

doi: 10.7541/2020.145

寄生于罗非鱼的刺纹车轮虫种群分析及其寄主偏好性研究

秦微微 赵元荪 唐发辉

(重庆师范大学动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要: 文章在刺纹车轮虫 *Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Paperna, 1983 的重描述基础上, 基于形态学特征、分子特征及系统发育分析, 对其种群多样性及寄主偏好性进行了研究。结果表明, 刺纹车轮虫三个种群: *Trichodina centrostrigata* (KP295473)、*Trichodina centrostrigata* (W) 和 *Trichodina centrostrigata* (Q) 在历经4年的时间里, 未发生明显的种群分化; 其次, 刺纹车轮虫与寄生于海水寄主的车轮虫聚支, 表明二者具有较近的亲缘关系; 再次, 刺纹车轮虫主要寄生于鲈形目的广盐性罗非鱼, 少数寄生于其他淡水鱼类, 具有较强的寄生特异性; 最后, 此研究中的寄主罗非鱼对于刺纹车轮虫具有100%的高感染率, 表明刺纹车轮虫为罗非鱼养殖业中一类潜在病害性微生物。

关键词: 刺纹车轮虫; 种群; 罗非鱼; 寄主偏好性; 感染率

中图分类号: S941.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)06-1247-09

罗非鱼隶属于鲈形目Perciformes、丽鱼科Cichlidae、罗非鱼属 *Oreochromis*, 是原产于非洲的中小型硬骨鱼类, 现为世界水产业重点培养的海、淡水养殖鱼类, 是渔业经济发展的重要组成。自20世纪60年代以来, 我国罗非鱼养殖业发展迅速^[1], 但在养殖过程中常常遭受多种病害的困扰。其中, 车轮虫就是常见的寄生虫, 主要寄生于鱼类的皮肤及鳃, 往往引起皮肤病和鳃病, 从而影响幼鱼的生长发育, 严重时可引起鱼苗大批死亡, 严重危害养殖渔业的发展^[2-4]。迄今, 基于健康养殖的理念, 尚未有高效低毒的车轮虫病防治手段。

作为一类具有危害性的游走类纤毛虫, 车轮虫的寄主十分广泛, 除鱼类外, 其亦可广泛地外寄生或共栖生于贝类以及两栖类。据报道, 全世界已记录车轮虫400余种^[5-10], 其中感染罗非鱼的车轮虫达30种, 包括车轮虫属 *Trichodina* 18种, 拟车轮虫属 *Paratrichodina* 1种, 小车轮虫属 *Trichodinella* 2种, 三分虫属 *Tripartiella* 9种。刺纹车轮虫 *Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Paperna, 1983 是罗非鱼上常见的病害性纤毛虫^[7, 9, 11-18]。本文结合其

形态学特征、分子特征及系统发育分析, 对刺纹车轮虫的种群多样性及寄主偏好性进行了研究, 以期作为罗非鱼的车轮虫病病原的鉴定提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集与鉴定

寄主罗非鱼(单性吉富系列: *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) 分别于2017年7月、2018年7月采自重庆市江津区长冲镇鱼类养殖场。将其带回实验室解剖取鳃进行涂片镜检以观察车轮虫的活体, 自然空干后的鳃涂片采用干银法进行染色^[19]。车轮虫的形态描述及测量依据 Lom 的统一特定方法进行^[20]; 齿体定位图则借助 CorelDRAW 11.0 绘制; 齿体定位描述则依据 Van As 和 Basson^[21] 倡导、唐发辉等^[22] 补充的方法进行。基于形态学测量数据, 利用 SPSS 和 Past3 软件进行种群间的显著性差异分析与主成分分析(PCA)。

1.2 DNA提取、扩增、测序与序列提交

为了DNA数据获取的准确性, 用于分子研究的

收稿日期: 2019-06-24; 修订日期: 2020-01-28

基金项目: 国家自然科学基金(31970409和31672280); 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, 31672280); the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2018jcyjAX0808); Science & Technology Research Foundation of Education Committee of Chongqing (KJQN201800508)]

作者简介: 秦微微(1995—), 女, 学士; 主要从事鱼类寄生虫学研究。E-mail: 1257437263@qq.com

通信作者: 唐发辉(1979—), 女, 博士; 主要从事鱼类寄生虫及其病害学研究。E-mail: trichodina@126.com

刺纹车轮虫两种群[*Trichodina centrostrigata* (W)与*Trichodina centrostrigata* (Q)]各自分别进行了两次(2条序列)与四次(4条序列)纯化虫体的分离与DNA样本的扩增测序。具体操作为:每次收集1—2只无菌水洗涤数次的刺纹车轮虫于1.5 mL的Eppendorf管中,按照REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma, St. Louis, USA)试剂盒说明书提取样本DNA,随后保存于-20℃备用。18S rDNA扩增共涉及3对引物和3种PCR反应条件:(1) 82F (5'-GAAACTGGGAATGGCTC-3')和LSUR (5'-GT TAGTTTCTTTTCTCCGC-3')^[23],反应条件为:94℃预变性1min 30s; 94℃变性20s, 58℃退火20s, 72℃延伸2min, 35个循环; 72℃再延伸5min; (2) TGF (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')和TG-R (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3')^[23],反应条件为:94℃预变性5min; 94℃变性1min, 56℃退火1min, 72℃延伸2min, 35个循环; 72℃再延伸10min; (3) 18S-F1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGC CAGT-3')和18S-R1 (5'-TGCAGGTTACCTACG GAAA-3')^[24],反应条件为:94℃预变性1min, 56℃退火2min, 72℃延伸2min, 5个循环; 94℃变性1min, 58℃退火1min, 72℃延伸2min, 35个循环; 72℃再延伸10min。ITS-5.8S rDNA扩增引物为ERIB10-V (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGGAAG-3')和28S1R (5'-GTGTTTCAAGACGGGTCG-3')^[25],PCR反应条件为:94℃预变性3min, 94℃变性30s, 54℃退火30s, 72℃延伸2min, 35个循环; 72℃再延伸10min。PCR纯化产物送至英潍捷基(上海)贸易有限公司完成测序。

