

贵州省首次发现武陵洞蛭

吴清姐¹, 黄太福^{1,2}, 兰香英¹, 吴涛¹, 龚小燕^{1,3}, 伍丽艳¹, 刘志霄^{1*}

¹吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首

²湖南壶瓶山国家级自然保护区管理局, 湖南 石门

³湖南省怀化市第三中学, 湖南 怀化

收稿日期: 2023年1月15日; 录用日期: 2023年2月15日; 发布日期: 2023年2月22日

摘要

2019年3月, 在贵州省务川县马福林自然保护区云丰村简家沟的一个溶洞中的洞顶壁采集到一种营陆生生活的洞栖性真洞穴蛭类, 经过形态特征的比较观察和线粒体COI基因的系统发育分析, 将其鉴定为山蛭科中国洞蛭属的武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*), 系贵州省环节动物门蛭纲动物的新记录。

关键词

武陵洞蛭, 新记录, 蛭纲, 贵州省

Wuling Cave Leeches (*Sinospelaeobdella wulingensis*) Were First Discovered in Guizhou Province, China

Qingjie Wu¹, Taifu Huang^{1,2}, Xiangying Lan¹, Tao Wu¹, Xiaoyan Gong^{1,3}, Liyan Wu¹, Zhixiao Liu^{1*}

¹College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou Hunan

²Hunan Hupingshan National Nature Reserve Administration, Shimen Hunan

³The No. 3 High School of Huaihua City, Huaihua Hunan

Received: Jan. 15th, 2023; accepted: Feb. 15th, 2023; published: Feb. 22nd, 2023

Abstract

In March 2019, a cave-dwelling terrestrial troglobite leech species was collected from the ceiling of a karstic cave of Jianjiagou near the Yunfeng Village in the Nature Reserve of Mafulin of Wu-

*通讯作者。

文章引用: 吴清姐, 黄太福, 兰香英, 吴涛, 龚小燕, 伍丽艳, 刘志霄. 贵州省首次发现武陵洞蛭[J]. 世界生态学, 2023, 12(1): 94-100. DOI: 10.12677/ije.2023.121012

chuan County, Guizhou Province, China. Based on the comparative observation of morphological characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial *COI* gene, it was identified as *Sinospelaeobdella wulingensis*, a new record of Haemadipsidae belonging to Class Hirudinea, Phylum Annelida in Guizhou Province.

Keywords

Sinospelaeobdella wulingensis, New Record, Hirudinea, Guizhou Province

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

蛭类, 系环节动物门(Annelida)蛭纲(Hirudinea)的统称, 全球范围内已知蛭类 700 余种, 我国已知蛭类 2 亚纲 3 目 9 科 37 属 118 种, 约占世界蛭类物种数的 1/6 [1]。传统上, 根据栖息环境的不同, 将蛭类区分为“水蛭”和“陆蛭”。Sawyer 对陆蛭进行归类整理, 将其统归为山蛭科, 包括 3 颚类组(trignathous) 5 属和 2 颚类组(duognathous) 12 属[2]。之后, 3 颚类组又相继被修订为 3 属, 即三颚四环蛭属(*Tritetrabdella*)、山蛭属(*Haemadipsa*) [3] [4]和中国洞蛭属(*Sinospelaeobdella*) [5]。

中国洞蛭属目前仅发现 2 种, 即洞穴山蛭(*Haemadipsa cavatuses*) [6]和武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*) [5], 武陵洞蛭是该属的模式种, 目前已知仅分布于湘西州境内的少数几个溶洞中[5]和四川省邻水县的老龙洞[7], 而洞穴山蛭仅分布于云南西畴德宏自治州境内的个别溶洞中[6] [8], 其学名已修订为 *Sinospelaeobdella cavatuses* [5]。

贵州省地处我国西南腹地, 与重庆、四川、云南、广西和湖南接壤, 境内以喀斯特地貌为主, 溶洞众多, 洞穴动物资源非常丰富[9] [10] [11], 但迄今未见有关该省洞穴蛭类的专题研究报道。近年, 我们在贵州省遵义市进行洞穴动物资源调查时, 在务川县马福林保护区的一个溶洞的顶壁采集到一种陆生蛭类, 经形态学比较观察和分子分析, 将其鉴定为武陵洞蛭, 系该种在贵州省境内的首次记录, 从而使武陵洞蛭已知的分布范围扩展到贵州省, 为该属种动物地理与演化的深入研究提供了基础资料。

