

# 中国无尾两栖类新记录种——朝鲜侧褶蛙

周圣博<sup>①②</sup> 张芷赫<sup>③#</sup> 王惠<sup>①</sup> 苗青<sup>①④</sup> 徐树军<sup>④⑤</sup>  
关萍<sup>①②\*</sup> 史静耸<sup>⑥</sup>

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 辽宁盘锦湿地生态系统国家野外科学观测研究站 盘锦 124112; ③ 辽宁师范大学生命科学学院 大连 116081;

④ 辽宁双台河口湿地生态系统国家定位观测研究站 盘锦 124112; ⑤ 沈阳农业大学国有资产管理处 沈阳 110866;

⑥ 中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室, 中国科学院古脊椎动物与古人类研究所 北京 100044

**摘要:** 2021年9月在沈阳市蒲河湿地公园(41°41'54" N, 122°52'19" E, 海拔35 m)采集到3号无尾两栖类动物, 经形态特征比较确认为侧褶蛙属(*Pelophylax*)金线侧褶蛙种组(*P. plancyi* species complex)的物种。基于线粒体12S rRNA和16S rRNA基因联合构建的侧褶蛙属部分物种最大似然系统发育树显示, 采集到的侧褶蛙标本与朝鲜侧褶蛙(*P. chosonicus*)聚为一支, 且具有较高的支持率(0.95)。综合形态和系统发育比较, 确定采集到的标本为无尾目(Anura)蛙科(Ranidae)侧褶蛙属的朝鲜侧褶蛙, 系中国两栖动物分布新记录种。

**关键词:** 朝鲜侧褶蛙; 中国; 无尾两栖类; 侧褶蛙属; 新记录种

**中图分类号:** Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2022)03-440-07

## New Record Species of Anura from China—*Pelophylax chosonicus*

ZHOU Sheng-Bo<sup>①②</sup> ZHANG Zhi-He<sup>③#</sup> WANG Hui<sup>①</sup> MIAO Qing<sup>①④</sup>  
XU Shu-Jun<sup>④⑤</sup> GUAN Ping<sup>①②\*</sup> SHI Jing-Song<sup>⑥</sup>

① College of Bioscience and Technology, Shenyang Agricultural University, Key Lab of Global Changes and Biological Invasions, Liaoning Province, Shenyang 110866; ② Liaoning Panjin Wetland Ecosystem National Observation and Research Station, Panjin 124112;

③ College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081; ④ Liaoning Shuangtai Estuary Wetland Ecosystem Research Station, Panjin 124112; ⑤ State-owned Asset Management Office of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866;

⑥ Key Laboratory of Vertebrate Evolution and Human Origins of Chinese Academy of Sciences, Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044, China

**Abstract:** Three tailless amphibian specimens were collected in Puhe Wetland Park (41°41'54" N, 122°52'19"

**基金项目** 2021年辽宁省普通本科高等学校校企合作项目[资源共享(2021-57)], 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: 两栖爬行动物分类学; E-mail: shengbo122@163.com;

**#共同第一作者** 张芷赫, 女, 本科生; 研究方向: 分子生物学; E-mail: zhihe99411@163.com。

收稿日期: 2021-12-09, 修回日期: 2022-03-17 DOI: 10.13859/j.cjz.202203013

E, elevation 35 m) in Shenyang in September 2021 (Fig. 1, with Fig. 3 showing the habitat). In this study, the morphological characteristics of the collected specimens were compared and analyzed in detail with *P. chosonicus* and *P. plancyi*. The 12S rRNA and 16S rRNA gene of 3 samples were amplified and sequenced by second-generation high-throughput sequencing. The 12S rRNA and 16S rRNA gene information of 19 species of *Pelophylax* distributed in China and abroad (including a species of *Rana* as an outgroup) were obtained in NCBI GenBank database and existing reports. Phyml 3.0 to construct maximum likelihood phylogenetic tree. Morphological analysis shows that there are interspecific differences between our specimens and *P. plancyi*, which is consistent with the type origin species of *P. chosonicus*. The results of ML phylogenetic tree show that the *Pelophylax* specimens collected in Shenyang Puhe Wetland Park and the type origin (Korea) specimens of *P. chosonicus* gather into one branch (Fig. 2), with a high support rate (95%). By comprehensive comparison with morphological and phylogenetic analysis, the specimens we collected should be the *P. chosonicus* of the genus *Pelophylax* in the family Anura, and be a new record of amphibian distribution in China.

