

# 浙江九龙山发现北仑姬蛙新种群的两性异形

陈智强<sup>①②</sup> 钟俊杰<sup>②</sup> 冯磊<sup>②</sup> 郑伟成<sup>③</sup>

丁国骅<sup>②</sup> 吴延庆<sup>④</sup> 林植华<sup>②\*</sup>

① 浙江农林大学动物科技学院 临安 311300; ② 丽水学院生态学院 丽水 323000;

③ 浙江九龙山国家级自然保护区管理中心 遂昌 323300; ④ 生态环境部南京环境科学研究所 南京 210042

**摘要:** 2017年和2018年的4月在浙江九龙山国家级自然保护区发现一种姬蛙,经形态学比较、16S rRNA序列比对及系统发育分析,鉴定为北仑姬蛙 (*Microhyla beilunensis*),是该种的地理新分布。通过测量31只成体(25雌和6雄)的体长、头长、头宽、吻长、鼻间距、眼间距、眼径、前臂及手长、后肢全长和足长10个形态指标,研究该种的两性异形。结果显示,该种具有雌性大于雄性的个体大小两性异形;体长之外的9个局部形态特征均与体长成正相关,去除体长效应后,北仑姬蛙雄蛙前臂及手长显著大于雌蛙,其余形态特征在两性间均无差异;主成分分析(特征值  $\geq 1$ )显示,头长、头宽、吻长、鼻间距、眼间距、眼径、前臂及手长、后肢全长和足长等9个特定体长的形态变量辨析出两个主成分,共解释了原始数据52.5%的变异,头宽和前臂及手长在第一向量上具有较高的正负载系数,且两性形态在第一向量上差异显著,这表明头宽和前臂及手长可用于区分雌雄个体。

**关键词:** 北仑姬蛙; 地理新分布; 两性异形; 个体大小; 前臂及手长

**中图分类号:** Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 02-178-11

## Sexual Dimorphism of Beilun Pygmy Frog (*Microhyla beilunensis*) from Jiulongshan Mountain, Zhejiang

CHEN Zhi-Qiang<sup>①②</sup> ZHONG Jun-Jie<sup>②</sup> FENG Lei<sup>②</sup> ZHENG Wei-Cheng<sup>③</sup>

DING Guo-Hua<sup>②</sup> WU Yan-Qing<sup>④</sup> LIN Zhi-Hua<sup>②\*</sup>

① College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300;

② College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000; ③ Administration Bureau of Zhejiang Jiulongshan National Nature Reserve, Suichang 323300; ④ Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China

**Abstract:** Amphibian resources are abundant and unique in China, and more new amphibian species were found through molecular techniques. A *Microhyla* species was found during a field survey in Zhejiang Jiulongshan National Nature Reserve in April of 2017 and 2018. They were identified based on morphological

**基金项目** 遂昌县县校合作项目 (No. 2017-hz09, 2019-hz07), 生态环境部南京环境科学研究所重点物种评估项目 (No. 2019-2-4-6), 浙江省自然科学基金项目 (No. LQ16C040001), 国家科技部科技基础性工作专项 (No. 2015FY110200);

\* 通讯作者, E-mail: zhlin1015@126.com;

**第一作者简介** 陈智强, 男, 硕士研究生; 研究方向: 两栖动物资源保护与利用; E-mail: zqchen96@qq.com。

收稿日期: 2019-11-05, 修回日期: 2020-01-05 DOI: 10.13859/j.cjz.202002007

comparison, BLAST comparison and phylogenetic analysis of mitochondrial 16S rRNA gene. Thirty-one adult (25♂♂ and 6♀♀) were captured and measured for snout-vent length (SVL), head length (HL), head width (HW), snout length (SL), internasal distance (IND), internorbital distance (IOD), diameter of eye (DE), length of lower arm and hand (LLAH), total length of leg (TLL) and foot length (FL) to examine sexual dimorphism of this species. Corresponding data were processed by one-way ANOVA, linear regression and principal component analysis. Our results showed that: (1) the species was identified as *M. beilunensis* and this sample locality is a new geographic distribution of *M. beilunensis* (Figure 1); (2) *M. beilunensis* displays female-biased sexual size dimorphism (Table 3); (3) other nine morphological traits were positively related with SVL in both sexes of *M. beilunensis* (Figure 3); (4) the mean value of LLAH in males was larger than female after removing the effect of SVL (Table 3); (5) a principal component analysis resolved two components (eigenvalues 1) from nine SVL-adjusted morphological traits, accounting for 52.47% of variation in the original data (Table 4). The first component had high positive loading for HW and LLAH, and morphological traits between male and female differed significantly in their scores on the first axis (Table 4), indicating that HW and LLAH could distinguish females and males.

**Key words:** *Microhyla beilunensis*; New geographic distribution; Sexual dimorphism; Body size; Length of lower arm and hand

近 50 年来, 过度开发、栖息地破坏、人类驱动的气候变化和疾病传播等因素导致许多物种种群数量的快速下降和物种灭绝 (Wake et al. 2008, Hoffmann et al. 2010, Yan et al. 2018)。全球范围内的评估分析结果显示, 两栖动物是受威胁程度最高的类群之一 (Hoffmann et al. 2010)。我国幅员辽阔, 具有丰富且独特的两栖动物资源 (费梁等 2012, 中国两栖类 2019)。我国两栖动物受威胁程度高于世界平均水平 (江建平等 2016, IUCN 2016, 李成等 2017), 故亟需开展该类群动物的多样性保护研究。

随着分子技术的成熟, 两栖动物新种和地理新分布被广泛发现 (Zhang et al. 2018, 陈智强等 2018, 吴延庆等 2019)。物种是保护行动中保护和管理的单位, 只有对于某一物种具有足够的知识和描述才能制定出必要的物种保护计划和机制 (Mace 2004)。许多关于新种的报道只进行了初步的描述, 无法进一步为物种资源的保护计划提供更加全面的依据。

