

微孢子虫一新种的描述及分子鉴定

吴后波¹ 吴英松² 吴灶和¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; 2. 第一军医大学热带医学研究所, 广州 510515)

关键词: 赤点石斑鱼; 格留虫; 小亚单位核糖核酸基因; 系统发育; 新种
中图分类号: S941.51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0150-05

随着集约化、高密度养殖业的发展, 传播性寄生虫病给水产业造成了严重的损失, 微孢子虫是养殖鱼类的主要病原生物之一, 迄今, 已报道的鱼类寄生微孢子虫多达 100 余种, 分属微孢子虫门 16 属^[1, 2], 其中绝大部分是鱼类特有的。在中国, 目前仅报道了三属、七种, 这可能与该领域的研究相对较薄弱有关^[3]。然而近年来由于一些不确切的原因, 生产实践中频发微孢子虫病, 给养殖业造成了严重的经济损失。作者于 2001 年 8 月在对广东省深圳市大亚湾进行海洋渔业调查中发现, 养殖的赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 被一种微孢子虫大量寄生, 严重时可导致死亡。本文通过形态观察及分子证据显示了该微孢子虫为一新种, 定为 *Glugea epinephelus* sp. nov., 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料及诊断 11 尾石斑鱼采自广东省深圳市大亚湾, 冰冻运回实验室。个体体重为 200—350g, 体长 18—28cm。按照寄生虫诊断方法进行检查。虫体染色参照吴英松^[4]报道方法。新鲜孢子涂片后, 置空气中自然干燥, 用 10% 的福尔马林固定, 吉姆萨染色 5—10min, 封片, 镜检。

1.2 孢子的纯化 从病鱼腹腔中剥离黑色胞囊, PBS 洗涤, 匀浆器匀浆, 用两层纱布过滤。滤液再用 100 μ m 孔径的筛子滤过, 蔗糖密度梯度离心 (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6), 800r/min 离心 20min。小心吸出孢子层, 用冷却的 PBS 洗涤 3 次 (640r/min, 10min), 同上进行蔗糖密度梯度离心, PBS 洗涤直到

表 1 同源及系统分析中所用的微孢子虫种

Tab. 1 All microsporidian species used in homological and phylogenetic analysis

编号 No.	微孢子虫种 Microsporidian species	GeneBank 登陆号 No. of GeneBank	宿主 Host
A	<i>Glugea. epinephelus</i>	AY090038	<i>Epinephelus akaara</i>
B	<i>G. anomala</i>	AF056016	<i>Casterosteus aculeatus</i>
C	<i>G. atherinae</i>	GAU15987	<i>Algeruba presbyter</i>
D	<i>G. placoglossi</i>	AJ295326	<i>Placoglossus altivelis</i>
E	<i>G. stephani</i>	AF056015	<i>Flatichthys flesus</i>
F	<i>Pleistophora finisterrensis</i>	AF044393	<i>Micromesistius poutassou</i>
G	<i>P. typicalis</i>	AJ044387	<i>Myoxocephalus scorpius</i>
H	<i>P. mirandellae</i>	AJ295327	<i>Rutilus rutilus</i>
I	<i>Heterosporis anguillarum</i>	U47052	<i>Anguilla japonica</i>
J	<i>Ichthyosporidium. sp</i>	L39110	<i>Ichthyosporidium sp</i>
K	<i>Loma salmonae</i>	LSU78736	<i>Onchorhynchus tshawytska</i>
L	<i>Microgemma caullery</i>	AY033054	<i>Taurulus bubalis</i>
M	<i>Microsporidium cypselurus</i>	AJ300706	<i>Cypselurus pinnatibarbatus japonicus</i>
N	<i>Pseudoloma neurophilia</i>	AF322654	<i>Pseudoloma neurophilia</i>
O	<i>Tetranoria brevifilum</i>	AF364303	<i>Saphthalmus maximus</i>
P	<i>Spraguea lophii</i>	AF056013	<i>Lophius piscatorius</i>
Q	<i>Encephalitozoon cuniculiz</i>	AF517832	<i>Oryzolagus cuniculus</i>

