

# 蠕虫线粒体基因组研究及其应用进展

贾万忠, 闫鸿斌, 倪兴维, 娄忠子, 李宏民, 曹平, 才学鹏

中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 兰州 730046

E-mail: jwanzhong@yahoo.com.cn

2011-02-16 收稿, 2011-06-15 接受

公益性行业(农业)科研专项(200903036-07)、国家科技支撑计划(2007BAD40B04)和家畜疫病病原生物学国家重点实验室自主课题(SKLEVB2008ZZKT014)资助项目

**摘要** 蠕虫主要包括扁形动物和线虫, 其种类繁多, 生活方式多样, 可寄生于动物和植物体内, 引起蠕虫病, 其中血吸虫病、棘球蚴病、旋毛虫病等是重要的人兽共患寄生虫病, 在世界各地普遍流行, 危害严重. 蠕虫线粒体基因组的碱基组成、基因结构、基因变异等方面有其特点, 这为蠕虫线粒体功能基因组学研究、比较基因组学研究、分子分类学研究、虫种(株)鉴定与分类、生态学研究、分子系统发育和进化分析等提供了重要依据, 为蠕虫病的诊断、分子流行病学与生态学调查等分子检测方法的建立奠定了基础. 近 20 年来蠕虫线粒体基因组研究得到了极大发展, 迄今为止, 已完成蠕虫 93 个种(虫株)线粒体基因组全序列测定和分析. 本文将对蠕虫线粒体基因组序列分析方面的研究进展、应用和今后发展方向作一简要评述.

## 关键词

蠕虫  
线粒体基因组  
进化  
分子分类  
DNA 条形码

蠕虫(helminths)隶属于动物界, 主要包括扁形动物门(Platyhelminthes)、线形动物门(Nematoda)和棘头动物门(Acanthocephala), 是生物界中重要的一大类生物, 多数营寄生生活, 既可寄生于家畜、家禽及人体内, 也可寄生于植物体内, 导致动物(包括人)和植物的疾病, 危害严重<sup>[1-4]</sup>. 深入了解蠕虫种群遗传学特性, 不仅有助于研究蠕虫的系统分类学、起源、进化等, 而且有助于开展蠕虫病流行病学和生态学等研究, 从而为蠕虫病的有效防控提供重要依据和指导作用<sup>[5-8]</sup>. 虽然 18S 核糖体 rRNA 基因(18S rDNA)和内部转录间隔(ITS1 和 ITS2) 被证明是鉴定蠕虫可靠的分子遗传标记, 但是用线粒体基因来代替 18S rDNA 和 ITS 作为分子遗传标记, 用于分析和鉴定蠕虫种类尤其是亲缘关系相近种或者虫株、研究基因的变异现象等则更为有效. 动物线粒体基因组很小, 独立于细胞核染色体基因组之外, 但又与细胞核染色体基因组紧密联系; 有相对稳定的基因数目, 基本上是母系遗传; 很少发生基因重组; 相对于核基因, 其

突变率高, 进化速度快. 此外, 线粒体基因的碱基组成, 基因的排列位置, 遗传密码的使用, tRNA 的二级结构, 主要非编码区数目、位置及其二级结构等有其自身特点, 为人们研究真核生物的起源和线粒体基因的演化、物种种群遗传学特性、物种分类等提供了便利条件. 线粒体基因组的这些特征已经在蠕虫的分类、种群遗传学分析、基因进化、物种起源、疾病诊断等方面得到了越来越多的应用<sup>[9,10]</sup>. 为此, 本文针对蠕虫线粒体基因组的研究进展及其应用作一评述.

## 1 蠕虫线粒体基因组全序列测定完成概况

自 1990 年, 猪蛔虫(*Ascaris suum* Goeze, 1982)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900)线粒体基因组全序列测定完成后<sup>[11]</sup>, 根据保存在后生动物线粒体基因组数据库(<http://www.mitome.info/>)及线粒体(细胞器)基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/taxtree.cgi?db=Mito>)

&taxid=33208&result=frame&complete=All&init\_rankid=5)提供的数字及本文作者完成的部分绦虫序列,迄今为止已经分别完成扁形动物门绦虫、吸虫和涡虫线粒体基因组序列 28 个(本文作者完成 9 个)、16 个和 1 个,线形动物门线虫线粒体基因组 47 个和棘头动物门棘头虫线粒体基因组序列 1 个(总计 93 个)的测定,这些物种的名称及线粒体基因组大小等信息见表 1.

## 2 蠕虫线粒体基因组研究方法

蠕虫线粒体基因组序列测定与分析主要步骤包括虫体样品制备、基因组 DNA 提取、线粒体基因组 DNA(mtDNA)片段重叠扩增、PCR 产物序列测定、序列拼接组装和全序列注释.

### 2.1 测序方法

(i) 以线粒体基因组分离为基础的方法. 初期,生物体线粒体基因组全序列分析是通过梯度离心法对线粒体细胞器和完整 mtDNA 分离,限制性酶切,与载体连接,然后对重组体克隆筛选,序列测定和组装等步骤完成的.但这一方法只适用于材料来源丰富的生物体如脊椎动物,或可以进行体外培养的生物体,以满足 mtDNA 分离时对足够材料的需求.在蠕虫线粒体基因组研究早期,猪蛔虫和秀丽隐杆线虫线粒体基因组测定就是通过这一技术路线实现的.这些方法同时要求组织材料必须新鲜,以保证分离的 mtDNA 的完整性<sup>[11,12]</sup>.此外,对于不同个体间 mtDNA 存在多态性的物种如线虫,不适于使用这一技术路线对 mtDNA 进行测序.这一瓶颈问题严重阻碍了 mtDNA 作为生物分子标记在蠕虫学研究中被广泛应用<sup>[13]</sup>.

(ii) 以文库构建和筛选为基础的方法. 旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)线粒体基因组测序是通过单一酶切位点消化全部基因组 DNA(包括线粒体基因组 DNA),构建基因组 DNA 文库( $\lambda$ EMBL4),用线粒体 *cytb* 部分序列 PCR 扩增产物作为基因探针筛选文库,鉴定出一含线粒体基因组全序列的重组阳性克隆,然后再对阳性克隆进行引物步移法(*primer-walking*)测序而完成的<sup>[14]</sup>.但这一方法,费时费力,使用范围极其有限<sup>[15]</sup>.

(iii) 以常规 PCR 技术为基础的方法. 随着 PCR 技术的广泛使用,以 PCR 为基础的线粒体基因

组全序列测定方法随之涌现,主要的技术路线为:根据保守区序列设计引物,将基因组分为数个片段,片段之间有部分重叠区,然后采用常规 PCR 扩增方法获得目的片段序列,对 PCR 产物经引物步移法直接测序或者进行克隆后再测序(Sanger 法),最后将这些序列拼接成完整基因组全序列<sup>[16-18]</sup>.这一方法避免了费时费力的线粒体分离与纯化工作,大多数蠕虫线粒体基因组全序列测定是通过这一技术路线实现的.在实际应用中,一些研究者根据测序对象的特殊性,还进行了针对性改进,如 Tang 等人<sup>[19]</sup>使用滚环扩增法(*rolling circle amplification, RCA*)成功对色矛纲(*Chromadorea*)施特克尔霍夫索属线虫(*T. cosgrovei*)和秀丽隐杆线虫全基因组序列进行了测定.结果表明,这一改进方法可以使少量样品的线粒体基因组首先得以扩增,其扩增产物用于后续直接测序、限制性酶切分析、基因克隆等,克服了因线虫样品量少而可能对线粒体基因组分析带来的限制.常规 PCR 为基础的方法虽然在蠕虫线粒体基因组研究中起了重要作用,但缺点是对无参考序列的物种、新种或者具新分类地位的物种,其引物设计比较困难或者繁琐,使用范围也会受到一定限制.

(iv) 以长片段 PCR 为基础的方法. 近来,线虫线粒体基因组全序列测序采取的策略是:根据保守区设计两对引物,利用长片段 PCR(*long PCR*)方法扩增两段序列,两段序列间有部分重叠区.这一方法的优点是可通过提取单个线虫个体(通常 1~10 mm 长)基因组 DNA,作为长片段 PCR 的模板,进行特异性 PCR 扩增,然后对 PCR 产物进行步移法或者克隆后测序,例如十二指肠钩虫(*A. duodenale*)和美洲板口线虫(*N. americanus*)的线粒体基因组序列的测定<sup>[16]</sup>.一般从单个线虫提取的 DNA 可进行 5 次以上 PCR 反应,反应产物可用于直接测序、克隆、其他多种分析等,对样品需要量少,单个虫体样品即可满足多种实验要求,测序工作也不再受线虫个体间 mtDNA 多态性的限制<sup>[15,20,21]</sup>.另外,引物设计也相对容易,因为仅需要设计两对引物.因此,随着长片段 PCR 技术的日趋成熟和 DNA 聚合酶性能的不断改进,这一方法将成为今后线虫线粒体基因组测序所采用的最主要方法和策略之一.

