

DOI: 10.12264/JFSC2021-0202

异育银鲫寄生洪湖碘泡虫的鱼卵传播途径

杨坤^{1,2}, 翟凯旋¹, 习丙文^{1,2}, 陈凯², 谢骏², 潘良坤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: 洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*)是引起异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)“喉孢子病”的重要病原, 每年导致养殖苗种和成鱼大量死亡。本研究通过隐性感染异育银鲫母本人工受精、实验室条件下受精卵孵化和幼鱼培育, 采用单管半巢式 PCR、荧光定量 PCR 和寡核苷酸荧光原位杂交等检测手段进行亲本、卵和幼鱼等环节的检测分析, 探究异育银鲫寄生洪湖碘泡虫是否存在经卵传播途径。结果表明, 所采用的 34 尾异育银鲫母本(A1~A22, B1~B12)的洪湖碘泡虫隐性感染率达 50%~75%, 其中, 卵和伪鳃检出率高于卵巢组织样品; 特异性寡核苷酸探针荧光原位杂交在隐性感染母本的卵巢、伪鳃、肾、脾组织检测到洪湖碘泡虫前孢子生成阶段营养体; 实验室条件下阳性母本所产的卵经孵化和培育出的幼鱼 15 dph 和 30 dph 样品可以检出阳性(A1、A18、B8 和 B9); 荧光原位杂交显示 15 dph 幼鱼在伪鳃、鳃和肾脏组织检测出阳性信号。本研究进一步揭示了异育银鲫寄生洪湖碘泡虫存在经鱼卵传播途径; 研究结果可为相关疾病制定防控措施奠定重要的理论基础。

关键词: 银鲫; 洪湖碘泡虫; 传播途径; PCR; 荧光原位杂交

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)12-1612-09

洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*)是当前异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)养殖中引起苗种和成鱼发生“喉孢子病”的重要寄生虫病原, 每年导致全国各地养殖异育银鲫大量死亡, 给水产养殖产业造成极大的经济损失^[1-2]。目前, 针对“喉孢子虫病”还没有确切有效的治疗药物^[3-4], 因此, 开展洪湖碘泡虫感染传播规律和致病机制研究, 将为制定疾病综合防控措施奠定重要理论基础。

黏孢子虫多数具有复杂的两替换宿主(two alternative-host)生活史^[5-6]。鱼类宿主感染黏孢子虫的传播途径主要通过无脊椎动物宿主释放的放射孢子虫以及部分类群中存在的鱼-鱼水平传播^[6]。国内研究人员在异育银鲫寄生的黏孢子虫生活史方面已经开展了大量研究, 先后发现和报道了 20

余种放射孢子虫^[7-12]; 然而, 截至目前仍没有发现洪湖碘泡虫的无脊椎动物宿主和放射孢子虫。在前期研究过程中, 作者团队通过 PCR 检测在发病池塘成鱼的卵巢中检测到很高的阳性率(40%)^[13], 并且在试验基地水泥池养殖异育银鲫自然繁殖幼鱼(2~3 cm)中发生了“喉孢子病”。基于这些发现, 作者推测洪湖碘泡虫在养殖异育银鲫中可能存在垂直传播。为了验证该推测, 本研究采用单管半巢式 PCR、荧光定量 PCR 和寡核苷酸荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)等检测手段, 分析隐性感染异育银鲫母本在人工受精、实验室条件下孵化, 培育幼鱼中洪湖碘泡虫感染情况。相关研究结果将为进一步研究洪湖碘泡虫的致病机制, 寻找疾病早期防治手段等提供一定的理论依据。

收稿日期: 2021-05-10; 修订日期: 2021-05-24.

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

作者简介: 杨坤(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类寄生虫. E-mail: 764513834@qq.com

通信作者: 习丙文, 研究员, 研究方向为水生动物寄生虫病与防治. E-mail: xibw@ffrc.cn

1 材料与方法

1.1 异育银鲫人工繁殖

在 2020 年 4—5 月, 分 2 批从中国水产科学院淡水渔业研究中心南泉试验基地鲫鱼养殖池塘(前期检测群体中存在洪湖碘泡虫隐性感染)随机挑选 22 尾和 12 尾性成熟异育银鲫(体重 150~250 g)作为母本, 以建鲤(*Cyprinus carpio*, 体重 1~1.5 kg)作为父本, 人工注射催产素, 开展人工授精和孵化。

待雌鱼排卵后, 逐条擦干体表, 用手挤压鱼体腹腔, 将卵挤至一次性塑料容器中; 部分卵收集到 50 mL 离心管中保存留待后续 PCR 检测。随后立即将建鲤精液挤入容器中; 加入曝气自来水快速搅拌均匀, 使卵受精。将受精卵均匀撒到棕片上, 挂入室内控温循环水养殖桶中的 80 目网箱中孵化和培育; 水体保持溶氧>6 mg/L、水温(23±1) °C。每尾亲本的受精卵分别置于单独的网箱。取异育银鲫母本分别解剖其伪鳃、卵巢和建鲤精液等留做后续检测。

