

doi: 10.7541/2021.2020.289

重庆地区眉溪小车轮虫及其与近缘种的比较

夏萍* 唐发辉* 赵元荪

(重庆师范大学生命科学学院, 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要: 通过活体显微观察和银染法, 文章对采自重庆地区不同宿主的眉溪小车轮虫 *Trichodinella myakkae* (Mueller, 1937) Šrámek-Hušek, 1953 的3个株系进行了详细的形态学描述, 并与近缘种周从小车轮虫 *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950) Šrámek-Hušek, 1953 和纤细小车轮虫 *Trichodinella subtili* (Lom, 1959) Lom & Haldar, 1977 进行了比较。结果显示: 眉溪小车轮虫各株系在形态上无明显差异, 但与周从小车轮虫及纤细小车轮虫有明显差异。基于所获眉溪小车轮虫的分子数据, 详细分析了眉溪小车轮虫的分子特征, 研究了眉溪小车轮虫种内分化, 结果显示: 眉溪小车轮虫各株系的18S rDNA序列相似度为99.2%—100%, 遗传距离为0.000—0.003, *T. myakkae* (HM)与*T. myakkae* (AN)的18S rDNA几乎一致, 但*T. myakkae* (PP)与*T. myakkae* (HM和AN)的18S rDNA存在7个变异位点, 且在18S rRNA 四个高变区 (V3、V4、V5和V7) 均具有一致的二级结构构型, 表明三株系的18S rDNA相似度和遗传变异属于种内水平, 但*T. myakkae* (PP)与*T. myakkae* (HM和AN)则显示出分子分化。系统发育分析显示: 眉溪小车轮虫与周从小车轮虫相互独立, 眉溪小车轮虫各株系与其宿主鱼一致的系统发育关系显示出两者具有协同进化的趋势。

关键词: 眉溪小车轮虫; 种内分化; 种类鉴定; 协同进化

中图分类号: Q959.116; S941.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)06-1371-10



车轮虫是一类危害性外寄生纤毛虫, 常寄生于海、淡水鱼类、部分贝类及极少数的腔肠动物; 当感染强度较大时, 可能引发宿主鳃呼吸功能障碍等, 极其严重时可导致宿主死亡^[1-3]。目前车轮虫主要的研究工作大多数仍聚焦于形态分类学方面^[4, 5]。根据Lynn^[6]纤毛虫分类系统, 车轮虫科Trichodinidae包括车轮虫属Trichodina、三分虫属Tripartitella和小车轮虫属Trichodinella等10个属, 其中小车轮虫属因其个体微小且同一物种的不同种群之间齿体差异较大而颇受争议。

眉溪小车轮虫 *Trichodinella myakkae* (Mueller, 1937) Šrámek-Hušek, 1953 隶属于小车轮虫属, 由Mueller于1937年在美国佛罗里达州的大口黑鲈 *Aplites salmoides* 上首次检获并描述^[7-9], 后在小口牛胭脂鱼 *Ictiobus bubalus* 和草鱼 *Ctenopharyngodon*

idellus 等宿主上均有发现^[10, 11], 但迄今均未见任何可供参考的附着盘银染资料 (车轮虫形态学物种鉴定的重要依据); 由于常与其他车轮虫混合感染宿主鱼, 且形态量度也难以与小车轮虫属其他物种相区分, 故难以对其进行种类鉴定。眉溪小车轮虫与周从小车轮虫 *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950) Šrámek-Hušek, 1953 和纤细小车轮虫 *Trichodinella subtili* (Lom, 1959) Lom & Haldar, 1977 形态相似, 有研究认为眉溪小车轮虫是周从小车轮虫或纤细小车轮虫的同物异名^[11-13]。随着分子技术在车轮虫领域的应用, 车轮虫的研究得到进一步发展。2006年Gong等^[14]提交了眉溪小车轮虫的18S rDNA序列 (AY102176), 但由于未提供分子数据对应的原始银染标本, 该序列的有效性仍有待进一步核实^[15, 16]。为此, 本文基于新获得的寄生于多种宿主

收稿日期: 2021-01-04; 修订日期: 2021-06-14

基金项目: 国家自然科学基金(31970409); 重庆市自然科学基金(cstc2018jcyjAX0808); 重庆市教委科学技术研究项目(KJQN201800508)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970409); the National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2018jcyjAX0808); Science & Technology Research Foundation of Education Committee of Chongqing (KJQN201800508)]

作者简介: 夏萍 (1997—), 女, 硕士研究生; 主要从事鱼类寄生虫学研究。E-mail: 1819408667@qq.com 唐发辉 (1979—), 女, 博士; 教授, 主要从事鱼类寄生虫学研究。E-mail: trichodina@126.com *共同第一作者

通信作者: 赵元荪, E-mail: zhaoyuanjuncqnu@126.com

的小车轮虫形态学和分子数据,描述了眉溪小车轮虫的形态和分子特征,并进行了系统发育分析。

1 材料与方法

1.1 采集与鉴定

宿主鱼鲢*Hypophthalmichthys molitrix*和鳙*Aristichthys nobilis*于2019年6月采自重庆江津区同一养殖渔场(29°18'N, 106°16'E), 宿主鱼麦穗鱼*Pseudorasbora parva*于2019年8月采自重庆沙坪坝区(29°52'N, 106°44'E), 且上述宿主鱼均处于幼鱼期(体长约8—13 cm)。活体宿主鱼带回实验室解剖后, 使用体视显微镜(NIKON SMZ1500)进行车轮虫的活体观察, 并进行鳃涂片, 待自然空干后采用修订版干银法对鳃组织涂片进行附着盘的形态学染色^[17]。利用全自动光学显微镜(LEICA DM6000B)进行车轮虫附着盘的显微照片拍摄。采用“统一特定方法”对所获车轮虫样本进行形态学数据的测量与统计^[18]。齿体定位线条图利用软件CorelDRAW X8绘图完成。根据Van As和Basson提出, 唐发辉等^[19, 20]完善的方法进行齿体特征的描述。

1.2 主成分分析

使用PAST 3软件对眉溪小车轮虫各株系虫体直径、附着盘直径、缘膜宽、齿环直径、齿体纵长、齿长、齿钩长、齿锥宽、齿棘长、辐线数及齿体数11项形态学特征进行主成分分析(PCA), 利用变异协方差矩阵生成置信度为95.0%的散点图。

1.3 DNA提取、扩增与测序

在光学显微镜下使用玻璃微吸管吸取单只车轮虫, 无菌水洗涤纯化后采用试剂盒提取DNA (REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit), -20℃冻

