

中华蛸寄生丛集球虫(顶复亚门: 丛集球虫科) 新种的形态学与分子生物学研究*

任 静^{1,2} 何卫彤^{1,2} 王丽华^{1,2} 唐 艳^{1,2} 郑小东^{1,2}

(1. 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所 青岛 266003;
2. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 丛集球虫(顶复亚门: 类锥体纲: 丛集球虫科)是头足类消化道中一类常见寄生虫, 在福建连江海域以及浙江南麂岛周边海域采捕到的中华蛸(*Octopus sinensis*)盲囊及肠组织内发现一丛集球虫新种, 命名为多刺丛集球虫 *Aggregata octaculeata* sp. nov.。光学显微镜和扫描电镜下观察发现, 中华蛸体内的多刺丛集球虫存在配子生殖阶段和孢子生殖阶段, 其中, 孢子生殖阶段成熟卵囊呈近球形或椭球形, 长径 653.6—806.5 μm , 短径 588.1—787.1 μm 。孢子囊为卵球形或椭球形, 长径 22.4—26.1 μm , 短径 20.5—24.6 μm , 孢子囊壁为双层, 外部光滑, 内层多刺。孢子囊内子孢子呈卷曲状, 数目范围 8—13 个, 子孢子长度为 22.2—28.6 μm , 宽度为 3.0—5.0 μm 。基于 18S rRNA 基因构建的系统发育树进一步证实该物种隶属于丛集球虫属, 并高度支持了属内[(中华丛集球虫 *A. sinensis* + *A. octopiana*) + *A. eberthi*] + 多刺丛集球虫 *A. octaculeata* 的系统发生关系。

关键词 多刺丛集球虫; 新种; 中华蛸; 形态学; 18S rRNA

中图分类号 Q959.216; Q954; Q789 **doi:** 10.11693/hyh20210200052

中华蛸(*Octopus sinensis* d'Orbigny, 1841)隶属于软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、八腕目(Octopoda)、蛸科(Octopodidae)、蛸属(*Octopus*), 主要分布在太平洋西北部(Guerra *et al.*, 2010; Gleadall, 2016), 曾被认为是真蛸(*O. vulgaris* Cuvier, 1797)的同物异名(Warnke *et al.*, 2004; Okumura *et al.*, 2005; Iglesias *et al.*, 2007)。近年来, 基于形态特征和分子生物学分析, 从物种水平上将中华蛸与真蛸分开(Guerra *et al.*, 2010; Amor *et al.*, 2014; Gleadall, 2016)。中华蛸生长快, 具有重要的商业价值和开发潜力(Garrido *et al.*, 2018; Dan *et al.*, 2019)。近几年, 有关中华蛸养殖和饵料选择(Dan *et al.*, 2018, 2019)、分类研究(Amor *et al.*, 2017)等方面的研究相继开展, 但有关中华蛸寄生虫和疾病诊断等方面鲜有报道。

丛集球虫隶属于粘孢子总门(Myzozoa)、顶复亚

门(Apicomplexa)、类锥体纲(Conoidasida)、真球虫目(Eucoccidiorida)、丛集球虫科(Aggregatidae)、丛集球虫属(*Aggregata*), 是头足类消化道中一类常见的寄生虫(Castellanos-Martínez *et al.*, 2019)。丛集球虫的生命周期包括无性生殖阶段和有性生殖阶段, 无性生殖又称为裂体生殖, 有性生殖阶段包括配子生殖和孢子生殖, 在孢子生殖阶段, 丛集球虫的成熟卵囊内包含大量的孢子囊, 孢子囊中有子孢子。丛集球虫营异主寄生(Dobell, 1925; Hochberg, 1990), 在其生活史中, 无性生殖阶段寄生在中间宿主-甲壳类动物中, 有性生殖阶段寄生在终宿主-头足类动物中(Dobell, 1925; Gestal *et al.*, 2002), 具有感染性的子孢子包含在孢子囊中, 这些孢子囊可通过头足类动物的粪便释放到海洋中进而感染甲壳类中间宿主(Castellanos-Martínez *et al.*, 2019)。

* 国家自然科学基金项目, 31672257 号; 中央高校基本科研业务费专项, 201822022 号。任 静, 硕士研究生, E-mail: renjing@stu.ouc.edu.cn

通信作者: 郑小东, 博士生导师, 教授, E-mail: xdzheng@ouc.edu.cn

收稿日期: 2021-02-18, 收修改稿日期: 2021-03-26

目前,有关丛集球虫的记录有限, Poynton 等(1992)通过石蜡切片对 *Aggregata dobelli* 和 *A. millerorum* 的表型特征进行描述。Gestal 等(1999)通过扫描和透射电子显微镜及原子力显微镜技术研究了 *A. octopiana* 孢子发育阶段的不同形态和细胞学结构。随着分子生物学的发展,分子标记技术为头足类寄生虫形态学鉴定与诊断提供了新手段,成为分类学的重要补充。Kopečná 等(2006)分析了寄生于头足类中的丛集球虫属的系统发育关系,首次分析了丛集球虫的系统发生地位。随后,相关研究结合表型特征及 18S rRNA 核苷酸序列成功鉴定出丛集球虫属 *Aggregata eberthi* 及 *A. octopiana* 两新种,并对发生在欧洲水域的这两种丛集球虫的系统发育状况进行了评估(Castellanos-Martínez *et al.*, 2013; Tedesco *et al.*, 2017)。近年来,在东北太平洋、东北大西洋、西北印度洋、西南大西洋、西地中海等海域均有丛集球虫的