1.2 受精卵孵化及饲养管理

受精卵孵化过程中, 每隔 6 h 采集部分受精卵于解剖镜下观察其发育进程。待仔鱼孵化后, 投喂蛋黄 1 周, 每天 4 次。1 周后投喂丰年虫(由本实验室自行孵化)及商品开口料, 每天 3 次。每周对养殖桶定期清污, 养殖全程所用工具均严格消毒处理。

1.3 样品采集及 PCR 检测

分别采集异育银鲫母本的伪鳃、卵巢, 孵化后 3 d、15 d 及 30 d 孢子代幼鱼, 组织及幼鱼样品均采集 2 份, 分别置于-80 °C 冰箱中保存用于 PCR 检测以及 4% 多聚甲醛固定液中保存用于组织切片和荧光原位杂交检测。

1.3.1 样品 DNA 提取 洪湖碘泡虫 DNA 提取: 本研究所用洪湖碘泡虫对照样品由本实验室-80 °C 冷冻保存。将洪湖碘泡虫胞囊样品解冻后按照 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(生工)说明书步骤提取虫体 DNA, 获得的 DNA 保存于-20 °C 冰箱中, 作为 PCR 阳性对照备用。

母本组织 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, 使用电动研磨器匀浆, 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基因组 DNA, 保存于-20 °C 备用。

卵及幼鱼 DNA 提取: 卵及孵化后 3 d 的幼鱼, 均整体进行匀浆; 孵化后 15 d、30 d 幼鱼各取 15 尾在解剖镜下取伪鳃、卵巢、脾、肾组织, 每 5 尾的组织混合为 1 个样品进行匀浆。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基因组 DNA, 保存于-20 °C 备用。

1.3.2 单管半巢式 PCR 检测 单管半巢式 PCR (singal-tube semi-nested PCR) 检测参考前期研究所建立的方法^[7], 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 扩增结束后, 使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 统计各组织/幼鱼洪湖碘泡虫阳性检出情况, 阳性 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。测序获得片段经 NCBI 数据库 BLAST 比对分析。每个样品检测分别重复 3 次。

表 1 单管半巢式 PCR 引物设计

Tab. 1 Single tube semi-nested PCR primer design

引物 primer	名称 code	序列 sequence (5'-3')	T _m /°C
上游 forward	Myh_1176F	GTTGGTCCCCCTGGAAACC	61.91
下游 reverse	Myh_1618R	TCCATGAGGCAGCGTAAAGG	57.75
下游 reverse	Mh-in-r	AGCGAGCCCAGAATGCTAC	57.97

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 荧光定量 PCR 检测采用洪湖碘泡虫特异性引物 Mh-in-F/R, 并以鲫管家基因 β -actin 作为内参(引物信息见表 2)。采用 20 μ L 反应体系, 包括: TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L, 引物正向 0.8 μ L, 引物反向 0.8 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 6 μ L。反应程序为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 3 s, 60 °C 退火 34 s, 40 个循环; 熔解曲线设置为 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。

表 2 荧光定量 PCR 检测引物

Tab. 2 Real time-PCR primer design

引物 primer	名称 code	序列 sequence (5'-3')	T _m /°C
上游 forward	β -actin-F	CTCCCCCTCAATCCCAAAGCCAA	62.56
下游 reverse	β -actin-R	ACACCATCACCAAGATCCATCA	59.42
上游 forward	Mh-in-F	GTCCGGACATCGAAAGGAT	54.50
下游 reverse	Mh-in-r	AGCGAGCCCAGAATGCTAC	57.97

对第二批异育银鲫母本各组织及子代幼鱼样品进行重复检测验证。每个样品检测分别重复 3 次, 记录统计各组织/幼鱼的洪湖碘泡虫阳性率。

1.4 寡核苷酸探针荧光原位杂交(FISH)检测

1.4.1 洪湖碘泡虫特异性寡核苷酸探针设计 根据银鲫常见感染的洪湖碘泡虫、瓶囊碘泡虫(*Myxobolus ampullicapsulatus*)、武汉单极虫(*The-lohanellus wuhanensis*)、吴李碘泡虫(*M. wulii*)、茄

