

doi:10.3969/j.issn.1005-0507.2011.03.004

# 青南高原地区高原鼠兔棘球蚴的 分子鉴定和遗传分化分析\*

马俊英<sup>1</sup> 林恭华<sup>2</sup> 王虎<sup>1\*\*</sup> 吴献洪<sup>1</sup> 贾宁<sup>3\*\*</sup>

(1. 青海省地方病预防控制所, 西宁 811602; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008;  
3. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘要** 基于线粒体 *cox1* 基因部分序列对青南高原地区称多、达日、玛沁 3 县高原鼠兔感染的 20 份棘球绦虫幼虫 (棘球蚴) 样品进行分子鉴定和遗传分化分析。在测序获得的 700 bp 长度序列中检测到 17 个变异位点, 其中 11 个为简约信息位点。共检测到 9 个单倍型, 最大简约法和最大似然法都表明这些单倍型都属于石渠棘球绦虫。遗传距离和聚类分析显示, 称多和达日种群遗传距离最近, 而玛沁种群与称多、达日以及首次报道的石渠县样本的遗传关系较远, 此外玛沁种群的遗传多样性要高于其他 2 个种群, 推测玛沁地区可能是青南地区石渠棘球绦虫的起源地之一。单倍型谱系关系分析显示, 所有单倍型以及之前报道 (Xiao *et al.*, 2005) 的石渠县样本以 H1 为中心形成辐射状结构, 这与前人的研究结论即石渠棘球绦虫单倍型呈现链状结构相反, 显示出石渠棘球绦虫遗传分化规律的复杂性。

**关键词** 石渠棘球绦虫; 分子鉴定; 遗传分化; 谱系关系

棘球蚴病 (Echinococcosis) 又称包虫病 (Hydatid disease), 是由棘球属 *Echinococcus* spp. 绦虫寄生人和动物引起的一类重要的、具有地方流行特征的人兽共患寄生虫病。疾病呈世界性分布, 以发展中国家流行较为严重 (许隆祺等, 2000; Moro *et al.*, 2009)。棘球属绦虫的终宿主为狗、猫、狐等食肉类动物, 成虫寄生于小肠, 人和其他中间宿主可被终宿主粪便中的虫卵所感染。续绦期绦虫 (棘球蚴) 寄生于中间宿主, 主要在肝脏, 也可寄生于腹腔、肺、脑等处, 引起相应部位的棘球蚴病, 严重危害人体健康, 也严重妨碍农牧业发展。草原地区小型哺乳动物数量众多, 与牧民和家养动物关系密切, 是威胁当地群众健康和农牧业生产的重要媒介 (唐崇惕等, 2001)。

青南高原属世界屋脊——青藏高原的主体组成部分, 平均海拔 4 500 m 以上, 是棘球蚴病的高度流行地区 (王虎等, 2000)。高原鼠兔为这一地区的优势小兽, 近年来的研究表明, 高原鼠兔可以成为多房棘球绦虫 *E. multilocularis* 和石渠棘球绦虫 *E. shiquicus* 的中间宿主 (Xiao *et*

*al.*, 2006), 可通过藏狐、牧犬等食肉动物形成完整的媒介循环 (肖宁等, 2008)。因此对青南地区的高原鼠兔进行棘球绦虫研究, 可以为这一地区乃至整个青藏高原棘球蚴病的防控提供有价值的基础资料。本研究采集青海省果洛州称多、达日和玛沁 3 县高原鼠兔棘球绦虫样品, 以线粒体 *cox1* (Cytochrome c oxidase subunit 1) 基因为标记, 对其进行物种鉴定和遗传分化分析, 现将研究结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验样品:** 2006 ~ 2009 年, 采用夹捕法抓取称多 (Chengduo, CD)、达日 (Dari, DR)、玛沁 (Maqin, MQ) 高原鼠兔, 解剖收集病灶组织 (均发现在高原鼠兔肺脏感染)。分别提取每只鼠的每个棘球蚴样品 (均为一鼠一囊), 编号后保存于 95% 酒精中。

