

贵州省纳雍县远盲蚓属一蚯蚓的多基因鉴定

谢章丹, 熊荣川*, 谢采玲, 赵文杰, 陆丽琴, 陈静, 王银娟, 唐筱瑞

六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州 六盘水

收稿日期: 2026年3月26日; 录用日期: 2026年5月6日; 发布日期: 2026年5月14日

摘要

毕节市纳雍县地处贵州西北部乌蒙山区, 其蚯蚓物种多样性研究尚属空白。本研究对该区域采集的一号蚯蚓样品进行多基因分子鉴定, 以明确其分类学归属。通过转录组测序获取线粒体COI、COII、ND1、12S rRNA及16S rRNA基因序列, 结合GenBank数据库同源序列构建最大似然树和贝叶斯树, 并基于Kimura二参数模型估算遗传距离。结果表明: 该样品与*Amyntas californica* (加州腔蚓)在多个基因树中聚为支持率较高的单系群, COII、ND1、12S rRNA及16S rRNA基因遗传距离分别为1.79%、1.30%、0.30%和1.00%, 均低于种内分化阈值; COI基因分析显示与*Amyntas kiangensis*遗传距离为5.19%, 与标注为*Amyntas schmardae*的序列(实为*A. californica*误鉴)距离仅0.88%。综合多基因证据, 将该样品鉴定为*Amyntas californica*, 支持*A. kiangensis*为其次异名。本研究报道了该物种在贵州纳雍县的分布, 为西南地区蚯蚓分类修订提供了分子数据。

关键词

蚯蚓, 转录组测序, 分子鉴定, 纳雍

Multilocus Molecular Identification of an *Amyntas* Earthworm Distributed in Nayong County, Guizhou Province

Zhangdan Xie, Rongchuan Xiong*, Cailing Xie, Wenjie Zhao, Liqin Lu, Jing Chen, Yinjuan Wang, Xiaorui Tang

College of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui Guizhou

Received: March 26, 2026; accepted: May 6, 2026; published: May 14, 2026

*通讯作者。

文章引用: 谢章丹, 熊荣川, 谢采玲, 赵文杰, 陆丽琴, 陈静, 王银娟, 唐筱瑞. 贵州省纳雍县远盲蚓属一蚯蚓的多基因鉴定[J]. 自然科学, 2026, 14(3): 290-297. DOI: 10.12677/ojns.2026.143033

Abstract

Nayong County, Bijie City, located in the Wumeng mountainous area of northwestern Guizhou Province, remains a research gap regarding earthworm biodiversity. This study conducted multi-locus molecular identification of an earthworm specimen collected from this region to clarify its taxonomic status. Transcriptome sequencing was performed to obtain mitochondrial COI, COII, ND1, 12S rRNA, and 16S rRNA gene sequences. Phylogenetic trees were constructed using Maximum Likelihood and Bayesian inference methods based on homologous sequences from GenBank, and genetic distances were estimated using the Kimura two-parameter model. The results demonstrated that the specimen clustered with *Amyntas californica* in high-support clades across multiple gene trees, with genetic distances of 1.79% (COII), 1.30% (ND1), 0.30% (12S rRNA), and 1.00% (16S rRNA), all below the intraspecific divergence threshold. COI gene analysis revealed a 5.19% divergence from *Amyntas kiangensis* and only 0.88% from sequences annotated as *Amyntas schmardae* (which were confirmed to be misidentified *A. californica*). Based on multigene evidence, the specimen was identified as *Amyntas californica*, supporting *A. kiangensis* as a junior synonym. This study reports this species from Nayong County and provides molecular data for earthworm taxonomic revision in Southwest China.

