

重庆发现云南小狭口蛙及其系统发育关系

黄双^① 李春晓^{①②} 李成容^① 黄燕^{①*}

① 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室 南充 637009; ② 西华师范大学生态研究院 南充 637009

摘要: 2021年5月在重庆武隆仙女山国家森林公园采集到3号小狭口蛙标本,经形态学及分子生物学鉴定为云南小狭口蛙 (*Glyphoglossus yunnanensis*),属重庆市两栖动物分布新记录种。本文给出了这3号标本的17项外形特征测量值,并描述了其生境特征。对10个不同地理种群的云南小狭口蛙种群相关16S rRNA基因片段构建最大似然树表明,重庆武隆标本与云南小狭口蛙产地标本序列聚在一起,且其间的遗传距离为0.6%,远远小于小狭口蛙属物种之间的遗传距离。重庆武隆的这一分布点,使得对云南小狭口蛙在我国分布的认知往东北延伸了超过350 km。云南小狭口蛙在重庆武隆的分布新记录能帮助理解该物种潜在分布区以及谱系地理。

关键词: 重庆; 武隆; 两栖动物; 分布新记录; 云南小狭口蛙

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 06-929-08

Discovery of Yunnan Small Narrow-mouthed Frogs in Chongqing and Their Phylogenetic Relationships

HUANG Shuang^① LI Chun-Xiao^{①②} LI Cheng-Rong^① HUANG Yan^{①*}

① *Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education), China West Normal University, Nanchong 637002;* ② *Institute of Ecology, China West Normal University, Nanchong 637002, China*

Abstract: Three specimens of *Glyphoglossus* were collected from Chongqing Wulong Fairy Mountain National Forest Park in May 2021. The specimens were identified as *G. yunnanensis* (Amphibia, Anura, Microhylidae) by morphological and molecular data, which is a new record of this species in Chongqing municipality. Seventeen morphological characteristics of the specimens were measured (Table 2) and their habitats (Fig. 1) were also described. The construction of maximum likelihood trees for 16S rRNA gene fragments associated with 10 different geographic populations of *G. yunnanensis* populations showed that the sequences of specimens from Wulong, Chongqing, clustered with those from *G. yunnanensis* frog locality, and the genetic distance between them was 0.6%, much smaller than that between species of the genus *Glyphoglossus* (Table 2 and Fig. 2). This new locality in Wulong, Chongqing extends the distribution area of this species northeastward for more than 350 km in China (Fig. 3). The new record of *G. yunnanensis* in

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31901234);

* 通讯作者, E-mail: sunflower-hy@126.com;

第一作者介绍 黄双, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: 1249772300@qq.com。

收稿日期: 2022-03-11, 修回日期: 2022-08-06 DOI: 10.13859/j.cjz.202206013

Chongqing will play an important role in understanding the potential distribution area and pedigree geography of this species.

Key words: Chongqing; Wulong; Amphibians; New record; *Glyphoglossus yunnanensis*

云南小狭口蛙 (*Glyphoglossus yunnanensis*) 属姬蛙科 (Microhylidae) 小狭口蛙属。小狭口蛙属目前共发现 10 种, 中国分布 2 种 (Frost 2020, Zhang et al. 2021)。云南小狭口蛙在国内主要分布于四川南部、云南和贵州西部; 国外分布于越南 (北部) (费梁等 2012)。作者于 2021 年 5 月在重庆武隆仙女山国家森林公园采集到 3 号小狭口蛙标本, 经形态学及分子生物学鉴定为姬蛙科小狭口蛙属云南小狭口蛙, 属重庆市两栖动物分布新记录种。

1 方法

1.1 实验材料

2021 年 5 月在重庆仙女山国家森林公园一片湿地内 (107°44'14" E, 29°30'7" N) 采集到 3 号 (2 雄 1 雌) 小狭口蛙类成体标本 (表 1)。取肌肉组织保存于 95% 的乙醇中。标本福尔马林, 保存于西华师范大学西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 浸泡于 (标本号分别为 WL2021050201、WL2021050202 和 WL2021050206。)

1.2 形态鉴定与测量

标本的形态鉴定依据《中国两栖动物检索及图解》(费梁等 2005) 和《中国两栖动物及其分布彩色图鉴》(费梁等 2012)。使用数显游标卡尺 (CD-209PMX, Mitutoyo, 精确度为 0.01 mm) 测量 3 号标本的 17 项形态特征。