存。PCR体系: 2×*Taq* PCR预混液 (2×*Taq* Master Mix, Novoprotein, E005-02B) 6.25 μL, 引物各0.5 μL, 模板DNA 2 μL, 超纯水补足至25 μL体系。PCR反应程序为94℃预变性1min 30s; 94℃变性20s, 56℃退火20s, 72℃延伸2min, 35个循环; 72℃再延伸5min。18S rDNA的扩增引物为: 82F (5'-GAAACTG GGAATGGCTC-3') 和LSUR (5'-GTTAGTTTCTT TTCCTCCGC-3')^[21]; ITS-5.8S rDNA的扩增引物为: ERIB10-V (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGGAAG-3') 和28S1R (5'-GTGTTTCAAGACGGGTTCG-3')^[22]。扩增产物直接送至英潍捷基生物科技有限公司进行测序。

1.4 分子特征分析

在GenBank数据库中进行序列的同源性比对; 应用DAMBE7.2.136软件分析碱基替代饱和性; 采用MEGA6.0进行遗传距离(K-2-P模型)的计算及序列变异位点的分析; 使用BioEdit7.0.5.3进行18S rDNA的GC含量计算; 18S rRNA二级结构的预测基于RNA structure5.2完成, 所有参数均设置为默认, 选取自由能最低的模型并利用RNA Viz2.0参照European Ribosomal RNA Database手动调整完成^[23]。

1.5 系统进化分析

共选取63条序列使用BI (Bayesian Inference) 及ML (Maximum Likelihood) 构建18S rDNA系统发育树, 序列包括眉溪小车轮虫三株系共5条18S rDNA序列, 及在GenBank数据库中选的同源性较高的分子序列, 其余序列参照文献^[24]进行选取, 外群选取大肾形虫*Colpoda magna* (EU039896)与毛板壳虫*Coleps hirtus* (AM292311)。采用GTR+I+G模型在MrBayes3.1.2软件中构建BI树, 运行300万

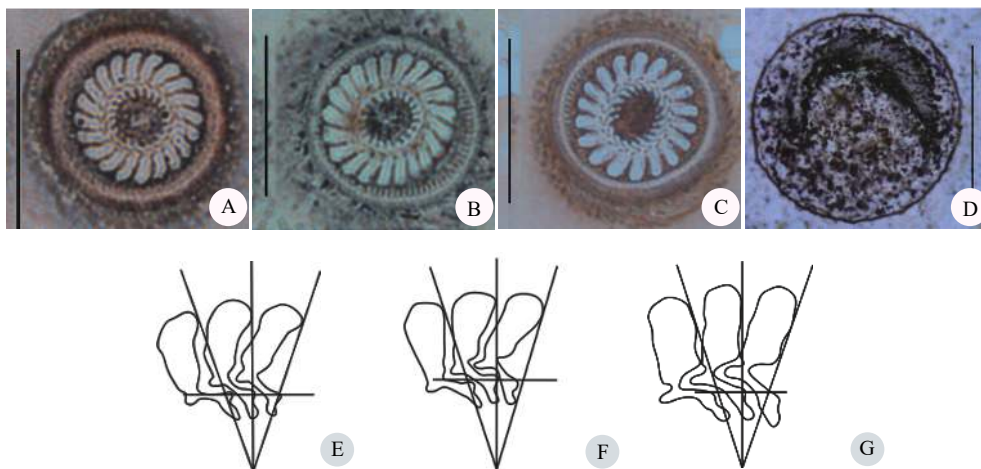


图1 眉溪小车轮虫附着盘的银染显微结构图及齿体定位图(本研究)

Fig. 1 Photomicrographs of silver impregnated specimen and denticle diagrammatic drawings of *T. myakkae*

A, E: 眉溪小车轮虫(HM); B, F: 眉溪小车轮虫(AN); C, G: 眉溪小车轮虫(PP); D: 眉溪小车轮虫口围绕度; 比例尺=10 μm
A, E: *T. myakkae* (HM); B, F: *T. myakkae* (AN); C, G: *T. myakkae* (PP); D: Adoral ciliary spiral turns of *T. myakkae*; Scale bar=10 μm

代, 每200代抽样1次, 舍弃前25.0%样本。通过在线工具The CIPRES Science Gateway V.3.3 (<http://www.phylo.org/>), 在RAxML-HPC2 XSEDE (8.2.12) 下构建ML树^[25, 26], 使用GTR+G模型进行1000次自举(Bootstrap)重复检测。利用FigTree v1.4.2显示系统发育树的拓扑结构, 使用Photoshop CS3美化树图。同理, 在GenBank数据库中选取鲢、鳙、草鱼及麦穗鱼线粒体16S rDNA序列各2条, 以奇额墨头鱼 *Garra mifrontis* (GU168764) 为外群构建宿主鱼的BI树。

2 结果

2.1 形态学描述

株系1: 眉溪小车轮虫 *Trichodinella myakkae* (HM; 图 1A和表 1)

采集地: 重庆江津区

采集时间: 2019年6月

宿主及寄生部位: 鲢; 鳃表

感染率: 100% (15/15)

感染强度: 中度 (车轮虫感染强度的划分标准:

光学显微镜下放大10×10倍后1个视野内平均虫体数为0—5为轻度; 虫体数5—10为中度; 虫体数>10为重度, 后同)。

形态学描述 ($n=13$): 该种虫体小型, 虫体直径(19.8 ± 1.1) μm ($17.2\text{—}21.9$ μm), 附着盘直径(16.5 ± 1.2) μm ($14.5\text{—}18.1$ μm), 齿环直径(8.1 ± 0.6) μm ($7.3\text{—}9.9$ μm), 缘膜宽(1.8 ± 0.5) μm ($1.2\text{—}2.9$ μm)。染色后附着盘齿体形态清晰, 无明显的中央颗粒; 齿钩部分发达, 略成长方形, 齿钩长(3.4 ± 0.3) μm ($2.9\text{—}3.9$ μm); 齿钩前缘超过Y+1轴, 前后缘稍弯曲, 多数齿钩外切缘略高于钝圆的骨突, 存在钩突且钩突较为发达, 无明显后突起, 齿钩连接纤细; 齿锥较发达, 齿锥宽(0.8 ± 0.2) μm ($0.4\text{—}1.1$ μm), 齿锥顶点钝圆略超Y轴; 齿棘短且纤细, 齿棘长(1.0 ± 0.3) μm ($0.7\text{—}1.5$ μm), 齿棘后倾斜不及Y轴与Y-1轴距离的一半, 无明显棘突; 口围绕度 $190^\circ\text{—}210^\circ$ 。

株系2: 眉溪小车轮虫 *Trichodinella myakkae* (AN; 图 1B和表 1)

采集地: 重庆江津区

采集时间: 2019年6月

表 1 眉溪小车轮虫三株系、纤细小车轮虫及周丛小车轮虫形态学特征统计 (测量单位: μm)

Tab. 1 Morphological characteristics of three strains of *T. myakkae*, *T. subtilis* and *T. epizootica* (measurement unit: μm)

