

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00367

我国淡水鱼类柱形病病原菌柱状黄杆菌的遗传多样性

王良发^{1,2} 谢海侠² 张金² 李楠² 姚卫建² 张立强²
熊传喜¹ 聂品²

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 为认识我国淡水鱼类烂鳃病的病原以及柱形病在我国的发生情况, 实验从发生烂鳃病的病鱼中分离细菌性病原, 经过生理生化特性分析以及是否在含托普霉素的 Shieh 培养基中生长并形成黄色假根状菌落, 是否产生降解明胶和硫酸软骨素的酶类等特性的鉴定, 并结合 16S rDNA 序列分析, 证实柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 是所分离的烂鳃病的病原。同时, 研究也证实 20 世纪曾经命名为烂鳃 (Gill-rot) 病原的鱼害黏球菌 (*Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, 1975) 是柱状黄杆菌的同物异名。利用分离到的 16 株柱状黄杆菌的 16S rDNA 序列, 以及已经发表的柱状黄杆菌的相关序列, 构建了系统发育树, 发现柱状黄杆菌的菌株聚成 3 枝, 与柱状黄杆菌的三种基因组型 (Genomovar) 相对应。其中当时命名为鱼害黏球菌的强毒株 G₄ 与分别分离自日本和美国的菌株聚为一枝。另外两枝包括的菌株较多, 它们中的一些菌株来源于相同的鱼类宿主, 如鲤形目的种类; 但是, 这两枝也包括一些特有的株, 如从欧洲和美国的鲑形目鱼类上分离的柱状黄杆菌聚为一枝, 这一枝还包括我国曾经命名为鱼害黏球菌的 G₁₈ 弱毒株。从我国隶属于鲈形目的鳊鱼和鲴形目的中华鲴上分离到的柱状黄杆菌则聚为另外一枝。作者认为对不同基因组型菌株的致病性和致病机理的研究将可能从根本上认识鱼类柱形病的流行规律。

关键词: 柱状黄杆菌; 同物异名; 柱形病; 16S rDNA; 系统发育; 基因组型

中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)02-0367-11

鱼类柱形病 (Columnaris disease) 是淡水鱼类养殖中的一类严重的细菌性疾病, 在世界范围内都有分布^[1]。其病原的研究可以追溯到 20 世纪初, 最早在密西西比河发现并命名, 由于菌体为一种细长杆菌且能形成柱状堆积, 将其命名为柱状芽孢杆菌 (*Bacillus columnaris*)^[2]。随后, Ordal 和 Rucker^[3] 从多种鱼类中分离到引起柱形病的病原菌, 但将其命名为柱形粒球黏细菌 (*Chondrococcus columnaris*)。与此同时, Garnjobst^[4] 从池塘中患柱形病的鱼体上分离到病原菌, 将其命名为柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnaris*)。根据当时的分类系统, 粒球黏细菌属 (*Chondrococcus*) 和嗜纤维菌属 (*Cytophaga*) 分别隶属于不同的科, 前者可形成微孢囊 (Microcyst) 和子实

体 (Fruiting body), 而后者则不能形成这样的结构。但在广泛收集柱形病病原, 经过传代后发现柱形粒球黏细菌会失去形成微孢囊和子实体的特点, 因此有学者认为柱状嗜纤维菌是柱形粒球黏细菌的变异株^[5, 6]。Pacha 和 Ordal^[7] 从生化组成的角度研究了柱形粒球黏细菌的鸟嘌呤与胞嘧啶的比例 (Guanine-cytosine ratio), 并与粒球黏细菌属标准株珊瑚粒球黏细菌 (*Chondrococcus corallodides*) 进行了比较, 发现两者差别很大, 认为柱形粒球黏细菌的分类地位需进一步研究。根据伯杰氏手册第八版的描述, 引起鱼类柱形病的病原在分类上属于不形成微孢体和子实体的一个新属, 即屈挠杆菌属 (*Flexibacter*)。直到 20 世纪 90 年代, 鱼类柱形病病

收稿日期: 2008-10-20; 修订日期: 2009-07-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2009CB118703) 资助

作者简介: 王良发 (1982—), 男, 四川广安人; 硕士研究生; 主要从事鱼类病害研究。E-mail: wlf_25@163.com

通讯作者: 聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

原的命名才为学术界广泛接受。Bernardet, *et al.*^[8] 将该病原归并到黄杆菌属(*Flavobacterium*), 而柱形粒球黏细菌(*Chondrococcus columnaris*)、柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris*)及柱状屈挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)则是柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)的同物异名。日本、美国、芬兰、比利时、巴西等国家的学者近年来分别报道了所在国家的柱状黄杆菌和柱形病的流行病学^[9—13], 而我国目前还没有这方面的报道。

