

•研究报告•

小腔游仆虫形态学、个体发育与分子系统学研究

张 雪¹ 王玉蕊¹ 樊阳波^{1,2} 罗晓甜¹ 胡晓钟¹ 高 凤^{1*}¹ (中国海洋大学水产学院, 山东青岛 266003)² (哈尔滨工业大学(深圳)土木与环境工程学院, 广东深圳 518055)

摘要: 游仆类是纤毛虫中进化最为复杂和高等的一大类群, 为了进一步探索和完善游仆类的多样性, 本研究利用活体观察、蛋白银和银浸法染色技术对采自青岛小西湖的小腔游仆虫(*Euplotes aediculatus*)的形态学及细胞发生学进行了详尽的研究, 并在完整的形态学及发生学研究基础上, 测定了小腔游仆虫的核糖体小亚基基因(SSU rDNA)序列, 通过序列比较和分子系统树构建等方法, 对小腔游仆虫的系统地位进行了分析。结果表明: 本种鉴别特征为9根额腹棘毛, 5根横棘毛, 2根缘棘毛, 2根尾棘毛, 8列背触毛, double-*eurystomus*型银线系。发生学特征包括: (1)后仔虫口原基在表皮下独立发生, 前仔虫完全继承老口围带; (2)额-腹-横棘毛原基从左向右按照3:3:3:2:2的模式形成额腹棘毛和横棘毛; (3)前后仔虫最左侧额腹棘毛分别由独立产生的原基形成; (4)缘棘毛原基独立发生; (5)初级背触毛原基来自虫体中部老结构的反分化; (6)前后仔虫尾棘毛分别来自最右侧2列背触毛原基和老背触毛列末端; 这些特征显示出游仆虫属个体发生模式的高度保守性。分子系统分析与形态学数据一致, 即游仆虫属为单元发生, 且小腔游仆虫与艾美游仆虫(*Euplotes amieti*)、阔口游仆虫(*E. eurystomus*)和伍氏游仆虫(*E. woodruffi*)聚在一起。

关键词: 纤毛虫; 小腔游仆虫; 形态学; 细胞发生; 系统学; 核糖体小亚基基因(SSU rDNA)

Morphology, ontogeny and molecular phylogeny of *Euplotes aediculatus* Pierson, 1943 (Ciliophora, Euplotida)

Xue Zhang¹, Yurui Wang¹, Yangbo Fan^{1,2}, Xiaotian Luo¹, Xiaozhong Hu¹, Feng Gao^{1*}¹ College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003² School of Civil and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology (Shenzhen), Shenzhen, Guangdong 518055

Abstract: Euplotids are the most complex and highly differentiated group of ciliates. In order to further explore the species diversity of euplotids, the morphology and morphogenesis of *Euplotes aediculatus*, collected from Small West Lake of Qingdao, were investigated using live observations, protargol, and silver nitrate impregnation. Based on the detailed morphological and morphogenetic data, the small subunit ribosomal rDNA (SSU rDNA) was sequenced for *E. aediculatus*. The species is characterized by the following features: nine frontoventral, five transverse, two left marginal, and two caudal cirri, eight dorsal kineties, and a silverline system of the double-*eurystomus* type. The main morphogenetic features during division are as follows: (1) the oral primordium of the opisthe develops de novo within a pouch beneath the cortex, the parental adoral zone of membranelles is entirely kept by the proter; (2) fronto-ventral-transverse cirral anlagen (FVTA) II–VI form cirri in the mode of 3:3:3:2:2; (3) frontal cirrus I/1 of the proter and opisthe is generated from the anlage formed de novo; (4) marginal cirri anlagen are formed de novo; (5) the primary dorsal kinety anlagen are from the dedifferentiation of several bristles in the middle of each parental dorsal kinety; (6) the right-most two dorsal kinety anlagen and parent dorsal kineties contribute to two caudal cirri for the proter and the opisthe, respectively. All of these features showed the high conservation of the ontogenetic process in the genus *Euplotes*. Sequence comparison and phylogenetic analyses based on SSU rDNA revealed a close relationship among *Euplotes aediculatus*, *E. eurystomus*, *E. amieti*, and *E. woodruffi*, which is consistent with their similar morphology.

Key words: ciliates; *Euplotes aediculatus*; morphology; morphogenesis; phylogeny; small subunit ribosomal rDNA (SSU rDNA)

收稿日期: 2017-02-18; 接受日期: 2017-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(31430077, 31572230)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: gaof@ouc.edu.cn

纤毛虫原生动物为单细胞真核生物,种类繁多,其自由生活的类群广泛分布于海洋、淡水和土壤等各种生境,甚至在苔原、极地和高盐等极端生境中也有发现,还有一些类群营寄生或共栖生活(Pan et al, 2015; Qu et al, 2015; Dong et al, 2016; Li et al, 2016)。纤毛虫高度分化的细胞器、各司不同功能的两型核结构以及特有的有性生殖方式(接合生殖),使其作为重要的模式生物在细胞生物学、遗传学、生态学以及真核生物的起源和进化等领域具有重要的研究价值(Corliss, 1979; Lynn, 2008; 宋微波等, 2009)。

游仆类是纤毛虫中进化最为复杂和高等的一大类群,其多样性、发生学及系统学一直是国内外研究的热点(Carter, 1972; Curds, 1975; Shao et al, 2010; Yi et al, 2012)。经典的系统分类中,游仆类隶属于纤毛虫中的腹毛类(Kahl, 1932; Borror, 1972; Corliss, 1979; Borror & Hill, 1995),但也有研究认为,游仆类与典型的腹毛类均为独立的亚纲级阶元(Adl et al, 2012; Gao et al, 2016)。游仆虫属(*Euplotes*)是游仆类中种类最多的一个属,目前属内已知物种70余种,广泛分布于海洋、淡水、土壤等各种生境(Curds, 1975; Curds & Wu, 1983; 宋微波等, 2009; Syberg-Olsen et al, 2016)。本属的基本特征为高度背腹扁平,腹面纤毛分化形成额腹棘毛、横棘毛、尾棘毛等,以此作为支撑、爬行于基质上;背面纤毛退化为触毛,成列分布;体表不同程度盔甲化,背面常有纵行的肋突结构;口围带高度发达,通常占体长的1/2以上;口侧膜单片(Curds, 1975; 宋微波等, 2009; Jiang et al, 2010b)。本属普遍存在特殊的背面银线系,可分为single-vannus型、double-eurystomus型、double-patella型、multiple型和complex型,为种间鉴定的重要依据之一(Curds, 1975; 谢冬梅等, 2016)。种间因具有极相似的形态特征(例如体型、大小、纤毛图式、皮层结构等)而导致种类划分相当困难。然而,诸如额腹棘毛、横棘毛、缘棘毛及尾棘毛的产生方式及数目在不同种间存在差异,因而成为种类区分的重要依据。

Pierson (1943)基于美国的多个淡水种群和4个低盐度咸水(盐度2.3‰)种群对小腔游仆虫(*Euplotes aediculatus*)进行了首次报道,之后,国外多位学者对该种进行了研究。由于小腔游仆虫和阔口游仆虫(*E. eurystomus*)在体型、纤毛图式、银线系模式等方

面有许多相同之处,长期以来这2个种常被混淆。

Pierson等(1968)提供了2个种详细的形态学区别特征,并对以往报道进行了鉴别分析。庞延斌和魏红兵(1999)报道了小腔游仆虫上海种群的形态学特征,并首次提供了细胞发生学信息,这是中国种群的唯一报道。虽然关于小腔游仆虫的研究很多,但缺乏在详细的形态学基础上的分子系统学研究。

