◆特邀栏目◆

参环毛蚓(*Amynthas aspergillum*)基因组测序及其特征分析*

张　君[1],江顺达[1],李秀芝[2],李雪松[2],卢　波[2],黄　俊[2],刘　军[1**],彭立新[2**]

(1.广西壮族自治区国有七坡林场,广西南宁　530031;2.广西科学院生物科学与技术研究所,非粮生物质能技术全国重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西南宁　530007)

摘要:参环毛蚓(*Amynthas aspergillum*),俗称广地龙,是中国广东与广西地区广泛分布的蚯蚓(Earthworm)物种,具有重要的药用价值。本研究采用流式细胞术与高通量测序方法对参环毛蚓基因组进行分析,测算出其大小、重复序列、杂合率和GC含量等,并利用生物信息学对基因组进行预测、注释和基因家族鉴定。结果表明,参环毛蚓基因组大小约1 Gb,通过从头组装二代测序数据,获得全长为765.69 Mb的Contig序列,组装成单倍体基因组641 Mb左右。其中,重复序列为386.28 Mb,占全长的50.42%,GC含量为40.34%,杂合率为1.68%,表明参环毛蚓基因组具有高重复、高杂合等特征。该基因组共预测到27 864个基因,其中99.04%基因能在功能数据库中找到注释,较多基因富集于信号转导(Signal transduction)、内分泌系统(Endocrine system)及与传染疾病(Infectious disease)相关功能上。通过对巨蚓科(Megascolecidae)所属物种的线粒体组的分析,蚯蚓种内的遗传距离(*p*-distance)有着较宽的分布(0－15.1%),其中壮伟远盲蚓(*A. robustus*)显示最大的种内遗传距离(15.1%),其次是*Duplodicodrilus acinctus*(13.6%)与*Pheretima kutamaensis*(10.9%),而参环毛蚓种内遗传距离为1.9%。不同物种间的遗传距离计算结果表明,参环毛蚓与加州腔蚓(*Metaphire californica*)的遗传距离(16.0%)最小,其次是标记远盲蚓(*A. masatakae*,16.2%)与壮伟远盲蚓(16.2%),以上4个物种同属于广西区域广泛分布的蚯蚓物种。根据核基因组的数据,参环毛蚓与通俗腔蚓(*M. vulgaris*)、皮质远盲蚓(*A. corticis*)的遗传距离分别为15.64%、20.03%,而通过线粒体基因组计算的遗传距离分别为21.00%与19.80%,提示无论是基于形态和解剖特征的传统分类学,还是基于线粒体谱系的分类,在单独使用时均有一定的局限性,因此全面厘清蚯蚓物种间的进化历程需依赖更多的核基因组数据。本研究为参环毛蚓全基因组的精细测序、遗传多样性保护和人工选育等研究奠定基础。

关键词:参环毛蚓;基因组分析;基因组大小;基因组特征

中图分类号:Q38　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-7378(2024)04-0446-13

DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20241226.009

收稿日期:2024-07-24　　修回日期:2024-11-11

*广西重点研发计划项目(桂科AB21238014)和自筹经费林业科技项目(2023GXZCLK 57)资助。

【第一作者简介】

张　君(1983－),女,经济师,主要从事林下经济研究。

【**通信作者简介】

刘　军(1980－),男,高级工程师,主要从事森林培育及林下经济研究,E-mail:71068973@qq.com。

彭立新(1980－),男,副研究员,主要从事动物遗传研究,E-mail:penglixin@gxas.cn。

【引用本文】

张君,江顺达,李秀芝,等.参环毛蚓(*Amynthas aspergillum*)基因组测序及其特征分析[J].广西科学院学报,2024,40(4):446-458.

ZHANG J,JIANG S D,LI X Z,et al. Genome Sequencing and Its Characteristics Analysis of *Amynthas aspergillum* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences,2024,40(4):446-458.

蚯蚓(Earthworm)属于环节动物门(Annelida)寡毛纲(Oligochaeta)动物,作为土壤生态系统重要物种之一,蚯蚓对提升土壤环境质量、保护土壤生态系统和生物多样性具有重要作用。据统计,2019 年之前全世界已发现 3 000—3 500 种蚯蚓[1-3],其中我国记录在册的有 640 种[4],是全球报道蚯蚓物种数最丰富的国家之一。中国也是较早利用蚯蚓的国家,其被用作中药材的历史可以追溯到《神农本草经》[5]。此外,《本草纲目》[6]也详细记载并阐述了蚯蚓的药用性能,明确其药性寒凉、味咸,具有降压平喘、解热镇痛、抗凝血、抗血栓、抗肿瘤等药理作用。参环毛蚓(*Amynthas aspergillum*),亦名参状远盲蚓,系中国南方广泛分布的蚯蚓物种,因主要产于广东、广西两地,故称广地龙。该物种与栉盲环毛蚓(*Amynthas pectiniferus*)、通俗腔蚓(*Metaphire vulgaris*)、威廉腔蚓(*M. guillemi*)一同被收录于《中华人民共和国药典 2020 年版 一部》地龙药材物种名单之中[7]。

长期以来,广地龙的获取主要依赖于野外捕捉。近年来,中药材市场对广地龙的需求呈现增长态势,然而同时却面临着野生资源数量下降及产品在数量和质量方面双提升需求之间的矛盾,这对参环毛蚓药材的生产与发展形成了极大的制约。为了加强野生资源的保护与利用,国家林业和草原局于 2023 年 7 月发布了新修订的《有重要生态、科学、社会价值的陆生野生动物名录》[8],上述 4 个蚯蚓物种(参环毛蚓、栉盲环毛蚓、通俗腔蚓和威廉腔蚓)均被收录其中。因此,开展参环毛蚓遗传资源保护工作,探究其选育与繁殖技术,并构建科学合理的良种培育及生产推广技术体系,是保障参环毛蚓道地药材可持续发展的必由之路。然而,目前多数研究主要集中在参环毛蚓道地药材的药效鉴定[9]以及真伪甄别[10]等方面,仅对皮质远盲蚓(*A. corticis*)、安德爱胜蚓(*Eisenia andrei*)、赤子爱胜蚓(*E. fetida*)和通俗腔蚓 4 种蚯蚓进行了全基因组测序并完成组装[11-15]。虽然已有的全基因组测序数据为认识蚯蚓多样性及其环境适应能力、再生机制提供了新的视角,但不同物种之间往往差异较大。参环毛蚓作为一个自然种群,具有个体大、野性强、人工养殖条件下易逃逸、繁殖力低等特性,目前暂无大规模人工养殖,因此对其人工驯化、选育有着迫切需求。无论是进行参环毛蚓遗传资源调查、种质资源保护,还是开展参环毛蚓养殖与种群结构优化,都需要依赖组学的研究基础,因而当前参环毛蚓基因组研究工作极为重要。为此,本研究采用流式细胞术和高通量测序技术对参环毛蚓基因组大小进行估算,对所得的基因组数据进行 *K*-mer 分析、基因组预测及注释,旨在为后续全基因组精细测序和药效分析提供参考依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 样本的采集与制备

