

## 武汉单极虫生活史中放射孢子虫的发现及鉴定

习丙文<sup>1,2\*</sup>, 李鹏<sup>3</sup>, 陈凯<sup>1</sup>, 章晋勇<sup>4</sup>, 谢骏<sup>1</sup>

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

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070;

3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

4. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 鲫养殖中粘孢子虫病非常严重, 为掌握其病原的感染传播途径, 实验通过粘孢子虫生活调查研究, 在底栖寡毛类苏氏尾鳃蚓体内发现了一种放射孢子虫。该放射孢子虫的孢子无孢柄; 孢体顶面观和侧面观都呈近卵圆形, 长 $(19.8 \pm 1.3) \mu\text{m}$ , 宽 $(18.2 \pm 1.1) \mu\text{m}$ ; 3个极囊梨形, 呈点状聚集分布在孢体顶端, 极囊长 $(4.53 \pm 0.4) \mu\text{m}$ , 宽 $(3.4 \pm 0.4) \mu\text{m}$ ; 3个尾柄几乎等长, 刺状, 从孢体基部向下伸展, 尾柄间夹角 $>100^\circ$ , 尾柄长 $(195.0 \pm 15.7) \mu\text{m}$ , 宽 $(11.5 \pm 0.8) \mu\text{m}$ 。根据形态特征将其划归为橘瓣放射孢子虫集合类群。18S rDNA序列分析表明该放射孢子虫与鲫体表寄生武汉单极虫为同一物种, 序列相似率为99.8%~100%。序列系统发育分析进一步发现单极虫类群中多数种类的放射孢子虫阶段主要寄生在苏氏尾鳃蚓体内。本研究首次发现和报道了鲫寄生武汉单极虫生活史中寡毛类宿主及其放射孢子虫的形态特征, 为鲫粘孢子虫病生态防控提供重要的基础资料。

**关键词:** 鲫; 武汉单极虫; 放射孢子虫; 生活史; 粘孢子虫病

**中图分类号:** Q 958.9; S 941.52

**文献标志码:** A

武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis*)隶属于后生动物亚界(Metazoa), 粘体动物门(Myxozoa), 粘孢子虫纲(Myxosporea), 双壳目(Bivalvulida), 是一种非常重要的水生动物寄生虫病原, 主要寄生在鲫(*Carassius auratus*)鳞片下的表皮上, 形成隆起的椭圆形包囊<sup>[1-3]</sup>。异育银鲫(*C. auratus gibelio*)苗种期严重感染武汉单极虫会大量死亡, 每年6-8月是该病的高发期。然而, 武汉单极虫病的防控目前缺乏有效的治疗药物。Wang等<sup>[1]</sup>通过初步实验发现投喂烟曲霉素(fumagillin)对异育银鲫武汉单极虫病有很好的疗效。但烟曲霉素药物非常昂贵, 一直没有在水产养殖中使用。此外, 由于国内对鱼类粘孢子虫生物学研究的匮乏, 对武汉单极虫的感染传播途径、生活史、与宿主间相互作用等都不清楚, 无法实现

实验室的人工感染、药物筛选和评价等方面的研究。

自Wolf等<sup>[4]</sup>首次发现虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)脑粘体虫(*Myxobolus cerebralis*)生活史存在交替宿主正颤蚓(*Tubifex tubifex*)和放射孢子虫(actinosporean)后, 粘孢子虫的生活史研究受到鱼病学家的广泛关注。目前, 约50多种粘孢子虫的生活史通过传统实验感染或DNA分子序列分析等方法被进一步发现和报道<sup>[5-6]</sup>。在粘孢子虫生活史中, 水体底栖寡毛类环节动物[如颤蚓(*Tubifex* sp.)、水丝蚓(*Limnodrilus* sp.)和苏氏尾鳃蚓(*Branchiura sowerbyi*)等]被普遍认为是鱼类宿主外的主要交替宿主。寡毛类宿主摄食粘孢子虫孢子后, 在肠上皮细胞间发生有性增殖并释放出成熟的放射孢子虫; 放射孢子虫悬浮在水体中, 与鱼类

