

四川宜宾发现黔北角蟾

宋佳^① 梁福轩^① 毛雨垚^① 郑普阳^{③④⑤} 谢锋^④ 王刚^{①②*}

① 成都师范学院化学与生命科学学院 成都 611130; ② 成都师范学院化学与生命科学学院特色园艺生物资源开发与利用四川省高校重点实验室 成都 611130; ③ 中国科学院大学 北京 100049;
④ 中国科学院成都生物研究所 成都 610041; ⑤ 四川大学 成都 610064

摘要: 2021年7月在四川省宜宾市筠连县大雪山风景区乌岭沟东北(27°53' N, 104°45' E, 海拔1380 m)采集到2号角蟾科(Megophryidae)布角蟾属(*Boulenophrys*)物种标本(标本号: WG202107005和WG202107006)。通过形态学比较并基于线粒体16S rRNA和细胞色素氧化酶亚基I(COI)基因序列构建的最大似然树显示, 2号标本是黔北角蟾(*B. qianbeiensis*)。目前, 已知黔北角蟾分布于贵州省桐梓县黄连自然保护区和贵州省宽阔水国家级自然保护区, 此次在四川宜宾发现黔北角蟾确定为四川省两栖类分布新记录种。

关键词: 两栖类; 布角蟾属; 分布新记录种; 四川省

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 02-299-08

Boulenophrys qianbeiensis Found in Yibin, Sichuan, China

SONG Jia^① LIANG Fu-Xuan^① MAO Yu-Yao^① ZHENG Pu-Yang^{③④⑤}
XIE Feng^④ WANG Gang^{①②*}

① College of Chemistry and Life Sciences, Chengdu Normal University, Chengdu 611130; ② College of Chemistry and Life Sciences, Sichuan Provincial Key Laboratory for Development and Utilization of Characteristic Horticultural Biological Resources, Chengdu Normal University, Chengdu 611130; ③ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;
④ Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041; ⑤ Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: The genus *Boulenophrys* belongs to the family Megophryidae, Anura. This genus includes 56 species, and they are widely distributed in Sichuan, Guizhou, Zhejiang, Fujian, Jiangxi, Guangdong and other regions in China. Currently, 5 species of genus *Boulenophrys* have been recorded in Sichuan Province, including *B. binlingensis*, *B. minor*, *B. ombrophila*, *B. spinata* and *B. wushanensis*. In July 2021, two subadult amphibians were collected from Wulinggou, Daxueshan town (27°53' N, 104°45' E, 1380m) in the Daxueshan Scenic Area (Yibin City, Sichuan Province, China). The specimens were measured according to Fe et al.'s method (2001), and their mitochondrial 16S rRNA and COI genes were amplified and sequenced. We gathered

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32001114), 成都师范学院科研创新团队立项基金项目 (No. CSCXTD2020B11);

* 通讯作者, E-mail: wanggang8793@163.com;

第一作者介绍 宋佳, 女, 理学学士; 研究方向: 两栖爬行动物生态与保育; E-mail: 1729258700@qq.com.

收稿日期: 2022-01-10, 修回日期: 2023-01-12 DOI: 10.13859/j.cjz.202302014

all available 16S rRNA and *COI* sequences of the *Boulenophrys* genus and the corresponding sequences of *Brachytarsophrys carinense* from GenBank (Table 2), and used maximum likelihood method to build a phylogenetic tree of *Boulenophrys*. Genetic distances among species were measured using uncorrected *p*-distances calculated by MEGA 7. Through morphometric measurements (Table 1) and external morphological (Fig. 2) examination, the two specimens were found to be similar to *B. qianbeiensis*. Two mitochondrial 16S rRNA and *COI* gene sequences, length 1094 bp, were obtained. The phylogenetic tree of species in *Boulenophrys* showed that the two specimens were clustered with the type of *B. qianbeiensis* (Fig. 3). and the genetic distance of *COI* gene between the specimen and *B. qianbeiensis* was 0.000 - 0.004, whereas the genetic distance between the specimen and the *B. omeimontis* group was 0.038 - 0.113. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA and *COI* genes as well as morphological traits have supported the two specimens were *B. qianbeiensis*, which should be a new amphibian record of Sichuan Province. Previously, *B. qianbeiensis* was only found in Huanglian Nature Reserve and Kuankuoshui National Nature Reserve in Guizhou Province. Our discovery not only expanded the distribution range of *B. qianbeiensis*, but also provided important information for protection and evolutionary research of *B. qianbeiensis*.

