

doi: 10.7541/2020.023

西藏温泉两种中国新记录纤毛虫第一双小核草履虫和明布雷斯四膜虫的形态学和系统发育学研究

姜传奇¹ 谷思雨² 安瑞志³ 巴桑^{3*} 缪炜^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072; 2. 哈尔滨师范大学黑龙江省水生生物多样性研究重点实验室, 哈尔滨 150025; 3. 西藏大学理学院湿地与流域生态实验室, 拉萨 850000)

摘要: 研究利用活体观察、蛋白银和银染色技术对采自西藏温泉的寡膜纲咽膜类纤毛虫第一双小核草履虫(*Paramecium primaurelia*)和膜口类纤毛虫明布雷斯四膜虫(*Tetrahymena mimbres*)进行了形态学研究, 首次描述了这两种纤毛虫细胞核器的形态和位置、纤毛图式和口膜的排布模式; 并且测定了SSU rDNA和COX I标记基因序列, 基于这两种基因的系统发育树均支持*P. primaurelia*聚在草履虫*P. aurelia*复合种中, *T. mimbres*聚在四膜虫*T. borealis*类群中。两种纤毛虫均为中国新记录种, 且首次在高原温泉中发现, 不仅为西藏地区温泉原生动物生物资源的发掘提供新的方法和思路, 也为原生动物环境适应性研究提供基础资料。

关键词: 西藏温泉; 纤毛虫; 新记录种; 形态学; 系统发育学

中图分类号: Q959.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)01-0197-09

纤毛虫隶属原生生物界, 原生动物亚界, 是较复杂的单细胞真核生物。纤毛虫物种丰富, 已记载8000余种, 广泛分布于淡水、海水、土壤甚至一些极端环境中^[1]。青藏高原是“世界屋脊”, 有着独特的自然环境和丰富的生物资源。其中, 西藏地区地热资源非常丰富, 各种地热显示遍布全区。1966年和1973—1976年, 王家楫等在第一次青藏高原综合科学考察中采集了大量的无脊椎动物标本, 随后完成的《青藏高原部分地区的原生动物》、《珠穆朗玛峰地区的原生动物》、《西藏水生无脊椎动物》共记述了西藏地区原生动物458种, 其中纤毛虫288种^[2-4]。期间, 也对部分温泉的原生动物进行调查, 共鉴定到原生动物52种, 其中纤毛虫有13种^[4]。近年来, 随着纤毛虫培养技术和研究手段的逐步发展完善, 可以对西藏温泉生境该类群的生物资源开展更深入和系统的研究。

本研究对位于西藏地区的日多温泉和羊八井温泉进行样品采集, 鉴定得到了两种寡膜纲纤毛虫中国新记录种: 咽膜类的第一双小核草履虫(*Para-*

mecium primaurelia)和膜口类的明布雷斯四膜虫(*Tetrahymena mimbres*)。本研究详细描述了这两种纤毛虫的形态学特征, 测定了它们的SSU rDNA和COX I基因序列并基于这两种分子标记进行了系统发育学分析。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

两种纤毛虫第一双小核草履虫和明布雷斯四膜虫于2018年10月采自西藏高原, 其中*P. primaurelia*采自拉萨市墨竹工卡县的日多温泉(N 29°41', E 92°14'; 海拔: 4365 m; 水温: 50—60℃), *T. mimbres*采自当雄县的羊八井温泉(N 29°58', E 90°21'; 海拔: 4350 m; 水温: 43℃)。使用采样瓶收集温泉原位水及悬浮物。样品采集后, 在实验室将不同采集地点的水样摇匀分别倒入培养皿中, 每个培养皿加入两粒已灭菌的麦粒, 将培养皿盖好盖子分别放入封闭样品盒内以避免样品交叉污染。培养4—5d后, 在解剖镜(ZEISS Stemi2000-C)下, 利用微吸管分离单

收稿日期: 2019-02-01; 修订日期: 2019-08-27

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2018M642954); 2018中央支持地方高校发展专项资金[藏财教指(2018)54号]资助 [Supported by China Postdoctoral Science Foundation (2018M642954); Tibet University 2018 Central Financial Support Special Funds for Local Colleges and Universities (2018) No. 54]

作者简介: 姜传奇(1988—), 女, 黑龙江伊春人; 博士后; 研究方向为原生动物学。E-mail: jiangchuanqi@ihb.ac.cn

通信作者: 缪炜, 博士, 研究员; E-mail: miaowei@ihb.ac.cn; 巴桑, 硕士, 教授; E-mail: hbasang2003@aliyun.com *共同通信作者

克隆株系, 并使用过滤(滤膜规格: 0.22 μm)原位水加入灭菌麦粒于25℃扩大培养。

1.2 形态学研究

在解剖镜下利用微吸管挑取少量纤毛虫于载玻片上进行活体压片, 在显微镜下(100×—1000×)观察虫体的大小、颜色、形状、运动方式和伸缩泡等活体特征。采用蛋白银染色法^[5]和氨银染色法^[6]制片, 分别获得*P. primaurelia*和*T. mimbres*的纤毛图式和核器特征等。此外, 细胞核的形态还以2%多聚甲醛(PFA)固定细胞, 经0.5 $\mu\text{g/mL}$ DAPI(4', 6-二脒基-2-苯基吡啶)核酸染料染色, 在荧光显微镜下观察。显微观察及拍照利用尼康显微镜(Nikon EC-LIPSE 80i)。系统分类和术语依据Lynn(2008)。