收稿日期: 2015-12-03 修回日期: 2016-01-14

资助项目: 国家自然科学基金(31302222); 江苏省自然科学基金(BK2011182); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 江苏省水产三新工程(D2015-13)

通信作者: 习丙文, E-mail: xibw@ffrc.cn

宿主相遇后侵入其体内<sup>[7]</sup>。截至目前已报道的放射孢子虫有150多种,形态多样;根据其孢体(spore body)、尾柄(caudal process)和孢柄(style)等形态特征被划分为20个集合类群(collective group)<sup>[5-6,8-11]</sup>。然而,目前已知的放射孢子虫和粘孢子虫组合,以及放射孢子类群和粘孢子类群间不存在明显一致的对应关系<sup>[12]</sup>。

鲫是我国重要的大宗淡水养殖品种,以江苏、湖北、广东等地养殖量最大<sup>[13]</sup>。在鲫养殖中粘孢子虫病危害非常严重,如“喉孢子虫病”(洪湖碘泡虫病)、“肝孢子虫病”(吴李碘泡虫病)、“肤孢子虫病”(武汉单极虫病)等,每年都有鱼苗、成鱼大量死亡,给养殖户造成严重经济损失。在江苏鲫养殖池塘开展粘孢子虫流行病学调查过程中,从池塘底泥苏氏尾鳃蚓体内发现多种放射孢子虫<sup>[14-15]</sup>,基于18S rDNA序列分析表明,其中一种放射孢子虫与鲫寄生武汉单极虫完全一致。本研究描述了该放射孢子虫的形态特征,并结合18S rDNA序列分析鉴定出其鱼体寄生粘孢子虫种类。

## 1 材料与方法

### 1.1 底泥寡毛类采集

采集池塘5~8 cm厚的底泥,用40目筛网筛去泥和杂质,挑出寡毛类(主要为苏氏尾鳃蚓)放入装有池塘水的敞口容器中带回实验室。用曝气的自来水冲洗3次后,将每条尾鳃蚓分别转入一次性塑料水杯中,加2~4 mL 曝气的自来水放置室温20~25 °C暂养。寡毛类物种鉴定参照《中国小蚓类研究》<sup>[16]</sup>。

### 1.2 放射孢子虫检查和采集

每天从暂养杯中吸取1 mL水样加入浮游生物计数框和凹面载玻片中,先用Olympus CX-31显微镜的10倍物镜检查,较小的放射孢子虫在40倍物镜下进一步观察。放射孢子虫形态采用图森(TAC-9.0C)图像软件进行拍摄,形态特征数据测量采用软件自带测量工具,用于提取基因组DNA的放射孢子虫样品,采用10 µL吸头在显微镜下从视野中收集约100个孢子,-20 °C保存待用。每次暂养杯中水样的检查都要更换吸管、吸头,避免交叉污染。

### 1.3 放射孢子虫18S rDNA序列扩增

基因组DNA提取采用Mag-MK磁珠法(磁珠法微量基因组DNA抽提试剂盒,上海生工)。18S rDNA序列片段扩增采用引物MyxospecF(TTCTGCCCTATCAACTWGTG)和MyxospecR(GGTTTCNCDGRGGGMCCAAC)<sup>[17]</sup>。PCR反应溶液(50 µL)体系:10×PCR buffer(Mg<sup>2+</sup>) 5 µL, dNTP Mixture 4 µL, 正反向引物(10 µM)各2 µL, TaKaRa Ex Taq (5 U/µL) 0.3 µL, 基因组DNA 3 µL, 补灭菌水至50 µL。反应程序设置为94 °C预变性5 min, 30个循环; 94 °C变性30 s; 54 °C退火45 s; 72 °C延伸60 s; 72 °C末端加尾7 min。PCR反应的阴性和阳性对照分别以灭菌纯水和实验室保存的洪湖碘泡虫DNA为模板。PCR阳性产物分2份送生工生物工程(上海)股份有限公司分别克隆测序和引物直接测序。

