



顾泽茂, 教授, 博士生导师, 国家现代产业技术体系特色淡水鱼岗位科学家, 教育部新世纪优秀人才。担任农业农村部水产用兽药临床药效及残留试验单位(华中农业大学)负责人、湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心主任、淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心—寄生虫病害防控PI; 兼任中国水产学会鱼病专业委员会委员、中国原生动物学会理事、农业农村部水产养殖病害防治专家委员会委员。主要从事水产动物病害防控与绿色养殖, 重点开展水生动物寄生虫病及相关药物研发, 寄生虫与细菌协同感染机制及防控技术等研究。发表研究论文100余篇, 授权专利14项, 主编或参编书籍6部, 科技成果转化1项, 主持和参与国家重点项目40余项。

## 鳃肤孢虫新种的分离和鉴定

张波<sup>1,2</sup>, 顾泽茂<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 双水双绿研究院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 为准确鉴定鳃肤孢虫病的病原, 实验基于形态学比较, 结合寄生特征分析和分子系统学方法开展研究, 并观察超微结构。形态学观察结果显示, 纺锤形或哑铃形白色孢囊, 长约 1.9~6.8 mm, 寄生于鳍条、皮肤、口腔、鳃盖内外表面和鳃丝; 圆形内生孢子, 直径约  $(9.8 \pm 1.8)$  ( $7.3 \sim 13.8$ )  $\mu\text{m}$ ; 孢子内环状细胞质和直径约  $(6.5 \pm 1.2)$  ( $3.9 \sim 8.3$ )  $\mu\text{m}$  的圆形折光体, 鉴定其为肤孢虫。该物种测量值区别于其他肤孢虫, 与寄生于鳃鳃的未定种 (HB) 测量值基本一致; 与广东省和河南省的鳃源鳃肤孢虫 (GD 和 HN) 以及 HB 寄生于相似部位。分子序列比对和系统发育结果显示, 该物种与 GD、HN、芬兰肤孢虫、鲑肤孢虫和寄生美洲鳃鳃的鳃肤孢虫序列的一致性大于 99%; 与 GD 和 HN 的亲缘关系最近, 与鲑肤孢虫次之, 与芬兰肤孢虫和鳃肤孢虫的亲缘关系较远。综上, 该物种与已报道的寄生与鳃的肤孢虫为同种, 并修订寄生鳃的鳃肤孢虫的 GD 和 HN 分离株记录; 将本研究肤孢虫和 HB、GD 和 HN 分离株一同命名为鳃肤孢虫 (*Dermocystidium sinipercae* sp. n.), 新种。鳃肤孢虫种内形态差异可能与采样时间和发育阶段有关; 孢子增殖分化过程在超微结构观察中被记录和描述。本研究证实鳃肤孢虫已于我国多地分布, 强调鳃产地检疫措施亟待落实。

**关键词:** 鳃; 肤孢虫; 形态学; 系统学; 超微结构; 鉴定

中图分类号: S 941.51<sup>+</sup>3

文献标志码: A

肤孢虫 (*Dermocystidium*) 隶属于中粘菌纲 (Mesomycetozoea) 肤孢目 (Dermocystida), 是一类真菌样原生动物寄生虫<sup>[1-4]</sup>。主要形态特征包括胶质样包裹的圆形或条形孢囊 (sporangium), 具透明环状细胞质 (cytoplasm) 和不透明圆形折光体

(refractile body) 的圆形内生孢子 (endospore)<sup>[1]</sup>。成熟内生孢子分裂增殖或产生具鞭毛的游动孢子 (zoospore) 感染鱼类完成传播<sup>[1-2]</sup>; 寄生于鳃丝和皮肤等器官并形成孢囊, 易引起缺氧或继发性感染而造成鱼类死亡<sup>[5-7]</sup>, 破坏生态环境并造成经济损

收稿日期: 2021-03-24 修回日期: 2021-10-09

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46); 湖北省农业科技创新中心 (2019-620-000-001-33)

第一作者: 张波 (照片), 从事水生动物寄生虫学研究, E-mail: zhangboo@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 顾泽茂, 从事水产动物病害学研究, E-mail: guzema@mail.hzau.edu.cn



失。全世界已鉴定命名肤孢虫仅 18 种<sup>[6]</sup>。其中中国记录报道 5 种, 分别为鳗鲡肤孢虫 (*D. anguillae*)、野鲤肤孢虫 (*D. koi*)、鲈肤孢虫 (*D. percae*)、广东肤孢虫 (*D. kwangtungensis*) 和中华肤孢虫 (*D. sinensis*)<sup>[6, 8-10]</sup>。此外, 分别寄生于鳊 (*Siniperca chuatsi*) 鳃和大口鲮 (*Silurus meridionalis*) 皮肤的 2 个种尚未被命名<sup>[11-12]</sup>。

肤孢虫结构简单, 分类特征较少<sup>[12-13]</sup>, 以孢囊和孢子的形态特征为主要的分类依据, 但受环境和发育状态的影响较大<sup>[4, 7, 12-15]</sup>。因此, 很多种仅被鉴定到属级阶元<sup>[3-4, 11-12]</sup>, 导致准确评估肤孢虫的物种多样性面临严峻挑战。近年来, 基于形态特征, 结合寄生特性和分子系统学的整合分类法进行肤孢虫物种鉴定已在国内外广泛实践<sup>[6, 16-17]</sup>。应用该方法有望解决上述“定属不定种”问题<sup>[4]</sup>, 丰富物种多样性, 并为肤孢虫病防控提供可靠资料。然而, 当前我国肤孢虫记录仍相当匮乏, 开展相关研究尤为必要。

