

陕西镇坪发现光雾臭蛙

周圣博^① 张勇^{②#} 徐哲超^② 宋要强^③ 刘平^③
胡自强^① 曲波^① 关萍^{①*}

① 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省全球变化与生物入侵重点实验室 沈阳 110866;

② 秦岭国家植物园 西安 710061; ③ 陕西化龙山国家级自然保护区管理局 镇坪 725600

摘要: 2022年6月在陕西省安康市镇坪县化龙山自然保护区(32°00'01" N, 109°17'05" E, 海拔1641 m)采集到1号无尾两栖类标本, 经形态特征比较确认为臭蛙属(*Odorrana*)物种, 基于线粒体16S rRNA分子片段对臭蛙属35个物种的系统发育进行分析, 其与模式产地四川南江的光雾臭蛙(*O. kuangwuensis*)在最大似然系统发育树中聚为一支, 支持率高达99%, 且遗传分化较小, 应属种内关系。综合形态特征比较和系统发育分析, 确定采集到的标本为无尾目(Anura)蛙科(Ranidae)臭蛙属的光雾臭蛙, 系陕西省两栖动物分布新记录种, 此发现为光雾臭蛙在大巴山脉分布的连续性提供了一定依据。

关键词: 臭蛙属; 分类学; 系统学; 陕西

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 03-473-07

Odorrana kuangwuensis Found in Zhenping County, Shaanxi

ZHOU Sheng-Bo^① ZHANG Yong^{②#} XU Zhe-Chao^② SONG Yao-Qiang^③ LIU Ping^③
HU Zi-Qiang^① QU Bo^① GUAN Ping^{①*}

① College of Bioscience and Technology, Shenyang Agricultural University, Key Lab of Global Changes and Biological

Invasions, Liaoning Province, Shenyang 110866; ② Qinling National Botanical Garden, Xi'an 710061;

③ Shaanxi Hualongshan National Nature Reserve Administration, Zhenping 725600, China

Abstract: In June 2022, a single specimen of amphibian was collected from Hualongshan Nature Reserve, Zhenping County, Ankang City, Shaanxi Province (32°00'01" N, 109°17'05" E, altitude 1641 m), and identified as a species of the genus *Odorrana* by comparison of morphological characters. In the phylogeny of 35 species of the genus *Odorrana* based on the mitochondrial 16S rRNA gene, it clustered with *O. kuangwuensis*, which was distributed in Nanjiang, Sichuan, the type locality, in the ML tree with 99% support, and should be intraspecific. Based on the morphological analysis and phylogenetic comparison, the collected

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2022YFF1301004), 2021年沈阳农业大学优秀本科毕业论文(设计)培育计划项目 (No. 48);

* 通讯作者, E-mail: 492508453@qq.com;

第一作者介绍 周圣博, 男, 本科生; 研究方向: 两栖爬行动物多样性与演化; E-mail: shengbo122@163.com;

共同第一作者 张勇, 男, 硕士; 研究方向: 野生动物调查与保护生态学; E-mail: zhytsinlingbg@qq.com.

收稿日期: 2022-10-08, 修回日期: 2023-02-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202303016

specimen was identified as *O. kuangwuensis*, a genus of frogs in the Anura family (Ranidae), which represents a new record of amphibians in Shaanxi Province, and provides evidence for the continuity of the distribution of *O. kuangwuensis* in the Daba Mountain Range.

