

青藏高原细粒棘球绦虫的分子鉴定与遗传变异分析

胡丹丹¹, 王凝¹, 钟秀琴¹, 王家海¹, 延宁¹, 阳爱国², 蒋忠荣³, 郭莉², 邓世金³, 达瓦次仁⁴, 孔维淑⁵, 刘天宇¹, 周旋¹, 谢跃¹, 古小彬¹, 杨光友^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 四川省动物疫病控制中心, 成都 610041; 3. 四川省甘孜州畜牧科学研究所, 康定 626000; 4. 西藏自治区动物疫病预防控制中心, 拉萨 850000; 5. 西藏那曲地区职业技术学校, 那曲 852000)

摘要: 为了探索青藏高原细粒棘球绦虫的遗传变异特点与系统发生关系, 为该地区细粒棘球绦虫病的分子诊断、流行病学和防控研究提供基础资料。本研究对采自青藏高原的 43 株细粒棘球绦虫的线粒体 *ND5* 基因全序列进行测序及分析, 共鉴定出 42 个分离株属于细粒棘球绦虫 G1 型, 1 个西藏绵羊分离株属于细粒棘球绦虫 G6 型。G1 型分离株中, 共有 43 个变异位点, 分为 27 个单倍型, 单倍型多样性为 0.940 ± 0.028 , 核苷酸多样性为 0.00193 ± 0.00114 , 单倍型之间的平均遗传距离为 0.0026。单倍型网络图以 H₉ 为优势单倍型, 其余单倍型围绕它呈辐射状。单倍型歧点分布分析呈单峰, 中性检验得到显著的负值。结果表明青藏高原细粒棘球绦虫流行的主要基因型为 G1 型, 且种内变异较小。

关键词: 细粒棘球绦虫; 线粒体 *ND5* 基因; 青藏高原; 分子鉴定; 遗传变异

中图分类号: S852.734

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)09-1438-07

Molecular Identification and Genetic Variation of *Echinococcus granulosus* in the Tibetan Plateau

HU Dan-dan¹, WANG Ning¹, ZHONG Xiu-qin¹, WANG Jia-hai¹, YAN Ning¹, YANG Ai-guo², JIANG Zhong-rong³, GUO Li², DENG Shi-jin³, DAWA Tsering⁴, KONG Wei-shu⁵, LIU Tian-yu¹, ZHOU Xuan¹, XIE Yue¹, GU Xiao-bin¹, YANG Guang-you^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Sichuan Centers for Animal Disease Control and Preventive, Chengdu 610041, China;

3. Ganzi Animal Science Institute, Kangding 626000, China; 4. Tibetan Centers for Animal Disease Control and Preventive, Lasa 850000, China; 5. Naqu Vocational and Technical School, Naqu 852000, China)

Abstract: The aim of current study was to identify the genotype and genetic variation of *Echinococcus granulosus* in the Tibetan plateau of China, and provide the basic molecular data needed for studies of the molecular diagnosis, epidemiology, prevention and control of echinococcus diseases. The whole mitochondrial *ND5* gene sequences of 43 isolates from the Tibetan plateau were analyzed. We found out that 42 isolates were belonged to *E. granulosus* G1 genotype, while one isolate from Tibetan sheep was identified as *E. granulosus* G6 genotype according to phylogenetic tree. There were 43 mutation sites in G1 isolates, which were separated in 27 haplotypes. The

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家科技支持计划项目(2006BAI06B09); 国家质检总局科技计划项目(2009IK019)

作者简介: 胡丹丹(1991-), 男, 四川泸州人, 硕士, 主要从事动物寄生虫病学研究, E-mail: 18783542005@163.com

* 通信作者: 杨光友, 教授, 博导, 主要从事动物寄生虫病学研究, E-mail: guangyou1963@aliyun.com

haplotype diversity and nuclear diversity were 0.940 ± 0.028 and 0.00193 ± 0.00114 , respectively; And mean genetic distance between haplotypes was 0.0026. Parsimony network showed a radialized expansion from a main founder haplotype H₉. The analysis of mismatch distribution showed a unimodal structure. Additionally, significant negative neutrality indices were detected. All these results suggested that the main genotype of *E. granulosus* in the Tibetan plateau was G1 with low genetic variability.

