

从 18S rRNA 基因序列探讨盾腹吸虫的系统发育关系

陈明秀 高 谦* 聂 品

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 盾腹亚纲吸虫被认为是寄生扁形动物中古老的类群, 包括盾腹科、多萼科、裂杯科和皱腹科, 科间系统发育关系尚存争议。本研究收集 GenBank 数据库中所有的盾腹吸虫 18S rRNA 基因序列, 测定了三种盾腹吸虫的相应序列, 分别采用最大简约法和最大似然法构建分子系统发育树。结果显示, 多萼科的分属地位不成立, 多萼属应还原到盾腹科; 盾腹科的盾腹亚科和杯盾亚科均非单系, 吸槽列数可能是平行进化特征, 不能反映盾腹科各亚科间的系统发育关系。建议将具有边缘器的吸槽型腹吸盘, 以及不具边缘器的吸杯型和皱褶型腹吸盘分别鉴定为盾腹科、裂杯科和皱腹科种类的共裔性状。

关键词: 盾腹亚纲; 盾腹科; 多萼科; 18S rRNA 基因; 系统发育

中图分类号: Q781; Q959.154 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)06-0817-05

盾腹吸虫隶属于扁形动物门吸虫纲^[1], 其单一的袋状肠管和生活史没有无性繁殖世代等特征被认为代表了古代吸虫的特点^[2, 3]。按照 Gibson 的分类系统^[1], 盾腹亚纲 (Aspidogastrea) 包括 4 个科, 裂杯科 (Stichocotylidae Faust & Tang, 1936)、皱腹科 (Rugogasteridae Schell, 1973) 及多萼科 (Multicalycidae Giboson & Chinabut, 1984) 为单属科, 且这三科的种类其脊椎动物宿主均为海洋软骨鱼类, 而盾腹科 (Aspidogastridae Poche, 1907) 包括三个亚科: 盾腹亚科 (Aspidogastrinae, Poche, 1907)、杯盾亚科 (Cotylaspidinae Chauhan, 1954) 和罗氏亚科 (Rohdellinae Giboson & Chinabut, 1984), 其脊椎动物宿主包括淡水和海洋的鱼类及爬行类。Gibson^[4]、Brook 等^[5]、Pearson^[6] 及 Zamparo 和 Brooks^[7] 曾研究和探讨过盾腹吸虫的系统发育关系, 尽管都是依据形态学特征, 但得出的结论不尽相同。Gibson^[4] 和 Pearson^[6] 认为盾腹科最为原始, 三个单属科的系统发育关系较近。然而, Brooks 等^[5] 和 Zamparo 和 Brooks^[7] 的研究显示, 皱腹科最为原始, 多萼科和盾腹科亲缘关系最近, 构成姐妹群。Rhode^[3] 由此认为仅依据形态学特征和宿主特性难以阐明盾腹吸虫的系统发育关系, 而综合形态学和 DNA 分子两方面的信息, 则可能解决这一问题。

与形态学结果相比, DNA 分子数据比形态学数据受适应进化的影响小, 可能更能解决有争议的系统发育关系^[8, 9]。18S rRNA 基因高度保守, 易于用通用引物扩增, 已被广泛应用于动物类群科以上分类阶元的系统发育研究^[8, 10, 11]。在扁形动物方面, 已有的研究大多以复殖吸虫、单殖吸虫和绦虫为主要对象, 而盾腹吸虫往往仅作为外类群出现^[12-16]。本研究收集 GenBank 数据库中所有的盾腹吸虫 18S rRNA 基因序列, 测定了三种盾腹吸虫的相应序列, 分别采用最大简约法和最大似然法构建基因树, 旨在探讨盾腹亚纲内部的分子系统发育关系, 为解决盾腹吸虫系统分类上的争议提供分子水平的证据。