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国重要的特色经济养殖鱼类<sup>[18]</sup>, 年产量达 33.7 万 t<sup>[19]</sup>。2019 年 7 月, 湖北省安陆市某养殖池塘暴发肤孢虫病, 造成鳊死亡, 本研究自患病鱼分离病原并应用整合分类方法鉴定其为鳊肤孢虫 (*D. sinipercae* sp. n.), 新种, 修订并完善了我国部分肤孢虫记录。本研究结合超微结构观察该肤孢虫发育特征, 以期助力防控肤孢虫病, 减少养殖户的经济损失。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**实验鱼** 自湖北省安陆市某养殖塘内随机捕捞患病鳊鱼种 (采样前 4 周投放, 产地为广东省某养殖场) 22 尾, 全长 8.2~12.1 cm, 体质量 4.2~14.5 g。经充氧后, 实验鱼被运往湖北省武汉市华中农业大学水产学院实验室用于病原分离和鉴定。

### 1.2 患病鳊的病原分离

自患病鳊取新鲜孢囊用于形态观察和数字影像记录, 随后分别保存于 70% 乙醇、10% 甲醛水溶液和 2.5% 戊二醛等实验试剂, 于 4 °C 环境冷藏备用。

### 1.3 分离病原的鉴定

**形态观察和数字影像记录** 制备涂片, 置于 Olympus BX53 显微镜下观察, 使用 Olympus

DP72 数码成像装置记录数字影像并测量形态数据。

**基因组提取和 PCR 扩增** 参照康为世纪通用型柱式基因组提取试剂盒说明书提取基因组。使用 Langenmayer 等<sup>[17]</sup> 设计的引物对 (上游引物: 5'-CCTATCAACTTTCGATGGTAAGGTATTGGC-3', 下游引物: 5'-CCGAAGACCTCACTAAACCATTCAATCG-3') 扩增核糖体小亚基基序序列 (SSU *rDNA*) 片段。50 μL PCR 反应体系: 上下游引物各 1 μL, 模板 2 μL, 2×Mix 25 μL (诺唯赞公司), 双蒸水 21 μL。PCR 扩增条件: 预变性 94 °C 4 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 62 °C 30 s 和延伸 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序。测序后结果经 Lynnon Biosoft 公司 DNAMAN 软件 SeqMan 组件拼接, 经由人工校对后 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对分析, 测序结果上传至 NCBI 数据库。

**系统发育分析** 基于 BLAST 比对结果, 采用贝叶斯推断 (Bayesian inference, BI) 和最大似然估计法 (Maximum Likelihood, ML), 构建该物种 SSU *rDNA* 系统发育树, 何氏杀鱼菌 (*Ichthyophonus hoferi*) (登录号: U43712) 和多态杀鱼菌 (*I. irregularis*) (登陆号: AF232303) 设置为外群。参考序列经 MAFFT<sup>[20]</sup> 软件比对后, 使用 Gblocks 软件<sup>[21]</sup> 删除模糊比对区段, 使用 jModelTest 软件<sup>[22]</sup> 计算获得最优核苷酸替代模型为 GTR+I+G。贝叶斯树经 MrBayes<sup>[23]</sup> 软件运算 1 000 000 代, 每 100 代取样一次, 舍弃前 25% 老化样本获得树形拓扑, 采用马尔科夫链蒙特卡洛方法 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 计算各分支的后验支持率 (Posterior Probabilities, PP)。最大似然树经 RAxML<sup>[24]</sup> 软件基于最优模型自展检验重复运算 1 000 次。系统发育树使用 FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) 编辑和查看。

### 1.4 病原的超微结构观察

孢囊经 2.5% 戊二醛溶液 4 °C 环境固定 24 h 后, 置于 1% 锇酸 4 °C 避光条件固定 3 h, 梯级脱水后分别进行扫描电镜和透射电镜观察。

**扫描电镜** 上述样本经德国徕卡 HCP-2 干燥仪临界点干燥, 破碎孢囊并全部黏附于载样台, 经德国徕卡 EM ACE200 低真空镀膜仪喷金镀膜后, 置于日本日立 SU8010 扫描电镜下观察并拍照记录。

透射电镜 孢囊和孢子样品经环氧树脂渗透包埋, 制作超薄切片, 经醋酸铀和枸橼酸铅双染色并彻底干燥后, 使用 200 kv FEI 公司 Tecnai G2 20 TWIN 透射电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 患病鳃症状和解剖观察

患病鳃离群游动于水面, 行动迟缓, 无摄食行为。肉眼观察患病鳃, 除在体表发现白色孢囊外, 未发现其他异常(图版 I-1, 2), 每尾鱼可分离孢囊 8~20 个。部分病鱼体态瘦削, 背面观被养殖者描述为“刀锋般”扁平(图版 I-3)。鳍条、皮肤、口腔、鳃盖内外表面和鳃丝为该病原的发育部位(图版 I-1, 4, 5), 其中背鳍上孢囊数量最多, 而在 3 尾鱼的鳃丝发现单个孢囊。此次调查感染率约 68% (15/22)。

### 2.2 分离病原的鉴定

形态学观察 白色孢囊呈纺锤形或哑铃形, 长约 1.9~6.8 mm ( $n=12$ ), 两端钝圆(图版 I-2)。孢囊内含圆形的内生孢子, 大小不一, 直径约  $(9.8 \pm 1.8)$  ( $7.3 \sim 13.8$ )  $\mu\text{m}$  ( $n=50$ )(图版 II-1, 2)。大孢子内偏心圆形折光体和其外围环状细胞质清晰可见, 折光体直径约  $(6.5 \pm 1.2)$  ( $3.9 \sim 8.3$ )  $\mu\text{m}$  ( $n=50$ )。小孢子特征与大孢子结构类似, 但中央区液泡结构未完全发育, 轮廓不清晰; 液泡外缘密集分布有大小不一的空泡(图版 II-1)。

