

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.05.002

黄鳝胃瘤线虫线粒体 *cox1* 基因的多态性研究^①

黄汉成¹, 王芝英², 林洁^{2,3},
马光旭², 朱宏宏², 周荣琼²

1. 西南大学(荣昌校区)动物科学系, 重庆 荣昌 402460; 2. 西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460;
3. 四川省达州市动物疫病预防控制中心, 四川 达州 635000

摘要: 为了解渝西地区黄鳝胃瘤线虫分离株线粒体细胞色素 C 氧化酶第 I 亚基(*cox1*)的遗传变异情况及其他科线虫的种群遗传关系, 本研究对该地区黄鳝胃瘤线虫 *cox1* 部分序列进行了克隆测序和进化分析. 结果表明渝西地区 6 株胃瘤线虫分离株的 *cox1* 序列长度一致, 均为 441 bp; 各分离株之间的相似性为 97.5%~100%. 种系发育树表明, 6 个胃瘤线虫分离株均位于同一分枝. 由于胃瘤线虫 *cox1* 序列种内相对保守, 种间差异较大, 故可作为种间遗传变异研究的标记. 本研究结果为胃瘤线虫的分类鉴定以及进一步的分子流行病学调查和群体遗传研究奠定了基础.

关键词: 胃瘤线虫; 线粒体 DNA; *cox1* 基因; 种系发育关系

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0007-06

胃瘤线虫 *Eustrongylides* spp. 隶属于膨结科 Diotrophmidae 胃瘤线虫属 *Eustrongylides*, 是黄鳝体内常见的寄生虫. 胃瘤线虫多数寄生在黄鳝的中肠, 呈聚集分布, 幼虫为优势虫种^[1]. 其中较多且较大的虫体以包裹形式存在, 一般情况下 1 个包裹内只有 1 条线虫. 少部分较小的虫体依附在中后肠或肠系膜的外表面生存, 且不结囊. 一些更小的虫体则单独寄生在消化道内^[2]. 淡水螺类和鱼类、黄鳝等可能分别为其第一中间宿主和第二中间宿主, 白鸢、夜鸢等水鸟则可能是其终末宿主^[3-5]. 黄鳝中寄生的均为胃瘤线虫的幼虫, 对养殖业造成不同程度的危害.

线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)具有相对分子质量小、结构简单、进化速度快、无组织特异性、突变率高、碱基误配率高、缺乏修复机制、系母性遗传等优点, 是研究动物分子系统学和种群遗传学最常用的分子标记^[6-8]. 细胞色素氧化酶基因是 mtDNA 编码多肽的基因, 常作为研究寄生虫种内及种间遗传变异情况的标记, 是鉴别寄生虫常用的分子标记之一^[9-11]. 本研究对黄鳝胃瘤线虫线粒体基因细胞色素 C 氧化酶第 I 亚基(*cox1*)部分序列的遗传变异情况进行研究, 构建胃瘤线虫的种群遗传变异关系, 从而明确黄鳝胃瘤线虫线粒体 *cox1* 基因部分序列能否成为理想的种间遗传标记.

1 材料和方法

1.1 样本来源

分别在渝西地区的荣昌、永川、大足、江津、双桥和璧山等 6 个采样点采集虫体样本, 并进行胃瘤线虫的形态学鉴定(表 1).

① 收稿日期: 2015-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172313).

作者简介: 黄汉成(1969-), 男, 广东高州人, 讲师, 主要从事动物生物学研究.

通信作者: 周荣琼, 教授.

表 1 胃瘤线虫样品来源

样本编码	样本来源	发育阶段	宿 主
<i>E. sp.</i> -RC isolate	重庆荣昌	幼虫	黄鳝
<i>E. sp.</i> -YC isolate	重庆永川	幼虫	黄鳝
<i>E. sp.</i> -DZ isolate	重庆大足	幼虫	黄鳝
<i>E. sp.</i> -JJ isolate	重庆江津	幼虫	黄鳝
<i>E. sp.</i> -SQ isolate	重庆双桥	幼虫	黄鳝
<i>E. sp.</i> -BS isolate	重庆璧山	幼虫	黄鳝