尽管如此,这一技术路线尚不能很好地用于高通量测序,特别是当对一个新种或者新的分类线虫进行从头测序(*de novo sequencing*)时费时费力,测序

表1 蠕虫线粒体基因组全序列测定完成情况<sup>a)</sup>

蠕虫种(株)名	大小	GenBank 登录号	蠕虫种(株)名	大小	GenBank 登录号
Platyhelminthes (Phylum)			Nematoda (Phylum)		
Trematoda (Class/16 species)			Chromadorea (Class/38 species)		
Digenea (Order)			Ascaridida (Order)		
<i>Clonorchis sinensis</i> Loose, 1907	13875	NC_012894; FJ381664	<i>Anisakis simplex</i> Rudolphi, 1809	13916	NC_007934; AY994157
<i>Fasciola hepatica</i> Linnaeus, 1758	14462	NC_002546; AF216697	<i>Ascaris suum</i> Goeze, 1782	14284	NC_001327; X54253
<i>Opisthorchis felineus</i> Blanchard, 1895	14277	NC_011127; EU921260	<i>Toxocara canis</i> Stiles, 1905	14322	NC_010690; AM411108
<i>Paragonimus westermani</i> Braun, 1899	14965	NC_002354; AF219379	<i>T. cati</i> Zeder, 1800	14092	NC_010773; AM411622
<i>Schistosoma haematobium</i> Bilarz, 1852	16901	NC_008074; DQ157222	<i>T. malaysiensis</i> Gibbons, 2001	14266	NC_010527; AM412316
<i>S. japonicum</i> Katsurada, 1904	14085	NC_002544; AF215860	Diplogasterida (Order)		
<i>S. mansoni</i> Sambon, 1907	14415	NC_002545; AF216698	<i>Pristionchus pacificus</i>	15954	NC_015245; JF414117
<i>S. mekongi</i> Voge et al, 1978	14072	NC_002529; AF217449	Oxyurida (Order)		
<i>S. spindale</i> Montgomey, 1906	16901	NC_008067; DQ157223	<i>Enterobius vermicularis</i> Linnaeus, 1758	14010	NC_011300; EU281143
<i>Trichobilharzia regenti</i> Horak et al, 1998	14838	NC_009680; DQ859919	Rhabditida (Order)		
Monogenea (Order)			<i>Ancylostoma caninum</i> Ercolani, 1859	13717	NC_012309; FJ483518
<i>Benedenia hoshinai</i> Ogawa, 1984	13554	NC_014591; EF055880	<i>A. duodenale</i> Creplin, 1845	13721	NC_003415; AJ417718
<i>B. seriolae</i> Meserve, 1938	13498	NC_014291; HM222526	<i>Angiostrongylus cantonensis</i> Nomura, 1944	13497	NC_013065
<i>Gyrodactylus derjavinoi</i> Malmberg et al, 2007	14741	NC_010976; EU293891	<i>A. costaricensis</i> Morer & Cespedes, 1971	13585	NC_013067
<i>G. salaries</i> Malmberg, 1957	14790	NC_008815; DQ988931	<i>Bunostomum phlebotomum</i> Raillet, 1902	13790	NC_012308; FJ483517
<i>G. thymalli</i> Zitnan, 1960	14788	NC_009682; EF527269	<i>Caenorhabditis briggsae</i> Dougherty, 1949	14420	NC_009885; AC186293
<i>Microcotyle sebastis</i> Coto, 1894	14407	NC_009055; DQ412044	<i>C. elegans</i> Maupas, 1900	13794	NC_001328; X54252
Cestoda (Class/28 species)			<i>Chabertia ovina</i> Raillet & Henry, 1909	13682	NC_013831; GQ888721
Cyclophyllidea (Order)			<i>Cooperia oncophora</i> Ransom, 1907	13636	NC_004806; AY265417
<i>Echinococcus granulosus</i> Batsch, 1786 (G1)	13588	NC_008075; AF297617	<i>Cylicocyclus insignis</i>	13828	NC_013808; GQ888712
<i>E. granulosus</i> (G4/horse strain)	13598	AF346403	<i>Haemonchus contortus</i> Cobb, 1898	14055	NC_010383; EU346694
<i>E. granulosus</i> (G5/cattle strain)	13717	NC_011122; AB235846	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar, 1976	18128	NC_008534; EF043402
<i>E. granulosus</i> (G6/camel strain)	13721	NC_011121; AB208063	<i>Mecistocirrus digitatus</i> Raillet, 1912	15221	NC_013848; GQ888722
<i>E. granulosus</i> (G7/pig strain)	13719	AB235847	<i>Metastrongylus pudendotectus</i> Wost, 1905	13778	NC_013813; GQ888714
<i>E. granulosus</i> (G8/cervid strain)	13717	AB235848	<i>M. salmi</i> Gedoelst, 1923	1393	NC_013815; GQ888715
<i>E. multilocularis</i> Leuckart, 1863	13733	NC_000928; AB018440	<i>Necator americanus</i> Stiles, 1903	13605	NC_003416; AJ417719
<i>E. oligarthrus</i> Diesing, 1863	13791	NC_009461; AB208545	<i>Oesophagostomum dentatum</i> Molin, 1861	13869	NC_013817; GQ888716
<i>E. shiquicus</i> Xiao et al, 2003	13807	NC_009460; AB208064	<i>Steinernema carpocapsae</i> Woutus, 1982	13925	NC_005941; AY591323
<i>E. vogeli</i> Rausch & Bernstein, 1972	13750	NC_009462; AB208546	<i>Strongyloides stercoralis</i> Bavay, 1876	13758	NC_005143; AJ558163
<i>Hydatigera taeniaeformis</i> Batsch, 1786 (China)	13647	NC_014768; FJ597547	<i>Strongylus vulgaris</i> Looss, 1900	14301	NC_013818; GQ888717
<i>H. taeniaeformis</i> (Germany)	13740	unpublished*	<i>Syngamus trachea</i> von Siebold, 1836	14647	NC_013821; GQ888718

续表 1

蠕虫种(株)名	大小	GenBank 登录号	蠕虫种(株)名	大小	Gen bank 登录号
<i>Multiceps multiceps</i> (Leske, 1780) Hall, 1900	13693	NC_012894;GQ228819*	<i>Teladorsagia circumcincta</i> Stadelman, 1894	14066	NC_013827; GQ888720
<i>Taenia asiatica</i> Eom & Rim, 1993	13703	NC_004826; AF445798	<i>Trichostrongylus axei</i> Railliet, 1909	13653	NC_013824; GQ888719
<i>T. crassiceps</i> Zedar, 1800	13503	NC_002547; AF216699	<i>T. vitrinus</i> Looss, 1905	13800	NC_013807; GQ888711
<i>T. hydatigena</i> Pallas, 1766	13492	NC_012896;GQ228818*	Spirurida (Order)		
<i>T. pisiformis</i> Bloch, 1780	13387	NC_013844;GU569096*	<i>Brugia malayi</i> Buckloy, 1960	13657	NC_004298; AF538716
<i>T. saginata</i> Goeze, 1782	13670	NC_009938; AY684274	<i>Chandlerella quiscalii</i> von Linstow, 1904	13757	NC_014486; HM773029
<i>T. solium</i> Linnaeus, 1758	13709	NC_004022; AB086256	<i>Dirofilaria immitis</i> Leidy, 1856	13814	NC_005305; AJ537512
<i>Hymenolepis diminuta</i> Rudolphi, 1819	13900	NC_002767; AF314223	<i>Onchocerca volvulus</i> Bickel, 1982	13747	NC_001861; AF015193
<i>Dipylidium caninum</i> Leuckart, 1863	13598	unpublished*	<i>Steria digitata</i> Railliet et Henry, 1911	13839	NC_014282; GU138699
<i>Avitellina centripunctata</i> Rivolta, 1874	13559	unpublished*	Tylenchida (Order)		
<i>Thysaniezia giardi</i> Moniez, 1879	13768	unpublished*	<i>Radopholus similes</i> Thorne, 1949	16791	NC_013253; FN313571
<i>Moniezia benedeni</i> Blanchard, 1891	13964	unpublished*	Enoplia (Class/9 species)		
<i>M. expansa</i> Blanchard, 1891	14133	unpublished*	Dorylaimida (Order)		
Pseudophyllidea (Order)			<i>Xiphinema americanum</i> Cobb, 1913	12626	NC_005928; AY382608
<i>Diphyllobothrium latum</i> Linnaeus, 1758	13608	NC_008945; DQ985706	Mermithida (Order)		
<i>D. nihonkaiense</i> Yamane et al, 1986	13747	NC_009463; AB268585	<i>Agamerms</i> sp. BH-2006 Cobb et al, 1923	16561	NC_008231; DQ665656
<i>Spirometra erinaceieuropaei</i> Muller, 1937	13643	NC_011037; AB374543	<i>Hexamerms agrotis</i> Wang et al, 1986	24606	NC_008828; EF368011
Turbellaria (Class/1 species)			<i>Romanomerms culicivorax</i> Ross, 1976	26194	NC_008640; EF154459
Acoela (Order)			<i>R. iyengari</i> Welch, 1883	18919	NC_008693; EF175764
<i>Symsagittifera roscoffensis</i> Graff, 1891	14803	NC_014578; HM237350	<i>R. nielsenii</i> Tsai & Grundmann, 1969	15546	NC_008692; EF175763
Acanthocephala (Phylum)			<i>Thaumamerms cosgrovei</i> Poinar, 1981	20013	NC_008046; DQ520857
Palaeacanthocephala (Class/1 species)			<i>Trelkovimerms spiculatus</i> Poinar, 1986	18030	NC_008047; DQ520859
Echinorhynchida (Order)			Trichocephalida (Order)		
<i>Leptorhynchoides thecatus</i> Linton, 1891	13888	NC_006892; AY562383	<i>Trichinella spiralis</i> Railliet, 1895	16706	NC_002681; AF293969

a) \*, 本文作者完成

的效率也不高. 因为在整个进程中需要不断设计新的引物或者根据已产生的序列重新设计引物. 此外, 对富含 AT 的模板 DNA 测序较困难, 读取的序列片段较短(约为 100 bp), 同时适合于引物设计的区域也很有限. 对于大多数物种而言, 依靠常规的双向引物步移法测序所获得的测序深度(depth of coverage, DOC)很低, 通常只有 2 倍(2x)<sup>[21,22]</sup>, 并且也限制了对点突变的检测<sup>[13,20,22,23]</sup>. 总之, 长片段 PCR 方法存在一定缺陷, 需要更有效的其他方法用于线粒体基因组序列测定. 目前, 主要通过长片段 PCR 方法为线粒体基因组高通量测序制备模板<sup>[21,22]</sup>.