在我国, 柱状嗜纤维菌和柱状屈挠杆菌这两种名称都在有关淡水鱼类病害的研究中使用过, 引起的症状基本一致, 主要包括烂鳃、烂尾以及内脏充血等^[14—16]。细菌性烂鳃病也是淡水鱼类中发生频率最高的疾病^[17]。湖北省水生生物研究所鱼病研究室^[18]从患烂鳃病的草鱼中分离到一种病原菌, 定名为鱼害黏球菌(*Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, 1975), 隶属于黏细菌目(*Myxococcales*), 黏球菌科(*Myxococcaceae*)。鱼害黏球菌的菌体可在鳃丝的边缘形成柱子样的堆积; 而且, 我们发现鉴定柱状黄杆菌的五步法^[19]同样适用于鱼害黏球菌, 即(1)可在终浓度为 1 μg/mL 托普霉素的 Shieh 培养基中生长; (2)形成黄色假根状菌落; (3)能够产生降解明胶的酶类; (4)能够结合刚果红; (5)产生硫酸软骨素降解酶。

因此, 有必要对引起我国淡水鱼类以烂鳃为主要症状的细菌性病原开展进一步的研究, 对其病原菌有一个比较正确的认识。

为此, 我们在湖北、广东、安徽、四川、北京等省市发生鱼类烂鳃病的水产养殖场开展了柱状黄杆菌的调查, 对分离到的病原进行了鉴定。同时, 对曾经命名为鱼害黏球菌的菌株也进行了分子生物学方面的鉴定。在此基础上, 我们利用已经报道的柱状黄杆菌的 16S rDNA 序列和本研究中克隆到的 16S rDNA 序列, 构建了柱状黄杆菌的系统发育树, 对我国流行的鱼类柱形病和其病原的遗传多样性有进一步的认识。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

从湖北、广东、安徽、四川、北京等省市水产养殖场的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)、中华鲟(*Acipenser sinensis*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)、红白锦鲤(*Cyprinus carpio kohaku*)、长吻鮠(*Leiocassis longirostris*)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)等鱼类中患柱形病的个体分离柱状黄杆菌(表 1)。曾经命名为鱼害黏球菌强毒株 G₄和弱毒株 G₁₈为中国科学院水生生物研究所保存。

表 1 16S rDNA 序列及其来源细菌与宿主
Tab. 1 16S rDNA sequences used in the present study with their derived bacteria and hosts

细菌 Bacterium	菌株 Stain	登录号 GenBank accession number	宿主 Host	地点 Locality
<i>F. columnare</i> 柱状黄杆菌	G ₄ ^a	EU395796	草鱼 Grass carp <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	武汉 Wuhan
	G ₁₈ ^a	EU395794	草鱼 Grass carp <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	武汉 Wuhan
	Z0	EU395791	鳊 Chinese perch <i>Siniperca chuatsi</i>	肇庆 Zhaoqing
	Z4	EU395792	鳊 Chinese perch <i>Siniperca chuatsi</i>	肇庆 Zhaoqing
	Z6	EU395795	鳊 Chinese perch <i>Siniperca chuatsi</i>	肇庆 Zhaoqing
	Z13	EU395793	草鱼 Grass carp <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	高要 Gaoyao
	LN1311	EU395790	草鱼 Grass carp <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	武汉 Wuhan
	C5	EU395797	胭脂鱼 Chinese sucker <i>Myxocyprinus asiaticus</i>	宜昌 Yichang
	X1	EU395799	中华鲟 Chinese sturgeon <i>Acipenser sinensis</i>	宜昌 Yichang
	QHJ1	EU395802	斑点叉尾鮰 Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	清江 Qingjiang

