



## 瓶囊碘泡虫的重描述及其与洪湖碘泡虫分子标记的比较

张潇艺<sup>1</sup>, 丁鹏<sup>1</sup>, 张城豪<sup>1</sup>, 孙荣华<sup>1</sup>, 杨承忠<sup>2</sup>, 柳阳<sup>1\*</sup>

(1. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266109;

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

**摘要:** 为了完善瓶囊碘泡虫的分类学特征及厘清其与洪湖碘泡虫的分类关系, 实验采用形态学、组织学和分子生物学方法对瓶囊碘泡虫进行了重描述, 并与洪湖碘泡虫的分子标记进行了系统比较。结果显示, 瓶囊碘泡虫寄生于异育银鲫的鳃, 形成乳白色的圆形或椭圆形孢囊, 直径为 1.2~1.4 mm。成熟孢子壳面观呈梨形, 前端较尖, 后端钝圆, 孢子长 17.3~19.6  $\mu\text{m}$ , 孢子宽 7.4~9.9  $\mu\text{m}$ 。两个极囊呈瓶状, 大小不等。大极囊长 6.4~9.7  $\mu\text{m}$ , 大极囊宽 2.1~3.3  $\mu\text{m}$ ; 小极囊长 5.3~8.9  $\mu\text{m}$ , 小极囊宽 2.0~3.3  $\mu\text{m}$ 。极丝圈数为 8~11 圈。组织学分析显示, 瓶囊碘泡虫寄生于鳃小片间的上皮组织。BLAST 分析显示, 本研究获得的瓶囊碘泡虫的小亚基核糖体 DNA (SSU rDNA) 序列与 GenBank 中瓶囊碘泡虫序列的相似性为 99.5%~99.8% (KC425223~KC425225、MH329620、JQ690361、JQ690373、KJ725082、MN227351、DQ339482)。系统发育分析表明, 瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫形成姐妹支。瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫分子标记序列的比较结果显示, 这两种碘泡虫的序列相似性为 98.2%~98.8%, 遗传距离为 0.014~0.018, 存在 27 个碱基差异。SSU rRNA 二级结构分析显示, 瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫同一物种不同群体间的二级结构一致, 两个物种间的二级结构存在明显差异, 表明 SSU rRNA 二级结构可以作为鉴别瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫的分子特征。本研究完善了瓶囊碘泡虫在异育银鲫鳃部的详细寄生部位, 提出 SSU rRNA 二级结构可以作为有效鉴别瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫的分子标记。

**关键词:** 粘孢子虫; 小亚基核糖体 DNA (SSU rDNA); 二级结构; 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) 隶属于刺胞动物门 (Cnidaria), 是一类个体微小、结构简单、物种丰富且分布广泛的后生动物寄生虫。目前, 全世界已报道的粘体动物超过 2 600 种, 除少数种类寄生于两栖类、爬行类、鸟类与哺乳动物外, 大部分粘体动物寄生于鱼类<sup>[1-2]</sup>。碘泡虫属 (*Myxobolus*) 是粘体动物中分布最广、物种最丰富的类群, 目前全世界已报道超过 900 种<sup>[3-5]</sup>。在经典分类学研

究中, 碘泡虫属物种的鉴定主要依据成熟孢子的形态特征, 如孢子形状、孢子大小、极囊形状、极囊大小、极丝圈数等<sup>[6]</sup>。然而, 由于部分碘泡虫物种间的孢子形态较为相似, 加之部分碘泡虫物种的不同群体表现出较大的形态差异, 导致早期记录的碘泡虫物种中存在大量同名异物和同物异名的现象<sup>[6-7]</sup>。此外, 早期国内外文献交流不畅也是同物异名产生的重要原因<sup>[8]</sup>。近年来, 研究

收稿日期: 2023-11-24 修回日期: 2024-03-28

资助项目: 国家自然科学基金 (32073012)

第一作者: 张潇艺 (照片), 从事水生动物寄生虫学研究, E-mail: 15606487328@163.com

通信作者: 柳阳, 从事水生动物寄生虫学研究, E-mail: liuyangqz@qau.edu.cn



发现碘泡虫的大部分种类具有严格的寄生特异性(宿主特异性、器官特异性、组织向性), 并且寄生特异性已成为碘泡虫物种鉴定的重要依据<sup>[9-11]</sup>。然而, 我国早期报道的大量碘泡虫物种被记录寄生于多种宿主的不同器官, 这为碘泡虫的物种鉴定带来严重困扰<sup>[6]</sup>。近年来, 分子标记的序列分析在碘泡虫物种的鉴定中发挥了重要作用, 解决了大量碘泡虫的分类难题。早期学者基于经典分类学方法, 分别将寄生于异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 体表的碘泡虫和欧鳊 (*Abramis brama orientalis*) 鳃丝的碘泡虫均鉴定为圆形碘泡虫 (*M. rotundus*)。然而, Liu 等<sup>[12]</sup> 和 Zhang 等<sup>[13]</sup> 通过小亚基核糖体 DNA (SSU rDNA) 序列分析发现, 这两种碘泡虫的序列相似度仅为 87%, 指出它们并非同一物种, 并将寄生异育银鲫体表的碘泡虫重新命名为丑陋圆形碘泡虫 (*M. turpisrotundus*)。另外, Liu 等<sup>[14]</sup> 发现, 寄生于我国的鲤 (*Cyprinus carpio*) 鳃丝的异型碘泡虫 (*M. dispar*) 与国外描述的异型碘泡虫的 SSU rDNA 序列相似度仅为 90%, 而与贝壳碘泡虫 (*M. musseliusae*) 的 SSU rDNA 序列完全一致, 因此, 将寄生于我国的鲤鳃丝的异型碘泡虫厘定为贝壳碘泡虫。分子标记的序列分析也已成为碘泡虫物种鉴定的重要依据。因此, 在完善碘泡虫形态特征的基础上, 补充其寄生特性和分子标记信息是厘清碘泡虫物种有效性及建立碘泡虫属物种名录的重要基础。