(V) 高通量测序方法. 近几年来, 高通量、低成本测序技术突飞猛进, 测序通量大幅度提高. 这类技术平台称为下一代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS), 其代表有 Roche 公司的 454 基因组测序仪, Illumina 公司的基因组分析仪 (Illumina Genome Analyzer) 和美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 的 SOLiD3 系统. 研究者目前所采取的策略是同时对多个样品进行长片段 PCR 扩增, 再将这些片段混合后, 用新一代高通量测序技术如 454 技术等结合相应的大型软件分析系统进行测序和组装, 个别空洞用常规 PCR 技术和测序方法进

行填补,最终组装成多个样品完整线粒体基因组序列,实现同时对多个不同种单个线虫线粒体基因组快速和高通量序列测定与分析的目的<sup>[21,22]</sup>. Jex 等人<sup>[21]</sup>用454技术对捻转血矛线虫(*H. contortus*)线粒体基因组进行了测序,其方法是将线粒体基因组 DNA 分2段进行长片段 PCR 扩增,将扩增产物混合,取5 μg 产物作为模板,用454技术GS20平台结合自动化组装程序(Newbler),成功完成了线粒体基因组全序列的测定和组装.平均测序深度约为40×,结果优于长片段 PCR 结合引物步移法测序.之后,Jex 等人<sup>[22]</sup>应用454技术同时对12种单个线虫线粒体基因组进行高通量测序,成功获得了这些线虫线粒体基因组的全序列(GQ888711~GQ8887122),取得了线粒体基因组序列分析的突破性进展.除对线虫线粒体基因组进行多态性研究外,Webb 等人<sup>[24]</sup>利用新一代高通量测序技术对米氏旋毛虫(*T. murrelli*)线粒体基因组测序结果表明,综合平均测序(片段)深度(average read depth)为250次(reads),线粒体基因组中整个蛋白质编码区大小为13917 bp,编码区碱基判定准确率为99.3%,非编码区大小为1524 bp.总之,这些技术特别适用于一个新种或者新分类地位的线虫进行从头测序、样品量少的单个虫体及多个样品快速和高通量线粒体基因组序列分析的目的.

综上所述,随着基因组测序技术的改进和突破性进展,蠕虫线粒体基因组序列测定工作发展迅速,已从最初需经过线粒体分离、线粒体基因组 DNA 分离、DNA 重组、重组体筛选与克隆、测序等一系列烦琐的过程,逐渐被常规 PCR 方法结合一般测序技术所代替.目前,长片段 PCR 方法结合新一代高通量测序技术已成为这一领域的主要工具和有效手段,并且使线粒体基因组序列测定的精度和深度大幅度提高,测序成本不断降低,使得实验条件和研究经费中等的实验室进行大规模蠕虫线粒体基因组测序变得可行.

## 2.2 线粒体基因组的结构预测和注释

蛋白质编码区、tRNA 基因和 rRNA 基因的寻找可利用生物软件进行,同时结合 Blast 和序列比对工具如 Clustal W 进行.蛋白质编码区可用 ORF 搜寻软件在线进行(ORFfinder from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)或者用 DNASTar 软件在本地计算机上进行(<http://www.dnastar.com/>). tRNA 结构预测也可使用专用预测软件在线进行,目前较常用的预测程序

为 tRNAscan-SE(<http://mi.caspur.it/mitozoa/tRNAscan-SE> 或者 <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>),能对具有典型三叶草结构、D-loop 结构以及 TV-loop 结构的 tRNA 进行预测,可获得线粒体基因组中绝大多数 tRNA 分子.其次为 ARWEN(<http://130.235.46.10/ARWEN>),也能对绝大多数 tRNA 分子作出准确预测与鉴定.对预测软件未能检测到的剩余 tRNA 分子,可使用序列比对方法和结合二级结构观察法得到<sup>[25,26]</sup>.主要非编码区二级结构的预测可使用 RNAstructure 和 MFOLD 等软件进行<sup>[27,28]</sup>.目前,在线粒体基因组注释方面,已开发出线虫专用序列注释软件(ARJ 和 RH)对全序列进行自动化注释,例如 Jex 等人<sup>[22]</sup>和 Wyman 等人<sup>[29]</sup>在高通量测序基础上结合自己开发的生物信息学自动注释软件(ARJ 和 RH)用于线粒体基因组序列分析.

## 3 蠕虫线粒体比较基因组学

蠕虫线粒体基因组大小、碱基组成、基因数目、基因排列、密码子利用、tRNA 二级结构等既有共同之处,不同类型之间又有其自身特点,构成线粒体基因组比较学的重要研究内容,其中基因数目、基因排列等比较基因组学内容已逐渐用于物种起源、进化、分类、鉴定等多个领域<sup>[30]</sup>.

### 3.1 基因组大小与碱基组成比较

蠕虫线粒体基因组结构与其他后生动物相似,为双链闭环分子.绦虫线粒体基因组大小为13.3~14.2 kb,变化范围较小,结构紧凑,富含 AT,含量约占70%.吸虫线粒体基因组核苷酸数目多在13.9~16.9 kb 之间,富含 AT,含量为60%~70%,但卫氏并殖吸虫(*P. westermani*)是一例外,AT 含量仅为51.5%.在4种碱基成分中,T 含量最高,其次为 A 和 G, C 含量最低.编码区占基因组的80%~95%,其中蛋白编码区约占基因组的70%.色矛线虫的线粒体基因组大小为13.4~18.2 kb,无尾器纲(Enoplia)线虫的线粒体基因组大小变化范围更大,约为12.6~26.2 kb.线虫与扁形动物相似,富含 AT 且含量更高,约占基因组68%~86%.通过对蠕虫线粒体基因组序列的比较,可以看出线虫线粒体基因组大小变化较大,而绦虫线粒体基因组较稳定且结构紧密;在线粒体基因组的碱基组成方面,线虫 AT 含量较高,吸虫则相对较低一些<sup>[31,32]</sup>.

### 3.2 基因数目与排列比较

扁形动物线粒体基因组所含基因数目很稳定,一共有 36 个编码基因,其中编码蛋白质的基因有 12 个,编码 tRNA 的基因有 22 个(其中 *trnS* 和 *trnL* 基因各有 2 个,其余 18 种 tRNA 分子各有 1 个),编码 rRNA 的基因有 2 个(*rrnL* 和 *rrnS*). 约占 60% 的蛋白编码基因是用于编码 NADH-Q 还原酶的 7 个亚基(*nad1*~*6* 及 *nad4L*),其余的用于编码细胞色素还原酶的 1 个亚基(*cytb*)、细胞色素氧化酶的 3 个亚基(*cox1*~*3*)和 ATP 合成酶的 1 个亚基(*atp6*),缺少较高等动物所具有的 *atp8* 基因. 扁形动物绝大多数物种线粒体基因都位于一条链(即+链)上,基因转录和复制按同一个方向即顺时针方向进行<sup>[33]</sup>.

线虫线粒体基因组所含基因数目则有不同程度的变化. 旋毛虫(*T. spiralis*)线粒体基因组拥有较高等动物所具有的 *atp8* 基因<sup>[33]</sup>; 无尾感器纲线虫线粒体基因组的蛋白基因多数为 12 个,也有部分线虫的线粒体蛋白基因为 13 或 14 个,此时 1~2 个蛋白基因有重复拷贝,而 tRNA 基因尤其是 tRNA 基因数目则变化较大,19~32 个不等<sup>[33]</sup>. 绝大多数线虫如猪蛔虫、犬钩口线虫(*A. caninum*)等的线粒体基因组所有基因都位于+链上,基因转录和复制按同一个方向即顺时针方向进行,而秀丽小杆线虫(*C. briggsae*)线粒体基因都位于-链上<sup>[21,22,34]</sup>. 此外,旋毛虫线粒体 *nad2*, *nad4*, *nad4L* 和 *nad5* 4 个基因在 mtDNA 的-链上,而其余 9 个蛋白基因则位于 mtDNA 的+链上; 10 个 tRNA 基因位于-链上,而其余 12 个位于+链上,这与有体腔的后生动物线粒体基因组基因的转录以 2 个方向不对称进行相同. 无尾亚纲其他线虫线粒体基

因分布与旋毛虫 mtDNA 相似<sup>[22,33,35,36]</sup>.

