



# 蚂蟥和水蛭种间遗传变异和系统关系的 ITS 序列分析

刘飞<sup>1,2</sup>, 郭巧生<sup>1</sup>, 史红专<sup>1\*</sup>, 王恬<sup>2</sup>, 陆树松<sup>3</sup>

(1. 南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095;

2. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095;

3. 桐乡欣龙特种水蛭养殖中心, 浙江 桐乡 314512)

**[摘要]** 目的:为了阐明蚂蟥 *Whitmania pigra*,水蛭 *Hirudo nipponia* 种间遗传分化系统关系。方法:运用 ITS 测序分析我国不同地区蚂蟥 *W. pigra*、水蛭 *H. nipponia* 核糖体 ITS 碱基序列差异,用 MEGA4.0 软件中的 MP 法构建的分子进化树。结果:蚂蟥和水蛭平均总 ITS 序列长度在 857.2~861.2 bp,其碱基 A,T,G,C 的平均分别为 25.12%,28.28%,17.34%,29.29%。GC 含量明显高于 AT 含量。通过对蚂蟥、水蛭 ITS 基因片段遗传特征的研究发现其种内变异很小,在 14 个群体中有 45 个位点发生转换。MP 系统树将 14 个种群蚂蟥和水蛭分为两大类群。结论:蚂蟥和水蛭的变异类型可能为种内变异为主。同时发现,基于 DNA 序列的蚂蟥及水蛭的系统分类结果与分类学的分类结果不完全一致,可能是由 ITS 序列在进化过程中发生了少量位点的变异,如碱基之间的转换、颠换和缺失等造成的。

**[关键词]** 蚂蟥;水蛭;rDNA;ITS 系统关系

蛭类在世界上约有 400~500 种,我国约有 100 种,已发现 89 种。虽然迄今作为医学研究的水蛭种类较多,但在《中国药典》(2005 年版)只收录了 3 种,即蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 和茶色蛭 *W. acranulata* Whitman。水蛭作为一味传统中药,其疗效在古代《神农本草经》、《名医别录》和《本草纲目》中均有记载。水蛭性平、味咸苦、有小毒。具有“通经、破瘀、消肿”之功效,主治血瘀经闭,症瘕积聚<sup>[1]</sup>。近年来国内、外学者对蚂蟥 *W. pigra*、水蛭 *H. nipponia* 的养殖、生理和药理等方面<sup>[2-10]</sup>进行了系统的研究。

核糖体 DNA 中的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列进化速率较快,在 rDNA 中,由于 ITS 区不加入成熟核糖体,所以受到的选择压力较小,进化速度较快,所提供的信息量也大,已被用于生物科内、属内、种间以及群体间的分子系统演化关系研究<sup>[11]</sup>。近年来也已被用于中药材种内种群间的差异性研究<sup>[12]</sup>。

近几年,随着水蛭及其相关产品的开发,其需求量仍将会快速增长,水蛭已成为世界性的紧俏中药材之一。1984 年水蛭被列入动物保护国际红皮书。保护现有的水蛭野生资源已成当务之急,为此水蛭种质资源亟待整理和评价,以便为水蛭核心种质资源库的建立提供有力保障。我国水蛭种质资源丰富,分布较广,且各品种之间的药用效果差异显著,本文以我国主要蚂蟥和水蛭主产区部分种群为试材,通过测定核糖体 ITS 完整序列,结合地理分布分析比较其序列特征。

## 1 材料

收集我国水蛭分布区 8 个省区的 14 份蚂蟥和水蛭种群种质资源,包括 2 个人工养殖品种,见表 1。经南京农业大学中药材研究所郭巧生教授鉴定分别为蚂蟥 *W. pigra*,水蛭 *H. nipponia*。每份种质至少 100 条水蛭,暂养在南京农业大学水蛭种质资源基地,每个地区选取 5 条个体水蛭或蚂蟥,进行 DNA 提取和扩增。

## 2 方法

采用改进的 SDS 法<sup>[14]</sup>,提取总 DNA。DNA 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,用 GIS 凝胶成像检测。ITS 通用引物序列如下: $P_1$ , GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAGG; $P_2$ , TCCTCCGCTTATTGATATGC。扩增

**[稿件编号]** 20100401008

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2006BAI06A15-9);浙江省重点科研社会发展项目(2007C23029)

