

基于遗传距离的粘孢子虫分类研究*

冉 佼, 杨承忠, 赵元蓉

(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:以 18S rDNA 作为分子标记研究了以粘孢子虫(Myxosporidia)常见属为代表的不同分类水平下的遗传距离分布规律。结果表明,粘孢子虫亲缘关系的远近与遗传距离具有明显的相关性,即粘孢子虫亲缘关系越远遗传距离越大,反之亦然;同时表明,本研究所涉及的种内、种间和属间阶元的遗传距离虽在一定范围内有重叠,但遗传距离由小到大排列依次为种内、种间、属间。研究认为物种之间在遗传距离上可能并不存在绝对的界限,但基于 18S rDNA 遗传距离的分歧在一定范围内对大多数物种的鉴定是有效的。

关键词:粘孢子虫;18S rDNA;遗传距离;分类

中图分类号:Q958.9

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2014)03-0031-04

粘孢子虫(Myxosporidia)是一类主要寄生于鱼类的寄生虫,可行组织寄生也可行腔寄生,广泛分布于全世界^[1],至今已知的种类已经超过 2 200 种^[2-4]。粘孢子虫营养体时期为活动期,生活在寄主的器官腔或细胞组织内,形态变化多样,在寄主体内摄取营养而生长、发育和繁殖;而不活动的孢子时期在完成生活周期过程中形成孢子,是形态最固定的阶段,主要机能是保护幼胚不受外界环境的侵袭^[5]。作为经济鱼类的一大类病原生物,粘孢子虫及其分类学问题一直倍受关注。

粘孢子虫由于个体微小、结构简单且种类繁多,各物种在形态上具有较大的相似性,因此常常给鉴定带来较大的难度。而基于形态特征的物种鉴定是粘孢子虫传统分类学的基础^[6-9],人们在实践过程中也逐渐认识到形态学分类的局限性,如易受鉴定人主观意识和物种地理差异等因素的影响而产生错误的结论等。随着分子生物学的发展,当形态学特征不足以解决相似种的鉴定问题时,分子生物学方法反而可能可以提供较为满意的答案^[10]。分子生物学手段在厘清粘孢子虫的分类和系统进化问题上已经得到了较为广泛的应用。目前应用在粘孢子虫研究领域中的分子标记主要有:18S rDNA, 28S rDNA、ITS1-5.8S rDNA-ITS2 等^[11-17]。其中,由于 18S rDNA 具有序列长度适中、信息充足、容易获得、广泛分布于几乎所有生物等特征,使之在包括粘孢子虫在内的不同研究领域中都得到了广泛应用^[14]。本研究以 18S rDNA 为分子标记,探讨以粘孢子虫常见属为代表的不同分类水平下的遗传距离的分布规律,以期对粘孢子虫分类和进化的研究积累基础资料。

1 研究方法

粘孢子虫 18S rDNA 序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)网站下载,一共下载了 96 个 18S rDNA 的代表序列(表 1),均以 FASTA 文件格式保存。用 MEGA 4.0 软件^[18] K2P 模型对粘孢子虫不同分类水平下的遗传距离进行计算并构建无根 NJ 树,用 Excel 对所得到的遗传距离进行统计分析并绘制频率分布图。

2 结果

经计算分别得到 3 个分类水平下的遗传距离:种内水平的遗传距离范围为 0~0.042(图 1a),其中大部分物种的遗传距离集中在 0~0.007 范围内(图 1a);种间水平的遗传距离范围为 0.010~0.323(图 1b),其中大多数物种的遗传距离集中在 0.135 2~0.260 4 范围内(图 1b);属间水平的遗传距离范围为 0.105~0.296(图 1c),其

* 收稿日期:2014-01-20 修回日期:2014-02-22 网络出版时间:2014-5-8 14:38

资助项目:国家自然科学基金项目(No. 31101637; No. 31172068);重庆市科委创新建设项目(No. CSTC,2010CA1010);重庆师范大学博士启动基金(No. 11XLB025)