Keywords

Earthworm, RNA-Seq, Molecular Identification, Nayong

Copyright © 2026 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

中国西南地区地处全球生物多样性热点之一的东喜马拉雅地区，独特的喀斯特地貌与亚热带湿润季风气候孕育了丰富的蚯蚓物种多样性。近年来，该区域蚯蚓分类学研究取得重要进展，孙静等在贵州梵净山国家级自然保护区及云南西双版纳等地相继发现并记述了满盈远盲蚓(*Amyntas impletus*)和喜湿远盲蚓(*Amyntas uvidus*)等新种，显著丰富了我国远盲蚓属(*Amyntas*)的物种记录[1]。截至2021年，中国已记录巨蚓科(Megascolecidae)蚯蚓579种(亚种)，其中远盲蚓属超400种[1]，为巨蚓科的优势类群。然而，相较于贵州梵净山、茂兰等保护区较完善的生物多样性调查，位于贵州西北部乌蒙山区的毕节市纳雍县，其蚯蚓区系组成及物种多样性状况尚缺乏系统性研究，存在明显的研究空白。

毕节市纳雍县地处滇东高原向黔中山地丘陵过渡的乌蒙山区倾斜地带，海拔高差显著，地形切割强烈，生境异质性高。该区域关于野生蚯蚓资源的物种组成与系统发育关系研究尚无文献记载。本研究在纳雍县采集到一蚯蚓样品，经形态初步鉴定为远盲蚓属(*Amyntas*)物种，但蚯蚓作为土壤穴居动物，长期适应密实、黑暗的地下环境，导致其形态分化受到显著限制，可用于分类的表型性状极为有限[2]。此外，体色等表型特征受环境因素影响极大，同一物种在不同土壤类型、湿度和营养条件下可呈现不同色泽，而不同物种可能因适应相似环境而表现出趋同的体色，造成鉴定混淆[3][4]。另外，Sato等(2023)通过对221个线粒体基因组序列(包括197个日本产标本和24个已发表的中国产标本序列)的分析发现，目前分别归类于*Amyntas*、*Metaphire*、*Duplodicrodrilus*和*Manus*的pheretimid蚯蚓在系统发育上相互嵌套，均不构成单系群(non-monophyletic)[5]。基于命名法规的优先律原则，这些属都应并入历史最悠久的属

Amyntas Kinberg, 1867 [5]。这一观点得到了多项基于 13 个蛋白编码基因(PCGs)构建的系统发育树的支持。Zhang 等的研究表明, *Metaphire californica* (KP688581)、*Duplodicodrilus schmardae* (KT429015)与多个 *Amyntas* 物种在系统发育树上互为姐妹群, 且支持率较高[6], 进一步佐证了这三个分类单元在属级合并后可能呈现更为密切的种内关系[7]。

本研究采用多基因联合鉴定方法, 对采自纳雍县的蚯蚓样品进行物种精准鉴定, 旨在明确该样品的分类学归属, 并为西南地区蚯蚓物种多样性与分类修订提供基础数据。

2. 材料与方法

2.1. 标本信息

2022 年 8 月, 研究团队在纳雍县一农地采集 1 条蚯蚓, 与伴生土壤一块带回实验室, 尾部体段洗净后放入冻存管(样本编号 T2226), 经液氮速冻处理后存于-80℃冰箱内保存备用, 其余体段保存于六盘水师范学院动物标本馆。

2.2. 转录组测序及分子标记提取

研究样品使用干冰运输, 委托北京百迈客生物科技有限公司进行 RNA 提取, 转录组测序文库的构建和测序。利用 Illumina novaseq6000 平台, 对不同长度的 cDNA 文库进行测序, 得到原始读取序列(Raw reads)。对 Raw reads 进行质控和过滤, 去除低质量和读长较短的 reads 后通过分类、聚类、矫正及拼接获得高质量的全长转录本(Unigene)。

根据中国蚯蚓多样性研究[8]-[10], 下载物种归属清晰, 采集信息完备的蚯蚓分类分子标记序列, 构建包含线粒体 12S rRNA、16S rRNA、COI、COII、ND1 基因序列数据集(AnnelidaRF.fas)。使用本地 Blast 构建蚯蚓分子标记参考数据库, 之后用 Unigene 数据与参考数据库比对, 提取 Unigene 中的 12S rRNA、16S rRNA、COI、COII、ND1 基因序列[11]。

