

基于线粒体 12S 对中国两大山系大熊猫 西氏贝蛔虫种群遗传多样性的分析

谢跃¹ 周璇² 孙韵¹ 古小彬¹ 杨光友^{1*}

(1 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014) (2 达州市达川区动物疫病预防控制中心, 达州 635000)

摘要:大熊猫是中国特有的珍稀濒危物种,而西氏贝蛔虫是大熊猫体内最为常见的肠道寄生虫,对野生和圈养大熊猫危害极大。考虑到大熊猫因分布区域的差异而形成了不同的亚种以及寄生虫与宿主间广泛的协同进化关系,西氏贝蛔虫是否也存在与大熊猫相适应的亚种分化一直是野生动物学家极其关注和热议的话题。为此,本文选择中国两大山系(岷山和邛崃)大熊猫种群体内共计 34 株西氏贝蛔虫虫体样本进行种群遗传多态性研究。利用 PCR 技术扩增出岷山(14 株)和邛崃(20 株)西氏贝蛔虫的线粒体 12S 基因全序列并对其做了遗传多样性分析。结果表明:(1) 34 个样本包含 9 个单倍型,呈现出一个高单倍性多样性和低核苷酸多样性的特点;(2) 负的 Tajima's D 和 Fu's Fs 中性检验值及“多峰型”的种群歧点分布图暗示种群不久前曾经历过突增长的现象;(3) 低的种群间的分化系数和高的基因流表明两个地理种群间未形成显著的遗传分化;(4) 系统发育树和单倍型网络图表明两山系种群分布无区域特异性。因此,岷山和邛崃山系大熊猫体内的西氏贝蛔虫种群遗传变异性较低,分化不明显。该发现不仅暗示了西氏贝蛔虫与其宿主(大熊猫)的进化不同步,而且还为不同区域大熊猫西氏贝蛔虫病的监控提供了理论依据。

关键词: 大熊猫; 西氏贝蛔虫; 种群遗传多样性; 线粒体 12S; 地理位置多态性; 保护生态学

中图分类号: Q958.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2015) 03-0328-08

Mitochondrial 12S – based analysis of genetic diversity of *Baylisascaris schroederi* in giant pandas from two mountain ranges in China

XIE Yue¹, ZHOU Xuan², SUN Yun¹, GU Xiaobin¹, YANG Guangyou^{1*}

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

(2 Centre for Animal Diseases Control and Prevention, Dachuan Animal Husbandry Bureau, Dazhou 635000, China)

Abstract: The giant panda is an iconic and threatened species for wildlife conservation in China. *Baylisascaris schroederi* is the most common intestinal parasite found in the giant panda and represents a significant threat to both wild and captive populations. Given that giant pandas are geographically and genetically distinct and that there often is co-evolutions between parasites and hosts, whether the evolution of *B. schroederi* correlates with the evolution of giant pandas has been, and is still, a matter of controversy. In this study, 34 *B. schroederi* isolates from two main giant panda populations distributed in Minshan (14) and Qionglai (20) mountain ranges, respectively, were subjected to analysis of population genetic diversities in terms of the complete mitochondrial 12S genes. Results showed that (1) a total of nine haplotypes were detected in the 34 isolates, with high haplotype diversity and low nucleotide diversity; (2) the negative neutrality tests (Tajima's D and Fu's Fs) and mismatch analysis indicated that *B. schroederi* experienced a temporary population expansion in the recent past; (3) the low *Gst* and high *Nm* values suggested a low genetic variability between Minshan and Qionglai populations; additionally, (4) the phylogenetic tree and network map exhibited a mixed population distribution without area-originated specificity. Collectively, *B. schroederi* across Minshan and Qionglai exhibited an insignificant genetic differentiation and had low genetic diversities between them. This finding implies different evolutionary rates between *B. schroederi* and pandas, and the results should contribute to the control of *B. schroederi* in different mountain-range pandas.

Key words: *Baylisascaris schroederi*; Conservation ecology; Genetic diversity; Giant pandas; Mitochondrial 12S; Phylogeography

基金项目：成都大熊猫繁育研究基金项目（CPF-2012-13）

作者简介: 谢跃 (1985-), 男, 博士研究生, 主要从事野生动物寄生虫病研究. E-mail: xyue1985@126.com

收稿日期: 2014-10-13; 修回日期: 2015-04-08

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: guangyou1963@aliyun.com

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是世界上现存的最古老珍稀物种之一, 具有重要的科研和学术价值 (Zhao *et al.*, 2013)。目前, 大熊猫主要分布于我国的邛崃、岷山、大相岭、秦岭、小相岭和凉山六大山系, 其种群数量 1 600 只左右。其中, 岷山和邛崃两大山系的数量最多, 分别占大熊猫总数的 44.36% 和 27.38% (国家林业局, 2006)。长期以来, 大熊猫除了受到历史进化过程中的气候巨变、人类活动及自身生理局限等因素影响外, 寄生虫感染也是导致其整个种群处于濒危的主要原因之一 (Zhao *et al.*, 2013)。

