

嗜盐古生菌 AJ6 的分离及系统发育分析

徐晓红, 吴敏*, 曹轶, 吴月红, 张婷

(浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310027)

摘要: 从新疆阿尔金山自然保护区阿牙克库木湖分离纯化得到嗜盐古生菌 AJ6, 革兰氏染色呈阴性, 杆状, 少数球形, 菌体大小为 $0.2 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 1.6 \sim 4.2 \mu\text{m}$, 最适 NaCl 和 Mg^{2+} 质量浓度分别为 15% 和 0.6%, 在 pH 为 6.0~7.0 条件下生长良好. 在此基础上, 进一步通过 PCR 方法扩增了菌株 AJ6 的 16S rRNA 基因 (16S rDNA), 测定了该基因的核苷酸序列, 并利用 "Clustalw" 软件和 "PHYLIP" 软件包分析 16S rDNA 序列, 对其进行同源性比较和系统发育学分析, 建立了嗜盐古细菌的系统发育树. 结果表明菌株 AJ6 与 *N. pallidum*、*N. pellirubrum* 和 *N. versiforme* 在同一类群中, 16S rDNA 序列同源性分别为 97.47%、96.44% 和 98.12%, 菌株 AJ6 是 *N. atrinena* 属中的一个新成员, 命名为 *N. atrinena altuensis*. 菌株 AJ6 的 16S rDNA 序列已登陆到 GenBank, 其序列号为 AY277584.

关键词: 新疆阿尔金山盐湖地区; 嗜盐古生菌; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1008-9497(2005)01-083-06

XU Xiao-hong, WU Min, CAO Yi, WU Yue-hong, ZHANG Ting (College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Isolation and phylogenetic analysis of halophilic archaea AJ6 Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2005, 32(1): 83~88

Abstract: Halophilic Archaea AJ6 was isolated and purified from the Altun Mountain National Nature Reserve of Xinjiang Uygur Autonomous Region. Strain AJ6 is Gram-negative rods, a few are globular, with the size of single cell of $0.2 - 0.6 \mu\text{m}$ by $1.6 - 4.2 \mu\text{m}$. The optimum salt concentration for its growth is 20% NaCl and 0.6% Mg^{2+} , and the optimum pH is 6.0-7.0. Based on its morphology and physiological and biochemical features, 16S rRNA encoding gene (16S rDNA) from AJ6 was amplified by PCR, and their nucleotide sequences were determined. "Clustalw" and "PHYLIP" software packages were used to analyze 16S rDNA sequence, and the homology was compared and phylogenetic analysis was exerted, at the same time, phylogenetic tree of halophilic archaea was established. It was considered that strain AJ6 is a novel species of the genus *N. atrinena*, and the name *N. atrinena altuensis* is proposed. The GenBank accession numbers of the 16S rDNA sequences about strain AJ6 is AY277584.

Key words: Soda Lake in Xinjiang Altun Region; extremely halophilic archaea; 16S rDNA; phylogenesis

嗜盐菌是一类生长在盐湖、天然或人工盐场、盐碱地带的细菌。一般认为, 生长环境需要的最适 NaCl 质量浓度在 15% 以上的嗜盐菌被称为极端嗜盐菌^[1], 其遗传、生理生化特性和菌种资源都具有研究和利用价值. 我国新疆地区具有地理环境特殊, 物种资源丰富的特点, 从该地区的阿尔金山自然保护区阿牙克库木湖中分离纯化到一株嗜盐古生菌 AJ6, 在进行部分生理生化指标检测的基础上, 测定

了其 16S rRNA 基因 (16S rDNA) 序列, 并进而对 AJ6 进行了系统发育分析.

1 材料和方法

1.1 菌株来源

菌株 AJ6 分离自阿尔金山的阿牙克库木湖, 参比菌株 *Halobacterium halobium* RIM 1 由复旦大学

收稿日期: 2003-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370029).

作者简介: 徐晓红 (1978-), 女, 硕士研究生, 主要从事嗜盐古生菌的研究.

