



洪湖碘泡虫在发病和隐性感染异育银鲫组织器官中的分布

杨坤^{1,2}, 翟凯旋¹, 习丙文^{1,2*}, 陈凯², 谢骏²

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为探究洪湖碘泡虫在被感染异育银鲫不同组织器官中的分布及不同感染阶段的差异, 实验采用显微镜镜检、PCR 检测及组织病理切片相结合手段, 对发病及隐性感染异育银鲫的肌肉、伪鳃、鳃、头肾等 11 个组织器官进行了广泛检测分析。显微镜镜检发现, 在发病鱼的咽、伪鳃和鳃能观察到孢囊或成熟孢子; 在隐性感染异育银鲫的咽上壁与副蝶骨间结缔组织、伪鳃及其血管周边观察到大量棕黄色结节, 并含有洪湖碘泡虫的成熟孢子。不同组织器官 DNA 样品 PCR 检测发现, 在发病鱼除肌肉外的其他 10 个组织器官中均检测到洪湖碘泡虫存在, 其中伪鳃检出率最高 (100%); 隐性感染异育银鲫在咽上壁组织、伪鳃、头肾、体肾、脾脏及卵巢中检出洪湖碘泡虫, 伪鳃检出率也为最高 (26.7%)。组织病理切片显示, 发病鱼咽上壁内分布着大量蜂巢状孢囊及成熟孢子, 伪鳃被严重侵占和破坏; 残存伪鳃鳃丝周边能观察到增殖和发育阶段的孢子生成细胞。综上所述, 本研究首次报道了洪湖碘泡虫在发病和隐性感染异育银鲫不同组织器官中的分布差异, 发现伪鳃可能是洪湖碘泡虫寄生和发育成熟的重要器官。结果为洪湖碘泡虫病的准确检验检测和进一步开展致病机制研究奠定基础。

关键词: 异育银鲫; 洪湖碘泡虫; 喉孢子虫病; 伪鳃; 单管半巢式 PCR 法; 组织分布

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

洪湖碘泡虫 (*Myxobolus honghuensis*) 隶属于刺胞动物门 (Cnidaria) 粘体动物亚门 (Myxozoa) 碘泡虫科 (Myxobolidae)^[1], 其成熟孢子正面观呈梨形, 缝面观呈水滴状, 孢子长 (16.9±0.5) μm, 孢子宽 (10.4±0.4) μm, 有 2 个大小不一的极囊, 极丝圈数为 7~8 圈, 孢子表面几丁质外壳外有一层透明状外膜, 是当前引起异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 养殖中苗种和成鱼发生“喉孢子虫病”的重要寄生虫病原, 每年都造成江苏、广东、辽宁等地养殖异育银鲫大量死亡。发病鱼主要表

现为离群独游、头背部发黑、反应迟缓、摄食困难、眼球突出、鳃盖不能闭合及眼后与鳃弓根部的口咽腔上壁发炎肿大, 特别严重的出现溃烂和空洞等症状^[2-4], 另外, 由于发病鱼严重贫血、炎症反应、压迫感染及继发感染等常导致死亡^[5]。

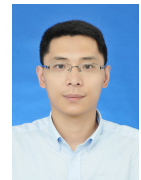
洪湖碘泡虫由 Liu 等^[1] 在湖北洪湖地区异育银鲫中发现和命名, 仅在异育银鲫咽部检出孢囊, 其他组织器官均未检出孢囊及孢子。由于粘孢子虫在鱼类宿主体内通常存在复杂的增殖和迁移过程, 本课题组在前期通过 PCR 检测初步发现在未

收稿日期: 2020-10-19 修回日期: 2021-04-09

资助项目: 财政部和农业农村部-国家现代农业产业技术体系 (CARS-45); 国家自然科学基金 (32073019)

第一作者: 杨坤, 从事鱼类寄生虫研究, E-mail: 764513834@qq.com

通信作者: 习丙文 (照片), 从事鱼类寄生虫学及寄生虫疾病防控研究, E-mail: xibw@ffrc.cn



发病成鱼的卵巢、体肾及脾脏等组织中均检测到很高的阳性率(40%)^[6]。因此,为进一步探究洪湖碘泡虫在异育银鲫组织器官中的分布以及不同感染阶段的差异,本研究采用显微镜镜检、PCR检测及组织病理切片相结合的手段,对发病及隐性感染洪湖碘泡虫的异育银鲫肌肉、伪鳃、鳃、头肾等11个组织器官进行了广泛的检测,相关结果将为开展洪湖碘泡虫的准确检验检疫和致病机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019年7月从江苏省常州市金坛某异育银鲫繁育场购买约10 000尾苗种(体长3~5 cm),养殖在淡水渔业研究中心南泉试验基地1亩池塘(666.67 m²,水泥护坡的标准塘)。放养2周后暴发洪湖碘泡虫病,病鱼离群靠边独游、鱼体发黑、口咽部红肿等。捞取池塘中濒死的36尾异育银鲫苗种进行解剖,分别采集其肌肉、咽上壁肌肉、伪鳃、鳃、脑、头肾、体肾、肝脏、脾脏、卵巢及肠道(每采集一个组织后所用剪刀及镊子都要冲洗干净,使用酒精棉球擦拭,防止交叉污染),各组织/器官分别进行显微镜检查并取样放置于1.5 mL灭菌EP管中,用于PCR检测。

