

doi: 10.7541/2014.50

强壮粗体虫的线粒体基因组及棘头虫的系统发育研究

潘庭双¹ 聂品²

(1. 安徽省农业科学院水产研究所, 合肥 230031; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 通过长距离 PCR 方法, 克隆了鳊(*Siniperca chuatsi* Basilewsky)肠道内寄生虫——强壮粗体虫(*Hebesoma violentum* Van Cleave)线粒体基因组全长序列, 共 13393 bp (GenBank 登录号: KC415004), 有 36 个基因, 其中蛋白编码基因 12 个, 核糖体基因 2 个, tRNA 22 个。所有基因均由线粒体基因组同一条链按同一个方向转录。利用该线粒体基因组和已经报道的一些轮虫纲种类的线粒体基因组序列, 构建了棘头虫和轮虫的系统发育树。系统发育研究表明: 包括强壮粗体虫、隐藏新棘头虫 *Pallisentis celatus* (Van Cleave) 和 *Parate-nuisentis ambiguous* (Van Cleave) 在内的始新棘头虫纲(Eoacanthocephala)与古棘头虫纲(Palaeacanthocephala)亲缘关系较近, 聚为一枝后再与原棘头虫纲(Archiacanthocephala)聚在一起; 棘头虫与双巢类轮虫(Bdelloid)亲缘关系最近, 聚为一枝, 然后再与单巢类轮虫(Monogonont)聚在一起, 表明棘头虫和轮虫具有较近的亲缘关系。

关键词: 棘头虫; 强壮粗体虫; 线粒体基因组; 系统发育; 轮虫

中图分类号: Q959.17 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)02-0351-11

棘头虫是一类利用节肢动物为中间宿主, 脊椎动物为终末宿主的肠道寄生虫, 目前全球报道约有 1200 种。在传统分类中, 棘头虫被归为线虫动物门; 但通过形态学^[1]及系统发育^[2]研究, 目前普遍认为棘头虫与轮虫亲缘关系很近, 统称为轮形动物门(Syndermata)。轮虫动物门(Rotifera)分为三个纲: 双巢纲(Bdelloidea)、单巢纲(Monogononta)及尾盘纲(Seisonidea), 但关于它们与棘头虫间的亲缘关系, 不同的研究者往往得出并不完全相同的结论^[3,4]。

然而, 在寄生虫学界通常将棘头虫作为一个独立的动物门, 即 Acanthocephala, 包含四个纲: 原棘头虫纲(Archiacanthocephala)、始新棘头虫纲(Eoacanthocephala)、古棘头虫纲(Palaeacanthocephala)及多棘头虫纲(Polyacanthocephala)^[5,6]。对于棘头虫不同纲之间的亲缘关系, 尽管有一些学者进行了系统发育方面的研究^[5,6], 但它们之间的亲缘关系尚有待进一步阐明^[8]。有学者认为始新棘头虫纲与多棘头虫纲亲缘关系较近, 它们在进化树上聚为一枝后, 再与古棘头虫纲聚在一起, 原棘头虫纲最后与

它们聚为一大枝^[2]。已经报道的有关棘头虫系统发育研究主要是基于 1—2 个基因, 如 18S 或 28S 核糖体 RNA^[1]、ITS^[9]、SSU 及 LSU rDNA 基因^[10]、cox1^[9]等, 而这些基因由于片段较短, 其所包含的信息量较少; 且它们相对比较保守, 进化速率较慢, 因此在系统发育方面所包含的信息远没有线粒体基因组丰富^[4,11]。近年来, 有关于线粒体基因组在棘头虫系统发育研究的报道, 如古棘头虫纲的似瘦棘吻虫 *Leptorhynchoides thecatus* (Linton)、始新棘头虫纲的 *P. ambiguus*、原棘头虫纲的 *Oncicola luehei* Travassos 和猪巨吻棘头虫 *Macracanthorhynchus hirudina-ceus* (Travassos)^[12-14]。然而, 棘头虫不同分类单元之间、棘头虫与轮虫等其他动物间亲缘关系的研究, 需要更多棘头虫线粒体基因组的支持。

强壮粗体虫是一种寄生于鳊(*Siniperca chuatsi* Basilewsky)肠道内的棘头虫^[15]。对该寄生虫的研究主要集中在形态学、流行病学及引起的肠道病理等方面^[15,16]。本研究克隆了强壮粗体虫线粒体基因组全长, 分析了其基因组成、核酸组成及密码子, 并对

收稿日期: 2013-02-25; 修订日期: 2013-12-25

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(No. 2009CB118703)资助

作者简介: 潘庭双(1973—), 男, 安徽安庆人; 博士研究生; 研究方向为鱼类寄生虫学。E-mail: pantingshuang@163.com

通信作者: 聂品(1961—), 男, 研究员; 研究方向为鱼类免疫学与寄生虫学。E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

强壮粗体虫与其他棘头虫、轮虫及其他动物间的亲缘关系进行了系统发育方面的分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料和总 DNA 的提取

强壮粗体虫采自湖北省梁子湖的鳊肠道, 经 0.6% 氯化钠溶液清洗干净后, 用 70% 酒精固定, -20°C 保存。总 DNA 的提取方法参照 Promega Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) 说明书。

1.2 常规 PCR 扩增与测序

利用已报道的引物(*cox1F*/*cox1R*, *cobF*/*cobR*, and *rrnLF*/*rrnLR*)^[13] 扩增 *cox1*、*cox2*、*cob*, 以及已

