

文章编号:1002-2694(2009)07-0660-05

# 台湾海峡异尖线虫病病原线虫幼虫的 rDNA 序列分析\*

张少雷,徐世三,罗大民

**摘要:**目的 分析台湾海峡异尖线虫病潜在病原线虫的 rDNA 序列,为建立病原分子生物学鉴别提供依据。方法 剖检台湾海峡常见鱼类的寄生线虫幼虫,镜检分类。提取虫体 DNA、用通用引物对 rDNA 进行 PCR 扩增、克隆、双向测序及 BLAST 比对。结果 获得 6 条来自 6 种线虫幼虫的 rDNA 序列,其中的 3 种在 GenBank 数据库中没有发现匹配的序列;证实台湾海峡分布的灰海鳗对盲囊线虫成虫和疑似其第三期幼虫实属同种;构建了基于 ITS-2 的序列间内部相似性程度关系树。结论 异尖线虫病病原幼虫所具有分子生物学鉴别信息位点主要集中在 ITS-2 间隔区。

**关键词:**异尖线虫病;异尖线虫;rDNA;序列分析

中图分类号:R383.1 文献标识码:A

## Sequence analysis of rDNA of Anisakid nematodes with zoonotic potential from Taiwan strait

ZHANG Shao-lei, XU Shi-san, LUO Da-min

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**ABSTRACT:**To analyze the rDNA sequence of the *Anisakid nematodes* with zoonotic potential from Taiwan straits, *Anisakid nematodes* were obtained from the gut of marine fish and identified chiefly based on the morphological characteristics. The genomic DNA of nematodes were extracted, and the sequence of rDNA ITS were amplified by PCR using universal primers, then cloned and sequenced bidirectionally. Sequences analysis was conducted by blasting database and software DNAMAN. Results of the blasting database showed that no match could be demonstrated in 3 of 6 rDNA sequences obtained from 6 different nematode species; the new sequences were submitted to the database and the accession numbers in GenBank were obtained. The relationship between adult *Contracaecum muraenesoxi* and its putative third stage larva was validated by molecular evidences. Sequences relationship based on the inner similarity of the internal transcribed spacer sequences was constructed. It was found that the phylogenetic informative loci were mainly gathered in the second internal transcribed spacer (ITS2) for these anisakid nematodes because of the ITS2 has higher transition ratio than that of the ITS1. It is evident that the sequence in this region could provide valuable information for the molecular distinction of anisakid nematodes with zoonotic potential from Taiwan straits.

**KEY WORDS:** Anisakiasis; *Anisakid nematode*; rDNA; sequence analysis

异尖线虫病是一种重要的食源性人兽共患寄生虫病<sup>[1-3]</sup>,来自深海而带虫较多的鱼,如三文鱼、鳕鱼等已进入国内大中城市市民的生食菜谱中,因此该病有可能出现于生食海鱼的人群中,应引起高度重视。潜在的异尖线虫病病原线虫有简单异尖线虫复合种(*Anisakis simplex sensu stricto*, *A. pegreffii* 和 *A. simplex* C)、典型异尖线虫(*A. typica*)、抹香鲸异尖线虫(*A. physeteris*)、拟地新蛔线虫(*Pseudoterranova decipiens*)、内弯对盲囊线虫(*Contracaecum aduncum*)和带鱼针蛔线虫(*Raphidascaris trichi*)等<sup>[2,4-5]</sup>。鉴于形态学观察对病原线虫的幼虫期进行分类鉴定仍具有一定的难度,选择

新的适用性强的属内种或复合种鉴别方法成为研究重点,例如利用 rDNA 的转录间隔区(ITS)既具有保守性,又在科、属、种水平上均有特异性序列的特点<sup>[6]</sup>,应用 ITS 作为分子标记进行物种鉴别得到了广泛应用<sup>[7-10]</sup>。本文对台湾海峡潜在异尖线虫病病原线虫幼虫的 rDNA 序列进行了研究,以便对这一特定海域的常见病原线虫幼虫的分子生物学鉴别研究提供依据。

\*福建省科技计划项目(2008N2005);厦门市科技计划项目(3502Z20074036)