报道(Labbé, 1895; Narasimhamurti, 1979; Poynton *et al.*, 1992; Gestal *et al.*, 2000, 2005, 2010; Sardella *et al.*, 2000),然而国内对于丛集球虫的研究较少, Ren 等(2019)在大规模死亡的短蛸中发现了丛集球虫,截至目前,于长蛸和短蛸中鉴定出一个丛集球虫新种(任静, 2021)。本研究在中华蛸体内鉴定出的丛集球虫为一新种,是对丛集球虫属生物学资料的补充,同时也为中华蛸疾病诊断和组织病理学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

野生中华蛸采自福建连江(26°16'N, 119°47'E)以及浙江南麂岛(27°29'N, 121°01'E),经解剖观察,被丛集球虫感染的中华蛸个体共 31 只,主要感染位置为中华蛸消化系统中的盲囊和肠。被感染中华蛸的胴背长、体重、采集地等信息均被详细记录(表 1)。

表 1 被丛集球虫感染的中华蛸样品信息
Tab.1 Sampling information of *O. sinensis* infected by *Aggregata*

序号	雌雄	胴背长(mm)	体重(g)	采样点	宿主编号
1	♀	126	483.1	连江	OUC-LSGB-202006070301
2	♀	128	577.4	连江	OUC-LSGB-202006070302
3	♂	110	290.8	连江	OUC-LSGB-202006070303
4	♂	133	745.4	连江	OUC-LSGB-202006070304
5	♂	143	959.2	连江	OUC-LSGB-202006070305
6	♂	125	465.5	连江	OUC-LSGB-202006070306
7	♂	109	768.7	连江	OUC-LSGB-202006070307
8	♂	146	782.1	连江	OUC-LSGB-202006070308
9	♂	126	604.4	连江	OUC-LSGB-202006070309
10	♂	148	773.3	连江	OUC-LSGB-202006070310
11	♂	128	365.9	南麂岛	OUC-LSGB-202006210311
12	♂	113	674.2	南麂岛	OUC-LSGB-202007240312
13	♂	121	450.8	南麂岛	OUC-LSGB-202007240313
14	♀	90	358.6	南麂岛	OUC-LSGB-202009120314
15	♂	96	465.4	南麂岛	OUC-LSGB-202009120315
16	♀	118	599.8	南麂岛	OUC-LSGB-202009160316
17	♀	123	1 071.1	南麂岛	OUC-LSGB-202010240317
18	♂	134	878.8	南麂岛	OUC-LSGB-202010240318
19	♂	140	349.2	南麂岛	OUC-LSGB-202010240319
20	♀	114	494.9	南麂岛	OUC-LSGB-202010240320

续表

序号	雌雄	胴背长(mm)	体重(g)	采样点	宿主编号
21	♀	131	934.8	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240321
22	♂	73	139.2	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240322
23	♂	132	1 283.1	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240323
24	♀	199	2 140.0	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240324
25	♀	77	169.4	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240325
26	♀	131	674.8	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240326
27	♂	70	130.8	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240327
28	♀	92	652.6	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240328
29	♂	103	451.9	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240329
30	♀	115	615.6	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240330
31	♀	151	1 143.7	南鹿岛	OUC-LSGB-202010240331

1.2 形态学鉴定

从鲜活中华蛭盲囊中分离出卵囊, 制成临时玻片标本, 采用光学显微镜(Olympus BX53)下观察其形态特征并拍照, 测定丛集球虫孢子生殖阶段的卵囊、孢子囊和子孢子各项形态特征数据。对卵囊、孢子囊和子孢子进行测量, 用微米(μm)表示, 并计算其平均值和标准偏差。将严重感染的盲囊和肠组织固定于波恩试剂中, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 使用切片机(Leica RM2016)切片。切片厚度为 $5\ \mu\text{m}$, 用苏木精和伊红染色(Culling *et al.*, 1985), 制成永久玻片标本, 然后观察孢子囊内的子孢子, 拍照并统计数目。

扫描电镜(SEM)样品取自宿主盲囊, 将丛集球虫的白点状卵囊置于 2.5%戊二醛固定液中固定 4 h, 用匀浆法制备分离的孢子囊。乙醇梯度脱水, 分离的孢子囊用液态 CO_2 进行临界点干燥, 喷金镀膜处理后(Gestal *et al.*, 1999)用扫描电子显微镜(VEGA3)观察并拍照。透射电镜(TEM)样品为分离的丛集球虫卵囊, 置于 2.5%戊二醛中固定 4 h, 清洗后置于锇酸固定液中, 乙醇梯度脱水, 包埋, 通过钻石刀切片并进行染色, 用透射电子显微镜(JEM1200)电镜下观察。

1.3 分子生物学鉴定

丛集球虫卵囊中提取总 DNA。取大约 50 mg 卵囊悬浮于 $600\ \mu\text{L}$ 提取缓冲液中, 使用超声波细胞破碎仪破碎, 加入蛋白酶 K 消化过夜, 参照苯酚-氯仿法提取 DNA (Sambrook *et al.*, 1989), 质量检测合格后的 DNA 置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

