

## 中国9种嗜子宫线虫系统发育的初步研究

吴山功<sup>1,2</sup> 王桂堂<sup>1</sup> 李文祥<sup>1</sup> 聂品<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072;2. 中国科学院研究生院,北京 100039)

**摘要:**为了探讨鱼类寄生嗜子宫线虫的系统发育关系,测定了8种嗜子宫线虫的 ITS rDNA(核糖体转录内间隔区核糖核酸)序列和9种嗜子宫线虫的 18S rDNA(小亚基核糖体核糖核酸)部分序列,并构建了 18S rDNA 序列的系统发育树。在比较和分析 ITS rDNA 和 18S rDNA 两种分子标记对嗜子宫科线虫系统发育适用性的基础上,分析了嗜子宫线虫的系统发育关系。结果表明:中国嗜子宫线虫是单系起源;黄颡鱼似嗜子宫线虫、赣州似嗜子宫线虫和棍头嗜子宫线虫亲缘关系非常接近,可能是较晚形成的种;似嗜子宫线虫属可能应该被细分为更多的属。

**关键词:**嗜子宫线虫;内转录间隔区;小亚基核糖体核糖核酸;系统发育

**中图分类号:**Q959.17 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2005)05-0571-05

嗜子宫线虫(Philometrids)是一类重要的寄生线虫,目前已报道的共有13属,100多个种,中国境内有4属13种,3个未定种。它们主要寄生在鱼体内,也有极少数寄生于人体<sup>[1]</sup>。其雌虫个体大,感染强度较高,对鱼类会造成一定的危害<sup>[2,3]</sup>。由于在自然界中,它们的雄虫非常小,寄生在鱼体内的时间短,因而难以被发现,通常仅能见到雌虫。所以嗜子宫线虫的分类主要依据成熟雌虫的特征、寄生部位和宿主特异性等<sup>[4-9]</sup>。但成熟雌虫由于适应寄生生活的需要,许多特征已经退化(如阴门、肛门缺失,口简单等),因此形态分类相当困难;同时,以前报道的绝大多数种类都是在光学显微镜下描述的,一些细微的特征很难被发现<sup>[10,11]</sup>,虽然近来随着电子显微镜的运用,许多以前没有发现的特征得到了描述,还有一些从前未曾描述清楚的特征也被重新观察,但由于分类标准不统一,所以嗜子宫线虫的分类就显得很混乱,争议颇多<sup>[6,12,13]</sup>。争议主要集中在体表疣突(Bosses),头乳突(Cephalic papillae)等在分类中的意义以及似嗜子宫线虫属(*Philometroides*)命名的合理性等问题上。此外,有人还认为现在的龙线超科(Dracunculoidea)[包括嗜子宫科(Philometridae)]的分类很不合理,没有真正

反映它们的系统发育关系<sup>[1]</sup>。因而作者认为有必要对嗜子宫线虫进行系统发育研究,以阐明该科内各种类间的发育关系。

系统发育研究是通过形态特征或合适的分子标记提供的信息位点,来构建系统发育树,从而进行发育关系分析。由于嗜子宫线虫的形态特征相当少,并且线虫中形态趋同进化广泛存在<sup>[14]</sup>,因而难以仅依据形态特征进行其系统发育研究,所以分子标记提供的大量信息位点就显得特别重要。事实上,在对线虫的研究中,核糖体转录内间隔区核糖核酸(ITS rDNA);小亚基核糖体核糖核酸(18S rDNA)已经被成功地用于系统发育分析<sup>[14-18]</sup>。本文也分别选用了 ITS rDNA、18S rDNA 两种分子标记对中国嗜子宫线虫的系统发育进行了初步探讨,目的是筛选适合于嗜子宫线虫系统发育研究的分子标记,以分析嗜子宫线虫的系统发育关系。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 所用材料包括四属九种嗜子宫线虫(表1),所有标本依据其形态学特征在显微镜下进行鉴定。样品用0.6%的生理盐水清洗,然后保存在福尔马林溶液或80%的酒精中。

