

韩 丹,余文华,张 蓉,等. 贵州麻江分布小弧斑姬蛙的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):145–150.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2020.12.031

# 贵州麻江分布小弧斑姬蛙的分子鉴定

韩 丹,余文华,张 蓉,李洪艳,海 艳,张细林,熊荣川

(六盘水师范学院生物科学与技术学院,贵州六盘水 553004)

**摘要:**姬蛙是一大类常见的农田物种,通常个体较小,蝌蚪间差异不明显,难以准确鉴定。本研究对采自贵州省黔东南州麻江县姬蛙类蝌蚪标本进行 DNA 提取,使用 PCR 技术扩增线粒体 16S rRNA 基因片段,参照 GenBank 中同源序列的系统发育关系对其进行初步分子鉴定。结果表明,标本 16S rRNA 基因片段与 27 条小弧斑姬蛙(*Microhyla heymonsi*)同源序列聚为一个单系,该单系内部序列间遗传距离小于本研究所用参考序列的种间遗传距离,因此,初步鉴定标本为小弧斑姬蛙蝌蚪。同时,本研究中小弧斑姬蛙支系的序列间遗传距离略高于所有参考序列的种内遗传距离,并且在单倍型网络中被分割为 6 个独立网络,暗示分布广泛的小弧斑姬蛙种内存在较大的支系分化。另外,本研究对参考序列中的可疑序列进行了初步探讨。

**关键词:**小弧斑姬蛙;16S rRNA 基因;克隆;分子鉴定;可疑序列

**中图分类号:** S185 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2020)12–0145–05

小弧斑姬蛙(*Microhyla heymonsi*),隶属姬蛙科(Microhylidae)、姬蛙属(*Microhyla*)<sup>[1]</sup>,是常见的农田蛙类。因其具有多样的环境适应能力,而广泛分布于中国、印度、缅甸、泰国、老挝、越南、柬埔寨、马来半岛、印度尼西亚等地区<sup>[1–2]</sup>。国内主要分布于四川、重庆、云南、贵州、河南、安徽、江苏、浙江、江西、湖南、福建、台湾、广东、海南、广西等地区<sup>[1]</sup>。小弧斑姬蛙在贵州省内多地均有分布,如绥阳、仁怀、赤水、大方、金沙、江口、印江、松桃、贵阳、贵定、荔波、罗甸、雷山、兴义、安龙、德江、剑河等地区<sup>[3]</sup>。然而,目前并没有明确的文献记载该物种在麻江县是否有分布。2016 年 6 月,笔者于贵州省黔东南州麻江县坝芒乡采集到疑似小弧斑姬蛙蝌蚪标本 3 号,但因蝌蚪较小,形态特征不明显,且与贵州分布的其他姬蛙蝌蚪极为相似,因此有必要对该标本使

用分子鉴定手段作进一步的物种鉴定。本研究拟对所采集的姬蛙蝌蚪标本进行 DNA 提取,扩增其线粒体 16S rRNA 基因(以下简称 16S 基因),并进行系统发育分析从而对其物种归属进行初步鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本信息

小弧斑姬蛙标本为 2016 年 6 月 25 日采自贵州省黔东南州麻江县坝芒乡的 3 个蝌蚪幼体,保存于六盘水师范学院生物科学与技术学院动物标本馆。参考序列<sup>[4–11]</sup>见表 1。

### 1.2 总 DNA 提取及线粒体 16S rRNA 基因片段扩增

取蝌蚪尾部肌肉,使用动物组织 DNA 提取试剂盒(Foregene, DE–05011;250 Preps)提取总 DNA。扩增引物为 1 对脊椎动物线粒体 16S 基因片段扩增通用引物(P7/P8)<sup>[12–13]</sup>。PCR 反应条件与华西雨蛙、寒露林蛙同源基因扩增条件相同<sup>[13–14]</sup>,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。

### 1.3 参考基因序列下载及系统发育分析

将所测得的小弧斑姬蛙线粒体 16S 基因序列经过上传 GenBank 进行搜索比对(Mega Blast)获得 100 条参考序列,与本研究所得基因序列一起构成数据集 A。用 Muscle 软件<sup>[15]</sup>对序列进行比对,在 Mtga X<sup>[16]</sup>中辅以人工校对并将首尾不整齐片段删

