

广西发现荔波臭蛙

莫秋妹^① 刘硕^{②#} 陈慧^① 余国华^{①*} 孙涛^{①*}

① 广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 广西师范大学广西珍稀濒危动物生态学重点实验室
桂林 541004; ② 中国科学院昆明动物研究所昆明动物博物馆 昆明 650223

摘要: 荔波臭蛙 (*Odorrana liboensis*) 已知仅分布于贵州省荔波县茂兰国家级自然保护区。2021 年 8 月, 在广西壮族自治区百色市那坡县弄尧 (23°01'21" N, 105°50'58" E) 采集到 2 号臭蛙标本 (1 雌, 1 雄)。经鉴定为荔波臭蛙, 属广西两栖纲新记录物种。2 号标本在形态上与荔波臭蛙模式标本基本一致, 仅体型大小和腹部体色稍有差异。基于线粒体 16S rRNA 基因部分序列构建的系统发育树表明, 荔波臭蛙那坡种群与模式标本聚为一支, 支持率为 100%, 遗传距离为 1.5%。本研究表明, 荔波臭蛙广西那坡种群与模式产地种群存在一定的遗传和形态分化, 可为蛙类生物地理学研究提供基础数据。

关键词: 百色; 16S rRNA; 喀斯特

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2022) 06-937-07

Odorrana liboensis Found in Guangxi

MO Qiu-Mei^① LIU Shuo^{②#} CHEN Hui^① YU Guo-Hua^{①*} SUN Tao^{①*}

① Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University), Ministry of Education, Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology, College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004; ② Kunming Natural History Museum of Zoology, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: *Odorrana liboensis* is only known from its type locality, Maolan National Nature Reserve, Libo County, Guizhou Province, China. In August 2021, two specimens (1 male, 1 female) of the genus *Odorrana* were collected from Nongyao, Napo County, Baise City, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (23°01'21" N, 105°50'58" E). The specimens were identified as *O. liboensis*, representing a newly recorded species of Amphibian in Guangxi. Morphologically the two specimens are basically consistent with type specimens of *O. liboensis*, with slight differences in body size and abdominal color. The phylogenetic tree constructed based on sequences of mitochondrial 16S rRNA gene showed that the two specimens were clustered together with *O. liboensis* from the type locality with a support value of 100% and a genetic distance

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32060114), 广西自然科学基金项目 (No. 2022GXNSFAA035526);

* 通讯作者, E-mail: yugh2018@126.com, suntao9658@126.com;

第一作者介绍 莫秋妹, 女, 硕士研究生; 研究方向: 两栖动物分类与进化; E-mail: 202872933@qq.com;

共同第一作者 刘硕, 男, 助理研究员; 研究方向: 两栖爬行动物学; E-mail: liushuo@mail.kiz.ac.cn。

收稿日期: 2022-04-26, 修回日期: 2022-07-15 DOI: 10.13859/j.cjz.202206014

of 1.5%. This study shows that there are genetic and morphological differentiations between the two specimens and the type specimens of *O. liboensis*, which provides basic data for the research of frog biogeography.

Key words: Baise; 16S rRNA; Karst

臭蛙属 (*Odorrana*) 广泛分布于东亚和东南亚的亚热带和热带的山地林间溪流 (费梁等 2012, Frost 2022, 中国两栖类 2022), 全球已知 62 种 (Frost 2022)。我国现有臭蛙属物种 40 种, 其中, 14 种在广西有分布记录, 包括封开臭蛙 (*O. fengkaiensis*)、无指盘臭蛙 (*O. grahami*)、大绿臭蛙 (*O. graminea*)、海南臭蛙 (*O. hainanensis*)、合江臭蛙 (*O. hejiangensis*)、黄岗臭蛙 (*O. huanggangensis*)、景东臭蛙 (*O. jingdongensis*)、荔浦臭蛙 (*O. lipuensis*)、龙胜臭蛙 (*O. lungshengensis*)、绿臭蛙 (*O. margaretae*)、长吻臭蛙 (*O. nasica*)、花臭蛙 (*O. schmackeri*)、竹叶蛙 (*O. versabilis*) 及安子山臭蛙 (*O. yentuensis*) (中国两栖类 2022)。

