

DOI:10.13350/j.cjpb.220310

• 论著 •

水泡带绦虫海南株的分子鉴定及系统发育分析*

杨思琪¹, 刘净闻¹, 卢西西¹, 赵秋宇¹, 芦亚君^{1,2**}

(1. 海南医学院热带医学院, 海南海口 531199; 2. 西安交通大学基础医学院)

【摘要】 目的 以 COI 基因和 ND1 基因作为 DNA 条形码对水泡带绦虫海南株进行分子鉴定和系统发育分析。方法 PCR 扩增 COI 基因和 ND1 基因片段, GenBank 数据库中进行 BLAST 多序列比对确定虫种。使用 MEGA11 软件构建基于邻接法的 COI 基因和 ND1 基因系统发育树, 并计算基于 K2P 模型的种内遗传距离和种间遗传距离; 分析核苷酸组成, 计算碱基转换率、碱基颠换率及碱基转换与颠换比值。使用 DNAsp 软件分析 COI 基因和 ND1 基因的单倍型多样性。登录 ABGD 网站检测 COI 基因和 ND1 基因是否存在明显的 DNA barcoding gap, 以评估 COI 基因和 ND1 基因作为 DNA 条形码进行物种分子鉴定的有效性。利用 DAMBE 软件检测碱基替换饱和度, 以明确 COI 基因和 ND1 基因构建系统发育树的准确性。结果 COI 基因的单倍型多样性为 0.8276, 含有 81 个可变位点, 碱基转换率(si)为 10%, 碱基颠换率(sv)13%, 转换与颠换比值为 0.77。ND1 基因的单倍型多样性为 0.9381, 含有 94 个可变位点, 碱基转换率(si)为 10%, 碱基颠换率(sv)为 11%, 转换与颠换比值为 0.91。COI 基因和 ND1 基因均具有明显的 DNA barcoding gap, 可作为有效的 DNA 条形码进行带绦虫属内物种的分子鉴别。COI 基因、ND1 基因 $I_{ss} < I_{ss.c}$, 且 $P < 0.05$, 两者均不存在碱基替换饱和, 包含了足够的系统发育信息, 适合进行系统发育分析。结论 单基因作为 DNA 条形码能够快速、简便的鉴别物种, 而多重 DNA 条形码能够提高分辨率和计算效率, 是分析系统发育关系和探索生物多样性的有效识别工具。

【关键词】 DNA 条形码; COI 基因; ND1 基因; 水泡带绦虫

【中图分类号】 R383.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0298-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):298-302.]

Molecular identification and phylogenetic analysis of *Taenia hydatigena* Hainan isolate

YANG Si-qi¹, LIU Jing-wen¹, LU Xi-xi¹, ZHAO Qiu-yu¹, LU Ya-jun^{1,2} (1. School of Tropical Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University)***

【Abstract】 **Objective** Molecular identification and phylogenetic analysis of *Taenia hydatigena* Hainan isolate were implemented using the COI gene and the ND1 gene as DNA barcodes. **Methods** Morphological characteristics of mature segments were treated with ethanol and then in xylene, and observed by optical microscope. Total genomic DNA from the sample tissue was extracted and then used as a PCR template. The COI and ND1 gene fragments were amplified by PCR, and multiple sequence alignments were performed by BLAST of the GenBank database to determine species. The phylogenetic trees were constructed based on the COI gene and the ND1 gene using the neighbor-joining algorithm. The intraspecific genetic distance and interspecific genetic distance were calculated using the K2P model. The nucleotide composition was analyzed, and the transitional substitution rates, the transversional substitution rates, and the transitional/transversional ratios were estimated in the MEGA version 11 software. Haplotype diversity was evaluated using DNAsp software. The DNA barcoding gaps of the COI and ND1 gene sequences were detected on the ABGD website to assess the effectiveness of the COI gene and the ND1 gene as DNA barcodes for species molecular identification. The substitution saturation was tested by the DAMBE software to clarify the accuracy of constructing phylogenetic trees based on the COI gene and ND1 gene. **Results** *Taenia hydatigena* is 122.4 cm long, consisting of 250–300 segments. An ovary and 600–700 testes exist in each mature segment. Each gravid segment contains a uterus that is filled with oval eggs. The COI sequence of *Taenia hydatigena* Hainan isolate obtained by PCR amplification was 422 bp with a G+C content of 33.1%, found to have a close phylogenetic relationship with *Taenia hydatigena* of Turkey (JN827307). The ND1 sequence of *Taenia hydatigena* Hainan isolate obtained by PCR amplification was 471 bp with a G+C content of 28.8%, found to have a close phylogenetic relationship with *Taenia hydatigena* of Sichuan Ya'an, China (JN831281). Genetic diversity a-

