



三棱碘泡虫 (粘体动物门: 碘泡科) 重描述及其系统发育关系分析

刘新华¹, 翁美其^{2,3}, 宋锐⁴, 赵媛莉^{2,3}, 李爱华^{2,3}, 章晋勇^{2,3,5*}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 农业农村部淡水养殖病害防治重点实验室, 湖北武汉 430072;

3. 中国科学院大学, 北京 100049;

4. 湖南省水产科学研究所, 湖南长沙 410153;

5. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要: 为有效鉴定三棱碘泡虫的有效性, 补充其生物学特征, 实验利用现代粘孢子虫整合分类学方法, 包括形态特征、寄生特性(宿主特征和寄生部位)及分子特征, 对其进行重新描述, 证实其分类有效性, 探讨其系统发育关系。结果显示, 三棱碘泡虫专性寄生于草鱼鳃丝间, 未在其他器官(肝脏、肾脏、肠道等)检获孢子。包囊呈乳白色, 长椭圆形, 长(2.4±0.3)(2.1~2.7) mm, 宽(0.8±0.1)(0.6~0.9) mm。成熟孢子壳面观呈卵圆形, 孢子后端未见“V”形褶皱, 孢子外包裹有一层透明的圆形黏液膜, 缝面观呈纺锤形, 孢子缝面可见三条平行而突出的脊线; 孢质均匀, 孢子后端具有一个大嗜碘泡; 成熟孢子长(10.3±0.4)(9.4~11.0) μm, 宽(9.5±0.5)(8.7~10.9) μm, 厚(7.4±0.5)(6.4~8.0) μm; 两极囊等大, 梨形, 极丝7~8圈; 组织病理显示, 病灶鳃组织未出现严重炎症反应。BLAST比对发现, 三棱碘泡虫与隐杆碘泡虫小核糖体RNA序列相似性最高(89.58%), 但远低于种内序列相似性。分子系统发育分析结果显示, 三棱碘泡虫先与寄生于鲤科鱼类的隐杆碘泡虫形成姊妹关系, 再与寄生于胭脂鱼科鱼类鳃的诺布尔碘泡虫、微小碘泡虫及毕斯塔斯碘泡虫形成独立的鳃寄生碘泡虫分枝, 表明宿主亲缘关系与组织趋向性在鱼类组织寄生碘泡科粘孢子虫系统演化历程中扮演重要作用。本研究补充了三棱碘泡虫包囊形态结构、组织趋向性及分子数据, 证实了其分类有效性。

关键词: 草鱼; 三棱碘泡虫; 粘孢子虫; 鳃; 系统发育分析

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

粘体动物(Myxozoa)是一类个体微小、形态结构简单、高度适应寄生生活的后生动物^[1-2], 可寄生于鱼类、两栖类、爬行类、鸟类以及哺

乳类动物等多个组织器官^[3-7]。碘泡虫属(*Myxobolus*)是粘体动物中物种多样性最高的类群, 已报道850余种^[8-9], 我国境内记述了300余种^[10]。

收稿日期: 2020-07-23 修回日期: 2020-09-08

资助项目: 湖南农业大学神农学者青年英才人才引进经费(540741900599); 湖南省现代农业产业技术体系项目(湘农发[2019]05号); 国家自然科学基金(31772411, 31772832); 湖北省自然科学基金(2018CFA074); 山东省泰山学者青年专家(tsqn201909133); 青岛农业大学高层次人才引进经费

第一作者: 刘新华(照片), 从事鱼类寄生虫学研究, E-mail: liuxinhua1990@163.com

通信作者: 章晋勇, E-mail: zhangjy@ihb.ac.cn; zhangjyong@126.com



鱼类粘孢子虫的传统分类主要基于成熟孢子的形态学特征进行物种鉴定、分类阶元划分。然而,粘孢子虫孢子具有较大可塑性,许多种在孢子形态上难以区分,导致以往记录或命名的种存在大量的同物异名、同名异物及隐存种的出现,许多具有较严格宿主与寄生部位特异性的种类被记录为多宿主、多组织器官寄生,这在多样性最高的碘泡虫科(Myxobolidae)尤甚^[11-13],如Liu等^[13]基于形态学特征、寄生部位特异性以及分子数据证实了此前我国报道的异形碘泡虫是贝壳碘泡虫的同物异名种。整合孢子形态、生态信息(组织趋向性、宿主亲缘关系及地理分布等)及分子特征等的粘孢子虫现代整合分类方法已在学界形成共识,粘孢子虫种类的描述必须提供准确的分子数据。基于该方法,近20年全球范围内厘定了大量非有效种,也发现了一些新种,极大地促进了人们对全球水生粘孢子虫多样性及各阶元粘孢子虫系统发育的认识。鉴于我国粘孢子多样性较高,且大多数记录或鉴定于20世纪,不少种的命名与鉴定有待商榷,因此,笔者就已报道的种类,尤其是前辈科学家命名的新种,开展了针对性的厘定工作,以求更全面了解水生粘孢子虫多样性、构建更合理的粘孢子虫分类系统。

三棱碘泡虫(*M. tricostatus*)最初由李连祥与倪达书先生在湖北黄冈一养殖场的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)鳃与脾脏中发现并命名,因其缝脊两侧各有1条与缝脊平行且粗细相同的脊线,使得孢子缝面观可见3条明显的脊线而得名^[10]。随后,在浙江养殖水域及钱塘江、曹娥江、甬江也相继发现三棱碘泡虫,但以上报道均仅基于其孢子形态的简单描述,未发现营养体与包囊,仅在鳃与脾脏位置发现散落孢子,无法确定其寄生部位。越来越多的证据表明,鱼类组织寄生碘泡虫科物种具有相对严格的组织趋向性,因此,我们认为前述报道的寄生于草鱼鳃与脾脏两部位的三棱碘泡虫可能为形态相似的2个种。基于现代粘孢子虫整合分类方法厘定三棱碘泡虫命名的有效性,对区分可能存在的隐存种、鉴定形态相似难以区分种及阐释碘泡虫科内系统发育关系等都十分有必要。本课题组在开展我国草鱼粘孢子虫多样性的调查过程中发现,时隔近50年,在湖北武汉汤逊湖野生草鱼鳃丝再次发现三棱碘泡虫,本研究补充了