报道的棘头虫(似瘦棘吻虫, *O. luehei*, GenBank 登录号分别为 NC_006892、NC_016754)及轮虫(*Rotaria rotatoria* Pallas, *Brachionus plicatilis* Muller; NC_013568, NC_010472 part-I 和 NC_010484 part-II) 线粒体基因组的保守序列设计 *cox2* 的上、下游引物扩增 *cox2* (表 1)。反应体系为: 总体积 50 μL , 含 5 μL 10 \times PCR Buffer, dNTPs 10 nmol, 引物各 20 pmol, *Taq* DNA 聚合酶(TakaRa)2.5 U, DNA 约 20 ng。PCR 反应的循环参数为: 94°C 变性 3min; 94°C 变性 30s, 45°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 共 33 个循环; 最后 72°C 延伸 10min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 扩增产物进行序列测定。

表 1 强壮粗体虫(*Hebesoma violentum*)线粒体基因组 PCR 扩增所需引物
Tab. 1 PCR primers used in the mitochondrial genome of *Hebesoma violentum*

引物 Primers	核苷酸序列 DNA sequence (5'-3')	PCR 产物大小 Estimated size of PCR products	引物来源 Primer source
<i>cox1F</i>	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	-680 bp	Folmer, 1994
<i>cox1R</i>	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
<i>cox2F</i>	GGWCAYCARTGATATTGA	-340 bp	This study
<i>cox2R</i>	CAATKACAATYGGTATAAA		
<i>rrnLF</i>	GACYGTRCTWAGGTAGCRTRATC	-600 bp	Gazi, 2012
<i>rrnLR</i>	AWRDRATRATCCAACATCGAGGTA		
<i>cobF</i>	CTTTTTAGGGTATGTTTTACC	-600 bp	Gazi, 2012
<i>cobR</i>	TCWACARYAYWCCTCC		
<i>cox1-rrnLF</i>	GGTTTATTGGGTTTAGTAGTGTGAGCG	-1.9 kb	This study
<i>cox1-rrnLR</i>	TACTTTTACCCTCAGCAGCGACATTC		
<i>rrnL-cobF</i>	AGGAATGTCGCTGCTGAGGGTAAAAG	-7.5 kb	This study
<i>rrnL-cobR</i>	CCCCACAGAACCCCAACGATGTAAGA		
<i>cob-cox2F</i>	GGCAAATGTCTTATTGAGGGATGACTGTG	-2.8 kb	This study
<i>cob-cox2R</i>	CTGGATAGGAGGTCAAAGTCCCCGTC		
<i>cox2-cox1F</i>	GAGGTTTTGCCTGTTGGATGTGGAC	-2.3 kb	This study
<i>cox2-cox1R</i>	ATTACCCTATAAGCCACAACCACA		

1.3 长距离 PCR 扩增与测序

根据 *cox1*、*rrnL*、*cob*、*cox2* 的测序结果, 设计长距离 PCR 引物扩增线粒体基因组上的剩余四个长片段 *cox1-rrnL*、*rrnL-cob*、*cob-cox2*、*cox2-cox1* (表 1), 大小分别为 1.9、7.0、2.8、2.3 kb。反应体系为: 总体积 50 μL , 含 5 μL 10 \times LA PCR Buffer, dNTPs 10 nmol, 引物各 20 pmol, LA *Taq* DNA 聚合酶(TakaRa)2.5 U, DNA 约 20 ng。PCR 反应的循环参数为: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 60°C 退火 30s, 68°C 延伸 10min, 共 33 个循环; 最后 72°C 延伸 10min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 扩增产物用于序列测定。

1.4 全序列拼接与组成分析

用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 进行序列拼接。用 MEGA 5 软件分析核苷酸、氨基酸组成及密码子使用情况。蛋白编码基因序列用在线程序 Open Reading Frame Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析, 密码子选择 invertebrate。大核糖体 RNA (*rrnL*) 及核糖体小 RNA (*rrnS*) 序列通过 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与已报道的棘头虫线粒体基因组比较获得。tRNA 用软件 tRNAscan-SE、DOGMA 查找, 并辅以手工查找。完整线粒体基因组序列用 Sequin 软件提交至 GenBank, 登录号: KC415004。强壮粗体虫环状基因

图谱用软件 GenomeVx 绘制。

1.5 系统进化分析

由于已经报道轮虫的线粒体基因组序列中有部分缺失 nad2、nad3 或 nad6^[17], 本研究中所包含的 44 种动物线粒体基因组中有 9 个蛋白编码基因为其共有。这些动物包括冠轮动物(Lophotrochozoans) 14

种、扁形动物(Platyzoans)20 种、脱皮动物(Ecdysozoans)5 种、后口动物(Deuterostomes)4 种, 外类群为棘胞动物 *Montastraea annularis* Ellis and Solander (表 2)。这些动物的 9 个蛋白编码基因氨基酸序列通过 ClustalX 比对后, 利用软件 Gblocks 选取最为保守的 1112 个氨基酸用于系统发育分析。

表 2 用于系统发育研究的物种及其线粒体基因组的 GenBank 登录号
Tab. 2 Species and their mitochondrial genome GenBank accession numbers used in the phylogenetic analyses