通讯作者:罗大民,Email:dmluo@xmu.edu.cn

作者单位:厦门大学生命科学学院,厦门 361005

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 市场购买从台湾海峡闽南浅滩渔场和厦门本港海域捕获的鱼类,剖检寄生于内脏表面和消化道中的线虫。显微镜下进行初步分类<sup>[1,11-13]</sup>,然后编号分别放入75%的酒精保存备用。本次检获的潜在病原线虫有简单异尖线虫<sup>[3,13]</sup>、内弯对盲囊线虫<sup>[14]</sup>、*Contracaecum* sp.<sup>[13,15]</sup>、带鱼针蛔线虫<sup>[1,16]</sup>等,多数线虫的发育期处于第三期幼虫阶段;另外还获得灰海鳗对盲囊线虫(*C. muraenesoxi*)的成虫和其疑似第三期幼虫<sup>[4,15]</sup>。

1.2 DNA提取 虫体DNA的提取均采用SDS/蛋白酶K法,用Wizard™ DNA Clean-Up columns (Promega)试剂盒对所提DNA进行纯化,然后于-20℃保存备用。

1.3 rDNA序列的PCR扩增 以纯化的每种线虫的DNA为扩增模板,用针对线虫rDNA保守区的通用引物NC5(5'-TAGGTGAACCTGCGGAA GGATCAATT-3')和NC2(5'-TTAGTTTCTTTT CCTCCGCT-3')进行扩增<sup>[17]</sup>。目的片段大约1kbp。扩增体系为50 μL 其中:2 μL 模板DNA, Taq 酶0.5U, Taq, 10 × PCR buffer 5 μL, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 两引物各0.15 μmol/L,用双蒸水补足至50 μL。扩增条件为:95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸75 s 共30个循环,最后72℃延伸7 min。产物4℃保存,将扩增的产物用1.5%琼脂糖进行电泳检验。以上所用药品均购自上海生工。

1.4 胶回收、克隆和测序 用EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit 试剂盒(上海生工)将1kbp左右的条带切胶回收。回收的片段连入pMD18-T载体(大连宝生),转入*Escherichia coli* DH5感受态细菌。用含有Amp的LB固体平板培养过夜。挑取单菌落,PCR检验,取阳性克隆送上海英俊生物公司进行测序。

1.5 序列分析 将测序结果登陆<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>进行BLAST比对。应用软件DNAMAN对获得的幼虫序列及幼虫与成虫序列进行比对。动态规划算法中的参数设置:空位打开罚分值为7;空位延伸罚分值为3。比对rDNA的5.8s部分,除去含NC5上游和含NC2下游部分,分别取每条序列的ITS-1和ITS-2间隔序列,然后再用DNAMAN分别进行比对,并分析序列之间内在的相似性程度关系。

## 2 结果和分析

2.1 灰海鳗对盲囊线虫与疑似其第三期幼虫的

rDNA序列比对 本次检获的灰海鳗对盲囊线虫成虫与疑似其第三期幼虫的测序结果分别经过BLAST比对数据库后,没有发现与数据库中已知的序列相匹配,因此将它们作为新的序列上传至GenBank,获得的序列登录号分别为EU828749和EU826125。将灰海鳗对盲囊线虫成虫与疑似其第三期幼虫的rDNA序列进行比对分析后发现,两者rDNA序列的相似性高达97.90%,即两序列间仅有20个碱基的差别(图1)。进一步对它们的ITS-1和ITS-2分别进行比对,结果表明它们之间的相似性也分别达到98.41%(7个错配)和96.29%(13个错配)。基于灰海鳗对盲囊线虫在台湾海峡鱼类寄生线虫的形态学特征<sup>[13,15]</sup>、区系特点和分子生物学证据等综合分析,我们认为在台湾海峡分布的灰海鳗对盲囊线虫成虫和该疑似其第三期幼虫实属同种,即GenBank中上传序列登录号分别为EU828749和EU826125的序列所对应的线虫分别为灰海鳗对盲囊线虫成虫和其第三期幼虫的rDNA(包括ITS1、5.8s、ITS2和部分18S、28S)。

2.2 其它线虫幼虫rDNA序列BLAST结果 本次检获的其它6种线虫幼虫的测序结果经过BLAST比对后发现其中有3条幼虫的序列与数据库中已知序列匹配,结合形态学特征观察结果,可以认为它们分别是*A. physeteris*(AB277821)、*A. pegreffii*(AB277823)和*C. aduncum*(AB277826)。另外2种幼虫的序列在数据库中没有与之相匹配的序列,因此将这两条序列作为新的序列上传至GenBank,序列登录号分别为FJ009682(*R. trichiuri*), FJ009683(*Contracaecum* sp.),即它们分别是带鱼针蛔线虫和台湾海峡鱼类寄生线虫优势种之一的*Contracaecum* sp.第三期幼虫的rDNA序列(含ITS1、5.8s、ITS2和部分18S、28S)。