1.3 DNA提取和PCR扩增

第一双小核草履虫(*P. primaurelia*)和明布雷斯四膜虫(*T. mimbres*)的DNA提取利用REDExtract-N-AmpTM PCR试剂盒, 利用微吸管分别挑取少量的*T. mimbres*和*P. primaurelia*细胞, 经蒸馏水清洗数次后, 放入PCR管中, 按照试剂盒说明书操作, 释放总DNA(www.sigmaaldrich.com)。两种纤毛虫SSU rDNA序列的扩增利用真核生物通用引物18S-F: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'和18S-R: 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACACCTAC-3'^[7]; *P. primaurelia* COX I 基因的扩增利用引物F199dT-B: 5'-TGTAACGACGCGCCAGTTCAGGWCCTGCMTTAGCHACYATG-3'和R1143dT: 5'-CAGGAAACAGCTATGACTARTATAGGATCMCCWCCATAAGC-3'; *T. mimbres* COX I 基因的扩增利用引物F298dT: 5'-TGTAACGACGCGCCAGTGCNCAYGGTYTAATNATGGT-3'和R1184dT: 5'-CAGGAAACAGCTATGACTADACYTCAGGTGACCRAAAAATCA-3'^[8]。PCR后, 扩增产物直接送测序公司测序。

1.4 系统发育学分析

除新测序列外, 其余序列均来自GenBank数据库, 包括109条SSU rDNA基因序列和112条COX I 基因序列(序列信息详见图版 I、图版 II)。选择七种盾纤类纤毛虫(*Pseudocohnilembus persalinus*、*Pseudocohnilembus longisetus*、*Philasterides dicentrarchi*、*Miamiensis avidus*、*Cyclidium glaucoma*、*Entodiscus borealis*、*Plagiopyliella pacifica*)作为外群构建系统发育树。序列比对利用MEGA 6.0中的Muscle程序^[9], 比对完成后, 两端截平并手动删除无法明确比对的模糊区域。最大似然树(ML)的构建采用MEGA 6.0软件, 选择GTR+I+G最优模型, 节点置信值来自1000叠代重复抽样^[9]。贝叶斯树(BI)利用MrBays 3.2.1软件构建, 选择GTR+I+G最优模型^[10], MCMC模拟运行10000000代, 每100代取样1次, 前10000棵树舍弃, 剩余的树用来计算后验概率。使用MEGA 6.0软件调整树形^[9]。

2 结果

2.1 第一双小核草履虫的形态学描述(图版 I, 表 1)

活体约(150—200) μm × (60—100) μm , 腹面观为长椭圆形或足形, 前端略尖, 具有明显的斜截区, 后端口区以下逐渐变窄, 虫体不对称(图版 I -A、E—I)。口区位于虫体腹面中部(图版 I -A、F、G、N)。虫体浅灰色, 体内充满内含物, 包括食物颗粒、晶体和食物泡等(图版 I -A、E—I)。大核一个, 椭圆形, 位于虫体中部, 约40 μm ; 小核两枚, 靠近大核, 约2 μm (图版 I -A、R)。伸缩泡两个, 分别于虫体前端和后端(图版 I -A、H)。体纤毛整齐, 长约6 μm ; 约十根尾纤毛聚集呈簇, 位于虫体尾部, 长约15 μm (图版 I -I)。运动方式为沿身体长轴旋转前进, 不时在水中快速自由穿梭。

体动基列60—80列(图版 I -B、C、J、K), 口前和口后缝合线明显, 口前缝合线从虫体顶端延至体中

表 1 第一双小核草履虫的形态学数据

Tab. 1 Morphometric data of *Paramecium primaurelia*

特征Character	最大值Maximum	最小值Minimum	平均值Mean	中值Median	标准差Standard deviation	变异系数Coefficient of variation (%)	个体数Number of cells
体长Body length	196.62	144.77	173.84	166.32	16.46	0.09	13
体宽Body width	98.57	56.81	79.20	77.44	12.15	0.15	13
大核长Macronucleus length	47.84	33.36	40.49	40.10	4.35	0.11	10
大核宽Macronucleus width	50.16	29.27	42.40	43.64	6.09	0.14	10

注: 数据来自活体制片(体长、体宽)和蛋白银染色制片(大核长、宽); 单位: μm

Note: Data from living body prepared specimens (body length, body width) and protargol impregnation prepared (macronucleus length, macronucleus width) specimens; Measurements in μm

部胞口处, 口后缝合线从口区底端延伸至尾部(图版 I-B、K—M)。口器具有属典型特征: 由三片小膜(P1、P2、P3)和一片口侧膜(PM)组成。三片小膜均由四列毛基列组成, P1四列毛基粒分散, P1长于P2, P3最短(图版 I-D、O—Q)。

2.2 明布雷斯四膜虫(*Tetrahymena mimbres*)的形态学描述(图版 II, 表 2)