瓶囊碘泡虫 (*M. ampullicapsulatus*) 寄生于鲫 (*C. auratus auratus*) 的鳃部, 最早于重庆市龙水湖发现并报道<sup>[15]</sup>。随后, 在重庆市永川区、重庆市南岸区南坪镇、江西省鄱阳湖、湖北省武汉市、湖北省洪湖市、江苏省盐城市等地相继发现并报道了瓶囊碘泡虫<sup>[16-20]</sup>。尽管瓶囊碘泡虫已被多次报道和描述, 但是其在宿主鳃组织的详细寄生部位仍不明确。Zhao 等<sup>[15]</sup> 指出瓶囊碘泡虫寄生于鳃小片间的上皮组织中, 但是该研究未提供组织病理切片支持其观点。随后, 张全中等<sup>[16]</sup> 提出瓶囊碘泡虫不仅可以寄生于鳃小片间的上皮组织, 还可以寄生于鳃小片和鳃丝的血管中, 但是该研究也未提供组织病理切片。另外, Liu 等<sup>[17]</sup> 对寄生瓶囊碘泡虫的金鱼 (*C. auratus auratus*) 鳃组织进行了病理分析, 但是该研究未对瓶囊碘泡虫的寄生部位进行描述。因此, 瓶囊碘泡虫在宿主鳃部的详细寄生部位尚未明确。

与瓶囊碘泡虫类似, 洪湖碘泡虫 (*M. honghue-*

*nsis*) 也是寄生异育银鲫的常见粘体动物种类。但是, 由于瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫的孢子形态相似、分子标记序列相似性高, 导致在物种鉴定过程中容易混淆。Xi 等<sup>[18]</sup> 在异育银鲫的咽部分离到一种碘泡虫, 因其孢子的形态特征和 SSU rDNA 序列与瓶囊碘泡虫较为相似, 将其鉴定为瓶囊碘泡虫。但随后的研究发现该碘泡虫应为洪湖碘泡虫<sup>[19]</sup>。为了更加便捷地区分瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫, Zhao 等<sup>[19]</sup> 对这两种碘泡虫的 SSU rDNA 序列进行比较, 建议将“不少于 10 个碱基变异位点”作为两个物种鉴别的分子依据。然而, 由于上述分析引用的瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫的种群数量有限, 将该指标作为鉴别这两个碘泡虫物种的依据缺乏可靠性。

针对瓶囊碘泡虫寄生部位不明确、瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫分子鉴别缺乏依据等问题, 本研究对瓶囊碘泡虫进行了补充描述, 并对瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫的 SSU rDNA 序列进行了系统比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2022 年 8 月于湖北省黄冈市某养殖池塘 (30°27'7" N, 115°15'54" E) 捕捞异育银鲫 37 尾 (全长 7.1~10.3 cm), 使用 MS222 麻醉后解剖。肉眼和光学显微镜检查各器官中是否存在粘体动物孢囊或成熟孢子。在异育银鲫鳃部发现粘体动物孢囊后, 将孢囊分别用无水乙醇和 10% 多聚甲醛保存, 被感染的鳃组织用 10% 多聚甲醛保存。

### 1.2 形态学分析

用镊子将 10% 多聚甲醛固定的孢囊放置在载玻片上, 用解剖针刺破孢囊使其破裂释放出孢子。用配备 ZEISS Axiocam 105 彩色相机 (ZEISS, Oberkochen, 德国) 的 ZEISS A1 显微镜对孢子进行观察和拍照。根据 Lom 等<sup>[21]</sup> 制定的测量标准对孢子进行形态学观察和形态计量分析。本研究获得了中国山东省实验动物管理和使用伦理委员会批准 (批号: SD2007695), 实验过程中操作人员严格遵守山东省实验动物管理和使用伦理委员会伦理规范, 并按照山东省实验动物管理和使用伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.3 组织学分析

感染的鳃组织在 10% 多聚甲醛中固定 48 h 后,

按照常规组织学方法进行石蜡切片制作, 包括系列乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片(切片厚度为 5~6  $\mu\text{m}$ ), 苏木精-伊红 (H.E) 染色后光学显微镜观察。

#### 1.4 DNA 提取、扩增和测序

取保存于无水乙醇的一个孢囊, 使用通用型柱式基因组提取试剂盒 (CWBio, 中国) 提取一个孢囊中全部孢子 ( $\geq 1000$  个) 的基因组 DNA。使用引物 ERIB1 和 ERIB10<sup>[22]</sup> 扩增粘体动物的 SSU rDNA 序列。PCR 反应的总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 两种引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (0.1 mol/L)、1  $\mu\text{L}$  基因组 DNA、12.5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ AceTaq Master Mix (Vazyme, 中国) 和 10.5  $\mu\text{L}$  双蒸水。循环条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 60 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 进行 35 次循环, 最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  下终延伸 7 min。使用 1% 琼脂糖凝胶分离 PCR 产物, 并使用 ABI PRISM<sup>®</sup>3730XL DNA 测序仪 (Applied Biosystems Inc., Foster, 美国) 进行双向测序。利用 BioEdit<sup>[23]</sup> 对测序结果进行拼接, 并根据测序峰图对拼接结果进行人工校正, 将拼接完成的序列提交至 GenBank。

