

四川地区鸡异刺线虫核糖体转录间隔区(ITS1/2)序列的遗传变异分析

古小彬^{1#*}, 朱俊扬^{1#}, 王保健¹, 郑晶², 杨光友¹, 汪涛¹, 赖为民¹

(1. 四川农业大学动物医学院, 成都 611133; 2. 四川出入境检验检疫局, 成都 610041)

摘要: 探讨四川地区鸡异刺线虫(*Heterakis gallinarum*)的遗传变异情况, 为该地区鸡异刺线虫病的流行特征及防控提供基础资料。采用 PCR 扩增四川 7 个地区共 59 个鸡源鸡异刺线虫核糖体 ITS1-5.8S-ITS2 片段并测序, 所得序列剪切 5.8S 序列后, 得到 ITS1/2 序列, 并分析 ITS1/2 序列的遗传多样性; 同时利用 GenBank 中已公布的异刺属(*Heterakis*)ITS1/2 序列信息, 进行系统发育研究。结果如下: 59 条鸡异刺线虫 ITS1/2 序列相似性较高(98.9%~100.0%), ITS1 序列间变异较 ITS2 大; 59 条序列有 20 个变异位点和 14 个单倍型(H1~H14); 四川种群具有丰富的单倍型多样性($Hd=0.532$)和较低的核苷酸多样性($\pi=0.00094$); 种群间基因交流频繁($Nm=31.72$), 群体遗传分化不明显($F_{st}=0.00782$), 以群体内变异为主(AMOVA 分析值=99.22%); 从单倍型网络图及进化树(MP 和 ML)分析来看, 7 个地理种群未形成显著的地理种群结构, 但四川整体种群曾经历过种群扩张(Tajima's $D=-2.55331$, Fu's $F_s=-10.564$; $P<0.05$); 进化树(MP 和 ML)能有效区分鸡异刺线虫与属内其他虫种。四川 7 个地区鸡的鸡异刺线虫基因交流频繁, 遗传多样性较低。

关键词: 鸡异刺线虫; 四川; ITS1/2 序列; 遗传多样性

中图分类号: S852.731

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)04-0796-09

Genetic Variation of *Heterakis gallinarum* in Sichuan based on the Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions (ITS1/2)

GU Xiao-bin^{1#*}, ZHU Jun-yang^{1#}, WANG Bao-jian¹, ZHENG Jing²,

YANG Guang-you¹, WANG Tao¹, LAI Wei-min¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611133, China;

2. Sichuan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of the present study was to analyze the characteristic of genetic variability in *Heterakis gallinarum* populations from Sichuan province, and provide a foundation for understanding the epidemiology and assist in the control of heterakiasis. The nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) of 59 *H. gallinarum* isolates from chickens belonged to 7 different geographical regions were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) and then sequenced. Sequences unit containing ITS1 and ITS2 (excepting 5.8S) were used to determine the genetic variability and genetic structure of *H. gallinarum* in Sichuan province, China. Meanwhile, the relationships of this nematode with selected members of genus *Heterakis* were assessed by phylogenetic analysis of ITS1/2 sequence datasets by maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML). Results showed that 59 *H. gallinarum* ITS1/2 sequences

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 四川农业大学学科“双支计划”(SC-03571357)

作者简介: 古小彬(1982-), 女, 四川自贡人, 副教授, 主要从事动物寄生虫与寄生虫病学研究; 朱俊扬(1990-), 男, 四川成都人, 硕士, 主要从事动物寄生虫与寄生虫病学研究。# 对本研究具有同等贡献, 并列第一作者

* 通信作者: 古小彬, 副教授, 硕导, E-mail: guxb121@126.com

identity ranged from 98.9% to 100.0%, and ITS1 sequences displayed greater variability than ITS2. Fifty-nine sequences contained 20 variable sites, and were classified into 14 haplotypes (H1-H14). The overall Sichuan population showed high haplotype diversity ($Hd = 0.532$) and low nucleotide diversity ($\pi = 0.00094$). Meanwhile, a frequency of gene flow ($Nm = 31.72$), a low degree of genetic differentiation ($Fst = 0.00782$), and an overwhelming genetic variability (99.22%) were observed within the overall Sichuan population. Phylogenetic trees (MP and ML) and haplotype network were both revealed that 7 different geographical regions did not form significant geographical populations. The different species within genus *Heterakis* were well distinguished in phylogenetic trees (MP and ML). Our results indicate that there is a high gene flow and low degree of genetic diversity across *H. gallinarum* population.