分子序列比对 凝胶成像结果显示, 序列长度 >1 500 bp (图 1), 实际测序拼接获得 SSU

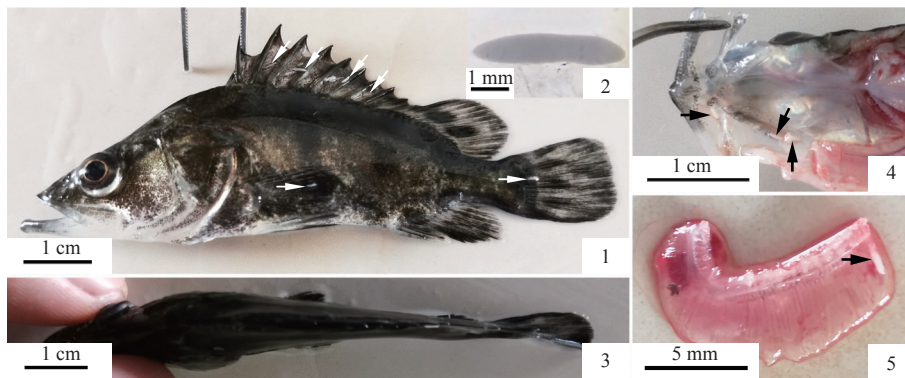
*rDNA* 序列片段为 1 297 bp (登录号: MW667583)。序列经 BLAST 比对结果显示, 寄生于鳃的鳃肤孢虫(广东省和河南省来源样本分别标记为 GD 和 HN, 下同, 登录号分别为 MT644942 和 MT644943)、寄生于美洲鳃( *Anguilla rostrata* )的鳃肤孢虫(登录号: MT644944)、寄生于河鲈( *Perca fluviatilis* )的芬兰肤孢虫( *D. fennicum*, 登录号: AF533950)和寄生于大鳞大麻哈鱼( *Oncorhynchus tshawytscha* )的鲑肤孢虫( *D. salmonis*, 登录号: U21337)与该序列一致性最高, 分别为 100%、99.85%、99.85%、99.77% 和 99.61%, 而鲈肤孢虫与本物种序列的一致性约 93.03%~93.41%。

系统发育分析 采用贝叶斯推断和最大似然估计法构建的系统树获得了一致拓扑结构, 但各节点支持较低(图 2)。肤孢虫属物种与西氏鼻孢子虫( *Rhinosporidium seeberi* )(登录号: AF118851)、两栖囊胞虫未定种 *Amphibiocystidium* sp. (登录号: EU650666、MK757501 和 EF493028)、蛙两栖囊胞虫( *A. ranae* )(登录号: AY692319)等其他属物种交叉聚类, 显示肤孢虫属非单系。GD 和 HN 聚类与本研究物种亲缘关系最近, 鲑肤孢虫(登录号: U21337)次之, 芬兰肤孢虫和寄生美洲鳃的鳃肤孢虫与该物种的亲缘关系较远。

根据形态学特征、序列比对和系统发育分析结果, 该病原可初步鉴定为肤孢虫属物种。

### 2.3 病原的超微结构观察

扫描电镜 内生孢子球形, 紧凑排布于孢囊壁内侧, 同一视野中内生孢子大小均一, 测量

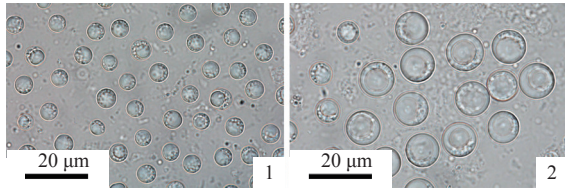


图版 I 患肤孢虫病的鳃

1. 病鱼侧面观, 箭头示孢囊; 2. 鳃肤孢虫孢囊; 3. 病鱼背面观; 4~5. 孢囊(箭头)发育于病鱼口腔和鳃丝。

### Plate I *S. chuatsi* with dermocystidiosis

1. lateral view of the diseased fish, white arrows show sporangia; 2. microscopic observation of sporangium of *D. sinipercae* sp. n.; 3. dorsal view of diseased fish; 4-5. sporangia (arrows) dwelt in oral cavity and gills



图版 II 鳊肤孢虫的内生孢子

Plate II Fresh endospores of *D. sinipercae* sp. n.

直径为  $(8.17 \pm 0.37)$  ( $7.41 \sim 8.98$ )  $\mu\text{m}$ ，偶见较大个体。内生孢子表面粗糙，由致密纤维外壳包裹，部分内生孢子由纤维束相互联接 (图版 III-1, 2)。同一孢囊内生孢子处于不同发育时期，个别孢子处于增殖阶段，中部缢缩形成 2 个子孢子体；部分内生孢子尚未吸收闭合的分裂芽痕和外围包裹的纤维网络外壳可清晰辨别 (图版 III-2, 3)。

**透射电镜** 孢囊壁双层，外层薄而电子致密，厚度仅数十纳米；内层厚而电子疏松，厚度约  $2 \mu\text{m}$  (图版 III-4)。内生孢子截面结构清晰，外缘可见电子疏松、厚度不均一的网状结构；内生孢子由单层均一的胶质样结构与外界分隔；内部结构电子较为致密，其中圆形折光体偏离孢子圆心位于一侧，中央电子致密，最外围电子疏松，

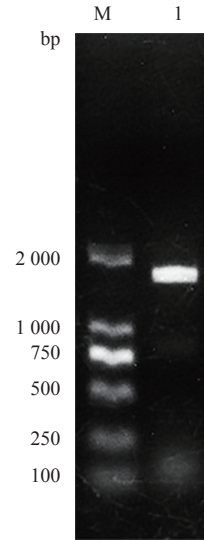


图 1 SSU rDNA 片段琼脂电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR product of SSU rDNA