#### 1.5 系统发育分析

利用本研究获得的 SSU rDNA 序列进行 BLAST 比对, 并从 GenBank 中选取 43 条与瓶囊碘泡虫序列相似性较高的粘体动物序列进行系统发育分析, 以楔形两极虫 (*Myxidium cuneiforme*) 和干地亚楚克拉虫 (*Zschokkella candia*) 作为外群。使用 MAFFT v.7.490<sup>[24]</sup> 对选取的序列进行多序列比对, 利用最大似然法 (Maximum like-hood, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian inferences, BI) 进行系统发育分析。使用 jModeltest<sup>[25]</sup> 在 Akaike 信息标准下筛选最佳核苷酸替代模型为 GTR+I+G, 并应用于最大似然和贝叶斯推理分析。最大似然法分析使用 GTR+I+G 模型, 通过 IQ-TREE v2.0<sup>[26]</sup> 设置 10 000 个 Ultrafast bootstrap replicates 进行分析。贝叶斯推理分析通过 MrBayes v3.2.7<sup>[27]</sup> 进行, 使用模型 GTR+I+G, 设置替换模型参数 Nst 为 6, 通过马尔可夫链蒙特卡罗方法 (Markov chain Monte Carlo process) 设置为 4 条链同时运行  $2 \times 10^6$  代, 每 100 代采 1 次。系统发育树由 MEGA v.7<sup>[28]</sup> 或 Figtree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/Figtree/>) 查看。

#### 1.6 SSU rDNA 序列的遗传变异分析

将本研究获得的瓶囊碘泡虫 SSU rDNA 序列进行 BLAST 比对, 并从 GenBank 获得 14 条相关的 SSU rDNA 序列 (9 条瓶囊碘泡虫的 SSU rDNA 序列、5 条洪湖碘泡虫的 SSU rDNA 序列)。使用 MAFFT v.7.490<sup>[24]</sup> 对所获得的 SSU rDNA 序列进行多序列比对, 然后使用 MEGA v.7.0<sup>[28]</sup> 进行两两序列间的遗传距离计算。通过 MEGA v.7.0<sup>[28]</sup> 获得序列间的变异位点, 使用 Bioedit v.7<sup>[23]</sup> 和 Ttools<sup>[29]</sup> 对结果进行编辑和查看。

#### 1.7 小亚基核糖体 RNA (SSU rRNA) 的 V4 和 V7 区二级结构预测

以鲑球孢虫 (*Sphaerospora truttae*) (AM410773) SSU rRNA 序列的二级结构为参考模型<sup>[30]</sup>, 对 15 条 SSU rRNA 序列 (1 条本研究获得的瓶囊碘泡虫序列以及 GenBank 中下载的 9 条瓶囊碘泡虫 SSU rRNA 序列和 5 条洪湖碘泡虫的 SSU rRNA 序列) V4 和 V7 区的二级结构进行预测。利用 MAFFT v.7.490<sup>[24]</sup> 对本研究获得的序列进行多序列比对, 将比对后的序列通过 MEGA v.7.0<sup>[28]</sup> 与参考模型鲑球孢虫的序列进行比较, 获得 V4 和 V7 可变区的序列。利用 RNA Structure v.5.2, 基于最小自由能原理对 V4 和 V7 可变区序列进行二级结构预测, 所有参数均为默认值<sup>[31-32]</sup>。预测后的二级结构通过 RNAViz v.2.0<sup>[33]</sup> 进行手动调整。

## 2 结果

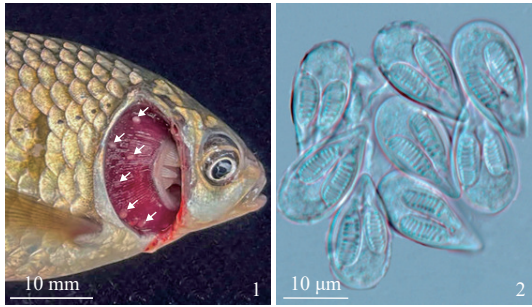
### 2.1 瓶囊碘泡虫的形态学描述

在 11 尾异育银鲫的鳃部发现大量白色孢囊, 孢囊呈圆形或椭圆形, 直径为 1.2~1.4 mm (图版 I -1)。成熟孢子壳面观呈梨形, 前端较尖, 后端钝圆, 孢子长 17.3~19.6  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ), 孢子宽 7.4~9.9  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ) (图版 I -2)。两个极囊呈瓶状, 大小不同, 大极囊 (极囊 I) 长 6.4~9.7  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ), 大极囊 (极囊 I) 宽 2.1~3.3  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ); 小极囊 (极囊 II) 长 5.3~8.9  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ), 小极囊 (极囊 II) 宽 2.0~3.3  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ), 极丝圈数为 8~11 圈。

### 2.2 组织学分析

组织学分析发现, 瓶囊碘泡虫的孢囊寄生于鳃小片间的上皮组织中 (图版 II -1, 2), 未观察到明显的病理变化。成熟孢子位于孢囊中部, 未成熟孢子聚集于孢囊边缘 (图版 II -2)。





图版 I 寄生异育银鲫鳃的瓶囊碘泡虫

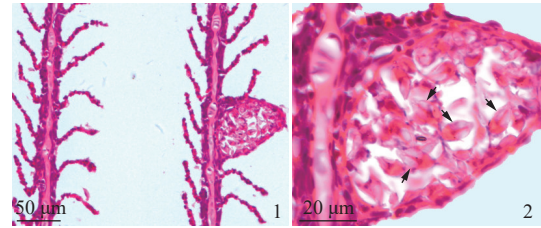
1. 寄生异育银鲫鳃的瓶囊碘泡虫的孢囊 (箭头); 2. 瓶囊碘泡虫的孢子。

**Plate I *M. ampullicapsulatus* infecting gills of *C. auratus gibelio***

1. plasmodia (arrows) of *M. ampullicapsulatus* in gills of *C. auratus gibelio*; 2. spores of *M. ampullicapsulatus*.