Key words: Amphibian; *Boulenophrys*; New record; Sichuan Province

布角蟾属 (*Boulenophrys*) 隶属于无尾目 (Anura) 角蟾科 (Megophyidae), 目前中国已知报道 56 种, 是中国两栖类中物种种类最多的一个属, 广泛分布于我国四川、贵州、浙江、福建、江西、广东等地。四川省位于青藏高原东缘, 目前已记录布角蟾属物种 5 种, 分别为炳灵角蟾 (*B. binlingensis*)、小角蟾 (*B. minor*)、峨眉角蟾 (*B. ombrophila*)、棘指角蟾 (*B. spinata*) 和巫山角蟾 (*B. wushanensis*), 主要分布于四川省东部、东北部与西南部山区 (中国两栖类 2021)。一直以来, 角蟾属 (*Megophrys*) 的分类地位及其物种组成存在争议, 最新的分类系统恢复了布角蟾属 (原 *Panophrys* 属)、无耳蟾属 (*Atympanophrys*) 以及短腿蟾属 (*Brachytarsophrys*) 的有效性 (Qi et al. 2021, Frost 2022)。

2021 年 7 月于四川省宜宾市筠连县大雪山风景区内进行野外调查时, 在风景区内海拔 1 380 m 的溪流附近采集到 2 号角蟾科布角蟾属物种标本 (标本号: WG202107005 和 WG202107006)。通过形态比较以及基于线粒体 16S rRNA 和细胞色素氧化酶亚基 I (*COI*) 基因序列的最大似然法分子系统发育分析, 此

2 号标本确定为黔北角蟾 (*B. qianbeiensis*)。黔北角蟾隶属于无尾目角蟾科布角蟾属。该物种是 2020 年才被发现并描述的一个新物种, 目前已知仅分布于贵州省桐梓县黄连自然保护区和贵州省宽阔水国家级自然保护区 (Su et al. 2020)。此次于四川宜宾采集到黔北角蟾确定为四川省两栖类分布新记录种。

1 生境描述

标本采集于四川省宜宾市筠连县大雪山镇乌岭沟东北 (27°53' N, 104°45' E, 海拔 1 380 m)。采集地周围环境为竹子、灌木与落叶阔叶混交林, 微生境为积水坑边的岩石, 其上生长有草本植物, 有流水汇入积水坑 (图 1)。

2 形态描述

根据费梁等 (2001) 的测量方法, 对 2 号标本 (标本号: WG202107005 和 WG202107006, 图 2, 表 1) 进行了测量与记录。2 号标本均为亚成体, 头宽大于头长, 头部扁平; 吻部钝尖, 吻棱明显; 从腹侧看, 吻部超出下颚边缘; 眼较大, 眼径大于鼓膜径,



图 1 黔北角蟾生境

Fig. 1 Habitat of *Boulenophrys qianbeiensis*

a. 采集地微生境; b. 采集地周围环境。a. Collection microhabitat; b. Surrounding environment of acquisition site.



图 2 四川宜宾黔北角蟾 (WG202107005) 活体照

Fig. 2 *Boulenophrys qianbeiensis* (WG202107005) from Yibin, Sichuan

a. 体侧面; b. 体腹面。a. Lateral view; b. Ventral view.

表 1 四川宜宾黔北角蟾量度 (单位: mm)

Table 1 Measurements of *Boulenophrys qianbeisis*, Yibin, Sichuan (Unit: mm)

	标本号 Voucher Number			标本号 Voucher Number	
	WG202107005	WG202107006		WG202107005	WG202107006
体长 Snout-vent length, SVL	35.5	34.7	前臂及手长 Length of lower arm and hand, LAHL	17.3	16.5
头长 Head length, HL	10.5	10.4	前臂宽 Diameter of lower arm, LAD	2.7	2.5
头宽 Head width, HW	11.4	11.3	手长 Hand length, HAL	9.7	8.8
吻长 Snout length, SL	4.7	5.0	后肢长 Hindlimb length, HLL	62.8	61.1
鼻间距 Internasal space, INS	4.0	4.4	胫长 Tibia length, TL	19.1	18.5
眼间距 Interorbital space, IOS	4.6	4.1	胫宽 Tibia width, TW	3.4	4.0
上眼睑宽 Width of upper eyelid, UEW	3.0	2.9	跗足长 Length of foot and tarsus, LFT	27.1	25.4
眼径 Diameter of eye, ED	4.7	4.7	足长 Foot length, FL	18.0	17.1
鼓膜径 Diameter of tympanum, TD	2.7	2.3			