**Key words:** *Pelophylax chosonicus*; China; Anura amphibians; *Pelophylax*; New record

朝鲜侧褶蛙 (*Pelophylax chosonicus*) 隶属于无尾目 (Anura) 蛙科 (Ranidae) 侧褶蛙属, 2008 年以前为金线侧褶蛙 (*P. plancyi*) 的亚种 (Shannon 1956, Dubois et al. 1994)。Frost (2008) 进行系统发育分析后对该物种进行了重新修订, *Amphibian Species of the World* 将其作为一个独立种归入侧褶蛙属。朝鲜侧褶蛙多分布于稻田、湿地等生态环境, 以各种昆虫为食。此前仅报道分布于朝鲜境内 (戴建华 2009)。

辽中区隶属辽宁省沈阳市, 地处辽宁省中部, 沈阳市西南部。境内有辽河、浑河、蒲河和绕阳河等 4 条河流过境, 属典型冲积平原, 整体地势平坦 (齐菲 2020)。辽中区为东北首个国家级生态县, 蒲河湿地公园为全国岸线最长、沈阳首个国家级湿地公园, 有着典型的湿地生态系统和丰富的物种多样性 (孙周平等 2019)。

本文作者于 2021 年 9 月在辽中蒲河湿地公园 (41°41'54" N, 122°52'19" E, 海拔 35 m) 采集到无尾两栖类标本 3 号 (1 成体♂、2 亚成体), 通过形态检视和线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因分子鉴定, 确定为朝鲜侧褶蛙, 且为中国的首次记录, 标本保存于沈阳农业大学生物科学技术学院 (标本号: 成体 SYAU

BAA000016, 亚成体 SYAU BAA000017 和 SYAU BAA000018)

## 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 号活体成体标本的形态指标。

### 1.2 线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因扩增

取 3 号标本肝组织, 保存于 95%乙醇溶液中。整体标本浸于 75%的乙醇溶液中, 保存于沈阳农业大学生物科学技术学院标本室。肝组织使用天根生物试剂盒 DP304 (天根生化科技有限公司) 提取总 DNA。利用 PCR 扩增并测定线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因部分片段序列。12S rRNA 基因扩增引物为依据 NCBI 数据库中的线粒体完整基因组, 定位到 12S rRNA 基因序列后用 Primer5.0 软件设计的 12S-1 (5'-CGC TGA AAA CGC TAA GAT GAA-3') 和 12S-2 (5'-TCC CTT GCG GTA CTG TAT CTG-3'); 16S rRNA 基因扩增引物参照 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  $\mu\text{l}$ , 其中包含 10  $\times$  Ex *Taq* buffer 2.0  $\mu\text{l}$ , 2.5 mmol/L dNTP Mix 1.6  $\mu\text{l}$ ,  $10^6$  U/L *Taq* 0.2  $\mu\text{l}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), DNA 模板 0.5  $\mu\text{l}$  (100 nmol/L), 去离子灭菌超纯水 13.7  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  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。

### 1.3 分子系统发育关系重建

选取 GenBank 中侧褶蛙属部分物种的 12S

rRNA 和 16S rRNA 基因序列与本研究测定序 列进行分子系统发育分析, 物种及序列信息见 表 1。所有序列在 Clustal X 1.8 (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, 利用 MEGA7.0 软件对齐 后, 将 12S rRNA 基因与 16S rRNA 基因序列截 去部分多余序列, 取保守片段拼接成 1 段长序 列, 对于部分物种基因序列缺失的部分用 gap 将其补齐。构建最大似然 (maximum likelihood, ML) 树前, 利用 jModeltest 2 (David 2008) 基

