

# 不同保存方式对吴李碘泡虫孢子形态的影响

柳 阳 郭庆祥 翟艳花 顾泽茂

华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 研究了 4 种保存方式(5%甲醛、10%甲醛、95%乙醇、-20℃冷冻)对吴李碘泡虫孢子形态的影响进行研究,结果表明,5%甲醛保存 7 d 后孢子各指标与新鲜孢子相比无显著性差异,但保存 30 d 后孢子部分指标显著小于新鲜孢子,说明 5%甲醛可以用于短暂(7 d 以内)保存吴李碘泡虫孢子。其他 3 种保存方式保存 7 d 和 30 d 均导致孢子形态学指标与新鲜样品存在显著性差异。保存过程中,孢子各形态指标的变化率不同,说明保存时孢子发生不规则变形。保存相同时间,95%乙醇对孢子各形态指标影响最大,其次依次为-20℃冷冻、10%甲醛、5%甲醛。随着保存时间的延长,除 10%甲醛保存孢子总体变化率增大外,其他 3 种保存方式保存孢子总体变化率均减小,说明延长保存时间吴李碘泡虫孢子并非一直收缩。

**关键词** 粘孢子虫; 吴李碘泡虫; 成熟孢子; 保存方式; 形态变异

**中图分类号** S 941 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0087-06

粘孢子虫(Myxosporea)是一类重要的后生动物寄生虫,除少数种类寄生两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类外,主要寄生鱼类<sup>[1-5]</sup>。粘孢子虫可寄生于鱼类体表、内脏器官或器官腔内,影响宿主生长发育,降低商品鱼价值,严重时直接导致养殖鱼类大量死亡,已成为我国鱼类养殖的重要寄生虫病原体<sup>[6-10]</sup>。

粘孢子虫物种多样性研究是该类群系统分类、起源与进化、流行病学及病害防控的基础。同时,准确的物种鉴定是粘孢子虫物种多样性研究的重要前提。目前粘孢子虫物种鉴定主要依据成熟孢子的形态学比较、分子序列分析及寄生特性分析<sup>[11-14]</sup>。生物进化的连续性决定了生物形态的稳定性,因此形态学比较是最为基础和直观的物种鉴定方法<sup>[15]</sup>。形态数据分析是粘孢子虫形态学鉴定的重要内容,其中来源于新鲜孢子的形态学数据最具代表性<sup>[16]</sup>。然而,由于野外采样时实验条件限制或其他原因,不能获得新鲜孢子的形态学数据,保存样品的形态学数据常用于粘孢子虫形态学鉴定<sup>[5,17-20]</sup>。粘孢子虫个体微小,不同保存方式、保存时间均会对孢子形态造成不同程度的影响,进而影响粘孢子虫形态学鉴定的准确性。为了提高粘孢子虫形态学鉴定的准确性,本文对 4 种常用保存方式(5%甲醛、10%甲醛、

95%乙醇、-20℃冷冻)对吴李碘泡虫孢子形态的影响进行了系统研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品收集与保存

寄生粘孢子虫的异育银鲫(体长 12.3 cm, 质量 19 g)采自洪湖市某养殖池塘,活体带回实验室。解剖病鱼,取出孢囊,新鲜孢子不经处理立即进行形态学观察与测量,其他样品分别用 5%甲醛、10%甲醛、95%乙醇、-20℃冷冻保存。

### 1.2 形态学数据测量

利用 Nikon E80i 显微镜观察粘孢子虫新鲜孢子并拍照,测量孢子长、孢子宽、孢子厚、大极囊长、大极囊宽、小极囊长、小极囊宽( $n=30$ )等数据。样品分别保存 7 d 与 30 d 后测量其形态学数据。根据毛毛等<sup>[21]</sup>方法计算粘孢子虫孢子各测量指标变化率(即处理组某一测量指标相对于新鲜孢子测量值减少或增加的百分率)与总变化率(即处理组所有测量指标变化率的平均值)。

