

中国德氏瘰螈形态、分子系统分析和生境描述

魏平凡^① 刘小龙^① 温汉华^② 张贵良^③ 王剑^{④*} 袁智勇^{①*}

① 西南林业大学, 云南省高校极小种群野生动物保育重点实验室 昆明 650224; ② 东莞市银瓶山森林公园 东莞 523000;

③ 河口瑶族自治县林业和草原局 河口 661300; ④ 红河学院生命科学与技术学院 蒙自 661199

摘要: 中越边境地区是全球生物多样性的热点地区, 近年来不断有新种、分布新记录种报道。2017年, 学者首次报道了德氏瘰螈 (*Paramesotriton deloustali* Bourret, 1934) 在中国的分布, 但仅描述了其线粒体全序列, 缺乏其他生物学信息。本研究于2013年在云南省红河州哈尼族彝族自治州河口县境内大围山保护区 (22°37' N, 103°52' E, 海拔 350 m) 采集到6号标本应为德氏瘰螈, 包括雄性成体标本4号和雌性成体标本2号, 对其形态和生境特征进行了详细描述。此次采集标本与模式标本系列形态吻合。基于细胞色素c氧化酶亚基I (COI) 基因的系统发育分析结果显示, 河口大围山德氏瘰螈种群与模式产地 (越南北部永福省三岛“Tam Dao, Vinh Phuc Province”风景区) 种群间的遗传分化较小 (p-distance 为0.6%), 与2017年所报道的云南标本聚为一支 (p-distance 为0.5%)。德氏瘰螈目前仅记录于中越边境地区, 分布地极为狭窄, 种群数量未知。为了更好地了解和保护包括该物种在内的中越边境生物多样性, 建议两国学者进行更多的合作研究。

关键词: 中越边境; 瘰螈属; 云南省; 两栖动物; 大围山

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 04-617-07

Morphology, Molecular Phylogenetics, and Habitat of *Paramesotriton deloustali* (Bourret, 1934) in Yunnan, China

WEI Ping-Fan^① LIU Xiao-Long^① WEN Han-Hua^② ZHANG Gui-Liang^③
WANG Jian^{④*} YUAN Zhi-Yong^{①*}

① Key Laboratory for Conserving Wildlife with Small Populations in Yunnan, Southwest Forestry University, Kunming 650224;

② Dongguan Yinpingshan Forestry Park, Dongguan 523000; ③ Forestry and Grassland Administration of Yao Autonomous County

of Hekou, Hekou 661300; ④ College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi 661199, China

Abstract: The China-Vietnam border region is a well-known biodiversity hotspot, harboring a striking diversity of species and endemism. New species and new records have been reported on both sides of the

基金项目 云南省基础研究计划 (专项) 优秀青年项目 (No. 202001AW070016), 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (No. 202005AC160046), 中国科协青年人才托举工程项目 (No. 2019-2021QNRC001), 生态环境部生物多样性调查、观测和评估项目 (No. 2019-2023年), 第二次青藏高原综合科学考察研究项目 (No. 2019QZKK0501);

* 通讯作者, E-mail: yuanzhiyongkiz@126.com, jianchihu@126.com;

第一作者介绍 魏平凡, 女, 硕士研究生; 研究方向: 两栖动物多样性与保育; E-mail: wpt2973@163.com.

收稿日期: 2020-12-24, 修回日期: 2021-05-05 DOI: 10.13859/j.cjz.202104014

border in recent years. Although *Paramesotriton deloustali* was first recorded in China in 2017, only the complete mitochondrial sequence was provided, and no other information was available, including its detailed distribution in China and morphological characteristics. Here we describe *P. deloustali* from China based on six newly collected specimens (four males and two females) from Dawishan Reserve (22°37' N, 103°52' E, altitude 350 m) in Hekou County, Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture, Yunnan Province (Table 1). The morphological characters of the Chinese specimens align closely with the type series from Vietnam (Fig. 1, 2), and the phylogenetic analyses based on the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene revealed a low genetic differentiation (p-distance is 0.6%) between Chinese population and those from its type locality at Tam Dao, Vinh Phuc Province, northern Vietnam. Additionally, our newly collected specimens have low genetic divergence (p-distance is 0.5%) from the sequences of the former record in Yunnan (Fig. 3). *P. deloustali* is currently recorded in the China-Vietnam border area only, and it is found in a narrow area with unknown population size and trends. We recommend further international collaboration between China and Vietnam to understand the distribution and conservation situation of this species better.