其包囊形态结构、组织趋向性及分子数据,并对其进行了重新描述,证实了其分类有效性,同时探讨了其系统发育位置及与邻近种系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 样本采集及处理

2018年7月于武汉市汤逊湖(30°41'08" N, 114°39'42" E)用拖网捕获草鱼14尾,体质量为1.3~2.1 kg,活体运输至实验室,暂养于50 L的水族箱中。按照《鱼病诊断与防治手册》^[14]对鱼体进行解剖与观察。首先,肉眼及解剖镜筛查鱼体表、鳃、肾脏、肝脏及肠道等表面是否出现可能的粘孢子虫包囊;然后依次取各器官进行压片观察,出现包囊或成熟孢子的器官组织制作压片,对孢子形态结构进行细致观察并拍照,获取孢子形态学参数。同时,将感染的病灶组织分别保存于95%乙醇、10%福尔马林及2.5%戊二醛溶液中,用于后续基因组提取、标本保存、组织病理分析及超微结构观察。

1.2 形态学观察

取单个包囊于载玻片上,用灭菌的解剖针刺破,滴少量蒸馏水,置于显微镜下(Olympus BX53)观察、拍照及测量(目镜10倍×物镜40倍)。参照Lom等^[15]建议的粘孢子虫形态描述标准对三棱碘泡虫进行测量与描述,随机选取50个成熟孢子,分别测量其孢子长、宽、厚及极囊长、宽。测量单位均为微米(μm),以平均值±标准差表示。极丝圈数在400倍光学显微镜下观察获得。模式图采用CorelDraw X 6.0软件绘制。

1.3 组织病理学

感染的鳃丝固定于10%中性福尔马林溶液48 h后,经乙醇和丙酮梯度脱水后移入二甲苯中透明,浸蜡包埋后切片,按照常规组织学方法进行石蜡切片制作,切片厚度为4~6 μm ,苏木精-伊红(H.E)染色后观察。

1.4 透射电镜观察

感染的鳃组织4℃条件下固定于2.5%的中性戊二醛溶液24 h后,经中性磷酸缓冲溶液(PBS)漂洗、系列丙酮脱水、渗透、包埋、切片后再醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,最后通过HITACHI H-7700透射电镜观察,工作电压为80 kV。

1.5 DNA提取、18S rDNA序列的扩增和测定

取95%乙醇保存的感染鳃丝,用PBS离心洗涤2次去除残余乙醇。利用DNA提取试剂盒(Qiagen,德国)提取样品基因组DNA。18S rDNA序列通过粘孢子虫通用引物MyxospecF(TTCTGCCCTATCAACTWGTG)^[16]和18R(CTACGGAAACCTTGTTACG)^[17]进行扩增。PCR反应体系:25 μL 1×PCR mixture(北京康为生物科技有限公司),DNA模板2 μL,正反引物各2.0 μL,双蒸水补至50 μL体系。PCR反应程序:94 °C预变性4 min;94 °C变性1 min,46 °C退火50 s,65 °C延伸90 s,35个循环;65 °C终延伸10 min。取10 μL PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,用胶回收试剂盒(北京康为生物科技有限公司)进行回收纯化,将目的片段连接到PMD 18-T载体(TaKaRa,日本),再转化到感受态细胞DH 5α中,于50 μL/mL氨苄青霉素的LB固体培养基均匀涂布并培养过夜,挑取阳性克隆用于测序。测序在自动测序仪ABI PRISM 3730 DNA Sequencer(Applied Biosystems,美国)上完成。测序结果通过BioEdit软件^[18]进行拼接,并根据测序峰图人工校正(DNASTAR INC.,Madison,Wis),最后将拼接完毕的序列提交至GenBank。

1.6 系统发育关系分析

将获得序列进行BLAST分析后从GenBank上选取相似碘泡虫科种类的18S rDNA序列构建系统发育树,以萨氏新角形虫(*Ceratomyxa shasta*)作为外类群。首先利用CLUSTAL 1.8软件^[19]对选取的序列进行多重比对,并经人工编辑、校对,分别利用最大似然法(Maximum Likelihood,

ML)和贝叶斯法(Bayesian Inferences, BI)对序列进行系统发育分析(各分支上的数值依次为BI法产生的后验概率和ML法产生的置信度值)。通过jModelTest^[20]筛选得到最佳核酸替代模型为GTR+I+G。ML分析利用PhyML3.0软件^[21]完成,运算100代。BI分析利用Mr. Bayes软件进行操作^[22],以随机树(Random tree)为起始树,替代模型参数Nst为6,马尔科夫链的蒙特卡洛方法(Markov Chain Monte Carlo process)设置为4条链同时运行1000000代,获得的系统发育树用Fig-Tree v1.4.2(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)和Adobe Illustrator(Adobe Systems Inc.,美国)进行查看、编辑和注释。

2 结果

对采集的样本检查发现,有3尾草鱼的鳃丝上出现大量白色包囊(图版 I -1),包囊呈长椭圆形,长(2.4±0.3) 2.1~2.7 mm,宽(0.8±0.1) 0.6~0.9 mm,每片鳃上包囊个数不等,但多分布于鳃丝中段,最多可达12个,感染率为21.4%(3/14),所有样品暂养于实验室过程中未出现死亡。取单个包囊进行压片观察,可见大量碘泡虫成熟孢子(图版 I -2),其他组织器官如肝脏、肾脏、肠道及脾脏等未发现粘孢子虫。

