



•综述• 土壤动物多样性: 物种与群落研究专辑

蚯蚓基因组学的研究进展: 基于全基因组及线粒体基因组

翟俊杰^{1,2}, 赵慧峰³, 商光申^{1,2}, 孙振钧¹, 张玉峰^{3*}, 王兴^{1,2*}

1. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193; 2. 生物多样性与有机农业北京市重点实验室, 北京 100193; 3. 廊坊师范学院河北省动物多样性重点实验室, 河北廊坊 065000

摘要: 蚯蚓被喻为土壤中的“生态系统工程师”, 具有高度的多样性且在全世界都有分布, 被用作土壤健康的指示生物。蚯蚓具有极强的环境适应能力, 在不断适应的过程中促进了自身基因组的进化。本文对近年来蚯蚓全基因组以及线粒体基因组的研究进展进行了综述。蚯蚓全基因组的测序、拼装和分析为研究蚯蚓生态学、污染物对蚯蚓致毒的分子机制、免疫防御的分子机制、蚯蚓再生的分子机制等奠定基础。而线粒体基因组多应用于蚯蚓分子系统发育方面的研究, 目前已有多种蚯蚓通过线粒体基因组测序完成了物种的鉴定。本文建议今后重点开展以下几方面的研究: (1) 针对现有的4种蚯蚓全基因组测序结果, 进一步进行比较基因组学、进化基因组学和功能基因组学的研究。(2) 完善不同种蚯蚓的基因文库和表达序列标签。(3) 建立线粒体基因组、全基因组与蚯蚓物种多样性的关联分析。

关键词: 蚯蚓; 基因组学; 全基因组; 线粒体基因组; 蚯蚓多样性

翟俊杰, 赵慧峰, 商光申, 孙振钧, 张玉峰, 王兴 (2022) 蚯蚓基因组学的研究进展: 基于全基因组及线粒体基因组. 生物多样性, 30, 22257. doi: 10.17520/biods.2022257.

Zhai JJ, Zhao HF, Shang GS, Sun ZJ, Zhang YF, Wang X (2022) Advances in earthworm genomics: Based on whole genome and mitochondrial genome. Biodiversity Science, 30, 22257. doi: 10.17520/biods.2022257.

Advances in earthworm genomics: Based on whole genome and mitochondrial genome

Junjie Zhai^{1,2}, Huifeng Zhao³, Guangshen Shang^{1,2}, Zhenjun Sun¹, Yufeng Zhang^{3*}, Xing Wang^{1,2*}

1 College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193

2 Beijing Key Laboratory of Biodiversity and Organic Farming, Beijing 100193

3 Hebei Key Laboratory of Animal Diversity, Langfang Normal University, Langfang, Hebei 065000

ABSTRACT

Background & Aims: Earthworms, which are known as the ecosystem engineers of the soil, are highly diverse and distributed worldwide. They are used as indicators of soil health. They are highly adaptable to their environment, and their genomes have evolved through the process of adaptation. In this paper, recent research progress of the whole genome and mitochondrial genome of the earthworms are reviewed.

Progresses: The sequencing, assembly and analysis of earthworm genome lay a foundation for the study of earthworm ecology, molecular toxicity mechanism of pollutants to earthworm, molecular mechanism of immune defense, earthworm regeneration and so on. The mitochondrial genome is mostly used in the study of molecular phylogeny of earthworms. Currently, various types of earthworm species have been identified based on mitochondrial genome sequencing.

Prospects: This paper highlights the following aspects of research that should be focused in future studies: (1) Carry out the studies on comparative genomics, evolutionary genomics and functional genomics using the existing whole genome sequencing results of the four species earthworms; (2) Improve the gene libraries and expressed sequence tags of different species of earthworms; (3) Strengthen the association analysis between mitochondrial genome and whole

收稿日期: 2022-05-11; 接受日期: 2022-10-01

基金项目: 国家自然科学基金(41371305; 31172091)

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: qqzyf123@126.com; swwangxing@cau.edu.cn

genome with the species diversity of earthworm.

Key words: earthworm; genomics; whole genome; mitochondrial genome; earthworm diversity

蚯蚓(环节动物门: 寡毛纲)作为一种古老的土壤无脊椎动物, 通过协调其他土壤生物促进生态系统多种功能服务(Liu T et al, 2019)。因为其强大的适应性及入侵性, 已经分布在世界各地(Phillips et al, 2019)。据统计, 2019年之前全世界共发现有3,000–3,500种蚯蚓, 其中我国记录有640种, 是亚洲乃至全球报道蚯蚓物种数最为丰富的国家之一(Csuzdi, 2012; 蒋际宝和邱江平, 2018)。蚯蚓被喻为土壤中的“生态系统的工程师”, 其往往可以改变土壤的结构和质量, 目前已有大量研究表明蚯蚓在土壤中的摄食和挖掘习性对土壤微生物和植物的生长存在良性作用(Velki & Ecimovic, 2017; Medina-Sauza et al, 2019)。随着经济和社会的快速发展, 土壤污染情况日益严峻, 蚯蚓凭借其自身对有毒物质的敏感性和其他独特的生物学优势, 已经逐渐成为一种检测土壤健康的生物标志物(Shi et al, 2017; Li et al, 2020)。蚯蚓在土壤生态系统中独特的作用可以提高土壤中养分的利用效率, 同时也可以增强农作物对病虫害的抵抗力, 这也使其在农业中的应用日益广泛(Bertrand et al, 2015)。此外, 在国际上蚯蚓也被用来处理有机废弃物、净化污水等(Sinha et al, 2010; Bhat et al, 2018)。

人类对蚯蚓的研究历史非常悠久, 可追溯到1758年, 林奈描述并命名了第一个蚯蚓物种, 广泛分布在欧洲的陆正蚓(*Lumbricus terrestris*)。1892年, 达尔文在*The Formation of Vegetable Mould, Through the Action of Worms: With Observations on Their Habits*中曾说过: “我们很难找到其他的生灵像它们一样, 虽看似卑微, 却在世界历史的进程中起到了如此重要的作用”(Darwin, 1892)。虽然达尔文给予了蚯蚓高度的评价, 但目前对于蚯蚓的研究多集中于其分布、多样性、生态系统服务功能、生态毒理学、天然免疫, 如其体内蛋白质含量、激素分泌、药用价值以及生态习性等, 在基因组学方面的研究相对较少, 缺乏功能、机理的深入研究(Li et al, 2016; Ding et al, 2019; Jin et al, 2020; Parolini et al, 2020; Ahmed & Al-Mutairi, 2022), 使其在基因组、基因功能、生化、细胞、分子和发育等方面的研究远远落