### 1.3 基因组 DNA 提取及 18S rDNA 基因扩增与测序

将 95%乙醇固定的部分孢子移入 500  $\mu$ L 细胞裂解液中(100 mmol/L 氯化钠,10 mmol/L Tris,

收稿日期: 2016-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572233,31501848)

柳 阳, 博士, 讲师. 研究方向: 水生动物医学. E-mail: liuyangqzh@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 顾泽茂, 博士, 教授. 研究方向: 水生动物医学. E-mail: guzemaom@mail.hzau.edu.cn

10 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 20 mg/mL 蛋白酶 K), 55 °C 水浴, 过夜。利用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (Bio-Teke™, 北京) 提取粘孢子虫的基因组 DNA。根据 Liu 等<sup>[22]</sup> 方法扩增粘孢子虫 18S rDNA 基因序列。PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。目的条带利用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (AxyPrep™, 杭州) 纯化回收。回收产物直接在 ABI 3730XL DNA 测序仪 (Applied Biosystems Inc., Foster, USA) 上利用扩增引物双向测序。测序结果利用 SEQMAN 程序 (DNASTAR INC., Madison, Wis) 进行拼接, 并根据测序峰图进行人工校正, 将拼接完成的序列提交至 GenBank 数据库。

#### 1.4 统计分析

形态学数据利用 SPSS 21 统计软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

## 2 结果与分析

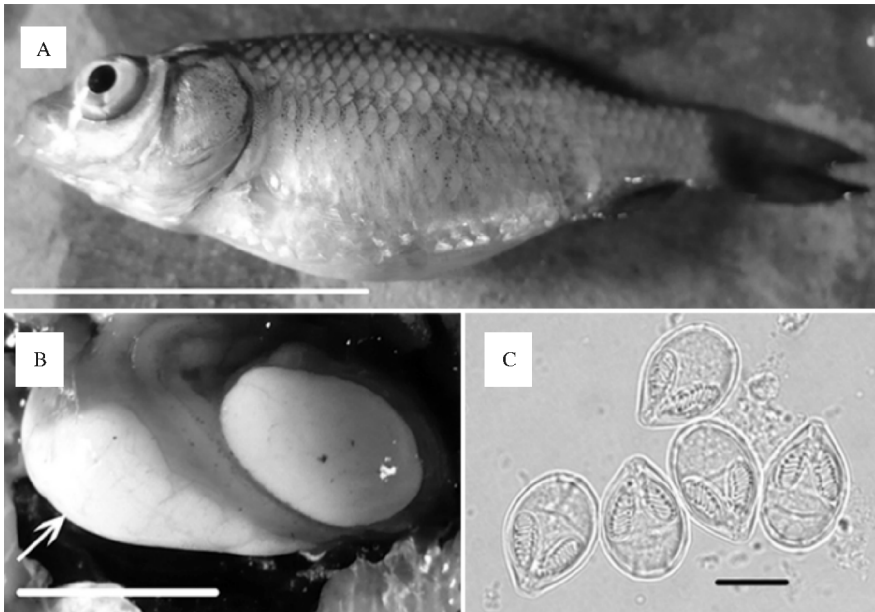
### 2.1 物种鉴定

该粘孢子虫寄生于异育银鲫肝脏, 造成宿主腹部鼓起 (图 1A), 在肝脏中形成 1.5~4.3 cm 的巨大孢囊 (图 1B)。孢子壳面观呈梨形, 后端钝圆

(图 1C), 孢子长  $17.7 \pm 0.6$  (16.1~18.6)  $\mu\text{m}$ , 孢子宽  $12.0 \pm 0.4$  (11.0~13.0)  $\mu\text{m}$ , 孢子厚  $9.0 \pm 0.3$  (8.0~9.6)  $\mu\text{m}$ ; 2 个极囊呈梨形, 大小稍有差别, 大极囊长  $9.6 \pm 0.5$  (9.0~10.8)  $\mu\text{m}$ , 大极囊宽  $3.9 \pm 0.3$  (3.1~4.1)  $\mu\text{m}$ , 小极囊长  $8.9 \pm 0.5$  (7.8~9.8)  $\mu\text{m}$ , 小极囊宽  $3.8 \pm 0.2$  (3.0~4.3)  $\mu\text{m}$ , 极囊内极丝 7~9 圈, 极突明显; 圆形嗜碘泡可见但不明显。该粘孢子虫形态特征及测量数据与吴李碘泡虫形态特征一致 (表 1)。本文扩增获得 1 528 bp 的 18S rDNA 序列 (KJ725081)。序列分析显示该序列与 GenBank 中吴李碘泡虫 18S rDNA 序列 (EF690300, HQ613412) 一致。形态学特征比较与分子序列分析均显示本文采集的寄生异育银鲫肝脏的粘孢子虫为吴李碘泡虫。