收稿日期:2019–07–02

基金项目:六盘水师范学院院级大学生创新项目(编号:201610977003);六盘水师范学院院级科技创新团队项目(编号:LPSSYKJTD201602);贵州省教育厅基金项目(编号:黔教合 KY 字[2015]387 号、黔教合人才团队字[2015]72 号);贵州省科技厅技术基金(编号:黔科合 J 字 LKLS[2013]04 号、黔科合 J 字 LKLS[2013]06 号)。

作者简介:韩 丹(1996—),女,贵州盘州人,硕士研究生,主要从事动物分子遗传多样性研究。E-mail:1412694623@qq.com。

通信作者:熊荣川,博士,副教授,主要从事动物分子遗传多样性研究。E-mail:xiongrongchuan@126.com。

表 1 本研究所用小弧斑姬蛙标本及参考序列信息

物种名	GenBank 索取号	标本号	采集地	数据来源
<i>Microhyla heymonsi</i>	MH544145	LPSMJ2016062506	贵州省黔东南州麻江县坝芒乡	本研究
<i>Microhyla heymonsi</i>	MH544146	LPSMJ2016062507	贵州省黔东南州麻江县坝芒乡	本研究
<i>Microhyla heymonsi</i>	MH544147	LPSMJ2016062508	贵州省黔东南州麻江县坝芒乡	本研究
<i>Microhyla heymonsi</i>	AB201190	KUHEK1845	泰国	[4]
<i>Microhyla heymonsi</i>	AB530636	未知	马来西亚	GenBank
<i>Microhyla heymonsi</i>	AB530637	未知	马来西亚	GenBank
<i>Microhyla heymonsi</i>	AB598336	KUHE;23856	泰国	[5]
<i>Microhyla heymonsi</i>	AF215372	未知	未知	[6]
<i>Microhyla heymonsi</i>	AF285200	未知	越南	GenBank
<i>Microhyla heymonsi</i>	AF285201	未知	越南	GenBank
<i>Microhyla heymonsi</i>	AY458596	未知	未知	[7]
<i>Microhyla heymonsi</i>	DQ283382	AMNH_A163850	越南	[8]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359087	KU;field_tag_DSM_1136	泰国	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359088	KU;field_tag_DSM_1152	泰国	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359089	KU;field_tag_DSM_1153	泰国	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359090	KU;field_tag_DSM_1205	泰国	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359091	RM MIHEJS2	新加坡	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359092	RM MIHEJS3	新加坡	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359093	RM MIHEJS4	新加坡	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359094	RM MIHEJS5	新加坡	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359095	RM MIHEJS6	新加坡	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	HM359096	RM MIHEJS8	新加坡	[2]
<i>Microhyla heymonsi</i>	KC179993	CAS;HERP;210748	缅甸	[9]
<i>Microhyla heymonsi</i>	KU840570	061002	四川省泸州市合江县自怀镇	[10]
<i>Microhyla heymonsi</i>	MG935906	USNM;587138	缅甸	[11]
<i>Microhyla heymonsi</i>	MG935907	USNM;587130	缅甸	[11]
<i>Microhyla heymonsi</i>	MG935908	USNM;586956	缅甸	[11]
<i>Microhyla heymonsi</i>	MG935909	USNM;586955	缅甸	[11]
<i>Microhyla heymonsi</i>	MG935911	USNM;586957	缅甸	[11]
<i>Microhyla heymonsi</i>	MG935912	USNMFS35509	缅甸	[11]

