

# 三肠目涡虫(*Tricladida*)中常用的分子标记及研究进展

王磊<sup>1,2</sup>,董自梅<sup>1</sup>,陈广文<sup>1</sup>,刘德增<sup>1</sup>

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.新乡学院 医学院,河南 新乡 453000)

**摘要:**介绍了三肠目涡虫研究中常用的分子标记,以及这些标记基因在 DNA 条形码、分子系统发育、遗传多样性、种群历史动态和系统地理学等方面的研究进展,并展望了这些分子标记在三肠目涡虫研究中的应用前景以及研究热点。目前,核糖体 18S、28S、ITS-1 与线粒体基因 COI 是三肠目涡虫研究中最常用的标记基因,18S、28S 常与 COI、ITS-1 联合构建序列用于分析种间进化关系。COI、ITS-1 作为 DNA 条形码常用于新物种分类学研究,此外还广泛用于遗传多样性、种群历史动态等相关研究。

**关键词:**三肠目涡虫;分子标记;DNA 条形码;遗传多样性;分子系统发育

**中图分类号:**Q953

**文献标志码:**A

涡虫纲隶属于扁形动物门,根据其消化系统与生殖系统的特点,可分为 11 或 12 个目。目前涡虫类动物被划分为被杆体纲(Rhabditophora)与链虫纲(Catenulida)<sup>[1-2]</sup>,其中三肠目涡虫属被杆体纲,分布比较广泛,全球共记录 12 科 128 属 300 余种。我国关于三肠目涡虫的分类、生态及进化研究基础较为薄弱,刘德增自 20 世纪 80 年代开始对我国淡水三肠目涡虫资源开展调查并发现了多个新物种<sup>[3-4]</sup>。随后,陈广文团队从形态学、分类学、毒理学、细胞遗传学、分子系统学、进化生物学和再生生物学等方面探讨了我国淡水涡虫的起源、演化和再生的分子机理<sup>[5-10]</sup>。关于我国淡水涡虫资源的研究,目前主要集中在形态学和核型分析<sup>[11]</sup>,利用分子标记基因开展遗传多样性、谱系地理学等研究较少,仅有利用 18S rDNA、COI 等基因对三肠目涡虫的分子系统学进行的初步研究<sup>[12]</sup>。本文就三肠目涡虫系统进化研究中常用的分子标记基因及其研究进展进行综述,以为科研工作者开展相关研究提供参考。

## 1 线粒体基因组

线粒体基因组广泛用于各种动物的遗传及进化研究,其主要特点为:①广泛存在于动物细胞中;②易于确定物种同源关系;③遗传结构简单;④母系遗传方式,多数无重组及其他遗传重排现象;⑤相对于核基因进化速率较快。近年来,线粒体基因组中细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(cytochrome c oxidase subunit I, COI)、细胞色素氧化酶 b 基因(Cytochrome b, Cyt b)、16S rRNA 等基因在系统发育、遗传多样性、谱系地理学研究中应用广泛。

### 1.1 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因

COI 在物种界定和识别方面广泛应用,被视为 DNA 条形码。研究表明:在许多动物类群中运用该基因能够成功地进行物种鉴定。由于目前涡虫物种鉴定主要依赖于生殖器官的特点,因此需要性成熟个体,从而导致许多无性种群无法识别<sup>[13-14]</sup>。为了解决这个问题,LÁZARO 等<sup>[15]</sup>对地中海区域淡水三肠目涡虫的研究发现,COI 种内遗传距离小于 0.04,而种间遗传距离大于 0.1,从而为三肠目涡虫无性个体物种鉴定提供了方便快捷的方法。随后,多位研究者利用 COI 作为 DNA 条形码对不同种类三肠目涡虫进行了物种鉴定:

收稿日期:2019-07-16;修回日期:2021-03-16.

基金项目:国家自然科学基金(32070427;31570376;31471965;U1604173);河南省重大公益性项目(201300311700).

作者简介:王磊(1984—),男,河南新乡人,河南师范大学博士研究生,研究方向为淡水涡虫资源与保护,E-mail:wangleixx@163.com.

通信作者:陈广文,教授,博士生导师,E-mail:chengw@sina.com.

