

基于线粒体 12S 基因分析四川地区鸡异刺线虫的种群遗传多态性

王保健, 朱俊扬, 简克灵, 杨光友, 汪涛, 赖为民, 赵习彬, 廖晓霞, 古小彬*

(四川农业大学动物医学院, 成都 611133)

摘要: 为探讨四川地区鸡异刺线虫的遗传变异特点和种群遗传结构特征, 利用 PCR 技术扩增了四川 7 个地区共 58 株鸡源鸡异刺线虫分离株的线粒体 12S 基因全序列, 经测序后分析其遗传多样性。结果显示, 58 条鸡异刺线虫 12S 基因全序列均为 699 bp, 序列中共有 38 个变异位点和 34 个单倍型(HS1-HS34); 单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(π)分别为 0.822 和 0.003 95。进一步分析表明, 7 个地理种群遗传分化不明显($F_{st}=0.007 87$), 种群间基因交流较频繁($Nm=31.52$); 分子方差分析(AMOVA)表明, 四川地区鸡异刺线虫的遗传分化主要来自于种群内部(99.21%), 种群间遗传变异水平较低(0.79%); 单倍型网络图和 NJ 系统发育树显示, 鸡异刺线虫 7 个地理种群的 34 个单倍型散在分布于不同种群内, 分布格局较为混杂, 未形成明显的地理分布格局。结果表明, 四川地区的鸡异刺线虫遗传多样性较低, 遗传分化不明显, 还未形成显著的地理遗传结构。

关键词: 鸡异刺线虫; 12S; 遗传多态性; 四川

中图分类号: S852.731

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)12-2264-09

Population Genetic Polymorphisms of *Heterakis gallinarum* in Sichuan Base on Mitochondrial 12S Gene

WANG Bao-jian, ZHU Jun-yang, JIAN Ke-ling, YANG Guang-you, WANG Tao, LAI Wei-min, ZHAO Xi-bin, LIAO Xiao-xia, GU Xiao-bin*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611133, China)

Abstract: To study the population genetic diversity and genetic structure of *Heterakis gallinarum* population in Sichuan, the complete sequence of mitochondrial 12S gene of 58 *H. gallinarum* isolates from 7 different geographical regions in Sichuan were amplified and analyzed the genetic diversity. The results showed that the complete lengths of mitochondrial 12S gene sequenced from 58 *H. gallinarum* isolates in this study were all 699 bp. These sequences contained 38 variable sites and were classified into 34 haplotypes(HS1-HS34). The values of haplotypes diversity(Hd) and nucleotide diversity(π) were 0.822 and 0.003 95, respectively. Genetic diversity with F_{st} and Nm furtherly showed that there were no significant genetic differentiation and frequent gene flow among the seven populations($F_{st}=0.007 87$, $Nm=31.52$). An analysis of molecular variance (AMOVA) estimated that 99.21% of the genetic variation was partitioned within the population, and only 0.79% occurred among populations. NJ phylogenetic tree and haplotype network were both revealed that 34 haplotypes from 7 different geographical regions dispersed different geographical populations, and haplotypes did not cluster according to their geographical location. The results indicated that the *H. gallinarum* population in Sichuan had a low level of genetic diversity

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31402188); 四川农业大学学科“双支计划”(03570422)

作者简介: 王保健(1990-), 男, 湖北随州人, 硕士生, 主要从事动物寄生虫病理学研究, E-mail: wangbaojian900325@163.com

* 通信作者: 古小彬, 副教授, 硕导, 主要从事动物寄生虫与寄生虫病理学研究, E-mail: guxb121@126.com

and no significant genetic differentiation, it have not formed significant geographical genetic structure.

Key words: *Heterakis gallinarum*; 12S gene; genetic polymorphisms; Sichuan

鸡异刺线虫病又称鸡盲肠线虫病(Histomoniasis),是由异刺科(*Heterakidae*)异刺属(*Heterakis*)的鸡异刺线虫(*Heterakis gallinarum*)寄生于多种家禽和野生鸟禽类盲肠内常见的一种肠道线虫病^[1-3]。该病呈世界范围内分布,常引起结节性盲肠炎,使患病动物出现腹泻、消瘦、贫血、产蛋率下降等症状,严重时甚至引起患病鸡衰竭死亡^[4-5]。同时,鸡异刺线虫亦是高致病率的火鸡组织滴虫病(*Histomonas meleagridis*)的传播媒介,给养禽业造成严重的经济损失^[6-7]。

目前,有关鸡异刺线虫的研究主要集中在形态学、流行病学以及疾病的防控等方面,在分子水平上的研究还相对较少。至今仅报道了核糖体 ITS 基因、18S 基因与线粒体 16S 基因在鸡异刺线虫分子分类与系统发育方面的研究情况^[4,8-9]。线粒体 12S rRNA 基因进化速度适中,具有母系遗传、无内含子和缺少重组等遗传特征,常被用于寄生虫种群遗传和系统进化的研究^[10-12]。目前,鸡异刺线虫遗传多样性的研究在国内外还尚属空白,然而了解寄生虫的群体遗传结构对其流行病学、进化生物学、抗药性机制等研究具有重要的指导意义^[13-14]。

