



鲫复合种隐性感染洪湖碘泡虫调查及遗传多样性分析

王立军^{1,2}, 周庆杰^{1,2}, 曹泽艺^{1,2}, 陈凯², 谢骏^{1,2}, 刁丙文^{1,2,3*}

(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, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 广西壮族自治区重要鱼类遗传育种与生态渔业产业技术工程研究中心, 广西 河池 547000)

摘要: 洪湖碘泡虫是中国异育银鲫养殖中常见的一种粘孢子虫, 严重感染时病鱼出现眼球凸起, 咽部发炎肿胀等症状, 造成苗种和成鱼死亡。为探究严重危害养殖异育银鲫“喉孢子虫病”病原的宿主范围以及不同宿主寄生虫株间的遗传差异, 本研究广泛采集了金鱼、红鲫、异育银鲫、彭泽鲫、方正银鲫、淇河鲫、金背鲫、杂交鲫等我国常见鲫复合种样品, 采用 18S *rDNA* PCR 检测了各样品伪鳃的洪湖碘泡虫感染率, 并进一步通过巢式 PCR 克隆测序获得部分样品洪湖碘泡虫的 ITS2 序列 (登录号: OR744899-OR744905)。PCR 检测结果显示, 来自 7 个地区 8 种鲫属鱼类品系都存在洪湖碘泡虫的隐性感染, 感染率为 25.0%~88.2%; ITS2 序列分析表明, 感染鲫复合种的洪湖碘泡虫株系间序列差异较低, 所获得的序列间仅有 6 个差异信息位点, 平均遗传距离为 0.003; 不同来源虫株间共存在 7 种单倍型, 其中 H1、H2 和 H3 只出现在金鱼、红鲫寄生虫株, H5 广泛存在不同来源的异育银鲫寄生虫株。系统发育分析显示, 来自不同鲫复合种的洪湖碘泡虫聚集为 2 个分支, 其中寄生金鱼的虫株与瓶囊碘泡虫亲缘关系较近。本研究结果为阐明异育银鲫“喉孢子虫病”的流行病学规律和防控疾病发生提供重要基础数据。

关键词: 鲫复合种; 洪湖碘泡虫; ITS2; 隐性感染率; 遗传多样性

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

洪湖碘泡虫 (*Myxobolus honghuensis*) 隶属于刺胞动物门 (Cnidaria) 粘孢子纲 (Myxosporaea) 碘泡科 (Myxobolidae) 碘泡属 (*Myxobolus*)^[1], 是引起异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)“喉孢子虫病”的重要寄生虫病原; 洪湖碘泡虫在异育银鲫中的感染率较高且地理分布广泛, 在江苏、江西、辽宁等地均有报道, 严重影响我国异育银鲫苗种培育和成鱼养殖^[2]。洪湖碘泡虫的流行季节在 5 月—10 月, 病害高发期为 5 月—7 月; 疾病感染发生早期无明显症状; 感染后期, 病鱼鱼体瘦弱, 头

背部发黑, 眼球凸起, 咽喉部充血红肿, 严重时咽部组织被大量孢囊取代, 鳃盖无法闭合, 并常伴随机械性损伤、继发性感染等, 最终导致病鱼死亡^[3-4]。

鲫 (*Carassius* spp.) 隶属于鲤科 (Cyprinidae) 鲫属 (*Carassius*), 是一类常见的淡水鱼。鲫环境适应能力强, 在我国分布广泛, 由于复杂的染色体倍性和独特的生殖方式, 具有丰富的遗传多样性和较大的表型差异, 并形成了许多地方特色的群体品系, 包括贵州金背鲫 (*C. gibelio* var. *jinbei*)、

收稿日期: 2023-11-06 修回日期: 2024-04-06

资助项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-45); 国家自然科学基金 (32073019)

第一作者: 王立军 (照片), 从事鱼类寄生虫研究, E-mail: 2022113006@stu.njau.edu.cn

通信作者: 刁丙文, 从事鱼类寄生虫学及寄生虫疾病防控研究, E-mail: xibw@firc.cn



江西彭泽鲫 (*C. gibelio* var. *pengze*)、河南淇河鲫 (*C. gibelio* var. *qihe*)、辽宁方正银鲫 (*C. gibelio* var. *fangzheng*) 等^[5-7]。与鲫同属变种的金鱼 (*C. auratus auratus*) 是由野生红黄色鲫选育而来, 在形态、体色上较鲫发生了很大变化, 作为观赏鱼具有巨大的经济价值^[8]。随着现代育种技术的不断发展, 我国学者选育、杂交等技术培育出许多生长快、个体大、适应性强、经济效益高的品种, 其中异育银鲫是我国目前养殖范围、养殖量最大的品种^[9]。