1 材料与与方法

1.1 实验材料 贝居盾腹吸虫 (*Aspidogaster conchicola*) 和饭岛盾腹吸虫 (*Aspidogaster ijimai*) 分别取自我国梁子湖的青鱼和丹江口水库的鲤鱼, 材料鱼解剖后取出肠道, 参照 Gao 等^[17] 的方法在解剖镜下从肠道中收集并鉴定盾腹吸虫; *Multicalyx elegans* 取自澳大利亚塔斯马尼亚岛附近海域的 *Calloporhinchus milii*, 由澳大利亚新英格兰大学 Rohde 教授赠送。虫体洗净后, 90% 乙醇固定。

1.2 DNA 的提取、扩增和序列测定 取单个酒精

收稿日期: 2006-11-15; 修订日期: 2007-05-11

基金项目: 中国科学院 (编号: [2005] 192) 资助

作者简介: 陈明秀 (1978—), 女, 湖北省仙桃市人; 硕士; 从事水生生物学和寄生虫学研究。* 同为第一作者

通讯作者: 聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

固定虫体置于TE 缓冲液 (pH 8.0) 中浸泡过夜,转入裂解液中(含 10 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L EDTA, 1% SDS, 0.5 mg/mL 蛋白酶 K), 55℃ 消化 6—9h。基因组 DNA 的提取参照标准的苯酚-氯仿抽提法进行^[18]。根据已有的盾腹吸虫 18S rRNA 基因序列设计正反向引物, 18S-F₂: 5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3' 和 18S-R: 5'-CTT GTT ACG ACT TTT ACT TCC-3'。PCR 反应总体积为 50 μL, 包括 5 μL 10 × PCR 反应缓冲液, dNTPs 200 μmol/L, 正反向引物各 0.5 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.25 U, 基因组 DNA 100 ng, 灭菌双蒸水补至终体积。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃, 30s, 57℃, 45s, 72℃, 1min 30s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.0 %

的琼脂糖凝胶电泳分离, 目的条带割下后参照 DNA 纯化试剂盒 (E.Z.N.A.® Gel. Extraction Kit, Omega) 的使用说明进行纯化, 连接到 PMD18-T 载体上, 再转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, LB 平板培养, 每个样品选取 2 个阳性克隆进行序列测定。

1.3 序列分析和分子系统树构建 共有 8 种盾腹吸虫用于本研究的系统发育分析, 多萼科和皱腹科各一种, 盾腹科 6 种, 其中盾腹亚科 4 种, 杯盾亚科 2 种。盾腹吸虫种类、样品编号、宿主种类以及 18S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号(表 1)。用 Clustal X 软件^[19]按照缺省参数设置进行多重序列比对。用 MEGA 3.0 软件^[20]分析和计算盾腹吸虫 18S rRNA 基因序列的碱基组成、遗传变异以及成对序列遗传距离。

表 1 本研究所使用的盾腹吸虫种类及相关信息

Tab. 1 List of aspidogastrea species used in this study with host species and GenBank accession number

盾腹吸虫 Parasite species	样品编号 Sample code	宿主 Host species	GenBank 登录号 Accession number
Aspidogastridae			
Aspidogastrinae			
<i>Aspidogaster conchicola</i> 1	Ac1	<i>Quadula pustulosa</i>	AJ287478
<i>Aspidogaster conchicola</i> 2	Ac2	<i>Mylopharygodon pieus</i>	DQ482608*
<i>Aspidogaster ijimai</i>	Ai	<i>Cyprinus carpio</i>	DQ482609*
<i>Lobatostoma manteri</i>	Lm	<i>Trachinotus blochii</i>	L16911
<i>Multicotyle purvisi</i>	Mp	<i>Siebenrockiella crassicollis</i>	AJ228785
Cotylaspidinae			
<i>Cotylaspis</i> sp.	Co	<i>Pelodiscus sinensis</i>	AY222083
<i>Cotylogaster basiri</i>	Cb	<i>Pogonias cromis</i>	AY222082
Multicalycidae			
<i>Multicalyx elegans</i> 1	Me1	<i>Callorhinchus milii</i>	AJ287532
<i>Multicalyx elegans</i> 2	Me2	<i>Callorhinchus milii</i>	DQ482610*
Rugogastridae			
<i>Rugogaster hydrolagi</i>	Rh	<i>Callorhinchus milii</i>	AJ287573