**[通信作者]** \* 史红专, Tel: (025) 84396591, E-mail: shihz@njau.edu.cn



表1 蚂蟥和水蛭种群分布地的基本情况

No.	种群	代号	学名	拉丁名	经度(E)	纬度(N)
1	江苏射阳	SY	蚂蟥	<i>Whitmania pigra</i>	120.18	33.49
2	河北衡水	HS	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	115.35	37.33
3	江苏建湖	JH	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	119.47	33.27
4	浙江桐	TXW	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	120.23	30.38
5	江苏大丰	DF	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	120.24	33.12
6	浙江桐乡养殖	TXC	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	120.33	30.35
7	江苏句容	JR	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	119.12	31.52
8	江苏宿迁	SQ	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	118.12	33.27
9	江苏南京养殖	NJC	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	118.50	32.02
10	江西乐安	LA	蚂蟥	<i>W. pigra</i>	115.46	27.16
11	安徽马鞍	MAS	水蛭	<i>Hirudo nipponica</i>	118.50	32.02
12	广西桂林	GL	水蛭	<i>H. nipponica</i>	109.56	25.47
13	广东广州	GZ	水蛭	<i>H. nipponica</i>	113.13	23.06
14	云南大理	DL	水蛭	<i>H. nipponica</i>	100.16	25.37

反应在 MJ/PTC-200 热循环仪上进行,反应体积 50  $\mu\text{L}$ ,包含 1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KCl}$ , 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Tris-HCl}$ , pH 8.4, 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 2 U *Taq* DNA polymerase, dNTP 0.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 引物  $P_1$  0.2  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和引物  $P_2$  0.2  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 模板 20 ng, 超纯水补至 50  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为 95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^\circ\text{C}$  变性 45 s, 57  $^\circ\text{C}$  退火 50 s, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 60 s, 循环 35 次; 72  $^\circ\text{C}$  延伸 7 min。

PCR 产物经 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 纯化后直接用于测序反应,由英俊生物技术有限公司测序部完成。各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。

序列的对位排列与分析用 CLUSTAL X (1.83) 软件对序列进行对位排列,手工适当校正以尽量减少排列所需缺失的数目,得到的序列用 MEGA4.0 分子进化遗传分析软件分析。在 Kimura-2 参数法计算遗传距离的基础上,以最大简约法 (maximum parsimony method, MP) 建树建立分子系统发生树。系统树各分支置信度用自举检验法 (bootstrap) 检验,共进行 1 000 次循环。

### 3 结果与分析

3.1 各种群蚂蟥和水蛭 ITS 序列差异分析 不同种群的蚂蟥、水蛭 ITS 序列见表 2,各地区水蛭和蚂蟥差异性序列见表 3。

表2 不同蚂蟥、水蛭种群的 ITS 序列

No.	碱基序列							
1~80	GCCGTTGGTC	CAGTGTTCGC	GCTGATCATC	GTGCAACGAA	CAATCGTTTG	TCACCGATT	CGTGCCTCT	CGGTGCTCC
81~160	TCGCTTCGTG	XGXXTCGCCX	GTGGTCGACC	GCAAGTGCCG	ACTTCGAAGT	CTCCCGGTCG	ATGACGACGA	CGACXACXGX
161~240	CCGGAGGTAC	TCCACGCCTA	TCCACGCCTA	TGGTACCTCT	CTTGCTCTCT	GTGACTGTCG	CGTCGCCGCT	XGTGXGXCGX
241~320	GCATCGCTAA	ACATTTTCGA	TACCGTTATC	TATAAAGTCG	CCGGGAGCCG	TAATTTGGCTT	TCTGACGCGG	TCGTCTGAGG
321~400	AGGACGTCCA	AAACGAGAGA	ACACTCTAAG	CGGTGGATCA	CTCGGCTCG	GGTTCGATGA	AGAGCGCAGC	TAAATGCGTT
401~480	AATTAATGTG	AATTGCAGGA	CACATTGAAC	ATCGACATCT	TGAACGCATA	TTGCGGCCCC	GGTCTCTCCC	GGAGCCAGGC
481~560	CTGTCTCAGG	GTCGGTTAGA	GTACAATCGC	GGGTTTTTCG	CTACGGCCCG	CGCAATGGGT	TTTCGCGGCA	GGGATTTCGA
561~640	GTTATTCGA	XXXXXXXXTX	TCACAGGTCT	XXXXXXXXTX	AXXXXXXAX	XGAGAGAXX	GCCGGAGCTT	TTCGTCTCCG
640~720	GTCCGAAGCG	CGGGTTGCCA	GAATGTCAGA	CCGGCGGTTG	CGCGTCACTG	CGTGCCTGTC	GATTAGATTC	GTTCCGTTGGT
720~800	CGCGCTCGT	CTXTXXGTX	GTCGCGGGGG	CAGTCTCTTG	ACGGTTCGTC	CGTGCCTGTC	CGCATGTCCC	ATTGACGGTA
800~863	TCGGAACGAA	CGGCGGCTCG	ATTTTCTCTC	AAGAGATTCC	CTTTTCGATTC	TGGCGAGCGA	CCG	