国内关于洪湖碘泡虫感染的研究主要集中于异育银鲫, 仅郭睿等^[10]曾报道一例金鱼暴发洪湖碘泡虫病。本研究团队在前期流行病学调查中发现洪湖碘泡虫在异育银鲫上具有较高的隐性感染率, 然而我国鲫属鱼类不同品系是否都可以感染洪湖碘泡虫以及感染不同品系鲫属鱼类的洪湖碘泡虫种群遗传差异尚未见研究报道。本研究对我国贵州、江西、河南、辽宁、江苏等地区的鲫属品系进行了洪湖碘泡虫隐性感染的调查, 利用 ITS2 分子标记探究感染不同品系鲫属样品的洪湖碘泡虫的遗传多样性, 旨在丰富洪湖碘泡虫的流行病学信息, 为“喉孢子虫病”防控提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究于 2022 年 5 月—2023 年 6 月, 从江西九江、安徽合肥、湖南岳阳和长沙、辽宁丹东、江苏无锡、河南淇县、贵州从江采集了 8 种不同品种的鲫属鱼类, 共 217 尾 (表 1)。所采样品都为 1 龄鱼 (15~30 g) 并送至中国水产科学研究院淡水渔业研究中心进行解剖检查, 采集伪鳃于 1.5 mL 离心管中 (每采集一个组织后所用剪刀及镊子都要冲洗干净, 使用 75% 乙醇擦拭, 防止交叉污染), 保存在 -20 °C 环境下, 用于后续分子检测。

本研究获得南京农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守水生动物实验室研究伦理规范, 并按照伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

将冻存组织样品于室温下解冻, 使用电动研磨器进行匀浆。采用磁珠法微量基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 提

取组织基因组 DNA, -20 °C 保存。

洪湖碘泡虫隐性感染 PCR 检测所使用的引物为本研究室前期以洪湖碘泡虫 18S *rDNA* 序列设计的引物组 MNF/MNR, 引物信息见表 2。25 μ L PCR 反应混合体系: 2 \times Taq Master Mix (Vazyme) 12.5 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, 模板 DNA 2.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L; 其中阴性对照组模板 DNA 由 ddH₂O 代替。PCR 反应扩增的条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 36 个循环; 72 °C 最终延伸 7 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定, 将所有阳性样品产物均送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序; 测序结果在 NCBI 数据库中进行序列比对进一步确定检测结果。

洪湖碘泡虫 ITS2 序列的 PCR 扩增测序

首先根据其 5.8S-ITS2-28S *rDNA* 序列设计巢式 PCR 检测的两对引物, 分别为 N3F/N3R (第一轮) 和 HH3F/HH3R (第二轮), 引物信息见表 2; 上述所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。两轮扩增采用的混合体系同上。第一轮扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 最终延伸 7 min。第二轮扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 最终延伸 7 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定, 将所有阳性样品产物均送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序; 测序结果在 NCBI 数据库中进行序列比对进一步确定检测结果。

1.3 DNA 序列分析

利用 SeqMan (DNASTAR) 软件对测序结果进行序列校对和编辑, 获得目标序列^[12]。将序列在 NCBI 核酸数据库中 BLAST 比对分析, 根据粘孢子虫物种的 SSU、5.8S 和 LSU 序列比对, 确定 ITS2 序列区域的起始和终止位置。采用系统发育分析软件 MEGA 7 软件的 Kimura two-parameter (K2P) 模型计算感染不同品系洪湖碘泡虫 ITS2 序列之间的遗传距离 (p-distance); 系统发育树分析以瓶囊碘泡虫 (*M. ampullicapsulatus*, JQ690374) 为外类群, 基于最佳模型 HKY, 采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 通过自展检验重复运算 1 000 次获得拓扑树支持率^[13]。将上述序列导入 DNAsp6 进行单倍型分析^[14]。

