

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.02.015

基于形态特征和线粒体 12S、Cyt b 和 ND4 基因片段的横斑锦蛇和玉斑锦蛇的关系研究

安小燕^{1,2}, 黄燕^{2*}, 丁利³, 干少雄¹, 毛晓陶⁴, 李书彬⁴

(1. 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081;

2. 西华师范大学生命科学学院珍稀动植物研究所, 四川 南充 637009;

3. 中科院成都生物研究所, 四川 成都 610041; 4. 天全县林业局, 四川 雅安 625500)

摘要: 本文通过对横斑锦蛇(*Elaphe perlacea*)肌肉线粒体 DNA 的提取, 对其中的 3 个基因—12SRNA、ND4 和细胞色素 b 进行扩增、测序, 与玉斑锦蛇(*Elaphe mandarinus*)及锦蛇属(*Elaphe*)17 个物种的相同基因片段重建系统发育树。系统发育结果表明横斑锦蛇与玉斑锦蛇系统发育关系最近, 但是两者不是同一个物种。最后将横斑锦蛇和玉斑锦蛇的外部特点进行对比, 发现横斑锦蛇与玉斑锦蛇在形态特征上存在稳定性差异。

关键词: 横斑锦蛇(*Elaphe perlacea*); 线粒体 DNA; 玉斑锦蛇(*Elaphe mandarinus*); 系统发育关系; 形态特征
中图分类号: Q959.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5508(2017)02-0085-06

Relationships Between *Elaphe perlacea* and *Elaphe mandarinus* Based on Morphological Characters and Mitochondrial 12S, Cyt b and ND4 Gene Sequences

AN Xiao-yan^{1,2} HUANG Yan^{2*} DING Li³ GAN Shao-xiong¹
MAO Xiao-tao⁴ LI Shu-bin⁴

(1. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China;

2. Institute of Rare Animals and Plants, West China Normal University, Nanchong 637009, China;

3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

4. Tianquan County Forestry Bureau, Ya'an 625500, China)

Abstract: *Elaphe perlacea* belongs to *Elaphe*, Megapodiidae. Stejneger collected a male specimen in Ya'an and named it *Elaphe perlacea* in 1929. The number of *Elaphe perlacea* is rare, and its distribution areas are limited. *Elaphe perlacea* is the least studied species of *Elaphe*. *Elaphe mandarinus* also belongs to *Elaphe*, and it was named in 1882. Due to the similarities in heads and tails of both species and the limited information, it is difficult to differentiate the two species. In 2010, a specimen of *Elaphe perlacea* was collected in Fengtongzhai Nature Reserve of Ya'an. We obtained DNA sequence data of *Elaphe perlacea* (complete sequences of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 4 [ND4] gene, cytochrome b gene and 12S rRNA partial sequences) and established phylogeny trees to examine the relationship of *Elaphe* species. The phylogenetic tree showed that *Elaphe perlacea* and *Elaphe mandarinus* were sister species, but also two valid species. And we also examined the morphological characters of *Elaphe perlacea* and *Elaphe man-*

收稿日期: 2016-12-13

基金项目: 天全县润楠、香果树和横斑锦蛇极小种群拯救保护项目调查监测、生境营造及技术培训部分(项目编号: 天政采招[2014] 26号)。

作者简介: 安小燕(1987-), 女, 四川宜宾, 中学二级教师。

* 通讯作者: 黄燕(1982-), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向: 动物学。

darinus, and found that there were stable differences between them.