收稿日期:2004-09-15;修订日期:2005-05-28

基金项目:国家自然科学基金项目(30371102);“973”项目(2002CB412308);中国科学院创新领域前沿课题资助

作者简介:吴山功(1974—),男,安徽省天长市人;在读硕士研究生;从事鱼类寄生虫学与免疫学研究

通讯作者:王桂堂, E-mail:gtwang@ihb.ac.cn

表 1 嗜子宫线虫的种类、宿主、ITS 和 18S rDNA 序列长度数据  
Tab.1 Hosts, geographical origins, and ITS and 18S rDNA sequence length of the philometrids used

物种 Species	宿主 Host	来源 Geographical Origin	序列长度 Sequence Length(bp)	
			ITS	18S
藤本嗜子宫线虫 <i>Philometra fujimotoi</i>	乌鳢 <i>Channa argus</i>	长江上游(四川泸州) the Upper Yangtze River	1069	879
棍头嗜子宫线虫 <i>P. clavaiceps</i>	红鳍原鲃 <i>Cultrichthys erythropterus</i>	梁子湖(湖北) Liangzi Lake, Hubei	1060	929
麦穗鱼嗜子宫线虫 <i>Philometroides pseudorasbori</i>	麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	黄河(山东临邑) the Yellow River		895
鲫似嗜子宫线虫 <i>P. carassii</i>	鲫 <i>Carassius auratus</i>	汤逊湖(湖北) Tangxun Lake, Hubei	883	895
赣州似嗜子宫线虫 <i>P. ganzhounensis</i>	花鲢 <i>Hemibarbus maculatu</i>	陡水水库(江西) Doushui Reservoir, Jiangxi	1096	923
鲤似嗜子宫线虫 <i>P. cyprini</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	保安湖(湖北) Baoan Lake, Hubei	952	895
黄颡鱼似嗜子宫线虫 <i>P. fulvidraconi</i>	黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	江口水库(江西) Jiangkou Reservoir, Jiangxi	1016	930
鲢棍形线虫 <i>Clavinema parasiluri</i>	鲢 <i>Silurus asotus</i>	军山湖(江西) Junshan Lake, Jiangxi	1372	882
<i>Densiphilometra monopteri</i>	黄鳊 <i>Monopterus albus</i>	牛山湖(湖北) Niushan Lake, Hubei	763	934
<i>Philonema</i> sp.		GenBank		893
黄颡前形蛇线虫 <i>Procamallanus fulvidraconis</i>	黄颡鱼 <i>Monopterus albus</i>	梁子湖(湖北) Liangzi Lake, Hubei	1090	888

**1.2 线虫总 DNA 的提取** 对于酒精固定的样品,将线虫在 TE(pH8.0)中浸泡两天,以去除酒精,基因组 DNA 的提取按照 Sambrook 等<sup>[19]</sup>的方法;而对于甲醛固定的样品,则按照 Dorris 等<sup>[16]</sup>的方法提取基因组 DNA。提取的 DNA 溶解在 TE (pH8.0) 中, -20℃ 保存备用。

**1.3 线虫 ITS rDNA 序列的扩增与测定** ITS rDNA 序列用特异性引物(正向引物: TW1 5'-GTTTCCG-TAGGTGAACCTGC-3',反向引物: AB28 5'-ATATGCT-TAAGTTCAGCGGCT-3'。它们分别对应于 18S rDNA 的 3' 端和 28S rDNA 的 5' 端保守序列)<sup>[18]</sup> 进行扩增。PCR 反应体系体积为 25μL。反应条件为 94℃ 1min, 55℃ 1.5min, 72℃ 2min, 共 35 个循环。反应前 94℃ 预变性 4min, 反应后 72℃ 延伸 10min。同时以宿主基因组及未加任何基因组成分的体系, 同样的条件进行 PCR 扩增来作为对照。PCR 产物用 Omega Bio-Tek 公司的 PCR 产物纯化试剂盒回收, 连接到 PGEM-T 载体上, 再转化到 *E. coli* M15 中。测序工作由上海博亚公司完成。序列 GeBanK 登录号 D0076680-DQ076689。