本研究共获得6条刺纹车轮虫18S rDNA序列,包括*T. centrostrigata* (W)种群2条序列:*T. centrostrigata* (W1, MN071225)和*T. centrostrigata* (W2, MN071226); *T. centrostrigata* (Q)种群4条序列:*T. centrostrigata* (Q1, MN071227)、*T. centrostrigata* (Q2, MN071228)、*T. centrostrigata* (Q3, MN071229)和*T. centrostrigata* (Q4, MN071230)。同样,共获得刺纹车轮虫ITS-5.8S rDNA序列6条,包括*T. centrostrigata* (W)种群2条序列:*T. centrostrigata* (W1, MN071231)和*T. centrostrigata* (W2, MN071232); *T. centrostrigata* (Q)种群4条序列:*T. centrostrigata* (Q1, MN071233)、*T. centrostrigata* (Q2, MN071234)、*T. centrostrigata* (Q3, MN071235)和*T. centrostrigata* (Q4, MN071236)。

1.3 18S rDNA的一级和二级结构分析

通过GenBank中BLAST对本研究所获的刺纹车轮虫序列进行序列同源性比对;使用MEGA6中的Kimura 2-parameter模型计算遗传距离;采用

MEGA6和BioEdit 7.0.5.3进行变异位点分析。基于自由能最小化利用RNA structure 5.2进行RNA二级结构预测,参照选自European ribosomal RNA database的二级结构模型,使用RNAViz 2.0进行手动调整^[26]。本研究选取与系统发育相关的18S rDNA的三个高变区(V4、V5和V7区)来分析刺纹车轮虫的种群变异。

1.4 系统发育树的构建

将本研究新获得的18S rDNA序列和从GenBank数据库中选取的寡膜纲53条完整或部分18S rDNA序列(共59条序列),以大肾形虫*Colpoda magna* (EU039896)和毛板壳虫*Coleps hirtus* (AM 292311)为外群,所有序列在MEGA6中的Clustal W多重比对后,分别使用MrBayes 3.1.2软件与CIPRES Science Gateway在线网站构建BI树与ML树^[27, 28],最后使用FigTree v1.4.2与Photoshop CS3完成系统发育树的绘制。

2 结果

2.1 形态学重描述

本研究所获刺纹车轮虫两个种群均采自重庆市江津区长冲镇鱼类养殖场的单性吉富系列罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*)的鳃表;基于本研究对寄主鱼的解剖调查数据:两次检测种群样本的感染率高而感染强度却较低(表1)。

种群1: 刺纹车轮虫, *Trichodina centrostrigata* (W)

感染率: 100% (检查84条, 84条感染)

感染强度: 轻度感染(+)

采集时间: 2017年7月

形态学描述(标本测量数 $n=14$): 虫体呈圆盘状, 属中型车轮虫, 虫体直径42.9—57.5 μm (49.4±4.1), 附着盘直径34.9—51.7 μm (41.8±4.2), 齿环直径21.7—32.4 μm (25.7±3.0), 缘膜宽3.0—4.4 μm

表1 罗非鱼感染刺纹车轮虫情况表

Tab. 1 Infection data of the *T. centrostrigata* from cultured tilapia

种群 Population	感染率 Infection rate	感染强度 Infection intensity	资料来源 Source
<i>T. centrostrigata</i> (W)	100% (84/84)	+	本研究
<i>T. centrostrigata</i> (Q)	100% (7/7)	+	本研究
<i>T. centrostrigata</i>	54.6% (112/205)	+++	[17]

注: 感染强度的界定: 轻度感染: 在10倍显微镜下1个视野内有0—5个虫体记为+; 中度感染: 5—10个虫体记为++; 重度感染: 10个虫体以上记为+++

Note: The definition of infective intensity: mild infection: a vision with 0—5 parasites marked for +; moderate infection: a vision with 5—10 parasites marked for ++; severe infection: a vision over 10 parasites marked for +++; all of them were under 10× microscope

(3.8 ± 0.4); 齿体之间嵌合紧密, 齿体纵长 $10.8—15.7 \mu\text{m}$ (12.9 ± 1.3), 齿长 $3.4—5.9 \mu\text{m}$ (4.7 ± 0.6)。齿钩宽大粗壮, 齿钩长 $4.9—7.0 \mu\text{m}$ (6.1 ± 0.5), 齿钩外切缘圆滑与缘膜不平行, 骨突钝圆且低于外切缘, 齿钩前缘平直, 齿钩凸点超过Y+1轴, 齿钩后缘平直或稍弯曲与齿钩凹点形成“L”形, 无明显后突起, 但有的齿体具有钩突; 齿钩连接纤细而齿锥发达, 齿锥宽 $1.6—2.3 \mu\text{m}$ (2.1 ± 0.3), 在X轴上下大小相似; 齿棘长 $3.8—6.8 \mu\text{m}$ (4.8 ± 0.7), 呈棒状, 较直略向前倾, 超过Y+1轴, 齿棘顶点钝圆, 无明显棘突; 辐射状排列的中央颗粒呈棒状或长条状; 口围绕度约 360° (图1和表2)。

种群2: 刺纹车轮虫, *Trichodina centrostrigata* (Q)

感染率: 100% (检查7条, 7条感染)

感染强度: 轻度感染(+)

采集时间: 2018年7月

形态学描述(标本测量数 $n=15$): 中型淡水车轮虫, 虫体呈圆盘状, 齿体与中央颗粒分布明显。虫体直径 $42.1—54.7 \mu\text{m}$ (47.4 ± 3.8), 附着盘直径

$35.1—46.3 \mu\text{m}$ (40.3 ± 3.3), 齿环直径 $20.5—30.9 \mu\text{m}$ (24.9 ± 2.8), 缘膜宽 $2.5—4.2 \mu\text{m}$ (3.5 ± 0.4); 齿钩长 $4.4—7.1 \mu\text{m}$ (5.8 ± 0.6), 齿钩宽大呈长方形, 骨突钝圆, 齿钩外切缘圆滑与缘膜平行且高于骨突, 齿钩前缘平直或稍弯曲, 齿钩凸点超过Y+1轴, 齿钩后缘平直光滑, 具明显钩突, 无明显后突起; 齿钩连接及齿锥发达, 齿锥宽 $1.1—2.6 \mu\text{m}$ (1.7 ± 0.4), X轴上锥形与下锥形比例接近; 齿棘长 $3.6—6.9 \mu\text{m}$ (5.0 ± 0.7), 齿棘前倾, 超过Y+1轴, 齿棘顶点尖锐且指向长条状中央颗粒, 无明显棘突; 口围绕度约 400° (图1和表2)。