1.2 主要试剂

PCR 试剂(Buffer, MgCl₂, dNTPs 等)、rTaq 酶、pMDTM19-T Vector、DL2000 DNA Marker、琼脂糖、Amp、X-gal、IPTG 购自大连宝生物公司; 酵母浸出粉(Yeast extract)、胰蛋白胨(Tryptone)购自 Oxiod 公司; EasyPureTM Quick Gel Extraction Kit DNA 胶回收试剂盒购自 TransGen Biotech 公司; 蛋白酶 K 购自 Merk 公司; 重组质粒 WizardTM Plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒购自 Promaga 公司; DH5 α 感受态细胞实验室制备保存。

1.3 样本 DNA 的提取

从 70% 酒精中取出单个虫体, 用双蒸水反复吹打冲洗 2 次后, 再用纯净水反复冲洗 2~3 次, 置于新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 用灭菌的眼科剪将虫体组织剪碎, 加入 270 μ L 的 SDS 裂解液(包括 30 μ L 100 mmol/L Tris-Cl(pH=8.0), 60 μ L 500 mmol/L NaCl 溶液, 150 μ L 50 mmol/L EDTA (pH=8.0), 30 μ L 10% SDS)和 30 μ L 50 μ g/ μ L 蛋白酶 K, 充分混匀, 放于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中消化 12~48 h. 采用酚/氯仿法抽提样本 DNA, 提取出的 DNA 样品分装后, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.4 PCR 扩增

以 Bowles 等^[12]报道的一对保守引物 JB3 和 JB4 作为扩增胃瘤线虫线粒体 *cox1*, 其序列为上游引物 JB3: 5'- TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' (24 bp), 下游引物 JB4.5: 5'-TAAAGAAAGAA-CATAATGAAAATG-3'(24 bp), 预期扩增片段大小约为 450 bp. 引物由上海生工生物技术公司进行合成, 使用时加灭菌超纯水进行稀释, 其稀释度为 10 pmol/ μ L, 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

反应体系为 25 μ L, 其中 2.5 μ L 10 \times PCR buffer(不含 Mg²⁺), 2.0 μ L dNTPs(2.5 μ mol/L), 3 μ L Mg²⁺(25 mmol/L), 0.5 μ L 上游引物 JB3(10 μ mol/L), 0.5 μ L 下游引物 JB4.5(10 μ mol/L), 2.0 μ L 模板 DNA, 0.2 μ L rTaq 酶(5 U/ μ L), 灭菌双蒸水 14.3 μ L. 反应在 Biometra 循环反应仪上进行. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 取 5 μ L PCR 产物在 10 g/L TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR 产物的克隆

按 DNA 胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物, 然后进行 pMDTM19-T 载体与 PCR 产物的连接. 在微量离心管中依次加入 1 μ L pMDTM19-T Vector 载体, 5 μ L Ligation Solution I, 1 μ L ddH₂O, 3 μ L PCR 纯化产物, 混匀, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱连接过夜. 将上述连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 Amp, IPTG 和 X-gal 的 LB 琼脂平板中, 于恒温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h.

1.6 测序及序列分析

筛选阳性克隆进行 PCR 鉴定, 送菌液到上海生工生命技术公司测序, 测序结果经过 BLAST 比对后用 DNASTAR 5.0 软件 EditSeq 程序对基因的核苷酸序列进行基本分析. 从 GenBankTM检索并下载相关 *cox1* 序列, 应用 Clustal X 1.83 软件进行比对; 为了比较测序所得序列与参照序列的遗传差异, 采用 DNASTAR 5.0 软件中的 MegAlign 程序进行相似性分析及 MEGA 4.0 软件中的邻接法(Neighbour-joining, NJ 法)构建系统进化树, 进化树的可靠性用 Bootstrap 进行分析, 共 1 000 个重复。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 与 DL2000 DNA Marker 进行比较, 在约 450 bp 处可见相

应条带, 与预期片段长度相符合, 无非特异性条带, 空白对照为阴性, 结果见图 1.

2.2 胃瘤线虫 *cox1* 基因 PCR 产物的克隆及鉴定

将 6 个样品纯化的 PCR 产物克隆到 pMDTM19-T Vector 载体中, 每个样品取 4 个白色菌落和一个蓝色菌落进行 PCR 鉴定, 结果白色的 4 个均为阳性, 蓝色的为阴性. 其中各取 1 个阳性样品为代表, 结果见图 2.