* 通讯联系人: 吴敏, 教授, wumin@zju.edu.cn

生命科学学院李庆国教授惠赠。

1.2 培养和分离

菌种分离和富集培养采用RM培养基(g/L): NaCl 25.0, 无水MgSO₄ 9.7, 柠檬酸钠 3.0, KCl 2.0, 无水CaCl₂ 0.2, 细菌蛋白胨(L37) 10, pH 7.0。固体培养基加琼脂 15。

水样直接加到液体培养基中(水样 液体培养基, 1:10), 37℃、120 r/min 光照振荡培养 12 d, 此时培养基呈红色, 取培养基 100~200 μL 涂布平板, 37℃ 光照培养, 待菌落长出后, 挑取单菌落反复划线纯化 3 至 4 次, 将最后一次挑取的单菌落接入液体培养基, 光照振荡培养 7 d 待用。

1.3 菌体特征和生长条件鉴定

1.3.1 个体形态

在RM培养基中37℃光照培养48 h, 革兰氏染色, 然后在光学显微镜下观察细菌细胞的形状, 并测定其大小。

1.3.2 菌落特征

划线接种于牛奶-盐-琼脂培养基^[2], 37℃光照培养。

1.3.3 生长条件鉴定

所有生长试验均在 20 mL 试管中装 5 mL 培养基, 按 10% 接种后 37℃ 光照培养 7 d, 然后用 721 型分光光度计在 460 nm 波长处测定光密度^[2]。每组试验 3 个重复。

1.4 基因组总DNA的抽提

DNA 抽提方法^[3]: 取 10 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 2 min; 取沉淀加溶液 I(葡萄糖 50 mM, Tris·Cl pH 8.0 25 mM, EDTA pH 8.0 10 mM) 重悬沉淀; -20℃ 冻融 2 至 3 次, 充分破裂细胞; 加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 至终浓度 0.1 mg/mL; 37℃ 水浴 3 h, 其间轻缓颠倒离心管数次; 加入等体积酚-氯仿异戊醇(v/v/v = 25/24/1) 抽提 2 次, 取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇沉淀核酸, 风干, -20℃ 保存。

1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增

根据文献[2, 3]报道的已知 16S rDNA 序列, 使用 DNA STAR 软件设计一对通用引物如下:

上游: 5' ATTCCGGTTGA TCCTGC 3'

下游: 5' A GGA GGTGA TCCA GCCGCA G 3'

PCR 扩增条件: 94℃ 变性 1 min; 50℃ 退火 45 s; 72℃ 延伸 1 min 30 s, 50 μL 反应体系 35 个循环。

1.6 PCR 产物的回收及纯化

采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 结果, 并割胶回收, 回收产物用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯

化试剂盒(购自上海生工生物工程有限公司)纯化。

1.7 纯化产物的克隆及序列测定

纯化的 PCR 产物采用直接 T/A 克隆法进行克隆。先使用 pUCm-T 载体 PCR 产物克隆试剂盒(购自上海生工生物工程有限公司)将 16S rDNA 纯化片段连接到质粒 pUCm-T 上, 再转化到大肠杆菌 DH5α 菌株制备的感受态细胞中, 在含氨苄青霉素(AMP^r)的平板生长过夜, 挑选白斑, 经 PCR 验证和酶切验证后, 随机取 3 个阳性克隆测序。重组质粒采用 ABI Prism 377XL 测序仪测定 DNA 序列, 测序引物为 M13F 和 M13R。

1.8 系统发育树的构建

将菌株 AJ6 的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列, 通过 Clustalw 1.8 软件包进行多序列匹配排列, 其中形成的缺口用中性元素填补, 然后将多序列匹配排列结果输入 PHYLIP (v3.6a3) 软件包进行系统发育的推测和分析。用于比较的相关菌株的基因库序列号等信息见表 1。

2 结果

2.1 嗜盐古生菌 AJ6 的分离

富集后的培养液划线于 RM 培养基平板, 根据菌落形态的差异, 挑选菌株 AJ6 接种于 5 mL 的 RM 培养液中振荡培养, 48 h 后发现培养液颜色从淡黄色转变为橙红色。

2.2 形态特征和生长条件

2.2.1 个体形态

菌株 AJ6 为革兰氏阴性菌, 不运动, 呈杆状, 少量球形, 菌体大小为 0.2~0.6 μm × 1.6~4.2 μm, 显微镜下观察结果见图 1。



图 1 AJ6 菌体的显微镜照片 × 2000

Fig 1 Optical micrographs of strain AJ6 × 2000

2.2.2 菌落特征

在牛奶-盐-琼脂培养基上生长良好, 菌落呈橙红色, 不透明, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 直径 1.0

~ 20 mm .