活体约(35—50) $\mu\text{m} \times (15—25) \mu\text{m}$, 呈卵圆形, 前端稍尖, 后端钝圆(图版 II-A、E—H), 长宽比约 2:1。口区较小, 位于体前端 1/4 处, 约占体长的 1/5—1/6。口纤毛长 6—7 μm ; 体纤毛密集排列, 长 4—5 μm (图版 II-A、F—H)。细胞质无色至灰白色, 含有数个随机分布的充满细菌的食物泡(直径约 3 μm , 图版 II-A、E—H)。大核一个, 球形或卵圆形, 直径约 10 μm , 位于体中部, 无小核(图版 II-I)。伸缩泡一个, 位于体后部, 直径约 6 μm , 伸缩周期约 1 min (图版 II-A、H)。

体动基列 16—18 列, 纵向排列, 靠近虫体顶部毛基粒密集, 虫体后部较稀疏(图版 II-B、C、J—N)。口区前有明显缝合线, 由口区前端延伸至虫体顶端无毛区(图版 II-B、J、M)。口后动基列(PK)两列, 口后动基列 1(PK1)开始于口侧膜中间位置, 向后延伸至细胞末端; 口后动基列 2(PK2)开始于口侧膜底部, 延伸至虫体末端(图版 II-B、J)。口腔纵轴与体轴平行, 口区内为典型的“四膜”式构造, 包括三片口区小膜(M1、M2、M3)及一片口侧膜(PM)。M1 略长于 M2, M1 与 M2 近乎平行, 均由三列平行的毛基粒构成; M3 较短, 形状近似圆形。口侧膜起始于 M2 前端, 围绕三片小膜边缘至口区底部(图版 II-D、O)。

2.3 系统发育学分析

本研究两种纤毛虫的 SSU rDNA 和 COX I 基因序列已提交至 GenBank 数据库, 其中 *P. primaurelia* 的 SSU rDNA 序列(序列号: MK579298, 长度 1649 个

碱基, GC 含量 43%)与 GenBank 中该种的序列(MG573196 和 MG573195)的相似度为 100%、99%; 其 COX I 基因序列(序列号: MK715448, 长度 859 个碱基, GC 含量 41%)与 GenBank 中该种的序列(FN421324 和 FJ905141)相似度均为 99%。*T. mimbres* 的 SSU rDNA 序列(序列号: MK579316, 长度 1655 个碱基, GC 含量 43%)与 GenBank 中该种(EF070251)的相似度为 99%; 其 COX I 基因序列(序列号: MK715449, 长度 876 个碱基, GC 含量 27%)与 GenBank 该种的序列(EF070292)的相似度为 99%。

本研究选择 GenBank 数据库中有 SSU rDNA 序列信息的 38 种四膜虫(46 条序列)、20 种草履虫(56 条序列), 以寡膜纲七种盾纤类纤毛虫作为外类群构建了系统发育树(图 1)。结果显示: (1)草履虫科单系。(2)新测序的西藏温泉种 *P. primaurelia* 与来自 GenBank 数据库中的四个 *P. primaurelia* 种群(MG573194、MG573195、MG573196 和 AF100315)聚为一枝, 聚在 *Paramecium aurelia* 复合种(*P. aurelia* complex)内。(3)四膜虫科单系, 包括两个主要类群: *T. borealis* 类群(*T. borealis* group)和 *T. australis* 类群(*T. australis* group); (4)新测序的西藏温泉种 *T. mimbres* 与 GenBank 的 *T. mimbres* (EF070251)聚为一枝, 与 *T. elliotti* (EF070246)聚为姐妹枝, 聚在 *T. borealis* 类群中。

COX I 基因系统发育树利用 GenBank 数据库中四膜虫的 57 条和草履虫的 48 条序列, 以盾纤类纤毛虫为外类群构建(图 2)。结果显示: (1)本研究新测序的 *P. primaurelia* 与 GenBank 中 11 种 *P. primaurelia* 种群均聚为一枝, 聚在 *P. aurelia* 复合种(*P. aurelia* complex)中。(2)本次新测序的 *T. mimbres* 与 GenBank 中 *T. mimbres* (EF070292)聚为一枝, 与 *T. elliotti* (EF079281)聚为姐妹枝, 共同聚在 *T. borealis* 类群中。

表 2 明布雷斯四膜虫的形态学数据

Tab. 2 Morphometric data of *Tetrahymena mimbres*

特征 Character	最大值 Maximum	最小值 Minimum	平均值 Mean	中值 Median	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (%)	个体数 Number of cells
体长 Body length	47.52	35.65	41.00	40.39	3.47	0.08	10
体宽 Body width	25.61	17.41	20.68	20.44	2.49	0.12	10
大核长 Macronucleus length	10.57	8.27	9.20	9.27	0.75	0.08	10
大核宽 Macronucleus width	8.46	5.19	7.52	7.74	0.99	0.13	10

注: 数据来自活体制片(体长、体宽)和银染染色制片(大核长、宽); 单位: μm

Note: Data from living body prepared specimens (body length, body width) and silver staining prepared (macronucleus length, macronucleus width) specimens; Measurements in μm

