中国科学: 生命科学 2010 年 第 40 卷 第 11 期: 1055 ~ 1062
SCIENTIA SINICA Vitae www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

免疫抑制沙鼠源肺孢子菌的分类地位

冯宪敏[①②], 魏超君[②], Rodney D. Adam[③], 李自慧[④], 卢思奇[②*]

① 吉林医药学院基础医学院病原教研室, 吉林 132013;
② 首都医科大学寄生虫学教研室, 北京 100069;
③ Department of Medicine and Immunobiology, University of Arizona College of Medicine, 1501 N. Campbell, Tucson, Arizona 85724-5049, USA;
④ 北京结核病胸部肿瘤研究所, 北京 101149
* 联系人, E-mail: wdxlsq42@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-22; 接受日期: 2010-07-29
北京市自然科学基金(批准号: 7052009)资助项目

摘要 肺孢子菌能够感染多种哺乳动物的肺脏, 并在免疫受抑制的个体引起肺孢子菌肺炎. 研究表明, 肺孢子菌分离株在系统进化树上分为两大枝, 二者所含菌株分别来源于灵长类和啮齿类. 基于宿主特异性以及 DNA 序列和形态学差异, 每一分枝内的菌株又可分为不同的种. 本研究采用地塞米松免疫抑制法, 导致沙鼠(28/35)肺组织感染. 对 18S, 5.8S rRNA 和 rRNA 内转录间隔区基因序列, 以及线粒体核糖体大亚基基因的部分序列分析表明, 本实验沙鼠源肺孢子菌与啮齿类动物来源的同属一枝, 但明显区别于其他啮齿类动物来源的菌株, 应考虑是一个独立的菌种.

关键词
肺孢子菌
长爪沙鼠
5.8S 核糖体 RNA 基因
rRNA 基因内转录间隔区
线粒体核糖体大亚基
18S 核糖体 RNA 基因

肺孢子菌种(*Pneumocystis*, spp), 是一类机会性病原体, 可在免疫功能受抑制哺乳动物引起肺孢子菌肺炎(pneumocystis pneumonia, PCP), 其中包括获得性免疫综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)的人群. 起初, 肺孢子菌一直被归类为原虫, 但是小亚基核糖体 RNA(16S-like rRNA)基因序列分析结果证实其属于真菌[1]. 由于缺乏理想的体外纯培养体系, 使得肺孢子菌种的分类受到限制. 因此, 该菌种的系统发育分类, 主要依据细胞核和线粒体基因内基因序列的差异. 这些基因包括: 线粒体(mt rDNA)、二氢叶酸合成酶(dihydropteroate synthase, DHPS)、胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthase, TS)、β-微管、二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)、芳香化酶(aromatase, AROM)及热休克蛋白 70 等基因[2~8]. 其中线粒体基因的进化速率相对较慢, 可以用于交叉类群的稳定比较. 而 ITS 较 18S(或 16S), 5.8S 和 26S rRNA 基因进化速率快, 序列中含有更多的遗传变异信息, 对于肺孢子菌的种株分析更为准确[5,9~12]. 目前, 比较公认的肺孢子菌种有 4 种, 即源于大鼠的 2 个(*P. carinii* 和 *P. wakefieldiae*), 源于人体的 1 个(*P. jirovecii*)和小鼠的 1 个(*P. murina*)[13,14]. 此外, 很可能还有更多的菌种存在, 其中包括兔源的 *Pneumocystis oryctolagi*[15]. 对于灵长类来源菌种的研究表明, 很多菌种或基因型一般与宿主的起源有一定关系, 提示肺孢子菌与其哺乳类宿主之间存在共进化关系(至少灵长类宿主来源的菌株如此)[16]. 同样, 以啮齿类为宿主的很多菌株也存在类似情况.

本研究对来自沙鼠和不同动物宿主(啮齿类、灵长类和哺乳类)肺孢子菌的 18S, 5.8S rDNA, ITS(1 和 2)及 mt LS rDNA 的部分序列进行了对比分析, 以期

英文版见: Feng X M, Wei C J, Rodney D A, et al. Phylogenetic status of *Pneumocystis* from corticosteroid-treated gerbils. Sci China Life Sci, 2010, 53: 1239—1246, doi: 10.1007/s11427-010-4074-5

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

更好地了解该菌株的系统发育地位.