两性异形现象普遍存在于动物界, 表现为同一物种雌雄个体间的身体大小、体色、局部形态特征、生理、行为等方面存在差异 (Faizi

et al. 2010, 李春瑜等 2013)。该现象可能由两性间性成熟年龄、繁殖策略、生育力选择的差异引起 (Howard 1978, Cadeeddu et al. 2012, 李春瑜等 2013)。研究特定种类的两性异形有助于进一步了解物种的生存策略及导致两性异形进化的选择压力, 为物种的资源保护提供依据。目前关于两栖动物两性异形的研究, 国内主要集中于叉舌蛙科 (林植华等 2005, 路庆芳等 2008, 施林强等 2011, 李春瑜等 2013)、蛙科 (郑荣泉等 2002, 陈旭等 2013, 刘鹏等 2013, 胡一中等 2015)、蟾蜍科 (李殿伟等 2014, 宫铃等 2016, 郑方东等 2018) 等物种, 对姬蛙科物种的相关研究较少, 仅涉及多疣狭口蛙 (*Kaloula verrucosa*, 贺佳飞等 2006) 和饰纹姬蛙 (*Microhyla fissipes*, 魏洁 2016, Ding et al. 2019)。

姬蛙科姬蛙属一新种北仑姬蛙 (*M. beilunensis*) 于 2018 年在浙江宁波北仑区被发现, Zhang 等 (2018) 基于体色、脚掌掌突与已有姬蛙属物种的差异以及线粒体 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 基因序列的系统发育结果, 认定该标本为姬蛙属新种并定名。之后, 未见

北仑姬蛙的相关地理分布和形态学的基础性工作报道。本文采用体色、形态指标和线粒体 16S rRNA 基因序列确定北仑姬蛙的在浙江丽水九龙山的地理新分布。同时,分析了北仑姬蛙九龙山种群个体大小及局部形态特征的两性异形,为其物种鉴定、性选择理论研究、种内地理变异和资源保护提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 野外考察及标本处理

2017 和 2018 年 4 月在浙江省丽水市遂昌县浙江九龙山国家级自然保护区(N28°22'35", E118°53'32", 海拔 660 m)采集到一种蛙类个体,拍照并进行体色和外部形态观察,确认为姬蛙属物种(图 1a)。所捕获的 31 只个体测量完形态特征后随机挑选 6 只成体(3♂♂: LSULL20170422001、LSULL20170422002 和 LSULL20180422006; 3♀♀: LSULL20180422001、LSULL20180422009 和 LSULL20180422012),用 70%酒精固定,保存于丽水学院两栖爬行动物实验室,其余个体放回原捕捉地。

### 1.2 形态学量度

参考费梁等(2009)的无尾类形态指标测量方法,用电子数显游标卡尺(Mitutoyo, 精确度为 0.01 mm)对九龙山采集到的姬蛙属个体(25♂♂和 6♀♀)的体长(自吻端至泄殖腔处的距离, snout-vent length, SVL)、头长(吻端至上下颌关节后缘的长度, head length, HL)、头宽(头两侧之间的最大距离, head width, HW)、吻长(吻端至眼前角的长度, snout length, SL)、鼻间距(左右鼻孔内缘之间的距离, internasal distance, INS)、眼间距(左右上眼睑内侧缘之间的最窄距离, interorbital distance, IOS)、眼径(与体轴平行的眼直径, Diameter of eye, DE)、前臂及手长(肘关节至第 3 指末端的长度, length of lower arm and hand, LLAH)、后肢全长(自体后端正中部位至第 4 趾末端的长度, total length of leg, TLL)和足长(自内蹠突的近端至第 4 趾末端的长度,

foot length, FL)等 10 个形态指标进行测量。所有个体的测量均由陈智强一人完成,以减少测量误差。

### 1.3 物种鉴定

用 DNA 提取试剂盒(GENVIEW-AT-DNA-50, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)提取 6 个标本的肌肉组织总 DNA;参考 Zhang 等(2018)的引物和 PCR 扩增条件,对样本的线粒体 16S rRNA 的 DNA 片段进行常规 PCR 扩增,PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。用 SeqMan 检查测序结果,去除杂峰,保留 511 bp 的 16S rRNA 序列,用 DNASP 4.0 鉴别单元型、计算单元型多样性和核苷酸多样性;随后在 GenBank 中与已知姬蛙属物种的相应序列进行 BLAST 比对,确认相似物种。参考 Zhang 等(2018)并从 GenBank 下载姬蛙属物种可用 16S rRNA 序列数据 16 条和 1 条北方狭口蛙(*Kaloula borealis*)序列(表 1)。用 MEGA 对所下载的 16S rRNA 序列和本实验采集到的 6 个标本序列进行对齐排列并截取长度一致的序列片段(486 bp),随后用 pairwise uncorrected *p*-distance 模型计算各样本间的遗传距离。

系统发育进化树用贝叶斯法(Bayesian Inference, BI)在 MrBayes 3.2 上进行构建。构树前,利用 MrModeltest 2.3 选择最适碱基替代模型为 GTR + G,外群设置为北方狭口蛙。系统树中结点的置信度由后验概率提供。

### 1.4 数据分析

用 Statistica 6.0 进行数据统计分析。统计前,用 Kolmogorov-Smirnov 和 Bartlet 方法分别检验数据的正态性和方差均质性,形态学指标数据经自然对数转化后符合参数分析条件。用单因子方差分析(one-way ANOVA)、线性回归(linear regression)、主成分分析(principal component analysis)等处理相应的数据。当统计指标存在显著差异时,进一步用 Tukey 多重比较进行检验。描述性统计值用平均值 ± 标准误表示,显著性水平设置为  $\alpha = 0.05$ 。