Key words: *Elaphe perlacea*, Mitochondrial DNA, *Elaphe mandarinus*, phylogeny relationship; morphological characters

横斑锦蛇 (*Elaphe perlacea*) 隶属游蛇科 (Colubridae) 锦蛇属 (*Elaphe*), 是我国四川省西部的特产动物。由美国学者 Stejneger L 于 1929 年依据采于雅安的一号雄蛇标本发表的新种。模式标本保存在美国博物馆。近 50 年未见再有报道, 有人认为可能绝灭。1980、1987、1988 年先后在汶川县卧龙自然保护区及泸定县海螺沟森林冰川公园获得锦蛇属标本 3 号。经鉴定为该种, 分别保存在四川师范学院 (现西华师范大学) 生物系和中国科学院成都生物研究所 (邓其祥, 江耀明, 1989)。横斑锦蛇蛇体全长 1 m 左右, 头呈椭圆形, 与颈区分不明显, 头背具对称排列的大鳞。吻鳞宽大于高, 从背面可见部分较多, 鼻孔较大, 位于前后两枚鼻鳞之间。颊鳞 1, 眼前鳞 1。眼后鳞 2, 上唇鳞 7, 2-2-3 式, 下唇鳞 8, 前 3 或 4 枚切前额片。背鳞 19-19-17 行, 平滑或中段部分鳞行起棱。肛鳞二分, 尾下鳞双行。全长 865 + 194、1055 + 189、884 + 146 毫米。背面灰色, 具有几乎等距排列的黑色横斑。每一横斑占 2 鳞行, 边缘镶有不甚清晰的白色。每两个相邻的横斑在腹面连接成卵圆形环, 环内横斑间相隔 1-2 鳞行, 前后两环间相隔 3-4 鳞行。体背卵圆形环 36-37 个, 尾部 9 个。头背前部有 2 黑色横斑, 其后为两个前后彼此相连的倒“V”形黑色斑。第一黑横斑位于吻鳞与鼻鳞之间, 前鼻鳞至第一上唇鳞而与下唇缘黑点相吻合, 第二黑横斑位于前额鳞, 经眼上鳞至眼。分为前后 2 支, 前支从眼前鳞到第三、四上唇鳞之间。后支从眼后鳞经前颞鳞斜向第五、六上唇鳞之间。第一倒“V”形黑斑自额鳞, 经顶鳞后颞鳞后方向前弯至下唇鳞内侧, 第二倒“V”形斑自顶鳞向外斜至颈侧腹面与颈部倒“V”形黑斑连接成第一卵圆形环 (胡杰, 李艳红等, 2002)。至今对横斑锦蛇的研究少之又少, NCBI 上还未收录关于横斑锦蛇的任何基因序列。

玉斑锦蛇 (*Elaphe mandarinus*) 隶属游蛇科锦蛇属 (*Elaphe*), 1882 年首先被 Cantor 发现并命名为 *Coluber Mandarinu*, 玉斑锦蛇全长 1 m 左右, 尾长约为全长的五分之一。背面紫灰或灰褐色, 正背有一行 18~31 + 6~11 个约等距排列的黑色大菱斑, 菱斑中心黄色; 腹面灰白色, 散有长短不一, 交互排列

的黑斑。头背黄色, 有典型的黑色倒“V”字型套叠斑纹。眶前鳞 1, 眶后鳞 2; 颞鳞 2(1) + 3(2); 上唇鳞 7, 2-2-3 式, 或 8, 3-2-3 或 2-2-4 式; 下唇鳞 9, 前 4 枚切前额片。背鳞 23-23-19 行, 平滑; 腹鳞 181~238; 肛鳞二分; 尾下鳞 53~75 对。

通过外表形态可以看出横斑锦蛇和玉斑锦蛇的头部和尾部斑纹较为相似, Schulz 在 1989 提出横斑锦蛇是玉斑锦蛇的变异体, 并且有许多人认为横斑锦蛇和玉斑锦蛇是同一个物种。可是仅从外表形态判断横斑锦蛇和玉斑锦蛇的关系是不够的, 也是不足以说服他们之间的关系。在过去的 20 年中, 分析线粒体作为一个多功能的 DNA 基因已被成功和有效的工具, 调查的亲缘关系。蛇最常见的使用的片段是线粒体细胞色素 b (细胞色素 b) 和/或 NADH 脱氢酶亚单位 4 (ND4 基因) 基因 (例如克劳斯和布朗, 1998 年 Kelly 等人, 2003 年。Malhotra 和索普, 2004 年, 劳森等人, 2005 年; Burbrink 和 Lawson, 2007)。本文拟从线粒体 DNA 及形态特征上对横斑锦蛇及玉斑锦蛇的关系进行研究。