### 2.2 不同保存方式保存 7 d 对吴李碘泡虫孢子形态的影响

保存 7 d 后, 除 5% 甲醛外, 其他保存方式均使得吴李碘泡虫形态指标与新鲜样品相比发生了显著变化 (表 2)。但是不同保存方式对吴李碘泡虫各个指标的影响不尽相同。在孢子长方面, 仅 10% 甲醛对孢子具有显著收缩作用。在孢子宽方面, 除 5% 甲醛外, 其他保存方式均对孢子具有显著收缩作用,



A: 异育银鲫寄生吴李碘泡虫导致腹部鼓起, 标尺 5 cm *Carassius auratus gibelio* infected by *Myxobolus wulii* with swollen abdomen, scale bar 5 cm; B: 异育银鲫腹部的孢囊 (箭头所示), 标尺 2 cm The infected fish showing enlarged hepatopancreas (arrow), scale bar 2 cm; C: 吴李碘泡虫新鲜孢子, 标尺 10  $\mu\text{m}$  Fresh spores of *Myxobolus wulii*, scale bar 10  $\mu\text{m}$ .

图 1 异育银鲫寄生吴李碘泡虫

Fig.1 *Myxobolus wulii* infecting *Carassius auratus gibelio*

表1 不同种群吴李碘泡虫形态学比较

Table 1 Morphological comparison of different populations for *Myxobolus wulii*

项目 Items	吴李碘泡虫(本文) <i>M.wulii</i> (This study)	吴李碘泡虫 <sup>[8]</sup> <i>M.wulii</i>	吴李碘泡虫 <sup>[23]</sup> <i>M.wulii</i>
宿主 Host	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>	异育银鲫 <i>C. auratus gibelio</i>
寄生部位 Site of infection	肝脏 Hepatopancreas	肝脏 Hepatopancreas	肝脏 Hepatopancreas
孢子长/ $\mu\text{m}$ Spore length	17.7 $\pm$ 0.6 (16.1~18.6)	18.0 $\pm$ 0.8 (16.0~19.6)	17.7 (16.5~18.9)
孢子宽/ $\mu\text{m}$ Spore width	12.0 $\pm$ 0.4 (11.0~13.0)	11.3 $\pm$ 0.6 (9.8~12.0)	10.6 (9.1~10.8)
孢子厚/ $\mu\text{m}$ Spore thickness	9.0 $\pm$ 0.3 (8.0~9.6)	8.9 $\pm$ 0.4 (7.8~9.8)	8.3 (7.2~9.0)
大极囊长/ $\mu\text{m}$ Large polar capsule length	9.6 $\pm$ 0.5 (9.0~10.8)	9.2 $\pm$ 0.6 (7.8~10.0)	9.3 (8.4~9.9)
大极囊宽/ $\mu\text{m}$ Large polar capsule width	3.9 $\pm$ 0.3 (3.1~4.1)	3.9 $\pm$ 0.2 (3.1~4.3)	3.7 (3.4~4.0)
小极囊长/ $\mu\text{m}$ Small polar capsule length	8.9 $\pm$ 0.5 (7.8~9.8)	8.6 $\pm$ 0.5 (7.5~10.0)	9.0 (8.1~9.2)
小极囊宽/ $\mu\text{m}$ Small polar capsule length	3.8 $\pm$ 0.2 (3.0~4.3)	3.8 $\pm$ 0.3 (3.0~4.2)	3.6 (3.4~3.8)
极丝圈数 No. filament turns	7~9	7~9	7~9

