

# 广西临桂县首次发现武陵洞蛭

廖金屏<sup>1</sup>, 陈美如<sup>1</sup>, 向海洋<sup>1</sup>, 殷梓涵<sup>1</sup>, 向冬琴<sup>1</sup>, 刘志霄<sup>1\*</sup>, 沈利娜<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首

<sup>2</sup>中国地质科学院岩溶地质研究所, 岩溶生态系统与石漠化治理重点实验室, 自然资源部广西岩溶动力学重点实验室, 广西 桂林

<sup>3</sup>广西岩溶资源环境工程技术研究中心, 广西 桂林

收稿日期: 2024年8月6日; 录用日期: 2024年9月20日; 发布日期: 2024年11月7日

## 摘要

本文记述了在广西临桂县会仙镇燕子洞顶壁采集到的一种陆生蛭类。综合形态学观察、线粒体 $COI$ 基因序列比对和系统发育分析, 将其鉴定为山蛭科中国洞蛭属的武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*), 这是该属在广西境内的首次报道。

## 关键词

溶洞, 武陵洞蛭,  $COI$ 基因, 新纪录, 广西

# *Sinospelaeobdella wulingensis* Recorded for the First Time in Lingui County of Guangxi

Jinping Liao<sup>1</sup>, Meiru Chen<sup>1</sup>, Haiyang Xiang<sup>1</sup>, Zihan Yin<sup>1</sup>, Dongqin Xiang<sup>1</sup>, Zhixiao Liu<sup>1\*</sup>, Lina Shen<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou Hunan

<sup>2</sup>Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Key Laboratory of Karst Ecosystem and Treatment of Rocky Desertification, Guangxi Key Laboratory of Karst Dynamics, Ministry of Natural Resources, Guilin Guangxi

<sup>3</sup>Guangxi Karst Resources and Environment Research Center of Engineering Technology, Guilin Guangxi

Received: Aug. 6<sup>th</sup>, 2024; accepted: Sep. 20<sup>th</sup>, 2024; published: Nov. 7<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

This paper describes a species of terrestrial leeches collected from the top wall of Yanzi Cave in Huixian Town, Lingui County, Guangxi. Based on morphological observation, mitochondrial  $COI$  gene sequence

\*通讯作者。

文章引用: 廖金屏, 陈美如, 向海洋, 殷梓涵, 向冬琴, 刘志霄, 沈利娜. 广西临桂县首次发现武陵洞蛭[J]. 世界生态学, 2024, 13(4): 499-505. DOI: 10.12677/ije.2024.134064

comparison and phylogenetic analysis, it was identified as *Sinospelaeobdella wulingensis* of the genus *Sinospelaeobdella* in Haemadipsidae. It was the first record of this genus in Guangxi.

## Keywords

Karst Cave, *Sinospelaeobdella wulingensis*, COI Gene, New Record, Guangxi

Copyright © 2024 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(leeches)俗称蚂蟥,隶属于环节动物门(Annelida)蛭纲(Hirudinea),全球现已知蛭类 700 余种,我国蛭类资源丰富,约占世界蛭类物种数的 1/6 [1]-[3]。根据栖息环境的不同,可将生活在地表有光环境中的蛭类划分为“水蛭”和“陆蛭”两大生态类群。1986 年, Sawyer 将所有的陆生蛭类归入山蛭科(Haemadipsidae),包含 2 组 17 属 70 余种,其中 3 颚类组(trignathous) 5 属, 2 颚类组(duognathous) 12 属。之后,山蛭科的 3 颚类组被修订为 2 属,即三颚四环蛭属(*Tritetrabdella*)和山蛭属(*Haemadipsa*) [4]-[6]。