LÁZARO 等<sup>[16]</sup>利用 COI 对地中海地区三角涡虫(*Dugesia sicula*)的无性三倍个体进行了物种鉴定;ÁLVAREZ-PRESAS 等<sup>[17]</sup>利用 COI 对伊比利亚半岛的 *Microplana terrestris* 无性个体进行了物种鉴定;*D. sicula* 和 *D. biblica* 在形态学上很难区分,但 SOLÁ 等<sup>[18]</sup>利用 COI 成功鉴定出了分布于以色列和土耳其的 *D. biblica*.最初,由于技术原因导致扩增较长的 COI 片段存在困难,早期获取的 COI 片段多数在 400 bp 左右,但 ALESSANDRO 等<sup>[19]</sup>研究巴西西南部涡虫时发现,当 COI 长度大于 600 bp 时才能有效地反映出 *Obama* 属的种间差异,因此在利用 COI 作为条形码研究中应使用较长片段.目前,COI 作为 DNA 条形码,已经广泛应用于三肠目涡虫无性个体的物种鉴定,并极大地推动了三肠目涡虫相关研究.

此外,COI 也广泛应用于种群历史动态研究.ÁLVAREZ-PRESAS 等<sup>[20]</sup>利用 COI 分析了巴西热带雨林中两种陆生涡虫的种群历史动态,发现这两个物种具有很高的遗传变异性,没有表现出种群扩张痕迹,处于一个长期的稳定状态.2013 年,LÁZARO 等<sup>[16]</sup>利用 COI 分析了地中海地区 58 个产地 *D. sicula* 的单倍型,发现在地中海地区 *D. sicula* 很可能起源于非洲,从地中海中部逐步扩散到整个地中海区域.在此过程中,*D. sicula* 由一个或多个种群变成三倍体并进行无性生殖,然后完成了在地中海区域的种群扩张.在种群扩张的过程中,除了其自身的无性生殖优势,人类的活动也起到了重要作用.RADER 等<sup>[21]</sup>在美国犹他州的瓦萨奇山脉 4 个淡水水域中的 50 个地点采集到 *Polycelis coronata* 共计 468 个样本,扩增其 COI 并进行分析,发现其种群扩散非常缓慢,这个结果与栖息地稳定假说是一致的.综上所述,COI 能够较好地反映出一个物种在某个地理区域种群起源、迁移及扩散的历程.

COI 除了作为三肠目涡虫的 DNA 条形码进行物种鉴定和分析种群历史动态以外,还常应用于分类地位、物种多样性及系统发育关系等研究.在进行这些研究时,可以单独用 COI 构建系统进化树,但多数情况下,要与 18S rDNA、28S rDNA、ITS-1 等基因的联合序列进行综合分析.例如,CHEN 等<sup>[22]</sup>单独利用 COI 构建 NJ 树和 ML 树,其拓扑结构都较好地分子系统发育的角度证明了 *D. sinensis* 属于三角涡虫属的一个特有种.MORFFE 等<sup>[23]</sup>在古巴发现一种陆生涡虫,形态学分析表明该物种属于 *Bipalium kewense*,利用 COI 构建 ML 树发现分布于古巴的 *B. kewense* 与分布于西班牙、葡萄牙的 *B. kewense* 聚为一支,且后验概率为 0.99,很好地支持了其拓扑结构的可靠性.LERIA 等<sup>[24]</sup>利用 COI 和 28S 研究古北区西部 *Schmidtea* 的多样性和生物地理学关系时发现,COI 联合 28S rDNA 构建的系统发育树较好地支持了核型分析假说,即染色体重排是 *Schmidtea* 物种形成的主要驱动因素.*Schmidtea* 属的 4 个物种具有较高的遗传分歧,结合前期研究和其现有分布状况,LERIA 又推断出 *Schmidtea* 可能起源于劳亚古大陆,但在经历渐新世纪时逐步失去了其遗传多样性,在更新世冰期之后 *Schmidtea* 的 3 个物种再次发生扩张,形成了其现有的地理分布格局.这些研究表明 COI 是三肠目涡虫研究中常用且应用广泛的分子标记基因.可用于种群历史动态、谱系地理学、遗传多样性和系统分类等方面研究.

