文章编号：1000-0615(2021)02-0265-09 水产学报, 2021, 45(2): 265−273

水产学报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA
DOI: 10.11964/jfc.20190911967
Science Press

吉陶单极虫地理分布新记录及不同地理株系间的比较

陈鸿真， 赵元君， 杨承忠*

(重庆师范大学生命科学学院，重庆市动物生物学重点实验室，重庆 401331)

摘要：为获知吉陶单极虫不同地理株系间的遗传变异及系统发育关系，实验对吉陶单极虫中国重庆、中国湖北、中国四川、日本盐田、韩国全北、韩国首尔等地理株系进行形态学比较及基于 18S *rDNA* 序列的变异位点、相似度、遗传距离、基因型的比较和系统发育分析。结果发现，吉陶单极虫各株系孢子形态特征基本一致；18S *rDNA* 序列相似度为 99.5%~100.0%，变异位点数为 0~6 个，遗传距离为 0.000~0.004；系统发育分析显示，大部分有鞘膜的单极虫聚为一支，无鞘膜的单极虫聚为另一支；无鞘膜单极虫依据寄生部位的不同形成了特殊的鳍寄生支系和鳃寄生支系。研究表明，吉陶单极虫鞘膜不宜作为该物种鉴定的主要依据，该物种的鉴定仍应以孢子本身的形态及量度为主；虽然单极虫鞘膜的形状和大小并不稳定，但物种自身有无鞘膜一般与其系统发育相关，且单极虫有鞘膜支系与无鞘膜支系可能有着不同的进化模式；吉陶单极虫并未形成与寄生部位相关的特殊分化也未形成地理种群特有的单系。这种遗传格局产生的原因可能是各地理分布区吉陶单极虫来源于一个共同的祖先株系且各地理株系之间隔离的时间较短或存在较频繁的基因交流，尚未形成较大的种群分化。

关键词: 吉陶单极虫；18S *rDNA*；株系比较；地理分布新记录

中图分类号: S 941 **文献标志码:** A

黏孢子虫 (Myxosporea) 是一类主要寄生于鱼类且种类繁多分布极广的后生动物 (Metazoa) 寄生虫[1-3]。在水产养殖中，虽然大多数物种不会引起严重的鱼类疾病，但有报道称一些单极虫 (*Thelohanellus*) 种类却能引起鲤科 (Cyprinidae) 鱼类大规模的死亡或经济价值下降[4-7]。最初 Bütschli[8] 于 1882 年将单极虫物种置于碘泡科 (Myxobolidae) 碘泡虫属 (*Myxobolus*)，随后，Kudo[9]在 1933 年，将只有单个极囊的物种从碘泡虫属中分离出来，单独建立了单极虫属，隶属于碘泡科。迄今为止，单极虫属已记录 100 余种[4, 10]，其中大多数种类感染淡水鱼类并形成孢囊。吉陶单极虫 (*Thelohanellus kitauei*) 最初由 Kitaue[11] 于 1980 年在日本鹿儿岛养殖鲤 (*Cyprinus carpio*) 的肠道发现，后 Egusa 等[12] 于 1981年首次对该虫做了详细描述并正式命名。随后又有学者在中国和韩国发现该种并对其进行了亚显微结构、系统发育分析、组织病理学分析及防治、分子检测以及生物信息学分析[5, 10, 13-28]，同时指出，吉陶单极虫形成的巨大囊肿阻塞鲤的肠道或肛门导致严重的肠道肿胀和鱼体消瘦[5, 10, 11, 12-18, 20-28]。以往的研究通常认为鲤的肠道是吉陶单极虫典型的单一感染部位[5-7, 9-18, 20-28]。

收稿日期：2019-09-16 **修回日期：**2020-08-05

资助项目：国家自然科学基金 (31970409；31672280)；重庆市自然科学基金 (cstc2018jcyjAX0738)；重庆市留学人员回国创业创新支持计划 (cx2018108)；重庆市教委科学技术研究项目 (KJQN201900505)

第一作者：陈鸿真 (照片)，从事鱼类寄生虫学研究，E-mail: 1040138923@qq.com

通信作者：杨承忠，E-mail: drczyang@126.com

然而，最近有报道称在鲤的皮肤上分离得到该种[19]。因此，吉陶单极虫并非鲤肠道的专性寄生虫，其寄生部位至少有肠道和皮肤 2 种。

对于自由生活的动物，地理隔离在物种种群分化中起着非常重要的作用[29-30]。但也有研究表明，对于一些营寄生生活的动物，寄生于不同宿主的种群，其遗传差异大于寄生于同一种类宿主且有地理隔离种群间的遗传差异[31-33]。同时，寄生虫在同种宿主内部转移栖息地时，通过寄生部位的选择也会导致物种种群分化甚至形成新种[34-35]。然而，这些研究在黏孢子虫领域中并不多见[36-38]。本实验在重庆发现并分离得到吉陶单极虫，重庆为该种的地理新记录；实验对吉陶单极虫重庆株系进行了系统描述，对该物种不同地理株系及不同寄生部位进行了比较，以期更深入地了解吉陶单极虫的进化规律。