1 材料与方法

1.1 动物感染和透射电子显微镜切片制备

35 只清洁级长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*), 购自首都医科大学实验动物中心. 鼠龄 4 周, 体重 22~25 g/只. 按 5 只/笼随机分为 7 组. 实验前, 所有用具、垫料均经高压消毒. 消毒垫料每周更换 1 次. 饲养室温度控制在 20~25℃. 动物购置后先适应性饲养 1 周. 从第 2 周开始, 诱导感染. 于双侧腹股沟皮下交替注射地塞米松注射液(湖北天药药业股份有限公司, 批号 021017), 剂量为 0.04 mg/g 体重/次, 每周 2 次, 共 8 周. 为预防细菌感染, 所有动物均在其自由饮用的冷开水中加入盐酸四环素, 浓度为 1 g/L, 饮水量无限制. 动物处死后, 获取右肺支气管肺泡灌洗液(bronchalveolarlavage fluid, BALF). 用未灌洗的左肺制作肺印片和组织切片, 剩余左肺贮存于–20℃用于 DNA 抽提. 肺印片经 Wright-Giemsa's 复合染色后观察动物感染情况.

透射电子显微镜切片制备: 将肺组织标本先用 2.5%戊二醛, 4℃, 前固定 2 h; 再用 0.2 mol/L 二甲砷酸钠(pH 7.2)缓冲液, 漂洗 3 次, 每次 10 min; 1%锇酸(OsO4), 4℃, 2 h 后固定. 固定样本用双蒸水冲洗 3 次, 每次 10 min, 而后进行梯度酒精脱水和 100%丙酮脱水. 脱水后经 VCD4206 室温浸透 2 h, 而后 37℃, Epon812 包埋 24 h. 经上述处理的样本最后进行超薄切片和醋酸铀/硝酸铅染色, 于 JEOL 型透射电子显微镜下观察.

1.2 DNA 的抽提和扩增

受染动物的肺组织样本用液氮研磨后, 用 1 mg/mL 的蛋白酶 K(溶于含 50 mmol/L EDTA(pH 8.0), 0.5%SDS 和 10 mmol/L Tris(pH 8.0)的缓冲液)50℃过夜消化, 随后用酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)抽提、乙醇沉淀获取 DNA, DNA 溶于适量 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl 和 1 mmol/L EDTA)中, 置于–20℃保存备用.

1.3 引物和聚合酶链反应

ITS1, 5.8S 和 ITS2 的扩增采用巢式 PCR 法. 第一步反应的引物为 1724F (5′-AAGTTGATCAAATTTGGTC-3′)/ITS2R(5′-CTCGGACGAGGATCCTCGCC-3′), 第二步反应的引物为 ITS1F(5′-CGTAGGTGAACCTGCGGAGATC-3′)/ITS2R1(5′-GTTCAGCGGGTGATCCTGCCTG-3′)[9,12]. 第一步 PCR 反应条件为: 94℃ 5 min 预变性, 之后进行 94℃变性 1 min, 47℃退火 1 min, 72℃延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 8 min. 第二步 PCR 反应条件为: 94℃, 5 min 预变性, 94℃变性 1 min, 62℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 8 min[17]. 反应总体积为 50 μL, 包括 5 μL 10×PCR 反应缓冲液, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L, 引物各 40 pmol, Tap 酶 3 U, 模板 5 μL, 灭菌去离子水定容至 50 μL. 取第一步反应的产物 5 μL, 用作第二步反应的模板.

18SrDNA 的扩增采用一步法 PCR, 所用引物为 p1(5′-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3′)和 p2(5′-TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3′)[8]. 反应条件为: 94℃, 5 min 预变性, 之后进行 94℃变性 30 s, 45℃退火 90 s, 72℃延伸 5 min, 共 29 个循环; 最后 72℃延伸 7 min. 反应总体积为 25 μL, 包括 GC 缓冲液(TaKaRa, 日本)15 μL, 引物各自 40 pmol, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L, Tap 酶 3 U, 模板 5 μL, 灭菌去离子水定容至 25 μL.

扩增 mt LS rRNA 部分序列片段所用的引物为 pAZ102-H-pAZ102-E(5′-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3′和 5′-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3′)[17]. 95℃, 5 min 热启动后, 进行 94℃变性 1 min, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72℃延伸 7 min.

以上试剂购自上海生物工程技术服务有限公司. 阴性对照模板为灭菌去离子水. 阳性对照样本来自本实验室感染的 SD 大鼠肺组织 DNA.

1.4 目的基因片段的克隆与测序

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 切下扩增的 DNA 片段, 用 DNA 片段纯化回收试剂盒(北京鼎国生物技术有限公司)纯化后, 与 pMD 18-T 载体(TaKaRa, 日本)连接, 重组质粒转化 JM109 感受态细胞, 复苏后涂布于 LB 固体培养基(含氨苄青霉素 100 μg/mL, X-Gal 0.5 mmol/L, IPTG 80 μg/mL)过夜培养. 每个 PCR 样本挑取 6 个白色或淡蓝色菌落用 LB 液体培养基培养(含氨苄青霉素 100 μg/mL), 经菌液 PCR 证实含有插入片段后, 提取质粒送 TaKaRa(大连)公司测序.