荔波臭蛙 (*O. liboensis*) 是 Luo 等 (2021) 发表的新种, 目前仅知在贵州荔波县茂兰国家级自然保护区有分布 (Luo et al. 2021)。该物种中等体型; 头长大于头宽; 鼓膜清晰可见; 眼大而突出; 无背侧褶; 掌突 2 个; 跖突 1 个; 后肢贴体前伸时胫跗骨关节到达眼鼻之间; 趾间全蹼; 关节下瘤明显; 四肢背面有棕色条纹; 背面光滑, 草绿色, 有不规则的棕色斑纹; 腹部光滑, 缺乏黑色的斑点; 雄性无声囊, 第 I 指基部具乳白色婚垫 (Luo et al. 2021)。2021 年 8 月, 在广西百色市那坡县弄尧村附近采集到 2 号成体臭蛙标本 (标本号 GXNU YU000307, 雌性; GXNU YU000308, 雄性), 基于形态特征和分子系统学证据, 确定为荔波臭蛙, 为广西蛙类分布新记录物种。

1 材料与方法

1.1 实验材料

标本采自于广西百色市那坡县弄尧东南方向 306 m 海拔 1 032 m 的喀斯特山洞附近 ($23^{\circ}01'21''$ N, $105^{\circ}50'58''$ E)。采集到 2 号标

本的肝组织样品保存于 99% 的分析纯乙醇溶液中, 标本浸泡于 75% 酒精溶液中, 现保存于广西师范大学。

1.2 形态测量

参照《广西两栖动物彩色图鉴》(莫运明等 2014), 对 2 号标本的形态指标进行测量。测量性状包括体长、头长、头宽、吻长、鼻间距、上眼睑宽、眼径、鼓径、前臂及手长、前臂宽、胫长和足长。

1.3 DNA 提取、扩增及测序

采用标准的蛋白酶 K 消化和苯酚-氯仿方法提取所保存肝组织的总 DNA。参考 Du 等 (2020) 的实验方案, 利用引物 L2188 (Matsui et al. 2006) 和 16H1 (Hedges 1994) 对样品的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增, 所得序列已上传到 GenBank (GenBank 序列号见表 1)。

1.4 遗传差异与系统发育分析

基于 Luo 等 (2021) 的结果, 从 GenBank 中下载臭蛙属部分物种的 16S rRNA 基因序列 (表 1), 并选择威宁蛙 (*Rana weiningensis*) 作为外群进行系统发育分析。序列在 MEGA 7 (Kumar et al. 2016) 中采用 Clustal W 进行比对。在 jModelTest 2.1.10 (Darriba et al. 2012) 中选择系统发育分析的最佳进化模型。利用 MrBayes 3.1.2 (Ronquist et al. 2012) 构建贝叶斯系统发育树, 4 条马尔科夫链同时运行 3×10^6 代, 每 100 代对系统发育树进行抽样。使用 MEGA 7 中的 Kimura 双参数模型计算臭蛙属物种间的遗传距离。

2 结果

2.1 形态特征

2 号标本的测量数据见表 2。标本体型中等; 头宽略小于头长; 吻长大于眼径, 吻端钝圆, 略突出于下颌; 吻棱明显; 鼻孔位于吻眼

表1 本研究中使用样本的标本号、序列号、采集地和文献来源的信息

Table 1 Information on voucher No., GenBank No., localities and resource of samples used in this study