但小于吻长，鼓膜显著，呈椭圆形；鼻孔斜置，距吻端较眼近。前肢细长，前臂及手长约为体长的 1/2，指长顺序为 II < I < IV < III，指端呈小球状，指间无蹼，指关节下瘤显著，内、外掌突显著。后肢纤细，胫长大于足长，趾长顺序为 I < II < V < III < IV，趾尖呈圆形，稍扩张，趾间具 1/3 蹼，在每一趾基部关节下瘤不明显，内蹼突椭圆形，外蹼突缺失。背部皮肤较光滑，带有许多黑色小刺，背侧具有数个大小不等的疣粒。两上眼睑间有倒三角形的棕色斑纹；后肢腹面橘红色，大腿和胫部侧面及背面具有数个小疣粒。腹面光滑，呈灰白色，两侧有不规则状黑色斑纹，具有许多白色颗粒。

3 系统发育和遗传距离分析

分别取 2 号标本后肢股部肌肉组织，采用苯酚-氯仿提取法 (Sambrook et al. 1989) 提取其总 DNA。选取线粒体 16S rRNA 和细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 基因为目标片段进行 PCR 扩增和测序。16S rRNA 的扩增和测序用引物 P7 (5'-CGC CTG TTT ACC AAA AAC AT-3') 和 P8 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3') (Simon et al. 1994) 进行。COI 的扩增序列和测序用引物 Chmf4 (5'-TYT CWA CWA AYC AYA AAG AYA TCG G-3') 和 Chmr4 (5'-ACY TCR GGR TGR CCR AAR AAT CA-3') (Y: C/T, W: A/T, R: A/G) (Che et al. 2012) 进行。扩增条件为，95 °C 初始变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 52 °C (16S rRNA) / 47 °C (COI) 退火 40 s, 72 °C 延伸 70 s, 共 36 个循环。扩增产物交由擎科生物 (成都) 生物有限公司采用上海 DNA 生物技术有限公司 (中国上海) 的 ABI3730 自动 DNA 测序仪进行测序。所得序列经核查后上传到 GenBank (表 2)。

根据 Qi 等 (2021) 的相关研究, 从 GenBank 下载黔北角蟾所在峨眉角蟾种组 (*B.*

omeimontis group) 以及小角蟾种组 (*B. minor* group) 的可用序列数据进行分子分析, 所下载的黔北角蟾序列数据主要来自 Su 等 (2020) 的研究 (表 2)。根据 Chen 等 (2017) 的研究, 下载了宽头短腿蟾 (*Brachytarsophrys carinense*) 的相应序列 (表 2) 为外群用于系统发育分析。

使用 BioEdit v.7.0.9.0 (Hall 1999) 中的 ClustalW 模块, 以默认设置组装和比对序列。得到序列的峰图通过人工检查并在必要时手动修正。未测序的片段被定义为缺失的位点。

利用线粒体基因联合数据构建系统发育树。系统发育分析采用最大似然法 (maximum likelihood method, ML) 在 PhyML v.3.0 (Guindon et al. 2010) 中进行。为了避免参数化不足或过大 (McGuire et al. 2007), 使用 PARTITIONFINDER v.1.1.1 为每个分区选择了最佳分区方案和最佳进化模型 (Robert et al. 2012)。该分析定义了 16S rRNA 和 COI 基因, 并使用贝叶斯推理标准 (Bayesian information criterion, BIC)。分析结果表明, 最佳分区方案为 16S rRNA/COI 基因, 并选择 JC + I + G 模型作为所有分区的最佳模型。对于最大似然树, 分支支持率是从 10 000 个非参数引导复制中提取的。重复抽样数设置 100, 计算 Bootstrapping 时使用命令 --bootstop-perms = 1 000 - N 100。随后, 用 MEGA 7 (Kumar et al. 2016) 中未修正距离模型 (uncorrected *p*-distance) 计算物种间的遗传距离。