表 1 用于分子分析样本信息

Table 1 Information of samples used in the molecular analyses

物种 Species	标本编号 Specimen number	采样点 Locality	GenBank 登录号 GenBank Accession
合征姬蛙 <i>Microhyla mixtura</i>	CIBZMH2017061201 ~ CIBZMH2017061203	陕西汉中南洋县 Yangxian, Hanzhong, Shaanxi, China	MH234532 ~ H234534
	CIB20170526001 ~ CIB20170526003	四川万源花萼山 Hua'e mountain, Wanyuan, Sichuan, China	MH234540 ~ H234542
北仑姬蛙 <i>M. beilunensis</i>	CIBBL002 ~ CIBBL006	浙江宁波北仑区柴 Chaiqiao, Beilun, Ningbo, Zhejiang, China	MH234535 ~ H234539
北仑姬蛙 (九龙山种群) <i>M. beilunensis</i> (Joulongshan population)	LSULL20170422001	浙江丽水遂昌 Suichang, Lishui, Zhejiang, China	MN498048
	LSULL20170422002		MN498049
	LSULL20180422006		MN633295
	LSULL20180422001		MN633297
	LSULL20180422009		MN633296
	LSULL20180422012		MN633298
冲绳姬蛙 <i>M. okinavensis</i>	KUHE12840	日本奄美大岛 Amamioshima, Japan	AB201184
饰纹姬蛙 <i>M. fissipes</i>	KUHE32943	安徽黄山 Huangshan, Anhui, China	AB201185
小弧斑姬蛙 <i>M. heymonsi</i>	KUHEUN(K1845)	泰国北碧府 Kanchanaburi, Thailand	AB201190
粗皮姬蛙 <i>M. butleri</i>	KUHE40591	越南 A Luoi, A Roang, Vietnam	AB634664
花姬蛙 <i>M. pulchra</i>	KUHE35119	泰国 Phu Luan, Loei, Thailand	AB201191
北方狭口蛙 <i>Kaloula borealis</i>	KIZHERP0174	/	JX678909

## 2 结果

### 2.1 物种鉴别

本调查发现九龙山种群个体体色多为褐色或灰褐色，两眼间及背部具“蝴蝶状”斑纹，斑纹镶有浅色细纹，体侧及后肢侧面具纵行斑纹，体背后半部及后肢背面具有明显的圆形斑点（图 1b, c）；腹面乳黄色或白色，具密集小黑点（图 1d）；前后脚掌掌突两个，外掌突明显较内掌突发达（图 1e, f）。体色及脚掌掌突特点显示九龙山种群与北仑姬蛙模式标本的形态特征相似。

对 6 只九龙山姬蛙属标本的线粒体 16S rRNA 的 511 bp 序列比对，发现 16 个变异位点、6 个简约信息位点，定义了 6 个单倍型，单倍型多态性和核苷酸多态性分别为 1.0 和 0.012。在 GenBank 上的 BLAST 比对结果显示，6 个九龙山种群姬蛙属标本的 16S rRNA 序列与已知北仑姬蛙模式产地标本（CIBBL002 ~ CIBBL006）的序列一致性最高，在 97.8% ~

99.2% 范围内。贝叶斯分析结果显示，6 个姬蛙标本与北仑姬蛙聚为一支且明显分为两个种群，并与合征姬蛙构成姐妹群关系（图 2）。各物种 16S rRNA 的遗传距离结果显示，九龙山种群与北仑姬蛙的遗传距离（1.4%）小于与合征姬蛙（*M. mixtura*）（3.7%）、冲绳姬蛙（*M. okinavensis*）（4.3%）、饰纹姬蛙（*M. fissipes*）（4.2%）、小弧斑姬蛙（*M. heymonsi*）（6.5%）、花姬蛙（*M. pulchra*）（9.4%）和粗皮姬蛙（*M. butleri*）（10%）的遗传距离（表 2）。进一步显示九龙山种群个体与北仑姬蛙模式标本具有相似的遗传信息。

### 2.2 两性异形

共测量来自九龙山的 31 只个体（25♂♂和 6♀♀），形态特征描述性统计详见表 3。实验涉及最小雌性个体体长为 24.88 mm 的怀卵个体，以此判定所检测个体均为性成熟个体。个体大小存在显著的两性差异，雌性个体体长显著大于雄性个体（表 3）。两性个体中其余 9 个形态指标均与体长呈正相关（所有均  $P < 0.05$ ）（图 3）。

