

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200426036

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

闽南-台湾浅滩鱼类绦虫的种类调查、季节
动态和分子系统学研究

Species Composition, Season Dynamic and Molecular
Systematic Analysis of Marine Fish Cestodes in
Minnan-Taiwan Bank

李洪涛

指导教师姓名: 王彦海 副教授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2007年 06月

论文答辩时间: 2007年 06月

学位授予日期: 2007年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2007年 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而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要	I
Abstract	III
前言	1
第 I 部分 闽南-台湾浅滩鱼类绦虫种类调查	4
一. 材料与方法	4
二. 结果	6
(一) 调查结果	6
(二) 虫种描述	10
1. 两叶目	10
1) 长颈棘头绦虫(<i>Echinobothrium longicolle</i> Southwell, 1925)	11
2) 尖嘴缸棘头绦虫新种(<i>Echinobothrium zugeimensis</i> n. sp.)	14
3) 中华巨叶绦虫新种(<i>Macrobothridium sinensis</i> n. sp.)	19
2. 锥吻目	23
4) 羽槽绦虫未定种(<i>Pterobothrium</i> sp.)	24
3. 盘首目	27
5) 日本前孔绦虫(<i>Anteropora japonica</i> Yamaguti, 1934)	28
4. 四叶目	32
6) 厦门约克绦虫新种(<i>Yorkeria xiamenensis</i> n. sp.)	32
7) 微小瘤槽绦虫新种(<i>Onchobothrium parva</i> n. sp.)	37
8) 腕槽绦虫属未定种(<i>Carpobothrium</i> sp.)	40
9) 阶室绦虫属未定种(<i>Scalithrium</i> sp.)	43
10) 微小扇槽绦虫新种(<i>Flabellobothrium parva</i> n. g. n. sp.)	47
三. 讨论	51
第 II 部分 闽南-台湾浅滩鱼类绦虫感染的季节动态	53
一. 材料与方法	53

二. 结果与分析	53
三. 讨论	56
第 III 部分 闽南-台湾浅滩鱼类绦虫的分子系统学研究	57
一. 材料与方法	57
1. 标本的采集	57
2. DNA 提取, PCR 扩增以及测序	57
3. DNA 序列数据的处理及系统进化树的重建	59
二. 结果与分析	60
1. 序列比对	60
2. 基于 16S rRNA 基因的绦虫遗传距离和系统进化树	60
3. 基于 18S rRNA 基因的盘首目绦虫的遗传距离和系统进化树	61
三. 讨论	64
附录	66
参考文献	68
硕士期间发表的论文和参与的课题	73
致谢	74

Content

Abstract (Chinese).....	I
Abstract (English).....	III
Introduction.....	1
Part I Species survey of marine fish cestodes in Minnan-Taiwan Bank	4
I Materials and methods	4
II Results	6
(I) Survey results.....	6
(II) Cestode species description	10
1. Diphyllidea	10
1) <i>Echinobothrium longicolle</i> Southwell, 1925.....	11
2) <i>Echinobothrium zugeimensis</i> n. sp.....	14
3) <i>Macrobothridium sinensis</i> n. sp.....	19
2. Trypanorhyncha.....	23
4) <i>Pterobothrium</i> sp.....	24
3. Lecanicephalidea.....	27
5) <i>Anteropora japonica</i> Yamaguti, 1934.....	28
4. Tetraphyllidea.....	32
6) <i>Yorkeria xiamenensis</i> n. sp.....	32
7) <i>Onchobothrium parva</i> n. sp.....	37
8) <i>Carpobothrium</i> sp.....	40
9) <i>Scalithrium</i> sp.....	43
10) <i>Flabellobothrium parva</i> n. g. n. sp.....	47
(III) Discussion.....	51
Part II Season dynamic of marine fish cestodes in	