2.1 形态学描述

成熟孢子壳面观为卵圆形,缝面观呈梨形,前端钝圆,孢子后端无“V形”褶皱,缝脊较为特殊,在缝脊的两侧各有1条与其平行的隆脊,连一起呈3条平行而突出的脊线(图版 I -3,4,图1),部分孢子孢壁外被一层透明的黏液膜(图版 I -2),



图版 I 三棱碘泡虫光镜观察

1. 感染症状; 2. 壳面观, 黏液膜(箭头); 3. 缝面观; 4. 缝脊线以及2条与缝脊平行的缝线放大图

Plate I Light microscopic observation of *M. tricostatus*

1. Clinical signs of *M. trocostatus* infection, showing the whitish oblong plasmodia dwelling in the gills of *C. idella*; 2. *M. tricostatus* in frontal view and a spore encapsulated within a transparent mucous envelope (arrow); 3. *M. tricostatus* in sutural view; 4. the magnification of *M. tricostatus* in sutural view, showing the pattern of three distinct parallel ridge

孢质均匀, 嗜碘泡明显, 位于孢子后端。孢子长 (10.3 ± 0.4) $(9.4 \sim 11.0)$ μm , 宽 (9.5 ± 0.5) $(8.7 \sim 10.9)$ μm , 厚 (7.4 ± 0.5) $(6.4 \sim 8.0)$ μm 。2个极囊等大, 梨形, 微呈“八”字形分开, 位于孢子前段, 约占1/2孢子长, 极囊下方各有一个极囊核(图2), 极囊长 (5.5 ± 0.3) $(4.8 \sim 6.2)$ μm , 宽 (3.3 ± 0.3) $(3 \sim 4.2)$ μm , 极丝圈数7~8圈(图2)。

2.2 组织病理

组织病理观察发现, 三棱碘泡虫包囊位于鳃丝间, 即将从鳃上脱落, 未出现明显的炎症反应, 但包围包囊的鳃丝出现明显的上皮细胞增生。通常包囊外被一层结缔组织与包围鳃丝上皮细胞隔离, 未成熟孢子聚集在包囊边缘, 成熟孢子多集聚于包囊中央(图版II)。

2.3 分子特征

利用粘孢子虫通用引物扩增得到1757bp三棱碘泡虫18S rDNA片段。BLAST比对发现, 三棱碘泡虫与寄生于高体雅罗鱼(*Leuciscus idus*)和拟鲤(*Rutilus rutilus*)鳃的隐杆碘泡虫(*M. elegans*)相似性最高, 达89.58%。将其与序列相似性较高的种类进行序列相似性与遗传距离分析, 结果发现序列相似性与遗传距离范围为0.191/80.9%至0.111/89.9%(表1)。分子系统发育关系分析表明, 三棱碘泡虫与寄生于同属雅罗鱼亚科(Leuciscinae)的高体雅罗鱼和拟鲤的隐杆碘泡虫形成姊妹枝, 再与寄生于亚口鱼科(Catostomidae)的小口牛胭脂鱼(*Ictiobus bubalus*)的诺布尔碘泡虫(*M. enoblei*)、微小碘泡虫(*M. minutus*)及康氏亚口鱼(*Catostomus commersoni*)的毕斯塔斯碘泡虫(*M. bibullatus*)一起聚类在鲤形目(Cyprini-formes)鱼类鳃寄生的碘泡虫大枝, 各节点有较高支持率。然而, 同寄生于草鱼鳃的饼形碘泡虫(*M. artus*)并未与三棱碘泡虫聚为一枝, 而与肌肉寄生的碘泡虫种类聚为独立的一枝(图3)。

分类学信息

三棱碘泡虫 *Myxobolus tricostatus* Li et Nie, 1973

宿主: 草鱼 *Ctenopharyngodon idella* Cuvier et Valenciennes, 1844

采样地点: 武汉市汤逊湖 (30°41'08" N, 114°39'42" E)

寄生部位: 鳃丝

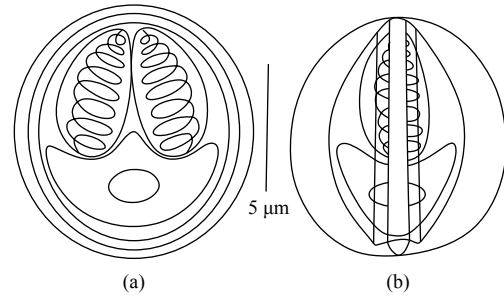


图1 三棱碘泡虫模式图

(a) 壳面观, (b) 缝面观

Fig. 1 Mode pattern of *M. tricostatus*

(a) *M. tricostatus* in frontal view, (b) *M. tricostatus* in sutural view

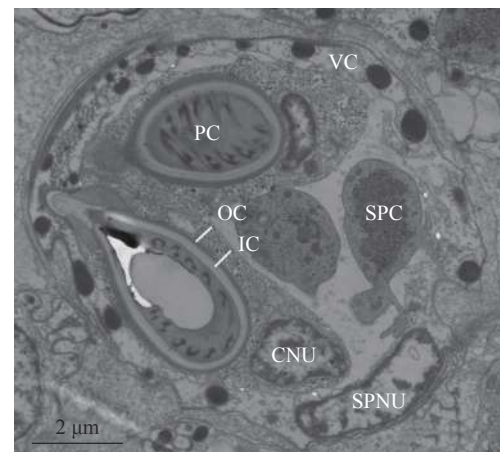


图2 三棱碘泡虫未成熟孢子亚显微结构图

PC. 极囊, OC. 极囊壁高电子密度外层, IC. 极囊壁电子密度透明内层, VC. 壳瓣细胞, SPC. 孢原质细胞, CNU. 极囊核, SPNU. 孢原质核