其中, -20℃冷冻对孢子影响最大(变化率为7.5%)。在孢子厚方面,除5%甲醛外,其他保存方式均对孢子具有显著收缩作用,其中95%乙醇对孢子影响最大(变化率为10%)。在大极囊长方面,10%甲醛与-20℃冷冻对孢子具有显著收缩作用。在大极囊宽方面,4种保存方式均未对孢子造成显著影响。在小极囊长方面,95%乙醇与-20℃冷冻对孢子具有显著收缩作用。在小极囊宽方面,仅95%乙醇对孢子具有显著收缩作用。

### 2.3 不同保存方式保存30 d对吴李碘泡虫孢子形态的影响

保存30 d后,4种保存方式均使得吴李碘泡虫形态指标与新鲜样品相比发生了显著变化(表2)。但是不同保存方式对吴李碘泡虫各个指标的影响也不尽相同。在孢子长方面,5%甲醛与95%乙醇对孢子具有显著收缩作用。在孢子宽方面,除5%甲醛外,其他保存方式均对孢子具有显著收缩作用。在孢子厚方面,4种保存方式均对孢子具有显著收缩作用。在大极囊长方面,95%乙醇与-20℃冷冻对孢子具有显著收缩作用。在大极囊宽方面,仅10%甲醛对孢子具有显著收缩作用。在小极囊长方面,仅95%乙醇对孢子具有显著收缩作用。在小极囊宽方面,4种保存方式均未对孢子造成显著影响。

### 2.4 不同保存方式保存不同时间后吴李碘泡虫孢子变化率

不同保存方式对吴李碘泡虫孢子具有不同程度

的影响(表3)。在保存相同时间时,95%乙醇对孢子的收缩作用最大,其次依次为-20℃冷冻、10%甲醛、5%甲醛。保存30 d与保存7 d相比,10%甲醛保存孢子总体变化率增大,其他3种保存方式孢子总体变化率均减小。另外,4种保存方式保存一定时间后,吴李碘泡虫各形态指标的变化率不一致。

## 3 讨论

形态学比较是粘孢子虫物种鉴定的重要内容<sup>[3,6]</sup>。毛毛等<sup>[21]</sup>发现多种固定液均对粘孢子虫孢子形态有显著影响,采用固定样品的形态学数据进行分析将会影响粘孢子虫物种鉴定的准确性。为了解决野外采样无法获得新鲜孢子形态学数据的问题并提高粘孢子虫形态学鉴定的准确性,本文对4种保存方式对吴李碘泡虫孢子形态的影响进行了系统研究。

本研究发现,4种保存方式均对吴李碘泡虫孢子形态产生影响。保存时间相同时,95%乙醇对孢子的影响最大,其次依次为-20℃冷冻、10%甲醛、5%甲醛。毛毛等<sup>[21]</sup>通过研究8种固定液对粘孢子虫孢子形态的影响,发现100%乙醇对孢子的影响最大。本研究与毛毛等<sup>[21]</sup>研究均说明高浓度乙醇对孢子具有较大的影响,其保存样品不适合用于形态学研究。10%甲醛保存武汉单极虫与咽碘泡虫30 d后其孢子总体变化率分别为1.38%和2.33%<sup>[21]</sup>,但本研究发现10%甲醛保存吴李碘泡虫

表 2 不同保存方式保存 7 d 和 30 d 对吴李碘泡虫形态学数据的影响

Table 2 Morphometric effects on the spores of *Myxobolus wuii* by different preservation methods

