

DOI: 10.12264/JFSC2021-0592

荧光定量 PCR 检测洪湖碘泡虫寄生异育银鲫组织器官的偏好

翟凯旋^{1,2}, 曹泽艺^{1,2}, 习丙文^{1,2}, 陈凯², 谢骏²

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

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

摘要: 为了阐明洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*)在隐性感染异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*, Bloch)不同组织器官中的分布情况, 本研究采集曾发生过喉孢子虫病养殖池塘的 2 龄健康异育银鲫的鳃(丝)、伪鳃、中肾、头肾、肌肉、脾脏、肝脏、卵巢、血液等 9 个组织器官, 采用荧光定量 PCR 检测分析了不同组织器官的感染率和相对感染强度。结果显示, 所采集的 30 尾异育银鲫都没有明显临床症状, 但鱼体的洪湖碘泡虫感染率为 100%, 均为隐性感染个体; 各组织器官间的感染率存在较大差异, 除肌肉未检出外, 感染率从高到低依次为: 伪鳃(100.0%)、卵巢(83.3%)、鳃(73.3%)、脾脏(70.0%)、中肾(36.7%)、头肾(23.3%)、肝脏(10.0%)、血液(6.7%)、肌肉(0)。不同组织器官的相对感染强度由高到低依次为: 伪鳃(14.4349±70.0529)、卵巢(0.9556±1.5627)、脾脏(0.3644±0.7854)、鳃(0.3339±0.2682)、头肾(0.2722±0.3761)、中肾(0.0379±0.1055)、肝脏(0.0019±0.0022)、血液(0.0012±0.0011)。研究表明, 洪湖碘泡虫可系统感染异育银鲫多个组织器官, 其中, 伪鳃感染率和感染强度最高, 可以作为该病早期检测和疫病监测的首选组织器官。

关键词: 洪湖碘泡虫; 喉孢子虫病; 异育银鲫; 伪鳃; 组织分布

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)07-1101-07

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*, Bloch)具有生长快、食性广等特点, 是我国重要的淡水养殖品种^[1]。随着集约化养殖的发展, 病害日益成为危害异育银鲫产业可持续发展的瓶颈; 其中粘孢子虫病是最为严重的寄生虫病之一, 由于缺乏有效的防控措施^[2-3], 每年造成异育银鲫苗种和成鱼大量死亡。目前, 异育银鲫可感染粘孢子虫的种类超过 62 种^[4], 如洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*)、武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis*)、吴李碘泡虫(*Myxobolus wulii*)、培养碘泡虫(*Myxobolus cultus*)等, 其中以引起“喉孢子虫病”的洪湖碘泡虫危害最为严重。当异育银鲫严重感染时, 咽上皮与颅骨间会出现大量发育成熟的孢子和胞囊^[2]。发病鱼呈现上浮, 离群独游, 头背部发黑, 反应

迟缓, 摄食困难, 单侧或双侧眼球突出, 鳃盖不能闭合; 打开喉部可见口咽腔上壁红肿溃烂, 其他器官没有明显症状, 最终发病鱼由于严重贫血、炎症反应、压迫感染及继发感染等导致死亡^[5-8]。

目前, 有关洪湖碘泡虫的完整生活史和组织感染分布特征等病原生物学的基础信息还缺乏详细研究。杨坤等^[9-10]和 Wang 等^[11]通过 PCR 检测发现, 池塘养殖的异育银鲫在没有“喉孢子虫病”的临床症状下, 从健康鱼样本中检测出很高的洪湖碘泡虫 DNA 阳性; 表明养殖异育银鲫中普遍存在隐性感染现象。在一些隐性感染个体的伪鳃及其周边组织显微镜镜检可以明显看到成熟的孢子和胞囊^[10]。刘晓聪等^[12]在异育银鲫的鳃中也曾检查到游离分散的成熟孢子。为了进一步阐明洪

收稿日期: 2021-12-24; 修订日期: 2022-02-21.