表 1 本研究应用的物种及序列信息

Table 1 The sequences used in this study

物种 Species	样本采集地 Locality	GenBank 序列号 GenBank accession number	
		12S rRNA	16S rRNA
朝鲜侧褶蛙 <i>Pelophylax chosonicus</i>	中国辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning, China	OL752686	OL752662
朝鲜侧褶蛙 <i>P. chosonicus</i>	中国辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning, China	OL752687	OL752663
朝鲜侧褶蛙 <i>P. chosonicus</i>	中国辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning, China	OL752688	OL752664
朝鲜侧褶蛙 <i>P. chosonicus</i>	朝鲜 North Korea	JF703436	JF703436
金线侧褶蛙 <i>P. plancyi</i>	中国上海 Shanghai, China	EU386885	EU386960
黑斑侧褶蛙 <i>P. nigromaculata</i>	中国辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning, China	OL752673	OL752649
湖北侧褶蛙 <i>P. hubeiensis</i>	中国安徽六安 Liuan, Anhui, China	AF205547	AF315137
福建侧褶蛙 <i>P. fukienensis</i>	中国台湾嘉义 Jiayi, Taiwan, China	AB023393	/
东京达摩蛙 <i>P. porosus</i>	日本米原/爱知 Miyara / Aichi, Japan	AB023392	LC389209
腾格里蛙 <i>P. tenggerensis</i>	中国宁夏固原 Guyuan, Ningxia, China	OL752667	OL752643
<i>P. ridibunda</i>	乌克兰/伊朗 Ukraine / Iran	AB023397	DQ474215
<i>P. saharica</i>	北非 North Africa	AY332766	DQ474231
<i>P. perezi</i>	意大利 Italy	AY043035	AY043069
<i>P. lessonae</i>	意大利/比利时 Italy/Belgium	AB023394	AY322276
<i>P. cretensis</i>	希腊 Greece	AJ318087	DQ474204
<i>P. epeiroticus</i>	希腊 Greece	AJ002595	DQ474207
<i>P. kurtmuelleri</i>	希腊 Greece	AJ222656	DQ474228
<i>P. bedriagae</i>	希腊 Greece	AB640918	AB640958
<i>P. cerigensis</i>	德国 Germany	MK013960	DQ474196
<i>P. shqipericus</i>	前南斯拉夫 Former Yugoslavia	AJ222651	/
<i>P. bergeri</i>	意大利 Italy	AJ222650	JN689222
东北林蛙 <i>Rana dybowskii</i>	中国辽宁 Liaoning, China	KX021949	KX021949

在中国无分布的部分物种未标注中文名。“/”未获取 16S rRNA 基因信息; 序列号相同为该物种的线粒体全基因组序列号。

Species not distributed in China are not labeled with Chinese names. “/” Means 16S rRNA gene information is not obtained; The same sequence number is the mitochondrial genome sequence number of the species.

于赤池信息准则 (Akaike information criterion, AIC) 选择最适核苷酸替代模型。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

本次采集到的标本体背呈绿色, 鼓膜及背侧褶呈金黄色至棕黄色, 成体四肢绿色, 无花纹; 亚成体四肢淡黄色, 有翠绿色条带状花纹。腹面黄色, 无花纹 (图 1)。对成体标本 SYAUBAA000016 形态数据进行检视, 体长 58.8 mm, 头长 20.5 mm, 头宽 20.3 mm, 吻长 8.5 mm, 鼻间距 3.5 mm, 眼间距 2.8 mm, 眼径 6.2 mm, 前臂及手长 22.5 mm, 鼓膜长 5.4 mm, 前臂宽 4.6 mm, 后肢长 86.6 mm, 胫长 23.3 mm, 胫宽 8.4 mm, 足长 32.1 mm, 内蹠突长 5.1 mm。标本头长与头宽几近相等, 吻端钝圆; 眼间距较窄, 小于鼻间距; 鼓膜大而明显, 仅略小于眼径。有一对咽内声囊, 在被捕捉时发出“叭-叭”声。前臂及手长较短, 指细, 指端钝尖, 指长顺序为 3、1、4、2。后肢