小车轮虫种类 <i>Trichodinella</i> spp.	眉溪小车轮虫 <i>T. myakkae</i> (HM)	眉溪小车轮虫 <i>T. myakkae</i> (AN)	眉溪小车轮虫 <i>T. myakkae</i> (PP)	眉溪小车轮虫 <i>T. myakkae</i>	纤细小车轮虫 <i>T. subtilis</i>	周丛小车轮虫 <i>T. epizootica</i>
宿主Host	鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	鳙 <i>Aristichthys nobilis</i>	麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	大口黑鲈 <i>Aplitessal moides</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	鲫 <i>Carassius auratus</i>
采集地点 Localization	重庆江津	重庆江津	重庆沙坪坝	美国佛罗里达州	四川宜宾	重庆沙坪坝
寄生部位 Location	鳃	鳃	鳃	鳃	鳃	鳃
虫体直径 Body diameter	17.2—21.9 (19.8±1.1)	16.3—21.9 (18.9±1.2)	15.2—21.6 (18.6±1.7)	19.0—26.0 (22.0±2.2)	19.5—22.5 (21.9±0.2)	22.0—30.0 (25.3±2.9)
附着盘直径 Adhesive disc	14.5—18.1 (16.5±1.2)	12.7—17.2 (14.8±1.8)	11.5—18.2 (14.0±1.7)	/	14.5—18.0 (16.6±0.4)	18.0—26.0 (21.6±2.8)
齿环直径 Denticular ring	7.3—9.9 (8.1±0.6)	6.2—7.8 (6.9±0.5)	5.5—7.7 (6.3±0.7)	/	10.0—11.0 (10.5±0.5)	10.0—13.0 (11.8±1.0)
缘膜宽 Border membrane	1.2—2.9 (1.8±0.5)	1.6—2.5 (2.0±0.2)	1.5—2.4 (1.8±0.3)	/	1.0—2.0 (1.7±0.4)	1.0—2.0 (1.9±0.35)
齿体数 Denticle number	18—20 (13)	17—20 (15)	17—22 (15)	18—22 (10)	21—22 (12)	22—23
辐线数 Radial pinsper	4	4	4	4	4	4—5
齿体纵长 Denticle span	4.4—5.6 (5.2±0.4)	4.1—5.5 (4.7±0.4)	3.7—5.2 (4.4±0.5)	/	4.0—5.0 (4.7±0.6)	5.0—6.0 (5.5±0.6)
齿长 Denticle length	1.4—2.2 (1.9±0.2)	1.7—2.7 (1.9±0.3)	1.7—2.5 (2.0±0.2)	/	2.5—3.0 (2.7±0.3)	3.0—5.0 (4.2±1.0)
齿钩长 Blade length	2.9—3.9 (3.4±0.3)	2.8—4.3 (3.5±0.4)	2.5—4.2 (3.3±0.4)	/	2.5—3.5 (2.8±0.5)	/
齿锥宽 Central part width	0.4—1.1 (0.8±0.2)	0.4—0.9 (0.6±0.2)	0.3—0.8 (0.5±0.1)	/	1.0—1.5 (1.1±0.2)	1.0—2.0 (1.5±0.3)
齿棘长 Ray length	0.7—1.5 (1.0±0.3)	0.5—1.2 (0.7±0.2)	0.4—1.0 (0.7±0.1)	/	0.5—1.5 (0.9±0.3)	0.6—0.8 (0.7±0.1)
资料来源 Resources	本研究	本研究	本研究	Mueller, 1937 ^[5]	齐欢等, 2011 ^[18]	赵元蓉等, 2007 ^[19]

注: 统计模式为最小值-最大值(平均值±标准差); “/”无描述或无数据

Note: The statistic mode is mix-max (mean±SD); “/”. No description or data

宿主及寄生部位: 鳙; 鳃表

感染率: 100% (18/18)

感染强度: 中度

形态学描述 ($n=15$): 小型淡水车轮虫, 齿体形态与 *T. myakkae* (HM) 株系相比, 本株系齿钩外切缘不圆滑, 这可能与染色时间相关, 但多数仍高于骨突; 齿钩前后缘平滑, 钩突显著且略为尖锐, 无明显后突起, 钩突与上个齿体形成的凹口嵌合较为紧密。形态学测量数据详见表 1。

株系3: 眉溪小车轮虫 *Trichodinella myakkae* (PP; 图 1C和表 1)

采集地: 重庆沙坪坝区

采集时间: 2019年8月

宿主及寄生部位: 麦穗鱼; 鳃表

感染率: 38.4% (4/11)

感染强度: 轻度

形态学描述 ($n=15$): 虫体小型与其他株系相比, 本株系齿钩更为发达, 整个齿钩几近填满Y轴与Y+1轴间的空间; 该种具有较为光滑的齿钩前后缘, 且其齿钩外切缘向上凸, 高于钝圆骨突; 齿钩连接较其他株系更为纤细, 钩突更为发达, 钩突向前与上个齿体形成的凹口嵌合疏松, 齿棘短但并不尖锐。形态学测量数据详见表 1。

2.2 眉溪小车轮虫三株系的主成分分析

主成分分析结果显示本研究获得的眉溪小车轮虫3个株系的形态学特征 (虫体直径、附着盘直径、缘膜宽、齿环直径、齿体纵长、齿长、齿钩长、齿锥宽、齿棘长、辐线数及齿体数) 构建的散点图高度重叠 (图 2)。

2.3 18S rDNA与ITS-5.8S rDNA分子特征

本研究已测定并提交于GenBank的眉溪小车轮虫相关DNA序列信息详见表 2。眉溪小车轮虫3个株系均与 *T. myakkae* (AY102176) 最相似 (相似度 $\geq 99.0\%$)。18S rDNA序列相似度及遗传距离显示, 3个株系间的序列相似度为99.2%—100%, 遗传距离为0.000—0.003。其中, *T. myakkae* (HM)与 *T. myakkae* (AY102176) 之间序列相似度为99.6%, 遗传距离为0.003; *T. myakkae* (AN)与 *T. myakkae* (AY102176) 之间序列相似度为99.6%, 遗传距离为0.003; *T. myakkae* (PP)与 *T. myakkae* (AY102176) 之间序列相似度为99.6%, 遗传距离为0.004。眉溪小车轮虫各序列与 *T. epizootica* (GU906246) 的序列相似度为96.7%—97.7%, 遗传距离为0.017—0.021。GC含量显示本研究所获3株系及 *T. myakkae* (AY102176) 为50.8%—51.2%。

18S rDNA与ITS-5.8S rDNA变异位点显示: 以

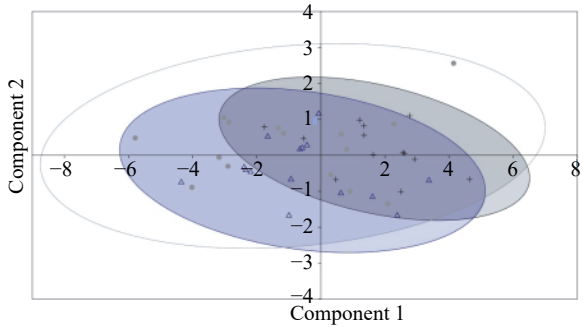


图 2 眉溪小车轮虫三株系形态特征主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of morphometric data of three strains of *T. myakkae*

