

# 基于血餐 iDNA 技术对武陵洞蛭专吸蝠血性的研究

吴清姐, 向冬琴, 向海洋, 廖金屏, 李金美, 刘志霄\*

(吉首大学 生物资源与环境科学学院, 中国湖南 吉首 416000)

**摘要:** 武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*)是中国洞蛭属(*Sinospelaeobdella*)的模式种,生活在环境条件较为稳定的溶洞深处,吸食洞栖性蝙蝠的血液,在洞顶壁完成其全部生活史,属于真洞穴动物。为了探究武陵洞蛭是否具有专吸蝠血性,2022年8月至2023年8月按季度在湘西州境内已发现有武陵洞蛭栖息的6个溶洞中进行微生境特征数据和样品采集,利用血餐 iDNA 技术对106条武陵洞蛭的寄主物种进行鉴定,结果显示:1)该蛭种通常栖息在潮湿、粗糙及岩屑(或泥屑)厚度为0.2~0.4 cm的洞顶壁,其种群分布点通常是蝙蝠的常栖点;2)其寄主组成为翼手目动物5科5属11种,中华菊头蝠(*Rhinolophus sinicus*)、大蹄蝠(*Hipposideros armiger*)和西南鼠耳蝠(*Myotis altarium*)是其主要的吸血对象;3)武陵洞蛭各群体的食物多样性指数和生态位宽度基本上均低于总体水平,冬季的食物多样性指数和生态位宽度均高于其他季节。总之,武陵洞蛭主要分布在蝙蝠常栖点附近的洞顶壁,因长期适应于溶洞生活,其食性已发生特化,已演化出专门吸食蝙蝠血液的行为生态习性。因此,对武陵洞蛭专吸蝠血性的深入研究将有助于探究蛭类动物食物多样性的演化路径,揭示吸血性蛭类食性演化的行为生态机制。

**关键词:** 武陵洞蛭; 血餐; iDNA 技术; 洞栖性蝙蝠; 专吸蝠血性

中图分类号: Q958

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)03-0247-11

## Study of *Sinospelaeobdella wulingensis* Exclusively-Batblood-Sucking Based on Bloodmeal iDNA Technology

WU Qingjie, XIANG Dongqin, XIANG Haiyang, LIAO Jinping, LI Jinmei, LIU Zhixiao\*

(College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China)

**Abstract:** Wuling cave leeches (*Sinospelaeobdella wulingensis*), the type species of *Sinospelaeobdella* as well as a kind of troglodites, live with cave-dwelling bats in some karstic caves of relatively stable environmental conditions. They feeds on the blood of cave-dwelling bats, and live in the roof of the caves at all their lives. To explore the exclusively-batblood-sucking of the leeches, from August 2022 to August 2023, appropriate samples and relevant data of micro-habitat characteristics were collected by conventional ways in six caves of *S. wulingensis* in Xiangxi Tujiazu and Miaozi Autonomous Prefecture, Hunan Province, and a total of 106 host bloodmeal samples of *S. wulingensis* were identified by iDNA technology. The results showed that: 1) The cave leeches usually inhabited some wet and rough cave ceilings, which have a 0.2~0.4 cm thick layer of rock/mud debris, and the population distribution of the leeches was closely related to the roost sites of cave-dwelling bats; 2) The hosts of the cave leeches included 11 species from 5 genera and 5 families of Chiroptera, among which *Rhinolophus sinicus*, *Hipposideros armiger* and *Myotis altarium* were the main blood supplier; 3) The food diversity index and niche breadth of each *S. wulingensis* population were lower than the overall levels, while these characteristic indicators in winter were higher than those in other sea-

收稿日期: 2023-10-11; 修回日期: 2023-12-03; 网络首发日期: 2024-02-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(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); 吉首大学研究生科技创新项目(Jdy22062)

作者简介: 吴清姐(1990-),女,苗族,湖南湘西土家族苗族自治州人,硕士研究生;\*通信作者: 刘志霄(1965-),男,湖南永州人,博士,教授,主要从事动物生态学和保护生物学研究, E-mail: zqliu1965@163.com。

sons. In conclusion, Wuling cave leeches are mainly distributed in the cave roof near where bats often roost. Due to long-term adaptation to cave life, they have evolved a specialized feeding habit and ecological behavior, that is, exclusively-batblood-sucking. Further studying the bat blood-sucking nature of the leeches will help to explore the evolutionary path of leech food diversity and reveal the behavioral ecological mechanism of haematophagous leech feeding habits.

**Key words:** *Sinospelaeobdella wulingensis*; bloodmeal; iDNA technology; cave-dwelling bat; exclusively-batblood-sucking

(*Life Science Research*, 2024, 28(3): 247-257)

蛭类隶属于环节动物门(Annelida)蛭纲(Hirudinea), 根据栖息环境的不同, 通常分为水蛭和陆蛭两大类。Sawyer<sup>[1]</sup>对陆蛭进行了分类整理, 将其统归为山蛭科(Haemadipsidae), 其下分为两组17属。之后, 其中的3个类组被修订为2属, 即三颚四环蛭属(*Tritetradella*)和山蛭属(*Haemadipsa*)<sup>[2-4]</sup>。近年, 基于形态和分子数据, 本课题组将首先发现于湘西土家族苗族自治州(以下简称湘西州)域内岩溶洞穴(karstic cave)中的陆蛭确立为3个类组的一新属——中国洞蛭属(*Sinospelaeobdella*), 其模式种为武陵洞蛭(*S. wulingensis*)<sup>[5]</sup>。

迄今, 已知生活在溶洞中的陆蛭仅2属3种, 即山蛭科2个类组光蛭属(*Leiobdella*)的新几内亚光蛭(*L. jawarerenis*)<sup>[6-7]</sup>以及3个类组中国洞蛭属的武陵洞蛭<sup>[5]</sup>和洞穴山蛭(*S. cavatuses*)<sup>[8]</sup>。随着调查研究的深入, 今后可望在溶洞中发现更多的陆蛭, 我们将所有的洞栖性陆蛭统称为洞蛭(cave leech), 以区别于传统上所谓的水蛭(water leech)和陆蛭(land leech)。

洞蛭是一类特殊的环节动物, 终生栖息在黑暗潮湿的溶洞顶壁, 体表缺乏色素, 在洞顶壁完成其全部生活史, 已演化成为真洞穴动物。野外观察和现场试验发现, 洞蛭可能专一性地吸食洞栖性蝙蝠的血液<sup>[5-6, 8-9]</sup>, 但这种“专吸蝠血性”(exclusively-batblood-sucking)还需要更充分的研究数据支持。

在过去10年中, 环境DNA(environmental DNA, eDNA)作为一种获取生物多样性信息的非损伤性工具受到推崇<sup>[10-11]</sup>。eDNA是指可以从环境样本中(如空气、水、土壤或其他动物身上)提取而不需要从目标生物体本身提取的DNA。在动物的eDNA研究中, 最为常用的是iDNA(invertebrate-derived DNA), 即从寄生性无脊椎动物身上所获取的DNA。iDNA可作为工具进行脊椎动物多样性调查, 如利用从蝇<sup>[12-14]</sup>、蚊<sup>[15-16]</sup>、蝉<sup>[17]</sup>等无脊椎动

物身上获得的iDNA来评估目标区域内的脊椎动物多样性。此外, 其还可用于调查生物多样性的其他维度, 如人畜共患性疾病<sup>[12, 18]</sup>。研究表明, 利用从野外采集的蛭类血液样品来筛选病毒及其脊椎动物寄主具有广阔的前景<sup>[18-19]</sup>。

无脊椎动物的血餐(bloodmeal)中保存着从其寄主身上难以直接获得的血液样本。血餐iDNA分析是一种方便有效的寄主物种鉴定与监测方法。当前, 从寄生性、暂寄生性或半寄生性无脊椎动物的血餐中获取其寄主的DNA样品(即iDNA), 并通过对血餐iDNA的分析来鉴定寄主动物的种类, 进而研究其寄主动物的多样性, 已成为研究寄生物与寄主的生态关系, 以及寄主动物多样性的一种新趋势。

