

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200226020

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

台灣海峽魚類絛蟲物種多樣性調查
及分子系統學初步研究

Investigation of Species diversity of Cestodes of Fishes in
Taiwan Strait and Preliminary Studies on Molecular
Phylogeny of Cestodes

周 霖

指導教師姓名: 楊 文 川 副 教 授

專 業 名 稱: 動 物 學

論 文 提 交 日 期: 2006 年 11 月 7 日

論 文 答 辯 日 期: 2006 年 12 月 31 日

學 位 授 予 日 期: 年 月 日

答 辯 委 員 會 主 席: 林宇光 教授

評 閱 人: _____

2006 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
前言.....	5
第一部分 台湾海峡鱼类绦虫物种多样性调查.....	8
I、材料方法.....	8
1. 材料获得.....	8
2. 绦虫的固定和保存.....	8
3. 永久玻片标本制作.....	8
4. 电镜实验材料准备.....	8
5. 光学显微镜观察.....	9
6. 电镜观察.....	9
7. 测量单位.....	9
8. 标本保存.....	9
II、结果.....	9
1. 日本副棘叶绦虫 (<i>Paraechinophallus japonicus</i> Yamaguti, 1934)	11
2. 细长副头槽绦虫 (<i>Parabothriocephalus gracilis</i> Yamaguti, 1934)	14
3. 刺鲳副头槽绦虫(<i>Parabothriocephalus psenopsis</i> Wang, 2004).....	17
4. 前孔绦虫新种 (<i>Anteropora xiamenensis</i> n.sp.)	21
5. 长节头槽绦虫 (<i>Cephalobothrium longisegmentum</i> Wang, 1984)	27
6. 巨首钩槽绦虫 (<i>Acanthobothrium grandiceps</i> Yamaguti, 1952)	32
7. 微钩钩槽绦虫 (<i>A. micracantha</i> Yamaguti, 1952)	35
8. 钩槽绦虫未定种 1 (<i>Acanthobothrium</i> sp.1)	38
9. 钩槽绦虫未定种 2 (<i>Acanthobothrium</i> sp.2)	41
10. 双裂花槽绦虫 (<i>Anthobothrium bifidum</i> Yamaguti, 1952)	48
11. 团扇螯对耳槽绦虫新属新种 (<i>Biotobothrium platyrhina</i> n.g.n.sp)	52
第二部分 绦虫分子系统学初步研究.....	56

I、目的基因的扩增及测序	56
1. 材料与amp;方法	56
1.1. 材料	56
1.1.1. 虫体获得	56
1.1.2. 主要试剂	56
1.1.3. 菌株和质粒	56
1.2. 基因组 DNA 提取	56
1.3. SSUrDNA 基因的扩增	57
1.4. DNA 纯化回收	58
1.5. 目的基因与载体 DNA 的连接	58
1.6. 连接产物的转化	59
1.7. 转化后细菌质粒 DNA 的提取	59
1.8. 阳性质粒酶切检验	60
1.9. 测序	61
2. 结果	61
II、13 种绦虫 SSUrRNA 基因系统进化树构建及亲缘关系分析	62
1 材料方法	62
1.1 序列来源	62
1.2 序列比对	63
1.3 系统进化树构建	63
2. 结果及讨论	64
3. 小结	66
参考文献	68
...	...

缩写语对照表

文本中出现：

AMP	氨苄青霉素
DNA	脱氧核糖核酸
DDW	双蒸水
EB	溴化乙锭
EDTA	乙二胺四乙酸
LB	Luria-Bertani 培养基
NJ	Neighbor-joining 邻接法
ML	Maximum likelihood 最大似然法
MP	Maximum parsimony 最大简约法
PCR	聚合酶链式反应
RNase	RNA酶
RNA	核糖核酸
SSUrRNA	小亚基核糖体RNA
TE	Tris-EDTA
dNTP	脱氧核糖核苷三磷酸
g, mg, μ g	克, 毫克, 微克
g(涉及离心力时)	离心力单位
hr, min, s	小时, 分钟, 秒
L, mL, μ L	升, 毫升, 微升
rDNA	核糖体DNA

rRNA 核糖体RNA

rpm 转/分

图版中出现:

Cp 阴茎囊

M 梅氏腺

Oc 接卵口

Od 输卵管

Os 渗透管

Ov 卵巢

T 睾丸

V 卵黄腺

Va 阴道

Vd 储精管

U 子宫

Ud 子宫管

摘要

目前世界上已报道的绦虫有 4000 余种，有近半数种类的绦虫寄生于鱼类。大量海洋鱼类尚未被调查，同时许多绦虫之间的系统发育关系亦尚不清楚。本文作者正是针对这些问题而开展研究的。全文共分为两部分：

第一部分：台湾海峡鱼类绦虫物种多样性调查。作者于 2003 年 4 月至 2005 年 3 月调查了厦门市场常见的海洋鱼类，对检获的绦虫进行仔细的光学显微镜形态观察结合扫描电镜照片比较鉴定。本文共描述 11 种，分别隶属于三个目，五个科，七个属。其中有两个种类，经作者形态比较鉴定它们为新种，并建议建立一新属来容纳其中一种。具体结果名录如下：

1. 日本副棘叶绦虫 (*Paraechinophallus japonicus* Yamaguti, 1934)
2. 细长副头槽绦虫 (*Parabothriocephalus gracilis* Yamaguti, 1934)
3. 刺鲳副头槽绦虫 (*Parabothriocephalus psenopsis* Wang, 2004)
4. 厦门前孔绦虫新种 (*Anteropora xiamenensis* n. sp.)
5. 长节头槽绦虫 (*Cephalobothrium longisegmentum* Wang, 1984)
6. 巨首钩槽绦虫 (*Acanthobothrium grandiceps* Yamaguti, 1952)
7. 微钩钩槽绦虫 (*Acanthobothrium micracantha* Yamaguti, 1952)
8. 钩槽绦虫未定种 1 (*Acanthobothrium* sp.1)
9. 钩槽绦虫未定种 2 (*Acanthobothrium* sp.2)
10. 双裂花槽绦虫 (*Anthobothrium bifidum* Yamaguti, 1952)
11. 团扇鲛对耳槽绦虫新属新种 (*Biotobothrium platyrhina* n. g. n. sp.)

第二部分：绦虫分子系统学的初步研究。先提取厦门前孔绦虫新种的 DNA，

后 PCR 扩增 SSUrRNA 基因，将扩增基因克隆进质粒后测序。目前，前孔科绦虫 DNA 序列还未见报道。将该序列加入 12 种来自 8 个目，12 个属的绦虫 SSUrRNA 基因序列进行序列比对排序，然后使用目前广泛使用的系统发育软件 PAUP*构建系统发育树，本文分别使用了三种不同的建树方法(NJ, MP, ML)，获得相对一致的结果。分子系统学分析的结果表明四叶目的并系地位，应当将原头目中的一些种类纳入四叶目中。同时分析结果也支持 Euzet (1994) 对盘首目的修订。

关键词： 鱼类绦虫 物种多样性 分子系统学

Abstract

There are nearly 4000 kinds of cestodes that have been reported from all over the world, and close to half of them have been found parasitizing in fishes. Presently many cestodes of marine fishes haven't been investigated, and the phylogenetic relationships among them are still unascertained. The author try to contribute to solving these problems. The work can be wholly divided into two parts:

First: Investigation of cestodes of fishes in Taiwan Strait. The author investigated the frequent marine fishes of Xiamen market from April, 2003 to March, 2005, and gained some cestodes from the fishes, subsequently we identified them carefully by light microscope morphological observation together with Scan Electron Microscope photos, in this article we describe 11 species, which belong to 3 orders, 5 families and 7 genres respectively. Of them the author has identified two new species by morphological comparison. Besides we propose to construct a new genus to contain one of the new species that have been found. They are all listed as follows:

1. *Paraechinophallus japonicus* Yamaguti, 1934
2. *Parabothriocephalus gracilis* Yamaguti, 1934
3. *Parabothriocephalus psenopsis* Wang, 2004
4. *Anteropora xiamenensis* n. sp.
5. *Cephalobothrium longisegmentum* Wang, 1984
6. *Acanthobothrium grandiceps* Yamaguti, 1952
7. *Acanthobothrium micracantha* Yamaguti, 1952
8. *Acanthobothrium* sp.1
9. *Acanthobothrium* sp.2

10. *Anthobothrium bifidum* Yamaguti, 1952

11. *Biotobothrium platyrhina* n. g. n. sp.

Second: The preliminary study in molecular phylogeny of cestodes. We first extracted the genomic DNA of the new species, then amplified the SSUrRNA gene by PCR, the amplified gene was cloned into plasmid and sent to be sequenced. (the sequences of this class cestode DNA had never been reported). We added up 12 SSUrRNA gene sequences which came from 8 orders and 12 genera to align. Then we employed the widely used phylogenetic software PAUP* to construct phylogenetic trees. We used three different construction methods (NJ, MP, ML) of phylogenetic trees. All of them resulted in the relatively identical outcome. Our results approve the paraphyletic position of Tetraphyliidea. Some species of Procephalidea should be brought into Tetraphyliidea, and they are also in support of the recent amendment (EUZET, 1994) of Lecanicephalidea.

Keyword: cestodes of fishes; species diversity; molecular phylogeny

绦虫 (Cestode) 又被称为带虫 (Tapeworm), 19 世纪初时, 科学家们已经开始普遍使用这个名称来指这一类成虫寄生于脊椎动物消化道的寄生虫。分类学上绦虫纲 (Cestoidea) 隶属于扁形动物门 (Platyhelminthes)。当前, 绦虫系统学是绦虫研究的主要内容之一。

Forey(1983)^[1]认为, 广义上系统学意味着对次序的研究, 终极目标是识别并用语言或图解表达一种次序, 这种次序在研究者看来即是研究对象之间的自然关系或真实关系, 并且可以用来作为一种通用的参证系统, 通用参证系统是表达事物和现象之间多种关系的系统, 其特点是, 尽管它可能是基于一种关系建立的, 它却可以解释其他许多关系。就生物系统学而言意味着必须假设: 生命是按有条理的方式组织而不是杂乱无章的。

自进化论出现后, 生物学家都已认识到生物物种有其发展的历史, 研究物种之间的系统发育关系理所当然地成为生物科学的任务之一。系统发育系统学 (Phylogenetic systematic) 又称分支系统学 (Cladistics), 由德国昆虫分类学家 Henning 上世纪五十年代创立。在六十年代其著作的英译本问世后在生物系统学中得到广泛的传播和运用。Henning (1966)^[2]认为分类学家的任务是创造一种通用的参证系统, 这种参证系统能够最全面地反映生物间的关系, 由于生物之间不仅在狭义的形态学差异上有其历史的根源, 其生理功能和行为方面的不同也有历史根源, 只有从系统发育关系出发, 才能在生物的一切可以想像到的特性和异同间找到联系。Henning 认为, 这种参证系统只能是严格地建立在单纯地亲缘关系上的分类。如今, 分支系统学已经是评估不同等级的生物之间亲缘关系的基石^[3]。分支系统学在绦虫研究领域运用较晚, 直到 1978 年, 才由 Brook 第一次将分支系统学用于绦虫系统学研究^[4], 但很快分支系统学成为绦虫系统学研究的主流, 特别在 1995 年第二届国际绦虫系统学会议倡导后, 整个绦虫系统学家们几乎完成了范式转移 (Paradigm shifts)^[3]。尽管分支系统学引入绦虫系统学较晚, 还是有许多相关的文章发表, 并且取得了一些重要的成果。真绦虫亚纲 (Eucestoda) 包括核叶目与所有多节绦虫的类群, 由于其清楚的近裔共性 (Synapomorphy) 被确定为单系 (Monophyly)^[5]。多节绦虫纲内各目的单系地位被认真地检验, 各主要类群之间的关系的假说也被建立作为进一步研究的框

