

淡水鱼类粘孢子虫的 18S rDNA 分子系统学研究

鲁义善 聂 品

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 利用两个通用引物 myxoF(5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCAGTAG-3') 和 myxoR(5'-ACCAGGTAAGTTTCCCGTGTTGA-3') 成功扩增出圆形碘泡虫、全圆碘泡虫、武汉单极虫、微山尾孢虫和库班碘泡虫 5 种粘孢子虫的部分 18S rDNA 序列, 其 GenBank 登录号为: AY165179—AY165183。并结合 GenBank 其他 13 个相关序列构建了 18 个物种的分子系统树。结果表明, 碘泡虫、尾孢虫和单极虫较 *Tetracapsula bryozoides* 和“PKX”分化晚, 它们形成了 2 个聚类: *T. wuhanensis*-*T. hovorkai*-*M. rotundatus*-*M. rotundus*-*M. bibullatus*-*M. pellicides*-*M. pendula*-*H. salminicola* 聚类和 *H. exilis*-*H. ictaluri*-*M. spinacurvatura*-*M. osburni*-*H. lesteri*-*H. weishanensis*-*M. kubanicum* 的聚类; 同一属内, 采自国内种类并没有因为地域关系而形成独立的分支, 而是与国外的种类交叉在一起, 这意味着粘孢子虫种类之间的地域差别并不大; 碘泡虫和尾孢虫在进化上都不是单系的, 而且分子数据难以将这两个属的种类分开, 因此尾孢虫的尾突可能并不是有效的分类依据, 而是和碘泡虫的壳片突起同源的一种附属结构。

关键词: 粘孢子虫; 分子系统树; 18S rDNA; 尾孢虫; 碘泡虫; 单极虫

中图分类号: S941.51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)06-0587-05

粘孢子虫是常见的鱼类寄生虫, 其分布是世界性的, 危害也不尽相同。轻者使鱼体消瘦, 发育迟缓, 如寄生于鳊(*Siniperca chuatsi* Basilewsky) 鳃部的微山尾孢虫(*Henneguya weishanensis* Hu, 1965) 和寄生于鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus) 肠壁的全圆碘泡虫(*Myxobolus rotundatus* Achmerov, 1956); 重者则使鱼丧失其商品价值, 造成严重的经济损失, 如寄生于鲫(*Carassius auratus auratus* Linnaeus) 体表的圆形碘泡虫(*Myxobolus rotundus* Nemecek, 1911) 和库班碘泡虫(*Myxobolus kubanicum* Bychowsky, 1940); 更甚者会导致宿主的大面积死亡, 如寄生于异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* (Bloch)) 腹腔的武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis* Xiao, 1993)。

粘孢子虫的系统分类对那些从事原生动物、刺胞动物, 乃至后生动物发育模式的研究者来说, 都十分重要^[1]。自从 1825 年 Jurine 发现粘孢子虫以来, 有关其系统学的争论就没有停止过。比较经典的是粘孢子虫隶属于原生动物还是后生动物的争论^[2-4], 碘泡虫属(*Myxobolus*) 与粘体虫属(*Myxosoma*)^[5-7] 以及霍氏虫属(*Hferellus*) 与冠孢虫属(*Mi-*

traspota)^[8,9] 的争论。利用分子系统学来研究粘孢子虫, 近年来在国际上报道较多^[10-13], 而国内尚未见报道。我国幅员辽阔, 粘孢子虫种类繁多, 仅《粘孢子虫志》^[14] 记载的淡水种类就有 575 种, 约占粘孢子虫种类世界总数^[15] 的 43%。如此多的种类仅靠传统的粘孢子虫分类方法(主要依据是孢子形态)难以阐明其进化和亲缘关系, 本文利用 18S rDNA 基因序列对上述 5 种常见鱼类寄生粘孢子虫的分类和亲缘关系进行了研究。

1 材料和方法

1.1 采样 5 种粘孢子虫分别取自不同的时间和地点(表 1), 种的确定主要依据《粘孢子虫志》^[14] 的分类检索。

1.2 孢子的裂解和基因组 DNA 的提取 孢子的裂解采用煮沸法, 即将孢子在沸水中煮 10min 破壳, 然后在裂解液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris pH7.6, 10mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 0.2mg/mL 蛋白酶 K)中于 55℃过夜; 基因组 DNA 的提取参照 Sambrook 的常规酚-氯仿法^[16], 所得 DNA 溶于 20μL 灭菌双蒸水,

收稿日期: 2003-04-07; 修订日期: 2004-05-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30025035)资助

作者简介: 鲁义善(1974-), 男, 山东济南人; 博士; 主要从事鱼类寄生虫研究; 现在湛江海洋大学工作

通讯作者: 聂 品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

表 1 5 种粘孢子虫及其相应的宿主
Tab. 1 Five myxosporean species and their fish hosts obtained in the present study

种类 Species	宿主 Host	感染部位 Site of infection	采样地点 Sampling site	采样时间 Date
圆形碘泡虫	鲫	鳃及体表	湖北鄂州	2002. 1
<i>Myxobolus rotundus</i>	<i>Carassius auratus auratus</i>	Gills and skins	Ezhou of Hubei Province	Jan. 2002
库班碘泡虫	鲫	背部皮下	湖北梁子湖	2001. 4
<i>M. kubanicum</i>		Subcutaneous of dorsal area	Liangzi Lake of Hubei Province	Apr. 2002
全圆碘泡虫	鲤	肠壁	江苏洪泽县	2002. 1
<i>M. rotundatus</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Outer wall of gut	Hongze of Jiangsu Province	Jan. 2001
微山尾孢虫	鳊	鳃	武汉大东门市场	2001. 10
<i>Heneguya weishanensis</i>	<i>Siniperca chuatsi</i>	Gills	Market of Dadongmen in Wuhan	Oct. 2001
武汉单极虫	异育银鲫	鳃	中科院水生所关桥基地	2002. 7
<i>Thelohanellus wuhanensis</i>	<i>C. auratus gibelio</i>	Gills	Guanqiao in the Institute of Hydrobiology, CAS	July 2002

然后置- 20℃冰箱待用。

1.3 18S rDNA 扩增和测序 由 GenBank 检索得到多个粘孢子虫 18S rDNA 序列,经多序列比对找出保守区,根据此保守区利用分子生物学软件包 DNASTar 中的 primerselect^[17]设计通用引物 myxoF(5'-CGCGGTAATTCAGCTCCAGTAG-3')和 myxoR(5'-ACCAGGTAAGTTTTCCCGTGTGA-3')。PCR 反应体系包括 10×buffer 5μL,引物各 20μmol/L,dNTPs 40μmol/L,模板 DNA 100ng,Ex Taq DNA 聚合酶(Takara)1.5U,然后用灭菌双蒸水补足至终体积 50μL,反应混合物首先于 94℃变性 4min 后,于以下参数进行 35 个循环:94℃变性 30s,50℃退火 30s,72℃延伸 1min。最后于 72℃延伸 10min。

PCR 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶上充分分离后,将目的条带割下,参照 E. Z. N. A. 凝胶纯化试剂盒(Omega)的说明进行纯化。为了序列的保真性,采用 PCR 产物双向测序校验的方法并将测序结果向 GenBank 提交。

1.4 分子系统树的构建和分析 从 GenBank 引用下列 18S rDNA 序列进行系统树的构建(括号中为其相应的 GenBank 登录号): *Heneguya exilis* (AF021881), *H. salminicola* (AF031411), *H. ictaluri* (AF195510), *H. lesteri* (AF306794), *M. bibullatus* (AF378336), *M. osburni* (AF378338), *M. pellicides* (AF378339), *M. pendula* (AF378340), *M. spinacurvatura* (AF378341), *Thelohanellus hovorkai* (AJ133419), *Tetracapsula bryozoides* (AY074916), “PKX” organism (U70623), *Polypodium hydriforme* (F0137526)。其中

P. hydriforme 被当作外群。

序列多重比对通过 Clustal X(1.8 版)程序^[18]按照缺省参数进行,并以手工优化去除引物附近差异较大的部分。最大简约树通过 Bootstrap 自检 100 次由 Phylip 软件包^[19]中的 DNAPar 程序构建。

2 结果与讨论

2.1 引物 myxoF 和 myxoR 可以从 5 种虫体基因组中扩增出约 800bp 的 18S rDNA 序列,其 GenBank 登录号分别为:圆形碘泡虫(*M. rotundus* AY165179),全圆碘泡虫(*M. rotundatus* AY156180),武汉单极虫(*T. wuhanensis* AY165181),微山尾孢虫(*H. weishanensis* AY165182)及库班碘泡虫(*M. kubanicum* AY165183)。

2.2 由上述 18 个序列构建的系统树可以看出:(1)尾孢虫属(*Heneguya*)、碘泡虫属(*Myxobolus*)和单极虫属(*Thelohanellus*)的种类较 *Tetracapsula bryozoides* 和“PKX”分化晚,它们形成了 2 个聚类:*T. wuhanensis*-*T. hovorkai*-*M. rotundatus*-*M. rotundus*-*M. bibullatus*-*M. pellicides*-*M. pendula*-*H. salminicola* 聚类 and *H. exilis*-*H. ictaluri*-*M. spinacurvatura*-*M. osburni*-*H. lesteri*-*H. weishanensis*-*M. kubanicum* 的聚类;(2)碘泡虫和尾孢虫在进化上都不是单系的,而且在该系统树中难以将这两个属的种类区分开来;(3)除 *H. salminicola* 外,尾孢虫都聚在一起;(4)在碘泡虫属内,采自国内的圆形碘泡虫、全圆碘泡虫和库班碘泡虫并没有因为地域关系而形成独立的分支,而是与国外的种类交叉在一起;(5)武汉单极虫和 *Thelohanellus hovorkai* 虽然聚在一起,但是并没有形成独立的分支(图 1)。

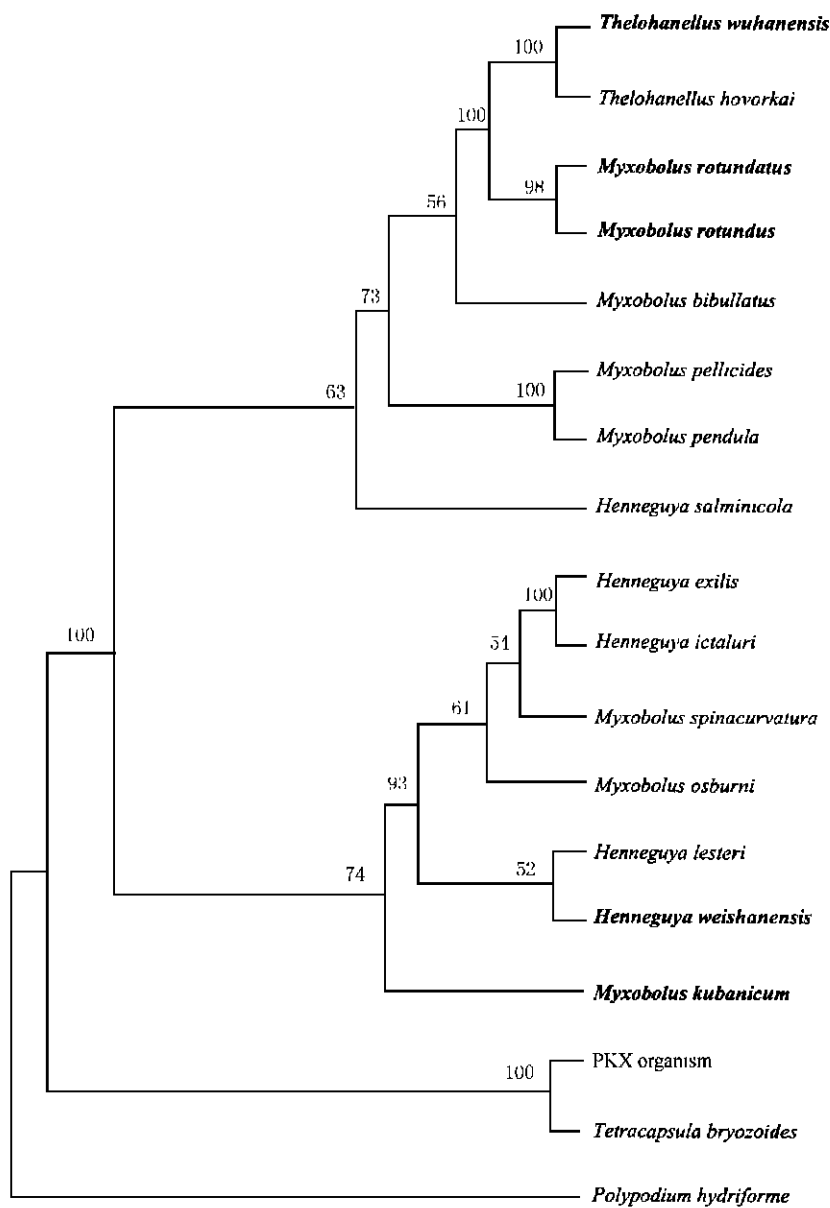


图 1 根据 18S rDNA 序列构建的 18 个物种的最大简约树。分支间的数字代表 Bootstrap 自检 100 次的支持率, 寄生中国淡水鱼类的 5 种粘孢子虫以粗体表示

Fig. 1 Parsimonious tree for 18 myxozoan species based on the phylogenetic analyses of 18S rDNA data. Numbers at nodes are parsimony bootstrap support indices after 100 replicates and the species in freshwater fish in China are shown in bold

2.3 根据近年来的报道,粘孢子虫起源于寄生性的刺胞动物 *Polypodium hydriforme*,而不是原生动[3],因此以 *P. hydriforme* 为外群来建立系统树。当然,在这里所讨论的粘孢子虫是粘体门(Myxozoa)的动物,而不仅仅是粘孢子纲(Myxosporae)的种类,它应该包括“PKX”及其近缘的以苔藓动物为宿主的所有四囊虫。“PKX”原是引起肾增生病(PKD)的未明生物体,现在已经证实是 *Tetracapsula bryosalmonae*,它也寄生于苔藓动物,和其他以苔藓动物为宿主的粘

孢子虫如 *T. bryozoides* 同属于粘体门的一个新纲——软孢子纲(Malacosporea)[20–22]。由图1可以看出,它们形成一个独立的分支,而且比现有的粘孢子虫纲的种类分化都早,这与相关报道完全一致[15]。碘泡虫、尾孢虫和单极虫同属单极亚目(Unipolarina),在本文的系统树中形成了2个聚类,一个包括4种尾孢虫3种碘泡虫,一个包括1种尾孢虫、2种单极虫和5种碘泡虫。可见碘泡虫和尾孢虫在进化上都不是单系的,而且分子数据难以将

这两个属的种类分开。尾孢虫和碘泡虫在形态上的主要区别在于尾孢虫都具有从壳瓣后端延伸的 2 根等长的尾突。实验表明尾孢虫的尾突可能并不是有效的分类依据, Andree 等^[13] 推测尾孢虫的尾突可能是和碘泡虫的壳片突起(如 V 型突)同源的一种附属结构;另一方面,除 *H. salmonicola* 外,所有的尾孢虫都聚在一起,说明它们之间的亲缘关系比较接近,这可能是由于长期适应单一的寄生方式所产生的趋同效应,因为目前所知的尾孢虫都是组织寄生的。两种单极虫虽然聚在一起,但是并没有与碘泡虫和尾孢虫分开,这说明它们有着共同的起源,也可能是因为作者选取的种类太少(由 GenBank 可用的序列所限)所引起远端吸引(Long-branch attraction)^[11] 效应,这表明分子数据在系统学的实际应用中存在着一定的局限。另外,在碘泡虫属内,采自国内的种类并没有因为地域关系而形成独立的分支,而是与国外的种类交叉在一起,这意味着粘孢子虫种类之间的地域差别并不像有关报道^[13] 那样明显。

参考文献:

- [1] Siddall M E, Whiting M F. Long branch abstractions[J]. *Cladistics*, 1999, **15**: 9—24
- [2] Anderson C L, Canning E U, Okamura B. A triphlast origin for Myxozoa[J]? *Nature*, 1998, **392**: 346—347
- [3] Siddall M E, Martin D S, Bridge D, *et al.* The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria[J]. *J Parasitol*, 1995, **81**: 961—967
- [4] Smothers J F, von Dohlen C D, Smith, *et al.* Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans[J]. *Science*, 1994, **265**: 1719—1721
- [5] Walliker L. The nature of the iodophilous vacuole of myxosporidian spores and a proposal to synonymize the genus *Myxosoma* Thebhan, 1892 with the genus *Myxobolus* Butschli, 1882[J]. *J Protozool*, 1968, **15**: 571—575
- [6] Lom J. On a new taxonomic character in Myxosporidia, as demonstrated in description of two new species of *Myxobolus* [J]. *Folia Parasitol*, 1969, **16**: 97—103
- [7] Desser S S, Paterson W B. Ultrastructural and cytochemical observations on sporogenesis of *Myxobolus* sp. (Myxosporida: Myxobolidae) from the common shiner *Notropis cornutus* [J]. *J Protozool*, 1978, **25**: 314—326
- [8] Lom J. *Hofrelius cyprini* (Doflein, 1898) Berg, 1898(syn: *Mitraspora cyprini* Fujita, 1912), *Myxobilatus nostalgicus* sp. n. and related species: partial revision of two Myxosporidian genera[J]. *Folia Parasitol*, 1986, **33**: 289—296
- [9] Lom J. *Hofrelius cyprini* Doflein, 1898 from carp kidney: a well established Myxosporidian species or a sequence in the developmental cycle of *Sphaerospora renicola* Dykova and Lom, 1982[J]? *Protistol*, 1985, **2**: 195—206
- [10] Andree K B, Gresoviac S J, Hedrick R P. Small subunit ribosomal RNA sequences unite alternate actinosporidian and myxosporidian stages of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease in salmonid fish[J]. *J Euk Microbiol*, 1997, **44**: 208—215
- [11] Anderson C L, Canning E U, Schafer S M, *et al.* Molecular confirmation of the life cycle of *Theohanellos hovorkai* Achmerov, 1960(Myxozoa: Myxosporidia) [J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 2000, **20**: 111—114
- [12] Andree K B, El-Matbouli M, Hoffman R W, *et al.* Comparison of 18S and ITS-1 sequences of selected geographic isolates of *Myxobolus cerebralis* [J]. *Int J Parasitol*, 1999, **29**: 771—775
- [13] Andree K B, Szekely C, Mohar K, *et al.* Relationships among members of the genus *Myxobolus*(Myxozoa: Bivalvulida) based on small subunit ribosomal DNA sequences[J]. *J Parasitol*, 1999, **85**: 68—74
- [14] Chen Q L, Ma C L. Myxozoa, Myxosporidia. Fauna sinica[M]. Beijing: Science Press. 1998[陈启鏊, 马成伦. 中国动物志. 粘体动物门, 粘孢子纲. 北京: 科学出版社. 1998]
- [15] Kent M L, Andree K B, Bartholomew J L, *et al.* Recent advances in our knowledge of the Myxozoa[J]. *J Euk Microbiol*, 2001, **48**: 395—413
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- [17] DNASTAR incorporation. Windows 32 Prime select, Version 4. 01[P]. Madison, Wisconsin. 1999
- [18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nuc Acids Res*, 1997, **24**: 4876—4882
- [19] Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, Version 3. 6(at pha3) [P], Seattle, Washington: Department of Genome Sciences, University of Washington. 2002
- [20] Anderson C L, Canning E U, Okamura B. 18S rDNA sequences indicate that “PKX” organism parasitizes Bryozoa[J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol*. 1999, **19**: 94—97
- [21] Anderson C L, Canning E U, Okamura B. Molecular data implicate bryozoans as host for “IKX” (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa[J]. *Parasitology*. 1999, **119**: 556—561
- [22] Canning E U, Okamura B, Cuny A. Development of a myxozoan parasite *Tetracapsula bryozoides* gen. n. et sp. n. in *Cistatella mucedo*(Bryozoa: Phylactolaemata) [J]. *Folia Parasitol*, 1996, **43**: 249—261

PHYLOGENETIC ANALYSES OF THE MYXOSPOREANS PARASITIC IN
FRESHWATER FISH OF CHINA BASED ON 18S RIBOSOMAL DNA

LIU Yi-Shan and NIE Pin

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology; Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Partial 18S rDNA sequences of five myxosporean species, *Myxobolus rotundus*, *M. rotundatus*, *Thelohanellus wuhanensis*, *Henneguya weishanensis* and *M. kubanicum* were amplified utilizing two common primers myxF (5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCAGTAG-3') and myxoR (5'-ACCAGGTAAGTTTCCCGTGTTGA-3') and stored in the GenBank with the access number AY165179-AY165183. By combining the 18S rDNA sequences of other 13 species available in the GenBank a parsimonious tree of 18 species was built with *Polypodium hydriforme* used as the outgroup. Results show *Tetracapsula bryœoides* and "PKX" organism lie on the root within the Myxozoa before the divergence of other major groups which form two clades as *T. wuhanensis*-*T. hovorkai*-*M. rotundatus*-*M. rotundus*-*M. bibullatus*-*M. pellicides*-*M. pendula*-*H. salminicola* and *H. exilis*-*H. italuri*-*M. spinacurvatura*-*M. osburni*-*H. lesteri*-*H. weishanensis*-*M. kubanicum*. Among the genus *myxobolus*, 3 species found in China did not form a clade but grouped with the European species, indicating that the geographic divergence of *Myxobolus* may not be distinct. Neither *Myxobolus* nor *Henneguya* was monophyletic and these two genera can not be distinguished using the molecular data. It is further proposed that the caudal protrusion of *Henneguya* may not be a valid taxonomic character but an appending structure homologous with the "V" projections in *Myxobolus*.

Key words: Myxosporean; phylogenetic tree; 18S ribosomal DNA; *Myxobolus*; *Henneguya*; *Thelohanellus*