物种 Species	标本号 Voucher No.	GenBank 序列号 GenBank No.	采集地 Locality	来源 Resource
本文标本 Specimen of this study	GXNU YU000307 GXNU YU000308	ON514525 ON514526	广西那坡 Napo, Guangxi	本研究 This study
荔波臭蛙 <i>Odorrana liboensis</i>	GZNU20160802003 GZNU20180608009 GZNU20180608007	MW481352 MW481351 MW481350	贵州荔波 Libo, Guizhou	Luo et al. 2021
竹叶蛙 <i>O. versabilis</i>	HNNU 003 LS	KF185055	贵州雷山 Leishan, Guizhou	Chen et al. 2013
长吻臭蛙 <i>O. nasica</i>	AMNH A161169	DQ283345	越南河静 HaTinh, Vietnam	Frost et al. 2006
无指盘臭蛙 <i>O. grahami</i>	HNNU 1008-016	KF185051	云南昆明 Kunming, Yunnan	Chen et al. 2013
绿臭蛙 <i>O. margaretae</i>	HNNU 20050032	KF185035	四川峨眉 Emei, Sichuan	Chen et al. 2013
龙胜臭蛙 <i>O. lungshengensis</i>	70028	KF185054	广西龙胜 Longsheng, Guangxi	Chen et al. 2013
荔浦臭蛙 <i>O. lipuensis</i>	NHMG 1303018	MH665676	广西荔浦 Lipu, Guangxi	Chen 未发表 Unpublished
景东臭蛙 <i>O. jingdongensis</i>	20070711017	KF185050	云南景东 Jingdong, Yunnan	Chen et al. 2013
黄岗臭蛙 <i>O. huanggangensis</i>	GZNU20170822001	MW481354	贵州荔波 Libo, Guizhou	Luo et al. 2021
花臭蛙 <i>O. schmackeri</i>	HNNU 0908-349	KF185047	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Chen et al. 2013
合江臭蛙 <i>O. hejiangensis</i>	ODHJ106	KR338103	四川合江 Hejiang, Sichuang	Xiong et al. 2015
海南臭蛙 <i>O. hainanensis</i>	HNNU 0606105	KF185032	海南五指山 Wuzhishan, Hainan	Chen et al. 2013
封开臭蛙 <i>O. fengkaiensis</i>	SYSa002253	KT315380	广西靖西 Jingxi, Guangxi	Wang et al. 2015
大绿臭蛙 <i>O. graminea</i>	OGW33	KR338210	广西金秀 Jinxiu, Guangxi	Xiong et al. 2015
安子山臭蛙 <i>O. yentuensis</i>	NHMG 1401035	MH665675	广西 Guangxi	Chen 未发表 Unpublished
威宁蛙 <i>Rana weiningensis</i>	SCUM0405171	KX269217	贵州威宁 Weining, Guizhou	Yuan et al. 2016

表2 广西那坡县所采荔波臭蛙标本形态量度

Table 2 Measurements of *Odorrana liboensis* from Napo County of Guangxi

项目 Item	GXNU YU000307 ♀		GXNU YU000308 ♂	
	数据 Data	Value (mm) Percentage (%)	数据 Data	Value (mm) Percentage (%)
体长 Snout-vent length SVL	48.8		43.7	
头长 Head length HL	18.4	37.7	15.3	35.0
头宽 Head width HW	17.9	36.7	14.4	33.0
吻长 Snout length SL	8.1	16.6	7.3	16.7
鼻间距 Internasal space INS	4.5	9.2	3.4	7.8
上眼睑宽 Upper eyelid width UEW	3.7	7.6	3.5	8.0
眼径 Diameter of eye ED	6.1	12.5	6.4	14.6
鼓径 Diameter of tympanum TD	3.8	7.8	3.7	8.5
前臂及手长 Length of lower arm & hand LAHL	26.3	53.9	23.7	54.2
前臂宽 Diameter of lower arm LAD	4.1	8.4	3.8	8.7
胫长 Tibia length TL	29.3	60.0	26.6	60.9
足长 Foot length FTL	27.8	57.0	24.7	56.5

表中比例指各形态测量值与体长的比例。

Percentage in the table refers to the proportion of each morphometric character to the snout-vent length.

之间略近于吻端；颊部略向外倾斜，颊面凹入；眼睛大而突出；鼓膜清晰可见；无颞褶；舌端有缺刻，呈心形；无背侧褶；指关节下瘤明显，分别为1、1、2、2；掌突椭圆，2个；指长顺序I<II<IV<III；后肢贴体前伸时胫跗关节达鼻眼之间；左右跟部相遇；内蹠突椭圆，无外蹠突；趾关节下瘤明显，分别为1、1、2、3、2；趾间具全蹼；趾长顺序I<II<III<V<IV；指端和趾端膨大呈吸盘状；雄性缺少声囊，第一指具有乳白色婚垫。