### 1.4 DNA 序列分析

样品测序片段采用SeqMan (Lasergen package, DNASTar Inc.)生物软件检查和拼接。序列比对采用Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)在NCBI GenBank数据库中检索登录的同源序列。序列一致性和DNA碱基替换最佳模型分析采用MEGA 6.0<sup>[18]</sup>; 测序获得序列和GenBank中部分粘孢子虫18S rDNA序列间的系统进化分析采用最小进化法(minimum evolution, ME)和最大似然法(maximum likelihood, ML), 模型参数设置为(Tamura 3-parameter + G), 分支节点的支持率采用Bootstrap 1000次检验。

## 2 结果

2015年5月在江苏溧阳鲫种养殖池塘(31°18' N, 119°28' E)底泥采集到的寡毛类主要是苏氏尾鳃蚓(图1), 虫体粗壮, 淡红色, 尾部具有成对鳃丝。在采集到的400条苏氏尾鳃蚓中共发现了9种放射孢子虫, 分别属于4种不同的放射孢子虫集合类群: 三突放射孢子虫(triactinomyxon)1种、橘瓣放射孢子虫(aurantiactinomyxon)2种、新型放射孢子虫(neoactinomyxum)5种和雷氏放射孢子虫(raabeia)1种。本研究描述的放射孢子虫归属于橘瓣放射孢子虫类群, 感染率为1%(4/400)。苏氏尾鳃蚓在暂养1周内, 每天都能检测到放射孢子虫释放, 此后由于苏氏尾鳃蚓没有摄食, 虫体瘦弱, 释放量逐渐减少。



图 1 池塘底泥采集到感染武汉单极虫的苏氏尾鳃蚓

Fig. 1 *B. sowerbyi* releasing the *T. wuhanensis* actinospore

## 2.1 橘瓣放射孢子虫 LY

由于该类型放射孢子虫发现于江苏溧阳 (Liyang), 遵循放射孢子虫命名习惯将其命名为 aurantiactinomyxon type LY (图2, 3)。

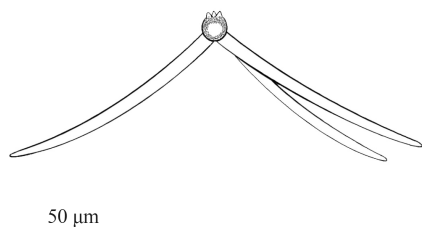


图 2 武汉单极虫的放射孢子虫模式图

Fig. 2 Line drawing of the *T. wuhanensis* actinospore

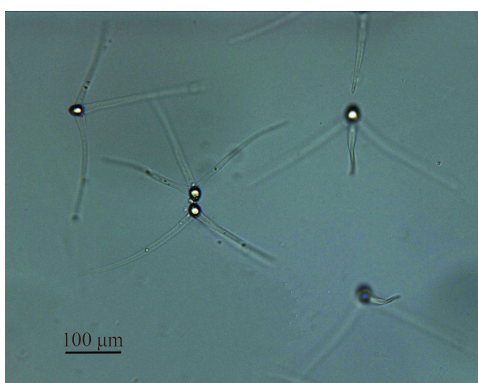


图 3 水体中悬浮的武汉单极虫的放射孢子虫

Fig. 3 Fresh floating actinospores released by *B. sowerbyi*

形体特征: 孢子不互相连接, 无孢柄; 孢体顶面观和侧面观都呈近卵圆形; 3个极囊梨形, 呈点状聚集分布在孢体顶端; 3个尾柄几乎等

长, 刺状, 从孢体基部向下伸展, 尾柄间夹角 $>100^{\circ}$ 。尾柄长 $(195.0\pm15.7)\mu\text{m}$ , 宽 $(11.5\pm0.8)\mu\text{m}$ ; 孢体长 $(19.8\pm1.3)\mu\text{m}$ , 宽 $(18.2\pm1.1)\mu\text{m}$ , 孢体内孢质细胞 (sporoplasm cell) 数目不详; 极囊长 $(4.53\pm0.4)\mu\text{m}$ , 宽 $(3.4\pm0.4)\mu\text{m}$ , 极囊内极丝 (polar filament) 盘绕圈数不详。