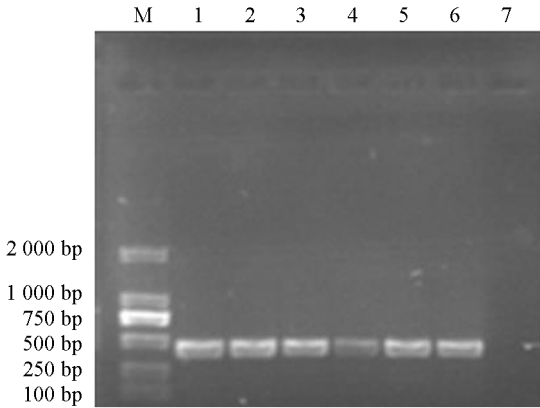


图 1 胃瘤线虫 *cox1* 基因的 PCR 扩增结果
M. 2 000 bp DNA 相对分子质量标准; 1. *E. sp.* -RC isolate; 2. *E. sp.* -DZ isolate; 3. *E. sp.* -YC isolate; 4. *E. sp.* -SQ isolate; 5. *E. sp.* -BS isolate; 6. *E. sp.* -JJ isolate; 7. 阴性对照.

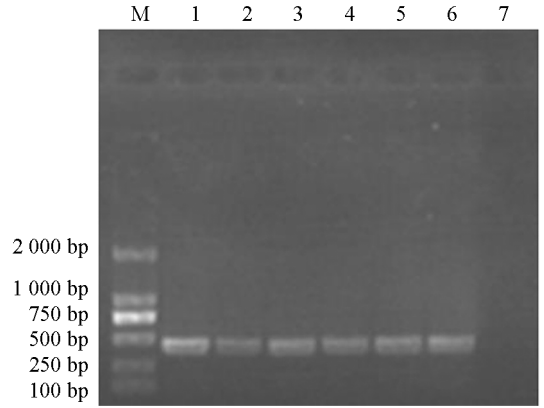


图 2 胃瘤线虫重组质粒的 PCR 鉴定
M. 2 000 bp DNA 相对分子质量标准; 1. *E. sp.* -RC isolate; 2. *E. sp.* -DZ isolate; 3. *E. sp.* -YC isolate; 4. *E. sp.* -SQ isolate; 5. *E. sp.* -BS isolate; 6. *E. sp.* -JJ isolate; 7. 阴性对照.

图 1 胃瘤线虫 *cox1* 基因的 PCR 扩增结果

图 2 胃瘤线虫重组质粒的 PCR 鉴定

2.3 测序结果及分析

将经过菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送至上海生工生命技术公司进行序列测定, 结果显示由 JB3 和 JB4.5 为引物扩增渝西 6 个地区胃瘤线虫的 *cox1* 基因, 其片段大小均为 441 bp. 对 6 个不同区县胃瘤线虫的 *cox1* 基因序列进行了种内比较, 结果显示胃瘤线虫所测的 *cox1* 基因片段的碱基 T 含量最高, 为 39.00%~40.36%; 碱基 C 含量最低, 为 11.79%~12.93%, A+T 含量为 59.18%~60.09%; G+C 含量为 39.31%~40.82%(表 2).

表 2 胃瘤线虫线粒体 DNA *cox1* 基因片段的碱基含量

样本来源	A 含量	G 含量	T 含量	C 含量	%
RC	19.73	28.12	40.36	11.79	
DZ	19.73	28.12	40.36	11.79	
YC	20.18	27.89	39.00	12.93	
SQ	19.73	28.12	40.14	12.02	
BS	19.73	28.12	40.36	11.79	
JJ	19.73	27.89	40.14	12.24	

2.4 胃瘤线虫 *cox1* 基因序列的相似性及种系发育进化树分析

运用 DNASTAR 5.0 和 MEGA 4.0 软件将本次所测得的序列与从 GenBank 中检索下载的其他 12 个基因序列进行相似性对比分析, 构建种系发育进化树. 这些序列分别是中国 *Contracaecum ogmorhini* (序列号: AJ616895, AJ616897, AJ616898, AJ616899, AJ616900)、中国 *Toxocara canis* (序列号: AJ920056, AJ920062)、美国 *Leptorhynchoides thecatus* (序列号: AY690564)、中国 *Pallisentis celatus* (序列号: JQ943583)、以色列 *Desmaptsamma anchorata* (序列号: HE591461)、美国 *Adineta uage* (序列号: JX184001)、美国 *Uityazicrinus sp.* (序列号: GU327847).