绦虫线粒体基因组基因序列排列较稳定,缺少变化. 尽管如此,微小膜壳绦虫(*H. diminuta*)和裸头科绦虫(*Anoplocephalidae*)的 *trnS2* 和 *trnL1* 排列次序与已测序的其他绦虫稍有不同, *trnS2* 位于 *trnL1* 之前<sup>[37]</sup>. 另外, NR1 区在泡尾带绦虫(*T. taeniaeformis*)位于 *trnL1* 和 *trnS2* 之间,而其他绦虫则位于 *trnY* 和 *trnL1* 之间即后者之前(待发表). 从基因的排列顺序看,绦虫与肝片形吸虫(*F. hepatica*)、卫氏并殖吸虫、华支睾吸虫(*C. sinensis*)和猫后睾吸虫(*O. felineus*)等复殖目吸虫(Digenea)最为相近,其次与单殖目(Monogenea)中的三代虫(*G. derjavinoidea*, *G. salaries* 和 *G. thymalli*)等也较相近,从一个侧面反映了绦虫和吸虫在进化上的亲缘关系(图 1)<sup>[38-44]</sup>. 虽然吸虫线粒体基因组基因数目保持稳定,但基因的排列顺序比绦虫线粒体基因富于变化,尤其是埃及血吸虫(*S. haematobium*)、曼氏血吸虫(*S. mansoni*)和梭形血吸虫(*S. spindale*)基因排列与其他吸虫差异较大,呈现出多样性<sup>[38-44]</sup>.

虽然线虫 mtDNA 中,各基因的大小相对稳定,具有相对保守性,但是基因数目变化大,而且排列顺序与位置比扁形动物门中吸虫和绦虫的变化多、复杂. 根据线粒体蛋白基因和 rRNA 基因的排列(gene arrangement)共分 11 种方式(GA1~GA11). 在分类学上属于同一目的线虫通常拥有相同或者相似的基因排列方式,如属于旋尾目(Spirurida)的 4 种线虫包括马来丝虫(*B. malayi*)、犬恶丝虫(*D. immitis*)、旋盘尾丝虫和指状腹腔丝虫(*S. digitata*)线粒体基因排列方式为 GA7. 约有一半的线虫具有 GA6 基因排列方式.

<i>T. spiralis</i>	<i>nad6</i>	<i>cytb</i>	<i>rrnS</i>	<i>rrnL</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>atp8</i>	<i>nad3</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>nad1</i>	<i>nad2</i>	<i>nad5</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	GA1	
<i>S. stercoralis</i>	<i>nad6</i>	<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad5</i>	<i>nad4</i>	<i>cox3</i>	<i>atp6</i>	<i>nad2</i>	<i>nad3</i>	<i>nad1</i>	<i>rrnS</i>	<i>cytb</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnL</i>		GA2	
<i>H. bacteriophora</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4L</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad1</i>	<i>atp6</i>	<i>nad2</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad3</i>	<i>cytb</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>		GA3	
<i>C. oncophora</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4L</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad1</i>	<i>atp6</i>	<i>nad2</i>	<i>cytb</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad3</i>	<i>nad5</i>		GA4	
<i>R. simitris</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad4</i>	<i>cytb</i>	<i>nad2</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad1</i>	<i>atp6</i>	<i>nad5</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad3</i>	<i>cox1</i>			GA5	
<i>O. volvulus</i>	<i>nad6</i>	<i>cytb</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4L</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad1</i>	<i>atp6</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad3</i>	<i>nad5</i>	<i>nad2</i>	<i>nad4</i>	<i>cox1</i>		GA6	
<i>T. canis</i>	<i>nad2</i>	<i>cytb</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad3</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4L</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad1</i>	<i>atp6</i>		GA7	
<i>E. vermicularis</i>	<i>nad2</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad6</i>	<i>cytb</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad3</i>	<i>nad5</i>	<i>cox2</i>	<i>rrnS</i>	<i>cox3</i>	<i>nad1</i>	<i>atp6</i>		GA8	
<i>Agamermis</i> sp.	<i>nad2</i>	<i>atp6</i>	<i>nad5</i>	<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox3</i>	<i>rrnL</i>	<i>cox2</i>	<i>cytb</i>	<i>nad1</i>	<i>nad6</i>	<i>nad4</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad3</i>		GA9	
<i>H. agrotis</i>	<i>nad2</i>	<i>cytb</i>	<i>rrnL</i>	<i>cox2</i>	<i>nad3</i>	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	<i>nad6</i>	<i>cox3</i>	<i>atp6</i>	<i>atp6</i>	<i>atp6</i>	<i>rrnS</i>	<i>nad5</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	GA10
<i>X. americanum</i>	<i>nad2</i>	<i>cox2</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4L</i>	<i>rrnL</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad1</i>	<i>cox1</i>	<i>cytb</i>	<i>rrnS</i>	<i>atp6</i>	<i>nad4</i>		GA11	

图 1 线虫线粒体基因组蛋白编码基因和核糖体核酸基因序列排列方式(GA)比较

无尾器纲线虫线粒体基因排列方式变化最大(图1)<sup>[34,36,45]</sup>.

### 3.3 密码子及其利用比较

扁形动物线粒体基因分别使用密码子表9, 线虫和棘头虫线粒体基因使用密码子表5. 在密码子表9中, ATG和GTG为最常见起始密码子, 终止密码子多为TAA和TAG, 而TGA终止密码子在线粒体基因则编码色氨酸(Trp), AAA编码天冬酰胺而非标准密码子的赖氨酸(Lys), AGA和AGG编码丝氨酸(Ser)而非标准密码子中的精氨酸(Arg). 在密码子表5中, ATG, GTG, ATT, ATC, ATA和TTG为常见起始密码子, 指状腹腔丝虫有4个线粒体基因的起始密码子为TTT<sup>[45]</sup>; TAA和TAG为终止密码子; AGA和AGG编码丝氨酸, TGA密码色氨酸, ATA编码甲硫氨酸(Met)而非标准密码子中的异亮氨酸(Ile). 不过也有一些特殊情况, GTT可能作为扁形动物某些线粒体基因的起始密码子如豆状带绦虫(*T. pisiformis*)线粒体 *atp6* 基因、缩小膜壳绦虫(*D. diminuta*)线粒体 *cox1* 基因<sup>[37,47]</sup>. 有的蛋白质如猪带绦虫(*T. solium*)的 *nad1* 翻译还使用T或者TA作为转录终止信号, 转录后加工时在T之后再插入A(A)作为蛋白翻译的终止密码子<sup>[47,48]</sup>.

由于蠕虫线粒体基因组T, A和G的含量较高, 因而TTT, GTT和TTG是高频密码子, 约占所有密码子的10%, 第一位和第二位由T或者G碱基构成的密码子所编码的氨基酸(Cys, Lys, Asn, Pro, Gln和Thr)几乎占整个蛋白质的50%, 而由A和C组成的密码子仅占密码子的2%, 蠕虫线粒体蛋白基因密码子组成具有明显偏爱性<sup>[47]</sup>.

### 3.4 tRNA 二级结构比较

扁形动物门大多数物种的线粒体 tRNA(trn)长度约为53~76 nt, 二级结构有2种形式: (1) 多数(17~18个)trn为典型的三叶草结构; (2) *trnC*, *trnS1*, *trnS2*和*trnR* 4个则呈D-loop结构(D-环, 缺配对的DHU臂). 极少数trn结构形式较特殊如缩小膜壳绦虫*trnC*和卫氏并殖吸虫的*trnR*为三叶草结构<sup>[31,37,38]</sup>. 肝片形吸虫和华支睾吸虫的*trnS1*和*trnS2*既可以呈D-loop结构也可以呈三叶草结构<sup>[31,38]</sup>. 多数吸虫的*trnF*为典型的三叶草结构, 但湄公血吸虫(*S. mekongi*)和马来血吸虫(*S. malayensis*)的*trnF*缺乏可变臂(variable arm)和配对的茎, 呈TV-loop结构<sup>[31,33,41]</sup>.

线虫线粒体 tRNA 长度约为52~65 nt, 二级结构有3种形式: (1) 2种*trnS*呈D-loop结构; (2) 除旋毛虫一部分trn分子呈典型三叶草结构外, 线虫的绝大多数trn分子呈TV-loop结构, 这在整个动物界是较少见的<sup>[33,36]</sup>; (3) 旋毛虫*trnR*, D, K, I, L1, L2, M和W等8种分子呈三叶草结构<sup>[49]</sup>.

已公布的所有蠕虫线粒体 tRNA 的反密码子相当保守, 无任何碱基突变, 其二级结构也相当保守: 受体臂由7个碱基对组成; 反密码子环由5个配对的碱基对形成的茎和1个7碱基的环组成, 反密码子在所有扁形动物中高度保守, 而在不同线虫间仍有不同程度的变异性. 在三叶草结构中, 反密码子环和TYC环间碱基数目多为4个(1~6个), 受体臂和D-环间碱基数多为2个(1~3个), 而DHU臂与反密码子环的茎之间的碱基数多为1个. 在D-loop结构中, 非配对DHU臂碱基数为7~12个. 在TV-loop结构中, DHU臂多由4个碱基对组成, TV-loop环非配对碱基数为多为6~12个<sup>[47]</sup>.