Key words: *Odorrana*; Taxonomy; Systematics; Shaanxi

臭蛙属 (*Odorrana*) 隶属于无尾目 (Anura) 蛙科 (Ranidae), 广泛分布于亚洲亚热带和热带地区, 中国目前记录 41 种 (Lin et al. 2022)。其中, 光雾臭蛙 (*O. kuangwuensis*) 是分布于大巴山脉的中国特有种, 最初仅记录分布于四川省 (胡淑琴等 1966), 近年来先后在湖北省保康县五道峡自然保护区 (乔梁等 2011) 和重庆市城口县东安乡兴田村 (易建华等 2013) 有所报道。陕西省臭蛙属物种共分布有 4 种, 分别为大绿臭蛙 (*O. graminea*)、绿臭蛙 (*O. margaretae*)、花臭蛙 (*O. schmackeri*) 及合江臭蛙 (*O. hejiangensis*) (中国两栖类 2022)。

陕西化龙山国家级自然保护区位于陕西省安康市镇坪县, 南接重庆, 东邻湖北, 面积为 28 103 hm², 处于大巴山弧形构造带内 (吕建荣等 2017), 是中国巴山北部地区重要的野生动植物物种资源库和亚热带具有典型代表的综合自然生态系统。

本文作者张勇于 2022 年 6 月在陕西化龙山国家级自然保护区 (32°00'01" N, 109°17'05" E, 海拔 1 641 m) 采集到无尾两栖类成体标本 1 号, 观察到同种亚成体并使用影像记录, 通过形态检视和线粒体 16S rRNA 分子片段鉴定, 确定为光雾臭蛙, 为陕西省首次记录。标本保存于沈阳师范大学两栖爬行动物标本馆 (标本号: SYNU 2207ON1)。

1 材料与方法

1.1 形态测量与鉴定

依据《中国两栖动物检索及图鉴》(费梁等 2005), 使用 10 分度游标卡尺 (Mitutoyo 牌, 量程 0~150 mm, 精度 0.1 mm) 测量所采集的 1 号成体标本的形态指标。鉴定依据光雾臭蛙

的原始描述 (胡淑琴等 1966) 及《中国动物志: 两栖纲 (下卷) 无尾目》中光雾臭蛙的形态特征 (费梁等 2009)。

1.2 线粒体 16S rRNA 分子片段的提取和扩增

取标本的肝组织, 保存于 95% 乙醇溶液中。整体标本浸于 70% 的乙醇溶液中, 保存于沈阳师范大学两栖爬行动物标本馆。肝组织使用试剂盒 DP304 (天根生化科技有限公司, 北京) 提取总 DNA。利用 PCR 扩增并测定线粒体 16S rRNA 基因部分片段序列。序列扩增引物参照 Simon 等 (1994) 的 16S-1 (5'-CGC CTG TTT ACC AAA AAC AT-3') 和 16S-2 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3')。PCR 反应体系为 20 μl, 其中包含 10 × Ex *Taq* buffer 2.0 μl, 2.5 mmol/L dNTP Mix 1.6 μl, 106 U/L *Taq* 0.2 μl, 上、下游引物各 1 μl (10 μmol/L), DNA 模板 0.5 μl (100 nmol/L), 去离子灭菌超纯水 13.7 μl。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送至南昌科畅生物工程有限公司进行测序, 所得序列上传到 GenBank (序列号 QQ450507)。

1.3 分子系统发育关系构建

选取 GenBank 中臭蛙属部分物种的 16S rRNA 基因序列与本研究测定序列进行分子系统发育分析 (表 1)。所有序列在 Clustal X 1.8 (Thompson et al. 1997) 中进行比对, 比对后的序列进行人工校对, 用 MEGA 7.0 软件对齐后, 将 16S rRNA 基因序列截去部分多余序列, 取保守片段拼接成一段长序列, 对于部分物种基因序列缺失的部分用 gap 补齐。利用 jModeltest 2 (David 2008) 基于赤池信息准则 (Akaike information criterion, AIC) 选择最适

表 1 构建系统发育树物种及 16S rRNA 基因信息

Table 1 Information on species and 16S rRNA genes used to construct phylogenetic trees