* **【基金项目】** 海南省自然科学基金项目(No. 2019RC223)。

** **【通讯作者】** 芦亚君, E-mail: luyajun@hainmc.edu.cn

【作者简介】 杨思琪(1999-), 女, 山东郯城人, 在读硕士。研究方向: 医学检验诊断。E-mail: 2206316459@qq.com

analysis demonstrated that the ND1 gene with haplotype diversity of 0.9381 revealed higher genetic diversity than the COI gene with haplotype diversity of 0.8276, with 15 different haplotypes from the 21 ND1 and 29 COI sequences, respectively. The ND1 gene contained 94 variable sites, which was higher than the 81 variable sites contained by the COI gene. The ratio of transitional to transversional pairs in the COI gene was 0.77, with the transitional rate of 10% and the transversional rate of 13%, separately. Besides, the ratio of transitional to transversional pairs in the ND1 gene was 0.91, with the transitional rate of 10% and the transversional rate of 11%, separately. Obvious barcoding gaps were observed in the COI gene and the ND1 gene, effectively discriminating *Taenia* species. Substitution saturation tests for the COI, ND1 sequences indicated little saturation ($I_{ss} < I_{ss.c}$; $P < 0.05$), and contained sufficient phylogenetic information to be suitable for phylogenetic analysis. **Conclusion** A single gene used as a DNA barcode marker could quickly and easily distinguish between species, whilst the multiple DNA barcodes contribute to improving resolution and computational efficiency and are effective identification tools for analyzing phylogenetic relationships and exploring biodiversity.

【Key words】 DNA barcoding; the COI gene; the ND1 gene; *Taenia hydatigena*

水泡带绦虫 (*Taenia hydatigena*) 隶属于扁形动物门 (Platyhelminthes) 绦虫纲 (Cestoda) 带绦虫属 (*Taenia*), 其成虫寄生于犬、狼等犬科食肉动物小肠内, 其幼虫阶段细颈囊尾蚴寄生于中间宿主猪、牛、羊等家畜的内脏中。水泡带绦虫既可以感染野生动物, 也可以感染家畜^[1-2]。

随着分子生物学的发展, 应用特定的基因片段作为 DNA 条形码进行物种的分子鉴定越来越普遍。DNA 条形码技术已广泛用于生物个体的分子识别、揭示生物多样性和系统发育关系^[3-4]。目前, COI 基因是进行动物物种分子鉴定最常用的 DNA 条形码, 其在生物多样性中的研究已成为热点。GeneBank 和 BOLD 数据库中约有 450 万个 COI 基因条形码, 包括 250 000 个物种的不同个体^[5]。在进行物种分子鉴定的过程中, 也可以选择其他基因片段作为 DNA 条形码。单基因或多基因联合作为 DNA 条形码的最终目的是提供准确的分子鉴定依据和遗传信息数据^[6-7]。本研究使用 COI 基因和 ND1 基因作为 DNA 条形码对海南犬小肠内获取的绦虫标本进行分子鉴定, 并对 COI 基因和 ND1 基因作为 DNA 条形码进行带绦虫属内不同物种划分的有效性, 以及用于系统发育分析的准确性进行评估。