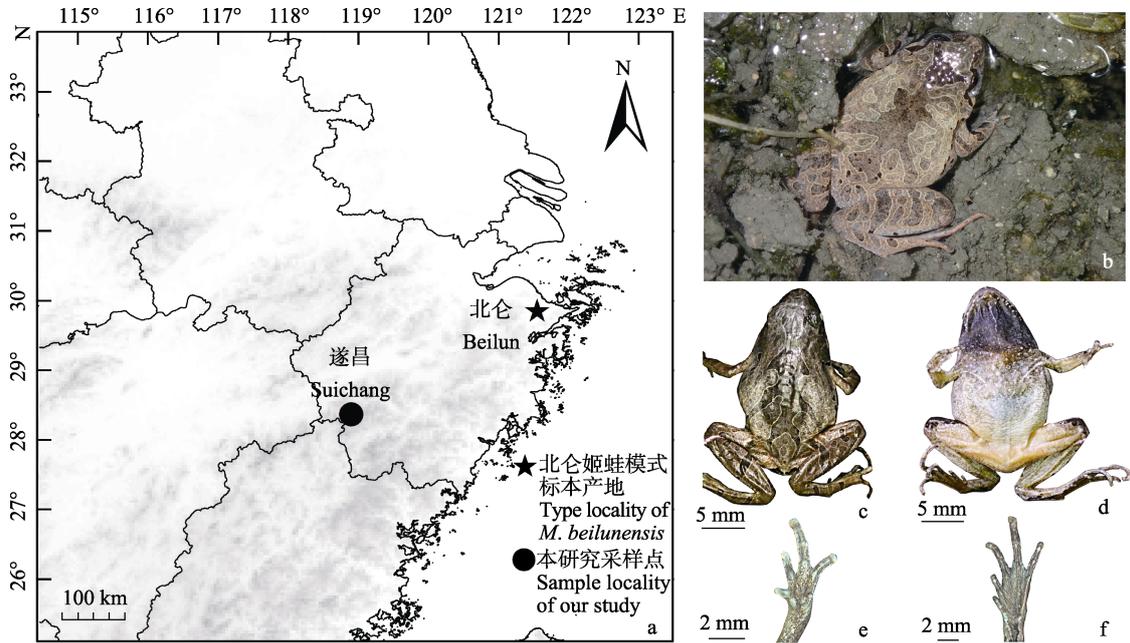


图 1 本研究样本采集点及九龙山姬蛙标本照片 (丁国骅摄)

Fig. 1 Sample locality of our study and photos of *Microhyla* sample from Jiulongshan population (photo by DING Guo-Hua)

a. 本研究样本采集点位于浙江遂昌九龙山; b. 姬蛙标本生态照; c. 背面; d. 腹面; e. 前脚掌; f. 后脚掌。

a. Sample locality of our study is Jiulongshan Mountain in Suichang, Zhejiang; b. Field photo of *Microhyla* sample; c. Dorsal view; d. Ventral view; e. Ventral view of hand; f. Ventral view of foot.

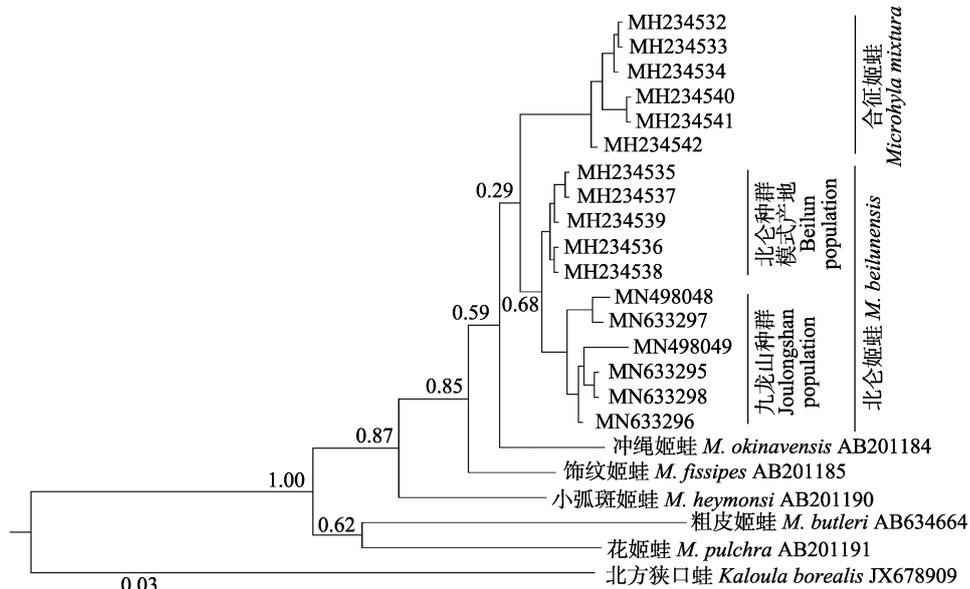


图 2 基于 16S rRNA 486 bp 序列构建的贝叶斯树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA 486 bp using Bayes method

分支上的数值代表贝叶斯树的后验概率值; 标尺代表每个位点的替换率。

Numbers above the nodes show posterior probabilities. The scaleplate represents substitutions/site.

表 2 基于线粒体 16S rRNA 序列 23 个样本间的遗传距离  
Table 2 Genetic distance between 23 samples based on 16S rRNA sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1 台征姬蛙																							
2 <i>Microhyla mixtura</i>	0.000																						
3	0.000	0.000																					
4	0.008	0.008	0.008																				
5	0.008	0.008	0.008	0.000																			
6	0.004	0.004	0.004	0.008	0.008																		
7 北仑姬蛙	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.029																	
8 模式产地种群	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.027	0.002																
9 <i>M. beilunensis</i>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.029	0.000	0.002															
10 Beilun population	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.027	0.002	0.000	0.002														
11	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.027	0.002	0.000	0.002	0.000													
12 北仑姬蛙	0.035	0.035	0.035	0.040	0.040	0.031	0.019	0.017	0.019	0.017	0.017												
13 九龙山种群	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.044	0.023	0.021	0.023	0.021	0.021	0.025											
14 <i>M. beilunensis</i>	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.033	0.012	0.010	0.012	0.010	0.010	0.015	0.015										
15 Jiulongshan population	0.031	0.031	0.031	0.035	0.035	0.027	0.015	0.012	0.015	0.012	0.012	0.006	0.023	0.012									
16	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.031	0.010	0.008	0.010	0.008	0.008	0.012	0.013	0.002	0.010								
17	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.033	0.012	0.010	0.012	0.010	0.010	0.015	0.015	0.000	0.012	0.002							
18 冲绳姬蛙 <i>M. okinavensis</i>	0.046	0.046	0.046	0.050	0.050	0.042	0.035	0.033	0.035	0.033	0.033	0.040	0.054	0.044	0.035	0.042	0.044						
19 小孤群姬蛙 <i>M. heymonsii</i>	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.064	0.058	0.056	0.058	0.056	0.056	0.067	0.075	0.062	0.060	0.062	0.071						
20 饰纹姬蛙 <i>M. fissipes</i>	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.040	0.035	0.033	0.035	0.033	0.033	0.044	0.050	0.040	0.040	0.038	0.040	0.052	0.058				
21 粗皮姬蛙 <i>M. butleri</i>	0.102	0.102	0.102	0.106	0.106	0.102	0.096	0.098	0.096	0.098	0.098	0.106	0.109	0.094	0.102	0.096	0.094	0.119	0.106	0.104			
22 花姬蛙 <i>M. pulchra</i>	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.089	0.087	0.089	0.087	0.087	0.096	0.102	0.091	0.091	0.089	0.091	0.096	0.091	0.098	0.104		
23 北方狭口蛙 <i>Kaloula borealis</i>	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.123	0.125	0.123	0.125	0.123	0.123	0.129	0.135	0.121	0.125	0.123	0.121	0.131	0.124	0.116	0.137	0.133	