注: X. 差异碱基序列。

各类群间有其中变异位点 45 个,包括简约信息位点 43 个。共发现 51 个单倍型。碱基变异类型有 G-A 转换, C-T 转换, T-A 颠换, 在 601~610 bp 有插

入或缺失变异,见表 4。可见其 ITS 序列能提供较为丰富的信息。ITS 区域具有较高的 (G+C) 含量,提示碱基的变异并不依赖于 rDNA 序列的组成。



表3 蚂蟥、水蛭 ITS 序列差异分析

No.	91 ~ 100 bp	151 ~ 160 bp	231 ~ 240 bp	571 ~ 580 bp	591 ~ 600 bp	601 ~ 610 bp	611 ~ 620 bp	731 ~ 740 bp
SY1	CGAGTCGCC	CGACGACTGT	CGTGTGTCGT	AAGGCTCGTC	CCTTCTTTCT	TTA- - - - AC	AGAGAGAAGA	CTGGTCCGTC
SY2	C. GG. . . . C	. . . . G. . T. T	A. . . T. T. . T	AAGGCTCG. T	CCT. CTTTCT	. T. C- C- . . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
SY3	C. GG. . . . C	. . . . A. . T. T	C. . . C. T. . T	CAGGCTCG. C	TCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
SY4	C. GG. . . . C	. . . . G. . T. T	- . . . C. T. . T	AAGGCTCG. T	CCT. CTTTCT	. T. C- - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
SY5	C. GG. . . . C	. . . . A. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
HS1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - C- . . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
HS2	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	A. . . T. T. . T	AAGGCTTG. C	TCT. CTTTCT	. T. - - C- G. C	A. . . . . AGA	. . GG. CT. . C
HS3	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	A. . . T. T. . T	AAGGTTGC. T	TCT. CTTTCT	. T. C- C- . . C	A. . . . . AGA	. . GG. CT. . C
HS4	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	- . . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	TCT. CTTTCT	. T. C- C- . . C	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . C
HS5	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	- . . . T. T. . T	CAGGCTCG. T	CCT. CTTTCT	. T. - - C- . . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
JH1	C. AA. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	AAGGTTGC. C	CCT. TCTCTA	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GA. CC. . C
JH2	C. AA. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . T. T. . T	AAGGTTGC. C	CCT. TCTCTG	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
JH3	C. AA. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	AAGG- - CG. C	TCT. TCTCTG	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
JH4	C. AA. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . T. T. . T	AAGGTTGC. C	TCT. TCTCTA	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
JH5	C. AA. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	AAGG- - CG. C	CCT. TCTCTG	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
TXW1	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	AAGGTTGC. C	CCT. TCTCTA	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GA. CC. . C
TXW2	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	ACGGTTGC. C	CCT. TCTCTA	. C. - - CAG. G	A. . . . . AGA	. . GA. CC. . C
TXW3	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	A. . . C. T. . T	ACGGTTGC. C	CCT. TCTTTA	. C. CACAG. G	A. . . . . AGA	. . GA. CC. . C
TXW4	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	- . . . T. T. . T	ACGGTTGC. C	CCT. TCTCTA	. C. CACAG. G	A. . . . . AGA	. . GA. CC. . C
TXW	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	ACGGTTGC. C	CCT. TCTTTA	. C. - - CAG. G	A. . . . . GGA	. . GA. CC. . C
DF1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . T	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
DF2	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - T- . . C	A. . . . . AGA	. . GA. CC. . C
DF3	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGCC-CG. C	CTT. CTTTCT	. T. - - T- . . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
DF4	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	A. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - T- . . T	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
DF5	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. T	CCT. CTTTCT	. T. - - T- . . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
TXC1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
TXC2	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	ACGGTTGC. C	CCT. TCTCTA	. T. - - - - . C	A. . . . . GAA	. . GA. CC. . C
TXC3	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	A. . . C. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. TCTCTA	. T. T- T- . . C	A. . . . . GGA	. . GA. CC. . C
TXC4	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	ACGGTTGC. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . GAA	. . GA. CC. . C
TXC5	C. AG. . . . C	. . . . G. . C. T	C. . . C. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. T- C- . . C	A. . . . . GGA	. . GA. CC. . C
JR1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
JR2	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - G- . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
JR3	C. AG. . . . T	. . . . G. . T. T	A. . . T. T. . C	GAGGCTCG. C	CCT. CTCTCT	. T. - - - A- . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
JR4	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	GAGGCTC-. T	CCT. CTCTCT	. T. - - - A. C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
JR5	C. AG. . . . T	. . . . G. . T. T	- . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - A- - . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
SQ1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
SQ2	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
SQ3	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGTTGC. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
SQ4	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . C	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
SQ5	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
GL1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
GL2	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . T	AGGGCTCG. T	TCC. CTCTCT	. C. CACAA. G	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . T
GL3	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . C	AAGGCTCG. T	TCC. CTCTCT	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . T
GL4	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . C	AGGGCTCG. C	TCC. CTCTCT	. C. CACAG. G	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . T
GL5	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . C	AAGGCTCG. T	TCC. CTCTCT	. C. CACAA. G	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C
GZ1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. TGTGA. C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
GZ2	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . T	AGAGCTCG. C	TCC. CTCTCT	. T. TGTG- . C	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . T
GZ3	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	- . . T. C. . C	AGAGCTCG. C	TTC. CTCTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . T
GZ4	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . C	AGGGCTCG. C	TTC. CTCTCT	. T. TGTGA. C	A. . . . . GGA	. . GG. CT. . T
GZ5	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. C. . C	AAGGCTCG. C	TTC. CTCTCT	. T. TGTGA. C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
DL1	C. AG. . . . C	. . . . G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCG. C	CCT. CTTTCT	. T. TGTGA. C	A. . . . . AGA	. . GG. CC. . C
DL2	T. AG. . . . C	. . . . G. . T. C	C. . . T. . . C	AAGGCTCG. T	TTC. CTCTCT	. T. - - - - . C	A. . . . . GGA	. . GG. CC. . C