后于其他模式动物, 例如线虫等。

蚯蚓的物种繁多, 蚯蚓分类学仍然以性成熟个体的形态解剖方法为主, 但是由于大量蚯蚓幼体无显著的形态鉴定特征, 并且其基因的高度同源性导致分类鉴定仍有很长的路要走。从进化生物学的角度看, 蚯蚓有着丰富的形态特征(如无腿运动), 丰富的多样性, 进化保护等, 目前采用的分类鉴定方法主要有DNA条形码、多基因系统发育学、线粒体基因组分析、转录组分析、表达序列标签(expressed sequence tag, EST)等(Marchán et al, 2022)。但由于缺乏基因组的相关信息, 蚯蚓的鉴定及遗传进化等方面的研究也受到了一定限制(Marchán et al, 2020b; Rajesh & Anant, 2020)。如果可以丰富并完善其基因组学的相关研究, 蚯蚓将不仅限于作为土壤环境健康的指示生物, 而是逐渐向土壤模式动物的方向发展, 从而更为便捷地对环境进行指示服务(Shao et al, 2020), 并有可能揭示环境胁迫对蚯蚓个体和多样性影响的分子机制, 为探索蚯蚓适应土壤复杂多变环境的分子机制奠定基础。

近些年来, 关于蚯蚓基因组方面的研究虽也取得了一定进展, 但仅有4种蚯蚓的全基因组被测序完成, 测序蚯蚓种类和测序质量有待进一步提高, 目前多集中在全基因组的测序和组装, 以及基于线粒体基因组的分子系统发育等方面的研究, 缺少功能基因组的研究。据统计, 最早与蚯蚓基因组学相关的文献发表于1995年, 自2015起每年均有相关文章发表(图1)。本文基于Web of Science核心合集数据库, 以earthworm、genome为主题关键词进行论文检索, 筛选并对相关文献进行关键词分析后, 基于此使用VOSviewer构建并优化文献摘要共现图谱, 对现有的有关蚯蚓基因组的研究热点与趋势进行了分析(图2)。通过共现图谱可以发现, 目前的研究热点多集中在线粒体基因组、系统发育分析, 以此来为蚯蚓的物种多样性提供一定证据。同时对于爱胜蚓属(*Eisenia*)的研究相对较为丰富。本文总结了1995–2022年Web of Science核心合集数据库现有蚯蚓基因组研究的成果, 并对今后蚯蚓基因组的研究方向提出了展望。

Fig. 1 Number of published papers on earthworm genomics. Literature source: Web of Science Core Collection; Publication years: 1995–2022; Search keywords: Earthworm, Genome.

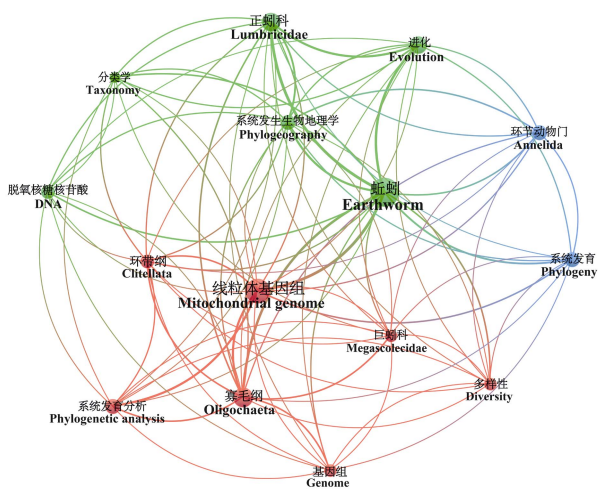


Fig. 2 Key words coexistence network of research on earthworm genomics

作为土壤动物的代表, 温度和降水量是影响蚯蚓全球分布最为关键的因素, 这也就使其广泛分布于除极地和干旱地区的全球各地, 而蚯蚓的挖洞、摄食和排泄等行为对维持土壤肥力至关重要 (Pirooznia et al, 2007; Phillips et al, 2019)。蚯蚓在全球的广泛分布, 在一定程度上表明其在面对复杂多变的环境时具有极强的适应性, 这也就意味着蚯蚓往往具有强大的分子机制来维持自身的生存与繁衍 (Wang et al, 2021)。这种强大的分子机制也逐渐引

此外,在环境污染物胁迫下,显著变化的蚯蚓基因、蛋白表达以及相关代谢物可作为分子生物标志物,用于污染物的环境评价、胁迫检测、作用机制以及蚯蚓应对污染物的免疫防御机制的研究,基于此目前已有大量针对蚯蚓的毒理研究。[Gong和Perkins \(2016\)](#)对已有的相关研究进行总结分析后发现,目前已有多种生化、生理和分子等层面的蚯蚓生物标志物,主要包括DNA损伤、DNA甲基化、金属结合蛋白(例如金属硫蛋白)的诱导、抗氧化系统的抑制、能量储备反应和免疫学变化、溶酶体膜稳定性、神经冲动传导性、精子数量和质量、组织病理学和行为等等,并发现了相关基因存在显著变化,但基因与蛋白质和代谢物之间的相互作用关系,以及遗传和表观遗传变化在污染物及环境等胁迫条件的适应过程中的作用并不明确。

除了已知的关键基因，在缺乏全基因组序列的情况下，表达序列标签可以快速完成基因表达、基因功能和涉及特定生理过程的新基因鉴定，是比较基因组和功能基因组研究的重要资源(Pirooznia et al, 2007; Liu et al, 2013)。在多种蚯蚓中，赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)常被用作土壤动物生态毒理的模式生物，对其毒理分子机制的探究也是目前的研究热点之一。Pirooznia等人于2007年就已经完成了对赤子爱胜蚓进行基因功能注释，分析其进化情况，构建基因文库和对表达序列标签的序列分析，可以完成表达基因鉴定并比较基因组差异，进而更好地研究其对环境污染物的基因表达响应，并且可以对关键基因(涉及生长、发育、再生、致病、免疫以及环境污染物扰动下的差异表达基因)进一步分析(Pirooznia et al, 2007; Zwarycz et al, 2015; Bhambhani et al, 2016)。

et al, 2018; Paul et al, 2018; Liu C et al, 2019)。全基因组测序技术虽然在快速发展, 但目前来看其成本依旧过高, 而简化基因组测序技术的出现与发展正在逐步弥补这一不足。

