

贵州省两栖动物新纪录——宜章臭蛙 及其系统发育分析

李仕泽^① 石磊^② 吕敬才^③ 魏刚^④ 徐宁^⑤
陈靖^② 姜森^② 王斌^{⑥*}

① 黔西南民族职业技术学院 兴义 562400; ② 梵净山自然保护区管理局 铜仁 554400; ③ 贵州省生物研究所 贵阳 550009;

④ 贵阳学院, 贵州省生物多样性与应用生态学特色重点实验室 贵阳 550005; ⑤ 茅台学院食品科学与工程系 仁怀 563003;

⑥ 中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室, 生态恢复与生物多样性保育四川省重点实验室,

中国科学院成都生物研究所 成都 610041

摘要: 2015年5月至7月在贵州省梵净山国家级自然保护区采集到6号臭蛙标本, 经鉴定为宜章臭蛙 (*Odorrana yizhangensis*) (两栖纲, 无尾目, 蛙科), 属贵州省两栖动物新纪录。本文给出了这6号标本的22项外形特征量度, 并描述了其生境特征。基于12S rRNA和16S rRNA基因片段构建的最大似然系统发育树表明, 这些标本与宜章臭蛙模式产地标本聚在一起, 且他们之间的遗传距离远远小于臭蛙属物种之间的距离。宜章臭蛙在贵州的新记录将促进该物种的分类与谱系地理学研究。

关键词: 贵州省; 新纪录; 宜章臭蛙

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 06-1110-08

New Record of *Odorrana yizhangensis* in Guizhou Province and Its Phylogenetic Analyses

LI Shi-Ze^① SHI Lei^② LÜ Jing-Cai^③ WEI Gang^④ XU Ning^⑤ CHEN Jin^②
JIANG Sen^② WANG Bin^{⑥*}

① Southwest Guizhou Vocational and Technical College for Nationalities, Xingyi 562400; ② Fanjingshan National Nature Reserve Administration, Tongren 554400; ③ Biological Research Institute of Guizhou Province, Guiyang 550009; ④ Guizhou Provincial Key and Special Laboratory for Biodiversity and Ecology Appliance, Guiyang University, Guiyang 550005; ⑤ Department of Food Science

and Engineering, Maotai University, Renhuai 563003; ⑥ CAS Key Laboratory of Mountain Ecological Restoration and Bioresource Utilization & Ecological Restoration and Biodiversity Conservation Key Laboratory of Sichuan Province,

Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31360144, 31201702), 贵州省科学技术基金项目 (黔科合J字 LKG[2013]05号), 贵阳市科技计划项目 (筑科合同 No. 201110360), 贵州省协同创新中心项目 (黔教合协同创新字[2015]06), 梵净山国家级自然保护区第二次本底调查项目 (No. 2011fmr006);

* 通讯作者, E-mail: wangbin@cib.ac.cn;

第一作者介绍 李仕泽, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物生态及保护; E-mail: lshz92@163.com。

收稿日期: 2016-02-22, 修回日期: 2016-07-06 DOI: 10.13859/j.cjz.201606020

Abstract: Six specimens of odour frogs were collected from Fanjing Mountain National Nature Reserve (FMNNR) in Guizhou Province from May to July in 2015 (Table 1). The specimens were identified as *Odorrana yizhangensis* (Amphibia, Anura, Ranidae); and this is the new record of this species in Guizhou Province. Twenty two morphological characters of the specimens were measured (Table 2) and their habitats (Fig. 1) were also described. The maximum likelihood phylogenetic tree constructed based on 12S rRNA and 16S rRNA gene fragments showed that the six specimens were clustered with the *O. yizhangensis* sampled from its type locality (Fig. 2), and the genetic distance of Kamura-2-parameter model between our specimens and *O. yizhangensis* sample from its type locality was much smaller than that between *Odorrana* species (Table 3). New found of *O. yizhangensis* in Guizhou Province would promote taxonomic and phylogeographic studies on this species.