### 3.5 主要非编码区及其二级结构

绝大多数蠕虫线粒体基因组包含2个主要非编码区(noncoding region, NR, NCR), 大小差异明显, 序列高度变异, 即使是亲缘关系相近的物种也很少具有相似性. 尽管如此, 但是这一区域富含AT, 通常含有1个以上的反向重复序列, 可形成稳定而复杂的茎-环二级结构, 控制线粒体基因组复制和转录起始等功能<sup>[11,17,37]</sup>. *T. regenti*吸虫的非编码区含有3个长184 bp单元的重复序列, 每一单元均可形成稳定的含茎-环的二级结构<sup>[42]</sup>. 一些绦虫的NR区富含可变量目串联重复, 如在扩展莫尼茨绦虫(*M. expansa*)线粒体基因组NR2(LNR)中, 一微卫星序列ATT-ATGATGTATAATAGGTATAGTGTATTAA共有15个拷贝(待发表). 多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)线粒体基因组NR1(SNR)中, AATTTATCCGGTTT-GATGTGCCT序列单元共有2个, 而它的反向序列AGGCACATCAAACCGGATAAATT也有2个, 后者和前者相间排列, 中间被其他短序列隔开<sup>[17]</sup>. 这些茎-环结构类似于脊椎动物线粒体DNA中D环区附近的保守序列CSB1~CSB3, 可作为DNA-蛋白质结合时蛋白质(转录起始因子)的结合位点, 因此AT富集区被认为对线粒体DNA的复制和转录起着调控作用<sup>[17]</sup>.

### 3.6 线粒体 *nad4* 和 *nad4L* 基因之间的重叠区大小比较

绦虫中除了带属(*Taenia* Linnaeus, 1758)的线粒体 *nad4* 和 *nad4L* 基因间重叠区大小为 34 bp 外, 其余绦虫的该重叠区为 40 bp<sup>[47]</sup>. 对于吸虫而言, 此重叠区大小多数为 28 或者 40 bp, 日本分体血吸虫(*S. japonicum*)和 *T. regenti* 吸虫的重叠区大小为 37 bp, 湄公血吸虫为 64 bp<sup>[34]</sup>. 相反, 绝大多数线虫的这 2 个基因并不排列在一起, 而且部分线虫如旋毛虫和 *H. agrotis* 线虫的 *nad4* 基因位于 *nad4L* 之前<sup>[33]</sup>. 这些特征可用于线粒体基因组序列比较分析与注释. Nakao 等人<sup>[47]</sup>认为猪带绦虫和多房棘球绦虫线粒体基因 *nad4L* 和 *nad4* 之间无重叠区, 但是随着愈来愈多的绦虫线粒体基因组序列的测定和数据的积累, 通过比较基因组学研究不难发现这 2 个基因之间仍然存在重叠区, 需要对它们的线粒体基因组原始注释进行修正.

## 4 线粒体基因组序列的应用

线粒体基因组序列已在蠕虫虫种鉴定、分子分类、物种起源与进化、疾病诊断等方面得到愈来愈多的应用.

### 4.1 虫种的分子分类与鉴定

带科(Taeniidae)绦虫的分类过去一直存在分歧, 其原因是成虫在表型上缺乏特征, 而寄生于多种中间宿主的绦虫表型易受宿主和外界环境因素的影响其形态多变. 随着 DNA 扩增技术和测序技术的不断发展, 寄生虫分子分类学鉴定也得以发展. 分类学上有用的 DNA 序列或者 DNA 条形码数据促进了形态学方法以外其他寄生虫虫种鉴定方法的广泛使用.

亚洲带绦虫(*T. asiatica*)以前曾认为是牛带绦虫(*T. saginata*)的亚种(*T. saginata asiatica*), 是否为一个独立种一直存在争论. 牛带绦虫在医学和兽医学上具有重要意义, 可导致人的绦虫病和牛囊尾蚴病. 亚洲带绦虫是近来经常报道的一种带属绦虫, 形态学上与牛带绦虫相似, 但其生活史与牛带绦虫不同. Jeon 等人<sup>[47,50-52]</sup>通过对它们线粒体基因组全序列的测定, 结果表明亚洲带绦虫与牛带绦虫线粒体基因组核苷酸序列的差异为 4.6%, 与猪带绦虫线粒体基因组序列的差异为 11%, 同属内不同种间核苷酸差

异的标准为 2%以上, 这从基因水平上解决了亚洲带绦虫新种的独立种地位和这 3 种绦虫的亲缘关系, 并为开展猪囊虫病临床诊断、分子流行病学调查和综合防治等工作奠定了基础. 相反, 亚洲带绦虫和牛带绦虫 18S rDNA 序列间的核苷酸差异仅为 0.7%, 从这一基因上很难区分这 2 种绦虫, 结果导致将亚洲带绦虫认为是牛带绦虫或者是它的 1 个亚种或者虫株<sup>[53]</sup>.

棘球属(*Echinococcus* Rudolphi, 1866)绦虫尤其是细粒棘球绦虫(*E. granulosus*)及种以下阶元的分类学问题仍存在一定分歧和争议. 根据线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因型的差异, 人们将细粒棘球绦虫分为 G1~G10 10 种不同基因型, 与形态学、地理分布等传统方法所得到的虫株分类结果有良好的一致性. 不同虫株(基因型)所寄生的终末宿主和中间寄主略有不同, 其致病性、地理分布等方面存在不同程度的差异(表 2)<sup>[54-59]</sup>. 近来, 对细粒棘球绦虫分类学研究结果表明种内存在 4 个或 5 个“隐藏种”, 需要对它的分类进行修正<sup>[60]</sup>. 线粒体基因组全序列分析表明, 马株(G4)与其他虫株间核苷酸差异在 10%以上, 从这个意义上看它完全具有独立种的分类学地位; 牛株(G5, *E. ortleppi*)与其他虫株间的核苷酸差异在 6%以上, 也具有独立种的地位. 此外, 塔斯马尼亚绵羊株(G2)和水牛株(G3)与普通绵羊株(G1)间核苷酸差异很小, 统称为细粒棘球绦虫狭义种(*E. granulosus* s. s.), 而 G6, G7 和 G8 与普通绵羊株(G1)间核苷酸差异均超过 10%, 因此它们应属于新种(图 2). 这有力地促进了棘球绦虫分类学的发展, 给棘球蚴病病原学鉴定和分子流行病学调查提供了重要依据, 同时这些研究结果对疫苗、诊断试剂及药物的研制和开发具有重要意义<sup>[55,61-65]</sup>.

毛圆科的胃肠道捻转血矛线虫和柏氏血矛线虫(*H. placei*)是不是 2 个独立的种一直存在争论. 通过对来自美国的这 2 种线虫线粒体 *nad4* 基因序列的比较分析, 发现核苷酸序列的差异为 16%, 在线粒体 DNA 水平上是 2 个明显不同的种. 此外, 也没有证据表明在它们的野生种群中存在渐渗杂交(introgressive hybridization)现象, 从而证实了这 2 种线虫是 2 个独立的种<sup>[66]</sup>.

### 4.2 物种起源与系统进化

寄生性扁形动物门的 3 个种类间相互关系争议较多, 限制了人们对其寄生生活进化和偶然适应性



表2 细粒棘球绦虫株(基因型)宿主与地理分布

虫株/基因型	中间宿主	终末宿主	可能的地理分布
绵羊株(G1/sheep strain)	绵羊、牛、猪、骆驼、山羊、人	犬、狐狸、澳洲野狗、狐狼、土狼(鬣狗)	澳大利亚大陆、欧洲、美国、新西兰、非洲、中国、中亚、南美、前苏联
塔斯马尼亚岛绵羊株(G2/Tasmania strain)	绵羊、人、牛(未定)	犬、狐狸	塔斯马尼亚、阿根廷
水牛株(未定)(G3/bufflo strain)	水牛、牛和人(未定)	犬、狐狸(未定)	亚洲
马株(G4/equine strain)	马、其他马属动物	犬	欧洲、中东、南非、新西兰和美国(未定)
牛株(G5/cattle strain)	牛、人	犬	欧洲、南非、印度、斯里兰卡、前苏联
骆驼株(G6/camel strain)	骆驼、山羊、牛和人	犬	中东、非洲、中国、阿根廷、加拿大
猪株(G7/pig strain)	猪、人(未定)	犬	欧洲、前苏联、南非、加拿大
麋鹿株(G8/cervid strain)	麋、鹿、驯鹿、人(未定)	狼、犬	南美、欧亚大陆、加拿大
猪株(G9/pig strain)	猪、人(未确定)	犬?	波兰、加拿大
麋鹿株(G10/moose strain)	麋、人(未确定)	狼、犬	加拿大
狮株 (Lion strain/未有详细基因型分析资料)	斑马、羚羊、疣猪、南非野猪、水牛、长颈鹿和河马(未定)	狮	非洲

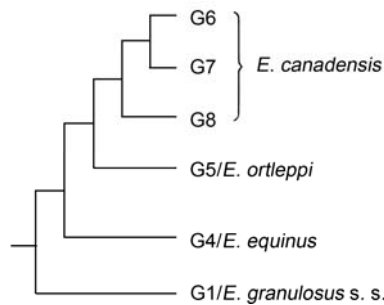


图2 细粒棘球绦虫种下阶元分类学地位及分子进化关系  
根据线粒体基因组全序列绘制

的理解与认识。绦虫纲和单殖亚纲(幼虫具有后钩)是姊妹类的历史观念已经废除。愈来愈多证据支持单殖亚纲非单系。通过对本尼登虫(*B. seriola*)线粒体基因组全序列、*M. sebastis* 吸虫和 *Neobenedenia* 属一未定种吸虫部分蛋白质基因序列比较与分析表明单殖亚纲并非单系，而复殖亚纲和绦虫纲为姊妹类并且各为单系。单殖亚纲和盾盘亚纲吸虫种类的成虫及幼虫形态，以及复殖亚纲吸虫种类的雷蚴形态均与涡虫纲的某些种类别的形态有许多相似之处，可以推测吸虫纲的祖先可能是由涡虫类演化而来，并可能是多起源性的(图 3)<sup>[39,67,68]</sup>。