续表3

No.	91 ~ 100 bp	151 ~ 160 bp	231 ~ 240 bp	571 ~ 580 bp	591 ~ 600 bp	601 ~ 610 bp	611 ~ 620 bp	731 ~ 740 bp
DL3	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. C. . C	AAGGTTCC. C	TTC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... GGA	.. GG. CT. . T	
DL4	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. C. . C	AAGGTTCC. T	TCC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... GGA	.. GG. CT. . T	
DL5	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. T. . C	AAGGTTCC. C	TCC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... AGA	.. GG. CT. . T	
NJC1	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
NJC2	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AGGGCTCC. T	CCT. CTTTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
NJC3	C. AG. .... C	.... G. . T. T	A. . . T. T. . T	AAGGCTCC. T	CCT. CTCTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CT. . C	
NJC4	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AGGGCTTG. C	CCT. CTTTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
NJC5	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. T	CCT. CTCTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
MAS1	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
MAS2	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. T. . T	AAGGC-CG. C	TCC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... GGA	.. GG. CC. . C	
MAS2	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. T. . C	AAGGC-CG. C	TTC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... GGA	.. AG. CC. . C	
MAS3	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. C. . C	GGGGCTCC. T	TCC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... GGA	.. AG. CC. . C	
MAS4	T. AG. .... C	.... G. . T. C	C. . . T. C. . C	AGGGCTCC. T	TCC. CTCTCT . T. TGTGA. C	A. .... GGA	.. GG. CC. . C	
LY1	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. TGTGA. C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
LY2	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTCTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
LY3	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - - A - C	A. .... AGG	.. GG. CC. . C	
LY4	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - - A - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
LY5	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTCTCT . T. - - - - - C	A. .... AGG	.. GG. TC. . C	
LA1	C. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - - - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
LA2	T. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . C	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - C - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
LA3	T. AG. .... C	.... G. . T. T	-. . . T. T. . T	AGGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - C - - C	G. .... AGA	.. GG. TC. . C	
LA4	T. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - C - - C	A. .... AGA	.. GG. CC. . C	
LA5	T. AG. .... C	.... G. . T. T	C. . . T. T. . T	AAGGCTCC. C	CCT. CTTTCT . T. - - C - - C	G. .... AGA	.. GG. CC. . C	