作者简介:冉佼,男,研究方向为鱼类寄生虫学,E-mail: ran_jiao@126.com;通讯作者:赵元蓉,E-mail: zhaoyuanjuncqnu@126.com

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140508.1438.007.html>

表 1 用于本研究的物种序列

Tab. 1 The sequence's accession number for the organisms used in this study

物种名	GenBank 号	物种名	GenBank 号
<i>Henneguya corruscans</i>	KF296356.1	<i>Henneguya adiposa</i>	EU492929.1
<i>Henneguya corruscans</i>	JQ654971.1	<i>Henneguya sutherlandi</i>	EF191200.2
<i>Henneguya creplini</i>	EU732598.1	<i>Henneguya pseudorhinogobii</i>	AB447996.1
<i>Henneguya rhinogobii</i>	AB447993.1	<i>Henneguya eirasi</i>	KF296355.1
<i>Henneguya lesteri</i>	AF306794.1	<i>Henneguya eirasi</i>	KF296355.1
<i>Henneguya gurlei</i>	DQ673465.1	<i>Henneguya multiplasmodialis</i>	KF296354.1
<i>Henneguya exilis</i>	AF021881.1	<i>Henneguya multiplasmodialis</i>	JQ654970.1
<i>Henneguya doneci</i>	HM146129.1	<i>Henneguya yokoyamai</i>	AB693053.1
<i>Henneguya doneci</i>	EU344899.1	<i>Henneguya ogawai</i>	AB693051.1
<i>Henneguya pellis</i>	FJ468488.1	<i>Henneguya cynoscioni</i>	JN017203.1
<i>Henneguya akule</i>	EU016076.1	<i>Henneguya tunisiensis</i>	GQ340975.1
<i>Henneguya zschokkei</i>	U13827.1	<i>Henneguya doori</i>	U37549.1
<i>Henneguya zschokkei</i>	AF378344.1	<i>Myxobolus ampullica psulatus</i>	KC425224.1
<i>Myxobolus hearti</i>	GU574808.1	<i>Myxobolus ampullica psulatus</i>	JQ690373.1
<i>Myxobolus intimus</i>	FJ716098.2	<i>Myxobolus honghuensis</i>	HM188545.1
<i>Myxobolus intimus</i>	JF311899.1	<i>Myxobolus cultus</i>	AB121146.1
<i>Myxobolus intimus</i>	JX390690.1	<i>Myxobolus cultus</i>	HQ613409.1
<i>Myxobolus intimus</i>	JN252486.1	<i>Myxobolus koi</i>	FJ841887.1
<i>Myxobolus arcticus</i>	AB469993.1	<i>Myxobolus insidiosus</i>	EU346374.1
<i>Myxobolus arcticus</i>	AF085176.1	<i>Myxobolus insidiosus</i>	U96494.1
<i>Myxobolus fryeri</i>	EU346372.1	<i>Myxobolus kisutchi</i>	AB469989.1
<i>Myxobolus neurobius</i>	AB469987.1	<i>Myxobolus kisutchi</i>	EF431919.1
<i>Myxobolus neurobius</i>	AF085180.1	<i>Myxobolus neurotropus</i>	DQ846661.1