### 1.2 细胞色素氧化酶 b 基因

Cyt *b* 常作为 DNA 条形码,用于种群历史动态、谱系地理学、遗传多样性和系统分类等研究.但是在三肠目涡虫中运用 Cyt *b* 进行分子系统发育研究的报道较少.2011 年 LÁZARO 等<sup>[25]</sup>在研究 *S. mediterranea* 生物地理学关系时,分析了 200 个样本的 Cyt *b*,得到了 10 种单倍型,通过与 COI 和 N13(Netrin 受体样蛋白的第 13 区域内含子基因)的联合分析发现,*S. mediterranea* 是一个古老的物种,由科西嘉岛和撒丁岛扩散到其他区域,并且无性种群正逐步取代有性种群成为优势种群.但是由于 Cyt *b* 进行 PCR 扩增时难度较大,LÁZARO 在此次实验中扩增出的 Cyt *b* 只有 677 bp,相较于其他物种的片段长度较短.因此 Cyt *b* 在三肠目涡虫的研究中属于尚未完全开发的分子标记基因,在今后的研究中可以深入发掘其在 DNA 条形码、种群历史动态、谱系地理学等研究中的应用.

### 1.3 16S rRNA 基因

16S rDNA 序列长度约为 1 500 bp,分子大小适中,是细菌分类系统研究中最常用的分子标记基因,但在三肠目涡虫中研究中应用较少.2007 年 ÁLVAREZ-PRESAS 等<sup>[26]</sup>试用 16S rDNA 作为新的分子标记研究三肠目涡虫的分子系统发育.他从 9 种陆生涡虫中扩增出 16S rDNA,分析发现存在变异过多,并不适用于陆生涡虫分子系统发育研究.2017 年,RIESGO 等<sup>[27]</sup>从 10 个产地 84 个 *Bdelloura candida* 样本中分别获取了 346 bp 的 16S rDNA,得到了 11 个单倍型,结合 ITS-2 基因序列,探讨了 *B. candida* 种群的系统地理和

种群遗传关系,发现由于哈特拉斯角和科德角这两个屏障限制了种群基因流动,大西洋和墨西哥湾沿岸的种群之间有明显而强烈的遗传断裂.RIESGO的实验证明了16S rDNA也可用于研究营寄生生活的三肠目涡虫的谱系地理学,但是否也适于其他营自由生活的种类还有待于进一步研究.鉴于16S rDNA在其他物种分子系统发育研究中具有重要作用,可尝试逐步开展16S rDNA在三肠目涡虫研究中的应用.

## 2 核基因组

核基因与线粒体基因相比通常进化速率较低,且存在多拷贝现象.但核基因组的核糖体相关基因不同区域进化速率不同,18S rRNA、28S rRNA、ITS基因常用于分子系统发育研究.此外人们也在探索其他核基因,例如延伸因子-1 $\alpha$ (Elongation factor-1 $\alpha$ ,EF-1 $\alpha$ )基因在系统发育、遗传多样性、谱系地理学研究中的应用.

### 2.1 18S rRNA 基因

18S rDNA在三肠目涡虫研究中应用较早.1996年CARRANZA等<sup>[28]</sup>从*S. mediterranea*核基因组中扩增出18S rDNA,并发现了2种类型的18S rDNA,分别是I型和II型,只有I型能转录为RNA,通过构建NJ树分析发现,I型和II型经历了不同分化过程,II型较早从扁涡虫科和枝肠涡虫科分化出来.CARRANZA等<sup>[29]</sup>利用18S rDNA对海洋涡虫、淡水涡虫、洞穴涡虫和陆生涡虫之间的进化关系进行了研究,发现陆生涡虫的祖先来自于淡水涡虫,其后很少有单独利用18S rDNA研究三肠目涡虫系统分类的报道,大多使用多种基因联合分析.如SLUYS等<sup>[30]</sup>使用18S rDNA和COI联合序列构建了贝叶斯树,并运用GMYC法建树分析了地中海地区淡水涡虫的系统进化关系,发现其进化结果与形态学结果一致,并可用于某些隐藏物种的分析鉴定.HARRATH<sup>[31]</sup>用18S rDNA与COI序列联合构建的贝叶斯树和最大似然树拓扑结构相同,说明了洞穴涡虫和陆生涡虫、淡水涡虫没有直接联系,但是洞穴涡虫和海洋涡虫是姊妹群关系.近年来,18S rDNA基因也逐渐应用于其他领域,例如,文献<sup>[32]</sup>用18S rDNA和COI分析了37个采集于阿尔卑斯山的*Crenobia alpina*种群,遗传多样性分析表明:*C. alpina*在该区存在5个地理基因类群,超过10个遗传谱系.由于阿尔卑斯山地区的造山运动以及高海拔栖息地影响,使*C. alpina*成为多种隐藏物种的复合体.综上,18S rDNA最初的应用范围主要集中于系统分类的研究,而后逐渐与其他基因联合用于系统进化及种群多样性分析.