Key words: *Heterakis gallinarum*; Sichuan; ITS1/2 sequences; genetic variation

鸡异刺线虫(*Heterakis gallinarum*)是大多数家禽及一些野生鸟禽类动物盲肠内最常见的线虫之一^[1],呈世界性分布。我国多个地区均有鸡异刺线虫感染报道,各地感染率为20.30%~76.60%^[2-4]。鸡异刺线虫除引起宿主发病和死亡外,还可作为高感染率和高死亡率的火鸡组织滴虫病(又称黑头病, histomoniasis)的重要传播载体^[5]。因此,鸡异刺线虫在养殖业和野生鸟禽类保护中具有重要意义。

寄生虫同种物种的不同地理种群,由于地理隔离以及对各自特异的生态环境的长期适应,最终形成了地理种群间的种质差异,从而导致不同虫株的感染力、药物敏感性以及流行病学等特征的差异^[6]。而核糖体DNA内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)具有长度适中和较高的进化速率等特点,不仅在种间存在较大的变异性,在同一物种的不同地理种群中也存在着明显的差异性,可用于比较种内群体之间的遗传变异^[7]。

目前,ITS序列作为分子标记已经成功地应用于鸡异刺线虫的分子分类鉴定^[5]。然而对于不同地理来源鸡异刺线虫的遗传变异情况,有无遗传分化等种群遗传特征仍未见报道。因此,本研究基于核糖体的2个转录间隔区序列(ITS1/2序列)分析了四川7个地区共59个鸡源鸡异刺线虫分离株的遗传多样性及遗传结构等特征,为进一步了解四川地区鸡异刺线虫病的流行特征及防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采用循序沉淀法^[8]从鸡盲肠内分离收集虫体,经形态学鉴定^[9]为鸡异刺线虫,于-20℃冰箱保存待用。从四川7个地区共采集到59个鸡异刺线虫

样本,样本编号为雅安(YA1~YA9)、西昌(XC1~XC8)、绵阳(MY1~MY9)、达州(DZ1~DZ10)、成都(CD1~CD6)、广元(GY1~GY7)及自贡(ZG1~ZG10)(图1)。



括号里的数字为标注的每个地区所采集的样品数量
The numbers of *H. gallinarum* isolates are shown in each region

图1 四川7个地区所采集的59个鸡异刺线虫分布
Fig. 1 The geographical location of 59 *Heterakis gallinarum* isolates collected from 7 different geographical regions of the Sichuan province, China

1.2 基因组DNA的提取

将冻存的各地鸡异刺线虫1条置于预冷研钵中,加入200 μL的虫体裂解缓冲液快速研碎虫体,随后加入适量蛋白酶K消化虫体过夜,随后采用酚/氯仿法提取鸡异刺线虫的DNA^[10],提取的DNA于-20℃保存备用。

1.3 ITS基因的PCR扩增及测序

采用保守引物扩增ITS1-5.8S-ITS2序列^[7],引物序列如下,NC5-ITS-R: 5'-GTAGGTGAACCT-GCGGAAGGATCATT-3'; NC2-ITS-F: 5'-TTAG-

TTTCTTTTCCTCCGCT-3'。扩增体系如下(25 μL): 上、下游引物(20 pmol) 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μL , 灭菌 ddH₂O 补齐至体系 25 μL ; 且以 ddH₂O 为空白对照; 上述试剂混合后瞬时离心。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

取 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 将凝胶中条带大小与预期结果相符的胶块切割下来, 移入 1.5 mL 灭菌离心管中, 根据 TIANGEN 公司的 DNA 纯化回收试剂盒说明书纯化回收。纯化回收的产物克隆入 pMD19-T 载体, 转化入 DH5 α 感受

态细胞, 经培养后, 以菌液为模板进行 PCR 鉴定。将 PCR 阳性菌液送往英潍捷基生物技术有限公司进行正反双向测序。

1.4 数据处理与分析

1.4.1 序列特征分析 根据峰图对测序结果进行人工校对, 所有序列经比对和编辑后得到对应的 ITS1/2 序列。利用 Clustal W 1.81 分析四川地区鸡异刺线虫 ITS1/2 序列的变异位点。MEGA 5.0 软件计算各碱基(A、T、C、G)的组成含量。采用 DNASTar 中的 MegAlign 程序对所测序列与 GenBank 数据库中公布的异刺属(*Heterakis*)ITS1/2 序列进行序列同源性比对分析(表 1)。