形碘泡虫(*M. toyamai*)、长孢碘泡虫(*M. longisporus*)、塔形碘泡虫(*M. pyramidis*)、培养碘泡虫(*M. cultus*)以及宿主异育银鲫的 18S rDNA 序列进行比对分析(Clustal X 软件), 选取洪湖碘泡虫高度特异性区域设计 DNA 探针(图 1): 5'-FAM-TCATAAACATTACACCCCTGAGCGAGCCCAGA ATGCTACTTTATG-3', 长度为 45 bp, 由上海生工技术有限公司合成。

MH329617_My_honghuensis	TGAATTTCATAAAAGTAGCATTCTGGGCTCGCTCAGGGTGTAAATGTTATGAGGGATAT	1380
KC425225_My_ampullicapsulatus	GAATTTTATAAAAGGAGCATCTGGGCTCAACTCAGGGTGTGAATGTTATGAAAGGGATAT	1380
JQ968687_TheL_wuhanensis	TGTAGGTGGATTATGCCTTGCAATTGTCAAGAGCTTGGGTCAAACCTGAGGTTTGATG	1380
EF690300_My_wulii	GTAAATTCTCCATGGAAGGGTGTGAGGGGCAACCTGAGGTATTGACTGTGGAAAGGAGAT	1380
FJ710802_My_toyamai	TTAAATTCTCATGGATGTAGTACAGGAGGTTGCTGCCAAGTGTGCTGCATTTGTGAAGGAGA	1380
AY364637_My_longisporus	ATTGTTAAATTCCATGGGTGTAAATGCAGGAGGTTGCCGAATGTGTGTCATCTATGAAAG	1380
HQ613411_My_pyramidis	TGTAAATTTCGTGGTGGATGCGGAGGGCAACCTGACGTGTCATTTGCGAAAGGAGA	1380
HQ613409_My_cultus	GCAGAATTTCGACAAACGATTGCTGGCATGGTAAACATGTCAGTATAATGTTCTTGAGA	1380
EF189737_Car_gibelio	CTCGCGTTGATTAAAGTCCCTGCCCTTGACACACCCTCGCTACTACCGATTGGAT	1380

图 1 洪湖碘泡虫与常见黏孢子虫和宿主异育银鲫 18S rDNA 序列片段比对及探针设计位点

Fig. 1 Alignment between the SSU 18S rDNA sequences of *Myxobolus honghuensis* and other myxosporeans and fish host *Carassius auratus gibelio*

1.4.2 荧光原位杂交 根据单管半巢式 PCR 检测结果, 挑取阳性母本组织及子代幼鱼, 进行荧光原位杂交检测, 分析洪湖碘泡虫在异育银鲫卵巢及孵化幼鱼中的组织分布。

荧光原位杂交的实验流程: 将固定在 4% 多聚甲醛中的组织/幼鱼取出, 制作组织切片, 无需染色, 常规脱蜡至水洗。切片使用 30% H₂O₂ 和纯甲醇混合液(1:9, 体积比)室温处理 10 min, 之后用 DEPC 水洗 3 次; 处理后的切片置于湿盒(内含 35 mL 5×SSC 和 35 mL 甲酰胺)中, 常温反应 15 min, 之后用 DEPC 水洗 2 次; 滴加蛋白酶 K 覆盖组织, 放入湿盒, 在分子杂交仪中 37 °C 下反应 20 min; 用 0.2% 甘氨酸洗液洗 1 min, 终止反应。生理盐水(PBS)洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定组织 10 min, PBS 洗 3 次, 乙酸酐洗 2 次, 每次 5 min, PBS 洗 5 次; 用 5×SSC 溶液洗 2 次后, 将切片放入湿盒内, 用预杂交液覆盖组织, 65 °C 下预杂交 1 h。取出湿盒, 向切片滴加探针, 覆盖组织, 65 °C 杂交 48 h; 杂交结束后, 用 2×SSC 溶液洗 1 次, 甲酰胺和 4×SSC 混合液(1:1, 体积比)在 65 °C 烘箱中洗 3 次, 每次 20 min, 取出后用 PBS 洗 5 次; 将 DAPI 染液用 DEPC 水稀释 1000 倍, 滴加到组织

上染色 5 min; 用 PBS 洗 3 次后, 滴加防淬灭剂, 用指甲油封片。制备好的杂交玻片在 LEICA DM2500 荧光显微镜下观察并采集图像。

2 结果与分析

2.1 建鲤精液和异育银鲫母本伪鳃、卵巢、未受精卵的 PCR 检测结果

本研究所用的到建鲤精液的单管半巢式 PCR 检测都为阴性; 分别采集了 34 尾异育银鲫母本的伪鳃、卵巢和未受精卵, 其中, 第一批和第二批各 22 尾和 12 尾(A1~A22, B1~B12, 表 3, 表 4)。单管半巢式 PCR 检测结果显示, 第一批母本伪鳃、卵巢和未受精卵阳性总检出率 50% (11/22, 表 3), 其中, 卵巢样本检测都为阴性, 伪鳃样本阳性率较高达 36.4% (8/22, A6、A8、A10、A13、A16、A17、A18 和 A20), 卵的阳性率为 27.3% (6/22, A1、A9、A16、A17、A19 和 A20); 伪鳃样本检出率高于卵和卵巢。第二批母本样品采用单管半巢式 PCR 和荧光定量 PCR 两种检测方法分析, 其中荧光定量 PCR 的灵敏度和阳性检出率高于单管半巢式 PCR。尤其卵巢样品中, 单管半巢式 PCR 法未检出; 然而, 荧光定量 PCR 的检出率达