Key words: Guizhou Province; New record; *Odorrana yizhangensis*

臭蛙属 (*Odorrana*) 物种主要分布于亚洲亚热带和热带地区, 中国现已报道 36 种 (Frost 2016), 其中贵州省报道分布有 8 种, 即安龙臭蛙 (*O. anlungensis*)、务川臭蛙 (*O. wuchuanensis*)、大绿臭蛙 (*O. graminea*)、绿臭蛙 (*O. margaretae*)、无指盘臭蛙 (*O. grahami*)、筠连臭蛙 (*O. junlianensis*)、花臭蛙 (*O. schmackeri*) 和龙胜臭蛙 (*O. lungshengensis*)。除花臭蛙和绿臭蛙在贵州大部分地区有分布外, 其余各种在贵州呈片断化分布 (伍律等 1986, 费梁等 2012, 赵宇中等 2013)。作者于 2015 年 5 月至 7 月在梵净山国家级自然保护区采集到 6 号臭蛙成体标本 (5 雄 1 雌), 经形态学和分子系统学比较分析, 鉴定为宜章臭蛙 (*O. yizhangensis*)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本文作者于 2015 年 5 月至 7 月在贵州省梵净山国家级自然保护区一段溪流内 (27°53'43"N, 108°43'17"E) 采集到 6 号 (5 雄 1 雌) 臭蛙类成体标本 (表 1)。取肌肉组织存于 95% 的乙醇中 (样品号见表 1)。标本浸泡于福尔马林, 保存于中国科学院成都生物研究所。

1.2 形态鉴定与测量

标本的形态鉴定依据标准为《中国两栖动物检索及图鉴》(费梁等 2005) 和《中国两栖

动物及其分布彩色图鉴》(费梁等 2012)。使用游标卡尺对 6 号标本的 22 项形态特征进行测量, 精确到 0.02 mm。

1.3 DNA 提取、扩增及测序

采用高盐法从以上肌肉样品中提取总 DNA。本研究利用 PCR 扩增并测定了 12S rRNA 基因部分片段和 16S rRNA 基因部分片段。扩增 12S 的引物为 P1 和 P2 (Kocher et al. 1989), 扩增 16S 的引物为 P7 和 P8 (Simon et al. 1994)。PCR 扩增条件和步骤参照 Chen 等 (2013)。扩增产物经电泳检测后, 大小符合要求的产物交由生工生物工程 (上海) 有限公司测序。采用双向测序, 测序引物为 PCR 扩增引物。所得序列上传到 GenBank (GenBank 接受号见表 1)。

1.4 分子系统发育关系重建

下载了 GenBank 中的臭蛙属部分物种和蛙科部分相近物种的 12S rRNA 和 16S rRNA 基因序列, 结合本文所测序列, 进行分子系统发育分析 (表 1)。系统发育分析中以黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculatus*)、细刺水蛙 (*Hylarana spinulosa*)、沙巴湍蛙 (*Amolops chapaensis*) 和中国林蛙 (*Rana chensinensis*) 为外群 (Chen et al. 2013)。所有序列在软件 Clustal X v1.8 (Thompson et al. 1997) 中进行比对, 采用默认配置, 比对后的序列进行人工校对。系统发育树的构建采用最大似然法