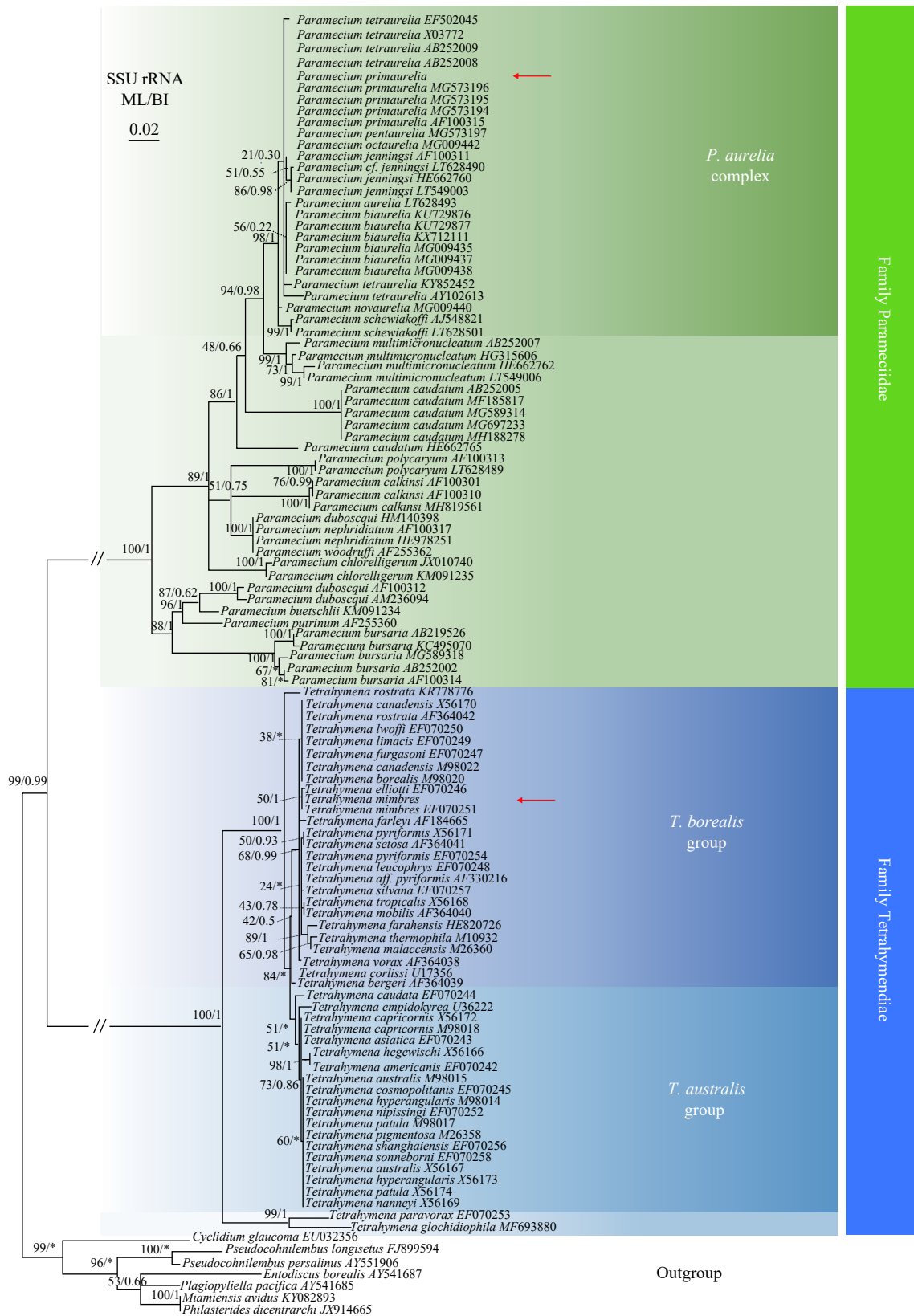


图1 基于核糖体小亚基基因序列构建的最大似然树

Fig. 1 Maximum likelihood (ML) tree based on small subunit ribosomal DNA sequences

箭头指出本文新测序种。节点置信值以最大似然树和贝叶斯树顺序给出。比例尺代表每100个碱基位点中有两个碱基替代
Newly characterized sequences in this study are shown in arrows. The numbers at the nodes represent the support values of ML and Bayesian inference (BI). The scale bar corresponds to two substitutions per 100 nucleotide positions