本研究中作者选用线粒体 12S 基因作为分子标记,分析四川地区 7 个地理种群共 58 株鸡源鸡异刺线虫的遗传多样性及遗传分化等特征,探讨四川地区鸡异刺线虫各地理种群之间的遗传分化程度,为该地区鸡异刺线虫病的分子诊断和分子流行病学研究奠定基础,亦为鸡异刺线虫病和火鸡组织滴虫病的防控提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

58 个鸡异刺线虫样品分别采集于成都(CD1-CD6)、达州(DZ1-DZ7)、广元(GY1-GY7)、绵阳(MY1-MY8)、西昌(XC1-XC8)、雅安(YA1-YA10)及自贡(ZG1-ZG12)7 地,从鸡盲肠分离得到虫体后,用灭菌生理盐水清洗干净,经形态学鉴定^[15]后保存于-20℃冰箱待用。

1.2 样品基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指

南》^[16],稍作改进。取冻存于-20℃的各地鸡异刺线虫 1 条置于预冷研钵中,加入适量 DNA 裂解缓冲液碾碎虫体,随后加入 5 μL 蛋白酶 K (20 μg·L⁻¹)消化至澄清,采用酚/氯仿法提取 DNA,样品于-20℃保存备用。

1.3 引物设计及 12S 序列的扩增

根据 GenBank 上已发表的鸡蛔虫(JX624728)、鸽蛔虫(JX624729)和鸚鵡蛔虫(JX624730)的线粒体基因组相关序列的保守区域,应用 Primer Premier5 软件设计一对引物。P1:5'-AGTTTATGAAG-AATGTTTGTGTTTTTGGTGC-3'; P2:5'-CCACCA-AAATCATACTAACATACTC-3'。引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系(25 μL):2×Taq PCR Master-Mix 12.5 μL,上下游引物(20 pmol)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,dd H₂O 9.5 μL。试剂混合以后进行瞬时离心混匀。PCR 扩增反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,53℃复性 45 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。同时以 dd H₂O 代替 DNA 模板作为空白对照。反应结束后取 5 μL 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其大小纯度及亮度,随后将阳性 PCR 产物送往英潍捷基生物技术有限公司进行正反双向测序以保证测序结果的准确性。

1.4 数据处理与分析

测序结果返回后根据峰图进行人工校对,以 DNAMAN 5.2.10 软件(Lynnon BioSoft, Quebec, Canada)对序列进行比对、拼接和剪切生成对应的 12S 全序列文件。将这些序列输入 MEGA 5.0 软件^[17]后运用 Clustal W 程序比对核苷酸序列,统计四川地区鸡异刺线虫 12S 基因的变异位点,并计算各个碱基(A、T、C、G)组成的含量和种群间遗传距离(基于 Kimura-2-parameter 模型)。采用 DNAsp 5.0 软件^[18]计算种群的多态位点数、单倍型数(haplotypes)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, *Pi*)、单倍型多样性(Haplotypes diversity, *Hd*)、平均核苷酸差异指数(*K*)和核苷酸分歧度(*D_{xy}*)。采用 Tcs 1.21 软件^[19]构建单倍型简约网络图。以鸡蛔虫(*Ascaridia galli*) (GenBank No.: JX624728)作

为外群,采用 NJ 法构建系统发育树,并进行重复 1 000 次的自举检验(bootstrap test)。用 Arlequin 3.5 软件^[20]中的分子变异分析(AMOVA)和种群间的遗传差异分析(Fst)了解四川地区的遗传结构,基因流(Nm)由 $Nm = 1/4(1/Fst - 1)$ 计算而得,并对各种群进行中性检验(Tajima's D 和 Fu's Fs)。