生活时荔波臭蛙皮肤表面光滑；眼睑上缘、颞部、鼓膜前后缘、体侧、前肢和后肢有白色小刺；背面呈草绿色，许多不规则的棕色斑纹；体腹白色，有不规则的棕色斑，至腹部减少，较背面颜色浅；后肢有棕色带，股部4条，胫部3条；四肢腹面浅紫色，股腹后面有白色小疣粒（图1）。



图1 广西那坡县荔波臭蛙

Fig. 1 *Odorrana liboensis* from Napo County of Guangxi

a. 侧面；b. 腹面；c. 腹面；d. 背面。a. Lateral view; b. Ventral view; c. Ventral view; d. Dorsal view

2.2 系统发育分析

本文采用16S rRNA基因部分序列比对后的长度为843 bp, 最适核苷酸进化模型为TIM2+I+G。本文所采臭蛙标本与荔波臭蛙模式产地标本相聚构成单系（图2），且支持率高达100%。本研究中所采用的臭蛙属物种间遗传距离的范围为1.9%~15.9%（表3），广西的荔波臭蛙标本与荔波臭蛙模式产地标本的遗传距离为1.5%，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均支持采集于广西百色那坡县的臭蛙标本为荔波臭蛙。

3 讨论

荔波臭蛙广西那坡县标本与其模式产地标本在形态特征上基本一致（Luo et al. 2021），但在体型大小和体色上存在一些差异。广西那坡县臭蛙标本较模式产地标本的体型小（雌性