物种 Species	产地 Localities	标本号 Voucher No.	16S rRNA 基因号 Gene No. of 16S rRNA
本研究标本 This study sample	中国陕西化龙山 Hualongshan, Shaanxi, China	SYNU2207ON1	QQ450507
光雾臭蛙 <i>Odorrana kuangwuensis</i>	中国四川南江 Nanjiang, Sichuan, China	HNNU0908II185	KF185034
北圻臭蛙 <i>O. bacboensis</i>	中国广西那坡 Napo, Guangxi, China	SYS a001046	KT315385
滇南臭蛙 <i>O. tianmanensis</i>	中国云南河口 Hekou, Yunnan, China	HNNUHK001	KF185044
封开臭蛙 <i>O. fengkaiensis</i>	中国广西十万大山 Shiwandashan, Guangxi, China	SYS a001025	KT315382
海南臭蛙 <i>O. hainanensis</i>	中国海南五指山 Wuzhishan, Hainan, China	HNNU0606105	KF185032
宜昌臭蛙 <i>O. ichangensis</i>	中国湖北宜昌 Yichang, Hubei, China	HNNU10071061	KF185041
合江臭蛙 <i>O. hejiangensis</i>	中国四川合江 Hejiang, Sichuan, China	HNNU10071202	KF185052
南江臭蛙 <i>O. nanjiangensis</i>	中国四川南江 Nanjiang, Sichuan, China	HNNU10071291	KF185042
贵州臭蛙 <i>O. kweichowensis</i>	中国贵州从江 Congjiang, Guizhou, China	GZNU20170822001	MW481359
花臭蛙 <i>O. schmackeri</i>	中国湖北宜昌 Yichang, Hubei, China	HNNU 0908II349	KF185047
天目臭蛙 <i>O. tianmuyi</i>	未知 Unknown	HNNU1610003	MK650102
黄岗臭蛙 <i>O. huanggangensis</i>	中国福建武夷山 Wuyishan, Fujian, China	HNNU0607001	KF185059
凹耳臭蛙 <i>O. tormota</i>	未知 Unknown	未知 Unknown	MZ041153
棕背臭蛙 <i>O. swinhoana</i>	中国台湾南投 Nantou, Taiwan, China	HNNUTW9	KF185046
长吻臭蛙 <i>O. nasica</i>	越南河静 HaTinh, Vietnam	AMNH A161169	KX893907
安子山臭蛙 <i>O. yentuensis</i>	中国广西 Guangxi, China	NHMG1401035	KX893891
小竹叶蛙 <i>O. exiliversabilis</i>	中国福建武夷山 Wuyishan, Fujian, China	HNNU0607032	KF185056
竹叶蛙 <i>O. versabilis</i>	中国贵州雷山 Leishan, Guizhou, China	HNNU003 LS	KF185055
鸭嘴竹叶蛙 <i>O. nasuta</i>	中国海南五指山 Wuzhishan, Hainan, China	HNNU051119	KF185053
龙头山臭蛙 <i>O. leporipes</i>	中国广东韶关 Shaoguan, Guangdong, China	HNNU10081099	KF185036
大吉岭臭蛙 <i>O. chloronota</i>	越南河江 Ha Giang, Vietnam	HNNU0606123	KX893906
大绿臭蛙 <i>O. graminea</i>	中国四川子淮 Zihuai, Sichuan, China	未知 Unknown	KU840589
越北臭蛙 <i>O. geminata</i>	越南河江 Ha Giang, Vietnam	AMNH 163782	KX893905
沙巴臭蛙 <i>O. chapaensis</i>	越南莱州 Lai Chau, Vietnam	AMNH A161439	KX893901
宜章臭蛙 <i>O. yizhangensis</i>	中国湖南桑植 Sangzhi, Hunan, China	CIBSZ2012062308	MH094862
龙胜臭蛙 <i>O. lungshengensis</i>	中国广西龙胜 Longsheng, Guangxi, China	HNNU70028	KF185054
安龙臭蛙 <i>O. anlungensis</i>	中国贵州安龙 Anlong, Guizhou, China	HNNU10081109	KF185049
务川臭蛙 <i>O. wuchuanensis</i>	中国贵州务川 Wuchuan, Guizhou, China	HNNU019 L	KF185043
筠连臭蛙 <i>O. junlianensis</i>	中国四川筠连 Junlian, Sichuan, China	HNNU002 JL	KF185058
无指盘臭蛙 <i>O. grahmi</i>	中国云南昆明 Kunming, Yunnan, China	HNNU1008II016	KF185051
云南臭蛙 <i>O. yunnanensis</i>	中国云南陇川 Longchuan, Yunnan, China	HNNU001YN	KF185057
景东臭蛙 <i>O. jingdongensis</i>	中国云南景东 Jingdong, Yunnan, China	20070711017	KF185050
绿臭蛙 <i>O. margaretae</i>	中国四川峨眉 E'mei, Sichuan, China	HNNU20050032	KF185035
光雾臭蛙 <i>O. kuangwuensis</i>	中国四川南江 Nanjiang, Sichuan, China	HNNU 0908II185	KF185034
荔波臭蛙 <i>O. liboensis</i>	中国贵州荔波 Libo, Guizhou, China	GZNU20160802003	MW481352
荔浦臭蛙 <i>O. lipuensis</i>	越南河江 Ha Giang, Vietnam	FJ882843	LC155911
金线侧褶蛙 <i>Pelodytes plancyi</i>	中国江西九江 Jiujiang, Jiangxi, China	SYAUBAA000035	OQ708392 本研究 This study