物种 Species	分类地位 Taxonomic group	GenBank 登录号 GenBank accession No.
Lophotrochozoa		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mollusca	NC_006886
<i>Musculista senhousiavoucher</i>	Mollusca	GU001954
<i>Terebellides stroemi</i>	Annelida	EU236701
<i>Lumbricus terrestris</i>	Annelida	NC_001673
<i>Loxosomella aloxiata</i>	Entoprocta	AB264800
<i>Loxocorone allax</i>	Entoprocta	NC_010431
<i>Urechis caupo</i>	Echiura	AY619711
<i>Urechis unicinctus</i>	Echiura	NC_012768
<i>Sipunculus nudus</i>	Sipunculida	NC_011826
<i>Laqueus rubellus</i>	Brachiopoda	NC_002322
<i>Terebratalia transversa</i>	Brachiopoda	AF331161
<i>Phoronis psammophila</i>	Phoronida	AY368231
<i>Flustra foliacea</i>	Bryozoa	JQ061319
<i>Watersipora subtorquata</i>	Bryozoa	NC_011820
Platyzoa		
<i>Hebesoma violentum</i>	Acanthocephala; Eoacanthocephala	KC415004
<i>Paratenuisentis ambiguus</i>	Acanthocephala; Eoacanthocephala	FR856885
<i>Pallisentis celatus</i>	Acanthocephala; Eoacanthocephala	JQ943583
<i>Leptorhynchoides thecatus</i>	Acanthocephala; Palaeacanthocephala	NC_006892
<i>Oncicola luehei</i>	Acanthocephala; Archiacanthocephala	NC_016754
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	Acanthocephala; Archiacanthocephala	FR856886
<i>Rotaria rotatoria</i>	Rotifera; Bdelloidea	NC_013568
<i>Philodina citrina</i>	Rotifera; Bdelloidea	FR856884
<i>Adineta vaga</i>	Rotifera; Bdelloidea	1
<i>Habrotrocha constricta</i>	Rotifera; Bdelloidea	2
<i>Macrotrachela quadricornifera</i>	Rotifera; Bdelloidea	3
<i>Adineta ricciae</i>	Rotifera; Bdelloidea	4
<i>Philodina roseola</i>	Rotifera; Bdelloidea	5
<i>Brachionus plicatilis</i>	Rotifera; Monogononta	NC_010472 part-I NC_010484 part-
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rotifera; Monogononta	6
<i>Brachionus manjavacas</i>	Rotifera; Monogononta	7
<i>Paragonimus westermani</i>	Platyhelminthes	NC_002354
<i>Taenia solium</i>	Platyhelminthes	NC_004022
<i>Taenia crassiceps</i>	Platyhelminthes	NC_002547

续表

物种 Species	分类地位 Taxonomic group	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Platyhelminthes	NC_000928
Ecdysozoa		
<i>Homarus americanus</i>	Arthropoda	HQ402925
<i>Scutigera coleoptrata</i>	Arthropoda	NC_005870
<i>Opisthopterus cinctipes</i>	Onychophora	NC_014273
<i>Epiperipatus biolleyi</i>	Onychophora	NC_009082
<i>Priapulus caudatus</i>	Priapulida	NC_008557
Deuterostomia		
<i>Branchiostoma floridae</i>	Cephalochordata	NC_000834
<i>Acanthaster planci</i>	Echinodermata	NC_007788
<i>Sarotherodon melanotheron</i>	Chordata	NC_015611
<i>Rhabdopleura compacta</i>	Hemichordata	NC_015649
Radiata (outgroups)		
<i>Montastraea annularis</i>	Cnidaria	NC_007224

注：“1”表示 JX183993、JX184001、JX184009、JX184017、JX184025、JX184033、JX184056、JX184064、JX184072；“2”表示 JX183994、JX184002、JX184010、JX184018、JX184026、JX184034、JX184057、JX184065、JX184073；“3”表示 JX183995、JX184003、JX184011、JX184019、JX184027、JX184035、JX184059、JX184067、JX184075；“4”表示 JW861109、JW861111、JW861112；“5”表示 JW861079、JW861081、JW868082、JW861084、JW861085；“6”表示 JX463644、JX463643、JX463645、JX463646、JX433647、JX463648、JX433649、JX463650、JX463651；“7”表示 JW861101、JW861103、JW861104、JW861106

Note: “1” indicates JX183993, JX184001, JX184009, JX184017, JX184025, JX184033, JX184056, JX184064, JX184072; “2” indicates JX183994, JX184002, JX184010, JX184018, JX184026, JX184034, JX184057, JX184065, JX184073; “3” indicates JX183995, JX184003, JX184011, JX184019, JX184027, JX184035, JX184059, JX184067, JX184075; “4” indicates JW861109, JW861111, JW861112; “5” indicates JW861079, JW861081, JW868082, JW861084, JW861085; “6” indicates JX463644, JX463643, JX463645, JX463646, JX433647, JX463648, JX433649, JX463650, JX463651; “7” indicates JW861101, JW861103, JW861104, JW861106

系统发育研究利用软件 MrBayes 3.2 进行贝叶斯分析(Bayesian Inference, BI)。依据 Akaike Information Criterion(AIC)标准, 利用 ProTest 2.0 软件选取 MtArt+G+I+F 为最适蛋白模型, 其次为 MtArt+G+F、MtArt+I+G、MtArt+G、RtRev+I+G+F。由于 MrBayes 软件中没有 MtArt 蛋白模型, 只能用 RtREV 替代。BI 系统发育树的计算是依据最适模型, 运行 4 个马尔可夫链(Markov Chain Monte Carlo, MCMC), 运行代数 1000000, 每 100 代储存为一棵树, 共生成 10000 颗树, 将前 2000 棵树(200000 代)去除, 剩下合为一棵树。

2 结果

2.1 线粒体基因组组成分析

强壮粗体虫线粒体基因组为双链环状, 全长 13393 bp, T、G、A、C 含量分别为 38.3%、28.5%、21.1%及 12.1%(表 3)。在 36 个基因中, 蛋白编码基因 12 个, tRNA 22 个、核糖体 RNA 2 个。所有基因均由同一条链按同一方向转录(图 1), 基因排列顺

