



鲇病原粘孢子虫米氏碘泡虫不同株系的比较

向 乾¹, 谭禄奇², 彭建军^{1,3}, 石小威^{1,4}, 杨承忠^{1*}, 赵元若^{1*}

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 动物生物学重庆市高校重点实验室, 重庆 401331;

2. 重庆师范大学, 淡水鱼类资源保护与利用重庆市重点实验室, 重庆 401331;

3. 湖南科技大学生命科学与健康学院, 湖南湘潭 411201;

4. 铜仁学院, 贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室, 贵州 铜仁 554300)

摘要: 为研究米氏碘泡虫不同寄生部位和不同地理分布的株系差异和遗传分化情况, 实验基于其形态特征、组织向性、地理分布、18S *rDNA* 序列相似度、遗传距离、系统发育, 对米氏碘泡虫各株系进行比较分析。结果显示, 米氏碘泡虫各株系孢子形态特征基本一致; 米氏碘泡虫重庆株系 1 (鲇鳃腔膜寄生)、重庆株系 2 (鲇肠寄生) 和江西株系 (鲇肠寄生) 间相似度为 98.6%~99.9%, 遗传距离为 0.000~0.013; 系统发育分析显示, 米氏碘泡虫重庆株系 2 先与江西株系聚支, 其形成的进化支再与重庆株系 1 形成姐妹群关系。研究表明, 米氏碘泡虫并没有形成地理种群特有的单系, 而是依据寄生部位形成肠寄生支系和鳃腔膜寄生支系。宿主种类相同的条件下, 较之于地理隔离, 寄生部位差异对于米氏碘泡虫种群分化的影响更大。

关键词: 鲇; 米氏碘泡虫; 18S *rDNA*; 株系比较

中图分类号: Q 958.9; S 943

文献标志码: A

粘孢子虫 (Myxosporidia) 是一类形态简单、种类繁多的微型内寄生刺胞动物, 迄今已报道 2 600 余种^[1-2], 主要寄生于鱼类, 少数寄生于两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类^[3-6]。碘泡虫属 (*Myxobolus*) 是粘孢子虫中种类最丰富、分布最广泛的属, 目前已报道种类超过 900 种, 主要寄生于鱼类, 其中一些种类常引起鱼类病害并造成严重经济损失^[1,3]。

米氏碘泡虫 (*M. miyairii*) 是 Kudo^[7] 于 1919 年在日本采集的鲇 (*Silurus asotus*) 肠道中发现并命名的寄生虫。但 Kudo 当时只描述了米氏碘泡虫孢子的壳面观形态及部分形态指标 (孢子长、宽和极

囊长), 随后在我国和俄罗斯也发现该种^[8-9]。Donec 等^[8] 补充描述了米氏碘泡虫的孢子厚度和极囊宽度等数据; 陈启鏊等^[9] 增加了包括孢子厚度、极囊宽度和极丝缠绕圈数等在内的其他特征描述, 并指出米氏碘泡虫具有多个宿主, 如鲇、大口鲇 (*S. meridionalis*)、翘嘴红鲌 (*Chanodichthys erythropterus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和长臀拟鲿 (*Pseudobagrus analis*) 等, 可寄生于多个部位 (体表、肠、肾脏、肝脏、脾脏和鳃等), 但由于当时技术条件限制, 未获得其分子信息。直到 2016 年, Liu 等^[10] 在江西鄱阳湖采集的鲇的肠道发现该种 (下文统一称为: 江西株系) 并首次提

收稿日期: 2023-04-07 修回日期: 2023-07-23

资助项目: 国家自然科学基金 (31970409); 重庆市自然科学基金 (CSTB2022NSCQ-MSX0994); 重庆市教委科学技术研究重点项目 (KJZD-202300503); 重庆市留学人员回国创业创新支持计划 (cx2018108); 贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室开放课题 ([2020]2003)

第一作者: 向乾 (照片), 从事动物系统学研究, E-mail: xq17815366557@163.com

通信作者: 杨承忠, 从事动物系统学研究, E-mail: drczyang@126.com;