12SRNA 在序列中是较保守的序列。现在通过提取横斑锦蛇线粒体 DNA, 并对其中的 3 个基因 12SRNA、ND4、细胞色素 b 进行扩增、测序, 最后与玉斑锦蛇的相应的线粒体 DNA 片段进行比较, 建立分子系统树, 计算遗传距离的方法来证明横斑锦蛇和玉斑锦蛇是两个不同的物种。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试实验材料为 2010 年在雅安市蜂桶寨自然保护区采集的横斑锦蛇标本的肌肉组织。玉斑锦蛇及锦蛇属其余物种的基因序列来自于 NCBI (表 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取

本研究中采用常规的苯酚-氯仿法提取总 DNA, 步骤如下:

(1) 取材: 取用 95% 乙醇保存的蛇肌肉 30 mg ~ 50 mg 于 1.5 ml 的 EP 管中。取样是要注意清洁, 避免交叉污染。将 EP 管中的酒精倒干, 用 dd H₂O

清洗一遍,或将样品置于 55℃ 的烘箱中至无酒精味即可。

表 1 17 个物种的 GenBank 登陆号

Tab. 1 17 species's genBank numbers

拉丁学名	cytb	ND4	12s
<i>Coronella girondica</i>	AF471088	AY487066	AY122835
<i>Elaphe carinata</i>	DQ902133	DQ902284	AY122838
<i>Elaphe climacophora</i>	DQ902105	DQ902285	AY122772
<i>Elapheb quadrivirgata</i>	DQ902120	DQ902300	AY122794
<i>Elaphe quatuorlineata</i>	AY486931	AY487067	AY122796
<i>Elaphe schrenckii</i>	DQ902124	DQ902302	AY122804
<i>Euprepiophis mandarinus</i>	DQ902115	DQ902294	AY122784
<i>Oocatochus rufodorsatus</i>	DQ902123	DQ902301	AY122800
<i>Oreophis porphyraceus</i>	DQ902118	DQ902305	AY122790
<i>Orthriophis taeniurus</i>	EF076709	DQ902298	AY122809
<i>Rhinechis scalaris</i>	AY486932	AY487068	AY122801
<i>Zamenis hohenackeri</i>	DQ902137	DQ902320	AY122779
<i>Arizona elegans</i>	DQ902101	DQ902279	AY122810
<i>Bogertophis rosaliae</i>	DQ902102	AF138751	AY122815
<i>Pseudelaphe flavirufa</i>	DQ902109	DQ902289	AY122841
<i>Pantherophis obsoletus</i>	AF283644	DQ902296	AY122843
<i>Senticolis triaspis</i>	DQ902127	AF138775	AY122848

(2) 消化:将 EP 管中加入 450 μL Tris-HCl 裂解缓冲液,再加 50 μL 10% SDS。最后加蛋白酶 K (PK) 10 μL 。50℃ 水浴 20 h 左右,至样品全部裂解至溶液澄清(期间要多次振荡)。

(3) 抽提 1:加等体积苯酚(约 510 μL),翻转振荡 10 min。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液。

(4) 抽提 2:将上清液取入另一个干净的 EP 管,针对上清液的量加一半的苯酚和一半的氯仿,翻转振荡 8 min ~ 10 min。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。

(5) 抽提 3:取上清液于干净 EP 管中,加入等体积的氯仿,可加至 1 000 μL ,振荡 8 min ~ 10 min。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。

(6) 沉淀:取上清液于一个干净的 EP 管中,加入上清液体积的 10% 的 3 Mol/L 的 NaAC。再加入总量 2 ~ 2.5 倍体积的 -20℃ 冰冻的无水乙醇。一个一个轻轻混匀。冰箱 -20℃ 冷冻 30 min(也可冷藏时间稍长或过夜)。13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,轻轻倾倒完液体(此步需要小心操作避免 DNA 块被倒出)。

