DOI: 10.13859/j.cjz.201403016

青海省发现两栖纲小鲵科无斑山溪鲵

丁义晶[①] 王贵虎[①] 陈振宁[①] 石长宏[②] 马永贵[①] 许升全[①*]

① 陕西师范大学动物研究所 西安 710062; ② 青海省玛柯河农业局 果洛藏族自治州 814300

摘要: 2012 年 8 月, 在青海省果洛藏族自治州班玛县采集到小鲵科山溪鲵属标本 2 尾, 经形态鉴定并和山溪鲵属近缘种进行线粒体 Cyt *b* 及 CO Ⅰ 基因序列比较分析, 鉴定为无斑山溪鲵(*Batrachuperus karlschmidti*), 为该物种在青海省内首次发现。

关键词:两栖纲; 小鲵科; 无斑山溪鲵; 新纪录; 青海省

中图分类号:Q959 **文献标识码**:A **文章编号**:0250-3263(2014)03-428-04

Batrachuperus karlschmidti (Amphibian Hynobiidae) Was Found in Qinghai Province

DING Yi-Jing[①] WANG Gui-Hu[①] CHEN Zhen-Ning[①] SHI Chang-Hong[②]
MA Yong-Gui[①] XU Sheng-Quan[①*]

① *Institute of Zoology, Shaanxi Normal University, Xi'an* 710062; ② *Qinghai Makehe Agricultural Bureau, Golog Tibetan Autonomous Prefecture* 814300, *China*

Abstract: This study applied morphological characters and DNA sequence data to identify the two specimens of *Batrachuperus* collected from Banma County, Golog Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province in August, 2012. Two mitochondrial genes Cyt *b* (754 bp) and CO Ⅰ (582 bp) of the two specimens were sequenced and the sequences of four related *Batrachuperus* species: *B. karlschmidti*, *B. pinchonii*, *B. tibetanus* and *B. londongensis* were downloaded from GenBank. The maximum-parsimony (MP) and maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees of these *Batrachuperus* species were constructed according to Cyt *b* and CO Ⅰ genes with outgroups *Liua tsinpaensis* and *L. shihi*. The phylogenetic trees show that: the sequences of the two specimens and three known sequences of *B. karlschmidti* form a high supported clade. Based on the phylogenetic trees and the morphological characters (the body without marble mark, the labial folds well developed and measurements of type), the two specimens were identified as *B. karlschmidti*, which is found from Qinghai Province for the first time.

Key words: Amphibia; Hynobiidae; *Batrachuperus karlschmidti*; New record; Qinghai Province

无斑山溪鲵(*Batrachuperus karlschmidti*)(两栖纲:有尾目:小鲵科:山溪鲵属)是刘承钊 1950 年根据四川炉霍标本发表命名的新种(Liu 1950)。早期的研究中许多学者对其有效性进行了探讨(赵尔宓等 1986, 赵尔宓 1990, 费梁等 1999, 2006)。Fu 等(2008)基于细胞色素 b 和同工酶技术对山溪鲵属物种界定进行

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 31372250), 陕西师范大学研究生培养创新基金项目(No. 2012CXS053), 陕西省科学院重点项目(No. 2012k-01), 中央高校基础科研业务费资助项目(No. GK201302053);

* 通讯作者, E-mail: xushengquan@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 丁义晶, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生动物学; E-mail: dyj.3668@163.com。

收稿日期: 2013-09-09, 修回日期: 2014-01-18

研究，显示无斑山溪鲵为有效种。Lu 等(2012)利用溯祖方法对生活在青藏高原东缘山区的山溪鲵属 5 个物种进行了谱系地理学研究，支持无斑山溪鲵物种的有效性。目前，无斑山溪鲵已知分布于四川康定、新龙、白玉、炉霍、色达、壤塘、理塘、雅江、木里和云南宁蒗(赵尔宓等 1986，费梁等 2006，Fu et al. 2008，Lu et al. 2012，Frost 2013)。青海省尚未报道有无斑山溪鲵分布。

2012 年 8 月在青海省果洛藏族自治州班玛县玛柯河乡考察时，采集到小鲵科山溪鲵属标本 2 尾，经形态鉴定并利用线粒体 Cyt *b* 及 CO Ⅰ 基因序列与山溪鲵属近缘种进行比较分析，鉴定为无斑山溪鲵，系青海省首次发现该物种。标本保存于陕西师范大学生命科学学院动物研究所标本室。

1　形态特征

标本信息:成体，1♀(标本编号 AH1)、1♂(标本编号 AH2)。采集地:青海省果洛藏族自治州班玛县玛柯河乡(33°05′19″N，100°28′59″E，海拔 3 800 m)。采集时间:2012 年 8 月 15 日。