Key words: *Echinococcus granulosus*; mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 gene; Tibetan Plateau; molecular identification; genetic variation

细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)的中绦期幼虫——细粒棘球蚴,寄生于人和多种动物的肝、肺与其它组织器官内而引起细粒棘球蚴病(cystic echinococcosis)^[1]。该病呈世界性分布,在中国 20 个省份有该病的病例报道,其中青藏高原为该病的高发地区^[2]。细粒棘球蚴病是一种危害严重的人兽共患寄生虫病,已被列为中国《国家中长期动物疫病防治规划》(2012—2020 年)优先防治和重点防范的动物疫病。

细粒棘球绦虫是一种较特殊的寄生虫,不同的地理环境或者不同的寄主宿主可能会导致该虫种在形态学、宿主范围、传播动力学、生命周期、致病性以及药物的敏感性等方面发生变化^[3-8]。通过对线粒体及核糖体基因的分析,细粒棘球绦虫被分为 10 个基因型(G1~G10)^[9-12]。但近年有的研究者认为,细粒棘球绦虫是由 *E. granulosus sensu stricto* (*s. s.*, 基因型 G1~G3), *E. quinus* (基因型 G4), *E. ortleppi* (基因型 G5)和 *E. canadensis* (基因型 G6~G10)这几种组成的复合种^[13]。

线粒体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位 5 (mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5, ND5)基因,是线粒体 DNA 中最大的编码基因,拥有较高的突变速率,是相关种群系统发育研究最有用的基因之一^[14]。它已被应用于包括寄生虫在内的多种生物^[15-18],但至今尚未见应用于细粒棘球绦虫遗传变异的研究报道。

青藏高原地处中国西南部,包括西藏自治区、青海省大部及新疆维吾尔自治区、甘肃、四川与云南省等的部分地区,面积广阔,平均海拔在 4 000 m 以上,存在特殊的地理气候条件,地域差异大,各种中间宿主广泛存在,可能成为细粒棘球绦虫发生变异的外在因素^[19]。本研究首次采用线粒体 ND5 基因全序列测序的方法对 43 株采自青藏高原的细粒棘球蚴进行了分子鉴定与遗传分析,以期为

该地区细粒棘球绦虫的种群遗传结构、细粒棘球蚴病的流行病学及防控研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 细粒棘球蚴的采集和处理

共采集细粒棘球蚴样品 43 个,分别来自位于青藏高原的西藏、青海和四川 3 个省区。其中,西藏绵羊分离株 7 个,牦牛分离株 1 个;青海绵羊分离株 23 个;四川人分离株 11 个,牦牛分离株 1 个。将样品分离、漂洗和编号后,于 -20 ℃ 冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 细粒棘球蚴总 DNA 的提取 用蛋白酶 K 消化和酚/氯仿法^[20]提取细粒棘球蚴基因组 DNA,保存于 -20 ℃ 冰箱备用。

1.2.2 线粒体 ND5 基因的扩增、纯化与测序 以 GenBank 上已发表的细粒棘球绦虫的线粒体全基因组为模板设计出前段(Fs: 5'-TGCGGTAGCTATGTCAGAAG-3', Fa: 5'-AAACCAAGAACCACAGCAAA-3')与后段(Ls: 5'-ATTTGAAGAAGATTGTGGCT-3', La: 5'-CTAAACGCAGGAATCACAGA-3')2 对特异性引物,分段扩增 ND5 基因。

