

doi: 10.7541/2018.005

青海湖裸鲤舌状绦虫裂头蚴的分子鉴定及系统发育研究

张学勇^{1,2} 简莹娜^{1,2} 李秀萍^{1,2} 裴全邦³ 王戈平^{1,2}
王光华^{1,2} 蔡其刚^{1,2} 马利青^{1,2}

(1. 青海大学畜牧兽医科学院, 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016;

2. 青海省畜牧兽医科学院, 西宁 810016; 3. 青海省三角城种羊场, 刚察 812300)

摘要: 通过PCR方法扩增了青海湖裸鲤体腔寄生舌状绦虫18S rRNA、CO I 和COB基因部分序列, 并进行分子鉴定, 分析了3种基因的同源性, 利用这3种基因进行分子进化和系统发育研究。结果显示, 经过分子鉴定, “面条样”绦虫为肠舌状绦虫, 克隆的18S rRNA、CO I 和COB基因序列分别与AF254121(中国)、AF153910(中国)和JQ279109(阿尔及利亚)的核苷酸序列同源性为100.00%、99.49%和93.32%。同时, 利用GenBank中其他种属绦虫的18S rRNA、CO I 和COB基因序列构建系统发育树, 均与已鉴定的肠舌状绦虫聚在同一支上, 且与肠舌状绦虫中国广州分离株种属亲缘关系较近, 与其他绦虫所属分支相距较远。初步阐明了鉴定的肠舌状绦虫分离株与其他种属之间的系统发育关系。

关键词: 青海湖; 裸鲤; 舌状绦虫; 分子鉴定; 系统发育

中图分类号: S941.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2018)01-0033-06

青海湖(Qinghai Lake)位于我国青藏高原东北部、青海省境内, 是我国最大的内陆咸水湖。该湖孕育的青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)是湖中唯一特有鱼类, 又名青海湖湟鱼, 不仅是青海湖及其支流的重要高原特色耐低温盐碱性经济鱼类, 还是《中国物种红色名录》收录特色珍稀保护物种^[1,2]。肠舌状绦虫裂头蚴(*Ligula intestinalis plerocercoid*)是引起鱼类寄生虫病的一种绦虫幼虫, 其成虫寄生于水鸟的肠道中, 由水鸟排出带虫卵的粪便到水中并孵化为钩蚴, 钩蚴被水蚤吞食后在其体内发育为原尾蚴, 带原尾蚴的水蚤被鱼类吞食后发育为裂头蚴, 感染裂头蚴的鱼被水鸟捕食后在其肠内发育成成虫并产卵, 就此完成寄生生活史^[3]。肠舌状绦虫裂头蚴在青海湖裸鲤体内可生长发育, 且生长可达数十厘米甚至几米, 严重挤压裸鲤体内器官迫使其萎缩, 特别是对鱼性腺的发育造成巨大影响^[4], 严重时导致裸鲤死亡, 是裸鲤养殖及渔业资源

保护的大敌^[3-5]。感染有肠舌状绦虫裂头蚴的裸鲤被水鸟水禽等吞食后, 裂头蚴可在肠中发育为成虫, 成虫对鸟类的健康可能同样会造成影响。

形态学鉴定是经典的传统的分类鉴定方法, 但是对于形态特征简单, 或者幼虫相似的鉴定存在局限性, 这就需要用分子生物学方法对寄生虫进行辅助分类鉴定。其中, PCR扩增及DNA序列多态性同源性分析是更有效的方法之一^[6]。Bouzid等^[5]选用CO I 和COB基因进行遗传分子进化研究, 发现不同地区的*L. intestinalis*及其宿主特异性是*L. intestinalis*发生生殖隔离及种系进化的重要力量, 鸟类的迁徙可能使种系同质, 打破了生殖隔离的遗传障碍。本研究利用舌状绦虫核基因18S rRNA基因和线粒体基因CO I 和COB基因进行裸鲤舌状绦虫裂头蚴分子鉴定, 并基于这3个基因的联合分析对舌状绦虫裂头蚴分离株分子进化发育进行研究。

