

DOI: 10.12264/JFSC2023-0069

寄生部位分化对吉陶单极虫种群分化的影响

沈宇航^{1, 2, 3, 4}, 张波^{1, 2, 3, 4}, 涂笑^{1, 2, 3, 4}, 顾泽茂^{1, 2, 3, 4}

1. 华中农业大学水产学院, 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;
3. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 湖北 武汉 430070;
4. 农业农村部水生动物疫病专业实验室(华中农业大学), 湖北 武汉 430070

摘要: 为探究寄生部位分化对黏孢子虫种群分化的影响, 以吉陶单极虫(*Thelohanellus kitauei*)为例, 研究了寄生于鲤(*Cyprinus carpio*)皮肤和肠道的吉陶单极虫的形态、寄生特征和分子遗传信息。寄生皮肤的吉陶单极虫(S型)形成单个明显孢囊, 直径约2.1 cm, 寄生肠道的吉陶单极虫(I型)形成多个(16个)孢囊, 直径0.21~0.82 cm; 孢子形态特征相比, S型和I型孢子鞘膜宽差异不显著($P>0.05$), 但孢子厚差异显著($P<0.01$), 孢子长、极囊长、鞘膜长、孢子宽和极囊宽呈现极显著差异($P<0.001$); 组织病理结果显示, 二者均寄生于结缔组织中, 引起淋巴细胞浸润、组织增生等炎症反应, 但S型孢子主要分散在真皮疏松层, 部分孢子侵入致密层, 造成结缔组织弯曲、变形, 而I型孢子主要分散在肠黏膜下层上方, 挤压并导致肠绒毛萎缩; 分子序列比对发现, S型和I型的SSU rDNA序列相似度较高, 为99.7%, 具有4个差异位点, ITS-5.8S rDNA序列间相似度较低, 仅97.3%, 共有20个差异位点。基于SSU rDNA和ITS-5.8S rDNA序列构建的系统进化树显示, S型和I型于吉陶单极虫支系内部各自聚类, 表明相同寄生部位的吉陶单极虫具有更近的亲缘关系。综上所述, 寄生不同部位的吉陶单极虫在形态、寄生特征和遗传信息方面存在不同程度的差异, 具有明显的种群分化特征, 说明寄生部位分化是驱动黏孢子虫种群分化的重要因素。

关键词: 种群分化; 吉陶单极虫; 寄生部位; 形态比较; 组织向性; 核糖体DNA

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)07-0921-12

黏孢子虫是一类形态简单、个体微小的后生动物寄生虫, 主要寄生于鱼类, 可在鱼体几乎所有器官和组织中寄生^[1]。黏孢子虫拥有丰富的物种多样性, 迄今全世界已报道2600余种^[2], 并且这一数量还在快速、大量地增加。已有研究表明, 物种多样性的形成和维持与种群分化密切相关^[3]。种群分化指物种内两个或多个种群在不同环境的影响下发生表型和基因变化^[4]。随着时间的推移, 它们可能会进一步分化为不同的物种^[5]。目前, 种群分化在黏孢子虫分类学^[6]、系统发育学^[7]和生态学^[8]等研究领域中都有发现, 并且往往发生于不同地理^[9]和宿主^[10]株系间。此外, 有学者发现不

同寄生部位的黏孢子虫也存在种群分化^[11]。然而, 由于黏孢子虫通常具有严格的器官特异性和组织向性^[12], 因此, 与寄生部位相关的种群分化研究仍比较匮乏。

吉陶单极虫隶属于黏孢子纲(*Myxosporea*)、双壳目(*Bivalvulida*)、碘泡科(*Myxobolidae*)、单极虫属(*Thelohanellus*), 主要寄生于鲤肠道, 可引起肠巨大囊肿病, 导致鲤大量死亡并造成严重的经济损失^[13]。吉陶单极虫最初由Kitaue^[14]于1980年在日本养殖鲤的肠道中检获, 后Egusa等^[13]通过显微观察对该虫进行了形态学描述并正式命名。1984年, 范至刚^[15]首次报道了我国湖南某地区养殖

收稿日期: 2023-03-27; 修订日期: 2023-05-31.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070431); 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项目(2021-620-000-001-33).

作者简介: 沈宇航(1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类寄生虫. E-mail: shenyuhang@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 顾泽茂, 教授, 研究方向为水产动物病害. E-mail: guzemao@mail.hzau.edu.cn

镜鲤肠道中的吉陶单极虫。之后，又有学者在河北^[16]、山东^[17]、辽宁^[18-19]等地养殖建鲤和鲤的肠道中陆续报道，并初步研究了该虫的显微和亚显微形态结构、血液和组织病理等。然而，受当时科研条件和技术手段的限制，以上研究未能提供吉陶单极虫分子信息，这给其物种准确鉴定和进化关系研究带来很大困难。近年来，随着基因序列分析和系统发育分析在黏孢子虫分类学研究中的广泛应用，上述问题得到了部分解决^[20]。Liu 等^[21]通过形态学比较和分子鉴定，将谢杏人等^[22]在河南地区报道的寄生鲤肠道的信阳单极虫(*The洛 hanellus xinyangensis*)厘定为吉陶单极虫。此外，由于吉陶单极虫地理分布广，众多学者利用分子标记技术开展了有关该虫不同种群间的基因分型和系统发育等研究^[23-25]。

吉陶单极虫自发现以来，一直被视为肠道专性寄生虫，诸多研究也均围绕肠道寄生的吉陶单极虫展开^[26-27]。然而，在 2016 年，笔者从鲤的皮肤分离到数个较大的、不规则的孢囊，经形态学和分子学鉴定为吉陶单极虫，从而首次证实皮肤是吉陶单极虫的另一寄生部位^[28]。近期，笔者又先后从鲤的皮肤和肠道分离到该虫。为探究寄生部位分化对吉陶单极虫种群分化的影响，本研究比较了不同部位吉陶单极虫的形态、寄生特征和分子遗传信息，以期揭示吉陶单极虫种群分化程度，也为探究黏孢子虫种群演化规律和寄生部位起源提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本采集、形态鉴定和分析

2022 年 3—4 月，在湖北省武汉市采集 12 尾鲤(体长 26.3~30.7 cm)，经病原学检测后，从患病鱼皮肤和肠道分别采集到孢囊。孢囊经解剖针刺破后，吸取少量孢子置于载玻片上，滴加少量蒸馏水后加盖盖玻片，利用 Olympus BX53 显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)和 Olympus DP72 数码成像系统(Olympus, Tokyo, Japan)对新鲜孢子进行观察并拍照。随机选取 40 个成熟孢子测量孢子长、孢子宽、孢子厚、极囊长、极囊宽、鞘膜长、鞘膜宽等数据。所有测量值均以微米(μm)为单位，