除。进行系统发育分析时不预先设定外群,构建无根系统发育树。使用 jModel Test<sup>[17]</sup> 中赤池信息量准则 (akaike information criterion, 简称 AIC) 筛选适合数据集 A 的最优模型,并使用相应的最优模型树 (best model tree) 作为拓扑结构基准。根据 AIC, 适合该数据集的模型为 GTR + I + G 模型,其中 G = 0.885,I = 0.605。使用 raxmlGUI 软件<sup>[18]</sup> 构建最大似然树 (maximum likelihood tree, 简称 ML tree), 自举检验支持率 > 70% 表明该支系关系得到充分解决。使用 Mrbayes 3.2<sup>[19]</sup> 构建贝叶斯树 (bayesian inference tree, 简称 BI tree), 碱基替换模型设置为 GTR + G + I, 以后验概率 (posterior probability, 简称

PP) 来表示各分支的可信度 (支持率), 贝叶斯后验概率 ≥ 95% 说明其支系支持率得到充分解决。使用 Mega X 软件构建邻接树 (neighbor – joining tree, 简称 NJ tree) 和最大简约树 (maximum parsimony tree, 简称 MP tree), 自举检验支持率 > 70% 表明该支系关系得到充分解决, 支持率在 50% ~ 70% 之间为中度支持, 否则视为未解决。

1.4 遗传距离的计算

选用软件 Mtga X, 分析数据集 A 中各序列间差异, 依据 Kimura 2 – parameter 模型计算两两序列间的遗传距离以及主要支系间的平均遗传距离。使用 R 语言基础包 (base) 绘制种间及种内遗传距离

数据的密度分布曲线,探明小弧斑姬蛙及近缘物种在 16S 基因上的种间及种内遗传距离的主要分布区域。

### 1.5 单倍型网络构建

根据双重单系法<sup>[5,20]</sup>,在数据集构建的系统发育树上,以自测序列为起点向根部回溯 2 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*。使用 R 语言程序包 haplotypes<sup>[21]</sup> 分析数据集 *B* 的单倍型类型并绘制单倍型网络(图 1 - A)。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。

## 2 结果与分析

### 2.1 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。经测序,获得长度为 544 ~ 555 bp DNA 序列(GenBank 索取号为 MH544145 ~ MH544147)。序列碱基组成存在明显的偏向性:AT 含量较高(A 含量为 31.1%,T 含量为 25.5%);GC 含量较低(G 含量为 20.9%,C 含量为 22.6%)。所扩增最长序列 MH544146(555 bp),对应小弧斑姬蛙线粒体基因组的(GenBank 索取号为 AY458596)2 161 ~ 2 703 bp 区间位置,对应小弧斑姬蛙 16S rRNA 全基因(位于线粒体基因组 AY458596 的 1 288 ~ 2 861 bp 区域)874 ~ 1 416 bp 区间位置,因此扩增目的序列为小弧斑姬蛙 16S rRNA 编码基因的下游区域。

### 2.2 序列及其系统发育分析结果

将所测得 16S 基因序列与 100 条同源序列一起构建的系统发育树中(图 1 - B),3 条自测序列与 27 条小弧斑姬蛙同源序列聚为 1 个单系(小弧斑姬蛙支系,图 1 - C 中节点 N11),同时得到 NJ(97%)、MP(90%)、ML(88%)以及 BI(100%)等方法的较高支持率支持(表 2)。在其内部,进一步分化为 5 个主要支系(节点 N04、N05、N06、N09 所在支系以及单序列支系 MG935906)。N05、N06、N09 均得到了 4 种系统发育推断方法较高支持(表 2)。本研究中 3 条自测序列与自怀、越南等种群的 6 条序列聚为 1 个支系(N04),但支持率较低(表 2)。

### 2.3 单倍型网络

提取小弧斑姬蛙支系序列构建数据集 *B*,以之

构建单倍型网络,在将简约上限设置为默认值 0.95 时,并未将所有序列包括在同一个单倍型网络中,其中支系 N06 中的 3 条序列(AB530636、AB530637、HM359091)单独构成 1 个独立网络。为进一步将主要支系都分割成独立的网络,更清晰地观察自测序列单倍型所属网络情况,根据系统发育树的主要支系分化的拓扑结构,将简约上限设置为 0.97,以得到更多的相互独立的单倍型网络(6 个单倍型网络分别为 Net01、Net02、Net03、Net04、Net05、Net06,图 1 - C)。然而,当所有支系都独立成单独的单倍型网络时,支系 N01 绝大部分序列构成单倍型网络 Net01(图 1 - A),而序列 DQ283382 单独构成一个单倍型网络 Net05(图 1 - C)。初步推定该序列为一条可疑序列,为探究其对系统发育关系构建的影响,从数据集 *A* 中剔除 DQ283382,重新构建序列间的系统发育关系,探究该序列对系统发育树拓扑结构和节点支持率的影响(表 2)。