该批异育银鲫苗种在随后池塘养殖中没有再暴发洪湖碘泡虫病。11月拉网将部分鱼随机转移至室内循环水养殖系统中养殖到次年5月,养殖过程中没有出现明显发病症状;从养殖桶中随机选取30尾无明显感染症状的异育银鲫(体质量20~30 g),如上重复取样、检查各组织器官。

1.2 主要试剂及仪器

奥林巴斯光学显微镜(Olympus CX-31)、上海彼爱姆解剖镜(BM)、Eppendorf梯度PCR仪、Bio-Rad凝胶成像系统等;苏木精-伊红(H.E)组织切片染液购于南京建成科技有限公司;TaKaRa

Premix Taq聚合酶、DL2000 DNA Marker、6X Loading Buffer等均购于无锡博瑞康生物有限公司;Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 组织样品镜检

异育银鲫解剖后,先在解剖镜下观察体表、伪鳃、体肾、脾脏、卵巢等组织器官是否有白色孢囊并拍照记录,随后取各组织,采用水浸片法,在显微镜下进一步观察各组织器官中是否存在洪湖碘泡虫感染,图像采用T-View 7.0软件拍摄。

1.4 单管半巢式PCR检测

样品DNA提取 洪湖碘泡虫DNA提取。本研究所用洪湖碘泡虫阳性对照样品由本实验室-80℃冷冻保存。将洪湖碘泡虫孢囊样品解冻后按照Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]说明书步骤提取虫体DNA,获得的DNA保存于-20℃。

鱼体组织DNA提取。将冻存组织样品解冻,剪取20~50 mg,放入1.5 mL灭菌EP管中,使用电动研磨棒进行匀浆,按照Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒说明书步骤提取组织DNA,提取后的DNA保存于-20℃。

单管半巢式PCR检测方法 本研究所用单管半巢式PCR检测方法由本实验室前期所建立^[6],对洪湖碘泡虫18S rDNA序列进行扩增,所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息见表1。

PCR反应体系采用25 μL反应体系: Premix Taq 12.5 μL、上游外引物 Myh_1176F (10 μmol/L) 0.5 μL、下游外引物 Myh_1618R (10 μmol/L) 0.2 μL、内引物 Mh-in-r (10 μmol/L) 0.4 μL、DNA模板 1.0 μL、ddH₂O 10.4 μL。以异育银鲫各组织器官样品提取的基因组DNA作为模板,同时以纯化的洪湖碘泡虫基因组DNA作为阳性对照, ddH₂O作为阴性对照进行PCR扩增。

表1 单管半巢式PCR引物设计

Tab. 1 Single tube semi-nested PCR primer design

基因 gene	引物名称 primers name	序列 sequences	T _m 值/°C T _m value
18S rDNA	Myh_1176F (上游 forward)	GTTGGTCCCCCTGGGAAACC	61.91
	Myh_1618R (下游 reverse)	TCCATGAGGCAGCGTAAAGG	57.75
	Mh-in-r (内引物 internal)	AGCGAGCCCAGAATGCTAC	57.97

反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 第一次循环: 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 15 个循环; 第二次循环: 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增结束后, 使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。分别记录发病及隐性感染异育银鲫检出阳性组织及数量, 统计阳性率。采用 SPSS 20.0 软件, 使用非参数检验法对各组织感染率进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每个组织的阳性样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序(扩增产物量较低的组织样品采用单克隆法进行测序); 测序结果在 NCBI 数据库中进行序列比对分析, 进一步确认检测结果为洪湖碘泡虫。

1.5 组织病理切片的制备

将发病鱼(3 cm)头部剪取后用 RNase free 多聚甲醛(4%)固定保存(组织块: 甲醛=1:9, 体积比), 用于组织切片制作。将固定好的组织从 4% 多聚甲醛固定液中取出, 流水冲洗后, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后进行组织切片, 晾干后使用苏木精-伊红(H.E)染色, 中性树胶封片。切片使用 T-View 7.0 软件在 Olympus CX-31 光学显微镜下进行观察并拍照。