个体头部扁平，头长大于头宽。躯干肥大近圆柱状，而背腹略扁。唇褶发达，眼长比前眼角到鼻孔距离长，眼间隔平坦，口角位于眼后角下方；咽喉部的肤褶延伸至背部侧面，从上部可看到；舌小，可伸长，两侧缘游离；犁骨齿列两小团，每侧 4～6 枚，位于内鼻孔之间，左右间距宽约 1 个齿列。四肢短，前肢略短于后肢，且较后肢细；指、趾略宽扁，末端钝圆，基部无蹼；贴体相对时，指、趾端距离大于两个肋沟；指 4 个，指长顺序为 2、3、4、1，趾 4 个，趾长顺序为 3、2、4、1；掌蹠部有棕色角质被覆物。尾长略长于头体长；尾高约为头体长的1/9；尾肌发达，背鳍褶起自近尾基部，腹鳍褶起于近尾末端。皮肤光滑，侧肋沟 12～13 条，尾部肌节间有浅沟。

生活时背面黑褐色，体表无斑点和条纹。各形态特征的测量值见表 1。标本的测量和描述及各部分结构名称依据文献(费梁等 2006)。

2　基于 Cyt *b* 和 CO Ⅰ 基因序列的物种鉴定

将采集到的 2 尾标本麻醉处死后，常温保存于无水乙醇。取肝和骨骼肌组织超低温保存用于 DNA 提取。使用基因组 DNA 试剂盒提取总 DNA，采用 Cyt *b* 引物(Moritz 1992)(Cyt *b*-

表 1　无斑山溪鲵成体的量度值(单位:mm)

Table 1　Measurements of adults of *Batrachuperus karlschmidti* (Unit:mm)

	AH1♀		AH2♂	
	测量值 Measurements	比例(%) Percentage	测量值 Measurements	比例(%) Percentage
全长 Total length	174.69		188.44	
头体长 Snout-vent length	82.77		94.19	
头长 Head length	24.86	30.04	24.98	26.52
头宽 Head width	14.79	17.87	15.65	16.62
头高 Head height	9.29	11.22	11.03	11.71
眼间距 Interorbital space	5.32	6.43	4.97	5.28
眼径 Diameter of eye	4.81	5.81	5.02	5.33
尾长 Tail length	91.92	111.05	94.25	100.06
尾宽 Tail width	8.29	10.02	9.39	9.97
尾高 Tail height	12.42	15.01	11.57	12.28
前肢长 Length of foreleg	19.26	23.27	22.04	23.40
后肢长 Length of hind leg	22.86	27.62	24.99	26.53

比例为各量度与头体长之比。Percentage are the ratios of measurements to snout-vent length.

L:5′-CGA AAA ACC CAC CCA TTA TT-3′, Cyt *b*-H:5′-GCA AAT AGA AAA TAC CAC TCC G-3′)和 COⅠ引物(Xia et al. 2012)(COⅠ-L:5′-TTT CAA CWA ATC ATA AAG ATA TTG-3′(W 为兼并碱基，代表 A 或 T)，COⅠ-H:5′-ATG AGA AAT TAT TCC AAA TCC TGG-3′)扩增线粒体 Cyt *b* 754 bp 和 COⅠ 582 bp 基因片段序列。PCR 扩增产物由上海生工生物公司进行 DNA 纯化和双向测序；利用 SeqMan 软件进行拼接和校正，并在 GenBank 中进行 BLAST 搜索比对，确保序列数据的可靠性。从 GenBank 下载了无斑山溪鲵、山溪鲵(*B. pinchonii*)、北方山溪鲵(*B. tibetanus*)、龙洞山溪鲵(*B. londongensis*)这几个近缘种的 Cyt *b* 754 bp 和 COⅠ848 bp 基因片段序列，并选择秦巴巴鲵(*Liua tsinpaensis*)和施氏巴鲵(*L. shihi*)为外群(表 2)。使用 PAUP Version 4.0 (Swofford 2003)软件，运用最大简约法(maximum parsimony, MP)、最大似然法(maximum likelihood, ML)分别构建了所选物种的 Cyt *b* 和 COⅠ基因序列系统发育树。构建系统发育树所有的核苷酸位点被等权(unweighted)和无序(unordered character)处理。用 jModeltest 3.7 (Posada 2008)软件，使用 Akaike 信息标准(Akaike information criterion, AIC)选择出 Cyt *b* 和 COⅠ基因最适核苷酸替换模型分别为 TVM+G 与 K81uf+I+G，用于最大似然法构建系统发育树。

基于 MP、ML 法对 Cyt *b* 和 COⅠ基因序列分别构建系统发育树(图 1)。两个基因、两种方法所构建的系统发育树表明，本研究的 2 尾标本与已知的 3 个无斑山溪鲵亲缘关系最近，