赵元若, 从事动物系统学研究, E-mail: zhaoyuanjuncnu@126.com



供了分子数据。

有研究表明, 宿主、寄生部位和地理分布的差异可能导致寄生虫种群发生分化, 甚至形成新种^[11-14]。但对于粘孢子虫类群, 种群或株系分化影响机制方面的研究却比较有限^[15-18], 本研究首次在重庆秀山采集的鲂的鳃腔膜和肠道分别获得了米氏碘泡虫(下文分别称为: 米氏碘泡虫重庆株系 1 和重庆株系 2), 并得到了相应的形态学和分子数据。为研究米氏碘泡虫株系分化与地理分布和寄生部位差异之间的关系, 实验基于形态和分子数据对不同地理分布及不同寄生部位来源的米氏碘泡虫进行比较, 以期为进一步了解该寄生虫的进化生物学特征积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集与物种鉴定

野生鲂宿主于 2020 年 8 月在重庆秀山县郊区河流用孔径为 1 cm 的透明单丝尼龙网捕获, 共 8 尾(体长范围为 20.4~31.5 cm)。活体用适量的 MS-222 麻醉剂 (350 mg/L) 进行安乐死, 然后进行剖检, 检查体表、鳃、肌肉、肝胰脏、肠、胆囊、肾脏、膀胱等部位是否有粘孢子虫孢囊。同时, 取各部位组织进行涂片, 镜检是否有离散孢子的存在。检查到孢囊或离散孢子后, 参考赵元著等^[19]的方法对获取的粘孢子虫新鲜样本进行图像采集及基因组 DNA 提取等工作, 随后结合形态学和分子生物学方法对其进行物种鉴定。

1.2 孢子形态差异性分析

基于成熟孢子的孢子长、孢子宽、极囊长、极囊宽的测量值, 利用 PAST3 进行主成分分析 (PCA), 以分析米氏碘泡虫重庆两株系间的形态差异, 使用变量协变矩阵生成具有 95% 置信区间的散点图。利用 SPSS 16.0 对两株系孢子长、孢子宽、极囊长、极囊宽的差异显著性进行非参数 Mann-Whitney U 检验。

1.3 DNA 提取与 PCR 扩增

DNA 提取 将分别从宿主鲂的鳃腔膜和肠获得的粘孢子虫(重庆株系 1, 重庆株系 2) 孢囊用镊子小心地剥离至 1.5 mL 离心管中, 用灭菌后的解剖针戳破后立即挑取部分孢子镜检, 显微拍照, 剩下的孢子分散于盛有灭菌超纯水的离心管中, 离心富集, 悬浮洗 2~3 次以除去杂质。粘孢

子虫基因组 DNA 提取采用 Dneasy Tissue Kit (QIAGEN, 德国) 试剂盒, 按生产厂家提供的说明书步骤进行操作; 再将成功提取的基因组 DNA 保存于 -20 °C 冰箱备用。

PCR 扩增 用于扩增 18S *rDNA* 的引物为 18e (5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3')^[20] 和 18R (5'-CTACGGAAACCTTGTTACG-3')^[21]。PCR 反应体系及程序: Mix (北京擎科生物科技有限公司) 12.5 μ L, 引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 模板 DNA 2 μ L, 最后用灭菌超纯水补足至终体积 25 μ L。PCR 反应程序: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 90 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。取获得的 PCR 产物于 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 DNA 凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 进行纯化回收, 再将回收产物转入 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 日本) 中, 随后导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 进行单克隆培养, 每株系送 3 个克隆子至北京擎科生物科技有限公司测序, 测序返回的每株系的 3 条 18S *rDNA* 序列均一致。

1.4 序列与系统发育分析

序列选取 将实验获得的米氏碘泡虫重庆株系 1 和重庆株系 2 的 18S *rDNA* 序列分别在 GenBank 的 BLAST 中进行序列同源性比对分析。根据比对结果选择同源性较高的 17 条序列, 加之本实验获得的米氏碘泡虫 2 株系序列。再选取鲑两极虫 (*Myxidium truttae*) (GenBank 登录号: AF-201374)、新楚克拉虫 (*Zschokkella nova*) (GenBank 登录号: DQ377688) 和黄疸楚克拉虫 (*Z. icterica*) (GenBank 登录号: DQ333434) 作为外群构建系统发育树。

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, 序列相似度的计算用在线序列双重比对工具 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) 计算获得。所选序列进行两两之间的遗传距离利用 MEGA 6.0^[22], 选择 K2P 模型计算完成。序列之间的变异位点采用 Bioedit 软件分析。