我们将生活在洞穴黑暗环境中的陆生蛭类特称为“洞蛭”(cave leech)。目前有关洞蛭的研究报道极为少见。我国仅见 2009 年由杨潼先生命名的山蛭属新种——洞穴山蛭[3],而有关洞穴山蛭的分类地位一直以来都存在争议。随着现代分子生物学技术的发展,有学者通过系统发育分析表明,山蛭属的洞穴山蛭与三颚四环蛭属的亲缘关系较近,但在形态学数据方面,洞穴山蛭与山蛭属和三颚四环蛭属的差异都较大,因此应把洞穴山蛭从山蛭属中分离出来[7]-[9]。但由于多方面的原因,一直未见正式的分类修订。

2019 年, Huang 等在湘西州的多个洞穴中发现了陆生吸血性的蚂蟥,经过形态特征比较和 COI 基因序列比对,将其鉴定为新种,命名为武陵洞蛭,同时建立了山蛭科 3 颚类组的一个新属——中国洞蛭属(*Sinospelaeobdella*),并将杨潼等描述的“洞穴山蛭”( *Haemadipsa cavatuses*)归入中国洞蛭属,将其种名修订为 *Sinospelaeobdella cavatuses* [3]。中国洞蛭属目前仅包含洞穴山蛭和武陵洞蛭两种。前者仅分布于云南西畴德宏自治州境内的个别溶洞中[10];后者是该属的模式种,目前已知其主要分布于湖南省湘西州境内[3],但也在四川省邻水县[11]和贵州省务川县[12]的个别溶洞中发现了其分布。

最近,我们在广西境内的一个溶洞的洞顶壁采集到一种陆生吸血性蛭类,经形态学比较观察和 COI 基因序列分析,我们将其鉴定为武陵洞蛭,这是该种在广西壮族自治区境内的首次记录。该发现不仅丰富了广西蛭类多样性的内容,而且将武陵洞蛭的分布范围向南推到南纬 25 度附近,具有一定的洞穴生物学和动物地理学意义。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

2023 年 11 月,在广西壮族自治区桂林市临桂县会仙镇合陂村附近的燕子洞(110°10'48"E, 25°02'54"N, 海拔 195 m)的洞顶壁采集到 2 条陆生蛭类标本,将其带回实验室,分别编号为 GXYZD2023112501 和 GXYZD2023112502。标本保存于吉首大学生物资源与环境科学学院动物标本室。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 形态观察与形态学物种鉴定

使用  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  的坐标纸测量活体标本的形态学数据(体长、头宽、尾吸盘直径等指标)。再依据蛭类保存的方法[13][14], 将活体标本置于清水中, 逐渐滴加酒精直至酒精浓度达到约 10%, 将标本在此浓度的酒精中浸泡 3~5 分钟, 直至标本受到刺激而不产生任何反应, 再将标本转移到 75%酒精中, 以使其呈现自然伸展状态。最后, 将标本密封保存在 95%酒精中。

依据杨潼(1996)对蛭类形态的描述[1], 在体视显微镜(LEICA M205 C)下对酒精浸泡后蛭体的体色、眼点、吸盘、乳突以及两性生殖孔的位置与间隔环数等重要特征进行观测, 并对其内部结构进行解剖观察。参考相关文献[1][3][10]-[12]进行形态特征比对和形态学物种鉴定。

### 2.2.2. DNA 测序与数据处理

取上述 1 号标本的一小部分尾吸盘保存于 100%酒精中, 送至北京擎科生物科技股份有限公司进行 mtDNA *COI* 基因的提取、扩增和测序。其中, 扩增引物选用蛭类通用引物 LCO1490/HCO2198 [15][16], 扩增反应条件设为  $94^{\circ}\text{C}$  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, 再用 1%的琼脂凝胶电泳检测扩增产物, 选取条带清晰明亮的产物进行纯化后测序, 对测序结果进行拼接[11]。

测序结果用 Chromas 2.6.5 查看峰值, 利用 SeqMan 软件进行编辑校正。然后再在 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物种序列进行序列比对, 使用 MEGA 11.0 对序列进行校正, 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。