表 1 样品信息表

Table 1 Samples used in this study and GenBank accession numbers for sequences

物种名或标本号 Species or the specimen No.	采集地 Locality	GenBank 接受号 GenBank accession numbers		
		12S rRNA	16S rRNA	
本文标本 Specimen of this study	FJS20150720001	贵州江口 Jiangkou, Guizhou	KX538892	KX538898
	FJS20150720002	贵州江口 Jiangkou, Guizhou	KX538893	KX538899
	FJS20150720004	贵州江口 Jiangkou, Guizhou	KX538894	KX538900
	FJS20150720005	贵州江口 Jiangkou, Guizhou	KX538895	KX538901
	FJS20150720006	贵州江口 Jiangkou, Guizhou	KX538896	KX538902
	FJS20150720007	贵州江口 Jiangkou, Guizhou	KX538897	KX538903
宜章臭蛙 <i>Odorrana yizhangensis</i>	湖南宜章 Yizhang, Hunan	KF185012	KF185048	
龙胜臭蛙 <i>O. lungshengensis</i>	广西龙胜 Longsheng, Guangxi	KF185018	KF185054	
花臭蛙 <i>O. schmackeri</i>	湖北宜昌 Yichang, Hubei	KF185011	KF185047	
筠连臭蛙 <i>O. junlianensis</i>	四川筠连 Junlian, Sichuan	KF185022	KF185058	
合江臭蛙 <i>O. hejiangensis</i>	四川合江 Hejiang, Sichuan	KF185016	KF185052	
安龙臭蛙 <i>O. anlungensis</i>	贵州安龙 Anlong, Guizhou	KF185013	KF185049	
无指盘臭蛙 <i>O. grahami</i>	云南昆明 Kunming, Yunnan	KF185015	KF185051	
海南臭蛙 <i>O. hainanensis</i>	海南五指山 Wuzhishan, Hainan	KF184996	KF185032	
光雾臭蛙 <i>O. kuangwuensis</i>	四川南江 Nanjiang, Sichuan	KF184998	KF185034	
大绿臭蛙 <i>O. margaretae</i>	四川峨眉 Emei, Sichuan	KF184999	KF185035	
务川臭蛙 <i>O. wuchuanensis</i>	贵州务川 Wuchuan, Guizhou	KF185007	KF185043	
沙巴端蛙 <i>Amolops chapaensis</i>	越南莱州 Lai Chau, Vietnam	DQ283372	DQ283372	
景东臭蛙 <i>O. jingdongensis</i>	云南景东 Jingdong, Yunnan	KF185014	KF185050	
中国林蛙 <i>Rana chensinensis</i>	陕西宁陕 Ningshan, Shanxi	KF185025	KF185061	
细刺水蛙 <i>Sylvirana spinulosa</i>	海南五指山 Wuzhishan, Hainan	KF185031	KF185067	
黑斑侧褶蛙 <i>Pelophylax nigromaculatus</i>	安徽金寨 Jinzhai, Anhui	KF185026	KF185062	

(maximum likelihood, ML)。构建 ML 树前, 利用软件 jModeltest v2 (David 2008) 基于 AIC 标准选择最适核苷酸替代模型。ML 树的构建在软件 PhyML v 3.0 (Guindon et al. 2012) 中完成, 并进行 1 000 次 bootstrap 重抽样分析, 检验各节点置信度。

1.5 遗传距离

用 MEGA v6.0 (Tamura et al. 2013) 中的 Kimura 双参数模型计算表 1 中所列的臭蛙属物种间的遗传距离。

2 结果

2.1 形态鉴定与量度

比较了贵州梵净山所采集的标本和文献所

列臭蛙属物种的形态鉴定特征, 发现采集于梵净山的臭蛙标本与宜章臭蛙模式产地标本的形态特征相近, 因此, 这些标本形态鉴定为宜章臭蛙。贵州梵净山宜章臭蛙标本雄蛙体长 (54.82 ± 0.59) mm (54.00 ~ 55.64 mm, $n = 5$), 雌蛙体长 77.1 mm。其他各部分测量数据见表 2。贵州梵净山宜章臭蛙头部扁平, 头长略大于头宽; 吻长大于眼径; 吻端钝圆, 突出于下唇; 吻棱明显, 颊部几近垂直, 凹陷深; 外鼻孔开口向后, 鼻孔略近吻端, 鼻间距大于眼间距; 鼓膜大而明显, 约为第 3 趾吸盘的 2 倍; 犁骨齿两斜列; 舌后端缺刻深。

前臂及手长约为体长之半, 前臂较粗壮; 指吸盘长径大于横径, 第 1 ~ 4 指腹侧沟均明

表 2 梵净山地区的宜章臭蛙标本形态量度 (单位: mm)
Table 2 Measurements on the specimens of *Odorrana yizhangensis*
from Fanjing Mountain of Guizhou Province (unit: mm)