本研究中的参环毛蚓样品来自玉林博白传统产区的野外采集。对采集样品形态初步鉴定后,剪取尾部肌肉组织用于基因组 DNA 提取,进行 COXI 片段的分子鉴定。PCR 反应体系为 25 μL,PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s、50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min。线粒体 COXI 片段扩增引物为 COI-F:ATTCTACAAACCATAAAGACATTGG;COI-R:TACACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术测定参环毛蚓基因组大小

将肌肉组织样品置于 0.8 mL 预冷的 mGb 解离液[45 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$、20 mmol/L MOPS、30 mmol/L 柠檬酸钠、1%(*W*∶*V*)聚乙烯吡咯烷酮(PVP)40、0.2%(*V*∶*V*)Tritonx-100、10 mmol/L EDTA-Na_2、20 μL/mL β-巯基乙醇]中,切碎后在冰上静置 10 min,用 40 μm 孔径滤网过滤,得到细胞核悬浮液。在细胞核悬浮液中加入碘化丙啶(PI)染液和 RNAase 溶液,使其工作浓度均为 50 μg/mL,混匀后置于冰上避光染色 1 h。分别使用鸡血细胞(基因组大小为 1.06 Gb)和鹅掌楸(*Liriodendron chinense*,基因组大小为 1.8 Gb)作为内参,将待测样品的悬浮液和内参样品的悬浮液按 2∶1 比例混合,利用 BD FACScalibur 流式细胞仪(北京焕彩元合科技有限公司)对染色后的细胞核悬浮液样品上机检测,采用 488 nm 蓝光激发,检测 PI 的发射光荧光强度,每次检测收集 10 000 个颗粒,变异系数(CV)控制在 5%以内,使用 Modifit 3.0 作图分析[16-18],计算当前参环毛蚓的基因组大小,公式如下:待测样品 DNA 含量=内参 DNA 含量×待测样品的荧光强度/内参样品的荧光强度。

1.2.2 基因组测序和质量评估

通过 MGI(华大)平台,构建 270—500 bp 的小片段文库,对文库进行双端测序。使用 SOAPnuke v 2.1.8[19]对原始测序数据进行过滤,去掉低质量、存在接头污染和 PCR duplication 的测序片段,剩余用

于后续分析。

1.2.3 基因组大小、重复序列和杂合率预测

选取 K 值为21,使用Jellyfish[20]计算 K-mer 分布,使用GenomeScope v 1.0[21]统计 K-mer 分布曲线,评估基因组大小、重复序列含量和杂合度。

1.2.4 基因组初步组装及其完整性评估

使用MaSuRCA v 4.1.1[22]对过滤后的测序数据进行全基因组的组装,以metazoa_odb10数据库为核心基因集,使用BUSCO 5.7.1(http://busco.ezlab.org/)评估组装完整性。

1.2.5 重复序列分析

使用同源序列比对(Homolog)和从头预测(*De novo*)两种方法对重复序列进行注释。具体方法如下:以RepBase v 23.06(https://www.girinst.org/repbase/)作为重复序列的比对数据库,使用RepeatMasker(http://www.repeatmasker.org/)和RepeatProteinMask 4.1.1(http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler/)识别与已知重复序列相似的序列,并对其进行分类。*De novo* 方法主要利用RepeatModeler和LTRharvest[23]先建立 *De novo* 重复序列库,通过RepeatMasker对重复序列或转座子自身的序列或结构特征进行构建,使用Tandem repeats finder工具[24]寻找基因组中的串联重复序列。

1.2.6 基因预测和注释

使用MAKER v 3.01.03[25]进行基因预测,用于注释的数据集有转录组数据及皮质远盲蚓、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、安德爱胜蚓与赤子爱胜蚓近源物种蛋白数据。对参环毛蚓基因组进行blast比对(-p tblastn -e 1e-5 -F -m 8),然后使用GeneWise[26]进行基因预测,从预测结果中随机挑选结构完整的基因2 000个,用于AUGUSTUS[27]与SNAP[28]参数训练。转录组数据首先通过HISAT v 2.2.1[29]进行比对,然后使用StringTie v 2.2.1[30]进行构建,最后使用MAKER进行整合得到最终基因集,以保证最终基因预测的可靠性。KEGG(https://www.genome.jp/kegg/)、SwissProt and TrEMBL数据库(https://www.uniprot.org/)用于基因功能注释。InterProScan(http://www.ebi.ac.uk/interpro/download/)用于GO功能分类分析。

1.2.7 线粒体的组装与系统发育树构建

使用GetOrganelle[31]进行线粒体组装,MitoFinder[32]用于线粒体基因组注释。从NCBI数据库中下载当前蚯蚓的线粒体基因组数据,使用PhyloSuite(v 1.2.3)[33]进行线粒体多基因合并后,用于构建线粒体的系统发育树。

1.2.8 基因组的系统发育树构建

从NCBI数据库获得皮质远盲蚓、通俗腔蚓与安德爱胜蚓的基因组数据,使用OrthoFinder[34]寻找直系同源基因,MAFFT[35]用于基因序列的多重比对,Gblocks[36]用于去除比对序列差异较大的区域,KaKs_Calculator 3.0[37]用于计算不同直系同源基因间的 Ka、Ks 及 Ka/Ks 比值,R 用于不同数据的可视化显示。