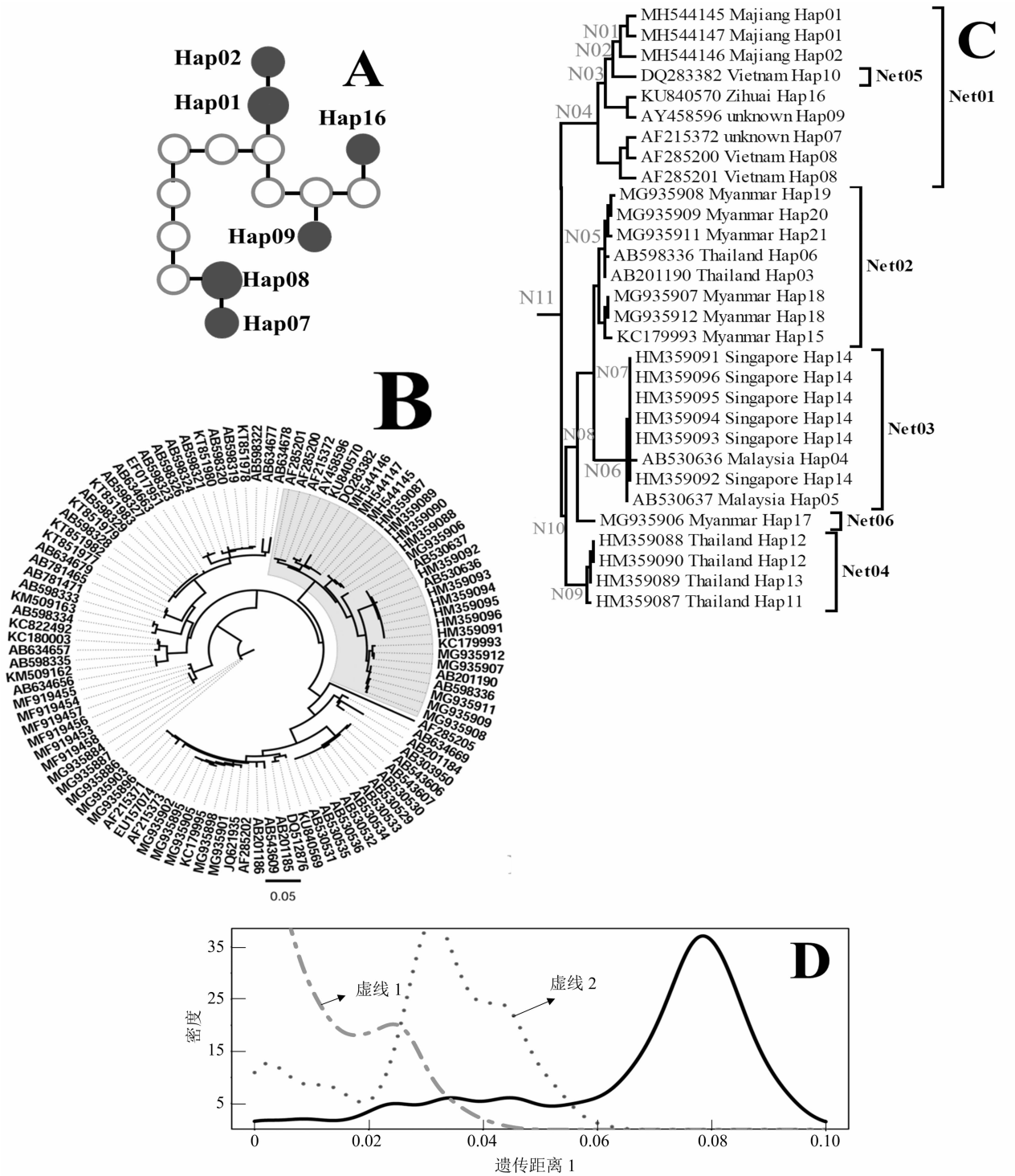
表 2 小弧斑姬蛙支系主要节点的支持率

节点名称	%							
	保留 DQ283382 的支持率				去掉 DQ283382 的支持率			
	NJ	MP	ML	BI	NJ	MP	ML	BI
N01	94	49	82	<50	96	94	90	82
N02	NA	NA	54	60	NA	NA	NA	NA
N03	NA	83	60	88	86	90	75	86
N04	57	42	38	<50	73	43	49	<50
N05	82	89	80	91	83	92	80	92
N06	100	100	97	100	100	99	98	100
N07	NA	84	71	100	NA	83	75	100
N08	50	70	76	100	50	65	77	100
N09	100	99	100	100	99	99	100	100
N10	NA	NA	47	91	NA	37	52	91
N11	97	90	88	100	96	91	88	100

注:NA 代表对应系统发育树中无该支系。

### 2.4 遗传距离

基于 16S 基因序列的遗传距离表明,小弧斑姬蛙支系内遗传距离为 0.0% ~ 1.6%,其内部支系 Net01、Net02、Net03、Net04 的内部序列间平均遗传距离分别为 1.12%、0.87%、0.15%、0.33%,亚支系间的遗传距离为 3.6%(2.2% ~ 5.6%);亚支系和非小弧斑姬蛙序列间的遗传距离为 7.7%(7.2% ~ 8.7%)。种间及种内遗传距离数据的密度分布曲线(图 1 - D)表明,相比所有序列种间遗传距离分布曲线,小弧斑姬蛙支系内部序列间的遗传距离分布曲线和种内遗传距离分布曲线重合较多,但总体高于种内遗传距离。