架^[3, 5, 6]。

从理论上讲,生物的表型特征是部分遗传信息的展现,遗传信息中包含的物种进化的历史信息应该大于其表型上展现的信息。由于绦虫结构简单,其形态上的特征包含较少的系统发育信息。因此分子数据在构建系统发育关系时就具有特别的优势。同时相比较形态学数据,分子数据还具有其他明显的优势^[7]: 1, DNA 分子来自严格的遗传,很少被环境影响; 2, DNA 分子特征描述上更明确,更易于进行数量上的处理,也更易于进行同源关系分析。当然在目前的情况下,我们的对于基因的知识还不足以解析出我们所需要的所有信息,甚至也无法准确无误地评估我们所获得的结果的可靠性。所以许多分类学家在目前也只是将分子系统学作为其他分析手段的补充。无论如何,虽然还有未解决的问题和争议, DNA 分子数据还是被分类学家普遍地应用。尽管和分支方法学一样,分子数据也是较晚才引进绦虫系统学研究^[8]。但在近些年的绦虫系统学研究方面,分子的研究资料也在加速地积累^[9]。相对于国外的研究,国内的研究则相对薄弱很多,特别是海洋鱼类绦虫系统学的研究,至今还没有试图澄清系统发育关系的报道。

种类调查是系统学研究的基础,但当前我国海洋鱼类绦虫的报道较少见。我国最早的海洋鱼类绦虫报道始于 Yoshida (1917)^[10],随后国内的研究者对海洋鱼类绦虫也有零星的报道,曾省(1933)^[11]报道了山东青岛附近海域的些鱼类绦虫,汪溥钦^[12],王彦海^[13-15],杨文川^[16-19]等也陆续报道了福建附近海域的一些鱼类绦虫种类。到2006年为止,我国海域仅有报道记录57种,这与我国海域辽阔,鱼类物种资源丰富的情況形成明显的反差。据 Schmidt (1986)^[20]至今还有45000余种的绦虫潜在宿主还未被调查,在海洋绦虫方面,至1996年,软骨鱼板鳃类已知的850种中,仅有五分之一被调查,但已经有数百种的四叶目绦虫种类被发现^[8]。因此,在海洋鱼类中发现新的绦虫种类的潜力十分巨大。

综上,我们可以发现,近几十年来新的理论和方法的出現,给系统学这门老的学科带来了新的活力。尽管这些理论方法在绦虫系统学上运用较晚,但近些年受到明显的重视,并被广泛的使用。我国海洋鱼类绦虫系统学的研究在过去较为薄弱却富有潜力,特别是我们拥有丰富的海洋鱼类绦虫资源。如何利用

现有的资源，并开展富有意义的研究是我们关心的重点。厦门位于台湾海峡沿岸，台湾海峡南面的台湾浅滩是我国重要的大陆架渔场，其丰富的鱼类资源繁荣了两岸的海鲜市场。同时，市场上新鲜的鱼类也为我们获取和多样的绦虫宿主提供了方便，这是我们立足点所在。在此之上我们展开台湾海峡鱼类绦虫物种资源考察，将为绦虫系统学提供基本的素材,也能丰富我国生物多样性编目。同时我们也进行了初步的分子系统学研究，这是国内对海洋绦虫系统学研究初次尝试，也是富有意义的探索。以上就是我们选题的基础。