Fig. 2 The ultrastructure of immature spores of *M. tricostatus*

PC. polar capsules, OC. outer electron-dense layer of polar capsules' wall, IC. inner electron-lucent layer polar capsules' wall, VC. valvogenic cell, SPC. sporoplasm cell, CNU. capsulogenic nucleus, SPNU. sporoplasm nucleus

宿主大小: 体质量 (1.50 ± 0.36) $(1.3 \sim 2.1)$ kg

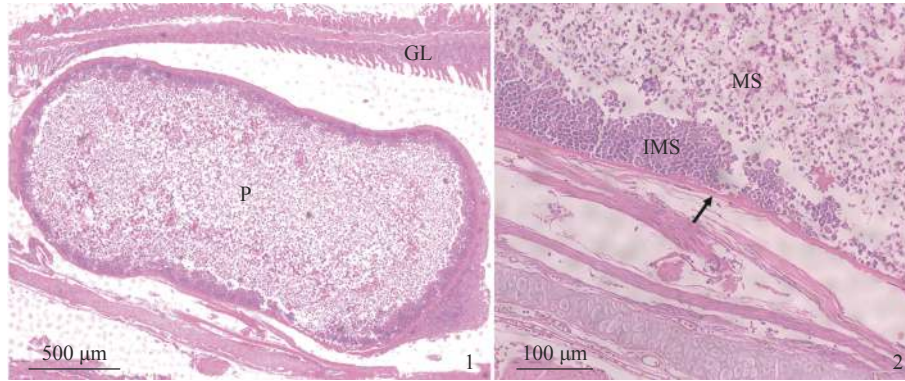
感染率: 21.4% (3/14)

样本保存: 10% 甲醛溶液固定标本保存于中国科学院水生生物研究所标本馆, 标本号: MTR201712041

GenBank 序列号: MK433255

3 讨论

草鱼隶属于鲤形目鲤科(Cyprinidae)雅罗鱼亚科草鱼属(*Ctenopharyngodon*), 是全球养殖产量最高的淡水鱼类, 2019年仅我国草鱼年产量达



图版 II 三棱碘泡虫寄生于鳃组织病理切片

1. 单个包囊在两片鳃之间; 2. 包囊被一层结蹄组织包围 (箭头), 未成熟孢子在包囊边缘, 而成熟孢子在中央位置; P. 包囊, GL. 鳃丝, IMS. 未成熟孢子, MS. 成熟孢子

Plate II Histological analysis of gills of *C. idella* with the infection of *M. tricoelosis*

1. a plasmodium (P) dwelling between two gill filaments (GL); 2. the plasmodium was encapsulated by a thin concentric layer of connective tissue (arrow) and the immature spores (IMS) accumulated in the periphery of plasmodia and mature spores (MS) located centrally; P. plasmodium, GL. gill filament, IMS. immature spore, MS. mature spore

表 1 三棱碘泡虫与其他相似碘泡虫种类基于 18S rDNA 的相似性 (上面对角) 和遗传距离 (下面对角)

Tab. 1 Comparison of sequence similarities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) of *M. tricoelosis* with other genetically related *Myxobolus* spp. based on the partial 18S rDNA

序号与种名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 三棱碘泡虫 <i>M. tricoelosis</i> MK433255		89.9	82.0	83.5	82.8	83.9	83.0	82.5	82.9	81.1	80.9	81.7	81.5
2 隐杆碘泡虫 <i>M. elegans</i> AF448445	0.111		80.7	84.0	83.7	82.5	82.4	79.8	83.2	81.2	80.7	81.1	81.7
3 碘泡虫未定种 <i>Myxobolus</i> sp. MG253819	0.180	0.193		82.0	80.7	81.1	81.4	79.6	81.7	89.8	89.8	88.7	89.8
4 微小碘泡虫 <i>M. minutus</i> KU232372	0.165	0.160	0.180		88.7	84.0	83.7	81.9	91.3	83.4	82.0	83.3	82.7
5 诺布尔碘泡虫 <i>M. enoblei</i> MG941009	0.172	0.167	0.193	0.113		83.9	83.6	82.4	88.9	81.1	81.6	81.9	82.1
6 变异碘泡虫 <i>M. varius</i> MK371244	0.161	0.175	0.189	0.160	0.161		93.7	85.0	83.8	82.9	81.8	83.2	82.4
7 碘泡虫未定种 <i>Myxobolus</i> sp. MK371248	0.170	0.176	0.186	0.163	0.164	0.063		85.2	83.8	82.9	81.8	83.2	82.4
8 英明仕碘泡虫 <i>M. intimus</i> JF311899	0.175	0.202	0.204	0.181	0.176	0.150	0.148		82.0	80.6	79.1	79.9	81.3
9 毕拉塔斯碘泡虫 <i>M. bibullatus</i> AF378336	0.171	0.168	0.183	0.087	0.111	0.162	0.162	0.180		81.3	81.7	81.6	82.1
10 巨间碘泡虫 <i>M. abitus</i> MG520367	0.189	0.188	0.102	0.166	0.189	0.167	0.171	0.194	0.187		89.3	91.5	94.6
11 阿冈碘泡虫 <i>M. algonquinensis</i> AF378335	0.191	0.193	0.102	0.180	0.184	0.187	0.182	0.209	0.183	0.107		90.6	89.0
12 东方碘泡虫 <i>M. bramae</i> AF507968	0.183	0.189	0.113	0.167	0.181	0.167	0.168	0.201	0.184	0.085	0.094		81.8
13 鲢碘泡虫 <i>M. drjagini</i> MF543859	0.185	0.183	0.102	0.173	0.179	0.167	0.176	0.187	0.179	0.054	0.110	0.092	