表 1 用于比较及系统发育分析的 16S rDNA 序列

Table 1 16S rDNA sequences used for comparison and phylogenetic analysis

Scientific name	Strain	Accession number	Reference
<i>Halobacterium salinarum</i>	DSM 3754	AJ496185	Unpublished
<i>Halococcus morrhuae</i>	NRC16008	D11106	4
	A TCC49257	AB004876	5
<i>Natrialba chahannaensis</i>	C112	AJ004806	Unpublished
	AS1.1986	AF262026	6
<i>Natrialba magadii</i>	NCMB2190	X72495	7
	NCMB 784	AJ002948	8
<i>Natrialba pallidum</i>	NCMB 786	AJ002947	8
	JCM 10478	AB023426	9
<i>Natronobacterium gregoryi</i>	NCMB2189	D87970	10
<i>Natronococcus amylolyticus</i>	Ah-36	D43628	11
	NCMB 2192	Z28378	12
<i>Natrononas pharaonis</i>	JCM 8858	D87971	10
<i>Natronorubrum bangense</i>	A 33	Y14028	13
	GA 33	AB005656	13

2.2.3 生长条件

NaCl 质量浓度对生长的影响: AJ6 在 NaCl 质量浓度为 12.5% ~ 17.5% 的培养基中生长良好, NaCl 质量浓度低于 5% 和高于 30% 菌体不生长, 最适生长的 NaCl 质量浓度为 15%, 故菌株 AJ6 属于极端嗜盐菌 .

Mg²⁺ 质量浓度对生长的影响: AJ6 在 Mg²⁺ 质量浓度为 0.6% ~ 2.4% 时适宜生长, 最适生长的 Mg²⁺ 质量浓度为 0.9% .

pH 对生长的影响: pH 为 6.0~7.0 条件下 AJ6 生长良好, 当 pH 值低于 5 或高于 10 时, 不能生长 . 生长曲线见图 2 .

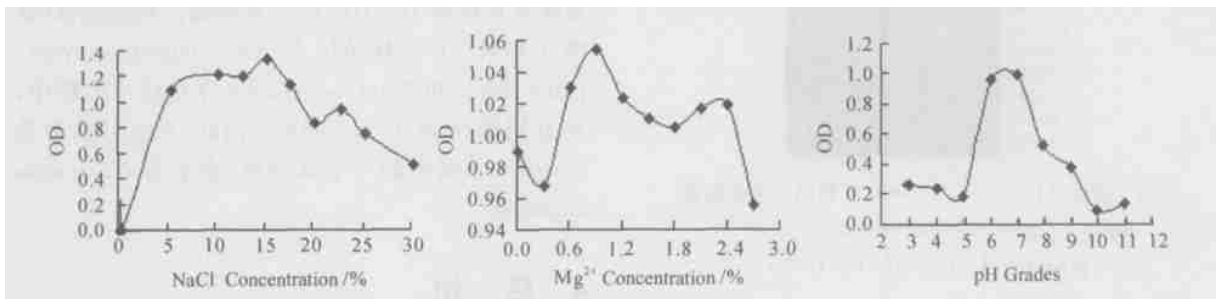


图 2 菌株 AJ6 的生长曲线 (NaCl, Mg²⁺, pH)

Fig 2 Growth curves of strain AJ6 (NaCl, Mg²⁺, pH)

2.3 嗜盐古生菌 AJ6 的 16S rDNA 的 PCR 扩增结果和序列

用一对通用引物可从菌株 AJ6 的 DNA 中获得一段长度约 1.5 kb 的扩增片段, 电泳图谱见图 3 . 结果表明, AJ6 的 16S rDNA 序列与参比菌株 *Halobacterium halobium* RIM 1 的 16S rDNA 序列大小类似 . 扩增片段经克隆后测序, 测得 AJ6 含 1461 个碱基, 该片段的 DNA 序列已登陆到 GenBank, 其序列号为 AY277584 .