2 结果与分析

2.1 流式细胞术检测的基因组大小

COX1 基因的PCR扩增产物大小为659 bp,覆盖 *COX1* 基因编码序列(CDS)的38—697位点,占全长的42.8%(图1)。通过对NCBI数据库的检索,获得与其序列一致性(Identity)最高的物种为参环毛蚓,共获得57条被注释为参环毛蚓的片段,一致性在90.07%到99.22%之间。此外,参环毛蚓与 *A. longicaeca*、加州腔蚓(*M. californica*)序列一致性较高,分别为85.36%与84.45%。流式细胞术与测序检测表明,使用鸡血细胞作为内参时,计算得到当前参环毛蚓的基因组大小为1.11 Gb,变异系数为0.86%;使用鹅掌楸作为内参时,计算得到其基因组大小为0.98 Gb,变异系数为1.46%。因此估计当前参环毛蚓的基因组大小为1 Gb左右。

```
COXI    ATGCGATGACTATATTCTACAAACCATAAAGACATTGGAACCCTATACTTCATTCTAGGAATTTGAGCCG  70
Result  -----------------------------------AACCCTATACTTCATTCTAGGAATTTGAGCCG  32

COXI    GAATAATTGGAGCCGGAATAAGACTTCTTATTCGTATTGAATTAAGACAACCTGGATCCTTCCTTGGAAG 140
Result  GAATAATTGGAGCCGGAATAAGACTTCTTATTCGTATTGAATTAAGACAACCTGGATCCTTCCTTGGAAG 102

COXI    AGATCAGCTATACAACACAATTGTAACAGCACACGCATTTCTAATAATTTTCTTTCTAGTGATGCCAGTA 210
Result  AGATCAGCTATACAACACAATTGTAACAGCACACGCATTTCTAATAATTTTCTTTCTAGTGATGCCAGTA 172

COXI    TTTATTGGCGGTTTTGGAAACTGACTGCTCCCACTTATACTAGGAACCCCCGACATAGCATTCCCACGTC 280
Result  TTTATTGGCGGTTTTGGAAACTGACTGCTCCCACTTATACTAGGAACCCCCGACATAGCATTCCCACGTC 242

COXI    TAAATAACATAAGATTTTGACTTTTGCCGCCATCCTTAATTCTATTAGTAAGGTCTGCGGCTGTTGAAAA 350
Result  TAAATAACATAAGATTTTGACTTTTGCCGCCATCCTTAATTCTATTAGTAAGGTCTGCGGCTGTTGAAAA 312

COXI    GGGGGCTGGCACCGGATGAACAGTTTACCCCCCTTTAGCAAGAAACATAGCACATGCGGGTCCCTCTGTA 420
Result  GGGGGCTGGCACCGGATGAACAGTTTACCCCCCTTTAGCAAGAAACATAGCACATGCGGGTCCCTCTGTA 382

COXI    GACCTTGCAATTTTCTCACTACATTTAGCGGGTGCCTCATCAATTTTAGGTGCCATTAACTTTATCACTA 490
Result  GACCTTGCAATTTTCTCACTACATTTAGCGGGTGCCTCATCAATTTTAGGTGCCATTAACTTTATCACTA 452

COXI    CAGTAATTAACATACGATGATCAGGGCTACGCTTAGAACGAATTCCACTATTTGTTTGAGCCGTAGTAAT 560
Result  CAGTAATTAACATACGATGATCAGGGCTACGCTTAGAACGAATTCCACTATTTGTTTGAGCCGTAGTAAT 522

COXI    TACTGTAGTACTTCTACTATTGTCGCTTCCCGTATTAGCCGGTGCTATTACTATATTACTAACAGACCGA 630
Result  TACTGTAGTACTTCTACTATTGTCGCTTCCCGTATTAGCCGGTGCTATTACTATATTACTAACAGACCGA 592

COXI    AATCTAAATACATCCTTCTTTGACCCAGCTGGAGGTGGTGACCCAATTCTATATCAACACTTATTCTGAT 700
Result  AATCTAAATACATCCTTCTTTGACCCAGCTGGAGGTGGTGACCCAATTCTATATCAACACTTATTC---- 658

COXI    TCTTTGGACACCCAGAAGTGTATATTTTAATTTTACCTGGATTTGGTGCAATTTCACACATCGTGACCCA 770
Result  ------------------------------------------------------------------- 

COXI    CTACACAGCAAAACTAGAGCCATTTGGCGCTCTTGGTATAATTTACGCCATATTAGGCATTGCCATCCTA 840
Result  ------------------------------------------------------------------- 
```

图 1　*COXI* 基因的测序序列

Fig. 1　Sequence of *COXI* gene

2.2　参环毛蚓基因组测序数据统计及基因组特征

通过对原始测序数据的统计,插入的 DNA 测序片段平均长度为 350 bp,对数据过滤后获得 150 bp 的 reads 共 44.21 Gb,其中 Q20 质量的 reads 占比为 98.84%,GC 含量为 40.34%。使用 GenomeScope 对 *K*-mer 数据进行统计,其拟合度在 93.893 2%和 98.307 0%之间,表明模型对实际数据的拟合较好。由于只使用了二代测序数据,单倍体基因组的预测长度仅为 641 Mb 左右,其中重复序列达到 329 Mb,占全长的 51.3%左右,并且杂合度高(约 1.68%),表明种群具有较高的遗传多样性(表 1)。这种杂合度也反映在 *K*-mer 频率分布图上(图 2),显示在主峰对应的深度 1/2 处有着明显的杂合峰。

表 1　*K*-mer 分析估计基因组大小

Table 1　Estimated genome size by *K*-mer analysis

项目 Item	杂合度/% Heterozygosity/%	单倍体长度/bp Haploid length/bp	重复序列长度/bp Repeat length/bp	独特序列长度/bp Unique length/bp	拟合度/% Fiting/%	错误率/% Error rate/%
Min	1.684 91	641 566 167	329 078 706	312 487 461	93.893 2	0.167 598
Max	1.686 62	641 702 783	329 148 781	312 554 002	98.307 0	0.167 598

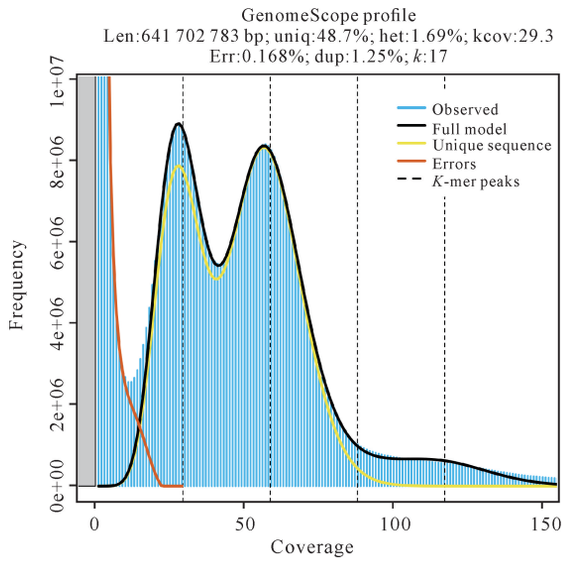


图 2　*K*-mer 分布图

Fig. 2　Distribution map of *K*-mer

2.3　参环毛蚓基因组组装和质量评估

使用 MaSuRCA 对参环毛蚓的二代测序数据进行从头组装，共获得全长约为 765.69 Mb 的 Contig 和 766.18 Mb 的 Scaffold，其中 Contig 与 Scaffold 序列最长均为 69 772 bp，而 Contig 和 Scaffold 的 N50 分别为 4 755 bp 与 5 254 bp(表 2)。BUSCO 评估结果显示，基因组序列中组装出 76.7%的 BUSCO 核心基因(表 3)。

表 2　MaSuRCA 组装结果统计

Table 2　Statistics of MaSuRCA assembly results

项目 Item	Contig		Scaffold	
	片段大小/bp Size/bp	数量 Number	片段大小/bp Size/bp	数量 Number
N10	14 118	403	15 534	3 677
N20	9 927	10 610	11 015	9 621
N30	7 555	19 511	8 416	17 640
N40	5 979	30 944	6 615	27 942
N50	4 755	45 341	5 254	40 976
N60	3 759	63 487	4 131	57 454
N70	2 902	86 663	3 171	78 624
N80	2 105	117 570	2 299	106 875
N90	1 309	163 128	1 418	148 848
Max length	69 772		69 772	
Total number		269 137		249 900
Total length	765 693 575		766 183 714	
GC ratio/%	40.66			40.66

Note: total number and total length are the number and length of fragments of all assembly contig and scaffold.