核苷酸替代模型。最大似然树的构建在 PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) 中完成, 并进行 1 000 次 bootstrap 重抽样分析, 检验各节点置信度。

2 结果

2.1 形态描述

SYNU 2207ON1, 雄性成体, 体长 62.6 mm, 头长 28.8 mm, 头宽 20.2 mm, 吻长 9.8 mm, 鼻间距 7.7 mm, 眼间距 11.2 mm, 眼径 8.0 mm, 前臂及手长 3.3 mm, 鼓膜径 3.8 mm, 前臂宽 7.0 mm, 后肢长 32.6 mm, 胫长 36.2 mm, 足长 30.8 mm, 跖足长 50.2 mm, 吸盘宽 20.6 mm。头部扁平, 头长略大于头宽, 吻端钝圆, 突出于下唇, 吻长于眼径, 吻棱明显, 颊部略向外侧倾斜。鼻孔位于吻眼间略近吻端。眼间距略

大于上眼睑宽, 鼓膜清晰, 小于眼径。前臂及手长约为体长之半, 指略扁, 关节下瘤明显, 后肢较长, 左、右跟部重叠, 胫长大于体长之半, 指末端圆, 膨大成扁平吸盘, 第一指端无沟, 其余 3 指末端腹两侧有沟。婚垫明显, 指式 3 1 4 2, 趾吸盘较指吸盘略小, 趾式 4 5 3 2 1。趾间全蹼, 蹼式 I 0--1 II 0-- $\frac{2}{3}$ III 0-- $\frac{2}{3}$ IV $\frac{3}{5}$ -- $\frac{1}{5}$ V, 内蹼突长椭圆形, 无外蹼突 (图 1)。

生活时体背面绿色, 头部及肩背部纯绿, 背部有黑酱色圆点; 体侧浅灰黄色, 散有黑色大斑; 四肢上横纹明显, 深浅相间; 股部后下方及其腹面、胫部内侧、跖及跖间均有块状斑纹, 无细云斑状之斑纹。腹面咽喉部紫灰色, 腹部略浅, 有斑点 (图 2)。液浸标本背面黄褐色, 体侧及四肢背、腹面深色斑纹明显。