以平均值、标准差及变化范围的形式表示。利用 IBM SPSS 21.0 软件^[29]对孢子各形态指标进行配对 t 检验分析。

1.2 组织病理学观察

取感染孢囊的皮肤和肠道组织用 4% 多聚甲醛溶液固定，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后，5~6 μm 切片，苏木精-伊红染色，最后用中性树胶封片，Olympus BX53 显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)下观察并拍照。

1.3 DNA 提取与序列扩增

参照说明书，采用基因组提取试剂盒(CWBIO, Beijing, China)提取成熟孢子基因组 DNA。PCR 扩增 SSU rDNA 片段，引物参照 18e^[30] 和 18R^[31]。PCR 反应体系为 50 μL，包括上下游引物各 1 μL，2 μL 模板 DNA，25 μL 2×Es Taq MasterMix (CWBIO, Beijing, China) 以及 21 μL ddH₂O。PCR 反应程序为：94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s，循环 35 次，最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增 ITS-5.8S rDNA 片段，引物参照 18R-V^[31] 和 Myxo28S1F-V^[32]，反应体系同上。反应程序为 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 50 s, 56 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 60 s，循环 35 次，最后 72 °C 延伸 5 min。引物序列见表 1。

表 1 本研究使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in the present study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	参考文献 reference
18e	CTGGTTGATTCTGCCAGT	[30]
18R	CTACGGAAACCTTGTACG	[31]
18R-V	CGTAACAAGGTTCCGTAG	[31]
Myxo28S1F-V	CACTTCACTCGCAGTTACT	[32]

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物，胶回收试剂盒(CWBIO, Beijing, China)纯化回收目的片段。纯化后的目的片段克隆到 pMD19-T 载体(Takara, Dalian, China)，转化至感受态细胞 DH5α(Trans, Beijing, China)并进行单克隆培养，经 PCR 验证后，挑选阳性克隆，送公司(北京擎科生物科技有限公司)测序。

1.4 序列分析

测序结果利用 NCBI 的 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)比对分析后, 检索和下载 GenBank 数据库中所有吉陶单极虫 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列, 并与本研究所获得的序列通过 MEGA 7.0^[33]软件的 Clustal W 程序进行序列多重比对, 计算序列之间的相似度和遗传距离。使用 Bioedit 7.2.5^[34]软件对比对后的序列进行差异位点分析。

1.5 系统发育分析

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 和 ITS-5.8S rDNA 系统进化树。参考序列经 MAFFT 7.503^[35]比对后, 使用 Gblocks 0.91b^[36]删除模糊比对片段。使用 DAMBE 7.3.11^[37]软件对序列替换饱和度进行检测。使用 jModelTest 2.1.10^[38]软件计算获得 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列的最优核苷酸替代模型分别为 TIM2+I+G 和 TPM2uf+I+G。BI 树经 MrBayes 3.2.7^[39]软件运算 1000000 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)计算各分支的后验概率。ML 树经 IQ-TREE 1.6.12^[40]基于上述模型, 自展检验重复运算 1000 次。鲑两极虫(*Myxidium truttae*, 登录号: AF201374)和脑碘泡虫(*Myxobolus cerebralis*, 登录号: AY479922)分别设

置为 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 系统树的外群。生成的一致树使用 FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) 查看和编辑。

2 结果与分析

2.1 宿主症状和孢囊特征

在检测的 12 尾鲤中, 发现 1 尾鲤皮肤有 1 处明显孢囊, 直径约 2.1 cm, 嵌于宿主鳞片下, 造成鳞片隆起(图 1a); 孢囊附近表皮组织损伤, 伴有轻微出血症状(图 1b), 感染率为 8.3%。在另 1 尾鲤的肠道发现数个大小不等的白色孢囊, 孢囊共有 16 个, 直径 0.21~0.82 cm, 阻塞宿主肠道末段(图 1c, 1d), 感染率为 8.3%。镜检其他内脏器官无异常。

2.2 形态鉴定与描述

分别取皮肤和肠道部位的少量孢子置于显微镜下检查, 发现成熟孢子壳面观均呈梨形, 缝面观略狭长, 单个梨形极囊位于孢子前端, 极囊极丝盘绕 8~10 圈, 孢子外围包被有一膜状鞘(图 2)。两部位的成熟孢子测量数据($n=40$)如下: 寄生皮肤的吉陶单极虫(标记为 S 型, 下同)孢子长(26.76 ± 0.85) μm , 孢子宽(10.45 ± 0.63) μm , 孢子厚(8.80 ± 0.45) μm , 极囊长(16.40 ± 0.57) μm , 极囊宽(7.40 ± 0.25) μm , 鞘膜长(32.88 ± 1.36) μm , 鞘膜宽(15.07 ± 1.28) μm ; 寄生肠道的吉陶单极虫(标记为 I 型,

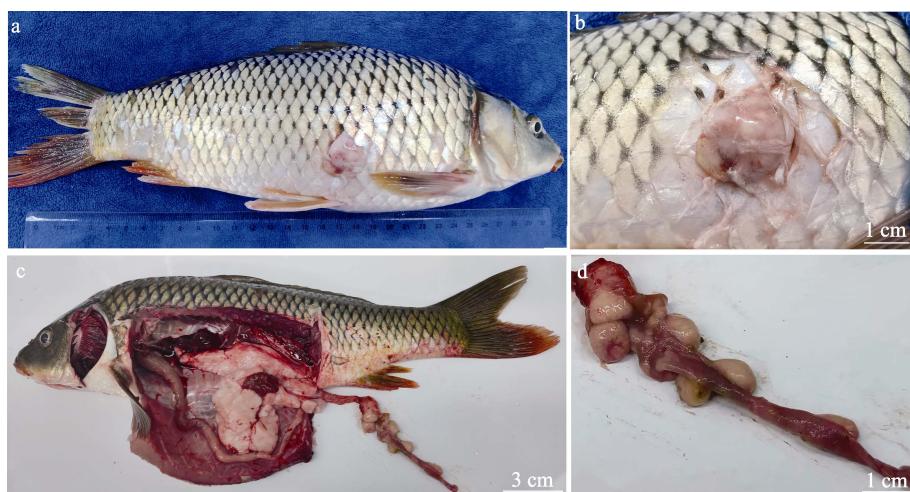


图 1 感染吉陶单极虫的鲤

a, b. 鲤皮肤孢囊; c, d. 鲤肠道孢囊。

Fig. 1 *Cyprinus carpio* infected with *Thelohanellus kitaei*

a, b. Single cyst in the skin of *C. carpio*; c, d. Numerous cysts in the intestine of *C. carpio*.