2.3. 参考基因序列下载及系统发育分析

将所测得的分子标记基因序列经过上传 GenBank 进行搜索比对(megablast), 下载 100 条蚯蚓同源序列作为参考序列, 与待测自测基因序列一起构成序列数据集。参照本课题组之前的研究方法(双重单系法), 筛选最适合该数据集序列演化模型, 构建最大似然树(Maximum likelihood tree, ML tree)以及贝叶斯树(Bayesian inference tree, BI tree), 计算支系内及支系间的遗传距离[12] [13]。

3. 结果

3.1. 测序结果

经转录组测序及同源比对提取, 获得本研究蚯蚓样品线粒体 COI、COII、ND1、12S rRNA 及 16S rRNA 基因序列, 并上传 Genbank(索取号分别为 T2226COI、T2226COII、T2226ND1、T2226X12S、T2226X16S)。

3.2. 支系分化

将所测得蚯蚓基因序列(自测序列)提交 Genbank 进行搜索比对, 分别下载 100 条蚯蚓线粒体 COI、COII、ND1、12S rRNA 及 16S rRNA 同源序列作为参考序列, 与待测基因序列一起构成序列数据集。基于不同的系统发育分析方法(ML、BI)对该数据集构建系统发育树(图 1)表明, 本研究的自测序列与 *Amyntas californica*(Genbank 中标记为 *Metaphire californica*, 下同)、*Amyntas kiangensis* 及 *Amyntas*

schmardae (Genbank 中标记为 *Duplodicodrilus schmardae*, 下同)物种的同源基因序关系较近。其中, 基于 COI 基因构建的系统发育树中(图 1(A)), 自测序列与 *Amyntas schmardae* 同源序列聚为一个支持率不高的支系, 然后与 *Amyntas californica*、*Amyntas kiangensis*、*Megascolecidae sp.* (分类地位待定)同源序列聚为一个支持率较高的支系。其中 *Amyntas kiangensis* 序列聚在 *Amyntas californica* 内部。在基于 COII、ND1、12S rRNA 及 16S rRNA 基因构建的系统发育树中(图 1(B)、图 1(C)、图 1(D)、图 1(E)), 自测序列均与 *Amyntas californica* 同源序列聚为支持率较高的支系。其中在基于 COII、ND1 基因构建的系统发育树中(图 1(B)、图 1(C)), 自测序列与在 *Amyntas californica* 同源序列间有支系分化, 即 *Amyntas californica* 同源序列以较高的支持率聚为一个支系。在基于 12S rRNA 及 16S rRNA 基因构建的系统发育树中(图 1(D)、图 1(E)), 自测序列深嵌在 *Amyntas californica* 支系分化内部, 与 *Amyntas californica* 同源序列间没有支系分化。