基金项目: 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: 翟凯旋(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类寄生虫. E-mail: 619081460@qq.com

通信作者: 习丙文, 研究员, 研究方向为鱼类寄生虫学及寄生虫病防控, E-mail: xibw@ffrc.cn

湖碘泡虫寄生异育银鲫不同组织器官差异,本研究通过荧光定量 PCR 检测分析了洪湖碘泡虫在异育银鲫伪鳃、鳃、头肾、卵巢等组织器官中的感染率和相对感染强度,为异育银鲫喉孢子虫病的早期检测和防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

异育银鲫幼鱼购自江苏省常州市金坛某繁育场,养殖在中国水产科学院淡水渔业研究中心南京试验基地的室外水泥池;在当年 6—7 月,发现有部分苗种死亡,经诊断为洪湖碘泡虫病。第 2 年养殖过程中没有再出现洪湖碘泡虫死亡情况。随机采集该水泥池中 2 龄异育银鲫 30 尾,记录体重和体长,采集尾静脉血,解剖和显微镜检查鳃(丝)、伪鳃、中肾、头肾、肌肉、脾脏、肝脏、卵巢(采集完每个组织后使用的剪刀和镊子用酒精棉擦洗干净,防止交叉污染)是否有洪湖碘泡虫的胞囊或孢子;同时,采集保存各组织样品于 1.5 mL 灭菌 EP 管中,记录编号,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,用

于分子检测。

1.2 样品 DNA 提取

将冻存组织解冻,使用电动研磨器匀浆,按照磁珠法微量基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)说明书步骤提取组织 DNA,保存 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。样品 DNA 使用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)测定质量和浓度,并调整至 $200\text{ ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 荧光定量 PCR 检测

研究所用的内参基因异育银鲫 β -actin 和靶基因洪湖碘泡虫 18S rDNA 引物由上海生工合成(表 1)。荧光定量 PCR 反应体系设置参照 Ultra SYBR Mixture 使用说明,包括 SYBR[®] Green Supermix $10\text{ }\mu\text{L}$,正反向引物各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$),DNA 模板 $2.0\text{ }\mu\text{L}$,RNase Free Water 补充至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序在 BIO-RAD CFX96 touch q-PCR system 仪器上设置如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s ,40 次循环;采集溶解曲线。将阳性样品的 PCR 产物送上海生工测序并通过序列比对分析,确保检测的有效性。

表 1 荧光定量 PCR 检测所用引物

Tab. 1 Primers used in real-time PCR analysis

引物 primer	名称 code	序列(5'-3') sequence (5'-3')	T_m 值/ $^{\circ}\text{C}$ T_m value
上游 forward	β -actin-F	CTCCCTCAATCCCAAAGCCAA	62.56
下游 reverse	β -actin-R	ACACCATCACCAGAATCCATCA	59.42
上游 forward	Mh-in-F	GTCCGGACATCGAAAGGAT	54.50
下游 reverse	Mh-in-R	AGCGAGCCCAGAATGCTAC	57.97

1.4 数据统计分析

异育银鲫的洪湖碘泡虫感染率=感染个体/检测个体总数;各组织器官感染率=感染器官样本数/检测器官样本总数。由于洪湖碘泡虫的孢子非常微小且发育为成熟孢子前的细胞很难用显微镜观察计数,各组织器官中洪湖碘泡虫相对感染强度(载虫量)采用洪湖碘泡虫 18S rDNA 相对异育银鲫宿主 β -actin 基因的拷贝数进行评价。荧光定量 PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法相对定量法分析。利用 SPSS25.0 统计软件对数据进行统计分析,其中感染率、感染强度差异统计分析采用 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果与分析

2.1 临床症状观察及洪湖碘泡虫镜检

在随机采集的 30 尾 2 龄健康异育银鲫(表 2)中都未观察到眼睛突出、口咽腔上壁红肿发炎等典型的临床症状。解剖取伪鳃过程中发现少数个体在副蝶骨和咽鳃骨间(图 1a)、伪鳃及动脉周边有黄褐色类结节(图 1b);这些类结节与成熟的胞囊结构明显不同,显微镜检后发现黄褐色类结节中充满洪湖碘泡虫“空壳化”的孢子(图 1c),极囊和孢质消失;偶见成熟孢子(图 1d);在其他器官均未检出明显的洪湖碘泡虫成熟胞囊和孢子。