2 结果

2.1 组织样品镜检

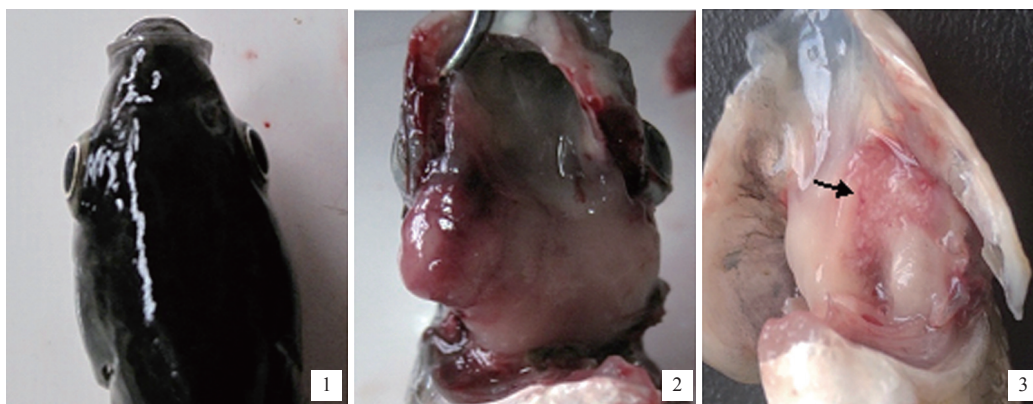
发病鱼可见眼球明显突出(图版 I-1), 剪开

口咽腔后, 可见咽部有明显的发炎红肿(图版 I-2), 将红肿部位剖开, 内部遍布着密集的白色小孢囊(图版 I-3), 孢囊内含有大量洪湖碘泡虫的成熟孢子。显微镜镜检可在伪鳃、咽上壁中检出孢囊和孢子; 同时, 在鳃丝中能检出分散的成熟孢子(表 2)。

显微镜和 PCR 检查综合分析表明, 本研究所检测的该批无明显感染症状的异育银鲫中隐性感染率达 26.7%(表 2); 隐性感染异育银鲫咽部并未出现红肿发炎等明显症状, 也未见白色孢囊; 沿咽上壁中部剖开, 在底部靠近副蝶骨和咽鳃骨的部位出现棕黄色结节(图版 II-1), 伪鳃及出伪鳃动脉周边分布着明显不同黑色素细胞的棕黄色结节(图版 II-2), 第 1 鳃弓出鳃动脉血管也附着有棕黄色结节(图版 II-3); 挑取棕黄色结节置于载玻片上进行压片镜检后可见大量洪湖碘泡虫的成熟孢子(图版 II-4)。因此, 隐性感染异育银鲫主要在伪鳃及周边组织检出成熟孢子(表 2)。

2.2 组织样品的单管半巢式 PCR 检测结果

采用单管半巢式 PCR 法对发病及隐性感染异育银鲫的肌肉、咽上壁肌肉、伪鳃、鳃、脑、头肾、体肾、肝脏、脾脏、卵巢及肠道样品进行检测。结果显示, 发病异育银鲫的肌肉、咽上壁肌肉、伪鳃、鳃、脑、头肾、体肾、肝脏、脾脏、卵巢及肠道的洪湖碘泡虫阳性检出率分别为 0%、100.0%、100.0%、91.7%、55.6%、44.4%、25.0%、2.7%、66.7%、13.9% 及 16.7%, 其中咽上壁肌肉、伪鳃的阳性检出率最高, 鳃次之; 隐性感染异育银鲫的肌肉、咽上壁肌肉、伪鳃、鳃、脑、头肾、