鉴于洞蛭是否专一性地吸食洞栖性蝙蝠的血液一直难以通过确切的实验予以验证, 本研究选择武陵洞蛭作为研究对象, 对其血餐iDNA进行分析。研究结果将有助于深入理解洞蛭与洞栖性蝙蝠之间的暂寄生关系, 以及山蛭科的系统演化路径或食性多样化过程, 同时对洞蛭及洞栖性蝙蝠资源的保护实践也有参考意义。

## 1 研究方法

### 1.1 研究区域简况及样品采集

湘西州(109°10.0'~110°22.5'E, 27°44.5'~29°38.0'N)位于武陵山脉东段, 地处我国第二阶梯向第三阶梯的过渡地带, 域内属亚热带季风湿润性气候, 雨量丰沛, 溶洞众多, 为洞穴动物的栖息和繁衍提供了良好的生态条件<sup>[20-21]</sup>。

2022年8月至2023年8月, 按春、夏、秋、冬4个季节分别对湘西州境内有武陵洞蛭分布的堂乐洞、旧寨坪洞、水牛洞进行数据和样品采集, 同时以鸡公洞、黄泥洞和金鸡洞作为参考样洞。

野外工作期间, 观察并记录洞穴中有蛭区(指有蛭群分布和卵茧群黏附的洞段, 或武陵洞蛭集

中分布之处)顶壁的质地、岩屑、滴水(或壁面水珠)、平整(或凹凸)情况。将 DJL-18 型温湿光三参数记录仪、Kestrel 5500 型便携式气象站和 TNHY-5-A 型手持式环境监测仪放置于有蛭区具有代表性的固定位置,以自动测量空气温度、露点温度、空气湿度、空气中 CO<sub>2</sub> 浓度、大气压和热指数等数据。利用 T391+激光测距仪、高性能手机等工具测量及拍摄记录武陵洞蛭、蝙蝠的栖点位置与分布情况,对武陵洞蛭的数量进行统计,对蝙蝠个体进行计数、种类鉴定和拍照记录,特别注意观察在洞内栖息的蝙蝠的优势种类,将不能识别的种类带回实验室进行鉴定。同时,记录在有蛭区洞顶壁、侧壁及底壁栖息或活动的其他生物种类。

综合考虑研究目的、研究条件及武陵洞蛭种群的实际数量和可持续性,分别在堂乐洞、旧寨坪洞和水牛洞按季度采样 4 次,每个洞采集的武陵洞蛭总数为 20~25 条;同时在鸡公洞、黄泥洞和金鸡洞进行参考性采样 1 次,其中鸡公洞采样 9 条,黄泥洞采样 14 条,金鸡洞采样 13 条。在每个洞穴的有蛭区选择刚吸过血的个体(鲜红色),佩戴乳胶手套进行样品采集。将样品保存在无水乙醇中,带回实验室,静置 1~2 d 备用。

### 1.2 DNA 的提取、扩增与测序

将每一条武陵洞蛭单独视为一份样品,用解剖刀解剖用无水乙醇浸泡过的样品,取出嗉囊里的血餐,根据生工生物工程(上海)股份有限公司提供的 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(B518251)所介绍的操作步骤,对血餐中的 iDNA 进行提取。提取物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,于 -20 °C 冰箱中保存备用。

选择不同动物类群的通用引物<sup>[22]</sup>(表 1)对每一份血餐 iDNA 样品进行 PCR 扩增。PCR 反应体系的总体积为 25 μL,其中包括 2 μL 模板 DNA、

2.5 μL 10× PCR 缓冲液、2 μL 25 mmol/L 的 dNTP、1 μL 10 μmol/L 的引物、0.5 μL *Taq* 酶,用双蒸水补足至 25 μL。PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min;随后 95 °C 变性 12 s,59 °C 退火 30 s,70 °C 延伸 25 s,循环 40 次;最后在 70 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 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工程(上海)股份有限公司进行纯化后测序。

### 1.3 数据分析

利用 Lasergene 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行拼接,然后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析,再结合野外调查时在洞穴中观察到的常栖动物,鉴定该基因序列所对应的具体物种,进而确定武陵洞蛭的吸血对象(即寄主)。

使用出现频率(frequency of occurrence,  $f_o$ )和相对序列丰度(relative read abundance,  $r_{ra}$ )<sup>[23]</sup>来估计武陵洞蛭的食物组成。

$f_o$  是含某一食物类别的样品数占总样品数的百分比,计算公式如下:

$$f_o = \frac{n_i}{n} \times 100\%$$

式中,  $n_i$  表示出现  $i$  类食物的样品数,  $n$  是有效样品总数。由公式可知,当一份样品中存在一种以上食物时,全部食物类别的  $f_o$  之和大于 100%。

$r_{ra}$  是某一食物类别的序列数占该样品总食物序列的百分比,反映的是相对生物量,其计算公式如下:

$$r_{ra} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \frac{s_{i,j}}{\sum_{i=1}^t s_{i,j}} \times 100\%$$

式中,  $t$  是食物类别数,  $n$  是有效样品总数,  $s_{i,j}$  是食物类别  $i$  在样品  $j$  中的序列数。由公式可知,

表 1 武陵洞蛭血餐 iDNA 提取所使用的引物及产物扩增长度

Table 1 Primers used for iDNA extraction and length of amplified products from the bloodmeal of *S. wulingensis*

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增产物长度 Length of amplified products/bp
脊椎动物 12S Vertebrate 12S	12SA 12SO	CTGGGATTAGATACCCACTAT GTCGATTATAGGACAGGTTCTCTA	100~122
哺乳动物 16S Mammal 16S	16Smam1 16Smam2	CGGTTGGGTTGACCTCGGA GCTGTTATCCCTAGGGTAACT	90~119
节肢动物 COI Arthropod COI	MZArtF MZArtR	AGATATTGGAACWTTATATTTTATTTTGG WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC	0
无脊椎动物 COI Invertebrate COI	LCO1490 HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGTTGACCAAAAAATCA	665~679

全部食物类别的  $r_m$  之和为 100%。

使用 Shannon-Wiener 指数( $H'$ )、Pielou 均匀度指数( $J'$ )及生态位宽度指数(niche breadth index,  $B$ )描述动物食物组成的多样性<sup>[24]</sup>。 $H'$ 表示食物类群的复杂程度,  $H'$ 越大, 表示食物类群越复杂;  $J'$ 与食物种类的丰富度有关,  $J'$ 越大, 表示食物种类越丰富;  $B$ 用于表示物种对资源的利用情况, 生态位越宽, 表示该物种可利用的食物越多样<sup>[25]</sup>, 特化程度越小。3个指数的计算公式如下:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

$$J' = H'/H_{\max}, H_{\max} = \ln s$$

$$B = 1 / \sum p_i^2$$

式中,  $p_i$ 表示某种食物  $i$  在所有食物中所占的比例,  $s$ 表示所有样品中所有食物种类的总数。

所有的数据统计分析与作图均在 Excel、SPSS 和 GraphPad 软件中完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 武陵洞蛭的生境特征

6个洞穴中所采集数据的综合分析结果显示: 在有蛭区, 空气温度为(18.01±3.34)℃, 露点温度为(15.28±3.14)℃, 空气湿度为(85.58±4.78)%, 空气中

CO<sub>2</sub>的体积分数为(949.02±420.30) μL/m<sup>3</sup> (或ppm), 大气压为(966.65±25.96) hPa, 热指数为(18.09±3.50)℃, 光照强度为 0, 洞顶壁滴水的 pH 值为 6.8±0.2。