表 1 洪湖碘泡虫感染鲫复合种的 PCR 检测结果

Tab. 1 PCR results of *M. honghuensis*-infected *C. auratus* complex

采集时间 sampling time	采集地点 sampling site	品种名称 breed name	类别 category	亲本来源 parental origin	检测数量/ 尾 sample size	阳性数量/ 尾 positive	隐性 感染率/% covert infection
2022.05	江西九江 Jiangxi Jiujiang	彭泽鲫 <i>C. gibelio</i> var. pengze	选育种	野生彭泽鲫 <i>C. gibelio</i> var. pengze	34	30	88.2
2022.05	安徽合肥 Anhui Hefei	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	杂交种	银鲫E系、团头鲂、兴国红鲤 <i>C. auratus gibelio</i> 、 <i>Megalobrama amblycephala</i> 、 <i>Cyprinus carpio</i>	14	11	78.6
2022.05	湖南岳阳 Hunan Yueyang	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	杂交种	银鲫E系、团头鲂、兴国红鲤 <i>C. gibelio</i> 、 <i>M. amblycephala</i> 、 <i>C. carpio</i>	21	16	76.2
2022.05	湖南长沙 Hunan Changsha	红鲫 <i>C. auratus</i> var. red	选育种	红鲫 <i>C. auratus</i> var. red	10	7	70.0
2022.06	辽宁丹东 Liaoning Dandong	方正银鲫 <i>C. gibelio</i> var. fangzheng	选育种	方正银鲫 <i>C. gibelio</i> var. fangzheng	18	9	50.0
2022.08	江苏无锡 Jiangsu Wuxi	金鱼 <i>C. auratus</i>	选育种	草金鱼 <i>C. auratus</i>	30	6	25.0
2022.08	江苏无锡 Jiangsu Wuxi	杂交鲫 <i>Carassius</i> sp.	杂交种	日本白鲫 <i>C. cuvieri</i> (♀)×红鲫(♂) <i>C. auratus</i> var. red	30	15	50.0
2022.10	河南淇河 Henan Qihe	淇河鲫 <i>C. gibelio</i> var. qihe	选育种	淇河鲫 <i>C. gibelio</i> var. qihe	30	10	33.3
2023.06	贵州从江 Guizhou Congjiang	金背鲫 <i>C. gibelio</i> var. jinbei	选育种	金背鲫 <i>C. gibelio</i> var. jinbei	30	12	40.0

2 结果

2.1 洪湖碘泡虫感染率统计

对采自 7 个省份 8 个鲫群体进行 PCR 检测, 结果显示, 所检测的 8 个鲫群体均携带洪湖碘泡虫; 在检测的 217 尾鲫样品中, 116 尾 (53.5%, 116/217) 样品检测结果为阳性 (图 1); 其中, 江西九江彭泽鲫感染率为 88.2%, 安徽、湖南异育银鲫感染率分别为 78.6%、76.2%, 湖南长沙红鲫感染率为 70.0%, 辽宁丹东方正银鲫、江苏无锡杂交鲫感染率均为 50.0%, 贵州从江金背鲫感染率为 40.0%, 河南淇县淇河鲫感染率为 33.3%, 江苏无锡金鱼感染率为 25.0% (表 1)。对各个阳性样品的 PCR 产物挑选后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序得到的 18S *rDNA* 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 确认为洪湖碘泡虫 (MH329617)。

2.2 洪湖碘泡虫遗传多样性分析

本研究从鲫复合种样品经巢式 PCR 克隆的 96 份产物, 由于产物的核酸浓度较低, 送测序仅成功获得 20 个样品的洪湖碘泡虫 ITS2 序列 (表 3)。将获得的所有洪湖碘泡虫 ITS2 序列进行比对分析, 结果显示, 在长度为 243 bp 的 ITS2 序列上, 共