<i>Myxobolus acanthogobii</i>	AY541585.1	<i>Myxobolus cerebralis</i>	AF115255.1
<i>Myxobolus lentisuturalis</i>	AY278563.2	<i>Myxobolus cerebralis</i>	EF370481.1
<i>Myxobolus pantanalisis</i>	KF296349.1	<i>Myxobolus cerebralis</i>	U96492.1
<i>Myxobolus episquamalis</i>	KC733437.1	<i>Myxobolus machidai</i>	AB693054.1
<i>Myxobolus episquamalis</i>	JF810537.1	<i>Myxobolus albi</i>	JF776164.1
<i>Myxobolus episquamalis</i>	AY129312.1	<i>Myxobolus albi</i>	EU420055.1
<i>Myxobolus musculi</i>	JQ388893.1	<i>Myxobolus inornatus</i>	JN896706.1
<i>Myxobolus musculi</i>	AF380141.1	<i>Myxobolus elegans</i>	JN252485.1
<i>Myxobolus macroca psularis</i>	FJ716095.1	<i>Myxobolus elegans</i>	AF448445.1
<i>Myxobolus macroca psularis</i>	AF507969.1	<i>Myxobolus pavlovskii</i>	HM991164.1
<i>Myxobolus spirosulcatus</i>	AB530263.1	<i>Myxobolus pavlovskii</i>	AF507973.1
<i>Myxobolus diversica psularis</i>	GU968199.1	<i>Myxobolus hakyi</i>	FJ816269.1
<i>Myxobolus muelleri</i>	DQ439806.1	<i>Myxobolus bilobus</i>	DQ008579.1
<i>Myxobolus muelleri</i>	AY325284.1	<i>Myxobolus longisporus</i>	AY364637.1
<i>Myxobolus ichkeulensis</i>	AY129315.1	<i>Myxobolus pseudodispar</i>	AF380145.1
<i>Myxobolus ichkeulensis</i>	AF378337.1	<i>Myxobolus pseudodispar</i>	EF466088.1
<i>Myxobolus squamalis</i>	U96495.1	<i>Myxobolus stanlii</i>	DQ779996.2
<i>Myxobolus wulii</i>	HQ613412.1	<i>Myxobolus pyramidis</i>	HQ613411.1
<i>Myxobolus nielii</i>	JQ690358.1	<i>Myxobolus pendula</i>	AF378340.1
<i>Myxobolus osburni</i>	AF378338.1	<i>Myxobolus bibullatus</i>	AF378336.1
<i>Myxobolus algonquinensis</i>	AF378335.1	<i>Thelohanellus nikolskii</i>	GU165832.1
<i>Thelohanellus caudatus</i>	KC865607.1	<i>Thelohanellus nikolskii</i>	DQ231156.1
<i>Thelohanellus wuhanensis</i>	HQ613410.1	<i>Thelohanellus kitauei</i>	HM624024.1
<i>Thelohanellus wuhanensis</i>	JQ690370.1	<i>Thelohanellus kitauei</i>	JQ690367.1
<i>Thelohanellus toyamai</i>	HQ338729.1	<i>Unicauda pelteobagrus</i>	KC193254.1