2 结 果

2.1 12S 基因的序列组成及单倍型分布

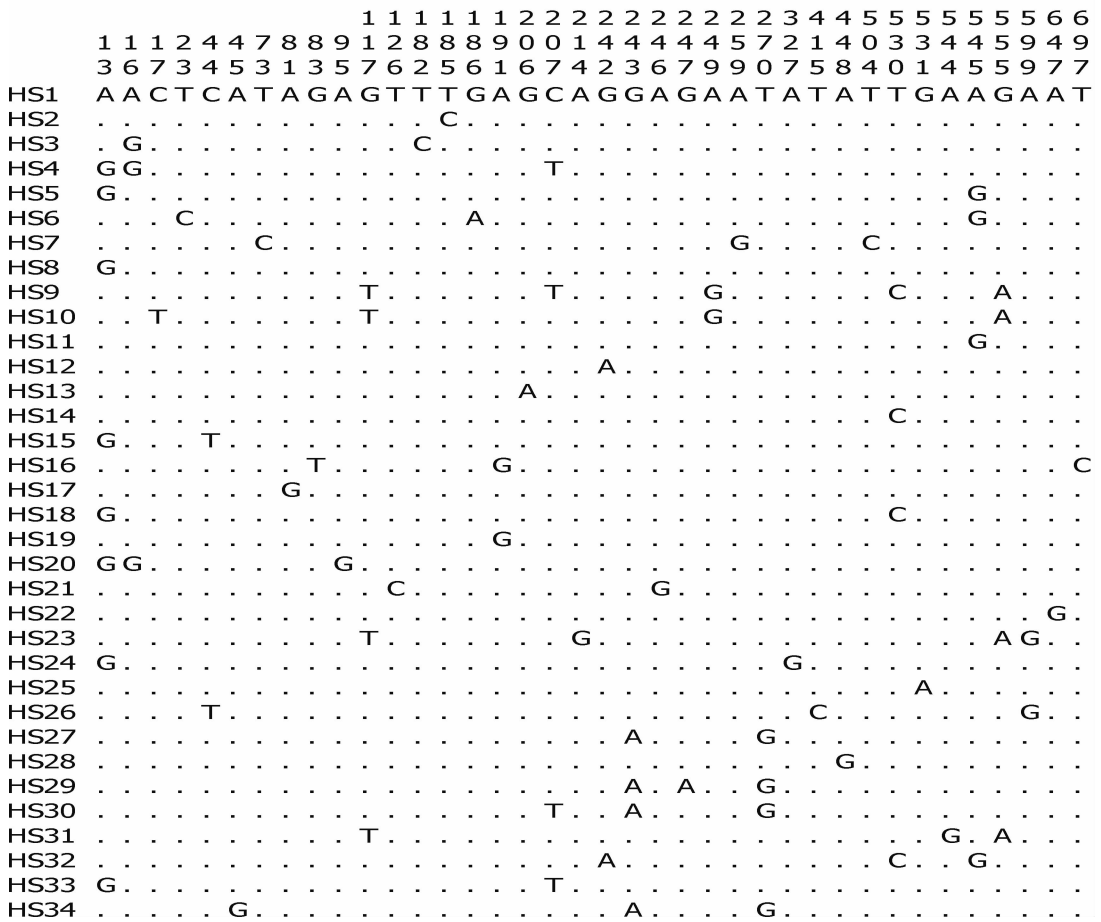
58 条测序结果经编辑和比对后均得到长为 699 bp 的 12S 基因全序列(登录号:KR153880 ~ KR153937)。经 MEGA 5.0 软件分析,12S 序列的 A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 30.2%、39.3%、8.9%和 21.6%,A+T 碱基含量为 69.5%,显著高于 C+G 的碱基含量(30.5%),表现出明显的 AT 偏倚性。DNA_{sp} 5.0 软件显示 58 条序列中共有 38

个变异位点(占 5.44%),包括 20 个单变异位点和 18 个简约信息位点,无碱基插入和缺失。其中 35 个转换位点,3 个颠换位点(图 1)。

四川地区鸡异刺线虫的 58 个样品共检测出 34 个单倍型(HS1-HS34)(表 1),HS1、HS9 和 HS14 为共享单倍型;其中单倍型 HS1 出现的频率最高(20/58),由 7 个地理种群共享,所占比率为 34.5%。单倍型 HS9 由 DZ7 和 YA11 共享,单倍型 HS14 由 GY6 和 XC5 共享,其余均为各群体特有的单倍型。

2.2 种群遗传多样性与种群扩张

从表 1 可见,四川各种群的单倍型多样性(Hd)范围为 0.786(西昌种群)~1.000(广元种群),四川整体种群单倍型多样性(Hd)为 0.882,表明四川鸡异刺线虫种群单倍型多样性(Hd)较为丰富。西昌种群的核苷酸多样性(π)最低(0.002 86),达州种群



HS1~HS34 为单倍型;小圆点代表碱基相同;上方的数字代表变异位点
 HS1-HS34 are haplotypes;A small dot indicates the same base as the first line;Numbers on top of the figure represent variable sites

图 1 鸡异刺线虫 34 个单倍型 12S 基因核苷酸变异
 Fig. 1 Nucleotide substitutions of mitochondrial 12S gene in 34 haplotypes of *Heterakis gallinarum*

的核苷酸多样性(π)最高(0.005 31),四川整体核苷酸多样性(π)为 0.003 95(表 1),表明四川鸡异刺线虫种群核苷酸多样性(π)较低。四川各种群的平均核苷酸差异指数(K)范围为 2.000(西昌种群)~3.714(达州种群)(表 1)。