### 2.2 28S rRNA 基因

28S rDNA也是一个常用的核糖体基因.学者们最早主要运用28S rDNA探讨三肠目涡虫间的进化关系,随着研究的深入,人们开始使用新的核基因来研究物种的系统发育关系.文献<sup>[33]</sup>运用18S rDNA和COI等基因进行分析时,常常发现无法反映某些种类之间的进化关系,随后尝试用28S rDNA.最终运用18S rDNA+28S rDNA+COI联合序列构建的进化树较好地解决了这些问题,并且发现淡水涡虫和陆生涡虫经历了从淡水到陆地再到淡水的进化过程.CHARBAGI-BARBIROU等<sup>[33]</sup>用18S rDNA+28S rDNA联合序列构建最大似然树,分析*Marine triclads*分类地位和系统发育关系,结果提示18S rDNA+28S rDNA较好地弥补了形态分类学的不足.KHANG等<sup>[34]</sup>使用COI+ITS-1+28S rDNA联合序列构建最大似然树分析了东南亚两种洞穴涡虫的分子系统发育地位,发现一种洞穴涡虫*D. batuensis*和淡水琉球三角涡虫*D. ryukyuensis*享有共同祖先,并且发现分布于澳大利亚的*D. notogaea*起源于东南亚.MAZZA等<sup>[35]</sup>对发现于欧洲的一种陆生涡虫*Diversibipalium multilineatum*单独使用28S rDNA构建的贝叶斯树进行分析时发现:意大利的*D. multilineatum*可以与日本、韩国的种群聚为一支,其拓扑结构较好地支持了形态学结果.研究表明,28S rDNA可以联合其他基因用于探讨三肠目涡虫的分类地位和系统发育关系,但还未应用到其他方面,如遗传多样性、种群历史动态等研究.

### 2.3 ITS 基因

ITS分为ITS-1(Internal transcribed spacer-1)和ITS-2(Internal transcribed spacer-2).其中ITS-1是18S rDNA与5.8S rDNA间的内转录1区;ITS-2是5.8S rDNA与28S rDNA间的内转录2区.由于ITS在进化过程中承受的自然选择压力较小,因此存在更多变异,可以为系统发育分析提供更多遗传性状,在动物系统发育研究中应用广泛.

### 2.3.1 ITS-1 基因

ITS-1 是三肠目涡虫分子标记基因中研究较早的基因.早在 1999 年,BAGUNÀ 等<sup>[36]</sup>为了解决三角涡虫属无性种群的物种鉴定问题,分析了这个属内 20 个物种的 ITS-1,构建了 NJ 树,其拓扑结构能够将所有的无性种群分配到特定的有性种群中.2009 年,LÁZARO 等<sup>[15]</sup>研究发现地中海地区的三角涡虫 ITS-1 种内遗传距离小于 0.03.2013 年,SOLÀ 等<sup>[37]</sup>对爱琴海地区三角涡虫属的种间遗传距离进行了研究,发现 COI 和 ITS-1 拓扑学结构一致,但在这个区域 COI 的种间遗传距离小于 0.027,而 ITS-1 的种间遗传距离小于 0.002,与 LÁZARO 的研究结果有明显的差异.STOCCHINO 等<sup>[38]</sup>在研究马达加斯加淡水三角涡虫时,对运用 COI 和 ITS-1 序列得到的遗传距离进行了分析,发现在该区域 COI 种间遗传距离和种内遗传距离均大于运用 ITS-1 所得到的结果.以上研究表明:ITS-1 能够厘定三角涡虫种间差异,将无性种群分配到特定有性种群中.但有些物种间的 ITS-1 差异无法显示,而 COI 却能很好地反映出他们之间的区别,这也许是 ITS-1 至今没有作为 DNA 条形码广泛应用于三肠目涡虫的物种鉴定的原因,而是作为一个辅助基因参与物种的分类鉴定.