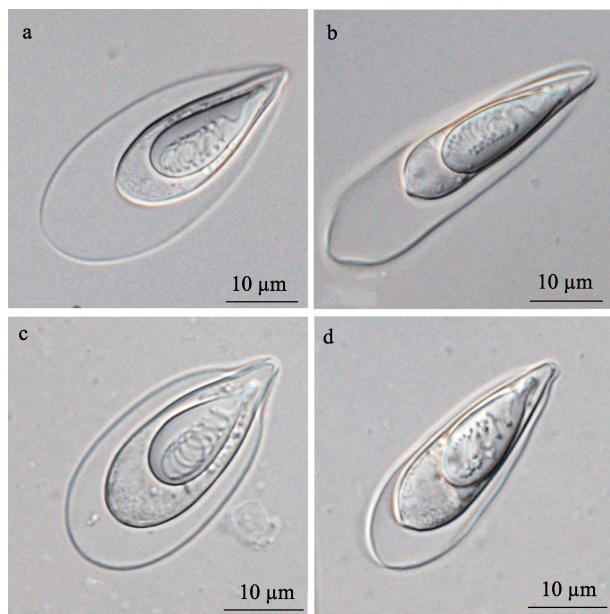


图2 吉陶单极虫孢子

a, b. S型孢子; c, d. I型孢子; a, c. 孢子壳面观; b, d. 孢子缝面观。S型: 寄生于皮肤; I型: 寄生于肠道。

Fig. 2 Myxospores of *Thelohanellus kitaei*
a, b. The S-type spore; c, d. The I-type spore;
a, c. Spore in frontal view; b, d. Spore in sutural view.
S-type: skin isolates; I-type: intestine isolates.

下同)孢子长(29.52 ± 1.20) μm, 孢子宽(9.29 ± 0.81) μm, 孢子厚(8.48 ± 0.43) μm, 极囊长(19.28 ± 0.87) μm, 极囊宽(7.02 ± 0.32) μm, 鞘膜长(39.73 ± 2.88) μm, 鞘膜宽(14.47 ± 1.55) μm(表2)。成熟孢子的形态特征与测量数据均支持本次从鲤皮肤和

肠道分离的寄生虫为吉陶单极虫。

2.3 形态差异分析

使用配对 *t* 检验对 S 型和 I 型的孢子形态测量数据($n=40$)进行显著性分析,结果显示, S 型的孢子长、极囊长和鞘膜长极显著大于 I 型(孢子长: $t=11.89$, $P<0.001$; 极囊长: $t=17.43$, $P<0.001$; 鞘膜长: $t=13.59$, $P<0.001$),而孢子宽和极囊宽极显著小于 I 型(孢子宽: $t=-7.17$, $P<0.001$; 极囊宽: $t=-5.819$, $P<0.001$),孢子厚显著小于 I 型($t=-3.21$, $P=0.002$); 鞘膜宽差异不显著($t=-1.90$, $P=0.06$)(图 3)。

2.4 组织病理学观察

皮肤组织病理切片显示,大量孢子分散在真皮的疏松层,并破坏疏松结缔组织,仅少部分孢子形成小型孢囊。同时部分孢子侵袭致密层并挤压致密结缔组织。宿主炎症反应表现为免疫细胞浸润和组织增生,在疏松层中观察到大量淋巴细胞(图 4a, 4b)。

肠道组织病理切片显示,吉陶单极虫形成的孢囊附着于肠黏膜下层结缔组织,孢囊内部呈“蜂窝状”。大量孢子包围、挤压小肠绒毛,从而散落在孢囊内。另有少量孢子位于结构异常的肠绒毛内。在黏膜下层周围分布着大量的淋巴细胞(图 4c, 4d)。

2.5 分子特征

分别扩增 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 片段,

表2 寄生皮肤和肠道的吉陶单极虫形态比较

Tab. 2 Morphological comparison of *Thelohanellus kitaei* isolates in skin and intestine of *Cyprinus carpio*

寄生部位 infection site	孢子长/μm spore length	孢子宽/μm spore width	孢子厚/μm spore thickness	极囊长/μm polar capsule length	极囊宽/μm polar capsule width	鞘膜长/μm membrane sheath length	鞘膜宽/μm membrane sheath width	极丝圈数 polar filament number	参考文献 reference number
皮肤 skin	29.52 ± 1.20 ($26.90 \sim 31.81$)	9.29 ± 0.81 ($8.06 \sim 10.97$)	8.48 ± 0.43 ($7.32 \sim 9.54$)	19.28 ± 0.87 ($15.97 \sim 20.73$)	7.02 ± 0.32 ($6.38 \sim 7.63$)	39.73 ± 2.88 ($33.72 \sim 47.16$)	14.47 ± 1.55 ($12.26 \sim 18.51$)	8~10	本研究 this study
皮肤 skin	29.6 ± 1.9 ($26.7 \sim 32.3$)	10.2 ± 0.6 ($9.1 \sim 11.8$)	-	19.7 ± 1.4 ($17.3 \sim 21.5$)	7.5 ± 0.3 ($6.9 \sim 8.2$)	39.3 ± 4.1 ($32.6 \sim 49.6$)	15.7 ± 1.3 ($12.9 \sim 17.8$)	8~10	[28]
肠道 intestine	26.76 ± 0.85 ($24.75 \sim 28.13$)	10.45 ± 0.63 ($9.02 \sim 11.97$)	8.80 ± 0.45 ($7.78 \sim 9.89$)	16.40 ± 0.57 ($14.82 \sim 17.65$)	7.40 ± 0.25 ($6.80 \sim 7.96$)	32.88 ± 1.36 ($30.37 \sim 36.69$)	15.07 ± 1.28 ($12.62 \sim 17.86$)	8~10	本研究 this study
肠道 intestine	26.3 ($23 \sim 29$)	9.2 ($8 \sim 11$)	-	16.8 ($14 \sim 18$)	7.4 ($6 \sim 9$)	33.4 ($31 \sim 35$)	15.0 ($12 \sim 17$)	-	[13]
肠道 intestine	25.5 ± 1.1 ($23.4 \sim 27.5$)	8.9 ± 0.8 ($7.9 \sim 10.9$)	9.3 ± 0.5 ($8.3 \sim 10.6$)	15.0 ± 1.2 ($13.0 \sim 18.0$)	7.3 ± 0.5 ($6.3 \sim 8.5$)	34.0 ± 2.6 ($30 \sim 40.5$)	14.5 ± 1.1 ($12.2 \sim 17.0$)	8~10	[21]

注: -表示无数据。

Note: - represents no data.