西氏贝蛔虫 (*Baylisascaris schroederi*) 是大熊猫体内最常见的肠道寄生虫, 对大熊猫的危害极大 (杨光友等, 1998; 杨光友和张志和, 2013)。该寄生虫成虫通常寄生于大熊猫的肠道内, 可引起肠道堵塞、炎症甚至大熊猫的死亡 (Wang *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013); 而其移行期幼虫则可广泛分布于大熊猫各内脏器官, 引起内脏幼虫移行症 (VLM), 如肠炎、肠损伤以及蠕虫性肝炎和肺炎。西氏贝蛔虫在野生大熊猫的感染率为 50% - 100%, 是导致野生大熊猫死亡的主要原发性和继发性病因之一 (Zhang *et al.*, 2008; 杨光友和张志和, 2013)。Zhang 等 (2008) 证实仅 2001 年至 2005 年 5 年间由西氏贝蛔虫感染造成的野生大熊猫死亡数就占到了总死亡数的 50% (Zhang *et al.*, 2008)。此外, 据最新流行病学调查数据显示, 目前野生大熊猫西氏贝蛔虫的感染率仍超过 54.0% (Zhang *et al.*, 2011)。尽管如此, 当前对于该蛔虫的研究仍局限于形态学和生物学方面 (杨光友等, 1998; Wang *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013)。近年来, 随着分子生物学的日新月异, 大量研究者也开始纷纷利用核糖体 (*ITS-2*) 以及线粒体 (*COXI*、*COXII* 和 *Cyt b*) 基因作为分子标记来对西氏贝蛔虫的系统发生关系进行研究 (何光志等, 2008; 牛李丽等, 2012a, 2012b; Li *et al.*, 2012), 其结果表明该蛔虫为贝蛔属蛔虫。随后, 部分研究者又利用核糖体 (*ITS*) 和线粒体 *Cyt b* 基因对不同山系大熊猫亚种体内的西氏贝蛔虫样本进行种群遗传多态性分析, 发现不同地域间的西氏贝蛔虫种群似乎存在较高的基因流, 以至该

物种遗传分化不明显 (Lin *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013); 但是由于各个山系种群间较多差异序列样本的出现也暗示该蛔虫可能在漫长的进化过程中由于面对外界环境的变化 (如气候、疫苗、宿主的抵抗力等) 而发生了不同的适应性改变, 并且寄生虫与宿主间复杂的协同进化关系更有可能加剧这一过程 (刘汉生等, 2008; 黄丽琴和郭宪国, 2009; Zhou *et al.*, 2013)。因此, 西氏贝蛔虫是否也存在与大熊猫相适应的亚种分化至今仍是野生动物学家极其关注和热议的话题。

鉴于谱系地理学的研究有助于理解物种种群分化、物种形成等, 且该方法在无脊椎动物, 特别是寄生虫中的运用较少 (Iorio *et al.*, 2009); 同时, 不同线粒体 DNA 分子因其进化的速率不同、位点保守性不同, 以至于对于同样的物种样本分析可能出现结果上的偏差 (Farias *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2011), 故本研究将对采自岷山和邛崃山系的 34 株大熊猫西氏贝蛔虫线粒体 12S 基因全序列进行扩增, 并以此分析该两大山系的西氏贝蛔虫分子地理谱系, 以期获得对该蛔虫遗传结构和进化关系的进一步了解。

1 研究方法

1.1 蛔虫样品的收集

2005 - 2014 年间, 34 株西氏贝蛔虫成虫样品被分别收集自邛崃和岷山两大山系, 其中, 邛崃山系 20 株, 岷山山系 14 株。采样点覆盖了这两个山系大熊猫的主要分布区域 (表 1)。虫体经形态学鉴定后, 用灭菌生理盐水清洗干净, 于 -70℃ 保存备用。

1.2 虫体总 DNA 的提取

采用传统酚/氯仿法对每个样本的总 DNA 进行提取, 具体步骤参照牛李丽等 (2012) 中所述。

1.3 12S 基因的扩增与测序

根据已报道的西氏贝蛔虫线粒体全基因组序列 (Xie *et al.*, 2011) (GenBank 登录号: NC_015927) 设计特异性引物, 扩增 12S 基因, 扩增长度为 800 bp 左右。扩增上游引物: 5' - GTT GTTTCTAGTGTGTTGGG - 3'; 下游引物: 5' - CCCTCAACACTCCAAACACG - 3'。PCR 扩增体系为 50 μ L: 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, DNA

3 μL , 灭菌双蒸水 16 μL , 上、下游引物各 3 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min, 最后 8 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 在凝胶成像系统下观察并拍照

记录。PCR 产物经胶纯化回收 (Wizard TM PCR-Preps DNA Purification System, Promega) 后, 送与上海 Invitrogen 公司进行双向测序。每个样品单独测序 3 次, 以确保测序结果的准确性。

表 1 西氏贝蛔虫样本采集点

Table 1 Origins and numbers of *B. schroederi* isolates

种群 (株数) Population (isolates)	样本采集点 Locations	样本编号 Sample codes	样本数量 No. of isolates	序列登录号 GenBank accession nos.
邛崃山系 (20 株) Qionglai mountain range (20 isolates)	宝兴 Baoxing	Q1 - Q5	5	KM595306 - KM595310
	汶川 Wenchuan	Q6 - Q8	3	KM595311 - KM595313
	天全 Tianquan	Q9 - Q16	8	KM595314 - KM595321
	彭州 Pengzhou	Q17 - Q20	4	KM595322 - KM595325
岷山山系 (14 株) Minshan mountain range (14 isolates)	北川 Beichuan	M1 - M3	3	KM595326 - KM595328
	青川 Qingchuan	M4、M5	2	KM595329 - KM595330
	平武 Pingwu	M6 - M14	9	KM595331 - KM595339