1.1 已测蚯蚓的全基因组信息

目前, 研究人员已对巨蚓科与正蚓科的4种蚯蚓进行了全基因组测序并进行了组装(表1, Zwarycz et al, 2015; Bhambri et al, 2018; Jin et al, 2020; Shao et al, 2020; Wang et al, 2021)。

1.1.1 赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)基因组解析

赤子爱胜蚓是目前常用的环境监测指示动物, 虽然其作为生态毒理研究模式生物是成功的, 但在全基因组研究之前仅有一组EST数据, 使其分子层面研究的发展受到了一定限制, 因此Zwarycz等(2015)对赤子爱胜蚓进行了全基因组测序与组装, 组装完成的结果为1.05 Gb, contig N50为1,850 bp。组装完成后对同源框进行了分类, 并与水蛭(*Helobdella robusta*)以及海蠕虫(*Capitella teleta*)进行比较后发现, 从赤子爱胜蚓与海蠕虫的最近共同祖先到赤子爱胜蚓与水蛭的最近共同祖先发生了许多基因扩增, 而从赤子爱胜蚓与水蛭的最近共同祖先到赤子爱胜蚓的谱系却具有异常水平的同源框增加, 为解释不同谱系的遗传多样性提供了一定的依据。随后, Bhambri等(2018)对赤子爱胜蚓进行了更完整的全基因组分析, 长度为1.47 Gb, contig N50为967 bp, 同时验证其二倍体染色体数目为22, GC含量达到40%, 更加完备的全基因组序列的分析为研究赤子爱胜蚓的发育多样性的遗传原因提

供了重要工具。

1.1.2 安德爱胜蚓(*Eisenia Andrei*)基因组解析

除了在环境方面的应用, 蚯蚓的再生过程也是研究人员的关注点之一。再生是最为复杂的生物学过程之一, 蚯蚓以其自身复杂的表型结构, 较短的再生周期以及可以双向再生等优势, 表明其可以作为一种研究再生机制的优秀动物模型。Shao等(2020)利用PacBio测序和Hi-C辅助组装等策略拼装了一个染色体水平的高质量安德爱胜蚓基因组, Scaffold N50约为111 Mb, 并结合蚯蚓不同再生时期转录组和单细胞转录组测序对再生发育机制进行了探究, 发现典型的再生通路Wnt信号通路在安德爱胜蚓显著扩张, 蚯蚓基因组中重复序列LINE2转座元件以及再生功能相关的基因家族(例如, *EGFR1*, 表皮生长因子受体)也有显著的扩增, 这些显著扩增的基因家族可能通过增加其拷贝数剂量效应来调控蚯蚓再生过程, 这为蚯蚓再生提供关键基因。

1.1.3 通俗腔蚓(*Metaphire vulgaris*)基因组解析

Jin等(2020)对通俗腔蚓的全基因进行了测序分析、组装与注释, 组装的序列由559个重叠群组成, 长度为728.6 Mb, N50重叠群大小为4.2 Mb。根据Hi-C结果, 重叠群锚定在41条染色体上。基因组序列核基因比较表明通俗腔蚓发生了全基因组重复, 随后发生了几次染色体融合事件。*Hox*基因和蚓激酶基因为基因组周围的部分簇。揭示了从古代四倍体到现代二倍体物种的进化路线, 基因组复制(四倍体化)可能导致通俗腔蚓体型更大。同时该研究发现*Hox*基因和蚓激酶基因是基因组周围的部分簇,

表1 蚯蚓全基因组测序基本信息

Table 1 Basic information of whole genome sequencing in earthworm

蚯蚓 Earthworm	基因组大小 Genome length	染色体数量 Number of chromosomes	染色体倍体 Chromosome ploidy	GC含量 GC content (%)	蛋白编码基因数 Number of protein-coding gene	测序组装技术 Sequencing assembly technology	参考文献 References
赤子爱胜蚓 <i>Eisenia foetida</i>	1.05 Gb	22	2	28.6	—	Illumina HiSeq 2000 2 × 100PE	Zwarycz et al, 2015
赤子爱胜蚓 <i>E. foetida</i>	1.47 Gb	22	2	40	—	Illumina HiSeq 2500	Bhambri et al, 2018
通俗腔蚓 <i>Metaphire vulgaris</i>	728.6 Mb	41	2	40	—	PromethION Single Molecule Platform, Illumina NovaSeq Sequencing Platform, Hi-C	Jin et al, 2020
安德爱胜蚓 <i>Eisenia andrei</i>	1.3 Gb	22	2	35–45	31,817	PacBio三代测序 PacBio RS Platform, Hi-C	Shao et al, 2020
皮质远盲蚓 <i>Amyntas corticis</i>	1.2 Gb	42	3	40.34	29,256	PacBio三代测序 PacBio SMRT Sequencing, Hi-C	Wang et al, 2021

通俗腔蚓基因组的测序和组装为蚯蚓的基因功能和进化研究提供参考。

1.1.4 皮质远盲蚓(*Amyntas cortices*)基因组解析

皮质远盲蚓具有强大适应能力, 现已广泛分布于世界各地。[Wang等\(2021\)](#)基于长读段三代测序与Hi-C测序相结合的策略, 对蚯蚓基因组进行了高质量拼装, 形成了一个长达1.2 Gb, 包含42条准染色体序列的基因组。蚯蚓基因组拼装序列的N50长度达到31 Mb, 结合转录组测序数据共预测出29,256个蛋白质编码基因, 且91.2%的后生动物单拷贝直系同源基因都在该基因组中存在完整匹配, 证明该基因组具有较高的完整性。这为深入探究隐藏在蚯蚓物种独特性背后的分子机制提供了先决条件。核型分析发现皮质远盲蚓具有多于120条的染色体, 通过杂合度估计的K-mer分析、倍性估计和核型分析, 发现其为三倍体物种, 这也就意味着其会有更多的基因材料用于适应性进化, 并且应激/防御基因会有更多的拷贝。同时, 与赤子爱胜蚓或安德爱胜蚓相比, 皮质远盲蚓基因组中与免疫系统过程、应激反应和稳态过程相关的基因功能更加丰富。这也就产生了更多的防御功能, 该研究通过对蚯蚓基因组的完整拼装与多组学分析, 揭示了世界广布种皮质远盲蚓基因组的三倍体特征及其与肠道微生物、土壤紧密互作的分子机制, 并为后续研究蚯蚓的适应机制提供了丰富且多元的数据资源。

