

刺纹车轮虫 18S rDNA 克隆与序列分析^{*}

王 琴, 唐发辉, 赵元著

(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:首次对刺纹车轮虫(*Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Paperna, 1983)进行了 18S rDNA 的克隆测序并分析, 研究结果显示:刺纹车轮虫是一种具有辐射状中央颗粒的淡水车轮虫, 具有相对较高的 GC 含量而位于分子系统树的顶枝, 它与海水环境中的车轮虫具有较高的序列相似性及较近的遗传距离从而聚为一枝。研究提示刺纹车轮虫具有较强的宿主适应性, 在系统进化中分化较晚并与海水种类具有较近的亲缘关系; 此外, 车轮虫的同源性与 18S rDNA 序列相似性、遗传距离具明显相关性, GC 含量与分子支序树分枝具有明显相关性。

关键词:刺纹车轮虫; 18S rDNA; 序列相似性; 遗传距离; GC 含量; 支序树

中图分类号:Q959.117⁺.6

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)04-0031-07

车轮虫(*Trichodinid*)是一类海/淡水环境中常见的病害性纤毛虫, 广泛寄生或共栖生于海洋与淡水鱼类、甲壳类、两栖类等动物的鳃、体表、鳍、膀胱、输尿管、生殖系统等部位, 迄今有文献记载的种类约 400 余种^[1-17]。国内对车轮虫的研究始于 20 世纪 50 年代, 共报道有 70 多种^[7-18]。近些年来相关研究取得了一系列重要结果和发现, 但大多数均聚焦于形态分类学和病害学研究方面^[7-18]; 而有关分子生物学方面的研究因研究难度大, 相关工作尚处于起步阶段^[19-22]。随着国内水产养殖业的蓬勃发展, 该类物种所引起的病害及由此造成的重大经济损失已引起人们的广泛关注^[7-18]。单性罗非鱼(*Oreochromis aureus* ♂ × *Oreochromis niloticus* ♀)是一种重要的、在国内广泛养殖的淡水品种。本研究对该鱼的外寄生刺纹车轮虫(*Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Paperna, 1983)进行了核糖体小亚基基因(18S rDNA)片段的扩增、克隆和测序, 分析研究了它的序列特征, 探讨了刺纹车轮虫的分子系统地位, 以期对相关研究的深入开展提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集与鉴定

单性罗非鱼于 2014 年 3 月采自重庆市江津区养殖鱼场。将宿主鱼带回实验室, 解剖 10 条罗非鱼, 发现仅有 2 条感染刺纹车轮虫, 感染率为 20%。宿主鱼被解剖后, 在显微镜下镜检以观察车轮虫活体, 用于干银法将有车轮虫的鳃涂片染色, 细胞核用 Foissner 创建的甲基绿-派咯宁活体染色法显示^[23]。车轮虫形态学特征的描述依据 Lom 提供的方法进行^[24]; 车轮虫附着盘中的齿体定位描述则依据 Van 和 Basson 倡导的、唐发辉等人补充的方法进行^[25-26]。

1.2 DNA 的提取、扩增、克隆与测序

收集 4~5 只刺纹车轮虫虫体放于 PCR 管中洗涤数次, 用 REDExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit (Sigma, St. Louis, USA)试剂盒按照操作步骤提取样本 DNA, 提取后保存于 -20 ℃。扩增引物采用 MedF-MedR 引物^[22], 其中, 上游引物序列为 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3', 下游引物序列为 5'-TGATCCTTCTG-CAG GTTCACCTAC-3'。PCR 反应参数设置为: 94 ℃预变性 1 min, 56 ℃退火 2 min, 72 ℃延伸 2 min, 5 个循环; 94 ℃变性 1 min, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min。取 3 μL 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳(120 V, 30 min)分离, 溴化乙锭染色, GelDocXR 检测目标条带。胶回收采用试剂盒 Gel Extraction Kit (QIAGEN), 克隆采用 p-MD19-T 载体试剂盒(TakaRa)对纯化后的 DNA 完成。测序工作由上海桑

* 收稿日期: 2015-01-11 修回日期: 2015-03-04 网络出版时间: 2015-5-15 10:55

资助项目: 国家自然科学基金(No. 31172068; No. 31471980); 重庆市科委项目(No. cstc2010ca1010; No. cstc2014jcyjA80008); 重庆市教委项目(No. KJ1400530)

作者简介: 王琴, 女, 研究方向为鱼类寄生虫学, E-mail: 469713394@qq.com; 通信作者: 赵元著, 教授, E-mail: zhaoyuanjuncqnu@126.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150515.1055.010.html>