**1.4 18S rDNA 序列的扩增与测定** 18S rDNA 序列的扩增与测定除了引物是线虫特异性引物(SSUA, SSU26R)<sup>[16]</sup>, PCR 反应退火温度是 52℃, 延伸时间是 1min 外, 其他条件都与 ITS rDNA 序列的扩增与测定一样。序列 GeBank 登录号 D0076680—

D0076689。

**1.5 分子系统发育树的构建** 以黄颡前蛇形线虫 (*P. fulvidraconis*) 作为外类群, 用软件 Clustal X(1.8)<sup>[20]</sup> 进行 DNA 序列排定并人工校正, DnaSP3.50<sup>[21]</sup> 来分析序列信息。使用 PHYLIP3.5c 软件包<sup>[22]</sup> 构建 NJ(Neighbor-joining) 树: 先用 SEQBOOT 生成 100 个 bootstrap 样本, 再以 DNAdist 生成遗传距离矩阵(遗传距离模型选择 Kimura 二参数模型, 转换/颠换比为 2.0); 然后用 NEIGHBOR 构建 100 棵距离树, 最后用 CON-SENSE 将他们合并为一棵。

用 TreeView(1.6)<sup>[23]</sup> 读取系统发育树文件。

**2 结果**

**2.1 ITS rDNA 序列**

用 ITS rDNA 引物测定了八种嗜子宫线虫的 ITS1 和 ITS2 rDNA 序列及 31bp 的 18S rDNA3' 末端、5.8S rDNA 和 46bp 的 28S rDNA5' 末端。其中 ITS1 rDNA 序列长度从 445 到 940bp, 变化较大; ITS2 rDNA 序列变化相对较小, 从 318 到 514bp; 而 5.8S rDNA 则几乎没有变化, 在 153 到 155bp 之间。序列的变化主要来自于插入与缺失, 转换与颠换较少发生。

序列经 Clustal X(1.8) 排序后, 由于 ITS rDNA 序列变化太大, 相似性较低。用 Mgea2 软件计算的 Kimura 双因子遗传距离在 0.0732—0.9882 之间, 除黄颡鱼似嗜子宫线虫 (*P. fulvidraconi*)、赣州似嗜子宫线

虫(*P. ganzhounensis*)、棍头嗜子宫线虫(*P. clavaiceps*)的距离值相对较小(在 0.0732 到 0.1443 间)外,其他种类间的距离最小值为 0.4135,最大值是 0.9882。

由于这些种类的 ITS rDNA 序列之间相似性很低,其遗传距离值又很大,所以无法构建系统发育树。

## 2.2 18S rDNA 序列

用线虫特异性引物测定了 9 种嗜子宫线虫的 18S rDNA 部分序列,另从 GenBank 上获得了一种嗜子宫线虫(*Philonema* sp.)的 18S rDNA 序列,这些序列的长度在 879—934bp 之间。序列变化主要也是插入与缺失,转换与颠换很少。18S rDNA 序列经 Clustal X(1.8)排序后,生成的 943 个核苷酸位点中,变异位点 140 个,信息位点 69 个。GC 含量在

46.0%—47.4% 之间。

用 NJ 法计算出的这些嗜子宫线虫之间的 Kimura 双因子遗传距离在 0—0.1199 之间。

在 18S rDNA 序列构建的系统发育 NJ 树(图 1)中,除个别种类外,似嗜子宫线虫属的线虫首先聚在一起,接着与棍形线虫属(*Clavinema*)的线虫相聚,然后再依次与嗜子宫线虫属、*Dentiphilometra* 属和 *Philonema* 属线虫相聚。虽然整个树的支持率相对较高,但似嗜子宫线虫属的支持率很低,只有 34%,而且,嗜子宫线虫属的棍头嗜子宫线虫穿插在似嗜子宫线虫属中,并且以 100% 的支持率与赣州似嗜子宫线虫相聚,然后又以 100% 的支持率同黄颡鱼似嗜子宫线虫相聚。

