

湖南通道发现雷山琴蛙

刘京 程彦林 周铝 姜世兴 张浪 李仕泽*

茅台学院资源环境系 仁怀 564500

摘要: 2020年5月23日在湖南省通道县万佛山镇(26°11'47" N, 109°56'21" E, 海拔924 m)采集到4号两栖动物标本, 经形态特征比较, 与雷山琴蛙(*Nidirana leishanensis*)相似; 基于线粒体16S rRNA构建的琴蛙属(*Nidirana*)部分物种贝叶斯系统发育树显示, 此次采集的琴蛙标本与雷山琴蛙聚为一支, 且具有较高的支持率(1.00); 基于Kamura双参数模型估算本次采集的琴蛙标本与雷山模式产地标本间的遗传距离为0.8%, 远小于琴蛙属物种间的遗传距离(1.4%~6.4%)。综合形态特征和系统发育比较, 确定此次采集到的琴蛙标本为无尾目(Anura)蛙科(Ranidae)琴蛙属的雷山琴蛙, 系湖南省两栖动物分布新记录种。

关键词: 雷山琴蛙; 分布新记录种; 湖南省

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 01-105-07

Nidirana leishanensis Found in Tongdao, Hunan

LIU Jing CHENG Yan-Lin ZHOU Lü JIANG Shi-Xing ZHANG Lang LI Shi-Ze*

Department of Resources and Environment, Moutai Institute, Renhuai 564500, China

Abstract: [Objectives] Four species of amphibian were recorded in Wanfoshan Town, Tongdao County, Hunan Province, China at 26°11'47" N, 109°56'21" E, altitude 924 m during a field survey on 23 May, 2020. They are recognized as first recorded in Hunan province by morphological and molecular. **[Methods]** Compared the specimens with other species of the genus *Nidirana* morphologically by comparing their measurement data and diagnosis feature (Sample information is shown in Table 1). Molecularly, based on 16S rRNA gene constructed Bayesian inference tree to analyze its phylogenetic relationship, the Kamura two-parameter model in MEGA v6.0 was used to calculate the genetic distances between species of the genus *Nidirana*. **[Results]** Through this research, we found the specimens were similar with *N. leishanensis* in morphological, morphometric measurements (Table 2) and feature (Fig. 1) conform to diagnosis characters. Based on 16S rRNA gene constructed Bayesian inference tree showed that the four specimens were clustered with the *N. leishanensis* with a high support (1.00) (Fig. 2). The genetic distance between the specimens and *N. leishanensis* from type locality was 0.8%, much lower than that between *Nidirana* species range from 1.4%

基金项目 贵州省林业厅科技项目(黔林科合[2020]13号), 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(KY字[2018]468号, KY字[2020]234号), 遵义市科技局项目(遵市科合HZ字[2020]319号);

* 通讯作者, E-mail: 976722439@qq.com;

第一作者介绍 刘京, 男, 副教授; 研究方向: 动物生态学; E-mail: 124969483@qq.com。

收稿日期: 2021-08-24, 修回日期: 2021-11-23 DOI: 10.13859/j.cjz.202201010

to 6.4% (Table 3). **[Conclusion]** Based on morphological and molecular compared, the specimens were identified as *N. leishanensis*, which is the new record of this species in Hunan Province, China.

Key words: *Nidirana leishanensis*; New record; Hunan Province

琴蛙属 (*Nidirana*) 广泛分布于欧亚大陆和美洲, 目前该属已报道 15 种 (Frost 2021), 其中, 中国记录分布 14 种, 湖南省记录分布 3 种, 分别为弹琴蛙 (*N. adenopleura*)、粤琴蛙 (*N. guangdongensis*) 和湘琴蛙 (*N. xiangica*) (中国两栖类 2021)。弹琴蛙在湖南广泛分布 (沈猷慧等 2014), 粤琴蛙分布在湖南东南部八面山等地 (Lyu et al. 2020), 湘琴蛙分布在湖南湘江流域以及浏阳大围山和双牌阳明山等地 (Lyu et al. 2020)。