1 材料与方法

1.1 标本的采集与物种的鉴定

宿主鲤于 2018 年 7 月 17 日采自重庆市大足区，活体送往实验室用过量的 MS-222 麻醉剂进行安乐死。随后剖检，用肉眼观察鳃、肌肉、肝脏、肠、脾脏、心脏和胆囊等部位。在其中一尾鲤的肠系膜处观察到吉陶单极虫的白色孢囊，剥离后并按照已有文献[39]进行后续的样品处理及基于形态学的物种鉴定。

1.2 DNA 提取与 PCR 反应

DNA 提取　按照 Dneasy Tissue Kit (QIAGEN，Germany) 试剂盒中的说明书对所获黏孢子虫的基因组 DNA 进行提取，将获取的基因组 DNA 置于−20 °C 冰箱保存备用。

PCR 反应　用于扩增 18S *rDNA* 及其测序的引物序列：18e (5′-CTGGTTGATCCTGCCAGT- 3′)[40] 和 18r (5′-CTACGGAAACCTTGTTACG- 3′)[41]。PCR 反应体系为 20 μL，其中引物各 0.5 μL (10 μmol/L)，5.8 ng 模板 DNA，Mix[英潍捷基 (上海) 生物公司] 5 μL，加超纯水至 20 μL。反应程序为 94 °C 预变性 90 s，94 °C变性 50 s，58 °C 退火 50 s，72 °C 延伸 2 min，循环 35 次，最后 72 °C 再次延伸 10 min，反应完成后 12 °C 保温。将 PCR 反应产物通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测，然后将有目的条带的 PCR 产物用胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit (OMEGA, America) 纯化回收。将回收产物插入 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 日本)，随后导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行单克隆培养，将 2 个克隆子送英潍捷基 (上海) 生物公司测序，测序返回 2 条序列相同的 18S *rDNA*。

1.3 序列分析和系统发育

序列选取　用于构建吉陶单极虫系统发育关系的 18S *rDNA* 序列共有 47 条，其中包括本研究得到的 1 条吉陶单极虫序列，其余 46 条序列选取参照文献 [10] 以及与本研究所获序列在 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行 BLAST 比对相似度较高的物种序列，包括单极虫、双尾虫 (*Dicauda*)、尾孢虫 (*Henneguya*) 和碘泡虫。选用鲑苔藓四囊虫 (*Tetracapsuloides bryosalmonae*，GenBank 登录号：FJ981823) 为外群。

18S *rDNA* 序列分析　通过 Clustal W 程序按照缺省参数进行序列多重比对，序列相似度用在线序列双重比对工具 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/) 计算获得。利用 MEGA 6.0[42] 软件 K2P 模型计算两两序列之间的遗传距离。利用 BioEdit 5.0.6 进行序列变异位点的分析。利用 DNAsp v6.0[43] 对吉陶单极虫各株系基因型进行计算。

系统树构建　利用在线工具 The CIPRES Science Gateway V.3.3 (http://www.phylo.org/)，在 RAxML-HPC2 XSEDE (7.6.3) 下构建最大似然树 (maximum likelihood，ML)，使用 GTR+G 模型进行 1 000 次自举 (Bootstrap) 重复检测。贝叶斯树 (Bayesian inference, BI) 在 MrBayes 3.1.2 软件中[44] 构建，位点变异设置为 invgamma 分布，序列最佳进化模型为 GTR+I+G (通过 Model test 3.7 计算获得)，运行 10 000 000 代，每 200 代抽样 1 次，在舍弃 25% 的老化样本后，根据剩余样本构建一致树。最后用 FigTree v1.4.2 和 Photoshop CS3 完成系统树的绘制。

2 结果

2.1 吉陶单极虫重庆株系形态学描述

吉陶单极虫重庆株系孢囊白色，圆形，直径约 1 cm，附着在鲤肠道外侧 (图 1)。感染率为 16.7% (1/6)，感染强度为 1 (肉眼可见 1 个孢囊)。吉陶单极虫重庆株系成熟孢子壳面观和缝面观均为瓜子型，孢子前端 (极丝开口端) 尖而后端

钝圆，孢子由一层薄而透明鞘膜包裹 (图 2)。极囊单个，呈梨形，位于孢子前端，占孢子体积的 1/2 以上，极丝盘绕 8~10 圈 (图 2)。孢子总长度 (30.20±3.23) μm (n=35)，总宽度 (12.25±2.93) μm (n=35)；孢子长 (25.85±0.93) μm (n=35)，孢子宽 (8.99±1.76) μm (n=35)；极囊长 (15.47±2.35) μm (n=35)，极囊宽 (6.86±1.48) μm (n=35) (图 2，表 1)。