宿主: 苏氏尾鳃蚓

采集地点: 江苏溧阳养殖池塘

感染率: 1%(4/400)

## 2.2 18S rDNA 序列

对从4条苏氏尾鳃蚓体内释放出的橘瓣放射孢子虫LY样品分别进行测序, 共获得2个单倍型18S rDNA序列片段 (haplotype, H1和H2), 823 bp。单倍型H1和H2间存在1个碱基位点差异 (A/T)。序列一致性分析表明本研究报道的放射孢子虫与武汉单极虫的相似率最高, 为99.8%~100%, 其中H1序列与已报道武汉单极虫序列 (JQ088179) 完全一致 (表1)。

系统发育分析表明橘瓣放射孢子虫LY序列与武汉单极虫 (HQ613410, JQ088179, JQ690370, JQ968687) 稳定的聚为一支, 遗传距离非常近。在构建的系统发育树中 (图4), 从GenBank中获得的 Aurantiactinomyxon 和 Neoactinomyxon 类群放射孢子虫与鱼类寄生单极虫 [如 *T. wuhanensis*, 吉陶单极虫 (*T. kitauei*), *T. hovorkai*, *T. nikolskii*, 汪氏单极虫 (*T. wangi*)] 聚为同一分支, 具有较近的亲缘关系, 并且除 neoactinomyxon (KJ152183) 来自于 *Isochaetides michaelsoni* 外, 其他放射孢子虫都发现自苏氏尾鳃蚓。

## 3 讨论

放射孢子虫曾被认为是一个寄生于无脊椎动物的独立生物类群。然而, 自粘孢子虫生活史中存在两替换宿主 (alternative host) 被发现和广泛接受后, 放射孢子虫纲 (Actinosporea) 的分类阶元在粘体动物的分类系统中被逐渐废除, 但其属级类群名称被建议保留, 作为不同的集合类群 (collective group) 用来容纳具有不同形态特征的放射孢子虫。集合类群的存在为放射孢子虫的描述和研究的信息交流提供极大便利。本研究所报道的放射孢子虫具有橘瓣放射孢子虫类群 (collective group: Aurantiactinomyxon) 典型特征: 卵圆形孢体、刺状尾柄、无孢柄等, 因此将其

表 1 不同来源武汉单极虫 18S rDNA 序列一致性  
Tab. 1 The sequence identity of available 18S rDNA of *T. wuhanensis*

|          | H1   | H2   | JQ690370 | JQ088179 | HQ613410 | JQ968687 |
|----------|------|------|----------|----------|----------|----------|
| H1       | 100  |      |          |          |          |          |
| H2       | 99.9 |      |          |          |          |          |
| JQ690370 | 99.9 | 99.8 |          |          |          |          |
| JQ088179 | 100  | 99.9 | 99.9     |          |          |          |
| HQ613410 | 99.9 | 99.8 | 99.8     | 99.9     |          |          |
| JQ968687 | 99.9 | 99.8 | 99.8     | 99.9     | 99.8     | 100      |