1.3 DNA 提取、扩增及测序

使用动物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tsingke Biotechnology Co. Ltd. Chengdu, China) 从乙醇保存的肌肉样品中提取总 DNA。利用 PCR 扩增并测定了 16S rRNA 基因 570 bp 的目的片段。扩增引物为 P7 和 P8 (Simon et al. 1994)。PCR 扩增条件和步骤参照 Chen 等 (2013)。PCR 扩增产物经电泳检测后, 大小

符合要求的产物交由北京擎科生物科技有限公司测序。所得序列上传到 GenBank。

1.4 分子系统发育关系重建和遗传距离

从 GenBank 中下载姬蛙科狭口蛙属 (*Kaloula*) 及姬蛙属 (*Microhyla*) 相关物种的 16S rRNA 基因序列, 及云南小狭口蛙 10 个地理种群相关 16S rRNA 基因序列, 结合重庆武隆标本测序结果 (表 1), 进行分子系统发育分析。以四川狭口蛙 (*K. rugifera*)、花姬蛙 (*M. pulchra*)、小弧斑姬蛙 (*M. heymonsi*)、饰纹姬蛙 (*M. ornata*) 为外群, 将所有序列通过 MAFFT 7.475 进行比对 (Rozewicki et al. 2019)。系统发育树的构建采用最大似然法并用 IQ-TREE 1.6.12 软件进行 (Chernomor et al. 2016), 在 Akaike 信息量准则 (Akaike information criterion, AIC) 下和贝叶斯 (Bayesian information criterion) 最佳模型均为 TIM2 + F + I + G4。基于 MEGAX 软件 Kimura 双参数模型计算遗传距离 (Kimura 1980, Kumar et al. 2018)。

1.5 分布区面积计算

利用最大熵模型 (Maxent) 对已知的云南小狭口蛙位点数据 (Zhang et al. 2020) 进行生境适宜性分析 (Phillips et al. 2008)。选取了来自 Worldclim version 1.4 (<https://www.worldclim.org/>) 的 19 个生态因子以及下载 NASA 发布的分辨率为 90 m 的航天飞机雷达地形测绘任务 (shuttle radar topography mission, SRTM) 数据 (<http://www.gscloud.cn/sources/accessdata/305?pid=302>), 提取分布区域海拔、坡度和坡向、河流图层, 在全球生物多样性信息网络 (global biodiversity information facility, GBIF) (<https://www.gbif.org/species/10711689>) 上下载了 78 个云南小狭口蛙分布点数据, 进行生境空间分布分析。Maxent 模型设置随机测试数据集

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	16S rRNA GenBank 号 GenBank accession numbers
	WL2021050201	MZ713163
本文标本 Specimen of this study	WL2021050202	重庆武隆 Wulong, Chongqing
	WL2021050206	
		云南宾川 Binchuan, Yunnan
		云南景东 Jingdong, Yunnan
		云南永德 Yongde, Yunnan
		云南绿春 Lvchun, Yunnan
云南小狭口蛙 <i>Glyphoglossus yunnanensis</i>		四川越西 Yuexi, Sichuan
		云南保山 Baoshan, Yunnan
		云南沧源 Cangyuan, Yunnan
		云南勐海 Menghai, Yunnan
		云南富源 Fuyuan, Yunnan
		云南昆明 Kunming, Yunnan
狮子鼻蛙 <i>G. molossus</i>	柬埔寨 Cambodia	AY948734
<i>G. guttulata</i>	越南嘉莱省安溪市社 Ankhe District, Gia-Lai Province, Vietnam	DQ283144
<i>G. minuta</i>	马来西亚彭亨州淡马鲁 Temerloh, Pahang, Malaysia	AB598340
<i>G. capsus</i>	马来西亚砂拉越 Sarawak, Malaysia	KJ488545
花甸小狭口蛙 <i>G. huadianensis</i>	云南丽江 Lijiang, Yunnan	MN860396
饰纹姬蛙 <i>Microhyla fissipes</i>	四川雅安 Yaan, Sichuan	MH822625
小弧斑姬蛙 <i>M. heymonsi</i>	贵州麻江 Majiang, Guizhou	MH544147
花姬蛙 <i>M. pulchra</i>	广东东莞 Dongguan, Guangdong	NC024547
四川狭口蛙 <i>Kaloula rugifera</i>	四川绵阳 Mianyang, Sichuan	NC029409