赤子爱胜蚓与安德爱胜蚓为近缘物种, 两者同样为二倍体, 染色体数目相同, 但安德爱胜蚓基因组最终组装的大小为1.3 Gb, 略小于赤子爱胜蚓。安德爱胜蚓使用的是PacBio三代测序和Hi-C测序, 赤子爱胜蚓用的是Illumina HiSeq 2500二代测序, 相比较来说安德爱胜蚓的基因组测序核组质量要高于赤子爱胜蚓, 使用BUSCO验证后, 赤子爱胜蚓基因组中的识别结果为18.2%, 而安德爱胜蚓则高达92.1%。关于两者的基因组学研究均表明, 基因家族的扩增或收缩会与特定表型和生理功能的进化有关, 并且在两者的基因组中均发现了丰富的扩展基因家族, 而这些基因复制发生在赤子爱胜蚓与安德爱胜蚓分化之前([Zwarycz et al, 2015](#); [Bhambri et al, 2018](#); [Shao et al, 2020](#))。已测定的通俗腔蚓与皮质远盲蚓同为巨蚓科, 通俗

腔蚓为二倍体, 皮质远盲蚓则为三倍体, 皮质远盲蚓测序质量高于通俗腔蚓。

1.2 简化基因组测序(reduced-representation genome sequencing, RRGs)

由于全基因组测序对于资金和技术的要求较高, 尤其是对于基因组偏大的物种, 而研究通常都想要覆盖全基因组的变异信息, 这就催生了简化基因测序技术, 这种技术在没有参考基因组的物种中也可以使用, 从而可以帮助人们进行生物系统发育分析、物种鉴定以及种群进化等方面的研究([Yuan et al, 2020](#); [Marchán et al, 2020b](#))。限制性酶切位点关联DNA测序(restriction site-associated DNA sequencing, RAD-seq)以及基因分型测序(genotyping-by-sequencing, GBS)是目前使用最为广泛的简化基因组测序技术([Andrews et al, 2016](#); [Marchán et al, 2020a](#))。

蚯蚓由于其强大的环境适应力, 以及庞大的种群数量, 常被认为是高度多态性的动物, 而它的多态性不仅仅体现在其形态层面的多样性, 更存在于其基因层面, 因此近些年来对于蚯蚓种群遗传变异的研究也日渐丰富([Yuan et al, 2020](#))。全基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的发现对于遗传图谱的研究至关重要, 并且SNPs目前仍广泛应用于蚯蚓的各项研究([Baird et al, 2008](#); [Marchán et al, 2020a](#))。[Anderson等\(2017\)](#)则通过RAD-seq对生存在高度污染的前矿区的粉正蚓(*Lumbricus rubellus*)的基因组进行了分析, 并与附近正常地区的蚯蚓基因组进行比较, 证明谱系之间不存在混合, 发现许多SNPs分离了种群, 表明这些基因被选择下来应对重金属毒性。[Yuan等\(2020\)](#)利用RAD-seq技术, 使用SNP标记揭示了巨蚓科蚯蚓*Amyntas*_YN2017 sp.的群体遗传分化和遗传结构, 并推测地理隔离导致的基因流减少影响了*Amyntas*_YN2017 sp.的群体遗传分化, 该研究也表明RAD-seq技术可以用于探索蚯蚓的种群系统发育关系和遗传多样性。

以上研究为蚯蚓的遗传研究、基因克隆和系统发育分析、免疫防御等提供了宝贵资源。蚯蚓的全基因组测序为同源类群比较、系统发育、基因组筛选注释预测编码基因序列, 以及了解基因组进化和多样性变化提供了关键资源。

2 基于线粒体基因组分析的蚯蚓分类学和系统发育研究

经典的蚯蚓分类主要是基于形态结构的比较。目前对于成年蚯蚓的鉴定, 在形态层面主要基于体色、体长、前列腺类型、刚毛位置和多寡、阴蒂位置和形式、环带位置及形状以及一些内脏器官, 如精巢囊和受精囊等(Pérez-Losada et al, 2009)。但相比于节肢动物, 蚯蚓可用于分类的性状依旧是极少的, 这可能与蚯蚓的世系始终在土壤中演化有关(树蚓例外)。虽然土壤密实和黑暗的环境很可能在一定程度上限制了蚯蚓形态的分化, 但由于蚯蚓的某些性状(如体色)可塑性较强, 不同属或物种在同一特征中也可能表现出相同性状。同时由于个体部分特征差异较大, 还有些形态特征为可变的, 这就对蚓种的分类及鉴定工作造成了一定的障碍(Pérez-Losada et al, 2009)。

在严苛的土壤环境中, 形态分化极为缓慢或可能停滞, 但是DNA的变异不会停滞, 近些年随着分子技术的快速发展, 分子数据为蚯蚓的分类带来了动能。21世纪初, 利用Sanger测序获得单基因或寡基因数据, 通过分子系统学手段为蚯蚓分类学、系统发育学和生物地理学研究提供了更为可靠的结果(Bozorgi et al, 2019)。蚯蚓在分子系统发育学最早的研究突破之一是DNA条形码的实现, 如细胞色素C氧化酶亚基I序列(COX1), 其他线粒体基因(COX2、ND1、12S与16S)以及核基因分子标记(28S、H3)等。这一方法可以帮助破译蚯蚓的不同扩散和定居模式, 以及它们的功能特征、地质历史和人为影响的潜在关系。分子系统学研究也主要集中在基于单基因或联合基因片段的系统分类与谱系地理学方面, 比如: 蚯蚓隐存种(cryptic species)的代表类群, 基于核基因与线粒体基因片段的背暗流蚓种组(*Aporrectodea caliginosa* species-complex)的系统发育以及地中海优势种*Hormogaster elisae* species-complex的谱系地理学与遗传景观分析(Pérez-Losada et al, 2009; Marchán et al, 2017)。基于多基因片段, 鉴定出伊朗波斯湾地区正蚓科3个新种, 并揭示了1个新属*Philomontanus* (Bozorgi et al, 2019)。