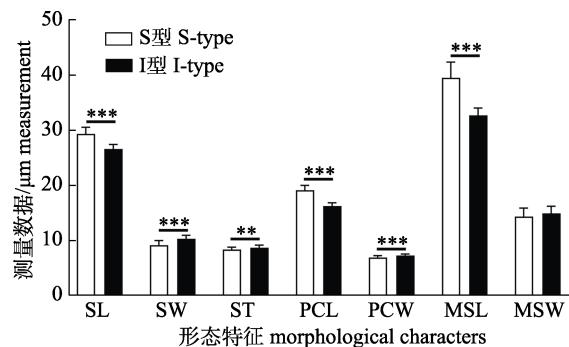


图3 S型(皮肤寄生)和I型(肠道寄生)孢子的形态学差异

SL: 孢子长; SW: 孢子宽; ST: 孢子厚; PCL: 极囊长;

PCW: 极囊宽; MSL: 鞘膜长; MSW: 鞘膜宽;

***表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.01$.

Fig. 3 Morphometric differences between the skin (S-type) and intestine (I-type) isolates of *Thelohanellus kitaei*
SL: spore length; SW: spore width; ST: spore thickness;
PCL: polar capsule length; PCW: polar capsule width;
MSL: membrane sheath length; MSW: membrane sheath width.
*** indicates $P<0.001$, ** indicates $P<0.01$.

在剔除两端模糊序列以及引物序列后, 得到 S 型和 I 型分子序列, 上传至 GenBank 数据库中。S 型 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列登录号为 OP765237 和 OP776735, 片段长度分别为 2049 bp 和 735 bp; I 型 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列登录号为 OP765236 和 OP776734, 片段长度分别为 2049 bp 和 737 bp。相似度和遗传距离分析结果显示, S 型和 I 型 SSU rDNA 序列与吉陶单极虫序列相似性均在 99%以上, 遗传距离均小于 0.01 (表 3)。S 型和 I 型 ITS-5.8S rDNA 序列与 JQ690368 相似性分别为 97.3% 和 100%, 遗传距离为 0.011 和 0.000(表 4)。

遗传差异位点分析显示, 相比于 7 条寄生部位均为肠道的吉陶单极虫 SSU rDNA 序列, 2 条寄生部位均为皮肤的序列出现 4 个位点的碱基变异,

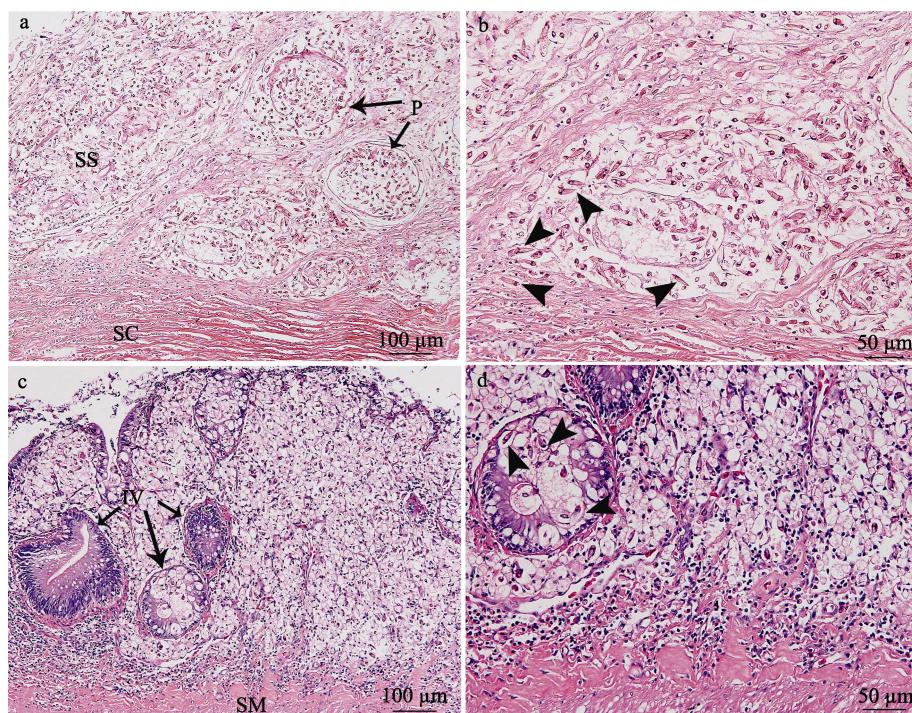


图4 感染吉陶单极虫的鲤皮肤(a, b)和肠道(c, d)组织病理切片

- 大部分孢子散落在真皮疏松层(SS)结缔组织内, 少量孢子形成小型孢囊(plasmodia, P);
- 部分孢子(无尾箭头示)侵入致密层(SC)结缔组织内;
- 孢囊位于肠黏膜下层(SM)结缔组织, 孢子包围、挤压肠绒毛(IV);
- 肠绒毛内的孢子(无尾箭头示)。

Fig. 4 Pathological section of the skin (a, b) and intestine (c, d) of *Cyprinus carpio* with *Thelohanellus kitaei* infecting
a. Most of spores scattered in the connective tissue of the stratum spongiosum (SS) while some spores formed small plasmodia (P); b. Some spores (arrow without tail) invaded into the connective tissue of the stratum compactum (SC);
c. Plasmodia located above the connective tissue of the intestinal submucosa (SM) while spores surrounded and extruded normal intestinal villi (IV); d. Spores (arrow without tail) in intestinal villi.

表3 吉陶单极虫10条SSU rDNA序列间相似度(右上)与遗传距离(左下)

Tab. 3 Similarity (upper right) and genetic distance (lower left) between 10 SSU rDNA sequence of *Thelohanellus kitauei*

吉陶单极虫序号 sequence ID of <i>Thelohanellus kitauei</i>	寄生部位 infection site	JQ690367	MF536693	MN227353	GQ396677	HM624024	HQ115585	MH329616	OP765236*	KR872638	OP765237*
JQ690367	肠 intestine		99.9%	100.0%	99.9%	99.8%	99.6%	99.6%	100.0%	99.7%	99.7%
MF536693	肠 intestine	0.000		99.9%	99.8%	99.7%	99.6%	99.6%	99.9%	99.6%	99.6%
MN227353	肠 intestine	0.000	0.000		99.9%	99.8%	99.6%	99.6%	100.0%	99.7%	99.7%
GQ396677	肠 intestine	0.001	0.001	0.001		99.7%	99.6%	99.6%	99.9%	99.6%	99.6%
HM624024	肠 intestine	0.000	0.000	0.000	0.001		99.4%	99.4%	99.8%	99.5%	99.5%
HQ115585	肠 intestine	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003		99.3%	99.6%	99.3%	99.3%
MH329616	肠 intestine	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.007		99.6%	99.9%	99.9%
OP765236*	肠 intestine	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.003	0.003		99.7%	99.7%
KR872638	皮肤 skin	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.006	0.001	0.003		100.0%
OP765237*	皮肤 skin	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.006	0.001	0.003	0.000	

注: *表示本研究获得的序列。

Note: * represents sequence obtained in this study.