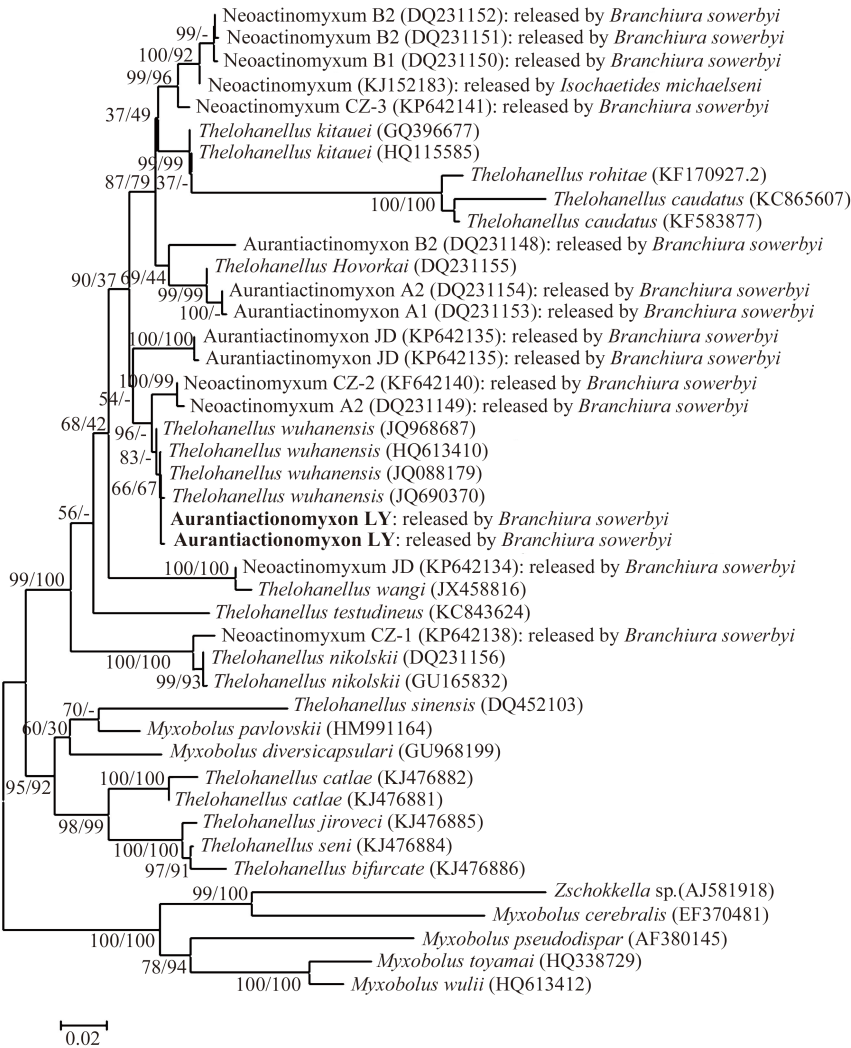


图 4 基于 18S rDNA 序列构建的粘体虫最小进化(ME)系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of myxozoans based on 18S rDNA sequences

划归为该类群。国内有关放射孢子虫的研究和报道较少, 目前已报道的共 13 种<sup>[14-15, 19-20]</sup>, 本研究将使国内报道的放射孢子虫增加到 14 种。

通过与文献中已报道橘瓣放射孢子虫的形态特征比较后, 本研究报道的放射孢子在尾柄形态、

大小方面与其他橘瓣放射孢子虫存在明显差异, 属于一种新型的橘瓣放射孢子虫(Aurantiactinomyxon type LY)。其形态特征与 Aurantiactinomyxon type 1<sup>[21]</sup>、Aurantiactinomyxon type A<sup>[22]</sup>和 Aurantiactinomyxon type 3<sup>[8]</sup>非常相似。然而, 前面 2 种



类型的尾柄长度都非常短(51.3 μm, 47.0 μm)。Aurantiactinomyxon type LY(195.0 μm)与type 3<sup>[8]</sup>的尾柄长度(114.5 μm)相近, 后者尾柄间呈120°夹角。

无脊椎动物寡毛类中寄生的放射孢子虫与鱼体寄生孢子虫间形态差异非常大, 几乎无法通过形态特征直接鉴定出粘孢子虫生活史中在两个宿主阶段所对应的虫体。传统粘孢子虫生活史研究主要通过实验室感染, 然而这种方法费时、费力, 并且要确保投喂的孢子、鱼、颤蚓没有受到其他污染。Ruidish 等<sup>[23]</sup>通过感染实验发现*Myxobolus pavlovskii* 在颤蚓寄生阶段的放射孢子属于一种Hexactinomyxon类型, 然而, Marton等<sup>[24]</sup>通过实验室感染和序列分析发现其应该对应另外一种Echinactinomyxon放射孢子虫。DNA序列分析为物种的快速、准确鉴定提了供