表 3 九龙山种群北仑姬蛙形态特征的描述性统计值

Table 3 Descriptive statistics for morphological traits of *Microhyla beilunensis* from Jiulongshan population

形态特征 Morphological traits	雌性 Female (n = 6)	雄性 Male (n = 25)	F 值和显著水平 F-values and significant levels
体长 Snout-vent length (mm)	28.71 ± 0.97 (24.88 - 31.35)	25.00 ± 0.24 (22.19 - 27.07)	$F_{1,29} = 27.58, P < 0.001; F > M$
头长 Head length (mm)	5.69 ± 0.11 (5.22 - 6.00)	5.38 ± 0.05 (4.54 - 5.75)	$F_{1,29} = 0.40, P > 0.05$
头宽 Head width (mm)	7.06 ± 0.32 (5.52 - 7.64)	6.61 ± 0.07 (5.32 - 7.44)	$F_{1,29} = 1.61, P > 0.05$
吻长 Snout length (mm)	3.25 ± 0.16 (2.64 - 3.72)	2.88 ± 0.06 (2.36 - 3.50)	$F_{1,29} = 0.10, P > 0.05$
鼻间距 Internasal distance (mm)	2.23 ± 0.17 (1.78 - 2.99)	2.09 ± 0.06 (1.62 - 2.81)	$F_{1,29} = 1.31, P > 0.05$
眼间距 Internorbital distance (mm)	2.99 ± 0.15 (2.64 - 3.65)	2.70 ± 0.06 (2.13 - 3.26)	$F_{1,29} = 1.63, P > 0.05$
眼径 Diameter of eye (mm)	2.65 ± 0.10 (2.32 - 3.07)	2.51 ± 0.04 (2.03 - 2.97)	$F_{1,29} = 1.92, P > 0.05$
前臂及手长 Length of lower arm and hand (mm)	9.98 ± 0.35 (8.78 - 10.89)	10.00 ± 0.11 (8.61 - 10.89)	$F_{1,29} = 7.27, P < 0.02; F < M$
后肢长 Total length of leg (mm)	41.45 ± 1.70 (33.32 - 44.54)	38.24 ± 0.38 (33.73 - 41.24)	$F_{1,29} = 1.65, P > 0.05$
足长 Foot length (mm)	13.74 ± 0.53 (11.41 - 14.78)	12.40 ± 0.14 (10.87 - 13.71)	$F_{1,29} = 0.01, P > 0.05$

数据用平均值 ± 标准误 (范围) 表示;  $F$  值和显著水平结果采用 one-way ANOVA 对各形态指标进行两性差异的统计检验; 其中, 除体长外的另 9 项形态学指标用其与体长的回归分析所获得的回归剩余值进行分析, 以去除体长的影响。若  $P < 0.05$ , 则进一步用 Tukey 检验比较两性的差异性指标大小; F: 雌性, M: 雄性。

Data represent as mean ± SE (range);  $F$ -values and significant levels were got from one-way ANOVAs used to analyzed differences of both sexes on morphological traits. Except for SVL, other 9 morphological traits were treated as residuals of those traits agansit SVL. If  $P < 0.05$ , Tukey's test was used for post hoc multiple comparisons between both sexes. F: females, M: males.

对 9 个形态指标与体长的回归剩余值进行分析显示, 仅前臂及手长存在两性差异, 其余 8 个形态指标均不受性别影响, 雄性的前臂及手长明显大于雌性 (图 3, 表 3)。

对头长、头宽、吻长、鼻间距、眼间距、眼径、前臂及手长、后肢全长和足长等 9 个特定体长的形态变量的主成分分析 (特征值  $\geq 1$ ), 辨析出两个主成分, 共解释了原始数据 52.47% 的变异 (表 4)。第一向量解释 34.36% 的变异, 并显示头宽和前臂及手长具有较高的正负载系数, 第二向量解释 18.11% 的变异 (表 4)。两性个体的形态特征在第一向量上的分值差异显著 ( $F_{1,29} = 4.29, P < 0.05, F < M$ ), 但在第二向量上的分值无显著差异 ( $F_{1,29} = 0.002, P > 0.05$ ) (图 4)。

### 3 讨论

北仑姬蛙的显著形态特征为体背后半部及后肢背面具有明显的圆形斑点及前后脚掌掌突两个, 外掌突明显较内掌突发达, 这两个外部形态特征可作为与姬蛙属其他物种区分的标志 (Zhang et al. 2018)。此外, 16S rRNA 序列 BLAST 比对结果中九龙山种群个体序列与已知的北仑姬蛙序列最相似, 贝叶斯树也同样显示, 九龙山种群个体与北仑姬蛙聚为一支且明显分成两个种群。通常在以 16S rRNA 作为分子标记时, 当种群遗传距离超过 2%, 即认定达到了种的水平 (Camargo et al. 2006, Kon et al. 2007), 但对于不同物种而言, 序列的差异性导致界定种水平的标准也有所不同。例如, 马