收稿日期: 2003-01-06; 修订日期: 2003-04-20
基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目 (KSCX2-1-04)
作者简介: 吴后波 (1967—), 男, 湖北洪湖人, 博士, 副研究员。研究方向: 海洋生物病害
E-mail: hhb_w@netease.com

镜检表明孢子已经足够纯, 血细胞板计数^[5]。

1.3 DNA 的抽提 孢子悬液经离心 (3000r/min, 10min) 后, 用含 0.5mg/mL 蛋白酶 K 的消化缓冲液 (100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-Cl, 25mmol/L EDTA, 0.5%SDS, pH8.0) 于 37℃消化过夜, 次日用等体积的酚/氯仿/异戊二醇 (25:24:1) 抽提两次, 乙醇沉淀, 沉淀溶于 50μL 无菌双蒸水中, 核酸蛋白仪测定 DNA 浓度^[6]。

1.4 聚合酶链式反应 (PCR) 与序列测定 根据已报道的微孢子虫 SSUrRNA 序列, 设计了一对引物, 正向引物 5'-CAC CAG GTT GAT TCT GCC-3', 反向引物: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。扩增条件: 95℃预变性 3min, 94℃变性 1min, 55℃退火 1.5min, 72℃延伸 2min, 35 个循环后, 72℃再延伸 5min。扩增产物用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测。产物经电泳回收, 克隆入 T 载体, 测序。

1.5 序列分析 序列经 GeneBank 进行同源性检索 (BLAST), 并进行对齐比较, 所得相似性及遗传距离矩阵用于同源树及系统发育树的构建, 所用软件为 DNAMAN (Version 4.0)。序列分析中所用到的序列及其在 GeneBank 中的登录号见表 1。寄生于人类的微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi* 作为外群对照 (out-group)。

2 结果

2.1 形态学检查及种的鉴定

研究发现, 该虫感染率达 90% 以上, 患病鱼游动缓慢, 腹部膨大, 体表、鳃未见任何出血等其他不良症状, 打开腹腔可见许多大小不一的黑色胞囊 (图 1), 最多的一尾病鱼腹腔多达 200 个胞囊, 但其他部位包括肝脏、肾脏、胆囊及肠道等部位均未见任何孢子。胞囊呈椭圆、圆形或不规则团块等状, 圆形胞囊直径为 0.3—1.2cm, 椭圆形和不规则胞囊大小为 0.6—1.4cm。另外还发现有两种类型胞囊, 一种为触感柔软, 囊壁较薄, 内含物为乳白色液状物, 其中含早期营养体, 产孢体 (Sporont) 及成熟孢子, 成熟孢子位于胞囊中央, 营养体位于外围, 产孢体所含孢核很多, 最多可达 100 余个; 另一种胞囊触感坚硬, 内含物呈乳白色块状, 其中只含成熟孢子。新鲜孢子涂片发现 (图 2), 孢子卵形, 前端稍窄, 后端钝圆, 活体标本孢子大小平均为 5.5×3.1μm [(4.6—7.2) × (2.8—3.5) μm], 福尔马林固定标本, 大小平均为 5.5×2.9μm [(4.4—7.1) × (2.6—3.2) μm]。活体时孢子呈半透明状, 不易看到极丝, 福红染色的标本可

辨别出孢子内有一与孢子纵轴成 45° 角环绕 14—16 圈的极丝。吉姆萨染色可清晰地看到孢子为单核, 位于孢子后端, 直径为 0.8—1.1μm。在细胞核下方有一椭圆形液泡, 大小平均为 1.1×0.8μm (图 3)。早期营养体近圆形, 直径约为 4.5—7.0μm, 吉姆萨