收稿日期: 2017-01-09; 修订日期: 2017-05-14

基金项目: 绒毛用羊疾病防控(治)关键技术与示范(CARS-39-6B); 国家外国专家局“千人计划”高层次外国专家项目(WQ20136300172)资助 [Supported by the Project of Research and Demonstration of Key Technologies For Prevention and Treatment of Diseases of Wool Sheep and Cashmere Goat (CARS-39-6B); SAFEA: “1000 Talent Plan for High-Level Foreign Experts” Program (WQ20136300172)]

作者简介: 张学勇(1986—), 男, 河北承德人; 硕士, 助理研究员; 研究方向为动物疫病的诊断和防治。E-mail: zhang_xyong@163.com

通信作者: 马利青, 硕士, 研究员, 硕士研究生导师; E-mail: maliq67@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 样品获取及基因组DNA的提取

当地兽医从死亡的青海湖裸鲤体内发现“面条样”寄生虫: 虫体呈现乳白色, 扁平长带状不分节, 长约40 cm(图 1)。剪取0.5 cm³大小的组织块分别放入新的保存管中, 用剪刀剪碎组织, 利用天根DNA提取试剂盒提取DNA, 具体操作步骤按照试剂盒使用说明书进行, DNA置于-20℃长期保存。



图1 “面条样”虫体标本

Fig. 1 The specimen of noodle-like parasite

1.2 PCR分子鉴定

利用Primer3 Input (version 0.4.0)软件, 基于GenBank基因组数据库18S rRNA基因和CO I 和COB基因设计引物进行PCR分子生物学鉴定。所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 1)。PCR扩增酶为宝生物工程(大连)有限公司的PremixTaq酶, 扩增反应体系如下: Premix Taq 25.0 μL, 上下游引物(浓度10 μmol/L)各2 μL, 模板DNA 3 μL, 补充水18 μL至PCR反应体系为50 μL。扩增后PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶中进行电泳(电压120 V, 时间30min), 电泳完成后在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

1.3 基因测序分析

PCR阳性产物测序委托北京金唯智生物科技有限公司完成, 采用Sanger双脱氧链终止法进行双向测序。测序结果经峰图分析后, 在GenBank上用

采用BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)方法进行同源序列搜索, 应用MEGA 5.0软件和Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)在线软件进行分析核苷酸序列和氨基酸序列的同源性。

1.4 序列比对与构建系统发育树

通过NCBI提供的BLAST在线搜索服务软件获取其他舌状绦虫的18S rRNA基因和CO I 和COB基因序列。使用MEGA 5.0软件的系统发育树构建功能对这些基因序列进行分析, 选择邻近法(Neighbor-Joining method, NJ)构建系统发育树, 并使用自展值(Bootstrap)检验其可靠性, 重复次数为2000, 分析不同分离株绦虫间的进化关系。

2 结果

2.1 PCR分子鉴定

利用基因组DNA提取试剂盒提取DNA后, 基于18S rRNA基因进行PCR扩增, 扩增出约569 bp的目的片段; 基于CO I 基因进行PCR扩增鉴定, 扩增出396 bp的目的片段; 同样基于COB基因进行PCR扩增鉴定, 扩增出405 bp的目的片段; 将PCR产物进行测序, 所得序列在GenBank用BLAST进行同源序列搜索并上传至GenBank(18S rRNA基因登录号为KY321842、CO I 基因登录号为KY321844和COB基因登录号为KY321843), 分别与*L. intestinalis*三种基因具有较高的同源性(表 2), 结果表明疑似样品在分子生物学上鉴定为*L. intestinalis*。

2.2 基因同源性比较分析

用Clustal Omega在线软件的Clustal2.1方法, 将本研究鉴定克隆序列KY321842 (18S rRNA基因序列)、KY321844 (CO I 基因序列)和KY321843 (COB基因序列)与已上传到GenBank上的*L. intestinalis*核苷酸序列分别进行同源性比较(表 2), 结果表明18S rRNA基因序列与AF254121 (中国)、KC900974 (伊朗)的核苷酸序列同源性分别为100.00%和98.99%; CO I 基因序列与AF153910 (中国)、JQ279102 (突尼斯)、JQ279074 (阿尔及利亚)的核苷酸序列同源性分别为99.49%、93.38%和