本研究在现场共观察到武陵洞蛭 1 929 条(其中有一些蛭体因每季度一次观察而被多次重复计数), 它们通常栖息在离洞口 12~100 m 的潮湿、粗糙且岩屑(或泥屑)厚度为 0.2~0.4 cm 的洞顶壁, 离洞底的高度为 1.00~15.90 m。一些有蛭区洞道的地面上有水沟, 沟内可见面积大小或流速不一的常流水或水体不稳定的静水坑。在没有水体淹没的地面通常有散落或厚积的蝙蝠粪粒及粪堆, 而与蝙蝠粪便厚积的地面相对应的洞顶壁就是蝙蝠经常栖挂的场所, 即常栖点(common roosting point), 同时也是武陵洞蛭数量较多的壁面。春夏期间, 武陵洞蛭在洞内的分布相对分散, 秋冬时期则相对聚集。在武陵洞蛭集中分布的洞顶壁及其附近, 通常可见蝙蝠种群或个体栖挂, 有时还可见灶马、尺蛾、菌蚊、马陆、伪蝎等节肢动物栖息(表 2)。

在 6 个样洞中共进行了 15 次观察, 在有蛭区共观察到 9 种 3 203 只蝙蝠(其中有一些蝙蝠因每季度一次观察而被多次重复计数), 其中中华菊头蝠(*Rhinolophus sinicus*)和大蹄蝠(*Hipposideros armiger*)占优势(表 3)。就各洞穴中蝙蝠的种类和

表 2 湘西州武陵洞蛭的微生境特征

Table 2 Microhabitat characteristics of *S. wulingensis* in Xiangxi Prefecture

洞名 Cave name	武陵洞蛭条数 Number of <i>S. wulingensis</i> *	有蛭区地面情况 Ground conditions of leech area	有蛭区的高度 Height of leech area/m	与蝙蝠的最近距离 Closest distance to the bats/m	武陵洞蛭分布情况 Distribution of <i>S. wulingensis</i>	武陵洞蛭周围的动物种类 Species of other animals around <i>S. wulingensis</i>
堂乐洞 Tangle cave	651	水沟、泥土、蝙蝠粪堆或散落粪粒	2.10~15.90	0.80	秋冬: 聚集; 春夏: 散布	蝙蝠、尺蛾、菌蚊、马陆、伪蝎
水牛洞 Shuiniu cave	569	水沟、蝙蝠粪堆或散落粪粒	1.24~3.57	0.50	冬: 聚集; 春夏秋: 散布	蝙蝠、灶马、尺蛾、菌蚊、马陆、伪蝎
旧寨坪洞 Jiuzhaiping cave	180	沙石地面、蝙蝠粪堆或散落粪粒	1.24~1.90	0.05	冬: 聚集; 春夏秋: 散布	蝙蝠、灶马、菌蚊、马陆
金鸡洞 Jinji cave	278	石块地面、蝙蝠粪堆或散落粪粒	1.00~12.25	0.02	春: 聚集或散布	蝙蝠、马陆
鸡公洞 Jigong cave	12	水沟、石块地面	1.00~3.50	20.00	冬: 散布	蜘蛛、菌蚊、灶马
黄泥洞 Huangni cave	239	水沟、蝙蝠粪堆或散落粪粒	1.50~5.50	0.01	春: 散布	蝙蝠、灶马、尺蛾
总计 Total	1 929	水沟、沙石、石块、泥土、蝙蝠粪堆或散落粪粒	1.00~15.90	0.01~20.00	聚集或散布	蝙蝠、尺蛾、灶马、菌蚊、马陆、伪蝎

注: \* 指多次观察后统计的总条数, 其中会有一些蛭体因每季度一次观察而被多次重复计数。

Note: \* refers to the total number of leeches counted in each observation. Some of the leeches were repeatedly included due to the quarterly observation.

数量而言,中华菊头蝠和大蹄蝠都远多于其他蝙蝠种。堂乐洞洞道复杂,蝙蝠多达 8 种,其中中华菊头蝠、大蹄蝠和西南鼠耳蝠(*Myotis altarium*)较为常见,冬季聚集在一起冬眠的中华菊头蝠可多达 1 000 只以上。5 月初,在黄泥洞观察到中华菊头蝠、大蹄蝠等 4 种蝙蝠。在水牛洞栖息的主要是大蹄蝠和中华菊头蝠,其他种类的蝙蝠也偶见,大蹄蝠常集群栖息在洞口附近,数量 500~700 只,中华菊头蝠常栖息在洞穴深处,数量 100~200 只。

**2.2 武陵洞蛭血餐 iDNA 的物种鉴定与食物组成**  
本研究在 6 个溶洞中共采样 15 次,总计采集

106 条武陵洞蛭样品进行血餐 iDNA 分析,其中,节肢动物 *COI* 引物(MZArF/MZArR)并未扩增出条带;无脊椎动物 *COI* 引物(LCO1490/HCO2198)的扩增结果为武陵洞蛭本身的 *COI* 基因;脊椎动物 12S 引物(12SA/12SO)和哺乳动物 16S 引物(16Smam1/16Smam2)扩增出了蝙蝠的 DNA。通过对数据进行综合分析发现:武陵洞蛭的食性单一,只吸食哺乳纲(Mammalia)翼手目(Chiroptera)动物(蝙蝠)的血液;没有发现取食翼手目以外的其他动物类群的 iDNA 证据。在武陵洞蛭的血餐 iDNA 中,共检测出 5 科 5 属 11 种洞栖性蝙蝠的标记基因(表 4)。

表 3 在 6 个样洞的有蛭区所观察到的洞栖性蝙蝠的分布情况  
Table 3 Distribution of cave-dwelling bats observed in the 6 sample caves of the leech areas

洞名 Cave name	观察次数 Observation times	蝙蝠种数 Number of bat species	蝙蝠种类 Species of cave-dwelling bats	蝙蝠数量 Number of bats*	蝙蝠的栖位 Roost site of bats	优势种 Dominant species of bats
堂乐洞 Tangle cave	4	8	A1, B, C1, A4, A2, A3, C2, A5	1 766	洞口附近, 洞穴深处	A1, B
水牛洞 Shuiniu cave	4	6	B, A1, A3, A2, C1, C3	830	洞口附近, 洞穴深处	B, A1
旧寨坪洞 Jiuzhaiping cave	4	4	B, A1, A4, A2	234	洞口附近, 洞穴深处	B
金鸡洞 Jinji cave	1	4	B, A1, A4, A2	75	洞口附近, 洞穴深处	B
鸡公洞 Jigong cave	1	5	A1, A4, A2, A5, C1	9	洞穴深处	A1
黄泥洞 Huangni cave	1	4	A1, B, A4, A5	289	洞穴深处	A1, B
总计 Total	15	9	A1, B, C1, A3, A4, A5, A2, C2, C3	3 203	洞口附近, 洞穴深处	A1, B

注: \* 指多次观察后统计的总数,其中有一些蝙蝠因每季度一次观察而被多次重复计数。A1, 中华菊头蝠; A2, 小菊头蝠; A3, 贵州菊头蝠; A4, 皮氏菊头蝠; A5, 大耳菊头蝠; B, 大蹄蝠; C1, 西南鼠耳蝠; C2, 华南鼠耳蝠; C3, 中华鼠耳蝠。表中的蝙蝠种类及优势种均按该物种数量多少进行排序。

Notes: \* refers to the total number of bats counted in each observation. Some of the bats were repeatedly included due to the quarterly observation. A1, *Rhinolophus sinicus*; A2, *R. pusillus*; A3, *R. rex*; A4, *R. pearsoni*; A5, *R. macrotis*; B, *Hipposideros armiger*; C1, *Myotis altarium*; C2, *M. laniger*; C3, *M. chinensis*. The bat species and dominant species in the table are sorted according to the number of the species.