对基因组 DNA 中 18S rRNA 小亚基进行扩增, 所

用引物为 Primer1-F: 5'-GGGGGTATTTGTATTTAAC AAGCA-3', Primer1-R: 5'-CCTACGGAAACCTTGTT ACGA-3' (Castellanos-Martinez *et al.*, 2013)。目的片段长度约为 800 bp, PCR 扩增采用 $50\ \mu\text{L}$ PCR 体系, 包含 $5\ \mu\text{L}$ $10\times$ PCR buffer, dNTPs $0.2\ \text{mmol/L}$, MgCl_2 $2\ \text{mmol/L}$, Primer1-F $0.25\ \mu\text{mol/L}$, Primer1-R $0.25\ \mu\text{mol/L}$, 模板 DNA $100\ \text{ng}$, Taq DNA 聚合酶 $2\ \text{U}$ 。反应程序为: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 10 min, 随后循环 35 次包括 $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $51\ ^\circ\text{C}$ 退火 1 min, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳下检测, 生工生物有限公司双向测序。18S rRNA 基因序列已上传至 GenBank (Nos: MW577122、MW577123、MW577124、MW577125、MW577126、MW577127、MW577128、MW577129、MW577130 和 MW577131)。

用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 软件对测序结果进行排列校对, 将本研究获得的 18S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 下载近缘物种的 18S rRNA 基因序列, 选用 *Eimeria bovis* (U77084) 和 *E. arnyi* (AY613853) 作为外群, 使用 MEGA 6.0 中的 Clustal W 将全部序列进行多重比对分析 (Tamura *et al.*, 2013), 去掉前后不整齐的较长序列, 保留中间的 gap 区域。在构建系统发育树之前, 用 jModelTest 2.1 软件 (Darriba *et al.*, 2012) 计算似然值的核苷酸进化模型, 在 AIC 标准下采用默认设置, 筛选出最优模型为 GTR+G。系统发育分析采用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian Inference, BI), 分别使用软件 MEGA 6.0 和 MrBayes

3.2 (Ronquist *et al*, 2012)构建系统发育树。在最大似然法(ML)分析中,进化树的节点可靠性通过1000次重复抽样分析进行评估。在贝叶斯法(BI)的分析中,在马尔科夫链蒙特卡洛分析(Markov chain Monte Carlo, MCMC)命令指导运行了100万代,每1000代采样一次,每1000世代保存一次取样树。待分裂频率标准误差小于0.01后,去除25%的老化样本。最终获得的系统发育树使用软件 FigTree 1.4.2 编辑 (Rambaut *et al*, 2008)。

2 结果

2.1 多刺丛集球虫, 新种, *Aggregata octaculeata* sp. nov.

终宿主: 中华蛸(*Octopus sinensis*)

寄生部位: 盲囊和肠组织及内部

发现地点: 福建连江(26°16'N, 119°47'E)以及浙江南麂岛(27°29'N, 121°01'E)

词源, 拉丁语, oct=八, 亦为蛸属的前三个字母, aculeata=多刺的, 是以终宿主蛸属的前三个字母加该种丛集球虫孢子囊有刺的结构特征命名。

模式标本存放处: 中国海洋大学水产学院标本

室, OUC-LSGB-HE0045

2.2 形态描述

被感染的中华蛸样本有31个(18个雄性个体和13个雌性个体), 体重(total weight, TW)为130.8—2140.0 g, 胴背长(mantle length, ML)为70—199 mm, 丛集球虫主要分布于盲囊和肠组织内部(图1)。

新鲜丛集球虫压片, 结果显示, 成孢子化的卵囊($n=10$)白色, 呈近球形或椭圆形, 长径为653.6—806.5 μm [(717.3 \pm 55.9) μm], 宽径为588.1—787.1 μm [(663.3 \pm 58.2) μm] (图2a)。孢子囊($n=30$)为卵球形或椭圆形, 孢子囊长径为22.4—26.1 μm [(24.3 \pm 0.8) μm], 宽径为20.5—24.6 μm [(22.4 \pm 1.0) μm] (图2b, 2c)。

扫描电镜结果同样显示孢子囊($n=30$)为卵球形或椭圆形, 孢子囊(图3d, 3e, 3f)长径为16.5—20.8 μm [(17.9 \pm 1.0) μm], 宽径为14.9—19.6 μm [(16.8 \pm 0.9) μm]。孢子囊壁(图3e, 3h)为双层, 外层膜状且光滑, 内层较厚且有刺, 它们紧密地连接在一起, 并有明显的裂缝线(ds) (图3f)。我们从新鲜压片中分离出孢子($n=10$), 呈卷曲状, 其长度为22.2—28.6 μm [(25.6 \pm 1.9) μm], 宽度为3.0—5.0 μm [(4.0 \pm 0.7) μm] (图2d)。