表 1 舌状绦虫PCR分子生物学鉴定所用引物

Tab. 1 Primers used for identification of *Ligula intestinalis*

靶基因 Target gene	引物序列 Primers sequences (5'—3')	T_m 参考值 T_m reference value (°C)	PCR产物大小 PCR product length (bp)
18S rRNA基因	AAGGACATTACACGTTCCGTCTAT AGTGATCCACCGCATAGAGTTGTA	60	569
CO I 基因	TACGTCTTAATTTTACCTGGTTTTG TACCACGAATCAAGTATCATGTA	55	396
COB基因	ATGGATTTAACTAATGATTCA ATGCAAGTAGAATAAATGTAA	48	405

93.13%, 与EU241310 (俄罗斯)、EU241238 (乌克兰)、JQ279085 (爱沙尼亚)、EU241303 (英国)的核苷酸序列同源性分别为92.62%、92.37%、92.11%和91.86%; *COB*基因序列与JQ279109 (阿尔及利亚)、JQ279139 (突尼斯)、EU241200 (法国)、EU241218 (乌克兰)的核苷酸序列同源性分别为93.32%、93.07%、89.88%和89.60%。同源性比较分析发现, 不同基因的分子标记得出的结论可能不同, 核基因分子标记显示物种变异小, 而线粒体基因标记则显示物种差异较大; 本研究鉴定的分离株

与我国的分离株(18S rRNA基因和*CO I* 基因, GenBank中未有我国*COB*基因记录)序列同源性较高, 同时发现*L. intestinalis*在亚洲(中国和伊朗)、欧洲(乌克兰、俄罗斯、英国和法国)、非洲(突尼斯和阿尔及利亚)都曾被发现并鉴定。

2.3 系统进化分析

选取GenBank已发表的相应序列运用MEGA5.0中的邻近法构建包含分离株的3种基因的相应进化树(图2—4)。基于18S rRNA基因构建的进化树显示: 本研究鉴定克隆的序列KY321842与AF254121

表 2 三种不同基因与其参考序列的核苷酸序列的同源性比较

Tab. 2 The homology comparison of nucleotide sequences of three different genes and reference sequences

18S rRNA基因参考序列 18S rRNA gene reference sequence	核苷酸同源性 Nucleotide homology (%)	<i>CO I</i> 基因参考序列 <i>CO I</i> gene reference sequences	核苷酸同源性 Nucleotide homology (%)	<i>COB</i> 基因参考序列 <i>COB</i> gene reference sequences	核苷酸同源性 Nucleotide homology (%)
KC900981	92.56	EU241312	91.60	EU241218	89.60
KC900973	97.79	AF153910	99.49	JQ279123	88.86
AF254121	100.00	JQ279102	93.38	JQ279138	92.57
KC900978	98.11	JQ279078	92.88	JQ279109	93.32
KC900979	96.57	JQ279074	93.13	JQ279139	93.07
KC900976	95.94	JQ279070	79.13	JQ279113	93.07
KC900974	98.99	EU241303	91.86	JQ279140	92.29
KC900972	98.96	JQ279085	92.11	JQ279107	93.09
KC900977	98.72	EU241310	92.62	JQ279147	93.09
KC900975	97.48	EU241238	92.37	EU241200	89.88