尼生物科技有限公司的测序仪完成。

1.3 序列分析与分子支序树的构建

本研究所用序列包括新测的刺纹车轮虫 18S rDNA 序列(见表 1 中粗体字)、本实验室提供的 18S rDNA 序列以及来自 GenBank 中 18S rDNA 序列,共 27 个(表 1)。序列相似性分析采用 GenBank 的 BLAST 进行;遗传距离的计算通过 MEGA 软件完成;GC 含量通过 BIOEDIT 软件计算完成。以微小游仆虫(*Euplotes minuta*) (EF094959)为外群,将上述 18S rDNA 序列经 CLUSTAL W 多重比对后,采用 PAUP * 4.0b10 软件和 Mr-Bayes3.1.2 软件分别构建 ML 树与 BI 树。

2 结果

2.1 形态学特征

刺纹车轮虫的显微照片见图 1。形态学描述:虫体呈圆盘状,侧面凸起不明显。虫体直径(51.8 ± 3.9) μm ,范围 48~56 μm ;附着盘直径(40.1 ± 4.9) μm ,范围 39~47 μm ;齿环直径(27.7 ± 3.2) μm ,范围 25~32 μm ;缘膜宽(3.7 ± 0.5) μm ,范围 3~5 μm 。齿体个数 24~29(26),辐线条数 8~10(8),中央呈辐射状排列的棒状颗粒个数 11~15(14)。齿体纵长(14.3 ± 1.5) μm ,范围 13~17 μm ;齿长(5.6 ± 0.5) μm ,范围 4~7 μm 。齿钩较宽大、镰刀形,占据 Y 及 Y+1 轴间大部分区域;齿钩长(6.3 ± 0.7) μm ,范围 5~8 μm ;齿钩外切缘圆滑或平直,与缘膜不平行,略高于骨突;齿钩前缘略弯曲,齿钩凸点未接触 Y+1 轴,齿钩后缘光滑与齿钩凹点略成“L”形,无明显钩突和后突;齿钩连接较发达,齿锥发达与下一齿体嵌合紧密,齿锥顶点圆滑一般未超过 $\frac{1}{2}YY-1$;齿锥宽(2.6 ± 0.3) μm ,范围 2~4 μm ;齿棘直、较粗,略向前倾斜,超过 Y+1 轴;齿棘长(5.3 ± 0.4) μm ,范围 5~7 μm ;齿棘顶点圆滑且指向中央颗粒,无明显棘突;口围绕度约 $410^\circ \sim 455^\circ$;大核“U”形,小核椭圆形;处在 +Y 位。

2.2 序列相似性、遗传距离及 GC 含量

所测刺纹车轮虫的 18S rDNA 序列片段长度为 1 594 个核酸(nt),GC 含量 49.62%;计算了 17 种车轮虫的 18S rDNA 序列相似性与遗传距离,具体见表 2。结果显示,17 种车轮虫 18S rDNA 序列之间的相似性范围为 85%~99%。两两比较中,文蛤车轮虫(*Trichodina meretricis*)与易变车轮虫(*Trichodina mutabilis*)间的相似性最低,为 85%;而蛤仔车轮虫(*Trichodina rudita picipis*)与缢蛏车轮虫(*Trichodina sinonovaculae*)、异齿车轮虫(*Trichodina heterodentata*)与显著车轮虫(*Trichodina nobillis*)、拟微小车轮虫(*Trichodina pseudominuta*)与网状车轮虫(*Trichodina reticulata*)、网状车轮虫与鳃车轮虫(*Trichodina sini percae*)、适度车轮虫(*Trichodina modesta*)与鳃车轮虫之间相似性最高,为 99%。17 种车轮虫 18S rDNA 序列之间的遗传距离范围为 0.003~0.231,其中异齿车轮虫与显著车轮虫的 18S rDNA 遗传距离最小为 0.003,易变车轮虫与高鳞车轮虫(*Trichodina hypsilepis*)的 18S rDNA 遗传距离最大为 0.231。

27 种鱼类寄生纤毛虫的 18S rDNA 序列 GC 含量见表 1。结果显示,9 种车轮虫的 GC 含量超过 50%,分别是异齿车轮虫、显著车轮虫、拟异齿车轮虫(*Trichodina paraheterodentata*)、周丛小车轮虫(C)(*Trichodinella epizootica* (C))、周丛小车轮虫(D)(*Trichodinella epizootica* (D))、周丛小车轮虫(H)(*Trichodinella epizootica* (H))、周丛小车轮虫(Y)(*Trichodinella epizootica* (Y))、小车轮虫未定种(*Trichodinella* sp. ZZ-2012)、眉溪小车轮虫(*Trichodinella myakkae*);9 种车轮虫的 GC 含量在 48%至 50%之间,它们是刺纹车轮虫、蛤仔车轮虫、缢蛏车轮虫、文蛤车轮虫、虾夷扇贝车轮虫(*Trichodina pecten is*)、车轮虫未定种 1(*Trichodina* sp. 1)、车轮虫未定种 2(*Trichodina* sp. 2)、单型车轮虫(*Trichodina uniforma*)、高鳞车轮虫;5 种车轮虫的 GC 含量在 46%至 48%之间,分别是易变车轮虫、拟微小车轮虫、网状车轮虫、适度车轮虫、鳃车轮虫。