图版 I 患洪湖碘泡虫病的异育银鲫临床症状

1. 患病异育银鲫的眼球突出, 2. 咽部红肿发炎, 3. 咽上壁内充满孢囊; 箭头指示为白色小孢囊

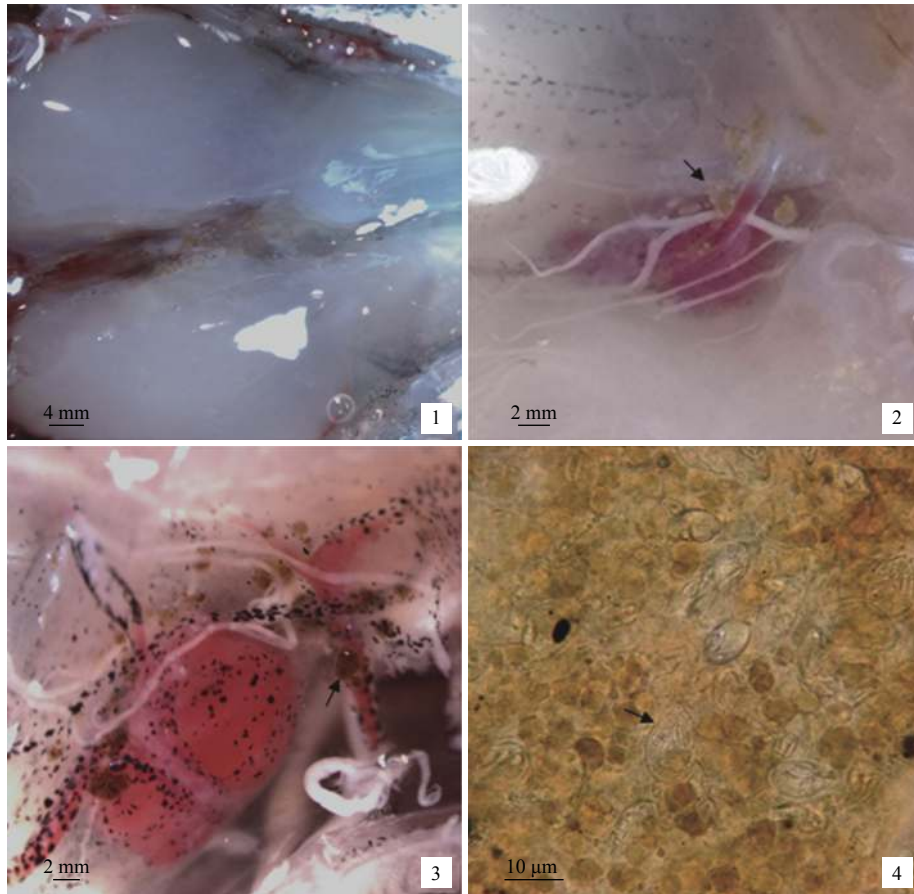
Plate I Clinical symptoms of diseased *C. auratus gibelio* infected with *M. honghuensis*

1. diseased fish with protruding eyes, 2. the inflamed and swelling pharynx, 3. numbers of sporocysts crammed in the lesion; the arrow indicates the sporocyst

表 2 异育银鲫感染洪湖碘泡虫组织样品阳性检出结果

Tab. 2 Infection prevalence of *M. honghuensis* in different organs of diseased and asymptomatic *C. auratus gibelio*

组织 tissues	发病鱼数量/尾(阳性率) (n=36) diseased fish no. (positivity rate)		隐性感染数量/尾(阳性率) (n=30) occult infection no. (positivity rate)	
	显微镜镜检 microscopic detection	PCR检测 PCR detection	显微镜镜检 microscopic detection	PCR检测 PCR detection
肌肉 muscle	0	0	0	0
咽 pharynx	36 (100.0%)	36 (100.0%)	0	1 (3.3%)
伪鳃 pseudobranch	36 (100.0%)	36 (100.0%)	4 (13.3%)	8 (26.7%)
鳃 gill	30 (83.3%)	33 (91.7%)	0	0
脑 brain	0	20 (55.6%)	0	0
头肾 head kidney	0	16 (44.4%)	0	3 (10.0%)
体肾 kidney	0	9 (25.0%)	0	1 (3.3%)
肝脏 liver	0	1 (2.7%)	0	0
脾脏 spleen	0	24 (66.7%)	0	1 (3.3%)
卵巢 ovary	0	5 (13.9%)	0	1 (3.3%)
肠道 intestine	0	6 (16.7%)	0	0



图版 II 洪湖碘泡虫孢囊在隐性感染异育银鲫的伪鳃周边组织分布

1-3 分别展示沿咽上壁中部刨开后底部靠近副蝶骨出现棕黄色结节、伪鳃和出伪鳃动脉周边的棕黄色结节以及伪鳃和第 1 鳃弓出鳃动脉(箭头)周边的棕黄色结节; 4 示例黄色结节中的洪湖碘泡虫孢子; 图中箭头分别指示黄色结节和成熟孢子

Plate II Distribution of sporocyst in pseudobranch of *C. auratus gibelio* under occult infection with *M. honghuensis*

1-3. indicate the brownish yellow sporocyst near the parasphenoid and pharyngobranchial under the upper pharynx wall, the sporocyst near the pseudo-branch and efferent pseudo-branch artery, and the brownish yellow sporocyst near the pseudo-branch and efferent branchial artery of the first branch; 4. shows the spores of *M. honghuensis* in the brownish sporocyst; arrows indicate yellow sporocyst and mature spores, respectively

体肾、肝脏、脾脏、卵巢及肠道的洪湖碘泡虫阳性检出率分别为 0%、3.3%、26.7%、0%、0%、10.0%、3.3%、0%、3.3%、3.3% 及 0%，其中伪鳃的阳性率最高(表 2)。将挑选出的阳性样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序，测序得到的 18S *rDNA* 序列提交到 NCBI 数据库 (GenBank 登录号 MW856671)，经 BLAST 比对确认为洪湖碘泡虫。