序、长度及间隔距离均列于表 3。

2.2 蛋白编码基因密码子使用情况及序列特点

强壮粗体虫线粒体基因组具有明显的 AT 偏好性, 这可能与碱基突变、自然选择有关^[18]。强壮粗体虫蛋白编码基因 AT 含量为 59.1%, 略多于 *O. luehei* (58.8%), 但少于似瘦棘吻虫(71.6%)、*P. ambiguus* (67.1%)、猪巨吻棘头虫(63.9%)及隐藏新棘虫 *Pallisentis celatis* (Van cleave)(61.5%)^[19]。强壮粗体虫蛋白编码基因密码子使用情况见表 4。

强壮粗体虫蛋白编码基因由多 T 的密码子编码, 类似于以前报道的一些无脊椎动物的线粒体基因组^[12,13]。12 个蛋白编码基因全长 9831 bp, 由 3227 个密码子组成(去除终止密码子)。在这些密码子中, 含量最多的依次为 TTT (6.43%)、TTG (5.97%)、GTT (5.82%); 含量最少的依次为 CGA、CGC、CGG、CAC, 含量分别为 0.18%、0.18%、0.21%、0.27%(表 5)。

强壮粗体虫线粒体基因组 12 个蛋白编码基因的氨基酸中, 含量最为丰富的依次为 Leu、Val、Ser, 含量分别为 16.42%、15.62%、11.75%, 这三种氨基

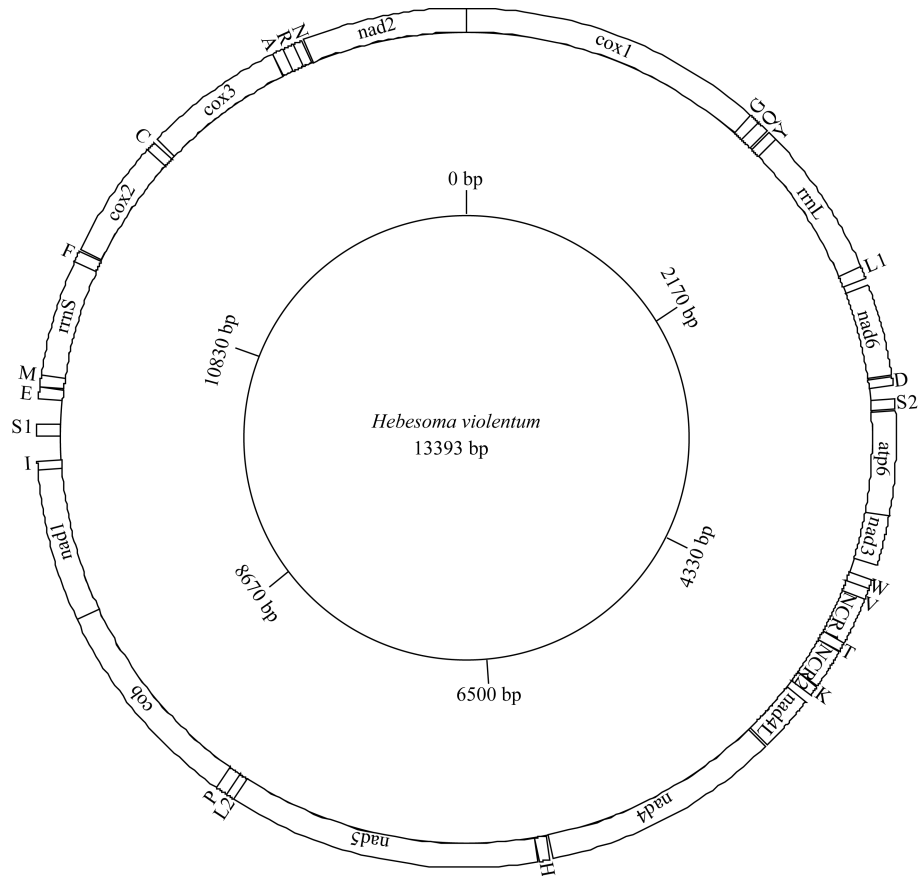


图 1 强壮粗体虫环状线粒体基因组

Fig. 1 Circular presentation of the complete mitochondrial genome of *Hebesoma violentum*

所有基因均按同一个方向进行转录, 22 个 tRNA 均由一个缩写字母表示。2 个亮氨酸、2 个丝氨酸分别依据其反义密码子标出, 其中 L1(trnL-uag)、L2(trnL-uaa)、S1(trnS-ucu)、S2(trnS-uga)

All genes are encoded in the same direction and 22 tRNA genes are designated by a single-letter abbreviation. The two leucine and serine tRNA genes are labeled according to their anticodon sequences, as L1 (trnL-uag), L2 (trnL-uaa), S1 (trnS-ucu), and S2 (trnS-uga), respectively

酸组成占总氨基酸的 43.79%。与强壮粗体虫相比, 似瘦棘吻虫中氨基酸最为丰富的依次为 Leu、Val、Phe, 含量分别为 16.38%、10.14%、9.93%, 占总氨基酸组成的 36.45%^[12]。在 *O. luehei* 线粒体基因组中, 含量最为丰富的依次为 Val、Leu、Ser, 含量分别为 18.24%、14.17%、10.27%, 占总氨基酸组成的 42.66%^[13]。在猪巨吻棘头虫线粒体基因中, 含量最多的依次是 Leu、Trp、Gly, 含量分别为 19.27%、11.38%、9.46%, 占总氨基酸组成的 40.11%^[14]。在 *P. ambiguus* 线粒体基因组中, 氨基酸含量最多的依次为 Leu、Phe、Gly, 含量分别为 21.31%、13.61%、9.33%, 占总氨基酸组成的 44.25%^[14]。在隐藏新棘头虫线粒体基因组中, 氨基酸含量最多的依次为 Val、Gly、Ser, 含量分别为 15.84%、10.82%、10.60%, 占总氨基酸组成的 37.26%^[19]。