**2.3 瓶囊碘泡虫的分子序列与系统发育分析**

本研究获得了瓶囊碘泡虫的 1 条 1 967 bp 的 SSU rDNA 序列 (OR792773)。BLAST 比对显示, 本研究获得的 SSU rDNA 序列与 GenBank 数据库中



图版 II 寄生瓶囊碘泡虫的异育银鲫鳃的组织切片

1. 位于鳃小片间上皮组织的孢囊; 2. 孢囊中的成熟孢子 (箭头) 和未成熟孢子。

**Plate II Histological section of gills of *C. auratus gibelio* infected by *M. ampullicapsulatus***

1. plasmodium developing in stratified epithelium of adjacent gill lamellae; 2. mature spores (arrows) and immature spores in plasmodium.

瓶囊碘泡虫的相似性为 99.5%~99.8% (KC425223 ~ KC425225、MH329620、JQ690361、JQ690373、KJ725082、MN227351 和 DQ339482) (表 1)。系统发育分析表明, 瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫构成姐妹群 (图 1)。

表 1 瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫基于 SSU rDNA 序列的相似性 (右上三角) 与遗传距离 (左下三角)

**Tab. 1 Comparison of sequence similarities (upper right triangle) and genetic distances (lower left triangle) of *M. ampullicapsulatus* and *M. honghuensis* based on SSU rDNA sequences**

序号与物种 no. and species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> OR792773		99.8	99.5	99.7	99.7	99.7	99.6	99.8	99.6	99.8	98.4	98.7	98.7	98.7	98.5
2 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> KC425225	0.001		99.8	99.7	99.9	99.8	99.6	99.9	99.8	99.8	98.7	98.8	98.7	98.7	98.6
3 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> KC425224	0.002	0.002		99.5	99.7	99.9	99.6	99.8	99.7	99.6	98.4	98.6	98.6	98.6	98.4
4 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> KC425223	0.001	0.000	0.002		99.6	99.6	99.4	99.9	99.7	99.8	98.4	98.6	98.6	98.6	98.6
5 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> MH329620	0.001	0.000	0.002	0.000		99.7	99.5	99.8	99.7	99.8	98.6	98.8	98.7	98.7	98.6
6 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> JQ690361	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002		99.8	99.8	99.8	99.7	98.5	98.6	98.5	98.6	98.5
7 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> JQ690373	0.003	0.004	0.002	0.004	0.004	0.002		99.6	99.6	99.4	98.4	98.5	98.4	98.5	98.3
8 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> KJ725082	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.004		99.8	99.8	98.6	98.7	98.7	98.7	98.6
9 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> MN227351	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002		99.7	98.4	98.4	98.4	98.4	98.2
10 瓶囊碘泡虫 <i>M. ampullicapsulatus</i> DQ339482	0.003	0.002	0.004	0.002	0.002	0.004	0.006	0.002	0.003		98.4	98.5	98.5	98.5	98.5
11 洪湖碘泡虫 <i>M. honghuensis</i> HM188545	0.016	0.016	0.017	0.016	0.016	0.017	0.018	0.016	0.018	0.016		99.9	99.8	99.9	99.9
12 洪湖碘泡虫 <i>M. honghuensis</i> KJ725074	0.015	0.014	0.016	0.014	0.014	0.016	0.016	0.014	0.016	0.015	0.002		100.0	100.0	100.0
13 洪湖碘泡虫 <i>M. honghuensis</i> MH329617	0.015	0.014	0.016	0.014	0.014	0.016	0.016	0.014	0.016	0.015	0.002	0.000		100.0	100.0
14 洪湖碘泡虫 <i>M. honghuensis</i> KR049222	0.015	0.014	0.016	0.014	0.014	0.016	0.016	0.014	0.016	0.015	0.002	0.000	0.000		100.0
15 洪湖碘泡虫 <i>M. honghuensis</i> JF340216	0.015	0.014	0.016	0.014	0.014	0.016	0.016	0.014	0.016	0.015	0.002	0.000	0.000	0.000	

**2.4 瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫的遗传变异比较**

本研究对瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫的 SSU rDNA 序列进行了系统比较。序列相似性对比结果显示, 瓶囊碘泡虫不同群体之间的序列相似性为 99.4%~99.9%, 洪湖碘泡虫不同群体之间的序列相似性为 99.8%~100.0%, 瓶囊碘泡虫与洪湖碘

泡虫之间的序列相似性为 98.2%~98.8%(表 1)。遗传距离对比结果显示, 瓶囊碘泡虫不同群体之间的遗传距离为 0.000~0.006, 洪湖碘泡虫不同群体之间的遗传距离为 0.000~0.002, 瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫之间的遗传距离为 0.014~0.018(表 1)。变异位点分析表明, 瓶囊碘泡虫不同群体之间存在

