

西藏三种苔藓栖生纤毛虫的形态和系统发育分析

刘真诚^{①②} 谷思雨^{①②} 缪炜^① 巴桑^{③*} 姜传奇^{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 中国科学院大学 北京 100049; ③ 西藏大学理学院湿地与流域生态实验室 拉萨 850000

摘要: 本研究利用活体观察和蛋白银染色方法对采自西藏日喀则和那曲的 3 种苔藓栖生纤毛虫, 鬃异源棘尾虫 (*Tetmemena pustulata*)、棘毛虫未定种 (*Sterkiella* sp.) 和殖口虫未定种 (*Gonostomum* sp.) 进行了形态学研究, 描述了活体、核器以及纤毛图式等形态学特征。同时, 测定了这 3 种纤毛虫的 SSU rDNA 基因序列, 并基于该序列进行了系统发育分析。3 种纤毛虫首次在西藏苔藓生境发现, 该研究丰富了对纤毛虫物种多样性和生态分布的认知, 为纤毛虫原生动物生物地理学研究提供基础资料, 同时也获得了这 3 种西藏苔藓栖生纤毛虫的种质资源, 为纤毛虫种质和遗传资源的挖掘和利用提供基础。

关键词: 西藏; 苔藓; 纤毛虫; 形态; 系统发育

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2022) 02-277-12

Morphological and Phylogenetic Studies on Three Moss Dwelling Ciliates in Tibet

LIU Zhen-Cheng^{①②} GU Si-Yu^{①②} MIAO Wei^① Basang^{①*} JIANG Chuan-Qi^{①*}

① Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

② University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; ③ Laboratory of Wetland and Catchments Ecology in Tibetan Plateau, Faculty of Natural Sciences, Tibet University, Lhasa 850000, China

Abstract: [Objectives] Three species of moss dwelling ciliates (3 genera, 2 families) were isolated from moss in Tibet and were identified by using morphological study. **[Methods]** The ciliates were studied morphologically using living observation and protargol staining methods. Morphological characters of three ciliates were counted for comparison with similar species, and phylogenetic trees were constructed for molecular identification. **[Results]** The morphological characteristics of *Tetmemena pustulata* (Fig. 1), *Sterkiella* sp. (Fig. 2) and *Gonostomum* sp. (Fig. 3) were described, respectively. The morphological characters of the Tibetan population of *Tetmemena pustulata* remain consistent with previous descriptions, but both *Sterkiella* sp. and *Gonostomum* sp. differ from known species. The SSU rDNA gene sequences of the three

基金项目 第二次青藏高原综合科学考察研究项目 (No. QZKK0403), 国家自然科学基金项目 (No. 32070418);

* 通讯作者, E-mail: jiangchuanqi@ihb.ac.cn, hbasang2003@aliyun.com;

第一作者介绍 刘真诚, 男, 硕士研究生; 研究方向: 遗传学; E-mail: zc_liu@yeah.net.

收稿日期: 2021-10-12, 修回日期: 2022-01-03 DOI: 10.13859/j.cjz.202202013

ciliates were amplified and phylogenetic analysis was conducted based on these sequences (Fig. 4). These three moss dwelling ciliates in this study were found in Tibet for the first time. The results of the phylogenetic analysis showed that the Tibetan population of *T. pustulata* clustered with the sequence of this species sequences from GenBank, the Tibetan population of *Sterkiella* sp. clustered with *Sterkiella paratricirrata* (MN191544), and the Tibetan population of *Gonostomum* sp. with *G. sinicum* (KY475614) and *Gonostomum* sp. (MG603605) clustered together as one branch, but by morphological comparison, the Tibetan population of *Sterkiella* sp. and *S. paratricirrata* showed obvious different characters of morphology, and the morphological characters of Tibetan population of *Gonostomum* sp. also differed significantly from those of *G. sinicum*. **[Conclusion]** Based on morphological studies and phylogenetic analysis, these three ciliates are finally identified as *T. pustulata*, *Sterkiella* sp. and *Gonostomum* sp. This study enriches the species diversity and ecological distribution of ciliates, providing further information of ciliate protozoans biogeography. Furthermore, this study obtains three moss ciliate resources, which will provide basis for mining and usage of ciliates germplasm and genetic resources.

Key words: Tibet; Moss; Ciliate; Morphology; Phylogeny

纤毛虫是一类单细胞真核生物，隶属于原生生物界原生动物亚界纤毛门。纤毛虫物种丰富且多样性高，目前已经记载约 8 000 余种，广泛分布在淡水、海水、温泉、土壤甚至一些特殊和极端生境中 (Lynn 2008)。青藏高原是世界上海拔最高的高原 (Yao et al. 2012)，自然环境相对恶劣，气候极端，被称为“世界第三级”。苔藓植物具有极强的抗逆性，因此在青藏高原植被中占据极大优势，其全年生产力甚至超过全部植被生产力的三分之一 (Li 1993)。纤毛虫作为苔藓生境中最丰富的真核微生物类群，其多样性备受关注 (Heger et al. 2018)。20 世纪 60 至 70 年代，王家楫等在第一次青藏高原综合科学考察中从苔藓生境中共鉴定到 73 种纤毛虫，隶属于 23 科 45 属 (中国珠穆朗玛峰登山队科学考察队 1962)。已有研究表明，苔藓生境中存在大量的不明或未知的纤毛虫类群，许多已经报道的种类其鉴定及描述有待补充和完善 (Foissner 1996, 2000, Mieczan et al. 2014)。

针对西藏苔藓这一特殊生境，对采自日喀则和那曲地区的苔藓样品进行处理，从中分离获得了 3 种旋唇纲纤毛虫。本研究利用活体观察和蛋白银染色技术详细描述了这 3 种纤毛虫的形态特征，测定了 SSU rDNA 基因序列并构

建系统发育树进行系统发育分析。研究结果补充和完善了该生境中纤毛虫种类的形态和分子信息，同时也为纤毛虫生物地理学研究提供基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集与amp;处理

从西藏苔藓样品中分离出 3 种旋唇纲纤毛虫并完成克隆培养。其中，鬃异源棘尾虫 (*Tetmemena pustulata*) 于 2019 年 7 月采集自西藏日喀则市仲巴县杰玛央宗冰川附近山坡 (82°16'4" E, 30°17'4" N, 海拔 5 008 m)，棘毛虫未定种 (*Sterkiella* sp.) 和殖口虫未定种 (*Gonostomum* sp.) 于同年 8 月采集自西藏那曲地区嘉黎县错查错岸边 (92°49'40" E, 31°0'19" N, 海拔 4 805 m)。使用金属铲挖取适量苔藓，包含苔藓根系和根系土壤，封装于干净的纸质信封中保存。带回实验室后，取少量苔藓样品置于无菌培养皿中，加入矿泉水稍没过样品，放入 1 粒灭菌的麦粒，盖好培养皿的盖子以防止交叉污染。25 °C 培养箱中培养 4~5 d 后，在体视镜下观察并使用微吸管分离出纤毛虫单个个体，使用矿泉水、麦粒浸出液和绿藻在 25 °C 下培养，以形成稳定的克隆群体，用

于后续的形态学和分子生物学研究。此外,建立了3种纤毛虫的稳定培养体系,并将纤毛虫的种质资源保藏于中国科学院水生生物研究所国家水生生物种质资源库的藻类和原生动物子库 (<http://www.nabrc.org.cn/#/subCenter/nccap>)。

1.2 形态研究

在体视镜下,使用微吸管从克隆群体中吸取数只个体均匀和运动活跃的纤毛虫,置于载玻片上进行活体压片观察。在显微镜下(100~1000倍)观察并记录纤毛虫活体大小、形状颜色、伸缩泡及运动方式。使用蛋白银染色技术(Shi et al. 1990)对纤毛虫进行染色制片后于显微镜下(100~1000倍)观察,记录纤毛图式和核器特征。此外,吸取数只纤毛虫于载玻片上,用2%多聚甲醛(paraformaldehyde solution)进行固定,再加入0.5 mg/L DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)核酸染料于避光条件下染色10 min,后于荧光显微镜下观察,记录大核和小核的数量、大小及形状特征。显微观察及拍照利用尼康显微镜(Nikon EC-LIPSE 80i)系统。系统分类和术语参照Lynn(2008)。

1.3 DNA 提取和 PCR 扩增

DNA 提取利用REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit 试剂盒。使用微吸管吸取10只纤毛虫,饥饿处理后,用无菌水清洗数次,参照试剂盒说明书,裂解细胞获得DNA模板,保存于4℃冰箱用于后续PCR扩增。使用真核生物SSU rDNA通用引物18S-F 5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3'和18S-R 5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3'扩增SSU rDNA基因(Medlin et al. 1988)。PCR扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳检测后,送至北京擎科生物科技有限公司武汉分公司进行测序。

1.4 系统发育分析

本研究获得3种纤毛虫的SSU rDNA基因序列,已提交至GenBank数据库。其余序列均来自GenBank数据库,包括90条腹毛目SSU rDNA基因序列,以阿库楯纤虫(*Aspidisca*

aculeata)和斯坦楯纤虫(*A. steini*)为外类群。将上述序列汇总后使用MEGA 6.0中的Muscle程序进行序列比对,参数设置默认,然后两端截平并手动删除模糊比对区域。利用MEGA 6.0软件构建最大似然(maximum likelihood, ML)树,选择GTR+I+G模型,节点置信值来自1000叠代重复抽样(Tamura et al. 2013)。贝叶斯树(Bayesian inference, BI)利用MrBays v3.2.6软件构建,选择GTR+I+G模型(Tamura et al. 2013),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。

2 结果

2.1 形态描述

2.1.1 鬃异源棘尾虫 *Tetmemena pustulata* (Müller, 1786) Eigner, 1999 (图1, 表1)

旋唇纲 Spirotrichea Bütschli, 1889

散毛目 Sporadotrichida Fauré-Fremiet, 1961

尖毛虫科 Oxytrichidae Ehrenberg, 1838

虫体为卵圆形,活体大小(100~120) μm × (40~55) μm,长宽比约为2.3:1。虫体背腹扁平,皮膜坚实,无伸缩性。细胞质透明,充满大小不等的食物泡。伸缩泡1个,完全舒张时直径约10 μm,位于虫体中部左侧,靠近口围带末端(图1a, b)。大核2枚,呈椭圆形,蛋白银染色后大小(12~20) μm × (7~12) μm,位于虫体中线上前后排布(图1c~e);小核2枚,球形,直径约3 μm,分别位于2枚大核旁(图1c, d)。运动通常表现为在底质中伏底快速爬行,或悬浮在水体中沿胞体纵轴翻滚前进。

口区约占虫体长度的1/2,口围带远端延伸至胞体顶部右侧,由25~33片小膜组成,口内膜与口侧膜几乎平行。额-腹-横棘毛数量稳定为18根:额棘毛(frontal cirri, FC)3根且较粗壮,最右侧额棘毛靠近口围带远端;口棘毛(buccal cirri, BC)1根,位于口侧膜右侧,邻近口侧膜前端;额腹棘毛(frontoventral cirri, FVC)4根,呈“V”形排布于口侧膜右

侧，靠近右缘棘毛列的位置；口后腹棘毛（postoral ventral cirri, PVC）3 根，其中前两根之间的距离更近；横前棘毛（pretransverse ventral cirri, PTVc）2 根；横棘毛（transverse cirri, TC）5 根位于靠近虫体末端的位置，并不分组，且呈现“√”形排布（图 1f~i）。左右缘棘毛列各 1 列，左缘棘毛列起始于虫体右缘前 1/3 的位置，包含 13~17 根棘毛，右缘棘毛列包含 17~23 根棘毛，左右缘棘毛列后端不相交（图 1d, j, k）。背触毛 6 列，其中 4 列完整，从胞体顶端一直延伸至末端，另 2 列位于胞体右上方，为背缘背触毛列，终止于虫体前 1/3 处。3 根尾棘毛（caudal cirri, CC）较其他棘毛更长，约 20 μm，明显延长至胞外（图 1j）。

2.1.2 棘毛虫未定种 *Sterkiella* sp. (图 2, 表 2)

旋唇纲 Spirotrichea Bütschli, 1889

散毛目 Sporadotrichida Fauré-Fremiet, 1961

尖毛虫科 Oxytrichidae Ehrenberg, 1838

虫体呈长椭圆形，在约 1/2 处达到最宽，两端钝圆，背腹扁平，活体大小 (90~110) μm ×

(40~50) μm，长宽比约为 2.2:1，胞体较坚实，不易变形弯曲。胞质内含有大量的圆形食物泡分布于左右缘以及尾部。伸缩泡位于虫体左侧约 1/2 处，完全舒张时直径约 10 μm（图 2a, b）。2 枚椭圆形大核清晰可见，前后排列于虫体中线上（图 2e, f），蛋白银染色后大小为 (10~16) μm × (8~12) μm；小核 2 枚，呈球形，直径约 3 μm，分别依附于 2 枚大核旁（图 2e）。运动通常表现为较快的在底质中伏底爬行，偶尔在水体中沿身体纵轴做翻滚前行。包囊呈球形，直径约 35 μm，内部透明，呈淡黄色，表面布满突起（图 2c, d）。

口区约占体长的 2/5，口围带由 23~27 片小膜组成，口内膜与口侧膜几乎等长且相交于前三分之一处（图 2j, m）。腹面棘毛排列呈现稳定的 8:5:4 模式，3 根粗壮的额棘毛位于虫体顶端；口棘毛 1 根，位于波动膜前端，额腹棘毛 4 根，呈“V”字形排列，最右侧额腹棘毛靠近右缘棘毛列起始的位置；3 根口后腹棘毛位于口围带后；横前棘毛 2 根；4 根横棘

表 1 鬃异源棘尾虫形态特征数据 (n = 9)

Table 1 Morphometric characterization of *Tetmemena pustulata*

特征 Character	范围 Range	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数 (%) Coefficient of variation
体长 Body length (μm)	99~121	107 ± 7.7	0.07
体宽 Body width (μm)	42~55	46 ± 3.9	0.08
小核数目 Micronuclei number	2	2 ± 0.0	0.00
小核直径 Micronucleus diameter (μm)	3~4	3 ± 0.4	0.12
大核数目 Macronuclear nodules number	2	2 ± 0.0	0.00
大核长度 Macronuclear length (μm)	12~20	15 ± 2.3	0.15
大核宽度 Macronuclear width (μm)	7~12	10 ± 1.4	0.14
额棘毛数目 Frontal cirri number	3	3 ± 0.0	0.00
额腹棘毛数目 Frontoventral cirri number	4	4 ± 0.0	0.00
口棘毛数目 Buccal cirri number	1	1 ± 0.0	0.00
口围小膜数目 Adoral membranelles number	25~33	30 ± 2.5	0.08
口后腹棘毛数目 Postoral ventral cirri number	3	3 ± 0.0	0.00
横棘毛数目 Transverse cirri number	5	5 ± 0.0	0.00
横前棘毛数目 Pretransverse ventral cirri number	2	2 ± 0.0	0.00
尾棘毛数目 Caudal cirri number	3	3 ± 0.0	0.00
左缘棘毛数目 Left marginal cirri number	13~17	14 ± 1.3	0.09
右缘棘毛数目 Right marginal cirri number	17~23	21 ± 2.0	0.09
背触毛列数目 Dorsal kineties number	6	6 ± 0.0	0.00

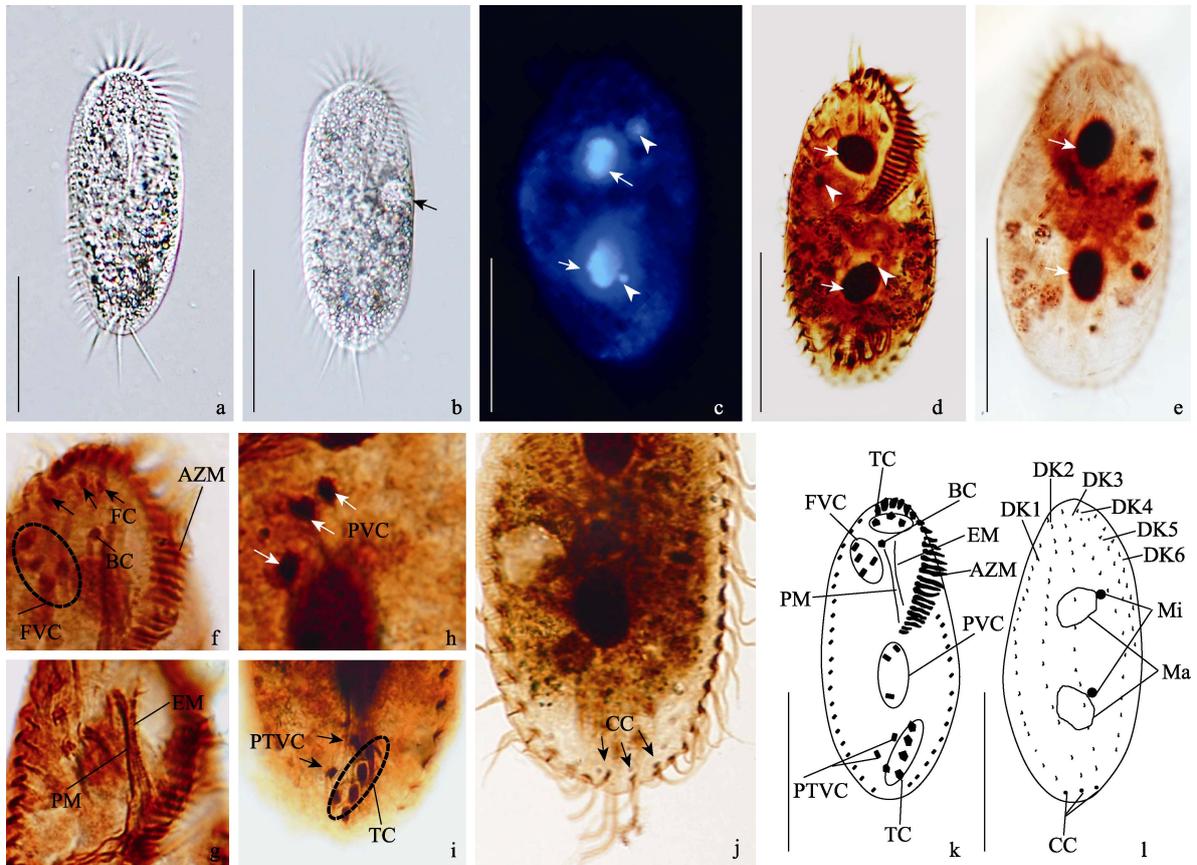


图 1 鬃异源棘尾虫的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Tetmemena pustulata*

a, b. 典型个体腹面观, 箭头示伸缩泡; c. 箭头示大核, 无尾箭头示小核; d. 纤毛图式腹面观, 箭头示大核, 无尾箭头示小核; e. 纤毛图式背面观, 箭头示大核; f. 箭头示额棘毛 (FC); g. 口内膜与口侧膜; h. 箭头示口后腹棘毛; i. 箭头示横前棘毛, 虚线椭圆示横棘毛; j. 箭头示尾棘毛; k. 纤毛图式腹面观; l. 纤毛图式背面观。标尺 = 50 μm 。

a and b. Ventral view a representative specimen, arrow show the contractile vacuole; c. Arrows show the macronucleus, arrowheads indicate micronuclei; d. Ventral view of infraciliature, arrows show the macronucleus, arrowheads indicate micronuclei; e. Dorsal view of infraciliature, arrows show the macronucleus; f. Arrows indicate frontal cirri (FC); g. Paroral membrane and endoral membrane; h. Arrows indicate postoral ventral cirri; i. Arrows indicate pretransverse ventral cirri, and dotted ellipse indicate transverse cirri; j. Arrows indicate caudal cirri; k. Ventral view of infraciliature; l. Dorsal view of infraciliature. Bar = 50 μm .

AZM. 口围小膜; BC. 口棘毛; CC. 尾棘毛; DK1 ~ DK6. 1 ~ 6 列背触毛列; EM. 口内膜; FVC. 额腹棘毛; Ma. 大核; Mi. 小核; PM. 口侧膜; PTVC. 横前棘毛; PVC. 口后腹棘毛; TC. 横棘毛

AZM. Adoralzone of membranelles; BC. Buccal cirri; CC. Caudal cirri; DK1 - DK6. Dorsal kineties 1 - 6; EM. Endoral membrane; FC. Frontal cirri; FVC. Frontoventral cirri; Ma. Macronuclear nodules; Mi. Micronuclear nodules; PM. Paroral membrane; PTVC. Pretransverse ventral cirri; PVC. Postoral ventral cirri; TC. Transverse cirri

毛靠近虫体末端, 呈“√”形排布 (图 2h ~ k, m)。左右缘棘毛各 1 列, 其中左缘由 14 ~ 18

根棘毛组成, 右缘由 18 ~ 20 根棘毛组成, 末端分离不相交 (图 2f, 1)。背触毛 6 列, 其中

左 4 列为完整的背触毛列，贯穿整个虫体，最右 2 列为背缘背触毛列，终止于虫体前 2/3 处（图 2g, n）。尾棘毛恒为 3 根（图 2l）。

2.1.3 殖口虫未定种 *Gonostomum* sp. (图 3, 表 3)

旋唇纲 Spirotrichea Bütschli, 1889

散毛目 Sporadotrichida Fauré-Fremiet, 1961

殖口科 Gonostomatidae Small & Lynn, 1985

虫体呈矛形，背腹扁平，活体大小为 (85 ~ 110) μm \times (30 ~ 40) μm ，长宽比约 3 : 1。皮膜柔软，可大幅度弯曲变形，胞质无色透明。伸缩泡 1 个，位于虫体约 1/2 处，完全舒张时直径约 10 μm （图 3a, b）。运动通常表现为在底质中伏底缓慢爬行。包囊呈球形，透明无色，直径约 25 μm ，外壁光滑无突起，具粘性，常有杂质粘附或粘附于其他固着物体上（图 3c, d）。

口区长度约占体长的 1/3，口围带由 25 ~ 28 片小膜组成。口内膜由单列整齐排布的毛基粒组成，并靠近口侧膜前端，并不与口侧膜相交（图 3h, k）。额棘毛恒为 3 根，位于虫体前

端；口棘毛 1 根；额腹棘毛形成 3 列棘毛列（frontoventral row, FR），从左至右分别为 2 ~ 3、3 ~ 4 和 5 ~ 8 根棘毛。口后腹面区域无棘毛，仅在虫体末端有 2 根横棘毛。左右缘棘毛列各 1 列，分别由 14 ~ 19 根和 27 ~ 31 根棘毛组成，末端分离不相交（图 3f, h ~ k）。椭圆形大核 2 枚，位于细胞中线上前后分布（图 3e, f），蛋白银染色后大小为 (11 ~ 17) μm \times (5 ~ 8) μm ；球形小核 2 枚，直径为 2 μm ，分别依附于大核旁（图 3e, f）。背触毛 3 列，都从虫体前端一直延伸至末端（图 3f, j, l）。尾棘毛 3 根，分别位于背触毛列的末端（图 3j, k）。

2.2 系统发育分析

本研究获得了 3 种苔藓生境旋唇纲纤毛虫的 SSU rDNA 基因序列（图 4）。鬃异源棘尾虫的 SSU rDNA 序列（*Tetmemena pustulata*，序列号：OK465003），长度为 1 644 bp，GC 含量为 45.49%，与 GenBank 中该种的序列（KM222092）相似度为 99.45%。系统发育分

表 2 棘毛虫未定种形态特征数据 (n = 9)

Table 2 Morphometric characterization of *Sterkiella* sp.

特征 Character	范围 Range	平均值 \pm 标准差 Mean \pm SD	变异系数 Coefficient of variation (%)
体长 Body length (μm)	87 ~ 112	101 \pm 10.0	0.10
体宽 Body width (μm)	37 ~ 48	43 \pm 3.7	0.09
小核数目 Micronuclei number	2	2 \pm 0.0	0.00
小核直径 Micronucleus diameter (μm)	2 ~ 3	3 \pm 0.3	0.09
大核数目 Macronuclear nodules number	2	2 \pm 0.0	0.00
大核长度 Macronuclear length (μm)	10 ~ 16	13 \pm 1.6	0.12
大核宽度 Macronuclear width (μm)	8 ~ 12	9 \pm 1.0	0.11
额棘毛数目 Frontal cirri number	3	3 \pm 0.0	0.00
额腹棘毛数目 Frontoventral cirri number	4	4 \pm 0.0	0.00
口棘毛数目 Buccal cirri number	1	1 \pm 0.0	0.00
口围小膜数目 Adoral membranelles number	23 ~ 27	26 \pm 1.2	0.05
口后腹棘毛数目 Postoral ventral cirri number	3	3 \pm 0.0	0.00
横棘毛数目 Transverse cirri number	4	4 \pm 0.0	0.00
横前棘毛数目 Pretransverse ventral cirri number	2	2 \pm 0.0	0.00
尾棘毛数目 Caudal cirri number	3	3 \pm 0.0	0.00
左缘棘毛数目 Left marginal cirri number	14 ~ 18	16 \pm 1.3	0.08
右缘棘毛数目 Right marginal cirri number	18 ~ 20	19 \pm 0.7	0.04
背触毛列数目 Dorsal kineties number	6	6 \pm 0.0	0.00

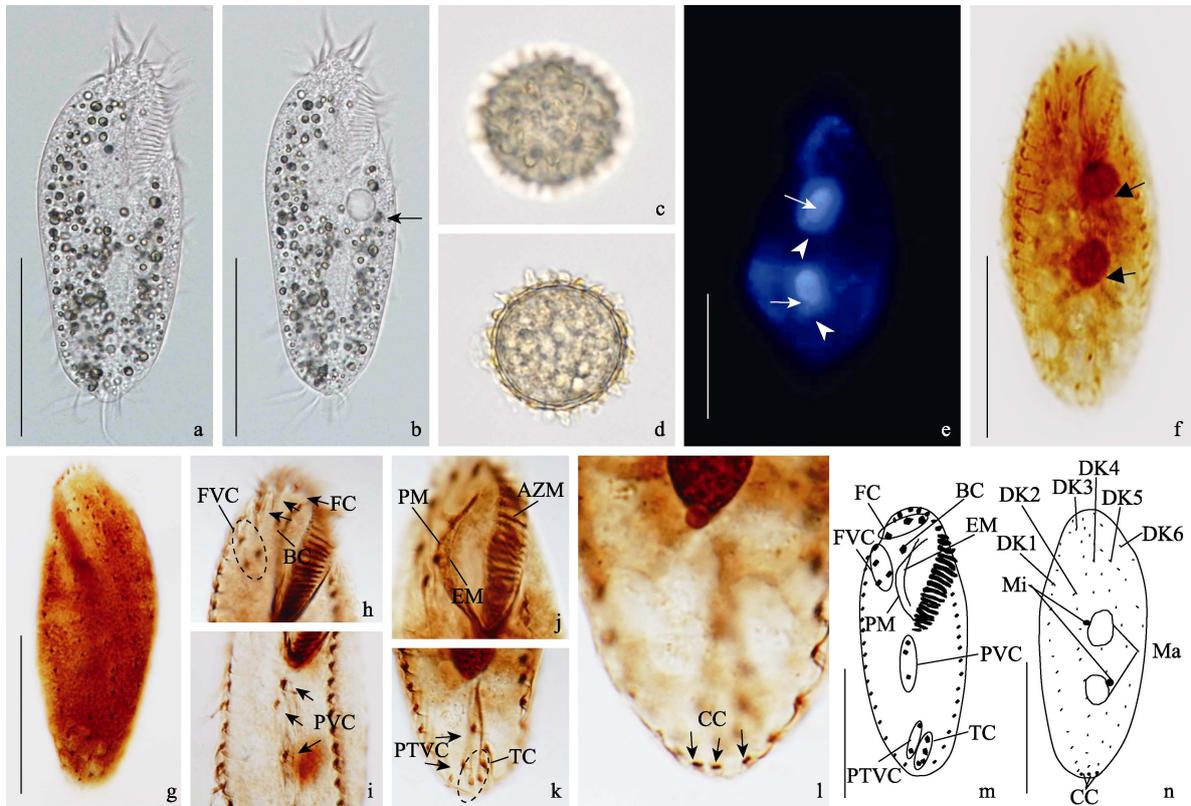


图 2 棘毛虫未定种的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Sterkiella* sp.

a, b. 典型个体腹面观, 箭头示伸缩泡; c, d. 包裹; e. 箭头示大核, 无尾箭头示小核; f. 纤毛图式腹面观, 箭头示大核; g. 纤毛图式背面观; h. 箭头示额棘毛; i. 口后腹棘毛; j. 口内膜与口侧膜; k. 箭头示横前棘毛; l. 箭头示尾棘毛; m. 纤毛图式腹面观; n. 纤毛图式背面观。标尺 = 50 μ m。

a and b. Ventral view a representative specimen, arrow show the contractile vacuole; c - d. Cyst; e. Arrows show the macronucleus, arrowheads indicate micronuclei; f. Ventral view of infraciliature, arrows show the macronucleus; g. Dorsal view of infraciliature; h. Arrows indicate frontal cirri; i. Postoral ventral cirri; j. Paroral membrane and endoral membrane; k. Pretransverse ventral cirri; l. Arrows indicate caudal cirri; m. Ventral view of infraciliature; n. Dorsal view of infraciliature. Bar = 50 μ m.

AZM. 口围小膜; BC. 口棘毛; CC. 尾棘毛; DK1 ~ DK6. 1 ~ 6 列背触毛列; EM. 口内膜; FC. 额棘毛; FVC. 额腹棘毛; Ma. 大核; Mi. 小核; PM. 口侧膜; PTVC. 横前棘毛; PVC. 口后腹棘毛; TC. 横棘毛

AZM. Adoralzone of membranelles; BC. Buccal cirri; CC. Caudal cirri; DK1 - DK6. Dorsal kineties 1 - 6; EM. Endoral membrane; FC. Frontal cirri; FVC. Frontoventral cirri; Ma. Macronuclear nodules; Mi. Micronuclear nodules; PM. Paroral membrane; PTVC. Pretransverse ventral cirri; PVC. Postoral ventral cirri; TC. Transverse cirri

析也显示, 鬃异源棘尾虫西藏种群的 SSU rDNA 序列与 GenBank 中的鬃异源棘尾虫 (KM222092) 聚为一枝 (ML 98/BI 0.99)。棘毛虫未定种的 SSU rDNA 序列 (*Sterkiella* sp., 序列号: OK465004), 长度为 1 697 bp, GC 含量为 44.96%, 与 GenBank 中棘毛虫 *Sterkiella* sp.

(KC404828) 及 *Sterkiella paratricirrata* (MN191544) 的序列较相似, 相似度分别为 99.76% 和 99.64%。系统发育分析结果也支持本研究中的棘毛虫西藏种群 SSU rDNA 序列与 *Sterkiella paratricirrata* (MN191544) 聚为一枝 (ML 40/BI 0.74)。殖口虫西藏种群的 SSU

rDNA 序列 (*Gonostomum* sp., 序列号: OK465005), 长度为 1 693 bp, GC 含量为 45.49%, 与 GenBank 中的库氏殖口虫 *Gonostomum kuehnelti* (MF445660 和 MW471095) 的两条序列相似度最高, 均为 97.61%。系统发育分析中与中国殖口虫 (*Gonostomum sinicum*, KY475614) 及另一殖口虫未知种 *Gonostomum* sp. (MG603605) 聚为一枝 (ML 59/BI 0.99)。

3 讨论

鬃异源棘尾虫由 Müller 于 1786 年第一次发现, 描述了其活体形态学特征, Wirnsberger 等于 1985 年进行了更详细的形态学特征的描述。鬃异源棘尾虫西藏种群与奥地利萨尔斯堡月亮湖种群, 国内的珠江种群 (Shao et al. 2013)、武汉东湖种群 (朱飞云等 2002) 以及

哈尔滨种群 (罗晓甜等 2016), 在活体形态和纤毛图式方面均一致。系统发育分析结果中, 鬃异源棘尾虫西藏种群 SSU rDNA 序列与 GenBank 中已有的鬃异源棘尾虫 SSU rDNA 序列 (KM222092) 聚为一枝 (ML 99/BI 1.00), 与 GenBank 中已有的异源棘尾虫未知种序列 (KP336401) 及鬃棘尾虫序列 (FM209297) 的相似度分别为 99.51%和 99.69%。系统发育分析与形态鉴定结果都支持本种为鬃异源棘尾虫。鬃异源棘尾虫最早在淡水环境发现 (Müller 1786), 此外在海洋 (Patterson 1989)、半咸水 (Shao et al. 2013) 中也均有记载, 本研究首次在西藏的苔藓生境发现, 体现出该种纤毛虫具有极强的环境适应性。

棘毛虫属目前包含 8 个物种, 仅本研究中的棘毛虫西藏种群与变藓棘毛虫 (*S. histriomuscorum*)、三毛棘毛虫 (*S. tricirrata*)

表 3 殖口虫未定种形态特征数据 (n = 10)

Table 3 Morphometric characterization of *Gonostomum* sp.

特征 Character	范围 Range	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数 (%) Coefficient of variation
体长 Body length (μm)	85 ~ 109	94 ± 7.9	0.08
体宽 Body width (μm)	28 ~ 42	33 ± 3.7	0.11
小核数目 Micronuclei number	2	2 ± 0.0	0.00
小核直径 Micronucleus diameter (μm)	2 ~ 3	2 ± 0.3	0.12
大核数目 Macronuclear nodules number	2	2 ± 0.0	0.00
大核长度 Macronuclear length (μm)	11 ~ 17	14 ± 1.6	0.11
大核宽度 Macronuclear width (μm)	5 ~ 8	6 ± 0.8	0.13
额棘毛数目 Frontal cirri number	3	3 ± 0.0	0.00
额腹棘毛数目 Frontoventral cirri number	11 ~ 15	12 ± 1.3	0.11
口棘毛数目 Buccal cirri number	1	1 ± 0.0	0.00
口围小膜数目 Adoral membranelles number	25 ~ 28	27 ± 1.0	0.04
额腹棘毛列 1 棘毛数量 Frontoventral row 1 cirri number	2 ~ 3	2 ± 0.5	0.20
额腹棘毛列 2 棘毛数量 Frontoventral row 2 cirri number	3 ~ 4	3 ± 0.5	0.14
额腹棘毛列 3 棘毛数量 Frontoventral row 3 cirri number	5 ~ 8	6 ± 0.8	0.12
横棘毛数目 Transverse cirri number	2	2 ± 0.0	0.00
尾棘毛数目 Caudal cirri number	3	3 ± 0.0	0.00
左缘棘毛数目 Left marginal cirri number	14 ~ 19	16 ± 1.4	0.08
右缘棘毛数目 Right marginal cirri number	27 ~ 31	28 ± 1.3	0.05
背触毛列数目 Dorsal kineties number	3	3 ± 0.0	0.00

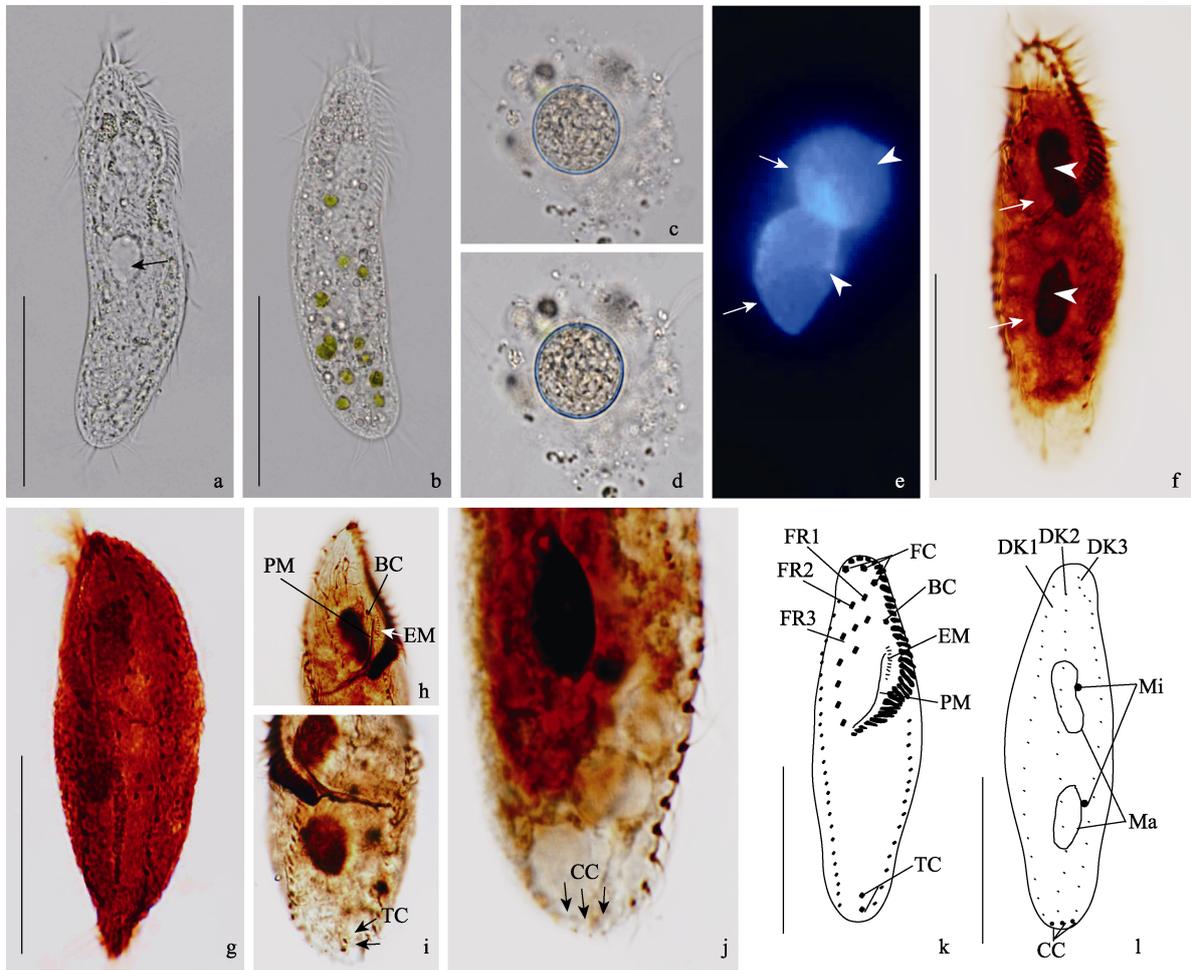


图 3 殖口虫未定种的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of *Gonostomum* sp.

a、b. 典型个体腹面观，箭头示伸缩泡；c、d. 包裹；e. 箭头示大核，无尾箭头示小核；f. 纤毛图式腹面观，箭头示大核，无尾箭头示小核；g. 纤毛图式背面观；h. 腹面棘毛，箭头示口内膜 EM；i. 箭头示横棘毛；j. 箭头示尾棘毛；k. 纤毛图式腹面观；l. 纤毛图式背面观。标尺 = 50 μm 。

a and b. Ventral view a representative specimen, arrow show the contractile vacuole; c and d. cyst; e. Arrows show the macronucleus, arrowheads indicate micronuclei; f. Ventral view of infraciliature, arrows show the macronucleus, arrowheads indicate micronuclei; g. Dorsal view of infraciliature; h. Ventral view of cirri, arrows indicate endoral membrane; i. Arrows indicate caudal cirri transverse cirri; j. Arrows indicate caudal cirri; k. Ventral view of infraciliature; l. Dorsal view of infraciliature. Bar = 50 μm .

BC. 口棘毛；CC. 尾棘毛；DK1 ~ DK3. 1 ~ 3 列背触毛列；EM. 口内膜；FC. 额棘毛；FR1 ~ FR3. 1 ~ 3 列腹部棘毛列；Ma. 大核；Mi. 小核；PM. 口侧膜；TC. 横棘毛

BC. Buccal cirri; CC. Caudal cirri; DK1 - DK3. Dorsal kineties 1 - 3; EM. Endoral membrane; FC. Frontal cirri; FR1 - FR3. Frontoventral row 1 - 3; Ma. Macronuclear nodules; Mi. Micronuclear nodules; PM. Paroral membrane; TC. Transverse cirri

及 *S. paratricirrata* 具有 2 个大核，可明确区别于同属其他种。棘毛虫西藏种群的活体形态、核器、纤毛图式特征与变藓棘毛虫相似，但是

包裹的形态明显不同，前者包裹表面有明显突起，后者包裹表面光滑无突起（张琦 2021）。棘毛虫西藏种群与三毛棘毛虫相比，前者左（14 ~

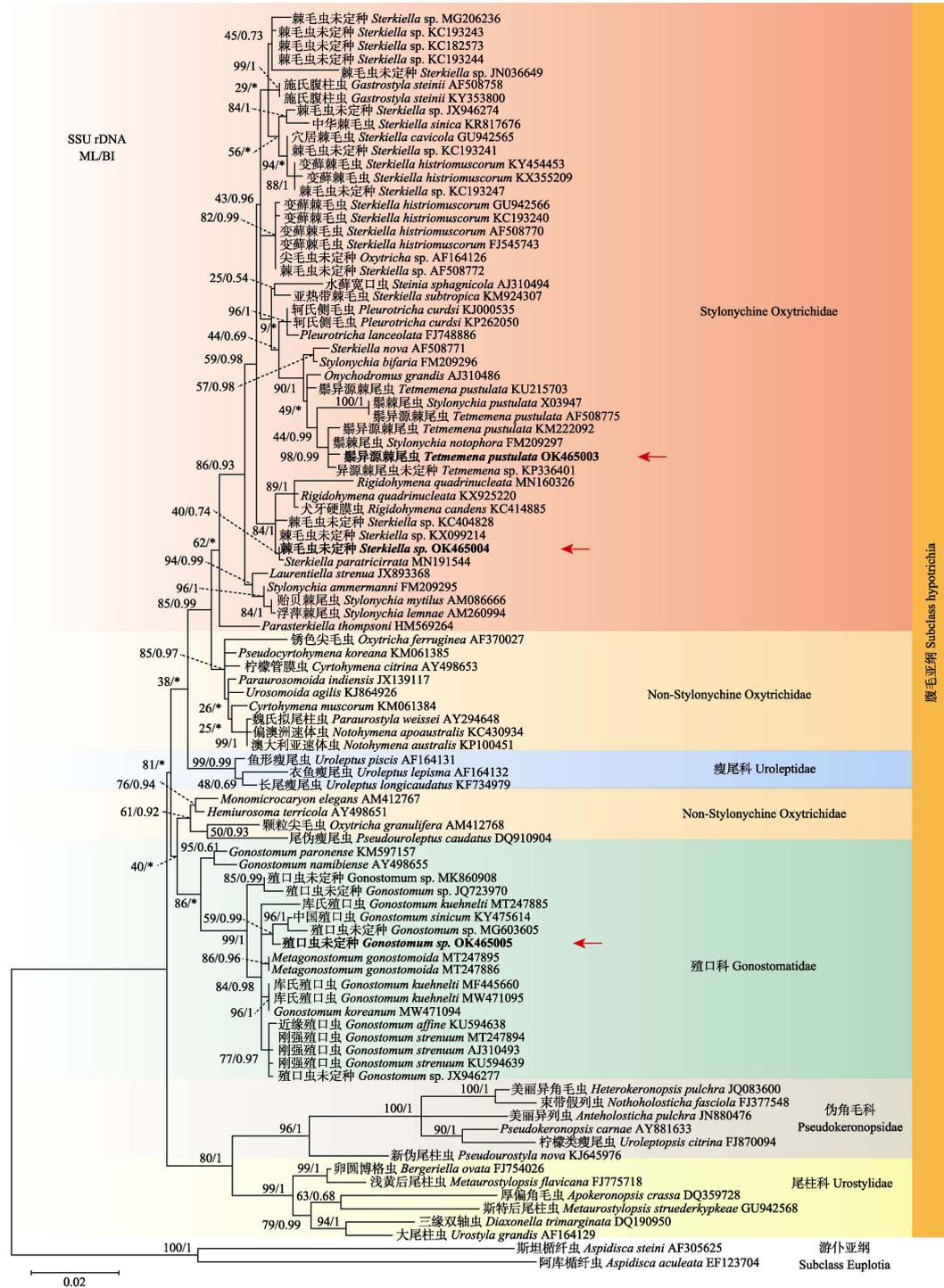


图 4 基于核糖体小亚基基因 (SSU rDNA) 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic 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 2 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 maximum likelihood and Bayesian inference (BI). The scale bar corresponds to 2 substitutions per 100 nucleotide positions.

18)、右(18~20)缘棘毛数量较多,而后者较少(10~13、11~13);此外,前者的背触毛列数目为6列,而后者为5列(Berger 1999)。系统发育分析结果中,棘毛虫属非单系,棘毛虫西藏种群与 *S. paratricirrata* (MN191544) 聚为一枝(ML 40/BI 0.74), SSU rDNA 序列相似度为 99.64%。但两者在形态上存在差异:棘毛虫西藏种群与 *Sterkiella paratricirrata* 小核数量不同(恒为 2 个 vs. 1~4 个),横棘毛数量也不同(4 vs. 3)(Wang et al. 2020)。棘毛虫属物种为常见陆生种类,在落叶林,苔藓及淡水湖泊中也有记录(Berger 2012)。棘毛虫未定种西藏种群首次在西藏苔藓生境中发现,体现出其一定的高原、低温适应性。

殖口虫属由 Engelmann 于 1862 年建立,目前包含 8 个物种(Berger 2012)。本研究中的殖口虫西藏种群符合殖口虫属的形态学特征,但与已知殖口虫种类具有明显的差异。与 *Gonostomum namibiense* 相比,殖口虫西藏种群虫体缺少一明显的短的尾巴(Berger 2012)。在大核的数量上,殖口虫西藏种群可明显区别于库氏殖口虫(*G. kuehneli*)和 *G. albicarpathicum* (2 vs. 15 vs. 4)。殖口虫西藏种群在口后腹面区域无棘毛,但 *G. gonostomoidum* 和 *G. terrestre* 均具有口后腹棘毛。殖口虫属的腹面棘毛列也是区别不同种的重要特征之一(Berger 2012)。在近缘殖口虫(*G. affine*)中,额腹棘毛区域只有 5 或 6 根棘毛形成斜行排列,而在 *G. algicola* 中额腹棘毛通常是区分为 4 根额腹棘毛和 3 根口后腹棘毛。刚强殖口虫(*G. strenuum*)的额腹棘毛列虽然也形成 3 列,但棘毛数量分别为 1、2 和 7 根,区别于殖口虫西藏种群的分别为 2 或 3 根、3 或 4 根和 5~8 根。此外刚强殖口虫腹面后端具有 4 或 5 根横棘毛,这一点也明显区别于殖口虫西藏种群(2 根横棘毛)。系统发育分析中,殖口虫西藏种群聚在殖口科内部,与中国殖口虫(*G. sinicum*, KY475614)及 *Gonostomum* sp. (MG603605) 聚为一枝, SSU rDNA 相似度分别为 99.15%和 98.79%。但殖口

虫西藏种群在形态上与中国殖口虫存在显著差异,殖口虫西藏种群的左缘棘毛列明显较少(14~19 vs. 18~27),且在口后区域并无棘毛,而中国殖口虫在口后区域有棘毛。殖口虫属的物种一般在土壤中比较常见(Berger 2012),也有少数淡水种类(Foissner et al. 2002)。殖口虫西藏种群形成包裹速度较快,说明该种对环境变化的响应较快,可能具有较强的抗逆性。

参 考 文 献

- Berger H. 1999. Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). Dordrecht: Springer, 1–1080.
- Berger H. 2012. Monograph of the Gonostomatidae and Kahliellidae (Ciliophora, Hypotricha). Austria: Springer, 58–164.
- Engelmann T W. 1862. Zur Naturgeschichte der Infusionsthiere. Leipzig: Engelmann, 1–47.
- Foissner W, Agatha S, Berger H. 2002. Soil Ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with Emphasis on Two Contrasting Environments, the Etosha Region and the Namib Desert. Austria: Linz, 1064–1459.
- Foissner W. 1996. Faunistics, taxonomy and ecology of moss and soil ciliates [Protozoa, Ciliophora] from Antarctica, with description of new species, including *Pleuroplitoides smithi* gen. n., sp. n. Acta Protozoologica, 35(2): 95–132.
- Foissner W. 2000. A compilation of soil and moss ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Germany, with new records and descriptions of new and insufficiently known species. European Journal of Protistology, 36(3): 253–283.
- Heger T J, Giesbrecht I J, Gustavsen J, et al. 2018. High - throughput environmental sequencing reveals high diversity of litter and moss associated protist communities along a gradient of drainage and tree productivity. Environmental Microbiology, 20(3): 1185–1203.
- Li Y. 1993. Response to disturbance of NPP and soil properties in a moss-shrub grassland on the Qilian Mt. Pratacultural Science, 2(1): 66–74.
- Lynn D. 2008. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature. England: Springer, 433–455.

- Medlin L, Elwood H J, Stickel S, et al. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2): 491–499.
- Mieczan T, Tarkowska-Kukuryk M. 2014. Ecology of moss dwelling ciliates from King George Island, Antarctic: the effect of environmental parameters. *Polish Polar Research*, 35(4): 609–625.
- Müller O F. 1786. *Animalcula Infusoria Fluviatilia et Marina: Quae Detexit. Denmark: Haunia, 1744–1822.*
- Patterson D. 1989. The ecology of heterotrophic flagellates and ciliates living in marine sediments. *Progress in Protistology*, 3(1): 185–277.
- Shao C, Pan X, Jiang J, et al. 2013. A redescription of the oxytrichid *Tetmemena pustulata* (Müller, 1786) Eigner, 1999 and notes on morphogenesis in the marine urostyleid *Metaurostyleopsis salina* Lei et al., 2005 (Ciliophora, Hypotrichia). *European Journal of Protistology*, 49(2): 272–282.
- Shi X, Qiu Z, Lu L, et al. 1990. Morphology and development of left - handed singlets derived from mirror - image doublets of *Stylonychia mytilus*. *The Journal of Protozoology*, 37(1): 14–19.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Wang J, Lyu Z, Shao C. 2020. Morphology, morphogenesis and molecular phylogeny of the new soil ciliate *Sterkiella paratricirrata* n. sp. (Ciliophora, Hypotrichia, Oxytrichidae). *Journal of Natural History*, 54(37/38): 2471–2488.
- Wirnsberger E, Foissner W, Adam H. 1985. Morphological, biometric, and morphogenetic comparison of two closely related species, *Stylonychia vorax* and *S. pustulata* (Ciliophora: Oxytrichidae). *The Journal of Protozoology*, 32(2): 261–268.
- Yao T, Thompson L G, Mosbrugger V, et al. 2012. Third pole environment (TPE). *Environmental Development*, 3(1): 52–64.
- 罗晓甜, 李俐琼, 马洪钢, 等. 2016. 鬃异源棘尾虫的形态学及细胞发生学研究. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 46(11): 83–85.
- 张琦. 2021. 十种土壤腹毛类纤毛虫的分类研究. 河北: 河北大学硕士学位论文, 33–35.
- 中国珠穆朗玛峰登山队科学考察队. 1962. 珠穆朗玛峰地区科学考察报告. 北京: 科学出版社, 145–172.
- 朱飞云, 余育和, 沈韞芬. 2002. 下毛目分子系统进化研究和鬃棘尾虫再描述(纤毛动物门:下毛目:尖毛虫科). *动物分类学报*, 27(1): 24–32.