2020 年 5 月, 在湖南通道县万佛山镇上洞村 (26°11'47" N, 109°56'21" E, 海拔 924 m) 采集到琴蛙属成体标本 4 号 (3♂ 1♀, 标本号见表 1), 经形态特征比较和系统发育分析, 鉴定为雷山琴蛙 (*N. leishanensis*), 为湖南省两栖动物分布新记录种。本文对其形态特征及生

态习性进行描述, 并初步探讨其形态特征的地理变异, 为琴蛙属物种的系统学和谱系地理学研究提供新信息。

1 材料与方法

1.1 材料

4 号标本取肌肉组织存于 95% 的乙醇中, 标本浸泡于 10% 福尔马林溶液中, 保存于茅台学院生物学标本室。

1.2 形态鉴定与测量

使用游标卡尺 (无锡锡工量具有限公司, 量程 200 mm, 精度 0.01 mm) 测量 4 号标本形态指标, 依据《中国两栖动物检索及图鉴》(费梁等 2005) 并参照《中国两栖动物及其分布彩色图鉴》(费梁等 2012) 和 Li 等 (2019), 进行形态鉴定。

表 1 样品信息表

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

物种及标本号 Species or the specimen No.	采集地 Locality	16S rRNA GenBank 登录号 16S rRNA of GenBank accession number
本文标本 Specimen of this study	湖南通道 Tongdao, Hunan	MZ707769
WB2020215♂		MZ707770
WB2020216♀		MZ707771
WB2020217♂		MZ707772
WB2020218♂		
雷山琴蛙 <i>Nidirana leishanensis</i>	贵州雷山 Leishan, Guizhou	MK293810
湘琴蛙 <i>N. xiangica</i>	湖南大围山 Mt. Dawei, Hunan	MN946433
海南琴蛙 <i>N. hainanensis</i>	海南陵水 Lingshui, Hainan	MK293808
弹琴蛙 <i>N. adenopleura</i>	福建武夷山 Mt. Wuyi, Fujian	MK293805
叶氏琴蛙 <i>N. yeae</i>	贵州桐梓 Tongzi, Guizhou	MN295227
粤琴蛙 <i>N. guangdongensis</i>	广东石门台 Shimentai, Guangdong	MN946404
林琴蛙 <i>N. lini</i>	云南江城 Jiangcheng, Yunnan	MF807818
仙琴蛙 <i>N. daunchina</i>	四川峨眉山 Mt. Emei, Sichuan	MF807822
瑶琴蛙 <i>N. yaoica</i>	广西大瑶山 Mt. Dayao, Guangxi	MK882271
孟闻琴蛙 <i>N. mangveni</i>	浙江大盘山 Mt. Dapan, Zhejiang	MN946424
琉球琴蛙 <i>N. okinavana</i>	琉球 Okinawa	AB761266
沙巴琴蛙 <i>N. chapaensis</i>	越南老街 Lao Cai, Vietnam	KR827711
南昆山琴蛙 <i>N. nankunensis</i>	广东南昆山 Mt. Nankun, Guangdong	MF807828
滇蛙 <i>N. pleuraden</i>	云南高黎贡山 Mt. Gaoligong, Yunnan	MF807816
绿臭蛙 <i>Odorrana margaretae</i>	四川洪雅 Hongya, Sichuan	NC024603
四川湍蛙 <i>Amolops mantzorum</i>	四川西岭山 Mt. Xiling, Sichuan	NC024180

1.3 分子鉴定

以高盐法提取保存于乙醇中肌肉组织的 DNA。利用引物 P7 和 P8 (Simon et al. 1994) PCR 扩增 16S rRNA 基因部分片段 (523 bp) 并测序。PCR 扩增条件和步骤参照 Chen 等 (2017)。扩增产物经电泳检测后, 大小符合要求的产物交上海生工生物公司测序。所得序列上传到 GenBank, GenBank 号为 MZ707769 和 MZ707770。

