

地龙及其混淆品原动物的形态及 DNA 双重条形码鉴定

高晓悦, 赵 邕, 郭 颖, 年骏杰, 张汉明, 吴 宇, 季 倩, 卜其涛*, 张 磊*

海军军医大学药学院 药用植物学教研室, 上海 200433

摘要: 目的 基于线粒体 cytochrome oxidase I (CO I) 和 16 S rRNA 基因开发 DNA 双重条形码鉴定方法, 由此验证并补充形态鉴定, 以期建立一种准确、有效地鉴定地龙及混淆品原动物的方法。方法 对收集到的 66 份样品依据形态特征进行初步鉴定, 使用优化后的引物同时扩增 CO I 和 16 S rRNA 序列。优化一步法双重 PCR 实验条件。用 MEGA 5.1 计算地龙及其混淆品的种内、种间遗传距离, 基于 K2P 模型构建 NJ 树。结果 CO I 和 16 S rRNA 双重 DNA 条形码鉴定与形态鉴定结合, 可准确鉴别地龙及混淆品原动物。结论 形态鉴定是分子鉴定的基础, 分子鉴定是形态鉴定的有力补充。二者结合可最大程度地实现地龙及其混淆品原动物的准确鉴定。DNA 双重条形码鉴定方法也可为地龙药材鉴定以及其他动物药材的分子鉴定提供参考。

关键词: 地龙; CO I 基因; 16 S rRNA; 原动物鉴定; 分子鉴定; 形态鉴定

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)09-2530-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.030

Morphological and DNA double barcode identification of *Pheretima* and its adulterants

GAO Xiao-yue, ZHAO Yong, GUO Ying, NIAN Jun-jie, ZHANG Han-ming, WU Yu, JI Qian, BU Qi-tao, ZHANG Lei

Department of Pharmaceutical Botany, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To develop an accurate and effective method to identify the original animals of Chinese medicine *Pheretima* (Dilong in Chinese) and its adulterants by using mitochondrial genes, cytochrome oxidase I (CO I) and 16 S rRNA as DNA barcoding sequences to certify and improve morphological analysis. **Methods** A total of 66 samples were initially identified according to their morphological characteristics, and then their CO I and 16 S rRNA sequences were simultaneously amplified for DNA barcoding. The two gene sequences were amplified with improved primers. One-step double PCR was used and the experimental conditions were optimized. The genetic distance among and within species of *Pheretima* and its hybrids was calculated by MEGA 5.1. The N-J tree was constructed based on K2P model. **Results** Combined with morphological identification, CO I and 16S rRNA double DNA barcoding identification can accurately identify *Pheretima* and its adulterants. **Conclusion** Morphological identification is the basis of molecular identification. Molecular identification can be a powerful supplement to the morphological identification. The combination of molecular identification and morphological identification can increase the accuracy of the identification of the original animals of *Pheretima* and its adulterants. Double DNA barcoding can also provide a solution for the identification of the medicinal materials of *Pheretima* and other animal medicinal materials. **Key words:** *Pheretima*; CO I gene; 16 S rRNA; protozoan identification; molecular identification; morphological identification

地龙为传统动物药, 始载于《神农本草经》, 具有清热定惊、通络、平喘、利尿的功效。《中国药典》2015 年版收载地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* E. Perrier、通俗环毛蚓

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 国家科技基础性工作专项: “常用道地药材及其产区的特征、标准及数字化”——道地药材知母、何首乌(夜交藤)、蔓荆子、蛇床子、地龙特征数据的收集和整理(2015FY111500-020, 2015FY111500-021); 海军军医大学本科生创新孵化基地项目(PH2019094)

作者简介: 高晓悦, 女, 药学 2017 级本科生。E-mail: gxy2890380040@sina.com

***通信作者** 张 磊, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药资源与品质调控。E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

卜其涛, 讲师, 研究方向为中药资源与品质调控。E-mail: bujenny@163.com

P. vulgaris Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* Michaelsen 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 的干燥体。前一种习称“广地龙”，后 3 种习称“沪地龙”。迄今为止，中国共记录有蚯蚓 9 科 28 属 640 种^[1]。地龙及易混淆品原动物种类繁多^[2]，且地龙药材采收加工尚未标准化，导致市场流通的地龙药材基原混乱，难以保证临床疗效及用药安全，亟需准确有效的原动物鉴定方法。目前，地龙药材的来源主要依靠野生资源^[3]，市场需求量不断增加，野生品种过度采集，导致资源面临枯竭。因此，地龙的人工养殖成为保障市场需求的必由之路。人工养殖的前提是确保基原准确，因此种苗鉴定至关重要。