2.3 分子支序树特征

图 2 显示基于 BI 法和 ML 法构建的 18S rDNA 支序树拓扑结构非常相似,具体结果为:1) 选取的类群分别聚为车轮虫枝和壶形虫(*Urceolaria*)枝两大枝系;2) 在壶形虫科(*Urceolariidae*)中龙介壶形虫(*Urceolaria serpyllarum*)和刺螯壶形虫(*Urceolaria urechi*)形成稳定的姐妹枝,再与科氏壶形虫(*Urceolaria korschelti*)聚在一分枝,处在支序树的基部位置;3) 在车轮虫枝系中,高鳞车轮虫从基部分枝单独聚为一枝(V 亚枝);4) 选取的 6 种小车轮虫先聚在一起构成小车轮虫枝(III 亚枝),再与车轮虫聚枝,两者有高靴攀值(1.00/99)支持;5) 蛤仔车轮虫与缢蛏车轮虫聚枝,然后与文蛤车轮虫聚为一枝,再与虾夷扇贝车轮虫和车轮虫未定种 2 构成的姐妹枝相聚,而后刺纹车轮虫也聚到 I 亚枝,构成了以中央颗粒为特征的车轮虫枝;6) 异齿车轮虫首先和显著车轮虫聚为姐妹枝,然后与拟异齿车轮虫聚枝,再与车轮虫未定种 1 聚为 II 亚枝,且与前述以中央颗粒为特征的车轮虫枝支构成

姐妹枝;7) 具有中央颗粒的网状车轮虫,与不具有中央颗粒的易变车轮虫、单型车轮虫、拟微小车轮虫、适度车轮虫、鳃车轮虫聚为一枝(IV 亚枝)。总体来看,车轮虫属、小车轮虫属(*Trichodinella*)按照属聚枝,组成一个车轮虫属-小车轮虫属-车轮虫科大枝。

表 1 27 种纤毛虫的 18S rDNA 序列信息
Tab. 1 18S rDNA sequence information of 27 ciliate species

种名	GenBank 登录号	序列长 度/nt	GC 含 量/%	采集地	宿主	寄生 部位
蛤仔车轮虫 <i>T. ruditapicis</i>	FJ499385	1 700	49. 47	中国山东	菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	鳃
缢蛭车轮虫 <i>T. sinonovaculae</i>	FJ499386	1 697	49. 20	中国山东	缢蛭 <i>Sinonovacula constricta</i>	鳃
文蛤车轮虫 <i>T. meretricis</i>	FJ499387	1 721	48. 23	中国北部湾	文蛤 <i>Meretrix lyreta</i>	鳃
虾夷扇贝车轮虫 <i>T. pectenis</i>	JQ663868	1 779	49. 86	中国大连	虾夷扇贝 <i>Patinopecten yessoensis</i>	鳃
车轮虫未定种 2 <i>Trichodina</i> sp2	HM583859	1 499	49. 43	挪威	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	体表
刺纹车轮虫 <i>T. centrostrigata</i>	KP295473	1 594	49. 62	重庆江津	罗非鱼 <i>O. aureus</i> ♂× <i>O. niloticus</i> ♀	鳃
异齿车轮虫 <i>T. heterodentata</i>	AY788099	1 698	50. 65	湖北武汉	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鳃
显著车轮虫 <i>T. nobillis</i>	AY102172	1 698	50. 82	湖北武汉	白鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	鳃
拟异齿车轮虫 <i>T. paraheterodentata</i>	GU906244	780	50. 38	重庆嘉陵江	鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	鳃
车轮虫未定种 1 <i>Trichodina</i> sp. 1	JQ821348	1 510	49. 93	乌干达	非洲鲶 <i>Clarias gariepinus</i>	鳃
周丛小车轮虫 C <i>T. epizootica</i> (C)	HQ407386	1 619	50. 40	重庆嘉陵江	鲫 <i>C. auratus</i>	鳃
周丛小车轮虫 D <i>T. epizootica</i> (D)	HQ407387	1 655	50. 58	重庆嘉陵江	鲤 <i>C. carpio</i>	鳃
周丛小车轮虫 Y <i>T. epizootica</i> (Y)	HQ407388	1 618	50. 56	中国重庆	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	—
周丛小车轮虫 H <i>T. epizootica</i> (H)	GU906246	1 618	50. 56	重庆嘉陵江	鲫 <i>Carassius auratus</i>	鳃
小车轮虫未定种 <i>T. sp.</i> ZZ-2012	JQ663869	1 699	50. 26	中国福州	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鳃
眉溪小车轮虫 <i>T. myakkae</i>	AY102176	1 699	50. 56	湖北武汉	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鳃
易变车轮虫 <i>T. mutabilis</i>	HQ407384	1 696	47. 88	中国重庆	鲤 <i>C. carpio</i>	鳃
单型车轮虫 <i>T. uniforma</i>	HQ407383	1 649	48. 21	中国重庆	鲫 <i>C. auratus</i>	鳃
拟微小车轮虫 <i>T. pseudominuta</i>	HQ407385	1 593	47. 21	中国重庆	鲫 <i>C. auratus</i>	鳃
网状车轮虫 <i>T. reticulata</i>	AY741784	1 702	46. 83	湖北武汉	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鳃
适度车轮虫 <i>T. modesta</i>	GU906245	1 219	46. 43	重庆嘉陵江	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	鳃
鳃车轮虫 <i>T. sinipercae</i>	EF599288	1 704	47. 07	湖北武汉	—	—
高鳞车轮虫 <i>T. hypsilepis</i>	EF524274	1 693	48. 20	湖北武汉	—	—
龙介壶形虫 <i>U. serpularum</i>	JQ663867	1 630	43. 87	中国青岛	龙介虫 <i>Serpula</i> sp.	鳃
刺螯壶形虫 <i>U. urechi</i>	FJ499388	1 696	44. 04	中国山东	单环刺螯 <i>Urechis unicinctus</i>	鳃
科氏壶形虫 <i>U. korschelti</i>	JQ663870	1 702	43. 65	中国青岛	长竹蛏 <i>Solen strictus</i>	鳃
微小游仆虫 <i>E. minuta</i>	EF094959	1 838	43. 42	—	—	—