最后, 综合形态学特征与分子数据的比较研究, 对标本进行物种鉴定。

## 3. 结果与分析

### 3.1 形态特征

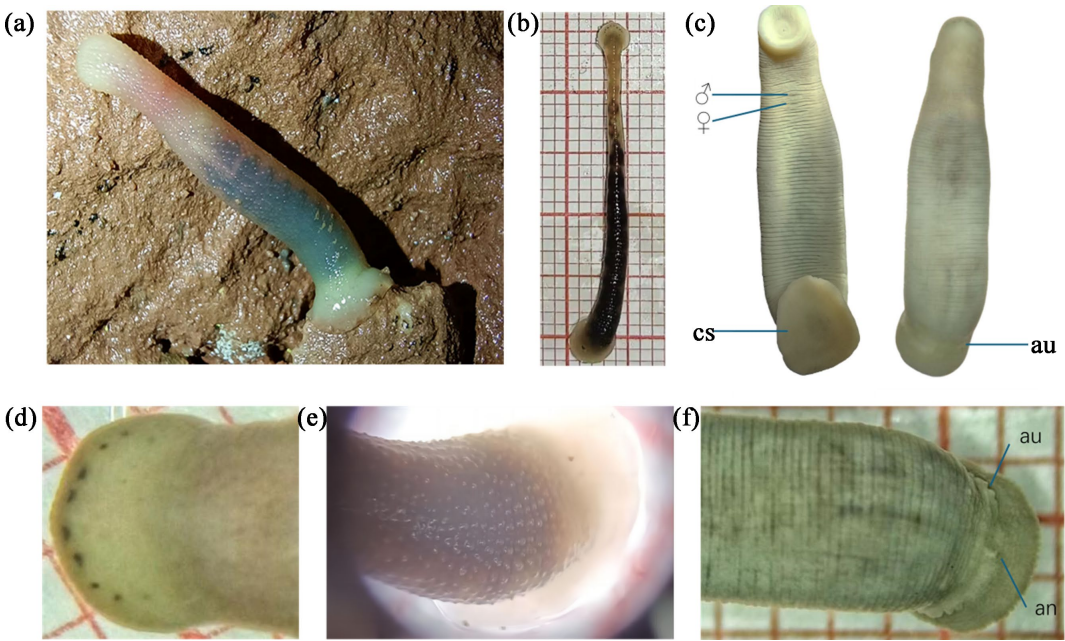
广西(洞蛭)标本的体型为中等大小, 大致呈长圆锥状, 体前 1/3 段较细, 呈红色或白色, 体后 2/3 段稍显宽大, 体表缺乏色素, 无条纹, 可较为明显地看到体内的精囊和嗦囊中储存的血餐, 故活体标本的体后 2/3 段呈现褐色, 其余部位呈微红色。乙醇浸泡后的标本呈乳白色, 腹面能够很清晰地看到雌、雄生殖孔的位置, 雌、雄生殖孔分别位于 35/36 体环和 33/34 体环的腹中环沟上, 间隔 2 环。口吸盘直径较大, 有颚 3 枚, 边缘呈瓣状。共有 5 对眼点, 第 1、2 对眼点呈弧形, 第 3、4、5 对呈点状, 第 2 对眼点最大, 第 5 对眼点无缺失现象。身体背面各环上具有明显的乳突和背感器, 但较山蛭属的小。在身体背部与尾吸盘交界处的左右两侧有 3 对耳状突, 肛门开口于尾吸盘与第 94 体环之间的背部正中处, 位于两侧的耳状突之间(图 1)。

活体静卧时的体长为 28.40/28.43 mm, 比洞穴山蛭的体长要小得多, 但它的吸盘吸力很强, 尾吸盘上约有 78 条辐射肋, 呈放射状, 最大拉伸体长可达 59.46 mm。头宽 2.80/2.82 mm, 整体可见 27 体节共 94 环, 完全体节的环数为 5 环。尾吸盘较大, 近圆形, 其直径(5.38/5.83 mm)超过身体的最大体宽(4.60/5.00 mm)(表 1)。嗦囊盲囊明显, 共有 14 对。第 1 对睾丸位于阴道后, 在输精管背面。