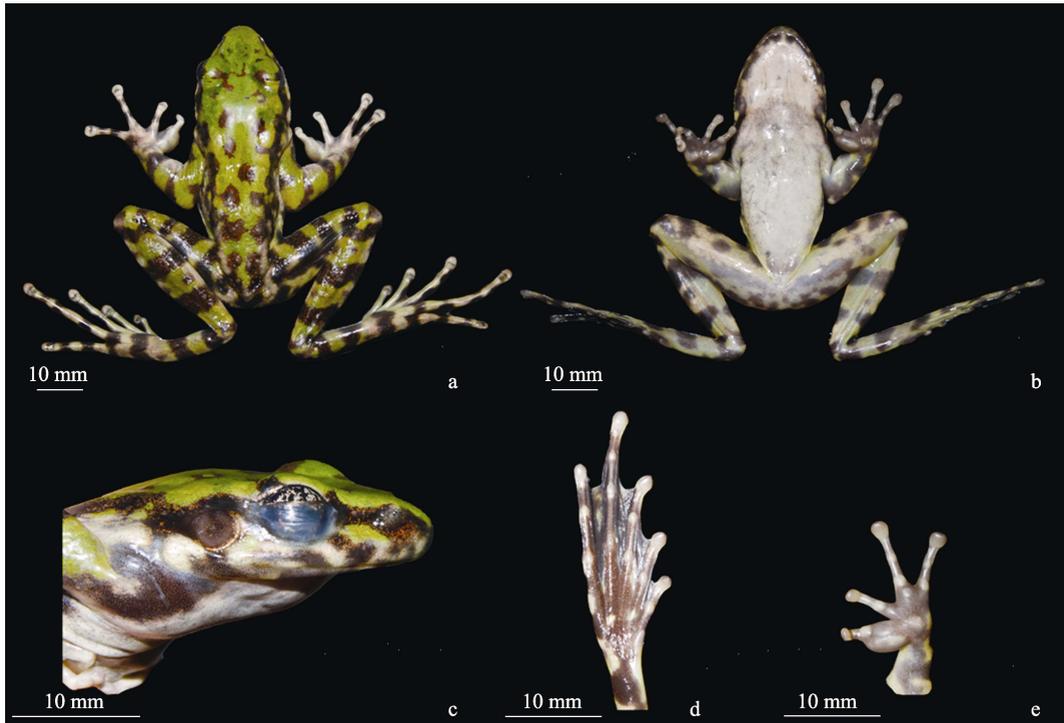


图 1 陕西化龙山国家级自然保护区采集的光雾臭蛙 (张勇摄)

Fig. 1 *Odorrana kuangwuensis* collected in Hualongshan Nature Reserve, Shaanxi Province (Photo by ZHANG Yong)

a. 背面观; b. 腹面观; c. 侧面观; d. 足部; e. 手部。a. Back view; b. Belly view; c. Side view; d. Foot; e. Hand.



图 2 陕西化龙山国家级自然保护区光雾臭蛙生态照（张勇摄）

Fig. 2 *Odorrana kuangwuensis* collected from Hualongshan Nature Reserve in life (Photo by ZHANG Yong)

2.2 分子系统发育关系

PCR 扩增获得本研究采集臭蛙线粒体 16S rRNA 基因片段，长度为 581 bp。最大似然树显示，化龙山国家级自然保护区所采集的光雾臭蛙标本与光雾臭蛙模式产地（四川南江县）标本聚为一支并构成单系（图 3），且有较高的支持率（99%）。二者遗传距离为 0.02。分子系统发育分析支持采集于化龙山国家级自然保护区的臭蛙标本为光雾臭蛙。

2.3 生境描述

光雾臭蛙在化龙山国家级自然保护区内栖息于海拔 1 640 m 左右环境阴湿，灌木和杂草茂密的山溪附近（图 4），与原始描述中光雾臭蛙栖息地生境类型相符（胡淑琴等 1966）。其多栖息于长有苔藓的石块上或石缝中，受惊扰即迅速跳入水潭内并潜入水底。