50%。第二批母本伪鳃、卵巢、卵样品基于荧光定量 PCR 的总阳性检出率达 75% (9/12, B1、B2、B3、B6、B7、B8、B9、B10、B12)。阳性样本 PCR 产物测序获得的序列与洪湖碘泡虫 (MH329617) 完全一致。

2.2 感染异育银鲫母本组织荧光原位杂交

选取 PCR 检测阳性的异育银鲫母本的卵巢、伪鳃、体肾、脾组织进行制备切片和荧光原位杂

交检测。原位杂交检测结果显示，在异育银鲫的卵巢结缔组织中可观察到大量绿色荧光信号(图 2A)，在伪鳃的鳃丝周边结缔组织可观察到绿色荧光信号分布(图 2B)，在体肾拟淋巴组织附近分布有少量绿色荧光信号(图 2C)，在脾脏中也可观察到绿色荧光信号分布(图 2D)。检测结果表明，在异育银鲫卵巢、伪鳃、体肾及脾脏等组织中均有洪湖碘泡虫的前孢子生成细胞(营养体)存在。

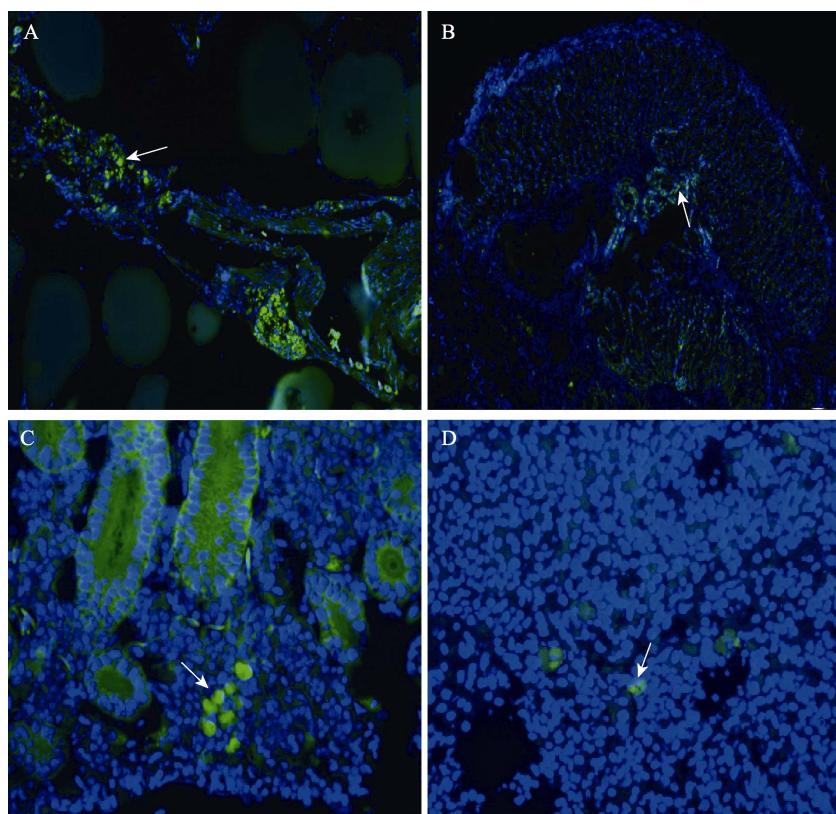


图 2 洪湖碘泡虫感染异育银鲫组织切片荧光原位杂交(绿色为荧光探针, 蓝色为 DAPI 染色)

A: 母本卵巢中的洪湖碘泡虫营养体(箭头); B: 母本伪鳃中的洪湖碘泡虫营养体(箭头);
C: 母本体肾中的洪湖碘泡虫营养体(箭头); D: 母本脾脏中的洪湖碘泡虫营养体(箭头)。

Fig. 2 In situ hybridized sections of *Myxobolus honghuensis* in infected tissues of *Carassius auratus gibelio*
(Green is fluorescent probe and blue is DAPI staining)

A: *M. honghuensis* trophozoite in ovary of broodfish (arrow); B: *M. honghuensis* trophozoite in pseudobranch of broodfish (arrow);
C: *M. honghuensis* trophozoite in kindeny tissue of broodfish (arrow); D: *M. honghuensis* trophozoite in spleen of broodfish (arrow).