系统发育树构建 利用 MrBayes 3.1.2 软件构建 BI (Bayesian inference) 树, 通过 Modeltest 3.7^[23] 计算获得最佳进化模型为 GTR+I+G, 共运行 10 000 000 代, 每 200 代抽样 1 次, 在舍弃 25% 的老化样本后, 再依据剩余样本构建一致树。

利用在线软件 CIPRES Science Gateway V. 3.1 (http://www.phylo.org/sub_sections/portal) 构建 ML (Maximum likelihood) 树, 选用模式为 RAxML-HPC2 XSEDE(8.2.12)。然后用 FigTree v 1.3.1 及 Photoshop CS6 编辑系统发育树。

2 结果

在采集的 8 尾鲇中共发现 2 尾感染米氏碘泡虫, 感染率为 25%。其中 1 尾(鱼体长为 27.3 cm) 感染部位为鳃腔膜, 形成 2 个肉眼可见的孢囊(重庆株系 1); 1 尾(鱼体长为 28.6 cm) 感染部位为肠, 形成 6 个肉眼可见的孢囊(重庆株系 2)。未发现米氏碘泡虫同时感染同一宿主不同寄生部位的情况, 孢囊均为乳白色, 球形, 直径约为 1 mm (图 1, 图 2)。

2.1 米氏碘泡虫重庆株系 1 的形态学描述

寄生于鲇鳃腔膜的米氏碘泡虫(重庆株系 1) 成熟孢子壳面观为细长的椭球形, 前端微尖, 后端钝圆, 孢子表面光滑, 两个极囊等大, 呈长梨形(图 1)。重庆株系 1 成熟孢子的量度为: 孢子长 (13.08 ± 0.70) $(10.56 \sim 13.83)$ μm ($n=30$), 孢子宽

(6.09 ± 0.55) $(4.94 \sim 7.17)$ μm ($n=30$); 极囊长 (4.97 ± 0.39) $(4.09 \sim 5.87)$ μm ($n=60$), 极囊宽 (1.34 ± 0.18) $(0.98 \sim 1.87)$ μm ($n=60$)(表 1)。

2.2 米氏碘泡虫重庆株系 2 的形态学描述

寄生于鲇肠的米氏碘泡虫(重庆株系 2) 成熟孢子整体形态同重庆株系 1(图 2)。重庆株系 2 成熟孢子的量度: 孢子长 (13.44 ± 0.63) $(12.43 \sim 14.80)$ μm ($n=30$), 孢子宽 (6.58 ± 0.35) $(6.01 \sim 7.30)$ μm ($n=30$); 极囊长 (5.37 ± 0.39) $(4.12 \sim 6.21)$ μm ($n=60$), 极囊宽 (1.45 ± 0.15) $(0.97 \sim 1.71)$ μm ($n=60$)(表 1)。

主成分分析结果显示, 两株系形态对应的散点聚集, 说明两个株系之间形态相似性非常高(图 3)。通过非参数 Mann-Whitney U 检验结果进一步表明, 米氏碘泡虫重庆株系 1 和重庆株系 2 间孢子形态量度无显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 米氏碘泡虫 18S rDNA 分子特征

米氏碘泡虫重庆株系 1 和重庆株系 2 的 18S rDNA 序列长度分别为 1922 nt 和 1913 nt, 上传至 GenBank, 获得登录号分别为 OP782431 和 OP787906。将米氏碘泡虫两株系 18S rDNA 序列通过 NCBI 数据库 BLAST 在线比对, 结果显示米

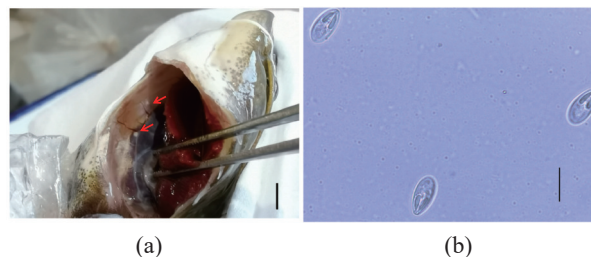


图 1 鲇鳃腔膜寄生的米氏碘泡虫孢囊 (a) 及孢子形态 (b)

(a) 重庆株系 1, 箭头指示孢囊, 比例尺=10 mm; (b) 壳面观, 比例尺=10 μm ; 下同。

Fig. 1 The cysts of *M. miyairii* in gill cavity membrane of *S. asotus* (a) and pore morphology

(a) Chongqing strain 1, arrows show the cysts, scale bar = 10 mm; (b) valvular view, scale bar = 10 μm ; the same below.