A—支系 Net01 的单倍型网络；B—基于小弧斑姬蛙 16S 基因序列及其同源参考序列构建的系统发育树；  
C—小弧斑姬蛙支系及其内部支系分化；D—基于本研究中 16S 基因序列计算的种内（虚线 1）、  
种间（实线）以及小弧斑姬蛙序列间的遗传距离（虚线 2）分布

图1 小弧斑姬蛙的系统发育分析

3 讨论

3.1 小弧斑姬蛙的分子鉴定

本研究系统发育分析结果表明,3 条自测序列

与 27 条小弧斑姬蛙同源序列聚为 1 个单系,既使去掉可疑序列(DQ283382)后,仍与 26 条小弧斑姬蛙同源序列聚为 1 个单系(表 2)。3 条自测序列与来自我国自怀以及越南的小弧斑蛙同源序列聚为 1 个

亚支系,内部序列间平均遗传距离分别为 1.12%,远低于本研究中所有序列的种间遗传距离(图 1-D)。因此,初步判定本研究所采集蝌蚪标本属于小弧斑姬蛙(*Microhyla heymonsi*)。但本研究涉及的麻江、自怀种群均距离模式产地台湾<sup>[3]</sup>较远,且缺乏其他种群数据(台湾种群、东部种群等),因此鉴定结果有待进一步证实。

### 3.2 小弧斑姬蛙内部支系分化

在本研究中,小弧斑姬蛙支系进一步分化为 6 个亚支系,各支系在单倍型网络分析中被分割为独立的网络(排除 1 条可疑序列后,仍有 5 个支系)。且部分支系单系性在多种系统发育分析方法中得到较高的支持率,如支系 Net02、Net03。亚支系间的遗传距离与种内距离不完全重合,偏高,但并没有超越种间距离(图 1-D),说明小弧斑姬蛙物种内部种群间有了较大的遗传分化。考虑其较为广阔的分布范围<sup>[3]</sup>,这种分化可能在一定程度上是由于种群间相距较远,基因交流频率较低所致,详细的种内支系分化关系以及分化水平有待更为充分的抽样研究支撑。