1.4 数据分析

扩增序列长度为 800 bp, 经 BLASTn 分析确认其包含西氏贝蛔虫完整 12S 基因后, 用 DNAMAN 5.2.2 软件 (Lynnon Biosoft, USA) 进行编辑、校对和序列比对, 生成对应的 12S 全长序列文件。Mega 5.0 软件分析碱基组成 (Tamura *et al.*, 2011); DnaSP 5.0 (Librado *et al.*, 2009) 软件对序列多态性位点数、单倍型数、核苷酸多样性指数 (Pi) 和单倍型多样性指数 (Hd) 参数进行统计; 用 Arlequin 3.5.1.2 软件 (Excoffier *et al.*, 2010) 中的分子变异分析 (AMOVA) 估算遗传变异在群体内和群体间的分布, 并计算群体间遗传分化系数 (Gst) 及其显著性 (重复次数 1000), 群体间基因流 Nm 由公式 $Nm = (1 - Gst) / 2Gst$ 计算而得。此外, 通过估算种群扩张事件的单倍型歧点分布 (mismatch distribution) 和中性检验值 (Tajima's D 和 Fu's Fs) 来检测西氏贝蛔虫中性假说是否成立。最后, 用转移贝蛔虫 (*Baylisascaris transfuga*) 12S 基因为外种群 (GenBank 登录号: NC_015924.1), 借助 Mega 5.0 软件构建最大简约 (MP) 系统发育树 (Tamura *et al.*, 2011), 并用 bootstraps (重复次数 1000) 检验聚类树各分支的置信度。最后, 使用 Network 4.6.1.2 软件构建单倍型简约网络图 (Bandelt *et*

al., 1999)。

2 结果

2.1 12S 基因的序列组成及变异

对我国岷山和邛崃两大山系共 34 个样本的 12S 全序列进行编辑和比对后, 得到 694 bp 的同源全序列。经 Mega 5.0 软件分析, 该序列的 A、T、C、G 碱基的平均含量为 29.3%、38.5%、9.9% 和 22.3%, A + T 含量为 67.8%, 明显高于 G + C, 符合 12S 基因的一般特点。DnaSP 5.0 软件分析显示, 34 个样本序列共含 13 个变异位点, 占总位点数的 1.873%, 其中单突变位点 8 个, 简约信息位点 5 个, 无缺失和插入。多态性分析显示, 34 个样本共检出 9 个单倍型 (S1 - S9), 其中岷山山系 7 个 (S1、S3 - S8), 邛崃山系 6 个 (S1 - S4、S6、S9) (表 2)。总群体单倍型多样性指数 (Hd) 为 $0.782\ 500 \pm 0.001\ 678$, 核苷酸多样性指数 (Pi) 为 $0.002\ 583 \pm 0.001\ 678$ 。

2.2 群体遗传结构分析

对岷山和邛崃两个山系西氏贝蛔虫群体的 12S 基因序列进行比对, 结果表明各群体在遗传参数上差异不大。群体间分化系数 (Gst) 和基因流 (Nm) 检测表明, 两个群体间存在的基因流 Nm 达 64.71, 而分化系数 Gst 仅 0.00385 (表 2)。AMO-

VA 分析进一步显示，西氏贝蛔虫群体间的遗传差异为 100.26%，而群体内部的遗传差异却为 -0.26%，证实西氏贝蛔虫群体内遗传结构不明显。

表 2 不同大熊猫栖息山系的西氏贝蛔虫遗传多样性指数
Table 2 Summary of the genetic diversity of *B. schroederi* from giant pandas inhabiting different mountain ranges

种群 Population	个体数 Isolate	单倍型数 No. of Haplotype	变异位点数 No. of variation sites	单倍型多样性 (<i>Hd</i>) Haplotype diversity (± SD)	核苷酸多样性 (<i>Pi</i>) Nucleotide diversity (± SD)	Tajima's D	Fu's Fs	分化系数 <i>Gst</i>	基因流 <i>Nm</i>
岷山 Minshan	14	7	10	0.8571 ± 0.0652	0.003040 ± 0.002022	-1.5372 *	-1.9092 *		
邛崃 Qionglai	20	12	21	0.7263 ± 0.0901	0.002199 ± 0.001538	-0.3107	-1.0241	0.00385	64.71
总体 Total	34	9	13	0.7825 ± 0.0547	0.002583 ± 0.001678	-1.4359 *	-2.4025 *	—	—