12 个蛋白编码基因的起始密码子并不完全相同, 其中 *cox1*、*atp6*、*cob*、*nad1*、*cox3* 这 5 个蛋白编码基因的起始密码子为 GTG, *nad4*、*nad5*、*cox2* 这 3 个蛋白编码基因起始密码子为 TTG, *nad6*、*nad4L* 起始密码子为 ATT, *nad3*、*nad2* 起始密码子分别为 ATG、ATC。12 个蛋白编码基因的终止密码子也不完全相同, 其中 *nad6*、*nad4L* 以 TAG 为终止密码子, *atp6*、*nad5*、*cob*、*cox2*、*nad2* 以 TAA 为终止密码子, 而 *cox1*、*cox3*、*nad1*、*nad3*、*nad4* 仅以 T 为终止密码子。12 个蛋白编码基因的起始、终止密码子详见表 3。

2.3 转运 RNA 及核糖体 RNA 基因

强壮粗体虫线粒体基因组中有 22 个 tRNA, 其中 *trnL*、*trnS* 均为 2 个, 这些 tRNA 长度为 47—65 bp。*trnA*、*trnH*、*trnL1*、*trnK*、*trnS2* 有完整的 dihydrouridine

表 3 强壮粗体虫线粒体基因组基因组成分析
Tab. 3 The mitochondrial genome organization of *Hebesoma violentum*

基因 Gene	起始位点 Start	终止位点 Finish	核苷酸数目 No. of nt	氨基酸数目 No. of aa	起始密码子 Initiation	终止密码子 Termination	间隔序列 Intergenic sequence
cox1	1	1537	1537	512	GTG	T	1
trnG	1537	1590	54				-1
trnQ	1591	1655	65				0
trnY	1661	1710	50				5
rrnL	1711	2476	766				0
trnL1	2477	2535	59				0
nad6	2570	3034	525	174	ATT	TAG	34
trnD	3040	3090	51				5
trnS2	3152	3207	56				61
atp6	3210	3740	531	176	GTG	TAA	2
nad3	3741	3993	253	84	ATG	T	0
trnW	4070	4117	48				76
trnV	4115	4169	55				-3
NCR1	4170	4409	240				0
trnT	4410	4456	47				0
NCR2	4457	4661	205				0
trnK	4662	4716	55				5
nad4L	4756	5043	288	95	ATT	TAG	39
nad4	5058	6264	1207	402	TTG	T	14
trnH	6278	6335	58				13
nad5	6341	7912	1572	523	TTG	TAA	5
trnL2	7913	7961	49				0
trnP	7961	8021	61				-1
cob	8021	9112	1092	363	GTG	TAA	-1
nad1	9113	9884	772	257	GTG	T	0
trnI	9882	9931	50				-3
NCR3	9932	10050	119				0
trnS1	10051	10115	65				0
NCR4	10116	10237	122				0
trnE	10238	10295	58				0
trnM	10302	10360	59				6
rrnS	10361	10947	587				0
trnF	10948	11000	53				0
cox2	11011	11610	600	199	TTG	TAA	10
trnC	11609	11659	51				-2
cox3	11678	12392	715	238	GTG	T	18
trnA	12396	12455	60				3
trnR	12455	12507	53				-1
trnN	12509	12558	50				1
nad2	12567	13391	825	274	ATC	TAA	8

注: 不包括终止密码子, nt=核苷酸, aa=氨基酸

Note: Stop codons were not included, nt = nucleotide, aa = amino acid

表 4 强壮粗体虫线粒体基因组核苷酸组成分析
Tab. 4 Nucleotide composition of the mitochondrial genome of *Hebesoma violentum*

核苷酸 Nucleotide	长度 Length (bp)	核苷酸含量 Nucleotide percentage					
		A	C	T	G	A+T	G+C
Entire sequence	13393	21.1	12.1	38.3	28.5	59.4	40.6
Protein coding sequence	9831	19.2	11.2	40.4	29.2	59.6	40.4
Condon position*							
1 st	3277	22.1	10.7	33.0	34.2	55.1	44.9
2 nd	3277	13.8	14.8	49.1	22.3	62.9	37.1
3 rd	3277	22.2	10.4	37.0	30.4	59.2	40.8
Ribosomal RNA genes sequence	1353	28.7	13.3	31.2	26.8	59.9	40.1
Transfer RNA genes sequence	1147	23.1	12.2	36.1	28.6	59.2	40.8
Non-coding region 1	240	33.7	16.7	24.2	25.4	57.9	42.1
Non-coding region 2	205	17.6	10.2	37.6	34.6	55.2	44.8

注:终止密码子除外

Note: Termination codons were excluded

表 5 强壮粗体虫线粒体基因组 12 个蛋白编码基因密码子组成及使用频率分析

Tab. 5 Genetic code and codon usage for the 12 mitochondrial protein coding genes of *Hebesoma violentum*