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

1.5　系统进化树的构建

用 BLASTX 和 BLASTN 搜索 GenBank 数据库, 获得肺孢子虫株或菌种及用于外群参照之真菌的相应基因序列. 用 DNAMAN 5.2.2 和 CLUSTALX 1.81 软件, 对上述序列进行比对分析, 并以统一标准对序列进行人工编辑. 用 MEGA 3 软件计算遗传距离, 所选用的参数为 p-distance(p-距离)和 pairwise deletion (成对删除)p-distance 为不同核苷酸数与参与比较的总核苷酸数之比值. SPSS13.0 软件对遗传距离进行两两比较, 使用单因素方差分析法进行分析. 用 MEGA 3 软件的 NJ(neighbor-joining)法构建系统发育树, 进行 1000 次自引导复制(bootstrap replications)以评价发育树拓扑结构的可靠性[18].

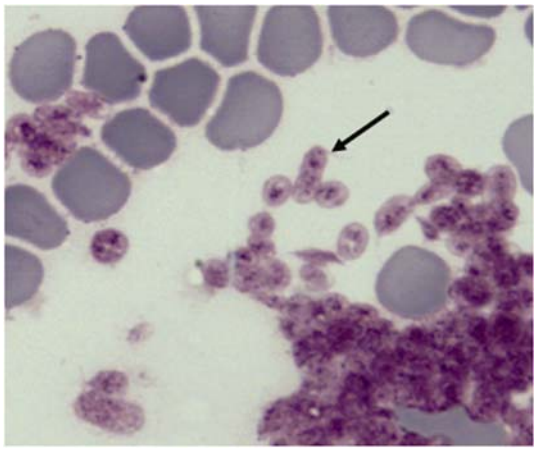


图 1　沙鼠肺印片 Wright-Giemsa's 复合染色结果(1000×)
箭头示肺孢子菌包囊和滋养体

2　结果

2.1　动物感染和 TEM 观察

实验用沙鼠经皮下注射地塞米松免疫抑制 8 周, 处死后以肺印片 Wright-Giemsa's 复合染色镜检结果评估动物肺孢子菌感染情况. 结果显示, 沙鼠感染的阳性率为 80%(28/35), 肺印片中均可见大量肺孢子菌包囊和滋养体(图 1).

受染沙鼠肺组织的超薄切片, 经 TEM 观察, 肺泡腔内可见滋养体型、包囊和囊前期. 滋养体内含有核、核仁和丰富的线粒体. 线粒体的数量、大小和形状多变. 菌体自胞浆伸出不同形状的伪足(图 2(A)~(C)). 部分包囊排出囊内小体形成空泡, 成熟包囊内含有发育成熟的囊内小体. 囊前期为滋养体发育至包囊的中间型(图 2(D)~(F)). 沙鼠源菌种的包囊直径为 1~3 μm, 明显小于小鼠、大鼠及兔源菌种者, 其直

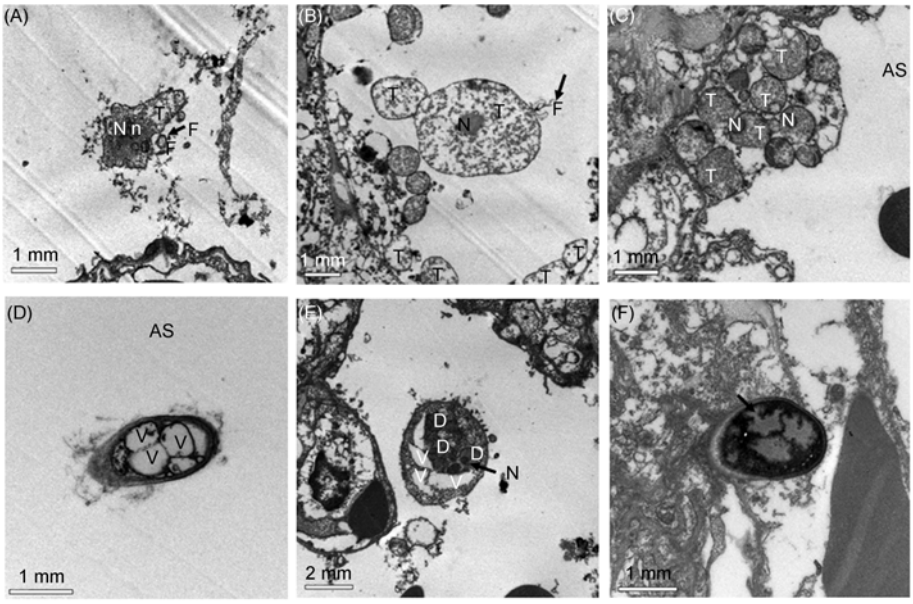


图 2　沙鼠源肺孢子菌包囊和滋养体型电子显微镜观察
(A) 滋养体型(T): 核(N), 核仁(n), 分枝伪足×20 K; (B) 滋养体型: 箭头示分枝伪足×15 K; (C) 肺泡腔内(AS)的小滋养体型(T)×12 K; (D) 肺泡腔内(AS)的含有空泡(V)的空包囊×20 K; (E) 成熟包囊, 可见囊内小体(D)和空泡(V)×10 K; (F) 囊前期(↑)×25 K

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

径范围为 4~6 μm 不等[19].