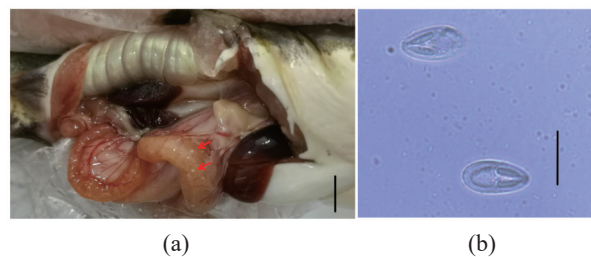


图 2 鲇肠寄生的米氏碘泡虫孢囊 (a) 和孢子形态 (b)

(a) 重庆株系 2。

Fig. 2 The cysts of *M. miyairii* in intestine of *S. asotus* (a) and pore morphology (b)

(a) Chongqing strain 2.

表 1 米氏碘泡虫各株系孢子的形态学比较

Tab. 1 Morphological comparison of spores among strains of *M. miyairii* (in microns)

株系 strain	宿主 host	寄生部位 sites of attachment	采集地 locality	孢子长/ μm spore length	孢子宽/ μm spore width	极囊长/ μm polar capsule length	极囊宽/ μm polar capsule width	资料来源 reference
日本株系 Japanese strain	鲈 <i>S. asotus</i>	肠	日本	13~14.5	6~7	4.5		[7]
俄罗斯株系 Russian strain	鲈 <i>S. asotus</i>	肠	俄罗斯	13~15	6~7	4.5~8.0	1.7~2.0	[8]
混合株系* mixed strain	鲈 <i>S. asotus</i>	体表、肠、鳃、肾、肠系膜、胆、鳃弓、鳃、脾、肝	中国辽宁、湖北、江苏、山东、浙江、四川、重庆、云南、湖南、贵州	11.8 (10.2~13.2)	5.8 (5.0~6.0)	5.3 (4.6~6.4)	1.4 (1.2~1.6)	[9]
江西株系 Jiangxi strain	鲈 <i>S. asotus</i>	肠	中国江西	13.3±0.49 (12.5~14.7)	6.6±0.27 (6.2~7.4)	6.5±0.30 (6.2~7.5)	1.9±0.14 (1.5~2.3)	[10]
重庆株系1 (S1) Chongqing strain 1 (S1)	鲈 <i>S. asotus</i>	鳃腔膜	中国重庆	13.08±0.70 (10.56~13.83)	6.09±0.55 (4.94~7.17)	4.97±0.39 (4.09~5.87)	1.34±0.18 (0.98~1.87)	本研究
重庆株系2 (S2) Chongqing strain 2 (S2)	鲈 <i>S. asotus</i>	肠	中国重庆	13.44±0.63 (12.43~14.80)	6.58±0.35 (6.01~7.30)	5.37±0.39 (4.12~6.21)	1.45±0.15 (0.97~1.71)	本研究

注：混合株系*为《中国动物志：粘体动物门：粘孢子纲》^[9]所描述的米氏碘泡虫信息，该资料未说明各采集地样本的孢子量度。
Notes: The information of mixed strain is from Fauna Sinica: Myxozoa: Myxosporidia^[9], which did not include the specific size of spores from each sampling locality.

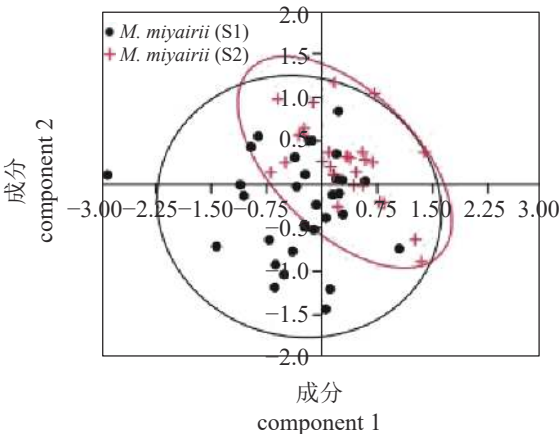


图 3 米氏碘泡虫重庆两株系的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of two Chongqing strains of *M. miyairii*

米氏碘泡虫重庆两株系与江西株系 (KT001495) 的序列相似度最高 (98.6%~99.9%)，遗传距离最小 (0.000~0.013)；其次为鲟尾孢虫 (*Henneguya ictaluri*)