表 3　BUSCO 评估结果统计

Table 3　Statistics on the results of the BUSCO assessment

类型 Types	数量 Number	百分比/% Percentage/%
Complete BUSCOs (C)	732	76.7
Complete and single-copy BUSCOs (S)	631	66.1
Complete and duplicated BUSCOs (D)	101	10.6
Fragmented BUSCOs (F)	133	13.9
Missing BUSCOs (M)	89	9.4
Total BUSCO groups searched	954	

2.4　参环毛蚓基因组重复序列分析结果

通过 Homolog(Trf、RepeatMasker、RepeatProteinmask 数据库)与 *De novo* 两种方法对参环毛蚓基因组的重复序列进行分析，分别获得 40.79、59.77、57.04、365.67 Mb 重复序列，对不同方法获取的重复序列合并后共获得总长度为 386.28 Mb 的重复序列，占全基因组组装序列的 50.42%。在该基因组中，重复序列主要以散在重复(Interspersed repeats)为主，因此进一步对重复序列中转座元件(TE)进行不同类型的分类，详细统计数据见表 4。其中，长末端重复序列(Long Terminal Repeated，LTR)是最丰富的重复元件，占基因组的 19.86%；其次是长散在重复元件(Long Interspersed Nuclear Elements，LINE)，占基因组的 12.48%。同时，对不同的 TE 序列分歧度进行分析，图 3(a)显示了以 Repbase 为库，通过 RepeatMasker 注释得到的 TE 分歧度分布图，其中重复序列主要以低分歧度的 DNA 转座子为主，其次以 LINE 为主；而通过 *De novo* 方法预测得到的重复序列主要以 LTR 为主，其次是 LINE 与 DNA 转座子[图 3(b)]。

表 4　重复序列分类结果

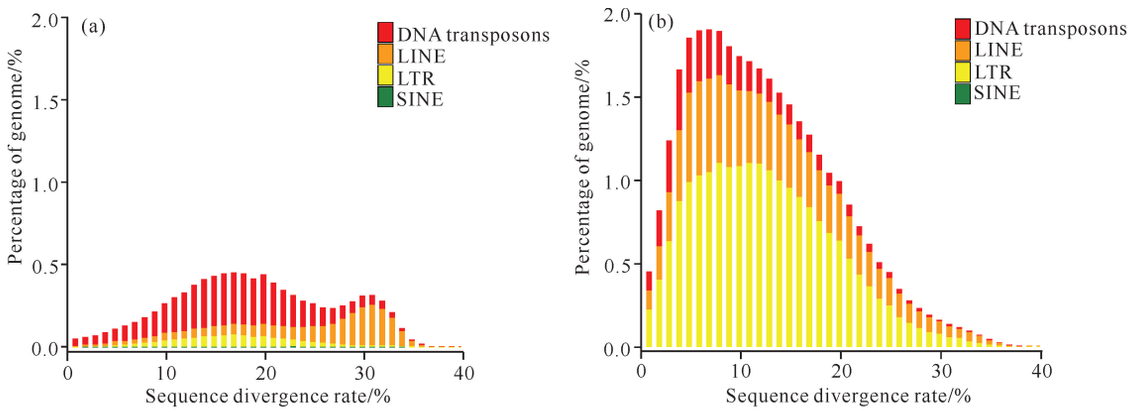
Table 4　Classification results of repeated sequences

转座元件 TE	长度/bp Length/bp	占比/% Percentage/%
DNA transposons	64 488 599	8.420
LINE	95 609 592	12.480
SINE	272 483	0.036
LTR	152 164 593	19.860
Other	29 706	0.004
Unknown	168 529 890	21.990

Note: SINE means short interspersed nuclear elements.

2.5　参环毛蚓基因预测和注释结果

通过 MAKER 对基因预测数据集进行整合，共获得 27 864 个预测基因，其平均基因长度为 5 094.78 bp，平均编码序列长度为 1 404.87 aa，平均外显子数量为6.16个，平均外显子长度是228.01



(a) The divergence distribution map of Transposable Elements (TE) obtained through RepeatMasker annotation using Repbase as a library. The *x*-axis represents the divergence of TE sequences annotated in the genome compared to the corresponding sequences in RepBase, while the *y*-axis indicates the percentage of TE sequences in the genome at that level of divergence. Different TEs are indicated by different colors. (b) The divergence distribution map of TE predicted by the *De novo* method.

图 3　4 种转座元件分歧度分布

Fig. 3　Divergence distribution of four TE sequences

bp,平均内含子长度为 622.07 bp。对当前基因预测数据集进行功能注释,27 597 个基因(99.04%)能在数据库中获得注释信息,其中 26 610 个基因(95.50%)在 NR 数据库中获得注释,18 646 个基因(66.92%)在 KEGG 数据库中获得注释,17 305 个基因(62.11%)在 GO 数据库获得注释(表 5)。被 KEGG 数据库所注释的基因主要分布在信号转导(Signal transduction)、内分泌系统(Endocrine system)和传染疾病(Infectious disease)相关分类中,分别有 9 933(35.6%)、5 776(20.7%)与 4 718(16.9%)个基因,与细胞膜上的受体、信号分子传导、激素分泌、传递和调节有着重要的关系[图 4(a)]。被 GO 数据库注释的基因主要分布在细胞过程(Cellular process)、细胞解剖实体(Cellular anatomical entity)和结合(Binding)功能分类中,分别有 12 029(43.2%)、12 087(43.3%)与 11 241(40.3%)个基因,与细胞内的化学反应、信号传导、信号传导通路和分子间互作相关,详细结果见表 5 与图 4(b)。