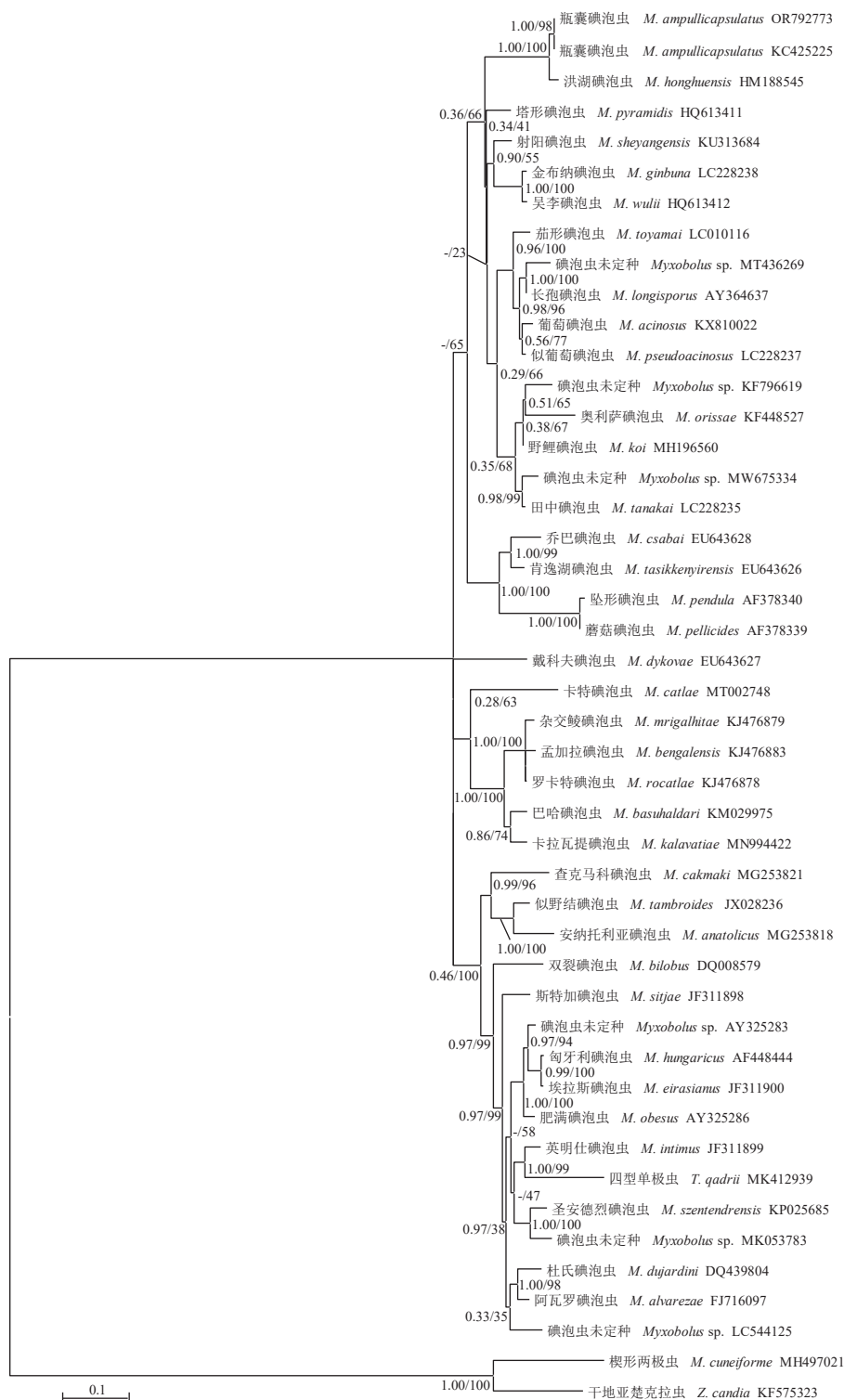


图 1 基于 SSU rDNA 序列构建的 BI/ML 系统发育树

分支点的支持值列为最大似然分析的贝叶斯后验概率/自举值。

Fig. 1 Phylogenetic tree generated by ML analysis of aligned partial SSU rDNA sequences of *M. ampullicapsulatus* and related species

Support values at branching points are listed as Bayesian posterior probabilities/bootstraps values from maximum likelihood analysis.

9 个变异位点, 洪湖碘泡虫不同群体之间存在 27 个变异位点 (图 2)。 27 个变异位点 (图 2)。  
10 个变异位点, 瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫之间存在

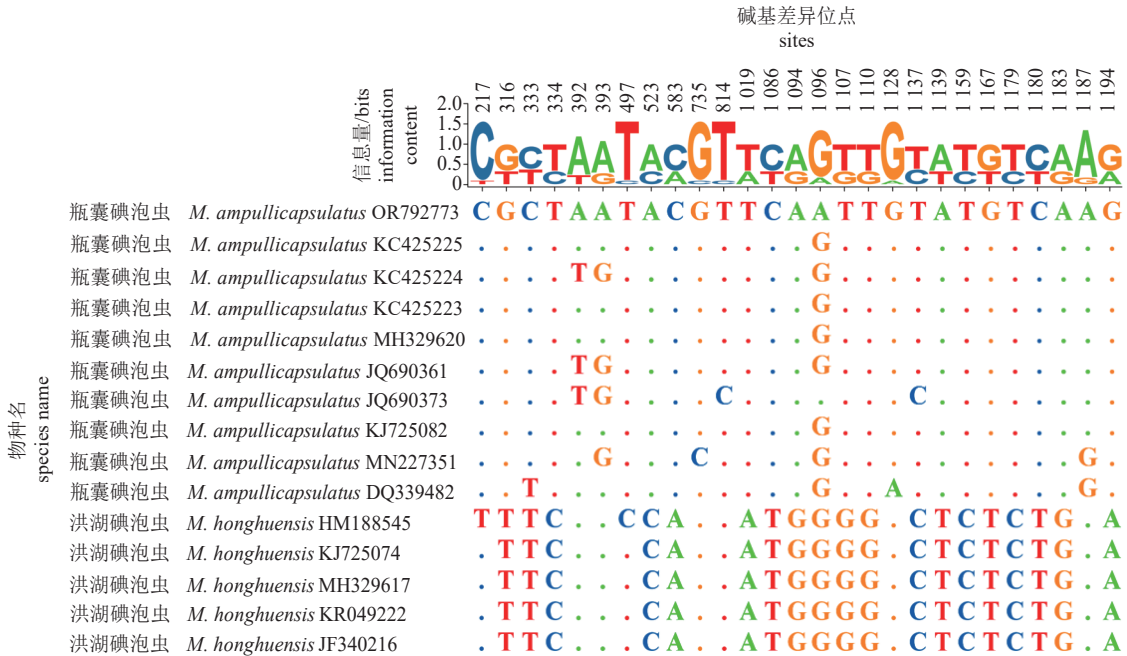


图 2 瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫 SSU rDNA 序列的核苷酸差异

标题中的数字表示不匹配位点的位置。

Fig. 2 Nucleotide differences in SSU rDNA sequences among different populations of *M. ampullicapsulatus* and *M. honghuensis*

Numbers in the header indicate unmatched site positions.