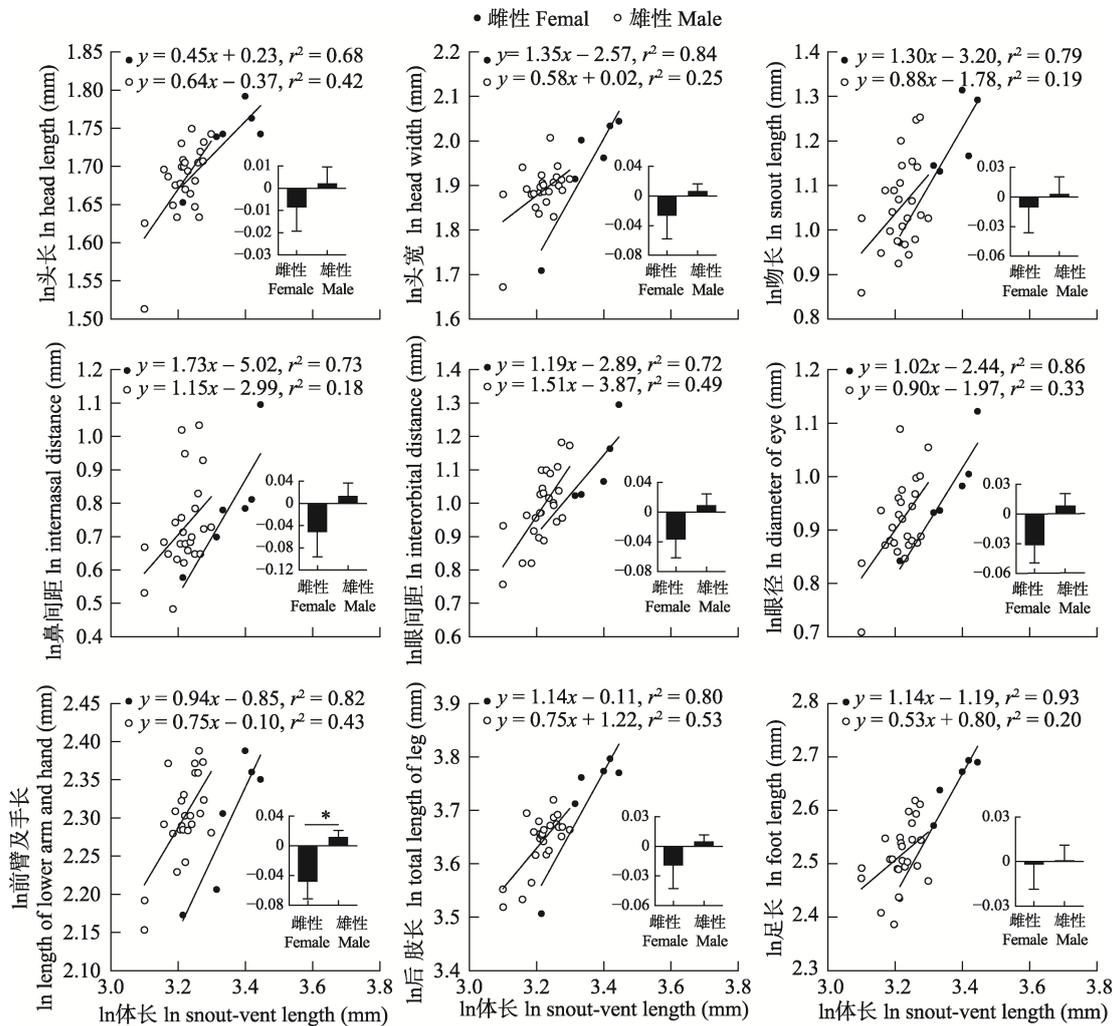


图3 九龙山种群北仑姬蛙雌雄个体9个形态特征与体长之间的线性回归

Fig. 3 Linear regressions of 9 morphological traits on SVL of both sexes in

*Microhyla beilunensis* from Jiulongshan population

图中给出回归方程和回归系数。小图为两性个体相应形态特征与体长的回归剩余值的平均值  $\pm$  标准误, \*  $P < 0.05$ 。

Regression equations and regression coefficients are given in the figure. Small figures are mean values  $\pm$  SE for residuals of corresponding traits against SVL in female versus male, \*  $P < 0.05$ .

达加斯加岛两栖类研究中认为, 序列差异值达 3% 时才可分辨出不同的种 (Vieites et al. 2009)。本研究结果显示, 九龙山种群与北仑姬蛙的遗传距离仅 1.4%, 故可认定为同一物种; 而与姬蛙属其他物种的遗传距离均大于 3%, 超过种间识别的最低差异程度, 故可认定为不同物种。因此, 本研究通过与北仑姬蛙模式产地标本的形态学比较、16S rRNA 的 BLAST 比

对、系统发育关系构建及遗传距离比较, 确认九龙山种群个体为北仑姬蛙。而贝叶斯分析结果的后验概率支持率不高可能由于北仑姬蛙与合征姬蛙间的遗传距离较近, 且本研究中采用的 16S rRNA 序列较短等综合原因导致的。

北仑姬蛙在浙江省宁波市北仑区 (海拔 120 m) 被发现和命名 (Zhang et al. 2018), 之后尚未见其他地区该种的报道。本研究中, 在

表 4 北仑姬蛙九龙山种群 9 个形态变量  
主成分分析前两个向量的负载系数

Table 4 Loading of the first two axes of a principal component analysis on nine morphological variables of *Microhyla beilunensis* from Jiulongshan population

形态变量 Morphological variables	负载系数 Factor loading	
	第一向量 PC1 Principal component 1	第二向量 PC2 Principal component 2
头长 Head length	0.354	0.177
头宽 Head width	0.705*	-0.065
吻长 Snout length	0.569	0.052
鼻间距 Internasal distance	0.661	0.276
眼间距 Internorbital distance	0.540	0.533
眼径 Diameter of eye	0.689	0.496
前臂及手长 Length of lower arm and hand	0.723*	-0.354
后肢长 Total length of leg	0.471	-0.675
足长 Foot length	0.446	-0.635
解释方差百分比 Proportion of variance explained (%)	34.36	18.11

个体大小的影响通过用检测变量与体长的回归剩余值进行消除；\* 变量具有主要贡献。

Size effects are removed in all cases by using residuals from the regressions on SVL; \* Variables with the main contribution to each factor.