(7) 漂洗:取 70% 的酒精 120 μL 于 EP 管内,轻旋后把酒精倒掉,斜于卫生纸上,除去剩余的乙醇。

(8) 溶解:在每个样品管中加入适量的 dd H₂O,一般加 40 μL ~ 50 μL 溶解 DNA。在离心机内轻甩一下,4℃ 保存备用。

(9) 电泳检测:用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA,根据点样的含量和条带的亮度,估计 DNA 的

浓度,方便以后的实验。

1.2.2 PCR 的扩增

细胞色素 b 的引物:L14910/H16064 (Burbrink et al., 2000)

ND4 的引物:ND4/Leu (Arévalo et al., 1994)

12S 的引物:L1091mod/H1557mod (Zaher et al., 2009)

反应体积为 25 μL ,包括配备的反应缓冲液 2.5 μL , 2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTP 2 μL , 10 pmol $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL , 2.5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 聚合酶 0.25 μL , 总 DNA 1 μL (含 10 ng ~ 100 ng DNA), dd H₂O 补足到 25 μL 。12S 扩增条件如下:95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 40 s, 57℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 60 s, 最后一个循环 72℃ 再延伸 5 min, 循环次数为 35 次; 最后 4℃ 保存。ND4 和细胞色素 b 扩增条件如下:95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 20s, 循环次数为 35 次; 最后一个循环 72℃ 再延伸 5 min, 最后 4℃ 保存。

1.2.3 PCR 产物的纯化

PCR 产物的纯化均采用柱式 PCR 产物回收试剂盒纯化。回收步骤按照试剂盒使用说明书进行。纯化后用琼脂糖凝胶电泳检测条带。

1.2.4 测序

将纯化的 PCR 产物委托生物技术公司测定。

1.2.5 数据分析

DNA 序列用 Bioedit 软件 (Hall, 1999) 的 Clustal W Multiple alignment 进行比对,并辅以人工校正和编辑,同时拼接 12S rRNA、细胞色素 b 和 ND4。由于细胞色素 b 和 ND4 是双向测序,在拼接 ND4 时,要仔细核查峰图文件。同时与近缘种如玉斑锦蛇等的序列进行比对。在 GenBank 下载玉斑锦蛇的同段基因序列作为参照模板进行编辑。

分别在 GenBank 上下载亲缘关系较近的 17 个物种的 12S rRNA、细胞色素 b 和 ND4 序列,同时拼接 12S rRNA、细胞色素 b 和 ND4 序列。

采用 MEGA 4.0 软件 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2006) 计算核苷酸的组成、变异位点数目等序列特征,用 Kimura 2-parameter 模型,计算不同种群间的遗传距离。

采用邻接法 (neighbor-joining, or NJ), 分别对 12S rRNA、细胞色素 b、ND4 以及它们的拼接序列构建分子系统发育树。NJ 法计算进化树时去除序列间的成对缺失,并对进化树进行自举检验 (boot-