从表 2 可见,四川各地理种群间的核苷酸分歧度(D_{xy})相差较小(0.315%~0.492%),其中雅安种群和西昌种群间核苷酸分歧度(D_{xy})最小(0.315%),达州种群和自贡种群间的核苷酸分歧度(D_{xy})最大(0.492%)。四川各种群间的核苷酸分歧度表现为达州和其它种群的核苷酸分歧度较大。四川鸡异刺线虫各种群间的遗传距离为 0.317%~0.496%,以雅安种群和西昌种群间遗传距离最小(0.317%),达州种群和自贡种群间的遗传距离最大(0.496%)(表 2),与核苷酸分歧度结果一致。四川整体种群的平均遗传距离为 0.004。

从中性检验值来看,7 个地理种群的 Tajima's D 值和 Fu's F_s 值均为负值(-1.975 83~-0.496 05; -4.265 77~-0.282 27),广元种群和雅安种群的 Tajima's D 值和 Fu's F_s 值为负值且差异显著($P<0.05$)(表 1)。四川整体种群的 Tajima's D 值和 Fu's F_s 值均为负值(-1.252 13, $P>0.05$ 和 -1.913 42, $P>0.05$)(表 1)。由此可见,四川地区的鸡异刺线虫种群历史中可能出现过扩张现象。

2.3 种群分化和遗传结构

根据 AMOVA 分子变异分析,种群内遗传变异占总变异的 99.21%,而仅有 0.79%的变异发生在种群间(表 3),可见种群内分子遗传变异是总变异的主要来源。四川整体种群的总 F_{st} 值为 0.007 87,7 个地理种群间的 F_{st} 值为 -0.059 82~0.061 65(表 4),其中成都与西昌种群间的 F_{st} 最高为 0.061 65。四川 7 个地理种群间基因流 N_m 为 -49.269 6~120.522 9,四川整体种群的总基因流 N_m 为 31.52,表明种群间存在较大的基因交流。

2.4 系统发育树与单倍型网络图的构建

从构建的 NJ 树来看(图 2),34 个鸡异刺线虫的单倍型构成一个大的分支,显著区别于作为外群的鸡蛔虫(*Ascaridia galli*)。各单倍型并没有按照地理来源的不同分成几个明显的簇,单倍型的出现没有一定的规律可循,尚未形成显著的地理种群结构。

单倍型网络图显示单倍型 HS1 位于网络图的中心呈辐射状分布,相邻单倍型之间的突变从 1 步

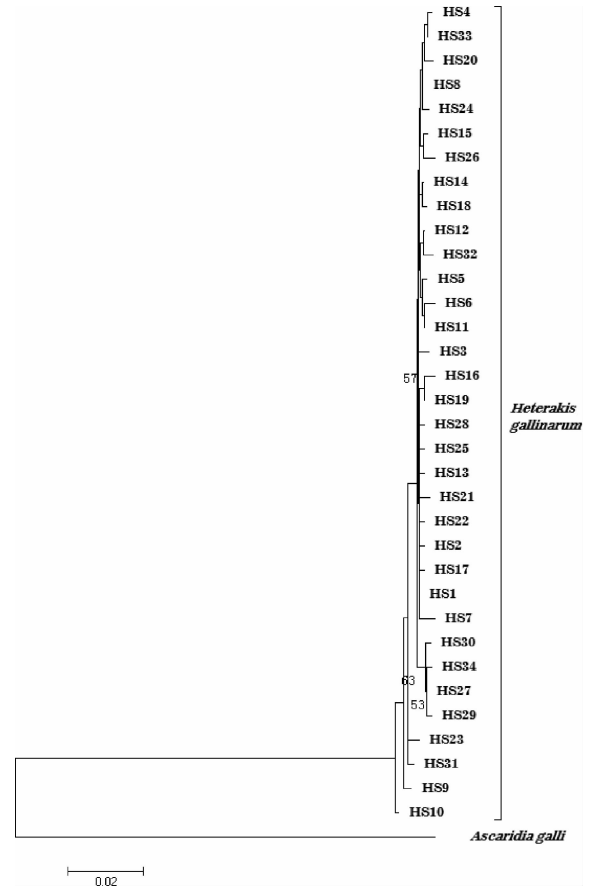


图 2 基于 12S 基因的 34 个单倍型构建的 NJ 树

Fig. 2 Neighbor-Joining (NJ) tree constructed by using 34 12S haplotypes

到 5 步不等(图 3)。网络图中各单倍型的聚类情况与 NJ 树的聚类情况非常相似,同样未形成显著的地理种群结构。

3 讨论

本研究首次成功扩增了鸡异刺线虫线粒体 12S 基因全序列,并分析了四川七个地区鸡异刺线虫的种群遗传多态性和种群遗传结构。寄生虫种群遗传结构受特殊地理环境和宿主因素的影响^[21]。四川省位于长江上游,地跨青藏高原、横断山脉、云贵高原、秦巴山地和四川盆地等几大地貌单元,地势西高东低,地形复杂多样,境内高山峡谷、江河湖泊较多这些自然屏障在地理隔离中具有重要的作用^[22]。本研究中鸡异刺线虫分离株的来源地达州、广元、绵阳、西昌、雅安和自贡属于成都平原或秦巴山系、大凉山系等山系,这些山系不仅具有各自不同的生态环境,且各山系间被山脉、河流分隔开来。四川从东到西依次有渠江、嘉陵江、涪江、岷江和大渡河等,这