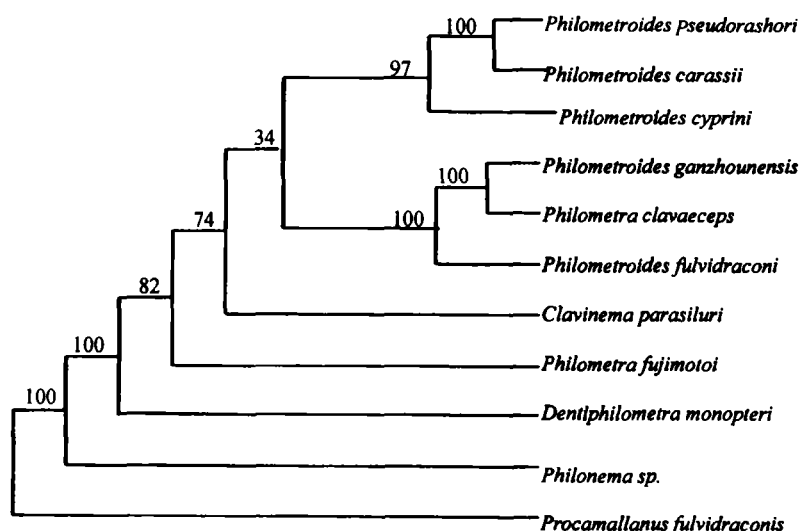


图 1 运用 NJ 法构建的嗜子宫线虫的 18S rDNA 序列系统发育树,节点显示 100 次重复抽样检验的自展值

Fig.1 Phylogenetic tree of the philometridae based on 18S rDNA sequences by using the NJ method. The numbers on the branches indicate the bootstrap values

## 3 讨论

本文所研究的中国嗜子宫线虫 ITS rDNA 序列经 Clustal X (1.8)排序后显示为不相关的序列,差异太大,遗传距离最大值达到了 0.9882,所以作者认为 ITS 区域 rDNA 序列不适宜用于嗜子宫线虫科内种类间的系统发育研究。在嗜子宫科中,ITS rDNA 序列差异太大的主要原因是 ITS rDNA 是非编码区,经受的进化压力较小,从而随着物种长期进化会发生很大的变化。这也从另一侧面反映了嗜子宫线虫起源的古老<sup>[24]</sup>。

18S rDNA 是蛋白编码区,经受的进化压力大,它的变化很缓慢。在 18S rDNA NJ 树中,我国嗜子宫线虫紧紧地聚在一起,形成一个单系,bootstrap 值高达 100%。18S rDNA 系统树把嗜子宫线虫不同属

较好地分开了。说明 18S rDNA 适合嗜子宫科线虫的系统发育研究。

黄颡鱼似嗜子宫线虫、赣州似嗜子宫线虫、棍头嗜子宫线虫这三种嗜子宫线虫的 ITS rDNA 序列差异较小,在 18S rDNA 系统树中,它们又以 100% 的支持率聚在一起;在形态上这三个种也很相似,而且仅在中国分布,因而认为它们是较晚形成的种类。然而,根据现行的分类系统,它们被分在两个属(似嗜子宫线虫属和嗜子宫线虫属)中,主要依据是前两者体表分布有疣突,而后者没有,说明体表疣突在现行的嗜子宫线虫分类系统中被认为是一个重要的属间分类特征。作者认为,疣突仅为一个体表附属结构,很容易发生变异,因此,它不足以作为嗜子宫线虫属间分类的最主要依据。

