

# 基于 18S rDNA 与 ITS-5.8S rDNA 对重庆地区网状车轮虫的种内分化研究

王诗瑶 赵元君 唐发辉\*

重庆师范大学生命科学学院 动物生物学重庆市重点实验室 重庆 401331

**摘要:** 本研究基于形态和分子数据对采自重庆地区 5 个地理株系的网状车轮虫 (*Trichodina reticulata*) 进行了比较研究及重描述。研究结果表明,网状车轮虫不同株系表现出不同的表型分化,含形态略有不同的齿体及有或无中央颗粒,因而具有明显的种内形态多样性。不同地理株系网状车轮虫的 18S rDNA 序列相似度在 99.0% ~ 100% 之间,遗传距离为 0.000 ~ 0.008,并在三大变异区 (V4、V5 与 V7) 均具一致的二级结构,表明不同株系的 18S rDNA 相似度与遗传距离均属种内水平。综合 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 的变异位点和系统发育对种内分歧的研究分析显示,来自不同地理分布和宿主的网状车轮虫株系皆因相同的变异位点而聚为一枝,以此推断网状车轮虫的种内分化主要受其基因的影响,地理分布与宿主差异等环境影响在目前的种群分化阶段暂未突显。此外,本研究进一步验证了中央颗粒不能作为网状车轮虫的主要鉴别性特征的观点。

**关键词:** 网状车轮虫; 种内分化; 18S rDNA; ITS-5.8S rDNA

**中图分类号:** Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 01-077-13

## Study on Intraspecific Differentiation of *Trichodina reticulata* from Chongqing Based on 18S rDNA and ITS-5.8S rDNA

WANG Shi-Yao ZHAO Yuan-Jun TANG Fa-Hui\*

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

**Abstract:** Based on the comparative morphological and molecular characteristics of five strains of *Trichodina reticulata*, redescription of this species was conducted in the present study (Fig. 1 - 3, Table 2). The results indicated that these five strains showed different phenotype differentiation patterns including different denticle morphologies and the presence or absence of central granules, thus this species has dominant intraspecific morphological diversity. However, the sequence similarity and genetic distance among the five strains of *T. reticulata* were 99.0% - 100% and 0.000 - 0.008, respectively, and their major variation areas (V4, V5 and V7)

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31672280), 重庆市自然科学基金项目 (No. cstc2018jcyjAX0808), 重庆市教委科学技术研究项目 (No. KJQN201800508);

\* 通讯作者, E-mail: trichodina@126.com;

**第一作者简介** 王诗瑶, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类寄生虫学; E-mail: 954810886@qq.com。

收稿日期: 2019-07-30, 修回日期: 2019-11-29 DOI: 10.13859/j.cjz.202001010

of 18S rDNA possessed a consistent secondary structure (Fig. 6, 7), which suggests that genetic distances among these different strains are within the intraspecific level. Furthermore, the analysis of intra-species divergence on the basis of 18S rDNA and ITS-5.8S rDNA variation site and phylogenetic tree (Bayesian inference, BI tree and maximum likelihood, ML tree) showed that these strains of *T. reticulata* with different geographical distributions and hosts were clustered into one clade mainly due to the same mutation site (Fig. 4, 5 and 8, 9), suggesting that the intraspecific differentiation for *T. reticulata* probably is mainly influenced by their genes, rather than the environmental factors including geographic distribution and host type. Besides, the present study confirmed that central granules should not be the main characteristics for species identification in *T. reticulata*.

**Key words:** *Trichodina reticulata*; Intraspecies differentiation; 18S rDNA; ITS-5.8S rDNA

重庆地区淡水养殖业发达,主要经济鱼类、贝类、两栖类受车轮虫感染的现象屡见不鲜,调查发现淡水鱼类的感染率最高(陶燕飞等 2008, 齐欢等 2011),当其大量感染车轮虫时会导致寄生部位出现机械性损伤,严重时导致鱼苗死亡(唐发辉等 2007, 李进等 2014)。迄今,国内外已报道的车轮虫约 400 种(van As et al. 1992, Mitra et al. 2013, Tang et al. 2013, Wang et al. 2017),其中网状车轮虫(*Trichodina reticulata*)为车轮虫属中常见的淡水物种之一。网状车轮虫在国内外不同地区,如北美、欧亚大陆、以色列、南非、中国及前苏联都有发现,并且广泛寄生于世界各地的鲤科鱼类,且部分鲈形目鱼类及两栖类蝌蚪也有相关该虫种的报道(Kazubski 1988, 赵元著 2013),属于一类较为常见的淡水广布种。由于分布地区及宿主的广泛性,不同的网状车轮虫种群在国内外被接连报道,但各类研究均未对网状车轮虫的种内分化的各种影响因素(如基因变异、宿主、生境等)进行探讨。尤其是近年来的相关研究提出了网状车轮虫的中央颗粒是否可以作为种类鉴别的主要特征的观点(Wang et al. 2019),也有待进一步的证据证实或验证。本研究基于上述研究背景,结合形态学与分子证据(18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA)对重庆地区网状车轮虫的种内分化进行深入探讨,以期网状车轮虫的分类学与系统进化提供可参考的基础性研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本的采集与鉴定

宿主鱼于 2018 年 10 月至 2019 年 5 月分别采自重庆北碚区(29°48' N, 106°39' E, 20 尾)、沙坪坝区廖家坪(29°52' N, 106°44' E, 10 尾)以及沙坪坝区回龙坝(29°42' N, 106°33' E, 10 尾)养殖鱼塘或自然水体,以上三处采集地所获得的网状车轮虫样本分别命名为 *Trichodina reticulata* (B)、*Trichodina reticulata* (L) 和 *Trichodina reticulata* (H)。将所有宿主鱼带回实验室,解剖并进行鳃涂片,车轮虫的活体观察在体视显微镜(NIKON SMZ1500)下进行。自然空干的鳃涂片用 Klein (1958) 干银法染色,采用 LEICA DM6000B 显微镜(1 000×)对银染标本进行显微观察和拍照。形态学数据的统计模式依据 Lom (1958) 提出的“统一特定方法”进行。利用 Pass3 软件对车轮虫的主要形态统计学数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。采用电脑软件 CorelDRAW 11.0 绘制齿体定位图,齿体的定位描述则根据修订的齿体定位法进行(唐发辉等 2005)。

### 1.2 DNA 提取、扩增和测序

使用玻璃微量移液管分离单只活体网状车轮虫,置于 1.5 ml EP 管中用无菌水洗涤数次,按照 REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma, St. Louis MO) 试剂盒说明书提取样