注: . 相同碱基序列省略; - 碱基缺失序列。

表4 不同种群蚂蟥、水蛭 ITS 碱基含量

碱基频率	ITS					平均碱基数
	T/%	C/%	A/%	G/%	(G+C)%	
江苏建湖 JH	24.72	28.44	17.5	29.32	57.76	860.8
浙江桐乡 TX	24.78	28.44	17.56	29.24	57.68	861.2
江苏句容 JR	25.16	28.22	17.32	29.34	57.56	857.6
江西乐安 LA	25.26	28.22	17.26	29.26	57.48	857.8
桐乡养殖 TXA	25.04	28.44	17.38	29.16	57.6	858
江苏射阳 SY	25.18	28.32	17.28	29.26	57.58	857.6
江苏宿迁 SQ	25.14	28.36	17.32	29.26	57.62	857.2
河北衡水 HS	25.38	28.08	17.32	29.24	57.32	858.2
南京养殖 NJA	25.34	28.08	17.34	29.24	57.32	857.2
广东广州 GZ	25.16	28.26	17.24	29.38	57.64	859.6
广西桂林 GL	24.9	28.38	17.34	29.38	57.76	861.2
云南大理 DL	25.28	28.14	17.28	29.34	57.48	860
江苏大丰 DF	25.3	28.28	17.36	29.2	57.48	857.4
安徽马鞍山 MAS	25.08	28.28	17.2	29.44	57.72	860.6

2.2 蚂蟥和水蛭 ITS 长度和碱基频率分析 所测各种群 ITS 平均长度均在 857.2 ~ 861.2 bp, 统计分析表明 ITS 中各碱基频率都存在显著偏差, 其中 A

含量最低, G 含量最高, (G + C) 平均分别为 57.32% ~ 57.76%, 显著高于其相应的 (A + T) 含量, 见表 4。

2.3 遗传距离和重建系统树 各地区蚂蟥和水蛭的聚类地区内基本呈现一致性, 但也存在多个地区内的变异现象, 见图 1。如广州、桂林、大理出现了基因序列混杂现象, 而广州、桂林地区个别水蛭类群与其他地区蚂蟥聚类在一起的现象, 而同为水蛭类群的马鞍山也有 1 个类群与蚂蟥聚类在一起, 而蚂蟥类群内部的地区之间混杂现象较为明显, 说明水蛭和蚂蟥种群内存在一定的基因流现象。从图 1 还可以看出少量水蛭种群混杂在蚂蟥类群中, 而无蚂蟥类群混杂在水蛭类群的现象。一般认为吸血动物水蛭的进化程度略高于杂食动物蚂蟥, 由此分析认为水蛭种群内存在种群退化现象。