(random test percentage) 为 25%。正则化乘数 (regularization multiplier) 默认为 1.1; 最大的环境背景点 (max number of background points) 默认为 10 000; 采用交叉验证重复运算 4 次。构建的适宜分布模型采用 AUC 值 (area under curve) 作为主要可信度和准确性指标, 并计算其最适宜分布范围的面积 (Elith et al. 2011)。

2 结果

2.1 形态鉴定与量度

获得 2 只雄蛙与 1 只雌蛙的 17 项形态指标数据 (表 2)。雄蛙体长 26.83 mm 和 27.89 mm, 雌蛙体长 37.59 mm, 头小, 头宽大于头长, 吻

端短圆, 鼻间距大于鼻吻距, 背部有细长疣或痣粒, 沿脊线及其两侧、眼后斜至胯部的细长疣多断续排列成行, 四肢背面有痣粒, 雌蛙体腹面光滑, 雌性体型大于雄性, 第四指短小, 其余 3 指较宽扁, 指末端钝圆, 指间无蹼 (图 1a, b); 后肢粗短, 前伸贴体时胫跗关节达肩部, 趾端钝尖, 雄蛙趾间全蹼 (图 1c), 雌蛙第四趾之蹼仅达其长的 2/5, 蹼缘缺刻深 (图 1a)。背面多为灰黄色或棕黄色, 其上有镶以米黄色细边的深棕色对称斑纹; 跨部有一对醒目的圆斑点, 四肢具横纹或斑纹不规则; 腹面色浅, 具深色云斑 (图 1c, d)。雄蛙第三指宽扁而长; 指上无婚垫。

表 2 重庆武隆的云南小狭口蛙标本 17 项原始形态量度 (单位: mm)

Table 2 Seventeen primitive morphological measures in the specimens of *Glyphoglossus yunnanensis* from Wulong Fairy Mountain National Forest Park of Chongqing (unit: mm)

	WL2021050201 (♂)	WL2021050202 (♂)	WL2021050206 (♀)
头体长 Snout-vent length	27.89	26.83	37.59
头长 Head length	8.16	8.80	11.80
头宽 Head width	10.78	10.44	15.74
吻长 Snout length	3.50	4.16	4.63
鼻间距 Internasal space	2.02	2.61	2.92
鼻吻距 Distance between nostril and snout	2.20	2.38	2.67
鼻眼距 Distance between nostril and eye	2.24	2.24	3.05
两眼前角距 Distance between anterior corners of eyes	5.11	4.73	6.19
两眼后角距 Distance between back corners of eyes	7.59	8.09	10.64
前臂及手长 Length of lower arm and hand	14.66	16.64	19.04
手长 Hand length	9.53	10.90	11.80
前臂宽 Width of lower arm	2.40	2.71	3.52
股长 Thigh length	14.49	15.07	16.01
胫长 Tibia length	13.69	14.25	17.29
胫宽 Tibia width	4.64	5.33	6.44
跗足长 Length of foot and tarsus	21.15	24.25	28.43
足长 Foot length	16.26	17.57	20.34