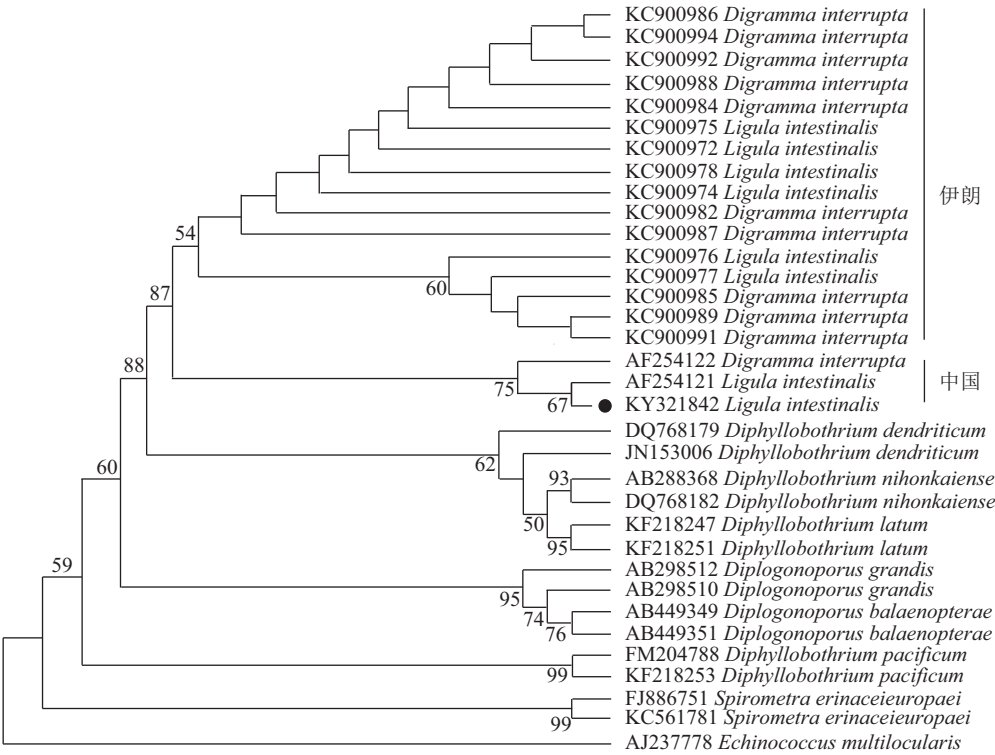


图 2 基于18S rRNA基因序列以邻近法所构建的系统发育树(NJ树)

Fig. 2 The Neighbor-Joining phylogenetic tree based on nucleotide sequences of 18S rRNA gene

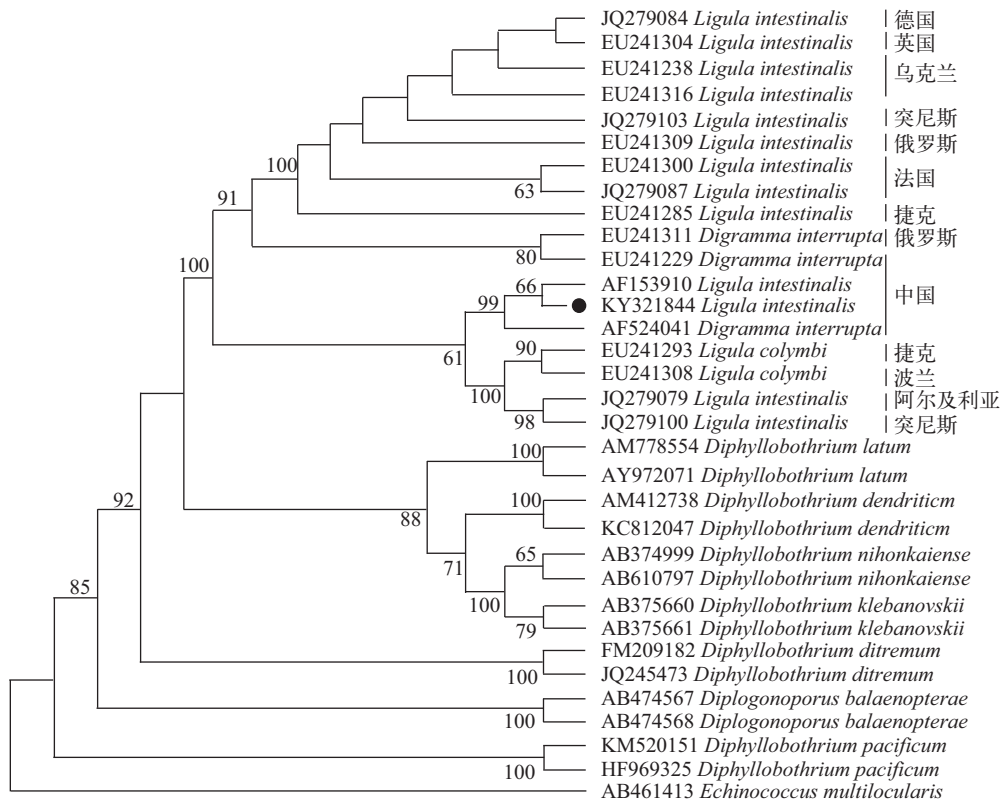


图 3 基于CO I 基因序列以邻近法所构建的系统发育树(NJ树)