Minnan-Taiwan Bank	53
I Materials and methods	53
II Results and analysis	53
III Discussion	56
Part III Molecular systematic analysis of marine fish cestodes in Minnan-Taiwan Bank	57
I Materials and methods	57
1. Collection of specimens	57
2. DNA isolation, PCR amplification and gene sequencing	57
3. Sequence alignment and phylogenetic analysis	59
II Results and analysis	60
1. sequence alignment	60
2. Cestodes genetic distances and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene	60
3. Lecanicephalidean species genetic distances and phylogenetic analysis based on 18S rRNA gene	61
III Discussion	64
Appendix	66
References	68
The papers published and the subjects attended during the period of study for master degree	73
Acknowledgements	74

摘要

2004年10月到2006年10月,对厦门、东山等闽南-台湾浅滩海域进行鱼类寄生绦虫调查,并对两个新近命名种的感染季节动态进行了研究。

本次调查共检查鱼类88种456条,其中有绦虫检出的鱼类12种。有绦虫成虫寄生的宿主,除刺鲳外,全部为软骨鱼类。调查共获得海洋鱼类绦虫27种,分属于5目11科17属。其中能够鉴定到属的有24种,鉴定到种的有14种。在这24种中,包括了5个新种、10个未定种以及2个国内首次报道种(长颈棘头绦虫和日本前孔绦虫)。尤其是两叶目三个种在国内的首次报道,填补了我国绦虫资源中没有两叶目绦虫的空白,为我国生物资源的多样性研究提供了资料。

本文选取了调查结果中的10种绦虫进行描述,其中包括5个新种,3个未定种和2个国内首次报道种:

1. 长颈棘头绦虫(*Echinobothrium longicolle* Southwell, 1925)
2. 尖嘴鲳棘头绦虫新种(*Echinobothrium zugeimensis* n. sp.)
3. 中华巨叶绦虫新种 (*Macrobothridium sinensis* n. sp.)
4. 羽槽绦虫未定种 (*Pterobothrium* sp.)
5. 日本前孔绦虫(*Anteropora japonica* Yamaguti, 1934)
6. 厦门约克绦虫新种 (*Yorkeria xiamenensis* n. sp.)
7. 微小瘤槽绦虫新种 (*Oncobothrium parva* n. sp.)
8. 腕槽绦虫属未定种 (*Carpobothrium* sp.)
9. 阶室绦虫属未定种 (*Scalithrium* sp.)
10. 微小扇槽绦虫新种(*Flabellobothrium parva* n. g. n. sp.)

寄生于中华团扇鲷的中华巨叶绦虫新种和团扇鲷对耳槽绦虫的季节感染动态表明,两种绦虫的月感染率变化呈现互补现象,即两个虫种同时出现的几率比较小,推断这两个虫种在中华团扇鲷肠道空间内可能存在竞争现象;两种绦虫的月感染强度变化在一定程度上受感染率的制约,也呈现数量互补现象。

本文亦对闽南-台湾浅滩部分鱼类绦虫的种间关系做了分子系统学研究。通过测定绦虫纲5目19种的16S rRNA基因序列以及盘首目5个种的18S rRNA

基因序列，构建分子系统进化树。结果显示，不同目的绦虫各自聚集成一支，支持了传统分类学中对于目的划分；头节从两部分到四部分的进化，也符合了物种从简单到复杂的进化规律。进化树结果也支持了两叶目中关于巨叶绦虫属和棘头绦虫属的划分，以及四叶目的阶室绦虫属和盘首目的前孔绦虫属的分类地位。

关键词：绦虫；海洋鱼类；两叶目；分子系统学

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Species composition of marine fish cestodes and seasonal dynamic of 2 newly identified cestodes in Minnan-Taiwan Bank along the coastal area of Xiamen and Dongshan were investigated from October, 2004 to October, 2006.

88 species of marine fish and 456 individuals were examined in this survey. Among them, 12 species were found to be cestode-parasiting. All of those cestode-inhabiting fishes are elasmobranchs, except *Psenopsis anomela*. 27 species of cestode in total were obtained in this study, which can be allocated to 5 orders, 11 families, and 17 genera. Among those, 14 species can be positioned to actual species. On the other hand, there were 24 species that can only be allocated to genus, including 5 new species, 10 unidentified species, and 2 domestically first reported species (i.e., *Echinobothrium longicolle* Southwell, 1925; and *Anteropora japonica* Yamaguti, 1934). Notably, 3 species of Diphyllidea were firstly reported in China in this survey, furnishing the blankness Diphyllidean study and enhancing the diversity of bio-resources in China.