+. 眉溪小车轮虫 (HM); Δ. 眉溪小车轮虫 (AN); ●. 眉溪小车轮虫 (PP)
+. *T. myakkae* (HM); Δ. *T. myakkae* (AN); ●. *T. myakkae* (PP)

表 2 眉溪小车轮虫三株系18S rDNA和ITS-5.8S rDNA序列登录号

Tab. 2 Accession numbers of 18S rDNA and ITS-5.8S rDNA sequences of three strains of *T. myakkae*

眉溪小车轮虫各株系 Various strains of <i>T. myakkae</i>	样本号 Specimen number	DNA序列号 Accession number	
		18S rDNA	ITS-5.8S rDNA
<i>T. myakkae</i> (HM)	HM1	MW311496	MW311501
	HM2	MW311497	MW311502
<i>T. myakkae</i> (AN)	AN1	MW311498	MW311503
	AN2	MW311499	MW311504
<i>T. myakkae</i> (PP)	PP	MW311500	MW311505

T. myakkae (AY102176) 为参考序列, *T. myakkae* (HM)与 *T. myakkae* (AN) 株系18S rDNA的相同变异位点共有7个, 且 *T. myakkae* (HM) 在第34位也存在变异位点; *T. myakkae* (PP) 有7个变异位点。ITS-5.8S rDNA序列变异位点显示, 以 *T. myakkae* (HM) 为参考序列, *T. myakkae* (AN) 无变异位点, 而 *T. myakkae* (PP) 存在18个变异位点 (图 3)。本研究所获眉溪小车轮虫3株系及 *T. myakkae* (AY102176) 的18S rDNA碱基组成频数显示平均转换频数为3, 颠换为1, 转换高于颠换, 转换率与颠换率之比 $R=2.28 (>2.0)$; 密码子第1、2、3位点转换及颠换频数如表 3所示, 其中第2位点最为保守, 无碱基替换, 故 R 值不可计算。18S rDNA基因碱基替换饱和和曲线如图 4所示, 转换遗传距离(S)大于颠换遗传距离(I), 且其增加速度也大于后者; 转换遗传距离(S)整体呈线性上升趋势, 而颠换遗传距离(I)则趋于稳定。各碱基替换饱和和度情况显示, 替换饱和指数ISS(Index of Substitution Saturation) 小于替换饱和指数临界值ISS.c (the critical ISS value), 且 $P=0.0000$ (差异极显著)。

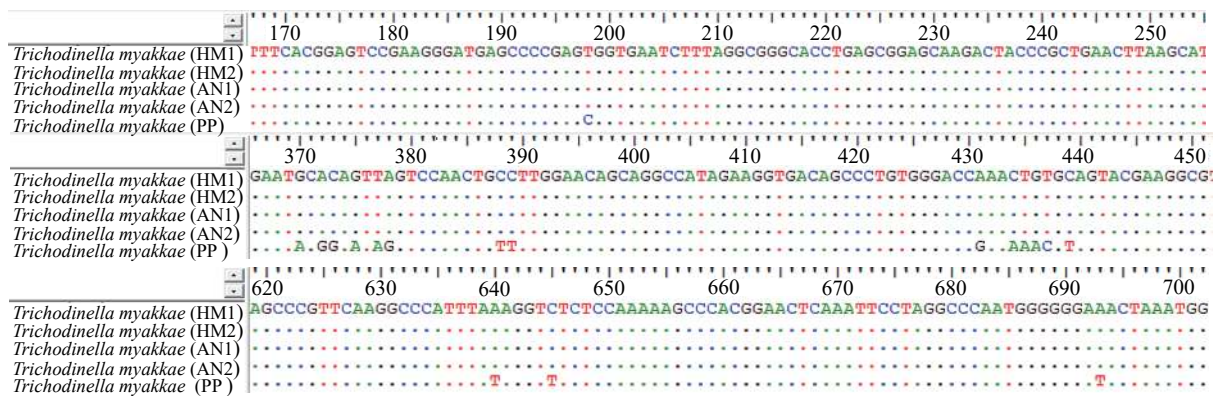


图3 眉溪小车轮虫三株系ITS-5.8S rDNA序列变异位点比较

Fig. 3 Comparison of variation sites among three strains of *T. myakkae* based on ITS-5.8S rDNA sequences

表3 眉溪小车轮虫各株系18S rDNA碱基对数组成频数

Tab. 3 Base pairs composition frequency of *T. myakkae* based on 18S rDNA

频数Frequency	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC
Avg	1527.0	3.0	1.0	2.3	355.0	1.0	1.0	0.0	1.0	335.0
1st	509.0	1.0	1.0	2.1	117.0	1.0	0.0	0.0	0.0	124.0
2nd	510.0	0.0	0.0	nc	130.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.0
3rd	508.0	1.0	1.0	2.5	109.0	0.0	0.0	0.0	0.0	112.0

频数Frequency	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
Avg	0.0	0.0	0.0	0.0	393.0	0.0	0.0	0.0	1.0	444.0
1st	0.0	0.0	0.0	0.0	130.0	0.0	0.0	0.0	0.0	139.0
2nd	0.0	0.0	0.0	0.0	131.0	0.0	0.0	0.0	0.0	151.0
3rd	0.0	0.0	0.0	0.0	133.0	0.0	0.0	0.0	0.0	155.0

注: Avg. 眉溪小车轮虫各株系的平均频率(取整数); 1st、2nd、3rd. 眉溪小车轮虫各株系第1、2、3位点的平均频率(取整数); ii. 相同碱基位点; si. 转换; sv. 颠换; R. 转换/颠换; nc. 不可计算
Note: Avg. Average frequency (rounded) of all *T. myakkae*; 1st, 2nd and 3rd. Average frequency (rounded) of the 1st, 2nd and 3rd of *T. myakkae*; ii. Same base site; si. Conversion; sv. Inversion; R. Conversion/inversion; nc. not computable

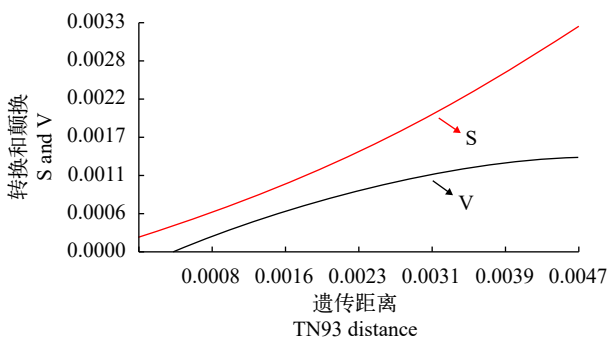


图4 眉溪小车轮虫18S rRNA碱基替换饱和和曲线

Fig. 4 Base substitution saturation curve of 18S rRNA sequence of *T. myakkae*

转换遗传距离(S)和颠换遗传距离(V)为纵坐标, TN93校正遗传距离为横坐标

The transition genetic distance (S) and the transversion genetic distance (V) are ordinate, and the TN93 correction genetic distance is abscissa