Fig. 3 The Neighbor-Joining phylogenetic tree based on nucleotide sequences of CO I gene

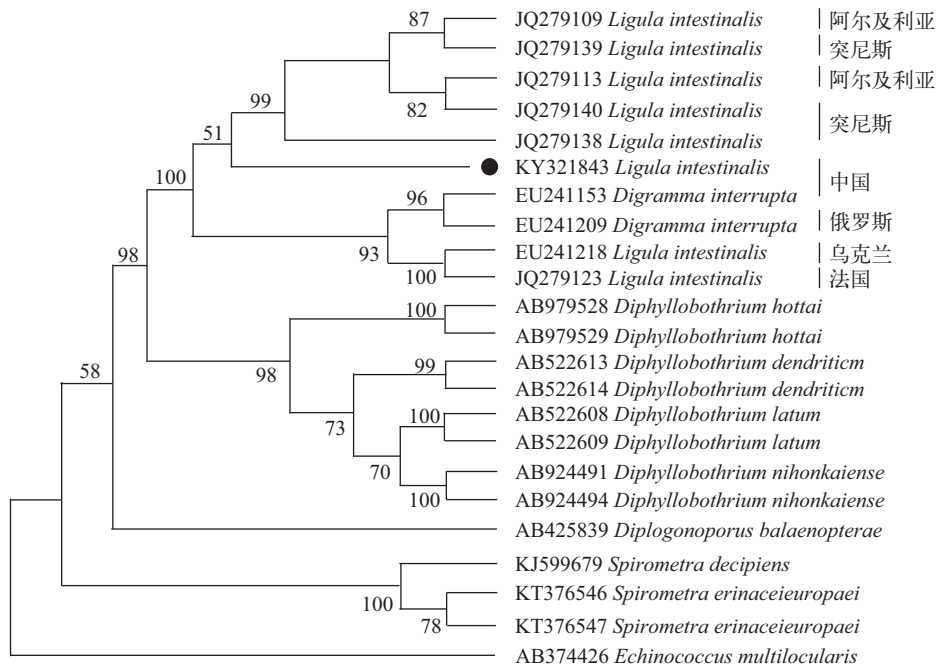


图 4 基于COB基因序列以邻近法所构建的系统发育树(NJ树)

Fig. 4 The Neighbor-Joining phylogenetic tree based on nucleotide sequences of COB gene

中国分离株聚成一支, 也与双线绦虫AF254122中国分离株聚在一大支; 同样*L. intestinalis*伊朗分离株(KC900976/77)与双线绦虫伊朗分离株(KC900985/89/91)也聚在一支上, *L. intestinalis*伊朗分

离株(KC900972/4/5/8)与双线绦虫伊朗分离株(KC9009/82/84/86/87/88/92/94)也聚在一支上; 同时发现舌状绦虫、双线绦虫中国分离株与伊朗的分离株是分开的, 分别聚成两大类群。基于CO I 基

因的进化树显示: 克隆序列KY321844与AF153910舌状绦虫中国分离株聚成一小分支, 也与AF524041双线绦虫中国分离株聚在一支; 舌状绦虫突尼斯(非洲)分离株与其他欧洲国家的舌状绦虫分离株聚在一支。基于*COB*基因的进化树显示: 克隆序列KY321843与舌状绦虫阿尔及利亚分离株(JQ279109/13)和舌状绦虫突尼斯分离株(JQ279138/39/40)聚在一大支; 同时发现舌状绦虫分离株(EU241218和JQ279123)与双线绦虫分离株(EU241153/209)聚在一大支。结果表明, 本研究鉴定的舌状绦虫分离株(青海)与舌状绦虫中国分离株(广州)种属亲缘关系较近, 与其他绦虫所属分支相隔较远, 在进化上得到了很好的鉴别; 中国分离株在进化上与其他地区的分离株遗传进化距离较远。

从3个进化树的分支状况还可发现, 不同地区的舌状绦虫和双线绦虫虽然存在分支跨越, 但是均聚在一个大的分支上, 与其他属种明显分开。这些结果还表明, 18S rRNA和*CO I* 基因均可用于舌状绦虫种的系统发育研究。