测量指标 Index	新鲜样本 Fresh spores		5%甲醛 5% formalin		10%甲醛 10% formalin		95%乙醇 95% alcohol		-20℃冷冻 -20℃ frozen	
	7 d	30 d	7 d	30 d	7 d	30 d	7 d	30 d	7 d	30 d
孢子长 Spore length	17.7±0.6 (16.1~18.6)	17.4±0.6 (16.0~19.0)	17.6±0.6 (16.9~19.0)	17.4±0.7 (16.0~19.0)*	17.2±0.6 (16.0~18.0)*	17.6±0.7 (16.0~19.9)	17.6±0.7 (15.9~19.0)	17.2±0.7 (15.8~19.0)*	17.4±0.7 (16.1~19.0)	17.4±0.6 (16.5~18.9)
孢子宽 Spore width	12.0±0.4 (11.0~13.0)	11.9±0.4 (11.0~12.6)	11.9±0.4 (11.0~12.6)	11.9±0.4 (11.0~12.3)	11.6±0.5 (10.0~12.3)*	11.5±0.7 (10.0~12.9)*	11.2±0.6 (9.9~12.2)*	11.1±0.4 (10.1~12.0)*	10.9±0.5 (10.0~12.2)*	11.3±0.6 (10.0~12.2)*
孢子厚 Spore thickness	9.0±0.3 (8.0~9.6)	9.0±0.3 (8.2~9.8)	9.0±0.3 (8.2~9.8)	8.8±0.3 (8.0~9.2)*	8.8±0.4 (8.0~9.5)*	8.2±0.4 (7.9~9.3)*	8.1±0.3 (7.5~9.0)*	8.0±0.4 (7.3~9.0)*	8.5±0.5 (8.0~9.6)*	8.2±0.3 (7.8~9.0)*
大极囊长 Large polar capsule length	9.6±0.5 (9.0~10.8)	9.7±0.5 (9.0~10.7)	9.7±0.5 (9.0~10.7)	9.6±0.5 (8.6~10.3)	9.3±0.5 (8.2~11.0)*	9.4±0.7 (8.0~10.5)	9.4±0.6 (8.1~10.9)	9.2±0.5 (7.8~10.0)*	9.1±0.6 (8.0~10.0)*	9.2±0.6 (8.0~10.0)*
大极囊宽 Large polar capsule width	3.9±0.3 (3.1~4.1)	3.7±0.3 (3.0~4.0)	3.7±0.3 (3.0~4.0)	3.8±0.3 (3.0~4.1)	3.7±0.4 (3.0~4.9)	4.0±0.3 (3.1~4.8)*	3.8±0.3 (3.2~4.6)	3.9±0.2 (3.2~4.1)	3.9±0.3 (3.2~4.8)	3.9±0.2 (3.5~4.2)
小极囊长 Small polar capsule length	8.9±0.5 (7.8~9.8)	8.9±0.5 (8.0~9.8)	8.9±0.5 (8.0~9.8)	8.9±0.5 (8.0~10.0)	8.7±0.5 (8.0~9.8)	8.6±0.7 (7.0~9.8)*	8.4±0.6 (7.0~9.8)*	8.6±0.5 (7.0~9.2)*	8.4±0.6 (7.0~9.6)*	8.6±0.7 (7.0~10.0)
小极囊宽 Small polar capsule width	3.8±0.2 (3.0~4.3)	3.9±0.2 (3.2~4.2)	3.9±0.2 (3.2~4.2)	3.8±0.3 (3.0~4.2)	3.8±0.3 (3.0~4.0)	3.9±0.2 (3.2~4.3)	3.6±0.3 (3.0~4.1)*	3.8±0.4 (3.0~4.3)	3.8±0.3 (3.1~4.2)	3.9±0.2 (3.3~4.0)

注:星号表示该指标与新鲜孢子相比有显著性差异( $P<0.05$ )。Note:“\*” indicating significant differences ( $P<0.05$ ) comparing to the measurements from fresh spores.