在 18S rDNA NJ 树中,似嗜子宫线虫聚为一大

枝(中间穿插有棍头嗜子宫线虫),但支持率很低(BS = 34);如果将这一大枝分成两个小分枝,那么每一枝的支持率却很高,分别达到 100% 和 97%。这有力地支持了伍惠生<sup>[25]</sup>和 Moravec 及 Van As<sup>[6]</sup>的观点,即:似嗜子宫线虫属的分类特征定位是不合适的,体表的疣突不能作为分属的主要依据,应该依据其他更重要的特征把似嗜子宫线虫属细分为更多的属。本研究所涉及的嗜子宫线虫种类有限,进一步的研究应该包括更多的种,以更好地阐明嗜子宫线虫科内属间及属内种间的系统关系。

### 参考文献:

- [1] Moravec F. Some aspects of the taxonomy and biology of dracunculoid nematodes parasitic in fishes: a review [J]. *Folia Parasitol*. 2004, 51:1—13
- [2] Yu Y, Wang G T, Feng W, et al. Philometroidiasis of yellow catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*: life cycle of the pathogen and its epidemiology. *Transactions of researches on fish diseases* [J]. 1993, 1:116—122 [余仪, 王桂堂, 冯伟, 等. 黄颡鱼似嗜子宫线虫病病原生活史及流行病学调查. 鱼病学研究论文集. 1993, 1:116—122]
- [3] Yu Y. *Philometroides ganzhouensis* n. sp. (Nematoda: Philometridae), with a note on the philometroidesis of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, 22 (suppl.): 77—82 [余仪. 赣州似嗜子宫线虫及其病害研究. 水生生物学报, 1998, 22 (增刊): 77—82]
- [4] Moravec F, Salgado-Maldonado G, Aguilar-Aguilar R. Two new nematodes, *Paraseuratoides ophisterni* gen. et sp. n. (Quimperiidae) and *Philometra ophisterni* sp. n. (Philometridae), from the swamp-eel *Ophisternon aenigmaticum* in Mexico [J]. *Folia Parasitol (Praha)*. 2002, 49(2): 109—117
- [5] Moravec F, Shaharom-harrison F. *Paraphilometroides nemipteri* gen. et sp. n. (nematoda: Philometridae) from the marine fish *Nemipterus peronii* (Valenciennes) from Malaysia [J]. *Folia parasitol (Praha)*. 1989, 36(4): 345—350
- [6] Moravec F, Van As J G. *Philometroides africanus* sp. n. (Nematoda: Philometridae), a new tissue parasite of the African pike *Hepsetus odoo* (Pisces) in Botswana [J]. *Folia Parasitol (Praha)*. 2001, 48(2): 127—131
- [7] Moravec F, Vidal-Martinez V M, Aguirre-Macedo M L, et al. First description of the male and redescription of the female of *Philometra salgadoi* Vidal-Martinez et al. 1995 (Nematoda: Philometridae) from the ocular cavity of the marine fish *Epinephelus morio* in Mexico [J]. *Parasitol Res*. 2001, 87(9): 526—529
- [8] Raaheed S. A revision of the genus *Philometra* Costa, 1845 [J]. *J. Helminthol*. 1963, 37: 89—130
- [9] Vidal-Martinez V M, Aguirre-Macedo M L, Moravec F. *Philometra (Ranjinema) salgadoi* n. sp. (Nematoda: Philometridae) from the ocular cavity of the red grouper *Epinephelus morio* (Pisces: Serranidae) from the Yucatan peninsula, Mexico [J]. *J. Parasitol*. 1995, 81(5): 763—766
- [10] Blaylock R B, Overstreet R M. *Margolisianum bulbosum* n. gen., n. sp. (Nematoda: Philometridae) from the southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Pisces: Bothidae), in Mississippi Sound, USA [J]. *J. Parasitol*, 1999, 85(2): 306—312
- [11] Moravec F. The morphology and systematic status of *philometra ovata* (Zeder, 1803) (Nematoda: Philometridae) [J]. *Folia Parasitol*. 1986, 33: 227—233
- [12] Moravec F. Redescription of the nematode *Philometra obturans* (Prenant, 1886) with a key to the philometrid nematodes parasitic in European freshwater fishes [J]. *Folia Parasitol*. 1978, 25: 115—124
- [13] Moravec F, Salgado-Maldonado G, Aguilar-Aguilar R. *Neophilometroides* n. gen. (nematoda: Philometridae) for *Philometroides caudatus* Moravec, Scholz and Vivas-Rodriguez, 1995, with erection of *Neophilometroidinae* n. subfam [J]. *J. Parasitol*. 2002, 88(4): 774—777
- [14] Blaxter M L, De Ley P, Garey J R, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum nematoda [J]. *Nature*. 1998, 392(6671): 71—75
- [15] Adams B J, Burnell A M, Powers T O. A phylogenetic analysis of *Heterorhabdus* (Nemata: Rhabditidae) based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA sequence data [J]. *J. Nematol*. 1998, 30: 22—39
- [16] Dorris M, Viney M E, Blaxter M L. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes [J]. *Int J. Parasitol*. 2002, 32(12): 1507—1517
- [17] Ferris V R. Evolution, phylogeny and systematics [M]. Kluwer Academic, Dordrecht, 1998, 57—82
- [18] Subbotin S A, Vierstraete A, De Ley P, et al. Phylogenetic Relationships within the Cyst-Forming Nematodes (Nematoda, Heteroderidae) Based on Analysis of Sequences from the ITS Regions of Ribosomal DNA [J]. *Mol Phylogenet Evol*. 2001, 21(1): 1—16
- [19] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (eds). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* 2nd ed [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 1989
- [20] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acid Res*. 1997, 25: 4876—4882
- [21] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis [J]. *Bioinformatics*. 1999, 15: 174—175
- [22] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c [P]. Seattle, Washington: Department of Genome Sciences, University of Washington. 1993
- [23] Page R D M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, 12: 357—358
- [24] Chabaud A G, Bain O. The evolutionary expansion of the Spirurida [J]. *Int J. Parasitol*. 1994, 24(8): 1179—1201
- [25] Wu H S. Parasitic nematoda of Liaoh River, Parasitic organisms of freshwater fish of China [J]. 1984, 177—200 [伍惠生. 辽河鱼类寄生线虫, 中国淡水鱼类寄生线虫论文集, 1984, 177—200]

