.170	0.145	0.125	0.237	0.106	0.125	0.083	0.018		27/14
25 Oliv	0.203	0.131	0.130	0.117	0.117	0.122	0.142	0.132	0.251	0.162	0.160	0.166	0.160	0.210	0.147	0.155	0.145	0.130	0.224	0.114	0.122	0.106	0.105	0.105	

大蟾蜍对泽陆蛙), 内群属内种间是 0.0% (中国林蛙对黑龙江林蛙) 到 10.6% (绿臭蛙对大绿臭蛙), 属间是 7.8% (峨眉林蛙对黑斑侧褶蛙) 到 26.7% (大头蛙对泽陆蛙)。

物种间序列变异位点基本上是转换 (transition) 多于颠换 (transversion)。这种差异在亲缘关系接近的类群中更显著, 如林蛙属中转换数 (ns)/颠换数 (nv) 值是 3.00~4.25。当然, 从一个类群到另一个类群这种差异可能不会总是如此, 如本文中的湖北侧褶蛙对黑斑侧褶蛙 ns/nv = 6/7, 花臭蛙与合江臭蛙 ns/nv = 3/4。

3.2 基因系统进化关系

根据测序的结果, 以中华大蟾蜍为外群, 基于

Tamura 距离, 采用邻接法构建了 24 种蛙科动物的进化关系树 (图 1)。内群的 24 个种分成 3 个支系, 第一个支系包括棘腹蛙、合江棘蛙、棘胸蛙、大头蛙、虎纹蛙、倭蛙、泽陆蛙共 7 种蛙, BCL 值 (自举检验重复值) 为 78%, 其中 3 种棘蛙构成一个单系, BCL 值为 99%。第二个支系为 3 种湍蛙, 即戴云湍蛙、华南湍蛙和武夷湍蛙构成, BCL 值为 99%。第三支系包含余下的 14 种蛙, BCL 值为 61%。其中 5 种林蛙分为两组即中国林蛙和黑龙江林蛙为一组, 峨眉林蛙、昭觉林蛙和镇海林蛙为另一组, 两组构成一个单系, BCL 值为 87%; 4 种臭蛙构成另一个单系, BCL 值为 58%; 2 种侧褶蛙先聚合, BCL 值为 99%, 后与弹琴水蛙聚合, BCL 值

为 86%；2 种粗皮蛙首先聚合在一起，BCL 值为 99%，再与由林蛙构成的单系聚合，BCL 值为 49%。第二支系首先与第三支系聚合，BCL 值为 85%，然后一起构成第一支系的姐妹群。

4 讨 论

4.1 中国蛙科的亚科划分

中国学者杨大同 (1991) 把湍蛙亚科 (Amolopinae) 分为 3 个属即湍蛙属 (*Amolops*)、胡湍蛙属 (*Huia*) 和裂腭湍蛙属 (*Meristogenys*)。费梁等 (1990) 根据浮蛙类的蝌蚪和成体特征，建立新亚科浮蛙亚科 (Occidozyginae)。这样，中国蛙科包含了 3 个亚科即蛙亚科 (Raninae)、湍蛙亚科和浮蛙亚科。本文的研究结果 (图 1) 表明，第二支系由 3 种湍蛙组成，属于湍蛙亚科；由蛙亚科的 7 个物种组成的第一支系不与蛙亚科另 14 个物种组成的第三支系直接聚合，提示第一支系的物种可能不属于蛙亚科。因此，原来的蛙亚科不是一个单系群。关于它们的分类地位将另文详细讨论。

4.2 传统蛙属 (*Rana*) 中国物种的分类研究

本世纪早期，Boulenger (1920) 曾就原蛙属的分类作过较为综合性的研究。那时的蛙属约有 195 种，他根据外形和骨骼等特征把蛙属分为 9 个亚属，分布在中国的亚属有 3 个，即蛙亚属 *Rana*