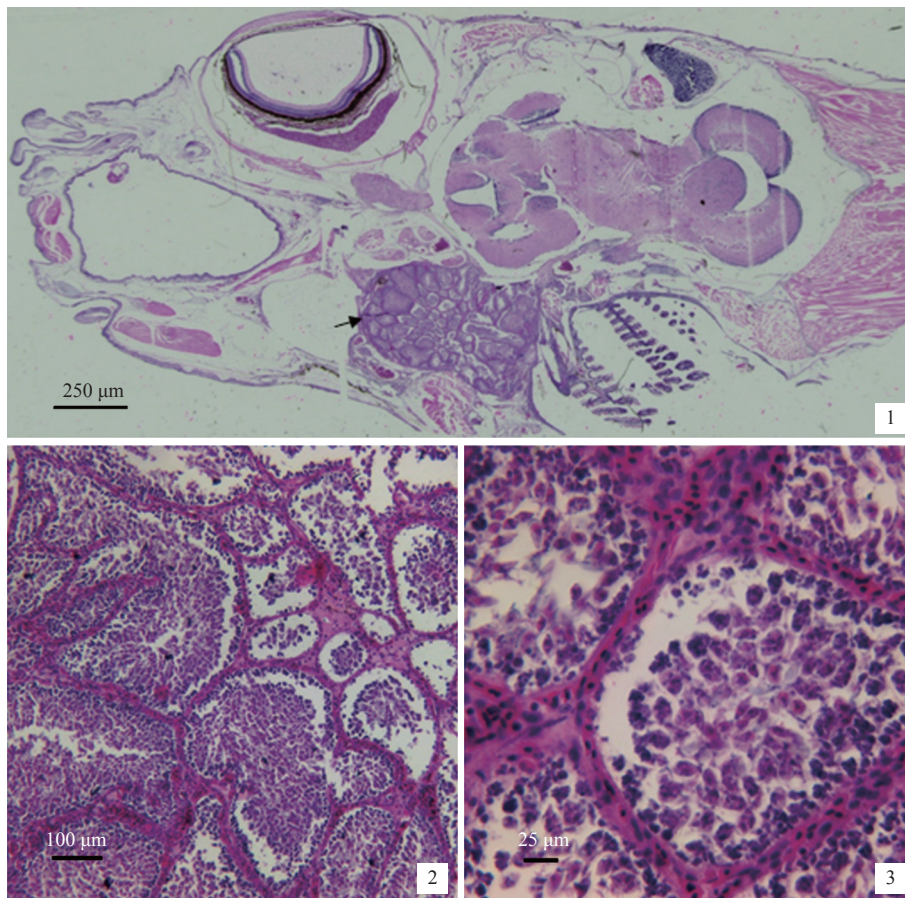
2.3 发病鱼头部组织切片

组织病理切片显示，在咽上壁与颅骨间分布着大量的蜂巢状孢囊，在较前端咽鳃骨与颅骨间也可见少量孢囊(图版 III-1, 2)；孢囊小室内存在大量发育成熟的孢子，在靠近孢囊小室内壁存在许多染色较深的多细胞核团状物，为孢子成熟前未分化和正在分化的孢子生成细胞 (sporogonic cells)；各小室间存在大量毛细血管和红细胞(图版 III-3)。在蜂巢状孢囊中间偶然能发现残存部分伪鳃鳃丝，

伪鳃结构被严重破坏(图版 IV-1)；在残存伪鳃鳃丝的周边可见孢囊小室中充满未发育成熟的和未分化的孢子生成细胞(图版 IV-1)；在油镜下可观察到孢子生成细胞的单核、两核、三核等不同增殖和发育阶段(图版 IV-2, 3)。

3 讨论

粘孢子虫在鱼体阶段发育存在复杂的增殖和迁移过程。目前，国内外有关洪湖碘泡虫在鱼体内发育及移行的研究非常匮乏。国内吴宝华等^[7]曾报道引起鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)“疯狂病”的鲢碘泡虫 (*M. drjagini*) 在颅腔中孢子生成阶段细胞发育特征；翟艳花^[8]报道了吴李碘泡虫 (*M. wulii*) 在异育银鲫血液中存在增殖期。有关洪湖碘泡虫在异育银鲫体内的细胞发育和移行途径尚不明确。本研究通过对发病及隐性感染异育银鲫的肌肉、伪鳃、鳃、头肾等 11 个组织器官 PCR 检