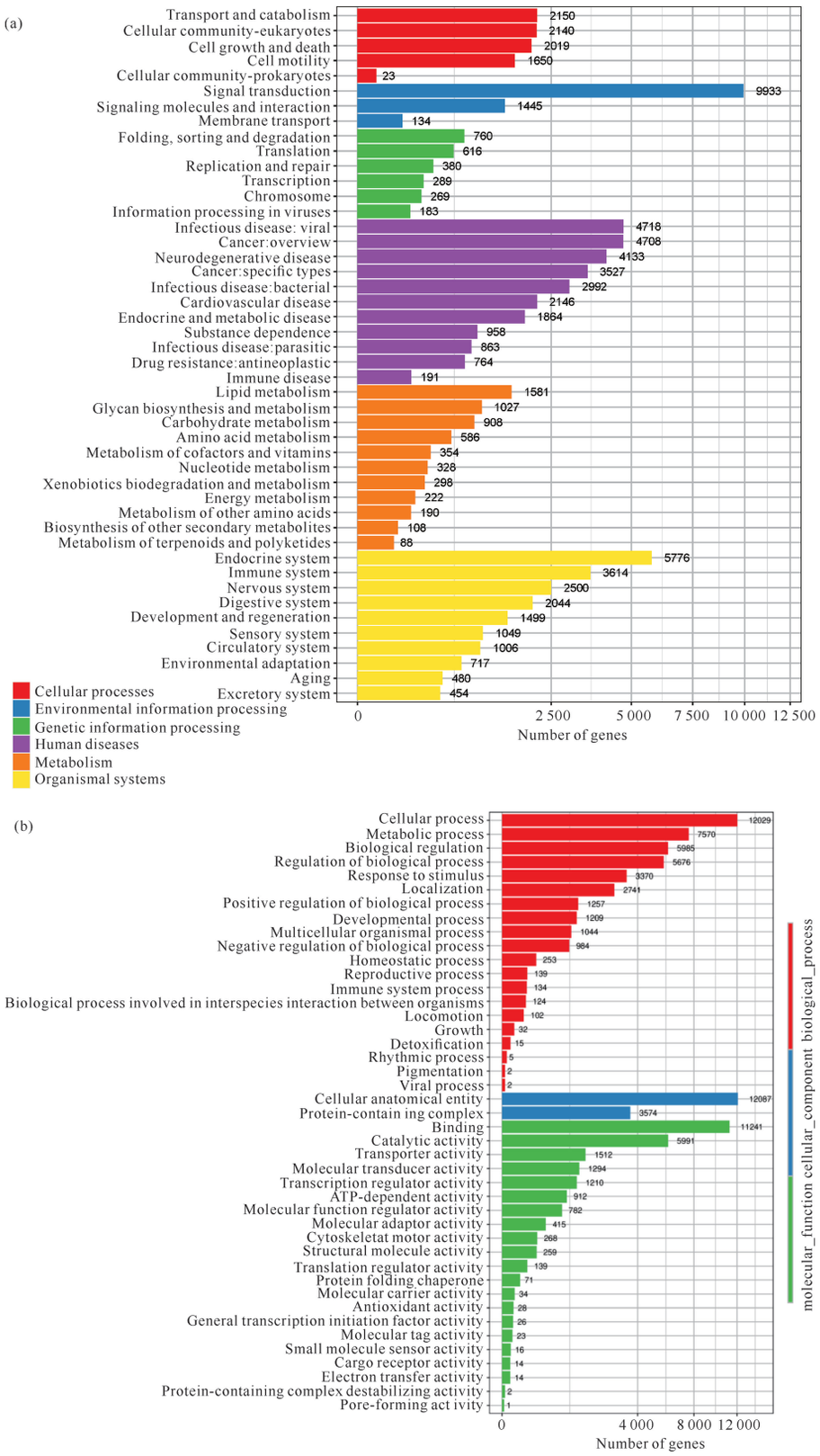
表 5　功能注释结果

Table 5　Results of functional annotation

数据库 Database	注释数量 Number of annotation	比例/% Percentage/%
NR	26 610	95.50
Swissport	16 755	60.13
KEGG	18 646	66.92
TrEMBL	26 260	94.24
Interpro	23 397	83.97
GO	17 305	62.11
Annotated gene	27 597	99.04
Total	27 864	

2.6　参环毛蚓线粒体基因组遗传距离与系统发育分析结果

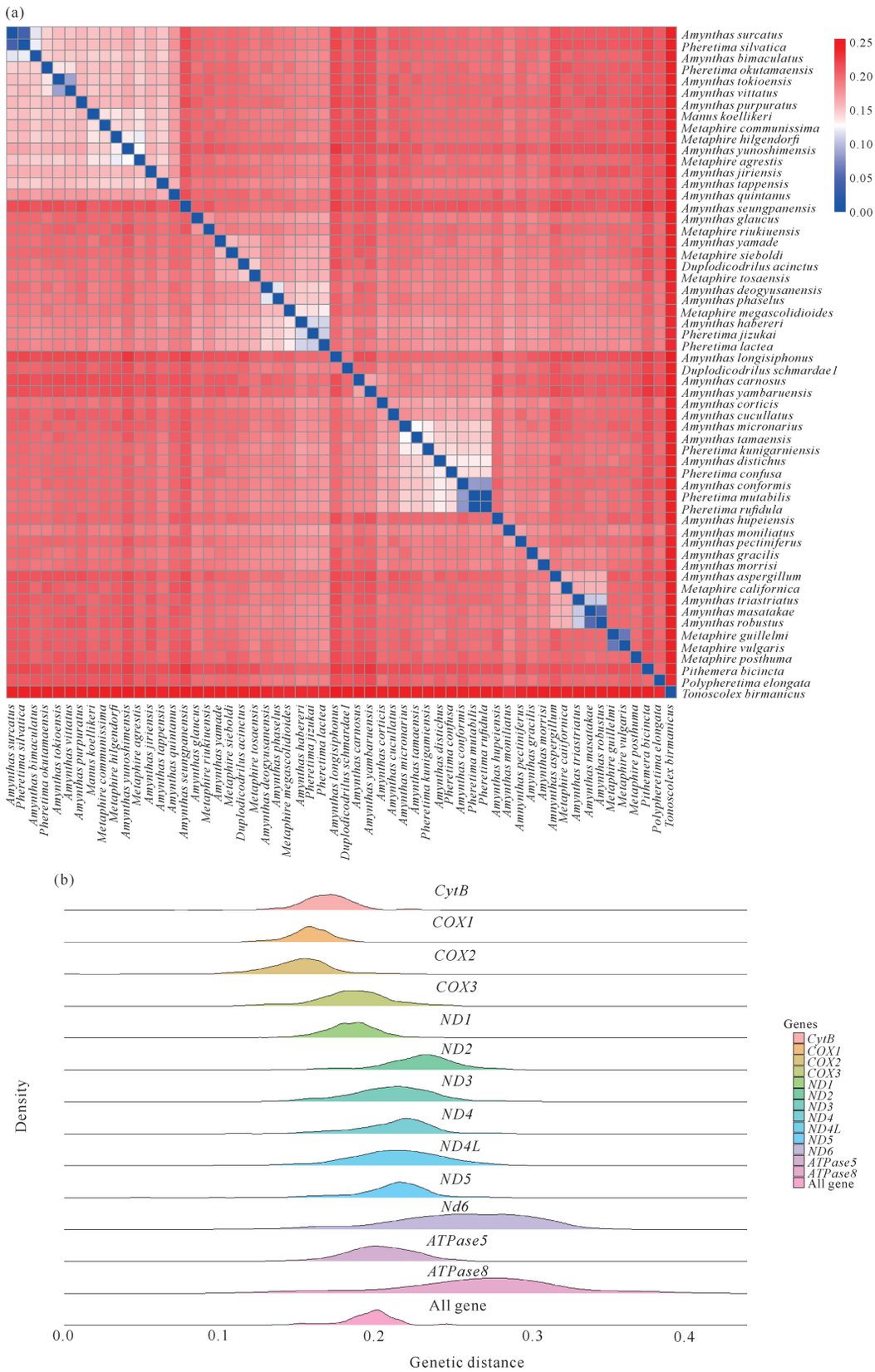
通过 NCBI 数据库检索,共获得有完整线粒体基因组的巨蚓科(Megascolecidae)蚯蚓数据 106 条,归为 58 个蚯蚓物种。通过基因序列提取,对 *CytB*、*COXI* 等 13 个基因的种内和种外的遗传距离进行多基因联合,结果如图 5(a)所示,在巨蚓科内,蚯蚓种内的遗传距离(*p*-distance)有着较宽的分布,从 0—15.1%均有,其中壮伟远盲蚓(*A. robustus*)显示最大的种内差距(15.1%),其次是 *Duplodicodrilus acinctus*(13.6%)、*Pheretima kutamaensis*(10.9%),而参环毛蚓种内遗传距离为 1.9%。不同种间的平均遗传距离为 19.5%,参环毛蚓与广布物种加州腔蚓遗传距离较小(16.0%),其次是同属于广西广泛分布的两个蚯蚓物种标记远盲蚓(*A. masatakae*,16.2%)和壮伟远盲蚓(16.2%)[图 5(b)]。参环毛蚓与广西广泛分布的蚯蚓其他物种,如远盲属(*Amynthas*)的简洁远盲蚓(*A. gracilis*)、毛利远盲蚓(*A. morrisi*)、皮质远盲蚓的遗传距离分别为 19.3%、19.5%与 19.8%。此外,参环毛蚓与栉盲环毛蚓、通俗腔蚓、威廉腔蚓的遗传距离均大于平均值 19.5%,分别为 19.8%、21.0%与 20.9%。不同基因的遗传距离计算结果表明,线粒体基因组中不同基因的平均遗传距离有所不同,其中最小的为 *COX2*(15.1%),最大为 *ATPase8*(26.4%),这与多基因联合系统发育树的构建结果一致。在种群水平上,本研究测序的个体能很好地与其他参环毛蚓个体聚类,在种间参环毛蚓系统发育关系较为明确(图 6)。



(a) KEGG gene annotation analysis; (b) GO secondary node annotation classification statistics chart.