(MZ905347)(87.7%~88.0%；0.011~0.117)。

米氏碘泡虫重庆株系 1 与重庆株系 2 相似度为 98.6%，遗传距离为 0.013，与江西株系相似度为 98.6%，遗传距离为 0.013；重庆株系 2 与江西株系间相似度为 99.9%，遗传距离为 0.000。米氏碘泡虫重庆株系 2 与江西株系 18S *rDNA* 之间，无碱基的替换，但江西株系在 239 位点上存在一个碱基的缺失。米氏碘泡虫重庆株系 1 与重庆株系 2 (或江西株系) 之间存在 22 个变异位点 (17 个转换位点，5 个颠换位点)，重庆株系 1 在 1514 位点上存在一个碱基的缺失 (图 4)。

2.4 系统发育

基于 18S *rDNA* 构建的 ML 和 BI 树呈现相同的拓扑结构。系统发育分析显示，米氏碘泡虫所有株系聚为一支，该支系与绚鲈碘泡虫 (*M. ompok*) (MG760574) 形成姐妹群关系，具有最近的亲缘关系。米氏碘泡虫 3 株系形成的进化支中，

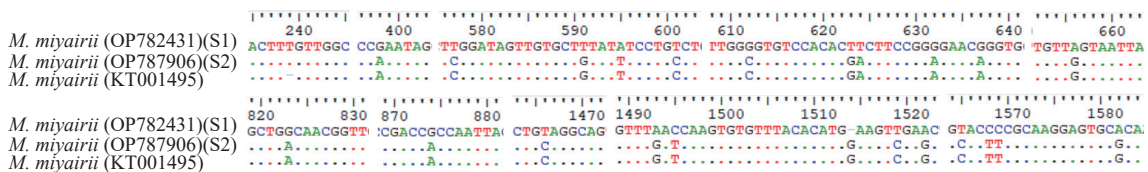


图 4 米氏碘泡虫各株系 18S *rDNA* 序列差异分析

Fig. 4 Site variation analysis of 18S *rDNA* among strains of *M. miyairii*

重庆株系 2 与江西株系 (KT001495) 聚在一支, 共同形成的进化支再与重庆株系 1 形成姐妹群关系 (图 5)。

3 讨论

实验所获米氏碘泡虫重庆株系 (重庆株系 1 和重庆株系 2) 的孢子形态量度与江西株系^[10]、日本株系^[7]和俄罗斯株系^[8]较为接近, 与《中国动物志》^[9]描述的形态量度差异较大, 但各株系孢子形态特征基本一致。本研究米氏碘泡虫重庆两株系间孢子形态基本一致, 主成分分析及非参数 Mann-Whitney U 检验结果显示, 两株系间孢子形态无显著差异, 应为同一物种。

过去诸多基于 18S *rDNA* 为分子标记的粘孢子虫物种鉴定方面的研究表明, 绝大部分粘孢子虫的种内相似度范围为 98.6%~100%^[10,24-27]。本研究米氏碘泡虫重庆株系 1 与重庆株系 2 相似度为 98.6%, 与江西株系相似度为 98.6%; 重庆株系 2 与江西株系间相似度为 99.9%。这从分子水平进一步说明米氏碘泡虫上述 3 株系应为同一物种。

米氏碘泡虫重庆株系和江西株系虽存在着长距离的地理隔离, 但从遗传距离和 18S *rDNA* 序列相似度来看, 3 株系的遗传变异并不能反映地理隔离与株系分化之间的相关性。米氏碘泡虫重庆株系 2 与江西株系的寄生部位相同 (肠), 分子水平上无显著差异 (相似度为 99.9%, 遗传距离为 0.000), 而重庆株系 1 (鳃腔膜寄生) 与上述肠寄生株系 (重庆株系 2 和江西株系) 在分子水平上存在较大差异 (相似度为 98.6%, 遗传距离为 0.013), 这表明寄生于相同部位的米氏碘泡虫具有更近的亲缘关系。系统发育分析结果也显示, 寄生于鳃腔道的重庆株系 2 和江西株系聚为一支, 他们形成的进化支再与鳃腔膜寄生的重庆株系 1 形成姐妹群关系 (图 5)。这说明米氏碘泡虫并没有形成地理种群特有的单系, 而是依据寄生部位形成肠寄生支系和鳃腔膜寄生支系。综合序列比较和系统发育分析结果表明, 宿主种类相同的条件下, 较之于地理隔离, 寄生部位差异对于米氏碘泡虫种群分化的影响可能更大。粘孢子虫种群分化是一个复杂的过程, 不同种类, 其影响因素并不完全