2.3 病原线虫幼虫ITS-1和ITS-2序列的多重比对 为了能够有助于设计出特异性引物或探针,从GenBank下载*A. simplex* s. s.(AB277822),*P. decipiens*(AB277824),结合对盲囊线虫*C. osculatum*(AB277825)序列,然后与本次实验检获的6种幼虫的ITS序列(含5.8s)进行多重比对,结果表明他们的同一性达到64.55%。分别截取上述9种线虫幼虫的ITS-1和ITS-2序列,分别进行多重比对的结果显示上述幼虫在这两个间隔区的相似性程度分别达到65.19%和52.47%;在仅考虑序列间内部相似性程度关系而未引入外群情况下,基于观察的分歧距离算法构建的序列间相似性程度关系树如图2 a, b所示。

Larva	TTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTAAAACAAAAGTCTCCGAACGTGCATGCCTTCCATGTGCGCGTATA	80
Adult	-----	79
Larva	CGTGAGCCGCGCAGCAAGTTGCACACATGTGGTGGTGGTGG...CCGTCAGCCGTGCTTTTTTGGCAGACAATGGTCTGT	157
Adult	-----tgg-----	159
Larva	AGCTTGCTGTGTGTTGAGGGGGGATAGGTGACGTGCTGGGCTAGTTAGAAAAGGTACGTGCTAGCGCCTATCCTCTCGTT	237
Adult	-----	239
Larva	ATTCGTAACAACGGTGTCCACTTTGGCGTCTACGCCTCACCTAGCTATCGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGGTGGG	317
Adult	-----	319
Larva	GATAAAGCTCCTCGTTTCGAGTCGAGTAGACTTAATGAGCCTGTGGTTACGGGCCCGGAAGCCCAAACAACCAGTCT	397
Adult	-----a-----a-----	399
Larva	TATGTTTGAATTGTAGAAAGGTGGTCTGTGCACCCCTGTGGTGTATGGATCGCCTTCAAATCGAGTTATAAATCTTAGC	477
Adult	-----a-g-----	479
Larva	GGTGGATCACTCGGTTTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCAC	557
Adult	-----	559
Larva	TAAGAATTCGAACGCACATTGCGCCATCGGGTTCGTTCCCGTTGGCAGCTGTGGCTGAGGGTCAATTATCGAAAACGAT	637
Adult	-----	639
Larva	CCCGGTTGGGCAGCTTCGCGCGCTAGTAGTCGGAGCGTCGCCCATGCGGTGTATTTCGGCAGCTGTGGTCTAACACGAC	717
Adult	-----a-----t-----	719
Larva	CATACCTTGCTAAGTCTTTGCTATGCCATTTGCTCGCAGTCATTGCTCAATGCGAGGCGATGATGGCCGTCAGTGTGTG	797
Adult	-g-----g-----	799
Larva	CTCTCAGATGCGGCTCCGAGCACGTGTTGTTG...CTCTGTTGGTGGTGGTGGTGGTATGGTTTGGTGGATGCATGC	874
Adult	-----ttg-g-----t-----	879
Larva	ATCGACAGCTAGTGATGAGAGTGATGCGAGGTGGCTATCGCTTGTGTT...TTGACCTCAGCTCAGTCGTGACTACCCGCT	951
Adult	-g-----gtt-----	959
Larva	GAATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAA	990
Adult	-----	998

图 1 灰海鳗对盲囊线虫的成虫和第 3 期幼虫的 ITS 序列比对结果

Fig. 1 Alignment of ITS sequences of the *C. muraenesoxi* adult and its putative third stage larva

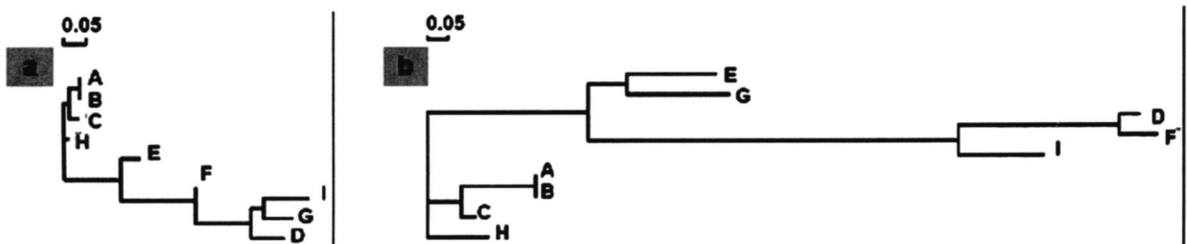


图 2 基于 ITS1(a)和 ITS2(b)序列间内部相似性程度关系树

Fig. 2 Phylogenetic tree(unrooted) of Anisakid larvae based on the ITS1(a) and ITS2(b) sequences