(*Rana*)、水蛙亚属 *Rana* (*Hylorana*) 和倭蛙亚属 *Rana* (*Nanorana*)。刘承钊等 (1961) 对当时中国蛙属已知的 35 种进行了描述，把 Boulenger 的倭蛙亚属 *Nanorana* 提升到属级，将余下的物种分为真蛙 (*Rana*) 和水蛙 (*Hylorana*) 两大类，未采用亚属级阶元。1961 年以来，中国蛙科的物种数量增至 90 多种。费梁等 (1990) 在详细研究中国蛙类成体、蝌蚪和卵的形态特征和生态，并参考国内外有关文献的基础上将蛙科动物中原隶蛙属 (刘承钊等, 1961) 的物种作了较大的变动，保留了林蛙属 (*Rana*)、棘蛙属 (*Paa*)；恢复了侧褶蛙属 (*Pelodytes*)、水蛙属 (*Hylorana*)、陆蛙属 (*Euphyllax*，现为 *Fejaryarya*)、大头蛙属 (*Limnonectes*)、虎纹蛙属 (*Hoplobatrachus*)；新建立了趾沟蛙属 (*Pseudorana*)、粗皮蛙属 (*Rugosa*)、腺蛙属 (*Glandirana*)、臭蛙属 (*Ordorana*)。本文的研究结果表明，把中国传统蛙属的物种简单地分为真蛙和水蛙两类 (刘承钊等, 1961) 是由于当时记录的蛙属物种数量较少所致，现在看来是不适宜的。前一节的分析已经表明原来的蛙亚科不是一个单系群，构成第一支系的 7 种可能不属于蛙亚科，即支持这些物种不属于蛙亚科的观点。倭蛙属作为属级已为国内外同行认可 (Dubois, 1992; Duellman, 1993; 刘承钊等, 1961; 叶昌媛等, 1993; 松井正文, 1996; 等),

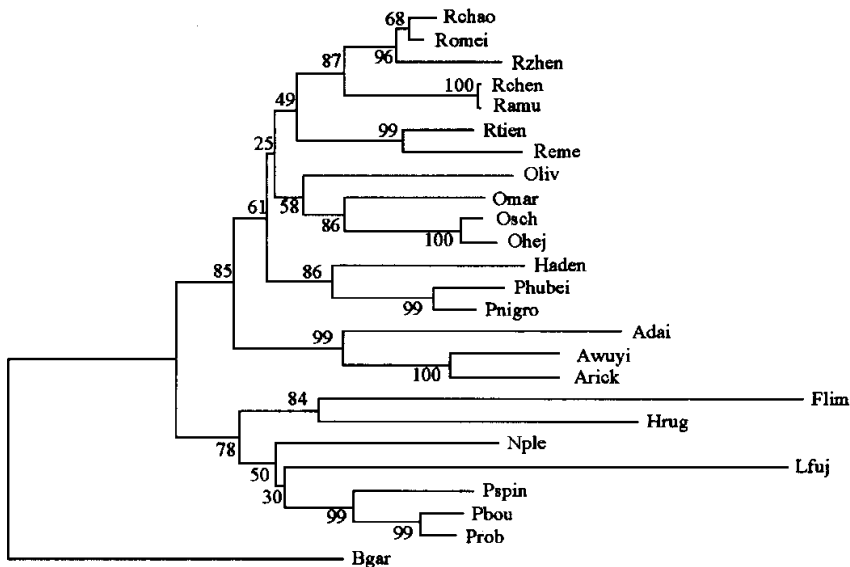


图 1 中国蛙科 24 种的进化关系

Fig. 1 Evolutionary relationships of 24 species of Chinese Ranidae

图中数字为自举检验置信值 (1 000 个复制序列)

Numbers on the tree represent confidence values from bootstrap test (1 000 replications)

本文的结果(图1和表2)提示陆蛙属、大头蛙属、虎纹蛙属和棘蛙属也是有效属。事实上,这些属已为世界不少学者所采用(Dubois, 1992; Duellman, 1993; 松井正文, 1996)。

属作为进化的单位,可以从三个方面分析,即遗传、系统发生和生态位。属级单位的遗传可以从宏观和微观两方面测度,宏观上是指形态相似性,这是传统分类研究的主要依据;微观上则以遗传标记如物种间蛋白质的比较、染色体的比较、核酸的比较来识别遗传差异,这是分子系统学的主要研究内容。本文研究的24种之间12S rRNA基因序列的差异(表2)基本印证了形态学的研究结果:林蛙属、臭蛙属、粗皮蛙属、侧褶蛙属各属内物种间的序列差异数明显小于各属与属之间的差异数,表明上述几个属是不同的遗传单位。