在 GenBank 中下载琴蛙属部分物种和蛙科部分相近物种的 16S rRNA 基因序列, 结合本次采集标本所测序列, 进行分子系统发育分析。以绿臭蛙 (*Odorrana margaretae*) 和四川湍蛙 (*Amolops mantzorum*) 为外群 (Li et al. 2019)。所有序列在软件 Clustal X v1.8 (Thompson et al. 1997) 中进行比对, 采用贝叶斯法 (Bayesian-inference, BI) 重建系统发育关系, 并获得系统树的支系结构和各支系的后验概率。建树之前, 利用软件 jModeltest v2 (David 2008) 基

于赤池信息标准选择最适核苷酸替代模型。用 MEGA v6.0 (Tamura et al. 2013) 中的 Kamura 双参数模型计算表 1 中所列琴蛙属物种间的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 形态描述

本次采集的 4 号标本中成体雄性 3 号 (WB2020215, WB2020217, WB2020218), 成体雌性 1 号 (WB2020216), 体型较大, 雄性头体长 54.88 ~ 55.28 mm, 雌性头体长 57.41 mm, 其他部位量度见表 2。吻端钝圆, 头长小于头宽, 瞳孔横置, 鼓膜明显, 呈圆形, 舌后端有明显缺刻, 犁骨棱和犁骨齿发达。前臂细长, 手指纤细, 指端略微膨大, 指长序 $3 > 1 > 4 > 2$, 掌突三, 呈椭圆形, 指关节下瘤明显, 第三、四指 2 个, 第一、二指 1 个; 后肢细长, 左右跟部重叠明显, 胫跗关节贴体前伸达眼鼻之间, 趾长序 $4 > 3 > 5 > 2 > 1$, 趾端有腹侧沟, 趾间

表 2 湖南通道雷山琴蛙成体标本形态量度 (单位: mm)

Table 2 Morphometric measurements on adults of *Nidirana leishanensis* from Tongdao, Hunan (Unit: mm)

	雄性 Male (n = 3)			雌性 Female (n = 1)
	WB2020215	WB2020217	WB2020218	WB2020216
头体长 Snout-vent length	55.09	55.28	54.88	57.41
头长 Head length	17.43	17.87	17.05	18.25
头宽 Head width	19.37	19.71	18.30	19.71
吻长 Snout length	8.11	8.21	7.85	8.26
鼻间距 Internasal space	5.51	5.87	5.88	5.79
眼径 Diameter of eye	5.33	8.82	5.62	5.83
眼间距 Interorbital space	4.66	4.60	4.45	4.77
上眼睑宽 Width of upper eyelid	3.25	3.52	4.30	3.36
鼓膜径 Diameter of tympanum	3.89	4.42	4.13	4.30
前臂及手长 Length of lower arm	23.13	24.76	22.72	24.77
前臂宽 Width of lower arm	3.90	4.15	3.78	3.94
后肢长 Hindlimb length	90.02	98.11	95.12	96.32
股长 Thigh length	26.33	26.61	26.19	25.71
胫长 Tibia length	28.75	30.35	29.70	29.76
胫宽 Tibia width	6.71	7.75	6.52	7.76
跗足长 Length of foot and tarsus	38.95	44.25	43.13	44.98
足长 Foot length	28.00	31.92	29.98	31.39

具 1/3 蹼，趾关节下瘤明显，第四趾上有 3 个，第三、五趾上 2 个，第一、二趾上各 1 个；内蹼突呈椭圆形，长为宽的 3 倍。背部及肩上腺橄榄色，体侧淡黄色；背部及体侧有黑色斑；背中线明显，呈棕色，四肢黄棕色；鼓膜棕色；颌腺白色；腹部光滑，四肢及咽部肉红色，腹部白色。雄性具一对内声囊，第一、二指具婚垫。本次采集雷山琴蛙标本生活照、手脚形态特征见图 1。