* *P* < 0.05

2.3 聚类分析和种群动态
采用 Mega 5.0 软件对 34 个样本进行聚类分析，结果表明所有个体聚为 3 个大支，但大多数分

支包含有两个山系样本，呈现混杂的分布格局，未形成明显的地理分支（图 1）。

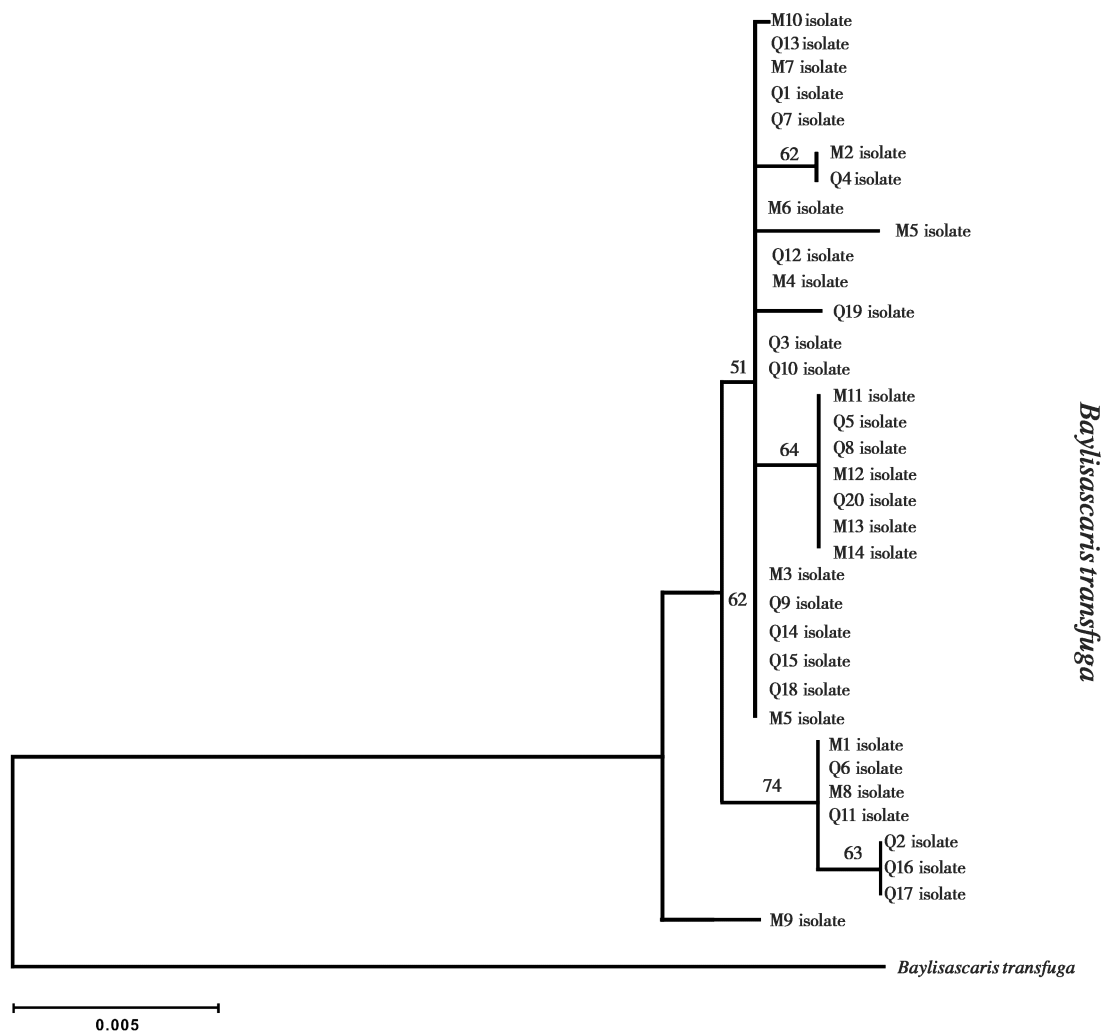


图 1 34 株西氏贝蛔虫样本的最大简约发育树. M1 – M14 代表岷山山系分离株，Q1 – Q20 代表邛崃山系分离株
Fig. 1 Maximum parsimony (MP) tree of 34 *B. schroederi* isolates. M1 – M14 represents Minshan population and Q1 – Q20 shows Qionglai population

为了进一步了解西氏贝蛔虫单倍型的关系，作者用单倍型网络图对该群体单倍型关系进行了构建，如图 2 所示，4 个单倍型（S1、S3、S4 和 S6）由两个山系共享，而 S2 和 S9 单倍型是邛崃山系群体所特有，S5、S7 和 S8 单倍型是岷山山系所特有。同时，单倍型网络图也呈现出以 S1 为中心的辐射状，且以 S1 单倍型频率最高（41.18%），两个山系群体共享该特点；因此，S1 相对来说为古老单倍型，在进化上较为原始，而其外部的枝端则是经古老单倍型 S1 突变衍生而来的年轻单倍型。

对两个山系群体进行中性检验，结果显示两个群体的 Tajima's D 和 Fu's Fs 值均为负（表 2）。单倍型歧点分布分析显示，无论以整个群体还是以两个单独的山系群体进行分析，其结果均呈现多峰

的现象（图 3）；然而小而不显著的 RG 和 SSD 参数值则说明，西氏贝蛔虫种群经历过较弱的突增长过程。

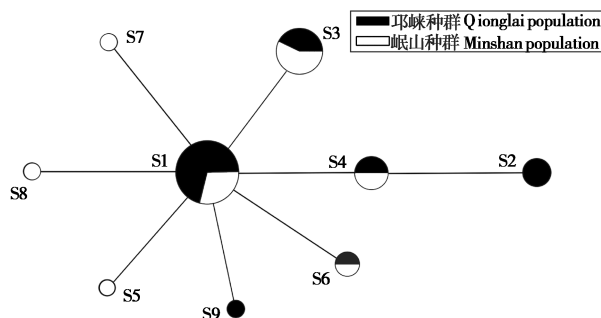


图 2 9 个西氏贝蛔虫单倍型网络图。圆圈面积大小代表单倍型频率

Fig. 2 Network map of the 9 haplotypes in *B. schroederi*. The area of each circle is proportional to the haplotype frequency