表4 吉陶单极虫3条ITS-5.8S rDNA序列的相似度(右上)与遗传距离(左下)

Tab. 4 Similarity (upper right) and genetic distance (lower left) between 3 ITS-5.8S rDNA sequences of *Thelohanellus kitauei*

吉陶单极虫序号 sequence ID of <i>Thelohanellus kitauei</i>	寄生部位 infection site	JQ690368	OP776734*	OP776735*
JQ690368	肠 intestine		100.0%	97.3%
OP776734*	肠 intestine	0.000		97.3%
OP776735*	皮肤 skin	0.011	0.011	

注: * 表示本研究获得的序列。

Note: * represents sequence obtained in this study.

分别是661位(C→A)、667位(A→T)、671位(C→G)和677位(A→C)。仅MH329616(寄生部位为肠道)在这4个位点与寄生皮肤的相同。皮肤寄生和肠道寄生的吉陶单极虫ITS-5.8S rDNA序列具有20个碱基位点差异,其中ITS-1序列有11个:2132位(A→T)、2141位(G→T)、2144位(插入C)、2193位、2201位、2246位、2342位和2384~2387位(插入AACG);ITS-2序列有9个:2362~2363位(AT→GC)、2681~2686位(缺失)和2774位(C→G)(图5)。

2.6 系统发育分析

系统发育分析显示,基于SSU rDNA序列构建的ML和BI树获得了一致的拓扑结构。单极虫属物种(*Thelohanellus* spp.)聚为2个支系:寄生鮰

的5种单极虫(*T. jiroveci*, *T. filli*, *T. seni*, *T. bifurcata*, *T. catlae*)稳定地聚为一支;光滑单极虫(*T. hovorkai*)作为单极虫属的模式种(type species),与其余5种单极虫(*T. kitauei*, *T. macrovacuolaris*, *T. wangi*, *T. wuhanensis*, *T. testudineus*)聚为另一支。所有吉陶单极虫聚为一支,光滑单极虫为其姊妹枝;吉陶单极虫内部按照寄生部位不同进行分支,S型聚为一支,I型聚为另一支(图6)。

基于ITS-5.8S rDNA序列构建的ML和BI树同样获得了一致的拓扑结构,所有吉陶单极虫聚为一支,武汉单极虫(*T. wuhanensis*)为其姊妹枝。寄生皮肤和寄生肠道的吉陶单极虫分别构成独立支系(图7)。

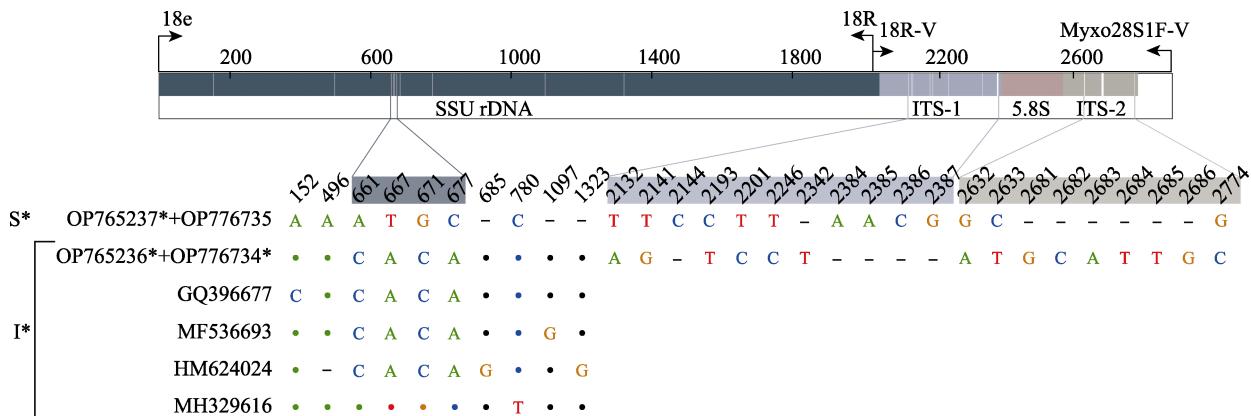
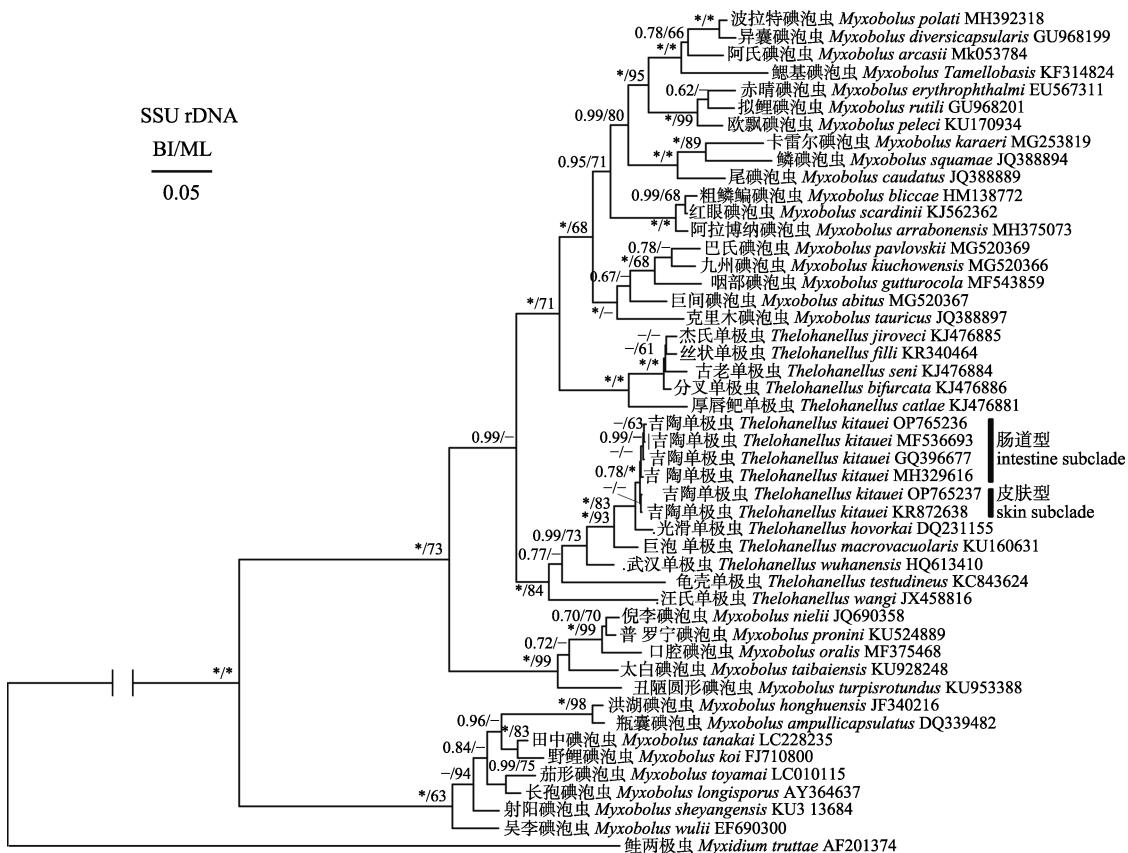