极大便利。通过基于18S rDNA序列分析结果表明Aurantiactinomyxon type LY与GenBank 中其他研究公布的武汉单极虫序列高度一致(99.8%~100%)。因此, 本研究发现的寄生在苏氏尾鳃蚓中Aurantiactinomyxon type LY 是鲫寄生武汉单极虫所对应的放射孢子。

单极虫属物种非常丰富, 命名的种类有108种<sup>[25]</sup>。目前, 已开展生活史相关研究的仅5种: *T. wuhanensis*, *T. kitauei*, *T. hovorkai*, *T. nikolskii*和 *T. wangi*(表2)。值得注意的是这些已知单极虫的放射孢子虫都寄生在苏氏尾鳃蚓中。此外, 在本研究构建的系统发育树中(图4), 尽管与单极虫聚集在同一谱系中的放射孢子虫被发现自不同的生物地理区系, 但几乎都寄生在底栖苏氏尾鳃蚓体内。

表 2 单极虫属生活史已阐明的种类

Tab. 2 Summary of known *Thelohanellus* life cycle

| 物种<br>species                          | 放射孢子虫<br>actinospore | 序列一致性/%<br>DNA match | 脊椎动物宿主<br>vertebrate host | 无脊椎动物宿主<br>invertebrate host |
|----------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>T. hovorkai</i> <sup>[22, 26]</sup> | aurantiactinomyxon   | 99.8                 | 鲤 <i>Cyprinus carpio</i>  | 苏氏尾鳃蚓 <i>B. sowerbyi</i>     |
| <i>T. nikolskii</i> <sup>[27-28]</sup> | aurantiactinomyxon   | 100                  | 鲤 <i>C. carpio</i>        | 苏氏尾鳃蚓 <i>B. sowerbyi</i>     |
| <i>T. kitauei</i> <sup>[28-29]</sup>   | aurantiactinomyxon   | 99.4                 | 鲤 <i>C. carpio</i>        | 苏氏尾鳃蚓 <i>B. sowerbyi</i>     |
| <i>T. wangi</i> <sup>[15]</sup>        | neoactinomyxum       | 100                  | 鲫 <i>C. auratus</i>       | 苏氏尾鳃蚓 <i>B. sowerbyi</i>     |
| <i>T. wuhanensis</i>                   | aurantiactinomyxon   | 100                  | 鲫 <i>C. auratus</i>       | 苏氏尾鳃蚓 <i>B. sowerbyi</i>     |

总之, 本研究描述了一种新型的寄生在底栖苏氏尾鳃蚓体内的橘瓣放射孢子虫, 并通过18S rDNA序列分析将其鉴定为鲫寄生武汉单极虫。本研究结果揭示了鲫养殖中武汉单极虫病病原生活史, 为通过控制池塘尾鳃蚓, 切断其生活史的生态防治策略提供重要的理论支持。

感谢中国水产科学研究院淡水渔业研究中心潘良坤、滕涛、王亚冰、高金伟等在池塘采样和实验中提供的帮助!