表 4 基于血餐 iDNA 技术分析的武陵洞蛭的食物来源  
Table 4 Dietary sources of *S. wulingensis* based on bloodmeal iDNA analysis

科 Family	属 Genus	种 Species	扩增出的 DNA 条数 Number of amplified DNA strips
菊头蝠科 Rhinolophidae	菊头蝠属 <i>Rhinolophus</i>	中华菊头蝠 <i>Rhinolophus sinicus</i>	204
		贵州菊头蝠 <i>Rhinolophus rex</i>	12
		小菊头蝠 <i>Rhinolophus pusillus</i>	4
		中菊头蝠 <i>Rhinolophus affinis</i>	16
		云南菊头蝠 <i>Rhinolophus yunnanensis</i>	4
蝙蝠科 Vespertilionidae	鼠耳蝠属 <i>Myotis</i>	西南鼠耳蝠 <i>Myotis altarium</i>	64
		大卫鼠耳蝠 <i>Myotis davidü</i>	28
		大鼠耳蝠 <i>Myotis myotis</i>	8
		蹄蝠科 Hipposideridae	蹄蝠属 <i>Hipposideros</i>
长翼蝠科 Miniopteridae	长翼蝠属 <i>Miniopterus</i>	亚洲长翼蝠 <i>Miniopterus fuliginosus</i>	8
假吸血蝠科 Megadermatidae	假吸血蝠属 <i>Megaderma</i>	印度假吸血蝠 <i>Megaderma lyra</i>	4

从物种组成上看, 武陵洞蛭的吸血对象(寄主)包括中华菊头蝠、大蹄蝠、西南鼠耳蝠等 11 种蝙蝠。在 15 次检测中, 各种寄主的出现次数、出现频率( $f_o$ )和相对序列丰度( $r_{ra}$ )如表 5 所示。出现 10 次以上的仅有 1 种, 出现 5~10 次的有 2 种, 有 4 种仅在 2~4 次检测中出现, 另有 4 种仅在 1 次检测中出现。中华菊头蝠的出现频率和相对序列丰度分别为 93.33%和 48.11%, 西南鼠耳蝠的分别为 40.00%和 15.09%, 大蹄蝠的分别为 40.00%和 16.98%。可见, 中华菊头蝠、西南鼠耳蝠和大蹄蝠是武陵洞蛭的主要食物来源, 约占总食物来源的 80.18%, 是武陵洞蛭的常吸血寄主。另外, 武陵洞蛭偶尔可吸食到大卫鼠耳蝠(*Myotis davidii*;  $f_o$ : 26.67%,  $r_{ra}$ : 6.61%)、中菊头蝠(*Rhinolophus affinis*;  $f_o$ : 6.67%,  $r_{ra}$ : 3.77%)、贵州菊头蝠(*Rhinolophus rex*;  $f_o$ : 20.00%,  $r_{ra}$ : 2.84%)、亚洲长翼蝠(*Miniopterus fuliginosus*;  $f_o$ : 13.33%,  $r_{ra}$ : 1.89%)、大鼠耳蝠(*Myotis myotis*;  $f_o$ : 13.33%,  $r_{ra}$ : 1.89%)、小菊头蝠(*Rhinolophus pusillus*;  $f_o$ : 6.67%,  $r_{ra}$ : 0.94%)、印度假吸血蝠(*Megaderma lyra*;  $f_o$ : 6.67%,  $r_{ra}$ : 0.94%)和云南菊头蝠(*Rhinolophus yunnanensis*;  $f_o$ : 6.67%,  $r_{ra}$ : 0.94%)的血液, 这些蝙蝠是武陵洞蛭的偶吸血寄主。

### 2.3 武陵洞蛭的食物多样性分析

#### 2.3.1 不同洞穴中武陵洞蛭的食物多样性

分析结果显示, 在 6 个洞穴中, 武陵洞蛭的血餐总体上是由菊头蝠科(Rhinolophidae)菊头蝠属(*Rhinolophus*)、蹄蝠科(Hipposideridae)蹄蝠属(*Hipposideros*)、蝙蝠科(Vespertilionidae)鼠耳蝠属(*Myotis*)、长翼蝠科(Miniopteridae)长翼蝠属(*Miniopterus*)、假吸血蝠科(Megadermatidae)假吸血蝠属(*Megaderma*)组成的(图 1)。其中, 显著性  $t$  检验

结果显示, 蹄蝠科蹄蝠属、蝙蝠科鼠耳蝠属和菊头蝠科菊头蝠属的相对含量差异显著( $P<0.01$ )。菊头蝠科菊头蝠属是水牛洞、金鸡洞、黄泥洞武陵洞蛭种群的主要食物来源, 蹄蝠科蹄蝠属是旧寨坪洞武陵洞蛭种群的主要吸血对象, 而蝙蝠科鼠耳蝠属是堂乐洞、鸡公洞武陵洞蛭种群的主要寄主。

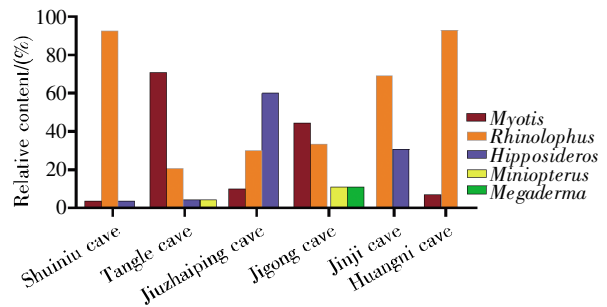


图 1 不同洞穴武陵洞蛭血餐 iDNA 在属水平上的相对含量

Fig.1 Relative content of bloodmeal iDNA of *S. wulingensis* in different caves at the genus level

本研究检测出武陵洞蛭共吸食 11 种蝙蝠的血液, 其食物多样性指数( $H'$ )为 0.705, 均匀度指数( $J'$ )为 0.284, 生态位宽度指数( $B$ )为 3.440, 各个洞穴武陵洞蛭种群的食物多样性指数( $H'$ )和生态位宽度指数( $B$ )基本均低于总体水平(表 6)。堂乐洞、水牛洞、鸡公洞的武陵洞蛭种群都检测出了 5 种食物, 而金鸡洞(头洞)种群的食物只有 2 种。鸡公洞武陵洞蛭种群的食物多样性指数( $H'$ )为 0.636, 均匀度指数( $J'$ )为 0.395, 生态位宽度指数( $B$ )为 3.857, 说明鸡公洞武陵洞蛭种群的食物类群最为复杂, 食物种类最丰富, 武陵洞蛭能利用的食物种类最多。其次就是堂乐洞武陵洞蛭种群, 其食物多样性指数( $H'$ )=0.506和均匀度指数( $J'$ )=0.315

表 5 武陵洞蛭血餐 iDNA 样品中的寄主种类分析结果( $n=15$ )

Table 5 Analysis of host species based on the bloodmeal iDNA samples of *S. wulingensis* ( $n=15$ )

寄主物种 Host species	在 15 次分析中寄主物种所出现的次数 Number of occurrence of host species in the analysis of 15 times	出现频率 $f_o$ (%)	相对序列丰度 $r_{ra}$ (%)
中华菊头蝠 <i>Rhinolophus sinicus</i>	14	93.33	48.11
西南鼠耳蝠 <i>Myotis altarium</i>	6	40.00	15.09
大蹄蝠 <i>Hipposideros armiger</i>	6	40.00	16.98
大卫鼠耳蝠 <i>Myotis davidii</i>	4	26.67	6.61
贵州菊头蝠 <i>Rhinolophus rex</i>	3	20.00	2.84
亚洲长翼蝠 <i>Miniopterus fuliginosus</i>	2	13.33	1.89
大鼠耳蝠 <i>Myotis myotis</i>	2	13.33	1.89
印度假吸血蝠 <i>Megaderma lyra</i>	1	6.67	0.94
小菊头蝠 <i>Rhinolophus pusillus</i>	1	6.67	0.94
中菊头蝠 <i>Rhinolophus affinis</i>	1	6.67	3.77
云南菊头蝠 <i>Rhinolophus yunnanensis</i>	1	6.67	0.94