3 讨论

1990 年，费梁等（2009）建立了臭蛙属 *Odorrana*，其广泛分布于日本、中国南方、中南半岛、印度东北部和东南亚海岛（AmphibiaWeb 2022）。臭蛙属作为蛙科的第二大属，近年不断有新物种或隐存种被发表，如荔波臭蛙

（*O. liboensis*）和苔斑臭蛙（*O. concolata*）等（Luo et al. 2021, Lin et al. 2022）。Lin 等（2022）对臭蛙属系统发育关系进行重建，结果显示光雾臭蛙与绿臭蛙为姊妹群，且与其同域分布的南江臭蛙（*O. nanjiangensis*）系统发育关系较远，本研究构建的系统发育树亦支持这一结果。

光雾臭蛙的模式产地为大巴山西段的四川省南江县（胡淑琴等 1966），后又在大巴山脉的东延部分湖北保康县五道峡自然保护区发现其新记录分布地（乔梁等 2011），本研究记录的光雾臭蛙分布地化龙山国家级自然保护区位于大巴山脉中段，否定了“冰期冰川作用破坏了光雾臭蛙在四川和湖北的连续分布，而在冰期过后又没有得到恢复而形成间断分布格局。”的假设（乔梁等 2011），为光雾臭蛙在大巴山脉分布的连续性提供了一定依据，将陕西省记录分布的臭蛙属物种记录提升至 5 种。此外，南江臭蛙的模式产地亦为四川省南江县（费梁等 2009），且在陕西记录分布于宁强等地（中国两栖类 2022），化龙山国家级自然保护区内是否有南江臭蛙与光雾臭蛙同域分布需要进一步研究。