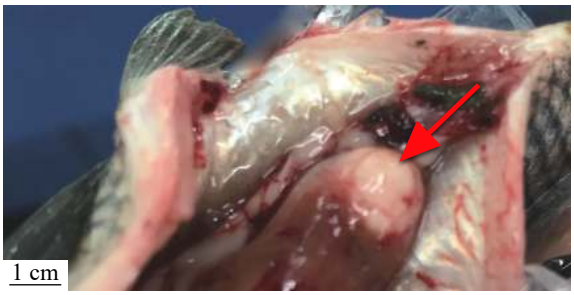

图 1　鲤肠道的吉陶单极虫孢囊

箭头指示孢囊

Fig. 1　Cyst of *T. kitauei* in intestine of *C. carpio*

Arrow shows the cyst

2.2　吉陶单极虫 18S *rDNA* 分子特征

吉陶单极虫重庆株系 18S *rDNA* 序列长度为 1 911 bp，上传至 GenBank，登录号为 MN227353。该序列经 GenBank BLAST 在线比对，结果显示，吉陶单极虫重庆株系与数据库公布的 6 条吉陶单极虫 18S *rDNA* 序列相似度在 99%以上 (99.5%~100.0%)(表 2)。这些序列共有 4 种基因型：韩国首尔株系 (GenBank 登录号：GQ396677) 为基因型Ⅰ (Genotype Ⅰ)；韩国全北株系 (GenBank 登录号：HM624024) 与中国四川株系 1 (GenBank 登录号：JQ690367)、中国四川株系 2 (GenBank 登录号：MF536693) 和中国重庆株系 (GenBank 登录号：MN227353) 共享基因型Ⅱ (Genotype Ⅱ)；中国湖北株系 1 (GenBank 登录号：KR872638) 为基因型Ⅲ (Genotype Ⅲ)；中国湖北株系 2 (GenBank 登录号：MH329616) 为基因型Ⅳ (Genotype Ⅳ)。4 种基因型间遗传距离为 0.000~0.004 (表 2)。

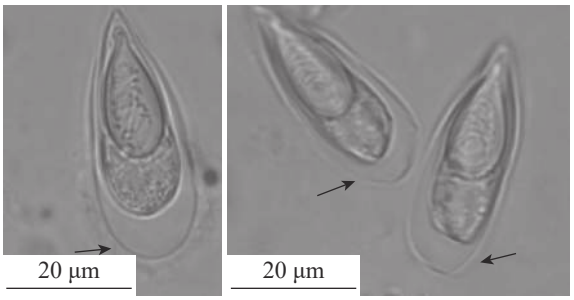

图 2　吉陶单极虫重庆株系孢子形态

(a) 壳面观，(b) 缝面观；箭头指示鞘膜

Fig. 2　Illustrations of Chongqing strain of *T. kitauei*

(a) valvular view, (b) sutural view; arrow shows membranous sheath

表 1　吉陶单极虫四大株系的形态学比较

Tab. 1　Morphological comparison of four strains of *T. kitaue*

吉陶单极虫株系 strains of *T. kitauei*	重庆株 Chongqing strain	湖北株 Hubei strain	日本株 Japan strain	四川株 Sichuan strain
孢子总长/μm　spore total length	30.30±3.32	39.30±4.10	33.4 (31-35)	38.41±2.45
孢子总宽/μm　spore total width	11.10±2.10	15.70±1.30	15.0 (12-17)	13.30±0.87
孢子长/μm　spore length	25.58±2.15	29.60±1.90	26.3 (23-29)	29.98±0.95
孢子宽/μm　spore width	8.85±1.06	10.20±0.60	9.2 (8-11)	8.72±0.51
极囊长/μm　polar capsule length	15.37±2.70	19.70±1.40	16.8 (14-18)	14.73±0.92
极囊宽/μm　polar capsule width	6.94±1.49	7.50±0.30	7.4 (6-9)	6.82±0.45
极丝圈数　polar filament number	8 ~ 10	8 ~ 10	-	8 ~ 10
宿主　hosts	鲤 *C. carpio*	鲤 *C. carpio*	鲤 *C. carpio*	镜鲤 *C. carpio*
感染部位　infected sites	肠	皮肤	肠	肠
地理位置　location	中国重庆	中国湖北	日本盐田	中国四川
资料来源　references	本研究	[19]	[13]	[21]

注：-. 未描述或无数据

Notes: -. no description or no data

吉陶单极虫各株系 18S *rDNA* 序列变异位点分析显示，各基因型间共有 6 个变异位点，以基因型 I 为基准，基因型Ⅱ、基因型Ⅲ和基因型Ⅳ在第 3 号碱基位置均发生颠换 (C→A)；基因型Ⅲ和基因型Ⅳ在第 512 号碱基位置发生颠换 (C→A)；基因型Ⅲ和基因型Ⅳ在第 518 号碱基位置发生颠换 (A→T)；基因型Ⅲ和基因型Ⅳ在第 522 号碱基位置发生颠换 (C→G)；基因型Ⅲ和基因型Ⅳ在第 528 号碱基位置发生颠换 (A→C)；基因Ⅳ在第 631 号碱基位置发生转换 (C→T) (图 3)。