2. 材料与方法

2.1. 样品采集及形态特征观察

2019 年 3 月, 项目组在贵州省务川县云丰村简家沟的一个溶洞(28.3423°N, 107.755°E)深处(离洞口约 250 m)的洞道顶壁采集到 2 条洞蛭, 分别编号为 GZ20190302001 和 GZ20190302002。将活体标本装于矿泉水瓶内, 瓶口用两层纱布封盖以保证瓶内通气。标本带回实验室后, 先进行活体外形特征观察。然后参照《中国动物志·环节动物门·蛭纲》[12]中介绍的方法, 使用数显式游标卡尺(精度 0.01 mm)对其进行观察和测量, 主要指标包括体长、体宽、头宽、尾吸盘直径、口吸盘直径; 颚的数量; 眼点的数量、分布模式及形状; 生殖孔的位置; 尾吸盘的形状及辐射肋的数量; 耳状突的形状和数量等。标本保存在吉首大学生物资源与环境科学学院动物标本室。

2.2. DNA 提取、扩增与测序

剪取上述标本的一小部分后吸盘, 采用生工生物工程(上海)股份有限公司(简称“生工生物”)提供的

Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(B518251)提取基因组 DNA, 使用蛭类通用引物 LCO1490/HCO2198 进行线粒体 *COI* 基因扩增[13], PCR 反应体系的总体积为 25 μL , 其中包括 1 μL 模板 DNA、12.5 μL 的 Taq PCR master Mix (Taq DNA 聚合酶、dNTP、 MgCl_2 、PCR Buffer、PCR 稳定剂、载凝胶剂和蓝色染料)、9.5 μL 的 ddH₂O、2 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物。扩增 *COI* 基因的 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 选取条带清晰明亮的 PCR 产物寄送至生工生物进行纯化后测序。

2.3. 数据处理

采用 EXCEL 软件对洞蛭的外部形态特征数据进行统计分析。

对于测序结果, 利用 DNASTAR lasergene 7.1.0 软件对拼接序列进行编辑校正。然后在 NCBI 上运行 Blast 程序, 进行比较确认, 下载部分亲缘关系较近的蛭类序列进行序列比对, 使用 MEGA11.0 计算修正后的序列间的遗传距离, 以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 进化树的各分支置信度采用 1000 次的自检分析进行重复检验。

综合形态学特征与分子数据的比较研究, 对本标本进行物种鉴定。

3. 结果与分析

3.1. 形态特征

该洞蛭标本体型中等, 呈长圆锥状, 体表缺乏色素, 因此可见到体内所贮存的宿主的血液(图 1)。酒精浸泡后, 标本呈现乳白色, 无条纹; 体长分别为 17.32 mm 和 22.66 mm, 最大体宽为 4.27 mm 和 4.53 mm; 头宽为 2.30 mm 和 2.76 mm; 尾吸盘近圆形, 直径为 4.87 mm 和 6.10 mm, 超过最大体宽(表 1)。



Figure 1. The leeches living on the ceiling of Jianjiagou Karstic Cave in Mafulin Nature Reserve, Wuchuan, Guizhou. Note: The visible body color is not surface one, but mainly that of host blood stored in their bodies

图 1. 栖息在贵州务川马福林保护区简家沟溶洞顶壁的蛭体。注: 所见体色并非体表颜色, 而主要是体内所贮存的宿主的血液的颜色

全身共有 27 体节 94 体环, 完全体节具 5 体环; 眼点 5 对, 依次分别位于第 2、3、4、5、8 体环的两侧, 呈半圆弧形排列, 第 1、2、3 对眼点呈弧形, 第 2 对最大, 第 4、5 对呈点状, 第 5 对眼点无缺失现象。雌、雄生殖孔分别位于第 35/36 体环和第 33/34 体环的腹面环沟上(表 1); 雌、雄生殖孔相隔 2 体环(图 2(a))。肛门开口于正背面第 94 体环与尾吸盘的交界处, 在背部与尾吸盘交界处的左右两侧有三对

大小相当并呈三角形的耳状突(叶) (图 2(b))。

Table 1. Comparison of morphological characteristics among the cave leech specimens from Guizhou and two known species of *Sinospelaeobdella*