**1.1.2 实验材料:** DNA 提取试剂盒 (DNeasy tissue kit; Qiagen, Germany), Ex-Taq 酶 (Ex-

收稿日期: 2011-04-20

\* 基金项目: 青海省科技计划项目 (2010-Z-742)

\*\* 通讯作者

Taq; Takara Biomedicals, Japan), PCR 仪 (Biometra), 测序仪型号为 ABI 3730 DNA Analysis System (Applied Biosystems, USA)。其余耗材均从上海生工购买。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取: 切取病灶组织, 用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 母液 (因棘球蚴在高原鼠兔体内感染病灶较小, 为保证 DNA 提取量, 所有组织全用于 DNA 提取, 所以未做形态学研究)。

1.2.2 标记基因的 PCR 扩增与测序: 按参考文献 (Xiao *et al.*, 2005) 的方法进行 *cox1* (mtDNA) 部分序列的 PCR 扩增。PCR 反应: 反应总体积为 50  $\mu$ L, 内含 200 mmol/L dNTPs, 每条引物 0.2 mmol/L, 1 U Ex-Taq 酶及 1  $\mu$ L DNA 样本。上游引物 F: 5'-AGAGAAAAT TGTGGAGTTACTGCT-3', 下游引物 R: 5'-ATTACTAATCAACTTAGACTTACA-3'。热循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 8 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物直接送上海生工进行测序。

1.2.3 DNA 序列校对及遗传多样性分析: 测序结果用 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 软件的默认参数设置进行同源排序, 并实施人工校对。以 DNASP v5 (DNA Sequence Polymorphism; Librado *et al.*, 2009) 软件统计序列变异位点信息, 并输出单倍型和遗传多样性信息。

1.2.4 系统发育分析: 从 GenBank 中下载棘球绦虫属 8 个已知种的 *cox1* 基因序列, 分别为: *E. granulosus* (NC\_008075)、*E. equinus* (AF346403)、*E. canadensis* (NC\_011121)、*E. ortleppi* (NC\_011122)、*E. multilocularis* (NC\_000928)、*E. shiquicus* (AB159136)、*E. oligarthrus* (NC\_009461)、*E. vogeli* (NC\_009462), 切取对应的 700 bp 序列, 以分支系统法鉴定本研究中的棘球绦虫各单倍型所属物种类型。系统发育关系用最大简约法 (Maximum Parsimony) 和最大似然法 (Maximum

Likelihood) 在 PAUP \* 4.0b10 软件 (Swofford, 2002) 中进行。最大简约树通过 TBR (Tree bisection-reconnection) 交换算法的启发式搜索 (Heuristic search) 进行; 最大似然树通过 “Fast” stepwise-addition 算法搜索。构建最大似然树时, 先在 Modeltest 3.07 (Posada *et al.*, 1998) 上对所有序列进行模型测试, 以 Akaike Information Criterion (AIC) 指数为指标, 获得最适模型及相应的统计学参数。对两种树的分支置信度进行 1 000 次 Bootstrap 自举检验。构建系统树时, 以棘球绦虫的近缘属种 *Taenia solium* (NC\_004022) 作为外类群。

1.2.5 遗传结构和单倍型网络分析: 由于本研究中所有样本都为石渠种 (见下文), 为探讨青南地区 3 县与首次发现于四川省石渠县的样本 (Xiao *et al.*, 2005) 之间的遗传关系, 我们采用 MEGA 4.0 软件计算其两两之间的 Kimura 2P 距离, 并据此绘制 UPGMA 聚类树。同时, 采用 TCS 1.2 软件 (Clement *et al.*, 2000), 基于简约统计法 (Statistical parsimony) 分析包括石渠县样本 (Shiqu, SQ; AB159136) 在内的各单倍型之间网络关系。

2 结果

2.1 单倍型组成和遗传多样性分布

经测序和校对, 最终得到 700 bp 长度的可用序列。所获得的 20 条序列中, 由于样品采集于一鼠一囊的病变组织, 每 1 条序列代表 1 个棘球蚴, 也代表 1 只高原鼠兔。称多县、玛沁县、达日县分别获得 9、6、5 条序列。在 20 条序列中共检测到 17 个变异位点, 其中 11 个为简约信息位点。共检测到 9 个单倍型 (H1-H9), 已上传至 GenBank (Accession No. HQ131665-HQ131673)。3 个地区单倍型组成和遗传多样性数据如表 1 所示, 其中, 3 个地区间的单倍型多样性大小顺序为称多 < 达日 < 玛沁, 而核苷酸多