比较此次所采集的琴蛙属标本和其他琴蛙属物种的形态鉴定特征，发现本次采集的标本形态特征与雷山琴蛙模式产地（贵州雷山）标本相符（Li et al. 2019）。

2.2 系统发育关系和遗传距离

PCR 扩增获得的琴蛙线粒体 16S rRNA 基因片段长度为 523 bp。序列中 T、C、A、G 含量分别是 24.7%、26.0%、27.3%、22.0%，A + T 的含量高于 G + C 的含量。本文所用最适核

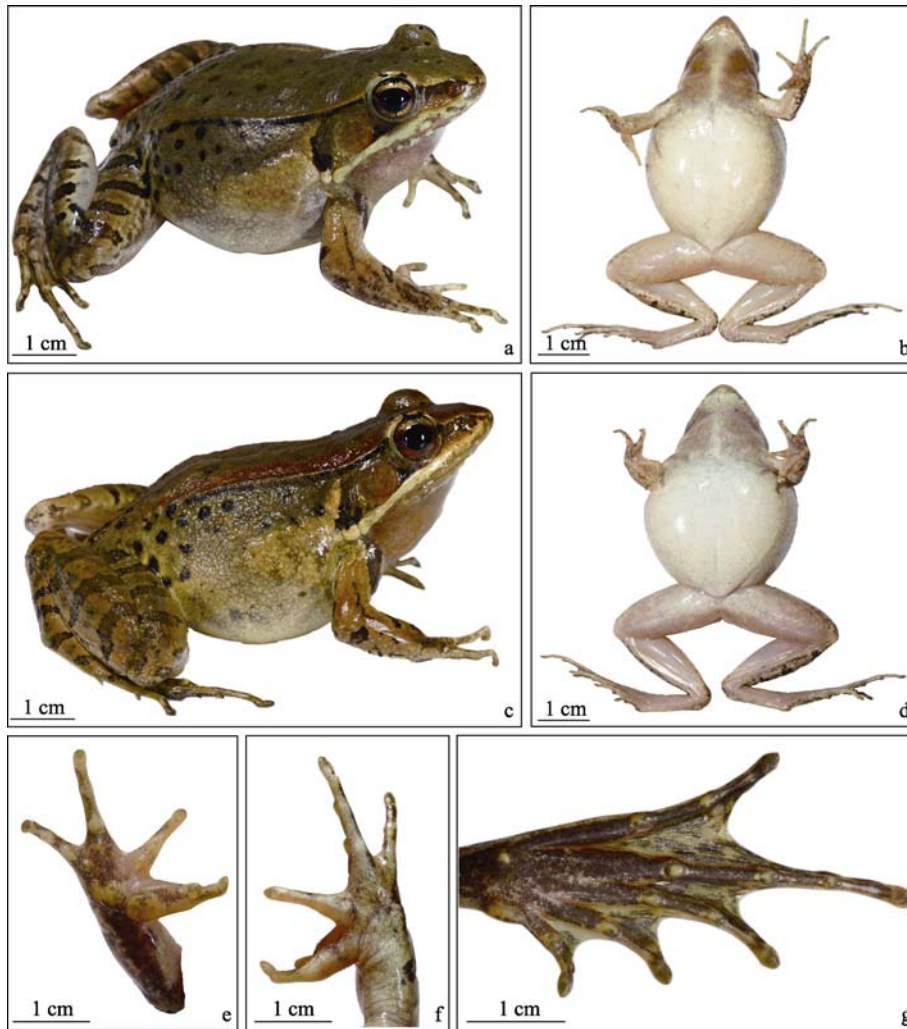


图 1 湖南通道雷山琴蛙生活照及局部照

Fig. 1 Living individual and locality photograph of *Nidirana leishanensis* from Tongdao, Hunan

a. 侧面观 (♂); b. 腹面观 (♂); c. 侧面观 (♀); d. 腹面观 (♀); e. 手背面观; f. 手正面观; g. 脚腹面观。
a. Lateral view (♂); b. Ventral view (♂); c. Lateral view (♀); d. Ventral view (♀); e. Dorsal view of hand; f. Facade view of hand; g. Ventral view of foot.