2.4 嗜盐古生菌 16S rDNA 序列相似性比较

为了比较各菌株间的 16S rDNA 序列相似性,

通过 Clustalw 软件包, 把各菌株序列转化为 PHYLIP 可以识别的形式, 用 DNADIST 应用程序求各菌株序列的遗传距离, 然后转化为相似性, 表 2 列出了各菌株的 16S rDNA 序列的相似性 .

2.5 嗜盐古生菌的系统发育

所构建的嗜盐古生菌的系统发育树见图 4, 它是各菌株 16S rDNA 序列为基础构建的 . 构建方法如下: 首先, 根据 “Kimura 2-parameter” 方式, 通过序列数据计算矩阵距离; 然后, 输入到 Fitch 程序中, 根据 Fitch-Margoliash 氏方式进行系统进化树估算^[14] . 各分支点的重复性用 PHYLIP 软件包中的

Seqboot、Consense 程序分析, 重复数为 1 000。从系统发育树上看, 菌株 AJ6 与 *N. pallidum*、*N. pellirubrum* 和 *N. versiforme* 分在同一类群中,

16S rRNA 序列同源性分别为 97.47%、96.44% 和 98.12%。

表 2 嗜盐古生菌各菌株 16S rDNA 序列相似性

Table 2 Similarity of 16S rDNA sequence of halophilic archaea strains

No. and abbreviation	% Similarities of 16S rDNA sequence																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1 <i>N. ab. hulunbeirensis</i>		<u>98.37</u>	<u>97.27</u>	98.59	95.73	93.80	93.07	<u>95.07</u>	94.58	93.22	92.55	93.46	88.33	88.52	89.03	88.74	
2 <i>N. ab. chahannaensis</i>			<u>96.65</u>	94.85	<u>96.00</u>	93.46	92.80	94.66	94.30	92.67	92.42	93.39	88.47	88.25	89.24	88.87	
3 <i>N. ab. magadii</i>				93.36	94.64	91.96	91.22	93.29	92.70	91.93	91.19	92.02	87.58	87.70	88.89	88.94	
4 <i>N. rr. bangense</i>					<u>96.07</u>	93.53	93.00	94.87	94.51	92.33	91.73	92.37	89.01	88.32	88.54	88.40	
5 <i>N. rr. tibetense</i>						93.60	92.87	94.80	94.30	93.28	92.42	92.98	89.21	88.99	89.31	89.49	
6 <i>N. nm. pallidum</i>								<u>97.74</u>	<u>97.47</u>	<u>96.80</u>	91.79	<u>96.50</u>	91.55	87.25	87.02	87.36	86.89
7 <i>N. nm. pellirubrum</i>									<u>96.44</u>	<u>96.38</u>	90.64	90.23	90.39	86.09	86.01	86.46	86.14
8 AJ6										<u>98.12</u>	92.47	91.67	92.50	87.99	87.84	88.89	87.99
9 <i>N. nm. versiforme</i>											90.71	90.16	91.21	86.43	86.35	88.19	86.83
10 <i>N. cc. amylophilus</i>												<u>95.77</u>	<u>95.23</u>	88.87	88.99	88.75	89.35
11 <i>N. cc. occultus</i>													92.91	86.70	87.36	88.68	88.33
12 <i>N. bt. gregoryi</i>														88.87	90.01	88.61	88.74
13 <i>H. cc. morrhuae</i>															94.43	88.13	88.94
14 <i>H. cc. saccharophilus</i>																88.19	88.66
15 <i>H. bt. salinarum</i>																	87.71
16 <i>N. mn. pharaonis</i>																	

Similarities > 95% are underline

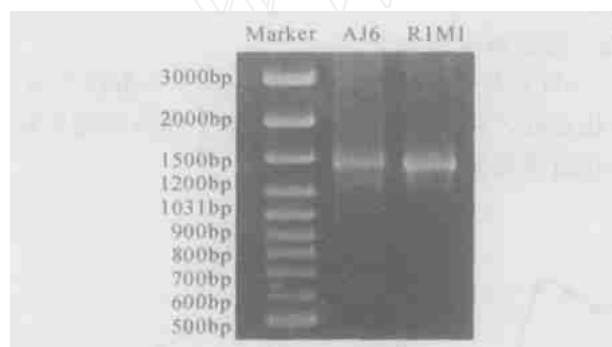


图 3 菌株 AJ6 16S rDNA PCR 扩增结果电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of strain AJ6 16S rDNA

