

云南省日本三角涡虫不同地理种群 mtDNA *CO I* 基因序列分析及其系统发育

张合彩^① 陈广文^{①*} 孙健^① 刘德增^{①②}

① 河南师范大学生命科学学院 新乡 453007; ② 黑龙江省科学院自然资源研究所 哈尔滨 150031

摘要: 对采自中国云南省的日本三角涡虫 (*Dugesia japonica*) 13 个地理种群的细胞色素 C 氧化酶 I 亚基基因 (*CO I*) 的部分片段进行 PCR 扩增、克隆和测序, 以采自河南省的日本三角涡虫 Luoyang 种群为外群, 用 Clustal X 1.80、MEGA 4.0、PAUP* 4.0、MrBayes 3.1.1 等程序对其进行序列分析和系统树构建。结果表明: 13 种群的 *CO I* 基因片段 A + T 的含量差异很小, 稳定在 67.1% ~ 68.8% 之间, 明显高于 G + C 的含量。序列间的成对遗传距离介于 0.000 ~ 0.199 之间, 其中 Yuxi、Dali2、Lincang1 3 个种群间的遗传距离最小, 为 0; Puer 和 Xishuang 种群间的遗传距离最大, 为 0.199。最大简约树和贝叶斯树拓扑结构基本一致, 均以较高支持率聚为两支。结合云南省的地形地貌及丰富的水系特征, 推测云南省日本三角涡虫可能是中部起源, 扩散至边缘, 也可能相反。究竟哪种推测更为可靠, 尚待进一步研究。

关键词: 云南; 日本三角涡虫; *CO I* 基因; 序列分析; 系统发育

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)03-131-05

Sequence Analysis of mtDNA *CO I* Gene and Phylogeny of Different Geographical Populations of *Dugesia japonica* in Yunnan Province

ZHANG He-Cai^① CHEN Guang-Wen^{①*} SUN Jian^① LIU De-Zeng^{①②}

① College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007;

② Institute of Natural Resources, Heilongjiang Academy of Science, Harbin 150031, China

Abstract: The fragments of *CO I* gene of 13 populations of *Dugesia japonica* collected from Yunnan Province, China were amplified via PCR, and then cloned and sequenced. The sequences were aligned and analyzed with Clustal X 1.80 and MEGA 4.0, and the maximum parsimony (MP) tree and Bayes tree were reconstructed via PAUP* 4.0 and MrBayes 3.1.1, respectively. The results show that the A + T contents of 13 sequences have little difference, ranging from 67.1% to 68.8%, more than the G + C contents obviously. The pairwise genetic distances based on model Kimura 2-parameter between sequences range from 0 to 0.199. Distances among populations of Yuxi, Dali2 and Lincang1 were 0, that between Puer and Xishuang was the largest (0.199). The MP tree and the Bayes tree almost show the same topology. Based on the clustering pattern of partial *CO I* genes and the geographical features of Yunnan, it is hypothesized that the freshwater planarian *D. japonica* in

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30170119, 30670247, 30870368), 教育部高等学校博士点基金项目 (No. 200804760003), 河南省杰出青年科学基金项目 (No. 0312001100), 河南省高等学校创新人才培养工程基金项目 (豫教高[2005]126号);

* 通讯作者, E-mail: chengw0183@sina.com;

第一作者介绍 张合彩, 女, 副教授; 研究方向: 分子系统学及淡水涡虫毒理学; E-mail: zhcai9339@sina.com。

收稿日期: 2010-11-25, 修回日期: 2011-03-06

Yunnan Province could have originated from the central sites, then diffused to the marginal sites, or vice versa.

More data are needed to test the hypothesis.

Key words: Yunnan Province; *Dugesia japonica*; CO I; Sequence analysis; Phylogeny

云南省地处中国边陲,地形复杂,气候多变,水系多样,境内三角涡虫资源丰富。三角涡虫属 (*Dugesia*) 隶属于扁形动物门 (Platyhelminthes) 涡虫纲 (Turbellaria) 三肠目 (Tricladida) 淡水亚目 (Paludicola) 三角涡虫科 (DugesIIDae)^[1]。该属是三角涡虫科的主要代表属,也是淡水亚目中的第一大属,到 2000 年为止,该属全世界已知 119 种^[2]。三角涡虫属种类既耐寒,又耐热,一般终年生活于 0 ~ 20℃ 的淡水中,是惟一世界性分布的属。由于该属涡虫形态和核型均存在着多型性,增加了形态分类的难度,所以三角涡虫的分类学研究进展非常缓慢。目前,我国仅报道日本三角涡虫 (*D. japonica*) 一种,分布在除青海、新疆和内蒙以外的其他各省份^[3-6]。日本三角涡虫作为涡虫的模式物种已开展了很多方面的研究,比如