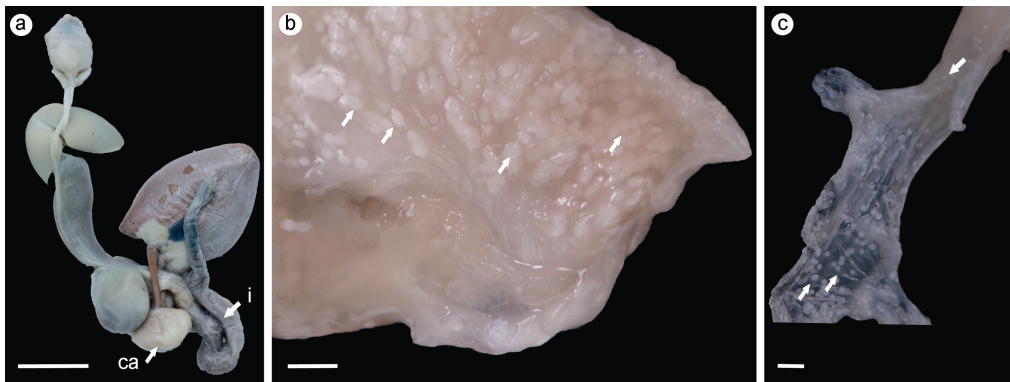


图1 丛集球虫分布

Fig.1 Distribution of *Aggregata*

注: a. 中华蛸消化系统, 比例尺=2 cm; b. 中华蛸盲囊, 箭头所指为盲囊内壁大量分布的丛集球虫, 比例尺=2 mm; c. 中华蛸肠, 箭头所指为肠内壁分布大量的丛集球虫, 比例尺=2 mm。ca: 盲囊; i: 肠

经组织学观察, 严重感染的中华蛸盲囊组织会被大量的丛集球虫卵囊替代(图3a), 在被感染的中华蛸盲囊中可以观察到丛集球虫的孢子生殖阶段(图3b, 3d—3j)和配子生殖阶段(图3c)。在丛集球虫的生活史中, 配子生殖阶段的一个小配子和一个大配子(图3c)结合能够产生合子, 从而进入孢子生殖阶段, 合子会长成一个具有众多细胞核的孢向虫(图3b), 其特征是细胞质表面有众多细胞核排列。单个核及细胞质出芽,

形成单核球形孢子母细胞。孢子母细胞会进一步发育, 成为孢子囊(图3d—3j), 孢子囊内部的细胞核和细胞质分裂形成孢子。组织学切片结果显示孢子囊内孢子的数目在8—13个之间(图3i, 3j)。

2.3 基于18S rRNA基因序列的丛集球虫系统发育分析

两种方法构建的系统发育树均具有很高的支持度, 拓扑结果强烈支持了丛集球虫科 Aggregatidae 为

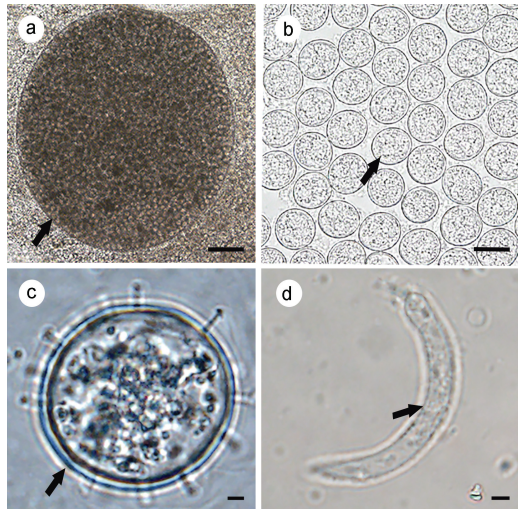


图 2 丛集球虫形态

Fig.2 Morphology of *Aggregata*

注: a. 新鲜压片下的卵囊(箭头), 比例尺: 100 μm ; b. 新鲜压片下的孢子囊(箭头), 比例尺: 20 μm ; c. 一个孢子囊(箭头), 比例尺: 2 μm ; d. 新鲜压片下的子孢子(箭头), 比例尺: 2 μm

单系发生, 中华丛集球虫 *A. sinensis* 和 *A. octopiana* 的亲缘关系最近, 与 *A. eberthi* 形成姐妹群, 最后与本研究中的多刺丛集球虫 *A. octaculeata* 聚在一起。此外, 研究结果强烈支持了 [(Aggregatidae+Cryptosporidiidae) + Haemogregarinidae] + Adeleidae 的系统发生关系(图 4)。

3 讨论

传统上丛集球虫的形态学鉴定依赖于孢子生殖阶段的形态特征, 依据光学显微镜下观察到成熟孢子囊的大小、孢子囊壁的结构、每个孢子囊内子孢子的数目以及子孢子大小等形态学特征(Gestal *et al.*, 2002, 2005, 2010)。本研究通过在光学显微镜下观察新鲜丛集球虫压片, 发现丛集球虫的孢子囊大小为 $24.3 \times 22.4 \mu\text{m}$, 与其他丛集球虫相比, 孢子囊仅小于 *A. bathytherma* 的孢子囊($28.7 \times 27.9 \mu\text{m}$) (Gestal *et al.*, 2010) (表 2)。扫描电镜结果显示, *A. octaculeata* 孢子