M. DL2000 marker, 1. SSU rDNA

由内向外电子密度变化明显，成环状分层；折光体外围细胞质电子密度较高且均一，大量具鞭毛的游动孢子分布其中 (图版 III-5)，未观察到细胞

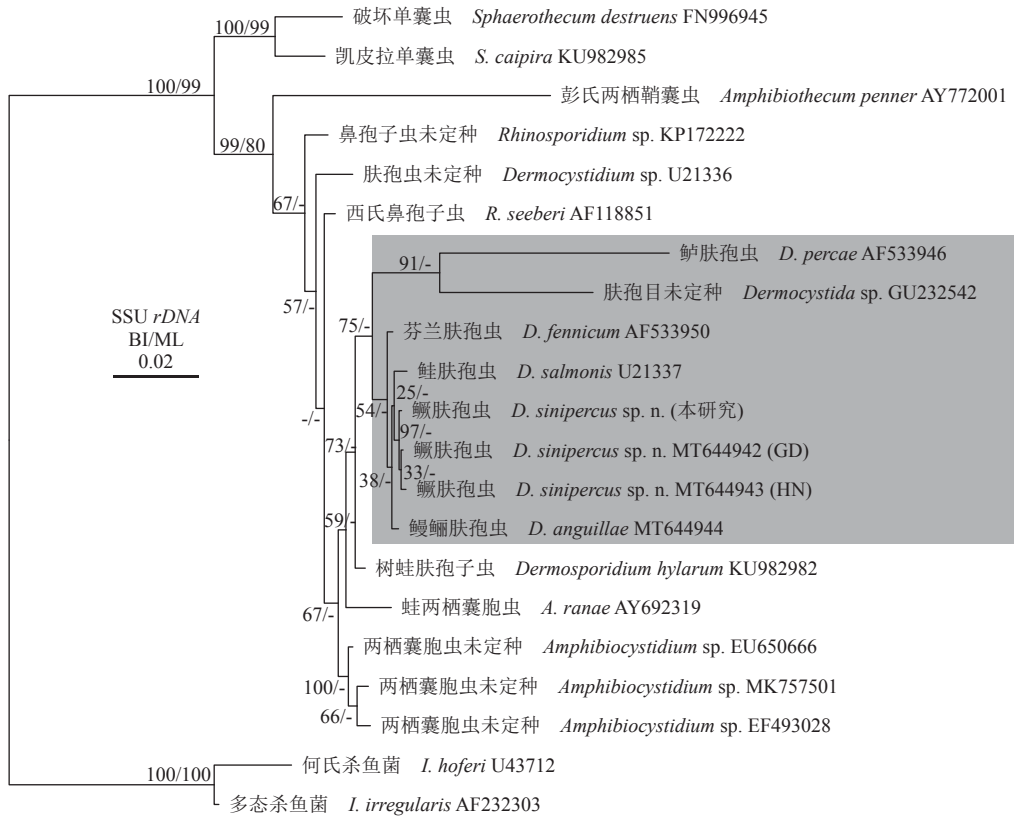
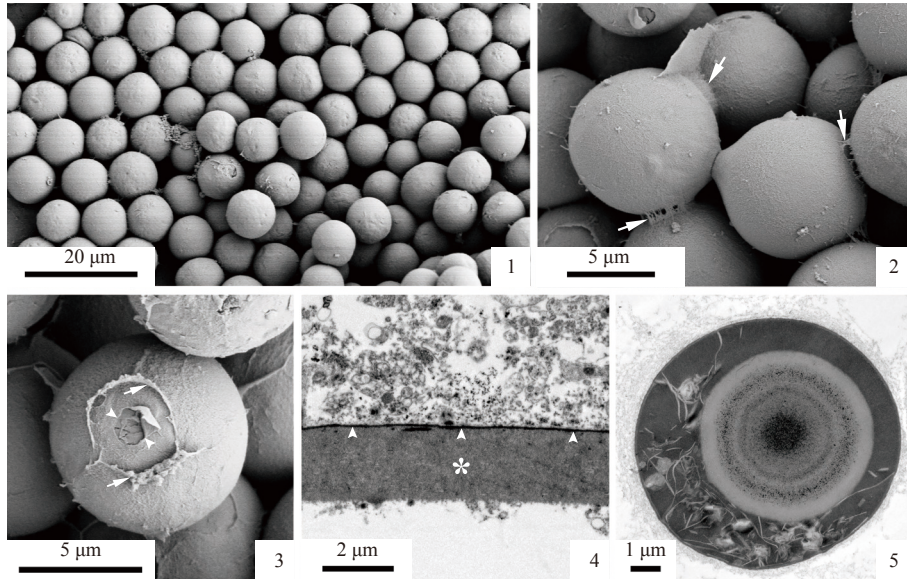


图 2 基于 SSU rDNA 序列构建肤孢虫和近缘物种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Dermocystidium* spp. with species from relative genus based on SSU rDNA



图版III 鳃肤孢虫超微结构

1~3. 扫描电镜观察, 1. 球状内生孢子, 2. 分裂中的内生孢子, 箭头示联接内生孢子的纤维结构, 3. 分裂后的内生孢子, 箭头示纤维网状外壳, 无尾箭头示分裂芽痕; 4~5. 透射电镜观察, 4. 孢囊壁的双层结构, 无尾箭头示囊外侧电子致密层, 星号示内侧电子疏松层, 5. 产生单鞭毛游动孢子的成熟内生孢子

Plate III Ultrastructural observations of *Dermocystidium sinipercae* sp. n.