2.2 基于SPSS与PCA对刺纹车轮虫的种群比较研究

以网状车轮虫 *Trichodina reticulata* Hirschmann & Partsch, 1955的 *T. reticulata* (S)种群^[25]作为种间对照, 通过SPSS软件对刺纹车轮虫 *T. centrostrigata* (W)和 *T. centrostrigata* (Q)两种群进行显著性差异分析, 结果显示: 网状车轮虫 *T. reticulata* (S)与刺纹车轮虫 *T. centrostrigata* (Q)在虫体直径、附着盘直径、缘膜宽、齿环直径、齿体纵长、齿长、齿钩长、齿棘长以及中央颗粒数九方面的形态特征具有极显著差异 ($P < 0.01$), 在齿锥宽具有显著差异 ($P = 0.019 < 0.05$); 刺纹车轮虫 *T. centrostrigata* (W)和 *T. centrostrigata* (Q)种群之间仅在齿锥宽上具有极显著差异 ($P = 0.003 < 0.01$, 表3)。

同理, 以网状车轮虫 *T. reticulata* (S)作为种间对照, 利用Past3对以上三个种群进行主成分分析, 刺纹车轮虫 *T. centrostrigata* (W)与 *T. centrostrigata* (Q)两种群在形态学上具有高度的重叠, 而网状车轮虫 *T. reticulata* (S)在形态学上明显区别于 *T. centrostrigata* (Q, 图2)。

2.3 基于18S rDNA与ITS-5.8S rDNA的分子特征分析

18S rDNA序列的同源性、遗传距离及变异位点的分析: 将 *T. centrostrigata* (W)与 *T. centrostrigata* (Q)种群的18S rDNA序列在GenBank中进行BLAST比对, 均与现有的刺纹车轮虫 *T. centrostrigata* (KP295473)最相似(相似度 $\geq 99.9\%$)。以上三个种群之间的序列相似度为 $99.8\%—100\%$, 遗传距离为 $0—0.001$ 。其中, *T. centrostrigata* (KP295473)与 *T. centrostrigata* (W)种群之间序列相似度为 100% , 遗传距离为 0 ; *T. centrostrigata* (KP295473)与 *T. centrostrigata* (Q)种群之间序列相似度为 $99.8\%—100\%$, 遗传距离为 $0—0.001$; *T. centrostrigata* (W)与 *T. centrostrigata* (Q)种群之间序列相似度为 $99.9\%—100\%$, 遗传距离为 $0—0.001$ 。7条刺纹车轮虫的18S rDNA序列经多重比对后, 其覆盖长度为 1326 bp , 与 *T. centrostrigata* (KP295473)进行变异位

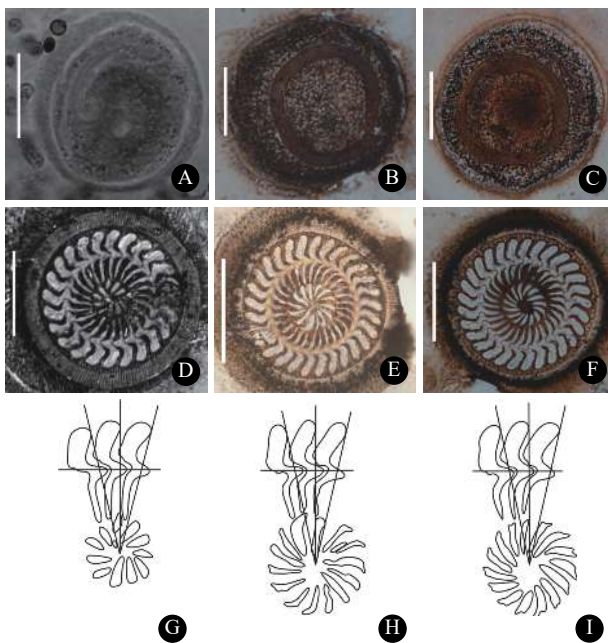


图1 刺纹车轮虫银染标本的显微照片与齿体定位图

Fig. 1 Photomicrographs of silver stained specimens and diagrams of the denticle location for *T. centrostrigata*

A、D、G. *T. centrostrigata* (KP295473)种群(王琴等, 2015); B、E、H. *T. centrostrigata* (W)种群(本研究); C、F、I. *T. centrostrigata* (Q)种群(本研究); A—C. 口围绕度; D—F. 附着盘显微结构; G—F. 齿体定位图。比例尺= $20 \mu\text{m}$

A, D, G. *T. centrostrigata* (KP295473) (from Wang Q et al, 2015); B, E, H. *T. centrostrigata* (W) (present); C, F, I. *T. centrostrigata* (Q) (present). A—C. Adoral ciliary spiral turns; D—F. Photomicrographs of adhesive disc; G—F. Diagrams of the denticle location. Bars= $20 \mu\text{m}$

表 2 刺纹车轮虫14种群形态学特征统计

Tab. 2 Biometrical data of fourteen populations of *T. centrostrigata* (measurement unit: μm)