* 示本研究所测定的序列; 盾腹吸虫种名后的数字代表样品来自不同宿主种类或不同地点

Asterisks indicate species sequenced in this study; the number following species names represent samples either from different host species or from different localities

以复殖亚纲的卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) (GenBank 登录号为 AY222140) 为外类群, 用 Phylip 软件包^[21]中的 SEQBOOT 程序生成自展数据集, 自展重复次数为 100; 分别利用 Phylip 中的 DNAMP 和 DNAML 程序构建最大简约树 (Maximum Parsimony tree, MP tree) 和最大似然树 (Maximum Likelihood tree, ML tree) 各 100 个; 采用 CONSENSE 程序获得各自的 50% 多数一致树。

2 结果

2.1 盾腹吸虫 18S rDNA 的序列分析

切除引物附近差异较大的部分序列后, 用于系

统发育分析的盾腹吸虫 18S rRNA 基因片段长度在 1765—1780 bp 之间。比对排序得到 1803 个同源位点, 有 309 个变异位点, 其中有 161 个简约信息位点。A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 25.7%、22.6%、23.3% 和 28.5%。

基于 Kimura 双参数模型的遗传距离矩阵显示, 8 个盾腹亚纲种类的种间遗传距离在 1.1%—9.1% 之间, 6 个盾腹科种类的种间遗传距离在 1.1%—7.7% 之间, 皱腹科的 *Rugogaster hydrolagi* 与盾腹科种类的遗传距离在 8.2%—9.1% 之间, 而多萼科的 *Multicalyx elegans* 与盾腹科种类的遗传距离在

2.7%—6.8%之间(表 2)。

表 2 盾腹吸虫 18S rDNA 序列基于 Kimura 双参数模型的成对序列遗传距离

Tab. 2 Pairwise distance (Kimura 2-parameter) matrix for 18S rDNA sequences of aspidogastrea species

	Ac1	Ac2	Ai	Lm	Mp	Co	Cb	Me1	Me2	Rh
Ac1	—									
Ac2	0.3	—								
Ai	1.3	1.1	—							
Lm	2.1	2.0	1.3	—						
Mp	7.4	7.3	6.8	7.7	—					
Co	7.0	6.8	6.3	7.0	3.7	—				
Cb	6.7	6.5	5.9	6.3	7.0	5.7	—			
Me1	3.5	3.3	2.8	3.4	6.8	6.2	5.7	—		
Me2	3.3	3.1	2.7	3.3	6.6	6.0	5.6	0.2	—	
Rh	9.0	8.9	8.2	8.6	9.1	9.0	8.4	8.0	7.9	—

注:样品编号与表 1 相同;表中数字表示核苷酸差异百分比

Note: Sample codes are as those indicated in Tab. 1; numbers in the table represent percentages of nucleotide divergence

2.2 盾腹亚纲的系统发育分析

本研究所构建的盾腹吸虫 18S rRNA 基因序列的 MP 树和 ML 树其拓扑结构是一致的,两者之间只有两个分支接点的支持率(BP)存在差异(图 1)。皱

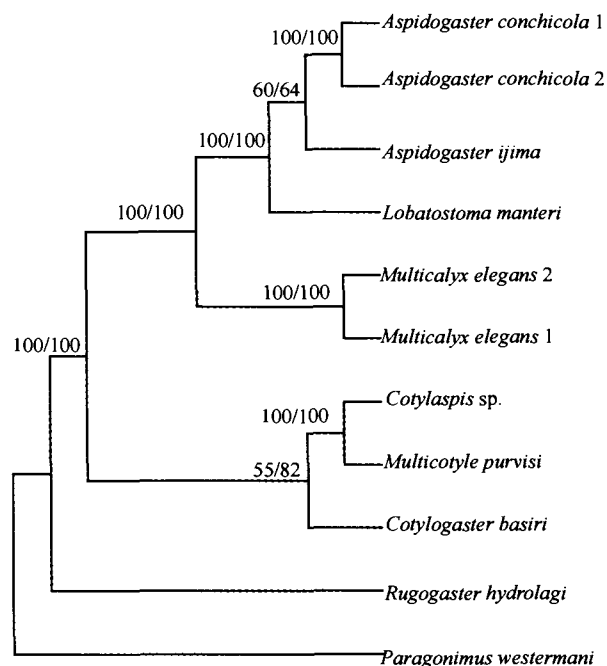


图 1 根据 18S rDNA 序列,以卫氏并殖吸虫为外类群构建的盾腹吸虫种类的最大似然树

Fig. 1 The maximum-likelihood tree resulting from analysis of 18S rDNA sequences of aspidogastrea species using the digenean *Paragonimus westermani* as outgroup