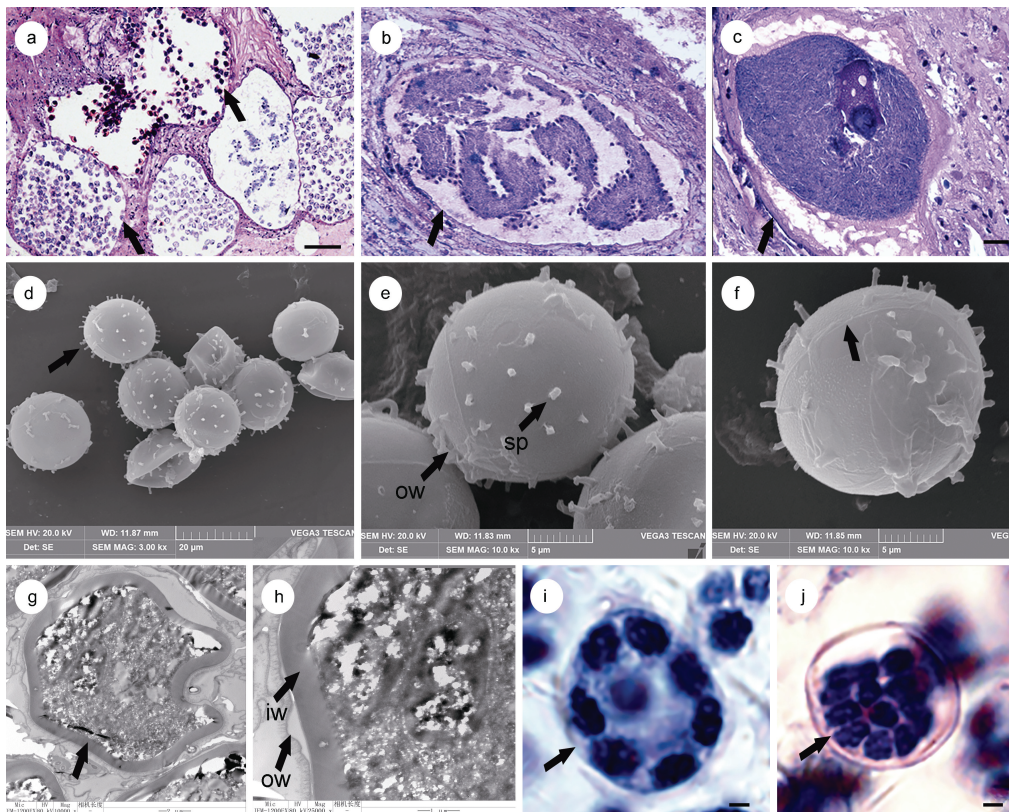


图 3 组织学切片下的丛集球虫形态和电镜下的孢子囊形态

Fig.3 Histological section of *Aggregata* and morphology of sporocysts under SEM and TEM

注: a. 盲囊被孢子生殖阶段丛集球虫的卵囊(箭头)感染, 比例尺: 100 μm ; b. 丛集球虫孢子生殖阶段的孢向虫(箭头), 有大量的细胞核, 比例尺: 20 μm ; c. 配子生殖阶段的大配子(箭头), 比例尺: 20 μm ; d. 扫描电镜中的孢子囊(箭头), 比例尺: 20 μm ; e. 扫描电镜中的孢子囊, 有双层壁, 外层膜状且光滑, 内层较厚且有刺, ow: 外层壁, sp: 刺, 比例尺: 5 μm ; f. 扫描电镜中的孢子囊, 有裂缝线(箭头), 比例尺: 5 μm ; g. 透射电镜下的孢子囊, 箭头示孢子囊壁, 比例尺: 2 μm ; h. 透射电镜下的孢子囊壁的细节, ow: 外层壁, iw: 内层壁, 比例尺: 1 μm ; i. 孢子囊的组织学切片, 内含 8 个子孢子(箭头), 比例尺: 2 μm ; j. 孢子囊的组织学切片, 内含 13 个子孢子(箭头), 比例尺: 2 μm