就 5.5 千万 t^[23]。目前, 在我国境内报道的草鱼寄生粘孢子虫种类达 41 种, 但绝大部分的种类都不会造成严重的病害, 仅饼形碘泡虫在 20 世纪 60 年代被报道引起全国各地草鱼夏花苗种严重粘孢子虫病, 造成苗种的大量死亡^[10, 24], 但近 20 年里未再出现。笔者近期在调查我国草鱼粘孢子虫多样性的过程中, 发现并采集到一种粘孢子虫, 经比较分析后发现其为三棱碘泡虫。

鉴于原始描述提供的分类学信息过少, 其有效性存疑, 本研究特利用粘孢子虫现代整合分类方法对其进行补充描述, 并证实了其分类有效性。尽管发现的三棱碘泡虫成熟孢子形态大小 (包括孢子长度、宽度以及厚度) 与极囊大小均与原始记录略有差异, 但都在种类形态变异范围之内。本实验首次报道了其极丝圈数为 7~8 圈, 而此前报道并未给出极丝圈数, 这可能与当时

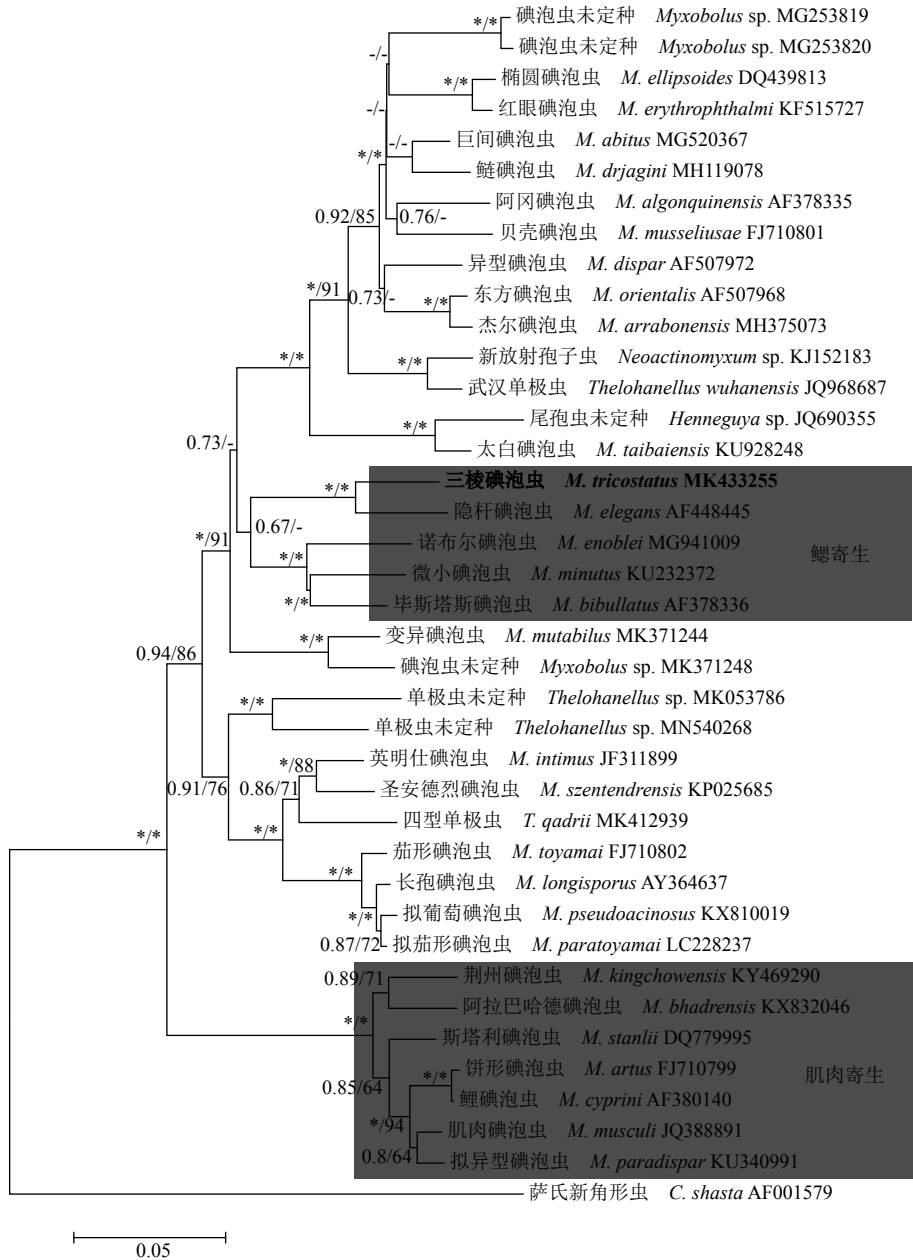


图 3 基于三棱碘泡虫 SSU rRNA 基因构建所得的贝叶斯树 (BI)

三棱碘泡虫以粗体表示, *. 表示支持率超过 95%, - 表示支持率低于 50%

Fig. 3 Phylogenetic tree generated by Bayesian analysis of the aligned partial SSU rRNA gene sequences of *M. tricostatus*

M. tricostatus was marked in bold, *. indicated support rate exceeding 95%, - indicated support rate below 50 percent

显微镜分辨率较低有关。另外, 本研究首次发现了三棱碘泡虫的营养体与包囊, 确定了其孢子发生, 以及寄生部位为鳃丝间, 而未在鳃丝感染的草鱼及其他未感染草鱼脾脏发现其包囊, 推测前人可能在草鱼脾脏发现了形态类似三棱碘泡虫的其他碘泡虫种类。