2.3 孵化幼鱼 PCR 检测

室内循环水孵化的异育银鲫幼鱼 3 d、15 d 及 30 d 样品的单管半巢式 PCR 检测结果显示，第一批母本孵化幼鱼对应的 A1 母本所产卵孵化出 30 d 幼鱼(30 dph)和 A18 的 15 dph 样品检出洪湖碘泡虫阳性，其余幼鱼检测结果均为阴性(表 3)。

第二批母本孵化幼鱼分别采用单管半巢式 PCR 和荧光定量 PCR 两种检测方法分析(表 4)。孵化出 3 天幼鱼都未检出阳性。母本 B8 所产卵孵化出幼鱼 15 dph 样品单管半巢式和荧光定量 PCR 都检出阳性。母本 B9 所产幼鱼 30 dph 样品荧光定量 PCR 检出阳性。母本 B10 所产幼鱼

表 3 单管半巢式 PCR 第一批幼鱼洪湖碘泡虫检测结果
Tab. 3 Detection results of the first batch of fish fry by single-tube semi-nested PCR

n=15

母本编号 fish-code	伪鳃 pseudo- branch	卵巢 ovary	未受 精卵 oocyte	3 dph	15 dph	30 dph	母本编号 fish-code	伪鳃 pseudo- branch	卵巢 ovary	未受 精卵 oocyte	3 dph	15 dph	30 dph
A1	-	-	+	-	-	+	A12	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	A13	+	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	A14	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	A15	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-	A16	+	-	+	-	-	-
A6	+	-	-	-	-	-	A17	+	-	+	-	-	-
A7	-	-	-	-	-	-	A18	+	-	-	-	+	-
A8	+	-	-	-	-	-	A19	-	-	+	-	-	-
A9	-	-	+	-	-	-	A20	+	-	+	-	-	-
A10	+	-	-	-	-	-	A21	-	-	-	-	-	-
A11	-	-	-	-	-	-	A22	-	-	-	-	-	-

注: “+”表示阳性结果; “-”表示阴性结果。

Note: “+” represents positive result; “-” represents negative result.

表 4 第二批幼鱼洪湖碘泡虫检测结果
Tab. 4 Detection results of the second batch of fish fry

n=15

母本编号 fish-code	伪鳃 pseudobranch		卵巢 ovary		未受精卵 oocyte		3 dph		15 dph		30 dph	
	semi-nested PCR	real-time PCR										
B1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B8	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
B9	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
B10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
B11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

注: “+”表示阳性结果; “-”表示阴性结果。

Note: “+” represents positive result; “-” represents negative result.

15 dph 样品荧光定量 PCR 检出阳性。

2.4 孵化幼鱼荧光原位杂交检测

孵化 3 d 幼鱼样品 PCR 没有检出阳性, 因此, 选取了 PCR 阳性实验组的 15 d 幼鱼进行整条鱼的组织切片和荧光原位杂交检测。如图 3 所示, 在

孵化 15 d 幼鱼鳃部的鳃丝和前面的伪鳃组织中有较为集中的绿色荧光信号(图 3A), 肾及体肾组织中也检测到有阳性信号(图 3B)。原位杂交结果表明, 孵化 15 d 后的异育银鲫幼鱼在鳃、伪鳃和肾脏组织出现疑似洪湖碘泡虫营养体感染分布。