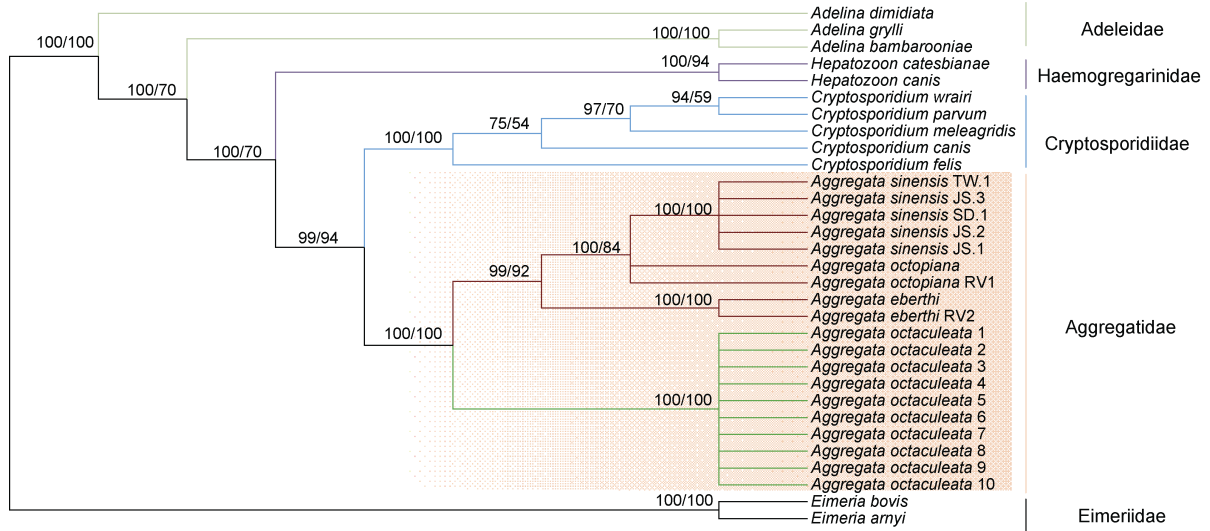


图 4 最大似然法和贝叶斯法构建的类锥体纲 18S 的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic relationships of Conoidasida by maximum likelihood and Bayesian methods

注: 基于 GTR+G 进化模型, 贝叶斯法(左, 节点数为后验概率)和最大似然法(右, 节点数为自举值)

囊大小为 17.9×16.8 μm, 这与真蛸体内 *A. octopiana* 的孢子囊(11—15 μm)大小存在较大差异(Gestal *et al.*, 1999)。丛集球虫具有宿主特异性, *A. octaculeata* 和 *A. octopiana* 分别寄生于不同宿主, 支持了中华蛸作为不同谱系从真蛸中分开的研究结果(Guerra *et al.*, 2010; Amor *et al.*, 2014; Gleadall, 2016)。而本研究中孢子囊在扫描电镜和新鲜压片中的测量结果差异较大, 推测因扫描电镜前期经过固定、脱水等处理方式所

致。中华蛸中的 *A. octaculeata* 孢子囊壁有刺(图 3d, 3f), 除此之外, *A. octopiana* 的孢子囊壁也有凸起(Gestal *et al.*, 1999; Castellanos-Martínez *et al.*, 2013), 其他丛集球虫孢子囊壁均光滑(Poynton *et al.*, 1992; Gestal *et al.*, 2000, 2005, 2010; Sardella *et al.*, 2000) (表 2)。多刺丛集球虫 *A. octaculeata* 子孢子包含在孢子囊内, 长度为 25.6 μm, 仅小于 *A. bathytherma* 的子孢子长度(49 μm) (Gestal *et al.*, 2010)。

表 2 丛集球虫属内各物种孢子生殖阶段主要特征的比较

Tab.2 Comparison in morphology of the sporogonic stages for species of *Aggregata* from cephalopod hosts

种类	宿主	孢子囊			子孢子		参考文献
		长径(μm)	宽径(μm)	内层壁	数目	长度(μm)	
<i>Aggregata eberthi</i>	<i>Sepia officinalis</i>	8.5	—	光滑	3	16.0	Labbé, 1895
<i>Aggregata kudoii</i>	<i>Sepia elliptica</i>	12.0	—	光滑	6—12	17.0	Narasimhamurti, 1979
<i>Aggregata andresi</i>	<i>Martialia hyadesi</i>	9.7	8.2	光滑	3	16.0—20.0	Gestal <i>et al.</i> , 2005
<i>Aggregata sagittata</i>	<i>Todarodes sagittatus</i>	17.0	15.0	光滑	4—8	12.0	Gestal <i>et al.</i> , 2000
<i>Aggregata bathytherma</i>	<i>Vulcanoctopus hydrothermalis</i>	28.7	27.9	光滑	14—17	49.0	Gestal <i>et al.</i> , 2010
<i>Aggregata dobelli</i>	<i>Enteroctopus dofleini</i>	23.0	21.0	光滑	9—22	21.0	Poynton <i>et al.</i> , 1992
<i>Aggregata patagonica</i>	<i>Enteroctopus megalocyathus</i>	13.0	12.0	光滑	8	18.0	Sardella <i>et al.</i> , 2000
<i>Aggregata octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	11.0—15.0	—	有刺	8	20.0	Schneider, 1875 Gestal <i>et al.</i> , 1999
<i>Aggregata millerorum</i>	<i>Octopus bimaculoides</i>	16.0	14.0	光滑	8—10	24.0	Poynton <i>et al.</i> , 1992
<i>Aggregata valdessensis</i>	<i>Octopus tehuelchus</i>	10.0	10.0	光滑	4—8	17.0	Sardella <i>et al.</i> , 2000
<i>Aggregata sinensis</i>	<i>Amphioctopus fangsiao</i>	20.6	20.3	有刺	7—18	22.8	任静, 2021
	<i>Octopus minor</i>	20.9	20.3		5—16	21.7	
<i>Aggregata octaculeata</i> sp. nov.	<i>Octopus sinensis</i>	24.3	22.4	有刺	8—13	25.6	本文