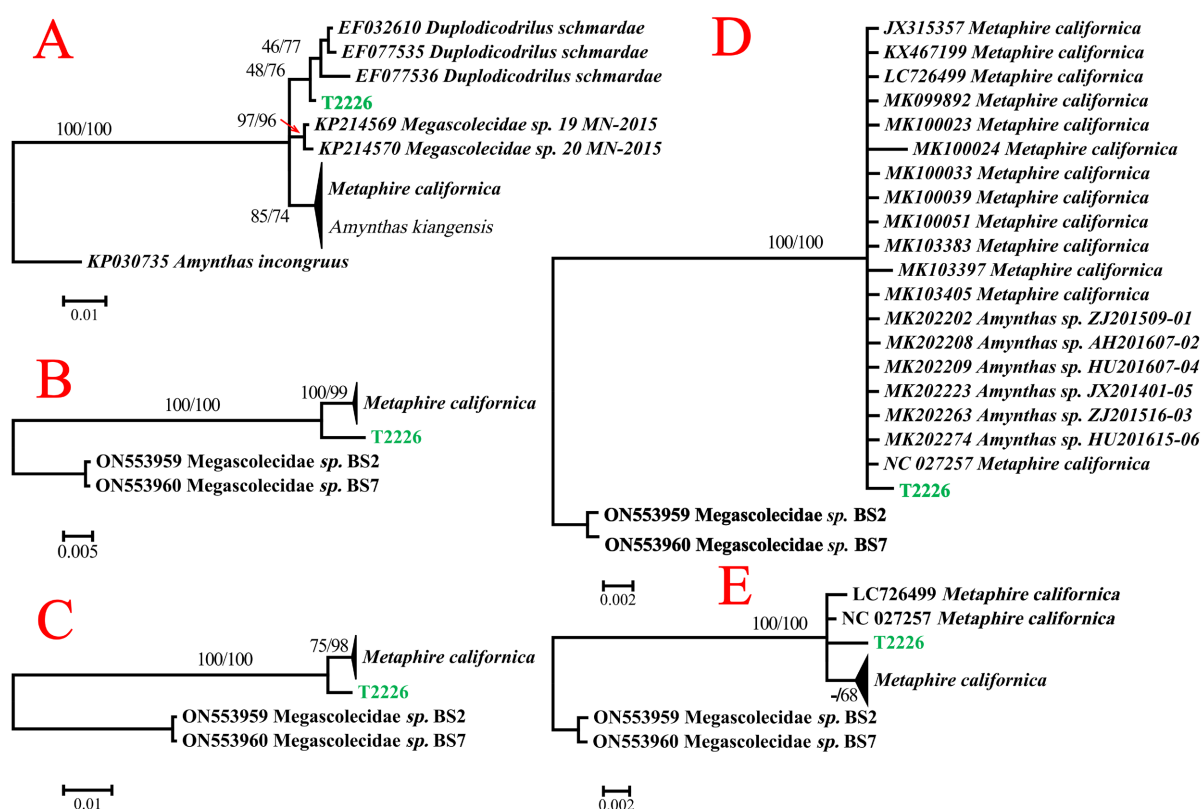


Figure 1. The Bayesian tree constructed based on the gene sequence datasets of COI (A), COII (B), ND1 (C), 12S rRNA (D), and 16S rRNA (E). The numbers near the branches represent the support rates (ML/B1) of the corresponding clades in phylogenetic trees constructed by different methods

图 1. 基于 COII (A)、COI (B)、ND1 (C)、12S rRNA (D)、16S rRNA (E) 基因序列数据集构建的贝叶斯树。支系附近数字为相关支系在不同方法构建的系统发育树中的支持率(ML/B1)

3.3. 遗传距离

基于 Kimura 二参数替换模型(K2P)估算序列间的遗传距离表明, 在线粒体 COI 基因序列构建的系统发育树中(图 1(A)), 自测序列与 *Amyntas schmardae* 支系遗传距离最小, 平均值为 0.88% (表 1); *Amyntas schmardae*、*Megascolecidae sp.*、*Amyntas californica* 及 *Amyntas kiangensis* 内部遗传距离分别为 0.94%、0.17%、0.08%、0.94%。在线粒体 COII 基因序列构建的系统发育树中, 自测序列与 *Amyntas californica*

支系遗传距离最小, 平均值为 1.79% (表 1); *Amyntas californica*、*Megascolecidae sp.* 内部遗传距离分别为 0.03%、0.00%。在线粒体 ND1 基因序列构建的系统发育树中, 自测序列与 *Amyntas californica* 支系遗传距离最小, 平均值为 1.30% (表 1); *Amyntas californica*、*Megascolecidae sp.* 内部遗传距离分别为 0.11%、0.00%。在线粒体 12S rRNA 基因序列构建的系统发育树中, 自测序列与 *Amyntas californica* 支系遗传距离最小, 平均值为 0.30% (表 1); *Amyntas californica*、*Megascolecidae sp.* 内部遗传距离分别为 0.08%、0.00%。在线粒体 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树中, T2226 与 *Amyntas californica* 支系遗传距离最小, 平均值为 1.00% (表 1); *Amyntas californica*、*Megascolecidae sp.* 内部遗传距离分别为 0.20%、0.00%。