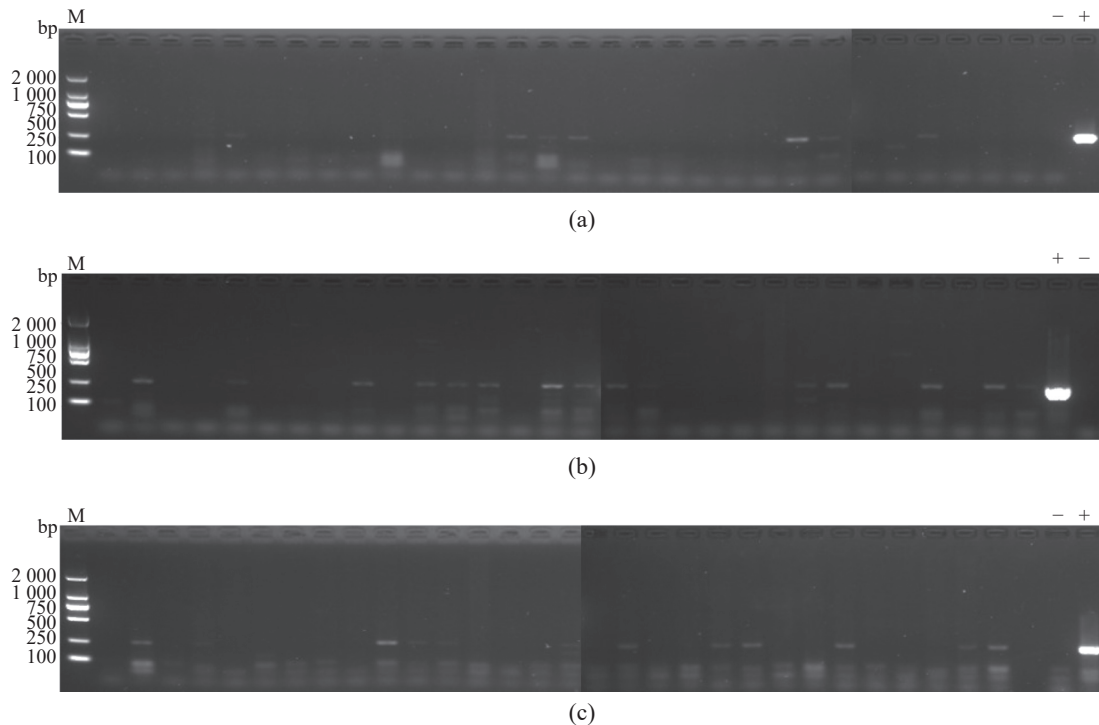
有 6 个变异信息位点。单倍型分析显示, 本研究检测洪湖碘泡虫样品存在 7 种单倍型。感染红鲫的虫株在第 87 位点存在变异, 形成单倍型 H1; 感染金鱼的虫株在第 30 和 163 位点存在变异, 形成单倍型 H2 和 H3; 感染方正银鲫的虫株在第 87 和 134 位点存在变异, 形成单倍型 H4 和 H5; 感染杂交鲫的虫株在第 87 和 189 位点存在变异, 形成单倍型 H5 和 H6; 感染金背鲫的虫株在第 87 和 201 位点存在变异, 形成单倍型 H5 和 H7; 感染异育银鲫 (湖南岳阳、安徽合肥)、淇河鲫和彭泽鲫的虫株在第 87 位点存在变异, 形成单倍型 H5。遗传距离分析显示, 感染鲫复合种的洪湖碘泡虫的遗传距离范围为 0.000~0.008, 平均遗传距离为 0.003 (图 2)。

基于 ITS2 序列的系统发育分析表明, 除外类群瓶囊碘泡虫外, 来自鲫复合种的洪湖碘泡虫聚集为一个大的分支, 其中来自金鱼样品的洪湖碘泡虫 (单倍型 H2 和 H3) 聚集为一个亚分支, 并且位于基部, 与瓶囊碘泡虫的亲缘关系较其他来源样品更近。来自红鲫 (H1)、方正银鲫 (H4 和 H5)、淇河鲫 (H5)、彭泽鲫 (H5)、异育银鲫 (H5)、金背鲫 (H5 和 H7) 及杂交鲫 (H5 和 H7) 的洪湖碘泡虫单独聚为一个亚分支。

表 2 本研究所用 PCR 引物信息

Tab. 2 Information of PCR primers used in this study

基因 gene	引物 primer	序列 sequence	T_m 值/ $^{\circ}\text{C}$ T_m value	来源 source
18S <i>rDNA</i>	MNF	GTCCGGACATCGAAAGGAT	54.50	[11]
18S <i>rDNA</i>	MNR	AGCGAGCCCAGAATGCTAC	57.97	[11]
ITS2	N3F(外引物)	ACGGTGGATCACTTGGTTCG	60.32	本研究
ITS2	N3R(外引物)	GCCACACCCTTTTACAGATGC	59.80	本研究
ITS2	HH3F(内引物)	AAGAACGTGGCAAATGCGATAAT	55.11	本研究
ITS2	HH3R(内引物)	CACCCCTTTTACAGATGCTGCTT	55.54	本研究

图 1 鲫复合种感染洪湖碘泡虫的 18S *rDNA* PCR 检测凝胶电泳

(a) 洪河鲫、(b) 杂交鲫、(c) 金背鲫; M. DL 2000 marker、+、- 阳性对照、- 阴性对照; 部分结果呈现。

Fig. 1 18S *rDNA* PCR detection of *M. honghuensis* in *C. auratus* complex samples

(a) *C. gibelio* var. qihe, (b) *Carassius* sp., (c) *C. gibelio* var. jinbei, M. DL 2000 marker, +, - positive control, -, negative control; partial results shown.