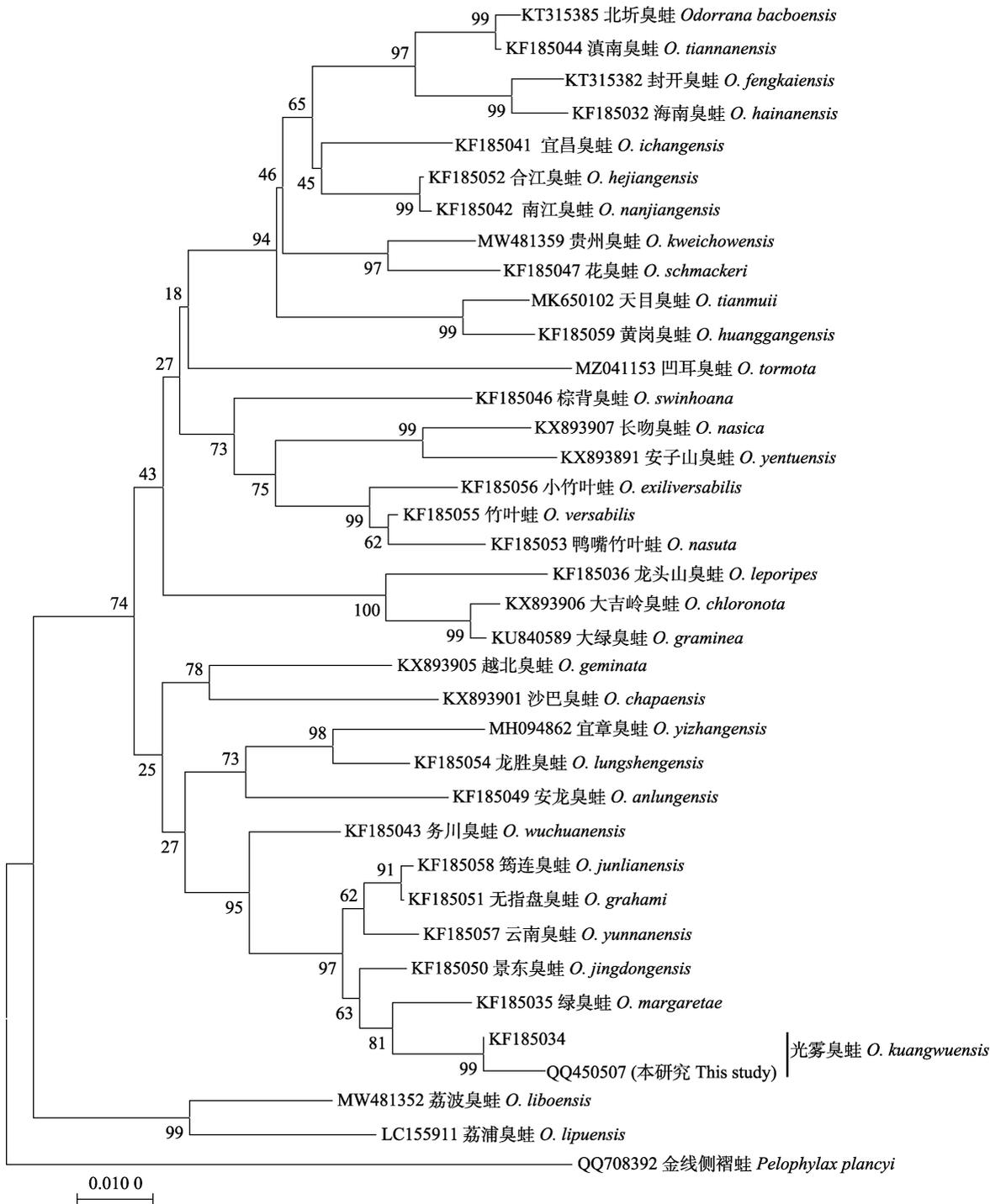


图 3 基于线粒体 16S rRNA 基因序列构建的臭蛙属部分物种最大似然系统发育树

Fig. 3 Maximum likelihood tree illustrating phylogenetic relationships of the genus *Odorrana* based on 16S rRNA sequences

支上的数字代表重抽样支持率。The figure above represents re-sampling support.



图 4 陕西化龙山国家级自然保护区内光雾臭蛙的生境

Fig. 4 The habitat of *Odorrana kuangwuensis* in Hualongshan Nature Reserve, Shaanxi Province

参 考 文 献

- AmphibiaWeb. 2022. Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California: AmphibiaWeb. [DB/OL]. [2022-10-01]. <https://amphibiaweb.org/>.
- David P. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253–1256.
- Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performances of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3): 307–321.
- Lin S S, Li Y H, Su H L, et al. 2022. Discovery of a new limestone karst-restricted odorous frog from northern Guangdong, China (Anura, Ranidae, *Odorrana*). *ZooKeys*, 1120: 47–66.
- Luo T, Wang S W, Xiao N. 2021. A new species of odorous frog genus *Odorrana* (Anura, Ranidae) from Southern Guizhou Province, China. *Asian Herpetological Research*, 12(4): 381–398.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651–701.
- 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, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 2009. 中国动物志: 两栖纲(下: 无尾目). 北京: 科学出版社, 1042–1080.
- 费梁, 叶昌媛, 黄永昭, 等. 2005. 中国两栖动物检索及图鉴. 成都: 四川科学技术出版社.
- 胡淑琴, 赵尔宓, 刘承钊. 1966. 秦岭及大巴山地区两栖爬行动物调查报告. *动物学报*, 18(1): 57–89.
- 吕建荣, 凌小惠. 2017. 化龙山自然保护区发展现状及对策. *陕西林业科技*, (6): 68–69.
- 乔梁, 鲁有强, 陈晓虹. 2011. 光雾臭蛙的分布新纪录及地理变异. *动物分类学报*, 36(1): 132–135.
- 易建华, 甘小平, 黄自豪, 等. 2013. 重庆市发现光雾臭蛙和南江臭蛙. *动物学杂志*, 48(1): 125–128.
- 中国两栖类. 2022. “中国两栖类”信息系统. 中国, 云南, 昆明: 中国科学院昆明动物研究所. [DB/OL]. [2022-10-01]. <http://www.amphibiachina.org/>.