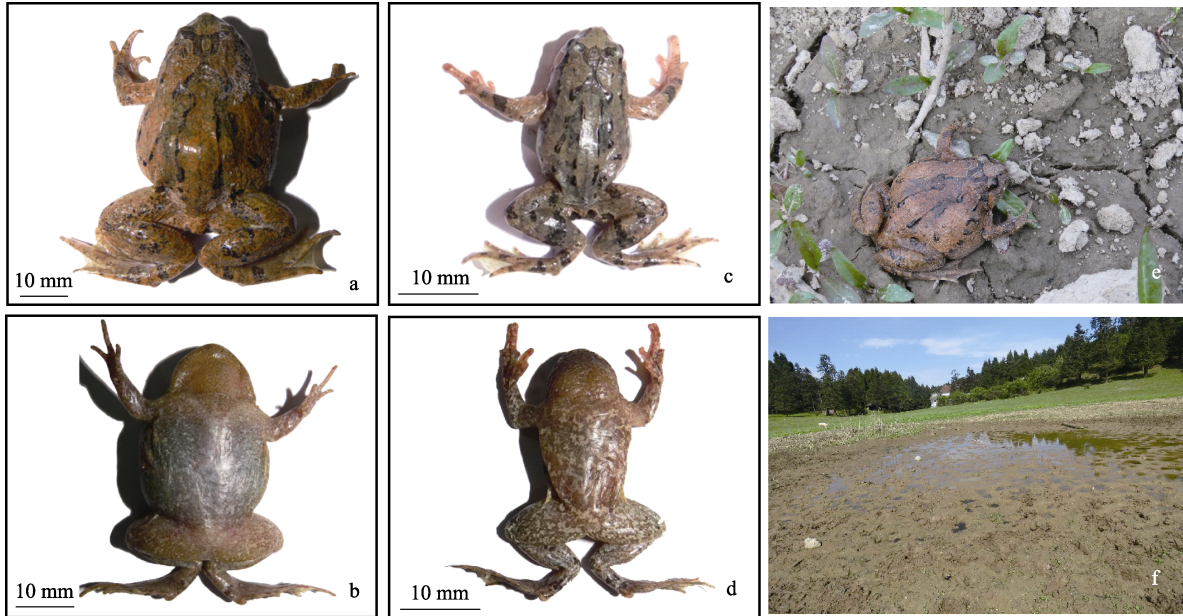


图 1 重庆武隆云南小狭口蛙及生境照

Fig. 1 *Glyphoglossus yunnanensis* and its habitat in Wulong Fairy Mountain National Forest Park

a. 背面观 (♀); b. 腹面观 (♀); c. 背面观 (♂); d. 腹面观 (♂); e. 生活照背面观; f. 武隆生境。

a. Dorsal view (♀); b. Ventral view (♀); c. Dorsal view (♂); d. Ventral view (♂); e. Dorsal view in life; f. Habitat of Wulong.

2.2 生境描述及分布

重庆武隆仙女山国家公园, 平均海拔 1 900 m, 年均气温 11.2 °C 左右, 年降水量高于 1 214.3 mm (邹福林 2003)。云南小狭口蛙主要分布在海拔 1 778 ~ 1 832 m 的高山草甸水塘 (图 1e), 5 月初在小水塘附近聚集产卵 (图 1f)。与其同域分布的两栖类有峨眉林蛙 (*Rana omeimontis*)、泽陆蛙 (*Fejervarya multistriata*)、棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*) 及华西雨蛙武陵亚种 (*Hyla gongshanensis wulingensis*)。

2.3 分子系统发育关系和遗传距离

基于 16S rRNA 基因 570 bp 序列, 使用最大似然法建立的分子系统树表明 (图 2), 重庆武隆样品序列与云南小狭口蛙不同种群序列聚合构成单系, 其抽样支持率为 98%。小狭口

蛙属内部分物种间的遗传距离为 2.5% ~ 13.6%, 平均遗传距离为 7.74% (表 3)。重庆武隆的云南小狭口蛙标本与模式产地云南昆明样本间的遗传距离为 0.6%, 地理种群间最大分化值为 0.08%, 远小于小狭口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自重庆武隆的标本为云南小狭口蛙 (图 2)。与小狭口蛙属内相关物种进行分析, 发现云南小狭口蛙与花甸小狭口蛙的遗传距离最小, 其遗传距离为 2.5%, 为种间最小遗传分化。

2.4 适宜分布区

Maxent 模型预测结果较好, 其训练集和验证集 AUC 值分别为 0.997 和 0.986。将云南小狭口蛙的潜在分布区域分为四个等级, 生境适宜性得分如图 3 所示, 图中深绿色代表不适宜