3 讨论

3.1 寄生特性

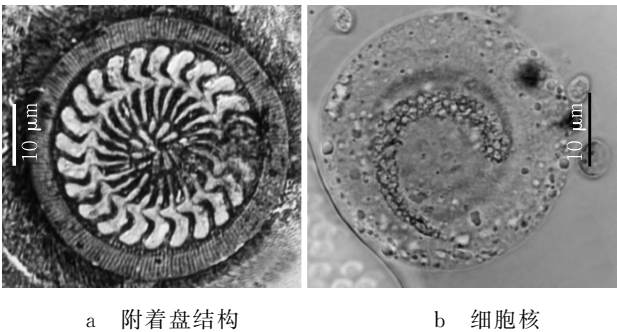
刺纹车轮虫由 Basson 等人首先在南非发现于莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、南方褶唇丽鱼(*Pseudocrenilabrus philander*)、伦氏罗非鱼(*Oreochromis rendalli*, 异名 *Tilapia rendalli*)、斯氏罗非鱼(*O. sparrmanii*, 异名 *Tilapia sparrmanii*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等鱼类的鳃表,或偶见于体表或鳍^[3]。El-Tantawy 和 Kazubski 在埃及尼罗河三角洲的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, 异名 *Tilapia niloticus*)的鳃表及体表也检获此虫^[4]。Basson 等人又在台湾的莫桑比克罗非鱼的鳃表、体表及鳍上检获刺纹车轮虫^[5]。之后, Van As 和 Basson 除了在赞比西河水系的安德森罗非鱼(*Oreochromis andersoni*)的鳃表、体表及鳍以及伦氏罗非鱼的鳃表、斯氏罗非鱼的体表及鳍外,还在鲃(*Barbus* sp.)的鳃表、野鲮(*Labeo cylindricus*)的鳃表、缺帘鱼(*Brycinus lateralis*)的体表及鳍、狮纹歧须鲃(*Synodontis leopardinus*)的鳃表、长伴丽鱼(*Hemichromis elongatus*)的鳃表、南方褶唇丽鱼的鳃表、体表及鳍和窄头鲷丽鱼(*Serranochromis angusticeps*)的鳃表检获到了刺纹车轮虫^[6]。而唐发辉等人在重庆地区鲫(*Carassius auratus*)的鳃表再次获得该物种^[27]。本研究中,笔者在重庆江津地区养殖单性罗非鱼的鳃表分离获得了刺纹车轮虫。总之,刺纹车轮虫主要寄生于罗非鱼属鱼类,少数寄生于其他淡水鱼体内。