表 3 吴李碘泡虫各形态指标变化率与总变化率

Table 3 The change rates of measurement indexes and total change rate of *Myxobolus wuii*

测量指标 Index	5%甲醛 5% formalin		10%甲醛 10% formalin		95%乙醇 95% alcohol		-20℃冷冻 -20℃ frozen	
	7 d	30 d	7 d	30 d	7 d	30 d	7 d	30 d
孢子长 Spore length	-0.57	-1.69	-2.82	-0.57	-0.57	-1.69	-2.82	-1.69
孢子宽 Spore width	-0.83	-0.83	-3.33	-4.17	-4.17	-9.17	-7.50	-5.83
孢子厚 Spore thickness	0.00	-2.22	-2.22	-8.89	-10.00	-5.56	-11.11	-8.89
大极囊长 Large polar capsule length	+1.04	0.00	-3.13	-2.08	-2.08	-5.21	-4.17	-4.17
大极囊宽 Large polar capsule width	-5.13	-2.56	-5.13	+2.56	-2.56	0.00	0.00	0.00
小极囊长 Small polar capsule length	0.00	0.00	-2.25	-3.37	-5.61	-5.62	-3.37	-3.37
小极囊宽 Small polar capsule width	+2.63	0.00	0.00	+2.63	-5.26	0.00	0.00	+2.63
总变化率 Total change rate	1.56	1.04	2.70	3.47	4.68	3.89	4.14	3.80

注:负号(-)表示与新鲜孢子相比没有变化;正号(+)表示与新鲜孢子相比增大。Note:“-” indicating the measurements diminish comparing that of fresh spores;

“0” indicating the measurement not change comparing that of fresh spores, “+” indicating the measurements increase comparing that of fresh spores.



30 d后孢子总体变化率为2.70%,说明同种固定液对不同粘孢子虫孢子的影响并不相同。这可能是由于不同粘孢子虫孢子壳瓣的结构与组成不同所致。随着保存时间的延长,除10%甲醛保存孢子总体变化率增大外,其他3种保存方式保存孢子总体变化率均减小,说明延长保存时间粘孢子虫孢子并非一直收缩。毛毛等<sup>[21]</sup>亦发现不同固定液随着保存时间的延长孢子总体变化率变化趋势不同。另外,毛毛等<sup>[21]</sup>发现10%甲醛保存样品随着时间的延长武汉单极虫与咽碘泡虫孢子总体变化率均减小与本文发现的吴李碘泡虫孢子总体变化率增大不同,说明同种固定液对不同粘孢子虫孢子的变形趋势不同。同时,本研究发现4种保存方式保存一定时间后孢子各指标变化率不一致,说明在保存过程中孢子发生不规则变形。