表 2 吉陶单极虫各株系基于 18S *rDNA* 序列的相似度 (右上) 与遗传距离 (左下)

Tab. 2 Similarities (right upper) and genetic distances (left lower) of strains of *T. kitauei* based on 18S *rDNA* sequences

编号 number	吉陶单极虫株系 strains of *T. kitauei*	GenBank 登录号 GenBank accession	编号 number						
			1	2	3	4	5	6	7
1	韩国首尔株系 Seoul strrain in Korea	GQ396677		99.7%	99.9%	99.6%	99.9%	99.6%	99.9%
2	韩国全北株系 Jeonbuk strain in Korea	HM624024	0.001		99.8%	99.5%	99.7%	99.5%	99.8%
3	中国四川株系1 Sichuan strain 1 in China	JQ690367	0.001	0.000		99.7%	99.9%	99.7%	100.0%
4	中国湖北株系1 Hubei strain 1 in China	KR872638	0.003	0.003	0.003		99.6%	99.9%	99.7%
5	中国四川株系2 Sichuan strain 2 in China	MF536693	0.001	0.000	0.000	0.003		99.6%	99.9%
6	中国湖北株系2 Hubei strain 2 in China	MH329616	0.004	0.003	0.003	0.001	0.003		99.7%
7	中国重庆株系 Chongqing strain in China	MN227353	0.001	0.000	0.000	0.003	0.000	0.003	

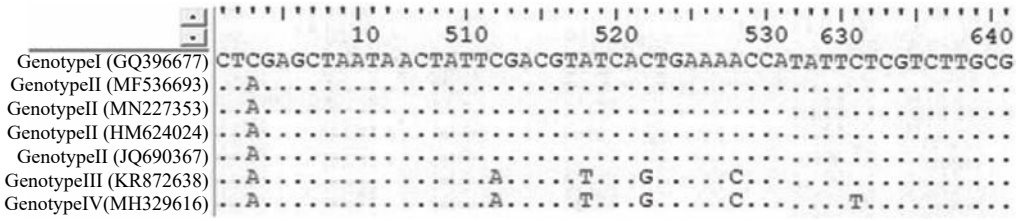

图 3 吉陶单极虫各株系 18S *rDNA* 变异位点分析

Fig. 3 Site variation analysis among strains of *T. kitauei* based on 18S *rDNA*

2.3 系统发育

基于 18S *rDNA* 构建的 ML 和 BI 树呈现出一致的拓扑结构 (图 4)。所有黏孢子虫物种聚为 2 大进化支：Clade A 和 Clade B。其中，Clade A 支的物种均为单极虫，且大部分物种具有鞘膜。Clade B 支中的单极虫 (均不具鞘膜) 先聚为一亚支再与碘泡虫属、双尾虫属和尾孢虫属物种混合聚支。

Clade A 中，所有吉陶单极虫聚成一小支，该小支与光滑单极虫 (*T. hovorkai*) 形成姐妹群关系，再依次与其他单极虫物种聚支。在吉陶单极虫支系中基因型 I (Genotype I) 和基因型 II (Genotype II) 聚为一支，基因型 III (Genotype III) 和基因型 IV (Genotype IV) 聚为一支 (图 4)。在 Clade B 中，寄生部位为鳃的单极虫聚为一支 (group I)，寄生部位为鳍的单极虫聚为另一支 (group II)，这两支互为姐妹支 (图 4)。

3 讨论

本研究在我国重庆地区首次发现吉陶单极虫，宿主为鲤。将该株系 (中国重庆株系) 与日本盐田株系、中国四川株系和中国湖北株系的形态比较发现，四大株系间孢子总长和总宽存在较大差异，孢子总长度差异最大可达约 9 μm，孢子总宽差异最大可达约 4 μm (表 1)。虽然如此，但各株系间的遗传距离 (0.000~0.004) 和序列相似度 (99.5%~100.0%) 却表现为种内水平 (表 2)[45]。同时，四大株系间孢子本身 (除鞘膜外) 大小较为接近 (表 1)，这表明，鞘膜的形态变化是造成四大株系孢子大小差异较大的主要原因。因此，