在 18S rDNA 支序树中,壶形虫和车轮虫分别聚为两大枝;在车轮虫大枝中,车轮虫属和小车轮虫属种类分别聚为 5 个亚枝(图 2);其中刺纹车轮虫与 4 种海水贝类寄生车轮虫和 1 种海水鱼类寄生车轮虫聚为一枝,这可能与其宿主罗非鱼隶属广盐性的鲈形目(Perciformes)鱼类相关。刺纹车轮虫寄生于其他淡水鱼,可能是引种养殖罗非鱼时常将之与其他淡水鱼类混养,从而刺纹车轮虫扩散感染所致。研究表明,刺纹车轮虫不是罗非鱼的专性寄生虫,且具有明显的宿主适应性,对生境表现出较强的适应能力。

3.2 与近缘种的亲缘关系及系统进化地位

在生物信息学中,常通过研究 DNA 序列相似性来反映物种间的相似程度或同源性,进而推测生物间的进化关系。序列相似性可以反映序列之间进化相关性,当物种间的序列相似性超过 30%,则认为它们很可能是同源的;如果两个序列相似性极高,则可以推测二者可能是经过 DNA 序列内碱基的替换、序列片段的缺失或序列重组等遗传变异过程演化而来的,二者可能有共同的祖先^[28-29]。本研究中,通过刺纹车轮虫与其他车轮虫的 18S rDNA 序列相似性的比较后发现:刺纹车轮虫与车轮虫未定种 2 的相似性最高,达 95%,表明二者亲缘关系最近;而与文蛤车轮虫的相似性最低,为 88%,表明二者亲缘关系较远。总体来看,17 种车轮虫 18S rDNA 序列相似性维持在 85%~99% 范围内,远远高出 30%,说明了该 17 种车轮虫可能有共同的进化祖先,即具有同源性。在 18S rDNA 支序树中,车轮虫属的 23 个种类构成 5 个亚枝,宿主为海、淡水鱼类或贝类,可见车轮虫以水生动物为寄主,且二者协同进化。

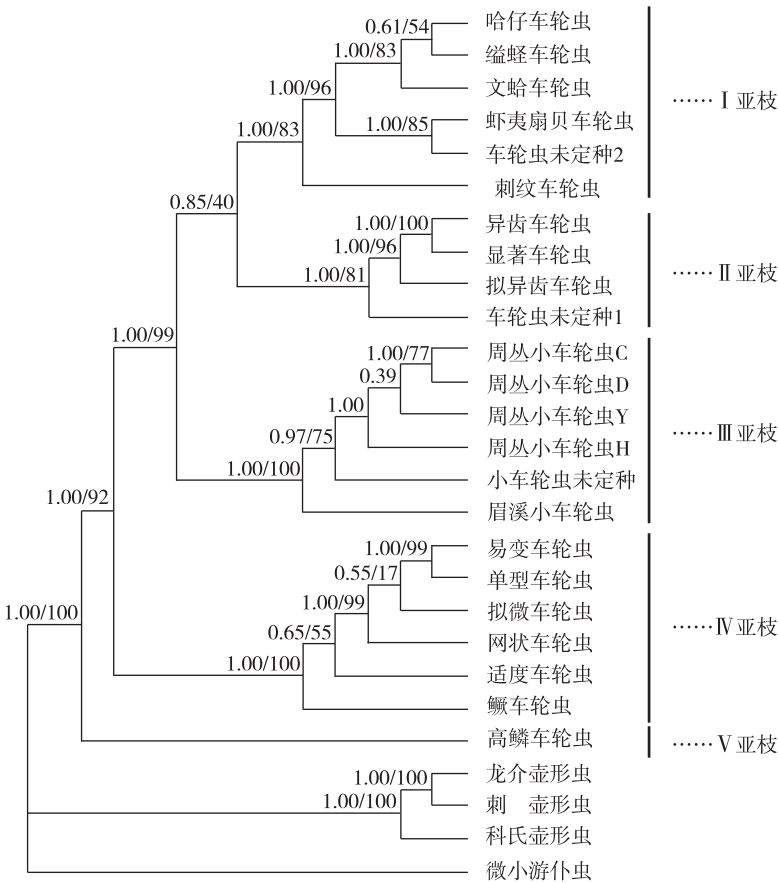
Stockle 和 Hebert 认为,物种的形成过程与 DNA 序列之间的差异程度密切相关^[30]。种群间遗传距离代表不同种群间的基因差异程度,通常可以用来衡量种群间遗传综合差异大小^[31]。本研究通过对 17 种车轮虫 18S rDNA 的遗传距离的分析研究,结果显示在 I 亚枝中,刺纹车轮虫与车轮虫未定种 2 的遗传距离最小为 0.075,与蛤仔车轮虫的遗传距离为 0.078,与缢蛏车轮虫的遗传距离为 0.080,与虾夷扇贝车轮虫的遗传距离为 0.081——表明以上各种车轮虫分化的历史较短,遗传综合差异较小,具有较近的亲缘关系。而与车轮虫属的其他种类相比,刺纹车轮虫与易变车轮虫的遗传距离最大为 0.216,表明二者遗传综合差异较大,亲缘关系较远。由于易变车轮虫与其余车轮虫 18S rDNA 遗传距离均较大,范围为 0.125~0.231,推测这是由易变车轮虫高度易变造成的,这与该虫种变化的形态学特征是基本相符的。其次,高鳞车轮虫与 16 种车轮虫 18S rDNA 遗传距离也较大,范围为 0.097~0.231,说明高鳞车轮虫在进化过程中分化较早,与其他车轮虫亲缘关系较远。综合对不同车轮虫 18S