表 1 异刺属 ITS 序列信息

Table 1 Information of ITS sequences of *Heterakis* in GenBank

物种 Species	地理分布 Geographical Distribution	基因 Gene	序列号 GenBank No.
<i>Heterakis gallinarum</i>	Sichuan 四川	ITS	KT310099~KT310157(本研究 This study)
<i>H. gallinarum</i>	Guangzhou 广州	ITS	AJ876757
<i>H. gallinarum</i>	Guangzhou 广州	ITS	AJ876758
<i>H. gallinarum</i>	Australia 澳大利亚	ITS1	AJ007453
<i>H. gallinarum</i>	Australia 澳大利亚	ITS2	AJ007454
<i>H. gallinarum</i>	America 美国	ITS	JQ995320
<i>H. spumosa</i>	Spain 西班牙	ITS	JX845278
<i>H. dahomensis</i>	Senegal 塞内加尔	ITS	JX845277
<i>H. isolonche</i>	China 中国	ITS	KM212953

1.4.2 遗传多样性分析 运用 DnaSP 5.0 软件计算种群的多态位点数、单倍型数(haplotypes)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, π)和单倍型多样性(Haplotypes diversity, H_d)。采用 MEGA 5.0 软件计算单倍型间的遗传距离(基于 Kimura 2-parameter 模型)。

1.4.3 遗传结构及中性检验分析 采用 Tcs 1.21 软件构建单倍型简约网络图。Arlequin 3.1 软件中的分子变异分析(AMOVA)和种群间的遗传差异分析(F_{st})了解四川地区的遗传结构; 基因流(Nm)由 $Nm=1/4(1/F_{st}-1)$ 计算; 同时计算种群的中性检验值(Tajima's D 和 Fu's F_s)。

1.4.4 异刺属系统发育树的构建 选用鸡蛔虫(*Ascaridia galli*) ITS1/2 序列(GenBank No.: AJ007451)作为外群, MEGA 5.0 软件中的最大简约法(MP)和最大似然法(ML)构建异刺属的系统发育树, 进行重复 1 000 次的自举检验。

2 结果

2.1 序列基本特征

成功扩增 59 个样品的序列, 序列长度为 1 067 或 1 068 bp 的序列(GenBank No.: KT310099~KT310157)。经比对和编辑后, 59 个样品的 ITS1 序列的长度有 428 或 427 bp 两种, 5.8S 序列均为 157 bp, ITS2 序列均为 386 bp。其中 59 个样品的 5.8S 序列没有检测到变异位点, 其序列相似性为 100%。剪切 5.8S 序列后, 将 ITS1 和 ITS2 序列串联得到 ITS1/2 序列, 其总长度为 814 或 813 bp。59 个鸡异刺线虫分离株的 ITS1/2 序列共检测出 20 个变异位点(占 2.46%), 包括 17 个单变异位点和 3 个简约信息位点。其中 14 个转换位点, 6 个颠换位点, 7 个样品在第 19 位点存在碱基缺失(表 2)。A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 25.6%、32.3%、18.1%、24.0%, A+T 碱基含量为 57.9%, 高于

表 2 鸡异刺线虫 14 个单倍型 ITS1/2 序列核苷酸变异
Table 2 Nucleotide substitutions of ITS 1/2 sequences in 14 haplotypes of *Heterakis gallinarum*

单倍型 Haplotype	样品数量 No. of sample	位点 Locus																			
		19	54	58	65	103	155	267	273	286	358	375	411	424	519	550	553	602	669	673	747
H1	40	A	T	A	T	T	A	G	G	A	A	A	T	T	T	G	A	A	A	T	A
H2	7	- ^c	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H3	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G ^a	•	•
H4	1	G ^a	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H5	1	G ^a	•	•	•	•	G ^a	A ^a	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H6	1	•	C ^a	•	C ^a	•	•	•	•	•	•	G ^a	•	•	•	A ^a	•	•	•	•	T ^b
H7	1	•	•	•	•	C ^a	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H8	1	•	•	G ^a	•	•	•	•	T ^b	•	•	•	A ^b	•	•	•	•	•	•	•	•
H9	1	•	•	•	•	•	•	C ^a	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H10	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H11	1	•	•	•	•	•	G ^a	•	•	•	T ^b	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T ^b
H12	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T ^b	•	•	C ^a
H13	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T ^b	•	•
H14	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C ^a	•	•	•	•	•	•	•