本 DNA, 保存于 -20 °C 备用。本研究 18S rDNA 序列的扩增引物为: 正向引物 82F (5'-GAA ACT GCG AAT GGC TC-3'), 反向引物 LSUR (5'-GTT AGT TTC TTT TCC TCC GC-3') (Utz et al. 2007)。PCR 反应体系为: 94 °C 预变性 1 min, 56 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 2 min, 进行 5 个循环; 然后 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。ITS-5.8S rDNA 扩增引物为: 正向引物 ERIB10-V (5'-CCG TAG GTG AAC CTG CGG AAG-3') 和反向引物 28S1R (5'-GTG TTT CAA GAC GGG TCG-3') (Wang et al. 2019)。PCR 反应体系为: 94 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 进行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 于 Gel Doc XR 凝胶成像系统中检测条带。切胶后按照 Gel Extraction Kit (150) 试剂盒进行纯化, 测序工作由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司的测序仪完成。本研究所测定网状车轮虫 3 株系的 18S rDNA 与 ITS-5.8S rDNA 序列提交于 GenBank (表 1)。

### 1.3 18S rDNA 的一级和二级结构分析

使用 GenBank 中 BLAST 进行序列同源性比对, 通过 MEGA6.0 (K-2-P 模型) 计算遗传距离, 采用 BioEdit7.0.5.3 进行变异位点分析。基于最小自由能模型, 利用 RNA Structure5.2 进行 RNA 二级结构的预测, 并使用 RNAViz2.0 进行调整 (Zhang et al. 2015)。

### 1.4 系统发育树的构建

将本研究新获得的 12 条 18S rDNA 序列, 以及在 GenBank 中选择寡膜纲中 63 条完整或部分的 18S rDNA 序列, 共 75 条序列, 以毛板壳虫 (*Coleps hirtus*, AM292311) 和肾形虫 (*Colpoda magna*, EU039896) 18S rDNA 序列为外群, 构建基于 18S rDNA 的系统发育树。同样, 在 GenBank 中选择 7 条完整或部分 ITS-5.8S rDNA 序列, 以及新获得的 12 条 ITS-5.8S rDNA 序列, 以拟微小车轮虫 (*Trichodina*

表 1 本研究网状车轮虫 3 株系 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列登录号

Table 1 Molecular sequence accession number of 18S rDNA and ITS-5.8S rDNA of three strains of *Trichodina reticulata*

株系 Strain	个体 Individual	登录号 Accession number	
		18S rDNA	ITS-5.8S rDNA
网状车轮虫 (B) <i>Trichodina reticulata</i> (B)	B1	MN224639	MN217550
	B2	MN224640	MN217551
	B3	MN224641	MN217552
	B4	MN224642	MN217553
	B5	MN224643	MN217554
	B6	MN224644	MN217555
	B7	MN224645	MN217556
	B8	MN224646	MN217557
网状车轮虫 (L) <i>Trichodina reticulata</i> (L)	L1	MN224647	MN217558
	L2	MN224648	MN217559
	L3	MN224649	MN217560
网状车轮虫 (H) <i>Trichodina reticulata</i> (H)	H	MN224650	MN217561

*pseudominuta*, HQ407392) 为外群, 构建基于 ITS-5.8S rDNA 的系统发育树。在 MrBayes3.1.2 软件中使用 GTR + I + G 模型构建贝叶斯树 (Bayesian inference, BI), 利用在线软件 CIPRES Science Gateway V. 3.1 构建最大似然树 (maximum likelihood, ML) (Wang et al. 2015)。利用 FigTreev1.4.2 软件查看系统树, 并在 Photoshop CS3 软件中完成系统树的绘制。

## 2 结果

### 2.1 网状车轮虫的形态学描述

本研究获得网状车轮虫 B、L 和 H 共 3 株系 (图 1, 表 2)。

#### 2.1.1 网状车轮虫 *Trichodina reticulata* (B) 株系

采集地: 重庆市北碚区

采集时间: 2018 年 10 月

宿主及寄生部位: 鲫 (*Carassius auratus*) 的鳃表



图 1 网状车轮虫附着盘显微结构图

Fig. 1 Photomicrographs of adhesive disc of *Trichodina reticulata*

a, b. *T. reticulata* (B) 株系 (采自鲫, 本研究); c. *T. reticulata* (L) 株系 (采自鲫, 本研究); d. *T. reticulata* (H) 株系 (采自鲤, 本研究); e. *T. reticulata* (W) 株系 (采自草鱼, Wang et al. 2019); f. *T. reticulata* (S) 株系 (采自鲫, Wang et al. 2019); 标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ; 图中箭头指示中央颗粒。

a, b. *T. reticulata* (B) (from *Carassius auratus*, present work); c. *T. reticulata* (L) (from *Carassius auratus*, present work); d. *T. reticulata* (H) (from *Cyprinus carpio*, present work); e. *T. reticulata* (W) (from *Ctenopharyngodon idellus*, Wang et al. 2019); f. *T. reticulata* (S) (from *Carassius auratus*, Wang et al. 2019). Bar = 20  $\mu\text{m}$ ; Arrows point the granules number.

形态学描述 (测量标本数  $n = 15$ ): 大型车轮虫, 附着盘比较清晰 (图 1a, b), 与已经报道的 *T. reticulata* (W) 株系 (图 1e, 2e, 表 2)、*T. reticulata* (S) 株系 (图 1f, 2f, 表 2) (Wang et al. 2019) 和本研究的其余两个株系相比, 本株系具有明显的中央颗粒, 且中央颗粒形状更为规则, 排布更加紧密, 部分虫体中央颗粒相对疏松地排列于附着盘中央。具略呈长方形齿钩, 齿棘略短而粗壮, 少部分样本中齿棘相对较细, 且部分虫体存在棘突 (图 2a, b)。口围绕度略小, 其余形态统计学数据及齿体特征与上述 4 株系描述一致 (表 2)。

### 2.1.2 网状车轮虫 *Trichodina reticulata* (L) 株系

采集地: 重庆市沙坪坝区廖家坪

采集时间: 2018 年 12 月

宿主及寄生部位: 鲫的鳃表

形态学描述 (测量标本数  $n = 15$ ): 大型车轮虫 (表 2), 附着盘相对清楚 (图 1c)。与已经报道的 *T. reticulata* (W) 株系、*T. reticulata* (S) 株系 (Wang et al. 2019) 和本研究的其余两个株系相比, 本株系齿钩宽呈棒槌状, 齿钩外切缘平滑, 几乎与缘膜平行, 齿钩前缘直且光滑 (图 2c)。部分齿体中存在齿锥顶点。与已报道的 *T. reticulata* (W) 株系相比本株系齿棘更短且粗壮。

### 2.1.3 网状车轮虫 *Trichodina reticulata* (H) 株系

采集地: 重庆市沙坪坝区回龙坝

采集时间: 2019 年 5 月

表 2 网状车轮虫 5 株系形态学特征

Table 2 Biometrical data of five strains of *Trichodina reticulata*

	网状车轮虫 (B) <i>T. reticulata</i> (B)	网状车轮虫 (L) <i>T. reticulata</i> (L)	网状车轮虫 (H) <i>T. reticulata</i> (H)	网状车轮虫 (W) <i>T. reticulata</i> (W)	网状车轮虫 (S) <i>T. reticulata</i> (S)
宿主 Host	鲫 <i>Carassius auratus</i>	鲫 <i>C. auratus</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鲫 <i>C. auratus</i>
采集地点 Localization	重庆北碚区 Chongqing Beibei	重庆沙坪坝区 (廖家坪) Chongqing Shapingba (Liaojiaping)	重庆沙坪坝区 (回龙坝) Chongqing Shapingba (Huilongba)	重庆江津区 Chongqing Jiangjin	重庆沙坪坝区 Chongqing Shapingba
寄生部位 Location	鳃 Gill	鳃 Gill	鳃 Gill	鳃 Gill	鳃 Gill
虫体直径 ( $\mu\text{m}$ ) Body diameter	51.9 - 67.6 (59.7 $\pm$ 7.9)	52.4 - 67.7 (60.0 $\pm$ 7.6)	59.2 - 72.1 (65.6 $\pm$ 4.3)	41.0 - 49.2 (44.4 $\pm$ 2.6)	51.9 - 69.3 (61.2 $\pm$ 4.9)
附着盘直径 ( $\mu\text{m}$ ) Adhesive disc	43.9 - 59.0 (51.4 $\pm$ 7.5)	44.2 - 63.4 (53.8 $\pm$ 9.6)	45.6 - 61.6 (53.5 $\pm$ 5.4)	32.9 - 40.8 (36.2 $\pm$ 2.3)	46.0 - 59.6 (52.6 $\pm$ 4.4)
齿环直径 ( $\mu\text{m}$ ) Denticular ring	28.6 - 38.4 (33.5 $\pm$ 4.9)	28.2 - 38.9 (33.6 $\pm$ 5.3)	25.3 - 34.7 (30.0 $\pm$ 3.0)	21.0 - 25.2 (22.5 $\pm$ 1.6)	27.9 - 35.0 (32.9 $\pm$ 2.7)
缘膜宽 ( $\mu\text{m}$ ) Border membrane	4.0 - 6.7 (5.4 $\pm$ 1.4)	3.9 - 5.9 (4.9 $\pm$ 1.0)	4.6 - 5.6 (5.1 $\pm$ 0.5)	3.2 - 4.9 (4.0 $\pm$ 0.6)	4.0 - 6.2 (5.0 $\pm$ 0.6)
齿体纵长 ( $\mu\text{m}$ ) Denticle span	13.3 - 18.4 (15.8 $\pm$ 2.6)	12.1 - 16.1 (14.1 $\pm$ 2.0)	13.4 - 19.8 (16.6 $\pm$ 1.9)	11.0 - 13.6 (12.0 $\pm$ 0.8)	12.2 - 17.8 (15.2 $\pm$ 1.4)
齿长 ( $\mu\text{m}$ ) Denticle length	4.5 - 8.6 (6.5 $\pm$ 2.1)	4.0 - 8.7 (6.4 $\pm$ 2.4)	5.6 - 9.2 (6.9 $\pm$ 1.3)	4.0 - 5.8 (5.1 $\pm$ 0.5)	5.1 - 7.4 (6.2 $\pm$ 0.7)
齿钩长 ( $\mu\text{m}$ ) Blade length	5.0 - 8.2 (6.6 $\pm$ 1.6)	4.0 - 7.8 (5.9 $\pm$ 1.9)	6.3 - 8.3 (7.3 $\pm$ 0.7)	4.5 - 6.3 (4.8 $\pm$ 0.5)	5.9 - 4 (6.7 $\pm$ 0.5)
齿锥宽 ( $\mu\text{m}$ ) Central part width	1.6 - 3.1 (2.4 $\pm$ 0.7)	1.8 - 2.8 (2.3 $\pm$ 0.5)	2.2 - 3.4 (2.8 $\pm$ 0.3)	1.1 - 2.0 (1.5 $\pm$ 0.3)	1.2 - 2.6 (1.9 $\pm$ 0.4)
齿棘长 ( $\mu\text{m}$ ) Ray length	4.8 - 6.8 (5.8 $\pm$ 1.0)	4.0 - 7.5 (5.8 $\pm$ 1.7)	4.3 - 6.3 (5.3 $\pm$ 0.7)	5.1 - 6.0 (5.8 $\pm$ 0.4)	4.6 - 7.7 (6.4 $\pm$ 0.9)
齿体数 Denticle number	24 - 28 (13)	24 - 28 (13)	21 - 24 (6)	22 - 26 (13)	26 - 29 (14)
辐线数 Radial pins perdenticle	5 - 8 (12)	6 - 9 (6)	—	—	—
中央颗粒数 Granules number	10 - 15	8 - 13	—	—	8 - 14
口围绕度 ( $^{\circ}$ ) Adoral ciliary spiral	384	415	—	—	400
资料来源 Source	本研究 Present work			Wang et al. 2019	

统计模式: 最小值 - 最大值 (平均值  $\pm$  标准差); —: 无描述或无数据。

Statistic mode: Min - Max (Mean  $\pm$  SD); —: No description or data.

宿主及寄生部位: 鲤 (*Cyprinus carpio*) 的鳃表

形态学描述 (测量标本数  $n = 14$ ): 大型车轮虫, 附着盘相对清楚 (图 1d)。本株系无中央颗粒。与已经报道的 *T. reticulata* (W) 株系、*T. reticulata* (S) 株系 (Wang et al. 2019) 和本研究的其余两个株系相比, 本株系齿体数略少, 齿钩呈棒槌状, 部分齿体存在棘突, 齿棘顶点

钝圆, 齿棘较短而细 (图 2d)。其余形态统计学数据及齿体特征与上述 4 株系描述一致 (表 2)。

## 2.2 基于主成分分析比较网状车轮虫的株系形态

利用 Past3 软件对网状车轮虫的 *T. reticulata* (B)、*T. reticulata* (L)、*T. reticulata* (H) 以及 *T. reticulata* (W) 和 *T. reticulata* (S) (Wang et al. 2019) 5 个株系进行主成分分析,

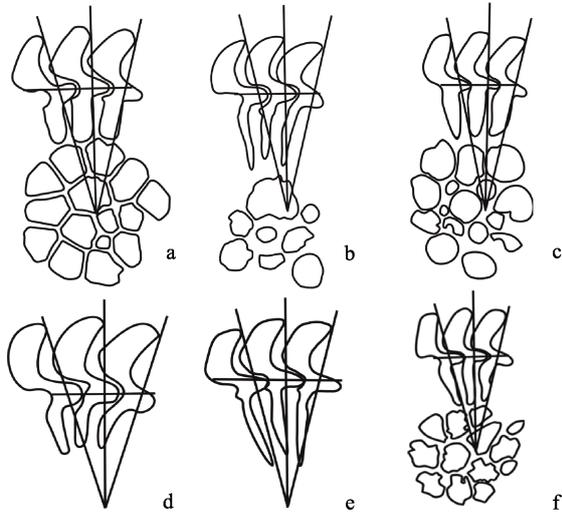


图2 网状车轮虫的齿体定位图

Fig. 2 Diagrammatic drawing of denticles of *Trichodina reticulata*

a, b. *T. reticulata* (B) 株系 (本研究); c. *T. reticulata* (L) 株系 (本研究); d. *T. reticulata* (H) 株系 (本研究); e. *T. reticulata* (W) 株系 (Wang et al. 2019); f. *T. reticulata* (S) 株系 (Wang et al. 2019)。

a, b. *T. reticulata* (B) (present work); c. *T. reticulata* (L) (present work); d. *T. reticulata* (H) (present work); e. *T. reticulata* (W) (from Wang et al. 2019); f. *T. reticulata* (S) (from Wang et al. 2019).

*T. reticulata*(B)、*T. reticulata*(L) 和 *T. reticulata* (S) 3 个株系在虫体直径、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量 9 项形态特征上高度重叠, 而 *T. reticulata* (W) 与 *T. reticulata* (H) 株系的形态特征明显区别于上述 3 个株系, 且 *T. reticulata* (W) 株系与 *T. reticulata* (H) 株系互不重叠 (图 3)。

### 2.3 网状车轮虫的分子特征

#### 2.3.1 网状车轮虫 18S rDNA 相似度和遗传距离

将本研究新获得的 *T. reticulata* (B) 株系、*T. reticulata* (L) 株系、*T. reticulata* (H) 株系的 18S rDNA 序列在 GenBank 中经 BLAST 比对, 均与美国国立生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 中现有的网状车轮虫 *T. reticulata* (AY741784) (Gong et al. 2006) 最相似 (相似度不低于 99.0%)。以上 3 个株系间的序列相似度在 99.0%~100% 之间, 遗传距离为 0.000~0.003。3 个株系与 *T. reticulata* (W) 株系、*T. reticulata* (S) 株系的 18S rDNA 序列相似度均在 99.0%~100% 之间, 遗传距离为 0.000~0.008。

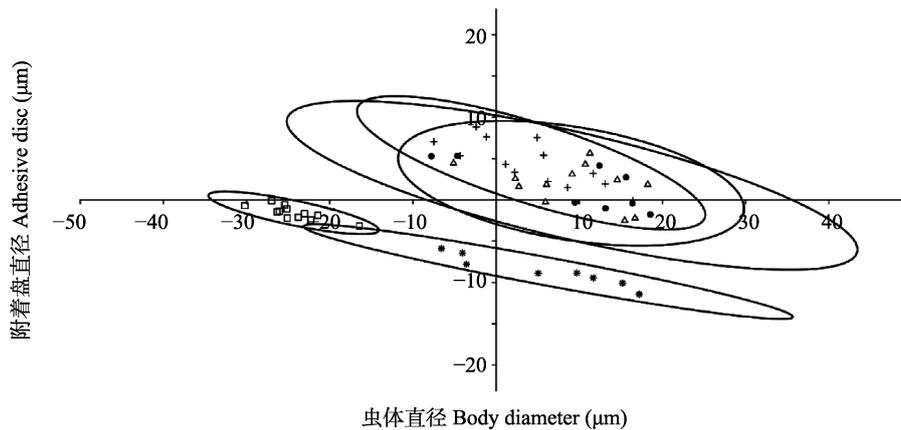


图3 网状车轮虫 5 株系的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of five strains of *Trichodina reticulata*

+ *T. reticulata* (B) • *T. reticulata* (L) ◻ *T. reticulata* (H) ◻ *T. reticulata* (W) △ *T. reticulata* (S)

椭圆线圈表示 5 大株系利用各主成分生成的散点分布范围, 坐标轴负值表示处于均值以下。

The elliptical coil indicates the range of scatter distribution generated by the five strains using each principal component, negative axis value means below the mean.

### 2.3.2 18S rDNA 和 ITS-5.8S 一级结构变异位点分析

将本研究新增的 3 个株系 *T. reticulata* (B)、*T. reticulata* (L) 和 *T. reticulata* (H) 与 *T. reticulata* (W)、*T. reticulata* (S) 株系进行 18S rDNA 变异位点分析, 以 *T. reticulata* AY741784 为参考标准, 5 个株系的 18S rDNA 序列产生变异的位点共有 11 个, 包括 8 个转换位点和 3 个颠换位点。其中, *T. reticulata* (W) 株系与 *T. reticulata* AY741784 相比在第 21 位、第 461 位、第 468 位、第 488 位、第 497 位、第 509 位、第 1469 位、第 1472 位发生变异。其余 4 株系 18S rDNA 序列主要变异位点在第 847 位 (C 转换为 T) 和第 851 位 (C 颠换为 A 或由 C 转换为 T) (图 4)。

对 5 株系的 ITS-5.8S rDNA 变异位点分析, *T. reticulata* (S1)、*T. reticulata* (B5)、*T. reticulata* (L3) 与 *T. reticulata* (H) 发生的变异位点最少 (6 个); *T. reticulata* (B2)、*T. reticulata* (B4)、*T. reticulata* (B8)、*T. reticulata* (L1)、*T. reticulata* (B7) 与 *T. reticulata* (H) 具有 17 个变异位点;

*T. reticulata* (S1)、*T. reticulata* (S2)、*T. reticulata* (B5)、*T. reticulata* (L2)、*T. reticulata* (L3) 与 *T. reticulata* (H) 则具有 19 个变异位点 (图 5)。

**2.3.3 18S rRNA 二级结构** 为进一步研究 5 个株系间的种内分化, 对 18S rRNA 二级结构三个高变区 (V4 区、V5 区、V7 区) 进行比较, 5 个株系在 V4 区、V5 区具有相同的二级结构构型, 仅在一级序列上存在碱基差异; 而在 V7 区, 所有株系均具有一致的二级结构构型, 且在一级序列上无碱基差异 (图 6, 7)。

**2.3.4 基于 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 的系统发育研究** 本研究基于 18S rDNA 所构建的贝叶斯 (BI) 树和最大似然 (ML) 树呈现出相同的拓扑结构, 本文只显示一颗以 BI 树为主干的系统发育树 (图 8)。网状车轮虫的 5 个株系均位于车轮虫科的进化枝中, 且分为三个枝, 即支系 a、支系 b、支系 c。支系 a 与支系 b 先聚枝, 再与支系 c 形成姐妹枝。基于 ITS-5.8S rDNA 所构建的 BI 树显示, 5 个地理株系的网

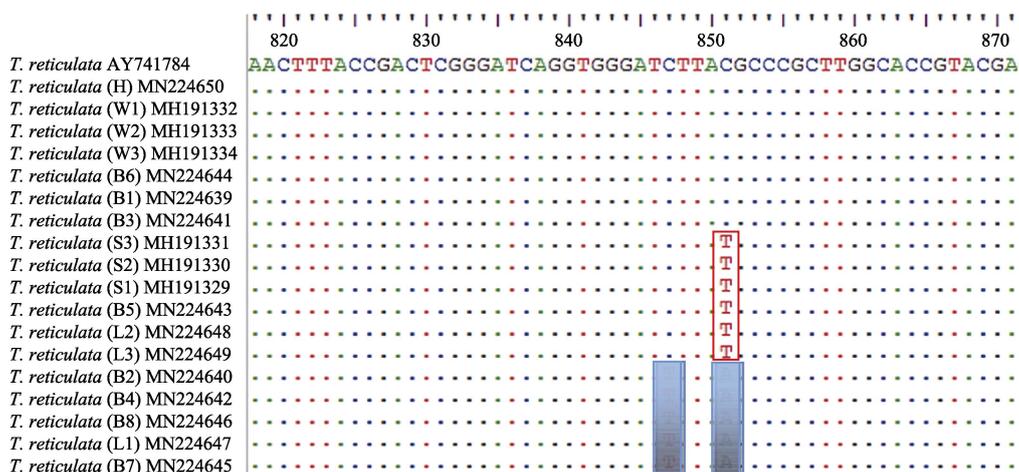


图 4 网状车轮虫 5 株系 18S rDNA 序列变异位点比较

Fig. 4 The comparison of variation sites among five strains of *Trichodina reticulata* based on 18S rDNA sequence

与 *T. reticulata* AY741784 (Gong et al. 2006) 序列相比, 红色长方形表示 *T. reticulata* (S1)、(S2)、(S3)、(B5)、(L2)、(L3) 的变异位点, 蓝色阴影表示 *T. reticulata* (B2)、(B4)、(B8)、(L1)、(B7) 的变异位点。

The sequence difference in *T. reticulata* AY741784 (Gong et al. 2006), *T. reticulata* (S1), (S2), (S3), (B5), (L2) and (L3) are marked by red rectangle; the distinct sequence sites in *T. reticulata* AY741784 (Gong et al. 2006), *T. reticulata* (B2), (B4), (B8), (L1), and (B7) are blue shaded.

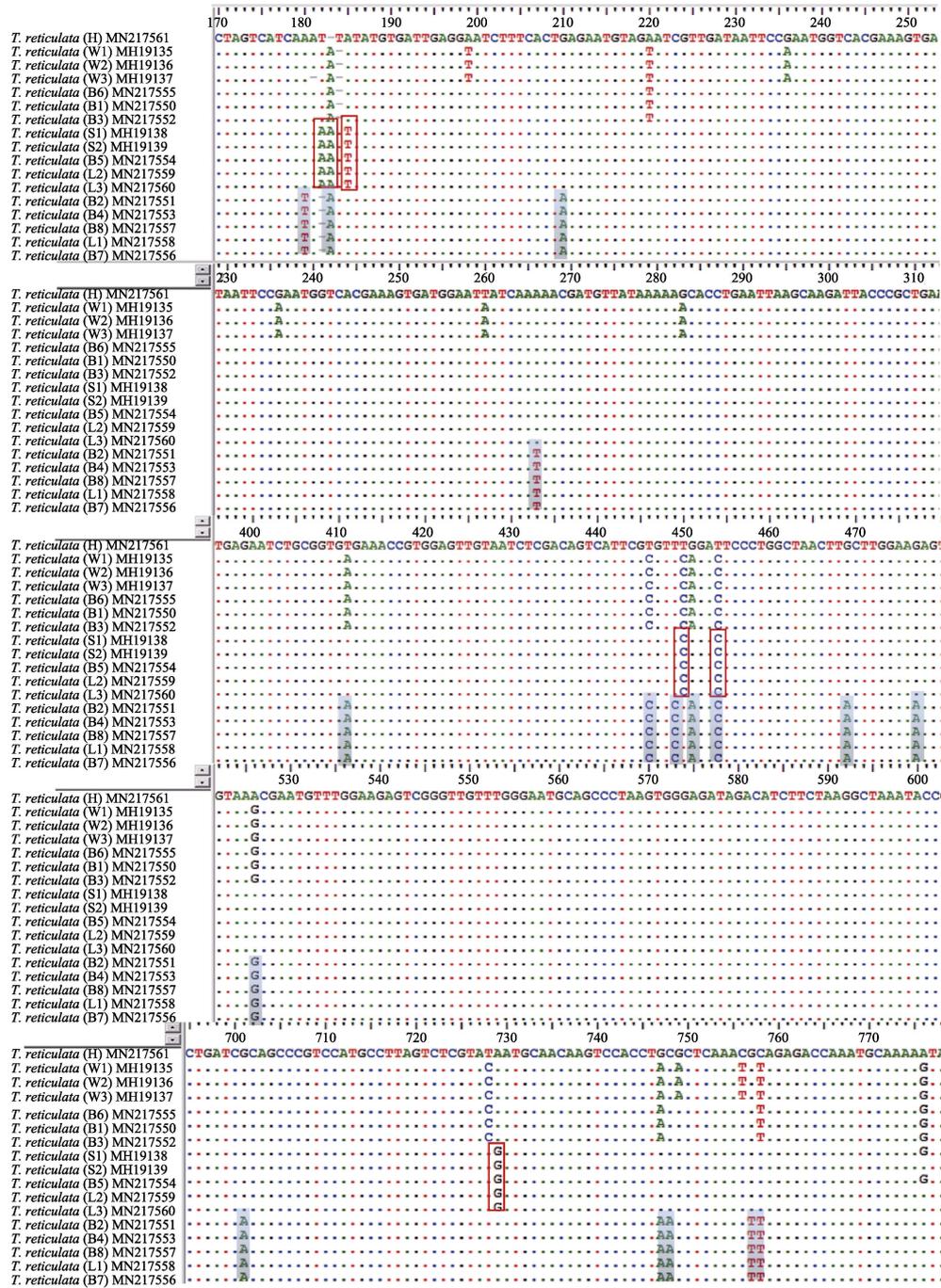


图 5 网状车轮虫 5 株系 ITS-5.8S rDNA 序列变异位点比较

Fig. 5 The comparison of variation sites among five strains of *Trichodina reticulata* based on ITS-5.8S rDNA sequence

红色长方形表示 *T. reticulata* (S1)、(S2)、(B5)、(L2)、(L3) 与 *T. reticulata* (H) 的变异位点；蓝色阴影表示 *T. reticulata* (B2)、(B4)、(B8)、(L1)、(B7) 与 *T. reticulata* (H) 的变异位点。

The sequence difference in *T. reticulata* (H), *T. reticulata* (S1), (S2), (B5), (L2) and (L3) are marked by red rectangle; the distinct sequence sites in *T. reticulata* (H), *T. reticulata* (B2), (B4), (B8), (L1), and (B7) are blue shaded.

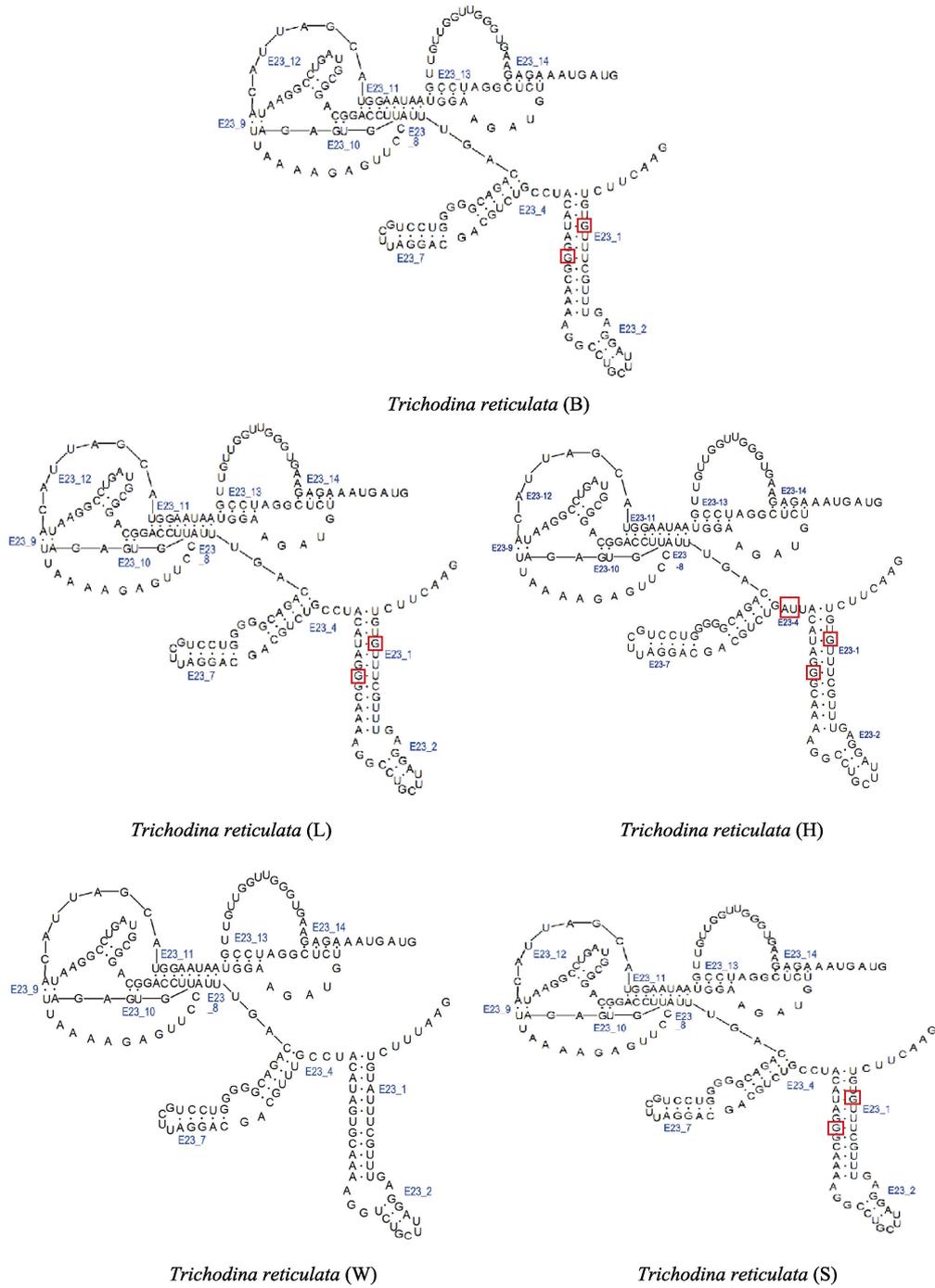


图 6 网状车轮虫 5 株系 18S rRNA V4 区比较

Fig. 6 The comparison of V4 regions for *Trichodina reticulata* based on the 18S rRNA secondary structure

*T. reticulata* (B)、*T. reticulata* (L) 和 *T. reticulata* (H) 株系，来自于本研究；*T. reticulata* (W) 和 *T. reticulata* (S) 株系，来自于 Wang et al. 2019；红色方框表示 5 株系的碱基差异。

*T. reticulata* (B), *T. reticulata* (L) and *T. reticulata* (H) from present work; *T. reticulata* (W) and *T. reticulata* (S) from Wang et al. 2019; Base differences in five strains are marked as red squares.

状车轮虫分为三个枝，支系 a、支系 b、支系 c。支系 a 中，*T. reticulata* (B) 与 *T. reticulata* (W) 形成姐妹枝，再与支系 b 聚枝，最后与支系 c 形成聚枝 (图 9)。

### 3 讨论

网状车轮虫的 5 个株系(含本研究 3 株系)在齿体和中央颗粒上表现出多样性的形态，如大部分虫体齿钩呈棒槌状，极少部分略呈长方形；*T. reticulata* (H) 株系和 *T. reticulata* (W) 株系无中央颗粒，其余 3 株系均具有卵圆形或规则排布的粒状中央颗粒。主成分分析显示，无中央颗粒的两个株系，即宿主为草鱼的 *T. reticulata* (W) 株系与宿主为鲤的 *T. reticulata*

(H) 株系，与有中央颗粒的 3 株系相比，即宿主均为鲫的 *T. reticulata* (B)、*T. reticulata* (L) 和 *T. reticulata* (S)，已出现明显的形态学变异，说明无中央颗粒的网状车轮虫种群已在表型方面出现了分化，而多样性的齿体形态在表型分化上表现较为稳定。同时，推测寄生于鲤和草鱼的网状车轮虫先于宿主为鲫的网状车轮虫发生表型分化；但由于本研究中宿主鱼样本量较少，有待进一步深入研究。同样地，结合 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 系统发育分析也显示，无中央颗粒的 *T. reticulata* (W) 株系和 *T. reticulata* (H) 株系始终与具有中央颗粒的网状车轮虫株系聚枝，因此，中央颗粒不属于该虫种较为稳定的形态学特征。基于 18S rDNA



图 7 网状车轮虫 5 株系的 18S rRNA V5 和 V7 区的比较

Fig. 7 The comparison of V5 and V7 regions for *T. reticulata* based on the 18S rRNA secondary structure

*T. reticulata* (B1) ~ *T. reticulata* (B8) [*T. reticulata* (B) 株系, 本研究]; *T. reticulata* (L1) ~ *T. reticulata* (L3) [*T. reticulata* (L) 株系, 本研究]; *T. reticulata* (H) 株系 (本研究); *T. reticulata* (W) 株系和 *T. reticulata* (S) 株系 (Wang et al. 2019). *T. reticulata* (B1) - *T. reticulata* (B8) [*T. reticulata* (B), present work]; *T. reticulata* (L1) - *T. reticulata* (L3) [*T. reticulata* (L), present work]; *T. reticulata* (H) (present work); *T. reticulata* (W) and *T. reticulata* (S) (from Wang et al. 2019).

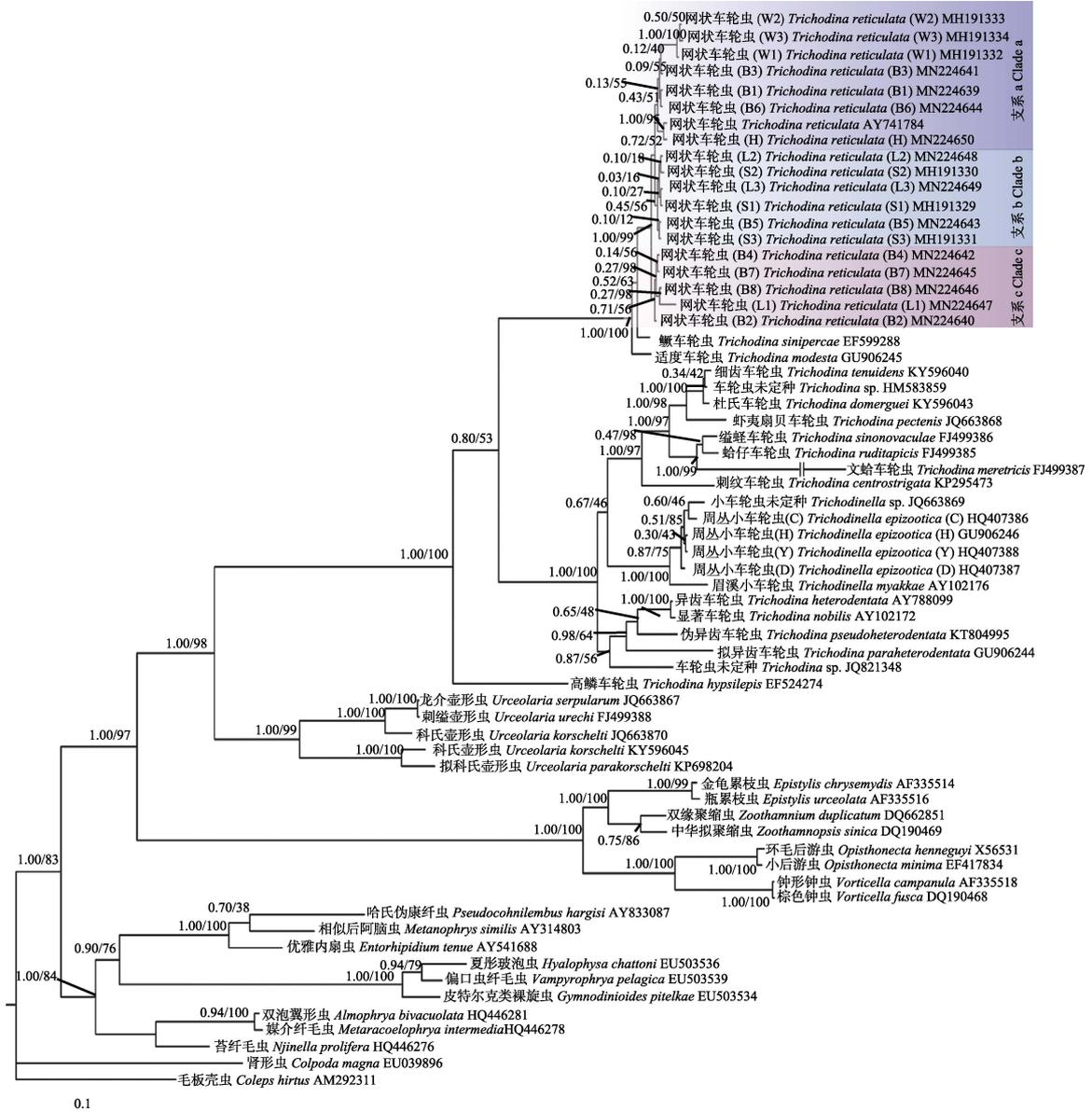


图 8 基于贝叶斯法与最大似然法构建的 18S rDNA 系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences by Bayesian inference and maximum likelihood analysis

分支节点处给出的数字是后验概率值 (BI) 和靴攀值 (ML), 标尺表示每 100 个核苷酸替换 10 个。

Numbers given at nodes of branches are the posterior probability value (BI) and bootstrap value (ML), scale bar represents 10 substitutions per 100 nucleotides.

分子标记对网状车轮虫的 5 大地理株系进行序列同源相似性比对和遗传距离计算显示: 序列相似度为 99.0% ~ 100%, 遗传距离范围在 0.000 ~ 0.008 之间, 并在 18S rRNA 二级结构的三个高

变区 (V4、V5、V7 区) 均具相同的二级结构构型, 其中, V7 区在一级序列上也完全一致, V4、V5 区的区别仅反映在一级序列上个别碱基的差异, 但均处于种内水平; 基于 18S rDNA

的 BI/ML 系统发育树显示，所有的网状车轮虫均聚集在一个高支持率 [后验概率值 (posterior probabilities, PP) = 1.00; 靴攀值 (bootstrap supports, BS) = 99] 的进化枝中，从而支持其为同种。综上，结合形态学、分子特征及系统发育综合分析，网状车轮虫 5 大株系在表型方面出现了分化，但基于分子证据证明此类分化应属于种内形态分化，这也表明网状车轮虫具有明显的种内形态多样性。该结果进一步支持并验证了中央颗粒不能作为网状车轮虫的主要分类学特征的观点 (Wang et al. 2019)。

进一步结合 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA

的变异位点及分子系统发育分析对网状车轮虫种内分歧研究显示：5 大地理株系的网状车轮虫并没有依据地理分布区和宿主聚枝，可推测来自相同地理分布和宿主的网状车轮虫已经出现种内分化；反而来自不同地理分布区和宿主的网状车轮虫皆因相同的变异位点而聚为一枝。如以基于 18S rDNA 构建的系统发育树为例，支系 b 中来自重庆沙坪坝区和北碚区的共 6 个样本，均在第 851 位发生 C 转换为 T 的变异，以此推断网状车轮虫的种内分化主要受其基因的影响，地理分布与宿主差异等环境影响在目前的种群分化阶段暂未突显。

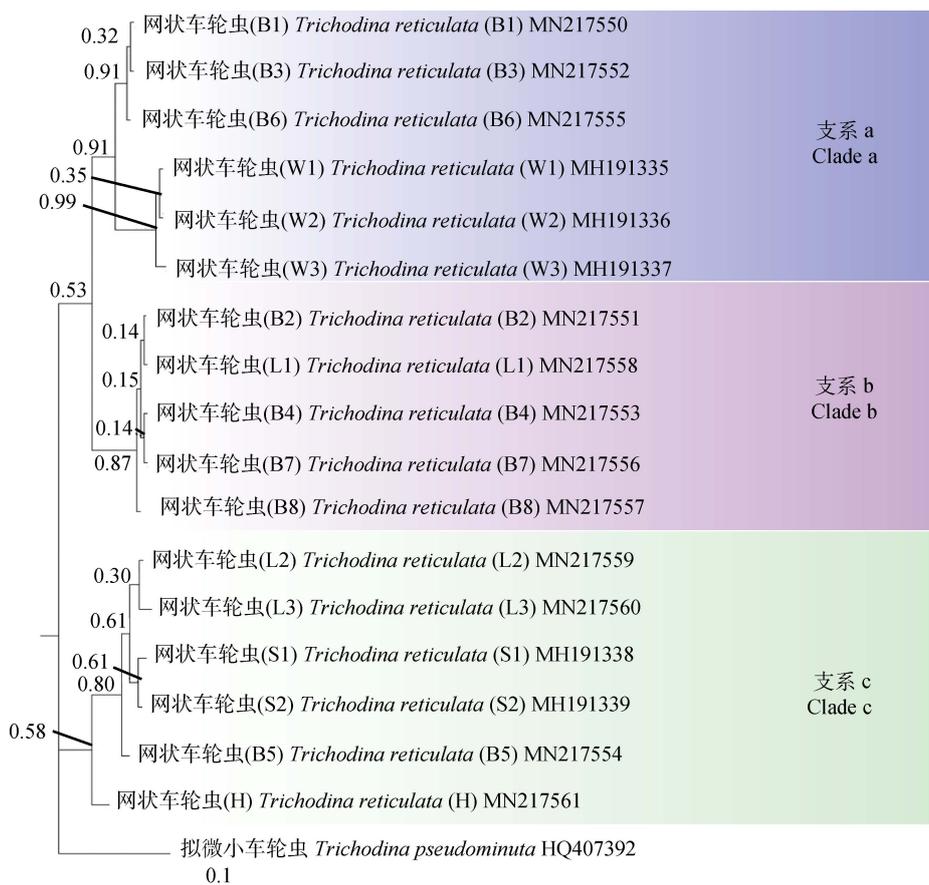


图 9 基于贝叶斯法构建的 ITS-5.8S rDNA 系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree based on ITS-5.8S rDNA sequences by Bayesian inference analysis

分支节点处给出的数字是后验概率值 (BI); 标尺表示每 100 个核苷酸替换 10 个。

Numbers given at nodes of branches are the posterior probability value (BI); scale bar represents 10 substitutions per 100 nucleotides.

## 参 考 文 献

- Gong Y C, Yu Y H, Eduardo V, et al. 2006. Reevaluation of the phylogenetic relationship between mobilid and sessilid peritrichs (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit rRNA genes sequences. *Eukaryotic Microbiology*, 53(5): 397–403.
- Kazubski S L. 1988. Morphological variation in a ciliate, *Trichodina reticulata* Hirschman & Partsch, 1955 (Peritrichida) in tadpole from small ponds. *Acta Protozoologica*, 27(1): 259–269.
- Klein B M. 1958. The dry silver method and its proper use. *Journal of Protozoology*, 5(2): 99–103.
- Lom J. 1958. A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians of uniform specific characteristics. *Journal of Protozoology*, 5(4): 251–263.
- Mitra A K, Bandyopadhyay P K, Gong Y C. 2013. Studies on trichodinid and chilodonellid Ciliophorans (Protozoa: Ciliophora) in the Indian freshwater and estuarine fishes with description of *Trichodinella sunderbanensis* sp. nov. and *Trichodina nandusi* sp. nov. *Parasitology Research*, 112(3): 1077–1085.
- Tang F H, Zhao Y J. 2013. Record of three new *Trichodina* species (Protozoa, Ciliophora) parasitic on gills of freshwater fishes from Chongqing, China. *African Journal of Microbiology Research*, 7(14): 1226–1232.
- Utz L R P, Eizirik E. 2007. Molecular phylogenetics of subclass Peritrichia (Ciliophora: Oligohymenophorea) based on expanded analyses of 18S rRNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(3): 303–305.
- van As J G, Basson L. 1992. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of freshwater fishes of the Zambesi River System, with a reappraisal of host specificity. *Systematic Parasitology*, 22(2): 81–109.
- Wang P, Gao F, Huang J, et al. 2015. A case study to estimate the applicability of secondary structures of SSU-rRNA gene in taxonomy and phylogenetic analyses of ciliates. *Zoologica Scripta*, 44(5): 574–585.
- Wang S B, Zhao Y J, Du Y H, et al. 2019. Morphological redescription and molecular identification of *Trichodina reticulata* Hirschman & Partsch, 1955 (Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) with the supplemental new data of SSU rDNA and ITS-5.8S rDNA. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(3): 447–459.
- Wang Z, Zhou T, Gu Z M. 2017. New data of two trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Trichodinidae) from farmed freshwater fishes in Hubei, China. *European Journal of Protistology*, 60(1): 50–59.
- Zhang Y, Zhao Y J, Wang Q, et al. 2015. 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). *Current Microbiology*, 71(2): 259–267.
- 李进, 唐发辉, 赵元著. 2014. 单型车轮虫 (*Trichodina uniforma*) 种群多样性研究. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 31(2): 10–15.
- 齐欢, 赵元著, 唐发辉. 2011. 长江上游四川江段鲤外寄生车轮虫的研究. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 28(5): 16–24.
- 唐发辉, 赵元著. 2007. 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. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 24(3): 8–12.
- 唐发辉, 赵元著, 陈辉. 2005. 鲫寄生车轮虫-新种的描述. 水生生物学报, 29(1): 75–80.
- 陶燕飞, 赵元著, 唐发辉. 2008. 重庆地区鲢-鳙及草鱼七种外寄生车轮虫的描述. 水生生物学报, 32(增刊 1): 124–129.
- 赵元著. 2013. 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. 内江师范学院学报, 28(2): 1–6.