strap),重复抽样1 000次,此法在 MEGA4.0 中执行。

2 结果和分析

2.1 横斑锦蛇和玉斑锦蛇的外形特点比较

从横斑锦蛇和玉斑锦蛇的外形特征上比较,横斑锦蛇全长 1m 以上,尾长占全长的 1/5 左右。背鳞 19~19~17 行,腹鳞 224~231,肛鳞二分,尾下鳞 57~69 对。眶前鳞 1,眶后鳞 2;颞鳞 1+2;上唇鳞 7,2-2-3 式;下唇鳞 8 或 9,前 4(3)枚切前颌片。躯尾背面呈不规则的窄横纹;头背斑纹的典型特征是:前端有两条黑横纹,一横跨吻背,一横跨两眼间,在眼下伸达唇缘,眼后另有一短黑纹斜达口角;头顶部有 2~3 个尖端向前,彼此套迭的倒“V”字形黑纹。玉斑锦蛇全长 1 m 左右,尾长约为全长的 1/5。背面紫灰或灰褐色,正背有一行 18~31+6~11 个约等距排列的黑色大菱斑,菱斑中心黄色;腹面灰白色,散有长短不一,交互排列的黑斑。头背黄色,有典型的黑色倒“V”字型套叠斑纹。眶前鳞 1,眶后鳞 2;颞鳞 2(1)+3(2);上唇鳞 7,2-2-3 式,或 8,3-2-3 或 2-2-4 式;下唇鳞 9,前 4 枚切前颌片。背鳞 23-23-19 行,平滑;腹鳞 181~238;肛鳞二分;尾下鳞 53~75 对(表 2)。

表 2 横斑锦蛇和玉斑锦蛇的鳞被特征比较

Tab. 2 Comparison of *Elaphe perlacea* and *Elaphe mandarinus*'s squama

类别	横斑锦蛇	玉斑锦蛇
背鳞	19~19~17 行	23-23-19 行
腹鳞	224~231	181~238
肛鳞	二分	二分
尾下鳞	57~69 对	53~75 对
眶前鳞	1	1
眶后鳞	2	2
颞鳞	1+2	2(1)+3(2)
上唇鳞	7,2-2-3 式	7,2-2-3 式或 8,3-2-3 或 2-2-4 式
下唇鳞	8 或 9	9
前颌片	4(3)枚	前 4 枚

通过外形比较,横斑锦蛇和玉斑锦蛇的外部特点确实相似。虽然在任何地区理解蛇的多样性历来依靠形态分析数据,但是形态数据已被证明难以揭开神秘的多样性理解物种间的关系。最终要通过分子水平进行验证。

2.2 序列特征

12S + cytb + ND4 合并后的序列,将样本的 3 个基因片段连接后,得到 2 417 bp。其中变异位点 951 个,简约信息位点 707 个,平均转换与颠换之比 R =

2.014,平均 T、C、A、G 的百分含量分别为 26.3%,27%,34.5%,12.2%,G+C 含量为 39.2%。

2.3 使用邻接法(NJ)构建分子系统发生树

根据所测序列,采用邻接法构建 16 种蛇系统发生树,所研究的 16 种蛇分成 4 个支系(图 1)。第 1 个支系包括剑蛇属(*Sibynophis*)的两种蛇,自举检验置信度为 100;第 2 个支系为雅蛇属(*Rhadinophis*),自举检验置信度为 39;德州鼠蛇(*Elaphe obsoleta*),鲍氏蛇属(*Bogertophis rosaliae*),光滑蛇(*Arizona elegans*)构成第 3 支系。自举检验置信度为 45。其他几种蛇构成第 4 支系。第 1 支系剑蛇属在系统树的最基部,为 16 种中较原始的类群。

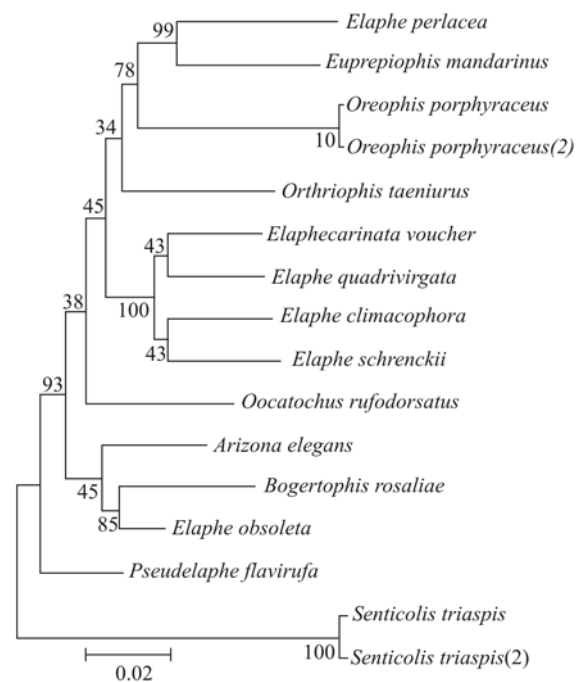


图 1 NJ 法构建系统发育树(N-J tree of 16 species)