刺纹车轮虫 <i>T. centrostrigata</i>	宿主 Host	采集地点 Localiza-tion	寄生部位 Location	虫体直径 Body diameter	附着盘直径 Adhesive disc	齿环直径 Denticular ring	缘膜宽 Border membrane	齿体纵长 Denticle span	齿长 Denticle length	齿钩长 Blade length	齿钩宽 Central part width	齿棘长 Ray length	齿体数 Denticle number	辐线数 Radial pins per denticle	中央颗粒 Granules number	口围绕度 Adoral ciliary spiral	资料来源 Source
种群1	单性吉富系列罗非鱼	亚洲中国	鳃	42.9—57.5 (49.4±4.1)	34.9—51.7 (41.8±4.2)	21.7—32.4 (25.7±3.0)	3.0—4.4 (3.8±0.4)	10.8—15.7 (12.9±1.3)	3.4—5.9 (4.7±0.6)	4.9—7.0 (6.1±0.6)	1.6—2.3 (2.1±0.3)	3.8—6.8 (4.8±0.7)	27—32(29)	6—9(8)	11—17(14)	360°	本研究
种群2	单性吉富系列罗非鱼	重庆江津	鳃	42.1—54.7 (47.4±3.8)	35.1—46.3 (40.3±3.3)	20.5—30.9 (24.9±2.8)	2.5—4.2 (3.5±0.4)	10.2—14.7 (12.5±1.2)	3.3—5.7 (4.6±0.5)	4.4—7.1 (5.8±0.6)	1.1—2.6 (1.7±0.4)	3.6—6.9 (5.0±0.7)	26—32(28)	6—9(8)	10—18(14)	400°	本研究
种群3	单性奥尼系列罗非鱼	亚洲中国	鳃	48.0—56.0 (51.8±3.6)	39.0—47.0 (43.1±3.9)	25.0—32.0 (28.7±3.2)	3.0—5.0 (3.7±0.5)	13.0—17.0 (15.3±1.5)	4.0—7.0 (5.6±0.5)	5.0—8.0 (6.3±0.7)	2.0—4.0 (2.6±0.3)	5.0—7.0 (5.6±0.4)	24—29(26)	8—10(8)	11—15(14)	410°—455°	[18]
种群4	南方褶唇丽罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、伦氏罗非鱼、斯氏罗非鱼、鳃	非洲南非 德兰士瓦	鳃、鳍	37.4—54.4 (44.6±3.8)	31.2—45.8 (37.6±3.6)	18.7—33.3 (23.2±2.5)	2.0—4.4 (3.4±0.4)	—	2.0—6.2 (4.1±0.6)	2.8—6.4 (5.2±0.7)	1.0—3.0 (1.9±0.3)	3.2—6.0 (4.5±0.6)	26—30(28)	6—7(7)	12—16(14)	410°—450°	[11]
种群5	莫桑比克罗非鱼	亚洲中国 台湾彰化	鳃、皮肤、鳍条	39.3—55.7 (47.6±4.8)	32.9—48.4 (40.5±4.2)	19.6—29.7 (24.0±2.7)	2.2—4.8 (3.9±0.6)	—	4.0—6.5 (5.2±0.6)	4.7—7.4 (6.0±0.7)	1.2—3.1 (2.0±0.4)	4.0—6.2 (5.2±0.7)	25—29(25)	6—8(8)	12—16(14)	410°—455°	[7]
种群6	尼罗罗非鱼	非洲埃及 尼罗河三角洲	鳃	48.0—66.0 (56.8±5.1)	32.0—49.0 (38.1±4.3)	20.0—29.0 (24.2±2.2)	4.5(3)	11.0—14.0 (12.0)	—	—	—	—	24—29(27)	—	—	—	[12]
种群7	南方褶唇丽鱼、长体伴丽鱼、安德森罗非鱼、伦氏罗非鱼、斯氏罗非鱼、窄头鲷、鳃、缺帘鱼、刺纹歧须鲷	非洲南非 纳米比亚	鳃、皮肤、鳍条	39.0—50.0 (46.6±3.4)	33.5—46.0 (40.4±3.7)	20.0—27.5 (24.1±1.8)	2.5—3.5 (3.1±0.3)	11.0—16.5 (12.7±0.1)	4.0—6.5 (4.9±0.5)	4.8—8.5 (5.5±1.0)	1.5—3.0 (1.9±0.4)	4.5—6.0 (5.3±0.5)	23—27(25)	8—10(9)	11—14(13)	400°—402°	[13]
种群8	莫桑比克罗非鱼	亚洲中国 台湾台北	鳃、皮肤、鳍条	38.0—51.0 (43.8±4.4)	30.0—45.0 (36.0±4.2)	18.5—26.0 (21.7±2.4)	3.0—4.0 (3.6±0.5)	10.0—13.0 (11.3±0.9)	3.0—5.0 (4.3±0.6)	5.0—6.0 (5.5±0.5)	1.0—1.5 (1.1±0.2)	3.5—5.0 (4.3±0.6)	24—29(26)	7—8(8)	13—16(14)	400°	[9]
种群9	尼罗罗非鱼	南美洲墨西哥 哥锡那罗亚	鳃、皮肤、鳍条	—	30.0—44.0 (37.5±3.9)	18.0—38.0 (19.6±2.1)	—	—	3.3—5.6 (4.3±0.7)	3.3—6.7 (4.6±0.8)	2.2—6.7 (2.7±0.9)	3.3—7.8 (5.3±1.0)	23—29(26)	6—8(6)	12—15(13)	—	[14]
种群10	鳃	亚洲中国 重庆沙坪坝	鳃	47.0—53.0 (50.3±2.3)	35.0—43.0 (38.5±3.6)	24.0—28.0 (25.8±1.8)	3.0—5.0 (4.1±0.6)	12.0—16.0 (14.2±1.8)	4.0—6.0 (5.1±0.5)	5.0—7.0 (6.2±0.6)	2.0—3.0 (2.6±0.3)	4.0—7.0 (5.1±0.7)	24—28(25)	8—10(8)	14	400°—420°	[15]
种群11	莫桑比克罗非鱼	亚洲印度 孟加拉邦	鳃	31.8—47.0 (41.5±4.9)	28.6—39.8 (35.1±4.5)	17.3—24.5 (20.9±2.8)	3.1—5.1 (3.6±0.4)	8.2—11.8 (10.4±1.2)	3.6—6.1 (4.5±0.6)	3.6—5.6 (4.6±0.6)	1.5—2.0 (1.8±0.2)	3.1—5.1 (4.0±0.6)	20—25(25)	5—9(8)	14	400°—410°	[16]
种群12	富系列罗非鱼	非洲中国 广西梧州	鳃	41.5—61.0 (52.8±4.9)	33.2—46.8 (46.7±4.9)	21.0—35.1 (28.7±3.5)	1.6—3.9 (2.8±0.5)	10.7—16.7 (14.1±1.5)	4.1—6.7 (5.5±0.6)	4.5—7.6 (6.3±0.9)	1.6—3.9 (2.6±0.5)	3.5—6.7 (5.2±0.7)	24—29(26)	7—10(8)	12—15(14)	380°—470°	[17]
种群13	富系列罗非鱼	非洲中国 广西梧州	鳃	39.1—52.6 (46.0±3.6)	33.2—46.8 (39.3±3.8)	19.1—25.8 (22.5±2.0)	2.2—3.9 (3.2±0.4)	10.2—14.1 (12.2±1.1)	3.0—5.0 (4.3±0.4)	4.2—6.9 (5.5±0.7)	1.8—3.2 (2.4±0.4)	3.1—4.8 (4.1±0.5)	22—27(25)	7—9(8)	10—15(13)	400°—450°	[17]
种群14	富系列罗非鱼	非洲中国 广西柳州	鳃	42.6—58.7 (49.0±5.1)	35.4—53.3 (42.3±5.5)	20.4—32.2 (25.9±3.9)	2.6—4.0 (3.2±0.5)	10.2—15.6 (13.0±1.6)	4.1—6.5 (5.0±0.7)	5.0—7.4 (5.9±0.7)	2.0—3.0 (2.5±0.3)	2.7—6.1 (4.5±0.8)	26—29(27)	8—10(9)	12—14(13)	380°—450°	[17]