都较高,食物生态位宽度也较大( $B=2.483$ )。金鸡洞武陵洞蛭种群的食物多样性指数最低( $H'=0.268$ ),生态位宽度指数也较低( $B=1.742$ ),而水牛洞武陵洞蛭种群的均匀度指数( $J'=0.223$ )和生态位宽度指数( $B=1.641$ )都最低,说明这两个种群能利用的食物种类较少。

2.3.2 不同季节武陵洞蛭的食物多样性

从图 2 可知,堂乐洞、水牛洞和旧寨坪洞武陵洞蛭种群全年的食物都主要来源于菊头蝠科菊头蝠属、蝙蝠科鼠耳蝠属、蹄蝠科蹄蝠属。另外,在堂乐洞武陵洞蛭种群的食物来源中我们还检测到了长翼蝠科长翼蝠属。显著性  $t$  检验分析结果显示,蝙蝠科鼠耳蝠属和蹄蝠科蹄蝠属在武陵洞蛭四季血餐中的含量差异显著( $P<0.01$ ),菊头蝠科菊头蝠属在武陵洞蛭四季血餐中的含量差异极显著( $P<0.001$ )。

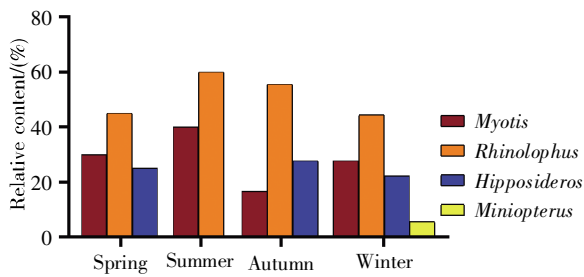


图 2 不同季节武陵洞蛭血餐 iDNA 在属水平上的相对含量  
Fig.2 Relative content of bloodmeal iDNA of *S. wulingensis* in different seasons at the genus level

不同的武陵洞蛭种群在各个季节的血餐 iDNA 也存在一定的差异(图 3)。一年四季中,水牛洞武陵洞蛭种群的主要吸血对象是中华菊头蝠,堂乐洞武陵洞蛭种群主要吸食西南鼠耳蝠的血液,而旧寨坪洞武陵洞蛭种群在春、秋、冬三季的主要食物来源是大蹄蝠。

不同季节武陵洞蛭的食物多样性存在一定的差异(表 7)。其中,冬季的食物多样性指数( $H'=0.659$ )、均匀度指数( $J'=0.368$ )和生态位宽度指数( $B=3.857$ )都最高,说明冬季武陵洞蛭的食物类群最为复杂,食物种类最为丰富;其次是春季;而夏季的食物多样性指数和均匀度指数均最小,分别为 0.549 和 0.341,说明夏季武陵洞蛭能够吸食的蝙蝠种类较少;秋季的食物生态位宽度指数( $B=2.893$ )最小,说明秋季武陵洞蛭能利用的食物资源较少。

3 讨论

武陵洞蛭作为中国洞蛭属的模式种,其研究才刚刚起步。目前仅见其新种描述<sup>[5]</sup>和之后的省级新记录报道<sup>[26-27]</sup>,以及有关其 PAE (posture-act-environment)行为谱<sup>[9]</sup>和卵茧形态与化学组成<sup>[28]</sup>的研究报道。本文在课题组前期研究的基础上,利用血餐 iDNA 技术对其专吸蝠血性进行了研究。

3.1 山蛭科血餐 iDNA 研究的意义

关于蛭类的血餐 iDNA 已有一些研究。例如, Schnell 等<sup>[22]</sup>通过对山蛭血餐 iDNA 的分析,探讨

表 6 不同洞穴武陵洞蛭种群的食物多样性及生态位宽度

Table 6 Food diversity and niche breadth of *S. wulingensis* populations in different caves

种群 Population	堂乐洞 Tangle cave	水牛洞 Shuiniu cave	旧寨坪洞 Jiuzhaiping cave	金鸡洞 Jinji cave	鸡公洞 Jigong cave	黄泥洞 Huangni cave	总计 Total
样品数 Number of samples	24	26	20	13	9	14	106
食物种类 Type of food	5	5	4	2	5	3	11
Shannon-Wiener 指数 $H'$	0.506	0.359	0.449	0.268	0.636	0.361	0.705
最大物种多样性指数 $H_{max}$	1.609	1.609	1.386	0.693	1.609	1.099	2.398
Pielou 指数 $J'$	0.315	0.223	0.324	0.387	0.395	0.328	0.284
食物生态位宽度指数 $B$	2.483	1.641	2.299	1.742	3.857	2.000	3.440

表 7 不同季节武陵洞蛭种群的食物多样性及生态位宽度

Table 7 Food diversity and niche breadth of *S. wulingensis* populations in different seasons

季节 Season	春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter	总计 Total
样品数 Number of samples	18	16	18	18	70
食物种类 Type of food	5	5	5	6	8
Shannon-Wiener 指数 $H'$	0.590	0.549	0.551	0.659	0.648
最大物种多样性指数 $H_{max}$	1.609	1.609	1.609	1.792	2.079
Pielou 指数 $J'$	0.367	0.341	0.342	0.368	0.312
食物生态位宽度指数 $B$	3.448	2.922	2.893	3.857	3.498

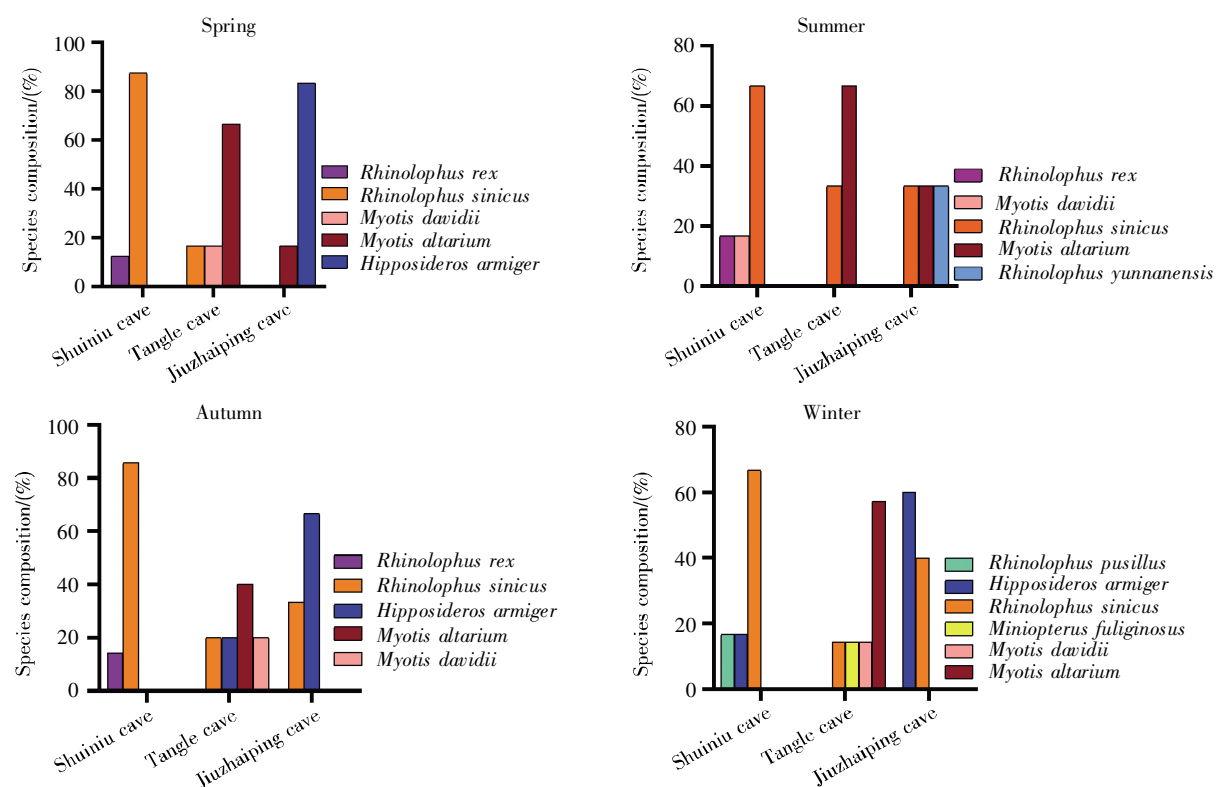


图3 三个武陵洞蛭种群在不同季节的血餐 iDNA 含量变化

Fig.3 Bloodmeal iDNA content changes of three populations of *S. wulingensis* in different seasons