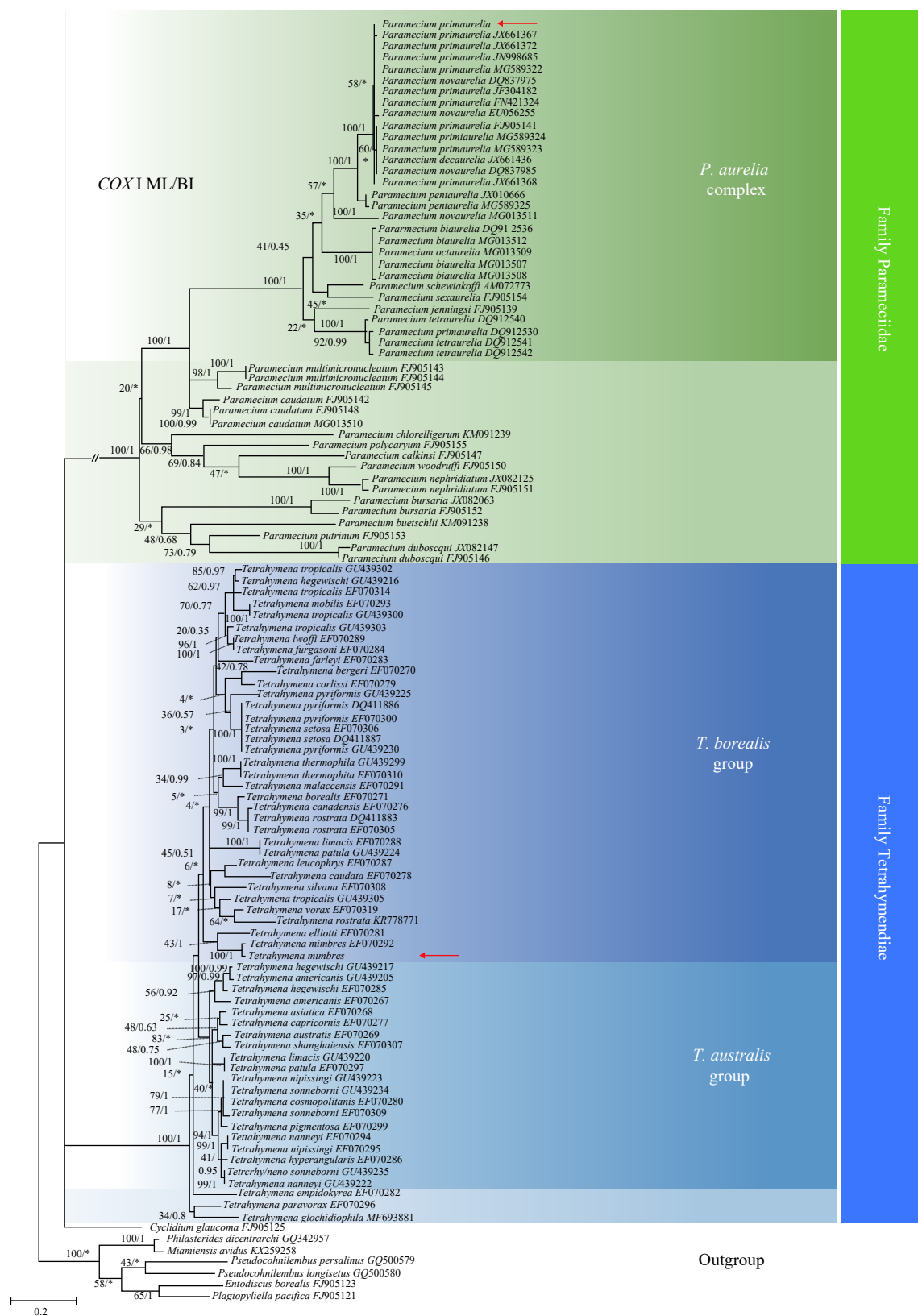


图 2 基于线粒体细胞色素氧化酶 I 基因序列构建的最大似然树

Fig. 2 Maximum likelihood (ML) tree based on cytochrome oxidase subunit I gene sequences

箭头指出本文新测序种。节点置信值以最大似然树和贝叶斯树顺序给出。比例尺代表每100个碱基位点中有两个碱基替代

Newly characterized sequences in this study are shown in arrows. The numbers at the nodes represent the support values of ML and Bayesian inference (BI). The scale bar corresponds to two substitutions per 100 nucleotide positions

3 讨论

第一双小核草履虫(*Paramecium primaurelia*)由Sonneborn于1975年命名,属于*P. aurelia*复合种^[11]。Gill和Hanson(1968)、Hufnagel(1969)和Sonneborn(1975)对*P. aurelia*复合种进行了形态学研究,*P. primaurelia*西藏种群符合*P. aurelia*复合种的形态学特征(虫体雪茄状,体长80—200 μm ,是体宽的3—4倍;伸缩泡两枚;大核一枚、小核两枚;体动基列60—80列、口区结构、前后缝合线等)^[11-13]。本研究利用活体观察、蛋白银、DAPI染色法,补充了该种活体特征、细胞核的形态和位置、纤毛图式和口区三片咽膜及口侧膜的排布模式,并提供了该种西藏温泉种群的SSU rDNA基因和COX I基因序列信息。这两种分子标记基因的系统发育学分析均支持*P. primaurelia*与GenBank中已发表的*P. primaurelia*种群聚为一枝,聚在*P. aurelia*复合种中,与形态学分类结果一致。

明布雷斯四膜虫(*Tetrahymena mimbres*)最早将其认定为*Tetrahymena pyriformis*复合种中的NT-1株系^[14],于1987年由Meyer和Nanney将其更名为*T. mimbres*^[15]。目前,关于该种的研究较少,无形态学方面的研究。本研究对该种活体形态、细胞核的形态和位置、体纤毛图式和三片口区小膜及口侧膜的排布模式进行了详细的描述,并提供了该种西藏温泉种群的SSU rDNA和COX I基因序列信息,系统发育学分析支持该种聚在*T. borealis*种群内部,与*T. ellioti*的亲缘关系较近。

利用采样瓶收集西藏温泉原位水及悬浮物,置于实验室中封闭培养,并在解剖镜下利用微吸管分离单克隆株系,进一步培养获得了两种中国新记录纤毛虫。其中,*P. primaurelia*为广布种,在美洲的南部、北部、中部,欧洲的俄罗斯、马尔他、保加利亚,非洲的纳塔尔,亚洲的日本、缅甸等地均有报道^[16-20],显示出其较强的环境适应性;首次在西藏日多温泉中的发现,表明该种还具有较强的高原和高温适应性。*T. mimbres*的首次发现是在美国新墨西哥州的温泉(Mimbres hot springs)^[21],之后在美国德克萨斯州的温泉中也有报道^[22],表明该种为喜高温种类,具有明显的高温适应性。*T. mimbres*首次在西藏羊八井温泉中的发现,也体现出该种有较强的高原适应性。本研究借助纤毛虫培养技术和形态学、分子生物学研究手段,鉴定出西藏温泉的两种中国新记录纤毛虫,为西藏温泉原生动物生物资源的发掘提供新的方法和思路,也为原生动物环境适应性研究提供基础性资料。