续表

细菌 Bacterium	菌株 Stain	登录号 GenBank accession number	宿主 Host	地点 Locality
	QHJ2	EU395803	斑点叉尾鲷 Channel catfish	清江
	H10	EU395801	<i>Ictalurus punctatus</i>	Qingjiang
	BJ4	EU395802	草鱼 Grass carp	汉川
	B2	EU395798	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Hanchuan
	A8	EU395800	红白锦鲤 koi	北京
	HJ	EU402411	<i>Cryprinus carpio kohaku</i>	Beijing
	IAM14301 ^b	AB010951	草鱼 Grass carp	安徽
	AU-98-24	AY842899	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Anhui
	Ga-6-93	AY842901	草鱼 Grass carp	Anhui
	?	AY095342	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Anhui
	EK-28	AB016515	长吻鲩 Longsnout catfish	合江
	LP 8	AB015480	<i>Leiocassis longirostris</i>	Hejiang
	PH-97028	AB015481	大麻哈鱼 Salmonid	美国
	FK 401	AB010952	<i>Oncorhynchus keta</i>	USA
	8239/97	AJ831826	斑点叉尾鲷 Channel catfish	美国
	8128/97	AJ831825	<i>Ictalurus Punctatus</i>	USA
	3294/95	AJ831824	鲤鱼 Common carp	美国
	ATCC 49512	AY635167	<i>Cyprinus carpio</i> L.	USA
	ATCC 49513	AB023660	斑点叉尾鲷 Channel catfish	美国
	IFO 15970	AB078043	<i>Acipenser sinensis</i>	USA
	IFO 14942	D12664	日本鳗鲡 Japanese eel	日本
	DSM 2063	AM230487	<i>Anguilla japonica</i>	Japan
	IAM 12365	D12656	泥鳅 Loach	日本
	CSF 259-93	AY662494	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Japan
	ATCC 49418	AY662493	香鱼 Ayu	日本
	ATCC 33236	L04320	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Japan
	B. gracilis	L04321	日本鳗鲡 Japanese eel	日本
	B. ureolyticus	M86695	<i>Anguilla japonica</i>	Japan
	B. distasonis	D12657	虹鳟 Rainbow trout	芬兰
	C. arvensicola	D12658	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Finland
	C. aurantiaca		北极红点鲑 Arctic charr	芬兰
			<i>Salvelinus alpinus</i>	Finland
			鳟鱼 Trout	芬兰
			<i>Squaliobarbus curriculus</i>	Finland
			褐鳟 Brown trout	法国
			<i>Salmo trutta</i> L.	France
			黑鲟 Black bullhead	法国
			<i>Ictalurus melas</i>	France
约氏黄杆菌	IFO 15970	AB078043		
<i>F. johnsoniae</i>	IFO 14942	D12664		
水生黄杆菌	DSM 2063	AM230487		
<i>F. hydati</i>	IAM 12365	D12656		
嗜冷黄杆菌	CSF 259-93	AY662494		
<i>F. psychrophilum</i>	ATCC 49418	AY662493		
纤维拟杆菌	ATCC 33236	L04320		
<i>B. gracilis</i>				
解脲拟杆菌	ATCC 33387	L04321		
<i>B. ureolyticus</i>				
吉氏拟杆菌	ATCC 8503	M86695		
<i>B. distasonis</i>				
野生嗜纤维菌	IAM 12650	D12657		
<i>C. arvensicola</i>				
橙黄嗜纤维菌	NCIMB 8628	D12658		
<i>C. aurantiaca</i>				

注: a 柱状黄杆菌 G₄ 和 G₁₈ 菌株是曾被命名为鱼害黏球菌的 G₄ 和 G₁₈ 菌株; bIAM14301 为柱状黄杆菌标准菌株, 其他图表中不再说明

Note: a *F. columnare* G₄ and G₁₈ representing strains of *Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, 1975; bIAM14301 is the standard stain of *F. columnare*. Similar indications are employed in other tables or figures

1.2 培养条件

细菌在 27°C 条件下于 Shieh 培养基(1 L 培养液中, 含蛋白胨 5 g, 酵母粉 0.5 g, 0.01 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g K_2HPO_4 , 0.05 g KH_2PO_4 , 0.3 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0067 g $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g NaHCO_3 , pH 7.2)中振荡培养 36h, 27°C 平板划线纯化筛选, 再次接种单菌落于液体培养基, 27°C 摇床培养 36h 后保种备用。

1.3 常规生化鉴定

参照 Griffin^[19]鉴定柱状黄杆菌的方法, (1)配制浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 托普霉素的 Shieh 培养基, 接种供试菌株, 27°C 恒温培养, 观察生长情况及菌落形态特征; (2)配制含 10 mg/mL 明胶的 Shieh 培养基平板: 将 10 g 明胶加入 1 L Shieh 培养基, 121°C, 130 kPa 灭菌 15min, 制备平板, 冷却, 用牙签点种供试菌株, 培养 48h 后在通风厨内向平板倒入 HgCl₂, 浸没培养基, 10min 后菌落周围有明显的透明圈为阳性; (3)配制含 30—50 mg/mL 刚果红 Shieh 培养基, 同样方法灭菌并制平板, 用牙签点种供试菌株, 27°C 培养 48h, 平板上菌落呈深红色为阳性; (4)配制硫酸软骨素平板: 配制 4 mg/mL 的硫酸软骨素溶液和 5% 的牛血清白蛋白组分 V, 分别加入到 37°C 左右的 Shieh 培养基中, 使硫酸软骨素和牛血清白蛋白组分 V 的终浓度分别为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1%, 制平板, 冷却, 用牙签点种供试菌株, 培养 48h 后在通风厨内向平板倒入 4 mol/L 的冰乙酸浸没培养基, 10min 后菌落周围有明显的透明圈为阳性。并参考《常见细菌系统鉴定手册》^[20], 对纯化的菌株进行菌体形态、菌落形态和培养特征的观察及主要生理生化试验。

1.4 分子生物学鉴定及系统发育树构建

基因组的提取 将菌株接种于 100 mL Shieh 培养基中, 27°C 振荡培养 36—48h, 1140 r/min 离心 10min 收集细胞, 用于基因组提取。每 10 mL 菌液加入 2 mL 消化液(10 mmol/L Tris, 0.1 mol/L EDTA, 1% SDS, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase, pH 8.0), 37°C 孵育 30min。消化完成后, 在消化液中加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)混合液, 抽提两次, 最后用 1/10 体积的 10 mol/L 醋酸铵和 2.5 倍体积的冰乙醇沉淀基因组, 4°C 1180 r/min 离心 15min 获取基因组 DNA。DNA 用 70%乙醇洗涤, 干燥后溶解于 0.1 mL 去离子水。