最终获得 2 条 16S rRNA + COI 碱基序列, 长度为 1 094 bp。重建的最大似然树显示, 该 2 号标本共同聚集为 1 支, 并且与黔北角蟾模式标本聚为 1 大支, 享有 97 的最大似然法自展值 (图 3)。本次采集于四川宜宾大雪山风景区的标本与黔北角蟾模式标本的 COI 基因遗传距离为 0.000 ~ 0.004, 与峨眉角蟾种组遗传距离为 0.038 ~ 0.113, 与小角蟾种组的遗传距离为 0.121 ~ 0.146, 支持于大雪山风景区采集的 2 号标本与模式产地黔北角蟾为同一物种。

表 2 本研究中使用物种个体的标本号、采集地及分子序列 GenBank 检索号
Table 2 Specimen ID, location and GenBank accession number of molecular samples used in this study

序号 ID	物种 Species	标本号 Voucher number	采集地 Locality	GenBank 检索号 Accession number	
				16S rRNA	COI
1	本研究 This study	WG202107005	中国四川宜宾大雪山风景区 Daxueshan Scenic Spot, Yibin, Sichuan, China	ON552245	ON565473
2		WG202107006		ON552246	ON565474
3		CIBTZ20190608015		MT651553	MT654520
4	黔北角蟾 <i>Boulenophrys qianbeiensis</i>	CIBTZ20190608017		MT651554	MT654521
5		CIBTZ20160715003	中国贵州黄莲自然保护区 Huanglian Nature Reserve, Guizhou, China	MT651555	MT654522
6		CIBKKS20180722002		MT651556	MT654523
7	桑植角蟾 <i>B. sangzhiensis</i>	CIBSZ2012062005	中国湖南八大公山自然保护区 Badagongshan Nature Reserve, Hunan, China	MT651558	MT654525
8		CIBSZ2012062008		MT651559	MT654526
9	棘指角蟾 <i>B. spinata</i>	CIBLS20190801001	中国贵州雷公山 Leigongshan, Guizhou, China	MT651551	MT654518
10		CIBLS20190801002		MT651552	MT654519
11	炳灵角蟾 <i>B. bilingensis</i>	KIZ025807	中国四川瓦屋山 Wawushan, Sichuan, China	KX811852	KX812115
12		SYSa005313		MH406892	MH406354
13	茵他依角蟾 <i>B. angka</i>	KIZ04059	泰国清迈茵他依国家公园 Kiew Mae Pan nature trail, Chiang Mai, Thailand	MN508052	
14	无量山角蟾 <i>B. wuliangshanensis</i>	KIZ046812	中国云南黄草岭 Huangcaoling, Yunnan, China	KX811881	KX812129
15	景东角蟾 <i>B. jingdongensis</i>	KIZ-LC0805067	中国云南黄草岭 Huangcaoling, Yunnan, China	KX811872	KX812131
16	大围角蟾 <i>B. daweiensis</i>	KIZ048997	中国云南大围山 Daweishan, Yunnan, China	KX811867	KX812125
17	宾川角蟾 <i>B. binchuanensis</i>	KIZ019441	中国云南鸡足山 Jizushan, Yunnan, China	KX811849	KX812112
18	粗皮角蟾 <i>B. palpebratespinosa</i>	KIZ011603	越南清和浦湖自然保护区 Pu Hu Nature Reserve, Thanh Hoa, Vietnam	KX811888	KX812137
19	峨眉角蟾 <i>B. omeimontis</i>	KIZ025765	中国四川峨眉山 Mountain E'mei, Sichuan, China	KX811884	KX812136
20	黄连角蟾 <i>B. hoanglienensis</i>	VNMN2018.02	越南萨帕镇老蔡村 Lao Cai, Sa Pa, Vietnam	MH514889	
21	番西邦角蟾 <i>B. fansipanensis</i>	VNMN2018.01	越南萨帕镇老蔡村 Lao Cai, Sa Pa, Vietnam	MH514886	
22	赤水角蟾 <i>B. chishuiensis</i>	CIBCS20190518031	中国贵州赤水自然保护区 Chishui Nature Reserve, Guizhou, China	MN954707	MN928958
23	江氏角蟾 <i>B. jiangi</i>	CIBKKS20180722006	中国贵州黄莲自然保护区 Kuankuosui Nature Reserve, Guizhou, China	MN107743	MN107748
24	小角蟾 <i>B. minor</i>	KIZ01939	中国四川青城山 Qingchengshan, Sichuan, China	KX811896	KX812145
25	宽头短腿蟾 <i>Brachyarsophrys carinense</i>	YPX20455	中国广西大瑶山 Dayaoshan, Guangxi, China	KX811811	KX812057