参考文献:

- [1] Lynn D H. The Ciliated Protozoa. Characterization, Classification, and Guide to the Literature (3rd edition) [M]. Springer: Dordrecht, 2008: 1-605.
- [2] Wang J J. Protozoa from the Everest Region. Scientific Investigation Report of Everest Region [M]. Beijing: Science Press, 1974: 145-172. [王家楫. 珠穆朗玛峰地区的原生动物. 珠穆朗玛峰地区科学考察报告, 北京: 科学出版社, 1974: 145-172.]
- [3] Wang J J. Protozoa from some districts of Tibetan plateau [J]. *Current Zoology*, 1977, **23**(2): 131-160. [王家楫. 青藏高原部分地区的原生动物 [J]. 动物学报, 1977, **23**(2): 131-160.]
- [4] Jiang J Z, Shen Y F, Gong X J. Aquatic Invertebrates of the Tibetan Plateau [M]. Beijing: Science Press, 1983: 1-492. [蒋燮治, 沈韞芬, 龚循矩. 西藏水生无脊椎动物. 北京: 科学出版社, 1983: 1-492.]
- [5] Shi X, Qiu Z, Li L U, *et al.* Morphology and development of left-handed singlets derived from mirror-image doublets of stylonychia mytilus [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1990, **37**(1): 6.
- [6] Foissner W. The silver carbonate methods [M]// Lee J J, Soldo (Eds.), *Protocols in Protozoology*. Society of Protozoologists. Lawrence: Allen Press, 1992: C7.1-C7.3.
- [7] Medlin L, Elwood H J, Stickel S, *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions [J]. *Gene*, 1988, **71**(2): 491-499.
- [8] Michaela C, Strüder-Kypke, Lynn D H. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker [J]. *Systematics and Biodiversity*, 2010, **8**(1): 131-148.
- [9] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725-2729.
- [10] Nylander J A A. MrModeltest 2. 2. Program distributed by the author [D]. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
- [11] Sonneborn T M. The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species [J]. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1975, **94**(2): 155-178.
- [12] Gill K S, Hanson E D. Analysis of predivision morphogenesis in *Paramecium aurelia* [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics & Physiology*, 1968, **167**(2): 219-236.
- [13] Hufnagel L A. Cortical ultrastructure of *Paramecium aurelia*. Studies on isolated pellicles [J]. *Journal of Cell Biology*, 1969, **40**(3): 779.
- [14] Ryals P E, Thompson G A. Alterations of the composition and size of the free fatty acid pool of *Tetrahymena* responding to low-temperature stress [J]. *Biochimica et*

- Biophysica Acta*, 1987, **919**(2): 122-131.
- [15] Meyer E B, Nanney D L. Isozymes in the ciliated protozoan *Tetrahymena* [J]. *Isozymes*, 1987, **13**(13): 61.
- [16] Przyboś E. Studies on the *Paramecium aurelia* species complex in Spain (Ciliophora) [J]. *Archiv für Protistenkunde*, 1991, **140**(2-3): 151-156.
- [17] Przyboś E, Rautian M, Potekhin A. First European record of *Paramecium septaurelia* and the discovery of new European habitats of *P. pentaurelia* and *P. exaurelia* in Russia (Astrakhan and Volgograd regions) [J]. *Folia Biologica*, 2004, **52**(1-2): 87-90.
- [18] Rautian M, Przyboś E, Surmacz M, *et al.* New Stands of species of the *Paramecium aurelia* complex in Africa and Europe [J]. *Folia Biologica*, 2014, **62**(4): 361-366.
- [19] Ewa , Tarcz S, Rautian M, *et al.* Species of the *Paramecium aurelia* complex in Russia (western region of European Russia) with molecular characteristics of *Paramecium novaurelia* [J]. *Folia Biologica*, 2006, **54**(1-2): 43-47.
- [20] Sardanelli F, Rescinito G, Giordano G D, *et al.* Data on the occurrence of species of the *Paramecium aurelia* complex world-wide [J]. *Protistology*, 2000, **1**(5): 179-184.
- [21] Preparata R M, Meyer E B, Preparata F P, *et al.* Ciliate evolution: The ribosomal phylogenies of the tetrahymenine ciliates [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1989, **28**(5): 427-441.
- [22] Kher C P, Doerder F P, Cooper J, *et al.* Barcoding Tetrahymena: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I (cox-1) barcode [J]. *Protist*, 2011, **162**(1): 2-13.