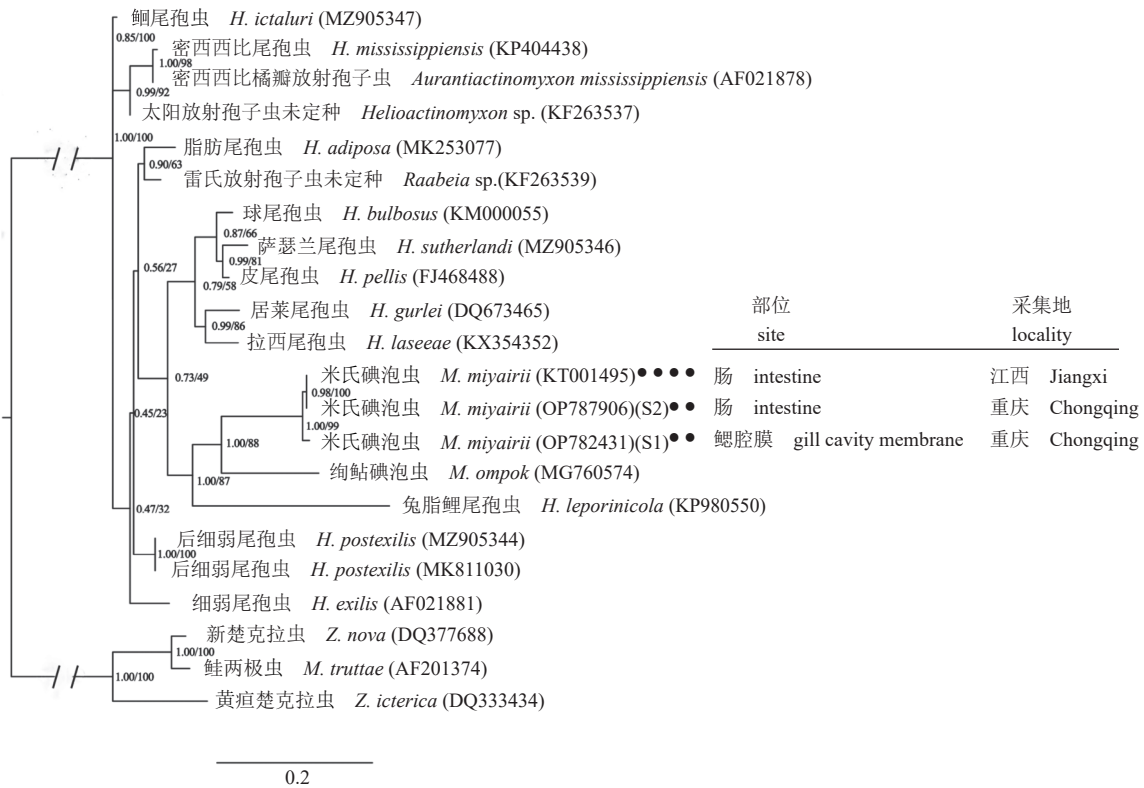


图 5 基于 18S *rDNA* 序列构建的 BI/ML 树

节点数字分别表示 BI 树和 ML 树的支持率; 物种名后面的数字表示 GenBank 登录号。

Fig. 5 BI/ML trees based on 18S *rDNA* sequences

The numbers at the nodes represent support rates of BI/ML trees; the numbers after the species name indicate the GenBank accession number.