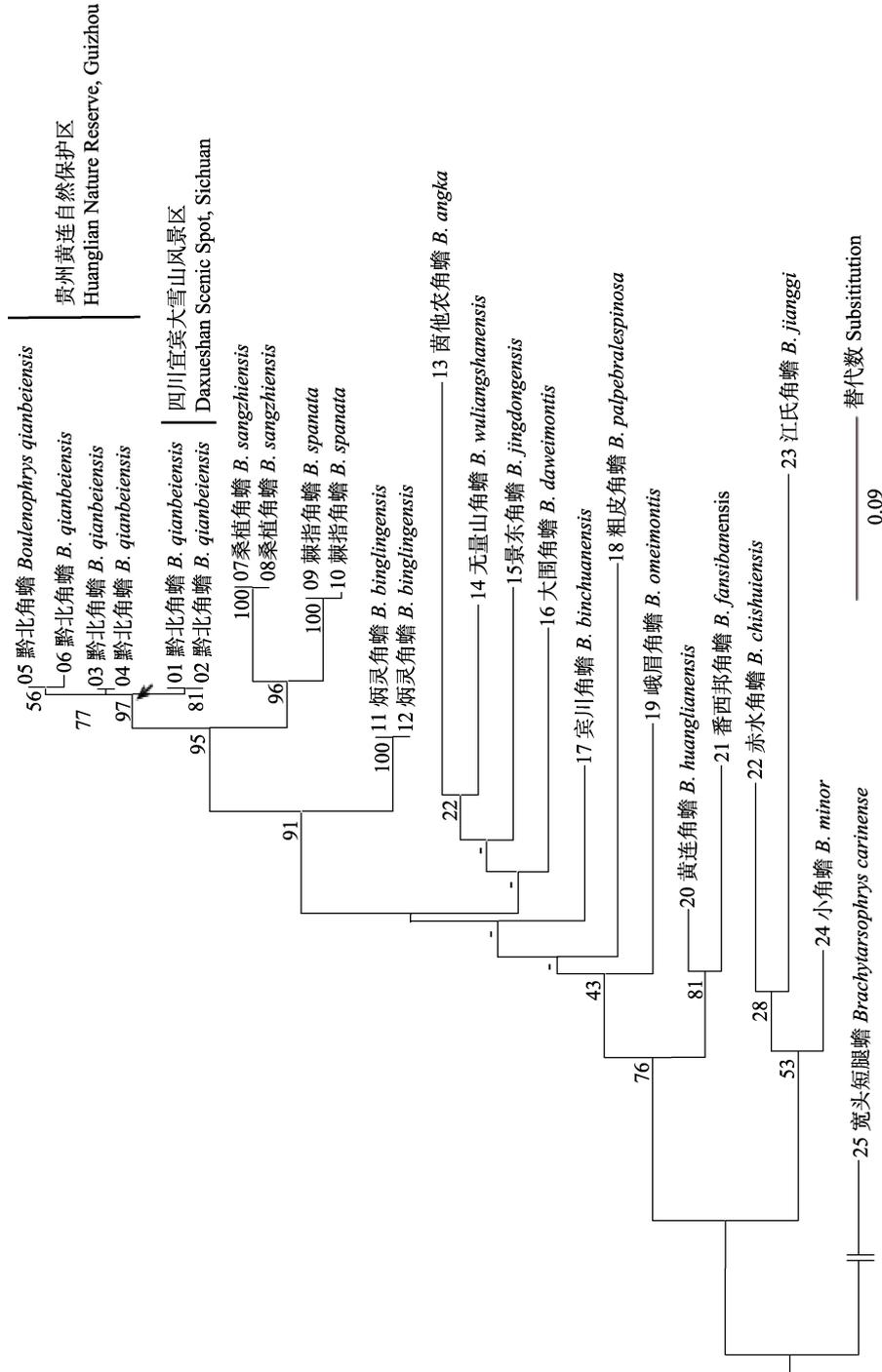


图 3 基于 16S rRNA 和 COI 基因序列重建布角蟾属的最大似然树
 Fig. 3 Maximum likelihood phylogenetic tree of genus *Boulenophrys* based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes

该系统发育树通过最大似然法 (ML) 构建, 每个节点处的数字为最大似然法自展值, 标尺表示每个点位上的替代数。
 The phylogenetic tree was constructed using maximum likelihood method (ML). The figures besides on each major node were ML bootstrap support. The scale bar represents the number of alternatives at each point.