了东南亚地区的生物多样性, 鉴定出分别隶属于哺乳纲、鸟纲(Aves)、爬行纲(Reptilia)和两栖纲(Amphibia)的42个以上不同的科。从血餐 iDNA已有的研究中可知, 山蛭类嗜吸哺乳动物的血液, 包括偶蹄目(Artiodactyla)、食肉目(Carnivora)、兔形目(Lagomorpha)、啮齿目(Rodentia)、树鼩目(Scandentia)和灵长目(Primates)等动物的血液<sup>[22, 29-31]</sup>。中国科学院昆明动物研究所的 Ji 等<sup>[32]</sup>利用山蛭的血餐 iDNA, 分析探究了我国云南哀牢山国家级自然保护区的脊椎动物多样性, 共鉴定出包括两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类在内的 86 种脊椎动物。Drinkwater 等<sup>[33]</sup>利用彩纹山蛭(*Haemadipsa picta*)的血餐 iDNA, 评估了马来西亚沙巴州森林退化梯度中哺乳动物多样性的差异, 共鉴定出鳞甲目(Pholidota)、长鼻目(Proboscidea)、鲸偶蹄目(Cetartiodactyla)、食肉目、灵长目、啮齿目 6 个目的哺乳动物。本课题组在研究武陵洞蛭血餐 iDNA 的同时, 对分布于湘西州洞外一些林区的天目山蛭(*Haemadipsa tianmushana*)的血餐 iDNA 也进行了初步分析, 结果显示, 天目山蛭的食物来源至少有两栖纲无尾目(Anura)和哺乳纲偶蹄目与灵长目(2纲3目)的6科6属, 并且其主要吸食蟾蜍属(*Bu-*

*fo*)两种蟾蜍(表8)的血液。而武陵洞蛭的食物来源仅为哺乳纲翼手目(1纲1目)中的5科5属, 洞栖性蝙蝠的血液是其唯一的食物(表4)。可见, 洞蛭由于长期适应于洞穴生活, 已衍生出专吸蝠血性的营养方式, 山蛭科的山蛭可能存在由泛吸血性向专吸血性演化的趋势。

### 3.2 武陵洞蛭的食物条件

食物需求是动物的第一需求, 食物关系也是物种之间最重要的生态关系。动物在选择食物的时候受到多种环境因子的影响。在进化过程中, 动物会产生适应性特征, 以适应新的食物条件或生存环境, 从而呈现摄食偏好或食性特化。

武陵洞蛭通常生活在环境条件相对稳定的洞穴深处, 多分布在粗糙、潮湿且岩屑(或泥屑)厚度为0.2~0.4 cm的洞顶壁, 周边是各种蝙蝠的常栖点。蝙蝠在洞穴中日眠或冬眠时, 会长时间地栖挂在洞顶壁或侧壁, 并且其翼膜宽大, 皮肤薄, 特别有利于武陵洞蛭吸血。除了蝙蝠以外, 偶尔也可见到灶马(裸灶螽)、马陆、伪蝎、菌蚊、尺蛾等无脊椎动物在有蛭区栖息或活动, 但在多年的野外考察和现场试验中我们发现, 灶马、马陆和伪蝎可能会随机性地啃食处于半冬眠或静息状态的蛭体

表 8 基于血餐 iDNA 技术分析的天目山蛭的食物来源  
Table 8 Dietary sources of *H. tianmushana* based on bloodmeal iDNA analysis

门	纲	目	科	属	种	样品数 Number
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	of samples
脊索动物门	两栖纲	无尾目	蟾蜍科	蟾蜍属	盘古蟾蜍	35
Chordata	Amphibia	Anura	Bufo	<i>Bufo</i>	<i>Bufo bankorensis</i>	
					中华蟾蜍	3
					<i>Bufo gargarizans</i>	
			叉舌蛙科	虎纹蛙属	虎纹蛙	2
			Dicroglossidae	<i>Hoplobatrachus</i>	<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>	
			蛙科	浮蛙属	尖舌浮蛙	1
			Ranidae	<i>Ooeidozyga</i>	<i>Ooeidozyga martensii</i>	
	哺乳纲	偶蹄目	牛科	牛属	黄牛	2
	Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	<i>Bos</i>	<i>Bos taurus</i>	
			猪科	野猪属	野猪	1
			Suidae	<i>Sus</i>	<i>Sus scrofa</i>	
		灵长目	人科	人属	智人	1
		Primates	Hominidae	<i>Homo</i>	<i>Homo sapiens</i>	

或其卵茧, 而武陵洞蛭不可能吸食它们的体液。因为灶马的个体虽然稍大, 但其活动能力强, 触角长, 对外界的刺激敏感, 而马陆和伪蝎的个体太少, 菌蚊幼虫则悬挂在丝上, 尺蛾静息时翅膀平铺, 武陵洞蛭都无法接近它们的身体吸食其体液。此外, 洞内其他个体较大的动物, 如小泡巨鼠 (*Leopoldamys edwardsi*), 由于重力作用, 无法爬到洞顶壁, 武陵洞蛭几乎没有接触小泡巨鼠的机会。总之, 我们认为洞栖性蝙蝠可能是武陵洞蛭唯一的食物来源。

### 3.3 武陵洞蛭专吸蝠血性的洞间差异

本文通过血餐 iDNA 分析发现, 中华菊头蝠、大蹄蝠和西南鼠耳蝠是武陵洞蛭的主要食物来源, 但在不同的洞穴中, 武陵洞蛭所吸食血液的蝙蝠种类有所差异(图 1)。水牛洞、金鸡洞和黄泥洞武陵洞蛭种群的主要食物来源是中华菊头蝠, 但旧寨坪洞的武陵洞蛭种群主要吸食大蹄蝠的血液(图 1)。在堂乐洞内, 中华菊头蝠是优势种类, 但其集中冬眠处的位置较高, 夏季又分散到人体难以进入的洞道内繁育, 故其栖点附近很难采到样, 而在堂乐洞冬眠的西南鼠耳蝠的数量较多, 其常栖点的位置也较低, 吸食西南鼠耳蝠的洞蛭样品相对容易采集, 因此分析结果显示, 堂乐洞武陵洞蛭种群的主要食源为西南鼠耳蝠。

在一年四季中, 武陵洞蛭的主要食物来源是菊头蝠属(图 2), 但在不同季节, 每个洞穴武陵洞蛭种群的食物种类和丰富度存在差异(图 3、表 7), 这主要与不同季节在洞穴中栖息的蝙蝠种类及数量有关。冬季武陵洞蛭的食物多样性较高, 可能是

有些蝙蝠从其他地方迁来冬眠所致。秋季武陵洞蛭的食物生态位宽度指数较小, 可能是一些蝙蝠已飞往其他地方冬眠的结果。显然, iDNA 的分析结果与采样的具体时间和位点密切相关。

### 3.4 血餐 iDNA 技术的优越性和不足之处

之前的调查研究显示, 武陵山区有翼手目动物 5 科 16 属 39 种<sup>[34-35]</sup>, 湘西州域内有翼手目动物 5 科 10 属 20 种<sup>[21]</sup>, 其中皮氏菊头蝠 (*Rhinolophus pearsoni*) 较为常见<sup>[36]</sup>。但本研究的 iDNA 样品并没有检测到皮氏菊头蝠, 其主要原因可能是在本项目的采样区域内, 该蝠种的个体数很少, 或者没有采集到吸食过该蝠种血液的武陵洞蛭样品。显然, 随着样品采集范围的扩大和样品采集数量的增多, 可望检测到更多的蝙蝠种类。