图 4　参环毛蚓基因预测和注释

Fig. 4　Gene prediction and annotation of *Amynthas aspergillum*



(a) Differences in genetic distance among different earthworm individuals in Megascolecidae; (b) Genetic distance density plot of different mitochondrial genes.

图 5　参环毛蚓线粒体基因组遗传距离与系统发育分析

Fig. 5　Genetic distance and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes in *Amynthas aspergillum*

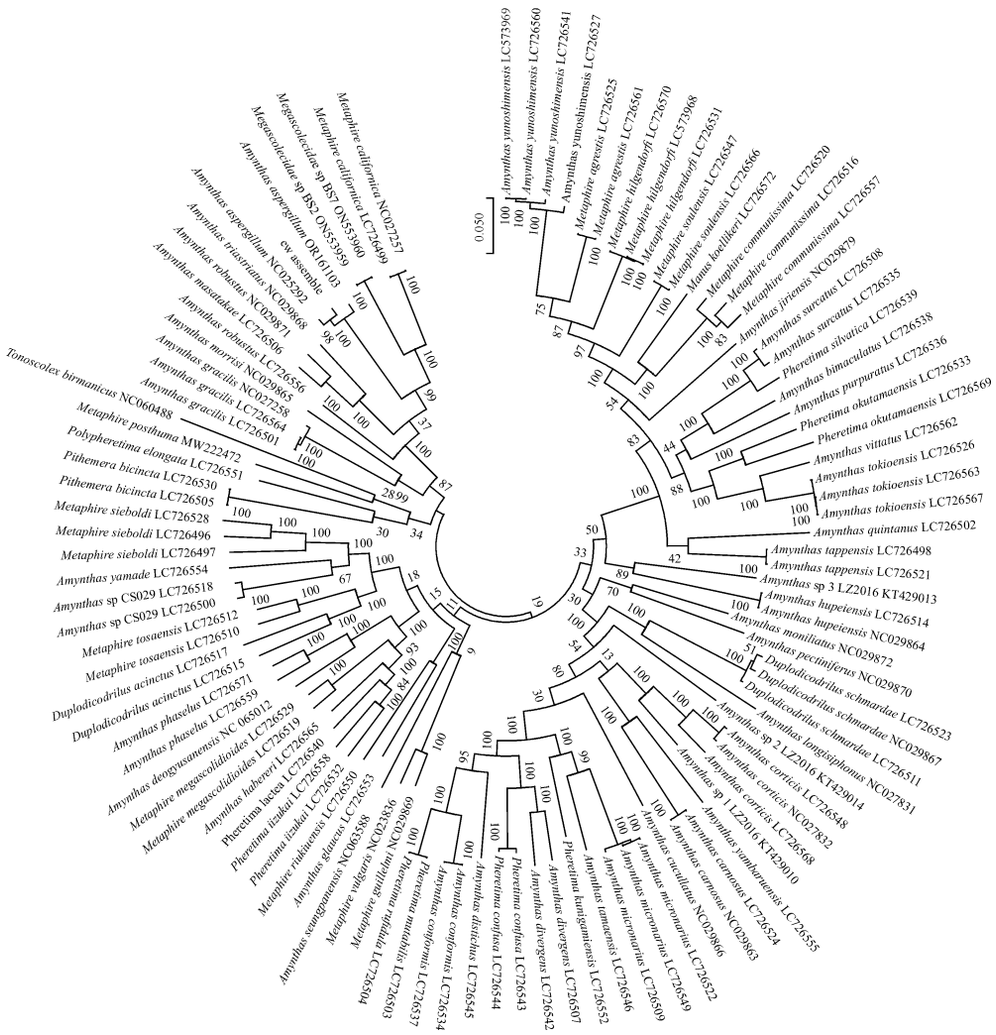


图 6　巨蚓科蚯蚓内系统发育树

Fig. 6　Phylogenetic tree of Megascolecidae earthworms

2.7　参环毛蚓基因家族鉴定及其遗传距离

从数据库中分别下载皮质远盲蚓、通俗腔蚓的基因组数据，以安德爱胜蚓作为外群，通过两物种相互之间的直系同源基因的搜索与比对，4 个物种基因组共获得 37 405 个直系同源基因，平均两个物种间有 6 234 个基因参与遗传距离的分析。结果显示参环毛蚓与通俗腔蚓、皮质远盲蚓平均遗传距离分别为 15.64%、20.03%(图 7)，与正蚓科(Lumbricidae)物种安德爱胜蚓平均遗传距离为 45.32%。这与通过线粒体基因组计算的平均遗传距离不一致，基于线粒体基因计算，参环毛蚓与通俗腔蚓、皮质远盲蚓的平均遗传距离分别为 21.00%、19.80%。

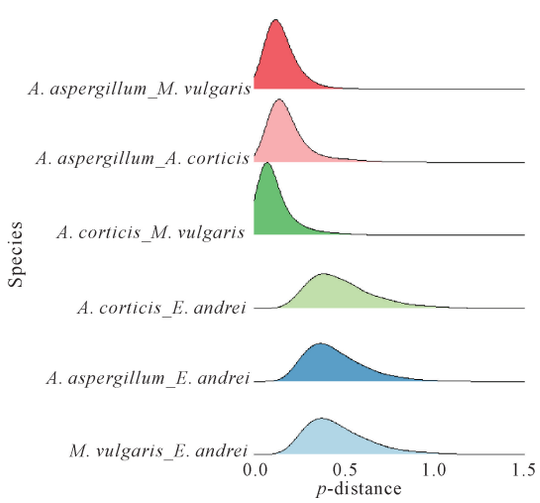


图 7　直系同源基因鉴定及遗传距离分布

Fig. 7　Identification of orthologous genes and distribution of genetic distance

3 讨论

目前,蚯蚓的研究多集中在地理分布、多样性、生态系统服务功能、生态毒理学、天然免疫、药用价值以及生态习性等领域。近年来,有关蚯蚓在土壤碳循环[38,39]、微生物群落[40-43]、环境污染物降解[44-46]、蚯蚓基因组等方面的研究逐渐增多,特别是多组学技术,如基因组、转录组、单细胞测序、蛋白组学在蚯蚓研究上的应用,使人们对蚯蚓基因组、基因功能、适应与进化、组织再生等方面的认识有了明显的提升[15]。基因组水平上的解析为认识蚯蚓多样性、系统分类、蚯蚓隐存种(Cryptic species)鉴定、新属种发现提供了强大工具,为蚯蚓环境适应能力、再生机制、遗传资源保护与利用、生物资源开发等提供基础数据。目前已对 4 种蚯蚓(皮质远盲蚓、安德爱胜蚓、赤子爱胜蚓与通俗腔蚓)进行了全基因组测序并完成组装[11-15]。Shao 等[13]通过对安德爱胜蚓基因组的研究发现,TE 占整个基因组的 56.72%,其中 DNA 转座子、LINE、LTR、SINE、Unknown 分别占 14.18%、12.42%、2.27%、0.56%、21.55%,LINE2 相比其他代表性后生动物物种有显著的扩张,在再生过程中,含有 LINE2 的差异表达基因(DEGs)的比例显著高于非 DEGs。在本研究中,参环毛蚓重复序列占全基因组组装序列的 50.42%,具体为 DNA 转座子(8.42%)、LINE(12.48%)、LTR(19.86%)、SINE(0.036%)、Unkown(21.99%),其中 LINE 占比与安德爱胜蚓基因组中的相当,这为研究蚯蚓的再生机制提供了新基因数据,后续可通过更多、更完整的蚯蚓基因组比较,阐述蚯蚓物种的再生机制异同。