图 5 吉陶单极虫 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列的差异位点

S*: 寄生部位均为皮肤的吉陶单极虫序列; I*: 寄生部位均为肠道的吉陶单极虫序列; OP765237*: 该序列与 KR872638 一致; OP765236*: 该序列与 JQ690367 和 MN227353 一致; OP776734*: 该序列与 JQ690368 一致。引物结合部位以箭头标示。

Fig. 5 Variation sites of SSU rDNA and ITS-5.8S rDNA sequences of *Thelohanellus kitauei*

S*: the sequences of *T. kitauei* that infect the skin; I*: the sequences of *T. kitauei* that infect the intestine; OP765237*: this sequence is identical with KR872638; OP765236*: this sequence is identical with JQ690367 and MN227353; OP776734*: this sequence is identical with JQ690368. Primer binding locations are marked by arrows.



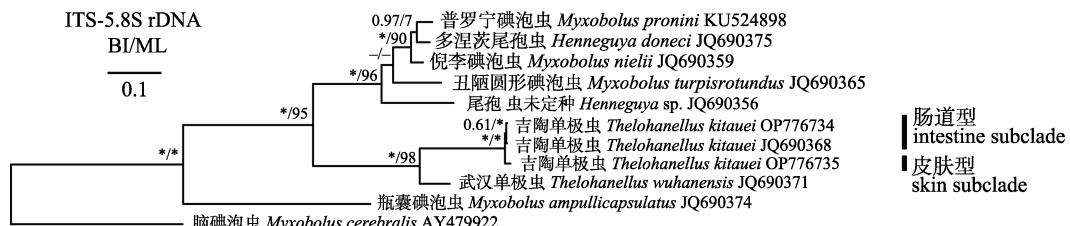


图 7 基于 ITS-5.8S rDNA 序列构建的 BI/ML 系统进化树
节点处数值分别代表贝叶斯法的后验概率和最大似然法的置信值。

星号(*)代表值等于 1.00/100, 破折号(–)代表值小于 0.60/60.

Fig. 7 BI/ML phylogenetic tree based on ITS-5.8S rDNA sequences
Posterior probabilities and bootstrap supports are given beside the nodes, respectively.
Asterisks (*) represent values = 1.00/100. Dashes (–) represent values < 0.60/60.

3 讨论

形态特征是黏孢子虫最为直接、简单和有效的分类指标。近年来, 随着研究技术的发展和对黏孢子虫认识的加深, 寄生特性以及分子序列分析成为黏孢子虫物种鉴定的重要辅助手段^[20]。本研究从鲤的皮肤分离到一种单极虫, 其形态学特征与 Zhai 等^[28]描述的吉陶单极虫基本重叠, 同时分子序列也完全一致, 证实了皮肤也可被吉陶单极虫寄生的观点。而从肠道中分离到的单极虫不仅形态和分子数据与吉陶单极虫重叠, 而且肠道也是吉陶单极虫的常见寄生部位。

进一步对比 S 型和 I 型的孢子形态数据, 发现除鞘膜宽以外, 其余形态特征均有明显差异(图 3)。研究表明, 黏孢子虫的形态差异即使在种内水平上也可能反映遗传差异^[41]。核糖体 DNA (rDNA) 作为检测黏孢子虫种内遗传差异的有效工具, 同时可应用于不同株系间的基因分型和种群分化研究^[7]。陈鸿真等^[25]发现不同地理株系的吉陶单极虫 SSU rDNA 序列表现出某些位点的差异, 基于此划分了 4 种基因型(Genotype I~IV)。本研究获得的 I 型和 S 型序列分别与基因型 II 和 III 一致, 并且寄生部位也一致。值得注意的是, 除 MH329616 外, 所有寄生肠道的吉陶单极虫 SSU rDNA 序列与寄生皮肤的序列间具有 4 个变异位点(图 5)。以上结果表明不同寄生部位间的吉陶单极虫存在遗传分化, 但分化程度较低, 这可能与 SSU rDNA 序列较为保守的特性相关^[42]。因此, 需要利用分辨率更高的分子标记进一步比较吉陶单极虫种群间的遗传差异。

核糖体 DNA 中的内转录间隔区 ITS 属非编码序列, 在物种进化过程中受到的选择压力较小, 能够为物种的遗传多样性研究提供丰富的变异和信息位点^[43~44]。本研究扩增获得的 I 型 ITS-5.8S rDNA 序列, 与 JQ690368 (寄生部位为肠道) 序列相似度为 100%, 而与 S 型序列相似度仅为 97.3%, 具有 20 个碱基差异。这进一步说明寄生不同部位的吉陶单极虫存在遗传分化现象, 并且可能有更多的基因型。系统发育分析能够进一步揭示黏孢子虫不同寄生部位间的潜在联系^[11]。基于 SSU rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列构建的吉陶单极虫系统进化树显示, 寄生相同部位的吉陶单极虫聚为了一支, 具有较近的亲缘关系, 证实了吉陶单极虫在不同部位间的遗传分化现象。类似的现象也在吴李碘泡虫(*Myxobolus wului*)^[45]、普罗宁碘泡虫(*Myxobolus pronini*)^[6]等多种黏孢子虫中存在。然而, 陈鸿真等^[25]发现, 寄生皮肤和寄生肠道的吉陶单极虫在 SSU rDNA 系统树中并未分支。产生的不一致结果可能与某些序列碱基位点的突变及 S 型样本量不足有关^[46]。另外, 受限于 S 型样本数量, S 型在 ITS-5.8S rDNA 系统树中呈单独一支, 并未形成聚类关系。因此, 在今后的研究中, 应补充不同地区或不同宿主的 S 型分子数据, 从而完善吉陶单极虫的系统发育关系。