a 附着盘结构 b 细胞核

图 1 刺纹车轮虫的显微照片

Fig. 1 Photomicrography of *T. centrostrigata*



注:图中物种拉丁学名见表 1。

图 2 基于 BI 法和 ML 法构建 18S rDNA 支序树

Fig. 2 18S rDNA topology generated by BI analysis and ML analysis

综合对不同车轮虫 18S

rDNA 序列相似性与遗传距离的结果可知,车轮虫间的序列相似性越高,则二者间的遗传距离越近,故车轮虫亲缘关系的远近是与 18S rDNA 序列的相似性及遗传距离具有明显相关性,即 18S rDNA 序列相似性越高,遗传距离越小,则亲缘关系越近;反之亦然。

表 2 17 种车轮虫基于 18S rDNA 的遗传距离和序列相似性
Tab. 2 Genetic distance and sequence similarity of 17 *Trichodina* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		94%	94%	88%	94%	95%	94%	94%	92%	93%	92%	89%	90%	90%	90%	90%	90%
2	0.078		99%	92%	96%	97%	94%	94%	91%	94%	89%	89%	90%	91%	90%	91%	91%
3	0.080	0.017		91%	96%	96%	94%	94%	92%	94%	89%	89%	90%	90%	90%	91%	91%
4	0.086	0.023	0.025		90%	92%	89%	89%	91%	89%	85%	86%	87%	87%	89%	87%	87%
5	0.081	0.044	0.042	0.042		97%	94%	94%	91%	94%	91%	88%	89%	90%	90%	90%	91%
6	0.075	0.037	0.039	0.033	0.023		94%	94%	91%	94%	88%	89%	90%	89%	90%	90%	90%
7	0.086	0.080	0.075	0.080	0.075	0.072		99%	96%	96%	89%	89%	90%	91%	90%	91%	92%
8	0.089	0.083	0.078	0.083	0.078	0.075	0.003		95%	96%	89%	89%	90%	90%	90%	91%	92%
9	0.098	0.089	0.089	0.097	0.095	0.089	0.045	0.048		93%	89%	87%	87%	87%	88%	88%	90%
10	0.083	0.077	0.075	0.078	0.078	0.064	0.048	0.052	0.073		88%	89%	90%	90%	91%	90%	90%
11	0.216	0.219	0.217	0.217	0.223	0.220	0.223	0.225	0.230	0.220		94%	96%	95%	94%	96%	89%
12	0.123	0.111	0.116	0.122	0.123	0.117	0.122	0.123	0.128	0.120	0.128		98%	98%	97%	97%	89%
13	0.123	0.111	0.113	0.122	0.123	0.117	0.122	0.123	0.128	0.120	0.125	0.006		99%	98%	98%	90%
14	0.120	0.111	0.116	0.119	0.123	0.117	0.122	0.123	0.128	0.120	0.125	0.006	0.006		98%	99%	91%
15	0.120	0.109	0.113	0.119	0.117	0.119	0.117	0.119	0.120	0.120	0.138	0.022	0.022	0.019		99%	90%
16	0.127	0.111	0.116	0.119	0.120	0.116	0.120	0.122	0.120	0.123	0.133	0.020	0.020	0.017	0.017		91%
17	0.122	0.117	0.116	0.116	0.112	0.108	0.097	0.098	0.109	0.106	0.231	0.131	0.131	0.131	0.120	0.125	

注:表中小数表示遗传距离,百分数表示序列相似性。1. 刺纹车轮虫,2. 蛤仔车轮虫,3. 缢蛭车轮虫,4. 文蛤车轮虫,5. 虾夷扇贝车轮虫,6. 车轮虫未定种 2,7. 异齿车轮虫,8. 显著车轮虫,9. 拟异齿车轮虫,10. 车轮虫未定种 1,11. 易变车轮虫,12. 单型车轮虫,13. 拟微小车轮虫,14. 网状车轮虫,15. 适度车轮虫,16. 鳃车轮虫,17. 高鳞车轮虫。以上物种拉丁学名见表 1。