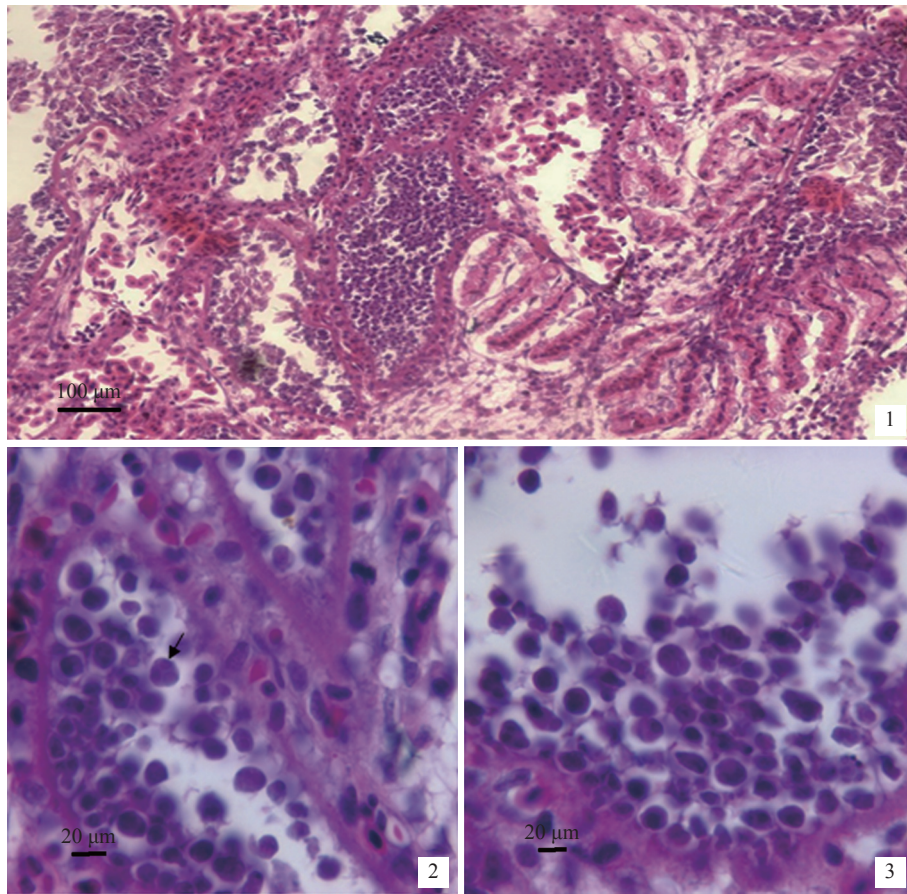


图版 III 感染洪湖碘泡虫异育银鲫幼鱼头部组织切片

1. 患病幼鱼头部纵切，箭头示口腔孢囊；2、3. 口腔孢囊局部放大

Plate III Histopathological sections of diseased *C. auratus gibelio* larvae head infected with *M. honghuensis*

1. longitudinal section of full head and arrow indicates the sporocyst in the pharynx; 2, 3. show the detailed characteristics of the sporoc



图版IV 感染洪湖碘泡虫异育银鲫伪鳃组织病理切片

1. 伪鳃被孢囊侵占，鳃丝结构不完整，周边存在大量不同发育期孢囊和孢子；2、3. 孢囊中孢子生成阶段的泛孢子母细胞和孢母细胞

Plate IV Pseudobranch tissue sections of *C. auratus gibelio* infected by *M. honghuensis*

1. the different developmental stage spores in the pseudobranch; 2, 3. the pansporoblasts and sporogenic cells in the pseudobranch

测发现，伪鳃所占丰度最高，其他组织如肾脏、脾脏等也有洪湖碘泡虫较高分布。肾脏和脾脏是鱼体免疫和造血重要器官，作者推测可能是由于洪湖碘泡虫在形成孢子的发育前期也存在血液移行阶段；因此，在肾脏、脾脏也有较高检出率。Nylund 等^[9]报道大西洋鲑 (*Salmo salar*) 伪鳃寄生的伪鳃小囊虫 (*Parvicapsula pseudobranchicola*) 在头肾、体肾、脾脏及肠道等其他组织器官中也有很高的感染率。本研究结果表明，洪湖碘泡虫可以感染异育银鲫多个组织器官，并且在伪鳃、肾脏、脾脏等器官中可持续存在较长时间。

尽管本研究对洪湖碘泡虫孢子生成阶段的细胞发育观察非常有限，但是从伪鳃鳃丝附近所观察到的孢子生成细胞表明，洪湖碘泡虫的孢子生成与鲤 (*Cyprinus carpio*) 寄生的莫氏球孢虫 (*Sphaerospora molnari*) 和鲑鳟寄生的脑碘泡虫 (*M. cerebralis*) 非常相似^[10-11]。此前由于缺乏对洪湖碘泡虫感染异育银鲫系统组织切片观察，一直认为

咽是洪湖碘泡虫的寄生位点。通过本研究发现，咽上壁的肌肉在隐性感染阶段的检出率并不高；发病鱼体的咽才有较高的检出率。发病鱼呈现明显的咽部肿胀，可能由于伪鳃组织中的孢囊和孢子不断增殖后侵袭到附近咽上壁组织。此外，在隐性感染异育银鲫的样品中主要在伪鳃血管及其周边组织检出洪湖碘泡虫成熟孢子。综合组织病理观察和 PCR 检测结果，推测伪鳃可能是洪湖碘泡虫在异育银鲫体内主要的寄生位点和孢子发育成熟位点。