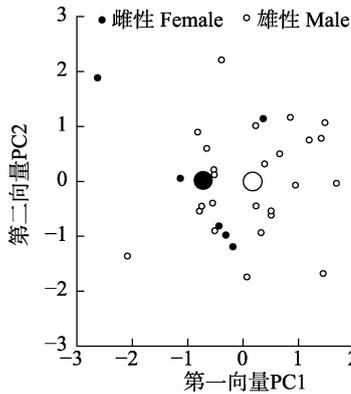


图 4 九龙山种群北仑姬蛙雌雄个体基于 9 个形态变量的主成分分析中前两个向量轴上的空间位置

Fig. 4 Positions of both sexes *Microhyla beilunensis* from Jiulongshan population in the space defined by the first two axes of a principal component analysis based on nine morphological variables

大圆表示因子分值的平均值。

Big circles represent mean values of factor scores.

浙江九龙山国家级自然保护区内(海拔 660 m)发现了该物种,为其地理新分布,拓宽了对北仑姬蛙地理和海拔分布范围的认识。北仑姬蛙新分布点与模式产地的直线距离约为 310 km,但在两个分布点间区域内未见北仑姬蛙分布的相关报道。因此,调查两个分布点间区域内是否有北仑姬蛙的分布,对于研究其自然历史和生物地理将提供基础生物学资料。本研究采集到的北仑姬蛙主要栖息于农田、池塘、水洼附近,白天隐匿在水域附近的草丛或阴湿的土洞、石穴内,夜晚栖息在草丛或岸边。4 至 6 月,雄蛙发出“嘎、嘎”的连续单一广告鸣声,鸣声时长范围为 0.248 ~ 0.331 s,主频范围为 1 750 ~ 2 412 Hz (Chen et al. 2020)。曾在北仑姬蛙生境中发现同属物种饰纹姬蛙和小弧斑姬蛙,以及泽陆蛙 (*Fejervarya multistriata*)、阔褶水蛙 (*Hylarana latouchii*)、弹琴蛙 (*Nidirana adenopleura*)和三港雨蛙 (*Hyla sanchiangensis*)等不同属物种。这些同域共栖的两栖动物具有何种生态适应机制有待进一步研究。

本研究中北仑姬蛙具有雌性个体大于雄性的两性异形模式,这不仅与该种模式产地物种的结果相同 (Zhang et al. 2018),而且与绝大多数无尾两栖动物类似 (Shine 1978)。这种模式可能是生育力选择的结果,即在繁殖期中雌性的能量投入较雄性多,故体型较大的雌性具有相对较高的生育力 (郑方东等 2018)。另一方面,小个体雄性优势假说推测小个体雄性具有较强的活动能力,使其在配偶搜索中更具优势,可获得更多的交配机会 (Blanckenhorn 2000),故性选择压力驱使雄性个体向小型化进化 (Zamudio 1998)。两栖动物成体个体大小与性成熟年龄有关 (Sarasola-Puerta et al. 2011, Cadeeddu et al. 2012)。然而,雄性性成熟时间通常较早,为获得更多的交配机会,其在生长发育中将更多的能量用于精子形成和求偶鸣叫,故限制了个体的发育 (Sarasola-Puerta et al. 2011, Cadeeddu et al. 2012)。同时,基于生态位分离假说,雌雄两性会在食性、栖息地选择

等方面发生生态位分化, 以避免性别间的种内竞争 (Shine 1989, Butler 2007), 从而会影响两性个体大小的进化, 导致两性异形产生 (Shine 1989, Butler 2007, 廖灏泓等 2013)。因此, 我们推测北仑姬蛙的两性异形可能是多种因素综合作用的结果, 尚待进一步去验证这些潜在影响两性异形的因素。

尽管北仑姬蛙九龙山种群的雌性 9 个局部形态特征的绝对值均大于雄性, 但在去除体长效应后, 仅显示出雄性前臂及手长明显大于雌性。在野外调查过程中发现, 抱对中的雄性北仑姬蛙常常面临雌性的反抗以及其他雄性的竞争, 因此具有较长前肢的雄蛙可增加抱对的牢靠程度, 从而提高自身的繁殖成功率 (贺佳飞等 2006, 刘鹏等 2013)。