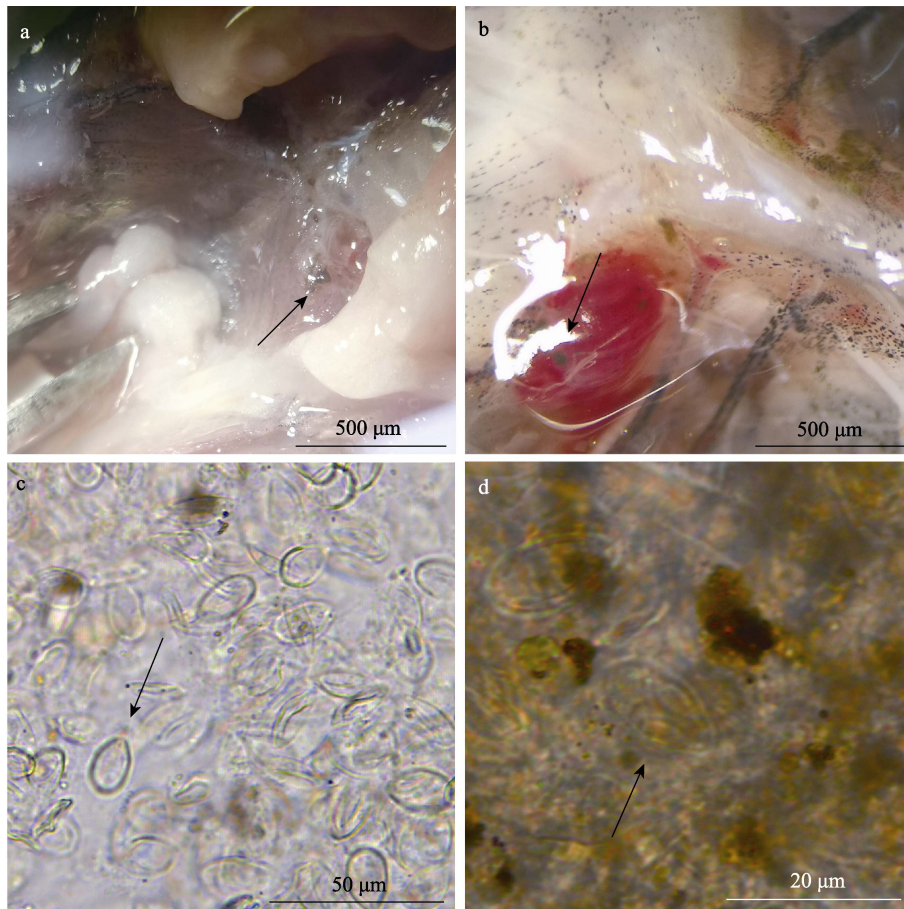


图 1 隐性感染 2 龄异育银鲫出现的黄褐色类结节和洪湖碘泡虫成熟孢子
 a. 咽上壁组织靠近副蝶骨的黄褐色类结节; b. 伪鳃和出伪鳃动脉周边的黄褐色类结节;
 c. 黄褐色类结节中的洪湖碘泡虫“空壳化”孢子; d. 黄褐色类结节中的洪湖碘泡虫成熟孢子.
 Fig. 1 Yellow-brown nodule-like lesions and spores detected in the covertly infected *Carassius auratus gibelio* with *Myxobolus honghuensis*
 a. Pseudotubercles near the parasphenoid and pharyngobranchial under the upper pharynx wall;
 b. Pseudotubercles near the pseudobranch and efferent pseudobranch artery;
 c. The shells of dead *M. honghuensis* spores; d. Mature spores of *M. honghuensis*.

2.2 异育银鲫不同组织器官的感染率

除了肌肉样品, 在异育银鲫的伪鳃、卵巢、鳃(丝)、脾脏、中肾、头肾、肝脏、血液都检测到洪湖碘泡虫, 感染率依次为 100.0%、83.3%、73.3%、70.0%、36.7%、23.3%、10.0%、6.7%; 其中, 伪鳃中的感染率最高, 且显著高于其他组织器官($P < 0.05$), 卵巢、鳃和脾脏感染率较高, 显著高于肝脏、中肾和血液中的($P < 0.05$)(表 2)。对各组织器官阳性样品的 PCR 产物进行挑选, 送至上海生工测序, 测序得到的 18S rDNA 序列在 NCBI 数据库中 BLAST 比对分析, 发现与洪湖碘泡虫 (MH329617) 一致, 确认为洪湖碘泡虫。