形态鉴定为传统鉴定方法，是分子鉴定的基础。由于地龙药材在加工过程中，雄孔、受精囊孔等特征部位多被破坏，通过性状较难鉴别，且该方法对研究者经验要求高，容易受主观因素影响。DNA 条形码技术自 2003 年由加拿大动物学家 Paul Hebert 提出以来^[4]，不仅在生物分类学领域得到广泛关注，在中药材鉴定的应用中也带来革命性突破。近年来，基于 CO I 基因的 DNA 条形码技术应用于动物类药材鉴定的研究已成为该领域研究热点。Hou 等^[5]报道了基于 CO I 序列的 DNA 条形码技术可准确鉴别药用品种线纹海马、大海马、三斑海马等基原动物以及其他品种海马。韦健红等^[6]和马梅等^[7]报道了基于 CO I 和 16 S rRNA 基因对地龙类药材的 DNA 条形码鉴定。格小光等^[8]将市场收集的地龙类药材 CO I 序列与 NCBI 数据库和地龙原动物数据库进行 BLAST 比对，鉴定出 34 个物种，发现市售非药典品种蚯蚓滥用率达 55%。在多种动物中，CO I 序列种内差异小于 1%，种间差异超过 10%^[9]。值得注意的是，地龙类原动物广泛分布于热带与亚热带，其变异情况较为频繁，CO I 序列种内差异远大于 1%^[1]。同时，NCBI GenBank、Bold Systems 等数据库收载地龙相关数据量有限，导致部分地龙伪品的基因序列数据无从比对。地龙正品 CO I 序列种内差异小于 3%^[6]，一些地龙伪品基因序列与正品对比相似度在 87%~91%，若以此相似度判断为正品显然是不合理的。对比相似度阈值的不合理取值和数据的错误分析是实际鉴定过程中常见的问题，因此，有必要将相似度阈值规范化以确保鉴定的准确性。16 S rRNA 基因是保守性强的线粒体基因^[6]，可有效弥补基于 CO I 基因单一条形码鉴定的不足，双重条形码鉴定可减少鉴定错误。目前的研究通常使用

通用引物对 CO I 基因或 16 S rRNA 基因分别进行 PCR 扩增^[6-7]，操作步骤繁琐，耗时长。为简化实验步骤、提高实验效率，本研究利用 CO I 基因及 16 S rRNA 基因对样品进行 DNA 双重条形码扩增，同时尝试一步法双重 PCR 并优化实验条件。为提高扩增稳定性，将相应通用引物进行优化，缩短扩增片段并使所有引物的退火温度 (T_m) 保持相对一致。将测序结果与 NCBI GenBank 数据库进行比对，结合形态特征观察结果鉴定地龙及混淆品原动物。本研究旨在建立一种准确、高效、可靠、稳定的地龙类药材原动物鉴定方法，以期为保证地龙药材基原准确性以及地龙养殖业种苗鉴定提供借鉴。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器

XTL-2400 体式显微镜 (上海思长约光学仪器有限公司); 爱国者体视显微镜 (GE-5)。Hettich micro 200R 离心机 (德国 Hettich 科学仪器有限公司); 培清电泳仪 (上海培清科技有限公司); 培清 JS680D 全自动凝胶成像分析仪 (上海培清科技有限公司); Eppendorf AG PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); Eppendorf 移液枪 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂

Trans direct animal tissue PCR kit (北京全式金生物技术有限公司); EasyPure[®] PCR Purification Kit (北京全式金生物技术有限公司); 全式金胶回收试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); 2x Taq Plus Master Mix II DNA 聚合酶 (南京诺唯赞生物科技有限公司); 无水乙醇购自国药集团，分析纯。

1.3 材料

在地龙产地及周边采集地龙及其混淆品种样品 66 份。样本经海军军医大学药学院张汉明教授进行形态鉴定后以 DNA 条形码鉴定结果进一步验证。样本包括《中国药典》2015 年版收载的 4 个品种地龙及其他 11 个品种，样品信息见表 1。

2 方法

2.1 形态特征及解剖鉴定

将蚯蚓洗净后，投入白瓷盘内，放适量水，慢慢滴加 95%乙醇，稀释至 10%麻醉蚯蚓。标本松弛且对戳刺无反应时，取出标本，洗去黏液，平铺于白瓷盘中，拉直。为防止 DNA 降解，直接用 95%乙醇固定保存。24 h 后测量并记录蚯蚓的长度，记录其体节数。观察刚毛着生方式，第一背孔起点，环带位置及形状，雄孔位置及形状，雌孔位置，受