10 species of cestodes in total, including 5 new species, 3 unidentified species, and two domestically first reported species were described in this research:

1. *Echinobothrium longicolle* Southwell, 1925
2. *Echinobothrium zugeimensis* n. sp.
3. *Macrobothridium sinensis* n. sp.
4. *Pterobothrium* sp.
5. *Anteropora japonica* Yamaguti, 1934
6. *Yorkeria xiamenensis* n. sp.
7. *Oncobothrium parva* n. sp.
8. *Carpobothrium* sp.
9. *Scalithrium* sp.
10. *Flabellobothrium parva* n. g. n. sp.

The seasonal dynamic of *Macrobothridium sinensis* n. sp. and *Biotobothrium*

platyrhina in *Platyrhina sinensis* showed that the variety of monthly infection rate of these two species presenting in a complementary pattern, i.e., the percentage of co-occurrence of these two cestodes is rather low, inferring that competition among these two species in the gut lumen of *Platyrhina sinensis* might exist. In addition, the transformation of monthly infection rate of these two species was somehow restricted by infection rate, thus the variety of quantity exhibited in complementary pattern, too.

Based on the molecular techniques, interrelationship of partial marine fish cestodes in Minnan-Taiwan Bank was examined in this study. By analysing the sequences of 16S rRNA of 19 species from 5 orders and the sequences of 18S rRNA of 5 Lecanicephalidean species, phylogenetic trees were constructed. The results showed that each branch of the tree was constructed by species from one order, supporting the ordinal status of classical taxonomy. Besides, the transformation of bipartite scolex to tetrapartite scolex is appropriate to species-evolutionary law in which morphology of an individual becomes more complicated with the progression. Furthermore, the phylogenetic tree resulted not only corroborates the systematic treatment of *Macrobothridium* and *Echinobothrium* in order Diphyllidea, but also verifies the taxonomic position of *Scalithrium* and *Anteropora* which are originated of Tetrephyllidea and Lecanicephalidea, relatively.

Keywords: Cestode; Marine fish; Diphyllidea; Molecular Systematic.

前 言

绦虫 (cestode) 隶属于扁形动物门绦虫纲 (Cestoda), 是常见的一种鱼类寄生虫, 其中一些虫种可以引起严重的鱼类疾病: 寄生于腹腔内的幼虫可压迫宿主的消化管、肝、脾及性腺等内脏器官并使其萎缩; 寄生于鱼类肠道内的成虫及幼虫, 可争夺宿主营养, 或头节钻入宿主肠粘膜而破坏肠壁组织, 或由多数虫体密集而造成肠阻塞, 阻碍宿主的消化吸收, 影响鱼类的正常增殖, 带来巨大的经济损失。国内最早开展关于鱼类绦虫病研究的人是廖翔华^[1]等 (1956)。他发现, 九江头槽绦虫病可造成草鱼等鱼种的大批死亡, 越冬草鱼的死亡率可高达 90%, 危害十分严重。

闽南-台湾浅滩渔场位于台湾海峡南口, 是中国东南海域重要的大陆架渔场。闽南沿海一带、台湾浅滩南部终年都有上升流出现, 把富营养盐的深层水带到表层, 促进饵料生物的大量繁殖, 从而形成一个上升流渔场^[2]。丰富的海洋鱼类资源为绦虫学的研究提供了极大的便利。

种类调查是鱼类绦虫学研究中的一项基础性内容。鱼类是绦虫终末宿主的最大群体之一, 海洋鱼类又以其种类丰富的优势成为绦虫学研究中的宝贵资源, 此项研究对于丰富我国绦虫物种多样性具有重大意义。

我国海洋鱼类绦虫的研究始见于 20 世纪 30 年代。曾省^[3] (1933) 报告了山东青岛, 济南的海洋鱼类绦虫; 汪溥钦^[4]等 (1984) 报道了福建部分地区的海洋鱼类绦虫; 90 年代, 杨文川等^[5-7]报道了福建厦门的几种海洋鱼类绦虫; 21 世纪最新的报道见于王彦海^[8] (2001) 和周霖^[9] (2006) 关于厦门鱼类绦虫的研究, 丰富了国内鱼类绦虫资源的数据。但是, 相对于国际上对于鱼类绦虫的丰富研究来说, 我国关于海洋鱼类绦虫的研究明显不足。