3 讨论

本研究利用18S rRNA、*CO I* 和*COB*基因进行了舌状绦虫的分子鉴定。*L. intestinalis*核基因组中的18S rRNA基因虫种间的同源性较高(表 2), 而线粒体基因组中的*CO I* 和*COB*基因的同源性较低(表 2); 而数据显示同一地区的虫种的线粒体基因的同源性较高。可见, 不同基因分子标记可能得出不同的结论, 特别核基因和线粒体基因, 核基因分子标记显示虫种变异小, 而线粒体基因标记则显示虫种差异较大; 同时发现*Digramma* spp.的线粒体基因与*Ligula* spp.的线粒体基因同源性也较高。Li等^[7]研究认为传统分类学上*Ligula*分为2个属(*Ligula Bloch* 1782和*Digramma Cholodkovsky* 1914)也是有争议的, 在基因序列水平上, *Digramma* spp. 种的28S rRNA基因和*CO I* 基因序列与*Ligula* spp.的序列相似性是一致的; 只在*ITS1*基因和*ND1*基因上分别有0.7%和7.4%的不同。28S rRNA、*CO I*、*ITS1*和*ND1*基因都是高度保守的, *Digramma* spp.与*Ligula* spp.之间的4个基因的低遗传分歧表明*Digramma* spp.可能不是独立的属, 还认为中国不同地方采集的*Digramma* spp.应属于*Ligula* spp.^[7], 这与本研究有一定的一致性(图 2—4)。同样, Logan等^[8]研究认为裂头科中的舌状属(*Ligula*)、双线属(*Digramma*)和裂头属(*Diphyllobothrium*)等分类有效性需修订, 认为双线属(*Digramma*)应属于舌状属(*Ligula*),

为一个分类群的复合体, 这与本研究的结果中, 不同地区的舌状绦虫分离株和双线绦虫的分离株都有聚在一支上的现象相吻合(图 2—4)。

Bouzid等^[5-9]研究认为发现, 宿主特异性和地理隔离是促使舌状绦虫种系进化的重要力量, 在欧洲-地中海不同的地区同时存在有宿主特异性的舌状绦虫和地理特异性的舌状绦虫; 如在埃塞俄比亚塔纳湖同一水域却同时存在着两种种系的舌状绦虫。在本研究中, 可见明显的地理特异性的舌状绦虫种系存在, 舌状绦虫中国分离株均聚在同一支进化树上(图 2和图 3)。同时, 不同的欧洲地理株型上大体均聚在一大分支上, 表现了一定的聚集遗传关系, 有较弱的遗传进化关系。终末宿主候鸟均存在频繁迁移现象, 寄生的舌状绦虫种群种系却较为均一, 而在宿主鱼中的舌状绦虫不同地区却有多样化的种群种系关系, 这可能与适应地中海的高浓度盐水的鱼种特异性有关, 鱼群不能够长距离的迁移, 阻碍了舌状绦虫的基因交流^[5-9]; 这与青海湖高纬度高盐度冷水湖的裸鲤相似, 寄生于裸鲤的舌状绦虫具有了地理株型的特异性。Britton等^[10]研究也发现, 在肯尼亚的巴林戈纳湖和奈瓦夏流域的不同宿主中表现出舌状绦虫进化的高度宿主特异性。

本研究对我国青海湖特有鱼种青海湖裸鲤体内感染的*L. intestinalis*幼虫的18S rRNA、*CO I* 和*COB*基因序列进行克隆测序列并进行了分子鉴定; 同时, 运用3种基因进行了裂头科常见属种之间的分子系统发育初步探究, 比较了主要虫种间基因的序列同源性, 得到了系统发育树, 初步阐明了鉴定种与其他种属之间的系统发育关系。

参考文献:

- [1] Cao L, Zhang E, Zang C X, et al. Evaluating the status of China's continental fish and analyzing their causes of endangerment through the red list assessment [J]. *Biodiversity Science*, 2016, 24(5): 598—610 [曹亮, 张鹏, 臧春鑫, 等. 通过红色名录评估研究中国内陆鱼类受威胁现状及其成因. 生物多样性, 2016, 24(5): 598—610]
- [2] Wang C X, Shi J Q, Wei F L, et al. AFLP genetic diversity of scaleless carp (*Gymnocypris przewalskii*) in different freshwater tributaries of Qinghai Lake [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(1): 82—89 [王朝溪, 史建全, 卫福磊, 等. 青海湖不同支流中青海湖裸鲤的AFLP遗传多样性分析. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(1): 82—89]
- [3] Carter V, Pierce R, Dufour S, et al. The tapeworm *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidae) inhibits LH expression and puberty in its teleost host, *Rutilus rutilus* [J]. *Reproduction*, 2005, 130(6): 939—945