所获眉溪小车轮虫3株系及*T. myakkae* (AY102176) 的4个高变区 (V3、V4、V5和V7) 二级结构预测结

果显示: 4个株系在4个高变区二级结构构型相同, 仅在V3、V4和V5区一级结构存在碱基差异; *T. myakkae* (HM)与*T. epizootica* (GU906246)的二级结构显示: 眉溪小车轮虫与周丛小车轮虫在螺旋H17 (V3区) 存在构型差异, 前者在螺旋H17仅有一个侧凸和大发卡环, 而周丛小车轮虫具有两个侧凸和小发卡环 (图5)。

2.4 系统发育分析

基于18S rDNA构建的ML和BI树呈现出一致的拓扑结构 (本文只呈现BI树, 图6A)。本研究的3个株系与*T. myakkae* (AY102176) 聚为一枝 (Clade



图5 眉溪小车轮虫 (HM)与周丛小车轮虫 (GU906246) 18S rRNA二级结构 H17区比较

Fig. 5 Comparison of H17 regions for *T. myakkae* (HM) and *T. epizootica* (GU906246) based on 18S rRNA secondary structure

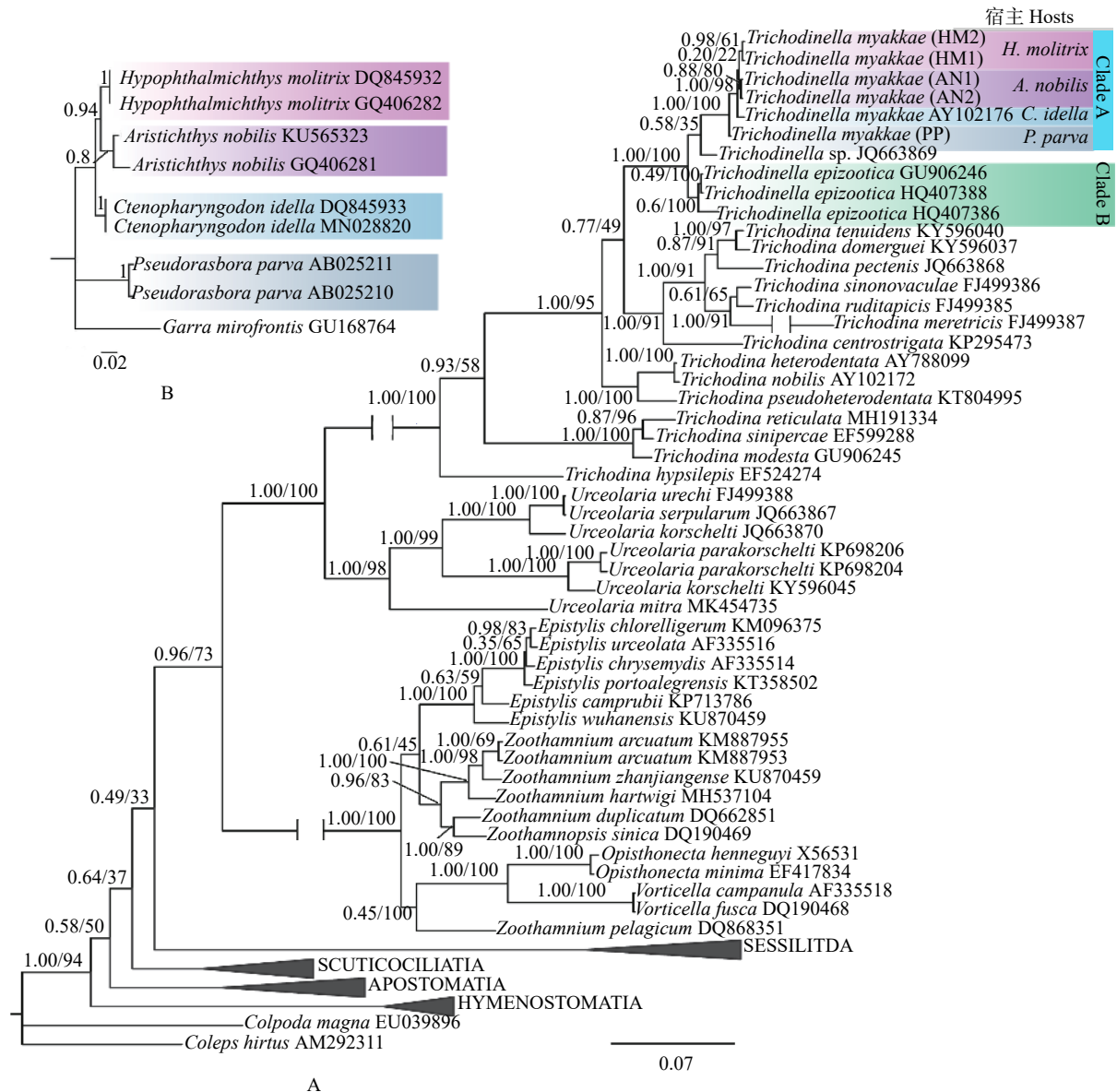


图 6 基于BI法与ML法构建的分子系统发育树

Fig. 6 Molecular phylogenetic tree constructed by BI and ML method

A. 基于BI法与ML法构建的纤毛虫核糖体18S rDNA系统发育树; B. 基于BI法构建的宿主鱼类线粒体16S rDNA系统发育树; 节点表示支持率; 物种名后为GenBank登录号

A. Ciliate phylogenetic tree based on ribosomal 18S rDNA sequences by BI and ML method; B. Fish phylogenetic tree based on mitochondrial 16S rDNA sequences by BI method; The nodes represent support value; Species names are followed by the GenBank accession numbers

A), 且位于系统发育树的顶部, 具有高支持率。Clade A中, 宿主为鲢的 *T. myakkae* (HM1) 和 *T. myakkae* (HM2) 及宿主为鳊的 *T. myakkae* (AN1) 和 *T. myakkae* (AN2) 分别聚枝后再形成姐妹枝, 后与宿主为草鱼的 *T. myakkae* (AY102176) 聚枝后再与宿主为麦穗鱼的 *T. myakkae* (PP) 聚枝。Clade A与小车轮虫未定种 *Trichodinella* sp. (JQ663869) 聚为一枝后再与由周丛小车轮虫构成的支系Clade B互为姐妹枝, 并具有高支持率。基于线粒体16S rDNA

构建的具有高支持率的鱼类系统发育树显示, 鲢枝、鳊枝先聚为一小枝后再与草鱼枝互为姐妹枝, 最后再与麦穗鱼枝聚枝(图 6B)。

3 讨论

3.1 眉溪小车轮虫的种类鉴定及与近缘种的比较

口围绕度为车轮虫口面区口围带盘绕程度, 是车轮虫科中属间分类的重要依据, 本研究获虫种口围绕度落入了小车轮虫属 180° — 270° 的范围^[27-29];