对本次所测得的 6 株序列中的 *cox1* 基因序列联机 BLAST, 应用 MegAlign 程序进行相似性分析(图 3). 渝西地区各分离株之间相应序列的相似性为 97.5%~100%; 与 GenBank 中下载的中国 *C. ogmorhini* (序列号: AJ616898) 的相似性最高为 70.5%; 与美国 *L. thecatus* (序列号: AY690564) 相似性最低为 28.1%.

用 MEGA4.0 的 NJ 法构建的种系发育进化树显示(图 4), 代表性的 6 株渝西地区分离株都在同一大分支上, 系统发生树中的 Bootstrap 值较高. 与中国 *T. canis* (AJ920062) 关系最相近, 与美国 *L. thecatus*

(AY690564)和 *U. sp.* (GU327847)的序列分支相隔较远.

		相似性百分率																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
异质性百分率	1	100.0	97.7	100.0	99.3	98.2	70.1	70.1	70.5	69.8	70.3	70.1	69.6	28.6	27.2	31.1	29.9	30.4	1		
	2	0.0	100.0	97.7	100.0	99.3	98.2	70.1	70.1	70.5	69.8	70.3	70.1	69.6	28.6	27.2	31.1	29.9	30.4	2	
	3	2.3	2.3	100.0	97.7	97.1	96.8	70.7	70.3	70.7	70.1	70.5	69.8	69.6	28.1	26.5	30.8	30.4	30.2	3	
	4	0.0	0.0	2.3	100.0	99.3	98.2	70.1	70.1	70.5	69.8	70.3	70.1	69.6	28.6	27.2	31.1	29.9	30.4	4	
	5	0.7	0.7	3.0	0.7	100.0	97.5	69.6	69.6	70.1	69.4	69.8	69.8	69.4	28.8	27.7	30.8	29.7	30.2	5	
	6	1.8	1.8	3.3	1.8	2.6	100.0	69.4	69.4	69.8	69.2	69.6	69.2	68.9	27.9	27.2	30.8	29.7	29.7	6	
	7	38.2	38.2	37.1	38.2	39.0	39.3	100.0	98.0	98.0	98.0	98.0	89.8	89.6	30.4	28.6	34.0	31.7	32.7	7	
	8	38.2	38.2	37.8	38.2	39.0	39.3	2.1	100.0	98.6	98.6	98.6	89.8	88.9	30.2	27.7	34.0	31.5	32.0	8	
	9	37.5	37.5	37.1	37.5	38.2	38.6	2.1	1.4	100.0	98.6	99.1	89.8	89.3	30.2	28.1	34.2	31.7	32.4	9	
	10	38.6	38.6	38.2	38.6	39.3	39.7	2.1	1.4	1.4	100.0	98.6	89.3	89.1	29.9	27.4	34.2	31.7	32.2	10	
	11	37.8	37.8	37.5	37.8	38.6	39.0	2.1	1.4	0.9	1.4	100.0	89.8	89.3	29.9	28.3	33.8	31.7	32.4	11	
	12	38.2	38.2	38.6	38.2	38.6	39.7	11.0	11.0	11.0	11.6	11.0	100.0	91.2	31.7	28.8	34.9	31.3	32.2	12	
	13	39.0	39.0	39.0	39.0	39.3	40.1	11.3	12.1	11.6	11.8	11.6	9.5	100.0	31.7	29.0	33.8	30.6	31.7	13	
	14	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	100.0	31.6	28.0	27.9	29.1	14	
	15	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	217.9	100.0	25.8	24.9	29.4	15
	16	193.9	193.9	194.9	193.9	196.2	194.9	160.9	160.4	158.7	158.7	162.1	152.2	162.5	350.0	350.0	100.0	31.0	33.7	16	
	17	206.7	206.7	202.7	206.7	209.8	208.9	180.7	183.4	180.9	180.9	180.9	198.0	200.2	202.8	350.0	197.4	100.0	30.3	17	
	18	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	190.4	192.2	188.7	190.4	188.7	187.7	350.0	350.0	350.0	169.6	181.2	100.0	18		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		

1: *E. sp.* -BS isolate; 2: *E. sp.* -DZ isolate; 3: *E. sp.* -RC isolate; 4: *E. sp.* -SQ isolate; 5: *E. sp.* -YC isolate; 6: *E. sp.* -JJ isolate; 7: AJ616895; 8: AJ616897; 9: AJ616898; 10: AJ616899; 11: AJ616900; 12: AJ920056; 13: AJ920062; 14: AY690564; 15: GU327847; 16: HE591461; 17: JQ943583; 18: JX184001.