材料与方法

1 虫体来源

从犬小肠内检获带绦虫属成虫 1 条。将新鲜虫体在生理盐水中清洗数次, 保存在 10% 甲醛溶液中。经鉴定为水泡带绦虫成虫。

2 方法

2.1 形态学观察 取虫体成熟节片, 用无菌 ddH₂O 清洗数次, 直至除净甲醛; 将节片分别在 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇溶液中浸泡 30 min; 脱水后的节片放在载玻片上, 滴加二甲苯 5 min 左右至虫体节片完全透明, 在节片周围的载玻片上滴

加中性树胶封片, 在光学显微镜下观察虫体形态特征。

2.2 基因组 DNA 提取 取 2~3 mm 虫体组织, 用无菌 ddH₂O 清洗以除净乙醇。将虫体组织剪碎, 置于 100 μL AB 溶液和 25 μL AD 溶液中 (北京百泰克动物组织直接 PCR 试剂盒 PR7511), 吹打混匀, 在室温下消化 10 min, 95 °C 孵育 5 min, 加入 100 μL AC 溶液后直接作为 PCR 模板进行目的基因的扩增。

2.3 COI 基因和 ND1 基因扩增 COI 基因扩增上游引物 (JB3): 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGTTTAT-3'; 下游引物 (JB4.5): 5'-TAAAGAAACAATGAAATG-3'^[8]。ND1 基因扩增上游引物 (JB11): 5'-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3'; 下游引物 (JB12): 5'-ACCACTAATAATTCACCTT-C-3'^[9]。PCR 反应体系总体积为 20 μL, 包括 10 μL 2×Power Taq PCR MasterMix, 4 μL ddH₂O, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 4 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共循环 35 次; 72 °C 后延伸 5 min。取 20 μL PCR 产物与 4 μL 6× DNA Loading buffer 混匀后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。阳性产物显现的特异性条带用 FastPure 凝胶 DNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产) 纯化, 纯化的 DNA 送至华大基因 Sanger 测序。

2.4 序列分析 获得的 COI 和 ND1 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对。在 MEGA 11 软件中使用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 用 K2P 模型 (Kimura 2-parameter) 计算种内遗传距离和种间遗传距离, 并分析核苷酸组成、计算转换及颠换比率。

2.5 单倍型多样性分析 使用 DNAsp v6.0 软件计算分离位点 (Segregating sites, S) 数目、每个位点的平均核苷酸差异数 (pi) 和突变总数来评价单倍型多样性 (Haplotype diversity, Hd)。

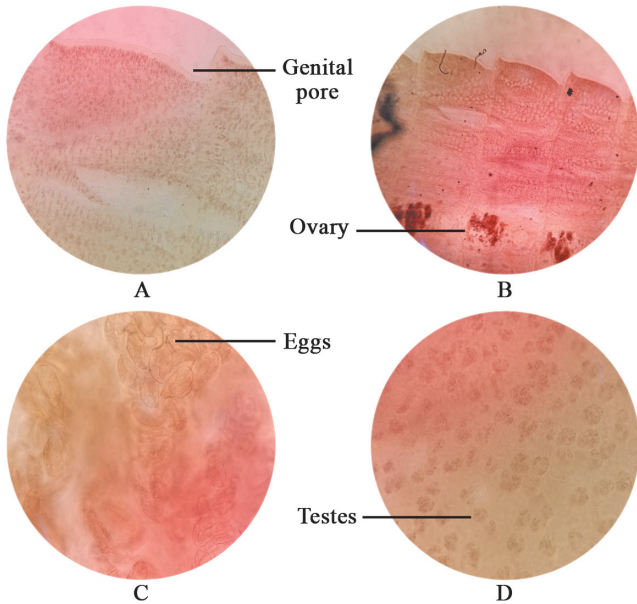
2.6 DNA 条形码有效性分析 通过 ABGD (Auto-

matic Barcode Gap Discovery)网站检测 COI 基因和 ND1 基因是否存在明显的 DNA barcoding gap^[10];使用 DAMBE(Data Analysis and Molecular Biology and Evolution)v7. 2. 14 软件^[11]检验碱基替换饱和度,以评估基于 COI 和 ND1 基因为 DNA 条形码鉴定物种的有效性和系统发育分析的准确度。