在头足类体内, 丛集球虫能够引发宿主感染, 导致盲囊上皮细胞脱落和结缔组织破裂, 造成黏膜萎缩和溃疡(Castellanos-Martínez *et al*, 2019)。目前已在真蛸体内发现 *A. octopiana* 分布于鳃、腕等组织处, 导致血细胞浸润, 甚至造成组织坏死(Mladineo *et al*, 2007), 丛集球虫迁移到消化道外被称为肠外球虫病(Mladineo *et al*, 2007; Castellanos-Martínez *et al*, 2019), 但在本研究中未发现中华蛸的肠外球虫病。多刺丛集球虫主要感染中华蛸的盲囊和肠组织, 在其他组织部位中并未发现。而严重感染的中华蛸盲囊及肠组织会被大量的丛集球虫卵囊替代(图 3a), 从而造成组织损伤。有关研究表明丛集球虫感染不是章鱼的致死因素(Hochberg, 1990), 可能是高密度的丛集球虫感染使章鱼更容易受到其他问题的影响, 如运输和温度的剧烈变化造成的应激(Poynton *et al*, 1992)。

研究表明, 寄生虫之间与宿主之间的系统发育关系不一致。虽然真蛸与中华蛸的亲缘关系非常近(Gleadall, 2016), 但本研究中的系统发育结果显示, 寄生于中华蛸中的 *A. octaculeata* 与寄生于真蛸中的 *A. octopiana* 并没有聚在一起, 与其他丛集球虫相比, 亲缘关系相对较远。

4 结论

在本研究中, 我们从中华蛸体内发现了一种丛集球虫新种, 命名为多刺丛集球虫 *Aggregata octaculeata* sp. nov., 形态学结果显示, 该物种孢子生殖阶段包括成熟孢子囊和子孢子, 孢子囊为卵球形或椭圆形, 孢子囊壁为双层, 外层膜状且光滑, 内层较厚且有刺。基于 18S rRNA 分子序列的系统发生结果进一步证实物种隶属于丛集球虫属, 并高度支持了属内[(中华丛集球虫 *A. sinensis* + *A. octopiana*) + *A. eberthi*] + 多刺丛集球虫 *A. octaculeata* 的系统发生关系。本研究的形态学和分子学数据为进一步研究头足类寄生虫分类学及系统发育进化提供基础资料, 对蛸类分类提供辅助依据, 同时也为中华蛸疾病诊断和组织病理学研究提供理论依据。

致谢 澳大利亚维多利亚博物馆卢重成教授对文章撰写提供了宝贵意见; 南鹿列岛国家海洋自然保护区管理局陈万东和倪孝品提供样品, 中国海洋大学贝类遗传育种研究室硕士研究生李嘉华协助实验, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 任 静, 2021. 蛸类寄生丛集球虫属 4 新种的形态学与分子系统学研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 14—26
- Amor M D, Norman M D, Cameron H E *et al*, 2014. Allopatric speciation within a cryptic species complex of Australasian octopuses. *PLoS One*, 9(6): e98982
- Amor M D, Norman M D, Roura A *et al*, 2017. Morphological assessment of the *Octopus vulgaris* species complex evaluated in light of molecular-based phylogenetic inferences. *Zoologica Scripta*, 46(3): 275—288
- Castellanos-Martínez S, Gestal C, Pascual S *et al*, 2019. Protist (Coccidia) and Related Diseases. In: Gestal C, Pascual S, Guerra Á *et al* eds. *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*. Cham: Springer, 143—152
- Castellanos-Martínez S, Pérez-Losada M, Gestal C, 2013. Molecular phylogenetic analysis of the coccidian cephalopod parasites *Aggregata octopiana* and *Aggregata eberthi* (Apicomplexa: Aggregatidae) from the NE Atlantic coast using 18S rRNA sequences. *European Journal of Protistology*, 49(3): 373—380
- Culling C F A, Allison R T, Barr W T, 1985. *Cellular Pathology Technique*. 4th ed. London: Butterworths
- Dan S, Iwasaki H, Takasug A *et al*, 2018. An upwelling system for culturing common octopus paralarvae and its combined effect with supplying natural zooplankton on paralarval survival and growth. *Aquaculture*, 495: 98—105
- Dan S, Iwasaki H, Takasugi A *et al*, 2019. Effects of co-supply ratios of swimming crab *Portunus trituberculatus* zoeae and *Artemia* on survival and growth of East Asian common octopus *Octopus sinensis* paralarvae under an upwelling culture system. *Aquaculture Research*, 50(4): 1361—1370
- Darriba D, Taboada G L, Doallo R *et al*, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772
- Dobell C, 1925. The life-history and chromosome cycle of *Aggregata eberthi* [Protozoa: Sporozoa: Coccidia]. *Parasitology*, 17(1): 1—136
- Garrido D, Martín M V, Rodríguez C *et al*, 2018. Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture*, 10(1): 3—14
- Gestal C, Guerra A, Abollo E *et al*, 2000. *Aggregata sagittata* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), a coccidian parasite from the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Mollusca: Cephalopoda). *Systematic Parasitology*, 47(3): 203—206
- Gestal C, Guerra A, Pascual S *et al*, 2002. On the life cycle of *Aggregata eberthi* and observations on *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae) from Galicia (NE Atlantic). *European Journal of Protistology*, 37(4): 427—435
- Gestal C, Nigmatullin C M, Hochberg F G *et al*, 2005. *Aggregata andresi* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* in the SW Atlantic Ocean and some general remarks on *Aggregata* spp. in cephalopod hosts. *Systematic Parasitology*, 60(1): 65—73
- Gestal C, Pascual S, Corral L *et al*, 1999. Ultrastructural aspects