图 3 渝西 6 地区胃瘤线虫与 GenBank 中检索的 12 种 *cox1* 基因的相似性对比分析

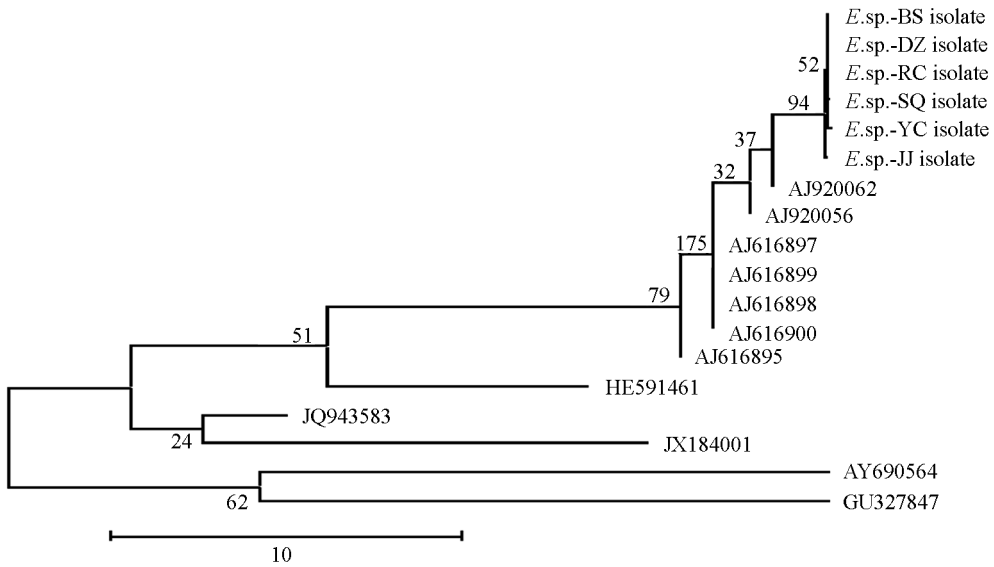


图 4 邻接法构建的胃瘤线虫 *cox1* 基因序列的种系发育进化树

3 讨论

随着分子生物学的发展,近年来应用 DNA 技术在寄生虫分子分类学和分子遗传学等方面的研究已取得很大进展.为了有效地防控寄生虫病,有必要对寄生虫虫株进行精确的分类和鉴定.传统的形态学鉴定对那些相似种或近缘种已很难进行区分,选择以基因为分子标记进行研究,则能获得比较满意的结果. DNA 技术是目前进行生物种群遗传变异、分类和分子种系发生等研究的主要手段之一^[13-16].对于研究亲缘关系较近类群的遗传结构,选取适当的 DNA 片段作为不同分类水平的研究材料已显得尤为重要,而 mtDNA 作为一种核外遗传物质,是真核细胞内较为简单的 DNA 分子,具有结构简单、进化速度快、极少