1-3. scanning electron microscopic observations, 1. spherical endospores, 2. endospores experiencing fission, arrows show the filiform component among endospores, 3. endospores after the fission, arrows show the filiform network outside spores, tailless arrows show the fission bud scar; 4-5. transmission electron microscopic observations, 4. bilayer sporangium wall, tailless arrows show outer electron-dense layer, asterisk shows inner electron-loose layer, 5. mature endospore with zoospores

核和线粒体等细胞器。

3 讨论

该病原形态特征与肤孢虫一致, 鉴定为肤孢虫<sup>[1]</sup>, 测量值与其他肤孢虫重叠(表 1)。①孢子测量值比较。鲈肤孢虫、芬兰肤孢虫、阿拉伯肤孢虫(*D. arabica*)、广东肤孢虫、鳃肤孢虫、鲑肤孢虫和鲤肤孢虫(*D. cyprini*)较该物种略小, 而叶氏肤孢虫(*D. erschowi*)、野鲤肤孢虫和中华肤孢虫略大。湖北省鳃鳃上发现的肤孢虫未命名种(*Dermocystidium* sp., HB)与该物种测量值高度重合。②折光体测量值比较。除与 HB 测量值相近外, 该物种较广东肤孢虫、芬兰肤孢虫、鳃肤孢虫和鲤肤孢虫大, 比野鲤肤孢虫和中华肤孢虫略小。③孢囊形态和测量值比较。该物种呈纺锤形或哑铃形孢囊, 区别于鲑肤孢虫的圆形孢囊和鲤肤孢虫的卵形孢囊, 与鳃肤孢虫、阿拉伯肤孢虫、叶氏肤孢虫、芬兰肤孢虫、野鲤肤孢虫、广东肤孢虫、GD 和 HN 的细长型或哑铃状的孢囊相似, 但该物种孢囊较大且测量值范围更大。④寄生特征比较。该物种与 HB、GD 和 HN 均寄生于鳃,

区别于其他肤孢虫。主要寄生部位为鳍条和皮肤, 与中华肤孢虫、鲑肤孢虫、鲈肤孢虫、野鲤肤孢虫、芬兰肤孢虫、叶氏肤孢虫、阿拉伯肤孢虫、GD 和 HN 的寄生部位相似, 与鳃肤孢虫、阿拉伯肤孢虫、鲤肤孢虫和 HB 主要于鳃丝发育的寄生特性有差别, 但本研究在鳃丝部位也发现了发育的孢囊(图版 I -5)。综上, 形态特征和寄生特征均支持本研究物种与 HB 为同种, GD 和 HN 寄生特征与本物种基本一致。

分子序列比对结果显示, 肤孢虫种间序列差异较小。该物种序列与鳃肤孢虫、芬兰肤孢虫和鲑肤孢虫序列一致性较高, 与 GD 分离株序列完全相同。肤孢虫属在系统发育树中聚类非单系, 与其他研究结果一致<sup>[16, 25]</sup>。除 *Dermocystidium* sp. (U21336) 外, 该物种与肤孢虫属其他物种亲缘关系较近。与 GD 和 HN 分离株成姐妹枝, 亲缘关系最近; 与芬兰肤孢虫和寄生美洲鳃肤孢虫亲缘关系比鲑肤孢虫更远。基于 BLAST 比对和系统发育分析结果, 该物种与寄生鳃的 GD 和 HN 分离株同源, 但区别于鳃肤孢虫其他分离株。

鳃肤孢虫首次发现于德国的欧洲鳃肤孢虫(*A.*

表 1 本物种与肤孢虫属相似物种的生物学特征比较

| 物种<br>species                               | 孢囊形状和大小/mm<br>sporangium shape and size                          | 孢子/ $\mu\text{m}$<br>spore    | 折光体/ $\mu\text{m}$<br>refractile body | 寄生部位<br>infection sites | 宿主<br>fish host   | 数据来源<br>references |
|---|--|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|--------------------|
| 鳊肤孢虫<br><i>D. sinipercae</i><br>sp. n.      | 纺锤形或哑铃形<br>fusiform or dumbbell-shaped; 1.9~6.8                  | 9.8±1.8<br>(7.3~13.8)         | 6.5±1.2<br>(3.9~8.3)                  | F, SK, OC, G            | 鳊<br><i>S. chuatsi</i>  | 本实验<br>this study  |
| 鳊肤孢虫<br><i>D. sinipercae</i> sp.<br>n. (HB) | —  | 8.4<br>(6.7~11.1)             | 6.2<br>(4.4~7.8)                      | G                       | <i>Siniperca</i> sp.  | [11]               |
| 鳊肤孢虫<br><i>D. sinipercae</i> sp.<br>n. (GD) | 条状<br>longish; 2.7~4.8   | 6.7±0.5<br>(5.6~7.6)          | 3.1±0.5<br>(2.1~4.1)                  | G, F, SK                | 鳊<br><i>S. chuatsi</i>  | [6]                |
| 鳊肤孢虫<br><i>D. sinipercae</i> sp.<br>n. (HN) | 条状<br>longish; 0.5~2.0   | 7.0±0.3<br>(6.4~7.9)          | 5.3±0.3<br>(4.4~5.9)                  | G, F, SK                | 鳊<br><i>S. chuatsi</i>  | [6]                |
| 鳊肤孢虫<br><i>D. anguillae</i>                 | 条状<br>longish; 0.7~2.8   | 5.8±0.6<br>(4.6~7.3)          | 3.7±0.5<br>(3.0~5.8)                  | G                       | 美洲鳊鲡<br><i>A. rostrata</i>  | [6]                |
| 阿拉伯肤孢虫<br><i>D. arabica</i>                 | 圆形或纺锤形<br>round or fusiform; 0.1                                 | 8.2<br>(6.4~10.3)             | —                                     | G, MU, V                | <i>Johinus maculatus</i> ;<br>星斑裸颊鲷<br><i>Lethrinus nebulosus</i> ;<br>埃及笛鲷<br><i>Lutjanus ehrenbergii</i> ;<br><i>L. malabaricus</i> ;<br>半点九棘鲷<br><i>Cephalopholis hemistiktos</i> ;<br>清水石斑鱼<br><i>Epinephelus polyphekadion</i> | [5]                |
| 鲈肤孢虫<br><i>D. percae</i>                    | 细长形<br>elongate; 0.1~2×0.04~0.18                                 | 6~7.75                        | —                                     | SK                      | 河鲈<br><i>Perca fluviatilis</i>  | [38]               |
| 鲑肤孢虫<br><i>D. salmonis</i>                  | 圆形<br>round; 1   | 7~8                           | —                                     | SK, G                   | 大西洋鲑<br><i>Salmo salar</i> ;<br>虹鳟<br><i>Oncorhynchus mykiss</i> ;<br>大鳞大麻哈鱼<br><i>O. tshawytscha</i>   | [34]               |
| 芬兰肤孢虫<br><i>D. fennicum</i>                 | 圆形, 卵形或哑铃形<br>round, oval, dumbbell-shaped;<br>0.1~2.0×0.04~0.18 | 6~7.75                        | 4.0~8.0                               | F                       | 河鲈<br><i>P. fluviatilis</i>   | [16]               |
| 广东肤孢虫<br><i>D. kwantungensis</i>            | 条状<br>longish; 6.5~8.4×0.1~0.2                                   | 8.5<br>(6.5~10.3)             | 5.8<br>(2.9~7.4)                      | G                       | 斑乌鳢<br><i>Ophiocephalus maculatus</i>   | [10]               |
| 叶氏肤孢虫<br><i>D. erschowi</i>                 | 细长形<br>elongate; 0.16~2.0  | 14.0~16.0                     | —                                     | SK                      | 鲤<br><i>Cyprinus carpio</i>   | [39]               |
| 野鲤肤孢虫<br><i>D. koi</i>                      | 细长形<br>elongate; 0.04~0.3  | 6~14                          | 4.5~10.0                              | SK, MU                  | 鲤<br><i>C. carpio</i>   | [40]               |
| 中华肤孢虫<br><i>D. sinensis</i>                 | —  | 13.8<br>(11.6~16.2)           | 9.5<br>(8.0~11.0)                     | SK                      | 异育银鲫<br><i>Carassius auratus gibelio</i>  | [9]                |
| 鲤肤孢虫<br><i>D. cyprini</i>                   | 卵形<br>ovoid; 0.6~2   | 4~5(fresh);<br>1.3~3(stained) | 1~2(stained)                          | G                       | 鲤<br><i>C. carpio</i>   | [41]               |