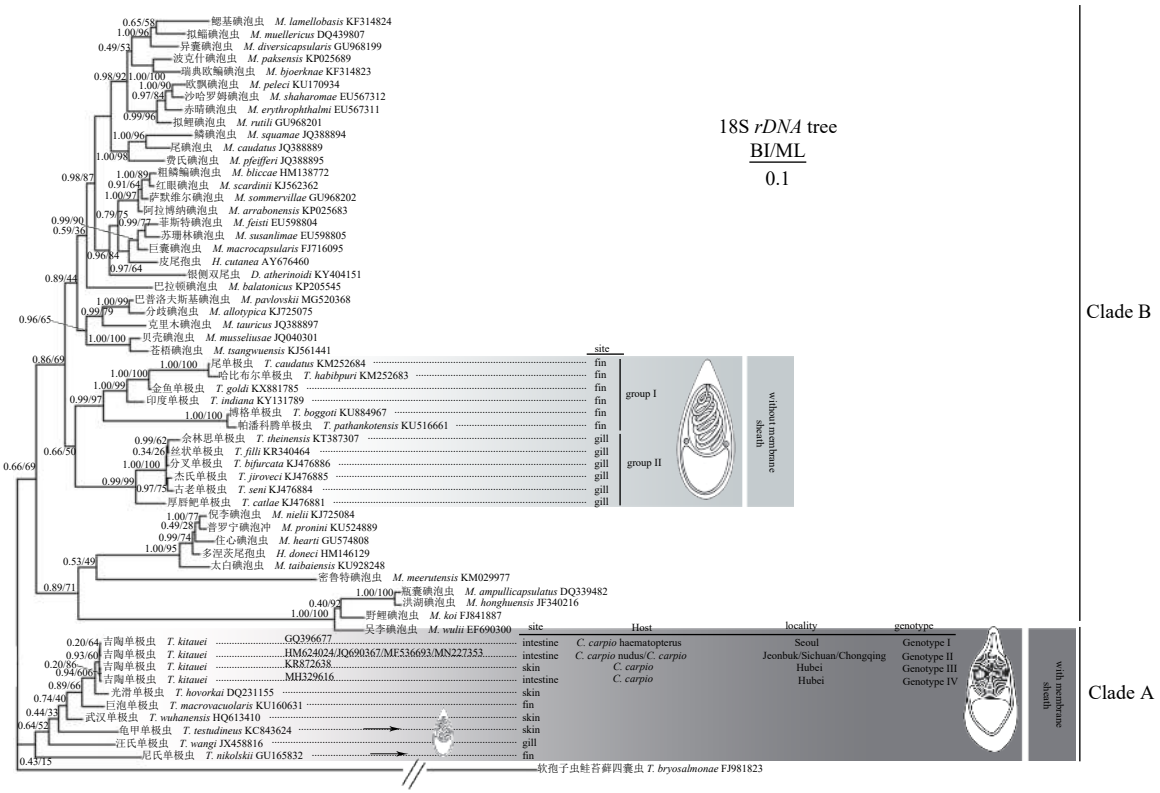

图 4　基于 18S *rDNA* 序列构建的 BI/ML 系统发育树

节点处数值分别表示 BI/ML 树靴攀值; 物种名后面为 GenBank 登录号

Fig. 4　Phylogenetic tree generated by BI/ML based on the 18S *rDNA* gene sequences

Numbers at the nodes are bootstrap confidence values resulting from BI/ML; the number after the species name indicates the GenBank accession number

吉陶单极虫鞘膜形态和大小并不稳定，不宜作为该物种鉴定的主要依据，该物种的鉴定仍应以孢子本身的形态及量度为主[46]。

系统发育分析显示单极虫物种主要聚为两大支系，其中大部分有鞘膜种类聚为一支 (Clade A)，无鞘膜的种类先聚为一亚支 (图 4，group I+group II) 再与其他物种聚为一大支 (Clade B) (图 4)。虽然单极虫在整体上呈现这样的聚支趋势，但并不严格，如具鞘膜支系 Clade A 中尼氏单极虫和龟甲单极虫为不具鞘膜的物种 (图 4)。单极虫是否含有鞘膜及其在系统发育中的位置关系分析表明，虽然单极虫鞘膜的形态和大小并不稳定，但物种自身有无鞘膜可能与其系统发育相关。鞘膜的存在与否可能是单极虫的遗传学特征，与进化有关，但单极虫鞘膜的大小和形态并不稳定，可能与寄生环境、宿主种类及寄生部位等诸多因素有关，而随着今后越来越多单极虫物种的发现及其分子和形态数据的获得，这些关系可能会越来越明晰。系统发育分析还显示，无鞘膜单极虫依据寄生部位的不同形成了特殊的鳍寄生支系 (group I) 和鳃寄生支系 (group II)，两支系形成姐妹群关系 (图 4，Clade B)。而这种依据寄生部位不同而聚支的关系在有鞘膜单极虫支系 (Clade A) 中并不存在 (图 4，Clade A)。这表明，单极虫有鞘膜支系与无鞘膜支系可能有着不同的进化模式，这也进一步证明了单极虫系统发育的并系或多系性[10, 18, 47-48]。