Codon	AA	No.	%	Codon	AA	No.	%
TTT	Phe	211	6.43	TAT	Tyr	95	2.89
TTC	Phe	35	1.07	TAC	Tyr	34	1.04
TTA	Leu	172	5.24	TAA	*	5	0.15
TTG	Leu	196	5.97	TAG	*	2	0.06
CTT	Leu	59	1.80	CAT	His	30	0.91
CTC	Leu	15	0.46	CAC	His	9	0.27
CTA	Leu	52	1.58	CAA	Gln	10	0.30
CTG	Leu	44	1.34	CAG	Gln	17	0.52
ATT	Ile	102	3.11	AAT	Asn	36	1.10
ATC	Ile	26	0.79	AAC	Asn	14	0.43
ATA	Met	86	2.62	AAA	Lys	38	1.16
ATG	Met	100	3.05	AAG	Lys	29	0.88
GTT	Val	191	5.82	GAT	Asp	41	1.25
GTC	Val	41	1.25	GAC	Asp	14	0.43
GTA	Val	111	3.38	GAA	Glu	27	0.82
GTG	Val	169	5.15	GAG	Glu	57	1.74
TCT	Ser	97	2.95	TGT	Cys	46	1.40
TCC	Ser	36	1.10	TGC	Cys	13	0.40
TCA	Ser	29	0.88	TGA	Trp	36	1.10
TCG	Ser	23	0.70	TGG	Trp	66	2.01
CCT	Pro	33	1.00	CGT	Arg	17	0.52
CCC	Pro	15	0.46	CGC	Arg	6	0.18
CCA	Pro	12	0.37	CGA	Arg	6	0.18
CCG	Pro	10	0.30	CGG	Arg	7	0.21
ACT	Thr	41	1.25	AGT	Ser	59	1.80
ACC	Thr	13	0.40	AGC	Ser	18	0.55
ACA	Thr	26	0.79	AGA	Ser	42	1.28
ACG	Thr	14	0.43	AGG	Ser	81	2.47
GCT	Ala	58	1.77	GGT	Gly	95	2.89
GCC	Ala	17	0.52	GGC	Gly	36	1.10
GCA	Ala	33	1.00	GGA	Gly	47	1.43
GCG	Ala	27	0.82	GGG	Gly	157	4.78

注:*为终止密码子

Note: *Stop (termination) codon

(DHU)臂及 pseudouridine(T Ψ C)臂, *trnR*、*trnQ*、*trnF*、*trnS1*、*trnV* 缺失 DHU 臂, 剩余的 12 tRNAs 缺失 T Ψ C 臂。强壮粗体虫 tRNA 的这些特征与其他已报道的棘头虫, 如似瘦棘吻虫和 *O. luehei* 的 tRNA 具有相似的特征。

强壮粗体虫的 *rrnL*、*rrnS* 的长度分别为 766 bp、587 bp, AT 含量分别为 61.6%、57.8%。*rrnL* 位于 *trnL1* 与 *trnY* 之间, 这与隐藏新棘虫、*P. ambiguus*、似瘦棘吻虫、*O. luehei* 完全相同, 而与猪巨吻棘头虫的不同, 其 *rrnL* 位于 *trnY*、*trnL2* 之间。*rrnS* 位于 *trnM*、*trnF* 之间, 这与 *O. luehei*、*P. ambiguus* 和猪巨吻棘头虫完全相同, 而与似瘦棘吻虫、隐藏新棘虫不同, 其位于 *trnS1*、*trnF* 之间。

2.4 非编码区

强壮粗体虫非编码区(Non-coding region, NCR)总长度为 988 bp, 包括 21 个非编码区, 每个非编码区的长度从 1—240 bp 不等。其中有 2 个非编码区较大, NCR1 大小为 240 bp, 位于 *trnV*、*trnT* 间; NCR2 大小为 205 bp, 位于 *trnT*、*trnK* 之间。NCR1、NCR2 的 AT 含量分别为 57.9%、55.2% (表 4)。

2.5 基因排列顺序及系统发育分析

线粒体基因组的基因排列顺序相对比较保守, 比较不同基因间的排列顺序可以作为评价后生动物间亲缘关系的一种辅助工作^[20]。已报道的棘头虫线粒体基因组中的基因有重排现象, 这在其他后生动物中也有报道^[21]。比较强壮粗体虫、隐藏新棘虫、似瘦棘吻虫、*O. luehei*、*P. ambiguus*、猪巨吻棘头虫这 6 种不同棘头虫线粒体基因组之间的基因排列顺序, 发现强壮粗体虫与隐藏新棘虫有 5 个 tRNA

(*trnT*、*trnK*、*trnE*、*trnS1*、*trnM*)发生重排。隐藏新棘虫与似瘦棘吻虫线粒体基因组基因排列顺序完全相同。似瘦棘吻虫与 *O. luehei* 有两处相邻的 tRNA 位置发生了位置交换, 它们分别是 *trnK*、*trnV* 及 *trnS1*、*trnM*。*O. luehei* 与 *P. ambiguus* 的基因排列顺序除 *trnS2* 位置不同外, 其余完全相同。*O. luehei* 与猪巨吻棘头虫有 6 个基因发生了重排, 它们分别是: *trnL1*、*trnL2*、*trnS1*、*trnS2*、*trnK*、*trnV*。

利用 44 种动物的线粒体基因组中 9 个蛋白编码基因氨基酸序列, 构建系统发育树, 以刺胞动物门的 *M. annulari* 为外类群。发现棘头动物门的种类聚为一枝, 具有较高的支持率, BI 的支持率分别 1.00 BPP (图 2)。从系统发育树上可以看出, 始新棘头虫纲的强壮粗体虫与 *P. ambiguus* 首先聚为一枝, 节点支持率为 1.00 BPP, 然后再与隐藏新棘虫聚在一起, 节点支持率为 1.00 BPP。始新棘头虫纲的种类与古棘头虫纲的似瘦棘吻虫聚为一枝, 节点支持率为 1.00 BPP。原棘头虫纲的猪巨吻棘头虫、*O. luehei* 聚为一枝, 节点支持率为 1.00 BPP, 这一枝与其他棘头虫聚为一大枝。Bdelloidea 纲的 7 个不同种类聚为一枝, 节点支持率为 1.00 BPP, Monogononta 纲的 3 个不同物种聚为一枝, 节点支持率为 1.00 BPP。棘头虫首先与双巢类轮虫聚为一类, 再与单巢类轮虫聚在一起, 共同组成轮形动物门(图 2)。