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

标本号	中文名	拉丁名	采集地
JSNTRDFQ	通俗腔蚓	<i>Metaphire vulgaris</i>	江苏如东
JSNTRDBCY	通俗腔蚓		江苏如东
JSNTRDPTY	通俗腔蚓		江苏如东
JSNTRD-A1	通俗腔蚓		江苏如东
JSNTRDYS1~8	通俗腔蚓		江苏如东
SHCMX-N3~4	通俗腔蚓		上海崇明
SHCMD-N2	通俗腔蚓		上海崇明
SHSMZ-N3	通俗腔蚓		上海崇明
ZJNBTB-1~2	通俗腔蚓		浙江宁波
JSTZTA-1~2	通俗腔蚓		江苏泰兴
JSZJR-DA	通俗腔蚓		江苏句容
JSHALS-A1~2	通俗腔蚓		江苏淮安
AHHALSY1~4	通俗腔蚓		安徽霍邱
JSSHU-1	通俗腔蚓		江苏沐阳
JSSHU-3	通俗腔蚓		江苏沐阳
JSNTRG-A2	通俗腔蚓		江苏如皋
HNZHOUK-1	通俗腔蚓		河南周口
SHCMSXZ-N1	威廉腔蚓	<i>Metaphire guillelmi</i>	上海崇明
SHCM-2	威廉腔蚓		上海崇明
JSSQTB	威廉腔蚓		江苏涟水
JSSQLS-2	威廉腔蚓		江苏涟水
BCY0511-3~6	栉盲远盲蚓	<i>Amyntas pectiniferus</i>	上海浦东
BCYCM3~4	栉盲远盲蚓		上海浦东
BCY0511-A	栉盲远盲蚓		上海浦东
BCY0511-7~8	阿美远盲蚓	<i>Amyntas amis</i>	上海浦东
SHCM-3	阿美远盲蚓		上海崇明
SHCM-1	无中文名	<i>Amyntas phaselus</i>	上海崇明
JSNTRD-2	无中文名		江苏如东
JSNTRD-N5	无中文名		江苏如东
SHFXJZ	加州腔蚓	<i>Metaphire californica</i>	上海奉贤
SHFXZL	直隶腔蚓	<i>Metaphire tschiliensis</i>	上海奉贤
HNZHOUK-2	直隶腔蚓		河南周口
SHFXTAO-1~2	湖北远盲蚓	<i>Amyntas hupeiensis</i>	上海奉贤
SHWXUT-3	湖北远盲蚓		上海万祥
SZYYIN-1	参状远盲蚓	<i>Amyntas aspergillum</i>	广东阳江
SHJSLX-5	皮质远盲蚓	<i>Amyntas corticis</i>	上海金山
SHJSLX-1	多肉远盲蚓	<i>Amyntas carnosus</i>	上海金山
SHJSLX-6	杜拉蚓属蚯蚓	未查到	上海金山
SHFXTAO-3~5	杜拉蚓属蚯蚓	未查到	上海奉贤
SHFXTAOWL	杜拉蚓属蚯蚓	未查到	上海奉贤
SHFXTIAN	杜拉蚓属蚯蚓	未查到	上海奉贤
HAINAN-3	无中文名	<i>Amyntas wujhouensis</i>	海南三亚
HAINAN-2	远盲蚓属蚯蚓	未查到	海南三亚
HAINAN-4	远盲蚓属蚯蚓	未查到	海南三亚

精囊孔位置、数量及形态，拍照并列表比较。解剖后观察受精囊、前列腺及盲肠形态特征，拍照并列表比较。

2.2 DNA 条形码鉴定

2.2.1 引物优化 将 COIF1-1P/HCO2198、COIF1-1/COIR1-1^[7]、16S rRNAF/16S rRNAH、16S f/16S r 4 组通用引物通过 NCBI Primer BLAST 进行优化，

基于 NCBI Genbank 数据库中的地龙及混淆品原动物线粒体 DNA 序列找出并消除通用引物和 DNA 模板的错配，同时使各组引物的 T_m 值尽可能保持一致。 T_m 通过诺维赞引物设计软件 CE Design V 1.04 获得。为保证双重扩增产物电泳效果，本研究设计了 2 组可同时扩增出约 500 bp 和 350 bp 条带的反应体系，见表 2。

表 2 CO I 基因和 16 S rRNA 基因优化引物

Table 2 Improved primers of CO I genes and 16 S rRNA genes

引物组别	基因片段	扩增片段长度/bp	引物名称	引物序列	$T_m/^\circ\text{C}$
第 1 组	CO I	362	COIF1-1P	5'-GCAGGAACAGGATGAACAGT-3'	54.5
			HCO2198-P	5'-TCTGGGTGCCCCAAGAAT-3'	55.3
	16 S rRNA	524	16 S rRNAF-P	5'-CGCCTGTTTAACAAAAACATT-3'	55.5
			16 S rRNAH-P	5'-CCGGTCTGAACCTCAGCTCA-3'	56.3
第 2 组	CO I	494	CO I F1-1P	5'-GCAGGAACAGGATGAACAGT-3'	54.5
			CO I R1-1P	5'-AATATGTGGTGGGCTCATACA-3'	55.4
	16 S rRNA	346	16 S r-P	5'-GGTATCCTAACCGTGCAAAG-3'	55.1
			16 S f-P	5'-AAGCCCCACGATTGATAAG-3'	55.1