### 3.2. 分子鉴定

从 1 号标本的一小部分尾吸盘组织中有效获得了 mtDNA *COI* 基因序列 685 bp, 在 *COI* 序列中含有 418 个保守位点, 221 个变异位点, 146 个简约信息位点, 75 个单突变位点。经 NCBI Blast 检测, 广西标本与武陵洞蛭的相似度最大, 达到 96.47%, 而与洞穴山蛭的相似度仅为 91.80%。基于邻接法建立的线粒

体 *COI* 基因的进化树表明, 广西标本与武陵洞蛭聚为一个支系, 而洞穴山蛭单独形成另一个支系, 均具有几乎 100%的支持率(图 2)。并且, 广西标本与武陵洞蛭的遗传距离平均相差仅 3.25%, 而与洞穴山



**Figure 1.** External morphological characteristics of the cave leeches from Guangxi: (a) The leech inhabiting the cave ceiling; (b) The leech in repose indoor; (c) Ventral view (left) and dorsal view (right) of the specimens after soaked in ethanol; cs: caudal sucker; au: auricle; ♂: male gonopore; ♀: female gonopore; (d) Eyespots on the back of head; (e) Mastoid process and dorsal sensilla on the dorsal surface of the body; (f) Location of the au-auricle and an-anus

**图 1.** 广西洞蛭标本的外形特征: (a) 栖息在洞顶壁的蛭体; (b) 在室内静卧时的蛭体; (c) 乙醇浸泡后标本的腹面观(左)与背面观(右); cs: 尾吸盘; au: 耳状突; ♂: 雄性生殖孔, ♀: 雌性生殖孔; (d) 头部背面的眼点排列; (e) 身体背面的乳突和背感器; (f) 示耳状突和肛门所在的位置

**Table 1.** Comparison of morphological data of the Guangxi (cave leech) specimens with *Sinospelaeobdella wulingensis* and *Sinospelaeobdella cavatuses*

**表 1.** 广西(洞蛭)标本与武陵洞蛭和洞穴山蛭的形态学数据比较

形态学指标	武陵洞蛭 <i>Sinospelaeobdella wulingensis</i> (Huang <i>et al.</i> , 2019; n = 21)	洞穴山蛭 <i>Sinospelaeobdella cavatuses</i> (杨潼等, 2009; n = 13)	广西标本 (n = 2)
体长(mm)	22.70 ± 5.02 (15.00~28.00)	31.00~44.00	28.40/28.43
头宽(mm)	2.30 ± 0.35 (1.80~2.80)	2.60~3.00	2.80/2.82
最大体宽(mm)	4.27 ± 0.72 (3.50~5.40)	6.00~8.00	4.60/5.00
尾吸盘直径(mm)	5.36 ± 0.73 (4.10~6.70)	6.00~7.50	5.38/5.83
颚	3 枚	3 枚	3 枚
完全体节环数	5	5	5
生殖孔间隔	2 环	2 环	2 环
最大眼眼位	第 2 对	第 1 对	第 2 对
第 5 对眼	存在	很小或缺失	存在
第 1 对睾丸位置	阴道后, 输精管背面	第 14 体节, 输精管外部	阴道后, 输精管背面
背部乳突大小	较小	较大而明显	较小