16S rDNA 的克隆及测序 柱状黄杆菌 16S rDNA 的特异性引物采用 Bader, et al.^[21]筛选出的引物

FvpF1: 5'-GCCCAGAGAAATTTGGAT-3'和 FvpR1: 5'-TGCGATTACTAGCGAATCC-3'。扩增条件为: 94°C 5min, 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min 30s, 循环 30 次, 72°C 延伸 5min。将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上进行克隆测序。

系统发育树的构建 柱状黄杆菌属于嗜纤维菌属-黄杆菌属-拟杆菌属类群(*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, CFB), 为了阐明鱼害黏球菌 G₄、G₁₈ 和从我国患烂鳃病或柱形病的鱼类中分离到的细菌病原与柱状黄杆菌之间的系统发育关系, 从 GenBank 中下载了黄杆菌属(*Flavobacterium*)、嗜纤维菌属(*Cytophaga*)及拟杆菌属(*Bacteroides*)部分种类的 16S rDNA 序列(表 1)。利用 Clustal X 软件进行序列比对^[22], 并辅以手工校正。以 16S rDNA 为遗传标记, 用系统发育分析软件 PHYLIP(Version 3.6), 基于邻位相连法(Neighbor-joining)构建 NJ 树, 基于最大似然法(Maximum likelihood, ML)的 MrBayes 法构建 ML 树(Felsenstein, 1981), 并进行 1000 次 Bootstraps 重复检验。以同科的吉氏拟杆菌(*Bacteroides distasonis*)作为外类群。树文件用 Treeview(Version 6.6)软件编辑。据 Kimura-2 参数法用 Mega3.1^[23]软件对序列变异水平进行分析。

2 结果

2.1 细菌形态特征

菌体形态呈细长、弯曲或直的杆状, 革兰氏染色阴性(图 1A), 无鞭毛, 27°C 培养 24h 出现干燥的、平铺在培养基表面上呈蔓延生长的菌落, 菌落边缘不整齐、假根状、中央较厚、呈颗粒状、大小不一, 菌落最初与培养基的颜色相近, 随着培养时间的延长逐渐变为淡黄色(图 1B)。

2.2 生化鉴定

曾命名为鱼害黏球菌的菌株 G₄、G₁₈ 和分离到的 14 株病原菌生化鉴定的结果一致, 它们都可以: (1)在终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 托普霉素的 Shieh 培养基中生长(图 1B); (2)形成黄色假根状菌落(图 1C); (3)能够产生降解明胶的酶类(图 1D); (4)能够结合刚果红(图 1E); (5)产生硫酸软骨素降解酶类(图 1F)。其他生化特性(表 2), 这些菌株都可初步鉴定为柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)。

2.3 系统发育分析

所有菌株的基因组经特异引物 PCR 扩增得到

1200 bp 左右的 16S rDNA 条带。对 16S rDNA 序列变异水平分析表明, 曾命名为鱼害黏球菌的 G₄、G₁₈ 菌株, 以及本研究分离的 14 株细菌的 16S rDNA 序列与拟杆菌属和嗜纤维菌属的变异幅度在 26.4%—32.6%, 远远大于与黄杆菌属其他种类的变异幅度 (6.9%—8.6%), 与柱状黄杆菌其他已经报道的 13 株的变异幅度为 0—2.1%(表 3)。由此可见, G₄、G₁₈ 菌株以及本研究中分离到的菌株与已经报道的柱状

黄杆菌的变异幅度远远小于本属其他种, 这也支持它们同为柱状黄杆菌的结论。

用 16S rDNA 序列构建的系统发育树(图 2)。从我国分离到的细菌在系统树上都与已经报道的黄杆菌属的细菌聚在一起, 形成一大枝, 有 100% 的支持率。这些都支持曾命名为鱼害黏球菌的病原菌和本研究分离到的病原菌均为柱状黄杆菌的结论。