三棱碘泡虫成熟孢子壳面观呈卵圆形, 缝面观呈梨形, 与其形态最为相似的种类有寄生于

草鱼鳃上的中南碘泡虫 (*M. chungnanensis*)、刺虎碘泡虫 (*M. acanthogobii*) 以及椭圆碘泡虫 (表 2)^[10]。通过比较分析发现, 三者与三棱碘泡虫可明显区分。中南碘泡虫未在鳃丝形成白色包囊, 且其极囊大小 [(4.8~6.2) μm × (3.0~4.2) μm vs. (3.6~4.8) μm × (2.4~2.8) μm] 比三棱碘泡虫更小, 极丝圈数 (5~6 圈 vs. 7~8 圈) 更少。尽管刺虎碘泡虫与椭圆碘泡虫在草鱼鳃丝上均形成包囊, 但二

者包囊均比三棱碘泡虫小(表 2)。另外,刺虎碘泡虫极囊更小 [(3.6~4.8) μm \times (2.8~3.6) μm vs. (4.8~6.2) μm \times (3.0~4.2) μm], 极丝圈数更少 (4~5 圈 vs.

7~8 圈)。椭圆碘泡虫孢子长度较三棱碘泡虫略大,但其极囊更小,极丝圈数更少。此外,三棱碘泡虫孢子末端无椭圆碘泡虫一样的“V”形褶皱。

表 2 三棱碘泡虫与已报道相似碘泡虫种类形态学比较

Tab. 2 Morphological comparison of *M. tricostatus* with other morphologically similar *Myxobolus* spp.

物种名 species name	三棱碘泡虫 <i>M. tricostatus</i>	三棱碘泡虫 <i>M. tricostatus</i>	中南碘泡虫 <i>M. chungnanensis</i>	刺虎碘泡虫 <i>M. acanthogobii</i>	椭圆碘泡虫 <i>M. ellipsoides</i>
感染部位 infection sites	鳃 gill	鳃 gill、脾脏 spleen	鳃 gill	鳃 gill	鳃 gill
孢子形态 spore shape	卵圆形 oval	卵圆形 oval	卵圆形 oval	卵圆形 oval	椭圆形 oval
孢子长/ μm spore length	10.3 \pm 0.4 (9.4~11.0)	9.3 (8.4~10.8)	9.7 (8.4~10.8)	10.0 (9.6~10.8)	11.0 (9.6~12.0)
孢子宽/ μm spore width	9.5 \pm 0.5 (8.7~10.9)	8.5 (7.2~9.0)	8.7 (8.0~9.6)	9.0 (7.8~9.6)	7.3 (7.0~7.8)
孢子厚/ μm spore thickness	7.4 \pm 0.5 (6.4~8.4)	6.0~7.2	6.3 (6.0~6.6)	5.8~6.6	6.0
极囊长/ μm polar capsule length	5.5 \pm 0.3 (4.8~6.2)	4.5 (3.6~4.8)	3.9(3.6~4.8)	3.8 (3.6~4.8)	4.9 (4.5~5.4)
极囊宽/ μm polar capsule width	3.3 \pm 0.3 (3.0~4.2)	2.9 (2.4~3.0)	2.7(2.4~2.8)	3.0 (2.8~3.6)	3.0 (2.4~3.2)
极丝圈数/ μm coils of polar filaments	7~8	—	5~6	4~5	5
参考文献 references	本研究 this study	[10]	[10]	[10]	[10]

注: —, 未知

Note: —, unknown

普遍认为粘孢子虫生活史涉及脊椎动物鱼类与无脊椎动物水蚯蚓两宿主,放射孢子感染鱼体至发育成熟,形成粘孢子脱落至水体后,被水底的水蚯蚓等底栖寡毛类吞食后发育成粘孢子完成一个生活史周期^[25-26]。关于粘孢子虫从鱼体进入到水体的过程,主要有 3 条途径:①成熟孢子通过排泄系统直接进入水体中;②鱼体死亡身体腐烂后,成熟孢子进入水体中或未经处理的感染鱼腐烂后通过地表水流入到养殖或天然水体中;③发育后期,包囊老化直接脱落进入到水体中^[27-29]。本研究发现部分三棱碘泡虫包囊已大部分突出于鳃丝外,组织病理分析进一步证实了其包囊处于即将从鳃丝上脱落的阶段,包囊周围组织虽出现鳃丝上皮细胞增生等病理反应,但并未观察到明显的炎症反应,说明三棱碘泡虫包囊成熟老化后可能从鳃丝上直接脱落进入水体中,病灶部位的鳃丝伤口也可以自行修复,故其寄生一般不会引起草鱼鳃碘泡虫病,但考虑其感染强度高且包囊尺寸较大,其寄生造成的鳃呼吸面积损伤在环境条件,如缺氧是极易引发鱼体死亡,值得警惕。此前描述中在鳃丝间未发现三棱碘泡虫包囊而仅观察到成熟孢子^[10],可能是包囊已经脱落,在脱落过程中包囊破裂后孢子溢出到鳃丝上残留所致。