此外,ITS-1 也常用于系统地理学、遗传多样性及系统发育关系等研究.SOLÀ 等<sup>[37]</sup>运用 COI+ITS-1 联合序列构建的贝叶斯树清晰地展示了爱琴海地区三角涡虫属不同种群间的遗传谱系关系和地理分布格局.LEMOS 等<sup>[39]</sup>用 ITS-1 构建了贝叶斯树,同时用 COI 构建最大似然树,分析了从巴西南部采集的 11 个陆生涡虫物种间的系统发育关系,与形态学结果分析一致并且可以识别某些物种的无性个体,表明在研究某些特定物种时 ITS-1 比 COI 更适用.

### 2.3.2 ITS-2 基因

ITS-2 在三肠目涡虫研究中起步较晚.RIESGO 等<sup>[27]</sup>用 ITS-2 和 16S rDNA 分析了美国大西洋沿岸营寄生生活的 *B. candida* 种群历史动态.两种基因都得到了 11 种单倍型,但 ITS-2 在大多数种群中单倍型间的分化差异要大于 16S rDNA,并发现大西洋和墨西哥湾沿岸种群之间有明显而强烈的遗传断裂.但 ITS-2 是否也适用于其他营自由生活的三肠目涡虫还需进一步探索.

综上,ITS 也属于一个热点研究基因.ITS-1 在三肠目涡虫分子系统发育研究中使用较早,适用研究内容较广泛;ITS-2 近些年才开始作为分子标记基因应用于三肠目涡虫的研究,其适用性还有待继续揭示.

## 2.4 延伸因子-1 $\alpha$ 基因

EF-1 $\alpha$  相对保守,但存在一些进化速度比较快的区域,目前已广泛应用于细菌和昆虫的分子鉴定及系统发育研究.CARBAYO 等<sup>[40]</sup>成功扩增出巴西热带区域多种陆生涡虫的 EF-1 $\alpha$  编码区序列(约 614 bp),并结合 COI、18S rDNA、28S rDNA 序列联合分析了这些陆生涡虫的系统发育关系,从分子发育角度将这些物种的系统发育关系进行了划分.MATEOS 等<sup>[41]</sup>为了研究欧洲区域 *Microplana* 属的涡虫,采集了多个产地的样本,利用 EF-1 $\alpha$ 、COI、18S rDNA、28S rDNA 联合序列建树,根据其拓扑结果重新划分了这个属的物种,并与利用这四个基因分别单独构建的最大似然树相互佐证.目前研究表明 EF-1 $\alpha$  不仅用于分类地位和系统发育研究,其还有更广阔的研究应用空间.

## 3 其他基因

除了这些常见的保守基因外,人们也探索其他基因作为三肠目涡虫的分子标记基因.例如糖原合成酶 3 (Glycogen synthase kinase 3, GSK-3)的内含子基因和 Netrin 受体样蛋白(Netrin receptor-like protein)的第 13 区域内含子基因(N13).LÁZARO 等<sup>[25]</sup>尝试扩增 N13 和 GSK-3 的内含子片段,对于前者而言 PCR 扩增较难,只得到了 336 bp 的内含子片段,分析发现 N13 在某些个体中具有杂合现象,并且只适用于种群历史动态分析而不适用于系统发育关系研究.后者只得到了约 50 bp 的片段,无法用于研究分析.

关于 ATP 酶  $\alpha$  亚基(ATPase-alpha, ATPase- $\alpha$ )基因,CARBAYO 等<sup>[40]</sup>在研究中尝试从巴西热带区域的陆生涡虫样本中扩增 ATPase- $\alpha$ ,但发现其难以扩增,只从少数样本中成功扩增出该序列,并发现这些序列高度保守,不适用于分子系统发育分析.

12S rRNA 基因和组蛋白 3 基因(Histone gene 3, H3)都是高度保守的基因,都存在可变区域,适用于研

究物种间的发育关系.ÁLVAREZ-PRESAS等<sup>[26]</sup>针对陆生和淡水三肠目涡虫的12S rDNA和H3,设计了引物,尝试利用其探讨三肠目涡虫系统发育关系,但尝试了多种试验条件都未能扩增出有效序列.