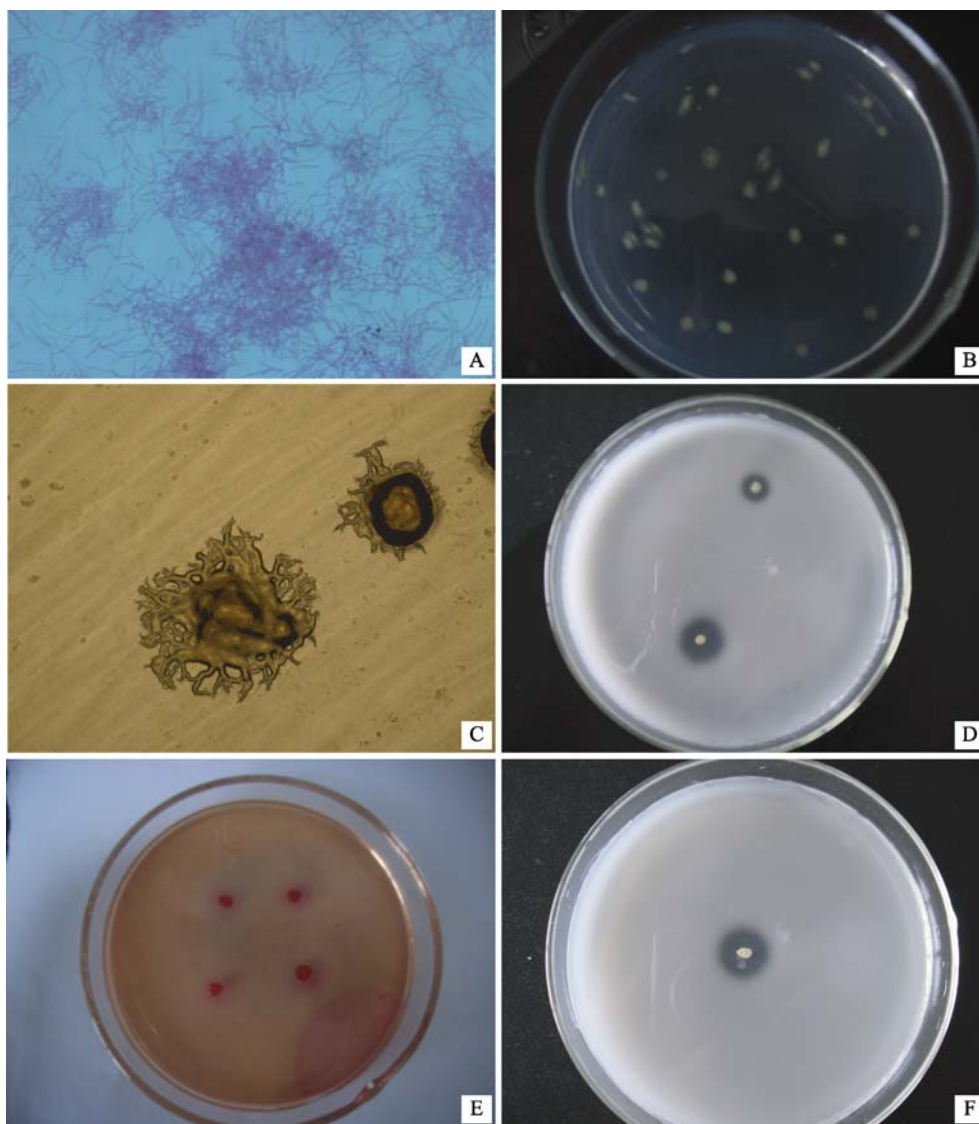


图 1 柱状黄杆菌的菌体形态、在 Shieh 平板上菌落形态、明胶降解能力、硫酸软骨素分解能力以及刚果红结合能力的研究结果

Fig. 1 *Flavobacterium columnare* cultured in Shieh medium, and its characteristics in degrading gelatin and chondroitinase and in binding Congo red

A. 柱状黄杆菌 G₄ 菌株的光镜照片, 示菌体, $\times 1000$; B. 在含 1 $\mu\text{g/mL}$ 托普霉素的 Shieh 培养基中; C. 示假根, $\times 100$; D. 菌落周围形成透明的环, 示降解明胶; E. 结合刚果红; F. 菌落周围形成透明的环, 表示降解硫酸软骨素

A. The morphous of *F. columnare* G₄ on light microscope, $\times 1000$; B. *F. columnare* G₄ grown on Shieh agar medium with 1 $\mu\text{g/mL}$ tobramycin; C. formed rizoid, $\times 100$; D. transparent cycle around the colony showing ability in degrading gelatin; E. showing binding of Congo red; F. transparent cycle around the colony showing production of chondroitinase

表 2 柱状黄杆菌菌株的生理生化特征
Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of *Flavobacterium columnare*

生化测试 Characteristics	G ₄	G ₁₈	Z0	Z4	Z6	Z13	LN1311	C5	X1	QJH1	QJH2	H10	BJ4	B2	A8	HJ
黄色假根 Flexirubin pigment, rhizoid colony	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
抗托普霉素 Tobramycin resistance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硫酸软骨素 AC 裂解酶 Chondroitin AC lyase production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吸附刚果红 Congo red absorption	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水解明胶 Gelatin hydrolysis of	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水解淀粉 Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
水解纤维素 Cellulose hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
水解卵磷脂 Lecithin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
分解七叶灵 Esculin degradation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S 试验 H ₂ S production	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
触酶 Catalase production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
亚硝酸盐还原 Nitrite reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
发酵葡萄糖 Glucose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
抗新霉素 Neomycin resistance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树,可以将柱状黄杆菌的菌株分为 3 枝,它们并没有明显的地域分布特点。但第 I 枝所包括的菌株最少,只有 3 株,分别是 20 世纪 70 年代在我国发现的曾命名为鱼害黏球菌的 G₄ 强毒株、已经报道的从日本的香鱼(*Plecoglossus altivelis*)和美国的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)分离到的两株柱状黄杆菌。第 II 和第 III 枝包括的菌株很多,每枝都有来源于多个分类单元鱼类,包括鲤形目的种类,如草鱼,鲶形目的种类,如斑点叉尾鲷和鳗鲡目的日本鳗鲡(*Anguilla japonica*);这两枝也包括一些特有的株,如从欧洲和美国的鲑形目种类上分离的柱状黄杆菌聚在第 II 枝,曾经命名为鱼害黏球菌的 G₁₈ 弱毒株也在这一枝;