3 讨论

洪湖碘泡虫是引起“喉孢子虫病”的重要寄生虫病原, 国内关于其宿主范围的研究相对匮乏, 以往报道仅集中于异育银鲫^[1,11,15-17]。翟凯旋等^[15]在洪湖碘泡虫感染异育银鲫组织偏好性的研究中, 对 30 尾无明显临床症状的异育银鲫进行检测, 发现洪湖碘泡虫隐性感染率为 100%, 在伪鳃部位洪湖碘泡虫检出率 100%; Wang 等^[18]采用巢式 PCR 检测了湖北鄂州、团风孵化场的 25 尾雌性异育银鲫的洪湖碘泡虫感染情况, 结果显示, 感染率高达 84.0%; 杨坤等^[19]在探究异育银

鲫寄生洪湖碘泡虫是否存在经卵传播途径时, 发现所采用的 34 尾异育银鲫母本的洪湖碘泡虫隐性感染率达 50%~75%。此外, 郭睿等^[10]首次在发病金鱼咽部鉴定和报道了洪湖碘泡虫。我国鲫属鱼类品系众多, 地理分布广泛, 除异育银鲫、金鱼以外的其他鲫复合种是否也被洪湖碘泡虫感染仍然未知。本研究基于前期的结果, 首次调查了中国不同地区不同品系鲫感染洪湖碘泡虫的情况, 发现来自 7 个地区 8 种品系鲫均存在洪湖碘泡虫的隐性感染, 彭泽鲫(江西九江)、异育银鲫(安徽合肥和湖南岳阳)、红鲫(湖南长沙)、方正银鲫(辽宁丹东)及杂交鲫(江苏无锡)隐性感染率较高,

表 3 洪湖碘泡虫 ITS2 序列测序统计表

Tab. 3 ITS2 sequences of *M. honghuensis* obtained and its haplotypes

宿主品种(采集地点) host breed (locality)	送测样品数量/尾(成功样品) sequencing no.(successful no.)	单倍型 haplotype	GenBank 登录号 GenBank accession no.
红鲫(湖南长沙) <i>C. auratus</i> var. red (Hunan Changsha)	7 (1)	H1	OR744899
金鱼(江苏无锡) <i>C. auratus</i> (Jiangsu Wuxi)	6 (3)	H2、H3	OR744900、OR744901
方正银鲫(辽宁丹东) <i>C. gibelio</i> var. fangzheng (Liaoning Dandong)	9 (2)	H4、H5	OR744902、OR744905
异育银鲫(安徽合肥) <i>C. auratus gibelio</i> (Anhui Hefei)	11(2)	H5	OR744905
异育银鲫(湖南岳阳) <i>C. auratus gibelio</i> (Hunan Yueyang)	9 (3)	H5	OR744905
淇河鲫(河南淇县) <i>C. gibelio</i> var. qihe (Henan Qixian)	8 (1)	H5	OR744905
彭泽鲫(江西九江) <i>C. gibelio</i> var. pengze (Jiangxi Jiujiang)	14(2)	H5	OR744905
杂交鲫(江苏无锡) <i>Carassius</i> sp. (Jiangsu Wuxi)	15(2)	H5、H6	OR744905、OR744903
金背鲫(贵州从江) <i>C. gibelio</i> var. jinbei (Guizhou Congjiang)	12(4)	H5、H7	OR744905、OR744904