表 1 高原鼠兔中石渠棘球绦虫单倍型分布和遗传多样性分析

Tab. 1 Haplotype distribution and genetic diversity of *Echinococcus shiquicus* from plateau pika

地点 Site	单倍型 (频率) Haplotype (frequency)	单倍型多样性 HD $\pm$ S. D.	核苷酸多样性 ND $\pm$ S. D.
称多 Chengduo	H1 (5), H2 (1), H3 (1), H4 (1), H5 (1)	0.722 $\pm$ 0.159	0.00437 $\pm$ 0.00140
达日 Dari	H1 (2), H5 (2), H6 (1)	0.800 $\pm$ 0.164	0.00286 $\pm$ 0.00079
玛沁 Maqin	H1 (1), H7 (2), H8 (2), H9 (1)	0.867 $\pm$ 0.129	0.00562 $\pm$ 0.00097

样性的大小顺序为达日 < 称多 < 玛沁。

### 2.2 物种鉴定

变异位点分析显示，本研究得到的 9 个单倍型与已报道的石渠种序列关系最近（相差 1~8 个碱基），其中 H5 与石渠种序列仅有 1 个碱基的差别。最大简约法构件的系统树显示，所有单倍型与已报道的石渠棘球绦虫序列（AB159136）

形成明显的单系群，此单系群与 *E. granulosus*、*E. equinus*、*E. canadensis*、*E. ortleppi*、*E. multilocularis* 的分支系数（Bootstrap 值）为 53%。Modeltest 分析显示，HKY + I + G 模型为最适模型；最大似然法的分析结果显示出与最大简约法类似的结论，同时，石渠种单系群与其他 7 种棘球绦虫的分支系数为 100%（图 1）。

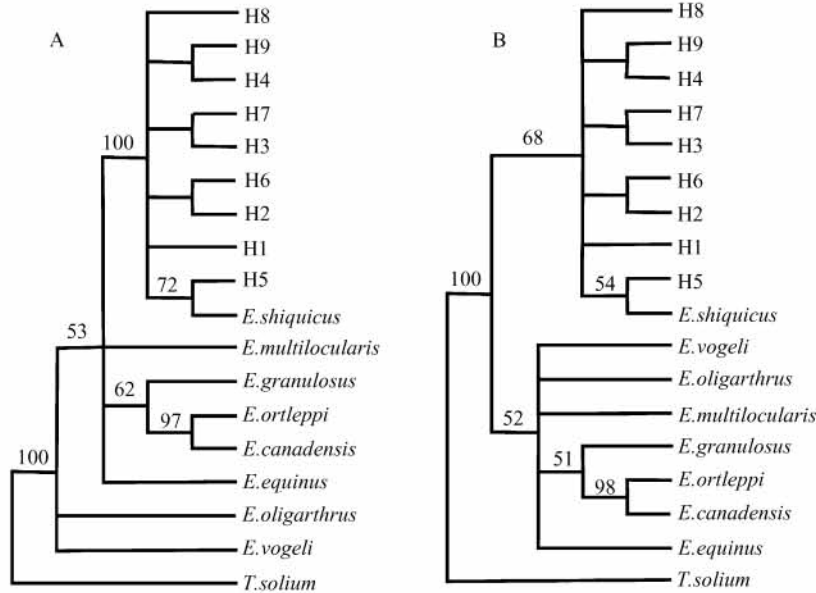


图 1 基于本研究中的 9 个单倍型序列（H1-H9）和已发表的棘球属物种序列构件的最大简约树（A）和最大似然树（B）

Fig. 1 Maximum parsimony tree (A) and maximum likelihood tree (B) based on the nine haplotypes (H1-H9) in this study and other reported *Echinococcus* species

猪带绦虫 (*T. solium*, NC\_004022) 作为外类群  
*T. solium* (NC\_004022) was taken as the outgroup