A = *A. pegreffii*, B = *A. simplex* s. s., C = *A. physeteris*, D = *Contracaecum* sp., E = *C. osculatum*, F = *C. aduncum*, G = *C. muraenesoxi*, H = *P. decipiens*, I = *R. trichiuri*

从图中可见,无论是根据 ITS-1 还是 ITS-2 序列, *A. physeteris*, *A. simplex* s. s., *A. pegreffii*, *P. decipiens* 四种异尖线虫病原线虫序列间相似性程度较高(90.52%和 79.64%),尤其是 *A. simplex* s. s. 与 *A. pegreffii* 两个姊妹种在 ITS-1 区仅有两处 C-T 转换<sup>[17]</sup>,这可能与他们体型较大且均具有一个发达的长圆柱状的胃有关;而 *P. decipiens* 由于还有一个发达的肠盲囊而与异尖线虫属分歧。基于 ITS-1 序列, *R. trichiuri*, *C. mu-*

*raenesoxi*, *Contracaecum* sp. 间相似性程度较高(80.50%),这三种幼虫的典型形态特征表现在肠盲囊从无到极短不等。*C. osculatum* 和 *C. aduncum* 幼虫除了胃盲囊发达外,其肠盲囊亦很发达,*C. muraenesoxi* 的肠盲囊极短而肠盲囊极发达。比较图 1 中 a、b 可见,基于 ITS-1 和 ITS-2 序列, *C. aduncum* 和 *C. muraenesoxi* 与其他序列的关系显然有别;计算各虫体 ITS 区域的碱基替换率表明 ITS-2 的序列变化大于 ITS-1(结果未列出),即异尖