在 18S rDNA 支序树中,暂无法确定是否具有中央颗粒的车轮虫未定种 2 与具有中央颗粒的虾夷扇贝车轮虫形成姐妹枝后再与具有中央颗粒的蛤仔车轮虫、缢蛭车轮虫、文蛤车轮虫、刺纹车轮虫聚枝。而具有中央颗粒的网状车轮虫与不具有中央颗粒的易变车轮虫、单型车轮虫、拟微小车轮虫、适度车轮虫聚为一枝。研究结果表明,中央颗粒在车轮虫枝系中是混杂的,能够形成中央颗粒的遗传特征扩散到不同分枝中,中央颗粒的存在与否不能作为车轮虫鉴定的依据,该结论支持先前的研究结果^[20-22]。

GC 含量是生物体基因组的基本特征,已广泛运用于微生物分类学中^[32]。据相关研究资料表明生物体的 GC 含量会随着时间推移而发生变化,以此建立生物体间的系统发生关系,可以揭示 GC 含量与物种进化的关系^[33]。在本研究所构建的 18S rDNA 支序树中,不同进化枝的分枝顺序与每个进化枝中虫种的 GC 含量相关。GC 含量在 46%至 48%之间的虫种先于 GC 含量在 48%至 50%之间的虫种分枝,位于支序树基部;GC 含量超过 50%的虫种位于支序树远端。本研究结果也进一步支持了唐发辉等人所提出的 18S rDNA 的 GC 含量与车轮虫的分化密切相关的观点^[22]。但由于 GenBank 中 18S rDNA 序列数据极为有限,GC 含量对车轮虫系统发生的影响程度有待更多的分子数据来揭示。

综上所述,通过对刺纹车轮虫寄生特性、与近缘种的亲缘关系以及对该物种系统地位的探讨,结果表明刺纹车轮虫具有相对较强的宿主适应性且在系统进化中分化较晚,与海水车轮虫具有较近的亲缘关系。

参考文献:

[1] 宋微波,赵元荪,徐奎栋,等. 海水养殖中的危害性原生动物[M]. 北京:科学出版社,2003.
Song W B, Zhao Y J, Xu K D, et al. Pathogenic protozoa in mariculture[M]. Beijing: Science Press, 2003.

[2] 赵元荪. 网状车轮虫 *Trichodina reticulata* Hirschman & Partsch, 1955 的世界地理分布特点及寄主特异性分析[J]. 内江师范学院学报, 2013, 28(2): 1-6.
Zhao Y J. Analysis on geographic distribution and host specificity of *Trichodina reticulata* Hirschman & Partsch, 1955[J]. Journal of Neijiang Normal University, 2013, 28

- (2):1-6.
- [3] 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.
 - [4] El-Tantawy S A M, Kazubski S L. The trichodinid ciliates from fish, *Tilapia nilotica* from the Nile Delta (Egypt) [J]. *Acta Protozoologica*, 1986, 25(4): 439-444.
 - [5] 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.
 - [6] 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.
 - [7] 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.
 - [8] 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.
 - [9] 李海波, 赵元君. 四川宜宾地区 4 种外寄生车轮虫的研究 [J]. *河北农业科学*, 2009, 13(11): 53-56.
Li H B, Zhao Y J. Study on four species of ectoparasitic trichodinids from cultured freshwater fishes in Yibin, Sichuan province [J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2009, 13(11): 53-56.
 - [10] 陶燕飞, 赵元君, 唐发辉. 重庆地区鲢、鳙及草鱼七种外寄生车轮虫的描述 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32(增刊): 124-129.
Tao Y F, Zhao Y J, Tang F H. Seven species of trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) from freshwater fishes, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* and *Ctenopharyngodon idellus*, with the description of *Trichodina chongqingensis* sp. nov. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(suppl): 124-129.
 - [11] 刘春宁, 赵元君. 重庆地区淡水鲶形目鱼类 4 种寄生车轮虫的分类 [J]. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 2010, 27(1): 1-5.
Liu C N, Zhao Y J. Morphological and taxonomic study on four species of trichodinids parasitic on gills of Siluriformes fishes from freshwater [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2010, 27(1): 1-5.
 - [12] 齐欢, 赵元君, 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.
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*, 2011, 28(5): 16-24.
 - [13] 韩晓燕, 赵元君. 四川岷江流域常见养殖经济鱼类外寄生车轮虫的研究 [J]. *内江师范学院学报*, 2011, 26(10): 22-31.
Han X Y, Zhao Y J. Study on ectoparasitic trichodinids from cultured commercial fishes from Minjiang River Valley, Sichuan province [J]. *Journal of Neijiang Normal University*, 2011, 26(10): 22-31.
 - [14] 谢志刚, 唐发辉, 赵元君. 江西鄱阳湖地区鲈形目鱼类外寄生车轮虫的研究 [J]. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 2013, 30(3): 9-16.
Xie Z G, Tang F H, Zhao Y J. Study on ectoparasitic trichodinids from Perciformes fishes along the Area of Poyang Lake, Jiangxi Province [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2013, 30(3): 9-16.
 - [15] 李进, 唐发辉, 赵元君. 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.
Li J, Tang F H, Zhao Y J. Study on the population diversity of *Trichodina uniforma* [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2014, 31(2): 10-15.
 - [16] 刘菲, 唐发辉, 赵元君. 太湖水域异齿车轮虫 *Trichodina heterodentata* Duncan, 1977 的形态分类学研究 [J]. *内江师范学院学报*, 2014, 29(4): 33-38.
Liu F, Tang F H, Zhao Y J. Morphological taxonomy study on *Trichodina heterodentata* Duncan, 1977 along Taihu Lake, China [J]. *Journal of Neijiang Normal University*, 2014, 29(4): 33-38.
 - [17] 王文强, 唐发辉, 赵元君. 云南地区水生经济动物外寄生车轮虫的研究 [J]. *四川动物*, 2014, 33(2): 265-270.
Wang W Q, Tang F H, Zhao Y J. Study on the ectoparasitic trichodinids (Ciliophora: Peritrichia) from aquatic economic animals in Yunnan, China [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, 33(2): 265-270.
 - [18] 唐发辉, 赵元君. 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): 8-11.
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*, 2007, 24(3): 8-11.
 - [19] 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.
 - [20] Zhan Z F, Xu K D, Warren A, et al. Reconsideration of phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit ri-