地区间分类明显主要聚类成三大类群。首先广州、大理、桂林、马鞍山、句容、南京人工养殖、衡水、大丰、宿迁等地聚在一起, 然后乐安、射阳、桐乡养

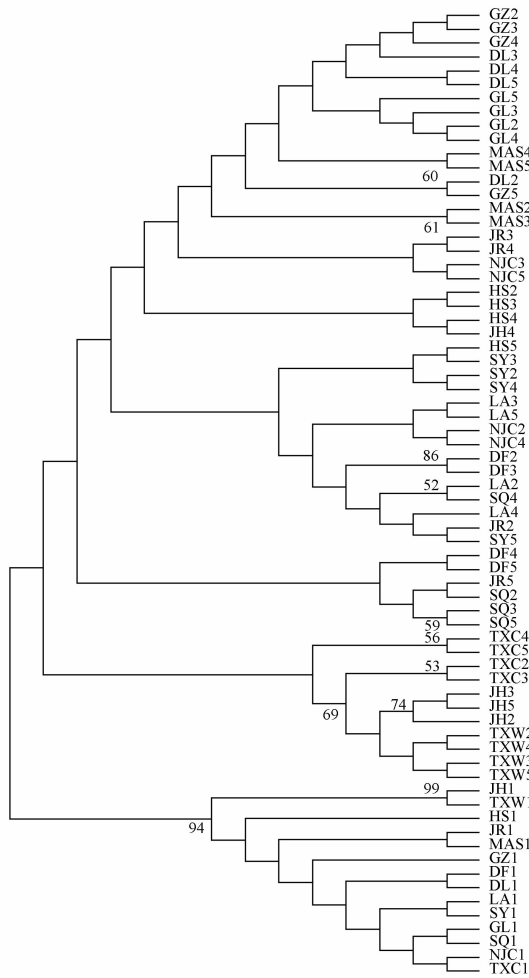


图1 不同地区蚂蟥、水蛭 MP 系统树

殖、浙江桐乡、建湖的蚂蟥聚为一起,最后2支主线才聚在一起。各地区蚂蟥和水蛭之间遗传距离,各地区遗传距离较近,说明蚂蟥与水蛭之间的 ITS 序列较为保守,分化并不十分明显,见表5。

### 3 讨论

**3.1 蚂蟥和水蛭 ITS 序列的遗传多样性** rDNA 在不同物种间存在丰富变异,适用于种以上水平的系统发育和分类鉴定研究,如巨蛤 *Tridacna crocea* 的 ITS1 长约为 270 bp,可变位点为 78 个,多态位点比例高达 28.89%<sup>[15]</sup>;取自澳大利亚沿海和中国南海的 2 个日本对虾 *Penaeus japonicus* 群体的 ITS1 长约 525 bp,群体间分歧度高达 18.1%<sup>[16]</sup>。但是,迄今尚未见到关于 ITS 区在同种蚂蟥不同群体间的研究报道。本研究中 14 个种群的 ITS 区变异位点比例为 5.214%,发生变异一般不会对生命活动产生太大的影响,因而这些变异随着个体的繁衍保留延续至今。但是,其变异位点比例比丁鱕<sup>[13]</sup>和日本对虾<sup>[16]</sup>明显要高,比巨蛤<sup>[15]</sup>的 29% 的变异明显要低,这可能与 ITS1 序列不转录表达有关。

从图 1 中可见,不同种群 ITS 序列存在着种内变异。在本研究中,蚂蟥与水蛭部分种群的被聚为一类,来自不同地区的蚂蟥、水蛭 2 个品种的 rDNA 序列总体一致,同源率达 94.786%,说明 ITS 序列仅与地区差异存在相关性。蚂蟥和水蛭均属于环节动物门 Annelida、蛭纲 Hirudinea、真蛭亚纲 Euhirudinea、无吻蛭目 Arhynchobdellida,前者属于黄蛭科

表5 蚂蟥、水蛭不同群体之间遗传距离

群体	DF	DL	GL	GZ	HS	JH	JR	LA	MAS	NJC	SQ	SY	TXC	TXW
DF	0													
DL	0.016	0												
GL	0.019	0.015	0											
GZ	0.017	0.014	0.016	0										
HS	0.012	0.015	0.017	0.016	0									
JH	0.019	0.023	0.021	0.024	0.019	0								
JR	0.012	0.015	0.017	0.016	0.012	0.018	0							
LA	0.011	0.016	0.018	0.016	0.011	0.019	0.011	0						
MAS	0.015	0.014	0.015	0.014	0.014	0.021	0.013	0.014	0					
NJC	0.012	0.015	0.017	0.016	0.011	0.020	0.011	0.011	0.014	0				
SQ	0.011	0.015	0.017	0.016	0.011	0.017	0.010	0.010	0.014	0.011	0			
SY	0.011	0.016	0.018	0.017	0.011	0.018	0.011	0.010	0.014	0.011	0.010	0		
TXC	0.016	0.021	0.022	0.021	0.017	0.017	0.015	0.015	0.019	0.016	0.014	0.015	0	
TXW	0.022	0.027	0.025	0.027	0.023	0.014	0.022	0.021	0.025	0.022	0.020	0.021	0.017	0