图 1 石斑鱼格留虫胞囊

Fig. 1 Cysts of *G. epinephelus*

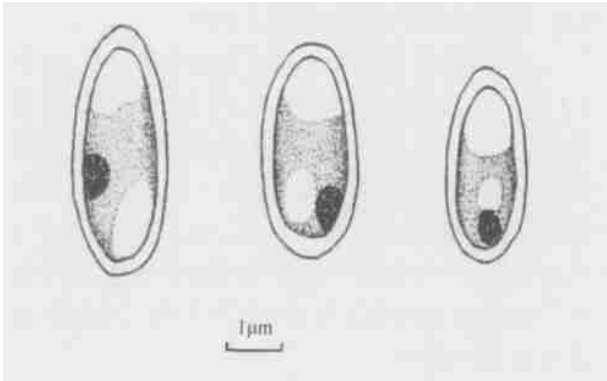


图 2 石斑鱼格留虫孢子示意图

Fig. 2 Line diagram of *G. epinephelus* spore

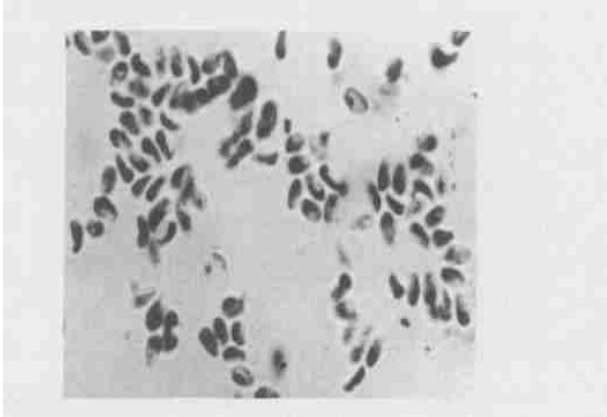


图 3 吉姆萨染色的石斑鱼格留虫孢子 (400×)

Fig. 3 *G. epinephelus* spores stained with Giemsa

染色显示为单核,随着营养体的继续发育,形状变得不规则,孢核反复分裂,形成多核原质体,之后发育为产孢体,孢子的具体发育过程未观察到。与其他相似典型种的比较发现,石斑鱼格留虫与 *Glugea anomal* 等格留虫属相关种有较大的相似性,而与中

国以前报道的 *Plistophora priacanthicola* sp. nov. 差异较大,主要在极丝缠绕圈术及核型,但孢囊颜色又与已报道的格留虫有显著差异,故而定为新种。几种微孢子虫典型种的比较,详见表 2。模式标本保存在中国科学院南海海洋研究所。

表 2 石斑鱼格留虫与相近典型种的比较分析
Tab. 2 The differences among *G. epinephelus* sp. nov., and some similar type species

寄生虫	地区分布	寄主	寄生部位	孢子大小 (μm)	孢囊大小 (μm)	孢囊颜色	极丝 圈数	孢子 核型
<i>G. epinephelus</i> sp. nov.	中国	<i>Epinephelus akaara</i>	腹腔	5.5×3.1	0.3—1.2	黑色	14—16	单核
<i>G. anomala</i>	法国、日本	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	游走细胞相关组织	4.9×2.5	0.25—0.85	白色	11—16	单核
<i>Plistophora Priacanthicola</i> sp. nov.	中国	<i>Priacanthius tayenus</i>	腹腔、生殖腺	5.45×3.14	1.0—2.5	灰(乳)白色、淡黄色	18—24	单核
<i>P. typicalis</i>	法国	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	腹腔条纹肌	4.4×2.3	大小不一	乳白色	25—33	多核
<i>P. senegalensis</i>	塞内加尔	<i>Sparus aurata</i>	肠壁	4.45×2.37	0.3—0.8	白色	19—25	多核
<i>Loma morhua</i>	加拿大	<i>Gadus morhua</i>	鳃、心脏、脾脏	4.2×2.0	大小不一	白色	16—17	单核

2.2 孢子纯化与核酸的提取及测序

匀浆过滤的孢子经蔗糖密度梯度离心后,位于 1:1 至 1:2 之间的白色层为孢子,黑色的孢囊膜等成分位于 1:3 至 1:4 之间,血细胞板计数,孢子浓度为 6.4×10^7 个/mL, PBS 稀释到 2×10^7 个/mL。酚/氯仿法提得的 DNA 浓度为 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 扩增得到 PCR 产物大小约为 1300bp, PCR 产物连接 T 载体, 测序得到 1326bp 的 SSUrRNA 基因的部分序列, GenBank 登录号为 AY090038。