就整个寄生虫学研究来说, 绦虫学方面的研究一直很少, 主要原因包括: 1. 绦虫体节易脱落, 虫体肌肉质过厚, 结构不易看清; 2. 寄生部位多位于终末宿主肠道, 虫体易腐烂; 3. 对人畜危害较大的绦虫局限于棘球绦虫、带绦虫等有限几类, 其他绦虫的研究受到的关注较少; 4. 生物化学和分子细胞生物学的研究占据了生物学研究的大部分, 基础性研究在资金、人力资源支持和投入方面严重不足。这些不足使得绦虫学研究发展十分缓慢。

分子系统学 (molecular systematics) 是检测、描述并解释生物在分子水平的多样性及其演化规律的学科。它的理论基础来源于系统学、分类学、遗传学、比较生物化学、分子生物学和进化论, 其方法来源于免疫学、仪器分析、生物化学和分子生物学^[10,11]。分子系统学是以研究生命的普遍性为对象的分子生物学与研究生物多样性的系统学相结合而出现的一个新的生物学分支, 基于在分子水平上的比较建立分子进化树, 来探讨生物的系统进化关系^[12]。它有两个重要的理论基础, 其一是中性进化理论, 认为大多数分子水平的变异是随机的, 生物大分子的结构变异能够反映进化变异的积累。自然选择在某些方面仍起着积极的作用, 导致一些生物大分子的保守结构; 其二是进化速度均衡论, 也即 Zuckerkandl 和 Pauling (1965) 提出的“分子钟”的概念, 认为生物大分子的进化基本保持一种恒定的进化速度, 分子变异程度能较好地反映物种进化距离^[10]。

在研究生物间的系统进化关系时, 最重要的途径是构建分子系统进化树。分子系统树就是在生物大分子进化速率相对恒定的理论上利用生物大分子间的序列差异或结构的比较而构建出来的, 可以很直观地揭示出不同生物的各类群间及种群间的系统进化关系^[13]。利用核糖体RNA基因片段间的DNA序列差异性构建的分子系统树已经解决了很多物种间系统发生关系问题。近年来, 许多基因已被很多研究者用于绦虫的系统学研究。

本文对绦虫分子系统学研究的两个手段基因是线粒体中的 16S rRNA 基因和细胞核中的 18S rRNA 基因:

真核生物线粒体基因组中包含非连锁的 12S rRNA 基因和 16S rRNA 基因, 它们比核对应物进化迅速得多。16S rRNA 基因的进化主要以碱基替换为主, 插入和缺失较少^[14], 适合于种、属水平以及属以上水平的研究, 可以很方便地用保守引物或通用引物对其定位并进行 PCR 扩增, 所以对其测序较多。

真核生物的核糖体上, 18S、5.8S、28S rRNA 基因串联在一起, 排列在某一染色体上形成核糖体 RNA 基因簇。18S rRNA 基因是真核生物染色体上编码核糖体小亚基 RNA 的基因, 由于 18S rRNA 基因序列及其二级结构高度保守, 并在蛋白质合成中具有重要的功能, 故而一般认为它比较适合于研究高级阶元的系统发育。18S rRNA 基因的核苷酸替换率较低, 被认为最有希望成为解决早期动物进化型式的工具。

根据Hoberg等(2001)^[15]的报告,关于绦虫系统学分类一直存在比较大的争议,并且存在不同的分类假说(Loennberg 1897; Fuhrmann 1931; Skrjabin 1940; Baer 1950; Spasskii 1951, 1958; Euzet 1959, 1974; Freeman 1973; Dubinina 1980; Euzet et al. 1981; Brooks et al. 1991等)和分类体系(Wardle & McLeod 1952; Yamaguti 1959; Schmidt 1986; Spasskii 1992; Khalil et al. 1994等)。早期利用系统学方法对多节绦虫亚纲的各个目进行研究的是Brooks et al.(1991)^[16]和Brooks & McLennan (1993)^[17]。从1996年开始,关于多节绦虫亚纲的系统学研究逐渐增多(Hoberg et al. 1997)^[18]。开始利用分子系统学手段进行绦虫各目分类研究的是Mariaux (1998)^[19], Olson & Caira (1999)^[20]和Mariaux & Olson (2001)^[21]。