表 1. 贵州洞蛭标本与中国洞蛭属已知的两个物种之间的形态特征比较

项目 Items	武陵洞蛭 <i>S. wulingensis</i> (Huang <i>et al.</i> , 2019; n = 21)	贵州标本 (n = 2)	洞穴山蛭 <i>S. cavatuses</i> (杨潼等, 2009; n = 13)
体长(mm)	22.70 ± 5.02 (15~28)	17.32/22.66	31~44
最大体宽(mm)	4.27 ± 0.72 (3.5~5.4)	4.27/4.53	6.0~8.0
头宽(mm)	2.30 ± 0.35 (1.8~2.8)	2.30/2.76	2.6~3.0
尾吸盘直径(mm)	5.36 ± 0.73 (4.1~6.7)	4.87/6.10	6.0~7.5
颚的数量	3 片	3 片	3 片
眼点的数量	5 对	5 对	5 对
眼点的形状	第 1、2、3 对呈弧形, 且第 2 对最大, 第 4、5 对呈点状,	第 1、2、3 对呈弧形, 且第 2 对最大, 第 4、5 对呈点状,	第 1、2 对呈弧形, 且第 1 对最大, 第 3、4、5 对 眼点逐渐变成小点状
第五对眼点	存在	存在	很小或缺失
眼点的分布情况	分布在第 2、3、4、5、8 体环的两侧, 呈半圆弧形排列	分布在第 2、3、4、5、8 体环的两侧, 呈半圆弧形排列	分布在第 2、3、4、5、8 环两侧, 呈半圆弧形排列
耳状突的数量	3 对	3 对	3 对
耳状突的形状	较小, 呈三角形, 3 对的大小几乎一样	较大而明显, 呈三角形, 3 对的大小几乎一样	呈三角形, 第 1 对大而明显, 后 2 对小且几乎不显
生殖孔的位置	♂: 第 33/34 体环 ♀: 第 35/36 体环	♂: 第 33/34 体环 ♀: 第 35/36 体环	♂: 第 33/34 体环 ♀: 第 35/36 体环
辐射肋	78 条左右, 呈放射状	78 条左右, 呈放射状	78 条左右, 呈放射状
尾吸盘的形状	近圆形	近圆形	圆盘状

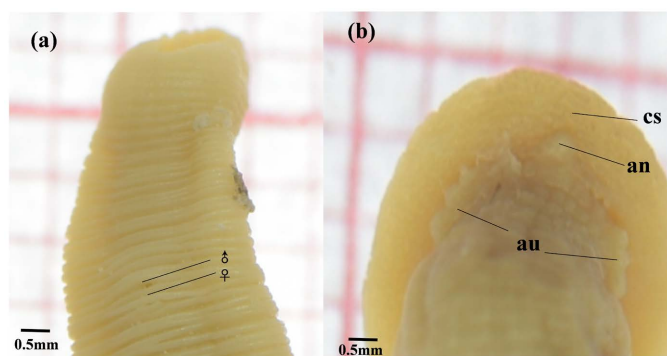


Figure 2. Partial external morphological characteristics of cave leech specimens from Guizhou. (a) Positions of gonopores: ♂ male gonopore, ♀ female gonopore; (b) dorsal view of posterior sucker: an: anus, au: auricle, cs: caudal sucker (The specimens preserved in 95% alcohol before photographing)

图 2. 贵州洞蛭标本的局部外形特征。(a) 雌、雄生殖孔的位置: ♂为雄性生殖孔, ♀为雌性生殖孔; (b) 尾吸盘背面观: an: 肛门, au: 耳状突, cs: 尾吸盘(观察拍照前, 标本保存于 95% 的酒精溶液中)

3.2. 分子鉴定

分子数据经过处理，获得线粒体 *COI* 基因序列长度 658 bp。通过 NCBI Blast 检测，贵州标本与武陵洞蛭的相似度高达 98.49%，与洞穴山蛭的相似度为 90.29%。基于线粒体 *COI* 基因构建的系统发育树显示，贵州标本与分布于湖南湘西州的武陵洞蛭聚为一个支系，而洞穴山蛭单独形成另一个支系(图 3)。遗传距离分析显示，贵州标本与模式产地的武陵洞蛭平均相差 1.16%，与四川的武陵洞蛭相差 4.7%，与洞穴山蛭平均相差 10.18% (表 2)。据此，我们将贵州的洞蛭标本鉴定为武陵洞蛭。