a. 转换; b. 颠换; c. 缺失

a. Transition mutation; b. Transversion mutation; c. Deletion

G+C 的碱基含量 42.1%。

2.2 ITS1/2 序列相似性分析

研究所得的 59 条鸡异刺线虫 ITS1/2 序列间相似性为 98.9%~100%，ITS1 间与 ITS2 间序列相似性分别为 98.4%~100% 和 99.0%~100%。本研究中的鸡异刺线虫四川株(59 条)与广州株(GenBank No.: AJ876757, AJ876758)、澳大利亚株(GenBank No.: AJ007453, AJ007454)、美国株(GenBank No.: JQ995320)的序列相似性较高(ITS1/2 序列: 99.3%~99.8%、98.9%~99.5%、96.4%~97.0%; ITS1 序列 98.8%~99.8%、98.1%~99.1% 和 92.5%~93.7%; ITS2 序列 99.2%~99.7%)。

本研究所的鸡异刺线虫(*H. gallinarum*)(59 条)与 *H. spumosa* (GenBank No.: JX845278)、*H. dahomensis*(GenBank No.: JX845277)、*H. isolonche* (GenBank No.: KM212953) 序列间相似性较低(ITS1/2 序列: 61.1%~61.9%、60.8%~61.2%、

67.5%~68.1%; ITS1 序列: 73.1%~74.0%、74.6%~75.5%、78.1%~79.2%; ITS2 序列: 50.6%~51.0%、46.7%~47.3%、59.1%~59.5%)。

2.3 种群遗传多样性分析

四川地区 59 个鸡异刺线虫分离株的 ITS1/2 序列共检测出 14 个单倍型(H1~H14),单倍型 H1 被 7 个地理种群的 40 个虫株所共享(占 67.8%);雅安株(YA4)、绵阳株(MY4、MY8)、达州株(DZ8)、成都株(CD1)和自贡株(ZG1、ZG6)共享单倍型 H2。除成都种群外,其余 6 个种群都有各自特有的单倍型。四川整体种群的核苷酸多样性(π)为 0.000 94,单倍型多样性(Hd)为 0.532。四川 7 个地理种群中,西昌种群的 π 最高(0.001 84),而雅安种群的 Hd 最高(0.722),成都种群的 π 和 Hd 最低(0.000 00 和 0.333)(表 3)。14 个单倍型的遗传距离为 0.001~0.011,平均遗传距离为 0.004。

表 3 基于 ITS1/2 序列的四川 7 地鸡异刺线虫种群遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity indexes of *Heterakis gallinarum* populations from the 7 different geographical regions in Sichuan, calculated from the ITS1/2 sequences

种群 Population	样品数量 No. of sample	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)
雅安 YA	9(YA1-YA9)	5(H1~H5)	0.722	0.001 23
西昌 XC	8(XC1-XC8)	3(H1, H6~H7)	0.464	0.001 84
绵阳 MY	9(MY1-MY9)	3(H1, H2, H8)	0.556	0.001 09
达州 DZ	10(DZ1-DZ10)	4(H1, H2, H9, H10)	0.533	0.000 49
广元 GY	7(GY1-GY7)	3(H1, H11, H12)	0.524	0.001 40
成都 CD	6(CD1-CD6)	2(H1, H2)	0.333	0.000 00
自贡 ZG	10(ZG1-ZG10)	4(H1, H2, H13, H14)	0.644	0.000 49
四川整体种群 SC	59	14(H1~H14)	0.532	0.000 94

YA. Ya'an; XC. Xichang; MY. Mianyang; DZ. Dazhou; GY. Guangyuan; CD. Chengdu; ZG. Zigong; SC. Sichuan. The same as below

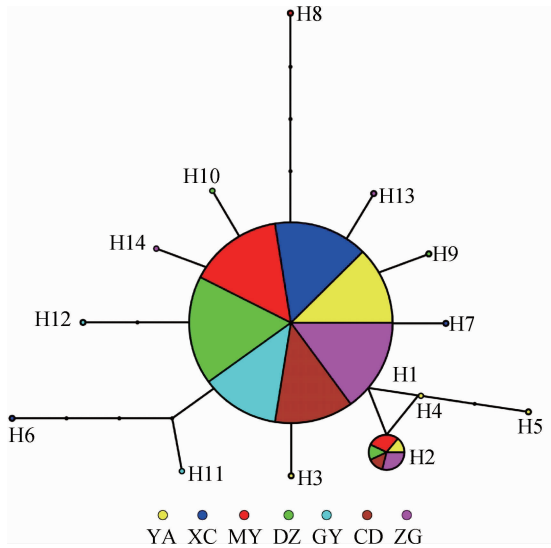
2.4 种群结构分析

2.4.1 单倍型网络图的构建 基于 14 个单倍型构建的单倍型简约网络图结构较为简单(图 2)。单倍型 H1 位于单倍型网络图的中心,为主要单倍型,其余单倍型围绕 H1 呈辐射状。单倍型间的突变从 1 步到 4 步不等。其中 H2、H4、H5 和 H6、H11 分别形成 2 个不同的分支,2 个分支均未形成地理聚类。