2.2 系统发育分析

用针对肺孢子菌 18S rDNA 序列的特异性引物进行一步 PCR 扩增, 从 3 只受染沙鼠肺组织 DNA 各获得大小为 2.1 kb 的片段(图 3). 同一动物样本来源的 5 个阳性克隆的核酸序列经测序, 所得序列完全一致. 用沙鼠源菌株 18SrDNA(2176 bp)的基因序列, 以及几种灵长类和啮齿类肺孢子菌的相同基因序列构建系统发育树. 以啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)和外囊菌(*Taphrina alni*)的相应序列作为外群(图 4). 分析结果表明, 源于灵长类的菌株形成一支, 而啮齿类的形成另一支, 后者包括沙鼠源的菌株. 在啮齿类的分支中, 源于沙鼠的菌株与其他啮齿类菌株相比, 它们的遗传距离有显著区别.

采用引物 1724F/ITS2R 和 ITS1F/ITS2R1 经 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 沙鼠源菌株的 ITS1/5.8S/ITS2 序列大约在 550 bp 处显示一明显条带(图 3). 分别以 5.8S rRNA 基因、ITS1 和 ITS2 序列构建系统进化树(图 5~7). 在所构建的 3 个进化树中, 每一树内的肺孢子菌均被分为两支, 它们分别源于灵长类和啮齿类. 基于 5.8S rRNA 基因序列构建的系统发育树显示, 沙鼠菌株在啮齿类组内明显远离其他菌株, 但 bootstrap 值仅为 34%. 如此, 序列资料将沙鼠肺孢子菌置于其他啮齿类菌株之中, 与灵长类和兔源的菌株明显区别开来.

此外, 以 mt LS rDNA 部分序列(340 bp)构建的系统发育树(图 3 和 8), 与 ITS1/5.8S/ITS2 树具有相同的进化趋势, 即灵长类来源的菌株聚为一支(bootstrap 值为 100%), 沙鼠的与啮齿类的聚为一支, 与

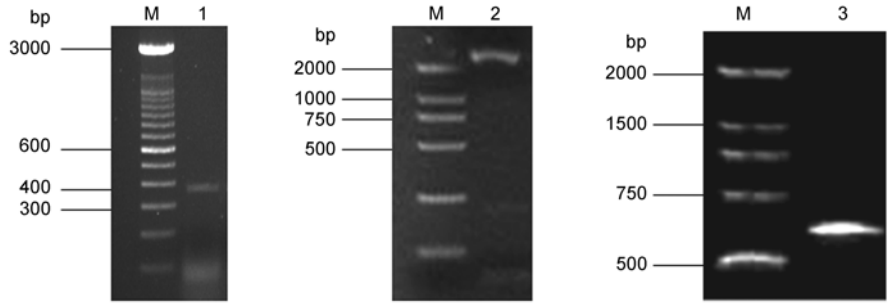


图 3 琼脂糖凝胶电泳检测结果

M: DNA maker; 泳道 1: mt LS rDNA 部分基因序列(340 bp); 泳道 2: 18S rDNA(2176 bp); 泳道 3: ITS1-5.8S rDNA-ITS2(550 bp)

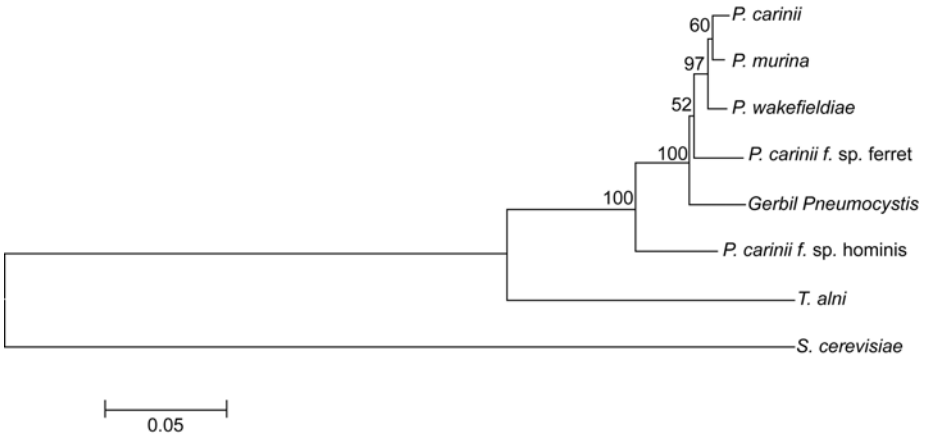


图 4 基于 18S rDNA 序列的系统发育树

P. carinii (X12708); *P. murina* (Y532651); *P. wakefieldiae* (L27658); *P. carinii f.* sp. ferret (S83267); *Gerbil Pneumocystis*; *P. carinii f.* sp. homnis (AB266392); *T. alni* (AJ495834); *S. cerevisiae* (Z71637)