但COX1条形码在分析一些古老的分支时, 也存在一定的局限性, 其他线粒体基因和核分子标记

单独使用时同样存在相似的局限性, 同时在系统发育中应用全基因组测序负担过重, 因此为了更为准确地进行物种划分, 需要从分子、形态学、生态学、行为学、古地理变迁、气候等方面整合信息。而线粒体基因组分析作为多种分子标记的来源, 具有建立基因序列的附加价值, 但如果缺乏核信息, 在不能完全进行谱系分类或存在异质性的情况下就容易出现问题, 因此在分类时也要注重核分析标记, 以排除深层次线粒体谱系与未知物种的混淆(Marchán et al, 2017, 2020a, 2022)。

线粒体基因组分析也有其优势, 首先在动物体内线粒体DNA通常包含36或37个基因, 13个编码氧化磷酸化有关的蛋白质, 并且通常至少有1个长度可变的序列不编码任何基因; 与单个基因相比, 线粒体基因组由于其信息量高, 且遵循母系遗传, 是推断系统发育关系的一种有前途的工具, 并已被应用于一些涉及蚯蚓的系统发育研究(Boore & Brown, 1995; Conrado et al, 2017)。

近些年, 随着二代测序技术的快速发展, 已经有越来越多的蚯蚓进行了线粒体基因组测序分析(表2), 而在这其中多为巨蚓科蚯蚓, 而正蚓科、链胃蚓科蚯蚓种类较少(Zhang et al, 2015, 2016a, b, c; Conrado et al, 2017; Zhang et al, 2020)。

2.1 蚯蚓线粒体基因组的特征

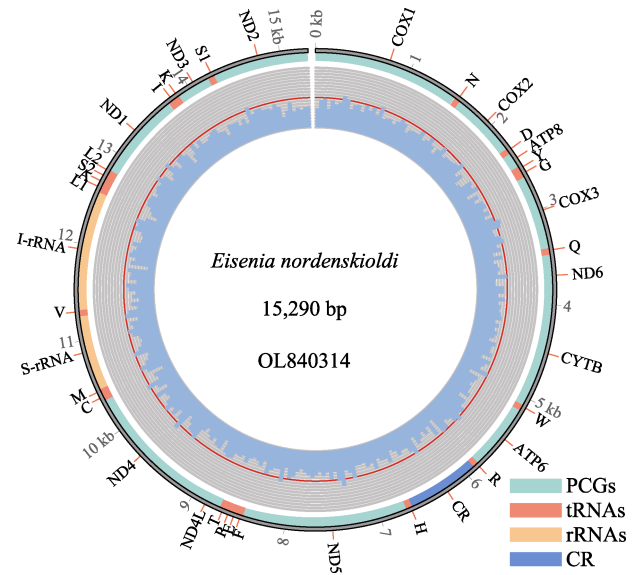
蚯蚓线粒体组为双链环状DNA, 包含37个基因, 即13个蛋白编码基因、22个转运RNA和2个核糖体RNA, 有些物种的线粒体组里包含控制区(control region), 有些物种则没有。蚯蚓线粒体组区别于大多数无脊椎动物和所有脊椎动物的显著特征是所有37个基因都位于正链上(图3), 而其他动物都是正负链均有分布, 表明线粒体基因顺序在寡毛纲动物中始终是保守的(Zhang et al, 2016c; Zhao et al, 2022)。目前报道的多数蚯蚓的线粒体组都是不完整的, 可能的原因是控制区的部分重复序列无法通过二代测序获得, 因为二代测序的reads一般都比较短(150–400 bp)无法测通长片段重复区域, 需要结合Sanger扩增控制区来重建环状DNA, 或者直接使用三代测序手段获得线粒体组的完整序列。

2.2 蚯蚓线粒体基因组的应用

随着线粒体基因组分析方法的普及, 目前, 蚯蚓线粒体组的数据主要用于分类学、系统发育和谱

表2 环带纲蚯蚓线粒体基因组测序物种的分类单元分布
Table 2 Taxonomic distribution of earthworm species based on mitochondrial genomes

分类单元 Taxa	GenBank登录号 GenBank accession no.	参考文献 References
正蚓科 Lumbricidae		
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	CM035405.1	未发表 Unpublished
<i>A. rosea</i>	NC_046733.1	Shekhovtsov & Peltek, 2019
<i>A. tuberculata</i>	OL840316–OL840317, OM687883–OM687886	Zhao et al, 2022
<i>A. trapezoides</i>	OM687887	Zhao et al, 2022
<i>Bimastos parvus</i>	MZ857199.1	Liu et al, 2021
<i>Dendrobaena octaedra</i>	MZ857197.1	Liu et al, 2021
<i>Eisenia andrei</i>	MZ857198.1	Liu et al, 2021
<i>E. nordenskioldi</i>	MZ857200.1, OL840314–OL840315, OM687887–OM687890	Liu et al, 2021; Zhao et al, 2022
<i>Lumbricus rubellus</i>	MN102127.1	Zhang et al, 2019
<i>L. terrestris</i>	NC_001673.1	Boore & Brown, 1995
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	MZ857201.1	Liu et al, 2021
<i>Pontoscolex corethrurus</i>	NC_034783.1	未发表 Unpublished
巨蚓科 Megascolecidae		
<i>Amyntas aspergillus</i>	NC_025292.1	Zhang et al, 2016b
<i>A. carnosus</i>	KT429008.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. corticis</i>	KM199290.1	Zhang et al, 2015
<i>A. cucullatus</i>	KT429012.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. gracilis</i>	KP688582.1	Zhang et al, 2015
<i>A. hupeiensis</i>	KT429009.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. instabilis</i>	KT429007.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. jiriensis</i>	NC_029879.1	Hong et al, 2017
<i>A. longisiphonus</i>	KM199289.1	Zhang et al, 2015
<i>A. moniliatus</i>	KT429020.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. morrisi</i>	KT429011.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. pectiniferus</i>	KT429018.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. redactus</i>	KT429010.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. robustus</i>	KT429019.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. rongshuiensis</i>	KT429014.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. seungpanensis</i>	OL321943.1	未发表 Unpublished
<i>A. spatiosus</i>	KT429013.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. triastriatus</i>	KT429016.1	Zhang et al, 2016c
<i>A. yunoshimensis</i>	LC573969.1	Seto et al, 2021
<i>Duplodocodrilus schmaridae</i>	KT429015.1	Zhang et al, 2016c
<i>Metaphire californica</i>	KP688581.1	Zhang et al, 2015
<i>M. guillelmi</i>	KT429017.1	Zhang et al, 2016c
<i>M. hilgendorfi</i>	LC573968.1	Seto et al, 2021
<i>M. vulgaris</i>	NC_023836.1	Zhang et al, 2016a
<i>Perionyx excavatus</i>	NC_009631.1	未发表 Unpublished
<i>Tonoscolex birmanicus</i>	KF425518.1	Wang et al, 2015
链胃蚓科 Moniligastridae		
<i>Drawida gisti</i>	NC_058285.1	Liu et al, 2020
<i>D. japonica</i>	KM199288.1	Zhang et al, 2016c
<i>D. ghilarovi</i>	OL840312–OL840313	Zhao et al, 2022