较为粗短, 左右跟部不相遇, 趾端钝尖, 满蹠, 第 5 趾外侧有狭窄缘膜, 内蹠突较小。朝鲜侧褶蛙与金线侧褶蛙的主要形态差异在于, 背侧褶及内蹠突较金线侧褶蛙不甚发达, 左右跟部不相遇。

### 2.2 分子系统发育关系

PCR 扩增共获得本研究采集侧褶蛙线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因片段各 3 条, 长度分别为 1 119 bp 和 601 bp。取保守片段拼接为 1 568 bp 序列。最大似然树显示, 沈阳蒲河湿地公园所采集的侧褶蛙标本与朝鲜侧褶蛙模式产地 (朝鲜) 标本聚为一支 (图 2), 且有较高的支持率 (95%)。分子系统发育分析支持采集于辽宁沈阳蒲河湿地公园的侧褶蛙标本为朝鲜侧褶蛙。

### 2.3 生境描述

朝鲜侧褶蛙在辽宁沈阳蒲河湿地公园内主要分布于海拔 30 ~ 50 m 植物生长较为茂盛的静水域, 常栖息于河流内植物叶片或河岸斜坡上 (图 3)。与其同域分布的两栖动物有黑斑侧褶蛙 (*P. nigromaculata*)、中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*)、北方狭口蛙 (*Kaloula borealis*) 和花背蟾蜍 (*B. raddei*)。

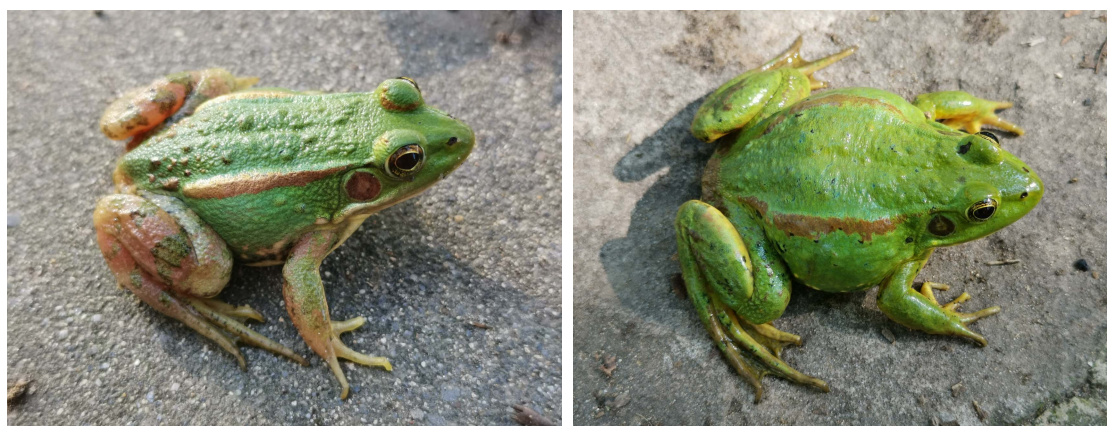


图 1 辽中区采集的朝鲜侧褶蛙

Fig. 1 *Pelophylax chosonicus* collected from Liaozhong District

左: 亚成体 SYAUBAA000017; 右: 成体 SYAUBAA000016. Left: Subadult SYAUBAA000017; Right: Adult SYAUBAA000016.