吉陶单极虫表现出的形态和遗传差异表明其存在种群分化。种群分化是一个复杂的生物进化过程。在黏孢子虫中, 种群分化通常与地理、宿主或寄生部位有关^[9~11]。然而, 它们只是不同种群的表现形式, 并不能直接驱动物种的种群分化。

事实上, 驱动种群分化的关键因素是种群所处的环境差异^[4]。Yokoyama 等^[41]发现七星库道虫(*Kudoa septempunctata*)日本和韩国株系具有形态差异并且已出现基因分型, 推测地理环境差异是导致其种群分化的主要因素。Liu 等^[6]发现普罗宁碘泡虫在不同寄生部位间(腹腔和内脏浆膜)的形态和遗传变异可能与微生境差异有关。本研究中, 吉陶单极虫寄生肠道和皮肤时依然保持相对严格的结缔组织向性。尽管如此, 在向不同部位发生种群扩张的过程中, 受不同器官微环境压力影响的吉陶单极虫可能会发生适应性进化, 最终导致种群分化。

综上所述, 寄生不同部位的吉陶单极虫形态、寄生特征和遗传信息存在不同程度的差异, 表现出明显的种群分化特征, 系统树中的聚类关系进一步佐证不同部位的吉陶单极虫存在种群分化。本研究丰富了吉陶单极虫表型和遗传多样性研究, 证明了寄生部位分化是影响黏孢子虫种群分化的因素之一, 可为今后探究黏孢子虫种群演化规律和寄生部位起源提供参考。

参考文献:

- [1] Kent M L, Andree K B, Bartholomew J L, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2001, 48(4): 395-413.
- [2] Okamura B, Hartigan A, Naldoni J. Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2018, 58(6): 1132-1145.
- [3] Schlüter D. Ecology and the origin of species[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, 16(7): 372-380.
- [4] Schlüter D. Evidence for ecological speciation and its alternative[J]. *Science*, 2009, 323(5915): 737-741.
- [5] Via S. Natural selection in action during speciation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106: 9939-9946.
- [6] Liu X H, Batueva M D, Zhao Y L, et al. Morphological and molecular characterisation of *Myxobolus pronini* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) from the abdominal cavity and visceral serous membranes of the gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in Russia and China[J]. *Parasites & Vectors*, 2016, 9(1): 1-11.
- [7] Whipples C M, Kent M L. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxospora)[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, 53(5): 364-373.
- [8] Atkinson S D, Bartholomew J L. Spatial, temporal and host factors structure the *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) population in the Klamath River basin[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, 10(7): 1019-1026.
- [9] Urawa S, Freeman M A, Johnson S C, et al. Geographical variation in spore morphology, gene sequences, and host specificity of *Myxobolus arcticus* (Myxozoa) infecting salmonid nerve tissues[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 96(3): 229-237.
- [10] Wang M, Zhao Y J, Yang C Z. The impacts of geographic and host species isolation on population divergence of *Myxobolus lentisaturalis*[J]. *Parasitology Research*, 2019, 118: 1061-1066.
- [11] Borzák R, Borkhanuddin M H, Cech G, et al. New data on *Thelohanellus nikolskii* Achmerov, 1955 (Myxosporea, Myxobolidae) a parasite of the common carp (*Cyprinus carpio*, L.): The actinospore stage, intrapiscine tissue preference and molecular sequence[J]. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2021, 15: 112-119.
- [12] Molnár K. Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development[J]. *Parasitol Hung*, 1994, 27: 5-20.
- [13] Egusa S, Nakajima K. A new myxozoa *Thelohanellus kitauei*, the cause of intestinal giant cystic disease of carp[J]. *Fish Pathology*, 1981, 15(3/4): 213-218.
- [14] Kitaue K. Intestinal giant-cystic disease affecting the carp, caused by *Thelohanellus* sp.[J]. *Fish Pathology*, 1980, 14(3): 145-146.
- [15] Fan Z G. Study of thelohanelliosis from common carp[J]. *Freshwater Fish*, 1984(5): 16-18. [范至刚. 散鳞镜鲤单极虫病的研究[J]. 淡水渔业, 1984(5): 16-18.]
- [16] Xiao G H, Zhang Z E, Shen X Q, et al. Histopathological studies on thelohanelliosis of carp[J]. *Hebei Fisheries*, 1992(4): 14-17. [肖国华, 张志恩, 沈象庆, 等. 鲤鱼单极虫病组织病理研究[J]. 河北渔业, 1992(4): 14-17.]
- [17] Zhou L, Gong Q L, Yu K K, et al. A preliminary study on the disease of Myxozoa, *Thelohanellus kitauei* of jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*)[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1998, 28(1): 59-62. [周丽, 宫庆礼, 俞开康, 等. 建鲤吉陶单极虫病的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 59-62.]
- [18] Zhou Y, Yang Z G, Zhang K, et al. Studies on the hematological pathology of common carp parasited by *Thelohanellus kitauei*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2001(6): 72-74. [周玉, 杨振国, 张凯, 等. 鲤吉陶单极虫病血液学研究[J].