多数系统学家认为,只有单系群才是自然的类群,努力重建系统发生的目的就是打破所有复系类群,保留单系类群。根据本文24个物种12S rRNA基因序列的数据(表2)和进化关系(图1),其中5种林蛙、4种臭蛙、2种粗皮蛙、2种侧褶蛙分别组成一个单系群。因此,从本文研究结果来说,它们都各为一个自然类群。

每个物种可能都有其独特的生态位。类似地,高一阶元如属可能也有独特的生态位。不过,它的生态位比它所包含的物种中任何一个所拥有的生态位都“宽”。因此,Inger(1958)提议把属定义为一群形态极相近的物种,它们占据相同的适应地带。Dubois(1988)认为这个标准只有一个全系群(homophyletic group)内,因而在一个科内或与物种遗传相似性一致的情况下才适用。上面谈及的林蛙属、臭蛙属、粗皮蛙属、侧褶蛙属都各自占据不同的适应地带(费梁等,1990;叶昌媛等,1993),而且与本文研究的遗传差异相吻合。

根据上面的论述,可以初步认为费梁等(1990)提议的林蛙属、臭蛙属、粗皮蛙属和侧褶蛙属属级阶元是合理的。至于目前尚未谈及的属,待做了类似研究后再讨论。

4.3 属间亲缘关系

Boulenger(1920)认为泽陆蛙与虎纹蛙同属于虎纹蛙群(Ranae tigrinae)。从外形和骨骼方面而论,它们的确相近似,但蝌蚪的口部结构极不相同,应为两个不同的类群(刘承钊等,1961;费梁等,1990)。本文的分析表明,虎纹蛙属与陆蛙属的关系虽相对较近,但这两个属在遗传上已出现很

大的分化,序列差异已达到20%,远超过其它属间如粗皮蛙属与林蛙属间的差异(8.9~12.3%)。

Boulenger(1920)认为倭蛙属由棘蛙群(Ranae liebighiana)进化而来,大头蛙群(Ranae kuhlinae)进化产生昏蛙属(Nyctibatrachus)。但本文的进化关系图上棘蛙属与大头蛙属系统发生关系较近,前者可能由后者进化而来。

与其他属相比,虎纹蛙属、陆蛙属、倭蛙属、大头蛙属及棘蛙属间相互关系较近。这与刘承钊等(1961)对传统蛙属中国的35个种的形态比较结果相近,其中还包括粗皮蛙与这些属相近。从外形来看似乎是这样,但本文的遗传分析结果包括序列差异情况和进化关系图都不支持这个观点,而认为粗皮蛙属与林蛙属更近。

刘承钊等(1961)认为沼蛙群与臭蛙群关系较近,但本文的分析结果是沼蛙群中的弹琴水蛙与侧褶蛙属中的湖北侧褶蛙和黑斑侧褶蛙聚为一支(图1),表明弹琴水蛙与侧褶蛙属关系较近,与臭蛙属关系较远。Boulenger(1920)认为水蛙亚属Rana(Hylorana)从蛙亚属Rana(Rana)进化而来。上述蛙亚属包括现在的侧褶蛙属;水蛙亚属包括沼蛙群(Ranae graciles)、纤蛙群(Ranae erythraceae)和臭蛙群(Ranae luctuosae)。依据本文的分析,推测侧褶蛙属与水蛙属亲缘关系较近,而与臭蛙属的关系较远。

4.4 属内物种间的亲缘关系

本文研究了蛙科11个属,只对4个属研究了3以上个的物种。

4.4.1 林蛙属 图1中5种林蛙明显分为两组,黑龙江林蛙和中国林蛙为一组;峨眉林蛙、昭觉林蛙和镇海林蛙为另一组。峨眉林蛙与昭觉林蛙的亲缘关系较近,它们与镇海林蛙的关系远。

刘承钊等(1961)认为分布于四川峨眉地区的林蛙与华东地区的林蛙存在明显差异,但都是“日本林蛙”而不是昭觉林蛙,这暗示峨眉与华东地区的林蛙亲缘关系较近。但本文结果表明峨眉林蛙与昭觉林蛙亲缘关系较近,而与镇海林蛙关系较远,这与它们的地理分布格局一致。另外,峨眉林蛙的繁殖季节是9~10月左右,昭觉林蛙是4~6月,镇海林蛙是2~3月,而且这3种林蛙在12S rRNA基因序列上存在明显的差异。以上分析支持峨眉林蛙(叶昌媛等,1993)和镇海林蛙(叶昌媛等,1995)都是有效种的观点。