### 2.5 瓶囊碘泡虫与洪湖碘泡虫 V4 和 V7 区的二级结构比较

SSU rRNA 序列的二级结构比较结果显示, 瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫不同群体间在可变区 V4 和 V7 区的二级结构均无明显差异, 而物种间的二级结构存在明显差异。具体表现是, 在 V4 区的 E23-3 区段, 瓶囊碘泡虫的不同群体均具有两个侧突, 无内部环, 而洪湖碘泡虫不同群体均仅有一个侧突, 但有两个内部环; 在 V7 区的 E43-3 区段, 瓶囊碘泡虫的不同群体均具有一个由 8 个碱基组成的内部环, 而洪湖碘泡虫不同群体均具有一个由 10 个碱基组成的稍大的内部环 (8 bp vs. 10 bp); 此外, 在 V7 区的 E43-4 区段, 瓶囊碘泡虫不同群体均具有两个内部环, 而洪湖碘泡虫不同群体均只有一个内部环 (图 3)。

### 3 讨论

异育银鲫是我国重要的淡水养殖鱼类, 具有生长速率快、易饲养、适应能力与抗逆性强等优

点<sup>[34-35]</sup>。粘体动物是异育银鲫重要的寄生虫病原, 目前已报道寄生异育银鲫的粘体动物超过 50 种, 其中洪湖碘泡虫、武汉单极虫 (*Thelohanellus wuhanensis*)、吴李碘泡虫 (*M. wulii*) 分别是引起异育银鲫“喉孢子虫病”“肤孢子虫病”和“腹孢子虫病”的病原, 频繁引发异育银鲫的大量死亡, 给异育银鲫的养殖业造成了严重损失<sup>[36-38]</sup>。

近来, 本团队在开展异育银鲫寄生粘体动物多样性调查的过程中, 从异育银鲫鳃部分离到一种碘泡虫, 对其进行了物种鉴定。孢子形态特征比较发现, 本研究获得的碘泡虫与 Zhao 等<sup>[15]</sup>描述的瓶囊碘泡虫形态特征基本一致, 仅在两个极囊是否大小相等方面存在差异。在原始描述中, Zhao 等<sup>[15]</sup>描述瓶囊碘泡虫的 2 个极囊大小相等, 但是随后的多位学者以及本文作者均注意到瓶囊碘泡虫的 2 个极囊大小存在差异, 并将瓶囊碘泡虫描述为具有 2 个大小不等的极囊<sup>[16, 19-20, 38-39]</sup>(表 2)。分子序列分析发现, 分离的碘泡虫与瓶囊碘泡虫的 SSU rDNA 序列相似性为 99.5%~99.8%。形态特征比较和分子序列分析均表明, 本研究从异育





表 2 不同来源的瓶囊碘泡虫之间的形态学比较

**Tab. 2 Comparison of *M. ampullicapsulatus* described in the present study and in the literature**

物种名 species name	孢子形态 spore shape	孢子长/ $\mu\text{m}$ spore width	孢子宽/ $\mu\text{m}$ spore width	极囊长/ $\mu\text{m}$ polar capsule length	极囊宽/ $\mu\text{m}$ polar capsule width	极囊形状 polar capsule shape	寄生部位 site of infection	宿主 host	来源 source
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	16.5~19.5	8.5~10.0	7.0~10.0	2.5~4.0	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫 <i>C. auratus auratus</i>	[15]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	16.5~22.7	8.2~14.0	6.2~11.8	1.8~4.1	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	金鱼 <i>C. auratus auratus</i>	[19]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	18.4~20.4	8.0~11.6	8.8~14.4	3.2~4.4	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫 <i>C. auratus auratus</i>	[19]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	16.5~22.7	8.2~14.0	(I) 6.2~11.8 (II) 6.1~10.9	(I) 1.8~4.1 (II) 1.6~3.6	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫; 金鱼 <i>C. auratus auratus</i> ; <i>C. auratus auratus</i>	[38]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	16.5~19.5	8.5~10.0	7.5~10.0	3.0~4.0	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫 <i>C. auratus auratus</i>	[16]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	17.0~19.0	8.5~10.5	(I) 7.5~10.0 (II) 7.0~8.0	(I) 3.0~4.0 (II) 2.0~3.5	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫 <i>C. auratus auratus</i>	[16]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	17.7~19.5	8.0~9.6	(I) 8.7~11.0 (II) 8.5~10.6	(I) 2.7~3.6 (II) 2.7~3.6	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	[20]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	16.6~19.4	8.6~10.2	7.4~10.1	2.8~3.8	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫 <i>C. auratus auratus</i>	[39]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	17.1~19.0	8.3~10.3	(I) 7.3~9.8 (II) 6.8~7.9	(I) 2.8~3.9 (II) 2.3~3.4	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	鲫 <i>C. auratus auratus</i>	[39]
<i>M. ampullicapsulatus</i>	梨形 pyriform	17.3~19.6	7.4~9.9	(I) 6.4~9.7 (II) 5.3~8.9	(I) 2.1~3.3 (II) 2.0~3.3	瓶形 ampullaceous	鳃 gills	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	本研究 present research

注意: (I) 代表稍大的极囊, (II) 代表稍小的极囊。

Notes: (I) represents a slightly larger polar capsule, and (II) represents a slightly smaller polar capsule.