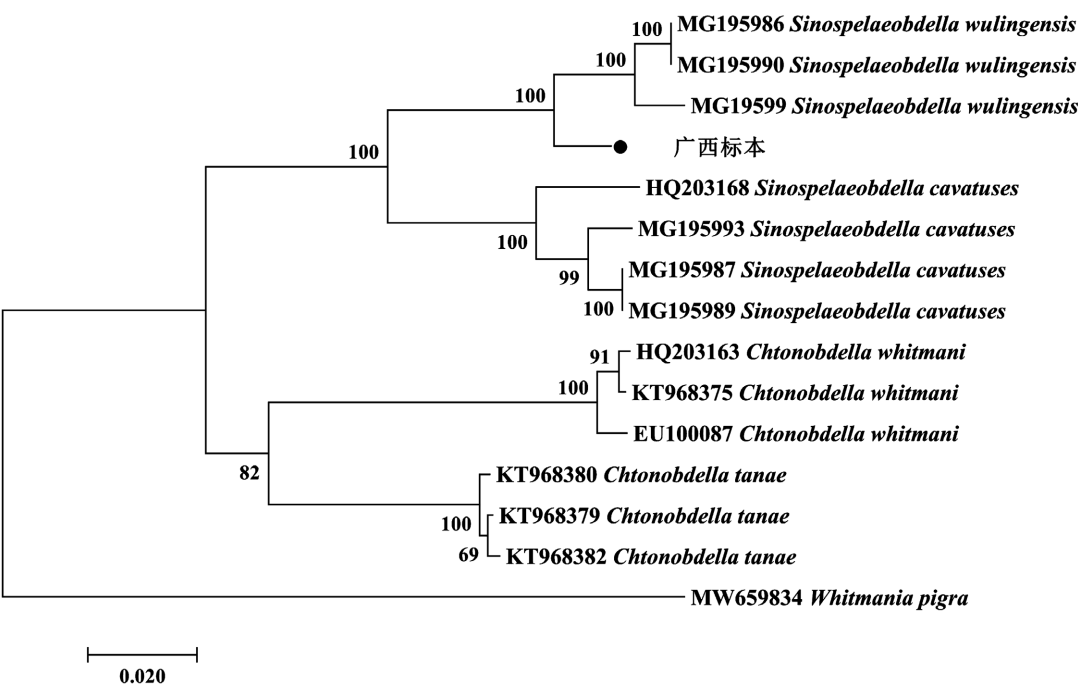


Figure 2. Phylogenetic tree constructed by NJ method based on mitochondrial *COI* gene  
图 2. 基于线粒体 *COI* 基因用 NJ 法构建的系统发育树

Table 2. Genetic distance between Guangxi (cave leech) specimens and species in the genus (*Sinospelaeobdella*) calculated based on *COI* gene  
表 2. 基于 *COI* 基因计算的广西(洞蛭)标本与属内蛭种的遗传距离

		广西标本	MG1959 86	MG1959 9	MG1959 90	MG1959 89	MG1959 87	MG1959 93	HQ2031 68
广西标本									
<i>Sinospelaeobdella wulingensis</i>	MG195986	0.0315							
	MG19599	0.0346	0.0157						
	MG195990	0.0315	0.0000	0.0157					
<i>Sinospelaeobdella cavatuses</i>	MG195989	0.0819	0.0961	0.0992	0.0961				
	MG195987	0.0819	0.0961	0.0992	0.0961	0.0000			
	MG195993	0.0835	0.0976	0.1008	0.0976	0.0142	0.0142		
	HQ203168	0.0850	0.1008	0.1039	0.1008	0.0346	0.0346	0.0362	

蛭的遗传距离平均相差 8.31% (表 2)。综上，我们将广西的洞蛭标本鉴定为武陵洞蛭。

4. 讨论

此次采集的广西(洞蛭)标本第 2 对眼点最大，第 5 对眼点仍然存在；第 1 对睾丸的位置位于阴道后输精管背面，这与武陵洞蛭的相符，而与洞穴山蛭不同[2] [10]。遗传距离的分析也表明，广西标本与洞穴山蛭的亲缘关系较远(8.31%)，而与武陵洞蛭较近(约为 3.25%)。之前，武陵洞蛭仅发现于湖南省湘西州



[2]、四川省[11]和贵州省[12],此次在广西境内为首次发现,因此是广西壮族自治区蛭类分布的新记录。广西在我国的动物地理区划上地处东洋界的华南区,境内喀斯特地貌复杂多样,溶洞众多,洞穴动物资源丰富,而武陵洞蛭在广西溶洞中的发现可为中国洞蛭属的起源演化研究提供基础数据,对于洞穴动物多样性的深入研究也有参考意义。