2.3 异育银鲫不同组织器官的感染强度

洪湖碘泡虫在隐性感染异育银鲫不同组织器官中的相对感染强度(载虫量/基因相对拷贝数)存在明显差异, 由高到低分别为伪鳃(14.4349 ± 70.0529)、卵巢(0.9556 ± 1.5627)、脾(0.3644 ± 0.7854)、鳃(0.3339 ± 0.2682)、头肾(0.2722 ± 0.3761)、中肾(0.0379 ± 0.1055)、肝脏(0.0019 ± 0.0022)、血液(0.0012 ± 0.0011)。其中, 伪鳃中的相对感染强度最高, 远高于其他组织; 同时, 伪鳃中洪湖碘泡虫相对基因拷贝数的波动范围最大, 不同异育银鲫个体的伪鳃感染强度存在较大差异。伪鳃中洪湖碘泡虫基因拷贝数在部分样本中出现非常大的异

表 2 隐性感染 2 龄异育银鲫各组织器官感染洪湖碘泡虫荧光定量 PCR 检测结果
 Tab. 2 Real-time PCR test of *Carassius auratus gibelio* covertly infected with *Myxobolus honghuensis*

样品编号 fish code	体重/g body weight	鳃(丝) gill	伪鳃 pseudobranch	脾脏 spleen	肝脏 liver	头肾 head kidney	中肾 middle kidney	卵巢 ovary	血液 blood	肌肉 muscle
1	41.7	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	43.9	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3	43.9	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	39.7	+	+	+	-	+	+	+	-	-
5	41.7	-	+	+	-	-	+	+	-	-
6	50.8	-	+	+	-	-	+	+	+	-
7	68.1	-	+	+	-	-	+	+	-	-
8	67.0	+	+	+	-	-	+	+	-	-
9	50.2	+	+	+	-	-	-	+	-	-
10	57.3	+	+	+	-	+	+	+	-	-
11	57.3	+	+	+	-	-	-	+	-	-
12	47.6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	53.6	+	+	-	-	-	-	+	-	-
14	45.0	+	+	+	-	-	+	+	-	-
15	47.1	+	+	-	-	-	+	+	-	-
16	38.6	+	+	-	-	-	-	+	-	-
17	37.9	+	+	-	+	-	-	+	-	-
18	54.7	-	+	-	-	-	-	-	-	-
19	51.7	+	+	+	+	-	+	+	+	-
20	38.1	+	+	+	-	-	-	+	+	-
21	37.5	+	+	+	-	+	+	+	-	-
22	48.3	+	+	+	-	-	-	+	-	-
23	41.5	+	+	+	-	+	-	+	-	-
24	35.8	-	+	-	-	-	-	+	-	-
25	32.9	+	+	+	-	+	-	+	-	-
26	42.5	+	+	+	-	+	-	+	-	-
27	43.2	+	+	-	-	-	+	+	-	-
28	27.1	+	+	+	-	-	-	+	-	-
29	34.7	+	+	-	-	+	-	+	-	-
30	27.4	-	+	-	-	-	-	-	-	-
感染率/% infection prevalence		73.3	100.0	70.0	10.0	23.3	36.7	83.3	6.7	0

注：“+”表示阳性结果；“-”表示阴性结果。

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

常值(图 2), 这些异常值与检查到黄褐色类结节个体的样本相对应。卵巢组织的感染强度仅次于伪鳃, 略高于鳃、脾脏和头肾。在卵巢组织部分样本中也出现较大异常值。

3 讨论

洪湖碘泡虫是引起异育银鲫苗种和成鱼发生

“喉孢子病”的重要寄生虫病原, 每年造成大量死亡。在此前的报道中, 洪湖碘泡虫在异育银鲫和金鱼^[13]的寄生部位主要为咽部, 鲜有寄生在其他组织器官的报道^[12-14]。由于粘孢子虫在鱼类宿主体内通常存在复杂的增殖和迁移过程, 使得粘孢子虫可能会随着寄生的发展而感染宿主的其他组织器官。如 Nylund 等^[15]发现主要寄生于大西洋鲑(*Salmo salar*)