PCR 扩增体系为 25 μL 体系: 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上下游引物(10 pmol · μL⁻¹)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 9.5 μL,混匀后稍加离心。前段扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,49 ℃ 复性 50 s,72 ℃ 延伸 50 s,共 38 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。后段扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,52 ℃ 复性 55 s,72 ℃ 延伸 55 s,共 38 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。同时,以 ddH₂O 代替模板 DNA 作空白对照。反应结束后,取 5 μL PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。PCR 扩增产物经柱式 DNA 胶回收试剂盒进行纯化后送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.2.3 数据分析 对测序结果进行人工比对峰图分析后,以 DNAMAN 5.2.2 (Lynnon Biosoft, USA) 对序列进行比对、拼接和剪切,生成对应的 ND5 全序列文件。将这些序列输入 MEGA 5.05 软件^[21]后,运用 Clustal W 程序比对核苷酸序列,并以棘皮动物线粒体密码子^[22]将核苷酸序列翻译为氨基酸序列进行比较分析,确定变异位点。DNA SP 5.10 软件^[23]用于确定单倍型,再以单倍型数据输入 MEGA 计算遗传距离。Arlequin 3.5.1.2 软件^[24]用于计算核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)、单倍型多样性(haplotypes diversity, Hd)、以及用于估算种群扩张事件的单倍型歧点分布(mismatch distribution)^[25]和中性检验值(Tajima's D 和 Fu's Fs)^[26-27]。从 GenBank 下载相应 ND5 序列,并以多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)为外群构建系统进化树,进化树采用 MrBayes 3.1.2 软件^[28]构建,使用 GTR 替换模型与 γ 分布比率差异,用 mcmc 法运算 2 000 000 代,每 1 000 代取样 1 次,从得到的样本中舍弃 500 个老化样本后总结得到共有树。TCS 1.21 软件^[29]用于构件单倍型简约网络图(Parsimony Network)。并以 Arlequin 软件与 Dnasp 软件分析人分离株类群和绵羊分离株类群的种群遗传分化。

2 结果

2.1 序列变异

在所测的 43 个样品中,得到长 1 599 bp 的 ND5 全序列 42 条(GenBank 登录号:KC756236~KC756274, KC756276~KC756278)。42 条序列与细粒棘球绦虫普通绵羊株(G1)序列高度相似(99.69%~100.00%),初步鉴定为 G1 型。序列之间的变异率为 0.00%~0.50%,共有变异位点 43 个,其中简约信息位点 13 个。发生转换 40 次(AG 转换 15 次,TC 转换 25 次),颠换 3 次,无插入和缺失。氨基酸序列显示,共有 16 个非同义突变位点。C、T、A 和 G 四种碱基含量分别为 6.09%、51.02%、15.00%和 27.89%,嘌呤含量(A+T)为 66.02%,嘧啶含量(G+C)为 33.98%。

此外,在所测样品中有 1 条序列全长 1 572 bp (GenBank 登录号:KC756275),与细粒棘球绦虫 G6 型(GenBank 登录号:AB208063)的序列相似性为 99.81%,初步鉴定为细粒棘球绦虫 G6 型(*E. canadensis*)。

2.2 系统发生与单倍型网络图

本研究所得 G1 型样品序列共分为 27 个单倍

型($H_1 \sim H_{27}$),G6 型样品为单倍型 H_{28} 。以多房棘球绦虫为外群构建的贝叶斯树能够将不同基因型分隔开,单倍型 $H_1 \sim H_{27}$ 与标准绵羊株 *E. granulosus* G1 聚合为一支,而 G6 型样品所在的 H_{28} 与骆驼株 G6 型归为一支(图 1)。

基于 ND5 基因和 TCS 软件构建的单倍型简约网络图(图 2),呈现出以单倍型 H_9 为中心的辐射状,相邻单倍型之间的突变从 1 步到 5 步不等。

2.3 遗传多样性与种群扩张

G1 型单倍型之间的遗传距离(基于 Kimura 2-parameters 模型^[30])为 0.000 6~0.005 0,平均遗传距离为 0.002 6。42 条序列的核苷酸多样性为 $0.001 93 \pm 0.001 14$,单倍型多样性为 0.940 ± 0.028 。单倍型歧点分布分析结果显示为单峰(图 3),Harpending's Raggedness index 为 0.027;同时 Tajima's D 与 Fu's Fs 均得到显著的($P < 0.01$)负值,分别为 -2.423 和 -24.54。

2.4 遗传分化分析

将细粒棘球绦虫分离株与羊分离株分为 2 个类群进行对比分析(牦牛分离株样本数太少不计入比较),发现它们之间的遗传距离较近,遗传分化度 F_{st} 值小于 0.05,基因流值大于 1(表 1)。