表 2 样本信息及部分 GenBank 分子序列数据信息

Table 2 Information of samples and DNA sequences for this study

样品种名及编号 Samples and number	样品采集地 Sampling location	Cyt *b* 序列号 Accession	COⅠ序列号 Accession	来源 Reference
无斑山溪鲵 *Batrachuperus karlschmidti* AH1	青海省班玛县	KF748916	KF748918	本研究 This study
无斑山溪鲵 *B. karlschmidti* AH2	青海省班玛县	KF748917	KF748919	本研究 This study
山溪鲵 1 *B. pinchonii* 1	四川省宝兴县	EU296279	JQ304149	GenBank
山溪鲵 2 *B. pinchonii* 2	四川省越西县	EU296267	JQ304135	GenBank
山溪鲵 3 *B. pinchonii* 3	四川省大邑县	EU296280	JQ304142	GenBank
北方山溪鲵 1 *B. tibetanus* 1	甘肃省西和县	EU296359	JN165794	GenBank
北方山溪鲵 2 *B. tibetanus* 2	甘肃省临夏县	EU296355	JN165796	GenBank
北方山溪鲵 3 *B. tibetanus* 3	四川省九寨沟	EU296375	JN165798	GenBank
无斑山溪鲵 1 *B. karlschmidti* 1	四川省康定县	EU296321	JQ304080	GenBank
无斑山溪鲵 2 *B. karlschmidti* 2	四川省炉霍县	EU296318	JQ304053	GenBank
无斑山溪鲵 3 *B. karlschmidti* 3	四川省雅江县	EU296327	JN165792	GenBank
龙洞山溪鲵 1 *B. londongensis* 1	四川省峨眉山	EU296388	JQ304103	GenBank
龙洞山溪鲵 2 *B. londongensis* 2	四川省汉源县	EU296394	JQ304115	GenBank
龙洞山溪鲵 3 *B. londongensis* 3	四川省洪雅县	EU296388	JQ304101	GenBank
施氏巴鲵 *Liua shihi*	湖北省巴东县	DQ333810	DQ333810	GenBank
秦巴巴鲵 *L. tsinpaensis*	陕西省周至县	DQ333813	DQ333813	GenBank

图 1　基于线粒体 DNA Cyt *b* 和 CO Ⅰ 基因部分序列构建山溪鲵属部分种类系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic trees of some *Batrachuperus* species based on mtDNA Cyt *b* and CO Ⅰ gene sequences

节点上的数字为内部分支检验置信度值，最大简约树/最大似然树。

Nodal values indicate bootstrap supports for MP and ML inferences MP tree/ML tree (all 1 000 replicates).

构成一个大的分支，并具有很高的支持度；这一分支进而与山溪鲵、北方山溪鲵、龙洞山溪鲵构成了山溪鲵属分支。Cyt *b* 和 CO Ⅰ 基因的分析结果都支持形态学鉴定结果，即班玛县的 2 尾山溪鲵标本为无斑山溪鲵。

3　结　论

本研究从形态和分子两方面对采自青海省班玛县玛柯河乡的山溪鲵属标本进行了物种鉴定，形态鉴定和系统发育分析都支持所获标本为无斑山溪鲵，此为青海省的首次报道。

参　考　文　献

Frost D R. 2013. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 5.6. New York, USA: American Museum of Natural History. [BD/OL] [2013-07-09]. http://research. amnh. org/herpetology/amphibia/index. html.

Fu J Z, Zeng X M. 2008. How many species are in the genus *Batrachuperus*? A phylogeographical analysis of the stream salamanders (family Hynobiidae) from Southwestern China. Molecular Ecology, 17(6): 1469 – 1488.

Liu C C. 1950. Amphibians of western China // Fieldiana: Zoology Memoirs vol. 2. Chicago: Chicago Natural History Museum, 1 – 400.

Lu B, Zheng Y C, Murphy R W, et al. 2012. Coalescence patterns of endemic Tibetan species of stream salamanders (Hynobiidae: *Batrachuperus*). Molecular Ecology, 21(13): 3308 – 3324.

Moritz C, Schneider C J, Wake D B. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. Systematics Biology, 41(3): 273 – 291.

Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution, 25(7): 1253 – 1256.

Swofford D L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. [BD/OL] [2013-07-09]. http://www. citeulike. org/group/1390/article/768473.

Xia Y, Gu H F, Peng R, et al. 2012. CO Ⅰ is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). Molecular Ecology Resources, 12(1): 48 – 56.

费梁，胡淑琴，叶昌媛，等. 2006. 中国动物志：两栖纲 上卷. 北京：科学出版社，206 – 218.

费梁，叶昌媛，黄永昭，等. 1999. 中国两栖动物图鉴. 郑州：河南科学技术出版社，316 – 317.

赵尔宓. 1990. 我国有尾类分类学中的几个问题及其名录 // 赵尔宓. 从水到陆——刘承钊教授诞辰九十周年纪念文集. 北京：中国林业出版社，217 – 220.

赵尔宓，江耀明. 1986. 山溪鲵属的分类与分布. 青藏高原研究. 横断山考察专集(一). 昆明：云南人民出版社，293 – 298.