分支上的数值为 bootstrap 自举 100 次的支持率,最大简约法得到的自举值标记在斜线后

Bootstrap values are shown on the tree branch, values obtained using maximum parsimony method following the slash

腹科的 *R. hydrolagi* 位于系统发生树的基部,与所有其他的 7 种盾腹吸虫构成姐妹群(BP 值均为 100)(图 1)。这 7 种形成两大支,多萼科的 *M. elegans* 嵌入盾腹科中,与盾腹亚科的多杯属(*Multicotyle*)及杯盾亚科的杯盾属(*Cotylaspis*)和杯腹属(*Cotylogaster*)种类(ML 树:BP = 55;MP 树:BP = 82),其中多杯属与杯盾属互为姐妹群(BP 值均为 100)(图 1)。

3 讨论

Faust 和 Tang^[22] 于 1936 年建立多萼属,隶属于盾腹科。后来, Gibson 和 Chinabut^[23] 对盾腹亚纲的分类系统进行调整,将多萼属从盾腹科中分离出来,成立多萼科,并建议将盾腹亚纲划分为两个目,盾腹目(*Aspidogastrida*)仅包括盾腹科,腹吸盘具有多列(3—4 列)小吸槽(Alveoli)被鉴定为共裔性状,而将多萼科、裂杯科和皱腹科组合为一新目-裂杯目(*Stichocotylida*),其特征是腹吸盘具有单一纵列的吸杯(Sucker)或皱褶(Rugae)。然而,在 Brooks 等^[5] 和 Zamparo 和 Brooks^[7] 依据形态学特征构建的系统发育树中,多萼科均与盾腹科构成姐妹群。在本研究依据 18S rRNA 基因序列数据构建的分子系统树中,多萼科的 *M. elegans* 既没有与盾腹科,也没有与皱腹科构成姐妹群,而是插入盾腹科中,导致目前的盾腹科为并系。另一方面,已有的研究显示,盾腹科吸虫的腹吸盘上均具有边缘器(Marginal organ),多萼属种类也具有边缘器,而裂杯科和皱腹科种类则没

有边缘器^[24]。因此,本研究建议将多萼属还原到盾腹科中,多萼科应为无效名称;推测边缘器是盾腹科种类的共有新征,具有边缘器的吸槽型腹吸盘为盾腹科种类的共裔性状,而不具有边缘器的吸杯型和皱褶型腹吸盘则分别是裂杯科和皱腹科种类的共裔性状。

根据腹吸盘上小吸槽的列数和两性生殖管的有无,盾腹科划分为3个亚科^[1]。盾腹亚科包括盾腹属、瓣口属、多杯属、簇盾属(*Lophotaspis*)和合杯属(*Synchocotyle*);杯盾亚科包括杯腹属、杯盾属和里龟属(*Lissemysia*);Rohdellinae 仅包括一种 *Rohdella siamensis*^[1]。然而,Zamparo 和 Brooks^[7]研究认为盾腹亚科的簇盾属、合杯属和多杯属应划归杯盾亚科。在本研究的分子系统树中,盾腹科种类分为两大支,盾腹属(4列吸槽)、瓣口属(4列吸槽)和多萼属(一列吸槽)聚为一支;另一支包括多杯属(4列吸槽)、杯盾属(3列吸槽)和杯腹属(3列吸槽)。可见,吸槽列数可能是平行进化特征,并不能反映盾腹科各亚科间的系统发育关系。由于目前的盾腹亚科和杯盾亚科均非单系类群,因此,有必要在广泛采样基础上进一步研究盾腹科内部的系统发育关系,并对其亚科划分进行修订。