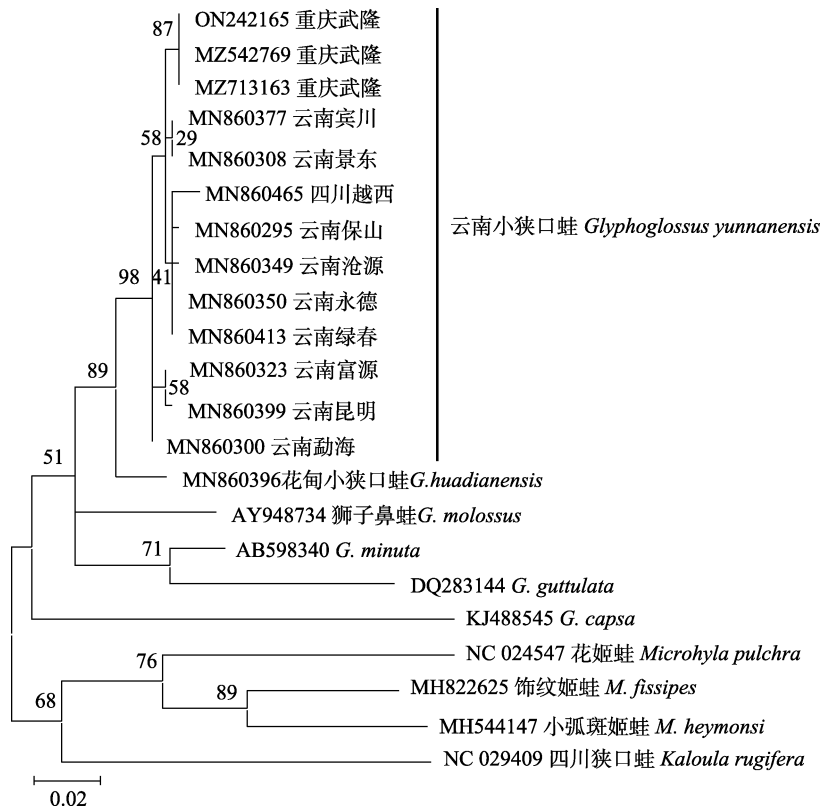


图 2 基于线粒体 16S rRNA 基因 570 bp 序列构建的小狭口蛙属最大似然系统发育树

Fig. 2 Maximum likelihood phylogenetic tree of *Glyphoglossus yunnanensis* based on the 570 bp sequence of the mitochondrial 16S rRNA gene

图中枝上的数字代表重抽样支持率。样本来源信息见表 1。

The figures on the bar in the chart represent resampling support. Sample information sources are shown in Table 1.

表 3 基于 16S rRNA 估算的小狭口蛙属部分物种间 *kamura* 双参数遗传距离
Table 3 Genetic distance of *Kamura*-2-parameter model for 16S rRNA gene sequences of some *Glyphoglossus* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
云南小狭口蛙 <i>Glyphoglossus yunnanensis</i>															
1 MZ542769 (重庆武陵 Wulong, Chongqing)	0.000														
2 MN860350 (云南永德 Yongde, Yunnan)	0.002														
3 MN860413 (云南绿春 Lvchun, Yunnan)	0.002	0.000													
4 MN860349 (云南沧源 Cangyuan, Yunnan)	0.004	0.002	0.002												
5 MN860295 (云南保山 Baoshan, Yunnan)	0.004	0.002	0.002	0.004											
6 MN860377 (云南宾川 Binchuan, Yunnan)	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006										
7 MN860308 (云南景东 Jingdong, Yunnan)	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006	0.000									
8 MN860399 (云南昆明 Kunming, Yunnan)	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006	0.008	0.008								
9 MN860465 (四川越西 Yuexi, Sichuan)	0.008	0.008	0.008	0.010	0.010	0.012	0.012	0.012							
10 MN860300 (云南勐海 Menghai, Yunnan)	0.008	0.006	0.006	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.014						
11 MN860323 (云南富源 Fuyuan, Yunnan)	0.008	0.006	0.006	0.008	0.008	0.010	0.010	0.002	0.014	0.004					
12 MN860396 花甸小狭口蛙 <i>G. huadianensis</i>	0.025	0.027	0.027	0.030	0.030	0.027	0.027	0.027	0.034	0.025	0.025				
13 AY948734 狮子鼻蛙 <i>G. molossus</i>	0.059	0.059	0.059	0.061	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.057	0.057	0.061			
14 AB598340 <i>G. minuta</i>	0.062	0.062	0.062	0.064	0.059	0.062	0.062	0.062	0.064	0.059	0.059	0.057	0.066		
15 DQ283144 <i>G. guttulata</i>	0.105	0.108	0.108	0.111	0.105	0.108	0.108	0.108	0.105	0.105	0.105	0.091	0.098	0.071	
16 KJ488545 <i>G. capsa</i>	0.136	0.133	0.133	0.130	0.136	0.133	0.133	0.127	0.142	0.124	0.124	0.129	0.149	0.142	0.161