2.4.2 遗传分化和中性检验值 AMOVA 分子变异分析显示四川种群内的遗传变异是总变异的主

要来源(99.22%),仅有 0.78%的变异发生在 7 个种群间。7 个种群间的 Fst 值为 $-0.058 82 \sim 0.047 82$ (表 4),均处于较低的分化水平。四川整体种群的总 Fst 值为 0.007 82,总基因流(Nm)为 31.72,说明四川种群内的基因交流非常充分,不存在明显的遗传分化。

从中性检验值来看,四川整体种群的 Tajima's D 值为 $-2.553 31$ ($P < 0.05$),Fu's Fs 值为 -10.564 ($P < 0.05$)。四川 7 个地理种群的 Taji-



圆圈的大小与单倍型的分布频率成正比;不同颜色代表来自不同种群的单倍型。YA. 雅安;XC. 西昌;MY. 绵阳;DZ. 达州;GY. 广元;CD. 成都;ZG. 自贡

The Circle sizes are proportional to the number of isolates. The different colours represent haplotypes from the different populations. YA. Ya'an; XC. Xichang; MY. Mianyang; DZ. Dazhou; GY. Guangyuan; CD. Chengdu; ZG. Zigong

图2 鸡异刺线虫14个单倍型构建的单倍型网络图

Fig. 2 A network map of the 14 haplotypes in *Heterakis gallinarum*

表4 四川鸡异刺线种群间ITS1/2序列的遗传分化度

Table 4 Pairwise fixation index (F_{st} values) of *Heterakis gallinarum* populations in Sichuan, calculated from nucleotide sequences derived from the ITS1/2 sequences

地区 Region	雅安 YA	西昌 XC	绵阳 MY	达州 DZ	广元 GY	成都 CD	自贡 ZG
雅安 YA	—						
西昌 XC	0.027 79	—					
绵阳 MY	0.031 25	0.003 84	—				
达州 DZ	0.047 82	0.016 31	0.004 54	—			
广元 GY	0.001 34	-0.030 21	0.004 31	0.023 78	—		
成都 CD	0.005 52	-0.040 25	-0.051 09	-0.058 82	-0.024 39	—	
自贡 ZG	0.047 82	0.016 31	0.004 54	0.000 00	-0.024 39	-0.024 39	—

表5 鸡异刺线虫种群ITS1/2序列中性检测指数

Table 5 The index of neutrality test of *Heterakis gallinarum* ITS1/2 sequences

种群 Population	Fu's F_s	Tajima's D
雅安 YA	-2.979 11*	-0.936 13
西昌 XC	0.971 41	-1.639 82*
绵阳 MY	0.133 55	-1.609 74*
达州 DZ	-2.881 02*	-1.400 85
广元 GY	0.263 26	-1.434 14
成都 CD	0.000 00	0.000 00
自贡 ZG	-2.881 02*	-1.400 85
四川整体种群 SC	-10.564*	-2.553 31*