表 1 基于 12S 基因的四川七地区鸡异刺线虫种群遗传多样性指数

Table 1 Genetic diversity indexes of *H. gallinarum* populations from the seven different geographical regions in Sichuan, inferred from 12S mitochondrial gene

种群 Population	样品数量 No. of sample	变异位点数 Number of variation sites	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity, H_d	核苷酸多样性 Nucleotide diversity, π	平均核苷酸 差异指数 Average number of differences, k	Tajima's D	Fu's F_s
成都(CD)	6	6	5(HS1~HS5)	0.933	0.003 43	2.400	-0.496 05	-1.727 65
达州(DZ)	7	11	5(HS1, HS6~HS9)	0.905	0.005 31	3.714	-0.934 21	-0.282 27
广元(GY)	7	11	7(HS1, HS10~HS15)	1.000	0.004 50	3.143	-1.622 57*	-4.265 77*
绵阳(MY)	8	8	6(HS1, HS16~HS20)	0.929	0.003 63	2.536	-0.861 54	-2.014 76
西昌(XC)	8	8	5(HS1, HS14, HS21~HS23)	0.786	0.002 86	2.000	-1.701 18*	-1.151 52
雅安(YA)	10	13	7(HS1, HS9, HS24~HS28)	0.867	0.003 72	2.600	-1.975 83*	-2.459 82*
自贡(ZG)	12	12	7(HS1, HS29~HS34)	0.833	0.004 10	2.864	-1.173 51	-1.492 13
四川整体	58	38	34	0.882	0.003 95	2.760	-1.252 13	-1.913 42

*. $P < 0.05$

表 2 四川地区鸡异刺线虫种群间的遗传距离(下三角)及核苷酸分歧度(D_{xy})(上三角)

Table 2 Genetic distances (below diagonal) and nucleotide divergence (D_{xy}) (above diagonal) among the *H. gallinarum* population from Sichuan province

种群 Population	成都(CD)	达州(DZ)	广元(GY)	绵阳(MY)	西昌(XC)	雅安(YA)	自贡(ZG)
成都(CD)	—	0.456	0.388	0.352	0.334	0.367	0.456
达州(DZ)	0.459	—	0.476	0.468	0.414	0.452	0.492
广元(GY)	0.391	0.479	—	0.406	0.353	0.386	0.417
绵阳(MY)	0.353	0.471	0.409	—	0.335	0.372	0.408
西昌(XC)	0.336	0.416	0.355	0.337	—	0.315	0.361
雅安(YA)	0.369	0.455	0.389	0.374	0.317	—	0.386
自贡(ZG)	0.388	0.496	0.420	0.411	0.363	0.389	—

数值扩大 100 倍

All the values were enlarged 100 times

表 3 四川鸡异刺线虫 12S 序列变异分子方差分析

Table 3 Analysis of molecular variance of *H. gallinarum* populations from Sichuan base on mitochondrial 12S gene

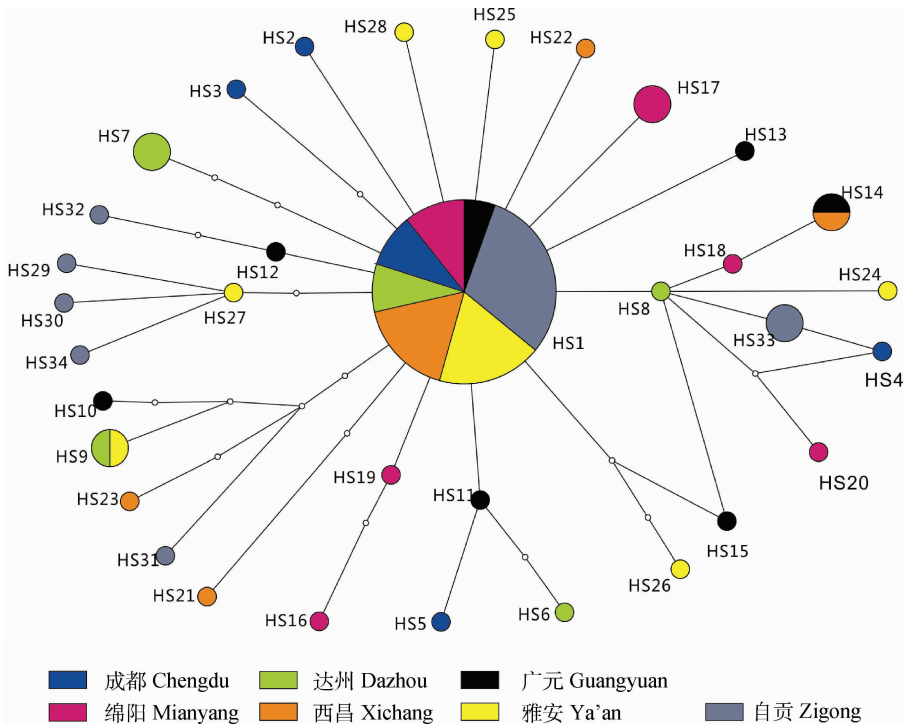
变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比率 Percentage of variation
群体间 Among populations	6	8.759	0.010 87 Va	0.79
群体内 Within populations	52	69.896	1.375 02 Vb	99.21
合计 Total	58	78.655	1.381 39	