核苷酸替代模型为 GTR + G + I。

基于贝叶斯算法构建系统发育树显示，采自湖南通道的琴蛙标本与雷山琴蛙模式产地（贵州雷山）的标本聚为一支，且支持率为 1.0（图 2）。基于 Kamura 双参数模型估算本研究

中所采用的琴蛙属部分物种的遗传距离（表 3），为 1.4% ~ 6.4%，平均遗传距离为 4.6%。湖南通道所采集琴蛙标本与雷山琴蛙模式产地标本间的遗传距离为 0.8%，远小于琴蛙属物种间的遗传距离。系统发育分析支持采自湖南通道的

表 3 基于 16S rRNA 基因序列估算的琴蛙属物种间 Kamura 双参数遗传距离

Table 3 Genetic distance of Kamura-2-Parameter model of 16S rRNA gene sequences of some *Nidirana* species examined in the study

物种 Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1 雷山琴蛙 <i>N. leishanensis</i>																				
2 雷山琴蛙 <i>N. leishanensis</i>	0.000																			
3 雷山琴蛙 <i>N. leishanensis</i>	0.000	0.000																		
4 雷山琴蛙 <i>N. leishanensis</i>	0.000	0.000	0.000																	
5 雷山琴蛙 <i>N. leishanensis</i>	0.008	0.008	0.008	0.008																
6 湘琴蛙 <i>N. xiangica</i>	0.014	0.014	0.014	0.014	0.018															
7 海南琴蛙 <i>N. hainanensis</i>	0.028	0.028	0.028	0.028	0.030	0.028														
8 弹琴蛙 <i>N. adenopleura</i>	0.029	0.029	0.029	0.029	0.035	0.029	0.038													
9 叶氏琴蛙 <i>N. yuae</i>	0.029	0.029	0.029	0.029	0.036	0.025	0.030	0.031												
10 粤琴蛙 <i>N. guangdongensis</i>	0.030	0.030	0.030	0.030	0.038	0.032	0.036	0.033	0.032											
11 林琴蛙 <i>N. lini</i>	0.031	0.031	0.031	0.031	0.038	0.027	0.033	0.029	0.025	0.040										
12 仙琴蛙 <i>N. daunchina</i>	0.032	0.032	0.032	0.032	0.038	0.028	0.034	0.038	0.014	0.034	0.033									
13 瑶琴蛙 <i>N. yaoica</i>	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.027	0.034	0.038	0.014	0.033	0.033	0.016								
14 孟闻琴蛙 <i>N. mangveni</i>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.040	0.038	0.040	0.010	0.038	0.040	0.027	0.044	0.044							
15 琉球琴蛙 <i>N. okinavana</i>	0.038	0.038	0.038	0.038	0.044	0.042	0.042	0.015	0.040	0.044	0.029	0.046	0.046	0.006						
16 沙巴琴蛙 <i>N. chapaensis</i>	0.038	0.038	0.038	0.038	0.046	0.032	0.035	0.043	0.018	0.043	0.040	0.024	0.024	0.046	0.046					
17 南昆山琴蛙 <i>N. nankunensis</i>	0.063	0.063	0.063	0.063	0.065	0.067	0.063	0.044	0.061	0.069	0.054	0.072	0.072	0.038	0.040	0.084				
18 滇蛙 <i>N. pleuraden</i>	0.064	0.064	0.064	0.064	0.071	0.056	0.062	0.050	0.052	0.060	0.045	0.056	0.062	0.050	0.052	0.071	0.069			
19 绿臭蛙 <i>Odorrana margaretae</i>	0.155	0.155	0.155	0.155	0.145	0.177	0.143	0.149	0.155	0.137	0.142	0.138	0.155	0.144	0.147	0.142	0.145	0.150		
20 四川湍蛙 <i>Amolops mantzorum</i>	0.157	0.157	0.157	0.157	0.139	0.191	0.126	0.151	0.162	0.130	0.139	0.157	0.157	0.149	0.159	0.164	0.135	0.154	0.149	

1 ~ 4. 湖南通道雷山琴蛙；5. 贵州雷山雷山琴蛙。

1 - 4. *N. leishanensis* form Tongdao of Hunan; 5. *N. leishanensis* form Leishan of Guizhou.