### 2.3 遗传结构和单倍型网络

遗传距离和聚类分析显示，称多和达日种群遗传关系最近，而玛沁种群与其他 3 个种群的遗传距离较远（表 2、图 2）。单倍型网络关系分析显示，所有单倍型以及之前报道的石渠县样本

以 H1 为中心形成辐射状结构（图 3），其中达日的 H5 与已报道的石渠棘球绦虫序列（AB159136）亲缘关系最近。

表 2 四个地区石渠棘球绦虫种群间的 Kimura 2P 遗传距离

Tab. 2 Kimura 2P genetic distance among four *Echinococcus shiquicus* populations

	SQ	CD	DR	MQ
SQ	-	0.0024	0.00192	0.00294
CD	0.00592	-	0.00103	0.00148
DR	0.00373	0.00364	-	0.00159
MQ	0.00792	0.00519	0.00532	-

注：SQ：石渠 Shiqu；CD：称多 Chengduo；DR：达日 Dari；MQ：玛沁 Maqin；下三角为均值，上三角为标准误 Below diagonal, the mean; above diagonal, S. E.

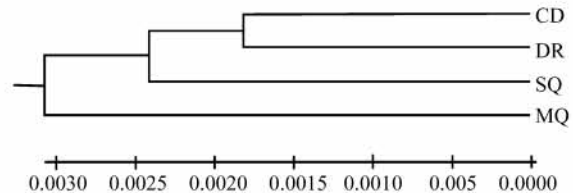


图 2 基于 Kimura 2P 遗传距离的 UPGMA 聚类图  
 Fig. 2 UPGMA cluster tree based on Kimura 2P genetic distance

## 3 讨论

系统发育分析表明，本研究所得到的 9 个单

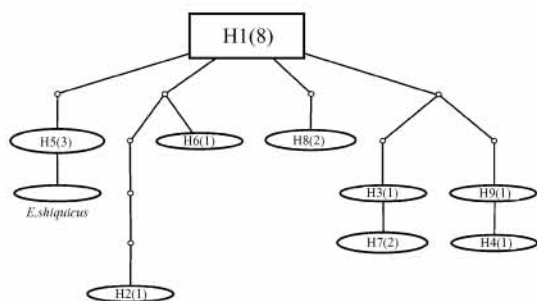


图 3 基于简约统计法的石渠种单倍型谱系图

Fig. 3 The statistical parsimony networks of *E. shiquicus* haplotypes

倍型均属于石渠棘球绦虫。高原鼠兔是青藏高原地区的关键种，青藏高原几乎所有的肉食性兽类如香鼬 *Mustela altaica*、艾虎 *M. eversmanni*、藏狐 *Vulpes ferrilata*、狼 *Canis lupis*、棕熊 *Ursus arctos* 等以及部分肉食性鸟类如金雕 *Aquila chrysaetos*、大鵟 *Buteo hemilasius*、猎隼 *Falco cherrug* 等以高原鼠兔为部分或主要食物来源 (Smith *et al.*, 1999)。这就为高原鼠兔感染的棘球绦虫形成寄主传播链创造了客观条件，因此对高原鼠兔这一媒介动物进行棘球绦虫种类鉴定具有重要意义。本研究从高原鼠兔中收集到的 20 份棘球绦虫样本都属于石渠种，而目前未见这个物种感染人的报告 (Nakao *et al.*, 2010)，因此目前看来高原鼠兔作为棘球绦虫的中间宿主对人的健康危害不大。然而，目前未见有石渠种感染人的报道也可能与这个物种发现时间较晚、研究较少有关 (Xiao *et al.*, 2005)，这同时也意味着必须加深对这一物种的了解，以应对将来其可能带来的疾病威胁。

遗传多样性的分析表明，玛沁种群遗传多样性高于其他两个种群。此外，遗传距离和聚类分析显示，玛沁居于较原始的地位 (表 2, 图 2)。由此推测，玛沁 (而非首次发现石渠种的石渠县) 可能是青藏高原石渠种的发源地之一。Nakao 等 (2010) 以 *cox1* 基因为标记，发现石渠种的单倍型形成链状结构，并据此认为，由于其寄主 (高原鼠兔和藏狐) 高度适应海拔环境，从而导致寄生其上的石渠棘球绦虫种群规模也较稳定，因此石渠种在进化过程中未经历过瓶颈效应。而我们的单倍型谱系关系分析显示，H1 以