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

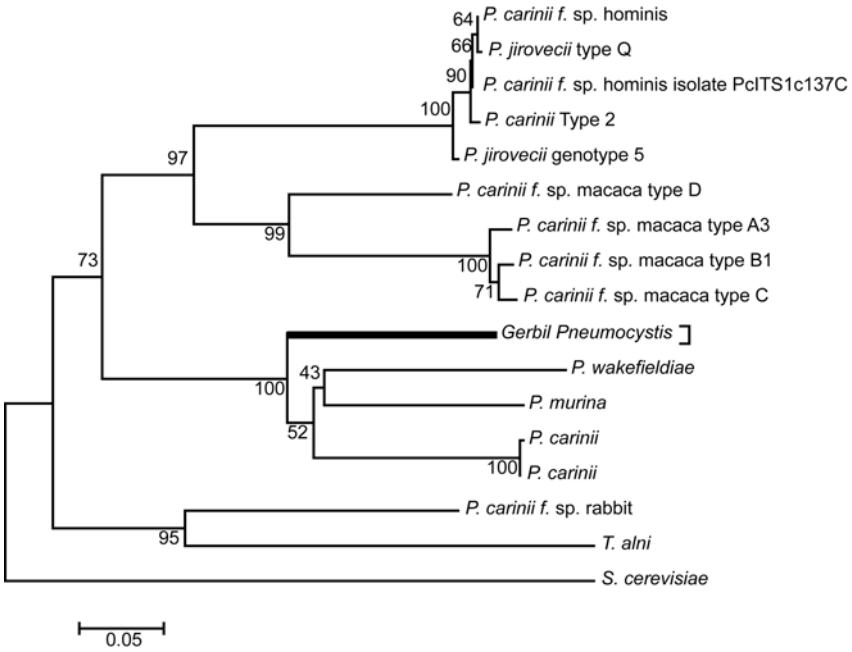


图 5　基于 ITS1 序列的系统发育树

P. carinii f. sp. hominis (AF013812); *P. jiroveci* typeQ (AY550106); *P. carinii f.* sp. hominis isolate PcITS1c137C (AF374249); *P. carinii* Type2 from human (U07226.1); *P. jiroveci* genotype 5 (AY328047); *P. carinii f.* sp. macaca type D (AF288834); *P. carinii f.* sp. macaca type A3 (AF288830); *P. carinii f.* sp. macaca type B1 (AF288832); *P. carinii f.* sp. macaca type C (AF288833); *Gerbil Pneumocystis* (AY875972.1); *P. wakefieldiae* (L27658.1); *P. murina* (AY532651.1); *P. carinii* (M86760); *P. carini* (PMC26S58R.1); *P. carinii f.* sp. rabbit (DQ010098); *T. alni* (AF492077); *S. cerevisiae* (AY235811)