3 讨论

本研究通过强壮粗体虫线粒体基因组全序列的测定, 并通过系统发育分析, 研究了强壮粗体虫与其他棘头虫, 以及棘头虫与轮虫不同类群之间的亲缘关系。

强壮粗体虫与已报道的其他棘头虫, 即隐藏新棘虫、*P. ambiguus*、似瘦棘吻虫、猪巨吻棘头虫、*O. luehei*, 在线粒体基因组基因的组成及蛋白编码基因排列顺序方面具有一致性。强壮粗体虫线粒体基因组的 36 个基因包含 12 个编码基因、22 个 tRNA、2 个核糖体 RNA, 所有这些基因均由同一条链、按同一方向转录, 这与多数后生动物线粒体基因组的基因均由 2 条链、按 2 个方向转录不同^[22]。强壮粗体虫完整线粒体基因组全长 13393 bp, AT 含量为 59.4%, 均小于已报道的 4 个棘头虫线粒体基因组全长

(13574—14281 bp)及 AT 含量(60.2%—71.46%)^[12—14, 19]。

强壮粗体虫线粒体基因组 12 个蛋白编码基因的起始、终止密码子与已报道的棘头虫具有相似的特征。*nad4*、*nad5*、*cox2* 起始密码子为 TTG, *nad6*、*nad4L* 起始密码子为 ATT, *cox1*、*atp6*、*cob*、*nad1*、*cox3* 起始密码子为 GTG, *nad3*、*nad2* 的起始密码子分别为 ATG、ATC。12 个蛋白编码基因中共有 7 个利用完整密码子作为终止子, 这包括 *nad6*、*nad4L* 为 TAG, *atp6*、*nad5*、*cob*、*cox2*、*nad2* 为 TAA, 另外 5 个基因利用非完整密码子 T 为终止子。非完整密码子为终止子这种现象在其他已报道的棘头虫中亦有报道, 如似瘦棘吻虫线粒体基因组中的 *cox1*、*nad1*、*nad4*、*nad5*、*cob* 均以 T 为终止子^[12], *O. luehei* 线粒体基因组中的 *cox1*、*cox3*、*nad5* 以 T 为终止子, *nad6*、*cob* 以 TA 为终止子^[13], 隐藏新棘虫线粒体基因组中 *cox1*、*cox3*、*atp6*、*nad4*、*nad4L*、*nad1* 以 T 为终止子^[19]。

强壮粗体虫与已报道的 5 种棘头虫线粒体基因组的蛋白编码基因及核糖体基因排列顺序完全相同, 而部分 tRNA 排列顺序有所不同。主要表现为 *trnK* 与 *trnV* 及 *trnS1* 与 *trnM* 在某些种类上发生位置互换, 而 *trnE*、*trnS2*、*trnL1*、*trnL2* 在一些种类中位置有所不同。

近年来, 由于一些轮虫的线粒体基因组序列信息的发布^[14, 17, 23, 24], 这使得分析棘头虫与轮虫的亲缘关系成为可能。但一些种类的轮虫线粒体基因组缺失部分蛋白编码基因^[17], 仅有 9 个蛋白编码基因可用于系统发育分析。分析表明, 棘头虫与双巢类轮虫亲缘关系更近, 它们聚为一枝后, 再与单巢类轮虫聚在一起, 且有很高的节点支持率。这与利用 16S rRNA、18S rRNA、28S rRNA^[3]及线粒体基因或基因组^[4, 12—14, 24]的研究结果相符。但是, 通过包括一种棘头虫和一种轮虫在内的冠轮动物线粒体基因组构建系统发育树^[25], 分析棘头虫与轮虫的亲缘关系时, 研究结果并不支持棘头虫与轮虫聚为一枝, 这也可能是样本量较少的原因。通过蛋白编码基因构建系统发育树, 表明棘头虫与双巢类轮虫亲缘关系较近, 且有很高的节点支持率, 且棘头虫这一枝嵌入双巢类轮虫和单巢类轮虫这两个分枝之间。由于轮虫动物门分为三个纲: 双巢纲、单巢纲、尾盘纲。因此, 在今后的研究中, 需要更多的轮虫样本, 尤其是尾盘类轮虫, 以彻底解决棘头虫与轮虫不同纲