中大多数物种的遗传距离集中在 0.181 4~0.257 8 范围内(图 1c)。

研究碘泡科(*Myxobolidae*)主要属的属间平均遗传距离可知,尾孢虫属(*Henneguya*)与碘泡虫属(*Myxobolus*)之间的平均遗传距离为 0.207;尾孢虫属与单极虫属(*Thelohanellus*)之间的平均遗传距离为 0.216;尾孢虫属与单尾虫属(*Unicauda*)之间的平均遗传距离为 0.231;碘泡虫属与单极虫属之间的平均遗传距离为 0.166;碘泡虫属与单尾虫属之间的平均遗传距离为 0.224;单极虫属与单尾虫属之间的平均遗传距离为 0.220。

基于 18S rDNA 所构建的 NJ 树,得到了较高的支持率(图 2)。由图 2 可见,系统树中同种个体聚在一起,除碘泡虫属外,各成员都聚在各自的属内。碘泡虫属下的物种成员并未聚成单系,而是分成了两个大枝,一枝与单极虫属聚在一起,他们共同形成的进化枝与剩下所有的碘泡虫属成员形成姐妹群关系。

3 讨论

种内和属内种间遗传距离在一定范围内有重叠;少数物种之间的遗传距离较小,与种内遗传距

离范围中的较大值重叠(图 1a、b)。这表明物种之间在遗传距离上可能并不存在绝对的界限。Stoeckle 和 Herbert^[19]认为,基因序列之间的分歧程度与物种的形成过程密切相关。本研究中,有些物种之间的遗传距离偏小,这可能反映了两物种分化的历史较短,不足以形成较大的遗传差异。但同时也不能排除物种鉴定本身对研究结果的影响。

由于粘孢子虫个体微小,有些种类形态极其相似等因素的影响,可能导致鉴定者把一些地理种群错误的鉴定为独立种。从本文所研究的 3 个水平(种内、种间和属间)遗传距离的分布来看,每个水平都有各自较为集中

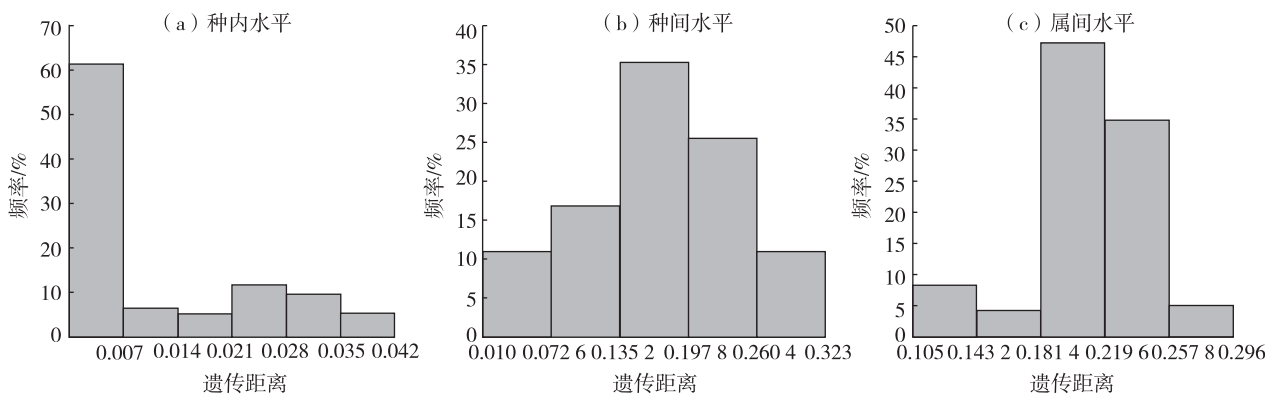
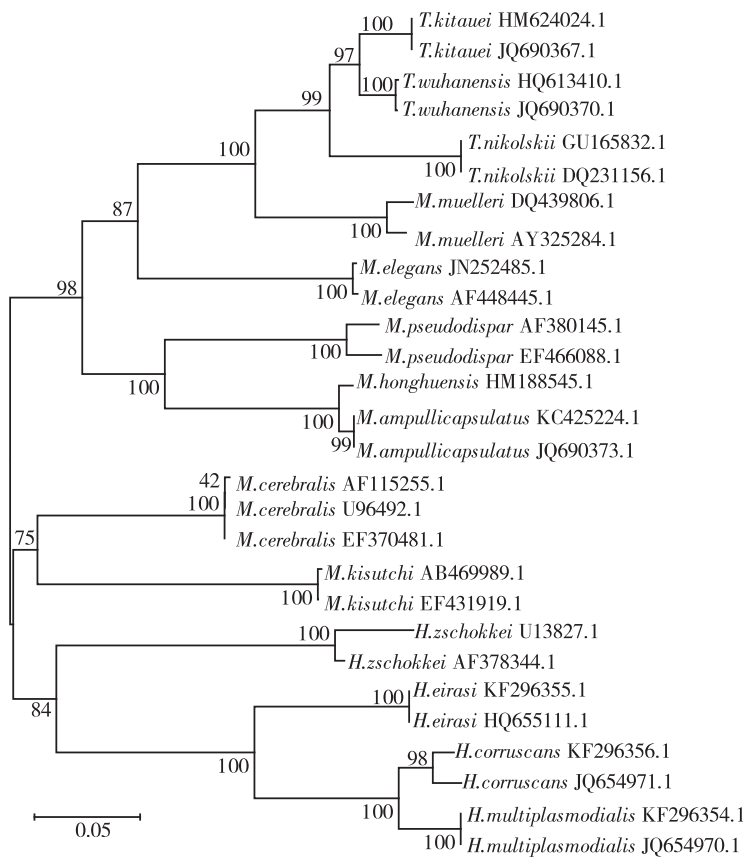