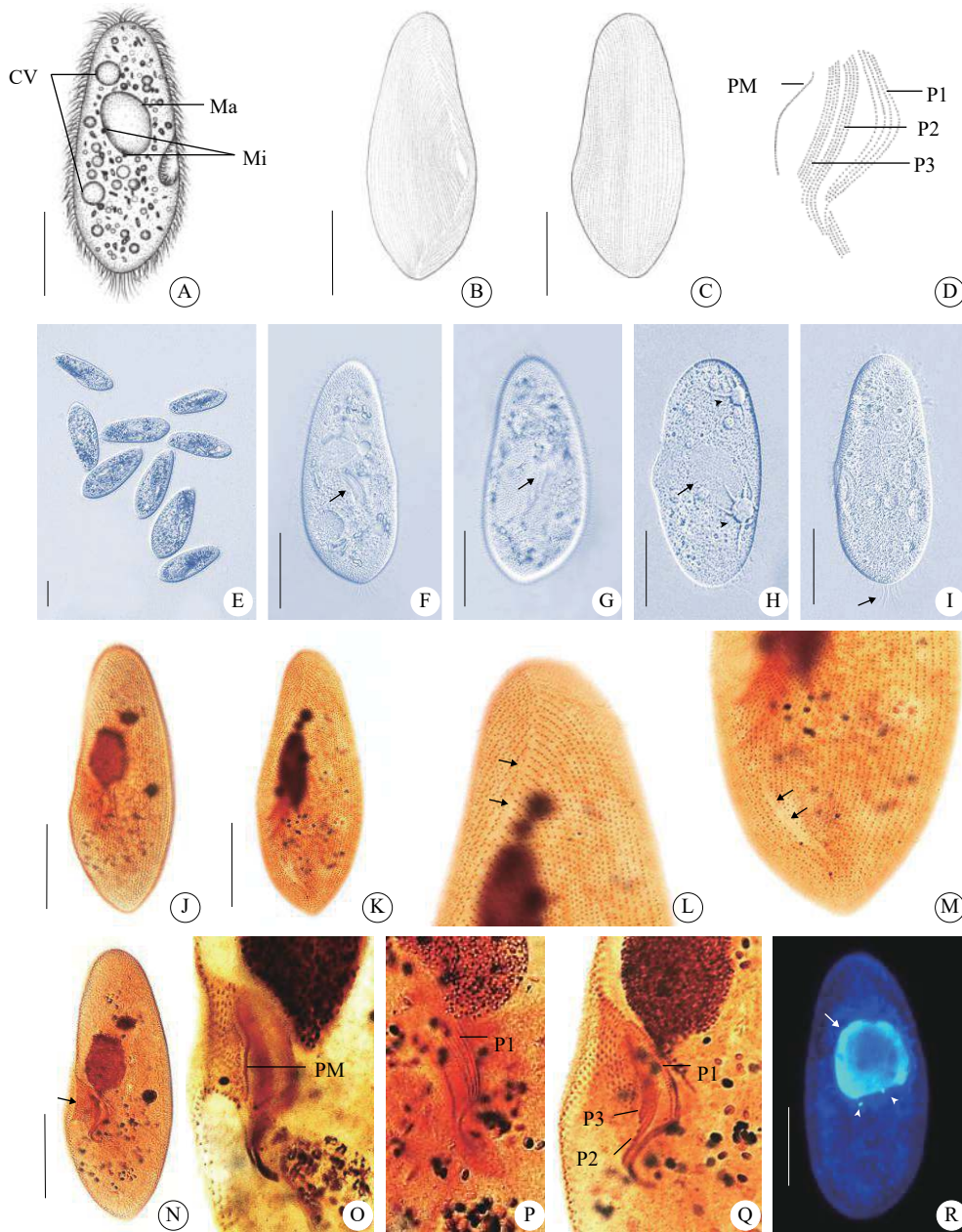
MORPHOLOGY AND PHYLOGENY OF TWO NEWLY RECORDED CILIATES (*PARAMECIUM PRIMAURELIA* AND *TETRAHYMENA MIMBRES*) FROM TIBETAN HOT SPRINGS IN CHINA

JIANG Chuan-Qi¹, GU Si-Yu², AN Rui-Zhi³, BA Sang³ and MIAO Wei¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Key Laboratory of Biodiversity of Aquatic Organisms, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 3. Laboratory of Wetland and Catchments Ecology in Tibetan Plateau, Faculty of Natural Sciences, Tibet University, Lhasa 850000, China)

Abstract: We used living observation, protargol impregnation and silver staining methods to investigate the nuclei morphology and position, infraciliature, and oral apparatus of two oligohymenophorean ciliates: *Paramecium primaurelia* and *Tetrahymena mimbres*, which collected from hot springs of Tibet Autonomous Region. SSU rDNA and COX I genes of these two species were sequenced, and the phylogenetic analysis revealed that *P. primaurelia* is clustered in *Paramecium aurelia* complex, and *T. mimbres* is clustered in *Tetrahymena borealis* group. These two species are newly recorded in China from the hot springs of Tibet Autonomous Region. The study of these two newly recorded species not only provides new methods and insights for the discovery of protozoa resources in the Tibetan hot springs, but also provides basic information for the study of protozoa environmental adaptation.