结 果

1 水泡带绦虫成虫形态特征

水泡带绦虫成虫头节、颈部、幼节和成节呈乳白色,孕节呈淡黄色。虫体全长 122.4 cm,有 250~300 个节片。成节长 10~14 mm,宽 4~5 mm,内含 1 个卵巢和 600~700 个睾丸。孕节内部含有子宫,子宫两侧具有 5~10 个较小的分支,子宫内部充满虫卵。成节和孕节的生殖孔位于节片单侧。虫卵呈椭圆形,大小 36~39 μm,内含 1 个六钩蚴(图 1)。



A 放大倍数 100 倍 B 放大倍数 40 倍 C、D 放大倍数 400 倍

图 1 水泡带绦虫形态

A Microscope magnification: ×100 B Microscope magnification: ×40 C, D Microscope magnification: ×40

Fig. 1 The tissues of *Taenia hydatigena* were made transparent in xylene

2 系统发育特征

PCR 扩增 COI 基因序列约 422 bp。基于 COI 基因的系统发育树(图 2)比较水泡带绦虫海南株与带绦虫属 28 个不同分离株的系统发育关系,结果显示水泡带绦虫海南株(*Taenia hydatigena* Hainan isolate)与土耳其 *Taenia hydatigena* (JN827307)系统发育关系较接近。

PCR 扩增 ND1 基因序列约 471bp。基于 ND1 基因的系统发育树(图 3)比较水泡带绦虫海南株与带绦虫属 20 个不同分离株的系统发育关系,结果显示水泡带绦虫海南株(*Taenia hydatigena* Hainan isolate)与