Key words: China-Vietnam border; *Paramesotriton*; Yunnan Province; Amphibians; Dawishan Reserve

生物类群的准确鉴定和详细的形态描述是研究生物学问题的基础，也是制定物种和生物多样性保护策略的前提。中越边境地区属于著名的全球生物多样性热点区域——印缅地区 (Myers et al. 2000, Clements et al. 2006)，分布有大量的特有种，多样性极为丰富。然而，由于国界以及交通的限制，对该区域中大部分地区的野外考察仍然很薄弱，甚至在某些地区仍是空白。近年来随着野外考察的不断深入，每年陆续有新种或分布新记录种在该区域被发现 (Jiang et al. 2017, Ren et al. 2018, Wang et al. 2018, Yuan et al. 2019)，其中就包括了原先仅记录于越南北部、模式产地位于永福省 (Vinh Phuc) 三岛 (Tam Dao) 的德氏瘰螈 (*Paramesotriton deloustali*) (Bourret et al. 1934)。

Zhang 等 (2017) 基于采自中国的样本发表了德氏瘰螈的线粒体全序列，并首次报道了该种在中国的分布记录。德氏瘰螈隶属于两栖纲 (Amphibia) 有尾目 (Caudata) 蝾螈科 (Salamandridae) 瘰螈属 (Frost 2020)。Zhang 等 (2017) 对该物种的其他生物学信息未做任何描述。至今，仍没有任何关于中国的德氏瘰螈形态、生境和自然生活史的资料，并且对于

该种在云南的具体分布地和分布范围尚不清楚。以上相关基础信息的缺乏，对该物种的濒危等级评估和保护都产生了巨大的限制。

本研究于 2013 年在云南省红河州哈尼族彝族自治州 (简称：红河州) 进行两栖动物考察和监测期间，采集到德氏瘰螈 6 号标本，在此对该物种的形态特征以及生境特征进行详细描述，以期能为将来的保护和研究工作提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 标本采集、物种鉴定和形态测量

2013 年 10 月 3 日，在红河州河口县境内大围山国家级自然保护区 (22°37' N, 103°52' E, 海拔 350 m) 采集到有尾类两栖动物雄性成体标本 4 尾和雌性 2 尾。取肌肉样品储存在 95% 乙醇中，整体标本固定保存于 75% 乙醇中。固定标本现分别保存于西南林业大学和红河学院。

物种鉴定结合形态数据和系统演化分析结果。其中，形态数据参考德氏瘰螈原始描述 (Bourret et al. 1934) 及越南相关描述文献 (Sparreboom 2014)。形态特征和测量方法参考 Yuan 等 (2014)，使用游标卡尺测量所采集

6 号德氏瘰螈标本相应形态指标，包括全长、头体长、尾长、头长、头宽、鼻眼距、鼻间距、腋胯长、尾高、前肢长、后肢长、眼间距、眼径和吻长。

1.2 系统发育关系重建

采用常规酚/氯仿抽提方法从大围山保护区采集到的 1 尾德氏瘰螈雄性样本（标本号 HU2013101）肌肉组织中提取基因组 DNA，然后使用分光光度计（Thermo Scientific NanoDrop 2000）检测 DNA 的量和浓度，-20 °C 保存。

引物使用 Chmr 4 和 Chmf 4 (Che et al. 2011)，扩增样本线粒体 COI 基因片段。在 25 μ l 的体系中进行标准的聚合酶链式反应（PCR）扩增，扩增条件为，94 °C 变性 5 min；94 °C 变性 1 min，46 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min，35 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。整个反应完成后 4 °C 保存。PCR 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳检测。最后送到北京擎科生物科技有限公司对产物进行双向测序。