表 4 四川鸡异刺线种群间线粒体 12S 基因的遗传分化度 (F_{st}) (下三角) 和基因流 (Nm) (上三角)

Table 4 Pairwise fixation index (F_{st} values) (below diagonal) and gene flow (Nm) (above diagonal) of *H. gallinarum* populations among the seven different geographical regions in Sichuan, inferred from the 12S mitochondrial gene

种群 Population	成都 (CD)	达州 (DZ)	广元 (GY)	绵阳 (MY)	西昌 (XC)	雅安 (YA)	自贡 (ZG)
成都 (CD)	—	6.702 2	-10.500 1	-49.269 6	3.805 2	10.619 6	16.143 4
达州 (DZ)	0.035 96	—	-8.401 3	4.973 6	13.366 6	29.906 8	4.436 0
广元 (GY)	-0.024 39	-0.030 67	—	120.522 9	-6.571 1	-4.429 2	-9.519 6
绵阳 (MY)	-0.005 10	0.047 68	0.002 07	—	7.470 8	20.548 7	4.644 3
西昌 (XC)	0.061 65*	0.018 36	-0.039 55	0.032 38	—	-5.412 1	9.026 4
雅安 (YA)	0.023 00	0.008 29	-0.059 82	0.012 02	-0.048 43	—	-20.107 0
自贡 (ZG)	0.015 25	0.053 35	-0.026 97	0.051 08*	0.026 95	-0.012 59	—

*. $P < 0.05$



圆圈的大小与单倍型的分布频率成正比;不同颜色代表不同样品来源

The circle sizes are proportional to the number of isolates; Different colors represent different sample sources

图 3 基于 34 个单倍型构建的单倍型网络图

Fig. 3 A network map of the 34 12S haplotypes in *H. gallinarum*

些流域的存在进一步将以上各地区隔离开。这些高山峡谷以及大江大河的存在从客观上构成了四川七个鸡异刺线虫群体间基因交流屏障,但是从本研究结果来看,四川鸡异刺线虫各地理种群间基因交流频繁,造成这一现象的原因很可能是由于鸡异刺线虫的宿主的迁移和其他的人为因素。本文从种群遗传多样性、遗传分化水平、种群遗传结构和系统发育树等方面对四川地区鸡异刺线虫群体遗传多态性进行了讨论分析。

3.1 遗传多样性分析

遗传多样性不仅是形成生物多样性的基础,也是物种进化潜能的保证。遗传多样性的降低或丧失对于生活在多变环境中的物种群体是一个极大的威胁^[23]。通常单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(π)是衡量一个物种或群体遗传多样性的 2 个重要指标^[24]。本研究中的 58 株鸡异刺线虫分离株共有 34 个单倍型,其 Hd 达 0.882,表明四川地区鸡异刺线虫的单倍型多样性较为丰富。但四川地区鸡异刺线虫种群总核苷酸多样性仅为 0.003 95,表现出较低的核苷酸多样性水平。这种高 Hd 值、低 π 值的现象反映了鸡异刺线虫种群在历史中可能出现过瓶颈效应,随后经历了快速的种群扩张,种群通过变异迅速的形成了较高的单倍型多样性,但还未能积累较高的核苷酸多样性水平^[25]。这种高 Hd 、低 π 的现象常发现于大多数具有较大的母系有效种群和较强繁殖能力的无脊椎动物中^[26-27]。此外,Tajima's D 和 Fu's F_s 检验也同样证明了鸡异刺线虫群体在历史上可能出现过群体扩张事件。

3.2 遗传分化和遗传结构分析

遗传分化系数(F_{st})和基因流(Nm)是两个最能反映遗传分化的指标^[28],从四川地区鸡异刺线虫遗传分化指数(F_{st})来看,种群间的遗传分化指数为 $-0.059 82 \sim 0.061 65$,种群总的遗传分化指数为 0.007 87,均表现出较低的遗传分化水平。而种群的总基因流达到 31.52,说明四川鸡异刺线虫种群间存在广泛的基因交流。这种广泛的基因交流很可能是由于宿主的移动造成的,目前已有许多关于宿主移动对寄生虫基因流影响的相关报道^[29-30]。此外,鸡异刺线虫是多宿主寄生虫,它不仅可以寄生在多种家禽体内也可寄生于多种野生鸟禽类动物。这种多宿主的寄生虫一般比单一宿主的寄生虫具有更低的遗传分化水平与更高的基因交流水平^[21,31]。这是因为鸡异刺线虫虫卵随粪便排出后,可能会污