2.3 序列分析

Blast 检索发现, *G. epinephelus* 与 3 种格留虫 *G. anomala*, *G. aterinae*, *G. stephani* 的同源性分别高达 92.6%, 92.0%, 92.6%, 是同源性最高的三种, 而与 *P. typicalis* 的同源性仅为 87.9%。对齐比较后所作出的遗传距离图谱也表明 *G. epinephelus* 与上述三种格留虫有着最小的遗传距离, 分别为 0.074, 0.080, 0.074。但与寄生于香鱼等的 *G. pleoglossi* 同源性仅为 77.9%, 遗传差距达 0.221。同源树见图 4。从系统发育树(图 5)很清楚的可以看到, *G. epinephelus* 与 *G. anomala*, *G. aterinae*, *G. stephani* 聚在一起, 并得到很高的可信值 (Confidence value) 支

持, 达 100%。而与其他属种亲缘关系差距较大, 如与匹里虫属典型种 *P. typicalis* 遗传距离达 0.121, 与鳗鲡匹里虫 (*Heterosporis anguillarum*) 达 0.146, 与 *Loma* 属的 *Loma salmonae* 的更是高达 0.285。

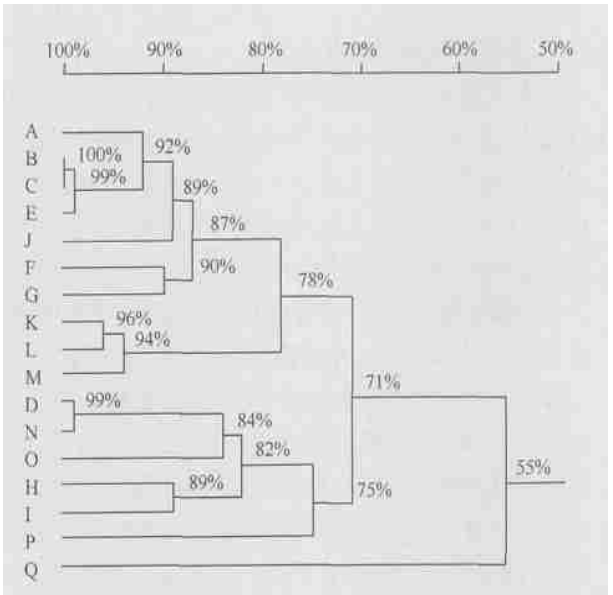


图 4 17 种微孢子虫同源树(分支点数值为相似度)
Fig.4 Homology tree based on the 17 microsporidia partial sequences of SSUrRNA

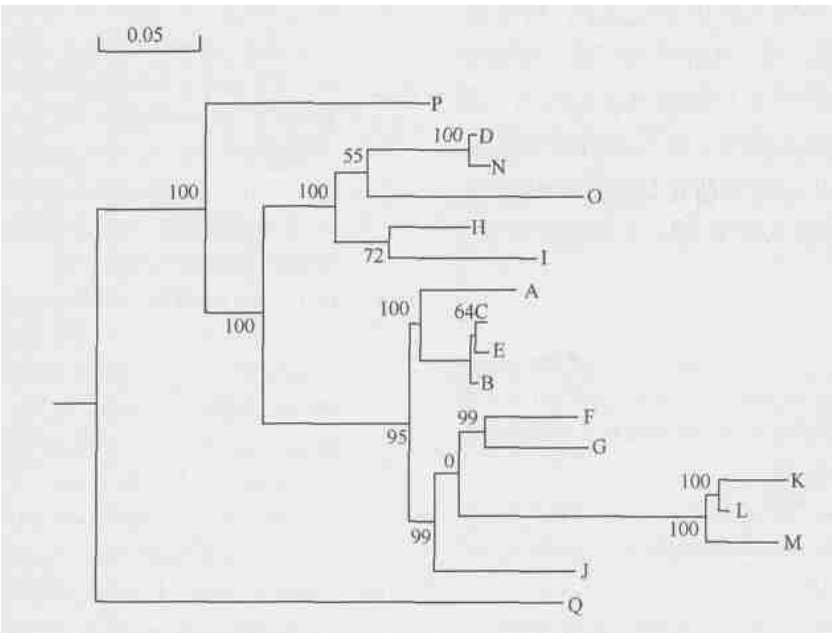


图5 17种微孢子虫系统发育树(分支点数值表明可信度)
Fig.5 Phylogenetic tree of 17 microsporidian small subunit ribosomal DNA