所得的序列使用 DNASTAR LASERGENE 7.0 软件包 (Burland 2000) 中的 SeqMan 进行质量检测并人工校对，生成一致序列。所得的全部一致性序列在 Clustal X 1.81 (Thompson et al. 1997) 中使用默认参数进行比对，之后使用 MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011) 编辑比对结果。使用 DNAsp 5.10 (Librado et al. 2009) 划分所得序列单倍型。

考虑到本研究所采集到的瘰螈标本形态上与德氏瘰螈最为接近，我们从 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载了 7 条已发表的 COI 序列进行对比分析，包括模式产地 (JJQ0102C04 ~ JJQ0102C07) 和中国云南记录产地的德氏瘰螈 (KY744236) 以及广西瘰螈 (*P. guanxiensis*, JN700851) 和富钟瘰螈 (*P. fuzhongensis*, JN700852)。本研究同时使用了贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 和最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建系统发育树。用 JModelTest 0.1.1 (Posada 2008) 计算

最佳替换模型。贝叶斯分析由 MrBayes 3.2 软件 (Ronquist et al. 2003) 完成，具体步骤和参数设置为，贝叶斯核苷酸的替换模型为 GTR 模型，位点间变异速率分布为 gamma，使用 4 条马尔科夫链，起始状态随机，每次运算 2 000 万代，并每 1 000 代进行一次抽样。基于收敛的情况，前 25% 代数舍弃掉。并通过 Tracer v1.5 (Drummond et al. 2007) 中的有效样本量 (Effective sample size, ESS) 值 (> 200) 判断结果是否收敛。另外，使用 RaxML (Stamatakis et al. 2008) 构建最大似然树，自展重抽样 1 000 次估计节点支持率，分子进化模型为 GTR + I 模型。该分析在 CIPRES Science Gateway v3.1 (Miller et al. 2010) 中完成。

使用软件 MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011) 中的 Kimura 双参数模型计算本研究采集的瘰螈种群与模式产地的德氏瘰螈以及广西瘰螈和富钟瘰螈之间的遗传距离。使用 P-distance 模型，默认其他参数的设定进行计算。

2 结果

2.1 外部形态特征

固定标本各部位度量数据见表 1。德氏瘰螈体型较大且肥硕，雄性全长 118.4 ~ 154.4 mm，雌性全长 168.0 和 184.9 mm。

头部平扁略呈三角形，头长大于头宽。吻长于眼径，吻端平截，突出于下唇前方，吻棱较明显。眼棕黄色，黑色虹彩横贯。鼻孔位于吻端外侧。口裂超过眼后角甚多，唇褶发达。无凶门，犁骨齿列 Δ 形。

四肢长度大致相等，后肢略比前肢粗壮 (图 1)。前肢向前贴头侧，指端达眼中部；前后肢贴体相对时，指、趾端彼此相触。指 4 个，指长顺序 I < V < II < III；趾 5 个，趾长顺序 I < IV < II < V < III；第一指、趾均甚短小。指、趾末端钝圆，无缘膜，无蹼 (图 2)。

雄性肛部肥厚隆起，肛孔纵长，肛裂内壁有多层指状乳突。雌性肛部不肥厚隆起，肛孔短，亦无指状乳突。尾扁薄、高，基部粗，向

表 1 大围山国家级自然保护区所采德氏瘰螈标本形态量度 (mm)

Table 1 Measurements of the Chinese specimens of *Paramesotriton deloustali* from Daweishan National Nature Reserve, Yunnan Province (all measurements are in the unit of mm)