注：统计模式：最小值—最大值(平均值±标准差)；—：无描述或无数据

Note: Statistic mode: Mix—Max(Mean±SD); —: No description or data

点分析, 结果显示: *T. centrostrigata* (Q1)在第2位点处发生颠换; *T. centrostrigata* (Q4)在第577位点出现gap (图 3)。

ITS-5.8S rDNA序列的同源性、遗传距离及变异位点的分析: 将6条ITS-5.8S rDNA序列进行序列同源性分析与遗传距离分析, 结果显示: *T. centrostrigata* (W)与*T. centrostrigata* (Q)种群之间的序列相似度为100%, 遗传距离为0。将ITS-5.8S rDNA序列进行变异位点分析, 结果显示*T. centrostrigata* (W)与*T. centrostrigata* (Q)种群之间无变异位点。

表 3 基于SPSS的车轮虫种群统计分析结果

Tab. 3 Statistical analysis of trichodinid populations based on SPSS

形态特征Morphological characteristics	P	
	<i>T. centrostrigata</i> (W) vs. <i>T. centrostrigata</i> (Q)	<i>T. centrostrigata</i> (Q) vs. <i>T. reticulata</i> (S)
虫体直径Body diameter	0.085	0.000
附着盘直径Adhesive disc	0.150	0.000
缘膜宽Border membrane	0.050	0.000
齿环直径Denticular ring	0.163	0.000
齿体纵长Denticle span	0.256	0.000
齿长Denticle length	0.678	0.000
齿钩长Blade length	0.315	0.000
齿锥宽Central part width	0.003	0.019
齿棘长Ray length	0.359	0.001
齿体数Denticle number	0.155	0.295
辐线数Radial pins per denticle	0.357	—
中央颗粒Granules number	0.449	0.000

注: $P>0.05$. 不存在显著性差异; $P<0.05$. 存在显著性差异; $P<0.01$. 存在极显著性差异; —. 无数据

Note: $P>0.05$ (no significant difference); $P<0.05$ (significant difference); $P<0.01$ (extremely significant difference); —. No data

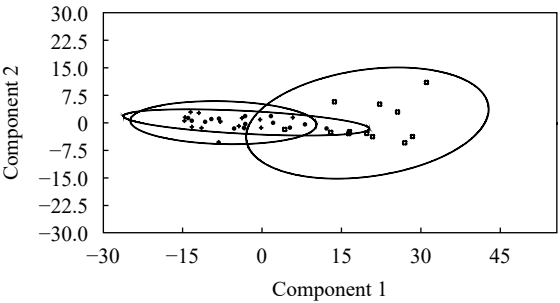


图 2 刺纹车轮虫种群的主成分分析(以网状车轮虫为参考对象)
Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of populations for *T. centrostrigata* (based on *T. reticulata*)

T. reticulata (S) (□), *T. centrostrigata* (W) (●), *T. centrostrigata* (Q) (+)

T. reticulata (S) indicated by square (□), *T. centrostrigata* (W) by dots (●) and *T. centrostrigata* (Q) by plus sign (+)

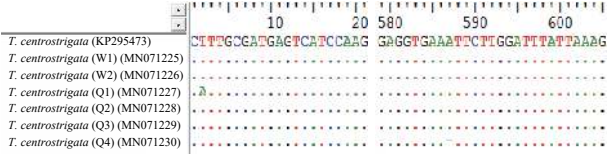


图 3 刺纹车轮虫3种群的18S rDNA序列变异位点比较

Fig. 3 The comparison of variation site among three populations of *T. centrostrigata*

18S rRNA二级结构的分析: 为了进一步评估刺纹车轮虫种群变异, 本文对其18S rRNA进行二级结构预测, 结果显示: 7条刺纹车轮虫序列在V4、V5和V7三个高变区具有一致的二级结构构型, 且在一级结构上也完全一样(图 4和图 5)。

2.4 系统发育分析

基于18S rDNA序列, 通过BI法与ML法构建的系统发育树显示: 所有刺纹车轮虫聚为一支, 具有高靴攀值(1.00BI, 100%ML)支持, 靠近系统发育树的顶端; 其次, 刺纹车轮虫支与2种海水鱼类和4种海水贝类寄生车轮虫聚为一支(1.00BI, 96%ML), 之后再与寄生于淡水类寄主的车轮虫聚支(图 6)。

3 讨论

3.1 刺纹车轮虫的系统发育与种群分化

刺纹车轮虫三个种群的形态学比较表明, 本研究涉及刺纹车轮虫*T. centrostrigata* (W)与*T. centrostrigata* (Q)种群在虫体大小及各形态特征量度上相似, 而王琴等^[18]从单性奥尼系列罗非鱼*Oreochromis aurea* ♂×*Oreochromis nilotica* ♀鳃表检获的*T. centrostrigata* (KP295473)种群在虫体各形态特征上则差异略大, 齿钩呈棒槌状, 棒状的中央颗粒略短。PCA与SPSS分析显示, *T. centrostrigata* (W)与*T. centrostrigata* (Q)种群除在齿锥宽上具有极显著差异($P=0.003<0.01$)外, 在其他形态特征上均不具有明显差异; 而不同物种之间在各形态特征上具有极显著性差异。18S rDNA与ITS-5.8S rDNA常用作种间、种内鉴定的分子标记^[29, 30], 刺纹车轮虫三个种群之间在18S rDNA的序列相似度(99.8%—100%)、遗传距离(0—0.001)、变异位点(1处颠换)仅存在微小差异, 但均在种内水平; 基于18S rRNA的二级结构预测表明, 三个种群在V4、V5与V7三个高变区不仅具有一致的二级结构构型, 在一级结构碱基序列上也无差异, 从而支持其同种性。在系统发育树中, 7条刺纹车轮虫序列并未按种群聚支。综上, 结合形态学、分子特征及系统发育综合分析, 刺纹车轮虫*T. centrostrigata* (KP295473)、*T. centrostrigata* (W)和*T. centrostrigata* (Q)三个种