再生生物学、发育生物学、毒理学等^[7-11]。在分子系统学方面,涡虫纲乃至整个扁形动物门等高级阶元的分子系统发育关系已比较清楚^[12],然而种及种下阶元系统学方面却鲜见报道。本文初步比较了采自云南省的 13 个日本三角涡虫种群的线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I 亚基基因 (CO I) 片段序列,构建了其分子系统树,以期为进一步开展该种涡虫的种群遗传学研究、物种间的亲缘关系和系统进化及种质资源管理与保护等提供资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集 实验用日本三角涡虫采自云南省 13 产地,外群采自河南省洛阳。样品具体信息及 GenBank 登录号见表 1。

表 1 本研究中所用样品信息

Table 1 Information of samples in this study

种群代号 Population code	采集地 Collection site	GenBank 登录号 (CO I) GenBank accession No (CO I)
外群 Outgroup	Luoyang	河南省洛阳市
	Dali1	大理州南涧县
	Dali2	大理州南涧县
	Dali3	大理崇圣三塔
	Dali4	大理苍山桃溪景区
	Yuxi	玉溪市澄江县
	Xishuang	西双版纳州勐海县
内群 Ingroup	Kunming	昆明市西山区
	Lijiang	丽江市玉龙雪山景区
	Baoshan1	保山市板桥乡
	Baoshan2	保山市板桥乡
	Puer	普洱市景东县
	Lincang1	临沧市澜沧县
	Lincang2	临沧市澜沧县

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、克隆与测序 用购自 Omega 公司的 Mollusc DNA Kit 试剂盒提取日本三角涡虫基因组 DNA。PCR 反应总体积为 25 μl,其中包括 10 × PCR Buffer (Mg²⁺

plus) 2.5 μl, 20 ng/μl 模板 DNA 2 μl, 0.2 μmol/L 引物 2 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μl, 5 U/μl TaqDNA 聚合酶 0.25 μl。PCR 反应在德国产 Biometra DNA 扩增仪中进行。反应条件

为:94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 30 个循环后, 72℃ 条件下终延伸 5 min。实验用引物由本实验室自行设计, 正向引物 S: 5'-AGC TGC AGT TTT GGT TTT TTG GT -3'; 反向引物 A: 5'-ATG AGC AAC AAC ATA ATA AGT ATC ATG-3'。

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 目的条带用 Omega 公司的 Gel Extraction Kit 试剂盒进行回收、纯化。纯化后产物使用 TaKaRa 公司试剂盒进行连接和转化。连接载体为 pMD18-T Vector (宝生物工程有限公司, 大连), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞为 DH52。单菌落经扩大培养后提取质粒。

1.3 序列分析及系统树构建 质粒 DNA 提纯后, 经电泳检测确定含有目的基因片段, 菌液交由上海英骏生物技术有限公司进行测序。测回序列 (含载体序列) 用 DNASTar 中的 Editseq 模块进行目的片段的截取, 用 Clustal X 1.80^[13] 进行序列比对。两端截齐后的序列 (含外群序列) 用 MEGA 4.0^[14-15] 计算其碱基组成和成对遗传距离, 距离计算时采用 Kumura 2-parameter 模型。用 PAUP* 4.0 和 MrBayes 3.1.1 分别构建最大简约树 (maximum parsimony tree, MP tree) 和贝叶斯树 (Bayesian tree), 其中 MP 分析中采用自展检验 (bootstrap, BS) 1 000 次随机重复抽样来对分支树的可靠性进行检验; 贝叶斯分析以随机树为起始树, 根据其最适模型, 4 条马尔可夫链运行 1 000 000 代, 每 200 代抽样并保存数据一次, 保存树的分支长度。舍弃前 500 棵树以保证树的似然率 -LnL 达到最大并趋于稳定。用剩余的 9 501 棵树构建 50% 合意树 (50% majority consensus tree, 贝叶斯树), 节点支持率为后验概率 (posterior probability, PP)。

2 结果与分析

2.1 日本三角涡虫不同地理种群的 CO I 基因序列及其差异 本实验所用引物具有很高的特异性, 目的基因片段经 PCR 扩增后得到清晰的电泳谱带, 经克隆后序列测定, 获得长度为

300 ~ 450 bp 的核酸序列。14 条序列经 Clustal X 比对, 两端截齐后, 得长度为 313 bp 的同源片段。不同种群样品中 4 种碱基 (A、T、G、C) 含量非常接近; 而且 14 个种群的 CO I 基因片段中 A + T 的含量差异很小, 稳定在 67.1% ~ 68.8% 之间, 明显高于 G + C 的含量 (表 2)。这一结果与其他无脊椎动物 CO I 基因的研究结果一致^[16-18], 即较高的 AT 含量, 是目前观测到的无脊椎动物线粒体 DNA 序列中的普遍现象。