	标本编号 Voucher number					
	SWFU 18981 ♂	SWFU 18982 ♂	SWFU 18983 ♀	HU 2013101 ♂	HU 2013102 ♂	HU 2013103 ♀
全长 Total length, TTL	154.4	118.4	168.0	163.0	151.5	184.9
头体长 Snout-vent length, SVL	85.8	84.3	92.8	78.2	82.5	96.8
尾长 Tail length, TAL	68.6	34.1	75.2	84.8	69.1	88.1
头长 Head length, HDL	26.4	24.5	26.9	24.7	24.2	22.3
头宽 Head width, HDW	19.9	18.8	21.8	17.9	18.9	21.8
鼻眼距 Orbitonarial distance, OND	7.7	6.1	7.1	7.3	7.5	8.2
鼻间距 Internarial distance, IND	7.2	5.8	7.2	6.1	6.8	6.1
腋臂长 Gleno-acetabular distance, GAD	42.6	36.6	45.1	42.4	40.6	50.0
尾高 Maximum tail depth, TAD	16.3	13.8	16.2	15.2	17.6	15.1
前肢长 Forelimb length, FLL	22.8	20.5	25.5	25.6	25.2	26.9
后肢长 Hindlimb length, HLL	26.1	25.1	23.4	27.5	28.2	26.4
眼间距 Interocular distance, ICD	7.3	5.7	9.1	11.8	11.5	12.3
眼径 Diameter of eye, ED	5.9	5.2	7.6	5.6	5.7	5.9
吻长 Orbitorostral distance, ORD	8.9	8.1	8.6	10.3	10.3	8.0

SWFU. 西南林业大学; HU. 红河学院。SWFU. Southwest Forestry University; HU. Honghe University.

后渐趋扁薄, 近尾端部几成薄片状 (图 1)。

皮肤粗糙, 背、侧面均散有大小不一的痣粒, 颈部和躯干部的痣粒较为粗大、密集。头侧有腺质棱脊, 背中央有明显棱脊, 背脊与枕部 V 型隆起相连, 向后延伸到尾背。体背两侧疣粒大, 排列成纵行, 前与头侧棱脊相连, 后延至尾侧中央。颈褶明显。躯干和尾部有不规则的横沟纹。咽胸部和腹部有扁平疣 (图 1)。

生活时, 整体背、侧面为棕褐色。咽喉、腹面底色黑灰色, 具不规则的橘红色大斑, 部分斑块内夹带少数黑色斑点。尾腹缘前 3/4 段红色, 尾后半部上下叶泛暗红色。体侧和尾侧少数疣粒红色 (图 1)。

2.2 系统发育关系重建

本研究新获得一条长度为 594 bp 的 COI 序列 (GenBank 号: MW692165), 共 121 个简约信息位点, 135 个碱基变异位点。贝叶斯法和最大似然法得到的系统发育树具有相似的拓扑结构, 这里只展示贝叶斯树 (图 3)。本研究所采德氏瘰螈标本与德氏瘰螈模式产地 (越南

北部永福) 标本以及中国云南新记录产地 (云南) 标本相聚, 构成显著支持的单系 (BI 支持率 1.0, 图 3)。遗传距离分析结果显示, 来自于云南大围山的瘰螈种群与广西瘰螈和富钟瘰螈具有较大的遗传分化, *p-distance* 分别为 5.1% 和 6.3%, 但与越南模式产地的德氏瘰螈分化非常小, *p-distance* 仅为 0.5%。综合形态学对比, 该结果表明, 来自云南大围山国家级自然保护区的瘰螈种群为德氏瘰螈。本研究所采集的德氏瘰螈标本与 Zhang 等 (2017) 首次在中国云南采集到的样本 COI 基因的遗传分化 (*p-distance*) 为 0.5%, 两者遗传差异较小。

3 生态与保护

德氏瘰螈仅见于河口县大围山国家级保护区海拔 300 ~ 800 m 的数条溪流及水田边的沟渠 (图 4), 已知分布点均在保护区实验区范围内。该种分布地溪流落差较大, 植被繁茂, 栖息于水流较缓的深潭中。水质清澈, 水底多为石块、泥沙和落叶等。水塘周围植被茂盛, 小

溪边灌木和杂草茂密,流溪上空未被树冠覆盖。溪内石块间有小鱼、水生无脊椎动物等小型动物。据野外和饲养观察,德氏瘰螈以沼虾(*Macrobrachium* sp.)为主要食物。

具初步调查,当地居民没有利用德氏瘰螈的传统,该物种也尚无规模化的商业贸易,其主要威胁来自于栖息地破坏。采集地溪流的下游地区存在香蕉种植田,蕉地扩大和农药使用



图 1 德氏瘰螈 (SWFU 18983, ♀)

Fig. 1 Female specimen of *Paramesotriton deloustali* (SWFU 18983, ♀) from Yunnan, China

a. 背面; b. 侧面; c. 腹面。a. Dorsal view; b. Lateral view; c. Ventral view.