线虫幼虫所具有的系统发育信息位点主要集中在 ITS-2 间隔区(图 3)。

E	.....GTTTCGACACCA...TCCGTACAATACTTCTTGTGAAGAGGAAATTGTGTGG	48
G	.....atcgaaaacgatccgc--g-g-g-...-t-cg-gc-g-ag-c..-g--c-tcgccca--c--	61
A	.....acggtgaactgtcttcacg.-tttttctgga-t--ga-gc-t-cggcaa-c-att..gc-gt----t	64
B	.....acggtgaactgtcttcacg.-tttttctgga-t--ga-gc-t-cggcaa-c-att..gc-gt----t	64
C	.....atggcaaacatcttc--g.-ctc-...gg--ga-gc-t-cggcaa-c--tt..gtcgtgt--t	60
H	.....atagtaaactatcttc-agtactttttatggt--ga-g--t-cggc-a-t--t-c-gtcg-at--t	67
D	tgaatatcaaacatcccggtgtttttgcgaacac--ggtgtat--g--gagc--tggtggtgtgtt-ctgc-gc--ct-	80
F	tgaatatcaaacatcccggtgtgtttt..ccaactc-tggtgtat--g-cgagc--tgatggtgtgtt--c--g.-ct-	77
I	.....atcgac-a-ga--cgaccgcgtatgcgg.c-c--	34
E	TGCATTCCGCAAGCAGTACTTCTTGGGCATCGCTCTT...GAAAGCACTCCTTGCTTAGACGAAATAATTGCAAAATT	123
G	--t-----g--t-gg-c--aaca-ga-ca-acc....ttgcta-g-t-----.-tg-c-tt-gc-c--gtca-	135
A	--...-t--tg-ttctat-a.tggacaatat-acga.....gcggt-----tgatg-c--aa-a-g-cg-	131
B	--...-t--tg-ttctat-a.tggacaatat-acga.....gcggt-----tgatg-c--aa-a-g-cg-	131
C	-g..-t--tcg-tct-tgaatcg-tcg--t-gcggc....tcg-cgg-----tt-ttg-gtga-g-g-cg-	133
H	-tttg-t--tcgt-c--t-g-tcg-tcgg--aacaacaatatctgagg-----tt-tgt-ct.a-t-g-cg-	146
D	--t--ggt-aggc-tc-cg--tccac-gg-g-g-ac...ctc-tatg...a-ggcg-c--ccgcgcc--t-cc-	152
F	c-tg-gt-tggt-g-cctc-t--aa-g-ga-g-ac...ttc-t-tg--gag--a-g-c--cgcgccga-t-cc-	153
I	--t-----g--ta-gg...g-c-gg-t-t-g-g...t-tgta-t--tg.--a-gcg-atgccgtcgt-gt-cc-	106
E	TTACTCGGTAAGGTGCA.....ATTATGGCCGTGAATATGTTGCTTCTCGATCGCGCTACCAGTATT	185
G	-g--aa-gc-ag-g.....-g-----c-.g-----ctca-----c-g-c-cg	196
A	ca--a-c-a-tctact-tactactaactagtagt--aggt-ag--ct-t-g-g-cacaa-a-t-a-a-gt-tgcca	211
B	ca--a-c-a-tctact-tactactaactagtagt--aggt-ag--ct-t-g-g-cacaa-a-t-a-a-gt-tgcca	211
C	ca--a-c-a-.c-ac.....g--tat-g-a-cgcaa-a--aaa-gt-tgcca	184
H	-a--a-ctg--caat.....at--gtgg-a-at-gg-gatg--aga-t--tgccg	199
D	-gct-a--ctgt----...catatctcgt...cg-a--cattagctcc--cgaggcgat--gccg-caagtgtcg	225
F	-gctaa--cttt----...catatctcgt...cg-a--cattagctcc--cgaggcgat--gccg-caagtgtcg	226
I	-gct-a--ct-t--tg...cccgaattgctatcgca--cattagctcc--cgaggcgat--gccg-caa-a-gca	183
E	TGTTGAT....TGTCGATAGCG.ACTGGAAGTATCGTAT...CGGATGC.....CTAAT...AGAGTGACA	240
G	----t-gct.c--t-g-g-t-tgg--tga--g-t-gttt-----atgcatcgacag--g-gatg-----tg	275
A	-t-cataggggcaacaacc--at-gt--taag-t-gc-gggt-at.-aaacg..gcaacgg--gacggac--ctat	287
B	-t-cataggggcaacaacc--at-gt--taag-t-gc-gggt-at.-aaacg..gcaacgg--gacggac--ctat	287
C	ct-cataggggcaacaacc--at-gt-t...g-t-gc-gggt-at.-aactgttgcaacgg-g-gacgg.....t	253
H	ct-ca-ggggca-caacc--at-gct-.a-ga-agt-gggt-at--aagccagggcaacgg-g-gatgtac--t.g	277
D	ctc-ct-gtcca-agat-cg--tccga-c-c-g-ttgcgaatt--c-a.....	274
F	ctc-ct-aacca-agat-cg--tccga-c-c-g-ttgcgaatt--c-atcggtttggggtg-ccg-atcaga-t-ctg	306
I	ca-ctc-...cccagatcg--tccga-cgcacta--g-tata-ct--gagtttgcgtcacgctt-cagtg--g-ag	260
E	TGTCTGGTTATTATGTGTTTTGACCTCAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAATTAAGCATATAATTA.....	310
G	c-agg--c--cgct-tg-----c-----c-----	355
A	gtga-caaa.-a-gatac-a-----	356
B	gtga-caaa.-a-gatac-a-----	356
C	gtga-ca-g.-acg-t--a-----	322
H	gcga-cat--acg-t-a-a-----	347
D	.....	274
F	gaaa-g-aag-gagg--a-gc-agg-t-gctg--c-atggtt-ga--t-a-ctcagtc-tgac--cccgtgaatttaa	386
I	g-ct-gatggtggc--caac--ctt-g-c-----	293
E	.....	310
G	.....	365
A	.....	356
B	.....	356
C	.....	322
H	.....	347
D	.....	274
F	gcatataacta	397
I	.....	293

图 3 9 种异尖线虫幼虫 rDNA ITS-2 序列的多重比对结果

Fig. 3 Multiple sequences alignment of rDNA in section of ITS-2 of 9 species of Anisakid larvae

A = *A. pegreffii*, B = *A. simplex* s. s., C = *A. physeteris*, D = *Contraecaecum* sp., E = *C. osculatum*, F = *C. aduncum*, G = *C. muraenesoxi*, H = *P. decipiens*, I = *R. trichiuri*