项目 Item	5 ♂			1 ♀	
	范围 Range	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	百分比 (%) Percentage	测量值 Value	百分比 (%) Percentage
头体长 Snout-vent length	54.00 ~ 55.64	54.82 ± 0.59		77.10	
头长 Head length	18.84 ~ 19.80	19.34 ± 0.41	35.29	25.20	32.68
头宽 Head width	17.72 ~ 18.82	18.39 ± 0.41	33.54	24.94	32.35
吻长 Snout length	8.18 ~ 8.84	8.57 ± 0.27	15.64	11.24	14.58
眼径 Diameter of eye	7.20 ~ 7.64	7.44 ± 0.16	13.56	8.50	11.02
上眼睑宽 Width of upper eyelid	4.78 ~ 5.26	5.01 ± 0.21	9.14	6.92	8.98
眼间距 Interorbital space	4.04 ~ 4.90	4.42 ± 0.41	8.06	5.92	7.68
鼻间距 Nasal space	5.54 ~ 6.62	6.14 ± 0.45	11.21	8.20	10.64
鼻眼距 Nasal-eye length	3.10 ~ 4.10	3.80 ± 0.40	6.94	6.40	8.30
鼻吻距 Nasal-snout length	3.14 ~ 4.00	3.63 ± 0.32	6.62	4.78	6.20
两眼前角距 Distance between front corner of eyes	9.30 ~ 9.52	9.36 ± 0.91	17.08	13.00	16.86
两眼后角距 Distance between back corner of eyes	15.58 ~ 15.82	15.67 ± 0.11	28.58	20.20	26.20
鼓膜径 Diameter of tympanum	4.04 ~ 4.52	4.23 ± 0.18	7.72	4.32	5.60
前臂及手长 Length of lower arm and hand	26.40 ~ 27.84	27.10 ± 0.55	49.43	37.32	48.40
前臂宽 Width of lower arm	6.78 ~ 7.46	7.20 ± 0.28	13.13	6.00	7.78
股长 Thigh length	24.12 ~ 25.84	24.85 ± 0.75	45.30	37.10	48.12
胫长 Tibia length	31.54 ~ 32.80	32.21 ± 0.55	58.75	44.00	57.07
胫宽 Tibia width	6.04 ~ 6.90	6.44 ± 0.32	11.74	10.00	12.97
附足长 Length of foot and tarsus	41.52 ~ 44.32	43.02 ± 1.12	78.49	58.94	76.45
足长 Foot length	30.80 ~ 33.20	31.84 ± 0.92	58.08	39.60	51.36
第 3 指吸盘宽 Third finger disk diameter	1.98 ~ 2.10	2.03 ± 0.04	3.70	3.16	4.10
第 4 趾吸盘宽 Fourth toe disk diameter	1.56 ~ 2.00	1.76 ± 0.18	3.21	2.42	3.14

表中百分比指各形态测量值与头体长的比例。

Percentage in this table means proportion of the measured values of each morphological item to the snout-vent length.

显；第 3 指吸盘约为鼓膜之半；指关节下瘤明显，且雌蛙指关节下瘤较雄蛙明显。后肢前伸贴体时胫跗关节未达吻端仅到鼻眼之间，胫长超过体长之半，左右跟部重叠；足长略短于胫长；趾吸盘略小于指吸盘；趾间全蹼。

背面皮肤光滑，除头与体侧外，前肢及蹼间亦有痣粒，雌蛙尤为明显；体侧有大小不一的扁平疣；颞褶细弱，在鼓膜后方向下成钝角状斜向肩前方；鼓膜下方至前肢基部有一排黄色颗粒状腺体。下颌缘和胸腹部有白色细刺，咽部和四肢腹面皮肤光滑（图 1）。

生活时背面绿色，从吻端至体后端以及体两侧有棕色大斑块，形状不规则，彼此相距较近，体侧则相对较小；沿吻棱、颞褶下方和鼓膜呈棕色，颌缘有棕色斑；在两眼前角之间有一小白点；四肢背面棕色横纹明显，股、胫部各有 5 ~ 7 条，体腹面白色，咽喉部密布深棕色斑，至胸腹部渐少；趾间蹼灰棕色。雄蛙体型较小，第一指具灰白色婚垫和天鹅绒状婚刺；有 1 对咽侧下外声囊（图 1）。