## A PRELIMINARY STUDY ON PHYLOGENY OF NINE SPECIES OF PHILOMETRIDS IN CHINA

WU Shan-Gong<sup>1,2</sup>, WANG Gui-Tang<sup>1</sup>, LI Wen-Xiang<sup>1</sup> and NIE Pin<sup>1</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

**Abstract:** Because of difficulties in finding males of philometrids, they are usually recognized by females only. The character of the female is lacking, so many arguments arise on the present classification system of this nematode. To reveal the phylogenetic relationships of the philometrids collected in China, the internal transcribed spacer region rDNA (ITS rDNA) of 8 species and the partial small subunit rDNA (18S rDNA) of 9 species were sequenced. Due to great divergence in the sequences, ITS rDNA was not considered suited for the phylogenetic studies in philometrids. Regarding 18S rDNA, an alignment of 943 nucleotide sites was obtained, of which, variable sites were 140 including 69 parsimony informative sites. Sequence divergence among the philometrids analyzed ranged from 0 between close species to 11.99% between distant species. In contrast with ITS rDNA, 18S rDNA was the more reliable marker for analyzing the phylogenetic position of the philometrids, thereby a phylogenetic tree based on the sequences of 18S rDNA was constructed. It was found that the tree strongly supported the philometrids in China to be a monophyly. The three species, *Philometroides fulvidraconi*, *P. ganzhounensis* and *Philometra claviceps* were very close in relationship, and might be appeared lately in history. The structure of the Cuticular bosses of philometrids was suggested to be lost easily in rapid evolution of the nematodes, thus it should not to be regarded as one of the most important distinct characteristics of the genus *Philometroides* from other genera. According to the present data and the previous opinions of other researchers, it was suggested that the genus *Philometroides* should be divided into different genera.

**Key words:** Philometrids; Internal transcribed spacer; Small subunit rRNA; Phylogeny