碱基变异位点作为区分瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫的分子依据, 其可靠性不足。

以往的研究表明, 微小动物 SSU rRNA 二级结构的 V4 和 V7 区域具有丰富的信息量和变异性, 对物种各阶元分类及演化分析具有重要的参考价值<sup>[30, 46]</sup>。本研究对瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫 SSU rRNA 的 V4 和 V7 区二级结构进行了比较分析, 发现瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫不同群体间的二级结构完全一致, 说明 SSU rRNA 序列的 V4 和 V7 区二级结构在这两种碘泡虫的不同群体间保守。同时, 本研究还发现瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫在 V4 和 V7 区二级结构上存在明显差异。可见, SSU rRNA 序列的 V4 和 V7 区二级结构可以作为有效鉴别瓶囊碘泡虫和洪湖碘泡虫的分子标记。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 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.
- [2] Okamura B, Hartigan A, Naldoni J. Extensive uncharted <https://www.china-fishery.cn>

biodiversity: the parasite dimension[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2018, 58(6): 1132-1145.

- [3] Eiras J C, Molnár K, Lu Y S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae)[J]. *Systematic Parasitology*, 2005, 61(1): 1-46.
- [4] Eiras J C, Zhang J Y, Molnár K. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2005 and 2013[J]. *Systematic Parasitology*, 2014, 88(1): 11-36.
- [5] Eiras J C, Cruz C F, Saraiva A, et al. Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporidia) described between 2014 and 2020[J]. *Folia Parasitologica*, 2021, 68: 012.
- [6] 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).
- [7] Zhang J Y, Yokoyama H, Wang J G, et al. Utilization of tissue habitats by *Myxobolus wulii* Landsberg & Lom, 1991 in different carp hosts and disease resistance in allogynogenetic gibel carp: redescription of *M. wulii* from China and Japan[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010,   
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- 33(1): 57-68.
- [ 8 ] 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).
- [ 9 ] Molnár K. Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development[J]. *Parasitologia Hungarica*, 1994, 27: 5-20.
- [10] Molnár K. Site preference of fish myxosporeans in the gill[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 48(3): 197-207.
- [11] Molnár K, Székely C. Tissue preference of some myxobolids (Myxozoa: Myxosporea) from the musculature of European freshwater fishes[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 107(3): 191-198.
- [12] Liu Y, Gu Z M, Luo Y L. Some additional data to the occurrence, morphology and validity of *Myxobolus turpisrotundus* Zhang, 2009 (Myxozoa: Myxosporea)[J]. *Parasitology Research*, 2010, 107(1): 67-73.
- [13] Zhang J Y, Wang J G, Li A H, *et al.* Infection of *Myxobolus turpisrotundus* sp. n. in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), with revision of *Myxobolus rotundus* (s. l. ) Nemeczek reported from *C. auratus auratus* (L. ) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(8): 625-638.
- [14] 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.
- [15] Zhao Y J, Sun C Y, Kent M L, *et al.* Description of a new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data[J]. *Journal of Parasitology*, 2008, 94(3): 737-742.
- [16] 张全中, 赵元蓉, 何根林. 瓶囊碘泡虫成熟孢子的显微及亚显微结构研究 [J]. *动物分类学报*, 2009, 34(3): 531-539.
- Zhang Q Z, Zhao Y J, He G L. The microscopic structure and ultrastructure observations of the mature spore for *Myxobolus ampullapsulatus* Zhao *et al.* , 2008 (Myxosporea, Myxobolidae)[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2009, 34(3): 531-539 (in Chinese).
- [17] Liu S Y, Luo L, Zuo F Y, *et al.* Immunosuppression and apoptosis activation mediated by p53-Bcl2/Bax signaling pathway -the potential mechanism of goldfish (*Carassius auratus Linnaeus*) gill disease caused by *Myxobolus ampullcapsulatus*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 998975.
- [18] Xi B W, Xie J, Zhou Q L, *et al.* Mass mortality of pond-reared *Carassius gibelio* caused by *Myxobolus ampullcapsulatus* in China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 93(3): 257-260.
- [19] Zhao Y J, Li N N, Tang F H, *et al.* Remarks on the validity of *Myxobolus ampullcapsulatus* and *Myxobolus honghuensis* (Myxozoa: Myxosporea) based on SSU *rDNA* sequences[J]. *Parasitology Research*, 2013, 112(11): 3817-3823.
- [20] 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).
- [21] 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.
- [22] Barta J R, Martin D S, Liberator P A, *et al.* Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences[J]. *The Journal of Parasitology*, 1997, 83(2): 262-271.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Nylander J A A, Ronquist F, Huelsenbeck J P, *et al.* Bayesian phylogenetic analysis of combined data[J]. *Systematic Biology*, 2004, 53(1): 47-67.
- [26] Minh B Q, Schmidt H A, Chernomor O, *et al.* IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(5): 1530-1534.