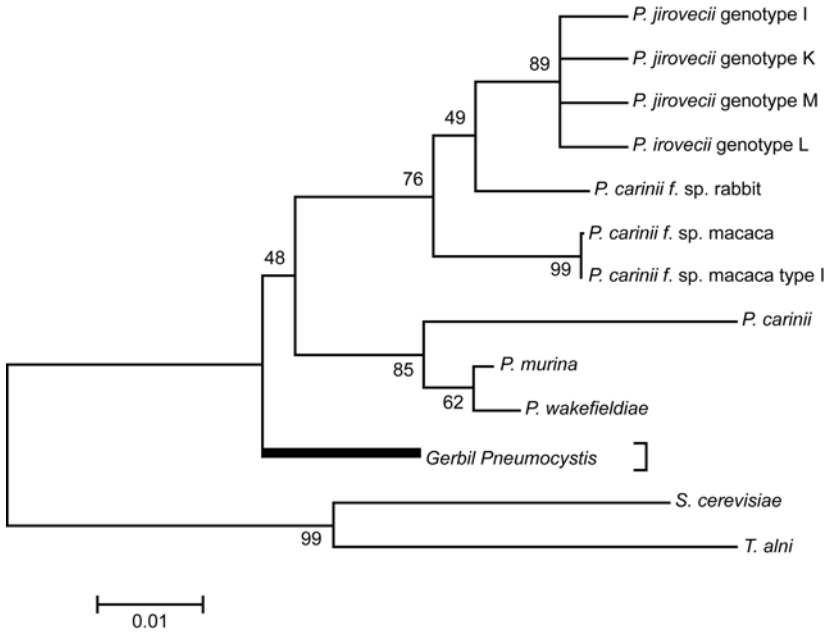


图 6　基于 5.8S rDNA 基因序列的系统发育树

P. jiroveci genotype I (AY328075); *P. jiroveci* genotype K (AY328077); *P. jiroveci* genotype M (AY330724); *P. jiroveci* genotype L (AY328078); *P. carinii f.* sp. rabbit (DQ010098); *P. carinii f.* sp. macaca (AF288848); *P. carinii f.* sp. macaca typeI (AF288847); *P. carinii* (M86760); *P. murina* (AY532651.2); *P. wakefieldiae* (L27658); *Gerbil Pneumocystis* (AY875972.2); *S. cerevisiae* (AY235811); *T. alni* (AF492077)

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

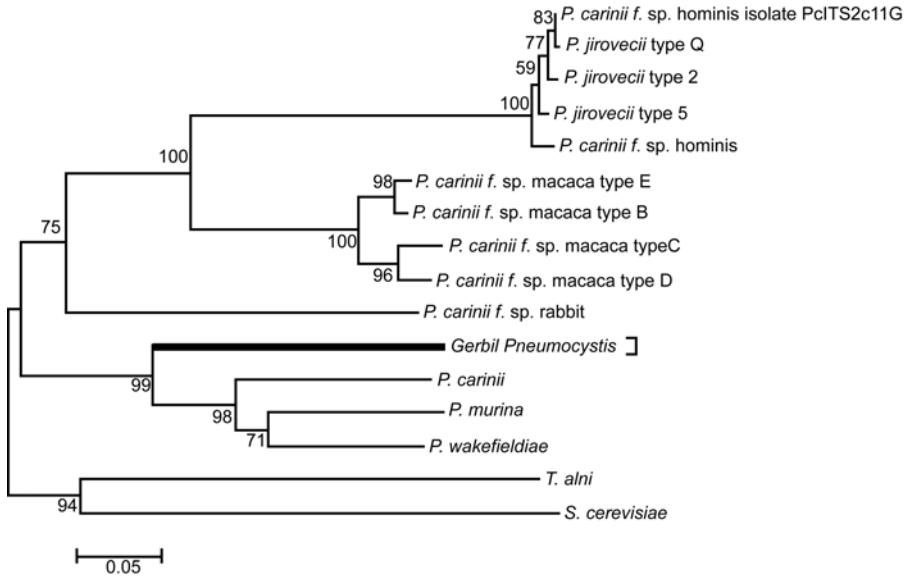


图 7　基于 ITS2 rDNA 基因序列的系统发育树

P. carinii f. sp. hominis isolate PcITS2c11G (AF374253); *P. jiroveci* type Q (AY550109); *P. jiroveci* type2 (AY328056); *P. jiroveci* type 5 (AY328058); *P. carinii f.* sp. hominis (AF013831); *P. carinii f.* sp. macaca typeE (AF288845); *P. carinii f.* sp. macaca typeB (AF288840); *P. carinii f.* sp. macaca type C (AF288842); *P. carinii f.* sp. macaca type D (AF223788844); *P. carinii f.* sp. rabbit (DQ010098); *Gerbil Pneumocystis* (AY875972.3); *P. carinii* (M86760); *P. murina* (AY532651.3); *P. wakefieldiae* (L27658.3); *T. alni* (AF492077); *S. cerevisiae* (AY235811)

P. murina 和部分大鼠源的距离较近.

3　讨论

本研究用皮下注射地塞米松抑制免疫的方法, 成功诱导长爪沙鼠感染了肺孢子菌. 显微镜检测结果显示, 沙鼠的感染率为 80%, 大于大鼠(75%)[20], 提示长爪沙鼠也可考虑作为建立肺孢子菌肺炎模型的候选动物.

由图 2 可见, 由受染沙鼠肺组织切片中得到的菌体, 其在组织学特征和寄生习性上符合 Pc 肺孢子菌的特点. 但其包囊直径(1~3 μm)明显小于小鼠、大鼠及兔源菌株的包囊(4~6 μm).

自肺孢子菌 DNA 序列分型广泛应用以来, 即假设单一菌种可以感染多种不同的哺乳类宿主. 然而, 分子分型方法以及交叉感染实验研究提供的证据进一步表明, 肺孢子菌群内存在广泛的菌种, 其中每一菌种具有完全或部分的宿主特异性[21]. 目前, 关于肺孢子菌的研究数据主要来自灵长类和啮齿类的分离株. 在系统进化分析过程中, 二者分别形成各自的分枝. 由于菌株宿主特异性和系统进化的模式不同, 使得不同哺乳动物来源的菌株与其宿主之间是否存在协同进化关系的问题[8,15,16,22]成为需要解决的问题. 而此问题的解决, 需要获得更广泛的宿主分离菌株的数据. 研究表明, rDNA 序列对于肺孢子菌在种水平或更细化的分类具有重要的作用. 不同的序列区间具有不同的进化速率, 因此可以在属水平上下进行比较. 例如, 同比邻的序列区间相比, 18S 和 5.8S rRNA 基因进化速率慢, 而 ITS1 和 ITS2 的进化速率相对较快, 因此建立在这些序列基础之上的系统进化树, 能够同步反映出不同进化水平上的进化趋势.