四川雅安株 *Taenia hydatigena* (JN831281)系统发育关系较接近。

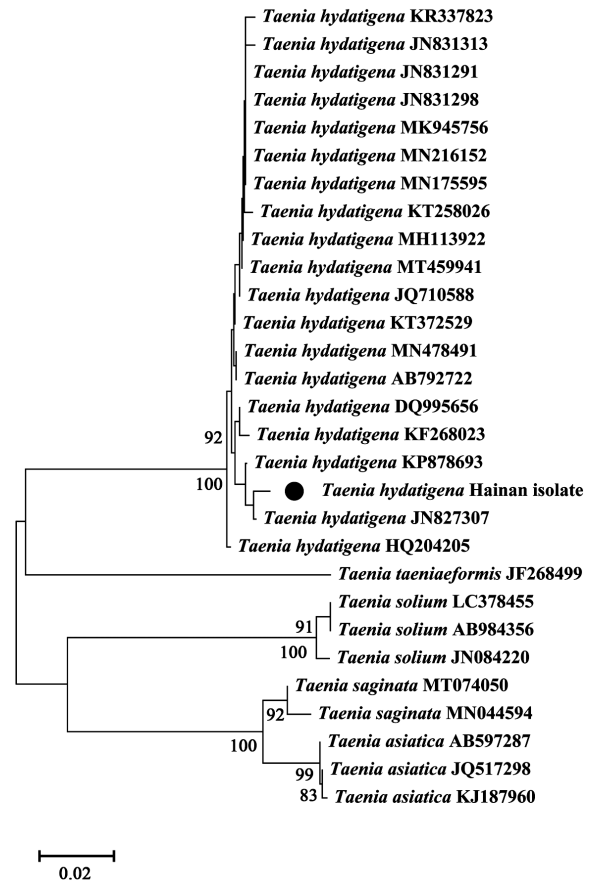


图 2 基于 COI 基因的系统发育树
Fig. 2 The COI NJ phylogenetic tree

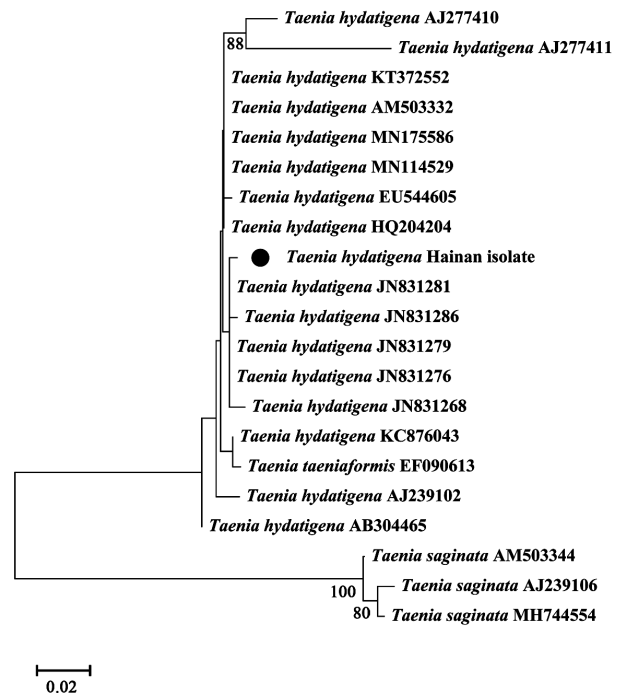


图 3 基于 ND1 基因的系统发育树
Fig. 3 The ND1 NJ phylogenetic tree

3 遗传多样性

基于 COI 基因的 29 个分离株序列具有 15 个单倍型,单倍型多样性为 0.8276,核苷酸多样性(π)为 0.07769,多态性位点数为 130。A、T、C、G 4 种碱基的平均含量分别为 22.3%、44.7%、9.6%和 23.5%,其中 G+C 含量为 33.1%。COI 基因含有 81 个可变位点。碱基转换率(s_i)为 10%,碱基颠换率(s_v)13%,转换与颠换比值为 0.77。

基于 ND1 基因的 21 个分离株序列具有 15 个单倍型,单倍型多样性为 0.9381,核苷酸多样性(π)为 0.12544,分离位点数为 260。A、T、C、G 4 种碱基的平均含量分别为 19.7%、51.6%、6.5%和 22.3%,G+C 含量为 28.8%。ND1 基因含有 94 个可变位点。碱基转换率(s_i)为 10%,碱基颠换率(s_v)为 11%,转换与颠换比值为 0.91。

4 DNA 条形码有效性评估

COI 基因和 ND1 基因在种内遗传距离和种间遗传距离比较显示(图 4),均存在明显的 DNA barcoding gap,可以作为有效的 DNA 条形码标记用于进行物种鉴定。

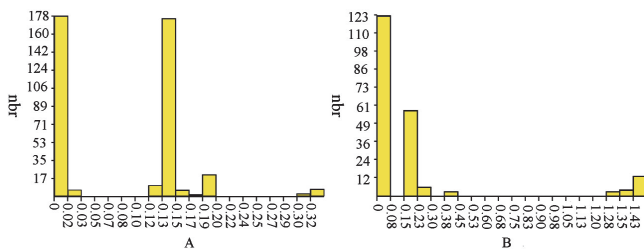


图 4 基于 COI 基因和 ND1 基因的 DNA barcoding gap 检测
Fig. 4 DNA barcoding gap analyses based on COI gene and ND1 gene

随着遗传距离的增加,COI 基因、ND1 基因的碱基转换率和颠换率呈上升趋势。当遗传距离为 0.1440 时,COI 基因的碱基转换率开始出现平台期;当遗传距离为 1.4416 和 1.2014 时,ND1 基因的碱基转换率和颠换率依次出现平台期(图 5)。DAMBE 软件显示 COI 基因序列的 I_{ss} (simple index of substitution saturation)=0.1091, $I_{ss.c}$ (critical I_{ss} value)=0.6812($I_{ss}<I_{ss.c}$), $P<0.05$;ND1 基因序列的 I_{ss} =0.2069, $I_{ss.c}$ =0.6764($I_{ss}<I_{ss.c}$), $P<0.05$ 。说明 COI 基因和 ND1 基因包含足够的系统发育信息,适合进行系统发育分析。