## 4 总结与展望

伴随分子生物学技术的迅猛发展,分子标记基因越来越多地应用于涡虫物种多样性、谱系地理学和系统发育等研究领域,有效地解决了许多困扰涡虫研究的问题,如无性个体物种鉴定困难、形态学分类指标单一等问题.对于地中海地区、非洲、美洲的三肠目涡虫无性种群COI和ITS-1都可以起到DNA条形码的作用.COI比ITS-1更好地反映出种间的差异,适用范围更广,是目前常用的三肠目涡虫DNA条形码.但在东亚地区这两种DNA条形码的适用性还有待验证.通过对上述多位学者研究结果的分析,建议使用片段长度大于600 bp的COI作为DNA条形码,且采用严格的鉴定标准进行分析.对于三肠目涡虫无性种群,其种内遗传距离应小于0.027,种间遗传距离应大于0.1.COI、ITS、Cyt *b* 由于进化速率较快,常用于种群历史动态的研究,但Cyt *b* 存在扩增困难的问题.18S rDNA,28S rDNA进化速率较慢,目前常与COI、ITS-1一起构建3至4个基因的联合序列,用于分析系统分类地位、遗传多样性和谱系地理学等问题.从已有的实验分析中发现<sup>[14,25,30]</sup>,多个核基因与线粒体基因的联合分析可以较好地反映出物种间的进化关系.使用多个DNA条形码的鉴定结果,往往比使用单个DNA条形码的结果准确.因此在研究中应选取多个标记基因联合分析,确保实验结果的准确性.除此之外,16S rDNA,EF-1 $\alpha$ ,N13,T-DNA等基因也见于谱系地理学、系统分类和遗传多样性研究.由于目前的研究多局限于某些特定的种属,这几种基因的适用性还有待进一步探讨.由于12S rDNA,H3,ATPase- $\alpha$ ,GSK-3等基因存在PCR难扩增或序列保守性等问题,目前并不适用于三肠目涡虫的研究.而细胞色素氧化酶II基因、微卫星DNA等目前尚未报道,这是今后研究中需要关注的区域.

总之,我国幅员辽阔,地质类型众多,气候环境多变,涡虫的地理分布格局从经度、纬度到温度、海拔等都有着巨大差异,为研究三肠目涡虫遗传多样性、谱系地理学和进化生物学等提供了广阔空间.因此可以尝试从适应性进化入手,选取合适的基因,研究三肠目涡虫物种之间分化以及导致其地理分布格局差异的原因.

## 参 考 文 献

- [1] 陈广文,陈晓虹,刘德增.中国涡虫纲分类学研究进展[J].水生生物学报,2001,25(4):406-412.  
CHEN G W, CHEN X H, LIU D Z. Advances in the study of Turbellaria in China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(4): 406-412.
- [2] ÇINAR M E. Checklist of the phyla Platyhelminthes, Xenacoelomorpha, Nematoda, Acanthocephala, Myxozoa, Tardigrada, Cephalorhyncha, Nemertea, Echiura, Brachiopoda, Phoronida, Chaetognatha, and Chordata (Tunicata, Cephalochordata, and Hemichordata) from the coasts of Turkey[J]. Turkish Journal of Zoology, 2014, 38(6): 698-722.
- [3] 刘德增.树枝肠科涡虫和细形山地涡虫在中国首次发现[J].动物分类学报,1990(1):124-127.  
LIU D Z. On the discovery of the family Dendrocoelidae and *Phagocata Vivida* from China[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1990(1): 124-127.
- [4] 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)[J].动物分类学报,1996(4):389-398.  
LIU D Z. Notes on four new species of the genus *Polycelis* from China[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1996(4): 389-398.
- [5] DONG Z M, YANG T, YANG Y B, et al. DjhnRNPA2/B1-like gene is required for planarian regeneration and tissue homeostasis[J]. Gene, 2017, 633: 9-16.
- [6] DONG Z M, YUWEN Y Q, SIMA Y X, et al. Photokinesis and Djopsin gene expression analysis during the regeneration of planarian eyes[J]. Integrative Zoology, 2017, 12(2): 157-164.
- [7] DONG Z M, CHEN G W, ZHANG H C, et al. A new species of *Polycelis* (Platyhelminthes, Tricladida, Planariidae) from China[J]. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 2017, 63(3): 263-276.
- [8] ZHANG H C, LIU T Y, SHI C Y, et al. Genotoxicity evaluation of an urban river on freshwater planarian by RAPD assay[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 98(4): 484-488.
- [9] DONG Z M, YANG Y B, CHEN G W, et al. Identification of runt family genes involved in planarian regeneration and tissue homeostasis[J]. Gene Expression Patterns, 2018, 29: 24-31.
- [10] DONG Z M, CHU G B, SIMA Y X, et al. *Djhs90s* are crucial regulators during planarian regeneration and tissue homeostasis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 498(4): 723-728.
- [11] CHEN G W, WANG Y L, WANG H K, et al. Chromosome and karyotype analysis of *Polycelis wutaishanica* (Turbellaria, Tricladida)