附着盘银染标本显示该种具有小车轮虫属较直的齿钩、纤细的齿锥和短小的齿棘等典型特征^[28, 30], 遗传距离和序列相似度显示: 本物种与周丛小车轮虫属于种间水平; GC含量均超过50.0%, 符合Tang和Zhao^[31]所总结的小车轮虫属GC含量区间; 基于18S rDNA构建的系统发育树同样显示: 本研究所获物种与周丛小车轮虫及小车轮虫未定种聚为小车轮虫枝系。综合上述形态学、分子特征及系统发育分析表明本研究所获物种应隶属于小车轮虫属。Mueller^[32]在1937年报道眉溪小车轮虫时, 国际无统一的形态学描述方法, 因此原始株系描述并不完善且缺乏附着盘银染图, 但基于已有的原始形态学特征描述显示: 本研究所获物种除具有齿棘外, 其辐线数、齿体数目和虫体大小等鉴别性特征均与眉溪小车轮虫原始株系一致, 且本研究物种齿钩较直, 有明显的突起等特征也与之相符^[5]。综上, 本研究所获物种应为眉溪小车轮虫, 并且本研究中的宿主鱼——麦穗鱼为眉溪小车轮虫的宿主新记录。

本研究所涉眉溪小车轮虫, 与近缘种周丛小车轮虫、纤细小车轮虫形态比较相似, 但眉溪小车轮虫的虫体直径、附着盘直径、齿环直径、齿长和齿锥宽等形态特征均小于周丛小车轮虫及纤细小车轮虫, 且齿体数区间并不重合。结合齿体定位图分析, 眉溪小车轮虫纤细较直的齿棘与周丛小车轮虫弯钩状齿棘不同; 眉溪小车轮虫仅具有1个前突起, 区别于纤细小车轮虫具向前的2个突起(钩突与齿锥前突起)这一鉴别性特征^[33]; 同时, 眉溪小车轮虫的口围绕度(190° — 210°)也大于纤细小车轮虫(170° — 190°)及周丛小车轮虫(180° — 190°)的口围绕度^[10, 11, 33, 34], 故基于形态学分析表明: 眉溪小车轮虫与周丛小车轮虫及纤细小车轮虫应为不同物种。18S rDNA构建的系统树显示, 眉溪小车轮虫与周丛小车轮虫单独聚枝, 且两者二级结构在螺旋H17存在明显的构型差异(眉溪小车轮虫仅有一个侧凸并有大的发卡环, 图5), 表明本研究所获物种与周丛小车轮虫具有种间水平的差异。

3.2 眉溪小车轮虫的种内分化及其与宿主的协同进化

形态学研究表明, 本研究中的眉溪小车轮虫3个株系形态特征相似(表1), 附着盘齿体形态无明显差异(图1), 且主成分分析显示3个株系形态学测量数据所形成的散点图高度重叠(图2), 综合形态学与主成分分析结果表明眉溪小车轮虫各株系均属同种, 且无明显表型分化。眉溪小车轮虫各株系18S rDNA序列相似度为99.2%—100%, 遗传距离为0.000—0.004。以往的研究表明, 18S rDNA不同分

类群遗传距离阈值种内水平为0.000—0.005^[31], 表明3株系在分子层面产生分化, 但属于种内水平。*T. myakkae* (HM)与*T. myakkae* (AN) 18S rDNA和ITS rDNA序列变异位点几乎一致, 而*T. myakkae* (PP)则产生了分子分化(图3)。有研究认为DNA的碱基替换记载着物种进化的信息, 且转换更易于饱和^[35]。本研究显示眉溪小车轮虫各序列差异度与遗传距离呈线性关系, 转换大于颠换(图4), 表明眉溪小车轮虫各株系种间的进化潜能较大, 且受进化噪音的影响较小, 其转换和颠换均具系统发育研究意义。结合DNA序列碱基组成及相关资料分析(表3), 碱基发生转换的可能易于颠换; 密码子第2位点较为保守, 且不同位点的碱基替换率不同, 但多表现为同义突变, 推测这些同义突变受到的自然选择压力较小, 突变后容易固定^[36—38]。眉溪小车轮虫不同株系18S rRNA的二级结构构型一致, 进一步表明本研究所获3株系均属同种。

18S rDNA的系统发育分析显示(图6): 宿主为鲢的*T. myakkae* (HM)枝与宿主为鳙的*T. myakkae* (AN)枝互为姐妹枝, 再依次与宿主为草鱼的*T. myakkae* (AY102176)及宿主为麦穗鱼的*T. myakkae* (PP)聚枝, 再次支持其为同种。各株系的宿主均属鲤科鱼类, 其中鲢和鳙隶属于鲢亚科Hypophthalmichthyinae, 草鱼隶属于雅罗鱼亚科Leuciscinae, 麦穗鱼隶属于鲃亚科Gobioninae, 且基于线粒体16S rDNA构建的宿主鱼系统发育树显示(图6B): 鲢亚科的鲢和鳙与雅罗鱼亚科的草鱼有较近的亲缘关系, 鲃亚科的麦穗鱼则与鲢亚科和雅罗鱼亚科较远, 与已有研究结果一致^[39, 40]。本研究所揭示的眉溪小车轮虫的系统发育关系显示其与宿主鱼具有相同的进化趋势, 表明二者之间可能存在共物种形成的协同进化关系, 故在一定程度上宿主也可能成为影响眉溪小车轮虫演化的重要因素。但受限于本研究眉溪小车轮虫样本量较少, 且涉及宿主鱼多样性较为局限, 因此来自更多宿主的相关数据的获取可能更有利于厘清其中的自然关系。

基于上述分析结果, *T. myakkae* (HM、AN)与*T. myakkae* (AY102176)株系差异较小, 而*T. myakkae* (PP)与其他株系已经出现差异, 但综合形态学特征、DNA序列分子特征(序列相似度、遗传距离、变异位点及二级结构)和分子系统发育分析的结果, 此类分化应属于种内水平, 推测部分眉溪小车轮虫在适应其不同宿主内的寄生生活过程中, 可能由于基因交流的减少而产生了种内多样性。系统发育分析还显示了眉溪小车轮虫与其宿主可能存在协同进化关系。

参考文献:

- [1] Li J, Tang F H, Zhao Y J. Study on the population diversity of *Trichodina uniforma* [J]. *Journal of Chongqing Normal University* (Natural Science Edition), 2014, **31**(2): 10-15. [李进, 唐发辉, 赵元著. 单型车轮虫 (*Trichodina uniforma*) 种群多样性研究 [J]. 重庆师范大学学报 (自然科学版), 2014, **31**(2): 10-15.]
- [2] Valladão G M, Gallani S U, De Pádua S B, *et al.* *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host—parasite relationship study [J]. *Parasitology*, 2014, **141**(5): 662-669.
- [3] Mahmoud M A, Aly S M, Diab A S, *et al.* The role of ornamental goldfish *Carassius auratus* in transfer of some viruses and ectoparasites to cultured fish in Egypt: comparative ultra—pathological studies [J]. *African Journal of Aquatic Science*, 2009, **34**(2): 111-121.
- [4] Tang F H, Zhao Y J. Record of three new *Trichodina* species (Protozoa, Ciliophora) parasitic on gills of freshwater fishes from Chongqing, China [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, **6**(9): 7108-7116.
- [5] Wang Q, Tang F H, Zhao Y J. Clone and sequence analysis of 18S rDNA for *Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Paperna, 1983 [J]. *Journal of Chongqing Normal University* (Natural Science Edition), 2015, **32**(4): 31-37. [王琴, 唐发辉, 赵元著. 刺纹车轮虫 18S rDNA 克隆与序列分析 [J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2015, **32**(4): 31-37.]
- [6] Lynn D H. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature [M]. 3 ed. Berlin: Pergamon Press, 2008: 428-435.
- [7] Mueller J F. Some species of *Trichodina* (Ciliata) from fresh water fishes [J]. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1937, **56**(2): 177-184.
- [8] Šramek-Hušek R. Zur frage der taxonomie und der pathogenität unserer ektoparasitischen Unceolariiden [J]. *Folia Zoologica et Entomologie*, 1953(2): 167-180.
- [9] Raabe Z. Uwagi o Urceolariidae (Ciliata, Peritricha) skrzyl ryb [J]. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, 1950(5): 292-310.
- [10] Davis H S. Studies of the protozoan parasites of fresh-water fishes [J]. *Fishery Bulletin*, 1947, **51**(1): 1-29.
- [11] Lom J, Haldar D P. Ciliates of the genera *Trichodinella*, *Tripartiella* and *Paratrichodina* (Peritricha, Mobilina) invading fish gills [J]. *Folia Parasitologica*, 1977, **24**(3): 193-210.
- [12] Song W B, Zhao Y J, Xu K D, *et al.* Pathogenic Protozoa in Mariculture [M]. Beijing: Science Press, 2003: 433-473. [宋微波, 赵元著, 徐奎栋, 等. 海水养殖中的危害性原生动植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 433-473.]
- [13] Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences. Hubei Province Fish Disease Pathogen Map [M]. Beijing: Science Press, 1973: 15. [中国科学院水生生物研究所. 湖北省鱼病病原区系图志 [M]. 北京: 科学出版社, 1973: 15.]
- [14] Gong Y C, Yu Y H, Villalobo E, *et al.* Reevaluation of the phylogenetic relationship between Mobilid and Sessilid Peritrichs (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit rRNA genes sequences [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, **53**(5): 397-403.
- [15] Utz L R P, Eizirik E. Molecular phylogenetics of subclass Peritrichia (Ciliophora: Oligohymenophorea) based on expanded analyses of 18S rRNA sequences [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2007, **54**(3): 303-305.
- [16] Tang F H, Zhao Y J, Warren A. Phylogenetic analyses of trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophora) inferred from 18S rRNA gene sequence data [J]. *Current Microbiology*, 2013, **66**(3): 306-313.
- [17] Klein B M. The dry silver method and its proper use [J]. *Journal of Protozoology*, 1958, **5**(2): 99-103.
- [18] Lom J. A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristics [J]. *The Journal of Protozoology*, 1958, **5**(4): 251-263.
- [19] Van As J G, Basson L. A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichia) and a review of the taxonomic status of some fish ectoparasitic trichodinids [J]. *Systematic Parasitology*, 1989, **14**(3): 157-179.
- [20] Tang F H, Zhao Y J, Chen H. Trichodinid ectoparasites from golden carp, with a description of *Trichodina paranigra* sp. nov. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(1): 75-80. [唐发辉, 赵元著, 陈辉. 鲫寄生车轮虫一新种的描述 [J]. 水生生物学报, 2005, **29**(1): 75-80.]
- [21] Bourland W A, Strüder—Kypke M C. *Agolohymena aspidocauda* nov. gen. nov. spec. a histophagous freshwater tetrahymenid ciliate in the family Deltopylidae (Ciliophora, Hymenostomatia), from Idaho (northwest U. S. A.): Morphology, ontogenesis and molecular phylogeny [J]. *European Journal of Protistology*, 2010, **46**(3): 221-242.
- [22] Wang S B, Zhao Y J, Du Y H, *et al.* Morphological redescription and molecular identification of *Trichodina reticulata* Hirschmann & Partsch, 1955 (Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) with the supplemental new data of SSU rDNA and ITS—5.8S rDNA [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2019, **66**(3): 447-459.
- [23] Zhang Y, Zhao Y J, Wang Q, *et al.* New comparative analysis based on the secondary structure of SSU—rRNA gene reveals the evolutionary trend and the family—genus characters of Mobilida (Ciliophora, Peritrichia) [J]. *Current Microbiology*, 2015, **71**(2): 259-267.
- [24] Wang S Y, Zhao Y J, Tang F H. Study on intraspecific differentiation of *Trichodina reticulata* from Chongqing based on 18S rDNA and ITS—5.8S rDNA [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2020, **55**(1): 77-89. [王诗瑶, 赵元著, 唐发辉. 基于 18S rDNA 与 ITS—5.8S rDNA 对重庆地区