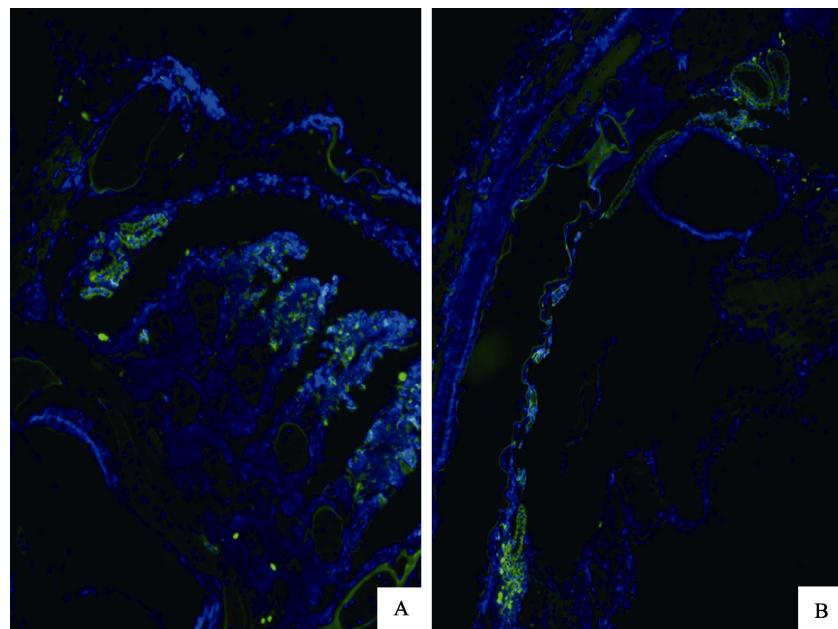


图 3 孵化 15 d 异育银鲫幼鱼整鱼组织切片原位杂交检测

A: 幼鱼鳃及伪鳃中的洪湖碘泡虫营养体(箭头, $\times 40$); B: 幼鱼头肾及体肾中的洪湖碘泡虫营养体(箭头, $\times 100$).
绿色为荧光探针, 蓝色为 DAPI 染色.

Fig. 3 In situ hybridized sections of infected *Carassius auratus gibelio* fry 15 d post hatching (A, $\times 40$; B, $\times 100$)
A: *M. honghuensis* trophozoite in gill and pseudobranch of infected fry (arrow);
B: *M. honghuensis* trophozoite in head kidney and kidney of infected fry (arrow).

3 讨论

异育银鲫寄生洪湖碘泡虫的完整生活史和鱼体感染传播途径等问题受到了广泛关注。尽管罗丹等^[14]通过荧光定量 PCR 在池塘水体中检测到洪湖碘泡虫 DNA, 但是前期大量的疫区养殖池塘调查采样都没有发现其对应的放射孢子虫^[15]。根据前期流行病学研究基础, 本课题组推测洪湖碘泡虫除可能的放射孢子虫感染途径外, 也许还存在随鱼卵传播途径。目前, 世界范围内报道的、可寄生在鱼类卵细胞内的黏孢子虫种类 17 种以上, 如 *Sphaerospora plagiognathopis*^[16]、*Myxobolus dahomeyensis*^[17]、*M. testicularis*^[15]、*Kudoa ovivora*^[18] 及 *K. azevedoi*^[19] 等。然而, 黏孢子虫是否可以随宿主鱼卵传播一直没有相关的报道^[20]。本研究通过 PCR 和荧光原位杂交检测, 在隐性感染异育银鲫母本卵巢、卵及实验室条件下繁育子代幼鱼中均检出洪湖碘泡虫, 提示异育银鲫寄生洪湖碘泡虫应该存在经鱼卵传播途径。本研究结果进一步支持 Wang 等^[21]发现洪湖碘泡虫可通过感

染异育银鲫母本直接传染幼鱼的结论。

核苷酸探针荧光标记原位杂交被广泛应用于细胞生物学和病原生物学研究相关领域^[21-25]。Dubuffet 等^[22]采用 RNA 探针揭示了微孢子虫 *Nosema granulosis* 和 *Dictyocoela duebeni* 在宿主钩虾(*Gammarus duebeni*)卵巢分布和垂直传播。Holzer 等^[23]、Bjork 等^[24]和 Markussen 等^[25]分别利用原位杂交分别研究了苔藓鲑四囊虫(*Tetra capsuloides bryosalmonae*)、角形虫(*Ceratomyxa shasta*)、伪鳃小囊虫(*Parvicapsula pseudobranchicola*)等在鲑鳟宿主体内组织分布和迁移路径。本研究采用荧光原位杂交直观地检测出 PCR 阳性样品的母本卵巢和幼鱼组织器官中洪湖碘泡虫分布。在卵样本检测中发现, 多聚甲醛固定后的卵黄颗粒也呈现很强的荧光信息, 由于当前采用的检测方法暂时无法确定是否为假阳性。因此, 洪湖碘泡虫在卵中的定位检测有待后续技术优化。

本研究所采用的荧光定量 PCR 检测的灵敏度优于单管半巢式 PCR, 更适用于没有临床症状的洪湖碘泡虫隐性感染亲本和苗种检测。在研究所

分析的卵巢样品中, 单管半巢式 PCR 法都未检出, 荧光定量 PCR 的检出率达 50%; 此外, 荧光定量 PCR 检测的伪鳃、卵巢、卵的结果呈现较好的吻合度。在检出阳性的异育银鲫卵巢样本中, 荧光定量 PCR 的 C_t 值普遍较高(30~34), 可能卵巢组织成分复杂造成洪湖碘泡虫 DNA 相对含量低于单管半巢式 PCR 检测阈值。