参考文献:

[ 1 ] Wang G T, Yao W J, Wang J G, *et al.* Occurrence of thelohanellosis caused by *Thelohanellus wuhanensis* (Myxosporea) in juvenile allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), with an observation on the efficacy of fumagillin as a

therapeutant[J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(1): 57-60.  
[ 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]. Disease of Aquatic Organisms, 2011, 93(3): 257-260.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] Wolf K, Markiw M E. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts[J]. Science, 1984, 225(4669): 1449-1452.  
[ 5 ] Yokoyama H, Grabner D, Shirakashi S. Transmission

- biology of the myxozoa[J]. Health and Environment in Aquaculture, 2012, 3-42.
- [6] Székely C, Borhanuddin M H, Cech G, *et al.* Life cycles of three *Myxobolus* spp. from cyprinid fishes of Lake Balaton, Hungary involve triactinomyxon-type actinospores[J]. Parasitology Research, 2014, 113(8): 2817-2853.
- [7] Gilbert M A, Granath J W O. Whirling disease of salmonid fish: life cycle, biology, and disease[J]. Journal of Parasitology, 2003, 89(4): 658-667.
- [8] Özer A, Wootten R, Shinn A P. Survey of actinosporean types (Myxozoa) belonging to seven collective groups found in a freshwater salmon farm in Northern Scotland[J]. Folia Parasitologica, 2002, 49(3): 189-210.
- [9] Rácz O Z, Eszterbauer E, Molnár K. Hungactinomyxon, a new actinosporean type and collective group (Myxozoa) from *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta)[J]. Systematic Parasitology, 2005, 61(2): 107-113.
- [10] 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.
- [11] Borkhanuddin M H, Cech G, Molnár K, *et al.* Description of raabeia, synactinomyxon and neoactinomyxon developing stages of myxosporeans (Myxozoa) infecting *Isochaetides michaelsei* Lastočka (Tubificidae) in Lake Balaton and Kis-Balaton Water Reservoir, Hungary[J]. Systematic Parasitology, 2014, 88(3): 245-259.
- [12] 孙海伟, 习丙文, 谢骏. 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.
- Sun H W, Xi B W, Xie J. Morphological characters and DNA identification of a new actinosporean type Guyenotia CZ collected from oligochaete *Branchiura sowerbyi*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1179-1184(in Chinese).
- [13] 农业部渔业渔政管理. 中国渔业统计年鉴[J]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 37.
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture. China Fisheries Yearbook[J]. Beijing: China Agricultural Press, 2014: 37(in Chinese).
- [14] Xi B W, Zhang J Y, Xie J, *et al.* Three actinosporean types (Myxozoa) from the oligochaete *Branchiura sowerbyi* in China[J]. Parasitology Research, 2013, 112(4): 1575-1582.
- [15] Xi B W, Zhou Z G, Xie J, *et al.* Morphological and molecular characterization of actinosporeans infecting oligochaete *Branchiura sowerbyi* from Chinese carp ponds[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2015, 114(3): 217-228.
- [16] 王洪铸. 中国小蚓类研究: 附中国南极长城站附近地区两新种[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 1-228.
- Wang H Z. Studies on Taxonomy, Distribution and ecology of microdrile oligochaetes of China, with description of two new species from the vicinity of the Great Wall Station of China, Antarctica[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 1-228(in Chinese).
- [17] Fiala I. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis[J]. International Journal of Parasitology, 2006, 36(14): 1521-1534.
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [19] 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.
- Wang G T, Yao W J. First report on the actinosporean in oligochaetes in China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(2): 198-200(in Chinese).
- [20] Zhai Y H, Zhou L, Gui J F. Identification and characterization of one novel type of *Triactinospomyxon* with short spore axis[J]. Parasitology Research, 2012, 110(6): 2385-2393.
- [21] ElMansy A, Székely C, Molnár K. Studies on the occurrence of actinosporean stages of fish myxosporeans in a Lake Balaton, Hungary, with the description of *Triactinomyxon*, *Raabeia*, *Aurantactinomyxon* types[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 1998, 46(4): 437-450.
- [22] Eszterbauer E, Marton S, Rácz Z O, *et al.* Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification[J]. Systematic Parasitology, 2006,