一般而言，宿主种类、地理隔离及寄生部位在种群分化中起着重要作用，而长距离的地理隔离是导致寄生虫种群分化的重要因素[31-33]。本研究中，寄生于皮肤的吉陶单极虫虽然形成了独立的基因型 (Genotype Ⅲ)，但该基因型并未与肠道寄生的所有基因型产生特殊的分歧，如其与基因型Ⅳ (Genotype Ⅳ) 的遗传距离 (0.001) 小于其他肠道基因型 (Genotype Ⅰ *vs*. Genotype Ⅱ) 之间的遗传距离 (0.003) (表 2)。同时，系统发育分析也显示，寄生部位相同的吉陶单极虫并未聚为一支 (图 4)。因此，吉陶单极虫寄生于不同寄生部位的株系并未形成与寄生部位相关的特殊分化。吉陶单极虫中国重庆株系、中国

四川株系及韩国全北株系共享一个基因型 (Genotype Ⅱ)，这表明地理隔离并未造成这些株系的种群分化。以上研究表明，吉陶单极虫不同株系之间的遗传变异与宿主种类、地理隔离和寄生部位并无明显的相关性。吉陶单极虫地理分布较广，但各株系间没有形成较大的遗传分化，也并未形成地理种群特有的单系。这种遗传格局产生的原因可能是各地理分布区吉陶单极虫来源于一个共同的祖先株系，且各地理株系之间隔离的时间较短或存在较频繁的基因交流，尚未形成较大的种群分化。

参考文献 (References)：

[1] Kent M L, Andree K B, Bartholomew J L, *et al*. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2001, 48(4): 395-413.

[2] Lodh N, Kerans B L, Stevens L. The parasite that causes whirling disease, *Myxobolus cerebralis*, is genetically variable within and across spatial scales[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2012, 59(1): 80-87.

[3] Lom J, Dyková I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species[J]. Folia Parasitologica, 2006, 53(1): 1-36.

[4] Zhang J Y, Gu Z M, Kalavati C, *et al*. Synopsis of the species of *Thelohanellus* Kudo, 1933 (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida)[J]. Systematic Parasitology, 2013, 86(3): 235-256.

[5] Seo J S, Jeon E J, Kim M S, *et al*. Molecular identification and real-time quantitative PCR (qPCR) for rapid detection of *Thelohanellus kitauei*, a myxozoan parasite causing intestinal giant cystic disease in the israel carp[J]. The Korean Journal of Parasitology, 2012, 50(2): 103-111.

[6] Liu Y, Jia L, Huang M J, *et al*. *Thelohanellus testudineus* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida) infecting the skin of allogynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(6): 535-542.

[7] Wang G T, Yao W J, Wang J G, *et al*. Occurrence of thelohanellosis caused by *Thelohanellus wuhanensis* (Myxosporea) in juvenile allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), with an observation on the efficacy of fumagillin as a therapeutant[J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(1): 57-60.

[8] Bütschli O. Myxosporidia[M]//Bronn H G. Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs 1. Leipzig, 1882.

[9] Kudo R. A taxonomic consideration of myxosporidia[J]. Transactions of the American Microscopical Society, 1933, 52(3): 195-216.

[10] Zhang X P, Liu Y, Whipps C M, *et al*. Multiple evolutionary routes of the single polar capsule in *Thelohanellus* species (Myxozoa; Myxobolidae)[J]. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 2019, 8: 56-62.

[11] Kitaue K. Intestinal giant-cystic disease affecting the carp, caused by *Thellohanellus* sp.[J]. Fish Pathology, 1980, 14(3): 145-146.

[12] Egusa S, Nakajima K. A new Myxozoa *Thelohanellus kitauei*, the cause of intestinal giant cystic disease of carp[J]. Fish Pathology, 1981, 15(3-4): 213-218.

[13] Fan Z G. Study of thelohanellosis from common carp[J]. Freshwater Fish, 1985, 5: 16-18.

[14] Rhee J K, Kim J O, Kim P G, *et al*. Prophylactic and therapeutic studies on intestinal giant-cystic disease of the israel carp caused by *Thelohanellus kitauei*. I. Course of formation and vanishment of the cyst[J]. The Korean Journal of Parasitology, 1990, 28(3): 183-194.

[15] Shin S P, Jee H, Han J E, *et al*. Surgical removal of an anal cyst caused by a protozoan parasite (*Thelohanellus kitauei*) from a koi (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2011, 238(6): 784-786.

[16] Liu Y, Whipps C M, Liu W S, *et al*. Supplemental diagnosis of a myxozoan parasite from common carp *Cyprinus carpio*: synonymy of *Thelohanellus xinyangensis* with *Thelohanellus kitauei*[J]. Veterinary Parasitology, 2011, 178(3-4): 355-359.

[17] Shin S P, Kim J H, Choresca C H, *et al*. Molecular identification and phylogenetic characterisation of *Thelohanellus kitauei*—short communication[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2013, 61(1): 30-35.