本文通过对闽南-台湾浅滩部分鱼类绦虫的分子系统学研究,希望能够结合形态特征解决形态分类学上部分存在争议的问题。

第 I 部分 闽南-台湾浅滩鱼类绦虫种类调查

材料与方法

1. 材料来源

用于绦虫调查的鱼类购自福建省厦门市轮渡市场、曾厝安海鲜市场以及漳州市东山县桂花市场和人民市场。虫种收集时间为 2004 年 10 月至 2006 年 10 月。

2. 绦虫材料的固定和保存

- (1) 问明鱼类来源后，记录所购鱼类名称，剖杀并取出消化道检查。在盛有干净海水的培养皿内，用小剪刀小心剖开消化道，然后用小镊子轻轻撕开，尽量避免虫体断裂。游离的较大虫体直接挑出，断裂的头节、体节及孕节用滴管轻轻吸出；小型虫体在解剖镜下检测，并用滴管吸出。在干净海水中轻轻冲洗上述虫体，对于有虫卵排出的孕节，将虫卵置于载玻片上显微镜观察。
- (2) 新鲜虫体洗净后，用煮沸的海水进行热固定。对于较完整的虫体，部分用 5% 福尔马林压片固定，用以制作永久玻片标本；部分用 2.5% 戊二醛溶液固定后，用以电镜扫描；部分用磷酸缓冲液保存于 -20°C ，或保存于 95% 乙醇，用以进行分子生物学研究。

3. 永久玻片标本的制作

- (1) 固定后的虫体用蒸馏水洗 2-4 hr，每 0.5 hr 换一次水。然后移入明矾洋红染液中染色。根据虫体大小，染色时间控制在 0.5-2 hr。染色后，蒸馏水冲洗 2-3 次，洗去表面染液，然后加入 1% 盐酸分色 2-15 min。用蒸馏水冲洗 2 次，每次 15-20 min。
- (2) 洗去残余盐酸后，依次用 50%、70%、80%、90%、95%、100% 酒精（2 次）逐级脱水，乙醇：二甲苯（1：1）、纯二甲苯透明，每步需要 20-25 min。
- (3) 最后用中性树胶封片。封片过程中，点燃酒精灯，保持周围空气干燥；小心挑取虫体，防止断裂；放置盖玻片时避免气泡出现。
- (4) 封片结束后，每片标本贴上标签，记录宿主，虫种名称，编号以及采集日

期。室温干燥 2-6 天。放于标本盒，干燥处保存。

4. 扫描电镜样品的处理

戊二醛溶液保存的样本中，选取较好的标本用磷酸缓冲液冲洗 4-5 次，每次 0.5 hr。用蒸馏水冲洗 20 min 后，在 50%、70%、80%、90%、95%、100% 酒精（2 次）逐级脱水，然后乙醇：醋酸异戊酯（1：1）、纯醋酸异戊酯置换酒精，每步需要 20 min。CO₂ 临界点干燥，喷金，在 XL30 ESEM-TMP 环境扫描电镜（荷兰 Philips-FEI 公司，EDAX 公司能谱仪）扫描拍摄。

5. 手绘图本的获得

永久玻片标本结构在 OLYMPUS 显微镜下观察，并借助绘图仪（OLYMPUS）手绘，扫描后用 Photoshop CS 处理，并保证原手绘图信息的完整性。

6. 其他说明

- (1) 除特殊注明外，本文所有测量数据单位均为微米。
- (2) 所有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。
- (3) 宿主鱼类鉴定均参考《福建鱼类志》^[22]。
- (4) 绦虫分类体系主要参考《脊椎动物绦虫学》（1959）^[23]、《绦虫鉴定手册》（1986）^[24]、《脊椎动物寄生绦虫检索》（1994）^[25]。

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