### 3.3 可疑序列剔除方法初探

在本研究使用的参考序列中 DQ283382 在系统发育关系重建中聚在支系 N04 内部,但在单倍型网络构建中,其并未与该支系的其他序列链接为一个共同的网络(Net01),而是独立成为 1 个单独网络(Net05)。鉴于该序列所在种群未有其他同源序列<sup>[4]</sup>(生物重复),初步判定为一条可疑序列。为探究该可疑序列对于系统发育关系重建的影响,本研究将其剔除后重新构建的系统发育树与未剔除时的系统发育树作对比。结果(表 2)表明,剔除该序列后,不同方法构建的系统发育树的拓扑结构更趋一致,如在剔除前,节点 N03 同时得到了 MP、ML、BI 方法的支持,但没有得到 NJ 的支持,在剔除后,同时得到了 4 种方法的支持;又如节点 N10 的聚类关系只得到了 ML、BI 的支持,剔除 DQ283382 后,增加了 MP 方法的支持。另外,剔除序列 DQ283382 后,系统发育树的大多数节点支持率都有所提高。例如 N01 节点,MP 的支持率由 49% 上升为 94%,BI 的支持率由 <50% 上升至 82%;又如 N03 节点,ML 树的支持率由 60% 上升到 75%;N04 节点的 NJ 树的支持率由 57% 上升至 73%。

综上所述,可疑序列 DQ283382 在一定程度上影响了系统发育关系的重建,而对比单倍型网络与

系统发育树拓扑结构的一致性,提供了识别类似可疑序列的一个视角,当然其适用性还有待更多的案例研究加以检验。

### 参考文献:

- [1] 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,2012:568-569.
- [2] Sheridan J A, Bickford D, Feng K, et al. An examination of call and genetic variation in three wide-ranging Southeast Asian anuran species[J]. The Raffles Bulletin of Zoology, 2010, 58(2): 369-379.
- [3] 费 梁,胡淑琴,叶昌媛,等. 中国动物志两栖纲(中卷)无尾目[M]. 北京:科学出版社,2009:894-899.
- [4] Matsui M, Ito H, Shimada T, et al. Taxonomic relationships within the pan-oriental narrow-mouth toad *Microhyla ornata* as revealed by mtDNA analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae) [J]. Zoological Science, 2005, 22(4): 489-495.
- [5] Matsui M. Taxonomic revision of one of the Old World's smallest frogs, with description of a new Bornean *Microhyla* (Amphibia, Microhylidae) [J]. Zootaxa, 2011, 2814(1): 33-49.
- [6] Vences M. Phylogenetic studies on ranoid frogs (Amphibia: Anura) with a discussion of the origin and evolution of the vertebrate clades of Madagascar[D]. Bonn: University of Bonn, 2000.
- [7] Zhang P, Zhou H, Chen Y Q, et al. Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians[J]. Systematic Biology, 2005, 54(3): 391-400.
- [8] Frost D R, Grant T, Faivovich J N, et al. The amphibian tree of life [J]. Bulletin of the American Museum of Natural History, 2006, 297: 257-291.
- [9] Rafael O S, Streicher J W, Sekonyela R, et al. Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera[J]. BMC Evolutionary Biology, 2012, 12(1): 1-21.
- [10] Goutte S, Dubois A, Howard S D, et al. Environmental constraints and call evolution in torrent-dwelling frogs[J]. Evolution, 2016, 70(4): 811-826.
- [11] Mulcahy D G, Lee J L, Miller A H, et al. Filling the BINs of life: report of an amphibian and reptile survey of the Tanintharyi (Tenasserim) region of Myanmar, with DNA barcode data [J]. ZooKeys, 2018(757): 85-152.
- [12] Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651-701.
- [13] 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.
- [14] 朱思瑾,张细林,张 爽,等. 重庆酉阳分布寒露林蛙的分子鉴定[J]. 自然科学, 2018, 6(1): 1-8.