[18] Shin S P, Nguyen V G, Jeong J M, *et al*. The phylogenetic study on *Thelohanellus* species (Myxosporea) in relation to host specificity and infection site tropism[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2014, 72: 31-34.

[19] Zhai Y H, Gu Z M, Guo Q X, *et al*. New type of patho-

genicity of *Thelohanellus kitauei* Egusa & Nakajima, 1981 infecting the skin of common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. Parasitology International, 2016, 65(1): 78-82.

[20] Zhao D D, Borkhanuddin M H, Wang W M, *et al*. The life cycle of *Thelohanellus kitauei* (Myxozoa: Myxosporea) infecting common carp (*Cyprinus carpio*) involves aurantiactinomyxon in *Branchiura sowerbyi*[J]. Parasitology Research, 2016, 115(11): 4317-4325.

[21] Ye L T, Lu M M, Quan K Y, *et al*. Intestinal disease of scattered mirror carp *Cyprinus carpio* caused by *Thelohanellus kitauei* and notes on the morphology and phylogeny of the Myxosporean from Sichuan Province, southwest China[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017, 35(3): 587-596.

[22] 周丽, 宫庆礼, 俞开康, 等. 建鲤吉陶单极虫病的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 59-62.
Zhou L, Gong Q L, Yu K K, *et al*. A preliminary study on the disease of Myxozoa, *Thelohanellus kitauei* of Jian carp (*Cyprinus Carpio* var. *Jian*)[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1998, 28(1): 59-62(in Chinese).

[23] 陶增思, 黎诚耀, 卢强, 等. 基因探针和PCR对鲤吉陶单极虫的检测[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(6): 580-584.
Tao Z S, Li C Y, Lu Q, *et al*. Detection of *Thelohanellus kitauei* by using gene probe and PCR method[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1996, 16(6): 580-584(in Chinese).

[24] 周玉, 杨振国, 张凯, 等. 鲤吉陶单极虫病血液学研究[J]. 湖北农业科学, 2001(6): 72-74.
Zhou Y, Yang Z G, Zhang K, *et al*. Studies on the hematological pathology of common carp parasited by *Thelohanellus kitauei*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2001(6): 72-74(in Chinese).

[25] 冯现维, 杨振国, 闫广谋, 等. PCR技术检测鲤鱼组织吉陶单极虫DNA[J]. 动物医学进展, 2002, 23(5): 62-63.
Feng X W, Yang Z G, Yan G M, *et al*. Detection of *Thelohanellus kitauei* in *Cyprinus carpio* by PCR[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2002, 23(5): 62-63(in Chinese).

[26] 周玉, 杨振国, 李岩松, 等. 鲤吉陶单极虫体被结构的扫描电镜观察[J]. 动物医学进展, 2005, 26(3): 90-91.
Zhou Y, Yang Z G, Li Y S, *et al*. Observation of *Thelohanellus kitauei* by scanning electron microscopy[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(3): 90-91(in Chinese).

[27] 张凤丽, 杨雅麟, 夏锐, 等. 吉陶单极虫可分泌蛋白酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 生物技术进展, 2019, 9(4): 375-383.
Zhang F L, Yang Y L, Xia R, *et al*. Gene cloning and bioinformatics analysis of secret protease gene from *Thelohanellus kitauei*[J]. Current Biotechnology, 2019, 9(4): 375-383(in Chinese).

[28] 叶彩燕, 汪开毓, 何琦瑶, 等. 框镜鲤肠管单极虫病的组织病理学分析及分子鉴定[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 1154-1161.
Ye C Y, Wang K Y, He Q Y, *et al*. Pathohistological analysis and PCR detection of intestinal thelohanellosis in mirror carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 1154-1161(in Chinese).

[29] Le Gac M, Giraud T. What is sympatric speciation in parasites?[J]. Trends in Parasitology, 2004, 20(5): 207-208.

[30] Via S. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2001, 16(7): 381-390.

[31] Criscione C D, Poulin R, Blouin M S. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2247-2257.

[32] Wang M, Zhao Y J, Yang C Z. The impacts of geographic and host species isolation on population divergence of *Myxobolus lentisuturalis*[J]. Parasitology Research, 2019, 118(3): 1061-1066.

[33] Dietrich M, Gómez-Díaz E, McCoy K D. Worldwide distribution and diversity of seabird ticks: implications for the ecology and epidemiology of tick-borne pathogens[J]. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2011, 11(5): 453-470.

[34] McCoy K D. Sympatric speciation in parasites-what is sympatry?[J]. Trends in Parasitology, 2003, 19(9): 400-404.

[35] McCoy K D, Boulinier T, Tirard C, *et al*. Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2001, 14(3): 395-405.

[36] 杨生华, 赵元莙, 陈围, 等. 口腔碘泡虫宿主新纪录及

种群分化研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2018, 35(3): 38-44.