在异育银鲫阳性母本所产幼鱼检测中仅有部分网箱样品检出阳性(A1、A18、B8 和 B9), 低于母本感染率(50%~75%)。在 A1 和 B9 母本网箱幼鱼中仅在 30 dph 样本中检测出洪湖碘泡虫感染, 3 dph 和 15 dph 样本都未检测出; 在 A18 和 B9 母本网箱幼鱼中仅在 15 dph 样本中检出阳性, 3 dph 和 30 dph 样本都未检出。幼鱼感染检出率低于母本以及幼鱼孵化不同天数样本感染检出差异现象, 可能由于洪湖碘泡虫在幼鱼体内没有快速大量增殖, 生物量低于当前检测技术阈值, 或者洪湖碘泡虫对于卵巢中卵的感染不是均匀分布, 幼鱼中不是所有个体都携带有洪湖碘泡虫。关于这一疑问, 有待洪湖碘泡虫随卵传播机制的进一步研究。

本研究所用的异育银鲫母本 PCR 检出有很高的洪湖碘泡虫感染率, 并且在前期养殖过程中没有明显的临床症状。虽然, 当前研究无法判断这些阳性母本是由于近期感染还是前期携带, 但是洪湖碘泡虫存在经鱼卵传播的研究结果表明异育银鲫苗种生产必须重视亲本的病原检验检疫。此外, 隐性感染洪湖碘泡虫在国内异育银鲫不同种群分布情况以及隐性感染在鱼可持续多长时间等问题也有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Xi B W, Xie J, Zhou Q L, et al. Mass mortality of pond-reared *Carassius gibelio* caused by *Myxobolus ampullicapsulatus* in China[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 93: 257-260.
- [2] Zhao Y L, Liu X H, Sato H, et al. RNA-seq analysis of local tissue of *Carassius auratus gibelio* with pharyngeal myxosporidiosis: Insights into the pharyngeal mucosal immune response in a fish-parasite dialogue[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 99-112.
- [3] Li Z W, Lu H D, Cao G P, et al. Histopathology and pathophysiology of *Carassius auratus gibelio* infected by *Myxo-*
- bolus pharynae*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1339-1350. [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.]
- [4] Ma Y, Zhou J X, Wang H, et al. Investigation report of *Carassius auratus gibelio* "Zhongke 3" myxosporiasis in Jilin province[J]. Scientific Fish Farming, 2015(12): 84-85. [马悦, 周井祥, 王好, 等. 吉林省异育银鲫“中科 3 号”黏孢子虫病调查报告[J]. 科学养鱼, 2015(12): 84-85.]
- [5] Wu Y S, Xiao W H, Wang J G, et al. A review of the life cycle of Myxosporean[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(2): 182-189. [吴英松, 肖武汉, 汪建国, 等. 黏孢子虫生活史的研究进展[J]. 水生生物学报, 2000, 24(2): 182-189.]
- [6] Zhao D D. Life cycle of several freshwater myxozoans and taxonomy of actinosporidian collective groups[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017. [赵丹丹. 几种淡水黏体动物的生活史及其放射孢子虫集合群的分类学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.]
- [7] Xi B W, Li P, Liu Q C, et al. Description of a new *Neactinomyxum* type actinosporidian from the oligochaete *Branchiura sowerbyi* Beddard[J]. Systematic Parasitology, 2017, 94(1): 73-80.
- [8] Xi B W, Zhou Z G, Xie J, et al. Morphological and molecular characterization of actinosporians infecting oligochaete *Branchiura sowerbyi* from Chinese carp ponds. [J]. Diseases of Aquatic Organisms. 2015, 114(3): 217-228.
- [9] Sun H W, Xi B W, Xie J, et al. Morphological characters and DNA identification of a new actinosporidian type *Guyenotia CZ* collected from oligochaete *Branchiura sowerbyi*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1179-1184. [孙海伟, 习丙文, 谢骏, 等. 一种 *Guyenotia* 放射孢子虫的形态和分子序列特征[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1179-1184.]
- [10] Gu W, Xi B W, Xie J, et al. Morphological characterization of a novel *Echinactinomyxon* type collected from *Branchiura sowerbyi*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 218-223. [顾伟, 习丙文, 谢骏, 等. 苏氏尾鳃蚓寄生放射孢子虫的形态描述[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 218-223.]
- [11] Xi B W, Zhang J Y, Xie J, et al. Three actinosporidian types (Myxozoa) from the oligochaete *Branchiura sowerbyi* in China[J]. Parasitology Research, 2013, 112(4): 1575-1582.
- [12] Wang G T, Yao W J. First report of the actinosporidian in Oligochaetes in China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(2): 198-200. [王桂堂, 姚卫建. 放射孢子虫在中国的首次发现[J]. 水生生物学报, 2000, 24(2): 198-200.]
- [13] 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. [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.]
- [14] Luo D, Zhao Y L, Liu X H, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Myxobolus honghuensis* and its application[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(2): 268-274. [罗丹, 赵媛莉, 刘新华, 等. 洪湖碘泡虫 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 268-274.]
- [15] Tajdari J, Matos E, Mendonça I, et al. Ultrastructural morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n., parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil[J]. Acta Protozoologica, 2005, 44(4): 377-384.
- [16] Chen Q L, Xie X R. A new genus and two new species of family Myxoboliidae from freshwater fishes of China (Myxosporidia: Myxobolidae)[J]. Zoological Systematics, 1984, 9(2): 3-7. [陈启鑑, 谢杏人. 中国淡水鱼类寄生黏孢子虫碘泡科一新属及二新种[J]. 动物分类学报, 1984, 9(2): 3-7.]
- [17] Grankoto A, Pampoulie C, Marques A, et al. *Myxobolus dahomeyensis* infection in ovaries of Tilapia species from Benin (West Africa)[J]. Journal of Fish Biology, 2010, 58(3): 883-886.
- [18] Sweare S E, Robertson D R. Life History, Pathology, and Description of *Kudoa ovivora* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea): An Ovarian Parasite of Caribbean Labroid Fishes[J]. The Journal of Parasitology, 1999, 85(2): 337-353.
- [19] Mansour L, Thabet A, Chourabi K, et al. *Kudoa azevedoi* n. sp. (Myxozoa, Multivalvulida) from the oocytes of the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* (Perciformes, Carangidae) in Tunisian coasts[J]. Parasitology Research, 2013, 112(4): 1737-1747.
- [20] Sitjà-Bobadilla A. Can Myxosporean parasites compromise fish and amphibian reproduction?[J]. Proceedings Biological Sciences The Royal Society, 2009, 276: 2861-2870.
- [21] Wang S, Zhang B, Guo Q, et al. Molecular and light microscopy evidence for the transfer of *Myxobolus honghuensis* from *Carassius auratus gibelio* broodfish to progeny[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(10): 1177-1184.
- [22] Dubuffet A, Smith J E, Solter L, et al. Specific detection and localization of microsporidian parasites in invertebrate hosts by using in situ hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 385-388.
- [23] Holzer A S, Sommerville C, Wootten R. Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed *Salmo trutta* L. [J]. Parasitology, 2006, 132(2): 193-205.
- [24] Bjork S J, Bartholomew J L. Invasion of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) and comparison of migration to the intestine between susceptible and resistant fish hosts[J]. International Journal for Parasitology, 2010, 40(9): 1087-1095.
- [25] Markussen T, Agusti C, Karlsbakk E, et al. Detection of the myxosporean parasite *Parvicapsula pseudobranchicola* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using in situ hybridization (ISH)[J]. Parasites & Vectors, 2015, 8(105): 1-6.