程 贝,韩如冰,刘家齐,等. 不同品种紫花苜蓿种子耐硒能力研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):150-155.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.032

# 不同品种紫花苜蓿种子耐硒能力研究

程 贝,韩如冰,刘家齐,赵世玉,张丹璐,樊文娜

(河南科技大学动物科技学院,河南洛阳 471000)

**摘要:**研究不同品种苜蓿在硒溶液处理条件下的发芽特性,比较其耐硒性,为富硒紫花苜蓿的栽植利用提供依据。试验采用水培法,以 WL343HQ、WL353LH、WL363HQ、WL903、劲能 5010、拉迪诺、甘农 5 号等 7 种苜蓿种子为研究对象,设置 5 个亚硒酸钠梯度,分别为 0、8.647、17.294、25.941、34.588 mg/L。试验使用人工培养箱,以滤纸作为发芽床,每个品种 3 次重复试验,单因素分析。根据发芽率、苗长、鲜质量、活力指数等指标来评判各个品种的耐硒能力以及分析随着硒浓度的增加各个指标的变化。结果表明,随着硒浓度的增加,发芽率、苗长、鲜质量、活力指数都呈现减小的趋势,各个浓度之间差异显著( $P < 0.05$ );通过综合比较 7 种紫花苜蓿品种的各个指标,耐硒能力表现为甘农 5 号 > WL343HQ = WL903 > 劲能 5010 > WL363HQ > 拉迪诺 > WL353LH。

**关键词:**紫花苜蓿;发芽势;发芽率;耐硒能力;活力指数

**中图分类号:** S541+.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0150-06

硒(selenium)为半金属元素,最先被瑞典科学家 Berzelius 于 1817 年发现,并被命名为“月亮女神”<sup>[1]</sup>。微量元素硒有着自身特殊的生化特性,在动植物的生理过程中起着重要作用<sup>[2]</sup>,对人畜健康有着重要影响,例如硒有抗氧化、抗癌、调节免疫力等作用,人体和动物体不能自发合成硒,且硒在人体内易排泄,因此人体必须每天摄入一定量的硒来保证机体正常的代谢<sup>[3]</sup>。但是我国大部分土壤中缺乏微量元素硒,所以仅靠自然生长的植物很难满

足动植物对硒的生长需要。对作物施硒可提高食物链中的硒水平<sup>[4]</sup>,牧草施用硒肥对解决低硒地区的人畜补硒问题有着重要意义<sup>[5]</sup>。已经证明植物在硒的生态链中可以更有效地将无机硒转化为有机硒,而人和动物对有机硒的吸收与利用远大于无机硒,我国属于缺硒国家,但仍发现有少量富硒地区,并根据各地区特点,在这些典型区域内开发了多种富硒农牧产品,如湖北恩施和陕西紫阳的富硒茶,可见富硒植物开发潜力巨大<sup>[6-7]</sup>。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)简称苜蓿,是古老的牧草,原产于伊朗,现分布于世界各国<sup>[8]</sup>,是世界上分布最广、种植面积最大的深根多年生豆科牧草,具有“牧草之王”的称号<sup>[9]</sup>,是我国分布最广泛和栽培最早及利用效益最高的豆科类牧草之一<sup>[10]</sup>,含有丰富的粗蛋白质、无机盐和氨基酸<sup>[11]</sup>,配比合理,堪称畜禽最好的牧草<sup>[12]</sup>。同时,它能保持水土、

收稿日期:2019-06-02

基金项目:河南科技大学大学生研究训练计划(SRTP)(编号:2018377)。

作者简介:程 贝(1994—),女,河南周口人,主要从事牧草分子研究。E-mail:18438699622@163.com。

通信作者:樊文娜,博士,讲师,主要从事牧草分子研究。E-mail:chou0516@163.com。

[15] Edgar R C. Muscle; multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(5): 1792-1797.

[16] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. Mega X; molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.

[17] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. Nature Methods, 2012, 9(8): 772.

[18] Silvestro D, Michalak I R. A graphical front-end for RAxML[J].

Organisms Diversity and Evolution, 2012, 12(4): 335-337.

[19] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. MrBayes 3. 2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. Systematic Biology, 2012, 61(3): 539-542.

[20] 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.

[21] Aktas C. Haplotypes; Manipulating DNA sequences and estimating unambiguous haplotype network with statistical parsimony[R]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=haplotypes>, 2019.