*. $P < 0.05$

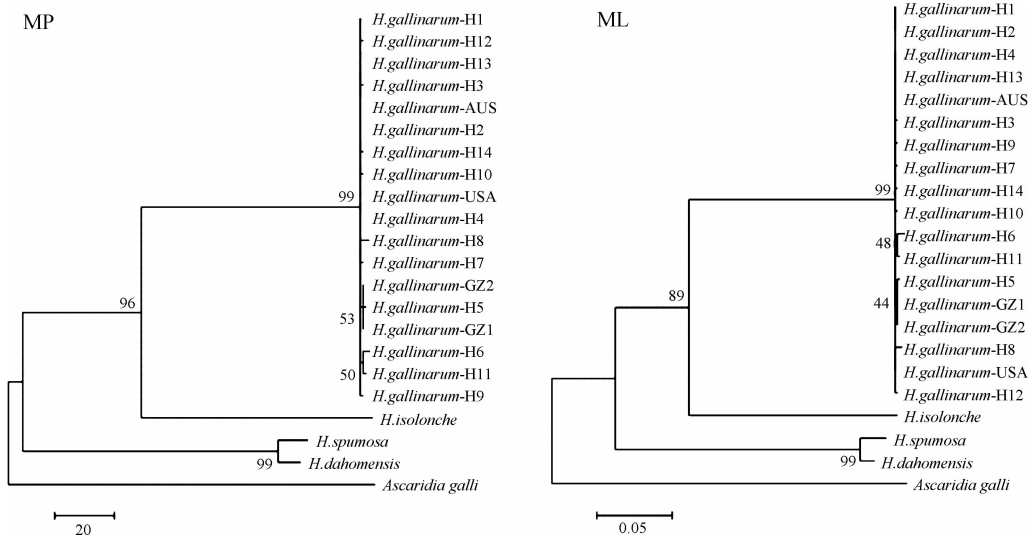
ma's D 值为-1.639 82~0.000 00,其中仅西昌种群和绵阳种群差异显著;而Fu's F_s 值为-2.979 11~0.971 41,其中雅安种群、达州种群和自贡种群差异显著(表5)。

2.5 异刺属系统发育树的构建

基于本研究得到的鸡异刺线虫(*H. gallinarum*)14个单倍型ITS1/2序列、GenBank报道的广州株、澳大利亚株、美国株鸡异刺线虫、*H. spumosa*、*H. dahomensis*、*H. isolonche*的ITS1/2序列构建系统发育树(MP和ML),构树结果见图3。结果显示,MP树和ML树具有非常相似的拓扑结构,不同地理来源的鸡异刺线虫(*H. gallinarum*)聚为一分支,*H. spumosa*和*H. dahomensis*形成一个分支,而*H. isolonche*单独位于另一个分支。

3 讨论

我国是世界养禽大国,养禽业从早期的单一自给、半自给性的农民家庭庭院模式,逐渐演变成规模化的现代集约养殖、庭院养殖及山林养殖等多元化养殖模式。寄生虫是养禽业的常见疾病,种类多,分布广泛,危害严重,而鸡异刺线虫是禽类肠道中最常



Ascaridia galli 作为外群; AUS. 澳大利亚; USA. 美国; GZ. 广州

Ascaridia galli as the outgroup. AUS. Australia; USA. United States of America; GZ. Guangzhou

图3 基于异刺属 ITS1/2 序列构建的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic trees by Maximum-parsimony (MP and ML) were constructed based on the ITS 1/2 sequences of the genus *Heterakis*

见的线虫之一,我国各地均有该寄生虫的报道,禽类感染率为 20.30%~76.60%^[2-4]。据作者调查,四川地区的雅安、西昌、绵阳、达州、成都、广元及自贡 7 地的鸡异刺线虫感染率为 23.3%~57.6%,而这 7 地属于成都平原或大巴山系、大凉山系等山系,这些山系间有大渡河、青衣江等众多江河,水系发达,从而形成天然屏障,将这 7 个地区进行隔离;而源自这 7 地的鸡异刺线虫会不会因山系、河流等地理隔离而出现地理种群间的种质差异呢?带着这个疑问,作者分析了四川地区鸡异刺线虫群体遗传多态性。

3.1 序列差异分析

鸡异刺线虫种内的 ITS1/2 序列相似性(96.4%~100%)显著高于种间(与 *H. spumosa*、*H. dahomensis*、*H. isolonche*)的序列相似性(60.8%~68.1%),表明 ITS1/2 序列在种内更为保守。虽然鸡异刺线虫的 ITS1/2 序列水平上具有较高的相似性,但不同地理来源虫株的 ITS1/2 序列也存在一定的差异,其中四川株与美国株的相似性(96.4%~97.0%)明显小于其与广州株和澳大利亚株的相似性(99.3%~99.8%和 98.9%~99.5%)。另外,59 个鸡异刺线虫样本的 ITS1 和 ITS2 的变异也存在明显的差异,变异位点在 ITS1 和 ITS2 中分别有 13 个和 7 个,碱基缺失仅出现于 ITS1 上。四川株与广州株、澳大利亚株和美国株的鸡异刺线虫 ITS1

变异均大于 ITS2,进一步支持了吕召宏等^[11]的结果。*Heterakis* 属内不同种比较时,却发现 ITS2 较 ITS1 表现出更高的变异性,进一步支持了 A. Ribas 等^[1]的结果,他认为 *H. dahomensis* 和 *H. spumosa* 的 ITS2 基因(3.12%±0.83%)进化分歧显著高于 ITS1(0.97%±0.47%),表明 ITS2 在种间变异性更大。因此,作者认为鸡异刺线虫种内的 ITS1 比 ITS2 的变异性更大,而 ITS2 在种间具有更高的变异性。