3 讨 论

从新疆阿尔金山自然保护区阿牙克库木湖分离得到的嗜盐菌株 AJ6, 革兰氏阴性, 不运动, 液体培养时细胞呈杆状, 少数球形, 菌体在 NaCl 质量浓度低于 5% 的条件下不能生长, 最适生长 NaCl 质量浓度为 15%, 最适生长 Mg²⁺ 质量浓度为 0.9%, 最适生长 pH 6.0~7.0。因此, 菌株 AJ6 属于极端嗜盐菌。

目前, 嗜盐古生菌分成 1 个科——嗜盐菌科, 15 个属, 50 多个种^[15,16]。根据嗜盐古生菌分类标准^[17], 新的分类单位应当优先同基于核苷酸序列的系统发育学分析相一致^[18]。嗜盐古生菌基于 16S

rDNA 序列的系统发育学进化距离与表形特征、化学分类数据有着很好的相关性^[17]。一般认为, 若 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 则可认为属于不同种; 若同源性小于 93%~95%, 则可认为属于不同属^[18]。从系统发育树和 16S rDNA 序列同源性角度分析(见图 4 和表 2), 菌株 AJ6 与 *N. nm. pallidum*、*N. nm. pellirubrum* 和 *N. nm. versiforme* 分在同一类群中, 并且同源性为 96%~98%。因此, AJ6 可认为是 *N. atrinena* 属中的一个新成员, 命名为 *N. atrinena altuensis*。

4 结 论

对阿尔金山自然保护区阿牙克库木湖中的嗜盐古生菌的分离纯化以及菌株 AJ6 的分类学研究, 结果表明了新疆的阿尔金山地区盐湖含有丰富的嗜盐古生菌物种资源。目前, 分离出的菌株包括极端嗜盐菌和适度嗜盐菌, 今后可尝试在其它不同条件下进行分离和纯化, 如嗜盐碱、嗜热等菌株, 从而更好地研究新疆阿尔金山盐湖地区的菌类资源。

另外要提及的是, 嗜盐菌紫膜上存在的细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin, BR)——BR 蛋白, 是一种优良的光敏材料, 有着良好的应用前景^[19]。目前, 仅在嗜盐菌科的 *H. alobacterium*, *H. aloarcua*, *H. alorubrum* 及 *H. alomicrobium* 4 个属中发现有此

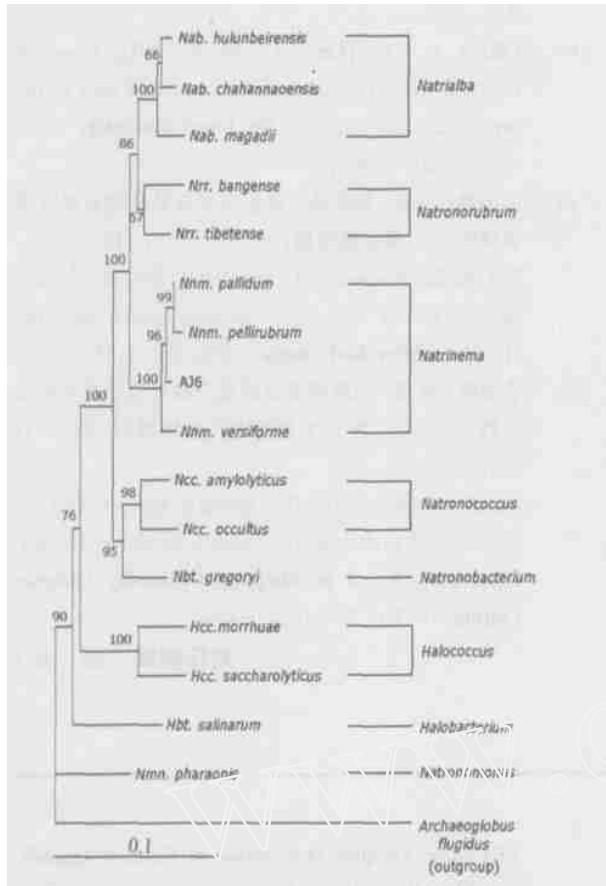


图 4 根据 16S rDNA 序列构建的嗜盐古生菌系统发育树

Fig 4 Phylogenetic tree of extremely halophilic archaea on the basis of 16S rDNA sequences