图 1 遗传距离分布

Fig. 1 The distribution of pairwise K2P genetic distance



注:物种名后面的数字表示 GenBank 登录号。

图 2 基于 18S rDNA 的 NJ 树

Fig. 2 Neighbor-joining (NJ) analysis of Kimura 2-parameter (K2P) distance of 18S rDNA sequences

的遗传距离范围,如种内大部分集中在 0~0.007,种间大部分集中在 0.134 2~0.197 8,属间大部分集中在 0.181 4~0.257 8,而这些集中区的范围之间几乎是不重叠的。这说明虽然物种之间可能并不存在绝对的界限,但这 3 个分类水平中的绝大多数物种的遗传距离却有较为明确的界限。比较遗传距离和系统发育树(图 1 和图 2)不难发现,亲缘关系越近则遗传距离就越短,反之亦然,两者具有明显的相关性。从属间平均遗传距离来看,除碘泡虫属与单板虫属的遗传距离最小(0.166)外,各属间平均遗传距离均大于 0.2。在系统树中,碘泡虫属的物种并未聚成单系,而是分成了两个大枝,一枝与单板虫聚在一起,他们共同形成的进化枝与剩下所有的碘泡虫属成员形成姐妹群关系。这说明碘泡虫属和单板虫属具有非常近的亲缘关系,而这点与它们之间的遗传距离最短相吻合。

目前 COI 基因的特定片段被学术界推崇为物种的 DNA 条形码,并且有 98% 的脊椎动物都符合分歧度在大于 2% 时可以鉴定为两个不同的种^[20]。而本文的研究表明基于 18S rDNA 遗传距离的分歧虽然没有绝对的物种界限,但在一定范围内对大多数物种的鉴定是有效的。

参考文献:

[1] Whipps C M, Kent M L. Phylogeography of the Cosmopolitan Marine Parasite *Kudoa thyrssites* (Myxozoa: Myxosporaea)[J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 2006, 53(5): 364-373.

[2] Kent M L, Andree K B, Bartholomew J L, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2001, 48(4): 395-413.

[3] Canning E U, Okamura B. Biodiversity and evolution of the Myxozoa[J]. Advances in Parasitology, 2003, 56: 43-131.

[4] Lom J, Dyková I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species [J]. Folia Parasitologica, 2006, 53(1): 1-36.

[5] 陈启鏊, 马成伦. 中国动物志粘体门粘孢子虫纲(淡水) [M]. 北京: 科学出版社, 1998.

Chen Q L, Ma C L. Fauna Sinica Myxozoa Myxosporaea [M]. Beijing: Science Press, 1998.

[6] 赵元君. 海淡水粘孢子虫学研究的现状与展望[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2004, 21(2): 55-59.

- Zhao Y J. Perspective in Myxosporean research from freshwater and seawater fishes[J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2004, 21(2): 55-59.
- [7] 马成伦, 赵元君. 四川省西部鱼类寄生粘孢子虫[J]. 重庆师范学院学报: 自然科学版, 1996, 13(1): 1-8.
- Ma C L, Zhao Y J. The Myxosporidia of freshwater fishes from the west region of Sichuan Province (Myxosporidia: Bivalvulida)[J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 1996, 13(1): 1-8.
- [8] 马成伦, 董新民. 四川省鱼类寄生粘孢子虫: Ⅲ. 碘泡虫(粘孢子纲: 双壳目)[J]. 重庆师范学院学报: 自然科学版, 1998, 15(4): 1-6.
- Ma C L, Dong X M. The Myxosporidia of freshwater fishes from Sichuan Province: Ⅲ. *Myxobolus Bubtschli* (Myxosporidia: Bivalvulida)[J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 1998, 15(4): 1-6.
- [9] 马成伦, 董新民. 四川省鱼类寄生粘孢子虫: IV 尾孢虫和单极虫(粘孢子纲: 双壳目)[J]. 重庆师范学院学报: 自然科学版, 1999, 16(1): 12-15.
- Ma C L, Dong X M. The Myxosporidia of freshwater fishes from Sichuan Province: IV. *Hemeguya Thelohan* and *The-lohanellus Kudo* (Myxosporidia: Bivalvulida) [J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 1999, 16(1): 12-15.
- [10] Yang C Z, Xiao Z, Zou Y, et al. DNA barcoding revises a misidentification on musk deer[J]. Mitochondrial DNA, 2014, DOI: 10.3109/19401736.201
- [11] Zhao Y, Sun C, Kent M L, et al. Description of a new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data[J]. Journal of Parasitology, 2008, 94(3): 737-742.
- [12] Zhao Y J, Li N N, Tang F H, et al. Remarks on the validity of *Myxobolus ampullicapsulatus* and *Myxobolus honghuensis* (Myxozoa: Myxosporidia) based on SSU rDNA sequences[J]. Parasitology research, 2013, 112(11): 3817-3823.
- [13] Whipps C M, Gossel G, Adlard R D, et al. Phylogeny of the multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporidia) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis[J]. Parasitology, 2004, 90(3): 618-622.
- [14] Fiala I. The phylogeny of Myxosporidia (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis[J]. International Journal for Parasitology, 2006, 36(14): 1521-1534.
- [15] Bartošo vP, Fiala I, Hypša V. Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporidians (Myxozoa: Myxosporidia) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 53(1): 81-93.
- [16] Liu Y, Whipps C M, Gu Z M, et al. *Myxobolus honghuensis* n. sp. (Myxosporidia: Bivalvulida) parasitizing the pharynx of allogynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) from Honghu Lake, China[J]. Parasitology Research, 2012, 110(4): 1331-1336.
- [17] 董江丽, 赵元君, 唐发辉, 等. 黄颡单尾虫(粘体门、双壳目)的重描述及基于 28S rDNA 和 ITS-5, 8S 序列的系统地位分析[J]. 动物分类学报, 2011, 36(1): 84-92.
- Dong J L, Zhao Y J, Tang F H, et al. Redescription of *Unicauda pelteobagrus* Ma, 1998 (Myxozoa, Bivalvulida), with phylogenetic analysis inferred from 28S rDNA and ITS-5, 8S sequence data[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2011, 36(1): 84-92.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular biology and evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [19] Stockle M Y, Hebert P D N. Barcode of life[J]. Scientific American, 2008, 299(4): 82-88.
- [20] Johns G C, Avise J C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene [J]. Molecular Biology and Evolution, 1998, 15(11): 1481-1490.

Animal Sciences

Taxonomic Research of the Myxosporidia Based on Genetic Distance

RAN Jiao, YANG Cheng-zhong, ZHAO Yuan-jun

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

Abstract: In the present study, we used 18S rDNA as a molecular marker to research the distribution of genetic distance of some common genera of the Myxosporidia. The results indicated that: there is a significant correlation between genetic relationships and genetic distances, species with the close relationship have a short genetic distance, and the reverse is also true; though there are some overlap on the genetic distances among intra-species, inter-species and inter-genera, the general trend of the genetic distance is: intra-species < inter-species < inter-genera. There may be no absolute bound for genetic distances among species, however, in a certain range, the divergence of genetic distance based on 18S rDNA is valid for most of species identification.

Key words: myxosporidian; 18S rDNA; genetic distance; taxonomy