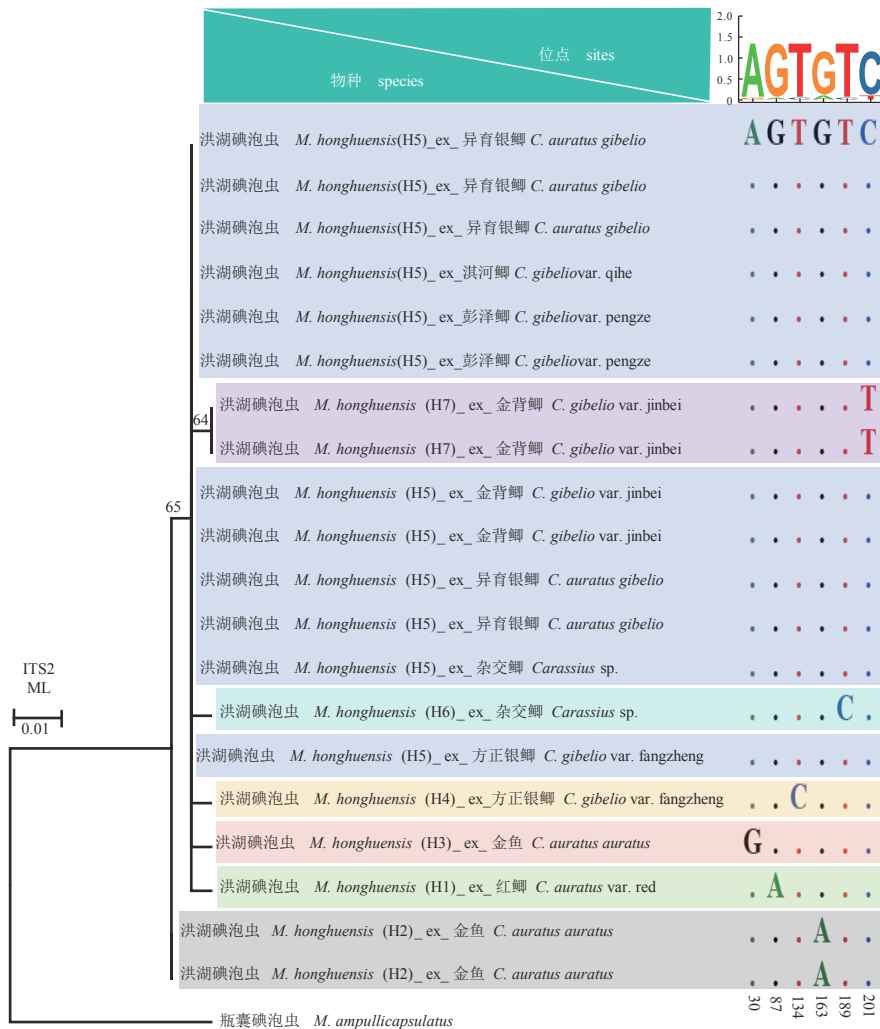


图 2 基于 ITS2 序列的 ML 分析构建的洪湖碘泡虫系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *M. honghuensis* isolates generated by ML analysis with ITS2 sequences

为 50.0%~88.2%; 草金鱼(江苏无锡)、淇河鲫(河南淇县)及金背鲫(贵州从江)隐性感染率为 25.0%~40.0%, 结果说明鲫复合种携带洪湖碘泡虫的普遍性, 同时表明洪湖碘泡虫在我国具有广泛的地理分布。因此, 本研究首次报道了杂交鲫、红鲫、方正银鲫、金背鲫和淇河鲫中均存在洪湖碘泡虫的隐性感染, 然而在养殖生产中这些品种很少有暴发洪湖碘泡虫“喉孢子虫病”的相关报道。我国广泛养殖品种的异育银鲫和重要观赏鱼品种的金鱼可能在贸易或引种的过程中进入到不同地区, 其中部分携带洪湖碘泡虫病原的个体进入当地的自然或养殖水体中, 从而造成洪湖碘泡虫在鲫属鱼类之间的传播扩散, 导致其感染的普遍性和广泛的地理分布。另外, 值得注意的是本研究中的杂交鲫是通过杂交选育获得的, 其亲本为白鲫和红鲫; 本研究发现红鲫和杂交鲫都存在隐性感染情况。那么, 白鲫是否也存在洪湖碘泡虫感染? 由于本研究未能获得相关样本, 仍然需要有待进一步调查分析。

中国境内的土著鲫属鱼类从形态学上可分为欧鲫和鲫; 欧鲫主要分布在新疆额尔齐斯河流域, 鲫广泛分布在从南到北不同水系。白鲫(*C. cuvieri*)原产于日本, 为我国引进外来品种。鲫曾存在 2 个指名亚种(*C. auratus auratus*)和银鲫亚种(*C. auratus gibelio*); 近年来基于基因组测序和染色体分型研究将其划分为 2 个独立物种, 既具有性生殖的双二倍体鲫(AABB)和单性雌核生殖的双三倍体银鲫(AAABBB)^[20]。本研究发现洪湖碘泡虫除了感染主要养殖品种异育银鲫外, 还可以广泛感染鲫的其他品系。那么, 感染鲫复合种的洪湖碘泡虫, 其不同宿主来源的虫株是否存在遗传差异? 18S *rDNA* 和 28S *rDNA* 作为分子标记广泛应用于粘孢子的分类和鉴定研究, 但二者具有高度的保守性, 较低的序列差异不适用于种群内遗传变化分析; 然而非编码区基因 ITS 由于受到的选择压力较小, 进化速度更快, 能提供更多的变异位点和信息位点, 更适合作为分析种内遗传变异的标记基因^[21-26]。本研究采用洪湖碘泡虫 5.8S-ITS2-28S *rDNA* 序列设计了两对引物 N3R/N3F 和 HH3R/HH3F, 建立了一种灵敏度较高的巢式 PCR 检测方法来探究鲫复合种所感染的洪湖碘泡虫的遗传多样性。研究结果显示, 感染鲫复合种洪湖碘泡虫的 ITS2 序列存在 6 个差异信息位点, 不同来源虫株间的平均遗传距离为 0.003。在鱼类寄生粘孢子虫 *Kudoa thyrsites*, *M. cerebr-*