2.2.2 DNA 粗提及一步法 PCR 双重直接扩增 在蚯蚓尾部剪取约 0.1 cm，剖开，洗净泥沙，放入 1.5 mL EP 管中，剪碎。参照 Trans direct animal tissue PCR kit 说明书，55 $^\circ\text{C}$ 水浴 20 min 释放 DNA。为提高后续扩增成功率，使用 EasyPure[®] PCR Purification Kit 进行柱纯化。使用“2.2.1”项所述引物扩增 CO I 基因和 16S rRNA 基因。PCR 反应体系为 30 μL ，包括 15 μL 的 2x Taq Plus Master Mix II DNA 聚合酶，4 个引物各 1 μL ，DNA 模板 3 μL ，加 ddH₂O 补足体系。PCR 反应条件为 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min，循环反应 35 次（95 $^\circ\text{C}$ 、15 s；48 $^\circ\text{C}$ 、20 s；72 $^\circ\text{C}$ 、35 s），延伸（72 $^\circ\text{C}$ 、7 min）。电泳检测扩增质量。使用全式金胶回收试剂盒对扩增产物进行纯化。送至苏州金唯智生物科技有限公司进行双向测序。

3 结果与分析

3.1 形态鉴定

由于篇幅有限，文中仅列出药典品种地龙的特征图片。受精囊孔、雄孔、雌孔见图 1，受精囊、前列腺、盲肠见图 2。各品种关键特征比较见表 3。通俗腔蚓与威廉腔蚓主要差异是雄孔和受精囊孔的结构稍有不同，通俗腔蚓雄孔交配腔有时能完全翻出，受精囊腔更深广。威廉腔蚓与直隶腔蚓较易混淆，直隶腔蚓雄孔区两侧皮褶形成马蹄形浅囊，雄孔位

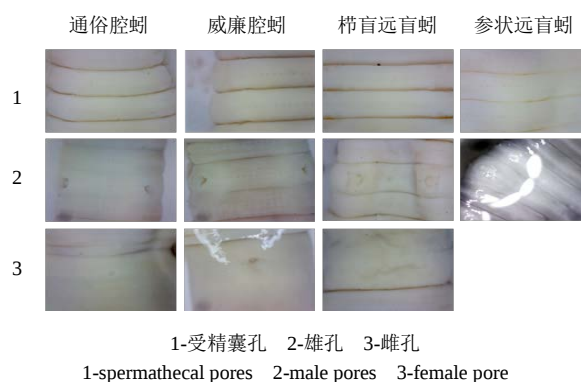


图 1 地龙及其混淆品原动物形态特征

Fig. 1 Morphological feature of *Pheretima* and its adulterants

于该浅腔底部的突起上。栉盲远盲蚓受精囊孔内外两侧腹面刚毛圈前后常有乳突，排列较规则，形成矩形或梯形；雄孔及乳突陷入时外观接近五边形，外露时乳突非常明显。加州腔蚓和湖北远盲蚓体型较小，加州腔蚓体长 80~150 mm，宽 2.5~5 mm，湖北远盲蚓体长 70~220 mm，宽 3~6 mm。湖北远盲蚓在 17/18 和 18/19 节间沟两侧各有 1 对椭圆形的较大乳突，易于鉴别。阿美远盲蚓与 *Amyntas phaselus* 形态极为相似，因依据形态特征未查到参考资料，本研究暂时仅依据分子鉴定结果判断二者品种。阿美远盲蚓雄孔外观与威廉腔蚓较相似，但阿美远盲蚓环带有背孔，威廉腔蚓环带无背孔，且