## 5. 小结

综合形态学与分子数据,将采自广西临桂县会仙镇燕子洞洞顶壁的陆生蛭类标本鉴定为山蛭科中国洞蛭属的武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*),这是武陵洞蛭在广西境内的新记录,具有一定的蛭类动物地理学意义。

## 致 谢

在野外标本采集和实验研究过程中,得到中国地质科学院岩溶地质研究所周黄鹤团队,以及吉首大学生物资源与环境科学学院黄兴龙博士、吴涛老师和吴清姐、张格菲、李金美等同学的支持与帮助,谨此一并致谢。

## 基金项目

国家自然科学基金联合基金项目(U21A2041)、国家自然科学基金资助项目(32160241)、湖南省自然科学基金项目(2021JJ30554)。

## 参考文献

- [1] 杨潼. 中国动物志·环节动物门·蛭纲[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 37-38.
- [2] 刘英奎, 白义, 齐宁, 等. 中国蛭类分类研究进展[Z]. 中国科技论文在线, 2011.
- [3] Huang, T., Liu, Z., Gong, X., Wu, T., Liu, H., Deng, J., *et al.* (2019) Vampire in the Darkness: A New Genus and Species of Land Leech Exclusively Bloodsucking Cave-Dwelling Bats from China (Hirudina: Arhynchobdellida: Haemadipsidae). *Zootaxa*, **4560**, 257-272. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4560.2.2>
- [4] Apakupakul, K., Siddall, M.E. and Bureson, E.M. (1999) Higher Level Relationships of Leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) Based on Morphology and Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12**, 350-359. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0639>
- [5] Trontelj, P. and Utevsky, S.Y. (2005) Celebrity with a Neglected Taxonomy: Molecular Systematics of the Medicinal Leech (Genus *Hirudo*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 616-624. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.012>
- [6] Borda, E., Ocegüera-Figueroa, A. and Siddall, M.E. (2008) On the Classification, Evolution and Biogeography of Terrestrial Haemadipsoid Leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Hirudiniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.09.006>
- [7] Borda, E. and Siddall, M.E. (2010) Insights into the Evolutionary History of Indo-Pacific Blood Feeding Terrestrial Leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Haemadipsidae). *Invertebrate Systematics*, **24**, 456-472. <https://doi.org/10.1071/is10013>
- [8] Steiner, H. (2013) Biospeleological Research in the Lao PDR. *16th International Congress of Speleology*, Brno, 21-28 July 2013, 413-419.
- [9] Nakano, T., Jeratthitikul, E., Tao, T.N., *et al.* (2016) A New Species of *Tritetrabdella* (Hirudinida: Hirudiniformes: Haemadipsidae) from Northern Indochina. *Raffles Bulletin of Zoology*, **64**, 105-116.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 吴清姐, 黄太福, 兰香英, 等. 贵州省首次发现武陵洞蛭[J]. 世界生态学, 2023, 12(1): 94-100.
- [13] 丁鲁民. 吸血蛭类的采集、保存及制片方法[J]. 口岸卫生控制, 2004, 9(4): 14-15.
- [14] Chen, J., Lai, Y. and Nakano, T. (2011) Three Species of Land Leeches from Taiwan, *Haemadipsa rjukjuana* Comb. n., a New Record for *Haemadipsa picta* Moore, and an Updated Description of *Tritetrabdella taiwana* (Oka). *ZooKeys*, **139**,

- 
- 1-22. <https://doi.org/10.3897/zookeys.139.1711>
- [15] Folmer, O., Black, 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.
- [16] Guan, S.M. and Gao, B.Q. (2008) COI Sequence, the DNA Barcode Affecting Animal Taxonomy and Ecology. *Chinese Journal of Ecology*, **27**, 1406-1412.