3 讨论

线粒体基因具有母系遗传的特点,常常作为种群遗传与基因变异研究的标记。标记基因的选择需要综合其片段长度与保守性等因素综合考虑。在有关四川、青海和西藏地区的细粒棘球绦虫遗传变异的研究报道中,M. Nakao 等^[31]采用 CO1 基因部分序列(789 bp)从 113 个细粒棘球绦虫中得到 26 个单倍型;J. Ma 等^[32]也用 CO1 基因部分序列(792 bp)从 35 个样本中得到 17 个单倍型;N. Yan 等^[33]利用 ND1 和 ATP6 基因全序列(共 1 407 bp)从 84 个样品中鉴定出 28 个单倍型,而马淑梅等^[34]利用 CO1、ND1 和 ATP6 基因的部分序列(共 1 327 bp)从 55 个样本中仅得到 13 个单倍型。除 J. Ma 等的序列变异性相对较大外,其余 CO1、ND1 和 ATP6 基因都显示出了较低的变异性。延宁等^[35]采用 12S 基因全序列(700 bp)对 42 个细粒棘球绦虫进行分析,仅得到 5 个单倍型,说明该基因序列最为保守。而本文以 ND5 基因全序列(1 599 bp),从 43 个细粒棘球绦虫样本中得到 28 个单倍型,说明其变异性相对较大,更适合种及以下分类单元的鉴定。

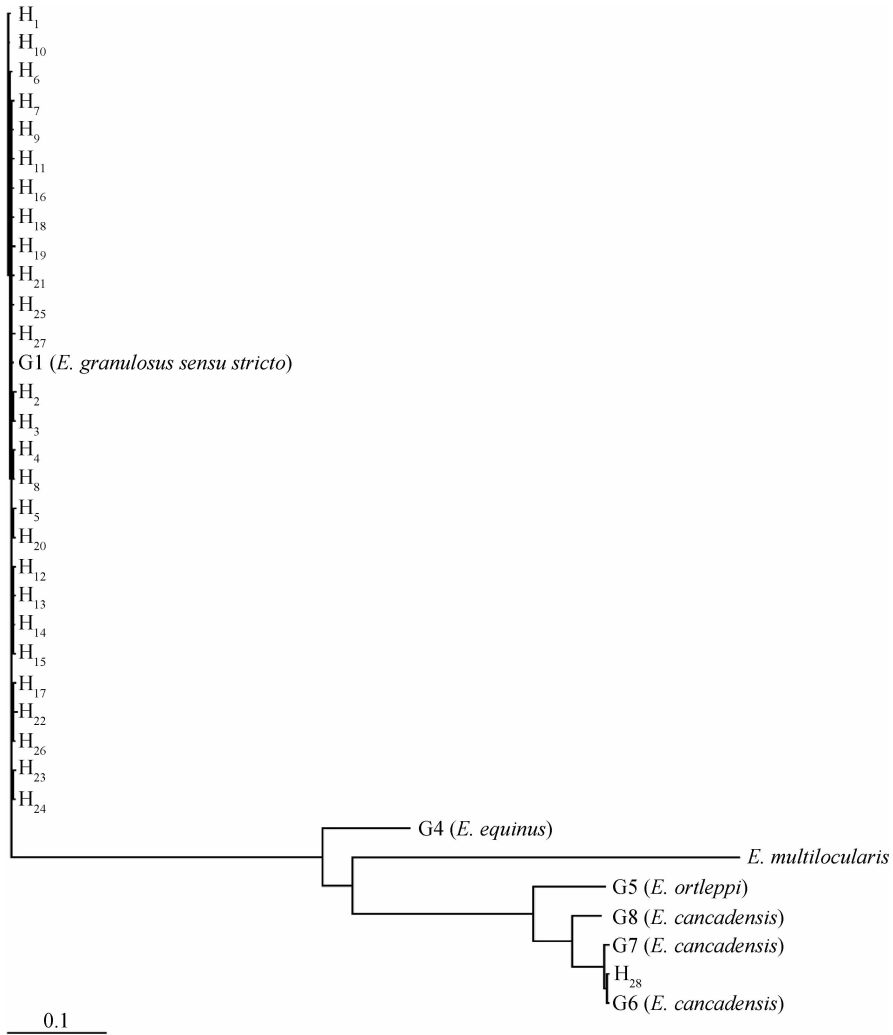


图 1 基于细粒棘球绦虫线粒体 ND5 基因以贝叶斯法构建的系统发生树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on *E. granulosus* mt ND5 gene using MrBayes