## 3 讨论

基于 ITS-1 构建的序列间的相似性关系基本能够反映线虫幼虫在盲囊,尤其是肠盲囊特征间的关系;但是基于 ITS-2 序列所反应的关系并不能与每个形态特征相对应,但显而易见的是 ITS-2 间隔区集中较多的信息位点,有人认为这类信息可以更好的反映系统发育关系<sup>[19]</sup>。因此,在异尖线虫病病原分子生物学鉴别研究中,可以针对 ITS-2 区域设计特异性引物或 DNA 探针。目前多数研究者认为对盲囊线虫属 (*Contracaecum* Railliet & Henry, 1912)和宫脂蛔线虫属 (*Hysterothylacium* Ward & Magath, 1916)为同物异名<sup>[4,14]</sup>,按命名法中的优先原则,应该使用对盲囊线虫属名称。

本研究中,针蛔属线虫 (*Raphidascaaris*) 与对盲囊线虫属内种的关系出现一些分歧。基于 ITS-1 和 ITS-2 序列, *R. trichiuri*、*Contracaecum* sp. 和 *C. osculatum* 三者之间的关系相对一致,但 *R. trichiuri* 与 *C. aduncum* 和 *C. muraenesoxi* 的关系却截然不同。这种情形在 Nadler 等<sup>[20]</sup>研究海豹蛔属 (*Phocascaaris*) 与对盲囊线虫属的系统关系时也遇到,这可能与属内种在 ITS-2 序列进化速率上有别有关。

## 参考文献:

- [1] 孙世正,小山力,影井升. 近海鱼类异尖科幼虫形态分类学研究—北部湾部分 [J]. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 1992, 10: 108-112.
- [2] 罗大民,方文珍. 异尖线虫病病原线虫在台湾海峡鱼类中的分布及动态 [J]. 台湾海峡, 2000, 19: 218-221.
- [3] 李会敏,徐真,张路平. 异尖属线虫研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1: 391-393.
- [4] 罗大民. 台湾海峡鱼类寄生线虫种类记述 [J]. 动物分类学报, 2001, 26: 154-160.
- [5] 李亮,徐真,张路平. 鱼类寄生宫脂属线虫研究进展 [J]. 寄生虫与医学昆虫报, 2006, 13: 244-250.
- [6] 刘春来,文景芝,杨明秀,等. rDNA- ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38: 101-106.
- [7] Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens [J]. Med Mycol, 2002, 40: 87-109.
- [8] Zhu X Q, Robin B, Gasser, et al. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences [J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28: 1911-1921.
- [9] Zhu X, D'Amelio S, Paggi L, et al. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) [J]. Parasitol Res, 2000, 86: 677-683.
- [10] Zhu X, D'Amelio S, Hu M, et al. Electrophoretic detection of population variation within *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) [J]. Electrophoresis, 2001, 22: 1930-1934.
- [11] Zhang L, Hu M, Shamsi S, et al. The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA [J]. Molecular and Cellular Probes, 2007, 21: 386-390.
- [12] Shih HH. Parasitic helminth fauna of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L and the differentiation of four anisakid nematode third-stage larvae by nuclear ribosomal DNA sequences [J]. Parasitol Res, 2004, 93: 188-195.
- [13] 罗大民,方文珍. 台湾海峡鱼类 8 种寄生线虫幼虫的特征排序 [J]. 台湾海峡, 1999, 18: 403-406.
- [14] 罗大民. 台湾海峡经济鱼类感染寄生线虫幼虫的调查 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38: 604-610.
- [15] 罗大民. 台湾海峡鱼类对盲囊线虫一新种及其内部变异研究 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1999, 6: 215-221.
- [16] 罗大民,方文珍. 台湾海峡鱼类寄生针晶蛔和对盲囊线虫幼虫的动态 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38: 902-906.
- [17] Umehara A, Kawakami Y, Araki J, et al. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes [J]. Parasitology International, 2008, 57: 49-53.
- [18] 李亮,张路平. 鱼类寄生线虫研究进展 [J]. 水利渔业, 2006, 26: 102-104.
- [19] 史全良,诸葛强,黄敏仁,等. 杨属 ITS 序列的分子进化特点分析 [J]. 分子植物育种, 2006, 4: 255-261.
- [20] Nadler SA, D'Amelio S, Fagerholm HP, et al. Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaaris* H. Øst, 1932 (Nematoda: Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data [J]. Parasitology, 2000, 121: 455-463.

收稿日期:2009-01-11;修回日期:2009-05-12