3 讨论

石斑鱼是传统的养殖品种,特别是近年来石斑鱼作为沿海优质商品鱼主要品种之一得到了很大的发展,然而任何一种养殖品种,随着集约化养殖的发展,病害问题也日益严重,本文报道的石斑鱼格留虫就严重威胁我国南海沿海石斑鱼的养殖。尽管微孢子虫的研究工作已经走过了一个多世纪,但迄今未有一个广为认同的分类系统。在 Sprague^[8] 的最新分类系统中,根据生活史中是否有出现双核将微孢子虫分为双单倍体纲(Dihaplophasea)和单倍体纲(Haplophasea)。长期以来,有关微孢子虫的分类及系统发育都是居于孢子及其前孢子的形态生物学性状作出的。电子显微镜的使用为微孢子虫的分类及系统发育提供了大量有价值的特征,然而电镜费时费力且要求很高的专业技术人员,而且大量的证据显示包括孢子大小、形状、孢核数、极囊结构、极丝圈数等生物性状的差异不但存在与种间也存在于种内^[9]。近年来,分子生物技术已广泛被人们用于微孢子虫的分类、系统发育学及疾病检测,特别是居于 rDNA 系列的比较研究已被广大学者认为是非常有用的工具,具有灵敏、特异性高、省时的优点。但 Baker^[12] 等指出居于分子数据建立的分类系统与居于形态、超微结构建立的有着明显的差异。

目前国内报道的海水鱼类寄生微孢子虫仅有大眼鲷匹里虫 (*Pleistophora priacanthusis* Hua & Dong,

1983), 鳗鲡匹里虫 (*P. anguillanum*, Hoshina, 1951, 现已归入 *Heterosporis* 属) 和湛江小孢子虫 (*Microsporidium zhangangensis*, Hua et al, 1988)^[3]。寄生于石斑鱼的微孢子虫国内外迄今未见报道。尽管在本研究中没有观察到前孢子发育的详细过程,但根据微孢子虫的最基本特征^[1]: 单细胞孢子,内含孢质,单极管缠绕孢质数圈不等,孢质前有极盘(Polaroplast),后有液泡(Posterior vacole)等,可以鉴定其为微孢子虫。然而由于其孢子大小,寄生位置,孢囊颜色等与已报道的鱼类寄生微孢子虫有着明显的差异,故定为新种。由于其孢子单型,产孢体产生的孢子数量较多,多达 100 余个,在具有生活史各期形式的孢囊中央,成熟孢子位于中央,其他生活史期分布在周围等特征表现出似格留虫属的特征,而与匹里虫属差距较大。但是观察未发现在鱼体任何细胞发现成熟孢子,而是大量孢囊积聚于腹腔,这可能是由于形成孢囊后从寄生组织脱落,而孢子发育前期采用的检测水平不能检出,这还有待于进一步对其生活史及传播模式的研究。根据从 Genbank 选择的 15 种鱼类寄生微孢子虫所做的同源树及系统发育树可以看出,该种应该归入格留虫属,这与形态学观察结果一致。

到目前为止,由于微孢子虫与粘孢子虫一样成熟孢子有一层坚硬的几丁质外壳,国内外迄今还未筛选出治疗鱼类微孢子虫的药物。鱼类微孢子虫的控制还只限于杜绝传播源以此来防止感染。但是大

多数对其传播模式及发育过程的研究发现, 鱼类微孢子经口传播, 进入消化道, 当条件适宜时, 极丝挤出释放感染性的孢原质侵入靶细胞开始起发育, 发育过程需要进入宿主血液循环。这为通过药物杀死其营养体阻断其发育从而达到防止微孢子虫病发生的目的提供了依据, 当然这需要进一步的研究证实。