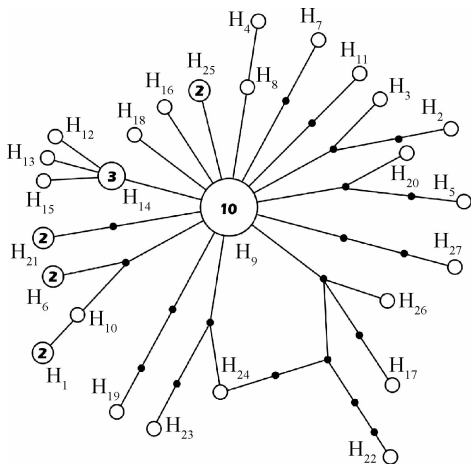


图 2 青藏高原细粒棘球绦虫单倍型简约网络图(圆圈面积代表样本数,圆点为变异节点)
Fig. 2 Parsimony network for *E. granulosus* of the Tibetan Plateau (The area of a circle and the dot represent the number of samples and the median vectors)

表 1 青藏高原细粒棘球绦虫人与绵羊分离株类群的遗传距离与遗传分化值

Table 1 Distance and fixation indexes for the two sub-populations of *E. granulosus* in the Tibetan Plateau

类群 Sub-populations	样品数 Numbers	遗传距离 Distance	<i>F_{st}</i> Value	基因流 Nm
人分离株	11	0.002 2	0.046 7*	5.12
绵羊分离株	29	0.001 8		

* $P < 0.05$

有学者曾用 CO1、ND1、ATP6 基因的部分序列以及 12S 的全序列对中国西部地区的细粒棘球绦虫进行分型分析^[31-38], 仅在新疆检测到少量的 G6 型, 绝大部分细粒棘球绦虫均被鉴定为普通绵羊株 G1 型(*E. granulosus* s. s.), 说明中国西部地区主

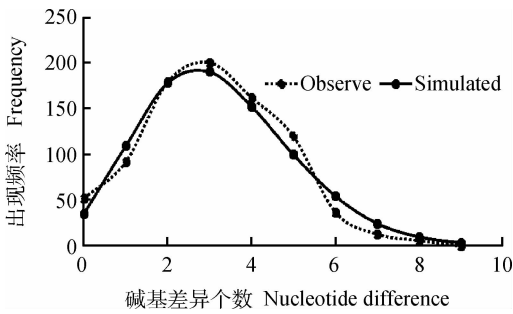


图3 青藏高原细粒棘球绦虫线粒体ND5基因单倍型歧点分布

Fig. 3 Mismatch distribution for the haplotypes of *E. granulosus* in the Tibetan plateau

要流行的细粒棘球绦虫基因型为G1型。本研究首次对采自青藏高原的43株细粒棘球绦虫的线粒体ND5基因全序列进行分析,42株样品与G1型序列高度相似,且在系统发育树上都归于*E. granulosus* G1型所在的一支,故鉴定为细粒棘球绦虫G1(*E. granulosus* s. s.)型,这与中国西部主要流行基因型一致。此外,来自西藏绵羊的1个分离株与细粒棘球绦虫G6型的序列相似性非常高,并且位于贝叶斯树的同一支,故鉴定其为G6(*E. canadensis*)型。本研究在西藏检出细粒棘球绦虫G6型,表明该基因型在中国可能有更广的分布范围。