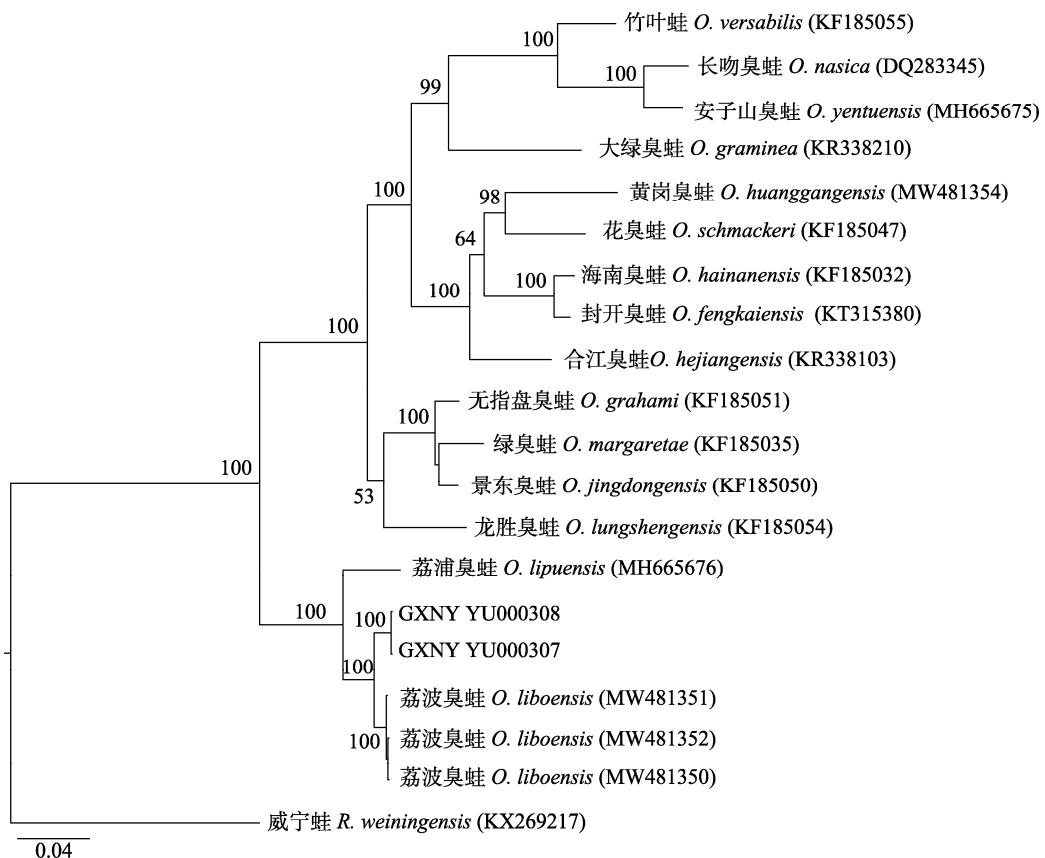


图 2 基于 16S rRNA 部分序列臭蛙属的贝叶斯系统发育树

Fig. 2 Bayesian phylogenetic tree of *Odorranidae* based on 16S rRNA sequences

图中数据是贝叶斯后验概率，低于 50% 的用符号“-”表示；括号里为 GenBank 序列号。

The data in the figure is Bayesian posterior probability (BPP), Less than 50% is represented by “-”; GenBank number is in parentheses.

体长 48.8 mm vs. 55.8~58.2 mm; 雄性体长 43.7 mm vs. 47.1~49.9 mm)，但头宽、吻长、眼径、前臂与手长、足长与体长比例相对较大，(雌性头宽: 36.7% vs. 32.6%~33.5%; 雄性头宽: 33% vs. 29.3%~31.3%; 雌性吻长: 16.6% vs. 15.2%~16.3%; 雄性吻长: 16.7% vs. 13.8%~14.6%; 雌性眼径: 12.5% vs. 9.6%~11.6%; 雄性眼径: 14.6% vs. 10~13%; 雌性前臂与手长: 53.9% vs. 50.5%~51%; 雄性前臂与手长: 54.2% vs. 43.5%~45.3%; 雌性足长: 57% vs. 48.7%~53.8%; 雄性足长: 56.5% vs. 52%~53.9%); 广西百色标本体腹面白色，喉部、胸部、腹部有不规则的棕色斑，至腹部减少，较背面颜色

浅；模式产地的荔波臭蛙身体腹面则缺少黑色斑纹。

荔波臭蛙之前仅发现于贵州荔波县茂兰国家级自然保护区的喀斯特洞穴内，此次在广西西部的那坡县发现该物种，提示该地区与贵州南部喀斯特地区有相似的物种组成，同时也暗示了该物种可能在邻近的云南文山及越南北部的喀斯特地区也有分布，对该区域将来的生物地理学研究有重要意义。洞穴生物种群的绝对数量一般较小 (Duan et al 2021)，因此本次发现对于今后荔波臭蛙的保护同样具有重要意义。模式产地记录的海拔为 645~728 m (Luo et al. 2021)，广西那坡县弄尧发现点的海拔为 1 032 m，

表 3 基于 Kimura 双参数模型计算线粒体 16S rRNA 基因部分臭蛙属物种的遗传距离

Table 3 Genetic distances of some *Odorranas* species estimated from 16S rRNA genes based on Kimura two-parameter model

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 荔波臭蛙 <i>Odorranas liboensis</i>															
2 荔波臭蛙 <i>O. liboensis</i>	0.015														
3 竹叶蛙 <i>O. versabilis</i>	0.141	0.144													
4 长吻臭蛙 <i>O. nasica</i>	0.157	0.159	0.072												
5 无指盘臭蛙 <i>O. grahami</i>	0.114	0.112	0.114	0.133											
6 绿臭蛙 <i>O. margaretae</i>	0.123	0.124	0.120	0.152	0.029										
7 龙胜臭蛙 <i>O. lungshengensis</i>	0.114	0.115	0.123	0.134	0.073	0.077									
8 荔浦臭蛙 <i>O. lipuensis</i>	0.046	0.047	0.151	0.157	0.123	0.130	0.118								
9 景东臭蛙 <i>O. jingdongensis</i>	0.107	0.108	0.115	0.138	0.021	0.029	0.066	0.114							
10 黄岗臭蛙 <i>O. huanggangensis</i>	0.130	0.136	0.115	0.131	0.106	0.119	0.103	0.144	0.100						
11 花臭蛙 <i>O. schmackeri</i>	0.132	0.138	0.117	0.129	0.095	0.108	0.103	0.136	0.096	0.079					
12 合江臭蛙 <i>O. hejiangensis</i>	0.137	0.140	0.113	0.135	0.089	0.106	0.093	0.148	0.095	0.084	0.076				
13 海南臭蛙 <i>O. hainanensis</i>	0.142	0.148	0.129	0.151	0.111	0.122	0.105	0.150	0.101	0.079	0.075	0.074			
14 封开臭蛙 <i>O. fengkaiensis</i>	0.145	0.152	0.125	0.140	0.103	0.114	0.102	0.152	0.096	0.076	0.077	0.070	0.019		
15 大绿臭蛙 <i>O. graminea</i>	0.137	0.138	0.101	0.124	0.102	0.112	0.113	0.143	0.107	0.125	0.109	0.119	0.127	0.122	
16 安子山臭蛙 <i>O. yentuensis</i>	0.147	0.153	0.074	0.036	0.135	0.146	0.138	0.154	0.138	0.125	0.123	0.130	0.140	0.132	0.124