- [27] 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.
- [28] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [29] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [30] Holzer A S, Wootten R, Sommerville C. The secondary structure of the unusually long 18S ribosomal RNA of the myxozoan *Sphaerospora truttae* and structural evolutionary trends in the Myxozoa[J]. *International Journal for Parasitology*, 2007, 37(11): 1281-1295.
- [31] Gonzalez P, Labarère J. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains[J]. *Microbiology*, 2000, 146(1): 209-221.
- [32] Hong S G, Jung H S. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences[J]. *Mycologia*, 2004, 96(4): 742-755.
- [33] De Rijk P, Wuyts J, De Wachter R. RnaViz 2: An improved representation of RNA secondary structure[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(2): 299-300.
- [34] Gui J F, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 409-415.
- [35] Wang Z W, Zhu H P, Wang D, *et al.* A novel nucleocytoplasmic hybrid clone formed via androgenesis in polyploid gibel carp[J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4(1): 82.
- [36] 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.
- [37] Liu Y, Yuan J F, Jia L, *et al.* Supplemental description of *Thelohanellus wuhanensis* Xiao & Chen, 1993 (Myxozoa: Myxosporea) infecting the skin of *Carassius auratus gibelio* (Bloch): ultrastructural and histological data[J]. *Parasitology International*, 2014, 63(3): 489-491.
- [38] 董江丽. 4种粘孢子虫基于 28S 和 ITS-5.8S rDNA 的系统分类学研究 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2011.
- Dong J L. Phylogenetic analysis inferred from 28S Rdna and ITS-5.8S rDNA data on four species of myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea)[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2011 (in Chinese).
- [39] 张全中. 三种淡水鱼类寄生粘孢子虫的亚显微结构比较研究 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2009.
- Zhang Q Z. Comparative studies on ultrastructure of spores of three myxosporeans parasitic in freshwater fish[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2009 (in Chinese).
- [40] 陆宏达, 蔡水局, 竹攸汀, 等. 引起池养异育银鲫高死亡率的粘孢子虫新种咽碘泡虫形态和分子分析 [J]. *海洋渔业*, 2012, 34(4): 406-416.
- Lu H D, Cai S J, Zhu Y T, *et al.* Morphological and molecular analysis of *Myxobolus pharynae* n. sp. (Myxosporea) causing high mortality of *Carassius auratus gibelio* in pond aquaculture, China[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(4): 406-416 (in Chinese).
- [41] 郭睿, 张善露, 江小斌, 等. 金鱼 (*Carassius auratus*) 咽部寄生洪湖碘泡虫 (*Myxobolus honghuensis*) 的分子鉴定和系统发育分析 [J]. *渔业研究*, 2021, 43(1): 61-66.
- Guo R, Zhang S P, Jiang X B, *et al.* Molecular identification and phylogenetic analysis of *Myxobolus honghuensis* found in pharynx of goldfish *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2021, 43(1): 61-66 (in Chinese).
- [42] 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).
- [43] Whipps C M, Diggles B K. *Kudoa alliaris* in flesh of Argentinian hoki *Macruronus magellanicus* (Gadiformes; Merlucciidae)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006, 69(2-3): 259-263.
- [44] Easy R H, Johnson S C, Cone D K. Morphological and molecular comparison of *Myxobolus procerus* (Kudo, 1934) and *M. intramusculi* n. sp. (Myxozoa) parasitising muscles of the trout-perch *Percopsis omiscomaycus*[J]. *Systematic Parasitology*, 2005, 61(2): 115-122.

- [45] 冉佼, 杨承忠, 赵元著. 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] Zhang Y, Zhao Y J, Wang Q, *et al.* New comparative analysis based on the secondary structure of SSU-rRNA gene reveals the evolutionary trend and the family-genus characters of Mobilida (Ciliophora, Peritrichia)[J]. *Current Microbiology*, 2015, 71(2): 259-267.

## Redescription of *Myxobolus ampullicapsulatus* and comparison with molecular marker of *M. honghuensis*

ZHANG Xiaoyi<sup>1</sup>, DING Peng<sup>1</sup>, ZHANG Chenghao<sup>1</sup>, SUN Ronghua<sup>1</sup>,  
YANG Chengzhong<sup>2</sup>, LIU Yang<sup>1\*</sup>

(1. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences,  
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** To improve the taxonomic characteristics of *Myxobolus ampullicapsulatus* and clarify its relationship with of *M. honghuensis*, *M. ampullicapsulatus* was comprehensively redescribed by morphological, histological and molecular methods, and a systematic comparison was made with molecular marker of *M. honghuensis*. In the present study, *M. ampullicapsulatus* was characterized by round or oval, white plasmodia in gills of gibel carp *Carassius auratus gibelio*, measuring 1.2-1.4 mm in diameter. Myxospores were pear-shaped in front view with pointed anterior end and rounded posterior, measuring 17.3-19.6  $\mu\text{m}$  in length, 7.4-9.9  $\mu\text{m}$  in width. Two ampullaceous polar capsules were unequal in size, with the larger polar capsule measuring 6.4-9.7  $\mu\text{m} \times 2.1-3.3 \mu\text{m}$  and the smaller one 5.3-8.9  $\mu\text{m} \times 2.0-3.3 \mu\text{m}$ . Polar filament coiled 8-11 turns. Histological analysis demonstrated that *M. ampullicapsulatus* developed within stratified epithelium between adjacent gill lamellae. A BLAST search conducted in this study revealed a high degree of similarity, ranging from 99.5% to 99.8%, between the obtained small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequence and those of *M. ampullicapsulatus* in GenBank (KC425223-KC425225, MH329620, JQ690361, JQ690373, KJ725082, MN227351, DQ339482). Furthermore, phylogenetic analysis indicated that *M. ampullicapsulatus* was closely related to *M. honghuensis*, serving as its sister species. Upon comparing the SSU rDNA sequences of *M. ampullicapsulatus* and *M. honghuensis*, it was observed that they shared a sequence similarity of 98.2% to 98.8%, a genetic distance of 0.014 to 0.018, and 27 base differences. The analysis of SSU rRNA sequences revealed that the secondary structures of different populations of *M. ampullicapsulatus* and *M. honghuensis* were found to be consistent, and there are obvious differences in the secondary structure between the two species. Moreover, notable differences were observed in the secondary structures of these two *Myxobolus* species, suggesting that the SSU rRNA secondary structure is expected to serve as a molecular feature to differentiate *M. ampullicapsulatus* and *M. honghuensis*. In summary, this study enhances the understanding of the detailed infection site of *M. ampullicapsulatus* in gills, and proposes that the SSU rRNA secondary structure may be used as an effective molecular marker for distinguishing *M. ampullicapsulatus* and *M. honghuensis*.

**Key words:** Myxosporidia; small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA); secondary structure; phylogenetic analysis

**Corresponding author:** LIU Yang. E-mail: [liuyangqz@qau.edu.cn](mailto:liuyangqz@qau.edu.cn)

**Funding projects:** Nature Science Foundation of China (32073012)