注: OC. 口腔; G. 鳃; F. 鳍条; SK. 皮肤; MU. 肌肉组织; V. 内脏; —. 无对应数据  
Notes: OC. oral cavity; G. gills; F. fins; SK. skin; MU. musculature; V. viscera; —. no data

*anguilla*) 的鳃丝上, 可影响寄主正常生长<sup>[26]</sup>。随后在日本、英国、匈牙利和以色列等国养殖欧洲鳊鲡中发现, 与鳊鲡引种造成肤孢虫的人为扩散有关<sup>[27-30]</sup>。中国于 20 世纪 90 年代引进美洲鳊鲡和欧洲鳊鲡开展养殖和推广<sup>[31-33]</sup>。Liu 等<sup>[6]</sup>报道鳊鲡肤孢虫感染养殖美洲鳊鲡, 证实鳊鲡肤孢虫已在中国出现。与此同时, Liu 等<sup>[6]</sup>基于 SSU *rDNA* 序列的比对结果鉴定寄生于鳊的肤孢虫 (GD 和 HN) 是鳊鲡肤孢虫。由于 SSU *rDNA* 研究肤孢虫仅能提供有限的遗传信息, BLAST 比对结果一致性较

高, 肤孢虫属的聚类关系也仅获得较低的节点支持<sup>[6, 25]</sup>。尽管如此, 本研究结果与 Liu 等<sup>[6]</sup>基本一致, 即美洲鳊鲡源和鳊源的肤孢虫的亲缘关系较其他肤孢虫远。因关于肤孢虫寄主的报道均为近缘宿主, 表现较强宿主特异性<sup>[14, 34-36]</sup>, 本研究认为不同宿主来源且聚类非单系的肤孢虫属不同物种。此外, HB 作为最早报道的感染鳊的肤孢虫, 在中国的记录时间早在鳊鲡引种之前<sup>[11]</sup>, 该物种在中国出现可能与鳊鲡肤孢虫的人为扩散事件无关。因此, 本研究修订鳊鲡肤孢虫的 GD 和 HN 分离

株记录, 与本研究物种和 HB 物种记录一并命名为 *Dermocystidium sinipercae* sp. n., 中文学名称为鳃肤孢虫。本研究补充了鳃肤孢虫的原始描述, 修订了 2 个分离株记录, 丰富了我国肤孢虫物种多样性信息。

本研究中鳃肤孢虫孢囊、内生孢子和折光体较 GD 和 HN 分离株大, 与 Liu 等<sup>[6]</sup>描述的 GD 和 HN 形态结构差异类似。肤孢虫自侵染宿主至内生孢子发育成熟并导致宿主发病需时数周<sup>[1, 35]</sup>。在此期间, 孢子或经历 3 种不同发育阶段<sup>[12]</sup>, 折光体逐渐充盈并为肤孢虫提供营养物质<sup>[37]</sup>, 在此期间形态特征将发生明显变化。本研究样本采集于 7 月, 而 GD 和 HN 分离株分别采集于 3 月和 4 月<sup>[6]</sup>, 3 个分离株产地不同且存在 1~4 个月的采样时间差。肤孢虫形态特征可能因其在不同发育时期被观察记录而存在差异。此外, 较高的环境温度可促进肤孢虫生长<sup>[14, 36]</sup>, 且观察到内生孢子增殖和产生游动孢子的过程, 推测内生孢子在夏季的发育状态较春季更为成熟。综上, 肤孢虫孢子和孢囊在种内形态差异可能与采样时间和发育条件有关。