之间的亲缘关系。

通过本研究可以发现, 始新棘头虫与古棘头虫纲亲缘关系紧密, 能聚为一枝, 然后再与原棘头虫聚在一起, 这与其他学者利用线粒体基因组的研究结论相符^[13,14]。通过 18S rRNA^[26]及形态特征^[6]研究, 均支持始新棘头虫与古棘头虫是姊妹群。然而, 一些学者通过 18S rRNA、SSU、LSU rDNA、cox1^[2, 27]等分子标记研究, 发现多棘头虫纲与始新棘头虫亲缘关系紧密, 能聚为一枝。目前由于缺乏多棘头虫纲种类的线粒体基因组数据, 多棘头虫纲与其他棘头虫纲间的亲缘关系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Sørensen M V, Giribet G. A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **40**(2): 585—608
- [2] García-Varela M, Nadler S A. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **40**(1): 61—72
- [3] Witek A, Herlyn H, Meyer A, *et al.* EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, **8**(1): 345
- [4] Fontaneto D, Jondelius U. Broad taxonomic sampling of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I does not solve the relationships between Rotifera and Acanthocephala [J]. *Zoologischer Anzeiger*, 2011, **250**(1): 80—85
- [5] Amin O M. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala, with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida) [J]. *Journal of Parasitology*, 1987, **73**(6): 1216—1219
- [6] Monks S. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters [J]. *Systematic Parasitology*, 2001, **48**(2): 81—116
- [7] Near T J. Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, **42**(3): 668—677
- [8] García-Varela M, Nadler S A. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences [J]. *Journal of Parasitology*, 2005, **91**(6): 1401—1409
- [9] Perrot-Minnot M J. Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) [J]. *International Journal for Parasitology*, 2004, **34**(1): 45—54
- [10] Passamanek Y, Halanych K M. Lophotrochozoan phylogeny assessed with LSU and SSU data: evidence of lophophorate polyphyly [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **40**(1): 20—28
- [11] Abascal F, Posada D, Zardoya R. The evolution of the mitochondrial genetic code in arthropods revisited [J]. *Mitochondrial DNA*, 2012, **23**(2): 84—91
- [12] 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]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, **60**(6): 706—715
- [13] Gazi M, Sultana T, Min G S, *et al.* The complete mitochondrial genome sequence of *Oncicola luehei* (Acanthocephala: Archiacanthocephala) and its phylogenetic position within Syndermata [J]. *Parasitology International*, 2012, **61**(2): 307—316
- [14] Weber M, Wey-Fabrizius Alexandra R, Podsiadlowski L, *et al.* Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggests secondary loss of sense organs [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, **66**(1): 182—189
- [15] Xie H X, Gao Q, Nie P. Intestinal pathology of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* infected naturally with the acanthocephalan *Hebesomea violentum* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 137—141 [谢海侠, 高谦, 聂品. 强壮粗体虫寄生引起的鳃肠道病理. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 137—141]
- [16] YU Y, Wu H S. Studies on the fauna of acanthocephala of fishes from middle reaches of the ChangJiang (Yangtze) River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1989, **13**(1): 38—50 [余仪, 伍惠生. 长江中游鱼类寄生棘头虫区系的研究. 水生生物学报, 1989, **13**(1): 38—50]
- [17] Lasek-Nesselquist E. A mitogenomic re-evaluation of the bdelloid phylogeny and relationships among the syndermata [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(8): e43554
- [18] Romero H, Zavala A, Musto H. Codon usage in *Chlamydia trachomatis* is the result of strand-specific mutational biases and a complex pattern of selective forces [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**(10): 2084—2090
- [19] Pan T S, Nie P. The complete mitochondrial genome of *Pallisentis celatus* (Acanthocephala) with phylogenetic analysis of acanthocephalans and rotifers [J]. *Folia Parasitologica*, 2013, **60**(3): 181—191
- [20] Park J K, Sultana T, Lee S H, *et al.* Monophyly of clade III nematodes is not supported by phylogenetic analysis of complete mitochondrial genome sequences [J]. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 392
- [21] Stach T, Braband A, Podsiadlowski L. Erosion of phylogenetic signal in tunicate mitochondrial genomes on different levels of analysis [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, **55**(3): 860—870
- [22] Gissi C, Iannelli F, Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species [J]. *Heredity*, 2008, **101**(4): 301—320

- [23] Suga K, Welch D B M, Tanaka Y, *et al.* Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**(6): 1129—1137
- [24] Min G S, Park J K. Eurotatorian paraphyly: Revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata) [J]. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 533
- [25] Podsiadlowski L, Braband A, Struck T H, *et al.* Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea [J]. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 364
- [26] Near T J, Garey J R, Nadler S A. Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, **10**(3): 287—298
- [27] García-Varela M, Cummings M P, Pérez-Ponce de León G, *et al.* Phylogenetic analysis based on 18S ribosomal RNA gene sequences supports the existence of class Polyacanthocephala (Acanthocephala) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, **23**(2): 288—292

THE CLONING OF THE MITOCHONDRIAL GENOME OF *HEBESOMA VIOLENTUM*(ACANTHOCEPHALA) AND THE PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ACANTHOCEPHALANS

PAN Ting-Shuang¹ and NIE Pin²

(1. Fisheries Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The acanthocephalan *Hebesoma violentum* Van Cleave was collected from the intestine of *Siniperca chuatsi* Basilewsky, which were captured in the Liangzi Lake of Hubei Province, China. Using long PCR we cloned the entire mitochondrial (mt) genome sequence of *H. violentum*(13,393 bp) (GenBank accession No. KC415004). The genome consists of 36 genes including 12 protein-coding genes, 22 transfer RNAs (tRNAs) and 2 ribosomal RNAs (rRNAs), which was consistent with previous reports about mt genomes of other acanthocephalan species. All genes in the mt genome were encoded on one strand and transcribed in the same direction. The phylogenetic analysis of the mt genomes of acanthocephalans, rotifers and others indicated that the class Eoacanthocephala, containing *Pallisentis celatus* Van Cleave, *Hebesoma violentum* Van Cleave and *Paratenuisentis ambiguus* Van Cleave, was closely related to Palaeacanthocephala which was then correlated with the class Archiacanthocephala. It is obvious that acanthocephalans are closely related to a clade containing bdelloids which were then correlated with the clade containing monogononts. Further phylogenetic analysis of rotifers in the Seisonidea and acanthocephalans in the Polyacanthocephala will provide insights into the phylogenetic relationship between the major taxa of rotifers and/or acanthocephalans, as well as between these two groups.

Key words: Acanthocephala; *Hebesoma violentum*; Mitochondrial genome; Phylogeny; Rotifera