Key words: Tibetan hot springs; Ciliates; New records; Morphology; Phylogeny

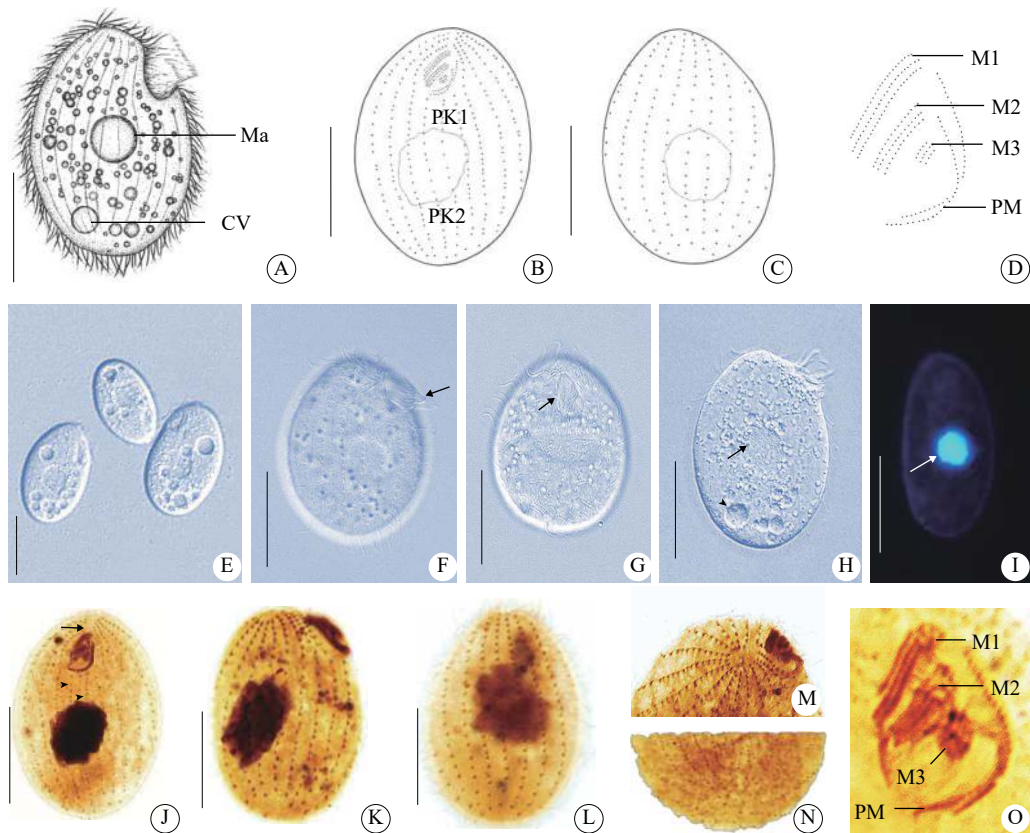


图版 I 第一双小核草履虫的形态学特征

Plate I Morphology of *Paramecium primaurelia*

A. 典型个体侧面观; B、C. 纤毛图式腹面观(B)和背面观(C); D. 口区纤毛图式; E. 群体形态; F、G. 典型个体腹面观(F)和背面观(G), 箭头指示口; H. 箭头指示大核, 无尾箭头指示伸缩泡; I. 箭头指示尾纤毛; J, K. 纤毛图式背面观(J)和腹面观(K); L, M. 箭头指示接缝线; N. 箭头指示口区; O. 口侧膜; P. 示分散的口区小膜1; Q. 口区小膜1—3的排布; R. 大核(箭头)和小核(无尾箭头)。Ma: 大核; Mi: 小核; P1—3: 小膜1—3; PM: 口侧膜。比例尺: 50 μm

A. Lateral view of a representative individual; B, C. Infraciliature in ventral view (B) and dorsal view (C); D. Oral infraciliature; E. Colony form; F, G. Ventral view (F) and dorsal view (G) of a representative individual, arrow points to oral; H. Arrow points to macronucleus, and arrowheads point to contractile vacuoles; I. Arrow points to caudal cilium; J, K. dorsal view (J) and Ventral view (K) of the infraciliature; L, M. Arrows point to suture; N. Arrow points to oral; O. Paroral membrane; P. Dispersion of P1; Q. Arrangement of peniculi 1—3; R. Macronucleus (arrow) and micronucleus (arrowheads). Ma: macronucleus; Mi: micronucleus; P1—3: peniculi 1—3; PM: paroral membrane. Scale bar: 50 μm



图版 II 明布雷斯四膜虫的形态学特征

Plate II Morphology of *Tetrahymena mimbres*

A. 典型个体侧面观; B、C. 纤毛图式腹面观(B)和背面观(C); D. 口区纤毛图式; E. 群体形态; F、G. 典型个体侧面观(F)和腹面观(G), 箭头指示口; H. 箭头指示大核, 无尾箭头指示伸缩泡; I. 大核; J—L. 纤毛图式腹面观(J)、侧面观(K)和背面观(L), 箭头指示缝合线, 无尾箭头指示口后动基列; M. 虫体顶部纤毛图式; N. 虫体底部纤毛图式; O. 口区小膜1—3和口侧膜的排布。CV: 伸缩泡; Ma: 大核; M1—3: 小膜1—3; PM: 口侧膜。比例尺: 20 μm

A. Lateral view of a representative individual; B, C. Infraciliature in ventral view (B) and dorsal view (C); D. Oral infraciliature; E. Colony form; F, G. Lateral view (F) and ventral view (G) of a representative individual, arrows point to oral; H. Arrow points to macronucleus and arrowhead points to contractile vacuole; I. Macronucleus; J—L. Ventral view (J), lateral view (K) and dorsal view (L) of the infraciliature, arrow points to suture and arrowheads point to postoral kineties; M. Anterior infraciliature of cell; N. Bottom infraciliature of cell; O. Arrangement of membranelles 1—3 and paroral membrane. CV: contractile vacuole; Ma: macronucleus; M1—3: membranelles 1, 2 and 3; PM: paroral membrane. Scale bar: 20 μm