本研究证实广东省、湖北省和河南省养殖鳃的肤孢虫病的病原均为鳃肤孢虫, 且其在国内的鳃养殖区已广泛分布。因本研究分离株与 GD 分离株分子序列完全一致, 我们推测此次湖北省鳃暴发的肤孢虫病与产地输入的病原有关。为保障我国鳃养殖产业的健康发展, 防控病原传播和疾病蔓延, 有必要调查鳃苗种的病原并开展检验检疫工作, 本研究结果将提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] Mendoza L, Taylor J W, Ajello L. The class mesomycetozoa: a heterogeneous group of microorganisms at the animal-fungal boundary[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56: 315-44.
- [2] Glockling S L, Marshall W L, Gleason F H. Phylogenetic interpretations and ecological potentials of the Mesomycetozoa (Ichthyosporea)[J]. *Fungal Ecology*, 2013, 6(4): 237-247.
- [3] Rowley J J L, Gleason F H, Andreou D, et al. Impacts of mesomycetozoean parasites on amphibian and freshwater fish populations[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2013, 27(3-4): 100-111.
- [4] Gozlan R E, Marshall W L, Lilje O, et al. Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 62.
- [5] Hassan M A, Osman H A M, Mahmoud M A. Studies on dermocystidiosis (yellow muscle disease) among some marine fishes of arabian gulf and red sea coast, Jeddah, Saudi Arabia[J]. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2014, 22(4): 478-487.
- [6] Liu Y, Li W X, Li D, et al. Identification of *Dermocystidium anguillae* Spangenberg, 1975 from the American eel *Anguilla rostrata* (Lesueur, 1817) and Chinese perch *Siniperca chuatsi* (Basilewsky, 1855)[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735793.
- [7] Pauley G B. Prespawning adult salmon mortality associated with a fungus of the genus *Dermocystidium*[J]. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 1967, 24(4): 843-848.
- [8] 潘炳华, 张剑英, 黎振昌, 等. 鱼类寄生虫学 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.  
Pan J H, Zhang J Y, Li Z C, et al. *Fish Parasitology*[M]. Beijing: Science Press, 1990 (in Chinese).
- [9] Xiao C, Chen C. A new species *Dermocystidium sinensis* sp. nov. from freshwater fishes of China[J]. *Transactions of Researches on Fish Diseases*, 1993, 1: 95-97.
- [10] 陈啓鏊, 谢杏人. 斑鳢和乌鳢寄生孢子虫的研究[J]. *水生生物学集刊*, 1960(2): 171-196.  
Chen Q L, Hsieh S R. Studies on sporozoa from the freshwater fishes *Ophiocephalus maculatus* and *O. argus* of China[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1960(2): 171-196 (in Chinese).
- [11] 湖北省水生生物研究所. 湖北省鱼病病原区系图志 [M]. 北京: 科学出版社, 1973.  
Institute of Hydrobiology of Hubei Province. An illustrated guide to the fish diseases and causative pathogenic fauna and flora in the Hubei Province[M]. Beijing: Science Press, 1973 (in Chinese).
- [12] Zhang Q Z, Wang Z J. *Dermocystidium* sp. infection in cultured juvenile southern catfish *Silurus meridionalis* in China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 65(3): 245-250.
- [13] Feist S W, Longshaw M, Hurrell R H, et al. Observations of *Dermocystidium* sp. infections in bullheads, *Cottus gobio* L., from a river in southern England[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(4): 225-231.
- [14] Pekkarinen M, Lotman K. Occurrence and life cycles of *Dermocystidium* species (Mesomycetozoa) in the perch (*Perca fluviatilis*) and ruff (*Gymnocephalus cernuus*) (Pisces: Perciformes) in Finland and Estonia[J]. *Journal of Natural History*, 2003, 37(10): 1155-1172.