一致。如透镜碘泡虫 (*M. lentisuturalis*) 种群分化的主要因素在于宿主种类差异^[28], 荆州碘泡虫 (*M. kingchowensis*) 种群分化主要因素在于寄生部位的不同^[15], 鲑四囊虫 (*Tetracapsuloides bryosalmonae*) 种群分化的主要因素则在于地理隔离^[29], 而人为干扰 (放养感染了脑碘泡虫的虹鳟) 则阻碍了不同地理群体间脑碘泡虫的种群分化^[30]。现有的研究结果虽然揭示了部分粘孢子虫种类种群分化的主要影响因素, 但粘孢子虫种群分化的内在机制其实并不清楚, 这可能涉及到更多更复杂的过程, 如作为终末宿主的环节动物的种类、生境及其行为对于粘孢子虫分布和传播的影响等。因此, 今后有关粘孢子虫种群分化机制方面的研究应综合考虑多因素对其基因流影响的可能性及程度。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development [M]//Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. Myxozoan evolution, ecology and development. Switzerland: Springer International Publishing, 2015: 1-20.
- [2] Okamura B, Hartigan A, Naldoni J. Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2018, 58(6): 1132-1145.
- [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] Hallett S L, Hartigan A, Atkinson S D. Myxozoans on the move: dispersal modes, exotic species and emerging diseases[M]//Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. Myxozoan evolution, ecology and development. Cham: Springer International Publishing, 2015: 343-362.
- [5] MacKenzie K, Kalavati C. Myxosporean parasites of marine fishes: their distribution in the world's oceans[J]. *Parasitology*, 2014, 141(13): 1709-1717.
- [6] Prunescu C C, Prunescu P, Pucek Z, et al. The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha) [J]. *Folia Parasitologica*, 2007, 54(3): 159-164.
- [7] Kudo R. Illinois biological monographs[M]. 1919, 5: 155.
- [8] Donec Z S, Shulman S S. Parasitic protozoa. Phylum cnidosporidia[M]//Bauer O N. Key to parasites of freshwater fishes of the USSR, vol 1. Leningrad: Nauka, 1984: 88-251 (in Russian).
- [9] 陈启鏊, 马成伦. 中国动物志: 粘体动物门: 粘孢子纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 356-357.
Chen Q L, Ma C L. Fauna sinica: Myxozoa: Myxosporea[M]. Beijing: Science Press. 1998: 356-357 (in Chinese).
- [10] Liu X H, Zhang J Y, Batueva M D, et al. Supplemental description and molecular characterization of *Myxobolus miyarui* Kudo, 1919 (Myxosporea: Myxobolidae) infecting intestine of Amur catfish (*Silurus asotus*)[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(4): 1547-1556.
- [11] McCoy K D, Bouludier 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.
- [12] McCoy K D. Sympatric speciation in parasites-what is sympatry?[J]. *Trends in Parasitology*, 2003, 19(9): 400-404.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 王茂, 赵元著, 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).
- [16] 黄艳梅, 赵元著, 周杨, 等. 石斑角形虫 (黏体门, 角形虫科) 的分子证据及其在不同宿主中的遗传变异 [J]. 水生生物学报, 2020, 44(6): 1263-1269.
Huang Y M, Zhao Y J, Zhou Y, et al. First molecular evidence of *Ceratomyxa epinephela* (Myxozoa: Ceratomyxidae) and its genetic variation from different host species[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(6): 1263-1269.

- 1263-1269 (in Chinese).
- [17] 杨承忠, 张雕雕, 赵元著. 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).
- [18] 陈鸿真, 赵元著, 杨承忠. 吉陶单极虫地理分布新记录及不同地理株系间的比较 [J]. *水产学报*, 2021, 45(2): 265-273.
- Chen H Z, Zhao Y J, Yang C Z. New record of geographic distribution of *Thelohanelus kitauei* and its comparative study of different geographic strains[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 265-273 (in Chinese).
- [19] 赵元著, 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 patho genetic protozoa in mariculture-II diagnostic methods for the Myxosporea[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(5): 681-688 (in Chinese).
- [20] Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference[J]. *The Quarterly Review of Biology*, 1991, 66(4): 411-453.
- [21] 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]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2003, 50(3): 215-219.
- [22] 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.
- [23] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [24] Karlsbakk E, Kristmundsson Á, Albano M, *et al.* Redescription and phylogenetic position of *Myxobolus aeglefini* and *Myxobolus platessae* n. comb. (Myxosporea), parasites in the cartilage of some North Atlantic marine fishes, with notes on the phylogeny and classification of the Platysporina[J]. *Parasitology International*, 2017, 66(1): 952-959.
- [25] 刘晓聪, 杨承忠, 赵元著. 洪湖碘泡虫的再描述及其近缘种的鉴别性研究 [J]. *水生生物学报*, 2016, 40(2): 350-357.
- Liu X C, Yang C Z, Zhao Y J. Redescription of *Myxobolus honghuensis* Liu *et al.* 2012 and identification on its genetic related species[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(2): 350-357 (in Chinese).
- [26] Yang C Z, Huang Y M, Atkinson S D, *et al.* Morphological and genetic analysis of *Ceratomyxa saurida* Zhao *et al.* 2015 and *Ceratomyxa mai* sp. nov. (Myxozoa: Ceratomyxidae) from the East China Sea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(1): 005662.
- [27] Molnár K, Eszterbauer E, Marton S, *et al.* Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, 100(3): 231-248.
- [28] 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.
- [29] Henderson M, Okamura B. The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America[J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2004, 271(1549): 1729-1736.
- [30] Whipps C M, El-Matbouli M, Hedrick R P, *et al.* *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1 (its-1) sequences support recent spread of the parasite to north america and within Europe[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 105-108.