## 参 考 文 献

- Blanckenhorn W U. 2000. The evolution of body size: what keeps organisms small? *The Quarterly Review of Biology*, 75(4): 385–407.
- Butler M A. 2007. Vive le difference! Sexual dimorphism and adaptive patterns in lizards of the genus *Anolis*. *Integrative and Comparative Biology*, 47(2): 272–284.
- Cadeeddu G, Giacoma C, Castellano S. 2012. Sexual size dimorphism in the Tyrrhenian tree frog: a life-history perspective. *Journal of Zoology*, 286(4): 285–292.
- Camargo A, DeSa R O, Heyer W R. 2006. Phylogenetic analyses of mtDNA sequences reveal three cryptic lineages in the widespread neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Anura, Leptodactylidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 87(2): 325–341.
- Chen Z Q, Lin Y F, Tang Y, et al. 2020. Acoustic divergence in advertisement calls among three sympatric *Microhyla* species from East China. *PeerJ*, 8: e8708.
- Ding G H, Tang Y, Lin Z H, et al. 2019. Mating pattern, female reproduction and sexual size dimorphism in a narrow-mouthed frog (*Microhyla fissipes*). *Animal Biology*, 69(2): 247–257.
- Faizi H, Pouyani R N, Rajabizadeh M, et al. 2010. Sexual dimorphism in *Trachylepis aurata transcaucasica* Chernov, 1926 (Reptilia: Scincidae) in the Zagros Mountains, western Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 6(1): 25–35.
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, et al. 2010. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 330(6010): 1503–1509.
- Howard R D. 1978. The evolution of mating strategies in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Evolution*, 32(4): 850–871.
- IUCN. 2016. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3.[DB/OL]. [2016-12-07]. <http://www.iucnredlist.org/>.
- Kon T, Yoshino T, Mukai T, et al. 2007. DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: A lesson from the gobioid fish *Schindleria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1): 53–62.
- Mace G M. 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 359(1444): 711–719.
- Sarasola-Puerta V, Gosá A, Oromí N, et al. 2011. Growth, size and age at maturity of the agile frog (*Rana dalmatina*) in an Iberian Peninsula population. *Journal of Zoology*, 114(3): 150–154.
- Shine R. 1978. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. *Oecologia*, 33(3): 269–277.
- Shine R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Quarterly Review of Biology*, 64(4): 419–461.
- Vieites D R, Wollenberg K C, Andreone F, et al. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(20): 8267–8272.
- Wake D B, Vredenburg V T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(Suppl 1): 11466–11473.
- Yan F, Lü J, Zhang B, et al. 2018. The Chinese giant salamander exemplifies the hidden extinction of cryptic species. *Current Biology*, 28(10): R590–R592.
- Zamudio K R. 1998. The evolution of female-biased sexual size dimorphism: A population-level comparative study in horned lizards (*Phrynosoma*). *Evolution*, 52(6): 1821–1833.
- Zhang M H, Fei L, Ye C Y, et al. 2018. A new species of genus

- Microhyla* (Amphibia: Anura: Microhylidae) from Zhejiang Province, China. *Asian Herpetological Research*, 9(3): 135–148.
- 陈旭, 张方, 陈潘, 等. 2013. 凹耳蛙的两性异形. *四川动物*, 32(1): 73–77.
- 陈智强, 王远飞, 樊晓丽, 等. 2018. 江苏宜兴发现凹耳臭蛙. *动物学杂志*, 53(6): 159–161.
- 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 2009. 中国动物志: 两栖纲 第二卷 无尾目. 北京: 科学出版社.
- 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.
- 宫铃, 师玉环. 2016. 忻州市花背蟾蜍两性异形研究. *教育教学论坛*, 41(49): 138–139.
- 贺佳飞, 周伟, 李明会, 等. 2006. 多疣狭口蛙的两性异形. *中南林学院学报*, 26(1): 77–81.
- 胡一中, 代亚如, 程岩岩, 等. 2015. 华南湍蛙的两性异形? *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 38(1): 23–27.
- 江建平, 谢锋, 臧春鑫, 等. 2016. 中国两栖动物受威胁现状评估. *生物多样性*, 24(5): 588–597.
- 李成, 谢锋, 车静, 等. 2017. 中国关键地区两栖爬行动物多样性监测与研究. *生物多样性*, 25(3): 246–254.
- 李春瑜, 洪美玲, 王力军, 等. 2013. 海陆蛙的两性异形和雌性繁殖特征. *动物学杂志*, 48(1): 16–21.
- 李殿伟, 郝婧玮, 金志民, 等. 2014. 中华蟾蜍两性异形研究. *牡丹江师范学院学报: 自然科学版*, 89(4): 35–37.
- 廖灏泓, 徐峰, 杨维康. 2013. 两栖爬行动物两性大小异形研究进展. *生态学杂志*, 32(11): 3082–3093.
- 林植华, 计翔. 2005. 浙江丽水虎纹蛙形态特征的两性异形和食性. *动物学研究*, 26(3): 255–262.
- 刘鹏, 刘恒, 张德成, 等. 2013. 东北林蛙的两性异形和抱对个体的形态相关性. *动物学杂志*, 48(2): 188–192.
- 路庆芳, 郑荣泉, 刘春涛, 等. 2008. 湖南平江棘胸蛙两性异形和雌性个体生育力. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 31(2): 220–224.
- 施林强, 张秀琴, 马小梅. 2011. 泽陆蛙(*Fejervarya limnocharis*)两性异形的个体发育和雌体繁殖. *生态学杂志*, 30(4): 717–723.
- 魏洁. 2016. 同域分布饰纹姬蛙和泽陆蛙的繁殖特征及其蝌蚪反捕食行为. 杭州: 杭州师范大学硕士学位论文, 22–30.
- 吴延庆, 陈巧尔, 陈智强, 等. 2019. 江西永丰发现长肢林蛙. *动物学杂志*, 54(3): 454–456.
- 郑方东, 王彦武, 刘西, 等. 2018. 黑眶蟾蜍的两性异形与选型配对模式. *动物学杂志*, 53(3): 360–367.
- 郑荣泉, 杜卫国, 寿鹿. 2002. 黑斑侧褶蛙的两性异形和雌性繁殖特征. *动物学杂志*, 37(4): 14–18.
- 中国两栖类. 2019. “中国两栖类”信息系统. 中国, 云南省, 昆明市: 中国科学院昆明动物研究所. [DB/OL]. [2019-11-01]. <http://www.amphibiachina.org/>.