- of the sporogony of *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae), a coccidian parasite of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from NE Atlantic coast. *European Journal of Protistology*, 35(4): 417—425
- Gestal C, Pascual S, Hochberg F G, 2010. *Aggregata bathytherma* sp. nov. (Apicomplexa: Aggregatidae), a new coccidian parasite associated with a deep-sea hydrothermal vent octopus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91(3): 237—242
- Gleadall I G, 2016. *Octopus sinensis* d'Orbigny, 2016 (Cephalopoda: Octopodidae): valid species name for the commercially valuable East Asian common octopus. *Species Diversity*, 21(1): 31—42
- Guerra Á, Roura Á, González Á F *et al*, 2010. Morphological and genetic evidence that *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 inhabits Amsterdam and Saint Paul Islands (southern Indian Ocean). *ICES Journal of Marine Science*, 67(7): 1401—1407
- Hochberg F G, 1990. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Diseases caused by protistans and metazoans. In: Kinne O ed: *Diseases of marine animals Volume III: Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata*. Published by Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 47—227
- Iglesias J, Sánchez F J, Bersano J G F *et al*, 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266(1/4): 1—15
- Kopečná J, Jirků M, Oborník M *et al*, 2006. Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: search for missing links. *Protist*, 157(2): 173—183
- Labbé A, 1895. Sur le noyau et la division nucléaire chez les Benedenia. *Comptes Rendus de Académie des Sciences Paris*, 120: 381—383
- Mladineo I, Bočina I, 2007. Extraintestinal gamogony of *Aggregata octopiana* in the reared common octopus (*Octopus vulgaris*) (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3): 261—264
- Narasimhamurti C C, 1979. The eimeriid *Aggregata kudio* n. sp. from sepia eliptica. *Angewandte Parasitologie*, 20(3): 154—158
- Okumura S, Kurihara A, Iwamoto A *et al*, 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*: improved survival and growth of common octopus paralarvae. *Aquaculture*, 244(1/4): 147—157
- Poynton S L, Reimschuessel R, Stoskopf M K, 1992. *Aggregata dobelli* n. sp. and *Aggregata millerorum* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from two species of octopus (Mollusca: Octopodidae) from the eastern North Pacific Ocean. *The Journal of Protozoology*, 39(1): 248—256
- Rambaut A, Drummond A, 2008. FigTree: tree figure drawing tool, version 1.2.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh
- Ren J, Zheng X D, Qian Y S *et al*, 2019. Pathogens and related diseases in non-European cephalopods: Asia. A preliminary review. In: Camino G, Santiago P, Ángel G *et al* eds. *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*. Cham: Springer, 227—230
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P *et al*, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539—542
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory
- Sardella N H, Ré M E, Timi J T, 2000. Two new *Aggregata* species (Apicomplexa: Aggregatidae) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca: Octopodidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology*, 86(5): 1107—1113
- Schneider A, 1875. Note sur la sporospermies oviformes du poulpe. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 4, 4045
- Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al*, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725—2729
- Tedesco P, Gestal C, Begić K *et al*, 2017. Morphological and molecular characterization of *Aggregata* spp. Frenzel 1885 (Apicomplexa: Aggregatidae) in *Octopus vulgaris* Cuvier 1797 (Mollusca: Cephalopoda) from central Mediterranean. *Protist*, 168(5): 636—648
- Warnke K, Söller R, Blohm D *et al*, 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(4): 306—312

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A NEW SPECIES OF *AGGREGATA* (APICOMPLEXA: AGGREGATIDAE) INFECTING *OCTOPUS SINENSIS*

REN Jing^{1,2}, HE Wei-Tong^{1,2}, WANG Li-Hua^{1,2}, TANG Yan^{1,2}, ZHENG Xiao-Dong^{1,2}

(1. Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract *Aggregata* (Apicomplexa: Conoidasida: Aggregatidae) is one of the commonest parasites that parasitizes in the digestive tract of cephalopods. A new species of parasitic *Aggregata*, i.e., *Aggregata octaculeata* sp. nov., was identified in *Octopus sinensis* (Mollusca: Octopodidae) in the waters of Zhejiang and Fujian Provinces based on morphological characters and 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene sequences. Morphological characteristics were described and measured in electron microscopy and light microscopy. *Aggregata octaculeata* is distinguishable in sporocyst structure (shape, size), number and size of the sporozoites, especially the different forms of sporocyst wall surfaces that possess projections or are spiny. The size of the oocysts is 653.6—806.5 μm in length and 588.1—787.1 μm in width. Mature sporocysts within oocysts are typically spherical to slightly subovoid and sporocysts are 22.4—26.1 μm in length and 20.5—24.6 μm in width. Sporozoites are typically spiral within sporocysts. Sporozoites are 22.2—28.6 μm in length and 3.0—5.0 μm in width. The phylogenetic tree constructed based on 18S rRNA indicates that *A. octaculeata* belongs to the genus *Aggregata*. Molecular phylogenetic analyses support the morphological results. Morphological characteristics combined with molecular data show that *A. octaculeata* is a new species of the genus *Aggregata* in a host that lives in western Pacific waters.

Key words *Aggregata octaculeata*; new species; *Octopus sinensis*; morphology; 18S rRNA