

哈利特角形虫宿主新纪录及两个地理株系的比较*

黄艳梅, 赵元茗, 杨承忠

(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:【目的】研究哈利特角形虫(*Ceratomyxa hallettae*)在不同地理分布和宿主种类下的遗传分化。【方法】基于哈利特角形虫的形态学、18S rDNA 的分子特征、系统发育、宿主、地理分布等特征对哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系间的遗传分化进行研究。【结果】褐蓝子鱼(*Siganus fuscescens*)为哈利特角形虫的新宿主;形态学分析显示哈利特角形虫两株系在形态量度上差异较小;分子特征分析显示两株系 18S rDNA 序列之间存在 7 个变异位点,且两者相似度为 99.60%,遗传距离为 0.003 8;系统发育分析表明,哈利特角形虫中国株系聚于海洋角形虫进化支,且与澳大利亚株系形成姐妹群关系。【结论】宿主种类差异与长期的地理隔离可能是造成哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系在分子(18S rDNA)和形态上发生分化的主要原因。综合角形虫的系统发育、地理分布、宿主类群等信息可知,哈利特角形虫的原始宿主可能为单斑裸颊鲷(*Lethrinus harak*),而褐蓝子鱼应为该寄生虫经历了宿主转移事件而获得的新宿主。

关键词:哈利特角形虫;新纪录;宿主转移;18S rDNA

中图分类号:Q958.9;Q959.115

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)02-0026-06

黏孢子虫是一类个体微小、分布广泛、种类繁多的后生动物寄生虫,具有复杂的生活史(宿主涉及无脊椎动物与脊椎动物),主要宿主为鱼类^[1-2]。角形虫属(*Ceratomyxa*)隶属于刺胞动物门(Cnidaria)黏孢子虫纲(Myxosporea)双壳目(Bivalvulida)角形虫科(Ceratomyxidae)^[3],属下物种主要寄生于海水鱼,另有少数寄生于淡水鱼,多为胆囊寄生;该属是黏孢子虫纲中包含种数较多的一个属,目前已有报道的该属物种达 300 余种^[4-10]。哈利特角形虫(*Ceratomyxa hallettae*)最初由 Gunter 等人^[11]于 2009 年在澳大利亚昆士兰州近海的单斑裸颊鲷(*Lethrinus harak*)的胆囊中检获并描述(本研究中称澳大利亚株系)。2019 年,笔者在中国厦门附近海域的褐蓝子鱼(*Siganus fuscescens*)胆囊中也检获到这一物种(本研究中称中国株系),褐蓝子鱼为该物种的新宿主,中国为该物种的地理新分布。本研究在对哈利特角形虫中国株系描述的基础上,进一步地对该物种现有的两个不同株系进行了比较研究;同时,综合系统发育、宿主类群、寄生部位、地理分布、生境特征等资料,对角形虫各支系及它们的进化关系进行了分析和讨论,以便深入了解角形虫这个特殊类群的进化模式。

1 材料与方法

1.1 样本采集与物种鉴定

哈利特角形虫的宿主褐蓝子鱼于 2019 年 12 月采自中国福建省厦门市附近海域(经纬度:北纬 24°24'56"、东经 118°5'51"),共采集到 6 尾,取鱼体胆汁进行检测后发现寄生虫,感染率为 17%,感染强度为重度感染,感染强度参照文献[9]进行界定。寄生虫样本的收集、处理与鉴定按照文献[12]进行。

1.2 DNA 提取与扩增

使用 Dneasy Tissue Kit 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)对哈利特角形虫的基因组 DNA 进行提取,参照该试剂盒的说明书进行有关操作。用于扩增 18S rDNA 序列的引物为 ERIB1(5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3')和 ERIB10(5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3')^[13]。使用 20 μ L 的 PCR 扩增体系,其中包含两种引物各

* 收稿日期:2020-10-26 修回日期:2020-11-27 网络出版时间:2021-04-07 14:22

资助项目:国家自然科学基金(No. 31970409;No. 31672280);重庆市自然科学基金(No. cstc2018jcyjAX0738);重庆市留学人员回国创业创新支持计划(No. cx2018108);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJQN201900505)

第一作者简介:黄艳梅,女,研究方向为鱼类寄生虫学,E-mail:1169094356@qq.com;通信作者:杨承忠,男,教授,博士,E-mail:drczyang@126.com

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210407.1355.006.html

0.5 μL、模板 DNA 5.8 ng、Mix(英潍捷基(上海)生物公司)5 μL,并添加超纯水至终体积。反应程序为:94 ℃预变性 90 s,循环 35 次的 94 ℃变性 20 s、55 ℃退火 20 s、72 ℃延伸 2 min,最后 72 ℃再次延伸 10 min。反应完成后在 4 ℃下保温。反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,将有条带的反应产物送至英潍捷基(上海)生物公司测序。

1.3 系统发育分析

1.3.1 序列的选取 用于构建系统发育树的序列为 NCBI 中可用的角形虫序列及与角形虫系统发育关系密切相关物种 *Myxodavisia bulani* (GenBank 登录号:KM273030),*Unicapsulocaudum mugilum* (GenBank 登录号:KP091845),*Palliatius indecorus* (GenBank 登录号:DQ377712),*Ceratonova shasta* (GenBank 登录号:AF001579) 与 *Ceratonova gasterostea* (GenBank 登录号:KF751186)的序列。选取 *Chloromyxum clavatum* (GenBank 登录号:JQ793641)和 *Chloromyxum auratum* (GenBank 登录号:AY971521)作为外群构建系统发育树。

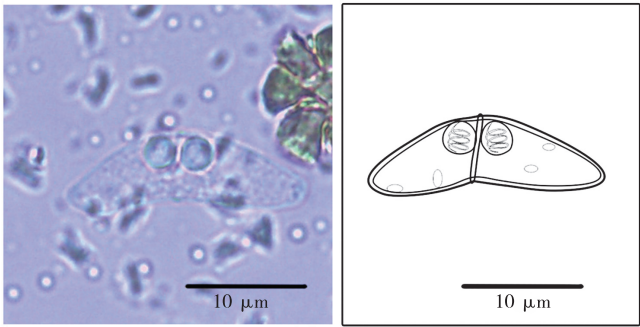
1.3.2 18S rDNA 序列分析 使用 BioEdit 5.0.6 和 ContigExpress Project 6.0 进行 18S rDNA 序列的拼接;利用网站 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa> 中的比对工具计算序列之间的相似度;使用 MEGA 6.0^[14] 计算所选角形虫序列之间的遗传距离,模型为 Kimura 2-parameter model;使用 BioEdit 5.0.6 进行序列变异位点的分析。

1.3.3 系统树的构建 Bayes(BI)系统树的构建参照文献[15]进行,位点变异设置为 invgamma 分布,通过 Model test 3.7 计算获得序列最佳进化模型为 GTR+I+G;运行 10 000 000 代,每 200 代抽样 1 次,在舍弃 25% 的老化样本后,根据剩余样本构建一致树。利用在线工具 The CIPRES Science Gateway V. 3.3(<http://www.phylo.org/>),在 RAxML-HP2 XSEDE(7.6.3)下构建最大似然树(Maximum likelihood,ML),使用 GTR+G 模型进行 1 000 次自举(Bootstrap)重复检测。使用 Photoshop CS3 对系统树进行修饰。

2 结果

2.1 哈利特角形虫中国株系的孢子形态描述

哈利特角形虫中国株系的孢子在缝面观呈弧形,缝线明显,等大的两个壳瓣从缝线处向两端延伸并形成两个圆钝的末端(图 1);孢子长(5.85 ± 0.01) μm (范围为 5.84 ~ 5.85 μm, $n=25$),厚(18.81 ± 1.09) μm (范围为 17.72~19.89 μm, $n=25$),两极囊等大且位于缝线两侧,呈球形,大小为(2.69 ± 0.09) μm (范围为 2.60~2.78 μm, $n=50$),极丝为 2~3 圈,孢子夹角为 $166.01^\circ \pm 5.54^\circ$ (范围为 $160.46^\circ \sim 171.55^\circ$, $n=25$) (表 1)。



a 成熟孢子显微图 b 成熟孢子线条图

图 1 哈利特角形虫孢子形态

Fig.1 Spore morphology of *C. hallettae*

表 1 哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系的孢子形态比较

Tab.1 The morphometric comparison of *C. hallettae* from China and Australia strains

形态参数、宿主、 分布地及资料来源	株系	
	中国	澳大利亚
孢子长/μm	5.85±0.01(5.84~5.85)($n=25$)	4.93(3.66~5.93)($n=30$)
孢子厚/μm	18.81±1.09(17.72~19.89) ($n=25$)	20.46(13.89~26.49)($n=30$)
极囊形态	球形	椭圆形
极囊大小/μm	2.69±0.09(2.60~2.78)($n=50$)	2.07(1.16~2.99)($n=30$),1.93(1.19~2.51)($n=30$)
孢子夹角/(°)	166.01±5.54(160.46~171.55)($n=25$)	176.1(150~190)($n=30$)
宿主	褐蓝子鱼(<i>S. fuscescens</i>)	单斑裸颊鲷(<i>L. harak</i>)
分布地	中国厦门	澳大利亚昆士兰州
资料来源	本研究	文献[11]

注:澳大利亚株系两个极囊大小不等,中国株系两个极囊等大

2.2 哈利特角形虫 18S rDNA 分子特征

哈利特角形虫中国株系 18S rDNA 长度为 1 678 nt,它的序列数据上传至 GenBank 数据库,登录号为 MW035086。该序列经 GenBank BLAST 在线比对,结果显示哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系的相似度为 99.60%,遗传距离为 0.003 8;与其他相似种 *C. auratae*,*C. gurnardi* 和 *C. thalassomae* 的序列相似度在 89.10%~92.50%之间,遗传距离在 0.069 5~0.108 4 之间(表 2)。哈利特角形虫的这两个株系的 18S rDNA 共同区段长度为 1 389 nt,其中存在 7 个变异位点,即:140,342,551,573,695,808 和 841 位点。以澳大利亚株系为基准,中国株系在 342,551,573,841 位点发生颠换(A→T,G→T,T→A,T→G),在 140,808 位点发生转换(G→A,G→A);此外澳大利亚株系在 695 位点处为简并碱基 W(图 2)。

2.3 系统发育分析

图 3 显示:基于 18S rDNA 构建的 BI 系统发育树包含 3 个支系即 Clade I,Clade II 和 Clade III。其中 Clade I 由淡水新角形虫属(*Ceratonova*)的 *C. shasta* 和 *C. gasterostea* 构成,位于系统树的基部;Clade II 由 *U. mugilum*,*M. bulani* 以及 6 个角形虫属的物种构成;Clade III 由绝大多数角形虫属物种构成,其中哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系相聚后再与 *C. thalassomae* 和 *C. robertsthomsoni* 构成的一支形成姐妹群关系。

表 2 哈利特角形虫与相似种的 18S rDNA 序列相似度(右上)与遗传距离(左下)

Tab. 2 Similarities (upper right diagonal) and the genetic distances (lower left diagonal) of *C. hallettae* and its similar species based on 18S rDNA sequences

物种名	GenBank 登录号	物种编号				
		<i>C. hallettae</i> (中国)	<i>C. hallettae</i> (澳大利亚)	<i>C. auratae</i>	<i>C. gurnardi</i>	<i>C. thalassomae</i>
<i>C. hallettae</i> (中国)	MW035086		99.60%	90.10%	89.10%	92.50%
<i>C. hallettae</i> (澳大利亚)	FJ204248	0.003 8		88.80%	88.20%	92.10%
<i>C. auratae</i>	KP765721	0.108 4	0.107 5		91.00%	88.10%
<i>C. gurnardi</i>	MG554470	0.103 6	0.102 7	0.069 8		87.50%
<i>C. thalassomae</i>	EU045332	0.069 5	0.069 6	0.118 2	0.108 9	

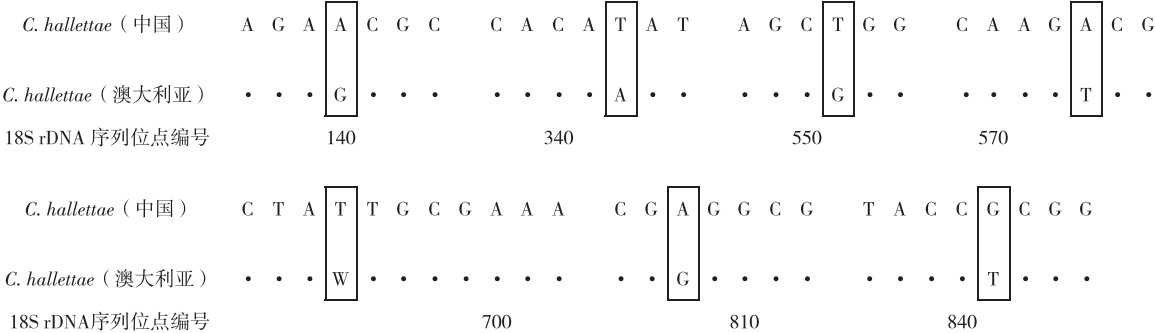


图 2 哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系的 18S rDNA 变异位点的比较

Fig. 2 The comparison of variation sites of 18S rDNA of *C. hallettae* from China strain and Australia strain

3 讨论

笔者在中国福建省厦门市沿海褐蓝子鱼的胆囊中检测到哈利特角形虫,这是在中国首次检出该寄生虫,褐蓝子鱼为它的宿主新纪录。将哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系进行形态比较后发现,它们在形态学量度上略有差异,两者孢子长均值相差 0.9 μm,孢子厚均值相差 1.6 μm,极囊均值相差 0.62 μm,孢子夹角均值相差 10°。以往的研究表明:以 18S rDNA 为分子标记的黏孢子虫遗传距离范围为 0.000~0.007、相似度范围为 98.60%~100%时,应为同种^[16-17]。在本研究中,哈利特角形虫两株系 18S rDNA 序列遗传距离为 0.003 8,相似度为 99.60%。因此哈利特角形虫中国株系和澳大利亚应为同一物种且两株系在形态量度与分子特征上的差异属于种内水平。同时,哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系的 18S rDNA 序列间存在 7 个变异位点,且分歧度为 0.38,表明两个株系已发生分化而形成了不同的种群。宿主种类差异与长期的地理隔离可能是造成哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系在分子(18S rDNA)和形态上发生分化的主要原因。



注:系统树节点的数值表示支持率(BI/ML);拉丁学名后为 GenBank 登录号

图 3 利用 BI 和 ML 法构建的角形虫 18S rDNA 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree (BI/ML) of ceratomyxids generated based on 18S rDNA sequences

基于 18S rDNA 构建的角形虫系统发育树主要形成 3 大支系:由肠道寄生的淡水新角形虫属物种构成的 Clade I 处于系统树的基部,为最早分化的支系;构成 Clade II 的物种均为胆囊寄生,其中除 *C. leatherjacketi* 寄生于海洋鱼类外,其余物种均寄生于淡水或广盐性鱼类。这一支系可能是角形虫淡水和海水适应辐射的一个过渡类群^[4,10,18];其余角形虫构成 Clade III,为角形虫系统中最大的支系,其中所含物种均为海洋鱼类胆囊寄生。哈利特角形虫中国株系与澳大利亚株系形成的一支聚于 Clade III 中的亚支 A 中,它们与 *C. thalassomae* 和 *C. robertsthompsoni* 所构成的一支具有最近的系统关系。有研究指出,角形虫的系统发育与宿主类群有着非常密切的关系:一般而言,宿主亲缘关系越近,寄生于它们体内的角形虫具有更近的系统关系^[9,19]。从图 3 可知:哈利特角形虫中国株系的宿主褐蓝子鱼隶属鲈形目(Perciformes)蓝子鱼科(Siganidae),而澳大利亚株系的宿主单斑裸颊鲷隶属鲈形目裸颊鲷科(Lethrinidae)。与亚支 A 中其他角形虫所寄生的宿主类群相比,裸颊鲷科与隆头鱼科(Labridae)、鲈科(Serranidae)、天竺鲷科(Apogonidae)、鲷科(Sparidae)的亲缘关系更近,而与蓝子鱼科的亲缘关系较远^[20-22]。这表明哈利特角形虫的原始宿主应为单斑裸颊鲷,褐蓝子鱼为哈利特角形虫通过宿主转移并经过长期的适应而获得的新宿主。

参考文献:

- [1] KENT M L, ANDREE K B, BARTHOLOMEW J L, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2010, 48(4): 395-413.
- [2] 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.
- [3] NESNIDAL M P, HELMKAMPF M, BRUCHHAUS I, et al. Agent of whirling disease meets orphan worm: phylogenomic analyses firmly place Myxozoa in Cnidaria[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54576.
- [4] 高磊, 赵元君, 杨生华, 等. 戴曼特角形虫中国新纪录及不同地理株系的比较[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2020, 37(3): 21-26.
- [5] GAO L, ZHAO Y J, YANG S H, et al. A New record of *Ceratomyxa diamanti* from China and comparison of its different geographic strains[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2020, 37(3): 21-26.
- [6] ABDEL-BAKI A A S, AL-QAHTANI H A, AL-QURAISHY S, et al. *Ceratomyxa azevedoi* n. sp. (Myxozoa: Myxosporae) parasitizing the gallbladder of *Lutjanus ehrenbergii* in the Arabian gulf[J]. Parasitology Research, 2017, 116(10): 2757-2763.
- [7] EIRAS J C, CRUZ C, SARAIVA A. Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Cnidaria, Myxosporae, Ceratomyxidae) described between 2007 and 2017[J]. Systematic Parasitology, 2018, 95: 427-446.
- [8] GUNTER N, ADLARD R. The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporae; Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporae; Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporae; Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporae; Sphaerosporidae) [J]. Systematic Parasitology, 2010, 75(2): 81-104.
- [9] EIRAS J C. Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporae; Ceratomyxidae) [J]. Systematic Parasitology, 2006, 65(1): 49-71.
- [10] HUANG Y M, ZHAO Y J, ZHOU Y, et al. First molecular evidence of *Ceratomyxa epinephela* (Myxozoa: ceratomyxidae) and its genetic variation from different host species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(5): 1263-1269.
- [11] ZHANG D D, ZHAO Y J, YANG S H, et al. Morphological and molecular identification of a novel species, *Ceratomyxa siganicola* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae) from *Siganus fuscescens*, in East China Sea[J]. Acta Parasitologica, 2019, 64: 596-602.
- [12] GUNTER N L, WHIPPS C M, ADLARD R D. *Ceratomyxa* (Myxozoa: Bivalvulida): robust taxon or genus of convenience? [J]. International Journal for Parasitology, 2009, 39(12): 1395-1405.
- [13] 赵元君, 马成伦, 宋微波. 海水养殖中原生动物病原虫鉴定: II 粘孢子虫的研究及鉴定方法[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 681-688.
- [14] ZHAO Y J, MA C L, SONG W B. Illustrated guide to the identification of pathogenetic protozoa in mariculture: II diagnostic methods for the Myxosporae[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(5): 681-688.
- [15] BARTA J R, MARTIN D S, LIBERATOR P A, et al. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences[J]. The Journal of Parasitology, 1997, 83(2): 262-271.

- [14] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [15] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MRBAYES 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [16] 冉佼, 杨承忠, 赵元君. 基于遗传距离的粘孢子虫分类研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2014, 31(3): 31-34.
RAN J, YANG C Z, ZHAO Y J. Taxonomic research of the Myxosporidia based on genetic distance[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2014, 31(3): 31-34.
- [17] KARLSBAKK E, KRISTMUNDSSON Á, ALBANO M, et al. Redescription and phylogenetic position of *Myxobolus aeglefini* and *Myxobolus platessae* n. comb. (Myxosporidia), parasites in the cartilage of some North Atlantic marine fishes, with notes on the phylogeny and classification of the Platysporina[J]. Parasitology International, 2017, 66(1): 952-959.
- [18] YANG C Z, ZHOU Y, ZHAO Y J, et al. Erection of *Unicapsulocaudum mugilum* gen. et sp. nov. (Myxozoa: Ceratomyxidae) based on its morphological and molecular data[J]. Journal of Natural History, 2017, 51(9/10): 457-467.
- [19] BOUDERBALA K, RANGEL L F, SANTOS M J, et al. *Ceratomyxa mennani* n. sp. (Myxosporidia: Bivalvulida) parasitizing the gallbladder of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from Tunisian waters[J]. Parasitology Research, 2020, 119(5): 1515-1522.
- [20] 樊冀蓉, 吴仁协, 赵元君, 等. 中国鲷科鱼类分类和系统发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 472-480.
FAN J R, WU R X, ZHAO Y J et al. Progresses on taxonomy and phylogeny of family Sparidae from China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 472-480.
- [21] 李仲璞. 盘丽鱼属鱼类线粒体基因组比较研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
LI Z P. Comparison on complete mitochondrial DNA of genus *Symphysodon*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [22] 庄轩. 斜带石斑鱼和赤点石斑鱼线粒体基因组全序列研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
ZHUANG X. Studies on complete mitochondrial genome of *Epinephelus coioides* and *Epinephelus akaara*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2007.

Animal Sciences

A New Host Record of *Ceratomyxa hallettae* and the Comparison of Two Different Geographic Strains

HUANG Yanmei, ZHAO Yuanjun, YANG Chengzhong

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences,

Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To research the genetic differentiation of *Ceratomyxa hallettae* from different geographic localities and hosts.

[Methods] Based on the morphological characteristics, 18S rDNA sequence features, phylogenetic analysis, host species and geographic distribution of different strains (China and Australia) of *C. hallettae* to investigate genetic divergence. [Findings] *Siganus fuscescens* is the new host for *C. hallettae*. The morphological analysis of *C. hallettae* from China and Australia showed that there were some slightly morphological differences. The molecular characteristic analysis of both strains showed that there were seven variable sites, and the 18S rDNA sequence similarity and genetic distance of both were 99.60% and 0.003 8, respectively. Phylogenetic analysis suggested that Chinese strain of *C. hallettae* was clustered in the clade of marine *Ceratomyxa* and formed a sister-group relationship with the Australian strain. [Conclusions] The different host species and long-term geographical isolation may be the main reasons for the molecular and morphological differentiation in different strains of *C. hallettae*. Combining the analyses of phylogeny, geographic distribution and host affinity, the results indicated that the original host of *C. hallettae* might be *Lethrinus harak*, and the *S. fuscescens* should be its new host after the parasite experienced host shift events.

Keywords: *Ceratomyxa hallettae*; new record; host shift; 18S rDNA

(责任编辑 方 兴)