<https://www.china-fishery.cn>

ralis 和 *Tetracapsuloides bryosalmonae* 中, 基于 ITS1 序列的遗传多样性分析发现, 其种群内的 ITS1 变异范围从 4.8% 到 43.5%^[22-23, 27]。尽管研究所用的分子标记不同, 但本研究所检测出的较低序列差异, 表明鲫复合种感染洪湖碘泡虫的虫株间遗传变异较小。另一方面, 本研究发现在感染鲫类群(红鲫和金鱼, 二倍型群体)的洪湖碘泡虫 4 条序列中就具有 3 个单倍型(H1、H2 和 H3), 其所具有的多样性高于银鲫类群(异育银鲫、方正银鲫、彭泽鲫、淇河鲫、金背鲫; 三倍型群体)的 16 条序列 3 个单倍型(H4、H5 和 H7); 系统发育分析表明, 感染金鱼的虫株较其他宿主来源的洪湖碘泡虫与外类群瓶囊碘泡虫亲缘关系更近。因此, 我们推测金鱼和红鲫类群可能是洪湖碘泡虫的原始宿主; 单倍型 H5 在不同银鲫类群(异育银鲫、方正银鲫、彭泽鲫、淇河鲫、金背鲫)广泛存在, 可能由于近期洪湖碘泡虫感染传播扩散。

致谢: 本研究在样品采集过程中受到湖南省水产科学研究所宋锐、高金伟, 河南省水产科学研究院张芹, 贵州省水产研究所张效平, 安徽省农业科学院水产研究所蒋阳阳, 黑龙江水产研究所程磊, 辽宁省淡水水产科学研究院闫有利等慷慨帮助。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 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, doi: 10.1007/s00436-011-2629-4.
 - [2] 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(3): 257-260.
 - [3] 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.
- 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 Hydrobio-*
- 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- logica Sinica, 2020, 44(2): 268-274 (in Chinese).
- [4] 贾洛. 洪湖碘泡虫抗体的制备及其特异性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
Jia L. Development and specificity assessment of antibodies for *Myxobolus honghuensis* (Myxosporidia: Bivalvulida)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016(in Chinese).
- [5] 董传举, 李学军, 孙效文. 我国鲫种群遗传多样性及起源进化研究进展 [J]. 水产学报, 2020, 44(6): 1046-1062.
Dong C J, Li X J, Sun X W. Research progress of the genetic diversity, origin and evolution of *Carassius auratus* in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(6): 1046-1062 (in Chinese).
- [6] 程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分 [J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 463-472.
Cheng L, Chang Y M, Lu C Y, et al. DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*[J]. Zoological Research, 2012, 33(5): 463-472 (in Chinese).
- [7] Takada M, Tachihara K, Kon T, et al. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia[J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 7.
- [8] Chen D, Zhang Q, Tang W Q, et al. The evolutionary origin and domestication history of goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States Of America, 2020, 117(47): 29775-29785.
- [9] 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.
- [10] 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.
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).
- [11] 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 [J]. 水产学报, 2022, 46(6): 1085-1093.
Yang K, Zhao 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 (in Chinese).
- [12] Swindell S R, Plasterer T N. SEQMAN. Contig assembly[J]. Methods in Molecular Biology, 1997, 70: 75-89.
- [13] 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.
- [14] Rozas J, Ferrer-Mata A, Carlos Sánchez-DelBarrio J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [15] 翟凯旋, 曹泽艺, 习丙文, 等. 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 [J]. 中国水产科学, 2022, 29(7): 1101-1107.
Zhai K X, Cao Z Y, Xi B W, et al. Quantitative tissue distribution of *Myxobolus honghuensis* in covertly infected allogynogynetic gibel carp[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(7): 1101-1107 (in Chinese).
- [16] 王钊, 王好, 钱爱东, 等. 一例查干湖异育银鲫洪湖碘泡虫病原的鉴定与生物信息学分析 [J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(5): 509-513.
Wang Z, Wang H, Qian A D, et al. Identification and bioinformatics of pathogen *Myxobolus honghuensis* found in silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* in Qagan Lake[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(5): 509-513 (in Chinese).
- [17] 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* et al. 2012 and identification on ITS genetic related species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 350-357 (in Chinese).
- [18] 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.
- [19] 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.