系统发育关系分析发现,三棱碘泡虫与鲤科鱼类鳃寄生的同属种类包括隐杆碘泡虫、诺布尔碘泡虫、毕斯塔斯碘泡虫以及微小碘泡虫聚为独立的一枝。在该枝系中,三棱碘泡虫与同寄生于雅罗鱼亚科的雅罗鱼与拟鲤的隐杆碘泡虫形成姊妹枝,表明宿主亲缘关系在二者的进化历程中扮演更重要的作用^[30]。另外,在该枝系中的其他 3 种寄生于鲤形目胭脂鱼科鱼类鳃的碘泡虫,包括诺布尔碘泡虫、毕斯塔斯碘泡虫与微小碘泡虫聚为另外一枝^[31-33],2 个进化枝共同构成鲤形目鳃寄生碘泡虫独立大枝,进一步证实了宿主亲缘关系与寄生组织趋向性对组织寄生碘泡虫科演化的重要作用。但本实验中寄生于草鱼鳃丝的饼形碘泡虫并未与三棱碘泡虫聚为一枝,反而与鲤科鱼类肌肉寄生的同属种聚为鲤科鱼类肌肉寄生碘泡虫枝。近年来,越来越多的研究表明,宿主特异性与组织趋向性在粘孢子虫整个进化历程中扮演重要作用,也是粘孢子虫重要的分类衍征,但究竟哪个衍征提供更强的进化信号尚存争议。Liu 等^[34]发现,鳃寄生的碘泡虫按照寄生部位明显聚类,表明寄生部位较宿主具有更强的进化信号。Shin 等^[35]对整个碘泡虫科粘体动物进行系统发育分析发现,碘泡虫科粘体动物首先依据宿主亲缘关系进聚类,而后在小分枝中又依据寄生部位不同

而分开聚类, 没有明显寄生部位特异性的种类则随机聚类, 表明宿主特异性较寄生部位具有更强的进化信号, 但也存在碘泡虫科不同类群在亲缘关系较近的宿主或同一宿主多次进化的过程, 因此, 获取更多碘泡虫科物种的形态与寄生特性数据对最终刻画出其进化历程极为重要。

综上所述, 本研究基于粘孢子虫现代整合分类学方法对三棱碘泡虫进行了补充描述, 确定其为有效种。考虑三棱碘泡虫与其亲缘关系最近种的序列相似性较低, 推测雅罗鱼亚科鳃寄生碘泡虫应有更大多样性有待挖掘。

参考文献 (References):

- [1] Fiala I, Bartošová-Sojtková P, Whipps C M. Classification and phylogenetics of Myxozoa[M]// Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. In Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Cham: Springer, 2015: 85-110.
- [2] 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.
- [3] Patra S, Bartošová-Sojtková P, Pecková H, et al. Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora (sensu stricto)* (Cnidaria: Myxozoa)[J]. *Parasites & Vectors*, 2018, 11(1): 347.
- [4] Székely C, Atkinson S D, Molnár K, et al. A synopsis of records of myxozoan parasites (Cnidaria: Myxozoa) from shrews, with additional data on *Soricimyxum fegati* from common shrew *Sorex araneus* in Hungary and pygmy shrew *Sorex minutus* in Slovakia[J]. *Folia Parasitologica*, 2016, 63(21): 1-5.
- [5] Bartholomew J L, Atkinson S D, Hallett S L, et al. Myxozoan parasitism in waterfowl[J]. *International Journal for Parasitology*, 2008, 38(10): 1199-1207.
- [6] Sitjà-Bobadilla A. Can myxosporean parasites compromise fish and amphibian reproduction?[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2009, 276(1669): 2861-2870.
- [7] Espinoza L L, Mertins O, Gama G S, et al. A new *Myxidium* species (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gallbladder of the turtle *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) from Peruvian Amazon[J]. *Acta Tropica*, 2017, 172: 75-79.
- [8] Eiras J C, Molnár K, Lu Y S, et al. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae)[J]. *Systematic Parasitology*, 2005, 61(1): 1-46.
- [9] Eiras J C, Zhang J Y, Molnár K, et al. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae) described between 2005 and 2013[J]. *Systematic Parasitology*, 2014, 88(1): 11-36.
- [10] 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.
- Chen Q L, Ma C L. Fauna Sinica[M]. Beijing: Science Press, 1998 (in Chinese).
- [11] 柳阳. 碘泡虫属的修订及中国部分碘泡虫物种的分类学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- Liu Y. Revision on Genus *Myxobolus* (Myxozoa: Myxosporea) and taxonomy of some *Myxobolus* species in China[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [12] 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.
- [13] Liu Y, Whipps C M, Gu Z M, et al. *Myxobolus musseliusae* (Myxozoa: Myxobolidae) from the gills of common carp *Cyprinus carpio* and revision of *Myxobolus dispar* recorded in China[J]. *Parasitology Research*, 2013, 112(1): 289-296.
- [14] 潘金培. 鱼病诊断与防治手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- Pang J P. Diagnostic and control manual of fish diseases[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1988 (in Chinese).
- [15] Lom J, Arthur J R. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1989, 12(2): 151-156.
- [16] Fiala I. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis[J]. *International Journal for Parasitology*, 2006, 36(14): 1521-1534.
- [17] 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*, 2010, 50(3): 215-219.
- [18] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41(41): 95-98.
- [19] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-