发生重组、无组织特异性、系母系遗传等特点, 也正是由于 mtDNA 的这些特点, 使之成为研究寄生虫系统进化的一种很好的分子标记。这样线粒体的一个基因就可以代表整个线粒体基因组的变异情况。在寄生虫的分类鉴定和群体遗传方面, 许多学者研究认为 *cox1* 基因序列可作为某些吸虫和线虫虫种、虫株特异的遗传标记^[11, 15, 17-20], 如细粒棘球绦虫 *Echinococcus granulosus*、内弯宫脂线虫 *Hysterothylacium aduncum*、肝片吸虫 *Fasciola hepatica* 和大片吸虫 *F. gigantica*、华支睾吸虫 *Clonorchis sinensis* 等。王凝等^[11]和 Ma 等^[17]分别对中国青藏高原地区 47 个和 521 个棘球绦虫分离株的 *cox1* 序列变异情况进行了研究, 结果显示王凝等^[11]的 47 个样品均被确定为细粒棘球绦虫 G1 基因型, 分为 10 个单倍型; 而 Ma 等^[17]的 521 个样本中的 177 个有变异位点, 检测到 105 个单倍型, 分属于 4 种棘球绦虫 *E. shiquicus*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* 和 *E. canadensis*。Wannasan 等^[15]利用线粒体和核糖体 DNA 对泰国的肝片吸虫和大片吸虫进行鉴定, 发现存在上述 2 种片形吸虫的中间种。Elliott 等^[20]对澳大利亚三氯苯咪唑耐药株、敏感株及田间分离株肝片吸虫的遗传多样性进行了研究, 发现其存在很高的遗传变异率, 其中利用 *cox1* 基因确定了 6 个单倍型。

本文对渝西地区 6 个区县黄鳝胃瘤线虫分离株 *cox1* 基因的遗传多态性进行了研究, 序列分析发现胃瘤线虫的 *cox1* 基因片段大小均为 441 bp, 其中 6 个分离株 *cox1* 基因片段的碱基 T 含量均最高, 而碱基 C 含量均最低。相似性分析表明, 渝西地区胃瘤线虫各分离株之间的相似性为 97.5%~100%, 与 GenBank 中下载的中国 *C. ogmorhini* 的相似性最高, 为 70.5%, 与美国 *L. thecatus* 相似性最低, 为 28.1%。说明渝西地区胃瘤线虫种内差异不明显, 而种间差异明显, 因此 *cox1* 可以进行黄鳝胃瘤线虫的种间鉴定。

种系发育进化树显示代表性的 6 株渝西地区胃瘤线虫分离株均都在同一大分支上, 系统发生树中的 Bootstrap 值较高, 与中国 *T. canis* 遗传距离最相近, 与美国 *L. thecatus* 和 *U. sp.* 的序列分支相隔较远, 表明渝西地区胃瘤线虫分离株与其他蛔虫所属分支相隔较远, 能够很好地得以鉴别, 因此线粒体 *cox1* 基因序列适合作为胃瘤线虫种间的遗传标记。本研究结果为黄鳝胃瘤线虫的分类鉴定及进一步的分子流行病学调查和群体遗传研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郇旭文, 夏冬. 江苏省黄鳝寄生虫感染的初步调查 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2004, 12(1): 59-61.
- [2] 王文彬, 王京仁, 曾伯平, 等. 黄鳝体内胃瘤线虫的种群生物学研究 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 535-539.
- [3] COYNER D F, SPALDING M G, FORRESTER D J. Epizootiology of *Eustrongylides ignotus* in Florida: Transmission and Development of Larvae in Intermediate Hosts [J]. Journal of Parasitology, 2003, 89(2): 290-298.
- [4] COYNER D F, SPALDING M G, FORRESTER D J. Epizootiology of *Eustrongylides ignotus* in Florida: Distribution, Density, and Natural Infections in Intermediate Hosts [J]. Journal of Wildlife Diseases, 2002, 38(3): 483-499.
- [5] XIONG F, WANG G T, WU S G, et al. Development of *Eustrongylides ignotus* (Nematoda: Dioctophmida) in Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos domestica* (L.)) [J]. Journal of Parasitology, 2009, 95(5): 1035-1039.
- [6] BLOUIN M S. Molecular Prospecting for Cryptic Species of Nematodes: Mitochondrial DNA Versus Internal Transcribed Spacer [J]. International Journal for Parasitology, 2002, 32(5): 527-531.
- [7] BOORE J L. Animal Mitochondrial Genomes [J]. Nucleic Acid Research, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [8] HU M, GASSER R B, ABS EL-OSTA Y G, et al. Structure and Organization of the Mitochondrial Genome of *Dirofilaria immitis* [J]. Parasitology, 2003, 127(Pt1): 37-51.
- [9] 伍慧兰, 庄远红, 黄文. 湖南省华支睾吸虫线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因的克隆及进化分析 [J]. 中国兽医科学, 2012, 42(1): 8-12.
- [9] WU H L, ZHUANG Y H, HUANG W. Cloning and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial *cox1* and *nad1* Genes of *Clonorchis sinensis* Isolates from Hunan Province [J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(1): 8-12.
- [10] 李淳, 李明伟, 刘国华, 等. 猬迭宫绦虫广东分离株线粒体 *pcox1* 基因的克隆及序列分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(8): 644-646.
- [11] 王凝, 古小彬, 汪涛, 等. 基于 *cox1* 基因对中国青藏高原地区细粒棘球绦虫遗传多态性的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(3): 453-460.
- [12] BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Genetic Variants Within the Genus *Echinococcus* Identified by Mitochondrial