Haemopidae、金线蛭属 *Whitmania*, 后者属于医蛭科 Hirudinidae, 医蛭属 *Hirudo*。不同科属的物种其 rDNA

保持高度一致,由此可以推断为各种群的 ITS 保守区序列应完全一致,仅受地区影响存在少量变异。



### 3.2 蚂蟥资源保护利用策略

本研究通过 ITS 序列分析,结果表明不同地区间蚂蟥和水蛭种内变异类型较多。这为蚂蟥和水蛭资源的保护和核心种质资源库的建立提供了依据。优先保护群体内遗传多样性丰富的种群,其次是遗传距离较远的种群,再次是特殊类型种群。此外,通过调查和整理,通过系统评价从中发现并选育出优良品质、相对稳定的中药材优良品种。因此在分析蚂蟥遗传多样性基础上还须进一步对其质量进行评价,包括蚂蟥真伪鉴别,主要经济性状比较,安全性评价特别是药理性评价等诸多方面。

#### [参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005:57.  
[2] Nikonov G I, Titova E A, Seleznev K G. A stable prostacyclin like substance produced by the medicinal leech *Hirudo medicinalis*[J]. Prostag Other Lipid Mediat, 1999, 58(1):1.  
[3] Shen D W, Lu Q W, Wang L, et al. Ultrastructure of electrical synapses between nociceptive and anterior pagoda neurons in the CNS of the leech (*Whitmania pigra*) [J]. Invert Neurosci, 2002, 4(4):193.  
[4] 史红专,刘飞,郭巧生. 蚂蟥耗氧率与窒息点的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(23):1817.  
[5] 史红专,刘飞,郭巧生. 温度对蚂蟥生长及摄食规律影响的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1944.

[6] 郭巧生,刘飞,史红专. 水蛭及其养殖基地农药与重金属残留分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21):1763.  
[7] 刘飞,史红专,郭巧生,等. 蚂蟥内脏器官和皮肤的组织结构观察[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22):1849.  
[8] 史红专,刘飞,郭巧生. 温度和体重对蚂蟥人工繁殖影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24):2030.  
[9] 史红专,郭巧生,刘飞,等. 野生和人工养殖蚂蟥不同炮制品内在质量的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24):2657.  
[10] 史红专,郭巧生,陆树松,等. 不同月龄蚂蟥内在品质及最佳采收期研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23):3060.  
[11] Beauchamp K A, Powers D A. Sequence variation of the first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA in ahermatypic corals from California[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1996, 5(4):357.  
[12] 张君毅,郭巧生,吴丽伟,等. 我国不同地区半夏 rDNA 序列分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21):1768.  
[13] 凌去非,李思发,张海军,等. 丁鱕不同群体 ITS1 区序列分析[J]. 水利渔业, 2006, 26(6):24.  
[14] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual. [M]. 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 667.  
[15] Eizadora T Y, Antonette J M, Virginia D M. Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Tridacna crocea* [J]. Mar Biotechnol, 2000, 2(6):511.  
[16] Chu K H. The first internal transcribed Spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea[J]. Mar Biotechnol, 2001, 3(4):355.

## Analysis of genetic differentiation and phylogenetic relationship between *Whitmania pigra* and *Hirudo nipponia* based on ITS sequence

LIU Fei<sup>1,2</sup>, GUO Qiaosheng<sup>1</sup>, SHI Hongzhan<sup>1\*</sup>, WANG Tian<sup>2</sup>, LU Shusong<sup>3</sup>

(1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;  
2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China  
3. Heshan Xinlong Special Leech Breeding Center, Tongxiang 314512, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the genetic differentiation and phylogenetic relationship between *Whitmania pigra* Whitman and *Hirudo nipponia* Whitman. **Method:** By the sequences of the rDNA internal transcribed spacer (ITS) the molecular phylogenetic tree was constructed by MP method using software MEGA 4.0. **Result:** The average length of ITS was 857.2-861.2 bp. The A, T, G and C contents in this fragment were 25.12%, 28.28%, 17.34%, 29.29%, respectively. The GC content was higher than the AT content. Little sequence variation was observed in ITS gene fragments with in species, and transition in only 45 loci was revealed in 14 populations. 14 *W. pigra* and *H. nipponia* populations were clustered into 2 groups by MP phylogenetic tree. **Conclusion:** The results also showed that the intraspecific variation was dominated in variation types of *W. pigra* and *H. nipponia*. The classification result of *W. pigra* and *H. nipponia* and its adulterants based on DNA sequences are not totally consistent with those based on classification. It showed that a little of mutation of base in ITS sequences had occurred in the process of evolution, such as transition cites, transversion cites among base or base gap.

[Key words] *Whitmania pigra*; *Hirudo nipponia*; ribosomal DNA; ITS; phylogenetic relationship

doi:10.4268/cjcm20110407