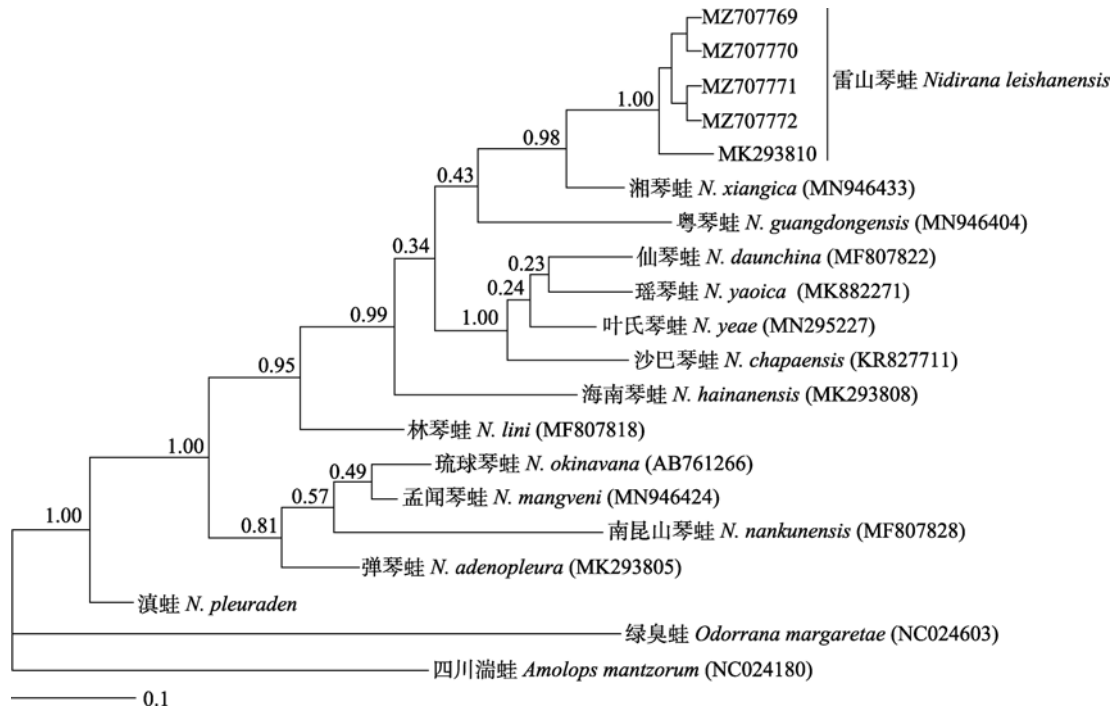


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的琴蛙属部分物种贝叶斯系统发育树

Fig. 2 Bayesian-inference tree *Nidirana* based on 16S rRNA gene sequences

图中支上的数字代表重抽样支持率。图中比例尺为系统发育树枝长，表示物种分化差异度。MZ707769 ~ MZ707772 为湖南通道雷山琴蛙，其余物种信息见表 1。

Numbers beside nodes indicate bootstrap values. WB2020215 to WB2020218 were from Tongdao of Hunan, and the information of other species sequences were shown in Table 1. The scale in figure is the branch length of BI tree, indicating the diversity of species differentiation.

琴蛙标本与雷山琴蛙关系较近。

因此，结合形态比较与分子系统学分析结果，鉴定采集于通道万佛山镇的琴蛙标本为雷山琴蛙，为湖南省两栖动物分布新记录种。

2.3 生境描述

本次雷山琴蛙标本采集于湖南省通道县万佛山镇上洞村海拔 920 m 左右的水田田埂上（图 3）。与其同域分布的两栖类有沼水蛙（*Hylarana guentheri*）、泽陆蛙（*Fejervarya multistriata*）、华西雨蛙（*Hyla annectans*）和斑腿泛树蛙（*Polypedates megacephalus*）等。