制的研究也逐渐与基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学等息息相关。而对蚯蚓来说, 不管是利用毒理基因组学挖掘新的生物标志物达到完善其环境监测功能的目的, 还是对其免疫防御机制探究, 都因缺乏基因组的信息而受到一定的限制, 这也就是为什么蚯蚓的研究多停留在观察、描述、生理等层面。目前已经有越来越多的研究人员参与完善蚯蚓的基因组信息, 并在不断地进行方法创新, 蚯蚓基因组测序的完成标志着人类对于蚯蚓生命现象和过程有了进一步的认识。

3.1 全基因组分析

目前完成全基因组测序的蚯蚓仅有4种(*Amyntas corticis*、*Eisenia andrei*、*E. foetida*、*Metaphire vulgaris*), 这4种蚯蚓的全基因组信息已相对完善, 并且后续相关研究已逐步展开。但相对于蚯蚓庞大的种群数量来说, 这是微不足道的, 所以后续需要对更多的蚯蚓种进行全基因组测序。

全基因组学分析可以更为全面且准确地鉴别蚓种、分析遗传进化等, 在今后的研究中, 可以就已有的全基因组信息进行更深层次的挖掘, 例如与蚯蚓生长发育、免疫防御相关的基因功能, 这将会从本质上理解蚯蚓的生态服务功能、如何发挥环境指示动物的作用以及回答蚯蚓适应土壤复杂环境的分子机制。根据蚯蚓基因组信息发现新的功能基因, 研发蚯蚓功能蛋白, 利用基因工程技术, 体外生产蚯蚓功能蛋白, 用于医药、功能蛋白和饲料等方面。

3.2 线粒体基因组分析


相对于全基因组信息的缺乏, 现已有多种蚯蚓的线粒体基因组已经被测定并分析, 但对于现有的蚓种数量来说是微不足道的, 因此线粒体基因组的测序工作任重道远。蚯蚓现已广泛分布于全球, 且蚓种间存在生殖隔离, 但对其进化过程的研究并不明确, 因此对于已有的线粒体基因组信息, 可以从蚯蚓的地域分布与进化过程两个角度进行更深入的对比与分析, 这将更好地对蚯蚓进行更好的应用与保护。

综上, 根据目前的研究进展, 本文建议未来可以从以下几个方面开展对蚯蚓基因组学的深入研究: (1)针对现有的4种蚯蚓全基因组测序结果, 进一步从比较基因组学、进化基因组学和功能基因组

学的方向分析, 从而能够更加深入理解蚯蚓的多样化、环境适应的分子机制以及种群进化机制。(2)完善不同种蚯蚓的基因文库和表达序列标签, 目前在这方面信息完善的蚯蚓种类较少, 这也在一定程度上限制了蚯蚓分子技术的发展。(3)加强线粒体基因组以及核基因组的综合分析, 力求解决更高层次的蚯蚓系统发育问题。蚯蚓基因组学研究才刚刚开始, 并且存在诸多困难, 但这是未来蚯蚓研究的必经之路。

ORCID

翟俊杰  <https://orcid.org/0000-0002-0688-1166>

王兴  <https://orcid.org/0000-0003-4056-4700>

参考文献

- Ahmed N, Al-Mutairi KA (2022) Earthworms effect on microbial population and soil fertility as well as their interaction with agriculture practices. *Sustainability*, 14, 7803.
- Anderson C, Cunha L, Sechi P, Kille P, Spurgeon D (2017) Genetic variation in populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*, across contaminated mine sites. *BMC Genetics*, 18, 97.
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G, Hohenlohe PA (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17, 81–92.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3, e3376.
- Bertrand M, Barot S, Blouin M, Whalen J, Oliveira T, Roger-Estrade J (2015) Earthworm services for cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 553–567.
- Bhambri A, Dhaunta N, Patel SS, Hardikar M, Bhatt A, Srikakulam N, Shridhar S, Vellarikkal S, Pandey R, Jayarajan R, Verma A, Kumar V, Gautam P, Khanna Y, Khan JA, Fromm B, Peterson KJ, Scaria V, Sivasubbu S, Pillai B (2018) Large scale changes in the transcriptome of *Eisenia fetida* during regeneration. *PLoS ONE*, 13, e0204234.
- Bhat SA, Singh J, Vig AP (2018) Earthworms as organic waste managers and biofertilizer producers. *Waste and Biomass Valorization*, 9, 1073–1086.
- Boore JL, Brown WM (1995) Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics*, 141, 305–319.
- Bozorgi F, Seiedy M, Malek M, Aira M, Pérez-Losada M,