伪鳃位于真骨鱼类鳃盖内侧和第一鳃弓的背前缘，血管由入伪鳃动脉和出伪鳃动脉组成；不同鱼类中存在自由式、覆盖式和封埋式 3 种类型伪鳃^[12-14]。研究表明，伪鳃具有调节内分泌、血氧监测、维持眼部血压等一系列功能^[15-20]。硬骨鱼的伪鳃能够通过出鳃动脉为眼部提供含氧血液，并且可以调节酸碱相关离子浓度。因此，伪鳃部位具有充足的养分及适宜的理化环境，为洪湖碘

泡虫的生长发育提供了非常有利的条件。这可能是镜检在隐性感染异育银鲫的第 1 鳃弓出鳃动脉血管内发现有洪湖碘泡虫孢囊存在, 以及 PCR 检测伪鳃阳性检出率较高的重要原因。

本研究所用的发病异育银鲫 (7 月) 和隐性感染异育银鲫 (次年 5 月) 都来自同一批养殖鱼, 然而, PCR 检测结果显示, 隐性感染异育银鲫各组织器官中洪湖碘泡虫的阳性检出率较发病异育银鲫均明显下降 (部分器官检出率降为 0%)。这可能是由于至次年 5 月时, 成熟孢子已经从鱼体内排出, 或孢子发育受到鱼体免疫抑制后丰度下降所致。另外 PCR 检测结果也表明, 此时隐性感染鱼体内仍然携带有病原体, 但是并不会导致鱼体发病。这可能是由于鱼体内病原体密度较小, 或鱼体免疫力较强, 导致洪湖碘泡虫的增殖受到抑制, 没有呈现“喉孢子虫病”暴发的临床症状。

作者在前期通过 PCR 检测异育银鲫成鱼卵巢中的洪湖碘泡虫感染率为 40%^[6], 然而, 在本次研究中发病异育银鲫卵巢的 PCR 阳性检出率仅为 13.9%。这前后感染率的差异可能与 2 次采样时间不同和鱼体处于不同的发育阶段有关。此前研究采集的鱼体为成鱼, 卵巢已经发育成熟, 而本次研究采集的鱼体为体质量约 5 g 的幼鱼, 卵巢尚未发育成熟, 洪湖碘泡虫可能还未大量移行至此, 因此出现不同批次检出率差异。

本研究首次报道了洪湖碘泡虫在异育银鲫伪鳃上的寄生情况, 证明伪鳃是洪湖碘泡虫在鱼体内寄生的重要靶器官, 并且对洪湖碘泡虫在发病及隐性感染异育银鲫不同组织器官上丰度变化情况进行了初步研究, 为接下来进一步研究洪湖碘泡虫在鱼体内的致病规律、移行路径以及完整生活史等奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Liu Y, Whipps C M, Gu Z M, *et al.* *Myxobolus honghuensis* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida) parasitizing the pharynx of allogynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) from Honghu Lake, China[J]. *Parasitology Research*, 2012, 110(4): 1331-1336.
- [2] 贾洛. 洪湖碘泡虫抗体的制备及其特异性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- Jia L. Development and specificity assessment of antibodies for *Myxobolus honghuensis* (Myxosporea: Bivalvulida)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [3] 马悦. 鲫碘泡虫的分离鉴定及体外培养技术研究 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2016.
- Ma Y. Isolation identification of Carp *Myxobolus* and technology of culture *in vitro*[D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [4] Xi B W, Xie J, Zhou Q L, *et al.* Mass mortality of pond-reared *Carassius gibelio* caused by *Myxobolus ampullicapsulatus* in China. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 93: 257-260.
- [5] 李振伟, 陆宏达, 操良萍, 等. 异育银鲫咽碘泡虫病组织病理与病理生理[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1339-1350.
- Li Z W, Lu H D, Cao G P, *et al.* Histopathology and pathophysiology of *Carassius auratus gibelio* infected by *Myxobolus pharynae*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1339-1350 (in Chinese).
- [6] 杨坤, 高志鹏, 习丙文, 等. 洪湖碘泡虫单管半巢式 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国水产科学, 2020, 27(8): 927-933.
- Yang K, Gao Z P, Xi B W, *et al.* Development a single-tube, semi-nested PCR method for the detection of *Myxobolus honghuensis* (Myxoporea: Bivalvulida)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(8): 927-933 (in Chinese).
- [7] 吴宝华, 蔡晓红. 鲢疯狂病病原体鲢碘泡虫孢子形成各阶段的观察研究[J]. *动物学报*, 1993, 39(1): 84-87.
- Wu B H, Cai X H. Observations on sporogenesis of *Myxobolus drjagini*, the pathogen of the twist disease in silver carp[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1993, 39(1): 84-87 (in Chinese).
- [8] 翟艳花. 银鲫两个不同品系对吴李碘泡虫感染抗性差异的比较 [D]. 武汉: 中国科学院, 2012.
- Zhai Y H. Comparison on differential resistance to *Myxobolus wulii* infection between clone A⁺ and clone D of gible carp[D]. Wuhan: Chinese Academy of Sciences, 2012 (in Chinese).
- [9] Nylund A, Hansen H, Brevik Ø J, *et al.* Infection dynamics and tissue tropism of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporea) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Parasites & Vectors*, 2018, 11(1): 17.
- [10] Korytář T, Wiegertjes G F, Zusková E, *et al.* The kinet-