图 3 湖南通道雷山琴蛙生境

Fig. 3 Habiat of *Nidirana leishanensis* by Tongdao of Hunan

3 讨论

琴蛙属物种在中国广泛分布，大多数物种间形态较为相似，因此在野外很难对其进行鉴

定（费梁等 2012）。近年来，随着分子生物学的发展，采用形态比较结合分子系统学分析对

物种进行鉴定的方法已广泛应用。

目前湖南省记录的琴蛙属物种 3 种，即弹琴蛙、湘琴蛙和粤琴蛙（中国两栖类 2021）。本文通过 GenBank 下载湖南已有报道的弹琴蛙及其近缘种的 16S rRNA 序列，构建系统发育树，计算遗传距离，发现本研究采集的标本和湖南省有记载分布的弹琴蛙、湘琴蛙和粤琴蛙的遗传距离分别为 2.9%、1.4%和 3.0%，和雷山琴蛙模式产地标本的遗传距离仅为 0.8%，远小于琴蛙属其他物种间的遗传距离。

采自湖南通道的琴蛙标本与湖南已记载的 3 种琴蛙属物种在形态上也存在一定差异（沈猷慧等 2014，Li et al. 2019，Lyu et al. 2020）。雄性头体长 54.88 ~ 55.28 mm，略小于湘琴蛙（56 ~ 62 mm）；趾间具 1/3 蹼迹，区别于弹琴蛙 2/3 蹼迹；后肢贴体前伸达眼至鼻孔之间，区别于粤琴蛙的后肢贴体前伸达鼻孔；左右跟部重叠明显，区别于湘琴蛙左右跟部相遇。本次采集的雷山琴蛙和模式产地标本在形态上也存在一些差异，通道的雷山琴蛙头宽略大于头长，雷山的为头长大于头宽。但由于本次采集的雷山琴蛙样本数有限，上述差异是否为适应不同的环境而导致的形态变异，还有待进一步采集标本进行论证。

雷山琴蛙为中国特有种，此前报道在我国的分布仅限于贵州省雷山县雷公山国家级自然保护区，海拔 1 300 m 左右的山区（Li et al. 2019）。此次在湖南省通道县万佛山镇上洞村（采集地海拔 924 m）发现雷山琴蛙，丰富了其分布信息，以及拓宽了对该物种分布海拔的认识。

致谢 感谢中国科学院成都生物所王斌、石胜超指导完成室内实验和野外调查工作，并对本论文撰写提供了指导和帮助。

参 考 文 献

Chen J M, Zhou W W, Nikolay A, et al. 2017. A novel multilocus

phylogenetic estimation reveals unrecognized diversity in Asia toads, genus *Megophrys sensu lato* (Anura: Megophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106: 28–43.

David P. 2008. jModelTest: jModeltest Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253–1256.

Frost D R. 2021. Amphibian Species of the World Version 6.0, An Online Reference: Names Assigned to Genus *Nidirana*. New York, USA: American Museum of Natural History. [DB/OL]. [2021-07-20]. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/Amphibia/Anura/Ranidae/Nidirana>.

Li S Z, Wei G, Xu N, et al. 2019. A new species of the Asian music frog genus *Nidirana* (Amphibia, Anura, Ranidae) from Southwestern China. *PeerJ*, 7: e7157.

Lyu Z T, Dai K Y, Li Y, et al. 2020. Comprehensive approaches reveal three cryptic species of genus *Nidirana* (Anura, Ranidae) from China. *ZooKeys*, 914: 127–159.

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.

费梁，叶昌媛，黄永昭，等. 2005. 中国两栖动物检索及图解. 成都：四川科学技术出版社，6–8，119–121.

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，344–349.

沈猷慧，杨道德，莫小阳，等. 2014. 湖南动物志：两栖纲. 长沙：湖南科学技术出版社，236–240.

中国两栖类. 2021. “中国两栖类”信息系统. [EB/OL]. [2021-07-20]. <http://www.amphibiachina.org/distribution>.