参考文献:

[1] Zhang J Y, Wu Y S, Lu Y S, *et al.* Advance in research of microspora infecting fish. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **28**(6): [章晋勇, 吴英松, 鲁义善, 汪建国. 鱼类寄生微孢子虫研究进展 [J]. 水生生物学报, 2003 **28**(6):]

[2] Nilsen F. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia with particular reference to genera that infect fish [J]. *Journal of Parasitology*, 2000, **86**(1): 128—113

[3] Cheng Q L. Fish parasites in LiaoHe. Proceedings of fish parasite in China freshwater [M]. Beijing: Agriculture publisher, 1984 9—21 [陈启臻. 辽河鱼类寄生孢子虫. 中国淡水鱼类寄生虫论文集 [M]. 北京: 农业出版社, 1984 9—21]

[4] Wu Y S, Wang J G. Studies of the ultrastructure of the sporogenesis of *Myxobolus rotundus* Nemecek. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(1): 61—69 [吴英松, 汪建国. 圆形碘泡虫孢子发生的超微研究. 水生生物学报, 2001, **25**(1): 61—69]

[5] Wu Y S, Wang J G. The immunogenicity of *myxobolus rotundus* Nemecek, 1911. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(3): 246—251 [吴英松, 汪建国. 圆形碘泡虫免疫原性的研究. 水生生物学报, 2000 **24**(3): 246—251]

[6] Lu Y S, Wu Y S, Wang J G. A method for isolation, purification and lysis of *Myxobolus* spores. [J] *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4)431—432 [鲁义善, 吴英松, 汪建国. 圆形碘泡虫孢子的分离纯化与裂解. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 431—432]

[7] Pomport-Castillon C, De Jonckheere J F, Romestand B. Ribosomal DNA sequences of *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus* and *Spraguea lophii* (Microsporidia): phylogenetic reconstruction [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, **40**: 125—129

[8] Sprague V, James J B, Edwin I H. Taxonomy of phylum microspora [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1992, **18**(5/6): 286—395

[9] Dunn A M, Smith J E. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission [J]. *Microbes and Infection*, 2001, **3**: 381—388

OCCURRENCE OF A NEW MICROSPORIDIUM IN THE ABDOMINAL CAVITY OF *EPINEPHELUS AKAARA*

WU Hou-Bo¹, WU Ying-Song² and WU Zao-He¹

(1. South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301;
2. Institute of Tropical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

Abstract: With the rapid development of aquaculture, the limit resulted from infective parasites is being significant. In a routine investigation of ocean fishery, a new species of fish parasitic microsporidium was found in the abdominal cavity of *Epinephelus akaara* at Daya Wan in South China Sea in October, 2001. To our best knowledge this is the first report of parasitic microsporidium in groupers in the world. The type specimens were preserved in the South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences. Through routine taxonomic detection, we placed it in the genus of *Glugea*, and named it *Glugea epinephelus* sp. nov. for it owns the obvious and representative characteristics of *Glugea* genus. However, the specie reported in the present study have significant differences compared to other microsporidiums belong to *Glugea* genus reported until now. Among the differences, it is most significant that the xenomas of *Glugea epinephelus* are black. For more validating the taxonomic position of the microsporidium, the SSUrRNA sequence of the pathogen was amplified using a specific pair primer. We compared the SSUrRNA sequences of *Glugea epinephelus* and that of other 15 species from GeneBank. The constructed homology tree and phylogenetic tree of these species displayed that there are highest homology between *Glugea epinephelus* and *G. anomala*, the type specie of *Glugea* genus, but exist relative significant genetic differences with *Pleistophora typicalis*, the type specie of *Pleistophora* genus and *Loma salmonae*, the type specie of *Loma* genus. As a result, we thought that the microsporidium was a new specie and belong to *Glugea* genus.

Key words: *Glugea epinephelus*; *Epinephelus akaara*; SSUrDNA; Phylogeny; new species