2.2 生境描述

宜章臭蛙在贵州梵净山自然保护区内主要

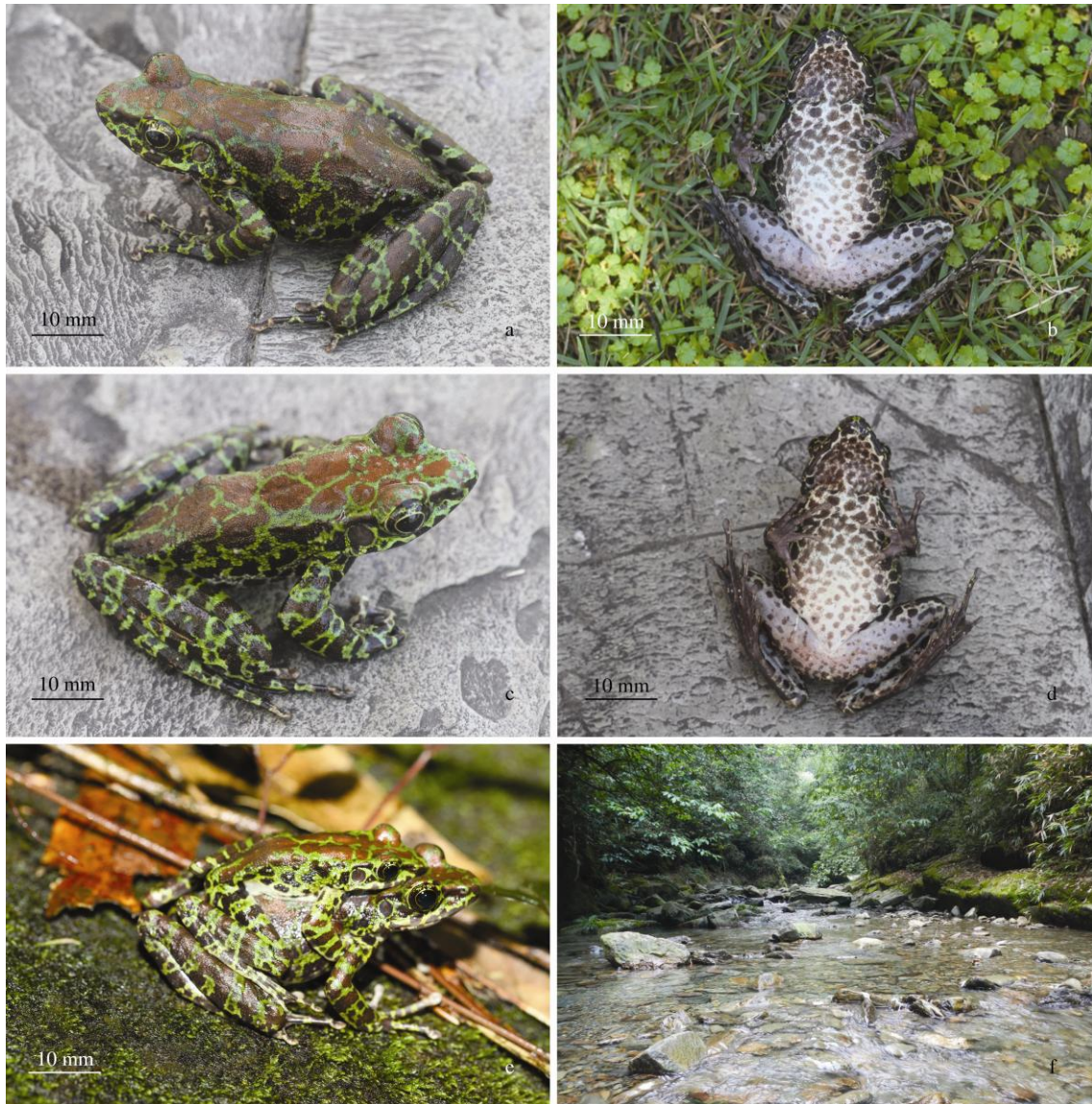


图 1 梵净山宜章臭蛙及生境照

Fig. 1 *Odorrana yizhangensis* and its habitat in Fanjing Mountain

a. 背面观 (♀); b. 腹面观 (♀); c. 背面观 (♂); d. 腹面观 (♂); e. 雌雄抱对; f. 梵净山生境。

a. Dorsal view (♀); b. Ventral view (♀); c. Dorsal view (♂); d. Ventral view (♂); e. Mating style; f. Habitat of *O. yizhangensis* in Fanjing Mountain.