尽管4种保存方式均对吴李碘泡虫孢子形态产生影响,但统计分析发现5%甲醛保存1周后孢子形态学数据与新鲜孢子相比无显著性差异,保存30 d后保存样品孢子长与孢子厚显著小于新鲜孢子,说明5%甲醛可以用于短暂(7 d以内)保存吴李碘泡虫。由于不同粘孢子虫孢子壳瓣的结构与组成不同,5%甲醛是否能用于短暂保存其他粘孢子虫仍需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] FRIEDRICH C, INGOLIC E, FREITAG B, et al. A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole, *Talpa europaea* L., 1978 (Vertebrata, Mammalia) [J]. Parasitology, 2000, 121: 483-492.
- [2] EIRAS J C. An overview on the myxosporean parasites in amphibians and reptiles [J]. Acta parasitologica, 2005, 50: 267-275.
- [3] LOM J, DYKOVA I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species [J]. Folia parasitologica, 2006, 53: 1-36.
- [4] PRUNESCU C C, PRUNESCU P, PUCEK Z, et al. The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals; *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha) [J]. Folia parasitologica, 2007, 54: 159-164.
- [5] BARTHOLOMEW J L, ATKINSON S D, HALLETT S L, et al. Myxozoan parasitism in waterfowl [J]. International journal for parasitology, 2008, 38: 1199-1207.
- [6] 陈启鏊, 马成伦. 中国动物志: 粘体动物门, 粘孢子虫纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [7] LIU Y, GU Z M, LUO Y L. Some additional data to the occurrence, morphology and validity of *Myxobolus turpisrotundus* Zhang, 2009 (Myxozoa: Myxosporea) [J]. Parasitology research, 2010, 107: 67-73.
- [8] 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: 1331-1336.
- [9] 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.
- [10] YUAN S, XI B W, WANG J G, et al. *Thelohanellus wangi* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a new gill parasite of allogynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) in China, causing severe gill myxosporidiosis [J]. Parasitology research, 2015, 114: 37-45.
- [11] 索栋, 赵元君. 尼氏单极虫(粘体门, 双壳目)重描述及基于18S rDNA系统地位分析 [J]. 动物分类学报, 2010, 35(1): 90-95.
- [12] YE L T, LI W X, WU S G, et al. Supplementary studies on *Henneguya doneci* Schulman, 1962 (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gill filaments of *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China: histologic, ultrastructural, and molecular data [J]. Parasitology research, 2012, 110: 1509-1516.
- [13] LIU Y, WHIPPS C M, GU Z M, et al. *Myxobolus musseliuae* (Myxozoa: Myxobolidae) from the gills of common carp *Cyprinus carpio* and revision of *Myxobolus dispar* recorded in China [J]. Parasitology research, 2013, 112: 289-296.
- [14] 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: 78-82.
- [15] 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.
- [16] LOM J, ARTHUR J R. A guideline for preparation of species descriptions in Myxosporea [J]. Journal of fish diseases, 1989, 12: 151-156.
- [17] 吴灶和, 陈启鏊. 淡水鱼类寄生粘孢子虫九新种 [J]. 水生生物学报, 2005, 11(2): 161-172.
- [18] YOKOYAMA H, ITOH N, TANAKA S. *Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) [J]. Journal of fish diseases, 2005, 28: 479-487.
- [19] ZHANG J Y, WANG J G, LI A H, et al. Redescription of *Myxobolus pyramidis* Chen, 1958 (Myxosporea: Bivalvulida) [J]. Parasitology research, 2006, 99: 65-69.
- [20] FEIJO M M, ARANA S, CECCARELLI P S, et al. Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Ara-

- guaia River, Brazil [J]. *Veterinary parasitology*, 2008, 15: 59-64.
- [21] 毛毛, 陆宏达, 竹攸汀, 等. 固定液保存对粘孢子虫形态的影响 [J]. *南方农业学报*, 2014, 45(9): 1674-1678.
- [22] LIU Y, YUAN J F, JIA L, et al. Supplemental description of *Thelohanellus wuhanensis* Xiao & Chen, 1993 (Myxozoa: Myxosporae) infecting the skin of *Carassius auratus gibelio* (Bloch); ultrastructural and histological data [J]. *Parasitology international*, 2014, 63: 489-491.
- [23] ZHANG J Y, YOKOYAMA H, WANG J G, et al. Utilization of tissue habitats by *Myxobolus wulii* Landsberg & Lom, 1991 in different carp hosts and disease resistance in allogynogenetic gibel carp; redescription of *M. wulii* from China and Japan [J]. *Journal of fish diseases*, 2010, 33: 57-68.

## Effects of different preservation methods on morphology of *Myxobolus wulii* spores

LIU Yang GUO Qingxiang ZHAI Yanhua GU Zemao

*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Effects of 4 common preservation methods (5% formalin, 10% formalin, 95% alcohol and -20 °C frozen) on spore morphology of *Myxobolus wulii* were investigated in the present study. Compared with fresh spores, only the spores preserved in 5% formalin for 7 d showed no significant differences in measurements ( $P < 0.05$ ), which indicated that 5% formalin is a suitable fixative for *M. wulii* spores preservation for a short period of time (less than 7 d). The change rates of measurement indexes of preserved spores were different, indicating that the present preservation methods made *M. wulii* spores deform irregularly. For spores preserved by different preservation methods in the same time period, 95% alcohol yielded the maximum contraction, following by -20 °C frozen, 10% formalin and 5% formalin. The total change rates of spores, except for that preserved in 10% formalin, decreased with the extension of preservation time, indicating that the preserving spores doesn't always shrink continuously.

**Keywords** Myxosporae; *Myxobolus wulii*; mature spores; preservation methods; morphometric variation

(责任编辑:边书京)