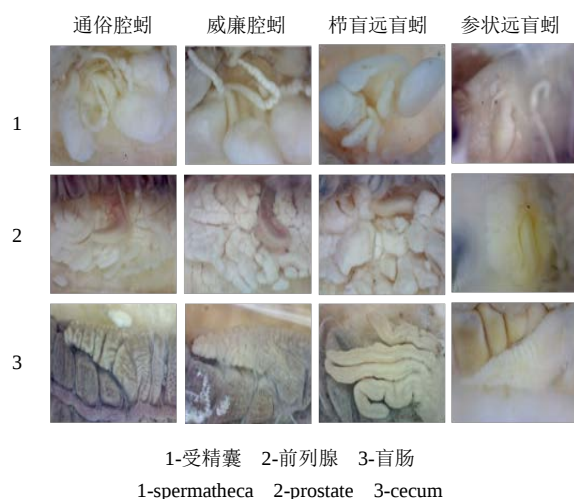


图 2 地龙及混淆品原动物解剖特征

Fig. 2 Anatomical characteristics of *Pheretima* and its adulterants

阿美远盲蚓环带前后的体节宽度差异明显，环带后体节明显变窄，二者较易区分。本研究收集到的参状远盲蚓以及 *Amyntas phaselus* 未见环带。资料记载参状远盲蚓受精囊孔腹侧区域有横排（1 排或 2 排）乳突^[10-11]，本研究观察样品时未见到此特征。样品体长 160 mm，宽 6 mm，与文献描述的长 117~375 mm，宽 6~12 mm 相比体型尚小，推测可能采集到的样品成熟度不够，生殖特征尚未发育完全。其他形态特征与资料相符。由于仅依据形态鉴定不能确定，因此结合 DNA 条形码鉴定结果确定品种归属。资料记载皮质远盲蚓雄孔侧面，刚毛圈前后具两对小圆形乳突^[12]，本研究采集的样品未观察到此特征。样品可能是由于不成熟导致生殖特征未发育完全。此外，蚯蚓变异情况较为频繁，故存在变异的可能。因此其品种归属也需结合 DNA 条形码鉴定结果判断。海南三亚采集的蚯蚓依据形态判断为远盲蚓属。上海金山采集的蓝色蚯蚓依据形态判断为链胃蚓科杜拉蚓属，其活体颜色墨蓝，易与药典品种区分。

3.2 DNA 条形码鉴定

3.2.1 CO I 和 16 S rRNA 基因序列分析 对地龙及混淆品原动物总 DNA 进行 PCR 双重扩增，均获得特异性 PCR 产物（图 3）。利用 CodonCode Aligner V 3.7.1 将各个样品的双向测序峰图校对拼接，去除引物区，校正准确后分别得到第 1 组 289 bp 的 CO I 基因序列和 468 bp 的 16 S rRNA 基因序列及第 2 组 437 bp 的 CO I 基因序列和 293 bp 的 16 S rRNA 基

因序列。用 NCBI GenBank 进行在线 BLAST 比对，所有序列匹配度都很高，表明扩增和测序结果准确可靠。

3.2.2 种内与种间变异分析 用 MEGA 5.1 计算并基于 Kimura-2-Parameter (K2P) 模型分析《中国药典》2015 年版收载的 4 个品种地龙 CO I 和 16 S rRNA 基因的种内、种间变异率，见表 4。其中，所有含有间隔和两端参差不齐的位点均被除去。由于已有文献报道广地龙正品参状远盲蚓 2 种基因的种间变异率，本研究仅针对其他未报道的数据进行分析。

3.2.3 基于系统发育树的物种鉴定 采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树，利用 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率，仅显示自展支持率 > 50%。基于 2 种基因构建的系统发育树均将地龙及其混淆品种分成了 2 大支，即分支较多的钜蚓科 (Megascolecidae) 和仅一支的链胃蚓科 (Moniligastridae) 杜拉蚓属（图 4）。钜蚓科一支中腔蚓属和远盲蚓属由于分类系统较混乱，并未分开。有些物种如栉盲环毛蚓既被命名为亚式腔蚓，又被命名为栉盲远盲蚓。

4 讨论

4.1 引物改良与 PCR 方法优化

格小光等^[8]研究了基于 CO I 序列的地龙类药材分子鉴定。韦健红等^[6]和马梅等^[7]研究了基于 CO I 和 16 S rRNA 基因对地龙药材的分子鉴定。然而以上研究都是先提取模板 DNA，再使用通用引物分别对 CO I 和 16 S rRNA 基因进行扩增。本研究基于样品线粒体 DNA 序列改良了 CO I 基因和 16 S rRNA 基因的通用引物，减少了通用引物和 DNA 模板的错配率，使各组引物的 T_m 值尽可能保持一致，并将扩增片段适当缩短，可提高扩增成功率，实现稳定的 DNA 双重条形码扩增。测序结果与 NCBI GenBank 数据库进行比对，每个样品分别得出 2 条基因序列的比对结果，二者相互补充。