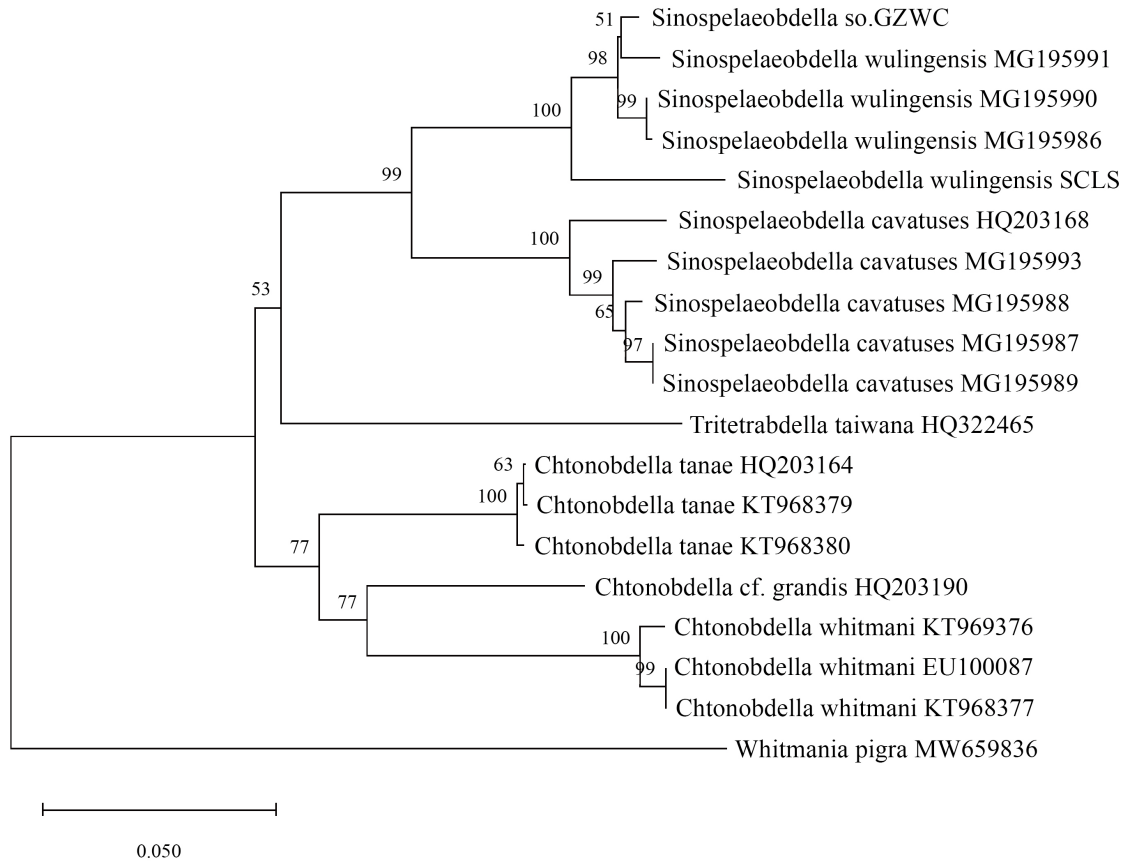


Figure 3. Neighbor-joining (NJ) tree based on the sequences of mitochondrial *COI* gene. The number on the tree indicated bootstrap value; *Sinospelaebdella* sp.GZWC indicated the No. of the specimen from Guizhou

图 3. 基于线粒体 *COI* 基因构建的 NJ 树。各分支上的数字表示节点支持率; *Sinospelaebdella* sp.GZWC 为贵州标本

Table 2. The uncorrected pairwise genetic distances in the *Sinocavebdella* based on *COI* gene

表 2. 基于 *COI* 基因计算的中国洞蛭属种内及种间的遗传距离

	S.sp. GZWC	S.wu SCLS	S.wu MG195990	S.wu MG195991	S.wu MG195986	S.ca HQ203168	S.ca MG195987	S.ca MG195988	S.ca MG195989	S.ca MG195993
S.sp. GZWC										
S.wu SCLS	0.047									
S.wu MG195990	0.012	0.044								

Continued

<i>S.wu</i> MG195991	0.011	0.047	0.015						
<i>S.wu</i> MG195986	0.012	0.044	0.001	0.017					
<i>S.ca</i> HQ203168	0.106	0.115	0.107	0.111	0.109				
<i>S.ca</i> MG195987	0.101	0.120	0.102	0.106	0.102	0.038			
<i>S.ca</i> MG195988	0.098	0.115	0.100	0.104	0.098	0.035	0.009		
<i>S.ca</i> MG195989	0.102	0.120	0.103	0.107	0.102	0.040	0.000	0.009	
<i>S.ca</i> MG195993	0.102	0.119	0.103	0.107	0.105	0.040	0.014	0.019	0.015