传统的血吸虫种系发生研究要依据虫卵形态、中间宿主特异性和生物地理学特征并将分体属吸虫分为 4 组，分别以日本分体血吸虫(*S. japonicum*)(包括

*S. malayensis*, *S. sinensium* (Bao, 1958, 中华血吸虫), *S. mekongi* 和 *S. ovuncatum* (Attwood et al., 2002))、曼氏血吸虫 *S. mansoni*(包括 *S. ranhaini*, *S. hippopotami* 和 *S. edwardiense*), 印地血吸虫(组)(*S. indicum*) (包括 *S. incognitum*, *S. nasale* 和 *S. spindale*)和埃及血吸虫(*S. haematobium*)(包括 *S. guineensis*(几内亚血吸虫), *S. curassoni* 和 *S. bovis* (牛血吸虫))为各组代表种。通过对分体属代表性种线粒体基因组全序列分析表明，与 *S. mansoni* 处于同一进化支的吸虫如 *S. haematobium*, *S. spindale*, *S. rodhaini*, *S. nasale*, *S. indicum*, *S. margrebowiei*, *S. leiperi*, *S. math*, *S. bovis*, *S. curassoni* 和 *S. intercalatum* 等拥有共同的、独特的线粒体基因组排列特征；而与 *S. japonicum* 处于同一进化支的其他吸虫则拥有另一种不同线粒体基因组排列特征。此外，其他吸虫种类的线粒体基因组排列特征与分体属吸虫也不尽相同，有其自身的排列特征，以此用于吸虫分子进化和分类学研究(图 3)。线粒体基因组全序列分析也表明，曼氏血吸虫、梭形血吸虫和埃及血吸虫 3 种吸虫与日本血吸虫组的其他分体属吸虫 (*Schistosoma* Weinland, 1858)在基因排列方面差异很大，单靠基因碱基的突变、片段的插入或缺失来实现是很困难的，这些结果有力地支持了分布于西亚、南亚和非洲的 3 种血吸虫(以曼氏血吸虫为代表)与分布于东亚和东南亚的日本分体血吸虫群(组)的血吸虫的起源可能不同，提出血吸虫“亚洲外起源”

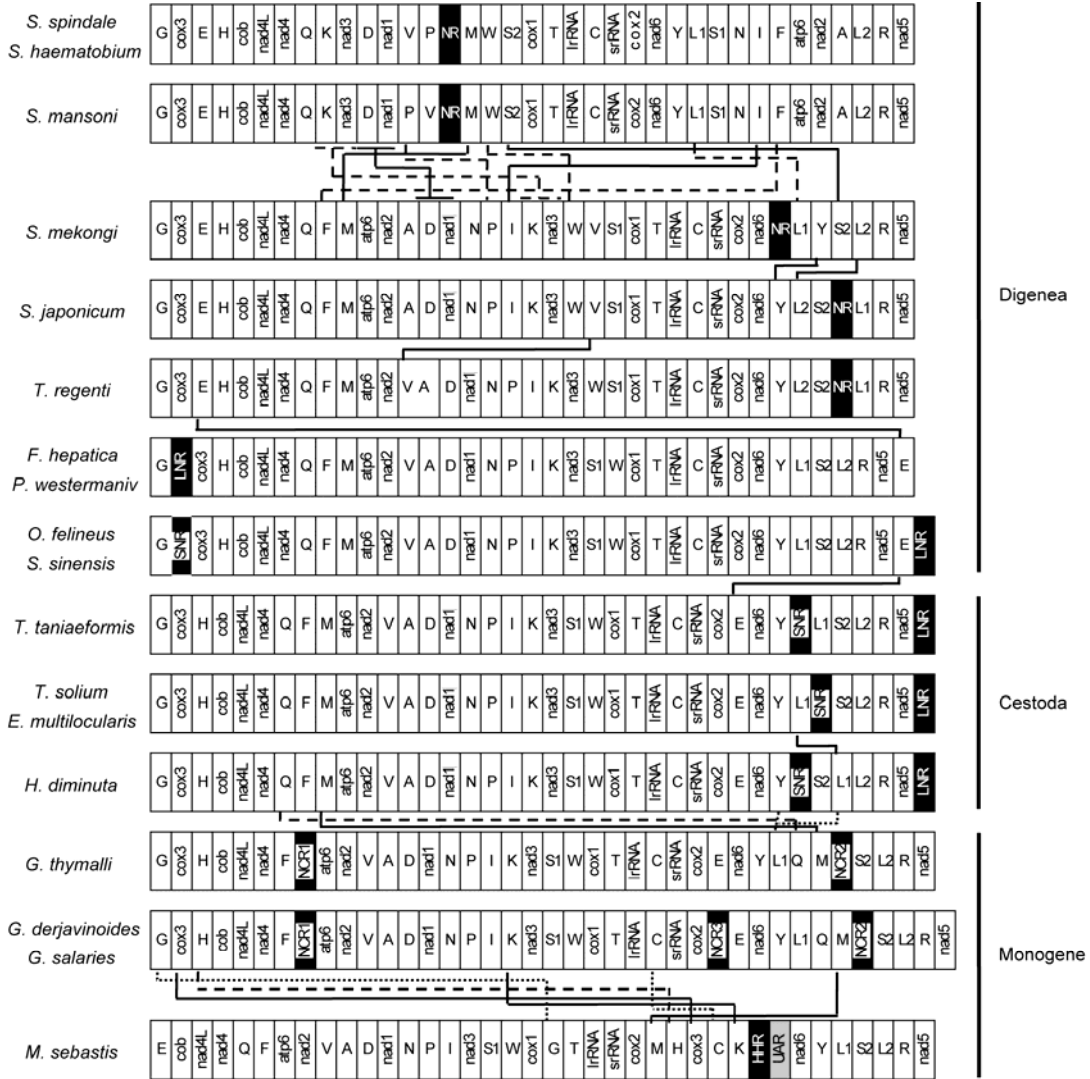


图3 吸虫和绦虫线粒体基因组全序列排列比较与亲缘关系  
 黑色框表示非编码区，灰色框表示富含 AT 的非编码区

说。同时，分体属吸虫系统进化的研究结果反过来也可用于预测其线粒体基因组基因的排列顺序(图3)<sup>[31]</sup>。

### 4.3 蠕虫病分子流行病学、地理学和生态学调查

DNA 检测是在寄生虫病分子流行病学和生态学研究中鉴定虫种所广泛应用的方法。在棘球属生态学方面，与人类关联栖息地上疾病时空传播追踪中分子遗传标记是必不可少的研究指标。评价棘球绦虫虫群遗传学结构的常用分子标记是具有高度多态性的微卫星 DNA，其中包括短串联重复 DNA。虽然已从细粒棘球绦虫和多房棘球绦虫获得一些单

位点微卫星多态性分子标记，但是其数量还相当有限。线粒体基因分子遗传标记系统发育地理学研究表明，多房棘球绦虫种群总体上可分为欧洲支、亚洲支和北美支，它们似乎可能是由更新世冰川期狐狸的地理隔离造成的<sup>[69]</sup>。在我国青藏高原新近发现的石渠棘球绦虫(*E. shiquicus*)则分别需要藏狐和高原鼠兔作为终末宿主和中间宿主，这与细粒棘球绦虫狭义种(*E. granulosus* s. s.)和多房棘球绦虫完全不同<sup>[70,71]</sup>。在不同的地理区域和宿主体内，细粒棘球绦虫可能存在差异明显的遗传特性。不同虫株(基因型)或者可称为不同种，其幼虫形态、对人体的致病性、宿主范围和流行病学方面存在不同程度的差异(表2)。

这些研究结果对疫苗、诊断试剂及药物的研制和开发具有重要参考意义<sup>[72]</sup>。在我国发现细粒棘球绦虫有2个主要基因型: G1型, 人、绵羊和牛为中间宿主; G6型, 人、牛和骆驼为中间宿主<sup>[60,66,72]</sup>。通过对来自病人和动物棘球蚴包囊样品的收集与分子鉴定, 可确定这2个基因型对人和动物致病性强弱及在棘球蚴病防控中的意义。

猪带绦虫种群内线粒体 *cox1* 基因片段和诊断抗原 Ts14 核基因存在微小遗传变异<sup>[73]</sup>。但是, 通过线粒体 *cox1* 和 *cytb* 基因全长序列分析与比较, 可将猪带绦虫分为2个主要地理支: 分布广泛的拉美和非洲支; 分布局限的亚洲支<sup>[74]</sup>。猪带绦虫地理分支表明猪带绦虫是殖民地时期(始于500年前)新近从欧洲传入拉丁美洲和非洲的, 猪带绦虫是独立传播到亚洲的。这一假说近来说得到了新的数据分析的进一步支持<sup>[75]</sup>。

#### 4.4 蠕虫病的诊断

传统的形态学方法有时对形态上相似、但在遗传学上有差别的虫种(隐蔽或者隐藏种)加以区别。另外, 形态学特征容易受到寄生部位、宿主种类等外界因素的影响。选择合适的和可靠的分子遗传标记来鉴定蠕虫虫种是一种有效的方法, 其中线粒体基因组或者片段被证明是有用的分子遗传标记, 在蠕虫病诊断中得到愈来愈多的应用。