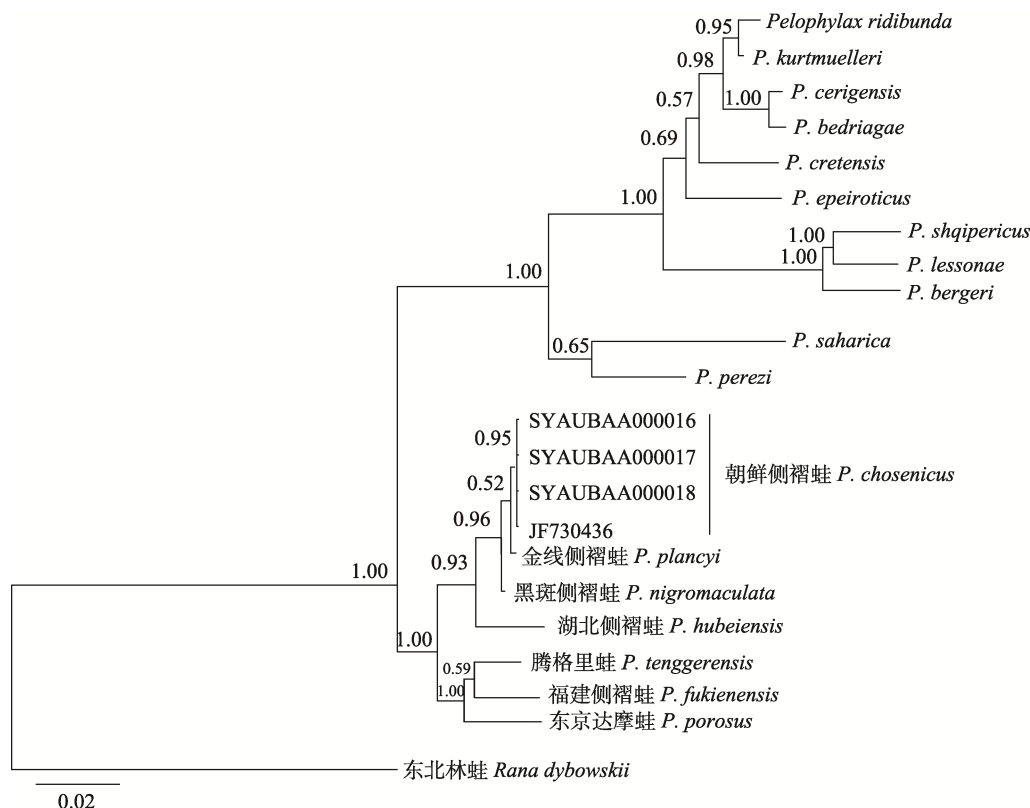


图 2 基于线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因序列构建的侧褶蛙属部分物种最大似然系统发育树

Fig. 2 Maximum likelihood tree for *Pelophylax* constructed based on 12S rRNA and 16S rRNA gene sequences

支上的数字代表重抽样支持率; SYAUBAA000016、SYAUBAA000017、SYAUBAA000018 为本研究中沈阳所采样品编号, JF730436 为模式产地朝鲜侧褶蛙序列号, 其余物种序列信息见表 1。

The figure above represents re-sampling support; SYAUBAA000016, SYAUBAA000017, and SYAUBAA000018 were sample numbers collected in Shenyang in this study. JF730436 was the serial number of *Pelophylax chosonicus* from type area. The sequence information of other species was shown in Table 1.



图 3 蒲河湿地公园内朝鲜侧褶蛙的生境

Fig. 3 The habitat of *Pelophylax chosonicus* in Puhe Wetland Park

### 3 讨论

侧褶蛙属广泛分布于古北界和东洋界, 根据 AmphibiaWeb (2021) 和中国两栖类 (2021) 的记录, 中国分布的侧褶蛙属物种有 6 种, 本文报道的朝鲜侧褶蛙是在中国境内首次发现。Pyron 和 Wiens (2011) 对来自 GenBank 的序列进行分子系统发育重建, 显示侧褶蛙属为一单系, 属内又分化成亚洲支系和欧洲支系两个亚支系。本文所构建的分子发育树亦支持这一结果。