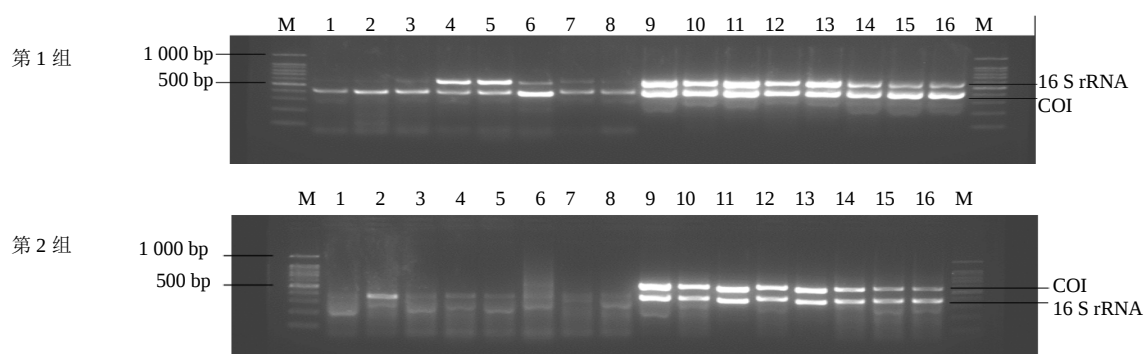
4.2 基于 CO I 和 16S rRNA 基因序列双重扩增的 DNA 条形码方法与形态鉴定结合可用于地龙原动物鉴定

参状远盲蚓与参环毛蚓、威廉腔蚓与威廉环毛蚓、通俗腔蚓与通俗环毛蚓、栉盲远盲蚓与栉盲环毛蚓等同名异物现象是由于蚯蚓分类系统的改进而出现的结果^[1]。对于药典规定的 4 种地龙原动物，成熟的栉盲远盲蚓和参状远盲蚓较易通过其生殖特

表 3 地龙及其混淆品原动物主要形态特征比较

Table 3 Comparison of morphological characteristics between *Pheretima* and its adulterants

品种	背孔起始位置	环带位置	雄孔	受精囊孔	受精囊	前列腺	盲肠
通俗腔蚓	12/13 节间	14~16 节	18 节腹侧；交配腔深而广，内壁具皱褶，雄孔位于腔底一个突起上，有时能全部翻出，似阴茎状或花菜状	3 对，位于 6/7~8/9 节的节间腹面两侧，受精囊腔深广，前后缘均隆肿，腔内有乳突 2~3 个	受精囊管较长，末端膨大为卵圆形；盲管末端 2/3 在一平面左右弯曲，为纳精囊	16~21 节，发达	简单，不分枝
威廉腔蚓	12/13 节间	14~16 节	18 节腹侧；交配腔下陷，体外呈一条纵裂缝，交配腔内壁具褶皱，褶皱间有刚毛 2~3 条；雄孔位于交配腔底部的一个突起上	3 对，位于 6/7~8/9 节的节间腹面两侧，孔位于节间沟横缝一小突起上，无受精囊腔	受精囊管较长，末端膨大为卵圆形或稍扁；盲管末端 2/3 在一平面左右弯曲，为纳精囊，与管分明	16~21 节，发达	简单，不分枝
栉盲远盲蚓	12/13 节间	14~16 节	18 节腹侧；雄孔位于十字形突起中央，常被一浅囊状皮褶盖住，内侧有一个或多个乳突，排列变化多样	3 对，位于 6/7~8/9 节的节间腹面两侧，孔常陷入，孔的内外两侧腹面刚毛圈前后常有乳突，呈矩形或梯形	受精囊末端球状或椭球状；盲管几与主体等长，末端约 2/3 膨大成棒状	16~21 节，发达	复式，具指状分枝
加州腔蚓	11/12 节间	14~16 节	18 节腹侧；雄孔在一浅囊中锥突顶上，其突有时外面可见，有时隐藏在内部	2 对，位于 7/8~8/9 节间沟内的梭形突上，周围无乳突	受精囊管短，末端卵圆形或类球形；盲管弯曲	16~21 节，发达	简单，不分枝
直隶腔蚓	12/13 节间	14~16 节	18 节腹面；两侧皮褶形成马蹄形浅腔，雄孔位于该浅腔底部的突起上	3 对，6/7~8/9 节的节间沟小突上	受精囊管粗、长，末端类球形或椭圆形；盲管末端左右弯曲幅度较大	16~20 节，发达	简单，不分枝
湖北远盲蚓	11/12 节间	14~16 节，环带腹侧有刚毛	18 节腹面两侧平项乳突上，稍偏内侧，在 17/18 和 18/19 节间沟两侧，各有 1 对椭圆形的较大乳突	3 对，位于 6/7~8/9 节的节间腹面两侧	受精囊长柱状或长椭圆形；盲管长于主体，末端膨大	16~20 节，发达	简单，不分枝
阿美远盲蚓	11/12 节间	14~16 节，有背孔	18 节腹侧，外观呈一条纵裂缝	3 对，6/7~8/9 节的节间沟的乳突上	受精囊管极粗，末端卵圆形；盲管末端 1/4 至 1/2 左右弯曲，幅度较大	16~20 节，发达	末端多弯成 L 形或钩状
<i>A. phaselus</i>	12/13 节间	未见	18 节腹侧，外观呈一条纵裂缝	3 对，6/7~8/9 节的节间沟的乳突上	受精囊管极粗，末端卵圆形；盲管末端 1/4 至 1/2 左右弯曲，幅度较大	16~20 节，发达	末端多弯成 L 形或钩状
皮质远盲蚓	11/12 节间	14~16 节	18 节腹侧，雄孔外侧皮褶形成一平项状	4 对，位 5/6~8/9 节的节间沟，外观小眼状	受精囊管直，末端卵圆形；盲管末端膨大	未见	简单，细长
多肉远盲蚓	13/14 节间	14~16 节	18 节腹侧，雄孔内侧，刚毛圈后有一对圆环形乳突	4 对，位 5/6~8/9 节的节间沟，受精囊孔突外观似半个圆圈，受精囊内侧，刚毛圈前有圆环形乳突，两侧对称或有缺失	受精囊管较粗，末端椭圆形；盲管末端膨大为枣形	16~20 节，发达	简单，细长
参状远盲蚓	11/12 节间	未见	18 节腹侧刚毛圈一小突上，外缘有数圈浅皮褶环绕，内侧刚毛圈隆起，前后两边有横排小乳突，每边 10~20 个不等	2 对，7/8~8/9 节的节间一椭圆形突起上	受精囊卵圆形或袋状，管短粗；盲管亦短，末端 2/3 微弯曲	17~19 节，较发达	简单或腹侧有齿状小囊
<i>A. wujhouensis</i>	11/12 节间	14~16 节	18 节腹侧，可见 3 个类圆形乳突，外有数圈皮褶环绕	2 对，7/8~8/9 节间一椭圆形突起上，7、8 节刚毛圈后各有 3 个椭圆形孔状乳突，7、8 节前后对应	受精囊卵圆形，管短粗；盲管占主体 1/2 至 2/3，末端 1/3 膨大为枣核状	16~21 节，发达	简单
链胃蚓科杜拉蚓属蚯蚓	无	未见	10 节后缘一横突上	1 对，7/8 节间	受精囊椭圆形，管短	10 节，椭圆形	未见