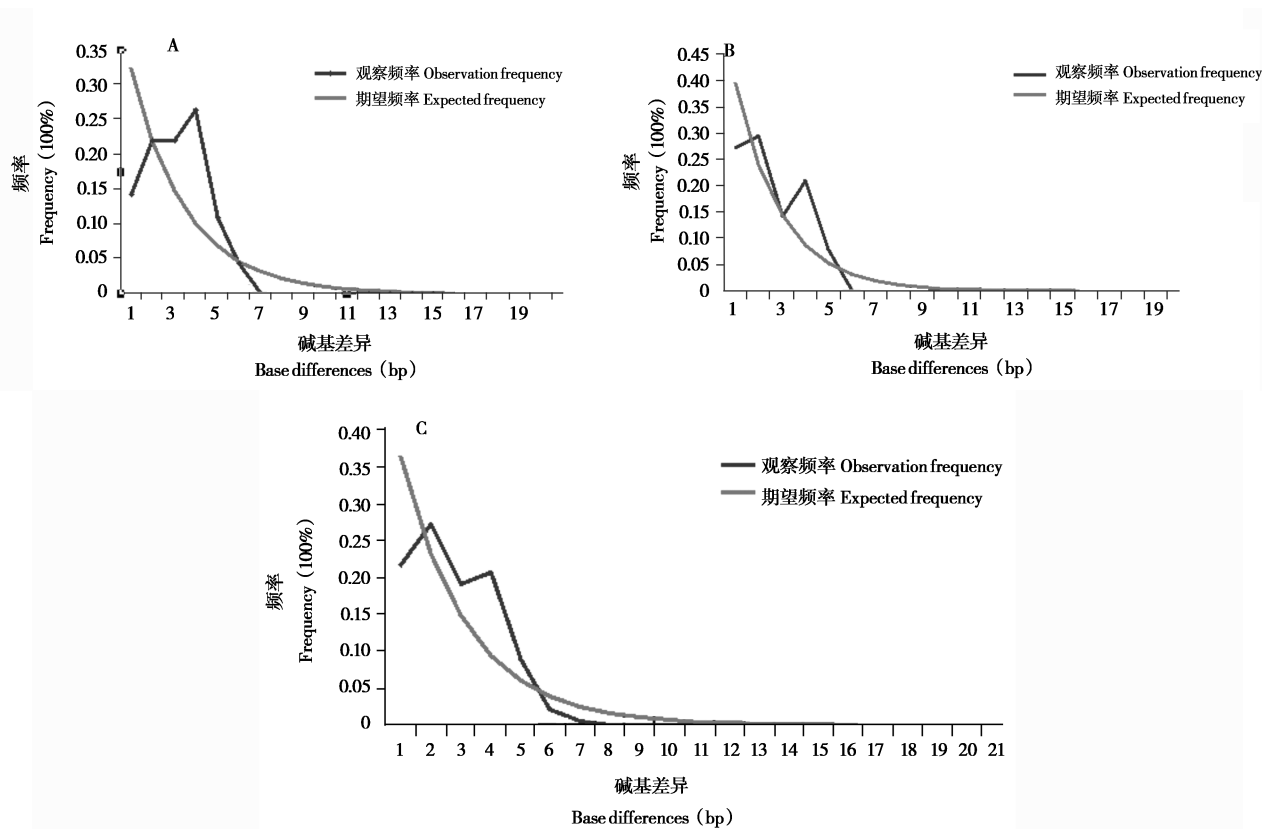


图 3 基因 12S 序列对西氏贝蛔虫的歧点多态性分析结果图。A、B 和 C 分别是岷山、邛崃及全部样本序列的歧点分析结果图；横坐标代表序列间的碱基成对差异数，纵坐标代表成对比较的相对频率；——为期望的扩张分布，——为观察到的实际分布

Fig. 3 Mismatch distributions of pairwise nucleotide differences for *B. schroederi* using the 12S gene. Mismatch distributions of A, B, C are observed and simulated for Minshan, Qionglai, and both, respectively. The horizontal axis represents the number of pairwise differences, and the vertical axis represents the relative frequencies of pairwise comparisons. —— represents the distributions expected for an expanding population; —— represents the observed mismatch distribution