图 2 德氏瘰螈手与足形态 (SWFU 18983, ♀)

Fig. 2 Close-up views of female *Paramesotriton deloustali* (SWFU 18983, ♀) from Yunnan, China

a. 手背面; b. 手腹面; c. 足背面; d. 足腹面。

a. Dorsal view of hand; b. Ventral view of hand; c. Dorsal view of foot; d. Ventral view of foot.

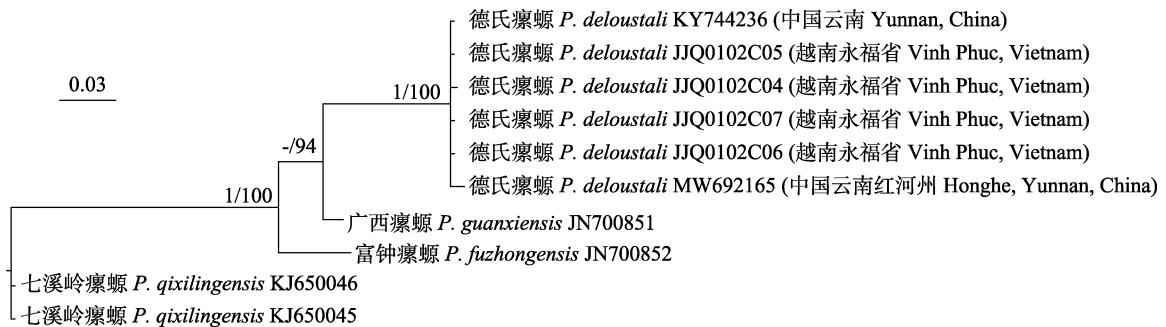


图 3 基于线粒体 COI 基因 594 bp 序列构建的瘰螈属的贝叶斯树

Fig. 3 Bayesian inference tree of *Paramesotriton* derived from COI sequences

图中“/”前后的数字分别表示贝叶斯后验概率和自展值支持率,低于 0.95/70%的用符号“-”表示。学名后为 GenBank 序列号或组织号。Numbers denote the Bayesian posterior probabilities (BPP) and bootstrap support (BS), respectively. Only high support by Bayesian posterior probabilities (BPP \geq 95%), and bootstrap support (BS \geq 70%) presented. GenBank accession numbers or sample number follow each species name.



图 4 德氏瘰螈栖息地环境

Fig. 4 Habitat of *Paramesotriton deloustali* at Daweishan National Nature Reserve, Yunnan, China

a. 溪流; b. 水潭。a. Ravine stream; b. Stream pool.

等对德氏瘰螈的生存造成了潜在的威胁。在 2013 年监测期间,作者在其栖息地多次发现电鱼等人类干扰活动,也可能对该地区德氏瘰螈种群的生存造成影响。德氏瘰螈在中国已知的分布区较狭小,且在越南仅北部部分区域(永福省 Vinh Phuc、北干省 Bac Kan、太原省 Thai Nguyen、宣光省 Tuyen Quang、河江省 Ha Giang、谅山省 Lang Son、老街省 Lao Cai 和安沛省 Yen Bai)(Nguyen et al. 2003, Lu et al. 2004, Weisrock et al. 2006, Bour et al. 2009)有分布记录,其他与中国接壤的地区(如莱州省 Lai Chau 和高平省 Cao Bang)是否有该螈的分布尚不清楚,并且实地种群生态方面的调查薄弱。建议今后中、越两国学者积极开展跨境研究调查合作,以摸清德氏瘰螈具体的分布范围和受威胁情况。

致谢 感谢云南大围山国家级自然保护区河口管护分局张贵生、李有福以及和华然对野外调查的帮助。感谢费梁和叶昌媛研究员鉴定物种。感谢西南林业大学李先琦同学在形态照片拍摄方面给予的帮助。

参 考 文 献

Bour R, Ohler A, Dubois A. 2009. The onomatophores of *Paramesotriton deloustali* (Bourret, 1934) (the seven errors

game). *Alytes*, 26(1/4): 153–166.