- 65(2): 97-114.
- [23] Ruidish S, ElMatbouli M, Hoffmann R W. The role of tubificid worms as an intermediate host in the life cycle of *Myxobolus pavlovskii* (Ahmerov, 1954)[J]. Parasitology Research, 1991, 77(8): 663-667.
- [24] Marton S, Eszterbauer E. The development of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa: Myxobolidae) includes an echinactinomyxon-type actinospore[J]. Folia Parasitologica, 2011, 58(2): 157-163.
- [25] Zhang J Y, Gu Z M, Kalavati C, *et al.* Synopsis of the species of *Thelohanellus* Kudo, 1933 (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida)[J]. Systematic Parasitology, 2013, 86(3): 235-256.
- [26] Yokoyama H. Transmission of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960 (Myxosporea: Myxozoa) to common carp *Cyprinus carpio* through the alternate oligochaete host[J]. Systematic Parasitology, 1997, 36(2): 79-84.
- [27] Székely C, ElMansy A, Molnar K, *et al.* Development of *Thelohanellus hovorkai* and *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporea: Myxozoa) in oligochaete alternate hosts[J]. Fish Pathology, 1998, 33(3): 107-114.
- [28] Borkhanuddin M H, Cech G, Molnár K, *et al.* The life cycle of three *Myxobolus* spp. and two *Thelohanellus* spp. (Myxozoa) from fishes of Lake Balaton and Kis Balaton Reservoir[C]//European Association of Fish Pathologists. 16th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Helsinki: European Association of Fish Pathologists: 2013.
- [29] Eszterbauer E, Atkinson S, Diamant A, *et al.* Myxozoan life cycle: Practical Approaches and Insights [M]//Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J L. Myxozoan evolution, ecology and development. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, 2015.

## The life cycle of *Thelohanellus wuhanensis* from *Carassius auratus* involving an Aurantiactinomyxon-type actinospore

XI Bingwen<sup>1,2\*</sup>, LI Peng<sup>3</sup>, CHEN Kai<sup>1</sup>, ZHANG Jinyong<sup>4</sup>, XIE Jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Hubei Collaborative Innovation Center for Freshwater Aquaculture, Wuhan 430070, China;

3. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

4. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** *Thelohanellus wuhanensis* is an important parasite in crucian carp culture, forming numerous plasmodia on the skin, and causing massive mortality of juvenile fish in soil ponds. During the survey of actinosporeans in oligochaetes of fish pond in Liyang (31°18'N, 119°28'E), an Aurantiactinomyxon-type actinosporean was found from the oligochaete *Branchiura sowerbyi*. The actinospores are not connected with each other, and possess a style-less spore body with 3 almost equal-sized, elongate caudal processes. In apical view, the spore body is spherical and three polar capsules are positioned on the top of the spore body and close to each other. There is an above 100° angle between each process. Spore body average length (19.8±1.3)μm, width (18.2±1.1)μm polar capsules (4.53±0.4)μm long, (3.4±0.4)μm wide; caudal processes (195.0±15.7)μm long, (11.5±0.8)μm wide. Fresh spores floating in water were collected with 10 μL pipette tip under microscope and stored at -20°C. Genomic DNA was extracted with MagicMag Genomic DNA micro Kit (Sangon Biotech, China) following the instruction. Partial 18S rDNA sequence was amplified with primers MyxospecF and MyxospecR (Fiala 2006). Positive PCR products were sequenced with the primers in Sangon Biotech. Homologous sequences were determined by performing a BLASTN search at NCBI. DNA sequence similarities were calculated using the MEGA 6.0 software package. On the basis of 18S rDNA sequence analysis, the actinosporeans reported here were identified as *T. wuhanensis*, and showed 99.8%–100% sequence similarity with *T. wuhanensis* (HQ613410, JQ088179, JQ690370 and JQ968687) available in GenBank. Phylogenetic analysis revealed the actinosporean stages of most taxa in the clade *Thelohanellus* developed in alternative host *Branchiura sowerbyi*.

**Key words:** *Carassius auratus*; *Thelohanellus wuhanensis*; actinospore; life cycle; *Branchiura*

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

**Funding projects:** Natural Science Foundation of China (31302222); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011182); China Agriculture Research System (CARS-46); Jiangsu Fishery Project (D2015-13)