云南菊头蝠是我国的特有蝠种, 已知分布于云南、四川<sup>[37]</sup>和贵州<sup>[38]</sup>, 在湖南省域内尚未见其分布记录<sup>[21, 34-35]</sup>。本研究在旧寨坪洞的一个血餐样品中检测到云南菊头蝠(图 3), 这说明云南菊头蝠在湘西州域内有分布。因此, 血餐 iDNA 技术可为物种新的分布记录研究甚至新种的发现提供新途径。

我们在 6 个溶洞共进行了 15 次有蛭区洞栖性蝙蝠的分布情况调查, 总共观察到 9 种洞栖性蝙蝠, 但从随机抽样采集的 106 条武陵洞蛭的血餐 iDNA 中总共鉴定出 5 科 5 属 11 种蝙蝠(表 4、表 6), 观察到的蝙蝠种类与血餐 iDNA 的鉴定结果存在明显差异, 这可能有以下 3 个方面的原因: 1) 全年在这 6 个溶洞中栖息(包括日眠和冬眠)的蝙蝠只是湘西州和武陵山区蝙蝠区系的一部分; 2) 经常在有蛭区栖息的蝙蝠也只是在整个溶洞

中栖息的所有蝙蝠的一部分; 3) 调查期间, 由于受到人为干扰, 有些处于清醒状态的蝙蝠在人靠近时早已飞走, 导致所观察到的蝙蝠物种数量偏低。这说明, 血餐 iDNA 鉴定可以对野外调查工作进行验证和补充。

此外, 值得注意的是, 洞螭所吸取的蝙蝠血液可以长时间地保存在嗦囊中, 这意味着可通过检测洞螭嗦囊中的 DNA 信息来探究在洞螭周围所栖息蝙蝠的物种多样性。因此, 血餐 iDNA 技术可作为一种减少野外调查工作量以监测蝙蝠等脊椎动物物种多样性的有效方法予以推广应用。

总之, 血餐 iDNA 技术是一种很有前景的生物多样性监测手段, 不仅可较大限度地减少对所监测脊椎动物寄主物种的种群及其生境的干扰与破坏, 还可监测到平时不易观察到的物种, 具有成本低、效率高、易推广应用的优点。但是, 要想获得目标区域内比较全面的数据, 以研究有关寄主物种的组成及其种群数量与分布, 则需要较大的时空范围内采集大量的样本, 这在今后的研究中应予以更多的重视。

#### 参考文献(References):

- [1] SAWYER R T. Leech Biology and Behaviour[M]. Oxford: Clarendon Press, 1986: 646–706.
- [2] APAKUPAKUL K, SIDDALL M E, BURRESON E M. Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 1999, 12(3): 350–359.
- [3] TRONTELJ P, UTEVSKY S Y. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*) [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2005, 34(3): 616–624.
- [4] BORDA E, OCEGUERA-FIGUEROA A, SIDDALL M E. On the classification, evolution and biogeography of terrestrial haemadipsoid leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Hirudiniformes) [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2008, 46(1): 142–154.
- [5] HUANG T F, LIU Z W, GONG X Y, et al. Vampire in the darkness: a new genus and species of land leech exclusively blood-sucking cave-dwelling bats from China (Hirudinida: Arhynchobdellida: Haemadipsidae) [J]. Zootaxa, 2019, 4560(2): 257–272.
- [6] EWERS W H. *Trypanosoma aunava* sp. n. from an insectivorous bat, *Miniopterus tristis*, in New Guinea, which may be transmitted by a leech [J]. Journal of Parasitology, 1974, 60(1): 172–178.
- [7] TESSLER M, BARRIO A, BORDA E, et al. Description of a soft-bodied invertebrate with microcomputed tomography and revision of the genus *Chtonobdella* (Hirudinea: Haemadipsidae) [J]. Zoologica Scripta, 2016, 45(5): 552–565.
- [8] 杨潼, 莫潇, 王德斌. 洞穴吸血陆螭一新种在中国云南省西陲的发现 [J]. 动物分类学报 (YANG Tong, MO Xiao, WANG Debin. A new species of cavernous blood-sucking land leech (Hirudinea, Haemadipsidae) in the west of Yunnan Province, China) [J]. Zoological Systematics, 2009, 34(1): 125–129.
- [9] 伍丽艳, 刘力, 任伯淞, 等. 基于 PAE 编码系统对武陵洞螭行为谱的初步研究 [J]. 生命科学研究 (WU Liyan, LIU Li, REN Bosong, et al. Preliminary investigation of the ethogram of *Sinospelaobdella wulingensis* based on PAE coding system) [J]. Life Science Research, 2022, 26(3): 239–246.
- [10] DEJEAN T, VALENTINI A, MIQUEL C, et al. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* [J]. Journal of Applied Ecology, 2012, 49(4): 953–959.
- [11] BOHMANN K, EVANS A, GILBERT M T P, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2014, 29(6): 358–367.
- [12] KOCHER A, DE THOISY B, CATZEFELIS F, et al. iDNA screening: disease vectors as vertebrate samplers [J]. Molecular Ecology, 2017, 26(22): 6478–6486.
- [13] CALVIGNAC-SPENCER S, MERKEL K, KUTZNER N, et al. Carrion fly-derived DNA as a tool for comprehensive and cost-effective assessment of mammalian biodiversity [J]. Molecular Ecology, 2013, 22(4): 915–924.
- [14] SCHUBERT G, STOCKHAUSEN M, HOFFMANN C, et al. Targeted detection of mammalian species using carrion fly-derived DNA [J]. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(2): 285–294.
- [15] KENT R J, NORRIS D E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B [J]. The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 2005, 73(2): 336–342.
- [16] KENT R, JULIUSSON L, WEISSMANN M, et al. Seasonal blood-feeding behavior of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) in Weld County, Colorado, 2007 [J]. Journal of Medical Entomology, 2009, 46(2): 380–390.
- [17] GARIEPY T D, LINDSAY R, OGDEN N, et al. Identifying the last supper: utility of the DNA barcode library for bloodmeal identification in ticks [J]. Molecular Ecology Resources, 2012, 12(4): 646–652.
- [18] ALFANO N, DAYARAM A, AXTER J, et al. Non-invasive surveys of mammalian viruses using environmental DNA [J]. Methods in Ecology and Evolution, 2021, 12(10): 1941–1952.
- [19] KAMPMANN M L, SCHNELL I B, JENSEN R H, et al. Leeches as a source of mammalian viral DNA and RNA—a study in medicinal leeches [J]. European Journal of Wildlife Research, 2017, 63(2): 36.
- [20] 武吉海. 中国西部概览: 湘西州 [M]. 北京: 民族出版社 (WU Jihai. Overview of Western China: Xiangxi Prefecture) [M]. Beijing: Ethnic Publishing House, 2002: 4–9.
- [21] 吴涛, 龚小燕, 黄太福, 等. 湘西州洞栖蝙蝠物种多样性的初步调查 [J]. 野生动物学报 (WU Tao, GONG Xiaoyan, HUANG Taifu, et al. Preliminary investigation into the species diversity of cave-dwelling bats in Xiangxi Autonomous Prefecture) [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2018, 39(4): 775–781.
- [22] SCHNELL I B, BOHMANN K, SCHULTZE S E, et al. Debugging diversity—a pan-continental exploration of the potential of terrestrial blood-feeding leeches as a vertebrate monitoring tool [J]. Molecular Ecology Resources, 2018, 18(6): 1282–1298.
- [23] DEAGLE B E, THOMAS A C, MCINNES J C, et al. Counting with DNA in metabarcoding studies: how should we convert sequence reads to dietary data? [J]. Molecular Ecology, 2019, 28(2): 391–406.
- [24] 李忠秋, 蒋志刚. 青海省天峻地区藏原羚的食性分析 [J]. 兽类学报 (LI Zhongqiu, JIANG Zhigang. Diet analysis for Tibetan gazelle (*Procapra picticaudata*) in Tianjun area, Qinghai Province, China) [J]. Acta Theriologica Sinica, 2007, 27(1): 64–67.
- [25] 侯瑾瑾. 鄱阳湖 4 种越冬鹤类的食性分化 [D]. 南昌: 南昌大学 (HOU Jinjin. Diet Niche Partitioning by Four Wintering Cranes in Poyang Lake) [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019: 25–44.