Comparative study on different strains of *Myxobolus miyairii* in catfish *Silurus asotus* pathogen

XIANG Qian¹, TAN Luqi², PENG Jianjun^{1,3}, SHI Xiaowei^{1,4},
YANG Chengzhong^{1*}, ZHAO Yuanjun^{1*}

(1. Animal Biology Key Laboratory of Chongqing Education Commission of China, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

2. Chongqing Key Laboratory of Conservation and Utilization of Freshwater Fishes, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

3. School of Life and Health Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China;

4. Guizhou Provincial Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Utilization in the Fanjing Mountain Region, Tongren University, Tongren 554300, China)

Abstract: Myxozoans are microscopic metazoan parasites which are recognized as a group of cnidarians that turned their free-living condition to parasitic life about 600 million years ago. There are more than 2 600 species of myxozoans, which mainly infect freshwater and marine fish, with a few infecting amphibians, reptiles, birds and mammals. *Myxobolus* Butschli 1882, with more than 900 species recorded to date, is the most speciose and wide-spread genus in Myxozoa, some of which can cause serious fish disease and bring great economic loss in fishery. *Myxobolus miyairii* Kudo 1919 is a pathogenic parasite of catfish *Silurus asotus* Linnaeus 1758, which is an economically important fish in China. This parasite was first discovered in Japan and subsequently found in China and Russia, successively. To investigate the strain divergence of *M. miyairii* from different parasitic sites and localities, the comparative study was carried out based on morphological characters, histotropism, geographic distribution, 18S rDNA sequence similarity, genetic distance and phylogeny. The myxospores of Chongqing strain 1 (infecting gill cavity membrane of *S. asotus*) of *M. miyairii* were ellipsoidal in shape with pointed anterior end and blunt posterior end. The myxospores of Chongqing strain 1 were 13.08 ± 0.70 (10.56-13.83) μm in length and 6.09 ± 0.55 (4.94-7.17) μm in width. The two polar capsules positioned at the anterior end of the spores, which were pyriform and equal, measured 4.97 ± 0.39 (4.09-5.87) μm long and 1.34 ± 0.18 (0.98-1.87) μm wide. The morphology of Chongqing strain 2 (infect intestine of *S. asotus*) was generally consistent with the Chongqing strain 1. The results of principal component analysis and Mann-Whitney U test on morphometry of the two strains further confirmed their morphological consistency. The similarity and genetic distance among Chongqing strain 1, Chongqing strain 2 and Jiangxi strain (infecting intestine of *S. asotus*) was 98.6%-99.9% and 0.000-0.013, respectively. Phylogenetic analysis showed that the Chongqing strain 2 and Jiangxi strain clustered together as a clade, which was a sister group to Chongqing strain 1. Results from sequence comparison and phylogenetic analysis indicated that *M. miyairii* did not form monophyletic lineages specific to geographic populations, but rather clustered according to the site of attachment; As far as the same host is concerned, different sites of attachment may have a greater impact on the population divergence of *M. miyairii* than that by geographic isolation. The comparative study of various strains of *M. miyairii* and its results are of great significance for people further understanding the evolution characteristics of *M. miyairii*.

Key words: *Silurus asotus*; *Myxobolus miyairii*; 18S rDNA; comparison of strains

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

ZHAO Yuanjun. E-mail: zhaoyuanjuncqnu@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31970409); Chongqing Natural Science Foundation (CSTB2022NSCQ-MSX0994); Science and Technology Research Key Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJZD-K202300503); Venture and Innovation Support Program for Chongqing Overseas Returnees (cx2018108); Open Research Fund of Guizhou Provincial Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Utilization in the Fanjing Mountain Region ([2020]2003)