Bourret R. 1934. Notes herpétologiques sur l'Indochine française VII. Une Salamandre nouvelle vivant au Tonkin. *Bulletin Général de L'indochine Publique*, 14(4): 83–84.

Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Molecular Biology and Evolution*, 132: 71–91.

Che J, Chen H M, Yang J X, et al. 2011. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12(2): 247–258.

Clements R, Sodhi N S, Schilthuizen M, et al. 2006. Limestone karsts of Southeast Asia: Imperiled arks of biodiversity. *Bioscience*, 56(9): 733–742.

Drummond A J, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(8): 214.

Frost D R. 2020. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 5.6. New York, USA: American Museum of Natural History. [EB/OL]. [2020-12-01]. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

Jiang Y, Wei Z, Han F, et al. 2017. The complete mitogenome sequence of *Tylotriton zieglerei* (Amphibia: Caudata). *Conservation Genetics Resources*, 9(3): 503–506.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.

Lu S, Yuan Z-G, Pang J, et al. 2004. Molecular phylogeny of the

- genus *Paramesotriton* (Caudata: Salamandridae). *Biochemical Genetics*, 42(5/6): 139–148.
- Miller M A, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop, 1–8.
- Myers N, Mittermeier R A, Mittermeier C G, et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853–858.
- Nguyen S V, Ho C T, Nguyen T Q, et al. 2003. Feasibility Study for a Programme to Conserve the Vietnamese Salamander *Paramesotriton deloustali* in Ba Be and Cho Don Districts, Bac Kan Province, PARC Project VIE/95/G31&031. Government of Viet Nam (FPD) /UNOPS/UNDP/Scott Wilson Asia-Pacific Ltd., Ha Noi.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253–1256.
- Ren J, Wang K, Nguyen T T, et al. 2018. Taxonomic re-evaluation of the monotypic genus *Pararhabdophis* Bourret, 1934 (Squamata: Colubridae: Natricinae) with discovery of its type species, *P. chapaensis*, from China. *Zootaxa*, 4486(1): 31–56.
- Ronquist F, Huelsenbeck J P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Sparreboom M. 2014. Salamanders of the Old World. The Salamanders of Europe, Asia and Northern Africa. Zeist, Netherlands: KNNV Publishing.
- Stamatakis A P, Hoover J R. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57(5): 758–771.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876–4882.
- Wang K, Jiang K, Wang Y, et al. 2018. Discovery of *Japalura chapaensis* Bourret, 1937 (Reptilia: Squamata: Agamidae) from Southeast Yunnan Province, China. *Zoological Research*, 39(2): 105–113.
- Weisrock D W, Papenfuss T J, Macey J R, et al. 2006. A molecular assessment of phylogenetic relationships and lineage accumulation rates within the family Salamandridae (Amphibia, Caudata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(2): 368–383.
- Yuan Z Y, Liu X L, Wang K, et al. 2019. *Nidirana chapaensis* (Bourret, 1937), one additional anuran species for the amphibian fauna of China. *Zootaxa*, 4571(4): 580.
- Yuan Z Y, Zhao H P, Jiang K, et al. 2014. Phylogenetic relationships of the genus *Paramesotriton* (Caudata: Salamandridae) with the description of a new species from Qixiling nature reserve, Jiangxi, southeastern China and a key to the species. *Asian Herpetological Research*, 5(2): 67–79.
- Zhang M W, Han F Y, Ye J, et al. 2017. The entire mitochondrial genome of Vietnam Warty Newt *Paramesotriton deloustali* (Salamandridae: *Paramesotriton*) with a new distribution record from China. *Conservation Genetics Resources*, 10(3): 551–554.