- [26] 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(REN Bosong, HUANG Taifu, WU Liyan, *et al.* *Sinospelaeobdella wulingensis* (Hirudinea, Haemadipsidae) found in Linshui County, Sichuan Province[J]. Sichuan Journal of Zoology), 2020, 39(6): 679–683.
- [27] 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(WU Qingjie, HUANG Taifu, LAN Xiangying, *et al.* Wuling cave leeches (*Sinospelaeobdella wulingensis*) were first discovered in Guizhou Province, China[J]. International Journal of Ecology), 2023, 12(1): 94–100.
- [28] 蒋能, 伍丽艳, 吴清姐, 等. 武陵洞蛭卵茧的形态结构和化学组成[J]. 生命科学研究(JIANG Neng, WU Liyan, WU Qingjie, *et al.* Morphology and chemical composition of *Sinospelaeobdella wulingensis* cocoons[J]. Life Science Research), 2023, 27(3): 237–244.
- [29] SCHNELL I B, THOMSEN P F, WILKINSON N, *et al.* Screening mammal biodiversity using DNA from leeches[J]. Current Biology, 2012, 22(8): R262–R263.
- [30] SCHNELL I B, SOLLMANN R, CALVIGNAC-SPENCER S, *et al.* iDNA from terrestrial haematophagous leeches as a wildlife surveying and monitoring tool—prospects, pitfalls and avenues to be developed[J]. Frontiers in Zoology, 2015, 12: 24.
- [31] WEISKOPF S R, MCCARTHY K P, TESSLER M, *et al.* Using terrestrial haematophagous leeches to enhance tropical biodiversity monitoring programmes in Bangladesh[J]. Journal of Applied Ecology, 2018, 55(4): 2071–2081.
- [32] JI Y Q, BAKER C C M, POPESCU V D, *et al.* Measuring protected-area effectiveness using vertebrate distributions from leech iDNA[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1555.
- [33] DRINKWATER R, JUCKER T, POTTER J H T, *et al.* Leech blood–meal invertebrate–derived DNA reveals differences in Bornean mammal diversity across habitats[J]. Molecular Ecology, 2021, 30(13): 3299–3312.
- [34] 黄太福, 张佩玲, 吴涛, 等. 湖南省翼手目(Chiroptera)动物分布名录[J]. 生命科学研究(HUANG Taifu, ZHANG Peiling, WU Tao, *et al.* A checklist and distribution of Chiroptera in Hunan Province, China[J]. Life Science Research), 2018, 22(3): 215–221.
- [35] 张佩玲, 黄太福, 张佑祥, 等. 武陵山区翼手目(Chiroptera)物种名录、分布及保护[J]. 世界生态学(ZHANG Peiling, HUANG Taifu, ZHANG Youxiang, *et al.* The checklist, distribution and conservation of Chiroptera in Wulingshan Region, China[J]. International Journal of Ecology), 2019, 8(2): 57–64.
- [36] 龚小燕, 黄太福, 吴涛, 等. 皮氏菊头蝠(*Rhinolophus pearsoni*)的栖息生态特征[J]. 生态学报(GONG Xiaoyan, HUANG Taifu, WU Tao, *et al.* Roosting ecology of *Rhinolophus pearsoni* in the Wuling mountains of South China[J]. Acta Ecologica Sinica), 2019, 39(15): 5718–5724.
- [37] 王晓琴, 王应祥, 胡锦鑫. 四川省菊头蝠科一新记录[J]. 四川动物(WANG Xiaoqin, WANG Yingxiang, HU Jinchu. A new record of Rhinolophidae in Sichuan[J]. Sichuan Journal of Zoology), 2005, 24(2): 175–175.
- [38] 许铁龙. 贵州省翼手目物种多样性及地理区系研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学(XU Tielong. Study on Chiroptera Species Diversity and Geographic Fauna in Guizhou[D]. Guiyang: Guizhou Normal University), 2017: 73–76.

## (上接第 205 页)

- [13] PALUNGWACHIRA P, TANCHAROEN S, PHRUKSANIYOM C, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of anthocyanins extracted from *Oryza sativa* L. in primary dermal fibroblasts[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 2089817.
- [14] LUNA-VITAL D, LUZARDO-OCAMPO I, CUELLAR-NUÑEZ M L, *et al.* Maize extract rich in ferulic acid and anthocyanins prevents high-fat-induced obesity in mice by modulating SIRT1, AMPK and IL-6 associated metabolic and inflammatory pathways[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 79: 108343.
- [15] ZHANG J L, WU J J, LIU F G, *et al.* Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: an outlined review[J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 858: 172500.
- [16] LI D T, WANG P P, LUO Y H, *et al.* Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: update from recent decade[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(8): 1729–1741.
- [17] CAPPUCIO F P, COOPER D, D'ELIA L, *et al.* Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies[J]. European Heart Journal, 2011, 32(12): 1484–1492.
- [18] BAUMER Y, MCCURDY S, WEATHERBY T M, *et al.* Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis[J]. Nature Communications, 2017, 8: 1129.
- [19] RODRIGUEZ-DUARTE J, GALLIUSI G, DAPUETO R, *et al.* A novel nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice[J]. British Journal of Pharmacology, 2019, 176(6): 757–772.
- [20] BLINC L, MLINARIC M, BATTELLINO T, *et al.* High-sensitivity C-reactive protein and carotid intima media thickness as markers of subclinical inflammation and atherosclerosis in pediatric patients with hypercholesterolemia[J]. Molecules, 2020, 25(21): 5118.
- [21] PADRÓ T, VILAHUR G, BADIMON L. Dyslipidemias and microcirculation[J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 24(25): 2921–2926.
- [22] LI X X, XIAO H, LIN C W, *et al.* Synergistic effects of liposomes encapsulating atorvastatin calcium and curcumin and targeting dysfunctional endothelial cells in reducing atherosclerosis[J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 649–665.
- [23] 崔云斌, 李嘉钰, 刘钰, 等. 植物花色苷及其生物合成与药理的研究进展[J]. 青海草业(CUI Yunbin, LI Jiayu, LIU Yu, *et al.* Advances in the study of plant anthocyanins and their biosynthesis and pharmacology[J]. Qinghai Prataculture), 2022, 31(3): 71–75.
- [24] 高丽霓. 活血化瘀中药联合他汀对动脉粥样硬化模型小鼠的治疗作用研究[D]. 北京: 中国中医科学院(GAO Lini. Study on the Therapeutic Effect of Traditional Chinese Medicine for Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis Combined with Statins on Atherosclerosis Model Mice[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences), 2022.
- [25] PELLO LÁZARO A M, BLANCO-COLIO L M, FRANCO PELÁEZ J A, *et al.* Anti-inflammatory drugs in patients with ischemic heart disease[J]. Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(13): 2835.
- [26] 叶泽森, 周里岩, 黄光业, 等. 丹参酮 II A 联合阿托伐他汀对大鼠动脉粥样硬化的治疗作用研究[J]. 生命科学研究(YE Zesen, ZHOU Liyan, HUANG Guangye, *et al.* Study of therapeutic effects of tanshinone II A combined with atorvastatin on atherosclerosis in rats[J]. Life Science Research), 2022, 26(2): 95–102.