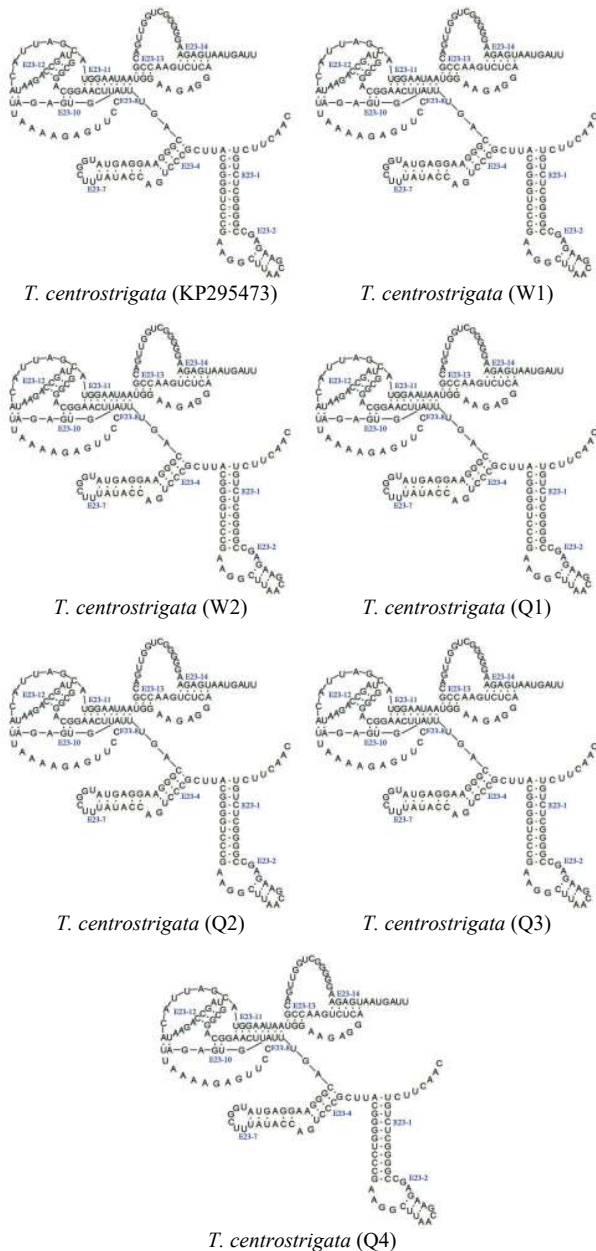


图4 刺纹车轮虫3种群的18S rRNA V4区的比较

Fig. 4 The V4 region of the 18S rRNA secondary structure for *T. centrostrigata*

群之间在虫体及各形态特征的量度上, 齿钩、齿棘、中央颗粒形态上, 18S rDNA序列上存在微小的种群差异, 但未出现明显的种群分化, 这可能是由于寄主罗非鱼品系不同而导致的。在系统发育树中, 刺纹车轮虫支靠近系统树的顶端且与海水寄主寄生车轮虫聚支, 表明其与海水寄主寄生车轮虫的亲缘关系较近, 且在系统进化中分化较晚。这可能是由于罗非鱼为广盐性的经济养殖鱼类, 在世界各地之间进行广泛地引种养殖中, 或许在引种过程中的检疫不严格等原因将海水环境中的刺纹车轮虫带入淡水领域。

3.2 寄主偏好性

刺纹车轮虫首次由Basson等^[11]发现于南非的鲈形目鱼类: 莫桑比克罗非鱼*Oreochromis mossambicus* Peters, 1852、南方褶唇丽鱼*Pseudocrenilabrus philander* Weber, 1897、斯氏罗非鱼*Tilapia sparrmanii* Smith, 1840、伦氏罗非鱼*Tilapia rendalli* Boulenger, 1896与鲤形目淡水鱼类: 鲤*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758的鳃表, 偶见于体表和鳍条。1986年, El-Tantawy和Kazubski^[12]在埃及尼罗河三角洲从鲈形目鱼类: 尼罗罗非鱼*Oreochromis nilotica* Linnaeus, 1758的鳃表检测到刺纹车轮虫。同年, Van As和Basson^[7]在中国台湾从养殖的莫桑比克罗非鱼鳃表发现此虫种。1992年, Van As和Basson^[13]在南非地区多次发现此虫种, 其寄生于鲈形目寄主长体伴丽鱼*Hemichromis elongatus* Guichenot, 1861与窄头鲈丽鱼*Serranochromis angusticeps* Boulenger, 1907的鳃表、南方褶唇丽鱼与安德森罗非鱼*Oreochromis andersoni* Castelnau, 1861的鳃

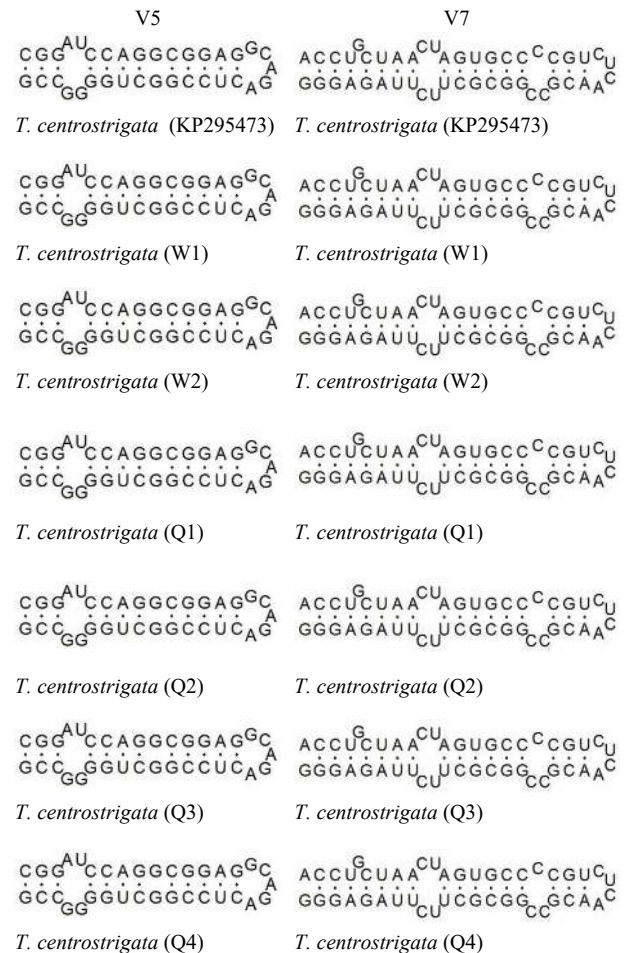


图5 刺纹车轮虫3种群的18S rRNA V5和V7区的比较

Fig. 5 V5 and V7 regions of the 18S rRNA secondary structure for *T. centrostrigata*