- 湖北农业科学, 2001(6): 72-74.]
- [19] Zhou Y, Yang Z G, Li Y S, et al. Observation of *Thelohanellus kitauei* by scanning electron microscopy[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(3): 90-91. [周玉, 杨振国, 李岩松, 等. 鲤吉陶单极虫体被结构的扫描电镜观察[J]. 动物医学进展, 2005, 26(3): 90-91.]
- [20] Liu Y. Revision on genus *Myxobolus* (Myxozoa: Myxosporida) and taxonomy of some *Myxobolus* species in China [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014: 126. [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: 126.]
- [21] Liu Y, Whippes C M, Liu W S, et al. Supplemental diagnosis of a myxozoan parasite from common carp *Cyprinus carpio*: synonymy of *Thelohanellus xinyangensis* with *Thelohanellus kitauei*[J]. Veterinary Parasitology, 2011, 178(3-4): 355-359.
- [22] Xie X R, Gong X N, Xiao W H, et al. Studies on *Thelohanelliosis* (Myxosporidiosis) parasitized freshwater fish in China I. *Thelohanelliosis* (Myxosporidiosis) parasitized carp in Xinyang, Henan Province[J]. Journal of Xinyang Agricultural College, 2000, 10(2): 1-5. [谢杏人, 龚小宁, 肖武汉, 等. 中国淡水鱼类单极虫病的研究 I. 河南信阳鲤鱼单极虫病的研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2000, 10(2): 1-5.]
- [23] Ye L T, Lu M M, Quan K Y, et al. Intestinal disease of scattered mirror carp *Cyprinus carpio* caused by *Thelohanellus kitauei* and notes on the morphology and phylogeny of the myxosporean from Sichuan Province, southwest China[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017, 35(3): 587-596.
- [24] Liu T, Wei W Y, Wang K Y, et al. Pathological and immunological analyses of *Thelohanellus kitauei* (Myxozoa: Myxosporida) infection in the scattered mirror carp, *Cyprinus carpio*[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-12.
- [25] Chen H Z, Zhao Y J, Yang C Z. New record of geographic distribution of *Thelohanellus kitauei* and its comparative study of different geographic strains[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(2): 265-273. [陈鸿真, 赵元君, 杨承忠. 吉陶单极虫地理分布新记录及不同地理株系间的比较[J]. 水产学报, 2021, 45(2): 265-273.]
- [26] Molnár K, Eszterbauer E. Specificity of infection sites in vertebrate hosts[M]//Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Cham: Springer, 2015: 295-313.
- [27] Shin S P, Jeong J M, Jun J W, et al. The phylogenetic study on *Thelohanellus* species (Myxosporea) in relation to host specificity and infection site tropism[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2014, 72: 31-34.
- [28] Zhai Y H, Gu Z M, Guo Q X, et al. New type of pathogenicity of *Thelohanellus kitauei* Egusa & Nakajima, 1981 infecting the skin of common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. Parasitology International, 2016, 65(1): 78-82.
- [29] Field A. Discovering statistics using IBM SPSS statistics[M]. 4th edition. London: SAGE Publications Ltd, 2013: 364-387.
- [30] Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference[J]. The Quarterly Review of Biology, 1991, 66(4): 411-453.
- [31] Whippes C M, Adlard R D, Bryant M S, et al. First report of three *Kudoa* species from eastern Australia: *Kudoa thrysites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithrysites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilochrus*)[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2003, 50(3): 215-219.
- [32] Whippes C M, Grossel G, Adlard R D, et al. Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis[J]. Journal of Parasitology, 2004, 90(3): 618-622.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Xia X. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1550-1552.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Nguyen L T, Schmidt H A, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. Molecular Biology and Evolution, 2015, 32(1): 268-274.
- [41] Yokoyama H, Mekata T, Satoh J, et al. Morphological and molecular comparisons between Japanese and Korean Isolates

- of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish Pathology, 2017, 52(3): 152-157.
- [42] Whippes C M, El-Matbouli M, Hedrick R P, et al. *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences support recent spread of the parasite to North America and within Europe[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 60(2): 105-108.
- [43] Li D, Liu Y, Zhai Y H, et al. Development and preliminary application of PCR method for the detection of *Myxobolus honghuensis* (Myxosporea: Bivalvulida)[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(1): 12-16. [李丹, 柳阳, 翟艳花, 等. 洪湖碘泡虫PCR检测方法的建立与初步应用[J]. 淡水渔业, 2017, 47(1): 12-16.]
- [44] Gao Y J, Yang C Z, Zhao Y J. Population geography of *Henneguya doneci* base on ITS-5.8S rDNA[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2015, 32(3): 48-53. [高永杰, 杨承忠, 赵元碧. 多涅茨尾孢虫ITS-5.8S rDNA的种群地理学研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2015, 32(3): 48-53.]
- [45] Yang C Z, Zhang D D, Zhao Y J. Redescription of *Myxobolus wulii* and comparison of its strains in different sections of the Yangtze river basin[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(5): 1092-1097. [杨承忠, 张雕雕, 赵元碧. 吴李碘泡虫的重描述及其长江流域不同江段株系的比较研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(5): 1092-1097.]
- [46] Zhang X P, Liu Y, Whippes C M, et al. Multiple evolutionary routes of the single polar capsule in *Thelohanellus* species (Myxozoa; Myxobolidae)[J]. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 2019, 8: 56-62.

The impacts of infection site differentiation on population divergence of *Thelohanellus kitauei* (Myxozoa: Myxosporea)

SHEN Yuhang^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Bo^{1, 2, 3, 4}, TU Xiao^{1, 2, 3, 4}, GU Zemao^{1, 2, 3, 4}

1. 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;
3. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;
4. National Aquatic Animal Diseases Para-reference Laboratory (HZAU), Wuhan 430070, China

Abstract: Myxosporeans are a group of microscopic parasites that primarily parasitize fish with more than 2600 species currently discovered worldwide. The rich diversity of this group has led to extensive research on population divergence in myxosporeans. To investigate the impacts of infection site differentiation on the population divergence of myxosporeans, *Thelohanellus kitauei* Egusa & Nakajima, 1981 was isolated from the skin (S-type) and intestine (I-type) of different common carps *Cyprinus carpio* L. We compared the morphological differences in the *T. kitauei* found at the two infection sites by measuring the morphological characteristics of both plasmodia and spores. Tissue samples from the infected skin and intestine were examined by histopathology. The small subunit (SSU) ribosomal DNA (rDNA) and internal transcribed spacer (ITS)-5.8S rDNA sequences of two isolates were also amplified, aligned, and phylogenetically analyzed with other *T. kitauei* sequences from GenBank. The results showed that the S-type formed a single plasmodium with a diameter of 2.1 cm, while the I-type formed sixteen plasmodia of different sizes (diameters of 0.21–0.82 cm). The membrane sheath widths of the S- and I-types were approximately identical ($P>0.05$). However, the spore lengths, polar capsule, and membrane sheath of the S-type were significantly greater than those of the I-type ($P<0.001$), while other morphological characteristics were significantly smaller than those of the I-type (spore thickness: $P<0.01$; the width of spore and polar capsule: $P<0.001$). Histologically, most of the S-type spores were distributed in the stratum spongiosum of the dermis, with some spores penetrating the stratum compactum, causing curvature and deformation of the dense connective tissue. The I-type spores were primarily scattered over the intestinal submucosa, and the intestinal villi squeezed by the spores showed atrophy to varying degrees. Both types infected the connective tissue, causing inflammatory reactions such as lymphocyte infiltration and tissue hyperplasia. Molecular sequence comparison showed that the SSU rDNA sequence similarity between the S-type and I-type was 99.7%, with 4 variation sites. However, the ITS-5.8S rDNA sequence similarity was only 97.3%, with a total of 20 variation sites. The phylogenetic tree was constructed based on SSU and ITS-5.8S rDNA sequences, respectively, demonstrating that the sequences of *T. kitauei* were divided into two lineages, ‘intestine’ and ‘skin’ subclades. In conclusion, the populations of *T. kitauei* infecting the skin and intestine of common carp showed varying degrees of difference in morphology, parasitic characteristics, and genetic information, providing obvious evidence of population divergence. It was demonstrated that the infection site differentiation is an important factor driving population divergence in myxosporeans.

Key words: population divergence; *Thelohanellus kitauei*; infection site; morphology comparison; tissue tropism; ribosomal DNA

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