Transovarial transmission of *Myxobolus honghuensis* in gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch)

YANG Kun^{1,2}, ZHAI Kaixuan¹, XI Bingwen^{1,2}, CHEN Kai², XIE Jun², PAN Liangkun²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: *Myxobolus honghuensis* is a parasitic pathogen that causes pharyngeal myxosporidiosis. The infection often results in massive mortality in cultured gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch). Currently, there is no effective drug for treating pharyngeal myxosporidiosis. Most myxosporeans have a complex life history involving two alternative hosts. Myxosporean infection in fish hosts occurs primarily through the horizontal transmission of actinosporean released by invertebrate hosts. Domestic researchers have performed many studies on the life history of myxosporea parasitized by *C. auratus gibelio*. Approximately 20 species of actinosporean have been discovered and reported. However, no invertebrate host and actinosporean have been found in *M. honghuensis*. In this study, gibel carp larvae were obtained by artificial insemination, hatched, and nursed in an indoor water circulation system with tap water at a temperature of (23±1) °C. Single tube semi-nested PCR, fluorescence quantitative PCR, and oligonucleotide fluorescence in situ hybridization (FISH) were used to detect *M. honghuensis* infection in brood stock tissues, eggs, and larvae. The covet infection rate of *M. honghuensis* in the 34 gibel carp females used in this study (A1–A22, B1–B12) was 50% to 75%. The positive infection rate in eggs and pseudobranch was higher than that in ovarian tissue samples. The pre-sporogenic stage of *M. honghuensis* was detected in the ovary, pseudobranch, kidney, and spleen of gibel carp. The 15 and 30 days post-hatch samples of gibel carp larvae (A1, A8, B8, and B9) obtained from infected females and completely cultured indoors were positive for *M. honghuensis* infection. The presence of *M. honghuensis* in the pseudobranch, gill, and kidney tissues of 15 days post-hatch larva was confirmed via FISH. The collective results reveal transovarian transmission of *M. honghuensis* in gibel carp.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *Myxobolus honghuensis*; transmission; PCR; FISH

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