分布于海拔 800 ~ 1 100 m 的溪流间, 溪流两侧灌木林茂密, 5 月初的夜间常见该蛙抱对栖于山溪内石头上或溪边长有苔藓的崖壁上亦或树枝及竹枝上 (图 1)。与其同域分布的两栖类有棘指角蟾 (*Megophrys spinata*)、棘腹蛙 (*Quasipaa boulengeri*)、武陵瘰螈

(*Paramesotriton wulingensis*)、大绿臭蛙、花臭蛙和华南湍蛙 (*Amolops ricketti*)。该蛙在小生境上与大绿臭蛙、花臭蛙和华南湍蛙均有重叠。

2.3 分子系统发育关系和遗传距离

本研究所用样品的 12S rRNA 与 16S rRNA 基因片段, 经比对编辑后联合成一个数据集,

最后得到有效序列长度为 859 bp(12S rRNA 长度为 329 bp, 16S rRNA 为 530 bp)。本文所用最适核苷酸替代模型为 GTR + G + I。

ML 系统树显示, 在梵净山所采的臭蛙标本与宜章臭蛙模式产地(湖南宜章)的标本相聚后构成单系(图 2), 且有较高的支持率(94%)。基于 Kimura 双参数模型估算的臭蛙属

部分物种间的遗传距离(表 3)表明, 本研究中所采用的臭蛙属物种间的遗传距离范围为 3.2% ~ 10.2%, 平均遗传距离为 6.4%。梵净山的臭蛙标本与宜章臭蛙模式产地湖南宜章样本间的遗传距离为 0.4%, 远远小于臭蛙属物种间的遗传距离。

因此, 分子系统发育分析和遗传距离结果

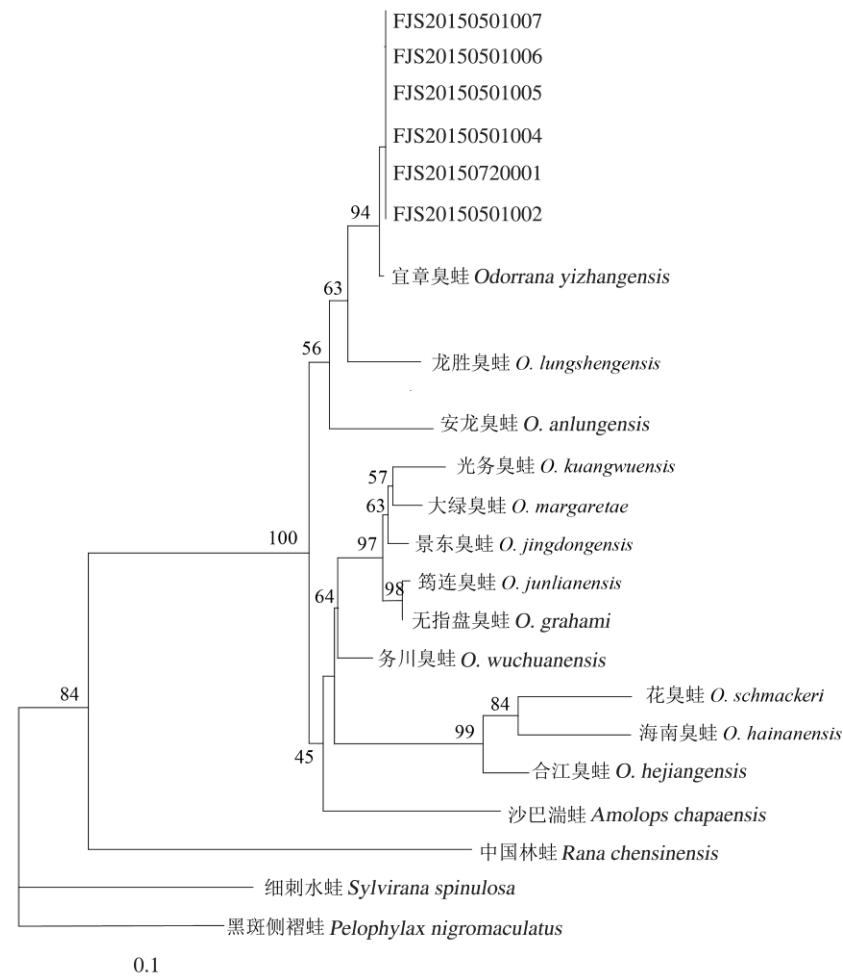


图 2 基于线粒体 12S rRNA 与 16S rRNA 基因联合序列构建的臭蛙属最大似然系统发育树

Fig. 2 Maximum likelihood tree for *Odorrana* based on concatenated dataset of 12S rRNA and 16S rRNA gene sequences

图中枝上的数字代表重抽样支持率。FJS20150720001、FJS20150720002、FJS20150720004、FJS20150720005、FJS20150720006、FJS20150720007 为本研究中梵净山的样品编号, 其余物种序列信息见表 1。

Numbers beside nodes indicate bootstrap values. Sequences of FJS20150720001, FJS20150720002, FJS20150720004, FJS20150720005, FJS20150720006 and FJS20150720007 were from Fanjing Mountains, and the information of other species sequences were shown in Table 1.

