

五株纤毛虫遗传关系的 ISSR 分析

张文静^{1,2} 余育和¹ 沈韫芬¹

(1. 中国科学院水生生物研究所原生动物分类与生态组, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术, 尝试对四种五株纤毛虫(褶累枝虫(*Epistylis plicatilis*)、绿草履虫(*Paramecium bursaria*)、多态喇叭虫(*Stentor polymorphus*)、嗜热四膜虫 BF1 株(*Tetrahymena thermophila* BF1) 和嗜热四膜虫 BF5 株(*T. thermophila* BF5)) 进行遗传关系研究。用 13 个 ISSR 引物对五株纤毛虫进行扩增, 六个 ISSR 引物获得多态片段。根据 Nei's 遗传距离矩阵构建了五株纤毛虫的遗传关系树状图。UPGMA, NJ 聚类图表明: 两株嗜热四膜虫最先聚在一起; 其次是褶累枝虫和多态喇叭虫聚在一起, 然后再与嗜热四膜虫聚在一起; 咽膜亚纲的绿草履虫形成独立的一枝。结果显示: ①缘毛亚纲纤毛虫可能是寡膜纲中较独特的一个类群, 建议提升缘毛亚纲纤毛虫的分类地位; ②缘毛亚纲褶累枝虫与膜口亚纲嗜热四膜虫的亲缘关系近于咽膜亚纲绿草履虫, 在寡膜纲中绿草履虫处于原始地位; ③五株纤毛虫基因组中均含有微卫星 DNA 序列: (GTG)₄、(GACA)₄、(AG)₈、(CAA)₆ 和 (GAA)₆₀。

关键词: 纤毛虫; ISSR 分析; 遗传关系

中图分类号: Q959.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)06-0633-06

纤毛虫原生动物是约在 10 亿年前由原核生物向动植物等真核生物进化的同时分离出来的独特的单细胞真核生物^[1,2]。在漫长的演化过程中, 纤毛虫形成了独具的两种功能的细胞核, 高度特化的细胞器以及高度的多样性。目前广泛被用作生理生化、细胞衰老与分化、信息传递、遗传毒理、环境生物学等研究的实验材料^[3,4]。由于种种原因, 其进化过程一直不明, 有关其遗传及进化等问题也一直存有争议^[5,6]。因此, 借助现代的研究手段对纤毛虫开展遗传关系的研究具有重要的理论意义和应用价值。

ISSR(Inter simple sequence repeat) 是 Zietkiewicz 等在 1994 年首次使用的一种分子标记技术^[7]。他是利用微卫星重复序列并在 3' 或 5' 锚定的寡聚核苷酸引物对基因组进行 PCR 扩增的标记技术, 可以使位于反向排列的合适长度的重复序列间的基因组片段被 PCR 扩增, 电泳形成指纹图谱。在众分子标记中, ISSR 标记因其模板 DNA 用量少、多态性高、无需活材料、稳定性强和简单快速等优点而占据优势。尽管 rRNA 基因序列在目前纤毛虫分子系统发育关系研究中占据主要地位, 但是它潜在的缺点也逐渐

在一些系统发育的研究中显现出来^[8,9]。同时, 基因树和物种树的区别也被越来越多的学者所重视。DNA 突变是随机过程, 在有限的序列内可能存在统计学上的偏差。为使分子树更真实地反映物种树, 需要对多基因和大量 DNA 序列进行分析, 从而最大限度地缩小两者间的差别^[10]。真核生物基因组 DNA 中, 简单重复序列区占据了绝大部分, 在这些区域蕴涵了大量的遗传信息^[11], 所以 ISSR 分析可以通过增加涉及的 DNA 序列的长度, 更真实地探讨物种间的关系。

ISSR 分子标记主要用于种间或种群的区分, 也已在其他高等真核生物(如马铃薯、稻等)中成功地进行了大量的系统发育和遗传关系的研究^[12,13]。但是, 至今尚未应用于原生动物的研究。本文尝试通过利用 13 种引物对四种五株关系较远的纤毛虫种类的 ISSR 分析以探索 ISSR 标记在纤毛虫分子系统学中使用的可行性, 并根据遗传距离矩阵构建 UPGMA 和 NJ 树, 对五株纤毛虫的系统遗传关系等问题进行了相应的探讨。在适当的引物条件下, 可以支持前人的工作结果。

收稿日期: 2005-01-04; 修订日期: 2005-04-04

基金项目: 中国科学院创新领域前沿项目(220207); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(2005FB13)资助

作者简介: 张文静(1978—), 女, 山东东平人, 博士生, 从事原生动物分子生物学研究。李文祥博士为本研究提供了部分 ISSR 引物, 并在实验中提供了帮助, 本实验室的颜庆云、王爱芹协助采样, 特此致谢!

通讯作者: 余育和, E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

1 材料与方法

1.1 样品的采集、分离和 DNA 提取 褶累枝虫 (*Epistylis plicatilis*)、绿草履虫(*Paramecium bursaria*)、多态喇叭虫(*Stentor polymorphus*)、嗜热四膜虫 BF1 株(*Tetrahymena thermophila* BF1) 和嗜热四膜虫 BF5

株(*T. thermophila* BF5) 的来源见表 1。两株嗜热四膜虫细胞系由华东师范大学原生动物组提供。由于纤毛虫是单细胞生物, 个体微小, 很难从单个个体提取 DNA, 所以每株纤毛虫至少收集 100 个个体提取总 DNA。DNA 提取方法参照张文静等^[14]的方法进行。

表 1 五株纤毛虫样品的种及株系名称、采集地点和时间
Tab 1 Species and strains names, collection locations and dates of five ciliate strains

物种 Species	采集地点 Collect ion locations	采集时间 Collect ion dates
<i>Epistylis plicatilis</i>	武汉西北湖	2004 年 3 月
<i>Paramecium bursaria</i>	武汉东湖	2003 年 3 月
<i>Stentor polymorphus</i>	武汉东湖	2003 年 9 月
<i>Tetrahymena thermophila</i> BF1	上海华东师范大学	2002 年 2 月
<i>T. thermophila</i> BF5	上海华东师范大学	2002 年 2 月

1.2 ISSR-PCR 扩增 采用 13 个 ISSR 引物(表 2)对 5 株纤毛虫进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25μL, 反应前 95℃预变性 2 min, 然后为 T℃(因引物而异, 见表 2) 1min, 70℃ 1.5 min, 95℃ 1 min, 循环 35 次。反应后 50℃ 1 min, 72℃延伸 10 min。扩增产物

用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以 200bp Marker (华美公司) 作为标准分子量对照。以上实验(包括样品的采集、分离和 DNA 提取) 独立重复 3 次, 以确定扩增带的稳定性。

表 2 本研究中用到的 ISSR 引物序列及其退火温度
Tab. 2 ISSR primers sequences and their annealing temperatures used in the present work

ISSR 引物名称 ISSR primer names	引物序列 Primer sequences	退火温度 The annealing temperatures(℃)
ISSR 15	CCA(GTG) ₄	50
ISSR 18	(GACA) ₄	50
ISSR 19	(AG) ₈ T	50
ISSR 20	(AG) ₈ G	50
ISSR II4	(GC) ₈ H*	66.6
ISSR II5	(CG) ₈ D**	66.6
ISSR II6	(GAG) ₆	58.8
ISSR III1	(CAGT) ₄	48
ISSR IIIB	(CA) ₈ A	50
ISSR III4	(CA) ₈ T	50
ISSR IIIB	G(CA) ₈	52
ISSR IIIB	(CAA) ₆	50
ISSR IIID	(GAA) ₆	50

* H= A/C/T; ** D= A/G/T

1.3 数据分析 选取多态性和稳定性高的 6 个 ISSR 扩增图谱, 用 Gene Tools 软件对电泳图谱进行自动分析, 同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 有带(包括弱带)的记为“1”, 无带的记为“0”。采用 POP-

GENE 软件^[15] 计算 Nei 氏遗传距离^[16]: $D= 1- 2N_{AB}/(N_A + N_B)$ 。利用软件 MEGA version 2.1^[17] 进行 UP-GMA(unweighted pair-group method for arithmetic averages analysis) 和 NJ(neighbor-joining) 聚类分析。

2 结果

2.1 电泳

13 个 ISSR 引物中, 7 个引物扩增条带极少, 无多态性。6 个 ISSR 引物获得成功扩增, 共得到 178 条带

(图 1)。电泳结果显示: 除了嗜热四膜虫 BF1 株和嗜热四膜虫 BF5 株的扩增结果极为相似外, 其他实验物种具有各自独特的指纹图谱; 6 个引物在不同物种中的扩增条带总数不同, 每条引物在每种材料中平均产生 6 条带; 引物 ISSR19 扩增条带最多, 共 47 条带。

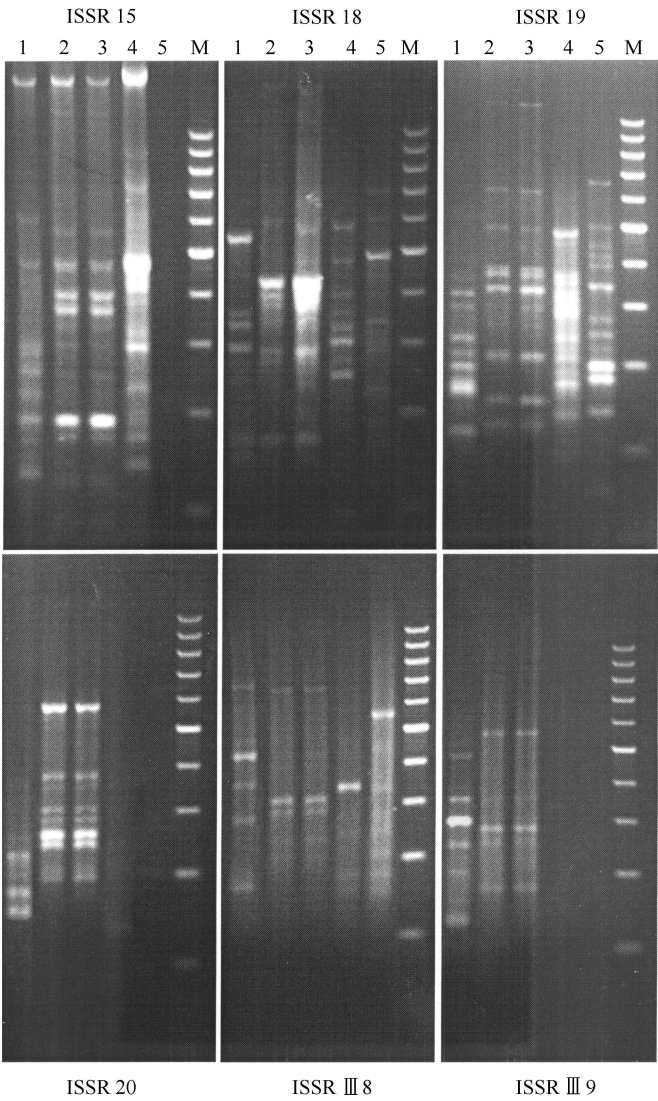


图 1 六个 ISSR 引物对五株纤毛虫基因组的扩增指纹图谱

Fig. 1 The amplification fingerprinting patterns of six ISSR primers in the genome of five ciliate strains

六个 ISSR 引物(six ISSR primers): ISSR 15、ISSR 18、ISSR 19、ISSR 20、ISSR III 8 和 ISSR III 9; 1. 褶裂枝虫(*E. plicatilis*); 2. 嗜热四膜虫 BF1 株(*T. thermophila* BF1); 3. 嗜热四膜虫 BF5 株(*T. thermophila* BF5); 4. 多态喇叭虫(*S. polymorphus*); 5. 绿草履虫(*P. bursaria*); M: 200bp 标准分子重量对照(200bp Marker)

2.2 遗传距离

五株纤毛虫之间的遗传距离列于表 3。两株嗜热四膜虫的遗传距离最小(0.038), 嗜热四膜虫 BF5 株与绿草履虫的遗传距离最大(0.906)。

2.3 遗传关系树

五株纤毛虫的 UPGMA 树(图 2)和 NJ 树(图 3)

的拓扑结构完全一致: 两株嗜热四膜虫最先聚在一起; 其次是褶裂枝虫和多态喇叭虫聚在一起, 然后再与嗜热四膜虫聚在一起; 咽膜亚纲的绿草履虫形成独立的一枝, 位于树的基部。

表 3 五株纤毛虫之间的遗传距离
Tab. 3 Genetic distances among five ciliate strains

	<i>E. plicatilis</i>	<i>T. thermophila</i> BF1	<i>T. thermophila</i> BF5	<i>S. polymorphus</i>	<i>P. bursaria</i>
<i>E. plicatilis</i>	—				
<i>T. thermophila</i> BF1	0.766	—			
<i>T. thermophila</i> BF5	0.795	0.038	—		
<i>S. polymorphus</i>	0.657	0.746	0.778	—	
<i>P. bursaria</i>	0.871	0.905	0.906	0.821	—

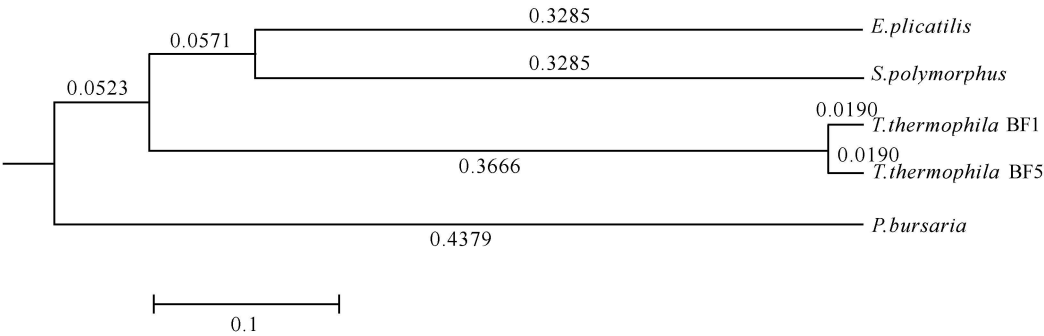


图 2 五株纤毛虫基于 UPGMA 的遗传关系树
Fig. 2 The genetic tree of five ciliate strains based on UPGMA

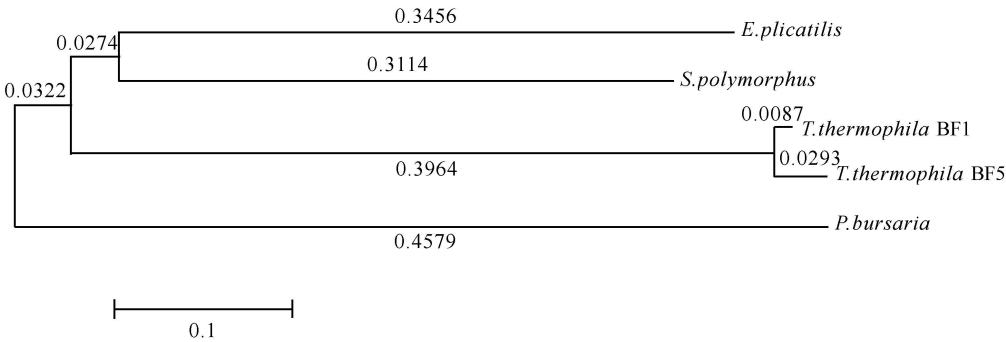


图 3 五株纤毛虫基于 NJ 的遗传关系树
Fig. 3 The genetic tree of five ciliate strains based on NJ

3 讨论

3.1 缘毛类纤毛虫分类地位分析

缘毛类纤毛虫被认为是纤毛虫的主要类群之一。早在十七世纪七十年代荷兰科学家列文虎克在自制显微镜下观察到钟虫, 此后人类便开始了缘毛类纤毛虫的研究历史。十九世纪八十年代, Butschli 分类系统曾将缘毛类归入当时的旋毛目, 并推测缘毛类起源于下毛类。二十世纪三十年代, Kahl 将其提升为缘毛目。Corliss 在 1968 年因为其具有与寡膜纲内其他纤毛虫相似的表膜下纤毛系结构和口器

的超微结构, 而把它归入寡膜纲, 定为缘毛亚纲^[18]。至今其进化地位仍存在争议^[19, 20]。

褶累枝虫 (*Epistylis plicatilis*)、隶属于纤毛门 (Ciliophora)、寡膜纲 (Oligohymenophorea)、缘毛亚纲 (Pectrichia)、累枝虫科 (Epistylidae), 是缘毛类纤毛虫中的常见代表种之一^[21]。在本文分析中, 它和异毛纲异毛目的多态喇叭虫的遗传距离 (0.657) 最小, 首先聚在一起, 然后与寡膜纲的另两个亚纲 (嗜热四膜虫和绿草履虫) 聚在一起 (图 2、3)。说明它和多态喇叭虫有较近的遗传关系。同时, 在形态学上, 缘毛类纤毛虫和多态喇叭虫共同具有独特的旋转的口部

纤毛和退化的体纤毛。另外, 缘毛类纤毛虫还具有许多其他纤毛虫所没有的生物学特性: 生活史双态型, 有固定态和游泳体; 大小结合子融合形成接合生殖等。显示了缘毛类纤毛虫在寡膜纲中的独特性, 建议提升缘毛类纤毛虫的分类地位。Greenwood 等^[22]也曾建议提升缘毛类纤毛虫的分类地位。所以从 ISSR 方法得到的遗传关系树为缘毛亚纲分类地位的提供提供了又一个佐证。

3.2 寡膜纲中三亚纲纤毛虫间的遗传关系分析

膜口亚纲嗜热四膜虫、咽膜亚纲绿草履虫和缘毛亚纲褶累枝虫同属寡膜纲。Lynn 和 Small^[21]依照动基系 (Kinetid) 的结构相似程度, 认为膜口亚纲与缘毛亚纲的关系近于咽膜亚纲。此后, Itabashi 等和 Miao 等^[20]分析 SSrRNA 基因序列亦得出缘毛亚纲和膜口亚纲间亲缘关系近。本文得出的各物种间遗传距离和关系树显示了同样的结果: 褶累枝虫和绿草履虫的遗传距离 (0.871) 明显大于它与嗜热四膜虫的遗传距离 (与嗜热四膜虫 BF1 株, BF5 株分别是 0.766, 0.795)。褶累枝虫与嗜热四膜虫的遗传关系近于与绿草履虫。

Lynn 和 Small^[21]从动基系的结构推测咽膜亚纲是整个寡膜纲纤毛虫的祖先。Str. der Kypke 等构建的 SSrRNA 基因系统树中, 咽膜亚纲纤毛虫处于寡膜纲枝的基部, 从而认为咽膜亚纲纤毛虫在寡膜纲中处于原始地位。Miao 等分别用 19 种和 31 种寡膜纲纤毛虫构建的 SSrRNA 基因系统树中, 咽膜亚纲纤毛虫也同样处于寡膜纲枝的基部。本文 ISSR 技术构建的树形图中咽膜亚纲的绿草履虫处于基部, 进一步支持了这个观点。

Miao 等^[20]以 SSrRNA 基因和 ITS1 序列构建的系统发育树中均没有涉及多态喇叭虫, 但所涉及的褶累枝虫、绿草履虫和四膜虫的关系都支持本文结果。在 Miao 等以 RAPD 构建的系统发育树中未包括草履虫, 所涉及的褶累枝虫、多态喇叭虫和四膜虫的关系与本文结果有出入: 他们认为褶累枝虫和四膜虫的关系近于多态喇叭虫; 而本文认为褶累枝虫和多态喇叭虫的关系近于四膜虫。诚然, 不同的分子标记得到的结果会有差异。就像 Miao 等讨论中提到的“RAPD 方法构建系统树的可靠性是建立在对大量随机引物 (或筛选出的多态性很强的引物) 的扩增产物进行统计分析的基础上的, 而我们的工作未经筛选只使用了 3 个随机引物 (纤毛虫 DNA 提取十分困难, 回收率低), 从而造成系统发育树的可靠性下降, 聚类混乱。”而在本文的 ISSR 分析中, 使用

的 ISSR 技术比 RAPD 技术更科学, 结果更稳定。在 13 个 ISSR 引物中筛选出的 6 个多态性强的引物用于建树, 可靠性比 Miao 等的 RAPD 分析强。

3.3 纤毛虫基因组中微卫星 DNA

尽管有学者研究了寄生原生动物的微卫星 DNA 序列, 但是对于自由生活的原生动物, 特别是纤毛虫, 微卫星的研究工作非常有限^[14, 22]。纤毛虫基因组中是否存在微卫星 DNA 以及微卫星 DNA 类型如何? 这个问题一直没有解决。本文通过微卫星 DNA 的相关技术 (ISSR 技术) 从一个侧面解答了这个问题。在 13 个引物中, 六个引物 (ISSR 15、ISSR 18、ISSR 19、ISSR 20、ISSR II8 和 ISSR III9) 获得成功扩增, 说明这五株纤毛虫基因组中含有这些引物相对应的微卫星 DNA 序列: (GTG)₄、(GACA)₄、(AG)₈、(CAA)₆ 和 (GAA)₆。进而揭示了在纤毛虫中应用微卫星 DNA 及其相关的 ISSR 技术的可能性。

传统分类主要是依赖形态特征等生理生化方法, 因此存在很多问题。由于纤毛虫原生动物个体微小, 许多种类形态极其相似, 仅依靠传统的形态观察和银染技术, 更无法准确标定其在由系统演变过程中的进化关系和地位, 同时, 纤毛虫系统分类上所存在的许多混乱亟需进行全面地澄清。因此, ISSR 分子生物学方法可从分子和基因水平上提供有益的补充和佐证。本文的 ISSR 分析从一个方面反映了几个物种间的遗传关系, 从而为纤毛虫的分类问题提供了新的分子生物学依据。

参考文献:

[1] Baroin-Tourancheau A, Delgado P, Perasso R, *et al.* A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, **89**: 9764—9768

[2] Fleury A, Delgado P, Iftode F, *et al.* Molecular phylogeny of ciliates: what does it tell us about the evolution of the cytoskeleton and of developmental strategies? [J]. *Dev. Genet.*, 1992, **13**: 247—254

[3] Shen Y F. Protozoology [M]. Beijing: Science Press. 1999[沈韞芬. 原生动物学. 北京: 科学出版社. 1999]

[4] Song W B. Progress of Protozoology [M]. Qingdao: Ocean University of Qingdao Press. 1999[宋微波. 原生动物学专论. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 1999]

[5] Corliss J O. The changing world of ciliate systematics: historical analysis of past efforts and a newly proposed phylogenetic scheme of classification for the protistan phylum Ciliophora [J]. *Syst. Zool.* 1974, **23**: 91—138

[6] Coombs G. H. Evolutionary Relationships Among Protozoa [M]. London: Kluwer Academic Publishers, 1998: 409—447

- [7] Zietkiewics E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20**: 176—183
- [8] Leipe D D, Gunderson J H, Nerad T A, *et al.* Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita iflate* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree [J]. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993, **59**: 41—48
- [9] Galtier N, Gouy M. Inferring phylogenies from DNA sequences of unequal base compositions [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995, **92**: 11317—11321
- [10] Zhang Y P. From DNA sequences to the species phylogenetic tree [J]. *Zool. Res.*, 1996, **17**: 247—252 [张亚平. 从 DNA 序列到物种树. 动物学研究, 1996, **17**: 247—252]
- [11] Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**: 1111—1115
- [12] Huang J, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theoret. Appl. Genet.*, 2000, **100**: 1050—1060
- [13] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, **100**: 1311—1320
- [14] Zhang W J, Yu Y H, Shen Y F, *et al.* Preliminary study on applicability of microsatellite DNA primers from parasite protozoa *Trypanosoma cruzi* in free-living protozoa [J]. *J. Ocean Univ. China*, **3**: 80—84
- [15] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, *et al.* POPGENE, The user friendly shareware for population genetic analysis [M]. Canada: University of Alberta, Edmonton. 1997
- [16] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, **76**: 5269—5273
- [17] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J], *Bioinformatics*, 2001, **17**: 1244—1245
- [18] Corliss J O. The value of ontogenetic data in reconstructing protozoan phylogenies [J]. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 1968, **87**: 1—20
- [19] Corliss J O. The ciliated protozoa: characterization, classification and guide to the literature 2ed [M]. New York: Pergamon. 1979
- [20] Miao W, Zhang X Y, Yu Y H, *et al.* Phylogenetic position of Peritrichs based on three kinds of molecular markers [J]. *Zool. Res.*, 2003, **24**: 1—10 [缪伟, 张锡元, 余育和, 等. 利用三种分子标记研究缘毛类纤毛虫的系统发育学地位 [J]. 动物学研究, 2003, **24**: 1—10]
- [21] Lee J J, Leedale F G, Bradbury P. An illustrated guide to the protozoa 2ed [M] Lawrence: Allen Press. 2000, 371—656
- [22] Zhang W J, Yu Y H, Shen Y F. Advances on genetic analysis of microsatellite DNA in protozoology [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**: 185—190 [张文静, 余育和, 沈钰芬. 微卫星 DNA 遗传分析在原生动物学中的研究进展. 水生生物学报, 2003, **27**: 185—190]

GENETIC RELATIONSHIPS OF FIVE CILIATE STRAINS INFERRED FROM ISSR ANALYSIS

ZHANG Wen-Jing^{1,2}, YU Yue-He¹ and SHEN Yun-Fen¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: ISSR analysis was conducted to investigate the genetic relationships of five ciliate strains: *Epistylis plicatilis*, *Paramecium bursaria*, *Stentor polymorphus*, *Tetrahymena thermophila* BF1 and *T. thermophila* BF5. Out of 13 ISSR primers, 6 primers generated highly reproducible and polymorphic DNA fragments. The genetic trees were constructed based on ISSR amplification fingerprintings using both unweighted pair-group method for arithmetic averages analysis (UPGMA) and neighbor-joining (NJ) methods. Two *T. thermophila* strains formed one branch first. *E. plicatilis* clustered with *S. polymorphus*, then grouped with *T. thermophila*. *P. bursaria* formed a separate branch. This shows that ① the peritrichs may be recognized as the particular ciliates within Oligohymenophorea, and they should be elevated to a higher taxonomic rank; ② the Peritrichia *E. plicatilis* has the closer relation with the Hymenostomatia *T. thermophila* than the Peniculia *P. bursaria*, which is the primordial group in the class Oligohymenophorea; ③ The genome of the five ciliate strains contain these microsatellite DNA sequences: (GTG)₄, (GACA)₄, (AG)₈, (CAA)₆ and (GAA)₆.

Key words: Ciliate; ISSR analysis; Genetic relationships