蛋白^[15]。由于从野外分离的菌株膜上 BR 蛋白表达量较低, 而基于对菌株的系统发育学研究和分类学地位的确定, 进而得到全长基因序列, 并将其转到高表达菌株中进行高效表达, 即可比较容易大量获得 BR 蛋白, 并应用于实际研究中。

衷心感谢新疆阿尔金山自然保护区管理处张会斌、刘志虎协助采集样品。

参考文献 (References):

- [1] MARGES N R, SCHINNER F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology[J]. **Extremophiles**, 2001, 5(2): 73 - 83
- [2] 张纪忠, 黄静娟, 徐德强, 等. 嗜盐杆菌属一新种[J]. **微生物学报**, 1990, 30(2): 87 - 93
ZHANG Ji-zhong, HUANG Jing-juan, XU De-qiang, et al A new species of Halobacterium [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1990, 30(2): 87 - 93
- [3] 李凌, 吴敏, 乔守怡, 等. br 基因的克隆和表达[J].

浙江大学学报(工学版), 2001, 35(3): 324 - 327.

L I L ing, WU M in, Q IAO Shou-yi, et al Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene[J]. **J of Zhejiang University (Engineering Science)**, 2001, 35(3): 324 - 327.

- [4] KAMEKURA M, SENO Y. Nucleotide sequences of 16S rRNA encoding genes from halophilic archaea Halobaculum morrhuae NRC16008 and Halobacterium mediterranei ATCC33500[J]. **Nucleic Acids Res**, 1992, 20(13): 3517 - 3523
- [5] VENTOSA A, GUTIERREZ MC, KAMEKURA M, et al Proposal to transfer Halobaculum turkmenicum, Halobacterium trapanicum JCM 9743 and strain GSL-11 to Haloterrigena turkmenica gen nov, comb Nov[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1999, 49(1): 131 - 136
- [6] XU Y, WANG Z, XUE Y, et al *Natralba hulunbeirensis* sp nov and *Natralba chahannaensis* sp nov, novel halobaculum-like archaea from soda lakes in Inner Mongolia Autonomous Region, China[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2001, 51(5): 1693 - 1698
- [7] LODWICK D, MCGENITY TJ, GRANT WD. The phylogenetic position of the halobaculum-like archaeon *Natronobacterium magadii*, determined from its 23S ribosomal RNA sequence[J]. **Syst Appl Microbiol**, 1994, 17: 402 - 404
- [8] MCGENITY TJ, GEMMELL RT, GRANT WD. Proposal of a new halobaculum-like genus Natrinema gen nov, with two species *Natrinema pellirubrum* nom nov and *Natrinema pallidum* nom nov[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1998, 48(4): 1187 - 1196
- [9] XN Hua-wei, ITOH T, ZHOU Pei-jin, et al *Natrinema versiforme* sp nov, an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2000, 50(3): 1297 - 1303
- [10] KAMEKURA M, DYALL-SMITH ML, UPASANI V, et al Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halobacterium*, *Natralba*, and *Natronomonas* gen nov, respectively, as *Halobacterium vacuolatum* comb nov, *Natralba magadii* comb nov, and *Natronomonas pharaonis* comb nov, respectively[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1997, 47(3): 853 - 857.
- [11] KANAL H, KOBAYASHI T, AONO R, et al *Natronococcus amyolyticus* sp nov, a halobaculum-like archaeon[J]. **Int J Syst Bacteriol**,