中国林蛙与黑龙江林蛙的12S rRNA基因序列

间仅有两个碱基位点的缺失或插入之差,所以在除去缺失或插入之后的序列差异分析时,它们两者间的核苷酸变异值为 0%。而根据我们测定的该基因的另一 442bp 片段(将另文报道),2 种蛙间的核苷酸变异值为 1.9%。与其它林蛙相比,这两种林蛙的序列差异偏小,这可能表明它们间的亲缘关系很近。但是,这两个物种的标本采自同一地点,即黑龙江省牡丹江市郊,而且黑龙江林蛙只采到 1 只标本。因此对这两种蛙间的关系,有必要增加标本数量再作研究。

4.4.2 臭蛙属 本文研究了 4 种臭蛙,结果显示合江臭蛙与花臭蛙亲缘关系最近,与绿臭蛙关系较近,而与大绿臭蛙亲缘关系最远。这一结果与刘承钊等(1961)的分析一致,也与形态学相似性吻合。

4.4.3 湍蛙属 本文研究认为武夷湍蛙与华南湍蛙间亲缘关系较近,与戴云湍蛙的较远。这印证了庞家庆等(1992)的形态研究结果。

4.4.4 棘蛙属 有关棘蛙群物种的分类问题,刘承钊等(1961)曾有评述,但未涉及相互间的亲缘关系。从分子证据看,合江棘蛙与棘腹蛙关系较近,与棘胸蛙较远。这也与它们的形态表征基本一致。

致谢 中国科学院成都生物所费梁、王跃招和谢锋,福建师范大学生物系蔡明章和高建明,浙江省自然博物馆蔡春抹,辽宁大学生物系温世生,辽宁师范大学生命科学学院李庆伟及本实验室的唐伯平和吴孝兵协助为本文采集部分标本,费梁教授热情提出修改意见,谨致衷心感谢!

参 考 文 献 (References)

- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. De Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Neirlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden and I. G. Young 1981 Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290** :457 ~ 465.
- Boulenger, G. A. 1920 A monograph of the south Asian, Papuan, Melanesian, and Australian frogs of the genus *Rana*. *Rec. Indian Mus.* **20** :1 ~ 126.
- Dubois, A. 1992 Notes sur la classification des Ranidae (Amphibiens, Anoures). *Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon* **61** 305 ~ 352.
- Dubois, A. 1988 The Genus in zoology: a contribution to the theory of evolutionary systematics. *Du Museum Mém. Mun. Nast. Nat. (A)* **140** :1 ~ 122.
- Duellman, W. E. 1993 Amphibian species of the world: additions and corrections. *Univ. Kans. Mus. Nat. Hist. Special Publ.* **21** :1 ~ 372.
- Fei, L., C. Y. Ye and Y. Z. Huang 1990 Key to Chinese Amphibia. Chongqing: Chongqing Branch Science and Technology Literature Publishing House, 1 ~ 364. [费梁,叶昌媛,黄永昭 1990 中国两栖动物检索.重庆:科学技术文献出版社重庆分社,1 ~ 364.]
- Felsenstein, J. 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39** :783 ~ 791.
- Hay, J. M., I. Ruvinsky, S. B. Hedges and L. R. Maxon 1995 Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. *Mol Biol Evol* **12** (5) :928 ~ 937.
- Hedges, S. B. and L. R. Maxson 1993 A molecular perspective on lissamphibian phylogeny. *Herpetol. Monogr.* **7** :27 ~ 42.
- Inger, R. F. 1958 Comments on the definition of genera. *Evolution* **12** :370 ~ 384.
- Inger, R. F. 1996 Commentary on a proposed classification of the family Ranidae. *Herpetologica* **52** (2) :241 ~ 246.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson 1989 Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** :6169 ~ 6200.
- Kumar, S. K. and M. Nei 1993 MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01. University Park, Pennsylvania State University.
- Liu, C. C. and S. Q. Hu 1961 Tailless Amphibians of China. Beijing: Science Press, 1 ~ 364. [刘承钊,胡淑琴 1961 中国无尾两栖类.北京:科学出版社,1 ~ 364.]
- Matsui, M. 1996 Natural History of the Amphibia. Tokyo: University of Tokyo Press, 1 ~ 302. [松井正文 1996 两生类の进化.东京:东京大学出版社,1 ~ 302.]
- Pang, J. Q. and Z. J. Liu 1992 On the supraspecific classification of Chinese frog, Genus *Amolops* (Anura: Ranidae). In: Jiang, Y. M. ed. A Collection of Papers on Herpetology, Chengdu: Sichuan Publishing House of Science & Technology, 101 ~ 110. [庞家庆,刘志君 1992 中国湍蛙属 *Amolops* (Anura: Ranidae) 的种上分类.见:江耀明主编.两栖爬行动物学论文集.成都:四川科学技术出版社,101 ~ 110.]
- Saitou, N. and M. Nei 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** :406 ~ 425.
- Sumida, M., M. Ogata, H. Kaneda and H. Yonekawa 1998 Evolutionary relationships among Japanese pond frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. *Genes Genet. Syst.* **73** (2) :121 ~ 133.
- Tamura, K. 1992 Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* **9** :678 ~ 687.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and D. J. Gibson 1994 Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22** :4673 ~ 4680.