- [15] Blazer V S, Hitt N P, Snyder C D, *et al.* *Dermocystidium* sp. infection in Blue ridge sculpin captured in Maryland[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2016, 28(3): 143-149.
- [16] Pekkarinen M, Lom J, Murphy C A, *et al.* Phylogenetic position and ultrastructure of two *Dermocystidium* species (Ichthyosporae) from the common perch (*Perca fluviatilis*)[J]. *Acta Protozoologica*, 2003, 42(4): 287-307.
- [17] Langenmayer M C, Lewisch E, Gotesman M, *et al.* Cutaneous infection with *Dermocystidium salmonis* in Cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(5): 503-506.
- [18] 梁旭方, 李姣. 鳊鱼饲料可控养殖技术[J]. *科学养鱼*, 2021(1): 68-69.
- Liang X F, Li J. Technical system of feed controllable culture of mandarin fish[J]. *Scientific Fish Farming*, 2021(1): 68-69 (in Chinese).
- [19] 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-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Fisheries Technology Extension Center, China society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [20] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772-780.
- [21] Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(4): 540-552.
- [22] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [23] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539-542.
- [24] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [25] Borteiro C, Baldo D, Maronna M M, *et al.* Amphibian parasites of the Order Dermocystida (Ichthyosporae): current knowledge, taxonomic review and new records from Brazil[J]. *Zootaxa*, 2018, 4461(4): 499-518.
- [26] Spangenberg R. A gill disease in the eel, caused by *Dermocystidium anguillae* n. sp.[J]. *Zeitschrift für die Binnenfischerei der DDR*, 1975, 22(12): 363-367.
- [27] Hatai K, Hirose H, Hioki M, *et al.* *Dermocystidium anguillae* Found on the gills of the European eel, *Anguilla anguilla* cultured in Japan[J]. *Fish Pathology*, 1979, 13(4): 205-210.
- [28] Wootten R, McVicar A H. *Dermocystidium* from cultured eels, *Anguilla anguilla* L., in Scotland[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1982, 5(3): 215-222.
- [29] Molnar K, Sovényi J F. *Dermocystidium anguillae* infection in elvers cultured in Hungary[J]. *Aquacultura Hungarica* (Szarvas), 1984, IV: 71-78.
- [30] Nitzan S. *Dermocystidium Anguillae* in elvers of the european eel *Anguilla Anguilla* L. in israel[J]. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, 1990, 42(2): 52-55.
- [31] 李学军, 潘崢, 张延斌. 我国内陆水域引进的食用鱼类[J]. *河南水产*, 1996(4): 13-16.
- Li X J, Pan Z, Zhang Y B. Food fish introduced to inland water in China[J]. *Henan Fisheries*, 1996(4): 13-16 (in Chinese).
- [32] 楼允东. 我国鱼类引种研究的现状与对策[J]. *水产学报*, 2000, 24(2): 185-192.
- Lou Y D. Present situation and countermeasure of the study on fish introduction in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(2): 185-192 (in Chinese).
- [33] 樊海平. 我国养殖鳊鲈新品种引进、试养调查分析[J]. *科学养鱼*, 2009(12): 2-3.
- Fan H P. Investigation and analysis on the introduction and trial breeding of new varieties of eel in China[J]. *Scientific Fish Farming*, 2009(12): 2-3 (in Chinese).
- [34] Davis H S. Studies of the protozoan parasites of freshwater fishes [M]. *Fishery Bulletin 41 of Fish and Wildlife Service*, 1947, 51(1): 25-27.
- [35] Olson R E, Dungan C F, Holt R A. Water-borne transmission of *Dermocystidium salmonis* in the laboratory[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1991, 12(1): 41-48.
- [36] Olson R E, Holt R A. The gill pathogen *Dermocystidium salmonis* in Oregon salmonids[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1995, 7(2): 111-117.
- [37] Elkan E. *Dermocystidium gasterostei* n. sp., a parasite of *Gasterosteus aculeatus* L. and *Gasterosteus pungitius* L.[J]. *Nature*, 1962, 196(4858): 958-960.
- [38] Reichenbach-Klinke H H. Der Entwicklungskreis der Dermocystidien sowie Beschreibung einer neuen Haplosporidien art *Dermocystidium percae* n. sp.[J]. *Verhandlungen der Deutschen Zoologen*, 1950, 14: 126-132.
- [39] Garkavi V L, Denisov A I, Afanasjev V I. A new species of Haplosporidia, *Dermocystidium erschowi* sp. n.,



- from *Cyprinus carpio*[J]. *Parazitologiya*, 1980, 14(6): 533-537.
- [40] Hoshina T, Sahara Y. A new species of the genus *Dermocystidium*, *D. koi* sp. nov., parasitic in *Cyprinus carpio* L.[J]. *Nsugaf*, 1950, 15(12): 825-829.
- [41] Červinka S, Vitovec J, Lom J, et al. Dermocystidiosis-a gill disease of the carp due to *Dermocystidium cyprini* n. sp.[J]. *Journal of Fish Biology*, 1974, 6(6): 689-699.

## Isolation and identification of *Dermocystidium sinipercae* sp. n.

ZHANG Bo<sup>1,2</sup>, GU Zemao<sup>1,2\*</sup>

(1. *Shuangshui Shuanglü Institute, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China)*

**Abstract:** To accurately identify the pathogen of *Siniperca chuatsi*, the experiments were based on morphological comparisons, combined with parasitic characterization and molecular phylogenetic methods to carry out the study and observe the ultrastructure. The results showed: fusiform or dumb-bell white sporangia, about 1.9-6.8 mm in length, were observed in the fins, skin, oral cavity, gills, the outer and the inner layer of the operculum of the diseased fishes; endospores of  $(9.8 \pm 1.8)$  (7.3-13.8)  $\mu\text{m}$  in diameter; the ring-like cytoplasm and circular refractive bodies of about  $(6.5 \pm 1.2)$  (3.9-8.3)  $\mu\text{m}$  in diameter. It was identified as *Dermocystidium*. The measured values of this species were different from those of other *Dermocystidium* and were in general agreement with those of the undetermined species (HB) parasitizing the gills of *Siniperca chuatsi*; it was parasitized by similar sites as *Dermocystidium* from Guangdong and Henan provinces (GD and HN) and *Dermocystidium* sp. (HB). Molecular sequence alignment and phylogenetic results showed that this species shared over 99% similarity with *Dermocystidium* sp. (HB and HN), *Dermocystidium anguillae*, *D. fennicum*, and *D. salmonis* in SSU *rDNA* sequences. Phylogenetic analysis indicated that *D. anguillae* sampled from Guangdong (GD) and Henan province (HN) branched closely with the present species, then *D. salmonis*, *D. anguillae*, and *D. fennicum*. We concluded that *Dermocystidium* sp. infecting *Siniperca* sp. are conspecific and we revised the records of the *D. anguillae* (GD and HN) isolates of *Siniperca chuatsi*; we named *Dermocystidium* in this study together with the isolates (HB, GD and HN) as *Dermocystidium sinipercae* sp. n.. The intraspecific morphological variation of *Dermocystidium sinipercae* sp. n. may be related to the sampling time and developmental environment; spore proliferation and differentiation processes were recorded and described in ultrastructural observations. This study confirms that *Dermocystidium sinipercae* sp. n. has been distributed in many parts of China, emphasizing the urgent need to implement quarantine measures for the origin of *Siniperca chuatsi*.

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; *Dermocystidium*; morphology; phylogenetics; ultrastructure; identification

**Corresponding author:** GU Zemao. E-mail: guzemao@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** Special Program of China Agriculture Research System (CARS-46); Hubei Agricultural Sciences and Technology Innovation Center (2019-620-000-001-33)