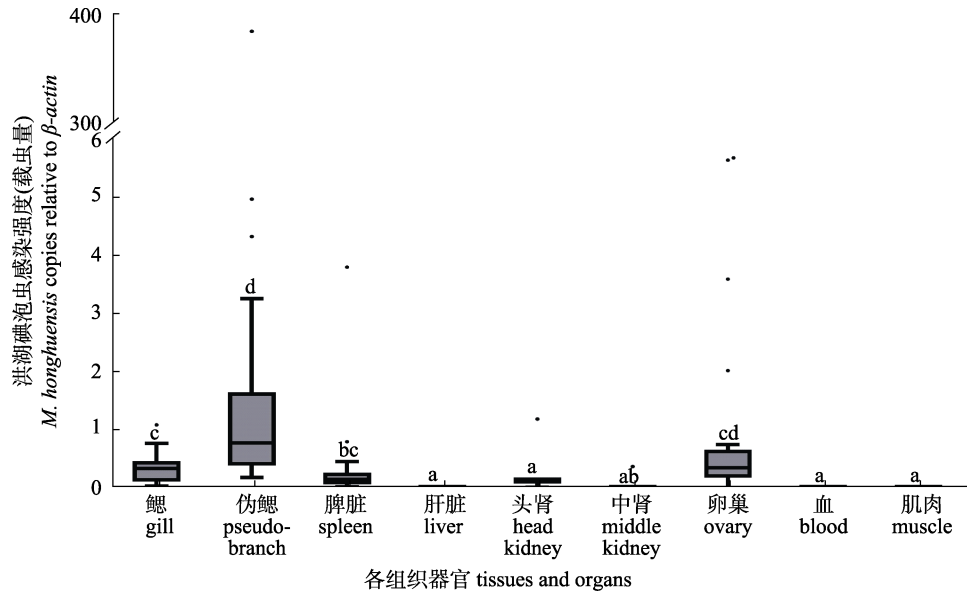


图 2 以洪湖碘泡虫 18S rDNA 相对异育银鲫 β -actin 基因拷贝数推测不同组织器官的相对感染强度

Fig. 2 Infection intensity of *Myxobolus honghuensis* in different organs inferred with the relative copies of 18S rDNA normalized to β -actin gene of gibel carp

伪鳃的伪鳃小囊虫(*Parvicapsula pseudobranchicola*) 在宿主的头肾、中肾、脾脏等其他组织器官中也存在感染。目前, 进一步深入研究发现, 洪湖碘泡虫可以感染异育银鲫的多个组织器官^[9-11], 并在这些组织器官中持续存在较长时间^[10]。

本研究通过荧光定量 PCR 检测方法发现洪湖碘泡虫在异育银鲫除肌肉以外的其他组织器官均有不同程度的感染, 其中伪鳃的感染率最高, 其次为卵巢、鳃、脾脏、肾脏等组织器官。研究结果与杨坤等^[10]和 Wang 等^[11]的结果基本一致; 但在本研究中所检测的异育银鲫样本中洪湖碘泡虫的感染率数值要更高。杨坤等^[16]对来自江苏地区隐性感染异育银鲫亲本检测后发现感染率为 50%; Wang 等^[11]对来自湖北地区隐性感染异育银鲫亲鱼检测后发现感染率为 84%; 而本研究所检测 2 龄异育银鲫隐性感染率高达 100%。不同报道中的差异可能与实验所采用的检测方法的灵敏度, 或不同批次样本感染率有关。罗丹等^[17]在对比洪湖碘泡虫不同 PCR 检测方法的灵敏性时发现 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法比常规 PCR 检测方法的灵敏度高出约 1000 倍, 荧光定量 PCR 检测方法具有更高的灵敏性。