- Yang, D. T. 1991 Phylogenetic systematics of the *Amolops* group of Ranid frogs of southeastern Asia and the Greater Sunda Islands. *Fieldiana Zool.* **63** :1 ~ 42.
- Ye, C. Y., L. Fei and S. Q. Hu 1993 Rare and Economic Amphibians of China. Chengdu : Sichuan Publishing House of Science & Technology, 1 ~ 412. [叶昌媛, 费 梁, 胡淑琴 1993 中国珍稀经济两栖动物. 成都 : 四川科学技术出版社, 1 ~ 412.]
- Ye, C. Y., L. Fei and M. Matsui 1995 Taxonomic study on Chinese *Rana japonica*. *Acta Herpetologica Sinica*, **4** ~ **5** :82 ~ 87. [叶昌媛, 费 梁, 松井正文 1995 我国日本林蛙 (*Rana japonica* Guenther) 的分类研究 两栖爬行动物学研究 **4** ~ **5** :82 ~ 87.]

外 文 摘 要 (Abstract)

EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AMONG CHINESE RANID FROGS INFERRED FROM MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES OF 12S rRNA GENE*

JIANG Jian-Ping ZHOU Kai-Ya

(Biodiversity and Molecular Evolution Laboratory, Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Approximately 400 base pairs of the mitochondrial 12S rRNA gene from 24 species of Chinese ranid frogs (Table 1) were sequenced. Phylogenetic analyses of these data using neighbor-joining method showed that these frogs were divided into three lineages. The first lineage (BCL 78%) contains 7 species, *Fejervarya limnocharis*, *Hoplobatrachus rugulosus*, *Limnonectes fujianensis*, *Paa boulengeri*, *P. spinosa*, *P. robertingeri*, and *Nanorana pleskei*, of which 3 species of *Paa* forming a monophyletic group (BCL 99%). The second lineage (BCL 99%) comprises 3 species, *Amolops daiyunensis*, *A. ricketti*, and *A. wuyiensis*, corresponding to the subfamily Amolopinae. The rest 14 species belong to the third lineage (BCL 61%), of which 5 species of *Rana* and 4 species of *Odorrana* forming a monophyletic group respectively. Two species of *Pelophylax* cluster together before they cluster with the genus *Hylarana*. Two species of *Rugosa* form a clade before they cluster with the monophyletic group of 5 species of *Rana*. The second and third lineage cluster at BCL = 85%, and a sister group relationship between the cluster and the first lineage is recognized. In other words, the first lineage comprising 7 species of the subfamily Raninae and the third lineage comprising 14 species of the subfamily Raninae do not cluster directly. This result suggests that the frogs of the first lineage are probably excluded from the subfamily Raninae. In addition, the molecular evidence supports the establishment of ranid genera *Fejervarya*, *Limnonectes*, *Hoplobatrachus*, *Paa*, *Odorrana*, *Rugosa* and *Pelophylax*. They were separated from the genus *Rana* which now represent only Brown frogs.

Key words Ranidae, Molecular phylogeny, mtDNA, 12S rRNA gene

* This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.39970094)