- 网状车轮虫的种内分化研究 [J]. 动物学杂志, 2020, 55(1): 77-89.]
- [25] Ronquist F, Huelsenbeck J P. Mrbayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [26] Gao F, Gao S, Wang P, *et al.* Phylogenetic analyses of cyclidiids (Protista, Ciliophora, Scuticociliatia) based on multiple genes suggest their close relationship with thigmotrichids [J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2014, 75(6): 219-226.
- [27] Zhao Y J, Tang F H, Tang A K. A taxonomic study of species of *Trichodinella* Sramek-Husek and *Tripartiella* Lom, with seasonal population dynamics of *Trichodinella epizootica* Sramek-Husek —— a study of trichodinids from freshwater fishes in Chongqing I [J]. *Journal of Chongqing Normal University* (Natural Science Edition), 2007, 24(1): 7-12. [赵元著, 唐发辉, 唐安科. 小车轮虫、三分虫种类及周丛小车轮虫种群周年动态——重庆地区淡水车轮虫研究 I [J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2007, 24(1): 7-12.]
- [28] Xu K D, Song W B. Diagnostic methods for identification of the species within the genus *Trichodina* Ehrenberg, 1838 (Protozoa, Ciliophora) [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2000, 30(3): 397-405. [徐奎栋, 宋微波. 车轮虫属 (原生动物, 纤毛门) 种类鉴定的方法学 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 397-405.]
- [29] Yu S S, Zhao Y J, Tang F H. Geographical distribution and diversity of trichodinid ectoparasites (Ciliophora, Oligohymenophorea, Mobilia) from the gills of fresh and estuarine fishes in Zhejiang province, China and coastal regions of the East China Sea [J]. *European Journal of Scientific Research*, 2011, 64(1): 61-74.
- [30] Gong Y C, Yu Y H, Shen Y F. Quantitative analysis of *Trichodina* denticulating characters and phylogenetic relationship studies on interspecies and intraspecies [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(3): 225-233. [龚迎春, 余育和, 沈韞芬. 车轮虫齿体特征的量化及其种内种间系统发育的研究 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(3): 225-233.]
- [31] Tang F H, Zhao Y J. Molecular phylogenetic evidences on mobilida based on genetic distance and GC content of 18S rDNA using broad taxon sampling [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(2): 358-369. [唐发辉, 赵元著. 基于18S rDNA遗传距离与GC含量对游走类纤毛虫的分子系统学研究 [J]. 水生生物学报, 2016, 40(2): 358-369.]
- [32] Gong Y C, Yu Y H. Progress in the taxonomy and phylogeny of trichodinids [J]. *Zoological Research*, 2007, 28(2): 217-224. [龚迎春, 余育和. 车轮虫分类与系统发育研究进展 [J]. 动物学研究, 2007, 28(2): 217-224.]
- [33] Qi H, Zhao Y J, Tang F H. Studies on ectoparasitic trichodinids from *Cyprinus carpio* in the upper reaches of the Yangtze River, Sichuan branch [J]. *Journal of Chongqing Normal University* (Natural Science Edition), 2011, 28(5): 16-24. [齐欢, 赵元著, 唐发辉. 长江上游四川江段鲤外寄生车轮虫的研究 [J]. 重庆师范大学学报 (自然科学版), 2011, 28(5): 16-24.]
- [34] Amlan K M, Durga, P H. First record of *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950) Šrámek-Hušek, 1953, with description of *Trichodina notopteridae* sp. n. (Ciliophora: Peritrichida) from freshwater fishes of India [J]. *Acta protozoologica*, 2004, 43(3): 269-274.
- [35] Simon C, Frati F, Beckenbach A, *et al.* Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1994, 87(5): 651-701.
- [36] Ma Q Q, Ma H Y, Ma C Y, *et al.* Cloning of COI sequence and identification of SNPs loci in *Scylla paramamosain* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 27(7): 111-116. [马群群, 马洪雨, 马春艳, 等. 拟穴青蟹线粒体COI基因序列克隆及SNPs位点分析 [J]. 生物技术通报, 2011, 27(7): 111-116.]
- [37] Hu Y L. Studies on structure and function of ribosome: a brief introduction to 2009 Nobel prize in chemistry [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36(10): 1239-1243. [胡永林. 核糖体的结构与功能研究——2009年诺贝尔化学奖简介 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(10): 1239-1243.]
- [38] Chen L L, Peng G Z, Zhang W L, *et al.* The significance of mutations in genomic evolution [J]. *Hereditas*, 2006, 28(5): 631-638. [陈玲玲, 彭贵子, 张伟丽, 等. 突变在基因组进化中的意义 [J]. 遗传, 2006, 28(5): 631-638.]
- [39] Tan Y D, Zhao Q X. Study on the phylogenetic relationship of Cyprinidae based on the distributions of intestinal bacteria and DNA sequence data [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 26-32. [谭远德, 赵庆新. 利用肠道菌群的分布和DNA序列对鲤科鱼类系统演化关系的研究 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 26-32.]
- [40] Wang X Z, Gan X N, Li J B, *et al.* Cyprinid phylogeny based on bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data: implications for Cyprinidae systematics [J]. *Science China—Life Sciences*, 2012, 42(8): 648-661. [王绪祯, 甘小妮, 李俊兵, 等. 基于分区贝叶斯法和最大似然法的鲤科鱼类系统发育分析及其系统学意义 [J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(8): 648-661.]

TRICHODINELLA MYAKKAE (MUELLER, 1937) ŠRÁMEK-HUŠEK, 1953 IN CHONGQING AREA AND COMPARAISON WITH ITS RELATED SPECIES

XIA Ping, TANG Fa-Hui and ZHAO Yuan-Jun

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Trichodinids are tiny parasitic ciliated protozoans with high diversity, and mainly parasitic in the fishes, shellfishes and rarely in coelenterates. The serious infections caused by trichodinids may induce damage to the hosts, or even death in severe cases. Many previous studies focused on morphology and taxonomy of trichodinids have been carried out worldwide. Because it is difficult to differentiate similar species based solely on morphological characters, molecular examination has been accepted for identification of species. In recent years, some studies have begun to apply molecular approaches to shed light on the past confusion of identification of taxa. It has been a long time since *Trichodinella myakkae* (Mueller, 1937) Šrámek-Hušek, 1953 was confused with its relative species, *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950) Šrámek-Hušek, 1953 and *Trichodinella subtili* (Lom, 1959) Lom & Haldar, 1977. It is also difficult to distinguish *T. myakkae* from other *Trichodinella* species by the only morphological characters, for *T. myakkae* shares similar shape and size to the related *Trichodinella* species and is often mixed infection with these trichodinids which are difficult to be isolated individually. Moreover, *T. myakkae* was reported from different regions around the world and mainly isolated from freshwater fish hosts, such as *Ctenopharyngodon idellus*, *Aplites salmoides* and other fishes. Therefore, it is of great significance to study phylogeny and the influencing factors of intra—species differentiation. This study collected three host fishes of *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* and *Pseudorasbora parva* for the examination of trichodinids. Under a binocular dissecting microscope, individual trichodinid was isolated from living host fishes by glass micropipettes. Three strains of *T. myakkae* were obtained, and their photomicrographs of silver impregnated specimen were provided. The PCA results showed that the morphological characteristics of the three strains were highly overlapping on the scatter plot. Besides, five 18S rDNA and ITS-5.8S rDNA sequences were obtained, all of which are highly similar to *T. myakkae* (AY102176) (sequence similarity $\geq 99.0\%$), and the GC content ranged from 50.8% to 51.2%. Taking *T. myakkae* (AY102176) as the reference sequence, based on 18S rDNA sequence, there were 7 variation sites in *T. myakkae* (AN) and *T. myakkae* (PP) respectively, and 8 variation sites in *T. myakkae* (HM). All strains appeared to have the same secondary structure, and the difference was only found in the primary sequence of V4 and V5 regions. The ML and BI trees constructed based on 18S rDNA indicated a highly similar topology. The results showed that there was no significant phenotypic difference among the three strains of *T. myakkae*, while *T. myakkae* showed the obvious difference from *T. epizootica* and *T. subtili*; meanwhile, *T. myakkae* (PP) showed the molecular difference from *T. myakkae* (HM) and *T. myakkae* (AN) at the intraspecies level. Based on the phylogenetic analysis, *T. myakkae* and *T. epizootica* were obviously independent, and all the strains of *T. myakkae* showed a significant coevolutionary relationship with their host fishes. In summary, our research clarified the confusions between *T. myakkae* and those similar or related species and provided the basic data for taxonomic and phylogenetic studies of *Trichodinella* species.

Key words: *Trichodinella myakkae*; Intraspecific differentiation; Species identification; Coevolution