- 4882.
- [20] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(7): 1253-1256.
- [21] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0[J]. *Systematic Biology*, 2010, 59(3): 307-321.
- [22] Ronquist F, Huelsenbeck J P. Mr Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [23] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fisheries and Fishery Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Center, China Fisheries Association. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [24] Zhang J Y, Zhao Y L, Batueva, M D, *et al.* Redescription of *Chloromyxum ellipticum* Li & Nie, 1973 (Myxosporea: Chloromyxidae) infecting the gall bladder of grass carp *Ctenopharyngodon idella* Valenciennes, 1844, supplemented by morphological and molecular characteristics[J]. *Parasitology Research*, 2017, 116(5): 1479-1486.
- [25] Xi B W, Zhou Z G, Xie J, *et al.* Morphological and molecular characterization of actinosporeans infecting oligochaete *Branchiura sowerbyi* from Chinese carp ponds[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 114(3): 217-228.
- [26] Kallert D M, Grabner D S, Yokoyama H, *et al.* Transmission of Myxozoans to vertebrate hosts[M]//Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. Myxozoan evolution, ecology and development[M]. Cham: Springer, 2015: 235-252.
- [27] 赵子明, 刘新华, 赵媛莉, 等. 荆州碘泡虫(粘体动物门, 碘泡虫科)重描述及其基于18S rDNA系统发育关系分析[J]. *淡水渔业*, 2017, 47(2): 79-85.
- Zhao Z M, Liu X H, Zhao Y L, *et al.* Redescription and phylogenetic analysis based on 18S rDNA of *Myxobolus kinchowensis* (Myxozoa: Myxobolidae)[J]. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(2): 79-85(in Chinese).
- [28] Alexander J D, Kerans B L, El-Matbouli M, *et al.* Annelid-Myxosporean interactions[M]// Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. Myxozoan evolution, ecology and Development[M]. Cham: Springer, 2015: 217-234.
- [29] 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[M]. Springer, 2015: 343-362.
- [30] Eszterbauer E. Molecular biology can differentiate morphologically indistinguishable myxosporean species: *Myxobolus elegans* and *M. hungaricus*[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2002, 50(1): 59-62.
- [31] Rosser T G, Griffin M J, Quiniou S M A, *et al.* *Myxobolus ictiobus* n. sp. and *Myxobolus minutus* n. sp. (Cnidaria: Myxobolidae) from the gills of the smallmouth buffalo *Ictiobus bubalus* Rafinesque (Cypriniformes: Catostomidae)[J]. *Systematic Parasitology*, 2016, 93(6): 565-574.
- [32] Grinham T, Cone D K. A review of species of *Myxobolus* (Myxosporea) parasitizing catostomid fishes, with a redescription of *Myxobolus bibullatus* (Kudo, 1934) n. comb. and description of *Myxobolus lamellus* n. sp. from *Catostomus commersoni* in Nova Scotia[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1990, 68(11): 2290-2298.
- [33] Lom J, Cone D. Myxosporeans infecting the gills of bigmouth buffalo (*Ictiobus bubalus*) in Illinois, USA[J]. *Folia Parasitologica*, 1996, 43(1): 37-42.
- [34] Liu X H, Yuan S, Zhao Y L, *et al.* Morphological and molecular characterization of *Myxobolus sheyangensis* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) with intralamellar sporulation in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(9): 3567-3574.
- [35] Shin S P, Nguyen V G, Jeong J M. 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.

Redescription and phylogenetic analysis of *Myxobolus tricostatus* (Myxozoa: Myxobolidae)

LIU Xinhua¹, WENG Meiqi^{2,3}, SONG Rui⁴, ZHAO Yuanli^{2,3}, LI Aihua^{2,3}, ZHANG Jinyong^{2,3,5*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Key Laboratory of Aquaculture Diseases Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4. Hunan Fisheries Science Institute, Changsha 410153, China;

5. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: *Myxobolus tricostatus* was found initially to infect the gills of grass carp in the late 1970s with simple and insufficient taxonomic data, so the taxonomic validity was problematic. In order to supplement description and verify the validity of *M. tricostatus*, we redescribed *M. tricostatus* collected from Lake Tangxun in Wuhan city, Hubei Province, using the integrative taxonomic approach of combining myxospore morphology, molecular data and ecological information of host and infection site, which has been widely accepted for the taxonomy of Myxozoa. Here, the plasmodia, tissue tropism and molecular data of *M. tricostatus* are first provided. The morphological features of the concerned species are as follows: whitish plasmodia infecting the gills measured (2.4±0.3) (2.1-2.7) mm in length and (0.8±0.1) (0.6-0.9) mm in width; mature spores encapsulated by a transparent mucous envelope were ovoid in frontal view and fusiform in sutural view, measuring (10.3±0.4) (9.4-11.0) μm long, (9.5±0.5) (8.7-10.9) μm wide, and (7.4±0.5) (6.4-8.0) μm thick; no "V"-shaped folds were observed on the posterior end of the spore; three parallel ridges could be observed in sutural view; two equal polar capsules were pyriform and coiled with 7-8 turns of polar filament. Histological observation showed that the plasmodia dwelled between the gill filaments, and no serious inflammation was found in the surrounding tissues. BLAST search indicated that *M. tricostatus* was most similar to *M. elegans* with the similarity of 89.58%, which was definitely below the intraspecies similarity range. Phylogenetic analysis revealed that *M. tricostatus* branched with *M. elegans* from the gills of *Leuciscus idus* and *Rutilus rutilus* with high support values within the clade of Cyprinidae gill-infecting *Myxobolus* spp. including *M. enoblei*, *M. minutus* and *M. bibullatus* from the gills of Catostomidae fish. The present phylogenetic results further confirmed that host affinity and tissue tropism provide strong evolutionary signal for tissue-infecting Myxobolidae. In conclusion, we provided here supplementary morphological, histological and molecular data of *M. tricostatus*, and verified the validity of its classification.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Myxobolus tricostatus*; Myxosporea; gills; phylogenetic analysis

Corresponding author: ZHANG Jinyong. E-mail: zhangjy@ihb.ac.cn; zhangjyong@126.com

Funding projects: Startup Foundation for Advanced Scholars, Hunan Agriculture University (540741900599); Hunan Provincial Scientific Modern Agricultural Research System (2019-05); National Natural Sciences Foundation of China (31772411, 31772832); Natural Science Foundation of Hubei Province (2018CFA074); Young Experts of Taishan Scholars in Shandong Province (tsqn201909133); Initiative Grant for High-level Personnel Recruitment in Qingdao Agricultural University