此外,通过对参环毛蚓基因组的预测共获得 27 864 个基因,且 99.04%基因有功能注释,其中大部分基因与信号转导、内分泌系统、传染疾病相关,这为开发天然药物提供丰富的物质基础,同时对参环毛蚓的深加工与副产物利用有着重要的指导作用,如可以通过对参环毛蚓基因组中蚓激酶相关酶系的挖掘,发现有潜在开发价值的酶系。通过基因组与线粒体基因组的分析表明,参环毛蚓与通俗腔蚓、皮质远盲蚓物种在基因组水平上的平均遗传距离分别为 15.64%、20.03%,在线粒体基因组水平上的平均遗传距离分别为 21.00%、19.80%,这种线粒体基因组与核基因组之间的遗传距离异质性,可能与皮质远盲蚓基因组三倍体特征有关。基因功能分析显示,皮质远盲蚓基因组扩张的基因家族主要与应激/防御、免疫系统与生殖等功能相关。这类有关蚯蚓组学水平的研究为参环毛蚓的研究提供了丰富的数据,例如皮质远盲蚓作为外来物种,在广西广泛分布,其强大的适应力、免疫与繁殖力等性状对参环毛蚓的人工繁育具有借鉴意义。因此,参环毛蚓的多组学研究对理解蚯蚓的生长、发育、繁殖和环境适应性相关遗传机制有着重要的作用。

基于线粒体基因组的分析表明参环毛蚓与加州腔蚓、标记远盲蚓、壮伟远盲蚓遗传距离最近,分别为 16.0%、16.2%、16.2%,这 4 个物种都在广西地区广泛分布,有着相同的栖居地。此外,加州腔蚓属于腔蚓属(*Metaphire*),结合之前参环毛蚓与通俗腔蚓、皮质远盲蚓基因组比较分析结果,在核基因组上,参环毛蚓与通俗腔蚓更为接近。以上数据表明,无论是基于形态和解剖特征的传统分类学,还是基于线粒体谱系的分类,单独使用时都有局限性。为更准确地进行物种划分,需要从分子、形态学、生态学等多方面整合信息,获取更多蚯蚓物种的核基因组数据,这将有利于全面厘清蚯蚓物种间的相互关系及进化历程。

4 结论

本研究结果表明参环毛蚓基因组为 1 Gb 左右,其重复序列含量为 50.42%,杂合率为 1.68%。这些数据显示该种群具有较高的遗传多样性,其基因组属于高重复、高杂合的基因组。鉴于此,在进一步基因组组装中,应适当增加其测序深度,以确保获取更为精准、完整的基因组信息。通过预测,该基因组共获得 27 864 个基因,且 99.04%基因有功能注释,其中大部分基因与信号转导、内分泌系统、传染疾病相关。通对线粒体基因组的分析,参环毛蚓种内遗传距离为 1.9%,与广布物种加州腔蚓遗传距离较小(16.0%),其次是标记远盲蚓(16.2%)、壮伟远盲蚓(16.2%)。通过基因组水平的比较,参环毛蚓与通俗腔蚓、皮质远盲蚓平均遗传距离分别为 15.64%、20.03%,这与通过线粒体基因组计算的通俗腔蚓(21.00%)、皮质远盲蚓(19.80%)的平均遗传距离不一致,因此不同蚯蚓物种鉴定的分类可能需要更多基因组数据支持。

参考文献

[1] CSUZDI C. Earthworm species, a searchable database [J]. Opuscula Zoologica Budapest, 2012, 43(1): 97-99.

[2] PHILLIPS H R P, BACH E M, BARTZ M L C, et al. Global data on earthworm abundance, biomass, diversity

and corresponding environmental properties [J]. Scientific Data,2021,8(1):136.

[3] PHILLIPS H R P,GUERRA C A,BARTZ M L C,et al. Global distribution of earthworm diversity [J]. Science,2019,366(6464):480-485.

[4] 蒋际宝,邱江平. 中国巨蚓科蚯蚓的起源与演化[J]. 生物多样性,2018,26(10):1074-1082.

[5] 孙星衍,孙冯翼. 神农本草经[M]. 北京:人民卫生出版社,1963.

[6] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,1982.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020年版 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[8] 国家林业林草局. 有重要生态、科学、社会价值的陆生野生动物名录[EB/OL]. (2023-06-26)[2024-05-22]. https://www.forestry.gov.cn/lyj/1/gkgfxwj/20230626/546059.html.

[9] XING Z,GAO H,WANG D,et al. A novel biological sources consistency evaluation method reveals high level of biodiversity within wild natural medicine: a case study of *Amynthas* earthworms as "Guang Dilong" [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B,2023,13(4):1755-1770.

[10] 张前程,文红梅,刘娜,等. 广地龙特异性引物序列的设计及其混伪品的鉴别[J]. 南京中医药大学学报,2020,36(3):408-413.

[11] BHAMBRI A,DHAUNTA N,PATEL S S,et al. Large scale changes in the transcriptome of *Eisenia fetida* during regeneration [J]. PLoS One, 2018, 13(9):e0204234.

[12] JIN F,ZHOU Z,GUO Q,et al. High-quality genome assembly of *Metaphire vulgaris* [J]. PeerJ, 2020, 8: e10313.

[13] SHAO Y,WANG X B,ZHANG J J,et al. Genome and single-cell RNA-sequencing of the earthworm *Eisenia andrei* identifies cellular mechanisms underlying regeneration [J]. Nature Communications, 2020, 11 (1): 2656.

[14] WANG X,ZHANG Y,ZHANG Y,et al. *Amynthas corticis* genome reveals molecular mechanisms behind global distribution [J]. Communications Biology,2021,4(1):135.

[15] 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):211-221.

[16] DOLEZEL J,BARTOS J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. Annals of Botany,2005,95(1):99-110.

[17] DOLEZEL J,GREILHUBER J,SUDA J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. Nature Protocols,2007,2(9):2233-2244.

[18] PAUL S,ARUMUGAPERUMAL A,RATHY R,et al. Data on genome annotation and analysis of earthworm *Eisenia fetida* [J]. Data in Brief,2018,20:525-534.

[19] CHEN Y,CHEN Y,SHI C,et al. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data [J]. GigaScience,2018,7(1):gix120.

[20] MARÇAIS G,KINGSFORD C. A fast,lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of *k*-mers [J]. Bioinformatics,2011,27(6):764-770.

[21] VURTURE G W,SEDLAZECK F J,NATTESTAD M,et al. GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads [J]. Bioinformatics, 2017, 33(14):2202-2204.

[22] ZIMIN A V,MARÇAIS G,PUIU D,et al. The MaSuRCA genome assembler [J]. Bioinformatics, 2013, 29(21):2669-2677.