外的单倍型及石渠县样本都以 H1 为祖先通过 2~5 步突变得来，并以 H1 为中心形成辐射状结构 (图 3)，可见其经历过瓶颈效应。这表明石渠种的遗传进化规律远比设想的要复杂，值得关注并深入研究，以利于相关疾病的防控。

参考文献

王虎, 马淑梅, 曹得苹, 等. 2000. 青南高原人群包虫病的调查研究. 中国寄生虫病防治杂志, 13 (1): 37-41.

许隆祺, 余森海, 徐淑慧. 2000. 中国人体寄生虫分布与危害. 北京: 人民卫生出版社, 68-74.

肖宁, 邱加闽, M. Nakao. 等. 2008. 青藏高原东部地区发现的新种: 石渠棘球绦虫的生物学特征. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 26 (4): 307-312.

唐崇惕, 唐亮, 康育民, 等. 2001. 内蒙古东部鄂温克旗草场鼠类感染泡状棘球绦虫情况的调查. 寄生虫与医学昆虫学报, 8 (4): 220-226.

Clement, M., D. Posada, K. Crandall 2000 TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, (9): 1 657-1 660.

Librado, P. and J. Rozas 2009 DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1 451-1 452.

Moro, P. and P. M. Schantz 2009 Echinococcosis; a review. *Int. J. Infect Dis.*, (13): 125-133.

Nakao, M., T. Li, X. Han *et al.* 2010 Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, 40 (3): 379-385.

Posada, D. and K. A. Crandall 1998 Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.

Smith, A. T., and J. M. Foggin 1999 The plateau pika (*Ochotona curzoniae*) is a keystone species for biodiversity on the Tibetan plateau. *Anim. Conserv.*, (2): 235-240.

Swofford, D. L. 2002 PAUP \*: phylogenetic analyses using parsimony (\* and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak *et al.* 1997 The CLUSTAL\_ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid Res.*, 25: 4 876-4 882.

Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao *et al.* 2005 *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.*, (35): 693-701.

Xiao, N., M. Nakao, J. Qiu *et al.* 2006 Short report: Dual infection of animal hosts with different *Echinococcus* species in the eastern Qinghai-Tibet Plateau Region of China. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 75 (2): 292-294.

## Molecular Identification and Genetic Variations of *Echinococcus* in Plateau Pika from Eastern and Southern Qinghai, China

MA Jun-Ying<sup>1</sup> LIN Gong-Hua<sup>2</sup> WANG Hu<sup>1\*</sup> WU Xian-Hong<sup>1</sup> JIA Ning<sup>3\*</sup>

(1. Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Qinghai 811602, China;

2. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Qinghai 810008, China;

3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

**Abstract** Based on mitochondrial *cox1* gene, we analyzed the taxonomic status and genetic variations of 20 *Echinococcus* samples in plateau pika from Chengduo (CD), Dari (DR) and Maqin (MQ) in eastern and southern Qinghai, China. From the sequenced 700 bp sequences, we detected 17 variable sites, in which 11 were parsimony informative sites. We identified nine haplotypes, all of which were *E. shiquicus* based on maximum parsimony and maximum likelihood analyses. CD and DR had a closer relationship than among other populations, while MQ had a far phylogenetic relationship from CD, DR and Shiqu (SQ, where *E. shiquicus* was first reported); moreover, MQ had higher genetic diversities than CD and DR, suggesting that MQ might be one of the origins in the eastern and southern Qinghai region. The statistical parsimony networks of *E. shiquicus* haplotypes showed a star-like expansion from a main founder haplotype, which was different from the former study showing a divergent network, indicating that the *E. shiquicus* might have a more complex historic genetic variation process than expected.

**Key words** *Echinococcus shiquicus*; Molecular identification; Genetic variation; Haplotype network

---

\* Author for correspondence