1~8-粗提 DNA 扩增效果 9~16-柱纯化 DNA 扩增效果 M-Marker 1、9-通俗腔蚓 2、10-威廉腔蚓 3、11-栉盲远盲蚓 4、12-加州腔蚓 5、13-直隶腔蚓 6、14-湖北远盲蚓 7、15-阿美远盲蚓 8、16-参状远盲蚓
1—8-crude DNA amplification effect 9—16-column purified DNA amplification effect M-Marker 1, 9-*Metaphire vulgaris* 2, 10-*Metaphire guillelmi* 3, 11-*Amyntas pectinifer* 4, 12-*Metaphire californica* 5, 13-*Metaphire tschiliensis* 6, 14-*Amyntas hupeiensis* 7, 15-*Amyntas amis* 8, 16-*Amyntas aspergillum*

图 3 地龙及混淆品 COI 及 16S rRNA 基因双重 PCR 电泳图

Fig. 3 Double PCR electrophoretogram of COI and 16S rRNA genes of *Pheretima* and its adulterants

表 4 4 种地龙原动物种内种间遗传距离

Table 4 Genetic distance between four species of *Pheretima*

基因类型	中文名	种间遗传距离差异/%	种内遗传距离差异/%
COI	通俗腔蚓	7.3~26.0	0~2.5
	威廉腔蚓	7.3~25.5	0~0.7
	栉盲远盲蚓	14.7~16.0	0~2.0
	参状远盲蚓	17.3~25.5	0~2.7 ^[6]
16S rRNA	通俗腔蚓	1.9~21.7	0~0.7
	威廉腔蚓	1.9~21.4	0~0.4
	栉盲远盲蚓	5.8~20.4	0~0.7
	参状远盲蚓	7.9~22.2	0~0.9 ^[6]

征与混淆品区分。通俗腔蚓与威廉腔蚓之间，以及二者与直隶腔蚓等形态差异较小，普通研究人员较难通过形态特征准确判断其物种，需与分子鉴定结果相结合才能准确判断。

地龙类动物分布于热带与亚热带，其变异情况较为频繁，这一现象在 DNA 条形码方法测序比对环节得到了印证，因此样品测序结果与数据库序列的相似百分比阈值的确定是 DNA 条形码方法鉴定的关键。通过 Vector NTI 和 MEGA 5.1 计算分析地龙及其混淆品的种内、种间 COI 变异率可知地龙原动物的种内相似百分比一般在 97% 以上。相似百分