3.2 遗传多样性分析

种群的遗传多样性是种群活力的基础,是物种适应环境变化、维持长期生存和进化的保证,学者们多采用核苷酸多样性(π)和单倍性多样性(Hd)来衡量种群的遗传多样性,这 2 个指标可反映物种遗传多样性的高低^[12]。由于 1 个碱基的变异就能生成 1 个新的单倍型,因此 Hd 可在短时间内积累变异而快速提高,但对 π 的影响却很小, π 值的提高需要长时间的积累,因此 π 在衡量种群遗传多样性时比 Hd 更具有代表性^[13]。

从本研究来看,四川 59 个鸡异刺线虫株有 14 个单倍型(H1~H14),其中单倍型 H1 在 7 个地理种群中均有分布,这种单倍型可认为是能够适应环境变化并在种群中稳定存在的优势单倍型,推测 H1 是最原始的单倍型^[14]。四川 7 个地区比较发

现,除成都种群外,其余 6 个地区种群都有各自所特有的单倍型,且成都地区 Hd 也是 7 个地区最低水平(0.333),这可能与成都地区属于平原地区,其地势平坦,外环境中鸡异刺线虫的感染性虫卵较容易传播到平原其他地区感染新宿主有关。从单倍型个数和四川整体种群的 Hd(0.532)来看,四川地区鸡异刺线虫的单倍型多样性相对较为丰富,而核苷酸多样性的结果却与单倍型多样性相反,其值均较低(小于 0.01),这可能是由于鸡异刺线虫种群历史上出现过瓶颈效应,经历了快速的种群扩张,种群通过变异形成了较高的单倍型多样性,但因扩张时间较短尚未能积累较高的核苷酸多样性水平^[15]。而 Tajima's *D* 值和 Fu's *F_s* 值(负值且差异显著)又进一步支持了四川地区鸡异刺线虫种群曾经历过种群扩张的推测^[16-17]。

3.3 遗传结构分析

四川整体种群的遗传分化指数(*F_{st}*)(0.007 82)和基因流值(31.27)反映出四川地区鸡异刺线虫种群的基因交流非常频繁,种群间的遗传分化程度较低^[18-19]。同时,除成都种群外,各地种群都拥有各自特有的单倍型,表明四川地区不同地理种群间的 ITS 基因仍存在一定的遗传分化,但是总体来说遗传分化不显著。此外,AMOVA 分子变异分析亦表明鸡异刺线虫种群间的遗传变异较小(0.78%)。从单倍型网络图和系统发育树中可见,7 个地理种群的单倍型并没有据地理来源形成明显的地理性聚类,表明四川地区的 7 个鸡异刺线虫种群还未形成显著的地理种群遗传结构。

鸡异刺线虫发育过程中不需要中间宿主,雌虫所产虫卵随宿主粪便排至外环境,在外环境中孵化至含二期幼虫的虫卵后方可感染禽类,由此可见,外环境中的异刺线虫发育阶段本身没有移动扩散能力。本研究中的四川 7 地被山脉、河流等隔离形成了物种基因交流的天然地理屏障,加之外环境中鸡异刺线虫发育阶段自身移动能力有限,不会引起物种间的高频率基因交流,但从本研究结果来看,这 7 地鸡异刺线虫的基因交流却非常频繁,究其原因可能有:(1)鸡异刺线虫除寄生于鸡之外,尚可寄生于红腹锦鸡、孔雀、环颈雉等野生鸟禽类,其可随鸟类的飞行被带到其他区域,从而逾越自然的地理屏障。再加上鸡异刺线虫生活史简单,不需要中间宿主,因此被鸟类带到另外一个新的环境中后容易感染宿主。而以往的研究报道亦证实宿主移动影响了寄生

虫基因交流,多宿主寄生虫的基因交流水平高于单宿主寄生虫^[20-22]。(2)四川各地人民喜食鸡肉,而鸡的养殖规模分布不均,导致四川各地区鸡的贸易频繁,可将鸡异刺线虫随贸易交易从一个地区带到另外一个地区,从而跨越地理屏障。另外,种群间的基因交流可加速或减缓寄生虫对药物的耐药性,这点在毛圆线虫和尖音库蚊(*Culex pipiens*)中亦得到证实^[20,23]。四川地区鸡异刺线虫种群间频繁的基因交流是否会导致这些地区鸡异刺线虫地理种群间耐药基因的传递还有待进一步研究;同时不同地理种群间的火鸡组织滴虫(鸡异刺线虫为传播媒介)的耐药基因是否会随鸡异刺线虫基因交流而传递仍有待解答。