本研究分别以肺孢子菌的 18S, 5.8S rDNA, ITS(1 和 2)及 mt LS rDNA 的部分序列进行对比分析, 构建系统发育树. 分析结果表明, 沙鼠来源的肺孢子菌归属于啮齿类来源的菌株组, 但与以往所报告的每一菌种之间存在差异. 且这种差异与啮齿类来源的各菌种之间的差异, 包括与已经公认的菌种 *P. murina*, *P. wakefieldiae* 和 *P. cariniif.* sp. Ferret 之间的差异具有可比性[20]. 根据 2006 年的国际标准[5], 本研究从长爪沙鼠来源的肺孢子菌株, 应该是一个独立的菌种, 可命名为 *Pneumocystis unguiculatii*.

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

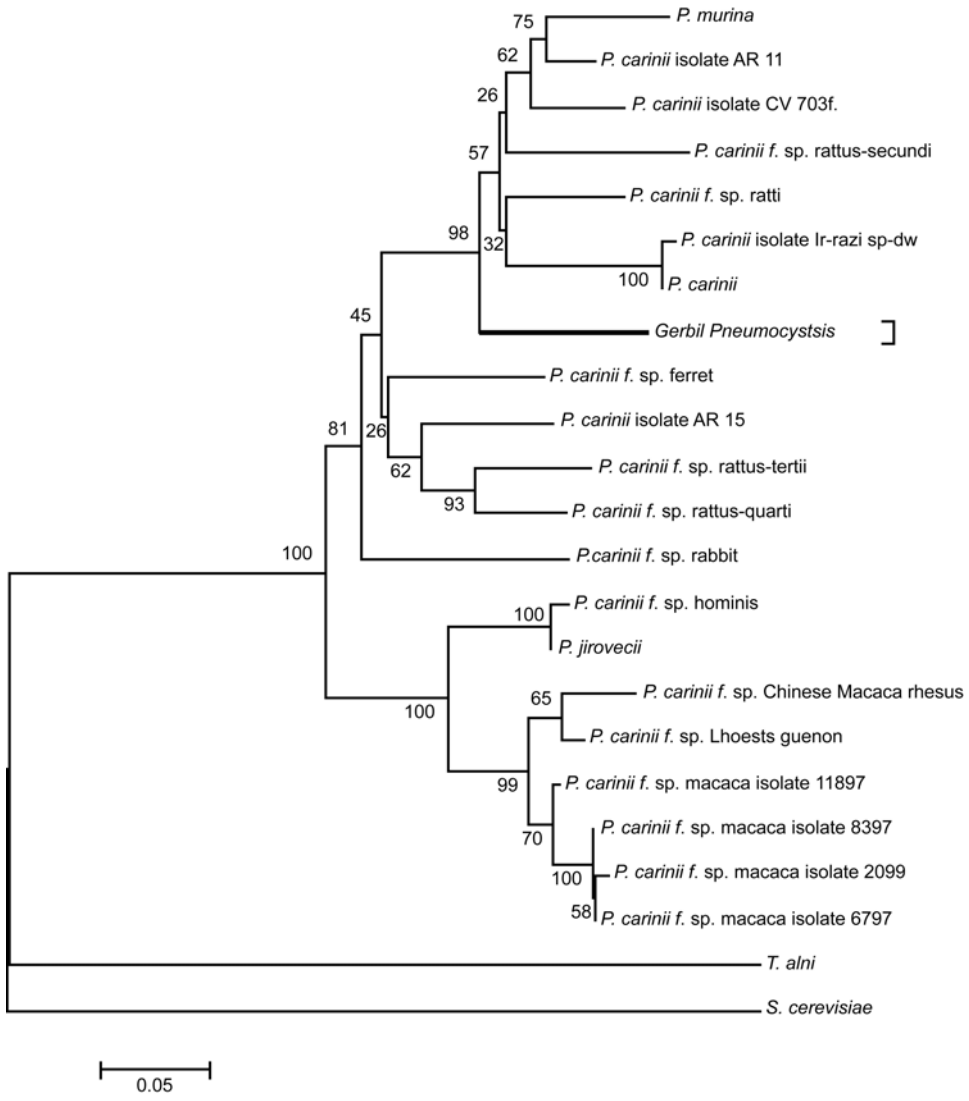


图 8　基于 mtLS rDNA 基因部分序列的系统发育树

P. murina (AF257179); *P. carinii* isolate AR 11 from Apodemus sylvaticus (AY279097); *P. carinii* isolate CV 703 from Microtus agrestis (AY279099); *P. carinii f.* sp. rattus-secundi (AF308807); *P. carinii f.* sp. Ratti (U20173); *P. carinii* isolate Ir-razi sp-dw (EF646865); *P. carini* (i S79764) Gerbil Pneumocystis (DQ452954); *P. carinii f.* sp. ferret (S42921); *P. carinii* isolate AR 15 from Eliomys quercinus (AY279098); *P. carinii f.* sp. rattus-tertii (AF308808); *P. carinii f.* sp. rattus-quarti (AF308809); *P. carinii f.* sp. rabbit (S42915); *P. carinii f.* sp. hominis (M58605); *P. carinii f.* sp. L hoests guenon (AY265382); *P. jiroveci* patient bronchoalveolar lavage isolate (S77852); *P. carinii f.* sp. Chinese macaca rhesus (AF362467); *P. carinii f.* sp. macaca isolate 11897 (AF461773); *P. carinii f.* sp. macaca isolate 8397 (AF402693); *P. carinii f.* sp. macaca isolate 2099 (AF402689); *P. carinii f.* sp. macaca isolate 6797 (AF461778); *T. alni* (AF492024); *S. cerevisiae* (Z71637)

参考文献

1　Edman J C, Kovacs J A, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature, 1998, 334: 519—522

2　Stedman T T, Butle D R, and Buck G A. The HSP70 gene family in *Pneumocystis carinii*: molecular and phylogenetic characterization of cytoplasmic members. J Eukaryot Microbiol, 1998, 45: 589—599

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055

3 Ma L, Imamichi H, Sukura A, et al. Genetic divergence of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in *Pneumocystis carinii* from 7 different host species. J Infect Dis, 2001, 184: 1358—1362
4 Banerji S, Lugli E B, Miller R F, et al. Analysis of genetic diversity at the arom locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol, 1995, 42: 675—679
5 Redhead S A, Cushion M T, Frenkel J K, et al. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol, 2006, 53: 2—11
6 Denis C M, Mazars E, Guyot K, et al. Genetic divergence at the SODA locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. Med Mycol, 2000, 38: 289—300