本研究对青藏高原42株G1型样品的ND5全序列进行分析,发现其A+T(66.02%)含量明显高于G+C(33.98%)含量,碱基含量存在明显的偏倚性,与贾万忠等报道的带科绦虫碱基含量特征相似^[39]。43个变异位点中有40个为转换,其余3个为颠换,没有缺失与插入,高度的转换比率与C. Simon等^[40]的看法相似,他们认为在亲缘关系接近的物种间总是有更高的转换差异比率。

在本次测定的G1型样品中,序列相似性较高,遗传距离很小,核苷酸多样性较低,这表明青藏高原细粒棘球绦虫的遗传多样性不高。但是在所测样品中检测出较多的变异位点、单倍型数以及较高的单倍型多样性,充分说明了ND5基因的变异性较大。简约单倍型网络图的结构显示,以单倍型H₉为中心呈现辐射状,且大部分单倍型距离中心只有1~3步,说明青藏高原细粒棘球绦虫的分化程度较低,同时也体现出了线粒体ND5基因的变异性较高。

M. Nakao等^[31]用线粒体COI基因与核基因*ef1a*部分序列研究青藏高原棘球绦虫基因多态性时得出了一个假设:细粒棘球绦虫与多房棘球绦虫

经由宿主的迁徙或人为的交易运输从其它疫区传播到了青藏高原,而这里有它们适合的外界环境和宿主环境,因此它们进行了大量的繁殖,导致了种群的扩张现象。随后,T. Yanagida等^[41]的进一步研究推测青藏高原的细粒棘球绦虫起源于家畜的发源地——中东。但是这一假设和推测还需要更多相关的研究予以证实。本研究中,青藏高原细粒棘球绦虫单倍型歧点分布呈单峰,中性检验的Tajima's D与Fu's Fs均得到负值,且都被显著性检验所支持,这暗示着该地区细粒棘球绦虫发生过种群扩张,与M. Nakao等的结论相符。

在细粒棘球绦虫的不同宿主分离株类群的比较中发现,它们之间有较近的遗传距离、低遗传分化度和较高的基因流水平,这表明青藏高原地区细粒棘球绦虫人分离株类群与羊分离株类群并未分化为2个独立的种群。

4 结论

本研究以线粒体ND5全序列分析的方法对青藏高原43株细粒棘球绦虫(分离自绵羊、人以及牦牛)进行了分析,鉴定出其中42株为细粒棘球绦虫G1型(*E. granulosus* s. s.),1株(分离自西藏绵羊)为细粒棘球绦虫G6型(*E. canadensis*)。在G1型样品中,共分为27个单倍型,其中H₉为优势单倍型。研究结果表明青藏高原细粒棘球绦虫的种内变异较小,人分离株种群与羊分离株种群尚未形成明显的种群分化。

参考文献:

- [1] 杨光友,张志和. 野生动物寄生虫病学[M]. 北京:科学出版社,2013.
- [2] CRAIG P S. Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China [J]. *Parasitol Int*, 2006, 55: 221-225.
- [3] 胡欢欢,伍卫平. 影响棘球绦虫病流行程度的因素[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 26(1): 58-61.
- [4] YANG Y R, CLEMENTS A C, GRAY D J, et al. Impact of anthropogenic and natural environmental changes on *Echinococcus* transmission in Ningxia Hui Autonomous Region, the People's Republic of China [J]. *Parasit Vectors*, 2012, 5: 146.
- [5] MCMANUS D P, THOMPSON R C. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis [J]. *Parasitology*, 2003, 127: 37-52.