3 讨论

大熊猫是野生动物保护的“旗舰”物种，西氏贝蛔虫作为大熊猫最为常见的肠道寄生虫，对野生和圈养大熊猫危害极大，是影响大熊猫种群变化的重要因素之一（Zhang *et al.*, 2008；杨光友和张志和，2013）。然而由于寄生虫与宿主间存在广泛的协同进化关系（刘汉生等，2008；黄丽琴和郭宪国，2009），西氏贝蛔虫是否也存在与大熊猫相适应的亚种分化目前仍然是一个值得关注和研究的课题。它的解答不仅对不同区域大熊猫西氏贝蛔虫病的监控提供指导，而且对保护大熊猫这一珍稀物种也将产生现实而又重要的意义。为此，本研究以大熊猫的两大聚居群——邛崃及岷山种群作为研究对象，并首次对采自该区域（邛崃及岷山）的 34 株大熊猫西氏贝蛔虫的 12S 基因全序列进行了扩增和种群遗传多样性分析。单倍型多样性指数（ Hd ）和核苷酸多样性指数（ Pi ）是常用的遗传多样性和分化评估指标，其值越高通常表示所研究的种群遗传多样性越丰富；反之越低。表 2 的结果清楚地显示，岷山和邛崃两大山系的西氏贝蛔虫种群具有较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性（ $Pi < 0.01$ ）。这种特点在海洋鱼类和软体动物的种群遗传结构研究中比较常见（Liu *et al.*, 2006），但在哺乳动物和线虫的种群遗传结构研究中出现的较少。该现象出现的原因可能与种群经历过瓶颈效应或是种群分化时间不长未能积累足够的变异有关。另外，寄生虫的种群分化与其宿主的迁移也紧密相关，宿主的迁移不可避免的会导致寄生虫种群的扩张（Falk and Perkins *et al.*, 2013）。在历史上，大熊猫曾在更新世中期和晚期广泛分布于我国东南部的长江、黄河和珠江流域，而后由于气候变化和人为活动的影响，大熊猫种群不断缩小、迁移；到近代，大熊猫仅局限于秦岭、岷山、邛崃、大相岭、小相岭和凉山六大山系（国家林业局，2006；Zhou *et al.*, 2013）。Zhao 等（2013）对上述地区大熊猫进行了全基因组测序分析，结果显示不仅仅是秦岭山系大熊猫出现了分化，而且岷山与邛崃大熊猫也出现了分化。然而有趣的是，与宿主大熊猫的遗传分化相反，我们的 AMOVA 分析显示西氏贝蛔虫在遗传多样性方面缺乏比较明显的按地理单元划分的地理分布格局特性，或许这与该物种较强的

适应力有关，即在不同环境下该蛔虫仍可快速扩散，从而其种群显示出较浅的分化和较低的多样性。同时，该结果也间接地说明大熊猫与西氏贝蛔虫在进化上存在不同步性。这些推论（低的种群分化和多样性）在理论上为我们实施不同区域大熊猫蛔虫病的统一防控提供了一定参考，然而考虑到本研究是从单基因水平探讨西氏贝蛔虫种群分化，或许将来更多的基因（包括核基因（ITS）和线粒体基因（mtDNA））和虫体样本应该被考虑并应用于测试该结论。

此外，西氏贝蛔虫的遗传多样性也与种群间基因流的发生强度有关。通常，基因流 Nm 值大于 1 表明种群间存在高水平的基因交流，并且足以抵制遗传漂变的作用，这也预示着种群分化的可能性比较小（Guilherme *et al.*, 2012）。在本次研究中，岷山和邛崃山系间的 12S 基因流 Nm 值为 64.71，提示两大山系的西氏贝蛔虫种群分化较低，这一结果也支持上述遗传多样性分析结论，进一步肯定了两种可能发生的情况：一是西氏贝蛔虫种群间的迁移或扩散（被动地）频率很高，以至于克服了遗传漂变对种群的分化效应；二是所研究的西氏贝蛔虫种群经历过一次种群扩张过程，但还没有足够的时间达到种群迁移与漂变的平衡状态。值得注意的是，上述推测在一定程度上也符合因大熊猫自身繁殖行为（雌雄间的跨区域交配）（Wildt *et al.*, 2006；张志和和魏辅文，2006；Wei *et al.*, 2015）以及西氏贝蛔虫独特的生活史特征（直接发育）（杨光友和张志和，2013；Xie *et al.*, 2013）而造成的不同区域蛔虫种群存在基因交流的情况。因为在自然条件下雄性成年大熊猫常因繁殖行为而跨区域与雌性熊猫进行交配，从而被动地增加了不同区域大熊猫蛔虫的交叉感染；不同蛔虫种群个体因而有机会进行“杂交”，以致彼此间基因交流频繁， Nm 值较高。当然，进一步证实该现象需要更多的分子遗传证据以及分子流行病学调查结果。

最后，在进行西氏贝蛔虫种群历史动态分析时，作者同时采用多种中性检验统计来进行分析。如表 2 中所示，除邛崃山系种群的西氏贝蛔虫 $Fu's F_s$ 和 $Tajima's D$ 负值不显著外，其余均为显著的负值。因此，我们推测西氏贝蛔虫过去经历了种群扩张；同时，以古老单倍型 S1 为中心呈星状分布的单倍型网络进化图也进一步佐证了西氏贝蛔虫种

群经历过有效数量的突增长过程。此外, 尽管歧点分布图呈现多峰型, 但统计参数 RG 和 SSD 却拒绝了种群扩张零的假设。而对于多峰分布图的产生而言, 其原因可能是由于样本量较小所致。最后, 西氏贝蛔虫种群群体间呈现较高的基因交流、较低的遗传变异, 表明其未分化出新的亚种; 同时, 西氏贝蛔虫在近期历史内出现的种群有效数量增长现象也暗示该物种在经历瓶颈阶段后可以迅速由极少数个体建立形成庞大的种群。综上所述, 由于不同地理分布的西氏贝蛔虫种群间存在广泛的基因交流和较低的遗传多样性, 故岷山和邛崃山系大熊猫体内寄生的西氏贝蛔虫种群分化不明显。同时, 研究还表明西氏贝蛔虫(寄生虫)与大熊猫(宿主)间的确存在不一致的进化速率。这些结果为大熊猫西氏贝蛔虫病的监控及相关研究提供了基础资料, 并在一定程度上为将来实施不同山系大熊猫西氏贝蛔虫病的统一防控奠定了基础, 丰富了大熊猫保护生物学内容。

参考文献:

- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Bio Evol*, **16** (1): 37–48.
- Excoffier L, Lischer H E. 2010. Arlequin suite ver 3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, **10** (3): 564–567.
- Farias I P, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A. 2001. The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *J Mol Evol*, **53** (2): 89–103.
- Falk B G, Perkins S L. 2013. Host specificity shapes population structure of pinworm parasites in Caribbean reptiles. *Mol Ecol*, **22** (17): 4576–4590.
- He G, Wang T, Yang G, Fei Y, Zhang Z, Wang C, Yang Z, Lan J, Luo L, Liu L. 2009. Sequence analysis of *Bs-Ag2* gene from *Baylisascaris schroederi* of giant panda and evaluation of the efficacy of a recombinant *Bs-Ag2* antigen in mice. *Vaccine*, **27** (22): 3007–3011.
- He G, Chen S, Wang T, Yan Y, Zhang Z, Li D, Yu H, Xie Y, Wang C, Gu X, Wang S, Peng X, Yang G. 2012. Sequence analysis of the *Bs-Ag1* gene of *Baylisascaris schroederi* from the giant panda and an evaluation of the efficacy of a recombinant *Baylisascaris schroederi* *Bs-Ag1* antigen in mice. *DNA Cell Biol*, **31** (7): 1174–1181.
- He G Z, Niu L L, Yang G Y, Deng J B, Wang S, Yu X M, Wang T, Gu X B, Chen W G. 2008. Sequence analysis of ITS-2 rDNA of roundworms from *Ailuropoda melanoleuca* and seven rare wild animals. *Chin Vet Sci*, **38** (11): 933–938. (in Chinese)
- Huang L Q, Guo X G. 2009. Coevolution between parasites and their hosts. *Int J Parasit Dis*, **36** (1): 49–54. (in Chinese)
- Iorio R, Slapeta J, Otranto D, Paoletti B, Giangaspero A, Traversa D. 2009. Phylogenetic relationships of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* (Spirurida: Habronematidae) within the order Spirurida inferred using mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene analysis. *Parasitol Res*, **104** (5): 979–984.
- Khan A, Dubey J P, Su C, Ajioka J W, Rosenthal B M, Sibley L D. 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol*, **41** (6): 645–655.
- Li Y, Niu L, Wang Q, Zhang Z, Chen Z, Gu X, Xie Y, Yan N, Wang S, Peng X, Yang G. 2012. Molecular characterization and phylogenetic analysis of ascarid nematodes from twenty one species of captive wild mammals based on mitochondrial and nuclear sequences. *Parasitology*, **139** (10): 1329–1338.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25** (11): 1451–1452.
- Lin Q, Li H M, Gao M, Wang X Y, Ren W X, Cong M M, Tan X C, Chen C X, Yu S K, Zhao G H. 2012. Characterization of *Baylisascaris schroederi* from Qinling subspecies of giant panda in China by the first internal transcribed spacer (ITS-1) of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol Res*, **110** (3): 1297–1303.
- Liu J X, Gao T X, Zhuang Z M, Jin X S, Yokogawa K, Zhang Y P. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Ausalian anchovy (*Engraulis australis*). *Mol Phylogenet Evol*, **40** (3): 712–723.
- Liu H S, Chen Z B, Hu Z H, Lin X T. 2003. Status and prospect for researching coevolution of parasite and host. *Ecol Sci*, **22** (3): 261–264. (in Chinese)
- Niu L L, Li Y, Gu X B, Yu H, Deng J B, Yan H J, Yu X M, Chen W G, Wang S X, Yang G Y. 2012a. Phylogenetic analysis of ascarids from *Ailuropoda melanoleuca* and five other species of wild mammals based on cytochrome *b* gene. *Chin Vet Sci*, **42** (9): 895–899. (in Chinese)
- Niu L L, Chen S J, Wang T, Gu X B, Yan Y B, Yu H, Deng J B, Yan H J, Yu X M, Chen W G, Wang S X, Yang G Y. 2012b. Genetic relationship of Ascarid nematodes from giant panda and seven other species of captive wild mammals based on *COX I* and *COX II* genes. *Acta Vet Et Zootech Sin*, **43** (10): 1645–1650. (in Chinese)
- Santos G B, Soares Mdo C, de F Brito E M, Rodrigues A L, Siqueira N G, Gomes-Gouvêa M S, Alves M M, Carneiro L A, Malheiros A P, Póvoa M M, Zaha A, Haag K L. 2012. Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol*, **42** (13–14): 1115–1118.
- Sprenst J F A. 1968. Notes on *Ascaris* and *Toxacaris*, with a definition of *Baylisascaris* gen. nov. *Parasitology*, **58** (1): 185–198.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol Biol Evol*, **28** (10): 2731–2739.