饭岛盾腹吸虫和贝居盾腹吸虫互为姐妹,但支持率较低(在 ML 树和 MP 树中分别为 60 和 64),这一支再与曼特尔瓣口吸虫(*Lobatostoma manteri*)构成姐妹群,支持率为 100%;另一方面,饭岛盾腹吸虫与贝居盾腹吸虫的遗传距离为 1.1%—1.3%,与曼特尔瓣口吸虫的也仅为 1.3%。因此认为,盾腹属和瓣口属种类间的系统发育关系尚未明了。进一步的研究应尽可能多地收集上述两属,以及相关的簇盾属和合杯属种类,利用进化速率相对较快的分子标记深入探讨其系统发育关系,以揭示头瓣的有无是否足以代表属间差异。

参考文献:

- [1] Gibson D I, Jones A, Bray R A. Keys to the Trematoda, Vol. 1. Wallingford: CABI Publishing. 2002, 544
- [2] Tang Z Z, Tang C T. Life histories of two species of aspidogastrea and the phylogeny of the group [J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 1980, 7: 153—169 [唐仲璋,唐崇惕.两种盾盘吸虫的生活史及吸虫纲系统发生的讨论.水生生物学集刊,1980,7: 153—169]
- [3] Rohde K. The Aspidogastrea, an archaic group of Platyhelminthes [A]. In: Littlewood D T J, Bray R A (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes* [C]. London: Taylor & Francis. 2001, 159—167
- [4] Gibson D I. Questions in digenean systematics and evolution [J]. *Parasitology*, 1987, 95: 429—460
- [5] Brooks D R, Bandoni S M, Grady R T. Aspects of the phylogeny of the Trematoda Rudolphi, 1808 (Platyhelminthes: Cercomeria) [J]. *Can J Zool*, 1989, 67: 2609—2624
- [6] Pearson J C. On the position of the digenean family Heronimidae: an inquiry into a cladistic classification of the Digenea [J]. *Syst Parasitol*, 1992, 21: 81—166
- [7] Zamparo D, Brooks D. Phylogenetic systematic assessment of the Aspidobothrea (Platyhelminthes, Neodermata, Trematoda) [J]. *Zool Scr*, 2003, 32: 83—93
- [8] Rohde K, Hefford C, Ellis J T, et al. Contributions to the phylogeny of Platyhelminthes based on partial sequencing of 18S ribosomal DNA [J]. *Int J Parasitol*, 1993, 23: 705—724
- [9] Fernandez M, Littlewood D T J, Latorre A, et al. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematode) based on 18S rRNA sequences [J]. *Parasitology*, 1998, 117: 383—391
- [10] Bridge D, Cunningham C W, DeSalle R, et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence [J]. *Mol Biol Evol*, 1995, 12: 679—689
- [11] Medina M, Collins A G, Silberman J D, et al. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA [J]. *PNAS*, 2001, 98: 9707—9712
- [12] Blair D, Barker S C. Affinities of the Gyliuachenidae: utility of the 18S rRNA gene for phylogenetic inference in the Digenea (Platyhelminthes) [J]. *Int J Parasitol*, 1993, 23: 527—532
- [13] Cribb T H, Bray R A, Littlewood D T J, et al. Relationships of the Digenea—evidence from molecules and morphology [A]. In: Littlewood D T J, Bray R A (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes* [C]. London: Taylor & Francis, 2001, 186—193
- [14] Olson P D, Cribb T H, Tkach V V, et al. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33: 733—755
- [15] Kodedová, Doležel D, Broucková M, et al. On the phylogenetic positions of the Caryophyllidea, Pseudiphylloidea and Proteocephalidea (Eucstoda) inferred from 18S rRNA [J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30: 1109—1113
- [16] Olson P D, Littlewood D T J. Phylogenetics of the Monogenea—evidence from a medley of molecules [J]. *Int J Parasitol*, 2002, 32: 233—244
- [17] Gao Q, Nie P, Yao W J. Scanning electron microscopy of *Aspidogaster ijimai* Kawamura, 1993 and *A. conchicola* Baer, 1827 (Aspidogastrea, Aspidogastreae) with reference to their fish definitive-host specificity [J]. *Parasitol Res*, 2003, 91: 439—443
- [18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed [C]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- [19] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876—4882
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150—163