第一部分 台湾海峡鱼类绦虫物种资源考察

I 材料与 方法

- 1. 材料获得：** 宿主鱼类主要购自厦门市轮渡农贸市场和曾厝垵海鲜市场。收集时间 2003 年 4 月-2005 年 3 月。鱼类鉴定种类根据《福建鱼类志》^[21]，种名经过检索 Fishbase 数据库 (www.fishbase.org version: 06/2006) 校对确保其为有效名称 (Valid name)。
- 2. 绦虫的固定和保存：** 解剖鱼类，取出消化道，用小剪刀小心剪开，尽量避免剪到虫体。然后将其浸入盛海水的烧杯中，用弯镊小心刮下肠粘膜，稍静置一会后，在烧杯底吸捡虫体。大型虫体肉眼即可看到，较小的虫体则必需借助解剖镜。对于活的虫体，我们将其吸于培养皿中，加入沸水，通过热固定，使得虫体伸展开。然后将其置于海水配制的 10%福尔马林溶液保存。如果虫体太厚，则先使用 10%福尔马林压片固定 2—6 小时。
- 3. 永久玻片标本制作：**
 1. 浸洗：取固定好的虫体置于流水中浸洗3hr；
 2. 染色：将虫体置于明矾洋红溶液中染色1—5hr；
 3. 分色：30%酒精+5%稀盐酸分色，后置于清水中洗净；
 4. 逐级脱水：视虫体大小分别用50%、70%、80%、90%、95%、100%（两次）酒精脱水5—20min；
 5. 透明：1/2酒精+1/2二甲苯透明5—10min，纯二甲苯透明5—10min。
 6. 封片：用中性树胶封片，避免出现气泡。
- 4. 电镜实验材料准备：** 使用pH7.2 的磷酸缓冲液 (PBS ,含8 g/ L NaCl、0.12 g/

L KCl、2.89 g/L Na₂HPO₄·2H₂O、0.2 g/L KH₂PO₄)冲洗固定的标本，加入1%锇酸二次固定。然后酒精逐级脱水，乙酸乙酯置换，临界点干燥，真空喷金。

5. **光学显微镜观察:** (Olympus CH-2) 观察玻片标本，测量相关数据，并用描绘器 (Olympus LB) 绘图。
6. **电镜观察:** 厦门大学纳米中心飞利浦 XL-30 环境扫描电镜观察拍摄。
7. **测量单位:** 除特殊注明外，本文所有测量单位均为微米。
8. **标本保存:** 模式标本均保存于厦门大学生命科学学院寄生动物研究室。

II 结果

假叶目 (*Pseudophyllidea* Carus, 1863)

(按 Jones, A. et al., 1994)^[22]

头节通常存在。背腹面各具一个吸槽，带钩或否。头节很少缺失，或被假头节或头节变体取代。吸槽很少缺失。链体外分节通常存在，分节完整或不完整。内分节完整或否。节片间有缘膜或否，通常宽大于长，怀卵节片位于链体上。每节一般具一套生殖系统，很少具两套。大多数种类生殖孔在节片腹面中央，但部分种类生殖孔在节片的侧缘或亚侧缘。睾丸位于节片髓质，数目多。阴茎囊通常存在。卵巢位于节片髓质，后端。卵黄腺滤泡状，通常位于节片皮质，有时髓质，有的可分布于纵向肌肉束间。子宫形状多样。子宫孔存在，腹面。第一中间宿主为甲壳类，第二中间宿主一般为鱼类，很少为脊椎动物。成虫主要寄生于鱼类，也见于其它脊椎动物。Bray 等 (1994)^[22]，将假叶目分为为六个科：头槽科 (*Bothriocephalidae* Blanchard, 1849)，棘叶科 (*Echinophallidae* Schumacher, 1914)，三枝钩科 (*Triaenophoridae* Loenberg, 1889)，嗜深科 (*Philobythiidea* campbell, 1977) 和蓬头科 (*Cephalochlamydidae* Yamaguti, 1959)。Bray 等 (1994) 认为三枝钩科 (*Triaenophoridae* loenberg, 1889) 与双凹科 (*Amphicotyllidae*

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库