- 1995, 45(4): 762 - 766
- [12] DENNER E, McGENITY TJ, BUSSE H, et al
Halococcus salifodinae spec nov, an Archaeal
isolate from an Austrian salt mine[J]. **Int J Syst
Bacteriol**, 1994, 44(4): 774 - 780
- [13] XU Y, ZHOU P, TIAN X. Characterization of two
novel halobalkaliphilic archaea *Natronorubrum
bangense* gen nov, sp nov and *Natronorubrum
tibetense* gen nov, sp Nov[J]. **Int J Syst Bacteriol**,
1999, 49 (1), 261 - 266
- [14] 徐毅, 周培瑾 嗜盐古细菌的系统发育分析[J]. **微
生物学报**, 1996, 36(2): 79 - 86
XU Yi, ZHOU Pei-jin. Phylogenetic development
analysis of archaeal halobacteria[J]. **Acta
Microbiologica Sinica**, 1996, 36(2): 79 - 86
- [15] IHARA K, UEMURA T, KATAGIRI I, et al
Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate
changes by gene duplication and functional
differentiation [J]. **J Mol Biol**, 1999, 285(1): 163
- 174
- [16] ASKER D, OHTA Y. *Haloferrax alexandrinus* sp
nov, an extremely halophilic
canthaxanthin-producing archaeon from a solar
saltern in Alexandria (Egypt) [J]. **Int J Syst Evol
Microbiol**, 2002, 52(3): 729 - 738
- [17] OREN A, VENTOSA A, GRANT WD. Proposed
minimal standards for description of new taxa in the
order *halobacteriales*[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1997,
47(1): 233 - 238
- [18] 王振雄, 徐毅, 周培瑾 嗜盐古生菌新种的系统分类
学研究[J]. **微生物学报**, 2000, 40(2): 115 - 120
WANG Zhen-xiong, XU Yi, ZHOU Pei-jin.
Taxonomy of a new species of halobalkaliphilic
archaeon[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2000, 40(2):
115 - 120
- [19] 徐晓红, 吴敏 细菌视紫红质蛋白的光谱分析与光
电特性应用[J]. **浙江大学学报(理学版)**, 2004,
31(5): 570 - 574
XU Xiao-hong, WU Min. Spectral analysis and
application of photoelectric characteristics in
bacteriorhodopsin[J]. **J of Zhejiang University
(Science Edition)**, 2004, 31(5): 570 - 574
(责任编辑 涂 红)

(上接第 82 页)

- [8] 徐剑 我国小鲵科几个属分类问题的探讨[J]. **中山
大学学报(自然科学版)**, 2002, 41(1): 79 - 81.
XU Jian. Some taxonomic problems of the
Hynobiidae[J]. **Acta Scientiarum Naturalium
Universitatis Sunyatseni**, 2002, 41(1): 79 - 81.
- [9] 徐剑 我国有尾动物分类中几个问题研究[J]. **四川
动物**, 2001, 20(4): 177 - 180
XU Jian. Study on some taxonomic problems of the
Batrachuperus, Liuia and *Hynobius*[J]. **Sichuan
Journal of Zoology**, 2001, 20(4): 177 - 180
- [10] 费梁, 叶昌媛 小鲵科的分类探讨, 包括一新属[J].
两栖爬行动物学报, 1983, 2(4): 31 - 37.
FEI Liang, YE Chang-ruan. Taxonomy of
Hynobiidae, with description of a new genus[J].
Acta Herpetologica Sinica, 1983, 2(4): 31 - 37.
- [11] EASTON ER, LEUNG VA. An annotated list of
the reptiles and amphibians of Macau[J]. **Southeast
Asia Review**, 1993, 24(4): 159 - 160
- [12] 费梁 中国两栖动物图鉴[M]. 郑州: 河南科学技术
出版社, 1999 316 - 317.
FEI Liang. **Graphic Description of Chinese
Amphibian** [M]. Zhengzhou: Henna Science Press,
1999 316 - 317.
- [13] 赵尔宓, 胡其雄 中国西部小鲵科的分类与演化, 兼
记一新属[J]. **两栖爬行动物学报**, 1983, 2(2): 29 -
35
ZHAO Er-mi, HU Qi-xiong. Taxonomy and
evolution of Hynobiidae in western China, with
description of a new genus[J]. **Acta Herpetologica
Sinica**, 1983, 2(2): 29 - 35
- [14] 赵尔宓, 吴贯夫 秦巴北鲵的分类地位, 兼论黄斑拟
小鲵是它的异名[J]. **四川动物**, 1995, 14(1): 20 -
23
ZHAO Er-mi, WU Guan-fu. Taxonomic status fo
Randon tsinpaensis Liu and Hu, 1996, with a
discussion on *Pseudohynobius flavamaculatus* (Fei
and Ye, 1982) as its synonym [J]. **Sichuan Journal
of Zoology**, 1995, 14(1): 20 - 23
(责任编辑 涂 红)