Yang S H, Zhao Y J, Chen W, *et al*. New host record of *Myxobolus oralis* and its population differentiation[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2018, 35(3): 38-44(in Chinese).

[37] 王茂, 赵元莙, 高磊, 等. 荆州碘泡虫寄生部位种群分化[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2019, 36(1): 29-36.

Wang M, Zhao Y J, Gao L, *et al*. Population divergence of *Myxobolus kingchowensis* on different parasite-sites[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2019, 36(1): 29-36(in Chinese).

[38] 杨承忠, 张雕雕, 赵元莙. 吴李碘泡虫的重描述及其长江流域不同江段株系的比较研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(5): 1092-1097.

Yang C Z, Zhang D D, Zhao Y J. Redescription of *Myxobolus wulii* and comparison of its strains in different sections of the Yangtze River Basin[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(5): 1092-1097(in Chinese).

[39] 赵元莙, 马成伦, 宋微波. 海水养殖中原生动物病原虫的鉴定: II 粘孢子虫的研究及鉴定方法[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 681-688.

Zhao Y J, Ma C L, Song W B. Illustrated guide to the identification of pathogenetic protozoa in maricuture-II diagnostic methods for the Myxosporean[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(5): 681-688(in Chinese).

[40] Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference[J]. The Quarterly Review of Biology, 1991, 66(4): 411-453.

[41] Whipps C M, Adlard R D, Bryant M S, *et al*. First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*)[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2003, 50(3): 215-219.

[42] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al*. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.

[43] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J C, *et al*. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(12): 3299-3302.

[44] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.

[45] 冉佼, 杨承忠, 赵元莙. 基于遗传距离的粘孢子虫分类研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2014, 31(3): 31-34.

Ran J, Yang C Z, Zhao Y J. Taxonomic research of the Myxosporidia based on genetic distance[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2014, 31(3): 31-34(in Chinese).

[46] Gao L, Zhang J, Yang C Z, *et al*. *Myxobolus jialingensis* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting urinary bladder and hepatopancreas of yellowhead catfish *Tachysurus fulvidraco* from China[J]. Zootaxa, 2020, 4819(1): 179-186.

[47] Griffin M J, Goodwin A E. *Thelohanellus toyamai* (Syn. *Myxobolus toyamai*) infecting the gills of koi *Cyprinus carpio* in the eastern United States[J]. Journal of Parasitology, 2011, 97(3): 493-502.

[48] Yuan S, Xi B W, Wang J G, *et al*. *Thelohanellus wangi* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a new gill parasite of allogynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) in China, causing severe gill myxosporidiosis[J]. Parasitology Research, 2015, 114(1): 37-45.

New record of geographic distribution of *Thelohanellus kitauei* and its comparative study of different geographic strains

CHEN Hongzhen ,　ZHAO Yuanjun ,　YANG Chengzhong *

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

Abstract: Myxozoa are microscopic parasites that principally infect fish. Some species can cause serious fish disease leading to great economic losses. *Thelohanellus kitauei* is one of those pathogenic species found in many areas. To clarify the genetic variation and phylogenetic relationships among different geographic strains of *T. kitauei*. Comparative analyses were conducted on strains of *T. kitauei* from Chongqing of China, Hubei of China, Shioda of Japan, Jeonbuk of Korea and Seoul of Korea based on their morphology. The comparison and analyses were also conducted for their site variation, similarity, genetic distance, genotype and phylogeny based on 18S *rDNA* sequences. The morphological characteristics of strains of *T. kitauei* from different localities were generally consistent. Among different strains, the similarities were 99.5%-100.0%, variation sites were 0-6, genetic distances were 0.000-0.004, based on 18S *rDNA* sequences. The phylogenetic analysis showed that thelohanellids with membrane sheath clustered as a clade and the remaining thelohanellids without membrane sheath clustered as another clade. The clade without membrane sheath was divided into fin-infection group and gill-infection group. The membrane sheath should not be used as a valid feature for species identification of *T. kitauei* whose identification should still be according to its morphology and morphometry of the spore excluding membrane sheath. Though the shape and size of membrane sheath was unstable, its presence or absence on thelohanellids might associate with phylogeny of thelohanellids. And the evolution pattern for clade possessing membrane sheath might be different from the clade without membrane sheath. The strains of *T. kitauei* did not form special differentiation in different parasitic sites and also did not form monophylies in different localities. The reason for this genetic situation might be: the isolation time was not long enough or there was the high frequence of gene flow among different strains which led to limited population differentiation.

Key words: *Thelohanellus kitauei*; 18S *rDNA*; comparison of strains; new record of geographic distribution

Corresponding author: YANG Chengzhong. E-mail: drczyang@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672280, 31970409); Chongqing Natural Science Foundation (cstc2018jcyjAX0738); Venture & Innovation Support Program for Chongqing Overseas Returnees (cx2018108); Science and Technology Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJQN201900505)