4 讨论

根据最新的分类系统，角蟾科包括无耳蟾属、布角蟾属、短腿蟾属 (*Brachytarsophrys*)、掌突蟾属 (*Leptobrachella*)、拟髭蟾属 (*Ophryophryne*)、齿蟾属 (*Oreolalax*)、齿突蟾属 (*Scutigera*) 和异角蟾属 (*Xenophrys*) 这 8 个属，广泛分布于我国各地 (中国两栖类 2021)。近年来，随着分子生物学的发展，采用形态分析结合分子系统学分析鉴定物种的方法被广泛运用，对角蟾科物种的分布范围的认知也在逐渐扩大，许多角蟾科的新物种也陆续被发现并描述。

结合形态比较与分子系统发育分析，本次采自四川宜宾大雪山风景区 2 号布角蟾属标本均为黔北角蟾，是四川省两栖类分布新记录种。根据原始描述，黔北角蟾的主要鉴别特征有：体型强壮且适中 (雄性成体体长 49.3 ~ 58.2 mm)，犁骨棱显著，犁骨齿缺失；鼓膜显著，呈椭圆形；掌突 2 个且显著，指间无蹼，趾间具 1/3 蹼；成体雄性黔北角蟾第二性征为，具有单咽下内声囊，内侧 2 指基部背面具婚垫，婚刺黑色，较大而稀疏 (Su et al. 2020)。尽管此次在四川宜宾采集的黔北角蟾均为亚成体，并未采集到成体，第二性征并不明显，但仍然同样具有与模式标本便于鉴别的标志性特征。此前，黔北角蟾仅被发现分布于贵州省桐梓县黄连自然保护区、贵州省宽阔水国家级自然保护区 (Su et al. 2020)。此次在四川宜宾发现黔北角蟾不仅将黔北角蟾的分布范围向西延伸了 300 余千米，对黔北角蟾的保护和演化研究也具有重要意义。

致谢 感谢中国科学院成都生物研究所为本文提供的技术支持，以及石胜超老师为本文的撰写和系统发育分析方面提出的建议和帮助，同时也感谢课题组其他同学对野外考察提供的帮助。

参 考 文 献

Che J, Chen H M, Yang J X, et al. 2012. Universal COI primers for

DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12(2): 247–258.

Chen J M, Zhou W W, Poyarkov N A, et al. 2017. A novel multilocus phylogenetic estimation reveals unrecognized diversity in Asian horned toads genus *Megophrys sensu lato* (Anura: Megophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106: 28–43.

Frost D R. 2022. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 6.1. [DB/OL]. [2022-03-04]. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>

Guindon S, Dufayard J, Lefort V, et al. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3): 307–321.

Hall T A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41): 95–98.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets 68. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.

McGuire J A, Witt C C, Altshuler D L, et al. 2007. Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Systematic Biology*, 56(5): 837–856.

Qi S, Lyu Z T, Wang J, et al. 2021. Three new species of the genus *Boulenophrys* (Anura, Megophryidae) from southern China. *Zootaxa*, 5072(5): 401–438.

Robert L, Brett C, Simon Y W H, et al. 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(6): 1695–1701.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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.

Su H J, Shi S C, Wu Y Q, et al. 2020. Description of a new horned

toad of *Megophrys* Kuhl & Van Hasselt, 1822 (Anura, Megophryidae) from southwest China. *ZooKeys*, 974(1986): 131-159.

费梁, 叶昌媛. 2001. 四川两栖类原色图鉴. 北京: 中国林业出

版社.

中国两栖类. 2021. “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. [EB/OL]. [2021-09-10]. [http:// www.amphibiachina.org/](http://www.amphibiachina.org/).