- ics of cellular and humoral immune responses of common carp to presporogonic development of the myxozoan *Sphaerospora molnari*[J]. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 208.
- [11] 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.
- [12] Laurent P, Dunel-Erb S. 9 The Pseudobranch: morphology and function[M]//Hoar W S, Randall D J. *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 1984: 285-323.
- [13] 孟庆闻, 樊恩源. 白鲢鳃部血管的研究[J]. *动物学报*, 1990, 36(2): 106-109.
- Meng Q W, Fan E Y. Studies on the gills vasculature of the silver carp[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1990, 36(2): 106-109 (in Chinese).
- [14] Olson K R. Vascular anatomy of the fish gill [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 214-231.
- [15] Munshi J S D, Roy P K, Ghosh T K, *et al.* Cephalic circulation in the air-breathing snakehead fish, *Channa punctata*, *C. gachua*, and *C. marulius* (ophiocephalidae, ophiocephaliformes)[J]. *The Anatomical Record*, 1994, 238(1): 77-91.
- [16] Waser W P, Heisler N. Oxygen delivery to the fish eye: blood flow in the pseudobranchial artery of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2004, 30(1): 77-85.
- [17] Bridges C R, Berenbrink M, Müller R, *et al.* Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question?[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 119(1): 67-77.
- [18] Quinn M C J, Veillette P A, Young G. Pseudobranch and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*: developmental changes and effects of growth hormone, cortisol and seawater transfer[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003, 135(2): 249-262.
- [19] Pelster B, Weber R E. The physiology of the root effect[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 1991.
- [20] King J A C, Smith P R, Ashcraft J C, *et al.* Ultrastructure of the pseudobranch in the euryhaline Cyprinodontid fish, *Rivulus marmoratus*[J]. *Journal of Morphology*, 1993, 218(2): 127-142.

Tissue tropism of *Myxobolus honghuensis* in diseased and asymptomatic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)

YANG Kun^{1,2}, ZHAI Kaixuan¹, XI Bingwen^{1,2*}, CHEN Kai², XIE Jun²

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The pharyngeal myxosporidiosis caused by *Myxobolus honghuensis* is one of the most severe parasitic diseases in the culture of *Carassius auratus gibelio*. In order to reveal the tissue distribution and differences of *M. honghuensis* in the diseased and asymptomatic *C. auratus gibelio*. This study has collected and examined the muscle, pseudobranch, gills, head kidney and other 11 organs by microscopic, one-tube semi-nest PCR and histopathological section. Microscopical exam showed that the sporocyst and mature spores were most detected in the pharynx, pseudobranch and gills of diseased fish, while the mature spores were enclosed with yellow nodal and most detected from pseudobranch and first efferent branchial artery in the asymptomatic gibel carp. PCR results showed *M. honghuensis* could be detected in most of the tested organs in diseased fish except muscle, and pseudobranch had the highest infection rate (100%). In asymptomatic *C. auratus gibelio*, positive results were detected in pharynx, pseudobranch, head kidney, kidney, spleen and ovary, and the highest infection rate (26.7%) also was from the pseudobranch. Tissue sections of the diseased *C. auratus gibelio* showed *M. honghuensis* forming numbers of sporocysts between the pharynx wall and skull, and some near the pharyngobranchials. The pseudobranch was seriously destructed by the sporecysts, and the sporogonic cells of *M. honghuensis* could be observed near the left pseudobranch filament. Based on the microscopic exam and PCR test, this study firstly found that the pseudobranch may be the main parasitic and sporogonic site of *M. honghuensis*, and revealed the infection variation of *M. honghuensis* between the diseased and asymptomatic *C. auratus gibelio*.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *Myxobolus honghuensis*; pharyngeal myxosporidiosis; pseudobranch; single tube semi-nested PCR; tissue tropism

Corresponding author: XI Bingwen. E-mail: xibw@ffrc.cn

Funding projects: China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45); National Natural Science Foundation of China (32073019)