- bosomal RNA gene sequences, with the establishment of a new subclass Mobilia Kahl, 1933[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2009, 56(6): 552-558.
- [21] Zhan Z F, Xu K D, Dunthorn M. Evaluating molecular support for and against the monophyly of the Peritrichia and phylogenetic relationships within the Mobilida (Ciliophora, Oligohymenophorea) [J]. Zoologica Scripta, 2013, 42(2): 213-226.
- [22] Tang F H, Zhao Y J, Warren A. Phylogenetic analyses of trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophorea) inferred from 18S rRNA gene sequence data[J]. Current Microbiology, 2013, 66(3): 306-313.
- [23] Foissner W. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa [J]. European Journal of Protistology, 1991, 27(4): 313-330.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- Tang F H, Zhao Y J, Chen H. Trichodinid ectoparasites from golden carp, with a description of *Trichodina parantigua* sp. nov. [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(1): 75-80.
- [27] 唐发辉, 赵元荪, 唐安科. 重庆地区鲫鱼外寄生车轮虫的记述及一新种描述[J]. 动物分类学报, 2005, 30(1): 35-40.
- 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.
- [28] Mount D W. Bioinformatics sequence and genome analysis [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [29] Zhao Y J, Li N N, Tang F H, et al. Remarks on the validity of *Myxobolus ampullicapsulatus* and *M. honghuensis* (Myxozoa: Myxosporidia) based on SSU rDNA sequences [J]. Parasitology Research, 2013, 112(11): 3817-3823.
- [30] Stockle M Y, Hebert P D N. Barcode of life [J]. Scientific American, 2008, 299(4): 82-88.
- [31] Nei M. Genetic distance between populations [J]. American Naturalist, 1972, 106: 283-292.
- [32] Du H, Hu H, Meng Y, et al. The correlation coefficient of GC content of the genome-wide genes is positively correlated with animal evolutionary relationships [J]. FEBS Letters, 2010, 584(18): 3990-3994.
- [33] Mooers A Ø, Holmes E C. The evolution of base composition and phylogenetic inference [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2000, 15(9): 365-369.

Animal Sciences

Clone and Sequence Analysis of 18S rDNA for *Trichodina centrostrigata* Basson, Van As & Paperna, 1983

WANG Qin, TANG Fahui, ZHAO Yuanjun

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

Abstract: The 18S rDNA of *Trichodina centrostrigata* was first cloned and sequenced in the present study, and the related analysis on this sequence was carried out for studying on *Trichodina centrostrigata*. The research result showed that *T. centrostrigata* was a freshwater trichodinid species with radial central granules, located in the top clade of phylogenetic tree with the relatively higher GC content, and always clustered with marine species by possessing higher sequence similarity and smaller genetic distance to these trichodinids. The conclusion was that *T. centrostrigata* was of strong adaptability to host, in earlier differentiation, and closely with marine trichodinid. Besides, the homology of trichodinid was probably related to the sequence similarity and genetic distance of 18S rDNA sequence, and the GC content was markedly in correlations with the topology of phylogenetic tree.

Key words: *Trichodina centrostrigata*; 18S rDNA; sequence similarity; genetic distance; GC content; phylogenetic tree