- 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 (in Chinese).
- [20] Wang Y, Li X Y, Xu W J, *et al.* Comparative genome anatomy reveals evolutionary insights into a unique amphitriploid fish[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2022, 6(9): 1354-1366.
- [21] 高永杰, 杨承忠, 赵元著. 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.
- Gao Y J, Yang C Z, Zhao Y J. Population geography of *Henneguya doneci* base on ITS-5.8Sr DNA[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2015, 32(3): 48-53 (in Chinese).
- [22] Whipps 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, doi: [10.3354/dao060105](https://doi.org/10.3354/dao060105).
- [23] Whipps C M, Kent M L. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea)[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, 53(5): 364-373.
- [24] Atkinson S D, Bartholomew J L. Disparate infection patterns of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) correlate with internal transcribed spacer-1 sequence variation in the parasite[J]. *International Journal for Parasitology*, 2010, 40(5): 599-604.
- [25] Fiala I. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis[J]. *International Journal for Parasitology*, 2006, 36(14): 1521-1534.
- [26] Andree K B, El-Matbouli M, Hoffman R W, *et al.* Comparison of 18S and ITS-1 rDNA sequences of selected geographic isolates of *Myxobolus cerebralis*[J]. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29: 771-775.
- [27] Henderson M, Okamura B. The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America[J]. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 2004, 271(1549): 1729-1736.

Investigation on covert infection of *Myxobolus honghuensis* in *Carassius* spp. complex and genetic diversity

WANG Lijun^{1,2}, ZHOU Qingjie^{1,2}, CAO Zeyi^{1,2}, CHEN Kai², XIE Jun^{1,2}, XI Bingwen^{1,2,3*}

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

2. Key Laboratory of Integrated Rice-Fish Farming Ecology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Guangxi Engineering Research Center of Fish Genetic Breeding and Ecosystem-based Fisheries, Hechi 547000, China)

Abstract: The myxosporean parasite *Myxobolus honghuensis* commonly infects farmed gibel carp (*Cauratus auratus gibelio*) in China. Heavy infections are associated with pop-eye, inflammation of pharyngeal wall and sever mortality in *C. auratus gibelio* and *Carassius auratus* var. red populations. In order to investigate the host range of *M. honghuensis* causing pharyngeal myxosporidiosis in pond cultured *C. gibelio* and the genetic differences among different strains, we collected a diverse range samples of *C. auratus* complex, including *C. auratus*, *C. auratus* var. red, *C. auratus gibelio*, *C. auratus gibelio* var. pengze, *C. auratus gibelio* var. qihe and *C. auratus gibelio* var. jinbei, a hybrid lineage of *C. cuvieri* (♀) and *C. auratus* var. red (♂), and a hybrid lineage of *Cyprinus carpio* (♀) and *C. auratus* var. red (♂). The infection prevalence of *M. honghuensis* in samples was determined using 18S *rDNA* PCR, and new ITS2 sequences of *M. honghuensis* were obtained through nested PCR (GenBank accession number: OR744899-OR744905). 18S *rDNA* PCR analysis revealed that all samples detected in this study were infected by *M. honghuensis*, and asymptomatic infection prevalence ranged from 25.0% to 88.2%. ITS2 sequences analysis showed only six distinct informative loci among the isolates of *M. honghuensis* from different fish host, and the average genetic distance was 0.003. Additionally, there were seven haplotypes identified among different isolates; H1, H2 and H3 were present only in goldfish and *C. auratus* var. red, while H5 was widely distributed in the samples of *C. auratus gibelio* of different breeds and localities. Phylogenetic analysis demonstrated that *M. honghuensis* isolated from *C. auratus* complex formed two distinct clades; notably, the strain found in goldfish displayed much closer relationship to *M. ampullicapsulatus*, which was commonly found on the gill of *C. auratus gibelio*. In conclusion, the results of this study provide crucial foundational data for understanding the epidemiology for pharyngeal myxosporidiosis in *C. auratus gibelio* as well as developing prevention and control strategies against the disease.

Key words: *Carassius auratus* complex; *Myxobolus honghuensis*; ITS2; covert infection; genetic diversity

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

Funding projects: China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45); National Natural Science Foundation of China (32073019)