- Wang N, Li D S, Zhou X, Xie Y, Liang Y N, Wang C D, Yu H, Chen S J, Yan Y B, Gu X B, Wang S X, Peng X R, Yang G Y. 2013. A sensitive and specific PCR assay for the detection of *Baylisascaris schroederi* eggs in giant panda feces. *Parasitol Int*, **62** (5): 435–436.
- Wang T, He G, Yang G, Fei Y, Zhang Z, Wang C, Yang Z, Lan J, Luo L, Liu L. 2008. Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Baylisascaris schroederi* Bs-Ag3 antigen in mice. *Vaccine*, **26** (52): 6919–6924.
- Wei F W, Hu Y B, Yan L, Nie Y G, Wu Q, Zhang Z J. 2015. Giant pandas are not an evolutionary cul-de-sac: evidence from multidisciplinary research. *Mol Biol Evol*, **32** (1): 4–12.
- Wildt D E, Zhang A J, Zhang H M, Janssen D L, Ellis S. 2006. Giant Pandas: Biology, Veterinary Medicine and Management. Cambridge: Cambridge University Press.
- Xie Y, Chen S, Yan Y, Zhang Z, Li D, Yu H, Wang C, Nong X, Zhou X, Gu X, Wang S, Peng X, Yang G. 2013. Potential of recombinant inorganic pyrophosphatase antigen as a new vaccine candidate against *Baylisascaris schroederi* in mice. *Vet Res*, **44**: 90.
- Xie Y, Zhang Z, Wang C, Lan J, Li Y, Chen Z, Fu Y, Nie H, Yan N, Gu X, Wang S, Peng X, Yang G. 2011. Complete mitochondrial genomes of *Baylisascaris schroederi*, *Baylisascaris ailuri* and *Baylisascaris transfuga* from giant panda, red panda and polar bear. *Gene*, **482** (1–2): 59–67.
- Yang G Y. 1998. Research progress of giant panda parasites and parasitic diseases. *Chin Vet Sci*, **18** (2): 206–208. (in Chinese)
- Yang G Y, Zhang Z H. 2013. Parasitic Diseases of Wildlife. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- Zhang J S, Daszak P, Huang H L, Yang G Y, Kilpatrick A M, Zhang S. 2008. Parasite threat to panda conservation. *Ecohealth*, **5** (1): 6–9.
- Zhang L, Yang X, Wu H, Gu X, Hu Y, Wei F. 2011. The parasites of giant pandas: individual-based measurement in wild animals. *J Wildl Dis*, **47** (1): 164–171.
- Zhang Z H, Wei F W. 2006. Giant Panda Ex-situ Conservation Theory and Practice. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- Zhao G H, Li H M, Ryan U M, Cong M M, Hu B, Gao M, Ren W X, Wang X Y, Zhang S P, Lin Q, Zhu X Q, Yu S K. 2012. Phylogenetic study of *Baylisascaris schroederi* isolated from Qinling sub-species of giant panda in China based on combined nuclear 5.8S and the second internal transcribed spacer (ITS–2) ribosomal DNA sequences. *Parasitol Int*, **61** (3): 497–500.
- Zhao S, Zheng P, Dong S, Zhan X, Wu Q, Guo X, Hu Y, He W, Zhang S, Fan W, Zhu L, Li D, Zhang X, Chen Q, Zhang H, Zhang Z, Jin X, Zhang J, Yang H, Wang J, Wang J, Wei F. 2013. Whole-genome sequencing of giant pandas provides insights into demographic history and local adaptation. *Nat Genet*, **45** (1): 67–71.
- Zhou X, Yu H, Wang N, Xie Y, Liang Y N, Li D S, Wang C D, Chen S J, Yan Y B, Gu X B, Wang S X, Peng X R, Yang G Y. 2013. Molecular diagnosis of *Baylisascaris schroederi* infections in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) feces using PCR. *J Wildl Dis*, **49** (4): 1052–1055.
- Zhou X, Xie Y, Zhang Z H, Wang C D, Sun Y, Gu X B, Wang S X, Peng X R, Yang G Y. 2013. Analysis of the genetic diversity of the nematode parasite *Baylisascaris schroederi* from wild giant pandas in different mountain ranges in China. *Parasit Vectors*, **6**: 233.
- 国家林业局. 2006. 全国第三次大熊猫调查报告. 北京: 科学出版社.
- 何光志, 牛李丽, 杨光友, 邓家波, 王帅, 余星明, 汪涛, 古小彬, 陈维刚. 2008. 大熊猫等八种野生珍稀动物蛔虫 ITS–2 基因的序列分析. *中国兽医科学*, **38** (11): 933–938.
- 黄丽琴, 郭宪国. 2009. 宿主与寄生虫的协同进化关系. *国际医学寄生虫病杂志*, **36** (1): 49–54.
- 刘汉生, 陈智兵, 胡朝晖, 林小涛. 2003. 寄生虫及其宿主协同进化的研究进展. *生态科学*, **22** (3): 261–264.
- 牛李丽, 李岩, 古小彬, 余华, 邓家波, 严慧娟, 余星明, 陈维刚, 王淑贤, 杨光友. 2012a. 基于 Cyt b 基因对大熊猫等六种珍稀野生动物感染蛔虫的种系发育分析. *中国兽医科学*, **42** (9): 895–899.
- 牛李丽, 陈世界, 汪涛, 古小彬, 严玉宝, 余华, 邓家波, 严慧娟, 余星明, 陈维刚, 王淑贤, 杨光友. 2012b. 大熊猫等八种野生哺乳动物蛔虫的线粒体 COX I 和 COX II 基因的亲缘关系分析. *畜牧兽医学报*, **43** (10): 1645–1650.
- 杨光友, 张志和. 2013. 野生动物寄生虫病学. 北京: 科学出版社.
- 杨光友. 1998. 大熊猫寄生虫与寄生虫病研究进展. *中国兽医学报*, **18** (2): 206–208.
- 张志和, 魏辅文. 2006. 大熊猫迁地保护理论与实践. 北京: 科学出版社.