利用生活史等传统方法鉴别十二指肠钩虫和美洲板口线虫感染费时费力, 但是它们在生活史方面和线粒体基因组序列上差异明显, 这给这类寄生虫病的流行病学研究和控制提供了便利条件。Zhan 等人<sup>[76]</sup>根据 *cox1* 基因保守区设计引物, 用特异性 PCR 方法分别扩增十二指肠钩虫和美洲板口线虫成虫、幼虫和虫卵的 *cox1* 基因片段(585 bp), 这样在成虫期、幼虫和虫卵各阶段就可将这2种钩虫很容易地进行区别, 从而对人体钩虫感染作出及时准确的诊断, 为进一步采取有效的治疗措施提供重要依据。相信随着蠕虫线粒体基因组序列的测定, 将为隐藏种的发现、形态学上易混淆虫种的鉴定等提供更多有用的分子遗传学标记。

#### 4.5 蠕虫病防治策略的制定

猪带绦虫、牛带绦虫和亚洲带绦虫是人体绦虫病的病原体。猪带绦虫在人和猪之间循环, 人也可感染

囊尾蚴或者自体感染; 亚洲带绦虫在人和猪之间循环, 尚未发现人囊尾蚴病例; 而牛带绦虫在人和牛之间循环, 也未发现人体囊尾蚴病例。但是, 这3种绦虫病可同时出现于同一区域<sup>[77-79]</sup>。因此, 通过对人体这3种带绦虫准确而及时的诊断, 可准确评估绦虫感染者在疾病传播上的危险性, 同时通过对患者进行早期驱虫, 可有效防止传染源的扩散, 从而达到控制囊尾蚴病, 保障人和动物卫生健康的目的<sup>[80]</sup>。可靠的流行病学信息包括准确的病原体检测工具也是有效控制绦虫病和囊尾蚴病流行不可或缺的。

近来, 通过对线粒体基因片段特定位点上胸腺嘧啶核苷酸碱基的扫描分析可准确地鉴别出牛带绦虫和亚洲带绦虫, 并对猪带绦虫2种基因型作出鉴别诊断。以线粒体基因为检测靶标分子的一种简单且可靠的多重 PCR 方法已经用于绦虫病和囊虫病鉴别诊断<sup>[81]</sup>。Yamasaki 等人<sup>[82]</sup>以 *cox1* 和组织酶 L 样-半胱氨酸蛋白酶基因(*clp*)为目标, 利用 LAMP 技术再结合限制性内切酶分析可以有效检测和鉴别人体粪便中猪带绦虫、牛带绦虫和亚洲带绦虫感染, 其敏感性达到从每克粪便中检出1个拷贝的目标基因或者5个虫卵的水平, 检出效果类似于常规 PCR 方法。但是 LAMP 方法简单、快速、特异和敏感, 成为绦虫病和囊尾蚴病流行国家疫病防控中的重要检测手段而得以广泛使用<sup>[81-86]</sup>。

### 5 未来研究方向

(1) 测定更多蠕虫线粒体基因组序列。自首个蠕虫线粒体基因组全序列测定以来, 在随后近20年的时间里, 先后完成的蠕虫线粒体基因组全序列测定数目并不多, 但仅在2009年之后完成了其中的30多个, 占1/3, 进展迅速。尽管如此, 所测定的蠕虫物种还很零散, 与其庞大的数目相比还只是“冰山一角”, 因此蠕虫线粒体基因组序列测定和数据库资料的不断积累仍是今后研究的热点和发展方向。目前, 国际上已经启动蠕虫线粒体基因组计划, 拟对400个物种的线粒体基因组进行全序列测定与分析。

(2) 新一代高通量测序技术的应用。目前, 新一代测序技术日趋成熟, 测序成本愈来愈低, 对模板的需求量愈来愈少, DNA 标记技术也有重大提高, 可对蠕虫的线粒体基因组实现高通量测序。新型计算机软件或者生物信息学技术的飞速发展, 也进一步促进了高通量测序技术的实际应用。

(3) 线粒体基因组数据库数据挖掘和利用. 由于线粒体基因组序列已成为一个生物体重要的条形码(biocording)之一, 线粒体基因组学应运而生, 线粒体基因组数据库相继建立, 数据库信息量飞速扩展. 与此同时, 对现有数据库进行数据挖掘也显得日益重要, 也成为今后研究的方向之一.

(4) 自动化注释软件的开发与利用. 线粒体基因组数据库信息量大, 数据的存贮、提取、加工等工作量大, 靠人工方法已难以满足实际需要, 因而相应的自动化软件开发也将成为新的热点和发展方向之一. 除利用现有的一些软件外, 还需要开发其他可用于绦虫、吸虫和线虫线粒体基因组分析和自动化注释软件, 适合不同应用目的如引物设计软件等, 对促进蠕虫线粒体基因组研究及其应用也十分必要.

(5) 拓展线粒体基因组序列的应用研究范围. 蠕虫线粒体基因组序列分析有着广阔的应用前景,

将在寄生虫分子分类、虫种鉴定、物种起源、分子进化、疾病诊断、分子流行病学调查等多个领域进行应用. 其中, 它在揭示物种起源、分子进化等生命奥秘研究中的作用更为突出.

## 6 结束语

综上所述, 蠕虫线粒体基因组序列测定与分析及其在寄生虫虫种分类鉴定、起源与进化、疾病诊断、流行病学调查、种群遗传学等方面的应用已引起科学家的极大兴趣, 新完成的线粒体基因组序列测定的蠕虫数目正在迅速增加. 蠕虫线粒体基因组结构与功能研究将成为生命科学领域面临的新课题和新机遇, 研究成果将有助于揭示物种起源与进化, 线粒体功能异常疾病致病机理, 为疾病的控制提供新的思路和方法. 相信, 随着这方面研究的深入, 将为人和动物寄生虫病的有效防治等产生深远影响.

## 参考文献

- 1 Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22: 466–483
- 2 Pawlowski Z S. Cestodiasis: Taeniasis, cysticercosis, diphyllbothriasis, hymenolepiasis, and others. In: Warren K S, Mahmoud A A F, eds. *Tropical and Geographical Medicine*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Information Services, 1990
- 3 Chai J Y, Murrell K D, Lymbery A J. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *Int J Parasitol*, 2005, 35: 1233–1254
- 4 Koenning S R, Overstreet C, Noling J W, et al. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *J Nematol*, 1999, 31: 587–618
- 5 Olson P D, Tkach V V. Advances and trends in the molecular systematic of the parasitic platyhelminthes. *Adv Parasitol*, 2005, 60: 165–243
- 6 Hu M, Gasser R B. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes—Progress and perspectives. *Trends Parasitol*, 2006, 22: 78–84
- 7 Boore J L, Brown W M. Big trees from little genomes: Mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 668–674
- 8 Boore J L. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 1767–1780
- 9 Hu M, Chilton N B, Gasser R B. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: Recent progress, and implications for population genetics and systematics. *Adv Parasitol*, 2003, 56: 133–212
- 10 Gasser R B, Newton S E. Genomic and genetic research on bursate nematodes: Significance, implications and prospects. *Int J Parasitol*, 2000, 30: 509–534
- 11 Okimoto R, Macfarlane J L, Wolstenholme D R. Evidence for the frequent use of TTG as the translation initiation codon of mitochondrial protein genes in the nematodes, *Ascaris suum* and *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6113–6118
- 12 Okimoto R, Macfarlane J L, Clary D O, et al. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics*, 1992, 130: 471–498
- 13 Littlewood D T, Gasser R B. Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes—Focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications. *Biotechnol Adv*, 2010, 18: 151–159
- 14 Keddie E M, Higazi T, Unnasch T R. The mitochondrial genome of *Onchocerca volvulus*: Sequence, structure and phylogenetic analysis. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, 95: 111–127
- 15 Burger G, Lavrov D V, Forget L, et al. Sequencing complete mitochondrial and plastid genomes. *Nat Protoc*, 2007, 2: 603–614
- 16 Hu M, Chilton N B, Gasser R B. The mitochondrial genomes of the human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea). *Int J Parasitol*, 2002, 32: 145–158