- from Shanxi province, China[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2008, 33(3): 449-452.
- [12] 张合彩, 陈广文, 孙健, 等. 云南省日本三角涡虫不同地理种群 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(3): 131-135.
- ZHANG H C, CHEN G W, SUN J, et al. Sequence Analysis of mtDNA COI Gene and Phylogeny of Different Geographical Populations of *Dugesia japonica* in Yunnan Province[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(3): 131-135.
- [13] ARAUJO A P, CARBAYO F. A new species of the land planarian *Issoca* sheds light on the polyphyletic status of the genus (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae)[J]. *ZooKeys*, 2018, 752: 1-15.
- [14] SLUYS R, VILA-FARRÉ M, RINK J, et al. An intriguing, new planarian species from Tasmania, with a discussion on protandry in triclad flatworms (Platyhelminthes, Tricladida)[J]. *Acta Zoologica*, 2018, 99(4): 406-414.
- [15] LÁZARO E M, SLUYS R, PALA M, et al. Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae)[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2009, 52(3): 835-845.
- [16] LÁZARO E M, RIUTORT M. *Dugesia sicula* (Platyhelminthes, Tricladida): the colonizing success of an asexual Planarian[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13(1): 268.
- [17] ÁLVAREZ-PRESAS M, MATEOS E, VILA-FARRÉ M, et al. Evidence for the persistence of the land planarian species *Microplana terrestris*, (Müller, 1774) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2012, 64(3): 491-499.
- [18] SOLÀ E, SLUYS R, SEGEV O, et al. The taxonomic status of *Dugesia biblica* from Israel and Turkey (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae)[J]. *Zookeys*, 2017(506): 1-12.
- [19] MARQUES A, ROSSI I, VALIATI V H, et al. Integrative approach reveals two new species of *Obama* (Platyhelminthes; Tricladida) from the South-Brazilian Atlantic Forest[J]. *Zootaxa*, 2018, 4455(1): 99-126.
- [20] ÁLVAREZ-PRESAS M, CARBAYO F, ROZAS J, et al. Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2011, 24(4): 887-896.
- [21] RADER R B, UNMACK P J, MOORE J N. Population genetics and dispersal of the flatworm, *Polycelis coronata*: a test of the habitat stability hypothesis[J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2016, 32(1): 1-14.
- [22] CHEN Y H, CHEN X M, WU C C, et al. A new species of the genus *Dugesia* (Tricladida; Dugesidae) from China[J]. *Zoological Systematics*, 2015, 40(2): 166-178.
- [23] MORFFE J, GARCÍA N, ADAMS B J, et al. First record of the land planarian *Bipalium kewense* Moseley, 1878 (Tricladida; Geoplanidae; Bipaliinae) from Cuba[J]. *Bioinvasions Records*, 2016, 5(3): 127-132.
- [24] LERIA L, SLUYS R, RIUTORT M. Diversification and biogeographic history of the Western Palearctic freshwater flatworm genus *Schmidtea* (Tricladida; Dugesidae), with a redescription of *Schmidtea nova* [J]. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*, 2018, 56(3): 335-351.
- [25] LÁZARO E M, HARRATH A H, STOCCHINO G A, et al. *Schmidtea mediterranea* phylogeography: an old species surviving on a few Mediterranean islands? [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11(1): 274.
- [26] ÁLVAREZ-PRESAS M, BAGUÑÀ J, RIUTORT M. Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2008, 47(2): 555-568.
- [27] RIESGO A, BURKE E A, LAUMER C, et al. Genetic variation and geographic differentiation in the marine triclad *Bdelloura candida* (Platyhelminthes, Tricladida, Maricola), ectocommensal on the American horseshoe crab *Limulus polyphemus* [J]. *Marine Biology*, 2017, 164(5): 111.
- [28] CARRANZA S, GIRIBET G, RIBERA C, et al. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida)[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 1996, 13(6): 824-832.
- [29] CARRANZA S, RUIZ-TRILLO I, LITTLEWOOD T J, et al. A reappraisal of the phylogenetic and taxonomic position of land planarians (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) inferred from 18S rDNA sequences[J]. *Pedobiologia*, 1998, 42(5): 433-440.
- [30] SLUYS R, SOLÀ E, GRITZALIS K, et al. Integrative delineation of species of Mediterranean freshwater planarians (Platyhelminthes; Tricladida; Dugesidae)[J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2013, 169(3): 523-547.
- [31] HARRATH A H, MANSOUR L, LAGNIKA M, et al. A molecular analysis of the phylogenetic position of the suborder Cavernicola within the Tricladida (Platyhelminthes), with the description of a new species of stygobiont flatworm from Benin[J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2016, 178(3): 482-491.
- [32] BRÄNDLE M, SAUER J, OPGENOORTH L, et al. Genetic diversity in the Alpine flatworm *Crenobia alpina* [J]. *Web Ecology*, 2017, 17(2): 29-35.
- [33] CHARBAGI-BARBIROU K, ÁLVAREZ-PRESAS M, VILA-FARRÉ M, et al. Marine triclads (Platyhelminthes, Tricladida, Maricola), a