[23] ELLINGHAUS D,KURTZ S,WILLHOEFT U. LTRharvest, an efficient and flexible software for *de novo* detection of LTR retrotransposons [J]. BMC Bioinformatics,2008,9:18.

[24] BENSON G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences [J]. Nucleic Acids Research, 1999,27(2):573-580.

[25] CANTAREL B L,KORF I,ROBB S M C,et al. MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes [J]. Genome Research,2008,18(1):188-196.

[26] BIRNEY E,CLAMP M,DURBIN R. GeneWise and genomewise [J]. Genome Research,2004,14(5):988-995.

[27] STANKE M,WAACK S. Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel [J]. Bioinformatics,2003,19(Suppl 2):ii215-ii225.

[28] KORF I. Gene finding in novel genomes [J]. BMC Bioinformatics,2004,5(1):59.

[29] KIM D,LANGMEAD B,SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nature Methods,2015,12(4):357-360.

[30] PERTEA M,PERTEA G M,ANTONESCU C M,et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. Nature Biotechnology,2015,33(3):290-295.

[31] JIN J J,YU W B,YANG J B,et al. GetOrganelle: a fast

and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes [J]. Genome Biology,2020,21(1):241.

[32] ALLIO R,SCHOMAKER-BASTOS A,ROMIGUIER J,et al. MitoFinder:efficient automated large-scale extraction of mitogenomic data in target enrichment phylogenomics [J]. Molecular Ecology Resources,2020,20(4):892-905.

[33] ZHANG D,GAO F,JAKOVLIĆ I,et al. PhyloSuite:an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. Molecular Ecology Resources,2020,20(1):348-355.

[34] EMMS D M,KELLY S. OrthoFinder:phylogenetic orthology inference for comparative genomics [J]. Genome Biology,2019,20(1):238.

[35] KATOH K,MISAWA K,KUMA K I,et al. MAFFT:a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. Nucleic Acids Research,2002,30(14):3059-3066.

[36] CASTRESANA J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis [J]. Molecular Biology and Evolution,2000,17(4):540-552.

[37] ZHANG Z. KaKs_Calculator 3.0:calculating selective pressure on coding and non-coding sequences [J]. Genomics,Proteomics & Bioinformatics,2022,20(3):536-540.

[38] NIGUSSIE A,KUYPER T W,BRUUN S,et al. Vermicomposting as a technology for reducing nitrogen losses and greenhouse gas emissions from small-scale composting [J]. Journal of Cleaner Production,2016,139:429-439.

[39] ZHU G,SCHMIDT O,LUAN L,et al. Bacterial keystone taxa regulate carbon metabolism in the earthworm gut [J]. Microbiology Spectrum,2022,10(5):e0108122.

[40] SWART E,GOODALL T,KILLE P,et al. The earthworm microbiome is resilient to exposure to biocidal metal nanoparticles [J]. Environmental Pollution,2020,267:115633.

[41] CUI W,GAO P,ZHANG M,et al. Adverse effects of microplastics on earthworms:a critical review [J]. Science of the Total Environment,2022,850:158041.

[42] YANG X,SHANG G,WANG X. Biochemical,transcriptomic,gut microbiome responses and defense mechanisms of the earthworm *Eisenia fetida* to salt stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2022,239:113684.

[43] ZHU G,CHAO H,SUN M,et al. Toxicity sharing model of earthworm intestinal microbiome reveals shared functional genes are more powerful than species in resisting pesticide stress [J]. Journal of Hazardous Materials,2023,446:130646.

[44] HIRANO T,TAMAE K. Earthworms and soil pollutants [J]. Sensors,2011,11(12):11157-11167.

[45] DU Y,SHANG G,ZHAI J,et al. Effects of soybean oil exposure on the survival,reproduction,biochemical responses,and gut microbiome of the earthworm *Eisenia fetida* [J]. Journal of Environmental Sciences,2023,133:23-36.

[46] GUDETA K,KUMAR V,BHAGAT A,et al. Ecological adaptation of earthworms for coping with plant polyphenols,heavy metals,and microplastics in the soil:a review [J]. Heliyon,2023,9(3):e14572.

Genome Sequencing and Its Characteristics Analysis of *Amynthas aspergillum*

ZHANG Jun[1],JIANG Shunda[1],LI Xiuzhi[2],LI Xuesong[2],LU Bo[2],HUANG Jun[2],LIU Jun[1**],PENG Lixin[2**]

(1. Guangxi Zhuang Autonomous Region State-owned Qipo Forest Farm,Nanning,Guangxi,530031,China; 2. National Key Laboratory of Non-Food Biomass Energy Technology,National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery,Institute of Biological Science and Technology,Guangxi Academy of Sciences,Nanning,Guangxi,530007,China)

Abstract: *Amynthas aspergillum*, commonly known as the "Guang Dilong", is an earthworm species widely distributed in Guangdong and Guangxi provinces of China, and has important medicinal value. In this study, the genome of *A. aspergillum* was analyzed by flow cytometry and high-throughput sequencing. The genome size, repetitive sequence, heterozygosity and GC content were calculated, and the genome was predicted, annotated and identified by bioinformatics. The results showed that the genome size of *A. aspergillum* was approximate 1 Gb. The full-length Contig sequence of 765.69 Mb was obtained by de novo assembly of the second-generation sequencing data, and the haploid genome was assembled into about 641 Mb. Among them, the repeat sequence was 386.28 Mb, accounting for 50.42% of the total length, the GC content was 40.34%, and the heterozygosity rate was 1.68%, indicating that the genome of *A. aspergillum* had the characteristics of high repetition and high heterozygosity. A total of 27 864 genes were predicted in the genome, of which 99.04% could be annotated in the functional database, and more genes were enriched in signal transduction, endocrine system and infectious disease. Based on the analysis of the mitochondrial group of Megascolecidae species, the intraspecific genetic distance (*p*-distance) of earthworms has a wide distribution (0—15.1%). Among them, *A. robustus* showed the largest intraspecific gap (15.1%), followed by *Duplodicodrilus acinctus* (13.6%) and *Pheretima kutamaensis* (10.9%). While the intraspecific genetic distance of *A. aspergillum* was 1.9%. By calculating the genetic distance between different species, the genetic distance between *A. aspergillum* and *Metaphire californica* (16.0%) was the smallest, followed by Amynthas masatakae (16.2%) and *A. robustus* (16.2%). These four species are all widely distributed in Guangxi. Based on nuclear genome data, the genetic distances between *A. aspergillum* and *M. vulgaris* and *A. cortices* were 15.64% and 20.03%, respectively. However, the genetic distance calculated by the mitochondrial genome was 21.00% and 19.80%, suggesting that both the traditional taxonomy based on morphological and anatomical features and the classification based on mitochondrial lineage have certain limitations when used alone. A comprehensive understanding of the evolutionary history of earthworm species depends on more nuclear genome data. This study provides a foundation for the high-resolution sequencing of the *A. aspergillum* genome, as well as for research on genetic diversity conservation and artificial breeding. This study lays a foundation for the fine sequencing, genetic diversity protection and artificial breeding of the whole genome of *A. aspergillum*.

Key words: *Amynthas aspergillum*; genome survey; genome size; genome characteristics

责任编辑:陆　雁