表 2 CO I 基因片段的碱基组成 (%)

Table 2 The base composition of CO I gene fragments of samples

种群代号 Population code	A	C	T	G	A + T
Luoyang	47.7	21.0	19.4	11.9	67.1
Yuxi	48.7	20.0	19.0	12.3	67.7
Lincang1	48.7	20.0	19.0	12.3	67.7
Dali2	48.7	20.0	19.0	12.3	67.7
Dali1	48.7	20.3	18.7	12.3	67.4
Puer	49.4	20.0	18.7	11.9	68.1
Dali4	49.4	19.7	19.4	11.6	68.8
Lijiang	48.7	20.0	19.0	12.3	67.7
Baoshan1	48.4	20.0	19.4	12.3	67.8
Baoshan2	49.0	20.0	19.4	11.6	68.4
Dali3	48.7	22.6	18.4	10.3	67.1
Xishuang	47.9	22.4	20.1	9.6	68.0
Lincang2	47.0	22.0	21.4	9.6	68.4
Kunming	46.3	21.7	20.8	11.2	67.1
平均含量 Average	48.4	20.7	19.4	11.5	67.8

序列比对结果表明, 在 134 ~ 137 位点间有插入缺失。在 313 个位点中, 保守位点 221 个, 可变位点 92 个, 简约信息位点 69 个 (对于内群序列, 保守位点 224 个, 可变位点 89 个, 简约信息位点 66 个)。基于 Kimura 2-parameter 模型由 MEGA 4.0 计算出的内群间成对遗传距离介于 0.000 ~ 0.199 之间, 其中 Yuxi、Dali2、Lincang1 3 个种群的遗传距离最小, 为 0; Puer 和 Xishuang 种群间的遗传距离最大, 为 0.199 (表 3)。

2.2 根据 CO I 基因序列构建系统发育树 使用 PAUP* 4.0 和 MrBayes 3.1.1 程序, 以采自河南洛阳的 Luoyang 种群为外群分别构建了

表 3 基于 CO I 序列的内群间成对遗传距离
Table 3 Pairwise distances between ingroups based on CO I sequences

种群代号 Population code	Yuxi	Lincang1	Dali2	Dali1	Puer	Dali4	Lijiang	Baoshan1	Baoshan2	Dali3	Xishuang	Lincang2	Kunming
Yuxi													
Lincang1	0.000												
Dali2	0.000	0.000											
Dali1	0.010	0.010	0.010										
Puer	0.040	0.040	0.040	0.044									
Dali4	0.047	0.047	0.047	0.051	0.026								
Lijiang	0.166	0.166	0.166	0.170	0.170	0.170							
Baoshan1	0.162	0.162	0.162	0.166	0.166	0.166	0.003						
Baoshan2	0.154	0.154	0.154	0.158	0.158	0.158	0.013	0.010					
Dali3	0.174	0.174	0.174	0.170	0.182	0.170	0.126	0.130	0.142				
Xishuang	0.182	0.182	0.182	0.186	0.199	0.190	0.134	0.138	0.150	0.134			
Lincang2	0.166	0.166	0.166	0.170	0.174	0.157	0.154	0.150	0.142	0.154	0.060		
Kunming	0.165	0.165	0.165	0.174	0.166	0.162	0.166	0.162	0.154	0.170	0.123	0.127	

最大简约树 (MP 树) 和贝叶斯树, 两棵树的拓扑结构基本一致 (图 1)。系统树以较高的支持

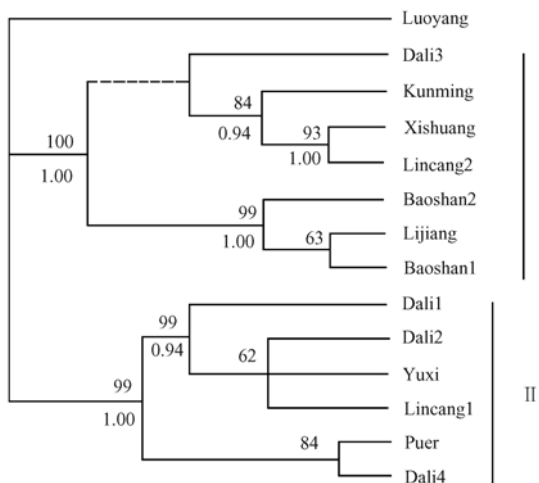


图 1 基于 CO I 基因片段的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on partial CO I sequences

分支上方和下方的数字分别表示 MP 分析自举检验的支持率 (只显示大于 60% 的) 和贝叶斯分析的后验概率 (只显示大于 0.90 的), 虚线表示 MP 树与贝叶斯树不一致的分支。
The bootstrap percentages of 1 000 replicates of MP analysis (only those > 60%) and the posterior probabilities of Bayes analysis (only those > 0.90) are shown above and below branches, respectively; The dashed showing the inconsistent branches between MP tree and Bayes tree.