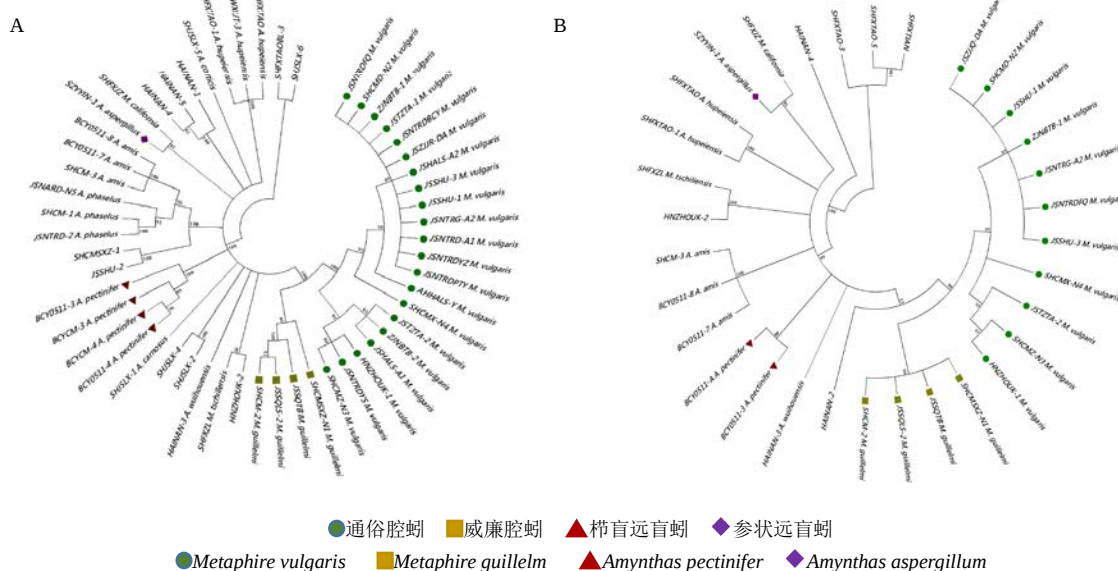


图 4 基于 COI 基因序列 (A) 和基于 16S rRNA 基因序列 (B) 的地龙及混淆品原动物进化关系 NJ 树

Fig. 4 NJ tree of *Pheretima* and its adulterants based on COI gene sequence (A) and 16S rRNA gene sequence (B)

比小于 97% 的对比结果均不可靠。通俗腔蚓和威廉腔蚓的相似百分比常常只差 2%~4%，容易出错，16 S rRNA 基因种内变异率一般不超过 1%，因此，加入 16 S rRNA 基因做进一步比对可纠正仅依据 CO I 序列比对而引起的差错。另外，借助比对软件将测序序列与基因库数据比对确认也很重要。本研究表明，基于 CO I 和 16 S rRNA 基因序列的双重 DNA 条形码方法结合传统形态鉴定方法可以准确鉴别地龙及混淆品原动物。

本研究基于数据库和测序结果绘制了地龙及其常见混淆品的进化关系图（图 4），分子水平上的进化关系分析可作为形态鉴定的验证与补充。直隶腔蚓、威廉腔蚓和阿美远盲蚓 DNA 差异较大，但形态特征较为相近，而加州腔蚓和参状远盲蚓、栉盲远盲蚓和皮质远盲蚓 DNA 差异较小，但形态特征差异较大，由此可见蚯蚓这一物种趋同进化和趋异进化的现象均较为频繁。由于本研究样本量限制，尚难联系分子证据和形态方法对于进化关系进行进一步的论证。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 黄健, 徐芹, 孙振钧, 等. 中国蚯蚓资源研究: I. 名录及分布 [J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(3): 9-20.
- [3] 李薇, 吴文如, 肖翔林. 地龙规范化生产的研究概况 [J]. 中草药, 2015, 36(9): 143-146.
- [4] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [5] Hou F X, Wen L L, Peng C, et al. Identification of marine traditional Chinese medicine dried seahorses in the traditional Chinese medicine market using DNA barcoding [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2018, 29(1): 107-112.
- [6] 韦健红, 李薇, 吴文如, 等. 基于 CO I 与 16S rRNA 基因对广地龙的 DNA 分子鉴定研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3274-3278.
- [7] 马梅, 李薇, 龚玲, 等. 基于 CO I 和 16S rRNA 基因的地龙药材及其混淆品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 595-598.
- [8] 格小光, 蒋超, 田娜, 等. 基于 DNA 测序技术的市售地龙类药材基原调查与考证研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1206-1214.
- [9] 杨帆, 周丽珊, 何铭琪, 等. DNA 条形码技术在动物类中药鉴定中的运用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8): 182-184.
- [10] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [11] 陈义. 中国动物图谱-环节动物（附多足类）[M]. 北京: 科学出版社, 1959.
- [12] 徐芹. 中国陆栖蚯蚓 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.