- [6] THOMPSON R C, MCMANUS D P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus* [J]. *Trends Parasitol*, 2002, 18(10): 452-457.
- [7] THOMPSON R, LYMBERY A, CONSTANTINE C. Variation in *Echinococcus granulosus*; towards a taxonomic revision of the genus [J]. *Adv Parasitol*, 1995, 35: 145-175.
- [8] ZHANG L H, JOSHI D D, MCMANUS D P. Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitochondrial DNA markers [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000, 94(3): 258-260.
- [9] BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54(2): 165-173.
- [10] BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Molecular genetic characterization of the cervid strain (northern form) of *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitology*, 1994, 109(Pt 2): 215-221.
- [11] SCOTT J C, STEFANIAK J, PAWLOWSKI Z S, et al. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitology*, 1997, 114(Pt 1): 37-43.
- [12] LAVIKAINEN A, LEHTINEN M J, MERI T, et al. Molecular genetic characterization of the fenoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitology*, 2003, 127(Pt 3): 207-215.
- [13] NAKAO M, YANAGIDA T, OKAMOTO M, et al. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis [J]. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(Pt 4): 444-452.
- [14] 智 妍, 葛振萍, 张春田. 基于线粒体 ND5 基因的昆虫分子系统学研究进展 [J]. 沈阳师范大学学报, 2008, 26(3): 347-350.
- [15] HICKS K A, HOWE D K, LEUNG A, et al. *In vivo* quantification reveals extensive natural variation in mitochondrial form and function in *Caenorhabditis briggsae* [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43837.
- [16] SU Z H, IMURA Y, OKAMOTO M, et al. Phylogeny and evolution of Digitulati ground beetles (*Coleoptera*, *Carabidae*) inferred from mitochondrial ND5 gene sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 30(1): 152-166.
- [17] CHITIMIA L, LIN R Q, COSOROABA I, et al. Genetic characterization of ticks from southwestern Romania by sequences of mitochondrial *cox1* and *nad5* genes [J]. *Exp Appl Acarol*, 2010, 52(3): 305-311.
- [18] AI L, WENG Y B, ELSHEIKHA H M, et al. Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp. isolates from different hosts and geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 181(2-4): 329-334.
- [19] WU T. The Qinghai-Tibetan plateau: how high do Tibetans live? [J] *High Alt Med Biol*, 2001, 2(4): 489-499.
- [20] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [21] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [22] NAKAO M, SAKO Y, YOKOYAMA N, et al. Mitochondrial genetic code in cestodes [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 111(2): 415-424.
- [23] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [24] EXCOFFIER L, LISCHER H E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3): 564-567.
- [25] ROGERS A R, HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Mol Biol Evol*, 1992, 9(3): 552-569.
- [26] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [27] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915-925.
- [28] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [29] CLEMENT M, POSADA D, CRANDALL K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(10): 1657-1659.
- [30] KIMURA M. A simple method for estimating evolu-

- tionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *J Mol Evol*, 1980,16(2): 111-120.
- [31] NAKAO M, LI T, HAN X, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences [J]. *Int J Parasitol*, 2010,40(3):379-385.
- [32] MA J, WANG H, LIN G, et al. Molecular identification of *Echinococcus* species from eastern and southern Qinghai, China, based on the mitochondrial *cox1* gene [J]. *Parasitol Res*, 2012, 111(1): 179-184.
- [33] YAN N, NIE H M, JIANG Z R, et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus* from the Tibetan plateau inferred by mitochondrial DNA sequences [J]. *Vet Parasitol*, 2013, 196(1-2): 179-183.
- [34] 马淑梅, MAILLARD S, 赵海龙, 等. 青南高原细粒棘球绦虫 mtDNA 基因多态性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(11): 1095-1099.
- [35] 延 宁, 聂华明, 蒋忠荣, 等. 基于线粒体 12S 基因对青海地区细粒棘球绦种群遗传多态性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(6): 972-978.
- [36] 杨俊克, 贾万忠, 景 涛, 等. 我国三省区细粒棘球绦虫基因的变异分析[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(9): 12-16.
- [37] ZHANG L H, CHAI J J, JIAO W, et al. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China [J]. *Parasitology*, 1998, 116(Pt 1): 29-33.
- [38] BART J M, ABDUKADER M, ZHANG Y L, et al. Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China [J]. *Parasitology*, 2006, 133(Pt 5): 571-579.
- [39] 贾万忠, 闫鸿斌, 史万贵, 等. 带属绦虫线粒体基因组全序列生物信息学分析[J]. 中国兽医学报, 2010, 26(6): 596-600.
- [40] SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc*, 1994, 87(6): 651-701.
- [41] YANAGIDA T, MOHAMMADZADEH T, KAMHAWI S, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East [J]. *Parasitol Int*, 2012, 61(4): 599-603.

(编辑 白永平)