从我国隶属于鲈形目的鳊鱼和鲴形目的中华鲴上分离到的柱状黄杆菌则聚在第 III 枝。

3 讨论

3.1 柱状黄杆菌的鉴定

16S rDNA 序列是细菌的有效遗传标记,已被广泛运用于细菌种类的鉴定^[24, 25]。20 世纪 70 年代报道的鱼害黏球菌^[18]的 16S rDNA 与黄杆菌属的种类具有高的相似性,与已经报道的柱形病原的柱状黄杆菌具有高度相似性,在系统树中聚为一枝,且有高的支持率。此外,当时描述 G₄ 菌株所引起草鱼柱形病的病状与柱状黄杆菌引起的病状相同:鳃丝末端膨大,弯曲,发白,鳃小片浮肿,糜烂,逐渐

表 3 柱状黄杆菌属部分种类的 16S rDNA 序列的遗传变异分析
Tab. 3 Genetic variation of 16S rDNA sequences for strains and/or species in the genus *Flavobacterium*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. G ₄																					
2. G ₁₈	0.5																				
3. Z0	0.8	0.6																			
4. Z4	0.9	0.8	0.2																		
5. Z6	0.9	0.8	0.2	0.0																	
6. Z13	1.2	1.1	0.5	0.3	0.3																
7. BJ4	0.5	0.0	0.6	0.8	0.8	1.1															
8. X1	1.2	0.8	0.5	0.3	0.3	0.6	0.8														
9. C5	0.5	0.0	0.6	0.8	0.8	1.1	0.0	0.8													
10. QJH1	1.1	0.9	0.3	0.2	0.2	0.5	0.9	0.5	0.9												
11. QJH2	1.1	0.9	0.3	0.2	0.2	0.5	0.9	0.5	0.9	0.3											
12. LN1131	0.8	0.3	0.9	1.1	1.1	1.4	0.3	1.1	0.3	1.2	1.2										
13. A8	0.5	0.0	0.6	0.8	0.8	1.1	0.0	0.8	0.0	0.9	0.9	0.3									
14. B2	0.8	0.3	0.9	1.1	1.1	1.4	0.3	1.1	0.3	1.2	1.2	0.6	0.3								
15. H10	0.5	0.0	0.6	0.8	0.8	1.1	0.0	0.8	0.0	0.9	0.9	0.3	0.0	0.3							
16. HJ	1.1	0.9	0.3	0.2	0.2	0.5	0.9	0.5	0.9	0.3	0.3	1.2	0.9	1.2	0.9						
17. AB010951	1.5	1.1	1.7	1.8	1.8	2.1	1.1	1.8	1.1	2.0	2.0	1.4	1.1	1.4	1.1	2.0					
18. AJ831825	0.5	0.0	0.6	0.8	0.8	1.1	0.0	0.8	0.0	0.9	0.9	0.3	0.0	0.3	0.0	0.9	1.1				
19. AB015480	0.9	0.8	0.2	0.0	0.0	0.3	0.8	0.3	0.8	0.2	0.2	1.1	0.8	1.1	0.8	0.2	1.8	0.8			
20. D12664	9.6	9.1	9.1	9.3	9.3	9.5	9.1	9.3	9.1	9.5	9.5	9.1	9.1	9.5	9.1	9.5	10	9.1	9.3		
21. AM230487	7.8	7.3	7.1	7.3	7.3	7.4	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4	7.3	7.3	7.6	7.3	7.4	8.0	7.3	7.3	4.0	
22. AY662494	7.3	6.8	6.6	6.8	6.8	7.0	6.8	6.8	6.8	6.9	7.0	7.1	6.8	7.1	6.8	7.0	7.5	6.8	6.8	5.8	3.5

注: 1—19. 柱状黄杆菌; 20. 约氏黄杆菌; 21. 水生黄杆菌; 22. 嗜冷黄杆菌; 遗传差异值 = 数据×1%

Note: 1—19. *Flavobacterium columnare*; 20. *Flavobacterium johnsoniae*; 21. *Flavobacterium hydatis*; 22. *Flavobacterium psychrophilum*; genetic diversity = the data × 1%

向鳃丝基部和左右鳃丝蔓延, 鳃丝软骨外露; 坏死细胞, 黏细胞与黏液以及水中泥尘杂物等搅混一起, 形成不规则的团块, 黏附于糜烂鳃丝的周围。把 G₄ 菌株接入试管培养, 在液体中先形成菌团, 然后向四周产生乳头状突起, 并逐渐延长成“柱子”。经观察, 没有发现“柱子”能转化为子实体的现象。这些都表明当时鉴定为草鱼烂鳃病的病原就是目前普遍接受的柱状黄杆菌, 鱼害黏球菌应该是柱状黄杆菌的同物异名, 柱形病应该是一个更广泛接受的名