2.4 遗传距离(如图 3.2 所示)

通过遗传距离表可以看出,横斑锦蛇(*Elaphe perlacea*)和玉斑锦蛇(*Elaphe mandarinus*)之间的遗传距离是 0.126,其中王锦蛇(*Elaphe carinata voucher*)与日本四线锦蛇(*Elaphe quadrivirgata*)之间的遗传距离 0.111,王锦蛇(*Elaphe carinata voucher*)与棕黑锦蛇(*Elaphe carinata voucher*)的遗传距离 0.121,青大将(*Elaphe climacophora*)和日本四线锦蛇(*Elaphe quadrivirgata*)的遗传距离 0.114,即:王锦蛇与日本四线锦蛇遗传距离 0.111 < 青大将和日本四线锦蛇的遗传距离 0.114 < 王锦蛇与棕黑锦蛇的遗传距离 0.121 < 横斑锦蛇和玉斑锦蛇之间的遗传距离是 0.126。这说明横斑锦蛇确实已经达到不同物种间的最小遗传距离。

表 3
Tab. 3
16 种蛇之间的遗传距离
Genetic distance of 16 species

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	其中:[1] # <i>Elaphe perlacea</i>
1																[2]# <i>Euprepiophis mandarinus</i>
2																[3]# <i>Elaphe carinata voucher</i>
3	0.164	0.162														[4]# <i>Elaphe climacophora</i>
4	0.157	0.166	0.116													[5]# <i>Oreophis porphyraceus</i>
5	0.169	0.153	0.171	0.175												[6]# <i>Bogertophis rosaliae</i>
6	0.183	0.178	0.165	0.17	0.182											[7]# <i>Pseudelaphe flavirufa</i>
7	0.167	0.176	0.165	0.153	0.174	0.152										[8]# <i>Senticolis triaspis</i>
8	0.208	0.207	0.182	0.192	0.208	0.2	0.174									[9]# <i>Elaphe quadrivirgata</i>
9	0.165	0.163	0.111	0.114	0.158	0.178	0.163	0.192								[10]# <i>Elaphe schrenckii</i>
10	0.161	0.171	0.121	0.117	0.168	0.171	0.169	0.192	0.118							[11]# <i>Oocatochus rufodorsatus</i>
11	0.172	0.158	0.156	0.164	0.157	0.172	0.16	0.191	0.158	0.159						[12]# <i>Oreophis porphyraceus</i> (2)
12	0.169	0.153	0.171	0.175	0	0.182	0.174	0.208	0.158	0.168	0.157					[13]# <i>Orthriophis aeniurus</i>
13	0.164	0.164	0.156	0.155	0.162	0.176	0.157	0.205	0.157	0.161	0.157	0.162				[14]# <i>Arizona elegans</i>
14	0.173	0.177	0.163	0.169	0.173	0.15	0.144	0.18	0.168	0.172	0.158	0.173	0.165			[15]# <i>Elaphe obsoleta</i>
15	0.168	0.164	0.149	0.155	0.172	0.135	0.135	0.189	0.152	0.16	0.155	0.172	0.152	0.142		[16]# <i>Senticolis triaspis</i> (2)
16	0.208	0.207	0.182	0.192	0.208	0.2	0.174	0	0.192	0.192	0.191	0.208	0.205	0.18	0.189	

4 讨论

4.1 实验技术的讨论

在采用常规的 95℃ 循环变性扩增时,最初用了不同的梯度测试 12 s 的扩增效果,最后检测出来发现在 51℃ ~ 58℃ 之间不同的温度梯度下扩增出来的效果都较好,在细胞色素 b 中,在 95℃ 变性过程中可以适当延长至 1 min,退火的温度也可以增加为 58℃。在检测扩增产物的过程中发现,如果电泳的时间超过 30 min,可能导致检测结果出现拖带的情况,这也许是引物二聚体引起的结果偏差。