3.4 系统发育关系分析

两种拓扑结构非常相似的 MP 和 ML 系统发育树表明,异刺属(*Heterakis*)线虫均可与作为外群的鸡蛔虫(*A. galli*)予以鉴别。各地的鸡异刺线虫株聚类形成一支,与同属的 *H. spumosa*、*H. dahomensis* 和 *H. isolonche* 能显著区分,其中 *H. isolonche* 与鸡异刺线虫较另外 2 种异刺属线虫的亲缘关系更近,这可能是因为鸡异刺线虫和 *H. isolonche* 均寄生于禽类,而 *H. spumosa* 和 *H. dahomensis* 寄生于啮齿类动物^[1,24]有关,进一步推测宿主因素对 ITS1/2 序列也存在一定的影响。

参考文献(References):

- [1] RIBAS A, DE-BELLOCQ J G, ROS A, et al. Morphometrical and genetic comparison of two nematode species: *Heterakis spumosa* and *Heterakis dahomensis* (Nematoda, Heterakidae) [J]. *Acta Parasitol*, 2013, 58(3): 389-398.
- [2] 汪溥钦. 福建主要家禽寄生线虫调查报告[J]. 中国畜牧兽医, 1962(10): 7-8.
WANG P Q. The investigation report of parasitic nematodes for major poultry in Fujian [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1962(10): 7-8. (in Chinese)
- [3] 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)
- [4] 刘孝刚, 于金玲, 于本良, 等. 鸡寄生虫流行区系调查

- [J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(3): 75-76.
- LIU X G, YU J L, YU B L, et al. The epidemiological investigation of chicken parasites [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 42(3): 75-76. (in Chinese)
- [5] BAZH E K. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Heterakis gallinae* from native chickens in Egypt [J]. *Parasitol Res*, 2013, 112(10): 3557-3560.
- [6] GASSER R B. PCR-based technology in veterinary parasitology [J]. *Vet Parasitol*, 1999, 84(3-4): 229-258.
- [7] ZHU X Q, CHILTON N B, JACOBS D E, et al. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences [J]. *Int J Parasitol*, 1999, 29(3): 469-478.
- [8] 秦建华, 李国清. 动物寄生虫病学实验教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 71-76.
- QIN J H, LI G Q. The experiment course of veterinary parasitology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 71-76. (in Chinese)
- [9] 史梅青, 张莉, 张路平. 山西和陕西两省鸟类寄生异刺属线虫的研究 (线虫纲: 异刺科) [J]. *四川动物*, 2010, 29(4): 527-535.
- SHI M Q, ZHANG L, ZHANG L P. Study on some species of the genus *Heterakis* (Nematoda: Heterakidae) from birds in Shanxi and Shaanxi, China [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2010, 29(4): 527-535. (in Chinese)
- [10] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 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)
- [12] WU S G, WANG G T, XI B W, et al. Population genetic structure of the parasitic nematode *Camallanus cotti* inferred from DNA sequences of ITS1 rDNA and the mitochondrial *COI* gene [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 164(2-4): 248-256.
- [13] 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)
- [14] POSADA D, CRANDALL K A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks [J]. *Trends Ecol Evol*, 2001, 16(1): 37-45.
- [15] AVISE J C. Phylogeography: the history and formation of species [M]. Harvard University Press, 2000: 447-448.
- [16] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [17] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915-925.
- [18] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. Vol. 4 [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 580.
- [19] HOLSINGER K E, WEIR B S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(9): 639-650.
- [20] 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.
- [21] TROUT R T, STEELMAN C D, SZALANSKI A L. Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas [J]. *J Med Entomol*, 2010, 47(2): 152-161.
- [22] 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.
- [23] RAYMOND M A, CALLAGHAN P F, FORT P, et al. Worldwide migration of amplified resistance genes in mosquitoes [J]. *Nature*, 1991, 350(6314): 151-153.
- [24] ŠNÁBEL V, UTSUKI D, KATO T, et al. Molecular identification of *Heterakis spumosa* obtained from brown rats (*Rattus norvegicus*) in Japan and its infectivity in experimental mice [J]. *Parasitol Res*, 2014, 113(9): 3449-3455.