率明显分为两大支系 I 和 II, 在 I 支中 MP 分析自举检验的支持率及贝叶斯分析的后验概率分别为 100% 和 1.00, 在 II 支中 MP 分析自举检验的支持率为 99%, 贝叶斯分析的后验概率为 1.00。结合云南省地理知识我们发现, 采自大理、玉溪、临沧、普洱等相对位于云南中部的地理种群聚为一支, 即 II 支; 而采自昆明、西双版纳、保山、丽江等该省相对边缘的地理种群聚在一起, 构成 I 支。云南省地形地貌复杂, 大体上, 西北部是高山深谷的横断山区, 东部和南部是云贵高原。境内水文特征多样, 横跨六大水系且湖泊星罗棋布^[19]。复杂多变的地形地貌和丰富多元化的水资源孕育了丰富的日本三角涡虫资源, 结合分支树的聚类结果, 我们推测云南省境内的日本三角涡虫可能是从中部起源然后向周边扩散, 即“中部起源”, 也可能是周边起源向中部汇拢, 即“周边起源”, 哪种推测更为可靠, 还有待于在包括云南及其周边省份更大范围内的密集取样进一步研究。

参 考 文 献

[1] 刘德增. 中国多目涡虫属四新种记述 (三肠目: 淡水亚目: 扁涡虫科). 动物分类学报, 1996, 21(4): 389 - 398.
[2] 刘德增. 我国的淡水涡虫. 北京: 北京师范大学出版

- 社,1991: 2-35.
- [3] Ichikawa A, Kawakatsu M A. New freshwater planarian, *Dugesia japonica*, commonly but erroneously known as *Dugesia gonocephala* (Duges). *Annot Zool Japon*, 1964, 37(3): 185-194.
- [4] Kawakatsu M, Oki I, Tamura S, et al. Studies on the morphology, karyology and taxonomy of the Japanese freshwater Planarian *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu, with a description of a new subspecies, *Dugesia japonica ryukyensis* subsp. nov. *Bull Fuji Women's College*, 1976, 14(2): 81-126.
- [5] Kawakatsu M, Oki I, Tamura S. Taxonomy and geographical distribution of *Dugesia japonica* and *D. ryukyensis* in the Far East. *Hydrobiologia*, 1995, 30(5): 55-61.
- [6] 陈广文,陈晓虹,吕九全. 中国淡水三角属涡虫研究的历史与进展. *动物学杂志*,1999,33(3): 37-41.
- [7] Horvat T, Kalafatic M, Kopjar N, et al. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species-the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Aquatic Toxicology*, 2005, 73: 342-352.
- [8] Lau A H, Knakievicz T, Prú D, et al. Freshwater planarians as novel organisms for genotoxicity testing: analysis of chromosome aberrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2007, 48: 475-482.
- [9] Knakievicz T, da Silveira P A, Ferreira H B. Planarian neoblast micronucleus assay for evaluating genotoxicity. *Chemosphere*, 2008, 72(9): 1267-1273.
- [10] Solana J, Lasko P, Romero R. Spoltud-1 is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev Biol*, 2009, 328(2): 410-421.
- [11] Umesono Y, Agata K. Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. *Dev Growth Differ*, 2009, 51(3): 185-195.
- [12] 张合彩,陈广文,孙健,等. 三肠亚目(扁形动物门:涡虫纲:序列目)涡虫系统发育研究进展. *河南师范大学学报:自然科学版*,2009,37(2): 172-176.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acides Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [15] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9: 299-306.
- [16] 孔晓瑜,喻子牛,刘亚军,等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究. *青岛海洋大学学报*, 2001, 30(1): 43-47.
- [17] Zheng X D, Wang R C, Wang X F, et al. Genetic variation in population of the common Chinese cuttlefish *Sepoella maindroni* (Mollusca: Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis. *J Shellfish Research*, 2001, 20(3): 1159-1165.
- [18] Zhang H C, Qiao G X. Systematic status of genus *Formosaphis* Takahashi and the evolution of galls based on the molecular phylogeny of Pemphigini (Hemiptera: Aphididae: Eriosomatinae). *Systematic Entomology*, 2007, 32(5): 690-699.
- [19] 王声跃. 云南地理. 昆明: 云南民族出版社,2002: 3-45.