- Domínguez J (2019) Multigene phylogeny reveals a new Iranian earthworm genus (Lumbricidae: *Philomontanus*) with three new species. *PLoS ONE*, 14, e0208904.
- Conrado AC, Arruda H, Stanton DWG, James SW, Kille P, Brown G, Silva E, Dupont L, Taheri S, Morgan AJ, Simões N, Rodrigues A, Montiel R, Cunha L (2017) The complete mitochondrial DNA sequence of the pantropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Rhinodrilidae, Clitellata): Mitogenome characterization and phylogenetic positioning. *ZooKeys*, 688, 1–13.
- Csuzdi CS (2012) Earthworm species, a searchable database. *Opuscula Zoologica Budapest*, 43(41), 97–99.
- Darwin C (1892) *The Formation of Vegetable Mould, through the Action of Worms: With Observations on Their Habits*. John Murray, London.
- Ding SY, Lin XT, He SE (2019) Earthworms: A source of protein. *Journal of Food Science and Engineering*, 9, 159–170.
- Giska I, Sechi P, Babik W (2015) Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 217.
- Gong P, Perkins EJ (2016) Earthworm toxicogenomics: A renewed genome-wide quest for novel biomarkers and mechanistic insights. *Applied Soil Ecology*, 104, 12–24.
- Hong Y, Kim MJ, Wang AR, Kim I (2017) Complete mitochondrial genome of the earthworm, *Amyntas jiriensis* (Clitellata: Megascolecidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 28, 163–164.
- Jiang JB, Qiu JP (2018) Origin and evolution of earthworms belonging to the family Megascolecidae in China. *Biodiversity Science*, 26, 1074–1082. (in Chinese with English abstract) [蒋际宝, 邱江平 (2018) 中国巨蚓科蚯蚓的起源与演化. *生物多样性*, 26, 1074–1082.]
- Jin F, Zhou ZL, Guo Q, Liang ZW, Yang RY, Jiang JB, He YL, Zhao Q, Zhao Q (2020) High-quality genome assembly of *Metaphire vulgaris*. *PeerJ*, 8, e10313.
- Li Y, Tang H, Hu Y, Wang X, Ai X, Tang L, Matthew C, Cavanagh J, Qiu J (2016) Enrofloxacin at environmentally relevant concentrations enhances uptake and toxicity of cadmium in the earthworm *Eisenia fetida* in farm soils. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 312–320.
- Li Y, Wang X, Sun Z (2020) Ecotoxicological effects of petroleum-contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122384.
- Liu C, Wang X, Tian JB, Ma PY, Meng FX, Zhang Q, Yu BF, Guo R, Liu ZZ, Wang HL, Xie J, Cheng NL, Wang JH, Niu B, Sun GQ (2019) Construction of a cDNA library and preliminary analysis of the expressed sequence tags of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *Molecular Medicine Reports*, 19, 2537–2550.
- Liu CQ, Liu D, Guo Y, Lu TF, Li XC, Zhang MH, Ma JZ, Ma YH, Guan WJ (2013) Construction of a full-length enriched cDNA library and preliminary analysis of expressed sequence tags from Bengal tiger *Panthera Tigris Tigris*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 11072–11083.
- Liu HY, Xu N, Zhang QZ, Wang GB, Xu HM, Ruan HH (2020) Characterization of the complete mitochondrial genome of *Drawida gisti* (Metagynophora, Moniligastridae) and comparison with other Metagynophora species. *Genomics*, 112, 3056–3064.
- Liu HY, Zhang YF, Xu W, Fang Y, Ruan HH (2021) Characterization of five new earthworm mitogenomes (Oligochaeta: Lumbricidae): Mitochondrial phylogeny of Lumbricidae. *Diversity*, 13, 580.
- Liu T, Chen XY, Gong X, Lubbers IM, Jiang YY, Feng W, Li XP, Whalen JK, Bonkowski M, Griffiths BS, Hu F, Liu MQ (2019) Earthworms coordinate soil biota to improve multiple ecosystem functions. *Current Biology*, 29, 3420–3429.
- Marchán DF, Decaëns T, Domínguez J, Novo M (2022) Perspectives in earthworm molecular phylogeny: Recent advances in Lumbricoidea and standing questions. *Diversity*, 14, 30.
- Marchán DF, Fernandez R, de Sosa I, Díaz Cosín DJ, Novo M (2017) Pinpointing cryptic borders: Fine-scale phylogeography and genetic landscape analysis of the *Hormogaster elisae* complex (Oligochaeta, Hormogastridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 112, 185–193.
- Marchán DF, Fernández R, Domínguez J, Díaz Cosín DJ, Novo M (2020a) Genome-informed integrative taxonomic description of three cryptic species in the earthworm genus *Carpetania* (Oligochaeta, Hormogastridae). *Systematics and Biodiversity*, 18, 203–215.
- Marchán DF, Novo M, Sánchez N, Domínguez J, Díaz Cosín DJ, Fernández R (2020b) Local adaptation fuels cryptic speciation in terrestrial annelids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 146, 106767.
- Medina-Sauza RM, Álvarez-Jiménez M, Delhal A, Reverchon F, Blouin M, Guerrero-Analco JA, Cerdán CR, Guevara R, Villain L, Barois I (2019) Earthworms building up soil microbiota, a review. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 81.
- Parolini M, Ganzaroli A, Bacenetti J (2020) Earthworm as an alternative protein source in poultry and fish farming: Current applications and future perspectives. *Science of the Total Environment*, 734, 139460.
- Paul S, Arumugaperumal A, Rathy R, Ponesakki V, Arunachalam P, Sivasubramaniam S (2018) Data on genome annotation and analysis of earthworm *Eisenia fetida*. *Data in Brief*, 20, 525–534.
- Pérez-Losada M, Ricoy M, Marshall JC, Domínguez J (2009) Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae)