3.2 柱状黄杆菌的遗传多样性与毒力和地理分布的关系

近年来, 基于 16S rDNA 的系统发育分析和限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)被用于鱼类病原细菌的遗传多样性研究^[26], Triyanto 和 Wakabayashi^[9]采用 16S rDNA 的 RFLP 和 DNA 杂交研究柱状黄杆菌的遗传

多样性, 将所获得 23 株柱状黄杆菌分为 3 种基因组型。Darwish 和 Ismaiel^[10]将 27 株柱状黄杆菌分为 3 种基因型(Genotype), 并认为基因型 I、II、III 分别与 Triyanto 和 Wakabayashi^[9]报道的 3 种基因组型 I、II 和 III 有很好的对应关系。有趣的是, Triyanto 和 Wakabayashi^[9]将我国分离的 G₄ 归类于第 I 基因组型(Genomovar), 而第 III 基因组型只含一株分离自日本的香鱼(*Plecoglossus altivelis*)的柱状黄杆菌, 在 Darwish 和 Ismaiel^[10]的研究中则没有使用 G₄ 菌株。Darwish 和 Ismaiel^[10]的第 III 基因型, 只包括分离自香鱼的菌株和来自美国的斑点叉尾鲷的菌株。事实上, Triyanto 和 Wakabayashi^[9]并没有测定 G₄ 菌株的 16S rDNA 序列, 他们的结论只是基于限制性内切酶的结果, 也没有说明 G₄ 菌株的来源。如果将我们的研究结果与上述基因型或者基因组型比较, 由我国分离的 16 株(包括 G₄ 和 G₁₈)柱状黄杆菌和引用自 GenBank 的柱状黄杆菌的 16S rDNA 序列构建的系