本工作基于小腔游仆虫青岛小西湖种群的形态学及发生学研究,提供了详细的活体特征、纤毛图式信息、完整的细胞发生时期银染照片及描述;并在准确的物种鉴定基础上,测定了其核糖体小亚基基因(SSU rDNA)序列,通过序列比较和分子系统树构建等方法对其系统地位进行了分析。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

本种于2013年10月10日利用直接采水法采自青岛小西湖,水温约20℃,淡水,湖水较清澈。样品采集后,在实验室将水样直接倒入培养皿中,解剖镜下去除大型后生动物及多余沉积物,加入适量米粒维持细菌繁殖,以供纤毛虫摄食,室温(约20℃)培养2–3天。

1.2 形态学和细胞发生学研究

在解剖镜下观察培养皿中虫体的体色、外形(包括柔软度、伸缩性等)及自由运动方式等;微吸管挑取虫体并吸取少量原位水置于载玻片上,进行活体压片(Foissner, 1991),在显微镜下用明视野和微分干涉观察(放大倍数100–1,000×)虫体细节特征,包括大小、纤毛器、伸缩泡、表膜皮层结构(有无皮层颗粒、表膜泡等结构)、射出体、内质及核器等特征。用蛋白银染色法(Wilbert, 1975)和银浸染色法(Foissner, 2014)对虫体进行染色并制成永久制片,显示其纤毛图式、核器结构及银线系特征。在显微镜下对虫体各特征进行数据统计,使用绘图器绘制虫体纤毛图式及核器。本文所涉及名词及术语参照宋微波等(2009)。

1.3 DNA提取、基因扩增与测序

挑取虫体并用抽滤(滤膜规格0.22 μm)后的原位水洗净,使用DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany)试剂盒提取虫体基因组DNA,具体操作步骤参见试剂盒说明书。核糖体小亚基基因(SSU rDNA)序列的扩增使用真核生物通用引物18s-F

(5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3')和18s-R (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') (Medlin et al, 1988)。PCR扩增后, 产物直接送测序公司测序(Yi et al, 2009)。

1.4 分子系统学分析

除本文新测序列外, 其余72条序列均来自GenBank数据库。原腹毛亚纲作为外类群。

使用在线服务器GUIDANCE2 Server (<http://guidance.tau.ac.il/index.html>)进行序列比对, 算法选择MAFFT, 其余参数为默认值。比对之后根据每列的得分, 将0.6以下的位点删除, 并删除两端的引物序列, 最后剩余1,958个位点构建系统树。使用在线服务器CIPRES Science Gateway (<http://www.phylo.org>)构建分子系统树。使用在线软件RAxML-HP2 v8 on XSEDE (Stamatakis et al, 2008)构建最大似然树(maximum likelihood, ML), 选择Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall, 1998)筛选的GTR + I + G作为最优模型, 节点置信值来自

1,000叠代重复抽样; 贝叶斯树(Bayesian inference, BI)使用在线软件MrBayesian v3.2.6 on XSEDE (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)构建, 选择MrModeltest v.2 (Nylander, 2004)筛选的GTR + I + G作为最优模型, MCMC模拟运行两组四条链10,000,000代, 每100代取样1次, 前10,000棵树舍弃, 剩余的树用来计算后验概率。使用MEGA 6.0 (Tamura et al, 2007)调整树形。分类系统参见Gao等(2016)。

2 结果

2.1 形态学描述

活体状态下, 小腔游仆虫虫体腹面观呈卵圆形至方形, 前端较方阔, 后端钝圆, 虫体前端有一非常透明的颌状突起, 从虫体右侧1/4处绕至虫体左侧1/4处, 最高处约10 μm ; 个体大小较稳定, 长150–170 μm , 宽100–120 μm , 厚幅比约为1:3, 背面稍隆起, 具6条明显的肋突(背触毛着生), 腹面扁平, 无明显肋突(图1A; 图2A–C)。胞质无色, 虫体口区

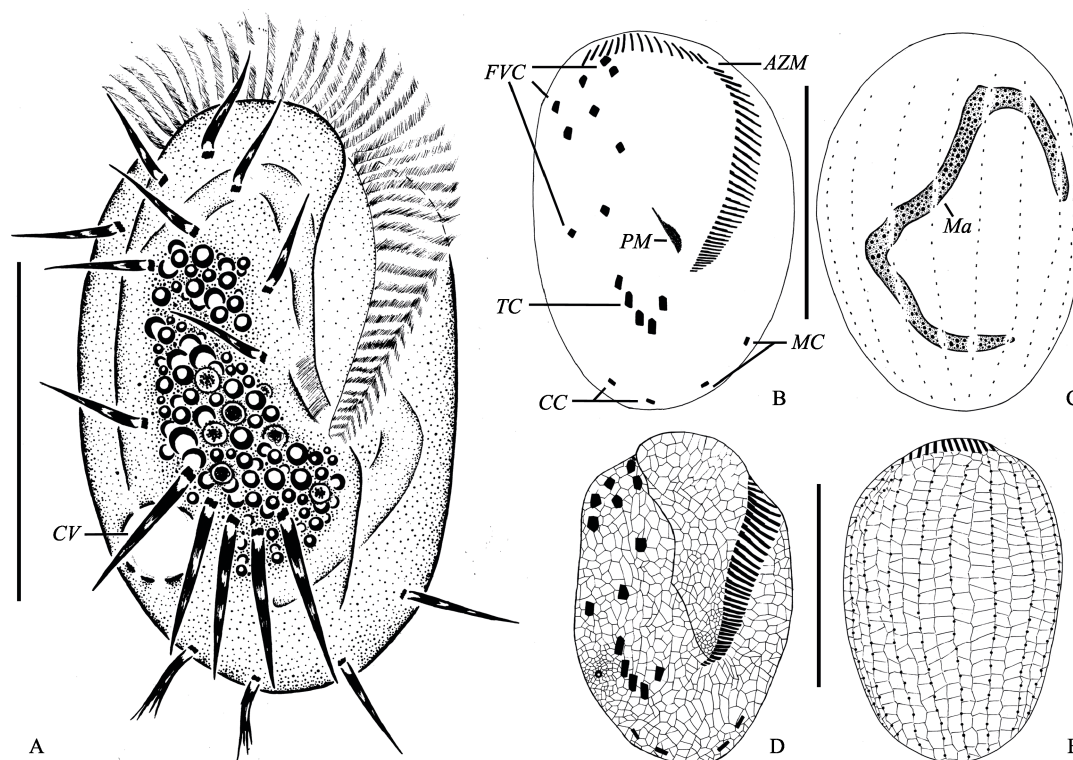


图1 小腔游仆虫的活体、蛋白银染色及银浸法染色的形态。A: 典型个体腹面观; B、C: 纤毛图式腹面(B)和背面(C)观; D、E: 腹面(D)和背面(E)银线系。AZM: 口围带; CC: 尾棘毛; CV: 伸缩泡; FVC: 额腹棘毛; Ma: 大核; MC: 缘棘毛; PM: 口侧膜; TC: 横棘毛。比例尺: 100 μm 。

Fig. 1 Morphology of *Euplotes aediculatus* in vivo, after protargol and silver nitrate impregnation. A, Ventral view of a representative individual; B and C, Ventral (B) and dorsal (C) view of the infraciliature and nuclear apparatus; D and E, Silverline system on ventral (D) and dorsal side (E); AZM, Adoral zone of membranelles; CC, Caudal cirri; CV, Contractile vacuole; FVC, Frontoventral cirri; Ma, Macronucleus; MC, Marginal cirri; PM, Paroral membrane; TC, Transverse cirri. Scale bar = 100 μm .

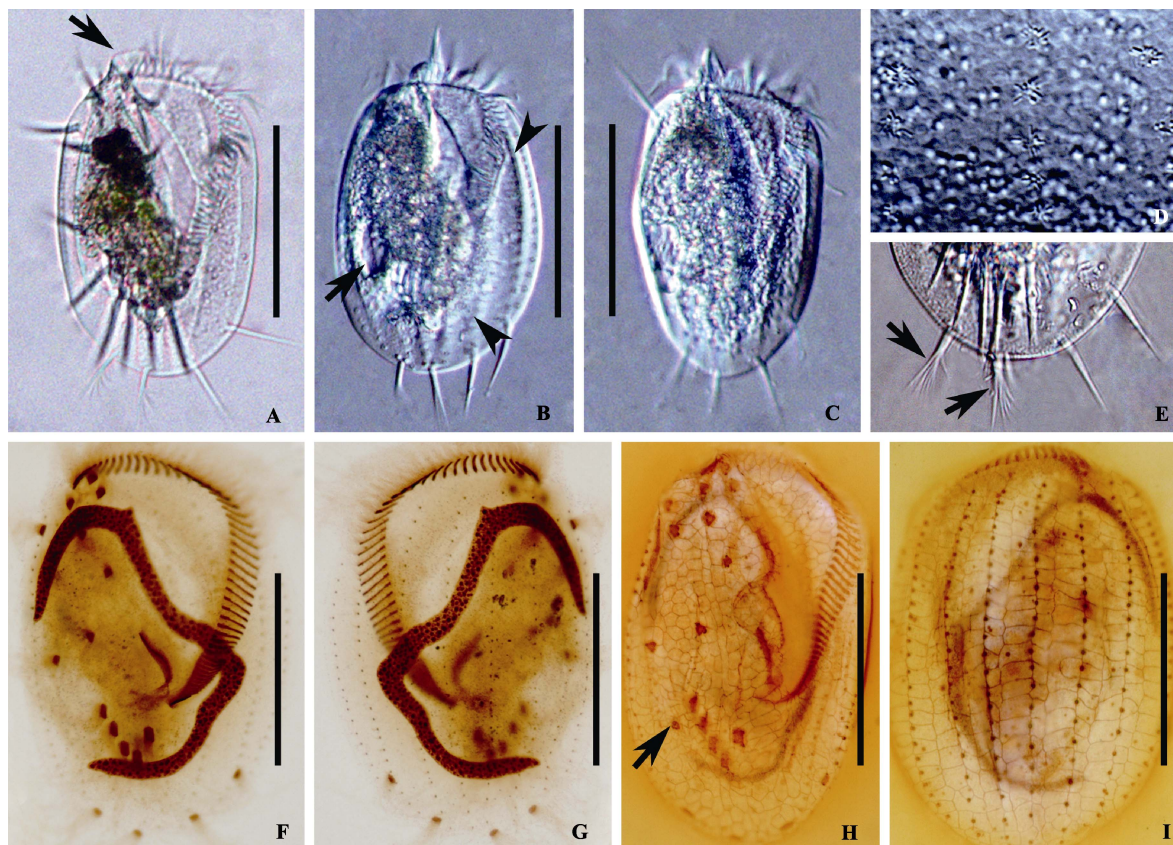


图2 小腔游仆虫的形态结构。A–E: 小腔游仆虫的活体照片; F, G: 蛋白银染色照片; H, I: 银浸法染色照片。A: 典型个体腹面观, 箭头示颌状结构; B, C: 不同个体腹面观示不同体型, B图箭头指示伸缩泡, 无尾箭头指示背面肋突; D: 示虫体背面围绕背触毛的皮层颗粒; E: 虫体后部腹面观, 示缘棘毛和分叉的尾棘毛; F, G: 纤毛图式腹面(F)和背面(G)观; H, I: 腹面(H)和背面(I)银线系, H图箭头指示伸缩泡。比例尺: 100 μm 。

Fig. 2 Morphology of *Euplotes aediculatus*. A–E, Photomicrographs in vivo; F and G, Photomicrographs after protargol; H and I, Photomicrographs after silver nitrate impregnation. A, Ventral view of a representative individual, arrow points to collar; B and C, Ventral views, showing different body shapes, arrow in picture B points to contractile vacuole, arrowheads in picture B point to ribs in the back; D, Dorsal view, showing the cortical granules arranged around the dorsal cilia; E, Posterior portion of an individual, showing the caudal cirri (arrows) and the left marginal cirri; F and G, Ventral (F) and dorsal (G) view of the infraciliature and nuclear apparatus; H and I, Silverline system on ventral (H) and dorsal side (I), arrow in picture H points to contractile vacuole. Scale bar = 100 μm .

及边缘区域透明, 口后中部区域由于含有食物泡和许多内质颗粒而呈灰黑色(图1A; 图2A–C)。背面皮膜下具无色针棒状皮层颗粒, 长约1 μm , 7–9个为一组, 呈花环状聚在背触毛基部(图2D)。单一伸缩泡位于最右侧横棘毛下方偏右处(图1A, 图2B), 舒张状态直径约25 μm , 舒张时间约90 s, 舒张状态变为收缩状态只需1 s。腹面观具一枚镜像“C”型大核, 左上部有一凹陷。运动方式为典型的游仆类爬行方式, 即依靠腹面棘毛爬行于基质, 速度较快。

口区阔大呈倒三角形, 约占体长的2/3; 口围带由47–55片小膜构成(表1), 从腹面额腹棘毛前端处(约3片小膜)绕到背面颌状突起处(约12片小膜), 再绕回腹面并延伸至体长2/3处, 腹面小膜基本呈平

直排布或稍微向内弯曲; 口侧膜位于口围带末端右侧口唇下方, 由不规则排列的毛基粒组成(图1B, 图2F)。

棘毛数较恒定(表1): 具9根额腹棘毛; 5根横棘毛; 2根左缘棘毛(图1B; 图2F); 2根尾棘毛, 且活体状态下尾棘毛末端纤毛呈分散状(图1A, 图2A, E)。活体状态下, 额腹棘毛及缘棘毛长约40 μm , 横棘毛较粗壮(长约45–50 μm), 尾棘毛稍短(约35–40 μm)。背触毛恒为8列, 中间一列具21–26对毛基粒, 最左侧一列具15–23对毛基粒(图1C, 图2G, 表1)。背面银线系为double-eurystomus型(图1E, 图2I), 腹面银线系可见伸缩泡开口位于最右侧横棘毛的右侧(图2H)。

表1 小腔游仆虫青岛小西湖种群的形态学数据。所有数据均来自蛋白银染色制片。
Table 1 Morphometric characterizations of *Euplotes aediculatus* from Small West Lake of Qingdao based on protargol-stained specimens

特征 Character	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Mean	中值 Median	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation	个体数 Number of cells
体长 Length of body (μm)	115	142	128.3	129	7.25	5.7	20
体宽 Width of body (μm)	76	101	92.2	93.5	6.28	6.8	20
口区长 Length of adoral zone (μm)	79	98	86.3	86.5	4.74	5.5	20
口围带小膜数目 Number of adoral membranelles	47	55	51.1	51.5	1.90	3.7	20
额腹棘毛数目 Number of frontoventral cirri	9	9	9	9.0	0	0	19
横棘毛数目 Number of transverse cirri	5	5	5.0	5.0	0	0	20
缘棘毛数目 Number of marginal cirri	2	2	2.0	2.0	0	0	20
尾棘毛数目 Number of caudal cirri	2	2	2.0	2.0	0	0	20
背触毛列数 Number of dorsal kineties	8	8	8.0	8.0	0	0	20
中央背触毛列毛基体数目 Number of dikinetids in mid-dorsal kinety	21	26	21.9	21.0	1.36	6.2	20
最左侧背触毛列毛基体数目 Number of dikinetids in the leftmost dorsal kinety	15	23	18.5	18.0	1.73	9.4	20

2.2 细胞发生学描述

2.2.1 口器

口器发生起始于后仔虫(细胞横二分裂时位于分裂沟后部的子代, 与前仔虫相对)口原基的出现, 后仔虫的口原基独立形成于老口围带下方皮膜深层的龛腔内, 最初为一团无序的毛基粒群(图3A)。随着毛基粒的快速增殖, 龛腔增大, 口原基开始从前向后组装成新的小膜并逐渐向表层延伸(图3A–C, E, F)。最终扩展至皮膜表层, 并向右弯折形成后仔虫的口围带(图3H)。

后仔虫的波动膜原基于皮膜深层的龛腔内形成于口原基末端附近, 并随着细胞发生的进行, 逐渐增殖, 最终发育为后仔虫的波动膜(图3B, C, E, F, H)。整个细胞发生过程中, 老口围带和波动膜均完全保留, 由前仔虫继承(图3E, H)。

2.2.2 腹面棘毛

口原基形成的同时, 口区右侧横棘毛前部区域独立产生两组各有5列短的由疏松毛基粒形成的线状额–腹–横棘毛原基(自左至右为原基II–VI), 但由于时期的缺乏, 我们无法判断是否为次级发生型(图3A)。随着毛基粒的增殖, 每列原基逐渐变粗, 并开始发生断裂, 5列额–腹–横棘毛原基列以3:3:3:2:2的模式断裂(图3B, C, E, F)。最后新形成的棘毛迁移至最终位置, 形成前后仔虫的腹面棘毛: 原基II–VI各贡献最下方的1根棘毛共形成5根横棘毛, 其余8根棘毛均为额腹棘毛(图3H)。

额–腹–横棘毛原基断裂时, 在皮膜表层前仔虫额–腹–横棘毛原基及老口侧膜左上方独立产生一组毛基粒, 此为前仔虫最左侧额–腹–横棘毛原基I; 相应的, 后仔虫的最左侧额–腹–横棘毛原基I独立产生于后仔虫波动膜原基的左上方(图3B, C, E, F)。随后, 两组原基增殖并迁移至其最终位置, 形成前后仔虫新的最左侧额腹棘毛(图3H)。

2.2.3 缘棘毛

当额–腹–横棘毛原基开始形成片段的时候, 前后仔虫的缘棘毛原基分别于老口围带和后仔虫口原基末端左侧附近独立形成(图3B)。之后, 两组原基逐渐增殖变粗, 并最终断裂形成前后仔虫的两根缘棘毛(图3C, E, F, H)。

2.2.4 背触毛及尾棘毛

背触毛原基于每一列老背触毛列的中线处由老结构反分化形成, 为典型的初级发生模式(图3D)。随后, 背触毛原基分成前后两组, 分别向前后两端迁移, 形成前后仔虫的背触毛列, 并最终替代老结构(图3H)。

前仔虫最右侧两列背触毛原基末端各形成1根尾棘毛, 后仔虫最右侧两列老背触毛末端各形成1根尾棘毛, 并随着背触毛列向两端移动, 迁移至最终位置(图3G)。

2.2.5 核器

大核在细胞发生过程中, 逐渐由左上部有一凹陷的镜像“C”型形成短棒状(图3E, F); 至细胞发生

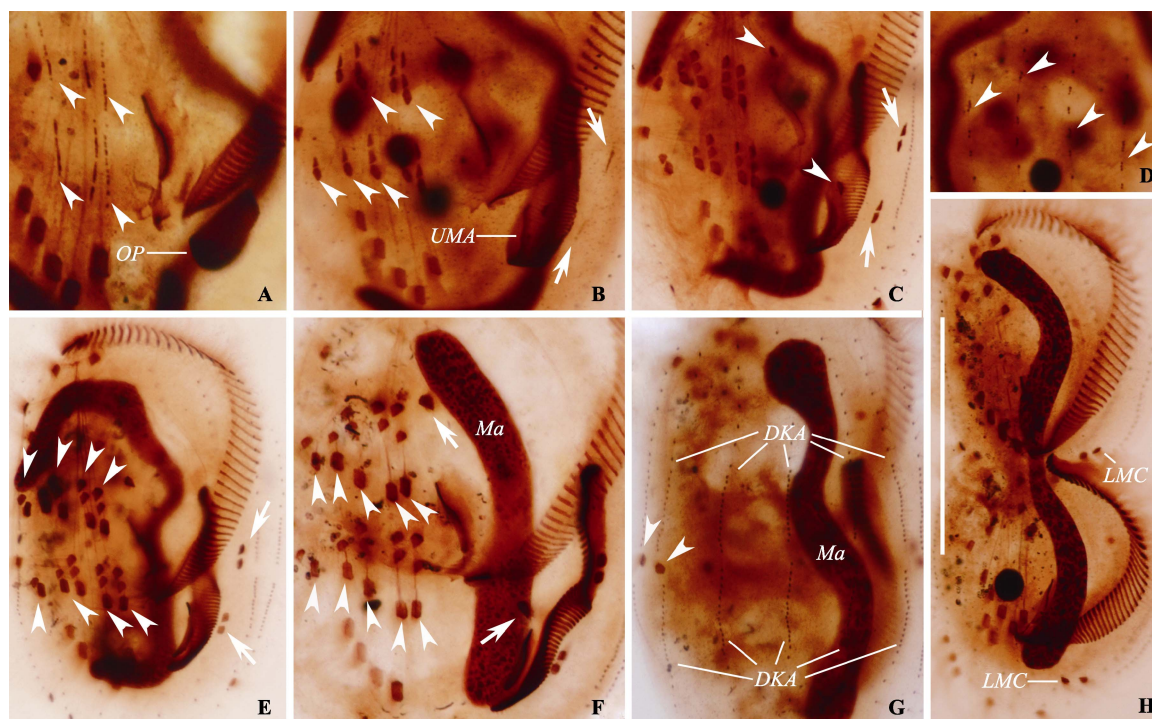


图3 小腔游仆虫细胞发生个体银染制片的显微照片。A: 发生早期个体, 示后仔虫口原基出现, 短箭头示前后仔虫的额-腹-横棘毛原基; B: 发生早中期个体腹面观, 短箭头示额-腹-横棘毛原基增粗并开始发生断裂, 长箭头示前后仔虫的缘棘毛原基; C: 发生中期个体腹面观, 示额-腹-横棘毛原基断裂形成棘毛, 短箭头示前后仔虫的最左侧一根额腹棘毛, 长箭头示缘棘毛原基开始断裂形成缘棘毛; D: 发生早中期个体背面观, 短箭头示新形成的背触毛原基; E: 发生中期个体腹面观, 短箭头示额-腹-横棘毛片段化基本完成并开始迁移, 长箭头示前后仔虫新的缘棘毛; F: 发生后中期个体腹面观, 短箭头示前后仔虫的横棘毛, 长箭头示最左侧一根额腹棘毛, 此时大核呈棒状; G: 发生后中期个体背面观, 短箭头示前仔虫新形成的尾棘毛; H: 发生末期个体腹面观, 示新形成棘毛基本迁移至其最终位置, 大核开始发生分裂。DKA: 背触毛原基; LMC: 左缘棘毛; Ma: 大核; OP: 后仔虫口原基; UMA: 波动膜原基。比例尺: 70 μm 。

Fig. 3 Photomicrographs of *Euplotes aediculatus* during morphogenesis after protargol impregnation. A, Ventral view of an early divider, showing the oral primordium in opisthe, arrowheads mark the frontal-ventral-transverse cirral streaks of both dividers; B, Ventral view of an early-middle divider, arrowheads show the differentiation of frontal-ventral-transverse cirral anlagen, arrows marks the marginal anlagen; C, Ventral view of a mid-stage divider, arrowheads demonstrate the leftmost frontal cirrus (I/1) in both proter and opisthe, arrows marks the differentiation of marginal anlagen; D, Dorsal view of an early-middle divider, arrowheads show the formation of dorsal kineties anlagen; E, Ventral view of another mid-stage divider, arrowheads show the differentiation of frontal-ventral-transverse cirral anlagen almost complete, arrows point to the new marginal cirri of both daughter cells; F, Ventral view of a late divider, noting the macronucleus become a short strand, arrowheads show the transverse cirri, arrows mark the leftmost frontal cirri (I/1); G, Dorsal view of another late divider, arrowheads show the newly formed caudal cirri in the proter; H, Ventral view of a last stage divider, showing cirri almost in their final position and the division of the macronucleus. DKA, Dorsal kineties anlagen; LMC, Left marginal cirri; Ma, Macronucleus; OP, Opisthe's oral primordium; UMA, Undulating membrane anlagen. Scale bar = 70 μm .

末期, 大核分裂, 分别在前后仔虫中形成新的大核 (图3G, H)。

2.3 分子系统学分析

小腔游仆虫青岛小西湖种群的SSU rDNA序列已提交至GenBank数据库, 序列号为KY921848。该序列包含1,809个碱基, G + C含量为44.44%。

我们选择GenBank中有SSU rDNA序列信息的游仆目5个科(楯纤虫科、舍太虫科、游仆虫科、腹棘虫科和尾刺虫科)的代表类群, 并以原腹毛亚纲

作为外类群构建了系统进化树(图4)。结果显示: (1) 以游仆虫属为代表的游仆虫科为明确的单源发生(100% ML, 1.00 BI); (2) 来自GenBank的小腔游仆虫的6个种群与阔口游仆虫(AF452707)以满分置信值聚为一支, 之后与本工作新测序的小腔游仆虫种群聚为姐妹支(100% ML, 1.00 BI)。序列比对结果显示, 本工作新测序的小腔游仆虫的SSU rDNA序列与姐妹支内各种群序列最少相差19个碱基, 最多相差29个碱基(图5)。

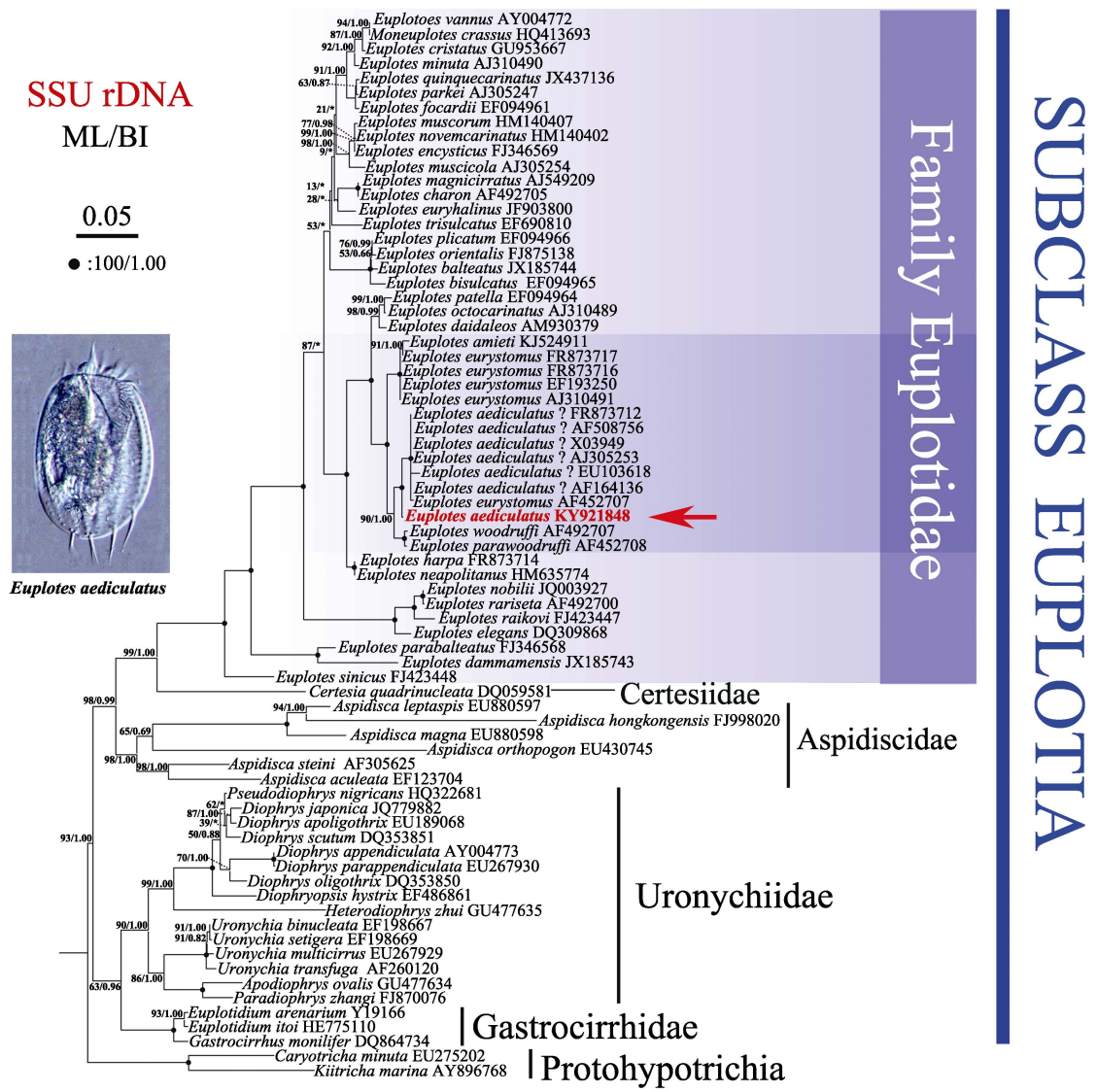


图4 基于核糖体小亚基基因序列构建的最大似然树。本文新测序列加粗显示。节点置信值以最大似然树/贝叶斯树顺序给出。黑点表示满分支置信值(100/1.00), “*”表示贝叶斯树与最大似然树拓扑结构不同。比例尺代表每100个碱基位点中有5个碱基替代。Fig. 4 Maximum likelihood (ML) tree based on small subunit ribosomal DNA sequences. Newly characterized sequence in this study is shown in bold. The numbers at the nodes represent the support values of ML/Bayesian inference (BI). Fully supported (100/1.00) branches are marked with solid circles. Asterisks reflect the disagreement between ML and BI. All branches are drawn to scale. The scale bar corresponds to five substitutions per 100 nucleotide positions.

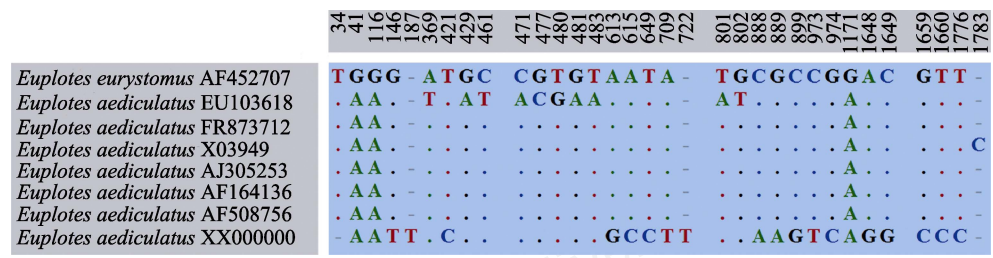


图5 7个*Euplotes aediculatus*种群及1个*E. eurystomus*种群的SSU rDNA碱基差异比较。数字代表比对后的碱基所在位置, 缺失位点用(-)表示, 比对一致的碱基用(.)表示。Fig. 5 Unmatched sites from SSU rDNA sequence alignment of seven *Euplotes aediculatus* populations and one *E. eurystomus* population. Numbers indicate the positions of nucleotides in the alignment, missing sites are represented by dashes (-), and matching sites are marked with dots (.).

3 讨论

3.1 形态学比较

3.1.1 小腔游仆虫青岛小西湖种群与其他种群的形态学比较

小腔游仆虫是淡水生境中常见的游仆虫种类之一,多位学者对该种进行了报道(Pierson, 1943; Tuffrau, 1960; Pierson et al, 1968; Carter, 1972; 庞延斌和魏红兵, 1999)。本文对小腔游仆虫青岛种群给出了首次报道,青岛小西湖种群的主要形态学特征(体型卵圆形,腹面无肋突,背触毛着生于6列较明显的脊上;口区右缘明显的小腔;镜像“C”型大核;纤毛图式)与模式种群完全一致,因此将本种群鉴定为小腔游仆虫。

本种群与形态描述较全的几个种群的腹面棘毛模式、背面银线系等特征也都高度一致,种群间的区别主要如下:与Pierson等(1968)报道的美国马里兰种群和美国华盛顿种群相比,本种群具更多口围带小膜(47–55片 vs. 约40片);庞延斌和魏红兵(1999)报道了上海种群并提供了细胞发生信息,本种群与上海种群的区别在于个体大小($150\text{--}170\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{--}120\text{ }\mu\text{m}$ vs. $120\text{--}130\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{--}85\text{ }\mu\text{m}$)及口围带小膜数(47–55片 vs. 40–50片)。前人的研究认为Tuffrau (1960)以及Carter (1972)报道的以阔口游仆虫为名的种群,实际均为小腔游仆虫(Pierson et al, 1968; Curds, 1975; 庞延斌和魏红兵, 1999)。本种群与Carter种群的主要区别在于本种群个体稍大($150\text{--}170\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{--}120\text{ }\mu\text{m}$ vs. $121.5\text{--}135\text{ }\mu\text{m} \times 73.5\text{--}85.5\text{ }\mu\text{m}$),但中间一列背触毛毛基粒较少(21–26 vs. 28–31),且Carter报道的3个种群中,只有1个种群背触毛恒为8列,与我们的种群相同,另外2个种群背触毛则恒为9列。虽然本研究的种群与前人研究的种群个体大小、口围带小膜数目稍有差异,但均属于种群间差异,因此为同种。

3.1.2 与属内相近种的形态学比较

20世纪初期以前,作者仅以体型大小、背面的脊、腹面棘毛的排列做为游仆虫的分类依据(Kahl, 1932)。之后,蛋白银染色方法和银浸染色方法的应用使得额腹棘毛数目、口围带形状和小膜数目、背触毛列数、大核形状和银线系成为重要的分类标准(Tuffrau, 1960; Carter, 1972; Curds, 1975)。由于早期研究缺乏详细的棘毛数目、银线系模式等形态学信

息,并且一些种有相同或相似的体型、大小、额腹棘毛数目、背触毛列数等特征,这些都使得游仆虫属的分类存在极大的混乱和困难。目前,属内已知种多达70余种(Tuffrau, 1960; Curds, 1975; Syberg-Olsen et al, 2016)。形态特征的不同组合形成了游仆虫不同程度的种间差异,其中额腹棘毛数目和银线系类型是非常重要且稳定的种间区分依据。除小腔游仆虫之外,具9根额腹棘毛和double-eurystomus型银线系的淡水生游仆虫还有4种:艾美游仆虫(*Euplotes amieti*)、阔口游仆虫、伍氏游仆虫(*E. woodruffi*)和芬克游仆虫(*E. finki*)。小腔游仆虫具以下特征可与这4种明显区分(表2): (1)活体状态和染色后呈现的纤毛图式口围带均呈垂直或平滑弧形,而阔口游仆虫和艾美游仆虫为“S”型——腹面口围带有弯曲; (2)背面具6列明显肋突,而阔口游仆虫和艾美游仆虫无明显肋突; (3)背触毛列数8列,而阔口游仆虫具8–12列,艾美游仆虫具12–15列,伍氏游仆虫具9–10列,芬克游仆虫具7列; (4)大核形状镜像“C”型且左上部有一凹陷,而阔口游仆虫“3”字型,伍氏游仆虫为“T”或“Y”型,芬克游仆虫为“C”到“J”型(Curds, 1975; Foissner, 1982; Dragesco, 2003; Dai et al, 2013; Liu et al, 2015)。

3.2 细胞发生学比较

小腔游仆虫的形态学报道虽然较多,但是仅庞延斌和魏红兵(1999)的上海金山卫种群提供了发生学信息。根据对小腔游仆虫青岛小西湖种群无性生殖期间形态发生的跟踪观察,本研究结果与庞延斌和魏红兵(1999)报道的上海金山卫种群的细胞发生过程一致,这说明小腔游仆虫具有稳定的发生学特征。

游仆虫属内大约有30个种有发生学报道,属内发生模式有较高的稳定性,即:老的口围带和口侧膜完全被保留,由前仔虫继承;后仔虫口侧膜原基来自于口原基(深层);前后仔虫的第1额腹棘毛均来源于独立发生的原基;左缘棘毛原基独立发生等(Washburn & Borror, 1972; Ruffolo, 1976; Shao et al, 2010; Fotedar et al, 2016)。小腔游仆虫细胞发生过程符合以上典型的游仆虫属发生模式。但是,属内各种之间的发生学特征也存在细微差异。Shao等(2010)根据额腹棘毛、横棘毛的形成模式及数目排布将游仆虫属的发生类型分为5类: *raikovi*型、*orientalis*型、*eurystomus*型、*affinis*型和*charon*型,根据尾棘毛的

表2 具double-eurystomus型银线系和9根额腹棘毛的淡水游仆虫的形态学比较

Table 2 Comparisons of freshwater <i>Euploates</i> with a double-eurystomus type of dorsal silverline system and consistently nine frontoventral cirri											
特征 Character	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>	艾美游仆虫 <i>E. amietii</i>
大小 Cell size in vivo (μm)	130-200 × 70-100	140-240 × 80-160	100-160 × 40-90	100-160 × 40-90	150-170 × 100-120	120-130 × 80-85	av. 132 × 84	121.5-135 × 73.5-85.5	110-160 × 60-80	ca. 60 × 40	ca. 60 × 40
虫体特征 Body features	口围带“S”型 Sigmoid adoral zone of membranelles (AZM)	口围带“S”型 Sigmoid AZM	口围带“S”型 Sigmoid AZM	口围带“S”型 Sigmoid AZM	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back	口围带垂直或平滑弧形; 背面具6条肋突 AZM is vertical or smooth curved; with 6 ribs on the back
口围带小膜数目 Number of adoral membranelles	60-65	53-67	50-65	50-65	52-70	40-50	-	48-52	59-70	19-22	19-22
背触毛列数 Number of dorsal kineties	12-14 (13)	12-15	8-12	8-12	8	ca. 8	-	8(9)	9-10	ca. 7	ca. 7
中间一列背触毛 Number of dikinetids in mid-dorsal kinety	18-26	21-28	17-25	17-25	21-26	-	-	28-31	ca. 22	ca. 10	ca. 10
大核 Macronucleus	“3”字型 “3”-shaped	“3”字型 “3”-shaped	“3”字型 “3”-shaped	“3”字型 “3”-shaped	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side	镜像“C”型, 左上部有一凹陷 Mirror-image “C” shaped, with an depression on the upper left side
参考文献 Data source	Liu et al (2015)	Dragesco, (1970, 2003)	Curds (1975)	Tuffaru (1960)	本工作 Present work	Pang and Wei (1999)	Pierson (1943)	Carter (1972)	Pierson et al (1968)	Dai et al (2013)	Foissner (1982)

“-”代表文章未提供该信息。 “-” represents the information not available in the article.

形成方式将发生类型分为3类: *focardii*型、*vannus*型和 *charon*型。而小腔游仆虫额-腹-横棘毛原基的形成模式为典型的 *eurystomus* 型, 即 FVT 原基以 3:3:3:2:2 方式断裂, 最终以9根额棘毛、5根横棘毛(棘毛 VI/2 在 V/2 稍后方)模式排布, 尾棘毛形成类型为大多数种的 *focardii*型, 即前、后仔虫的最右侧2列背触毛列原基后方各产生1根尾棘毛, 形成的尾棘毛数量恒定。左缘棘毛原基独立产生后两组原基逐渐增殖变粗, 并最终断裂形成前后仔虫的2根缘棘毛, 而不同于该属内部分种类, 例如: 稀毛游仆虫(*Euplotes rariseta*)仅产生1根缘棘毛(Ma et al, 2008)。

3.3 系统学比较

Borror 和 Hill (1995) 根据皮层结构(银线系类型)、内共生体、统计学数据以及发生学模式等将游仆虫属分为4个属: *Euplotes*、*Euplotopsis*、*Euplotoides* 和 *Moneuplotes*。但是此划分受到随后的系统学研究结果的质疑(Yi et al, 2009; Jiang et al, 2010a; Di Giuseppe et al, 2014; Chen et al, 2015), 因此有研究者建议将4个属恢复到原来的单一的游仆虫属(Liu et al, 2015), 本工作的分子系统分析也支持此观点。

基于 SSU rDNA 序列信息构建的分子系统树显示, 小腔游仆虫与艾美游仆虫、阔口游仆虫、伍氏游仆虫聚在一起。这与它们的形态学数据是一致的, 即都是具9根额腹棘毛和 *double-eurystomus* 型银线系的淡水生游仆虫。但是目前已有分子信息的阔口游仆虫和小腔游仆虫若干种群均没有各自聚为一支(图4)。形态学方面, 小腔游仆虫和阔口游仆虫在个体大小、体型、纤毛图式、背面银线系模式等方面有许多相同之处, 因此, 长期以来这两个种常被混淆, 如前文提及的 Tuffrau (1960) 以及 Carter (1972) 将小腔游仆虫错误地报道为阔口游仆虫。Pierson 等 (1968) 提供的详细形态学资料证明了小腔游仆虫和阔口游仆虫的区别: (1) 口围带小膜形状(垂直或平滑弧形 vs. 明显“S”型—腹面口围带有弯曲); (2) 颌状结构(不明显 vs. 明显); (3) 背面特征(具6列明显肋突 vs. 无明显肋突); (4) 口围带后缘与中间一根横棘毛的距离(较近 vs. 较远); (5) 大核形状(镜像“C”型, 左上部有一凹陷 vs. “3”字型)。Curds (1975)、庞延斌和魏红兵(1999)也对这2种的区别做了描述。

本工作涉及的来自 GenBank 的6条小腔游仆虫

序列, 分别来自系统学分析或者共生关系研究(Sogin et al, 1986; Petroni et al, 2002; Hewitt et al, 2003; Vannini et al, 2012)。这6个种群均和阔口游仆虫(AF452707)聚为一支, SSU rDNA 序列比较显示它们与阔口游仆虫(AF452707)分别相差3个碱基、4个碱基和13个碱基, 而与我们的种群相差19–29个碱基(图5)。鉴于该6个种群都没有发表对应的形态学信息, 且小腔游仆虫和阔口游仆虫非常容易被混淆, 因此分析认为: (1) 该6个种群可能是错误鉴定的阔口游仆虫(FR873712、AJ305253、AF164136、AF508756、X03949)或者其他未知种(EU103618); (2) 如果该6个种群与本研究中的小腔游仆虫种群在形态上不能区分, 则有可能小腔游仆虫存在隐匿种(Lahr et al, 2014)。很遗憾的是, GenBank 中的所有阔口游仆虫种群也没有对应的形态学信息, 增加了对这2个相似种进行比较的难度, 未来基于完整的形态学信息的阔口游仆虫的 SSU rDNA 的分子信息将有助于解决此混乱。

致谢: 感谢宋微波教授对本文构思和成文的帮助!

参考文献

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 429–493.
- Borror AC (1972) Revision of the order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa). *Journal of Protozoology*, 19, 1–23.
- Borror AC, Hill BF (1995) The order Euplotida (Ciliophora): taxonomy, with division of *Euplotes* into several genera. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42, 457–466.
- Carter HP (1972) Infraciliature of eleven species of the genus *Euplotes*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 91, 466–492.
- Chen XM, Zhao Y, Al-Farraj SA, Saleh AQ, El-Serehy HA, Shao C, Al-Rasheid KAS (2015) Taxonomic descriptions of two marine ciliates, *Euplotes dammamensis* n. sp. and *Euplotes balteatus* (Dujardin, 1841) Kahl, 1932 (Ciliophora, Spirotrichea, Euplotida), collected from the Arabian Gulf, Saudi Arabia. *Acta Protozoologica*, 52, 73–87.
- Corliss JO (1979) *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature*. Pergamon Press, Oxford.
- Curds RC (1975) A guide to the species of *Euplotes* (Hypotri-

- chida, Ciliata). Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology, 28, 3–61.
- Curds RC, Wu ICH (1983) A review of the Euplotidae (Hypotrichida, Ciliophora). Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology, 44, 191–247.
- Dai RH, Xu KD, He YY (2013) Morphological, physiological, and molecular evidences suggest that *Euplotes parawoodruffi* is a junior synonym of *Euplotes woodruffi* (Ciliophora, Euplotida). Journal of Eukaryotic Microbiology, 60, 70–78.
- Di Giuseppe G, Erra F, Frontini F, Dini F, Vallesi A, Luporini P (2014) Improved description of the bipolar ciliate, *Euplotes petzi*, and definition of its basal position in the *Euplotes* phylogenetic tree. European Journal of Protistology, 50, 402–411.
- Dong JY, Lu XT, Shao C, Huang J, Alrasheid KA (2016) Morphology, morphogenesis and molecular phylogeny of a novel saline soil ciliate, *Lamtoystyla salina* n. sp. (Ciliophora, Hypotricha). European Journal of Protistology, 56, 219–231.
- Dragesco J (1970) Ciliés Libres du Cameroun. Annales de la Faculté des Sciences (Numéro hors série). Université Fédérale du Cameroun, Yaoundé. (in French)
- Dragesco J (2003) Infraciliature et morphométrie de vingt espèces de ciliés hypotriches recoltés au Rwanda et Burundi, comprenant *Kahliella quadrinucleata* n. sp., *Pleurotricha multinucleata* n. sp. et *Laurentiella bergeri* n. sp. Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa", 45, 7–59. (in French)
- Foissner W (1982) Ecology and taxonomy of the Hypotrichida (Protozoa: Ciliophora) of some Austrian soils. Archiv Für Protistenkunde, 126, 19–143. (in French with English abstract)
- Foissner W (1991) Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. European Journal of Protistology, 27, 313–330.
- Foissner W (2014) An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated Protozoa'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 271–292.
- Fotadar R, Stoeck T, Filker S, Fell JW, Agatha S, Al Marri M, Jiang JM (2016) Description of the halophile *Euplotes qatarensis* nov. spec. (Ciliophora, Spirotrichea, Euplotida) isolated from the hypersaline Khor Al-Adaid Lagoon in Qatar. Journal of Eukaryotic Microbiology, 63, 578–590.
- Gao F, Warren A, Zhang QQ, Gong J, Miao M, Sun P, Xu DP, Huang J, Yi ZZ, Song WB (2016) The all-data-based evolutionary hypothesis of ciliated protists with a revised classification of the phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). Scientific Reports, 6, 24874.
- Hewitt EA, Müller KM, Cannone J, Hogan DJ, Gutell R, Prescott DM (2003) Phylogenetic relationships among 28 spirotrichous ciliates documented by rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29, 258–267.
- Jiang JM, Zhang QQ, Hu XZ, Shao C, Al-Rasheid KAS, Song WB (2010a) Two new marine ciliates, *Euplotes sinicus* sp. nov. and *Euplotes parabalteatus* sp. nov., and a new small subunit rRNA gene sequence of *Euplotes rariseta* (Ciliophora, Spirotrichea, Euplotida). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 1241–1251.
- Jiang JM, Zhang QQ, Warren A, Al-Rasheid KAS, Song WB (2010b) Morphology and SSU rRNA gene-based phylogeny of two marine *Euplotes* species, *E. orientalis* spec. nov. and *E. raikovi* (Ciliophora, Euplotida). European Journal of Protistology, 46, 121–132.
- Kahl A (1932) Urtiere oder Protozoa. I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria), 3. Spirotricha. Tierwelt Dtl., 25, 399–650. (in German)
- Lahr DJG, Laughinghouse HD, Oliverio A, Gao F, Katz LA (2014) How discordant morphological and molecular evolution among microorganisms can revise our notions of biodiversity on Earth. Bioessays, 36, 950–959.
- Li LQ, Zhao XL, Ji DD, Hu XZ, Al-Rasheid KA, Al-Farraj SA, Song WB (2016) Description of two marine amphiselliid ciliates, *Amphisiella milnei* (Kahl, 1932) Horváth, 1950 and *A. sinica* sp. nov. (Ciliophora: Hypotrichia), with notes on their ontogenesis and SSU rDNA-based phylogeny. European Journal of Protistology, 54, 59–73.
- Liu MJ, Fan YB, Miao M, Hu XZ, Al-Rasheid KAS, Al-Farraj SA, Ma HG (2015) Morphological and morphogenetic re-descriptions and SSU rRNA gene-based phylogeny of the poorly-known species *Euplotes amieti* Dragesco, 1970 (Ciliophora, Euplotida). Acta Protozoologica, 54, 171.
- Lynn DH (2008) The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature, 3rd edn. Springer-Verlag, Dordrecht.
- Ma HG, Jiang JM, Hu XZ, Shao C, Song WB (2008) Morphology and morphogenesis of the marine ciliate, *Euplotes rariseta* (Ciliophora, Euplotida). Acta Hydrobiologica Sinica, 32, 57–62.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene, 71, 491–499.
- Nylander JA (2004) MrModeltest 2. 2. Department of Systematic Zoology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.
- Pan HB, Hu JX, Jiang JM, Wang LQ, Hu XZ (2015) Morphology and phylogeny of three *Pleuronema* species (Ciliophora, Scuticociliatia) from Hangzhou Bay, China, with description of two new species, *P. binucleatum* n. sp. and *P. parawiackowskii* n. sp. Journal of Eukaryotic Microbiology, 63, 287–298.
- Pang YB, Wei HB (1999) Studies on the morphology and morphogenesis in *Euplotes aediculatus*. Journal of East China Normal University (Natural Science), (1), 103–109. (in Chinese with English abstract) [庞延斌, 魏红兵 (1999) 小腔游仆虫 *Euplotes aediculatus* 形态和形态发生的研究. 华东师范大学学报(自然科学版), (1), 103–109.]

- Petroni G, Dini F, Verni F, Rosati G (2002) A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22, 118–130.
- Pierson BF (1943) A comparative morphological study of several species of *Euplotes* closely related to *Euplotes patella*. *Journal of Morphology*, 72, 125–165.
- Pierson BF, Gierke R, Fisher AL (1968) Clarification of the taxonomic identification of *Euplotes eurystomus* Kahl and *E. aediculatus* Pierson. *Transactions of the American Microscopical Society*, 87, 306–316.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817–818.
- Qu ZS, Pan HB, Hu XZ, Li JQ, Al-Farraj SA, Al-Rasheid KAS, Yi ZZ (2015) Morphology and molecular phylogeny of three ciliophorid ciliates (Protozoa, Ciliophora) from China, including two new species, *Chilodonella parauncinata* sp. n. and *Chlamydonella irregularis* sp. n. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 267–279.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Ruffolo JJ (1976) Cortical morphogenesis during the cell division cycle in *Euplotes*: an integrated study using light optical, scanning electron and transmission electron microscopy. *Journal of Morphology*, 148, 489–527.
- Shao C, Ma HG, Gao S, Khaled ARA, Song WB (2010) Re-evaluation of cortical developmental patterns in *Euplotes* (s. l.), including a morphogenetic redescription of *E. charon* (Protozoa, Ciliophora, Euplotida). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28, 593–602.
- Sogin ML, Swanton MT, Gunderson JH, Elwood HJ (1986) Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene from the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*. *Journal of Protozoology*, 33, 26–29.
- Song WB, Warren A, Hu XZ (2009) Free-living Ciliates in the Bohai and Yellow Seas, China. Science Press, Beijing. (in Chinese and in English) [宋微波, Warren A., 胡晓钟 (2009) 中国黄渤海的自由生纤毛虫. 科学出版社, 北京.]
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology*, 57, 758–771.
- Syberg-Olsen MJ, Irwin NAT, Vannini C, Erra F, Di Giuseppe G, Boscaro V, Keeling PJ (2016) Biogeography and character evolution of the ciliate genus *Euplotes* (Spirotrichea, Euplotia), with description of *Euplotes curdsii* sp. nov. *PLoS ONE*, 11, e0165442.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Tuffrau M (1960) Révision du genre *Euplotes*, fondée sur la comparaison des structures superficielles. *Hydrobiologia*, 15, 1–77. (in French)
- Vannini C, Ferrantini F, Ristori A, Verni F, Petroni G (2012) Betaproteobacterial symbionts of the ciliate *Euplotes*: origin and tangled evolutionary path of an obligate microbial association. *Environmental Microbiology*, 14, 2553–2563.
- Washburn ES, Borror AC (1972) *Euplotes raikovi* Agamaliev, 1966 (Ciliophora, Hypotrichida) from New Hampshire: description and morphogenesis. *Journal of Protozoology*, 19, 604–608.
- Wilbert N (1975) Eine verbesserte Technik der Protargolimprägung für Ciliaten. *Mikrokosmos*, 64, 171–179. (in German)
- Xie DM, Fan XP, Ni B, Gu FK (2016) Morphogenesis of the cortical silver-line system in the ciliate genus *Euplotes* (Protozoa, Ciliophora). *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 46, 41–50. (in Chinese with English abstract) [谢冬梅, 范鑫鹏, 倪兵, 顾福康 (2016) 游仆虫(原生动物, 纤毛门)皮层银线系的形态发生模式. 中国海洋大学学报(自然科学版), 46, 41–50.]
- Yi ZZ, Katz LA, Song WB (2012) Assessing whether alpha-tubulin sequences are suitable for phylogenetic reconstruction of Ciliophora with insights into its evolution in euplotids. *PLoS ONE*, 7, e40635.
- Yi ZZ, Song WB, Clamp JC, Chen ZG, Gao S, Zhang QQ (2009) Reconsideration of systematic relationships within the order Euplotida (Protista, Ciliophora) using new sequences of the gene coding for small-subunit rRNA and testing the use of combined data sets to construct phylogenies of the *Diophrys*-complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 599–607.

(责任编辑: 徐奎栋 责任编辑: 闫文杰)