1. 贵州省荔波县荔波臭蛙；2. 广西壮族自治区那坡县荔波臭蛙。

1. *Odorranas liboensis* from Libo County of Guizhou Provence; 2. *Odorranas liboensis* from Napo County of Guangxi.

说明该种的分布海拔范围至少在 645~1 032 m 之间。臭蛙属分布格局受到青藏高原和云贵高原隆起、第四纪冰期和间冰期的相互作用及西南地区避难所的存在影响（何玉晓 2017）。那坡县种群与荔波县模式产地种群之间的遗传差异为 1.5%，说明这两个种群之间已产生了一定的分化，其原因可能与喀斯特地区环境异质性高、不同洞穴相对隔离从而阻碍了不同种群之间的扩散与交流有关。

参 考 文 献

- Chen X, Chen Z, Jiang J, et al. 2013. Molecular phylogeny and diversification of the genus *Odorranas* (Amphibia, Anura, Ranidae) inferred from two mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3): 1196–1202.
- Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772–772.
- Du L N, Liu S, Hou M, et al. 2020. First record of *Theloderma pyaukkyae* Dever, 2017 (Anura: Rhacophoridae) in China, with range extension of *Theloderma moloch* (Annandale, 1912) to Yunnan. *Zoological Research* 41(5): 576–580.
- Duan Y F, Li M, Xu K W, et al. 2021. Protect China's karst cave habitats. *Science*, 374(6568): 699.
- Frost D R. 2022. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0. New York (NY): American Museum of Natural History. [ED/OL]. [2022-02-21]. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Frost D R, Grant T, Faivovich J, et al. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2006(297): 1–291.
- Hedges S B. 1994. Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7): 2621–2624.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.
- Luo T, Wang S, Xiao N, et al. 2021. A New Species of Odorous Frog Genus *Odorrana* (Anura, Ranidae) from Southern Guizhou Province, China. *Asian Herpetological Research*, 12(4): 381–398.
- Matsui M, Shimada T, Liu W Z, et al. 2006. Phylogenetic relationships of Oriental torrent frogs in the genus *Amolops* and its allies (Amphibia, Anura, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(3): 659–666.
- Ronquist F, Teslenko M, van Der Mark P, et al. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539–542.
- Wang Y Y, Lau M W N, Yang J H, et al. 2015. A new species of the genus *Odorrana* (Amphibia: Ranidae) and the first record of *Odorrana baoensis* from China. *Zootaxa*, 3999(2): 235–254.
- Xiong R, Li C, Jiang J. 2015. Lineage divergence in *Odorrana graminea* complex (Anura: Ranidae: *Odorrana*). *Zootaxa*, 3963(2): 201–229.
- Yuan Z Y, Zhou W W, Chen X, et al. 2016. Spatiotemporal diversification of the true frogs (genus *Rana*): a historical framework for a widely studied group of model organisms. *Systematic Biology*, 65(5): 824–842.
- 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.
- 何玉晓. 2017. 基于线粒体基因和多核基因的臭蛙属系统发育研究. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文.
- 莫运明, 韦振逸, 陈伟才. 2014. 广西两栖动物彩色图鉴. 广西: 广西科学技术出版社. 1–282.
- 中国两栖类. 2022. “中国两栖类”信息系统. 中国, 云南省, 昆明: 中国科学院昆明动物研究所. [DB/OL]. [2022-02-21]. <http://www.amphibiachina.org/>.