Table 1. The genetic distance (%) information among branches in the phylogenetic trees in this study
表 1. 本研究中系统发育树各支系间遗传距离(%)信息表

序号	基因	支系 1	支系 2	最小值	最大值	平均值
1	COI	T2226	<i>Amyntas schmardae</i>	0.53	1.41	0.88
2	COI	T2226	<i>Megascolecidae sp.</i>	1.24	1.42	1.33
3	COI	T2226	<i>Amyntas californica</i>	1.78	2.13	1.82
4	COI	T2226	<i>Amyntas kiangensis</i>	4.88	5.63	5.19
5	COI	T2226	<i>Amyntas incongruus</i>	14.40	14.40	14.40
6	COI	<i>Amyntas schmardae</i>	<i>Megascolecidae sp.</i>	1.78	2.86	2.23
7	COI	<i>Amyntas schmardae</i>	<i>Amyntas californica</i>	1.96	2.86	2.24
8	COI	<i>Amyntas schmardae</i>	<i>Amyntas kiangensis</i>	4.69	6.39	5.38
9	COI	<i>Amyntas schmardae</i>	<i>Amyntas incongruus</i>	13.95	14.85	14.32
10	COI	<i>Megascolecidae sp.</i>	<i>Amyntas californica</i>	1.60	2.13	1.73
11	COI	<i>Megascolecidae sp.</i>	<i>Amyntas kiangensis</i>	4.50	5.44	4.91
12	COI	<i>Megascolecidae sp.</i>	<i>Amyntas incongruus</i>	14.17	14.40	14.29
13	COI	<i>Amyntas californica</i>	<i>Amyntas kiangensis</i>	3.39	4.13	3.62
14	COI	<i>Amyntas californica</i>	<i>Amyntas incongruus</i>	14.40	14.81	14.44
15	COI	<i>Amyntas kiangensis</i>	<i>Amyntas incongruus</i>	16.07	16.71	16.36
16	COII	T2226	<i>Amyntas californica</i>	1.66	1.97	1.79
17	COII	T2226	<i>Megascolecidae sp.</i>	10.69	10.69	10.69
18	COII	<i>Amyntas californica</i>	<i>Megascolecidae sp.</i>	10.56	11.85	11.09
19	ND1	T2226	<i>Amyntas californica</i>	1.11	2.33	1.30
20	ND1	T2226	<i>Megascolecidae sp.</i>	13.56	13.56	13.56
21	ND1	<i>Amyntas californica</i>	<i>Megascolecidae sp.</i>	13.67	15.27	14.04
22	12S rRNA	T2226	<i>Amyntas californica</i>	0.24	0.81	0.30
23	12S rRNA	T2226	<i>Megascolecidae sp.</i>	5.97	5.97	5.97
24	12S rRNA	<i>Amyntas californica</i>	<i>Megascolecidae sp.</i>	4.97	5.96	5.46
25	16S rRNA	T2226	<i>Amyntas californica</i>	0.58	2.91	1.00
26	16S rRNA	T2226	<i>Megascolecidae sp.</i>	5.59	5.60	5.59
27	16S rRNA	<i>Amyntas californica</i>	<i>Megascolecidae sp.</i>	4.97	7.75	5.54

4. 讨论

4.1. 加州腔蚓及相关物种的分类

本文使用基于多分子标记的分子系统发育学研究方法,对1号采自贵州纳雍县的蚯蚓进行初步的分子鉴定。结果表明,在系统发育树上,本研究样品与 *Amyntas californica*、*Amyntas kiangensis* 与 *Amyntas schmardae* 三个物种的聚类关系较近,这与三个物种特殊的分类学史有关系。*Amyntas californica* (Kinberg, 1867)是这三个物种中最早被描述的,最初被命名为 *Pheretima californica*, 模式产地为美国加利福尼亚州索萨利托湾(Sausalita Bay) [14]。该物种具有广泛的全球性分布,呈环热带分布格局,其原产地可能为中国,后被引入美洲及其他地区。历史上,该物种曾被记录的同物异名包括 *Pheretima modesta* 和 *Pheretima molesta*, Chen (1936)还提出该种可能是 *Metaphire hesperidum* (Beddard, 1892)的高级同物异名 [15]。*Amyntas kiangensis* 最初由 Michaelsen (1931)描述为 *Pheretima kiangensis*, 模式产地为中国苏州,模式标本保存于德国汉堡博物馆 [16]。该种在形态上属于典型的 pheretimoid 类群,具有“superficial male pores”等特征。*Amyntas schmardae* 的描述同样经历了复杂的属级变动,最初被描述为 *Megascolex schmardae*, 模式产地为日本 [17]。Beddard (1896)将其误认为新种 *Perichaeta trityphla* 并记录于巴巴多斯,后被证实为 *A. schmardae* 的次异名 [18]。该种在历史上曾被归入 *Metaphire* 属,称为 *Metaphire schmardae* (Genbank)。