均支持采集于梵净山的臭蛙标本为宜章臭蛙。

3 讨论

宜章臭蛙为中国特有种(费梁等 2012), 此前报道该蛙仅分布于湖南宜章(费梁等 2007)、湖北五峰(戴兴宗等 2008)、广东南岭(杨剑焕等 2011)、江西井冈山(杨剑焕等 2013)、重庆南川(朱艳军等 2015)。本文基于形态比较和分子系统发育分析结果发现该物种也分布于贵州省梵净山国家级自然保护区。宜章臭蛙梵净山种群与模式产地湖南宜章种群相比, 在形态上梵净山种群指关节下瘤明显, 且雌蛙较雄蛙明显; 趾间全蹼; 后肢前伸贴体时胫跗关节未达吻端, 仅到鼻眼之间; 除头与体侧外, 前肢及蹼间亦有痣粒。此外, 宜章臭蛙湖南莽山种群繁殖期为 7~9 月, 7~8 月份为该蛙繁殖高峰期(费东波 2010), 而梵净山种群繁殖期主要集中在 5 月份; 在分子上两个种群间成单系, 遗传距离为 0.4%, 说明两个种群间已产生分化。从地理分布上看, 宜章臭蛙梵净山种群处于武陵山系, 宜章臭蛙的模式产地湖南宜章处于南岭山脉, 中间隔以雪峰山及苗岭。宜章臭蛙梵净山种群与模式产地宜章种群在形态及分子上存在一定差异的原因是否由于长期的地理隔离造成, 还需进一步研究。

参 考 文 献

- Chen X H, Chen Z, Jiang J P, et al. 2013. Molecular phylogeny and diversification of the genus *Odorrana* (Amphibia, Anura, Ranidae) inferred from two mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3): 1196–1202.
- David P. 2008. jModelTest: jModeltest Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253–1256.
- Frost D R. 2016. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. An Online Reference: Names assigned to genus *Odorrana*. [DB/OL] [2015-12-20]. New York, USA: American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/>
- Guindon S, Gascuel O. 2012. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696–704.
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16): 6169–6200.
- Simon C, Frari F, Beckenbaeh A, et al. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primer. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651–701.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876–4882.
- 戴宗兴, 王美芳, 唐登奎, 等. 2008. 湖北省两栖类两新纪录. *动物学杂志*, 43(1): 153–154.
- 费东波. 2010. 湖南莽山国家级自然保护区宜章臭蛙与花臭蛙繁殖期的生境选择与种群动态研究. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文.
- 费梁, 叶昌媛, 江建平, 等. 2005. 中国两栖动物检索及图解, 成都: 四川科学技术出版社, 123–131.
- 费梁, 叶昌媛, 江建平. 2007. 中国蛙科一新种(两栖纲, 无尾目). *动物分类学报*, 32(4): 989–992.
- 费梁, 叶昌媛, 江建平. 2012. 中国两栖动物及其分布彩色图鉴. 成都: 四川科学技术出版社, 1–619.
- 伍律, 董谦, 须润华. 1986. 贵州两栖志. 贵阳: 贵州人民出版社, 1–144.
- 杨剑焕, 洪元华, 赵健, 等. 2013. 5 种江西省两栖动物新纪录. *动物学杂志*, 48(1): 129–133.
- 杨剑焕, 李韵, 张天度, 等. 2011. 3 种广东省两栖爬行动物新纪录. *动物学杂志*, 46(1): 124–127.
- 赵宇中, 郭云, 赵海兵. 2013. 环境因子对贵州臭蛙物种地理分布的影响. *农技服务*, 30(7): 763–765.
- 朱艳军, 陈卓, 常利明, 等. 2015. 重庆市发现宜章臭蛙. *动物学杂志*, 50(6): 969–973.