染饮水和饲料,蚯蚓及一些陆生甲壳类动物也可以作为鸡异刺线虫的存储宿主。当鸡或其他鸟禽吞食污染的饲料饮水或者存储宿主后就会造成鸡异刺线虫在不同宿主之间传播,由于宿主的迁移进而引起鸡异刺线虫在不同地域之间传播,从而形成广泛的基因交流,弱化了种群间遗传分化。从种群间的遗传距离来看,四川鸡异刺线虫七个地理种群之间遗传距离较小(0.003~0.005)。AMOVA 分析结果也显示,变异主要发生在种群内部(99.21%),种群间变异较小(0.79%)。这些结果均表明四川鸡异刺线虫各地理种群间存在频繁的基因交流,遗传分化水平较低。

3.3 系统发生树和单倍型网络图分析

根据 D. Posada 等^[32]的理论,本研究中的单倍型 HS1 可能为最古老的单倍型。单倍型网络图也显示单倍型 HS1 是四川地区鸡异刺线虫种群的起源中心,其余单倍型都由此演化而来。此外,种群间的低遗传分化,单倍型关系不符合地理分布也进一步说明四川地区鸡异刺线虫各种群可能起源于一个近期的大种群,然后再扩散到其他区域^[33]。系统发育树的拓扑结构显示,四川地区鸡异刺线虫各种群的系统发生关系与其分布的地理区域没有直接相关性,并没有形成显著的地理遗传结构,单倍型 HS1 在所有地理种群中均存在,且来自于同一地理种群的不同单倍型并没有聚成一簇,这也进一步表明四川地区鸡异刺线虫各地理种群间交流较为频繁,遗传分化水平较低。

从本研究的结果来看,四川鸡异刺线虫各地理种群之间存在广泛的基因交流,在此过程中火鸡组织滴虫也可能随着鸡异刺线虫的传播而流行。此外,鸡异刺线虫种群间频繁的基因交流也会导致寄生虫耐药基因的彼此传递,从而使寄生虫产生耐药性^[29]。

4 结 论

对采自我国四川地区鸡体内的 58 株鸡异刺线虫的线粒体 12S 基因进行了全序列测定以及种群遗传多态性分析。发现四川地区鸡异刺线虫的遗传多样性较低,各种群间基因交流较为频繁,遗传分化水平较低,还未形成显著的地理遗传结构。

参考文献(References):

[1] 杨光友,张志和. 野生动物寄生虫病学[M]. 四川出版

- 集团,2005:554-556.
- YANG G Y,ZHANG Z H. Parasitic diseases of wildlife[M]. Sichuan Publishing Group,2005:554-556. (in Chinese)
- [2] EBRAHIMI M,ASADPOUR M,KHODAVERDI M, et al. Prevalence and distribution of gastrointestinal helminthes in free range chickens in Mashhad,north-east of Iran[J]. *Scientia Parasitologica*,2014,15(1-4):38-42.
- [3] 鞠宏生. 鸡异刺线虫的流行情况及防治措施[J]. 养殖技术顾问,2011(5):129.
- JU H S. The epidemiological and prevention of *Heterakis gallinarum*[J]. *Technical Advisor for Animal Husbandry*,2011(5):129. (in Chinese)
- [4] 吕召宏,徐广庭,林瑞庆,等. 鸡异刺线虫 ITS rDNA 的 PCR 扩增、克隆及序列分析[J]. 中国畜牧兽医,2005,32(8):41-44.
- LV Z H,XU G T,LIN R Q, et al. PCR amplification, cloning and sequence analysis of ITS rDNA gene separated from *Heterakis gallinarum* [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*,2005,32(8):41-44. (in Chinese)
- [5] MWALE M,MASIKA P J. *In vivo* anthelmintic efficacy of *Aloe ferox*, *Agave sisalana*, and *Gunnera per-pensa* in village chickens naturally infected with *Heterakis gallinarum*[J]. *Trop Anim Health Prod*,2015,47(1):131-138.
- [6] 张 鹏. 鸡组织滴虫病与异刺线虫病混合感染的诊治[J]. 中国家禽,2012,34(17):50-51.
- ZHANG P. Diagnosis and Treatment of Chicken Histomoniasis and *Heterakis gallinarum* mixed infection [J]. *China Poultry*,2012,34(17):50-51. (in Chinese)
- [7] SCHWARZ A,GAULY M,ABEL H, et al. Pathobiology of *Heterakis gallinarum* mono-infection and co-infection with *Histomonas meleagridis* in layer chickens[J]. *Avian Pathol*,2011,40(3):277-287.
- [8] BAZH E K. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Heterakis gallinae* from native chickens in Egypt[J]. *Parasitol Res*,2013,112(10):3557-3560.
- [9] JIMÉNEZ F A,GARDNER S L,NAVONE G, et al. Four events of host switching in *Aspidoderidae* (Nematoda) involve convergent lineages of mammals [J]. *J Parasitol*,2012,98(6):1166-1175.
- [10] 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蚴种群遗传多态性研究[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(6):972-978.
- YAN N,NIE H M,JIANG Z R, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus* in Qinghai based on the mitochondrial DNA 12S gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*,2012,43(6):972-978. (in Chinese)
- [11] 徐梅英,李继姬,郭宝英,等. 基于线粒体 DNA 12S rRNA 和 COⅢ 基因序列研究中国沿海 7 个长蚴(*Octopus variabilis*) 野生群体的遗传多样性[J]. 海洋与湖沼,2011,42(3):387-396.
- XU M Y,LI J J,GUO B Y, et al. Genetic diversity of seven populations of *Octopus Variabilis* in China's coastal waters based on the 12S rRNA and COⅢ gene analysis[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*,2011,42(3):387-396. (in Chinese)
- [12] MOVILA A,MOROZOV A,SITNICOVA N. Genetic polymorphism of 12S rRNA gene among *Dermacentor reticulatus* fabricius ticks in the chernobyl nuclear power plant exclusion zone[J]. *J Parasitol*,2013,99(1):40-43.
- [13] ZHOU X,XIE Y,ZHANG Z H, et al. Analysis of the genetic diversity of the nematode parasite *Baylisascaris schroederi* from wild giant pandas in different mountain ranges in China[J]. *Parasit Vectors*,2013,6:233.
- [14] 张路平. 动植物寄生线虫的群体遗传结构研究进展 [DB/OL]. 中国科技论文在线精品论文,2011,17(4):1532-1536.
- ZHANG L P. Research progress on population genetic structure of parasitic nematodes from animal and plant [DB/OL]. Highlights of Sciencepaper Online,2011,17(4):1532-1536. (in Chinese)
- [15] 彭俊宇,宋海燕,陈文承,等. 湖南省部分地区商品鸡异刺线虫感染情况调查[J]. 中国动物传染病学报,2009,17(1):51-53.
- PENG J Y,SONG H Y,CHEN W C, et al. Prevalence of *Heterakis* in chickens in Hunan province[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*,2009,17(1):51-53. (in Chinese)
- [16] SAMBROOK J,RUSSELL D W. Molecular cloning [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [17] 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.
- [18] LIBRADO P,ROZAS J. DNAsp v5; software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J].

- Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [19] CLEMENT M, POSADA D, CRANDALL K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies[J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(10): 1657-1659.
- [20] 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.
- [21] BARRETT L G, THRALL P H, BURDON J J, et al. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions [J]. *Trends Ecol Evol*, 2008, 23(12): 678-685.
- [22] SU B, FU Y, WANG Y, et al. Genetic diversity and population history of the red panda (*Ailurus fulgens*) as inferred from mitochondrial DNA sequence variations[J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(6): 1070-1076.
- [23] 杨金权, 胡雪莲, 唐文乔, 等. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(1): 8-15.
YANG J Q, HU X L, TANG W Q, et al. mtDNA control region sequence variation and genetic diversity of *Coilia nasus* in Yangtze River Estuary and its adjacent waters[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43(1): 8-15. (in Chinese)
- [24] 郝桂英, 杨应东, 周英姿, 等. 基于线粒体 *cox1* 和 *Cyt b* 基因对四川地区多头带绦虫的种群遗传多样性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(4): 631-638.
HAO G Y, YANG Y D, ZHOU Y Z, et al. Population genetic diversity of *Taenia multiceps* isolated from Sichuan based on Mitochondrial *cox1* and *cyt b* gene [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(4): 631-638. (in Chinese)
- [25] AVISE J C. Phylogeography: the history and formation of species[M]. Harvard University Press, 2000; 447-448.
- [26] GRANT W S, BOWEN B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *J Hered*, 1998, 89(5): 415-426.
- [27] LAVERY S C, MORTIZ C, FIELDER D R. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro* [J]. *Mol Ecol*, 1996, 5(4): 557-570.
- [28] HOLSINGER K E, WEIR B S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(9): 639-650.
- [29] BLOUIN M S, YOWELL C A, COURTNEY C H, et al. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes[J]. *Genetics*, 1995, 141(3): 1007-1014.
- [30] TROUT R T, STELLMAN C D, SZALANSKI A L. Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas[J]. *J Med Entomol*, 2010, 47(2): 152-161.
- [31] ARAYA-ANCHETTA A, BUSCH J D, SCOLES G A, et al. Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 29: 164-179.
- [32] POSADA D, CRANDALL K A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks [J]. *Trends Ecol Evol*, 2001, 16(1): 37-45.
- [33] 余文华. 海南岛两种蝙蝠种群形态特征与地理亲缘关系的研究[D]. 海口: 海南师范大学, 2009.
YU W H. Study on the morphology and phylogeography of two vespertilionid bats in Hainan [D]. Haikou: Hainan Normal University, 2009. (in Chinese)

(编辑 白永平)