- [21] Felsenstein J, PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.6 (alpha3), Seattle, Washington: Department of genome Sciences, University of Washington. 2002
- [22] Faust E C, Tang C C. Notes on new Aspidogastrid species with a consideration of the phylogeny of the group [J]. *Parasitology*, 1936, **28**: 487—501
- [23] Gibson D I, Chinabut S. *Rohdella siamensis* gen. et sp. nov. (Aspidogastridae: Rohdellinae subfam. nov.) from freshwater fishes in Thailand, with a recognition of the classification of the subclass Aspidogastrea [J]. *Parasitology*, 1984, **88**: 383—393
- [24] Rohde K. The minor groups of parasitic Platyhelminthes [J]. *Adv Parasitol*, 1994, **33**: 145—234

PHYLOGENETIC SYSTEMATIC INFERENCE IN THE ASPIDOGASTREA (PLATYHELMINTHES, TREMATODE) BASED ON THE 18S rRNA SEQUENCE

CHEN Ming Xiu, GAO Qian and NIE Pin

(State key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, and Laboratory of Fish Diseases,
Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: The subclass Aspidogastrea (Platyhelminthes, Trematoda) is an archaic and minor group among parasitic platyhelminths, and comprises 4 families, of which the Aspidogastridae Poche, 1907 is divided into three subfamilies, and other three families, i.e. Stichocotylidae Faust & Tang, 1936, Rugogastridae Schell, 1973, and Multicalycidae Giboson & Chinabut, 1984 only contains a single genus each. However, there are still arguments on the phylogenetic relationships among these four families. In the present study, the 18S rRNA sequences of three aspidogastrea species, i.e. *Aspidogaster conchicola*, *Aspidogaster ijimai* and *Multicalyx elegans* were determined, and all published 18S rRNA gene data for aspidogastreans in the GenBank database were downloaded, in order to examine the phylogenetic relationships within the Aspidogastrea. According to the molecular data, nucleotide variations of 18S rRNA sequences across all eight species of aspidogastreans ranged from 1.1% to 9.1%, among 6 species of the Aspidogastridae from 1.1% to 7.7%, between *Rugogaster hydrolagi* of the Rugogastridae and six aspidogastrid species from 8.2% to 9.1%, whereas between *Multicalyx elegans* of the Multicalycidae and six aspidogastrid species only from 2.7% to 6.8%. Phylogenetic analyses of the 18S rRNA with the digenean species *Paragonimus westermani* as outgroup by the maximum parsimony (MP) and the maximum likelihood (ML) methods produced two identical topological trees. *R. hydrolagi* of the Rugogastridae locating at the base of phylogenetic trees, appears to be the sister group of all other aspidogastrea species, which form two main clades, the first comprising the *Aspidogaster* and the *Lobatostoma* of the Aspidogastrinae, and *M. elegans*, the second the *Multicotyle* of the Aspidogastrinae, and the *Cotylaspis* and the *Cotylogaster* of the Cotylaspidinae. Recognizing Multicalycidae, however, would make the Aspidogastridae paraphyletic. It suggested that the genus *Multicalyx* should revert to the family Aspidogastridae, and the Multicalycidae be invalid family name; furthermore, the adhesive disc, with marginal organ, consisting of alveoli, the adhesive disc, without marginal organ, consisting of well separated sucker, and of rugae, should be identified as the synapomorphy of the Aspidogastridae, the Stichocotylidae, and the Rugogastridae, respectively. In addition, both the Aspidogastrinae and the Cotylaspidinae were shown to be non-monophyletic, implying that the number of longitudinal rows of alveoli is the parallel evolution character, and being irrelevant to subfamilial relationships in the Aspidogastridae. Therefore, the subfamilial classification of the Aspidogastridae needs to be revised by examining more genera and species of aspidogastrids.

Key words: Aspidogastrea; Aspidogastridae; Multicalycidae; 18S rRNA gene; Phylogenetic relationship