preliminary molecular approach to their phylogeny[J].Cahiers De Biologie Marine,2011,52(3):303-311.

- [34] KHANG T F, TAN S H, PANHA S, et al. Molecular phylogenetics and sequence analysis of two cave-dwelling *Dugesia* species from Southeast Asia (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesidae) [J]. Raffles Bulletin of Zoology, 2017, 65: 515-524.
- [35] MAZZA G, MENCHETTI M, SLUYS R, et al. First report of the land planarian *Diversibipalium multilineatum* (Makino & Shirasawa, 1983) (Platyhelminthes, Tricladida, Continenticola) in Europe [J]. Zootaxa, 2016, 4067(5): 577-580.
- [36] BAGUÑÀ J, CARRANZA S, PALA M, et al. From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi [J]. Italian Journal of Zoology, 1999, 66(3): 207-214.
- [37] SOLÀ E, SLUYS R, GRITZALIS K, et al. Fluvial basin history in the northeastern Mediterranean region underlies dispersal and speciation patterns in the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae) [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2013, 66(3): 877-888.
- [38] STOCCHINO G A, SLUYS R, RIUTORT M, et al. Freshwater planarian diversity (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesidae) in Madagascar: new species, cryptic species, with a redefinition of character states [J]. Zoological Journal of the Linnean Society, 2017, 181(4): 727-756.
- [39] LEMOS V S, CAUDURO G P, VALIATI V H, et al. Phylogenetic relationships within the flatworm genus *Choeradoplana* Graff (Platyhelminthes: Tricladida) inferred from molecular data with the description of two new sympatric species from Araucaria moist forests [J]. Invertebrate Systematics, 2014, 28(6): 605-627.
- [40] CARBAYO F, ÁLVAREZ-PRESAS M, OLIVARES C T, et al. Molecular phylogeny of Geoplaninae (Platyhelminthes) challenges current classification: proposal of taxonomic actions [J]. Zoologica Scripta, 2013, 42(5): 508-528.
- [41] MATEOS E, SLUYS R, RIUTORT M, et al. Species richness in the genus *Microplana* (Platyhelminthes, Tricladida, Microplaninae) in Europe: as yet no asymptote in sight [J]. Invertebrate Systematics, 2017, 31(3): 269-301.

## Common molecular markers and research progress in *Tricladida*

Wang Lei<sup>1,2</sup>, Dong Zimei<sup>1</sup>, Chen Guangwen<sup>1</sup>, Liu Dezeng<sup>1</sup>

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

2. Medical College, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** A number of molecular markers are summarized in this paper. These markers have broad applications in *Tricladida* in the following areas: DNA bar-coding, molecular phylogeny, genetic diversity analysis, population history, phylogeography, etc. The research prospects and focus of these markers are also forecast in this paper. Presently, nuclear ribosomal marker of 18S, 28S and ITS-1, and mitochondrial marker of COI are usually used in the research of *Tricladida*. The concatenated sequences of the four markers are conspicuously availed in molecular phylogeny. As the DNA bar-coding, COI, ITS-1 are frequently used to support the separate species status of new species and distinguish the asexual specimens.

**Keywords:** *Tricladida*; molecular markers; DNA barcoding; genetic diversity; molecular phylogeny

[责任编辑 刘洋 杨浦]