Huang 等(2007)基于线粒体 COI 基因片段(566 bp)的 DNA 条形码研究提供了以上三个分类单元可能为同一物种的关键证据。该研究测定了包括 *Amyntas kiangensis*、*Amyntas californica* 和 *Amyntas schmardae* 在内的多种 pheretimoid 蚯蚓的序列,发现 *A. kiangensis* 与 *A. californica* 的遗传 *p* 距离仅为 0.7%~0.8%,远低于通常用于区分不同物种的阈值(一般>15%),据此提出 *A. kiangensis* 可能是 *A. californica* 的次异名 [19]。

4.2. 纳雍蚯蚓样本的分子鉴定

本研究从纳雍采集到的蚯蚓样本的线粒体 COII、ND1、12S rRNA 及 16S rRNA 基因与 *Amyntas californica* 同源序列聚为一个支持率较高的支系(图 1),且遗传距离不超过 2% (表 1),暗示属于同一物种。在基于线粒体 COI 基因构建的系统发育树中,自测序列与 *Amyntas californica*、*Amyntas kiangensis* 与 *Amyntas schmardae* 聚为一个支持率较高的支系,该支系内虽进一步分化为 *Amyntas californica*、*Amyntas kiangensis*、*Megascolecidae sp.* (巨蚓科未鉴定序列)与 *Amyntas schmardae* 几个支系,但支持率均不高,支系间遗传距离最高为 6.39%,未超过种间遗传距离 15% [19] [20],与之前认为 *Amyntas californica*、*Amyntas kiangensis* 为同一个物种的研究结果一致,*A. kiangensis* 可能是 *A. californica* 的次异名 [19]。另外,关于 *Amyntas schmardae* 的分子数据则揭示了更复杂的鉴定问题。Blakemore 等(2015)通过对韩国济州岛标本的 DNA 测序发现,样本 HY17 (鉴定为 *A. californica*)与 GenBank 中标注为“*Metaphire schmardae*”的序列 EF032610 (来自中国)相似度达 98%,但进一步比对确认后者实际上是对 *A. californica* 的误鉴定,而非真正的 *A. schmardae* (日本产) [17]。这一发现表明,GenBank 数据库中标记为 *A. schmardae* 的序列可能多源于 *A. californica* 的误鉴,导致这两种在形态上具有明显差异(*A. schmardae* 具有双精囊袋和肠盲囊,而 *A. californica* 缺乏这些结构)的物种在分子数据库中产生了混淆 [18]。本研究中来自 *A. schmardae* 的 3 条 COI 基因(EF032610、EF077535 及 EF077536)序列均来自中国,应是对 *A. californica* 的误鉴定。*Amyntas*、*Metaphire*、*Duplodocodrilus* 和 *Manus* 的 pheretimoid 蚯蚓在系统发育上相互嵌套,这些属都应并入历史最悠久的属 *Amyntas* Kinberg, 1867 [5],因此,本研究样品物种归属应为 *Amyntas californica*。