DNA Sequencing [J]. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, 1992, 54(2): 165–174.

- [13] 伍慧兰, 谭美英, 刘国华, 等. 湖南省鸡蛔虫线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因的序列测定及种系发育分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(12): 1592–1597.
- [14] 林洁, 谭燕财, 马光旭, 等. 黄鳝胃瘤线虫 ITS 及 5.8S rDNA 的克隆及序列分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(9): 49–54.
- [15] WANNASAN A, KHOSITHARATTANAKOOL P, CHAIWONG P, et al. Identification of *Fasciola* Species Based on Mitochondrial and Nuclear DNA Reveals the Co-Existence of Intermediate *Fasciola* and *Fasciola gigantica* in Thailand [J]. *Experimental Parasitology*, 2014(146): 64–70.
- [16] 黄丽, 周荣琼, 林洁, 等. 重庆荣昌犬钩虫 ITS 及 5.8S rDNA 的克隆及序列分析 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 38(11): 95–100.
- [17] MA C Y, WANG H, LIN G H, et al. Surveillance of *Echinococcus isolates* from Qinghai, China [J]. *Veterinary Parasitology*, 2015, 207(1/2): 44–48.
- [18] KESKIN E, KOYUNCU C E, GENÇ E. Molecular Identification of *Hysterothylacium aduncum* Specimens Isolated from Commercially Important Fish Species of Eastern Mediterranean Sea Using mtDNA *cox1* and ITS rDNA Gene Sequences [J]. *Parasitology International*, 2015, 64(2): 222–228.
- [19] CHELOMINA G N, TATONOVA Y V, HUNG N M, et al. Genetic Diversity of the Chinese Liver Fluke *Clonorchis sinensis* from Russia and Vietnam [J]. *International Journal for Parasitology*, 2014, 44(11): 795–810.
- [20] ELLIOTT T, MULLER A, BROCKWELL Y, et al. Evidence for High Genetic Diversity of NAD1 and COX1 Mitochondrial Haplotypes Among Triclabendazole Resistant and Susceptible Populations and Field Isolates of *Fasciola hepatica* (Liver Fluke) in Australia [J]. *Veterinary Parasitology*, 2014, 200(1/2): 90–96.

Polymorphism of the Mitochondrial *cox1* Gene of *Eustrongylides* Spp. from *Monopterus Albus*

HUANG Han-cheng¹, WANG Zhi-ying², LIN Jie^{2,3},
MA Guang-xu², ZHU Hong-hong², ZHOU Rong-qiong²

1. Department of Animal Science, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China;
2. Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China;
3. Dazhou Animal Disease Control and Prevention Center, Dazhou Sichuan 635000, China

Abstract: The study was carried out to examine the genetic variations of the mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit 1 gene (*cox1*) among *Eustrongylides* spp. isolates of *Monopterus albus* in Western Chongqing area, and to investigate the phylogenetic relationship among other nematodes as well. Molecular cloning was performed to obtain the partial *cox1* sequence of each *E.* spp. sample, and the homology analysis of these sequences were conducted. The results showed the same length of *cox1* sequences (441 bp.) of 6 *E.* spp. isolates with similarity of 97.5%–100%. Phylogenetic analysis of these sequences showed that all *E.* spp. isolates were grouped into a single clade. There was significant discrepancy between inter-specific sequence and intra-specific sequence in terms of *cox1* sequence, suggesting *cox1* gene could be used as genetic marker for the specific identification. The result of this study provides scientific basis and theoretical reference on the molecular level and epidemiology survey of parasitic *Eustrongylides*.

Key words: *Eustrongylides* spp.; Mitochondrial DNA; cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene; phylogenetic relationship