7 Keely S, Pai H J, Baughman R, et al. *Pneumocystis* species inferred from analysis of multiple genes. J Eukaryot Microbiol, 1994, 41: 94S
8 Demanche C, Berthelemy M, Petit T, et al. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol, 2001, 39: 2126—2133
9 Totet A, Pautard J C, Raccurt C, et al. Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jiroveci* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. J Clin Microbiol, 2003, 41: 1173—1180
10 Hosoya N, Takahashi T, Wada M, et al. Genotyping of *Pneumocystis carinii f.* sp. hominis isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. Microbiol Immunol, 2000, 44: 591—596
11 Lee C H, Helweg-Larsen J, Tang X, et al. Update on *Pneumocystis carinii f.* sp. hominis typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol, 1998, 36: 734—741
12 Nimri L F, Moura I N, Huang L, et al. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii f.* sp. hominis based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol, 2002, 40: 1146—1151
13 Keely S P, Fischer J M, Cushion M T, et al. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. Microbiology, 2004, 150: 1153—1165
14 Dei-Cas E, Chabe M, Moukhlis R, et al. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30: 853—871
15 Hugot J P, Demanche C, Barriel V, et al. Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear DNA sequence comparison. Syst Biol, 2003, 52: 735—744
16 Guillot J, Demanche C, Hugot J P, et al. Parallel phylogenies of *Pneumocystis species* and their mammalian hosts. J Eukaryot Microbiol, 2001, Suppl: 113S—115S
17 Lu J J, Bartlett M S, Smith J W, et al. Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type-specific oligonucleotide probes derived from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2973—2977
18 Gascuel O, Steel M. Neighbor-joining revealed. Mol Biol Evol, 1995, 23: 1997—2000
19 苏晓平, 安春丽, 刘冬娟, 等. 卡氏肺孢子虫透射电镜观察. 热带医学杂志, 2003, 4: 164—168
20 李自慧, 冯宪敏, 卢思奇, 等. 以 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列为标记的肺孢子菌分子系统发育研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38: 377—385
21 Atzori C, Agostoni F, Angeli E, et al. *P. carinii* host specificity: attempt of cross infections with human derived strains in rats. J Eukaryot Microbiol, 1999, 46: 112S
22 Guillot J, Demanche C, Norris K, et al. Phylogenetic relationships among *Pneumocystis* from Asian macaques inferred from mitochondrial rRNA sequences. Mol Phylogenet Evol, 2004, 31: 988—996

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/zc2010-40-11-1055