4.3. 转录组数据在蚯蚓分子鉴定中的应用

本研究采用转录组测序(RNA-seq)结合数据挖掘策略获取线粒体多基因序列,作为分子标记,对一未知蚯蚓进行多基因鉴定。相较于传统的单基因分子鉴定,基于不同基因分子鉴定避免了物种进化过程中,不完全分选(incomplete lineage sorting)带来的物种鉴定错误[21],提高分子鉴定的可靠性。同时,不同分子标记,因进化速率不同适用于不同分类层级的分类问题。例如,在蚯蚓的系统发育分析中,线粒体蛋白质编码基因(COI、COII和ND1)的进化速度快于其他基因,适用于种内、种复合体/群组内分析,线粒体16S rRNA和12S rRNA适用于属级分析[22],因此多基因鉴定可以对样品的不同层级分类地位进行多级鉴定。线粒体基因因其母系遗传、重组率低,且通常比核DNA具有更快的替换速率,为近期分化的支系提供了较多可变位点[23],因而常作为分子鉴定等种级水平分子系统发育研究的分子标记。而且,在所有细胞类型中持续恒定表达、维持细胞基本生命活动所必需的线粒体基因,更容易从不同组织的转录组测序中获取序列信息,提高了分子标记的成功率,降低了实验成本,因此基于转录组数据的多基因物种分子鉴定具有广阔的应用前景。

5. 结论

本研究采用转录组测序技术,对采自贵州省纳雍县的一号蚯蚓样品进行多基因分子鉴定。基于线粒体COI、COII、ND1、12S rRNA及16S rRNA基因序列构建的系统发育树显示,该样品与*Amyntas californica*聚为支持率较高的单系群,遗传距离均小于2%,而与*Amyntas kiangensis*及*Amyntas schmardae*的COI遗传距离分别为5.19%和0.88%。结合近期线粒体基因组系统发育研究揭示的属级非单系性,确认该样品应归属为加州远盲蚓*Amyntas californica*。本研究支持*A. kiangensis*为*A. californica*的次异名,并指出GenBank中标注为*D. schmardae*的序列实为*A. californica*的误鉴定。研究填补了贵州西北部蚯蚓区系研究的空白,证实了基于转录组测序的多基因联合鉴定在解决近缘种分类问题中的必要性和有效性。

致 谢

感谢六盘水师范学院明湖实验室李江丽、张荣洁、苏雨佳、熊可月、张燕、韦权昉、周玮维、黄秋月同学在野外采集和实验室工作方面提供的帮助。

基金项目

国家自然科学基金(31360512);教育部产学合作协同育人项目(LpssyXTYR202403);教育部供需对接就业育人项目(2025071776569);贵州省高等学校本科教学内容和课程体系改革项目(GZJG2025342);六盘水市科技局科技支撑项目(52020-2024-0-2-17, 52020-2024-PT-03);六盘水师范学院省级一流本科专业建设点项目(GZSYlzy202101, LPSSYlzy2003);六盘水师范学院一流本科课程培育项目(2022-03-042);六盘水师范学院大学生科研项目(2024DK223, 2024DK233)。

参考文献

- [1] 孙静, 蒋际宝, 贺晓清, 等. 西南地区远盲蚓属蚯蚓2新种记述[J]. 自然科学, 2021, 9(5): 800-806.
- [2] Barraux, A., Noël, S., Roy, V. and Dupont, L. (2024) Challenges of Molecular Barcode-Based Identification of Earthworm Specimens for Biodiversity Assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **12**, Article ID: 1358984. <https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1358984>
- [3] 翟俊杰, 赵慧峰, 商光申, 等. 蚯蚓基因组学的研究进展: 基于全基因组及线粒体基因组[J]. 生物多样性, 2022, 30(12): 207-217.
- [4] Pérez-Losada, M., Ricoy, M., Marshall, J.C. and Domínguez, J. (2009) Phylogenetic Assessment of the Earthworm Aporectodea Caliginosa Species Complex (Oligochaeta: Lumbricidae) Based on Mitochondrial and Nuclear DNA

- Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.003>
- [5] Sato, C., Nendai, N., Nagata, N., Okuzaki, Y., Ikeda, H., Minamiya, Y., *et al.* (2023) Origin and Diversification of Pheretimid Megascolecid Earthworms in the Japanese Archipelago as Revealed by Mitogenomic Phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **182**, Article 107735. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107735>
- [6] Zhang, L., Sechi, P., Yuan, M., Jiang, J., Dong, Y. and Qiu, J. (2016) Fifteen New Earthworm Mitogenomes Shed New Light on Phylogeny within the Pheretima Complex. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 20096. <https://doi.org/10.1038/srep20096>
- [7] Koo, J. and Hong, Y. (2025) Complete Mitochondrial Genome of the Korean Endemic Earthworm *Amyntas righii* (Clitellata: Megascolecidae). *Mitochondrial DNA Part B*, **11**, 44-48. <https://doi.org/10.1080/23802359.2025.2602249>
- [8] 袁柱. 横断山脉地区蚯蚓分类及分化与扩散研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [9] 赵琦. 中国海南岛环毛类蚯蚓分类学、系统发育学和古生物地理学研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [10] 高杏. 无量山地区巨蚓科分类及分子系统发育研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- [11] 熊荣川, 刘廷昌, 吕冬梅, 等. 贵州乌蒙大草原一种蚯蚓的多基因鉴定[J]. 六盘水师范学院学报, 2025, 37(6): 41-47.
- [12] 韩丹, 余文华, 张蓉, 等. 贵州麻江分布小弧斑姬蛙的分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(12): 145-150.
- [13] 熊荣川, 田应洲, 李松, 等. 威宁中华蟾蜍的分子鉴定[J]. 贵州农业科学, 2014(12): 32-36.
- [14] McCormack, G. (2007) Cook Islands Biodiversity Database, Version 2007.2. Cook Islands Natural Heritage Trust. <http://cookislands.bishopmuseum.org>
- [15] Chen, Y. (1936) On the Terrestrial Oligochaeta from Szechuan II. With the Notes on Gates' Types. Contributions from the Biological Laboratory of the Science Society of China. *Zoological Series*, **11**, 269-306.
- [16] Michaelsen W. (1931) *Ausländische opisthopore Oligochaeten*. *Zoologische Jahr-bücher, Abtheilung für Anatomie und Ontogenie der Thiere Jena*, **61**, 523-578.
- [17] Blakemore, R.J., Lee, S. and Seo, H. (2015) Account of Montane and Insular Speciation in Some Korean Megadriles (Annelida: Oligochaeta). *Journal of Species Research*, **4**, 1-22. <https://doi.org/10.12651/jsr.2015.4.1.001>
- [18] Beddard, F.E. (1896) On Some Earthworms from the Sandwich Islands Collected by Mr. R. L. Perkins; with an Appendix on Some New Species of *Perichaeta*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **64**, 194-211. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1896.tb03035.x>
- [19] Huang, J., Xu, Q., Sun, Z.J., Tang, G.L. and Su, Z.Y. (2007) Identifying Earthworms through DNA Barcodes. *Pedobiologia*, **51**, 301-309. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.05.003>
- [20] Liu, M., Miao, P., Liu, Z., Aspe, N.M., Zhang, Y. and Zhao, H. (2025) Two New Species of the Drawida Japonica Species Complex (Oligochaeta, Moniligastridae) from East Asia Delimited by Integrative Taxonomic Methods. *ZooKeys*, **1264**, 377-402. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1264.170881>
- [21] Steenyk, J.L., Li, Y., Zhou, X., Shen, X. and Rokas, A. (2023) Incongruence in the Phylogenomics Era. *Nature Reviews Genetics*, **24**, 834-850. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00620-x>
- [22] Chang, C. and James, S. (2011) A Critique of Earthworm Molecular Phylogenetics. *Pedobiologia*, **54**, S3-S9. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.07.015>
- [23] Dong, Z., Wang, Y., Li, C., Li, L. and Men, X. (2021) Mitochondrial DNA as a Molecular Marker in Insect Ecology: Current Status and Future Prospects. *Annals of the Entomological Society of America*, **114**, 470-476. <https://doi.org/10.1093/aesa/saab020>