注: *S.sp.*GZWC: 贵州务川洞蛭; *S.wu.*: 武陵洞蛭; *S.ca.*: 洞穴山蛭。

4. 讨论

贵州省务川县简家沟洞蛭标本的体表缺乏色素, 完全体节数为 5 环, 生殖孔间隔 2 环等特征与中国洞蛭属[5]的鉴别特征相符。与该属目前已知的武陵洞蛭和洞穴山蛭[5] [6]两种相比较, 其体型中等、眼点第 2 对最大且第 5 对眼点无缺失现象等特征区别于后者, 而更接近于前者。同时, 构建的系统发育树也显示, 贵州标本与武陵洞蛭聚为一支。因此, 将贵州洞蛭标本鉴定为武陵洞蛭。可是, 贵州标本与模式产地的武陵洞蛭标本也存在一些差异, 如耳状突前者明显大于后者, 究其原因, 一方面可能是该特征在不同地理种群之间变异较大, 另一方面则可能是观察标本较少或不同的标本保存方式造成的差异。

四川标本采集地和武陵洞蛭模式产地的直线距离约为 350 km, 平均遗传距离相差 4.5% [7]; 贵州标本采集地与四川标本采集地之间的直线距离约为 230 km, 遗传距离相差 4.7%, 而贵州标本采集地与武陵洞蛭模式产地的空间距离约为 190 km, 平均遗传距离仅相差 1.16%, 这表明武陵洞蛭贵州种群与模式产地种群之间可能存在更为频繁的基因交流。因此, 在今后的研究中, 洞蛭种群之间的交流模式以及是否存在亚种分化值得关注。

5. 结论

该务川洞蛭标本的形态结构与武陵洞蛭较为相似, 通过线粒体 *COI* 基因分析, 该洞蛭与武陵洞蛭的亲缘关系较近。因此, 综合形态学特征观察和 *COI* 基因序列比较, 将来自贵州省务川县云丰村简家沟溶洞中的陆生蛭种鉴定为武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*), 系贵州省环节动物门蛭纲的新记录, 为该属种动物地理及类群演化的深入研究提供了新的资料。

基金项目

研究过程中, 得到国家自然科学基金项目(32160241)、国家自然科学基金重点国际(地区)合作与交流项目(31961123003)委托子项目、湖南省自然科学基金项目(2021JJ30554)的经费支持, 以及贵州省遵义市务川县马福林保护区张显武副局长、其他工作人员及周边群众的热情帮助, 还得到中南林业科技大学张志强博士的支持, 谨此一并致谢!

参考文献

- [1] 刘英奎, 白义, 乔宁, 等. 中国蛭类分类研究进展[J/OL]. 中国科技论文在线, 2011.

-
- <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201103-415>, 2022-09-15.
- [2] Sawyer, R.T. (1986) *Leech Biology and Behaviour*. Oxford University Press/Clarendon Press, Oxford, 646-706.
- [3] Apakupakul, K., Siddall, M.E. and Burreson, E.M. (1999) Higher Level Relationships of Leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) Based on Morphology and Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, **12**, 350-359. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0639>
- [4] Borda, E., Ocegüerafigueroa, A. and Siddall, M.E. (2008) On the Classification, Evolution and Biogeography of Terrestrial Haemadipsoid Leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Hirudiniformes). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, **46**, 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.09.006>
- [5] Huang, T.F., Liu, Z.W., Gong, X.Y., *et al.* (2019) Vampire in the Darkness: A New Genus and Species of Land Leech Exclusively Bloodsucking Cave-Dwelling Bats from China (Hirudinida: Arhynchobdellida: Haemadipsidae). *Zootaxa*, **4560**, 257-272. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4560.2.2>
- [6] 杨潼, 莫潇, 王德斌. 洞穴吸血陆蛭一新种在中国云南省西陲的发现[J]. 动物分类学报, 2009, 34(1): 125-129.
- [7] 任伯淞, 黄太福, 伍丽艳, 等. 四川省邻水县发现武陵洞蛭[J]. 四川动物, 2020, 39(6): 679-683.
- [8] 郭云胶, 李粒, 杨荣杰. 洞穴山蛭生物学学习性观察研究[J]. 中国科技教育, 2010(7): 61-63.
- [9] 刘志霄. 洞穴生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2021.
- [10] 张远海, 艾琳·林奇. 洞穴探险[M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2004.
- [11] 黎道洪. 贵州喀斯特洞穴动物研究[M]. 北京: 地质出版社, 2007.
- [12] 杨潼. 中国动物志(环节动物门·蛭纲) [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [13] Folmer, O., Back, M., Hoeh, W., *et al.* (1994) DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294-299.