在发生洪湖碘泡虫病的异育银鲫中主要出现咽部发炎红肿, 咽上壁后有大量细小的白色胞囊

和成熟的孢子, 在其他器官中却很少能发现明显的病变和成熟孢子^[5-8]。杨坤等^[16]通过荧光原位杂交检测发现在隐性感染的异育银鲫伪鳃、卵巢、肾脏和脾脏等组织中均有洪湖碘泡虫的前孢子生成细胞(营养体)。本研究通过荧光定量 PCR 检测进一步确认了洪湖碘泡虫在隐性感染异育银鲫多个组织器官中的系统性感染, 并且伪鳃的感染强度(载虫量)远高于其他组织器官。研究结果表明伪鳃是洪湖碘泡虫在异育银鲫体内主要的寄生位点和孢子发育成熟位点^[10], 可以作为“喉孢子虫病”早期检测和监测采样时的首选组织器官。目前, 研究发现硬骨鱼类伪鳃与第 1 鳃弓出鳃动脉相连, 能够接受富含氧的血液; 伪鳃上的嗜酸性细胞含有许多线粒体和丰富的碳酸酐酶, 具有调节内分泌、血氧监测等一系列功能^[18-22]。洪湖碘泡虫对伪鳃的组织偏好性, 以及在伪鳃中快速增殖并形成大量成熟孢子, 是由于营养需求还是免疫逃避在发挥作用, 需要进一步探讨。此外, 本研究在部分隐性感染异育银鲫的伪鳃周边发现一些黄褐色类结节, 这些伪鳃处存在黄褐色类结节的样本在荧光定量 PCR 检测时出现非常大的异常值, 表明洪湖碘泡虫在这些个体中出现了大量的增殖。这些类结节与正常胞囊结构明显不同, 在类结节内包裹着洪湖碘泡虫“空壳化”的和成熟的孢子。这

一现象可能是由于鱼体黑色素巨噬细胞对洪湖碘泡虫孢子的免疫反应造成的。

根据已有研究,目前国内养殖异育银鲫可能普遍具有较高的洪湖碘泡虫隐性感染率^[11,17]。本研究对卵巢组织进行洪湖碘泡虫基因拷贝数检测时也发现部分样本出现较大异常值,表明洪湖碘泡虫在卵巢中存在很高的丰度。由于洪湖碘泡虫已被发现存在随鱼卵传播的途径^[16],国内异育银鲫苗种繁育场又缺乏对亲本的病原检疫,因此,苗种携带病因和疾病随苗种扩散风险非常高。鉴于当前针对异育银鲫养殖中洪湖碘泡虫病依然缺乏确切有效的治疗药物^[2-3],或许可以从亲本和苗种环节通过检测和筛选,生产无特定病原(specific pathogen free, SPF)苗种,从而解决异育银鲫产业的洪湖碘泡虫病的问题。此外,目前对洪湖碘泡虫病的关注主要局限于养殖的异育银鲫,该寄生虫病原在自然条件下的地理分布以及其在银鲫和鲫属亲缘关系较近种类中的感染情况等仍需进一步研究。