- [4] Trubiroha A, Kroupova H, Frank S N, *et al.* Inhibition of gametogenesis by the cestode *Ligula intestinalis* in roach (*Rutilus rutilus*) is attenuated under laboratory conditions [J]. *Parasitology*, 2011, **138**(5): 648—659
- [5] Bouzid W, Stefka J, Hypsa V, *et al.* Geography and host specificity: two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphylobothriidae) [J]. *International Journal for Parasitology*, 2008, **38**(12): 1465—1479
- [6] Liu Z K, Zhao G H, Liu G H, *et al.* Sequence and phylogenetic analysis of mitochondrial nad5 and rrnS genes for *Spirometra erinaceieuropaei* isolates from Hunan province [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, **32**(2): 258—261 [刘自逵, 赵光辉, 刘国华, 等. 湖南省猬迭宫绦虫的线粒体nad5和rrnS基因的序列测定及种系发育分析. 中国兽医学报, 2012, **32**(2): 258—261]
- [7] Li J, Liao X. The taxonomic status of *Digramma* (*Pseudophyllidea: Ligulidae*) inferred from DNA sequences [J]. *Journal of Parasitology*, 2003, **89**(4): 792—799
- [8] Logan F J, Horak A, Stefka J, *et al.* The phylogeny of diphylobothriid tapeworms (*Cestoda: Pseudophyllidea*) based on ITS-2 rDNA sequences [J]. *Parasitology Research*, 2004, **94**(1): 10—15
- [9] Stefka J, Hypsa V, Scholz T. Interplay of host specificity and biogeography in the population structure of a cosmopolitan endoparasite: microsatellite study of *Ligula intestinalis* (*Cestoda*) [J]. *Molecular Ecology*, 2009, **18**(6): 1187—1206
- [10] Britton J R, Jackson M C, Harper D M. *Ligula intestinalis* (*Cestoda: Diphylobothriidae*) in Kenya: a field investigation into host specificity and behavioural alterations [J]. *Parasitology*, 2009, **136**(11): 1367—1373

MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC STUDY OF *LIGULA INTESTINALIS* PLEROCEROID IN *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* FROM THE QINGHAI LAKE, CHINA

ZHANG Xue-Yong^{1,2}, JIAN Ying-Na^{1,2}, LI Xiu-Ping^{1,2}, PEI Quan-Bang³, WANG Ge-Ping^{1,2},
WANG Guang-Hua^{1,2}, CAI Qi-Gang^{1,2} and MA Li-Qing^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, the Academy of Animal and Veterinary Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Qinghai Academy of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Xining 810016, China; 3. Sanjiaocheng Sheep Breeding Farm of Qinghai Province, Gangcha 812300, China)

Abstract: To identify *Ligula intestinalis* pleroceroide parasitizing in the abdominal cavity of *Gymnocypris przewalskii* and analyze its phylogenetic status from Qinghai Lake, China, polymerase chain reaction (PCR) of 18S ribosomal RNA gene, *CO I* and *COB* gene was carried out. Their sequences homologies with other tapeworm species were analyzed and the phylogenetic relationships were inferred. The results showed that the noodle-like parasite was identified as *L. intestinalis*, and that its 18S rRNA gene homogeneity was 100.00% with AF254121 (China), and *CO I* and *COB* gene homogeneities were 99.49% and 93.32% with AF153910 (China) and JQ279109 (Algeria), respectively. Furthermore, the phylogenetic trees based on the 18S rRNA, *CO I* and *COB* gene sequences indicated that the collected tapeworm was in the same branch with *L. intestinalis*, which are close to the isolated species from China. The phylogenetic relationship between the identified *L. intestinalis* and other tapeworm species was elucidated.

Key words: Qinghai Lake; *Gymnocypris przewalskii*; *Ligula intestinalis*; Molecular identification; Phylogeny