4.2 横斑锦蛇与玉斑锦蛇的关系

通过 NJ 法建立的系统发生树中剑蛇属在系统树的最底部,表明在这 16 种蛇中是比较原始的。在最上层的是横斑锦蛇和玉斑锦蛇,说明这两种锦蛇在广义锦蛇属中的分化时间较晚。支持横斑锦蛇与玉斑锦蛇为姐妹群的支持率为 99,说明这两个物种系统发育关系很近,拥有最近共同祖先。从遗传距离表中也可以看出,横斑锦蛇和玉斑锦蛇的遗传距离为 0.126,比王锦蛇与日本四线锦蛇之间的遗传距离 0.111,王锦蛇与棕黑锦蛇的遗传距离 0.121,青大将和日本四线锦蛇的遗传距离 0.114,都要更大,因此更加说明了横斑和玉斑的遗传距离确实也达到了种的水平。

鳞被特征常常最为爬行动物分类的最重要的鉴别特征。通过查找资料发现在形态特征上,横斑锦蛇与玉斑锦蛇主要在以下方面有较稳定的区别:横斑锦蛇的背鳞 19 ~ 19 ~ 17 行,腹鳞 224 ~ 231,而玉

斑锦蛇的背鳞 23 - 23 - 19 行,腹鳞 181 ~ 238;横斑锦蛇的尾下鳞 57 ~ 69 对,而玉斑锦蛇的尾下鳞 53 ~ 75 对;横斑锦蛇的上唇鳞 7,2 - 2 - 3 式,下唇鳞 8 或 9,而玉斑锦蛇的上唇鳞 7,2 - 2 - 3 式,或 8,3 - 2 - 3 或 2 - 2 - 4 式,下唇鳞是 9。这些鳞被之间的稳定性差异说明了横斑锦蛇和玉斑锦蛇是不同的物种。这与赵尔宓(2003)的结果一致。支持横斑锦蛇为一有效物种。

4.3 横斑锦蛇的保护

总的来说,横斑锦蛇的分布十分狭窄,数量也相当稀少。据四川省陆生野生动物调查估计数量不足一万只。同时,横斑锦蛇的分布是不均衡的,在某些局部区域数量相对较丰富。例如,在原分布区的汶川卧龙保护区和雅安,某次四川省陆生野生动物调查中未能见到;而在石棉县的田湾河区域,密度为 194 只 · km⁻¹。对于横斑锦蛇现今的数量并不乐观,因此希望在相应的分布区里面加强保护。建议通过以下一些措施加强对横斑锦蛇的保护(胡锦鑫,胡杰,李艳红,2002 21(3))。

(1)加强科学研究:虽然横斑锦蛇已被列为四川省重点保护野生动物,但我们对于这一物种的了解尚很缺乏,有关其保护生物学方面的研究也有待于深入。通过调查,可选择数量相对较丰富的石棉县田湾河区域,对其个体生物学、生态学等开展专题研究。

(2)加强宣传、严格执法:过去在横斑锦蛇产区的一些收购站中,曾有报道收购到本种蛇的标本。现在,虽然收购站已被取缔,但非法收购、捕捉的现象却时有发生。因此,在有横斑锦蛇分布的县、市,

各级林业主管部门及基层单位一方面要加强对公众的保护宣传,另一方面对于非法捕捉、收售该种蛇类的不法分子要严厉打击(胡杰,李艳红等,2002)

现今对于横斑锦蛇的研究也比较欠缺,NCBI上还没有收录关于横斑锦蛇的任何基因序列,这对于横斑锦蛇的保护是不利的。因此希望能通过各方面的关注,提高大家对横斑锦蛇的保护意识。

参考文献:

- [1] Klaus-Dieter Schulz. 游蛇科锦蛇属专著[J]. 四川动物,1996.
- [2] LING Chen, LIU Shao ying, HUANG Song, et al. Phylogenetic Analyses Reveal a Unique Species of *Elaphe* (Serpentes, Colubridae) New to Science [J]. Asian Herpetological Research, 2010 - 1 - 2.
- [3] Song HUANG, Li DING, Frank T, et al. A New Species of the Genus *Elaphe* (Squamata: Colubridae) from Zoige County, Sichuan,

China[J]. Asian Herpetological Research, 2012 - 3.

- [4] 邓其祥,江耀明. 中国的横斑锦蛇[J]. 四川师范学院学报, 1989;10(2).
- [5] 胡杰,李艳红,李操,等. 横斑锦蛇的现状[J]. 四川动物,2002 - 04 - 09.
- [6] 莫邦辉,袁水全,郑渝池,等. 一种改进的齿突蟾动物肌肉线粒体 DNA 提取方法[J]. 应用与环境生物学报,2004 - 10.
- [7] 孟哲. 中国专家发现蛇类新种,西部为锦蛇属发源地[N]. 新华网,2012 - 4 - 15.
- [8] 童宗中,王义权,周开亚. 从 12SrRNA 基因片段序列研究 20 种蛇的系统发生关系[J]. 动物学报,2002,48(4).
- [9] 王义权,周开亚. 几种游蛇的 Cytb 基因片段序列分析及其演化关系[J]. 动物学报. 1999 - 3.
- [10] 蒋艾洛. 蜂桶寨保护区发现省级重点保护野生动物横斑锦蛇 [N]. 四川新闻网,2010 - 7 - 15.
- [11] 赵尔宓编. 四川爬行类原色图鉴[M]. 中国林业出版社.

(上接第 141 页)

销一体化体系。同时,积极培育流通中介组织,加强经纪人队伍,建设专业销售队伍建设,培育和引导农民走合作经济组织和专业协会的道路,发挥其示范带动作用,充分发挥“互联网+”在中药材产业发展中的作用。

2.5 加大技术人员培训,确保中药材产业发展

各级政府要结合中药材种植基地建设工作的启动,按照以市场为导向,以经济效益为中心,依靠科技进步,每年应选派一定量的专业技术人员学习培训和到外地参观,掌握土壤、水质、大气监测方法和水肥管理等技术,了解所种植的植物的生长特性要求,实行择优品种。要依托重点种植示范户、专业村和示范区的辐射带动全市中药材种植产业发展的工作思路。市、县、乡各级应进一步建立健全服务体系,加大试验示范力度,每年引种驯化一批、试验种植一批、推广种植一批,集中力量,突出重点,扶持重点户、示范户,以点带面,采取集约经营,鼓励重点种

植示范户,大户连农户的发展模式,推动了中药材种植产业的发展。依托天然林资源保护工程和退耕还林工程这两大林业工程,积极支持广大山区农民种植中药材,不断加大投资力度。尽力培养一批中药材种植技术人才,扩大影响,使广大农户对种植中药材有一定的感性认识,并认可和接受中药材的种植。中药材种植规模逐年扩大,种植技术水平逐步提高,经济和社会效益逐步显现,为财政增长、农民增收、建设社会主义新农村探索路子。

参考文献:

- [1] 邓乔华. 浅谈中药材生产基地运作过程中存在的问题及对策 [J]. 中国现代中药,2009. 11(9):11 ~ 14.
- [2] 李庆,尚明瑞. 绵阳市中药材产业发展存在的问题及对策 [J]. 现代农业科技,2013(21):337 ~ 341.
- [3] 袁国卿. 中药材种植基地建设若干问题探析 [J]. 国医论坛, 2008, 23(2):3940.
- [4] 朱跃萍,张锐锋. 浅谈中药材规范化种植基地的建设 [J]. 中国现代中药,2012,14(6):40 ~ 42.