讨论

DNA 条形码技术鉴别物种的原理是在分子进化的水平上选择高度保守的 DNA 片段扩增出具有足够变异位点的能够识别物种的一段 DNA 序列^[12-13]。DNA 条形码是对物种进行分子鉴定的有效标记,用于

区分和识别各种生物个体^[14]。线粒体 COI 基因是目前应用广泛的 DNA 条形码标记,可作为全球动物鉴定系统的核心工具。

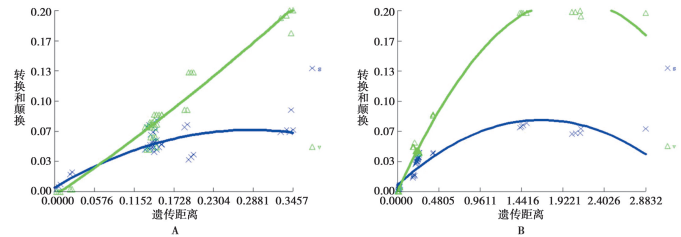


图 5 基于 COI 基因(A)的 29 个带绦虫属分离株和基于 ND1 基因(B)的 21 个带绦虫属分离株的碱基饱和度分析
Fig. 5 Base saturation analysis of 29 *Taenia* isolates based on COI genes(A) and 21 *Taenia* isolates based on ND1 genes(B)

传统的物种分类方法是基于形态学特征判断,要求样本具有典型的、或完整的形态特征,研究者具备扎实的理论基础和丰富的鉴定经验^[15-17]。与传统的物种分类方法比较,COI 基因不受这些因素所限,能够在 DNA 水平上区分物种,是一种通用的 DNA 条形码。尽管 COI 基因是生物个体中存在的基本的基因序列标记,但对于某些近缘种或隐存种的识别率相对较低^[18]。此外,基于多个基因标记的 DNA 条形码技术比单基因条形码具有更精准的分辨率。鉴于基因序列的变异和系统进化趋势,DNA 条形码必须在最小种间遗传距离和最大种内遗传距离具有明显的 DNA barcoding gap 才能识别出不同物种^[19-21]。因此,对 DNA 条形码的有效性评估是进行物种分子鉴定的前提。

本研究以 COI 和 ND1 双基因作为 DNA 条形码来鉴别犬小肠内的绦虫标本,COI 基因和 ND1 基因均具有明显的 DNA barcoding gap,均可以作为鉴别水泡带绦虫的 DNA 条形码。而且两者均包含足够的系统发育信息,适合进行系统发育分析。与 COI 基因相比,ND1 基因具有较高的单倍型多样性、碱基多态性和丰富的多态性分离位点。单基因 DNA 条形码能够快速、简便的鉴别物种,而多基因联合作为 DNA 条形码能够提高分辨率和计算效率,是发现隐存种、区别近缘种、探索生物多样性的有效识别工具。

【参考文献】

- [1] Nguyen MT, Gabri el S, Abatih EN, et al. A systematic review on the global occurrence of *Taenia hydatigena* in pigs and cattle[J]. Vet Parasit, 2016(226):97-103.
- [2] Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists[J]. Trends Ecol Evol, 2009, 24(2):110-117.
- [3] Ulziiyargal G, Yeruult C, Khulan J, et al. Molecular identification of *Taenia hydatigena* and *Mesocestoides* species based on copro-DNA analysis of wild carnivores in Mongolia[J]. Int J Parasitol Parasites, 2019(11):72-82.