- 17 Nakao M, Yokoyama N, Sako Y, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidae: Taeniidae). *Mitochondrion*, 2002, 1: 497–509
- 18 Le T H, Blair D, Agatsuma T, et al. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders—A cautionary tale from the parasitic flatworms. *Mol Biol Evol*, 2000, 17: 1123–1125
- 19 Tang S, Hyman B C. Rolling circle amplification of complete nematode mitochondrial genomes. *J Nematol*, 2005, 37: 236–241
- 20 Hu M, Jex A R, Campbell B E, et al. Long PCR amplification of the entire mitochondrial genome from individual helminths for direct sequencing. *Nat Protoc*, 2007, 2: 2339–2344
- 21 Jex A R, Hu M, Littlewood D T, et al. Using 454 technology for long-PCR based sequencing of the complete mitochondrial genome from single *Haemonchus contortus* (Nematoda). *BMC Genomics*, 2008, 9: 11
- 22 Jex A R, Hall R S, Gasser R B, et al. An integrated pipeline for next-generation sequencing and annotation of mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 522–533
- 23 Hu M, Chilton N B, Gasser R B. Long PCR-based amplification of the entire mitochondrial genome from single parasitic nematodes. *Mol Cell Probes*, 2002, 16: 261–267
- 24 Webb K M, Rosenthal B M. Next generation sequencing of the *Trichinella murrelli* mitochondrial genome allows comprehensive comparison of its divergence from the principal agent of human trichinellosis, *Trichinella spiralis*. *Infect Genet Evol*, 2011, 11: 116–123
- 25 Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 955–964
- 26 Laslett D, Canback B. ARWEN: A program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2008, 24: 172–175
- 27 Mathews D H. Predicting a set of minimal free energy RNA secondary structures common to two sequences. *Bioinformatics*, 2005, 21: 2246–2253
- 28 Mathews D H, Disney M D, Childs J L, et al. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7287–7292
- 29 Wyman S K, Jansen R K, Boore J L. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, 2004, 20: 3252–3255
- 30 Lupi R, de Meo P D, Picardi E, et al. MitoZoa: A curated mitochondrial genome database of metazoans for comparative genomics studies. *Mitochondrion*, 2010, 10: 192–199
- 31 Littlewood D T, Lockyer A E, Webster B L, et al. The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39: 452–467
- 32 Steinauer M L, Nickol B B, Broughton R, et al. First sequenced mitochondrial genome from the phylum Acanthocephala (*Leptorhynchoides thecatus*) and its phylogenetic position within Metazoa. *J Mol Evol*, 2005, 60: 706–715
- 33 Lavrov D V, Brown W M. *Trichinella spiralis* mtDNA: A nematode mitochondrial genome that encodes a putative ATP8 and normally structured tRNAs and has a gene arrangement relatable to those of coelomate metazoans. *Genetics*, 2001, 157: 621–637
- 34 He Y, Jones J, Armstrong M, et al. The mitochondrial genome of *Xiphinema americanum* sensu stricto (Nematoda: Enoplea): Considerable economization in the length and structural features of encoded genes. *J Mol Evol*, 2005, 61: 819–833
- 35 Jex A R, Waeschenbac A, Hu M, et al. The mitochondrial genomes of *Ancylostoma caninum* and *Bunostomum phlebotomum*—Two hookworms of animal health and zoonotic importance. *BMC Genomics*, 2009, 10: 79
- 36 Powers T O, Harris T S, Hyman B C. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Meloidogyne incognita*, *Romanomermis culicivorax*, *Ascaris suum*, and *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol*, 1993, 25: 564–572
- 37 von Nickisch-Roseneck M, Brown W M, Boore J L. Complete sequence of the mitochondrial genome of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*: Gene arrangements indicate that Platyhelminths are Eutrochozoans. *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 721–730
- 38 Shekhovtsov S V, Katokhin A V, Kolchanov N A, et al. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitol Int*, 2010, 59: 100–103
- 39 Perkins E M, Donnellan S C, Bertozzi T, et al. Closing the mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers evolution in the diet of parasitic flatworms. *Int J Parasitol*, 2010, 40: 1237–1245
- 40 Plaisance L, Huyse T, Littlewood D T, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the monogenean *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes: Monogenea), a parasite of grayling (*Thymallus thymallus*). *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 154: 190–194
- 41 Huyse T, Plaisance L, Webster B L, et al. The mitochondrial genome of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes: Monogenea), a pathogen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology*, 2007, 134: 739–747
- 42 Webster B L, Rudolfova J, Horak P, et al. The complete mitochondrial genome of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* (Platyhelminthes: Digenea), causative agent of cercarial dermatitis. *J Parasitol*, 2007, 93: 553–561

- 43 Huysse T, Buchmann K, Littlewood D T. The mitochondrial genome of *Gyrodactylus derjavinoideus* (Platyhelminthes: Monogenea)—A mitogenomic approach for *Gyrodactylus* species and strain identification. *Gene*, 2008, 417: 27–34
- 44 Le T H, Humair P F, Blair D, et al. Mitochondrial gene content, arrangement and composition compared in African and Asian schistosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, 117: 61–71
- 45 Yatawara L, Wickramasinghe S, Rajapakse R P, et al. The complete mitochondrial genome of *Setaria digitata* (Nematoda: Filarioidea): Mitochondrial gene content, arrangement and composition compared with other nematodes. *Mol Biochem Parasitol*, 2010, 173: 32–38
- 46 Van der Veer M, de Vries E. A single nucleotide polymorphism map of the mitochondrial genome of the parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Parasitology*, 2004, 128: 421–431
- 47 Jia W Z, Yan H B, Guo A J, et al. Complete mitochondrial genomes of *Taenia multiceps*, *T. hydatigena* and *T. pisiformis*: Additional molecular markers for a tapeworm genus of human and animal health significance. *BMC Genomics*, 2010, 11: 447
- 48 Nakao M, Sako Y, Ito A. The mitochondrial genome of the tapeworm *Taenia solium*: A finding of the abbreviated stop codon U. *J Parasitol*, 2003, 89: 633–635
- 49 Wolstenholme D R, Okimoto R, Macfarlane J L. Nucleotide correlations that suggest tertiary interactions in the TV-replacement loop-containing mitochondrial tRNAs of the nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 4300–4306
- 50 Jeon H K, Kim K H, Eom K S. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Taenia saginata*: Comparison with *T. solium* and *T. asiatica*. *Parasitol Int*, 2007, 56: 243–246
- 51 Jeon H K, Lee K H, Kim K H, et al. Complete sequence and structure of the mitochondrial genome of the human tapeworm, *Taenia asiatica* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitology*, 2005, 130: 717–726
- 52 Jeon H K, Eom K S. *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*: Genetic divergence estimated from their mitochondrial genomes. *Exp Parasitol*, 2006, 113: 58–61
- 53 Bowles J, McManus D P. Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestodes of human. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 50: 33–44
- 54 Bowles J, Blair D, McManus D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54: 165–173
- 55 Bowles J, Blair D, McManus D P. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology*, 1995, 110: 317–328
- 56 Bowles J, McManus D P. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol*, 1993, 23: 969–972
- 57 Lavikainen A, Lehtinen M J, Meri T, et al. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 2003, 127: 207–215
- 58 Le T H, Pearson M S, Blair D, et al. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 2003, 124: 97–112
- 59 Thompson R C A, McManus D P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 2002, 18: 452–457
- 60 Thompson R C A. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, 2008, 119: 439–446
- 61 Romig T. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbeck's Arch Surg*, 2003, 388: 209–217
- 62 Scott J C, Stafaniak 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*. *Parasitology*, 1997, 114: 37–43
- 63 Moks E, Jõgisalu I, Valdman H, et al. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology*, 2008, 135: 647–654
- 64 Nakao M, McManus D P, Schantz P M, et al. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 2007, 134: 713–722
- 65 Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*, 2008, 38: 861–868
- 66 Blouin M S, Yowell C A, Courtney C H, et al. *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* are distinct species based on mtDNA evidence. *Int J Parasitol*, 1997, 27: 1383–1387
- 67 Park J K, Kim K H, Kang S, et al. A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: Evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 11
- 68 Justin J L. Non-monophyly of the monogeneans? *Int J Parasitol*, 1998, 28: 1653–1657
- 69 Nakao M, Xiao N, Okamoto M, et al. Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Int*, 2009, 58: 384–389

- 70 Xiao N, Qiu J M, Nakao M, et al. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol*, 2005, 35: 693–701
- 71 Nakao M, Li T Y, Han X M, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int J Parasitol*, 2010, 40: 379–385
- 72 Eckert J, Gemmell M A, Meslin F X, et al. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern M. Paris: World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Organisation for Animal Health, 2001
- 73 Hancock K, Broughel D E, Moura I N, et al. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *Int J Parasitol*, 2001, 31: 1601–1607
- 74 Nakao M, Okamoto M, Sako Y, et al. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology*, 2002, 124: 657–662
- 75 Martinez-Hernandez F, Jimenez-Gonzalez D E, Chenillo P, et al. Geographical widespread of two lineages of *Taenia solium* due to human migrations: Can population genetic analysis strengthen this hypothesis? *Infect Genet Evol*, 2009, 9: 1108–1114
- 76 Zhan B, Li T, Zhang F, et al. Species-specific identification of human hookworms by PCR of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. *J Parasitol*, 2001, 87: 1227–1229
- 77 Ito A, Nakao M, Wandra T, et al. Taeniasis and cysticercosis in Asia and the Pacific: Present state of knowledge and perspectives. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2005, 36: 123–130
- 78 Eom K S, Jeon H K, Kong Y, et al. Identification of *Taenia asiatica* in China: Molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate. *J Parasitol*, 2002, 88: 758–764
- 79 Anantaphruti M T, Yamasaki H, Nakao M, et al. Sympatric occurrence of *Taenia solium*, *T. saginata*, and *T. asiatica*, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13: 1413–1416
- 80 Murell K D. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis. In: Murell K D, ed. WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniasis/Cysticercosis. Paris: World Organisation for Animal Health, 2005. 27–44
- 81 Mayta H, Gilman R H, Prendergast E, et al. Nested PCR for the specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 286–289
- 82 Yamasaki H, Allan J C, Sato M O, et al. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 548–553
- 83 Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, et al. Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cysticercosis. *Parasitol Int*, 2006, 55: S81–S85
- 84 Jeon H K, Chaib J Y, Kong Y, et al. Differential diagnosis of *Taenia asiatica* using multiplex PCR. *Exp Parasitol*, 2009, 121: 151–156
- 85 Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, et al. DNA differential diagnosis of human taeniid cestodes by base excision sequence scanning thymine-base reader analysis with mitochondrial genes. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 3818–3821
- 86 Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol*, 2009, 47: 168–174