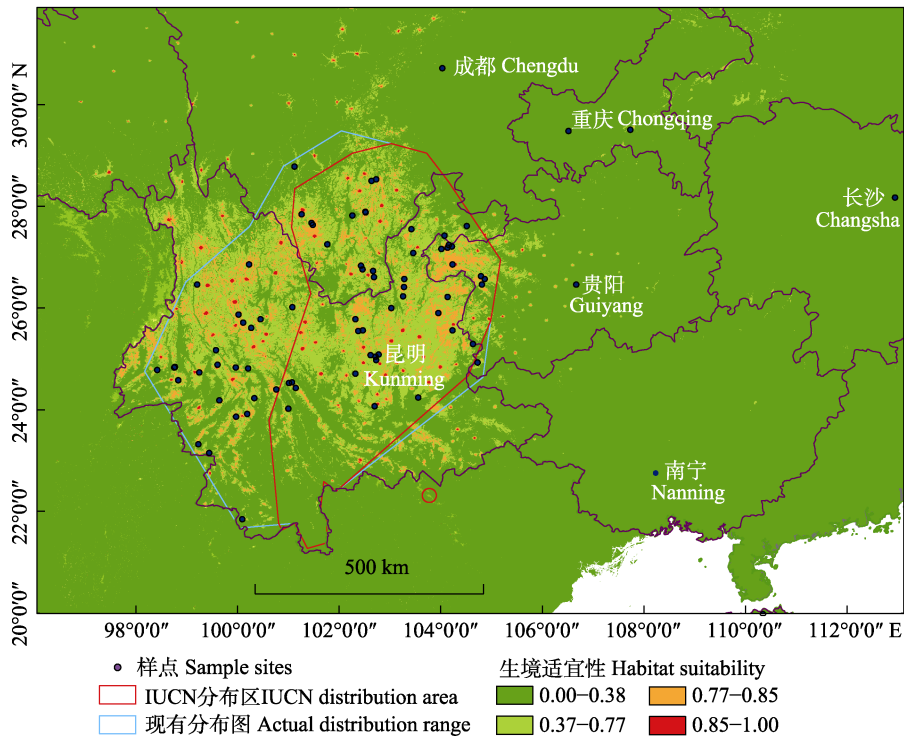


图 3 云南小狭口蛙潜在适宜分布图

Fig. 3 Potential suitability distribution localities of *Glyphoglossus yunnanensis*

颜色较暖地区表示适宜性得分较高的区域。

The warmer colors indicate areas with high suitability scores.

区、淡绿色代表低适宜区、橙色代表中适宜区，红色代表高适宜区，其中云南小狭口蛙适宜分布（高适宜区）的区域面积大概为 3.23 万 km^2 ，位于云贵高原及横断山脉的高山上。图 3 亦表示 IUCN 分布图 (<https://www.iucnredlist.org/species/57728/91598831>) 及现有分布区域对比。

3 讨论

云南小狭口蛙属于东洋界区系物种，分布于我国的四川南部、云南和贵州西部以及越南北部，此次在重庆武隆发现的云南小狭口蛙处于武陵山系北麓，使得对该物种在我国的地理分布认知向东北方向延伸 350 km。此次发现一方面提示重庆武隆地区的生物多样性还有待进一步研究，另一方面推测在重庆和云南、贵州海拔 1 700 m 以上的地方可能有该种分布，物

种实际分布范围可能更大。云南小狭口蛙在 IUCN 被评为低危 (least concerned, LC) 等级，因主要分布在海拔 1 700 m 以上的山区中，空间分布上属于相对高海拔地区，且分布区间主要为山地高原地貌，随着气候变暖，对该物种的影响也应得到持续关注。

参 考 文 献

- Chen X, Chen Z, Jiang J, 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.
- Chernomor O, Von Haeseler A, Minh B Q. 2016. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic Biology*, 65(6): 997–1008.
- Elith J, Phillips S, Hastie T, et al. 2011. A statistical explanation of

- MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*, 17(1): 43–57.
- Frost D R. 2022. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 6.0. New York, USA: American Museum of Natural History. [EB/OL]. [2022-07-29]. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120.
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547.
- Phillips S J, Dudik M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31(2): 161–175.
- Rozewicki J, Li S, Amada K M, et al. 2019. MAFFT–DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W5–W10.
- 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 D R, Hui H, Yu G H, et al. 2020. Shared response to changes in drainage basin: Phylogeography of the Yunnan small narrow-mouthed frog, *Glyphoglossus yunnanensis* (Anura: Microhylidae). *Ecology and Evolution*, 10(3): 1567–1580.
- Zhang D, Liu S, Zhang L, et al. 2021. A New Species of *Glyphoglossus* Gunther, 1869 (Anura: Microhylidae) from Western Yunnan, China. *Asian Herpetological Research*, 12(4): 371–380.
- 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.
- 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.
- 邹福林. 2003. 南国第一牧场——仙女山国家森林公园. *林业经济*, 8(1): 64–64.