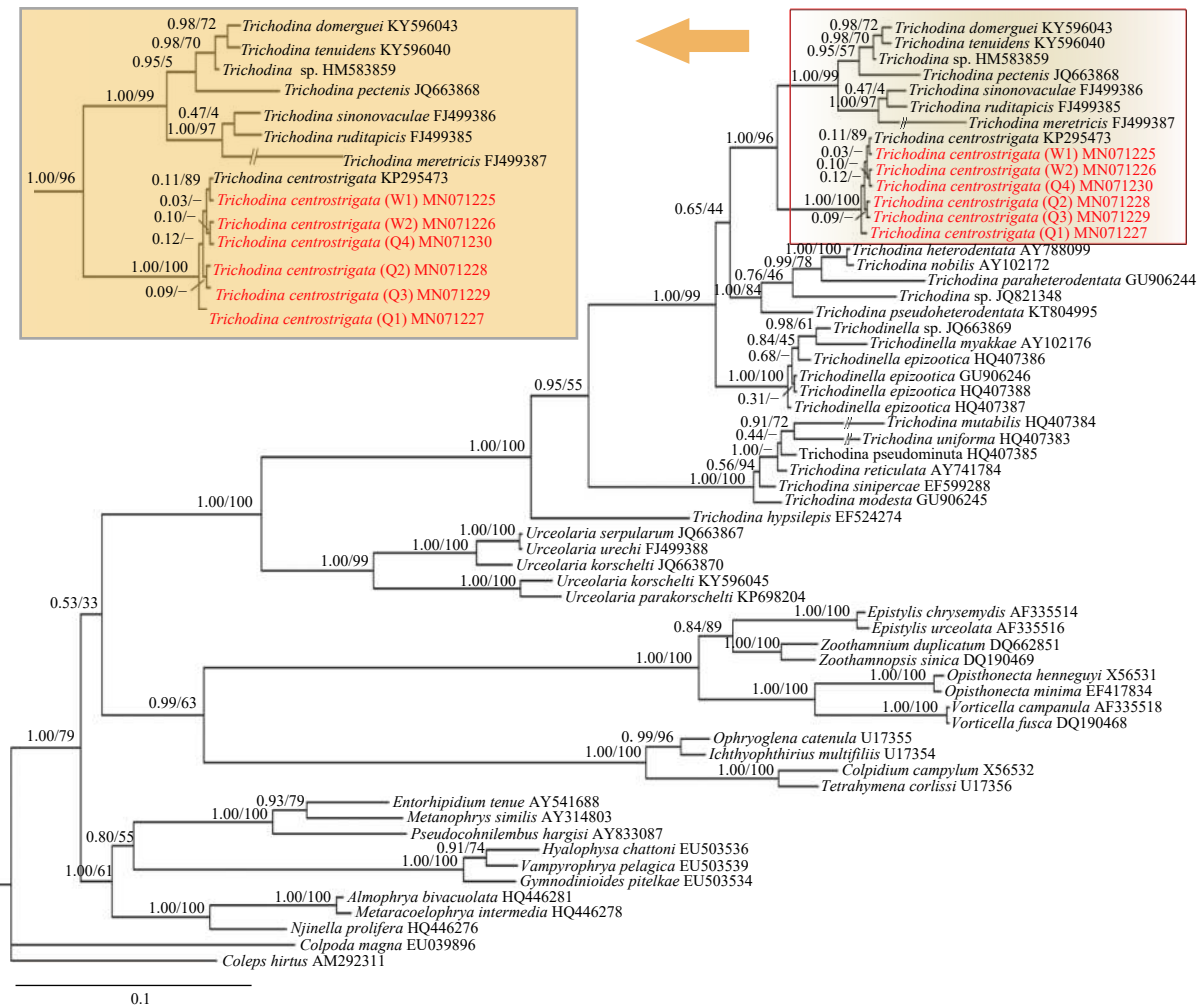


图 6 基于BI法与ML法构建的18S rDNA系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences by BI and ML analyses

表、体表及鳍、伦氏罗非鱼的鳃表、斯氏罗非鱼体表及鳍; 寄生于鲤形目寄主鲃 *Barbus* sp. 与野鲮 *Labeo cylindricus* Peters, 1852 的鳃表、缺帘鱼 *Brycinus lateralis* Boulenger, 1900 的鳃表及体表, 还寄生于鲶形目的狮纹歧须鲶 *Synodontis leopardinus* Pellegrin, 1914 的鳃表。1994 年, Basson 和 Van As^[9] 在中国台湾的莫桑比克罗非鱼的鳃表、皮肤及鳍条均获得该虫种。2002 年, Rodríguez-Santiago^[14] 在墨西哥锡那罗亚地区的尼罗罗非鱼的鳃表和鳍条上检测到该虫种; 2005 年, 唐发辉等^[15] 在中国重庆地区鲤形目鱼类: 鲫 *Carassius auratus* Linnaeus, 1758 的鳃表获得该虫种。2006 年, Mitra 和 Bandyopadhyay^[16] 在印度从莫桑比克罗非鱼的鳃表发现该虫种。之后, 姜艳妍等^[17] 在广西地区于养殖鱼塘或自然水体中的单性奥尼系列、吉富系列罗非鱼的鳃表检测到该虫。王琴等^[18] 于 2014 年在中国重庆江津区养殖鱼场的单性奥尼系列罗非鱼鳃表检测到该虫种; 而在本研究中, 两次不同时期的采样均

从单性吉富系列罗非鱼获得刺纹车轮虫。上述研究表明: 刺纹车轮虫主要寄生于鲈形目的罗非鱼, 故罗非鱼对刺纹车轮虫具有较明显的易感性。换言之, 该类病原同时也对罗非鱼表现出较显著的寄生特异性或宿主偏好性。

在本研究中, 尽管两次调查样本量不同, 感染率均为 100% (种群 2 样本量相对较少, 有待进一步深入调查), 但其感染强度较低, 均为轻度感染 (表 1)。推测这种高感染率、低感染强度的寄生方式, 有助于刺纹车轮虫在尽量减轻对寄主伤害的同时来寻求更多寄主的庇护, 以维持自身种群的繁衍。虽然本研究调查涉及的寄主罗非鱼暂未表现出明显的病症, 但刺纹车轮虫仍然是一类在水产养殖中不可忽视的潜在病原, 故在罗非鱼养殖业中仍值得渔民高度关注。

参考文献:

- [1] Chen S J, Li L H, Yang X Q, *et al.* Present situation of

- tilapia industry and measures of improving export competition power [J]. *South China Fisheries Science*, 2007, **3**(1): 75-80. [陈胜军, 李来好, 杨贤庆, 等. 我国罗非鱼产业现状分析及提高罗非鱼出口竞争力的措施 [J]. 南方水产, 2007, **3**(1): 75-80.]
- [2] Hubei Institute of Hydrobiology. Hubei Province Fish Disease Pathogen Map [M]. Beijing: Science Press, 1973: 15. [湖北省水生生物研究所. 湖北省鱼病病原区系图志 [M]. 北京: 科学出版社, 1973: 15.]
- [3] Tang F H, Zhao Y J. Taxonomic studies of three species of *Trichodina* Ehrenberg, 1838 with pathologic research into gill tissue of *Carassius auratus* caused by *Trichodina heterodentata* Duncan, 1977: a study of trichodinids from freshwater fishes in Chongqing II [J]. *Journal of Chongqing Normal University* (Natural Science Edition), 2007, **24**(3): 8-12. [唐发辉, 赵元荪. 三种鲫鱼外寄生车轮虫分类学及异齿车轮虫致鳃组织病理学研究——重庆地区淡水车轮虫研究 II [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2007, **24**(3): 8-12.]
- [4] Valladão G M R, Gallani S U, Pádua S B D, et al. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study [J]. *Parasitology*, 2014, **141**(5): 662-669.
- [5] Lom J, Dyková I. Protozoan Parasites of Fishes [M]. Developments in Aquaculture & Fisheries Science, 1992: 1-315.
- [6] 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, 赵元荪, 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.]
- [7] Van As J G, Basson L. Trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) ectoparasites of cultured cichlids from Taiwan [J]. *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica*, 1986, **25**(2): 135-139.
- [8] Basson L, Van As J G. Trichodinid (Ciliophora: Peritrichida) gill parasites of freshwater fish in South Africa [J]. *Systematic Parasitology*, 1987, **9**(2): 143-151.
- [9] Basson L, Van As J G. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of wild and cultured freshwater fishes in Taiwan, with notes on their origin [J]. *Systematic Parasitology*, 1994, **28**(3): 197-222.
- [10] Abdel-Baki A S, Al G A, Al-Quraishy S. First record of three African trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Saudi Arabia with re-evaluation of their host specificity [J]. *Parasitology Research*, 2017, **116**(4): 1285-1291.
- [11] Basson L, Van As J G, Paperna I. Trichodinid ectoparasites of cichlid and cyprinid fishes in South Africa and Israel [J]. *Systematic Parasitology*, 1983, **5**(4): 245-257.
- [12] El-Tantawy S A M, Kazuski S L. The trichodinid ciliates from fish, *Tilapia nilotica* from the Nile Delta (Egypt) [J]. *Acta Protozoologica*, 1986, **25**(4): 439-444.
- [13] Van As J G, Basson L. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of freshwater fishes of the Zambesi River System, with a reappraisal of host specificity [J]. *Systematic Parasitology*, 1992, **22**(2): 81-109.
- [14] Rodríguez-Santiago M A. Identificación de especies ectoparásitas del género *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichida) en *Tilapia nilotica* mediante correlación invariante con filtros compuestos [D]. Sinaloa: Unidad Mazatlán, 2002: 35-40.
- [15] Tang F H, Zhao Y J, Tang A K. Presence of ectoparasitic trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophorea, Peritrichida) on the gills of cultured freshwater fish, *Carassius auratus* in Chongqing, China, with the description of a new species of the genus *Trichodina* [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2005, **30**(1): 35-40.
- [16] Mitra A K, Bandyopadhyay P A. First record of ectoparasitic African trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) in a cichlid fish *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) from the Churni River system, West Bengal [J]. *India Animal Biology*, 2006, **56**(3): 323-333.
- [17] Jiang Y Y, Zhao Y J, Tang F H. Studies on the taxonomy and biodiversity of ectoparasitic trichodinids from cultured tilapia in Guangxi [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2015, **34**(4): 584-593. [姜艳妍, 赵元荪, 唐发辉. 广西地区罗非鱼外寄生车轮虫的形态分类学及多样性研究 [J]. 四川动物, 2015, **34**(4): 584-593.]
- [18] 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, 赵元荪. 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.]
- [19] Klein B M. The dry silver method and its proper use [J]. *Journal of Protozoology*, 1958, **5**(2): 99-103.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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, 赵元荪, 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.]
- [23] Irwin N A T, Lynn D H. Molecular phylogeny of mobilid and sessilid ciliates symbiotic in eastern pacific limpets (Mollusca: Patellogastropoda) [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2015, **62**(4): 543-552.
- [24] Utz L R P, Eizirik E. Molecular phylogenetics of subclass Peritrichia (Ciliophora: Oligohymenophorea) based on expanded analyses of 18S rRNA sequences [J]. *Jour-*

- nal of Eukaryotic Microbiology*, 2007, **54**(3): 303-305.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(12): 1572-1574.
- [28] 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.
- [29] Whipps C M, El-Matbouli M, Hedrick R P, *et al.* *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1(ITS-1) sequences support recent spread of the parasite to North America and within Europe [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, **60**(2): 105-108.
- [30] Yi Z Z, Miao M, Gao S, *et al.* On molecular biology of ciliated protozoa: frontier areas and progresses [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2016, **61**(20): 2227-2238.

POPULATION ANALYSIS AND HOST PREFERENCE OF *TRICHODINA CENTROSTRIGATA* BASSON, VAN AS & PAPERNA, 1983 FROM TILAPIA

QIN Wei-Wei, ZHAO Yuan-Jun and TANG Fa-Hui

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

Abstract: On the basis of redescription of *Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Papema, 1983, we further explored the population diversity and host preference based on morphological characteristics, molecular characteristics and phylogenetic analyses. The results showed that the three populations, viz. *Trichodina centrostrigata* (KP295473), *Trichodina centrostrigata* (W) and *Trichodina centrostrigata* (Q), had no obvious population differentiation in the last four years. Next, *T. centrostrigata* clustered trichodinids that live in the marine environment, which indicates a closer relationship between them. Again, *T. centrostrigata* has a strong parasitic specificity because they mainly parasitize the euryhaline tilapia, and only very few can parasitize other freshwater fishes. Finally, the host tilapia infection rate for *T. centrostrigata* in this study is 100%, which suggested that *T. centrostrigata* may be a potential pathogen in the tilapia aquaculture industry.

Key words: *Trichodina centrostrigata*; Population; Tilapia; Host preference; Infection rate