朝鲜侧褶蛙与金线侧褶蛙亲缘关系较近, 自 1956 年至今对其分类修订报道较多, 部分学

者将朝鲜侧褶蛙作为金线蛙的一个亚种 (Shannon 1956, Dubois et al. 1994), 1983 年 Kuramoto 根据繁殖生物资料等将朝鲜侧褶蛙定为一个独立的种 *Rana chosonica* (后经分类变动种名改为 *Pelophylax chosonicus*), 并得到 Dubois (1987, 1992) 和 AmphibiaWeb (2021) 等的支持。

本研究基于 Kimura 双参数模型估算的黑斑侧褶蛙、金线侧褶蛙和朝鲜侧褶蛙物种间的遗传距离仅为 0.2%~0.4%, 有研究发现侧褶蛙属内物种间, 尤其是黑斑侧褶蛙与金线侧褶蛙之间, 有线粒体渗透现象, 也有部分杂交个体产生 (Zhang et al. 2008, Shohei et al. 2015), 因此本研究没有采用遗传距离计算结果作为判定物种的标准。在辽宁沈阳朝鲜侧褶蛙采集地有黑斑侧褶蛙同域分布, 两物种间是否有基因交流现象仍需要进一步研究及更多的分子数据支持。

另外, 此前报道的金线侧褶蛙分布范围为辽宁丹东、华北及华东地区 (费梁等 2009)。金线侧褶蛙在辽宁省的分布地仅为丹东东港, 与华北的分布地并不相连, 且丹东市与朝鲜新义州市只由鸭绿江相隔, 其地理区系相邻, 分布区域连续, 没有隔离因素, 故推测辽宁丹东分布的“金线侧褶蛙”亦为朝鲜侧褶蛙。

## 参 考 文 献

- Amal B, Bae Y H, Groffen J, et al. 2017. *Pelophylax chosonicus* (Goldspotted Pond Frog). *Herpetological Review*, 48(3): 79–80.
- AmphibiaWeb. 2021. Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California: AmphibiaWeb. [DB/OL]. [2021-12-02]. <https://amphibiaweb.org/>.
- David P. 2008. ModelTest: Modeltest phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253–1256.
- Dubois A. 1987. *Miscellanea taxonomica batrachologica* (I). *Alytes*, Paris, 5(1): 7–95.
- Dubois A. 1992. Notes sur la classification des Ranidae (Amphibiens Anoures). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 61(10): 305–352.
- Dubois A, Ohler A. 1994. Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, genus *Rana*): a catalogue of available and valid scientific names, with comments on the name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities. *Zoologica Poloniae* 39(3/4): 139–204.
- Frost D R. 2008. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*, version 5.2. New York, USA: American Museum of Natural History. [DB/OL]. [2021-12-02]. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.
- 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.
- Kuramoto M. 1983. Studies on the speciation of pond frogs in East Asia. *Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology*, 6: 253–267.
- Pyron R A, Wiens J J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of advanced frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2): 543–583.
- Shannon F A. 1956. The reptiles and amphibians of Korea. *Herpetologica*, 12(1): 22–49.
- Shohei K, Takeshi I, Si M L, et al. 2015. Robust molecular phylogeny and palaeodistribution modelling resolve a complex evolutionary history: glacial cycling drove recurrent mtDNA introgression among *Pelophylax* frogs in East Asia. *Journal of Biogeography*, 42(11): 2159–2171.
- 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.
- Zhang H, Yan J, Zhang G, et al. 2008. Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog populations (*Pelophylax nigromaculata*): evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evolutionary Biology* 8(21): 1–16.
- 戴建华. 2009. 中国金线侧褶蛙种组的系统地理学. 南京: 南京师范大学博士学位论文.
- 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.
- 齐菲. 2020. 蒲河国家湿地公园植物多样性调查与美景度评价. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文.
- 孙周平, 余朝阁, 王永义. 2019. 辽宁省辽中区日光温室青秆直接还田番茄种植试验. 农业工程技术, 39(28): 22-24.
- 中国两栖类. 2021. “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]. [2021-12-02]. <http://www.amphibiachina.org/>.