- [4] Young MR, Proctor HC, de Waard JR, et al. DNA barcodes expose unexpected diversity in Canadian mites [J]. *Mol Ecol*, 2019, 28(24):5347-5359.
- [5] Thaler DS, Stoeckle MY. Bridging two scholarly islands enriches both; COI DNA barcodes for species identification versus human mitochondrial variation for the study of migrations and pathologies [J]. *Ecol Evol*, 2016, 6(19):6824-6835.
- [6] Laopichienpong N, Muangmai N, Supikamolseini A, et al. Assessment of snake DNA barcodes based on mitochondrial COI and Cytb genes revealed multiple putative cryptic species in Thailand [J]. *Gene*, 2016, 594(2):238-247.
- [7] Jaakko LOP, Kahanpaa J, Mutanen M. DNA Barcodes for the Northern European Tachinid Flies (Diptera: Tachinidae) [J]. *Plos One*, 2016, 11(11):e0164933.
- [8] Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54(2):165-173.
- [9] Gasser R, Zhu X, McManus D. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda) [J]. *Int J Parasitol*, 2000, 29(12):1965-1970.
- [10] Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation [J]. *Mol Ecol*, 2011, 21(8):1864-1877.
- [11] Xia X. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6):1550-1552.
- [12] DeSalle R, Egan MG, Siddall M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462):1905-1916.
- [13] Frzal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects [J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(5):727-736.
- [14] Paul DNH, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(41):14812-14817.
- [15] Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, et al. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics [J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15(12):1719-1727.
- [16] Balech B, Sandionigi A, Manzari C, et al. Tackling critical parameters in metazoan meta-barcoding experiments: A preliminary study based on cox1 DNA barcode [J]. *Peer J*, 2018(6):e4845.
- [17] Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, et al. From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding [J]. *Mol Ecol*, 2016, 25(7):1423-1428.
- [18] Goldstein PZ, DeSalle R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays* [J]. *Bioessays*, 2011, 33(2):135-147.
- [19] Pennisi E. Taxonomy. Wanted: a barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318(5848):190-191.
- [20] Hawlitschek O, Morini re J, Dunz A, et al. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany [J]. *Mol Ecol Resour*, 2016, 16(1):242-253.
- [21] Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, et al. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera Lamarck, 1816* and the creation of a new genus *Versteria* [J]. *Int J Parasitol*, 2013, 43(6):427-437.

【收稿日期】 2021-09-11 【修回日期】 2021-12-02

(上接 297 页)

- [17] Almeida A, Vieira-Damiani G, Silva M, et al. *Bartonella henselae* Infection in Sick Cell Disease Mice Is Associated with Hyperalgesia [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2019, 19(2):102-105.
- [18] Kordick DL, Brown TT, Shin KO, et al. Clinical and Pathologic Evaluation of Chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* Infection in Cats [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(5):1536-1547.
- [19] 栗冬梅, 徐爱玲, 宋秀平, 等. 巴尔通体在自然感染的啮齿动物组织中的分布 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2021, 32(2):181-187.
- [20] 栗冬梅, 俞东征, 刘起勇, 等. 云南省不同环境鼠形动物巴尔通体感染情况的研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(11):934-937.
- [21] Ziedins AC, Chomel BB, Kasten RW, et al. Molecular epidemiology of *Bartonella* species isolated from ground squirrels and other rodents in northern California [J]. *Epidemiol Infect*, 2016;1-8.
- [22] 杨发莲, 白鹤鸣, 杨慧, 等. 巴尔通体分离培养特性观察 [J]. *微生物学杂志*, 2006(1):10-13.
- [23] Read AF. The ecology of genetically diverse infections [J]. *Science*, 2001, 292(5519):1099-1102.
- [24] Konstantin VK, David BN. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in cold-hardiness- and wood quality-related candidate genes in Douglas fir [J]. *Genetics*, 2005, 171(4):2029-2041.
- [25] Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. [J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(4):872-881.
- [26] Vayssierraussat M, Moutailler S, Femenia F, et al. Identification of novel zoonotic activity of *Bartonella* spp France [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(3):457-462.
- [27] Kosoy M, Bai Y, Sheff K, et al. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. [J]. *America J Trop Med Hyg*, 2010, 82(6):1140-1145.

【收稿日期】 2021-11-13 【修回日期】 2022-01-09