本研究通过荧光定量检测详细分析了洪湖碘泡虫在隐性感染异育银鲫组织器官中的感染率和感染强度,掌握了洪湖碘泡虫在鱼体组织器官的分布规律和偏好性,为洪湖碘泡虫病的检验检疫、生态防控和进一步的致病机制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gui J F, Tang Q S, Li Z J, et al. Aquaculture in China[M]. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2018.
- [2] Xi B W, Xie J, Zhou Q L, et al. Mass mortality of pond-reared *Carassius gibelio* caused by *Myxobolus ampullacapsulatus* in China[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 93(3): 257-260.
- [3] Zhao Y L, Liu X H, Sato H, et al. RNA-seq analysis of local tissue of *Carassius auratus gibelio* with pharyngeal myxobolosis: insights into the pharyngeal mucosal immune response in a fish-parasite dialogue[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 99-112.
- [4] Guo Q X, Jia L, Qin J H, et al. Myxozoans and our dinner table: pathogenicity studies of *Myxobolus honghuensis* (myxosporea: Bivalvulida) using a suckling mice model[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(8): 653-660.
- [5] 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.]
- [6] Wang Z. Establishment and preliminary application of ELISA detection method of *Myxobolus honghuensis*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016. [王钊. 洪湖碘泡虫 ELISA 检测方法的建立与初步应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.]
- [7] Zhao D D. Life cycle of several freshwater myxozoans and taxonomy of actinosporean collective groups[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017. [赵丹丹. 几种淡水粘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.]
- [8] Li Z W, Lu H D, Cao G P, et al. Histopathology and pathophysiology of *Carassius auratus gibelio* infected by *Myxobolus pharynae*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1339-1350. [李振伟, 陆宏达, 操艮萍, 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.]
- [9] 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.]
- [10] Yang K, Zhai K X, Xi B W, et al. Tissue tropism of *Myxobolus honghuensis* in diseased and asymptomatic gibel carp, *Carassius auratus gibelio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(6): 1085-1093. [杨坤, 翟凯旋, 习丙文, 等. 洪湖碘泡虫在发病和隐性感染异育银鲫组织器官中的分布研究[J]. 水产学报, 2022, 46(6): 1085-1093.]
- [11] Wang S J, Zhang B, Guo Q X, 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.
- [12] Liu X C, Yang C Z, Zhao Y J. Redescription of *Myxobolus honghuensis* and identification on its genetic related species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 350-357. [刘晓聪, 杨承忠, 赵元君. 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.]
- [13] 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. [郭睿, 张善霖, 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.]
- [14] 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. [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.]
- [15] Nylund A, Hansen H, Brevik Ø J, et al. Infection dynamics and tissue tropism of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporidia) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Parasites & Vectors, 2018, 11(1): 17.
- [16] Yang K, Zhai K X, Xi B W, et al. Transovarial transmission of *Myxobolus honghuensis* in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*(Bloch)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(12): 1612-1620. [杨坤, 翟凯旋, 习丙文, 等. 异育银鲫寄生洪湖碘泡虫的鱼卵传播途径[J]. 中国水产科学, 2021, 28(12): 1612-1620.]
- [17] Luo D, Zhao Y L, Liu X H, et al. Development of a SYBR green 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.]
- [18] Meng Q W, Su J X, Li W D. Comparative anatomy of fishes[M]. Beijing: Science Press, 1987: 203-204. [孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 203-204.]
- [19] Munshi J S, Roy P K, Ghosh T K, et al. Cephalic circulation in the air-breathing snakehead fish, *Channa punctata*, *C. gachua*, and *C. marulius* (Ophiocephalidae, Ophiocephaliformes)[J]. The Anatomical Record, 1994, 238(1): 77-91.
- [20] Waser W P, Heisler N. Oxygen delivery to the fish eye: Blood flow in the pseudobranchial artery of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2004, 30(1): 77-85.
- [21] Bridges C R, Berenbrink M, Müller R, et al. Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question? [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 119(1): 67-77.
- [22] King J A C, Smith P R, Ashcraft J C, et al. Ultrastructure of the pseudobranch in the euryhaline cyprinodontid fish, *Rivulus marmoratus*[J]. Journal of Morphology, 1993, 218(2): 127-142.

Quantitative tissue distribution of *Myxobolus honghuensis* in covertly infected allogonogynetic gibel carp

ZHAI Kaixuan^{1,2}, CAO Zeyi^{1,2}, XI Bingwen^{1,2}, CHEN Kai², XIE Jun²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214081, China

Abstract: Pharyngeal myxosporidiosis, caused by *Myxobolus honghuensis*, is one of the most severe parasitic diseases in the cultured allogonogynetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch). The distribution of *M. honghuensis* in tissues and organs of covertly infected gibel carp was determined. Thirty 2-year-old fishes were collected from the pond, and the infection prevalence and intensity in gills, pseudobranch, spleen, liver, head kidney, middle kidney, ovary, blood, and muscle were detected via microscopic exam and quantitative PCR tests. Although the fishes did not display any obvious clinical signs, the real-time PCR tests revealed a 100% infection rate, and all fish used in this study had a covert infection of *M. honghuensis*. The infection prevalence of *M. honghuensis* in different tissues varied significantly (pseudobranch, 100%; ovary, 83.3%; gill, 73.3%; spleen, 70.0%; middle kidney, 36.7%; head kidney, 23.3%; liver, 10.0%; blood, 6.7%; and muscle, 0%). The infection intensity of *M. honghuensis* was inferred based on the relative expression of 18S rDNA normalized to the β -actin gene of fish host, and the real-time PCR data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The infection intensity in different tissues also was significantly different: pseudobranch, 14.4349 ± 70.0529 ; ovary, 0.9556 ± 1.5627 ; spleen, 0.3644 ± 0.7854 ; gill, 0.3339 ± 0.2682 ; head kidney, 0.2722 ± 0.3761 ; middle kidney, 0.0379 ± 0.1055 ; liver, 0.0019 ± 0.0022 ; and blood, 0.0012 ± 0.0011 . In conclusion, the pseudobranch of gibel carp is an important target organ in *M. honghuensis* infection, and should be considered as the first choice in future pathogen detection and disease surveillance.

Key words: *Myxobolus honghuensis*; pharyngeal myxosporidiosis; *Carassius auratus gibelio*; pseudobranch; tissue tropism

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