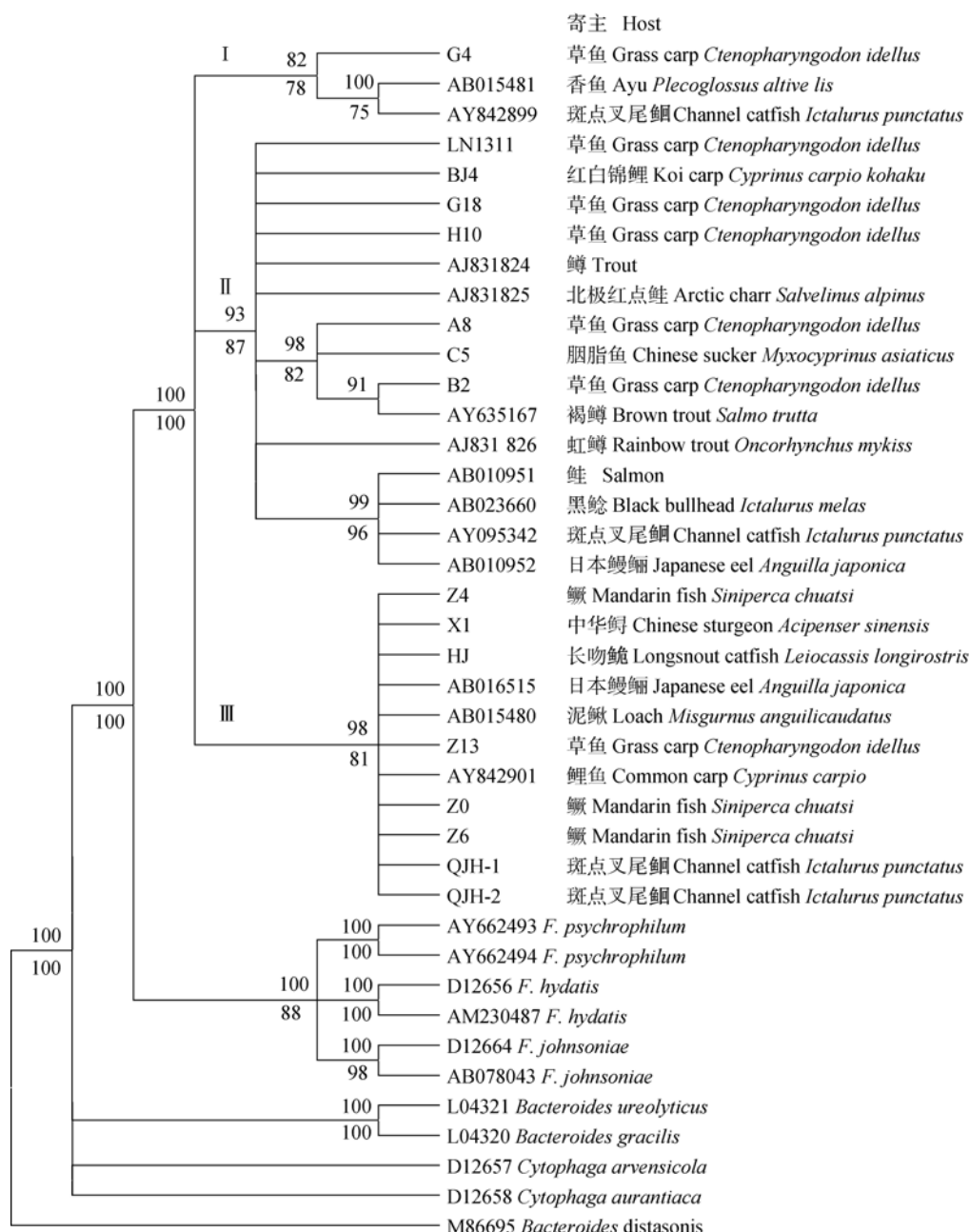


图2 基于黄杆菌属、拟杆菌属及嗜纤维菌属的 16S rDNA 部分序列构建的系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of bacteria from the genera *Flavobacterium*, *Bacteroides* and *Cytophaga*
树枝上方和下方的值分别表示 NJ 法和 ML 法对该枝的置信度

Numbers above branches are bootstrap values for NJ tree and those below branches for ML tree

统发育树同样可以分为 3 枝, 即 3 种基因型, 第 I 基因型对应于 Darwish 和 Ismaiel^[9]第 III, 第 II 对应于第 I, 第 III 则对应于第 II。

Schneck 和 Caslake^[27]通过对温水和冷水性鱼类上分离的柱状黄杆菌的遗传多样性的分析, 支持 Triyanto 和 Wakabayashi^[9]将柱状黄杆菌的不同菌株分为 3 种基因组型。值得强调是, 本研究中的第 I

基因型包括 3 个菌株, 分别是分离自我国草鱼的 G₄ 菌株、日本的香鱼和美国的斑点叉尾鲷的菌株。G₄ 是强毒株, 而分离自香鱼和斑点叉尾鲷的两个菌株是否为强毒株则未见报道。

尽管一些不同基因型的柱状黄杆菌的菌株可以交叉感染不同的宿主^[28], 但对于它们感染力的差异以及宿主和地理分布的认识却是不一致的。Shoemaker,

et al.^[29]使用两种基因组型的柱状黄杆菌感染斑点叉尾鲴的鱼苗, 发现第 II 基因组型的致病性更强, Soto, *et al.*^[30]用脉冲凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分析柱状黄杆菌 16S-23S rDNA, 将其分为两种基因组型(Groups A 和 B), 发现组型 A 对斑点叉尾鲴的鱼苗致病性更强。但 Thomas-Jinu 和 Goodwin^[28]发现菌株的致病性和它们的基因型似乎没有关系。另一方面, 从我国分离的 G₁₈ 是弱毒株, 聚在第二枝, 相当于 Darwish 和 Ismaiel^[10]总结的第 I 基因型, 已经证实 G₁₈ 的致病力弱于 G₄^[18]。值得注意的是, 这一基因型的很多菌株都分离自冷水性鱼类。尽管有作者认为柱状黄杆菌的基因型与宿主和地理分布没有关系^[9, 10], 但最近的报道显示, 分离自芬兰的柱状黄杆菌都属于一种基因型, 而且有一些独特的生长特性^[12]。Oliveres-Fuster, *et al.*^[31]研究发现分离自佩坦真鲷(*Dorosoma petenense*)的柱状黄杆菌聚为基因组型 I, 来自长鳍叉尾鲴(*Ictalurus furcatus*)和斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)聚为基因组型 II, 提出柱状黄杆菌的基因组型与寄主相关。我们的研究也显示第 II 和第 III 枝都有一些独特的鱼类宿主。G₁₈ 和 G₄ 株在一些毒力基因的表达方面也存在差异^[32], Stringer-Roth, *et al.*^[33]发现来自冷水性鱼类和暖水性鱼类的柱状黄杆菌在硫酸软骨素酶活性上存在差异。此外, 强毒株可在 18—22h 使实验对象死亡, 但观察不到明显的病变, 而弱毒株感染时病程较长, 病变进展缓慢^[34]。我国也有学者认为柱状黄杆菌存在 3 种血清型^[35], 他们在致病性或者感染力方面是否存在差异有进一步研究的必要。

本研究的结果表明我国的柱状黄杆菌存在遗传多样性, 我们首次证实了我国淡水鱼类的柱状黄杆菌也存在 3 种基因型。但有关它们的致病性与基因型的关系则有待进一步研究。

致谢:

实验过程中得到鱼类免疫与寄生虫学科组众多同事的帮助, 特此致谢!

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens [M]. West Sussex: Ellis Horwood. 1987, 225—247
- [2] Davies H S. A new gill disease of trout [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1926, 56: 156—160
- [3] Ordal E J, Rucker R R. Pathogenic myxobacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1944, 56: 15—18
- [4] Garnjobst L. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: A *Myxobacterium* pathogenic to fish [J]. *Journal of Bacteriology*, 1945, 49(2): 113—128
- [5] Breed R S, Murray S G D, Smith N R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed [M]. London: Bailliere, Tindall and Cox, Ltd. 1957
- [6] Bullock G L, McLaughlin J J A. Advance in knowledge concerning bacteria pathogenic to fishes [A]. In: Snieszko S F. A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes [C]. