

湖南郴州发现岭南两头蛇

张鹤^{①②} 费冬波^{③#} 赵成^① 刘松^③ 蔡波^④ 郭鹏^① 吴亚勇^{①*}

① 宜宾学院 宜宾 644007; ② 沈阳师范大学 沈阳 110034; ③ 湖南省农林工业勘察设计

研究总院 长沙 410007; ④ 中国科学院成都生物研究所 成都 610042

摘要: 2022 年 8 月, 于湖南省郴州市永兴县湘阴渡镇 (113°01'18" E, 26°11'87" N, 海拔 174 m) 采集到两头蛇活体标本 1 号, 通过形态测量比较, 发现所采集标本与中国广东省分布的岭南两头蛇 (*Calamaria arcana*) 形态特征基本一致; 后基于线粒体 Cyt *b* 基因片段进行分子系统发育分析, 结果显示该标本与岭南两头蛇形成高支持率单系群 (后验概率 PP 为 1.00, 自举值 BS 为 100), 所采集标本与岭南两头蛇的遗传距离为 1%。综合形态学和分子生物学证据, 最终确定该标本为两头蛇科 (Calamariidae) 两头蛇属的岭南两头蛇, 系湖南省蛇类分布新记录种。

关键词: 蛇类; 两头蛇科; 分布新记录种; 细胞色素 *b* 基因

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 04-615-07

Calamaria arcana Found in Chenzhou, Hunan

ZHANG He^{①②} FEI Dong-Bo^{③#} ZHAO Cheng^① LIU Song^③
CAI Bo^④ GUO Peng^① WU Ya-Yong^{①*}

① Yibin University, Yibin 644007; ② Shenyang Normal University, Shenyang 110034;

③ Hunan Prospecting Designing & Research General Institute for Agriculture Forestry & Industry, Changsha 410007;

④ Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610042, China

Abstract: An unidentified snake specimen was collected from a heap of sticks and dry leaves in Xiangyindu Town, Yongxing County, Hunan Province, China (113°01'18" E, 26°11'87" N, 174 m) during a biodiversity survey in early August 2022. Morphological characteristics comparison revealed that the collected specimen was generally consistent with the morphological characteristics of the *Calamaria arcana* from Guangdong Province, China. Bayesian and maximum likelihood phylogenetic analyses based on the mitochondrial gene fragment Cyt *b* showed a high support monophyletic group between the collected specimen with the *C. arcana* (PP 1.00, BS 100), and the uncorrected pairwise sequence divergence was 1%. Thus, based on morphological analysis and phylogenetic comparison, this specimen was finally identified as *C. arcana*, which is a new snake record in Hunan Province.

基金项目 宜宾学院科研启动项目 (No. 2019QD13), 湖南省国家重点野生动植物保护补助资金项目 (No. 2021-326);

* 通讯作者, E-mail: cdwy201101@163.com;

第一作者介绍 张鹤, 男, 理学学士; 研究方向: 动物生态学; E-mail: 767056223@qq.com;

共同第一作者 费冬波, 男, 农学硕士; 研究方向: 野生动物保护与自然保护区管理; E-mail: 276632801@qq.com。

收稿日期: 2022-12-29, 修回日期: 2023-05-08 DOI: 10.13859/j.cjz.202304014

Key words: Snake; Calamariidae; New record; Cytochrome *b*

两头蛇(*Calamaria*)为游蛇科(Colubridae)的小型无毒蛇类,目前,该属物种共报道有 67 种,主要分布于印度尼西亚、菲律宾、印度、缅甸、日本和越南(Uetz et al. 2023)。中国境内仅分布 5 种,包括尖尾两头蛇(*C. pavementata*)、钝尾两头蛇(*C. septentrionalis*)、云南两头蛇(*C. yunnanensis*)、贡山两头蛇(*C. andersoni*)和岭南两头蛇(*C. arcana*)。其中,岭南两头蛇由 Yeung 等(2022)依据采自广东南岭国家级自然保护区大东山管理站的两头蛇标本进行描述并命名,目前该物种已知仅分布于广东北部南岭地区。

2022 年 8 月 3 日晨,在湖南省郴州市永兴县湘阴渡镇滩头村(113°01'18" E, 26°11'87" N, 海拔 174 m)采集到蛇类活体 1 号,基于形态特征初步鉴定该蛇为两头蛇科两头蛇属物种,后基于分子生物学方法进一步鉴定,确认为 2022 年新描述的岭南两头蛇,系湖南省蛇类分布新记录种(高志伟等 2022, Uetz et al. 2022)。

1 材料与方法

1.1 标本处理

将所采集个体安乐死后,取肝及肌肉组织保存于 95%乙醇中,标本于 10%甲醛溶液中固定。标本定型后,经清洗后转移至 75%酒精溶液中长期保存,目前保存于宜宾学院动物多样性与生态保育宜宾市重点实验室标本馆(标本号 YBU 22810)。

1.2 形态鉴别

依据赵尔宓等(1998)、Yeung 等(2022)对采集的标本进行形态测量和描述。使用软尺进行头体长和尾长测量(精确到 1 mm)。借助解剖镜计数鳞片,若是对称性鳞片,则对左右两侧分别计数。鳞片计数指标共 12 项,包括眶上鳞、眶前鳞、眶后鳞、鼻鳞、颌片、上唇鳞、下唇鳞及其切前颌片对数、肛鳞、背鳞、腹鳞和尾下鳞。

1.3 分子鉴定

利用天根生化科技(北京)有限公司试剂盒提取标本肝组织总 DNA,用引物 H16064/L14919(Burbrink et al. 2000)扩增线粒体细胞色素 *b* (cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因片段。PCR 扩增反应,94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 后延伸 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,送至成都生物工程有限公司测序。返回序列采用 Lasergene v15.1 (DNASTAR, Inc.) 软件包的 SeqMan 对所获取的序列进行编辑。利用 Mega7 (Kumar et al. 2016) 中的 Clustal W (Thompson et al. 2003) 算法对所获得的序列进行比对,并人工矫正比对结果。

从 GenBank 下载已有两头蛇属物种同源序列,共计 16 条(表 1),选择盐边腹链蛇(*Hebius yanbianensis*)为外群(Liu et al. 2018)。利用 PartitionFinder v2.1.1 (Lanfear et al. 2017) 计算最佳模型后,分别使用 MrBayes v3.2.4 (Ronquist et al. 2012) 和 IQ-tree v2.0 (Minh et al. 2020) 构建贝叶斯树(Bayesian inference, BI)及最大似然树(maximum likelihood, ML)。贝叶斯分析每次包含 3 个独立的运算,每个运算包含 4 个马卡洛夫链(Markov chain Monte Carlo, MCMC),由一个冷链及三个热链构成,每个片段的进化模型依据之前得到的设定,每次运算 5×10^6 代,每 1 000 代对系统树取样;并将起始的 25%运算结果作为老化样本舍弃,后验概率(posterior probabilities, PP)大于 95%的被认为是显著支持;进行最大似然分析时,各支系的支持率由 1 000 次抽样运算提供,各支系自举值(bootstrap, BS)大于 75%被认为是显著支持。用 Mega7 (Kumar et al. 2016) 中的未校正距离模型(uncorrected genetic distance, *p*-distance)估算物种间的遗传距离。

表 1 样本 Cyt b 基因序列信息

Table 1 Information for Cyt b sequences used in this study

物种 Species	标本号 Voucher no.	采集地 Locality	序列号 Sequence ID
本研究 This study	YBU 22810	中国湖南 Hunan, China	OP980549
岭南两头蛇 <i>Calamaria. arcana</i>	KFBG 14611	中国广东 Guangdong, China	ON482335
钝尾两头蛇 <i>C. septentrionalis</i>	KFBG 14506	中国海南 Hainan, China	MH445956
	ROM 35597	越南高平 Cao Bang, Vietnam	KX694890
尖尾两头蛇 <i>C. pavementata</i>	KFBG 14507	中国广西 Guangxi, China	MH445957
云南两头蛇 <i>C. yunnanensis</i>	ROM 41547	中国云南 Yunnan, China	KX694891
贡山两头蛇 <i>C. andersoni</i>	SYS r001699	中国云南 Yunnan, China	MH445955
阿尔卡拉氏两头蛇 <i>C. alcalai</i>	PNM 9873	菲律宾民都洛 Occidental Mindoro, Philippines	MT819383
格维西氏两头蛇 <i>C. gervaisii</i>	KU 324661	菲律宾本格特 Benguet, Philippines	MT819384
	KU 3344858	菲律宾南伊罗戈 Ilocos Sur, Philippines	MT819385
易变两头蛇 <i>C. lumbricoidea</i>	KU 315159	菲律宾三宝颜市 Zamboanga City, Philippines	MT819388
	KU 334479	菲律宾东米萨米斯 Misamis Oriental, Philippines	MT819389
米氏两头蛇 <i>C. muellrei</i>	RMB 1283	印度尼西亚南苏拉威西 South Sulawesi, Indonesia	MT819391
	TNHC 58955		MT819390
巴拉望两头蛇 <i>C. palavanensis</i>	KU 309445	菲律宾巴拉望 Palawan, Philippines	MT819386
	KU 311411		MT819387
盐边腹链蛇 <i>Hebius yanbianensis</i>	GP 4006	中国四川 Sichuan, China	MH532291

2 结果

2.1 形态特征

本次采集标本 YBU 22810 为雄性成体，体型较小，头体长 127 mm，尾长 17 mm（图 1）；头颈区分不明显；颈部有一对白色斑纹；吻鳞较长且宽，背面可见；前额鳞大且与吻鳞相切；额鳞呈六边形且长大于宽；顶鳞长，与眶上鳞、眶后鳞、上唇鳞相切；无鼻间鳞、颊鳞和颞鳞；鼻鳞狭小，鼻孔极小；眶上鳞 1；眶前鳞 1，较小；眶后鳞 1；上唇鳞 4，1-2-1 式；颊鳞与额片不相切；下唇鳞 5，前 3 枚与前额片相切；前额片大于后额片；背鳞平滑；通体 13 行；腹鳞 176 枚；肛鳞完整；尾下鳞成对，20 对；尾部末端背鳞数为 5 行；尾前端未明显变细，但末端突然变细；体背部黑色，腹部玫红色，尾基部有一个白色小斑。该标本与 Yeung 等（2022）所描述的岭南两头蛇形态基本一致，但模式标本的颈部区域无白色斑纹；腹鳞数量

稍少，为 170 枚；尾下鳞数量稍多，为 22 对。

2.2 系统发育关系

最终获得 Cyt b 基因片段长度为 1 050 bp。基于最适模型 GTR + G 构建的贝叶斯和最大似然系统进化树，拓扑结构较为一致，但在一些节点上有轻微差异，因此仅展示贝叶斯树，各分支节点处分别呈现出相对应的后验概率值（PP）与自举值（BS）（图 2）。两头蛇属物种为高支持单系（PP 为 1.00，BS 为 100），永兴县发现的两头蛇物种与岭南两头蛇聚为一支（PP 为 1.00，BS 为 100），并与钝尾两头蛇构成姐妹支系（PP 为 1.00，BS 为 86）。基于 Cyt b 基因序列计算，本次采集的湖南的岭南两头蛇与广东的岭南两头蛇个体间的遗传距离为 1%，其他同属个体之间的遗传距离为 9% ~ 24%（表 2）。

3 讨论

研究显示，采自湖南省永兴县两头蛇标本

与广东南岭的两头蛇模式标本在形态上基本一致，仅腹鳞和尾下鳞存在微小差异；分子系统发育关系结果也显示，永兴县的两头蛇标本与广东南岭的岭南两头蛇形成高支持率单系群，遗传距离仅为 0.01；因此，结合形态学和分子生物学证据，确定永兴县采集的两头蛇标本为

岭南两头蛇，系湖南省蛇类分布新记录种（高志伟等 2022, Uetz et al. 2022）。

岭南两头蛇为穴居型的小型无毒蛇，多以蚯蚓和昆虫幼虫为食，主要栖息于丘陵及平原的阴暗环境中。本次报道的标本采集于雨后的早晨，天气凉爽，采集地点位于乡村道路旁的枯叶

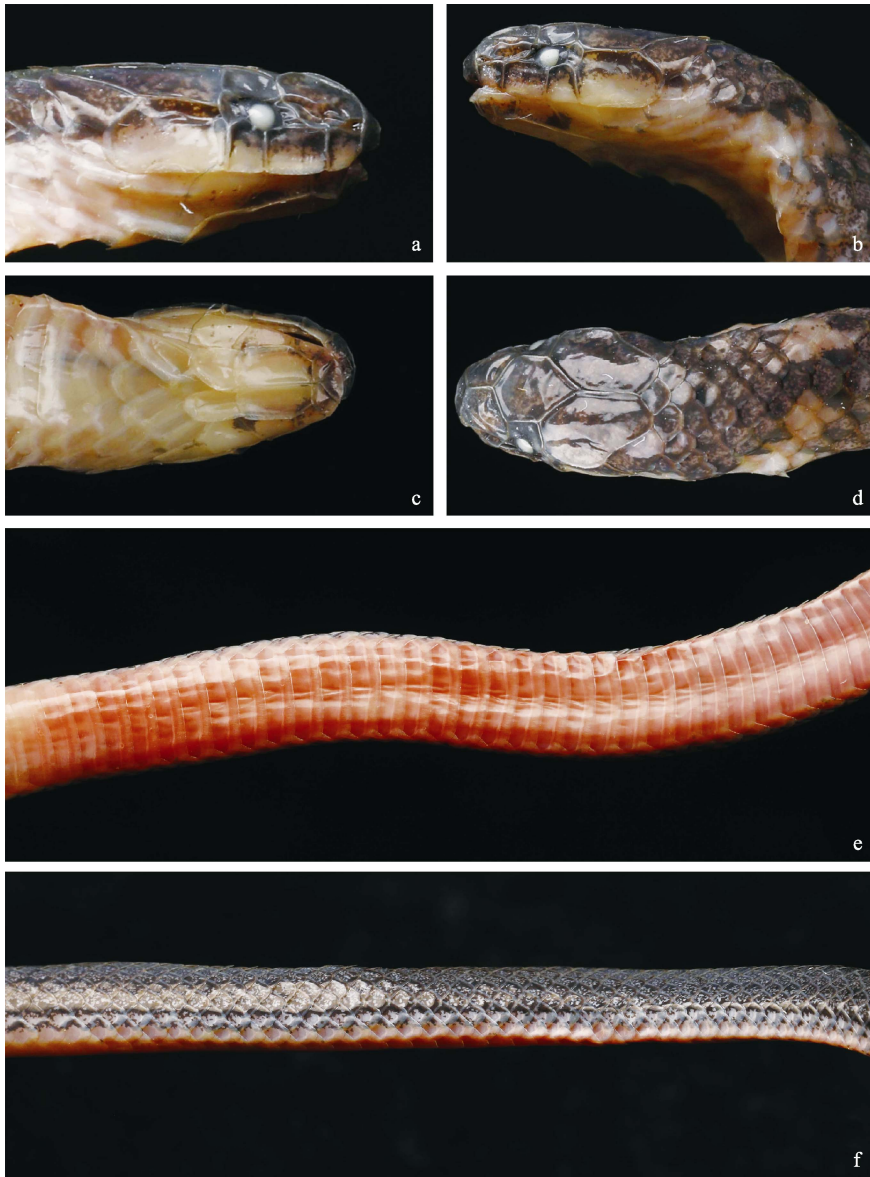


图 1 岭南两头蛇标本（采自湖南郴州永兴县）

Fig. 1 The specimen of *Calamaria arcana* from Yongxing County, Hunan Province

a. 头部右侧; b. 头部左侧; c. 头部腹面; d. 头部背面; e. 体中段腹面; f. 体中段侧面。

a. Right lateral; b. Left lateral; c. Head ventral; d. Head dorsal; e. Ventral view of mid-body; f. Lateral view of mid-body.

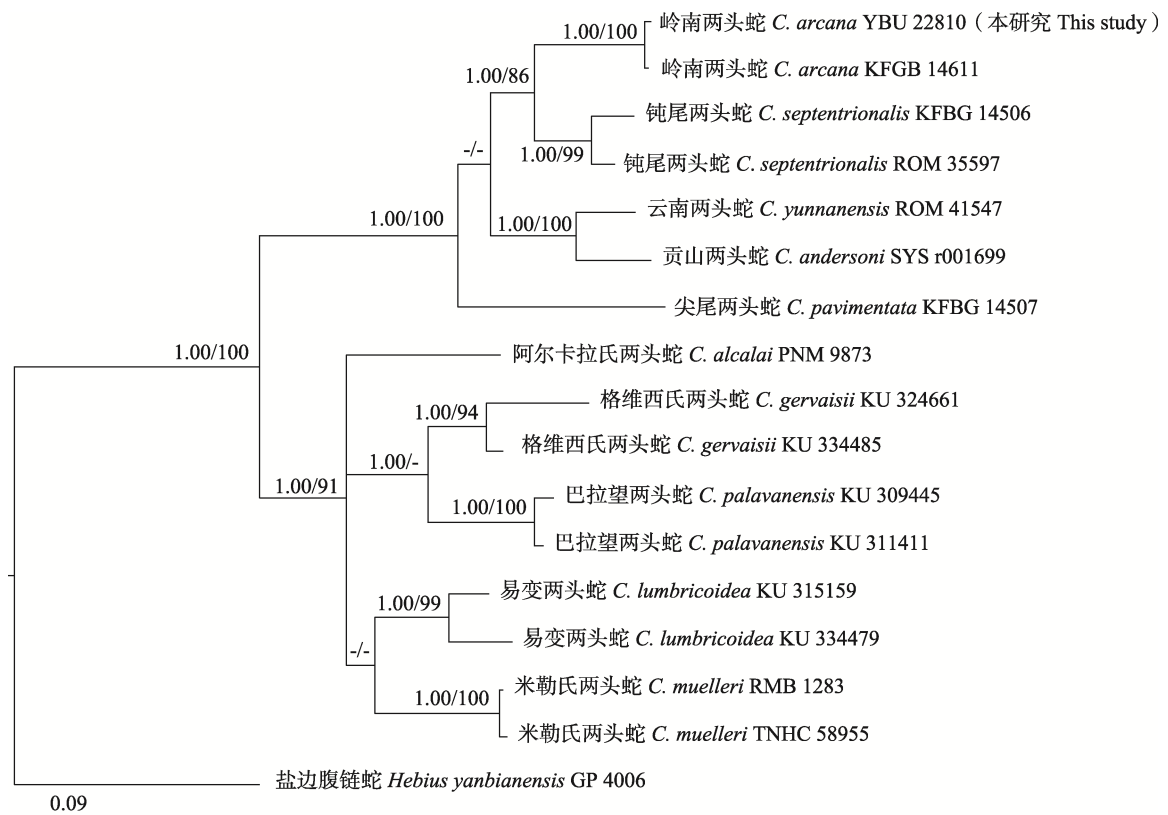


图 2 基于 *Cyt b* 基因序列构建的两头蛇属部分物种的贝叶斯系统发育树

Fig. 2 Phylogeny of genus *Calamaria* based on *Cyt b* gene sequences

数字代表贝叶斯后验概率/自举值。符号“-”表示贝叶斯后验概率小于 0.9 或自举值小于 70%。
Numbers above branches are Bayesian posterior probabilities and bootstrap support values for maximum likelihood analyses. “-” represents Bayesian posterior probabilities lower than 0.9 or bootstrap support lower than 70%.

堆中，周边植被覆盖度较高，为竹林、灌木乔木混交林，近处有一常年流动的溪流。该区域属亚热带季风性湿润气候，全年气温偏高，年均温度为 16~18℃，年降水量为 1 250~1 643 mm，具有湖南省少有的雨林特征。调查显示，本区域栖息的两栖类主要为蛙科（*Ranidae*）、叉舌蛙科（*Dicroglossidae*）和蟾蜍科（*Bufonidae*）物种，爬行类有乌梢蛇（*Ptyas dhumnades*）、银环蛇（*Bungarus multicinctus*）和原矛头蝮（*Protobothrops mucrosquamatus*）等。

高志伟等（2022）对湖南省爬行动物的调查中，并未发现岭南两头蛇的存在，按照湖南动物地理区系划分，永兴县属于湘南山地丘陵

区，是湖南省两栖爬行动物多样性最为丰富的地区。此次岭南两头蛇的发现，增加了对湖南地区爬行动物多样性的认知，至此，湖南的爬行动物种类由原来的 105 种（高志伟等 2022）增加到 106 种。

两头蛇因其隐秘的生活习性以及同属物种间形态的高度相似性，导致该类群通常难以区分，目前对该属物种整体了解较少（Yang et al. 2018, Yeung et al. 2022）。岭南两头蛇曾长期被误鉴定为尖尾两头蛇，后经分子系统发育分析，确定其新种地位（Yeung et al. 2022）；贡山两头蛇与岭南两头蛇均为近 5 年新描述的物种，表明中国的两头蛇物种多样性可能被低

表 2 基于 Cyt b 基因两头蛇属不同种个体间的遗传距离估算

Table 2 Uncorrected pairwise sequence divergences of genus Calamaria based on Cyt b gene

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 岭南两头蛇 <i>Calamaria arcana</i> YBU 22810*																	
2 岭南两头蛇 <i>C. arcana</i> KFGb 14611	0.01																
3 钝尾两头蛇 <i>C. septentrionalis</i> KFBG 14506	0.11	0.12															
4 钝尾两头蛇 <i>C. septentrionalis</i> ROM 35597	0.09	0.10	0.04														
5 尖尾两头蛇 <i>C. pavementata</i> KFBG 14507	0.19	0.19	0.18	0.19													
6 云南两头蛇 <i>C. yunnanensis</i> ROM 41547	0.18	0.18	0.14	0.14	0.21												
7 贡山两头蛇 <i>C. andersoni</i> SYS r001699	0.19	0.19	0.13	0.14	0.23	0.11											
8 阿尔卡拉氏两头蛇 <i>C. alcalai</i> PNM 9873	0.23	0.22	0.23	0.25	0.28	0.23	0.22										
9 格维西氏两头蛇 <i>C. gervaisii</i> KU 324661	0.20	0.20	0.18	0.21	0.25	0.22	0.20	0.20									
10 格维西氏两头蛇 <i>C. gervaisii</i> KU 334485	0.22	0.22	0.19	0.20	0.23	0.23	0.21	0.15	0.10								
11 易变两头蛇 <i>C. lumbricoidea</i> KU 315159	0.24	0.24	0.24	0.22	0.26	0.22	0.25	0.15	0.23	0.16							
12 易变两头蛇 <i>C. lumbricoidea</i> KU 334479	0.24	0.24	0.22	0.25	0.26	0.25	0.26	0.19	0.22	0.19	0.08						
13 米勒氏两头蛇 <i>C. muelleri</i> RMB 1283	0.18	0.19	0.20	0.22	0.26	0.23	0.22	0.16	0.17	0.16	0.14	0.14					
14 巴拉望两头蛇 <i>C. muelleri</i> TNHC 58955	0.19	0.20	0.20	0.22	0.26	0.24	0.22	0.17	0.17	0.17	0.14	0.14	0.01				
15 巴拉望两头蛇 <i>C. palavanensis</i> KU 309445	0.23	0.23	0.20	0.22	0.24	0.23	0.23	0.15	0.17	0.11	0.15	0.18	0.17	0.18			
16 巴拉望两头蛇 <i>C. palavanensis</i> KU 311411	0.23	0.23	0.19	0.20	0.23	0.22	0.21	0.15	0.15	0.10	0.16	0.19	0.17	0.18	0.02		
17 盐边腹链蛇 <i>Hebius yanbianensis</i> GP 4006	0.22	0.21	0.19	0.21	0.28	0.26	0.22	0.24	0.26	0.23	0.29	0.29	0.23	0.22	0.25	0.24	

本研究。 This study.

估，还需深入研究。

岭南两头蛇此前仅知分布于广东北部南岭地区，模式产地海拔为 700~800 m，此次发现点海拔为 174 m，表明岭南两头蛇的实际栖息海拔跨度可能更大。于湖南郴州永兴县发现岭南两头蛇，进一步补充了该物种的形态描述，丰富了该物种的地理分布信息。

参 考 文 献

Burbrink F, Tlawson R, Slowinski J B. 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American Rat Snake (*Elaphe obsoleta*): A critique of the subspecies concept. *Evolution*, 54(6): 2107–2118.

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

Lanfear R, Frandsen P B, Wright A M, et al. 2017. PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3): 772–773.

Liu Q, Zhong G H, Wang P, et al. 2018. A new species of the genus *Hebius* (Squamata: Colubridae) from Sichuan, China. *Zootaxa*, 4483(2): 385–394.

Minh B Q, Schmidt H A, Chernomor O, et al. 2020. IQ-TREE2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5): 1530–1534.

Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, (1): 2–3.

Ronquist F, Teslenko M, van Der Mark P, et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539–542.

Uetz P, Freed P, Aguilar R, et al. 2023. The Reptile Database. [DB/OL]. [2023-02-13]. <http://www.reptile-database.org>.

Yang J H, Zheng X. 2018. A new species of the genus *Calamaria* (Squamata: Colubridae) from Yunnan Province, China. *Copeia*, 106(3): 485–491.

Yeung H Y, Lau M W N, Yang J H. 2022. A new species of *Calamaria* (Squamata: Colubridae) from Guangdong Province, southern China. *Vertebrate Zoology*, 72(1): 433–444.

高志伟, 钱天宇, 江建平, 等. 2022. 湖南省两栖、爬行动物物种多样性及其地理分布. *生物多样性*, 30(2): 101–115.

赵尔宓, 黄美华, 宗愉. 1998. 中国动物志：爬行纲 第三卷 有鳞目 蛇亚目. 北京: 科学出版社.

（上接第 606 页）

2018 年 8 月中旬，于四川省会理县马宗乡采集到 3 号云南竹叶青蛇怀孕雌蛇（图 1b，表 1）。雌蛇全身绿色，尾部末端为砖红色。带回实验室单独于养殖箱（长 × 宽 × 高为 150 cm × 80 cm × 100 cm），各养殖箱顶端架设一个爬行动物加热灯泡（30 W，加热时间 9:00 ~ 16:00 时），并提供充足饮水和食物，每 5 日喂食 2 或 3 只小白鼠。在实验室条件下，所有雌蛇均自主进食。怀孕后期雌蛇体态肥硕，腹部明显膨大。

表 1 云南竹叶青蛇繁殖情况统计

Table 1 Data on pregnant female and newborns of *Viridovipera yunnanensis* biometrics

个体编号 Individual ID	怀孕雌体特征 Traits of pregnant female				幼体特征 Traits of newborn		
	头体长 Snout-vent length (mm)	尾长 Tail length (mm)	体重 Body mass (g)	窝仔数 Litter size	头体长 Snout-vent length (mm)	尾长 Tail length (mm)	体重 Body mass (g)
1 号 No. 1	751	119	222.8	6♂ 7♀	202.8 ± 3.1	43.2 ± 3.2	4.6 ± 0.2
2 号 No. 2	687	148	168.6	3♂ 5♀	218.1 ± 5.1	47.6 ± 2.3	6.4 ± 1.2
3 号 No. 3	700	155	174.3	5♂ 2♀	239.6 ± 5.7	50.1 ± 3.8	8.8 ± 0.2
平均值 ± 标准误 Mean ± SE	712.7 ± 33.8	140.7 ± 19.1	188.6 ± 29.8	9.3 ± 3.2	217.4 ± 15.8	46.4 ± 4.2	6.3 ± 1.9

2018 年 9 月 5 日 12 时左右，1 号雌蛇开始产仔，至 18 时许，共生仔蛇 11 条，其中，2 条仔蛇在出生时已死亡；9 月 6 日晚，该雌蛇再次产下 2 条仔蛇；最终，1 号雌蛇共产仔蛇 13 条（表 1）。9 月 10 日 10 时和 12 时，2 号和 3 号雌蛇先后开始产仔，至 18 时许，分别产下 8 条和 7 条仔蛇。新生仔蛇通身绿色，尾尖棕红色或白色（图 1c，表 1）。多数仔蛇出生后 5 d 左右完成第一次蜕皮，出生后 30 d，通过性别探针结合挤压泄殖腔的方式判定个体性别，探针能较深入泄殖腔后端或能轻松挤压出半阴茎，则该个体为雄性，否则为雌性；出生时已死亡的个体通过解剖生殖系统的方式判定个体性别。

雌蛇开始产仔时，尾部上翘，身体收缩，并缓慢向前蠕动；泄殖腔孔增大，逐渐露出半透明的卵膜以及盘曲在卵膜内的仔蛇；雌蛇继续收缩蠕动，直至带有仔蛇的卵膜完全排出，整个过程约持续 5 min。刚出生的仔蛇还未完全脱离卵膜，逐步从卵膜的破裂口钻出，并在向前蠕动过程中，使得连接泄殖腔的脐带脱落，整个过程约持续 20 min。仔蛇脱离卵膜后，便可四处活动。新生仔蛇未与母体在一起，未见雌蛇存在护幼与抚育行为，但多数仔蛇会聚集在一起。当仔蛇受到侵扰时，会张开嘴做出扑咬的动作。

（下转第 639 页）