- based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52, 293–302.
- Phillips HRP, Guerra CA, Bartz MLC, Briones MJI, Brown G, Crowther TW, Ferlian O, Gongalsky KB, van den Hoogen J, Krebs J, Orgiazzi A, Routh D, Schwarz B, Bach EM, Bennett JM, Brose U, Decaëns T, König-Ries B, Loreau M, Mathieu J, Mulder C, van der Putten WH, Ramirez KS, Rillig MC, Russell D, Rutgers M, Thakur MP, de Vries FT, Wall DH, Wardle DA, Arai M, Ayuke FO, Baker GH, Beauséjour R, Bedano JC, Birkhofer K, Blanchart E, Blossey B, Bolger T, Bradley RL, Callahan MA, Capowicz Y, Caulfield ME, Choi A, Crotty FV, Crumsey JM, Dávalos A, Diaz Cosin DJ, Dominguez A, Duhour AE, van Eekeren N, Emmerling C, Falco LB, Fernández R, Fonte SJ, Fragoso C, Franco ALC, Fugère M, Fusilero AT, Gholami S, Gundale MJ, López MG, Hackenberger DK, Hernández LM, Hishi T, Holdsworth AR, Holmström M, Hopfensperger KN, Lwanga EH, Huhta V, Hurisso TT, Iannone BV III, Iordache M, Joschko M, Kaneko N, Kanianska R, Keith AM, Kelly CA, Kernecker ML, Klaminder J, Koné AW, Kooch Y, Kukkonen ST, Lalthanzara H, Lammel DR, Lebedev IM, Li YQ, Jesus Lidon JB, Lincoln NK, Loss SR, Marichal R, Matula R, Moos JH, Moreno G, Morón-Ríos A, Muys B, Neirynck J, Norgrove L, Novo M, Nuutinen V, Nuzzo V, Pansu J, Paudel S, Pérès G, Pérez-Camacho L, Piñeiro R, Ponge JF, Rashid MI, Rebollo S, Rodeiro-Iglesias J, Rodríguez MÁ, Roth AM, Rousseau GX, Rozen A, Sayad E, van Schaik L, Scharenbroch BC, Schirrmann M, Schmidt O, Schröder B, Seeber J, Shashkov MP, Singh J, Smith SM, Steinwandter M, Talavera JA, Trigo D, Tsukamoto J, de Valença AW, Vanek SJ, Virto I, Wackett AA, Warren MW, Wehr NH, Whalen JK, Wironen MB, Wolters V, Zenkova IV, Zhang WX, Cameron EK, Eisenhauer N, Mujeeb Rahman P (2019) Global distribution of earthworm diversity. *Science*, 366, 480–485.
- Pirooznia M, Gong P, Guan X, Inouye LS, Yang K, Perkins EJ, Deng YP (2007) Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Bioinformatics*, 8, S7.
- Rajesh D, Anant S (2020) *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* delimitation by automated barcode gap discovery and neighbor-joining analyses: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 8, 93–100.
- Seto A, Endo H, Minamiya Y, Matsuda M (2021) The complete mitochondrial genome sequences of Japanese earthworms *Metaphire hilgendorfi* and *Amyntas yunoshimensis* (Clitellata: Megascolecidae). *Mitochondrial DNA Part B, Resources*, 6, 965–967.
- Shao Y, Wang XB, Zhang JJ, Li ML, Wu SS, Ma XY, Wang X, Zhao HF, Li Y, Zhu HH, Irwin DM, Wang DP, Zhang GJ, Ruan J, Wu DD (2020) Genome and single-cell RNA-sequencing of the earthworm *Eisenia andrei* identifies cellular mechanisms underlying regeneration. *Nature Communications*, 11, 2656.
- Shekhovtsov SV, Efremov YR, Poluboyarova TV, Peltek SE (2021) Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskioldi* complex (Lumbricidae, Annelida). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25, 647–651.
- Shekhovtsov SV, Golovanova EV, Ershov NI, Poluboyarova TV, Berman DI, Bulakhova NA, Szederjesi T, Peltek SE (2020) Phylogeny of the *Eisenia nordenskioldi* complex based on mitochondrial genomes. *European Journal of Soil Biology*, 96, 103137.
- Shekhovtsov SV, Golovanova EV, Peltek SE (2016) Mitochondrial DNA variation in *Eisenia n. nordenskioldi* (Lumbricidae) in Europe and Southern Urals. *Mitochondrial DNA Part A*, 27, 4643–4645.
- Shekhovtsov SV, Peltek SE (2019) The complete mitochondrial genome of *Aporrectodea rosea* (Annelida: Lumbricidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 4, 1752–1753.
- Shi ZM, Tang ZW, Wang CY (2017) A brief review and evaluation of earthworm biomarkers in soil pollution assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 13284–13294.
- Sinha RK, Chauhan K, Valani D, Chandran V, Soni BK, Patel V (2010) Earthworms: Charles Darwin's 'unheralded soldiers of mankind': Protective & productive for man & environment. *Journal of Environmental Protection*, 1, 251–260.
- Velki M, Ečimović S (2017) Important issues in ecotoxicological investigations using earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 239, 157–184.
- Wang AR, Hong Y, Win TM, Kim I (2015) Complete mitochondrial genome of the Burmese giant earthworm, *Tonoscolex birmanicus* (Clitellata: Megascolecidae). *Mitochondrial DNA*, 26, 467–468.
- Wang X, Zhang Y, Zhang YF, Kang MM, Li YB, James SW, Yang Y, Bi YM, Jiang H, Zhao Y, Sun ZJ (2021) *Amyntas corticis* genome reveals molecular mechanisms behind global distribution. *Communications Biology*, 4, 135.
- Yuan Z, Jiang J, Dong Y, Zhao Q, Sun J, Qiu J (2020) Unearthing the genetic divergence and gene flow of the earthworm *Amyntas_YN2017* sp. (Oligochaeta: Megascolecidae) populations based on restriction site-associated DNA sequencing. *European Journal of Soil Biology*, 99, 103210.
- Zhang LL, Jiang JB, Dong Y, Qiu JP (2015) Complete mitochondrial genome of four pheretimoid earthworms (Clitellata: Oligochaeta) and their phylogenetic reconstruction. *Gene*, 574, 308–316.
- Zhang LL, Jiang JB, Dong Y, Qiu JP (2016a) Complete mitochondrial genome of a pheretimoid earthworm *Metaphire vulgaris* (Oligochaeta: Megascolecidae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27, 297–298.

- Zhang LL, Jiang JB, Dong Y, Qiu JP (2016b) Complete mitochondrial genome of an *Amyntas* earthworm, *Amyntas aspergillus* (Oligochaeta: Megascolecidae). Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 27, 1876–1877.
- Zhang LL, Sechi P, Yuan ML, Jiang JB, Dong Y, Qiu JP (2016c) Fifteen new earthworm mitogenomes shed new light on phylogeny within the *Pheretima* complex. Scientific Reports, 6, 20096.
- Zhang QZ, Liu HY, Zhang YF, Ruan HH (2019) The complete mitochondrial genome of *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae) and its phylogenetic analysis. Mitochondrial DNA Part B, Resources, 4, 2677–2678.
- Zhang YF, Ganin GN, Atopkin DM, Wu DH (2020) Earthworm *Drawida* (Moniligastridae) molecular phylogeny and diversity in Far East Russia and Northeast China. The European Zoological Journal, 87, 180–191.
- Zhang YF, Zhang YM, Wu H, Li CS, Aspe NM, Wu DH (2022) Patterns of genetic variation in the *Eisenia nordenskioldi* complex (Oligochaeta: Lumbricidae) along an elevation gradient in Northern China. Diversity, 14, 35.
- Zhao HF, Fan SH, Aspe NM, Feng LC, Zhang YF (2022) Characterization of 15 earthworm mitogenomes from Northeast China and its phylogenetic implication (Oligochaeta: Lumbricidae, Moniligastridae). Diversity, 14, 714.
- Zwarycz AS, Nossa CW, Putnam NH, Ryan JF (2015) Timing and scope of genomic expansion within Annelida: Evidence from homeoboxes in the genome of the earthworm *Eisenia fetida*. Genome Biology and Evolution, 8, 271–281.
- (责任编辑: 傅声雷 责任编辑: 李会丽)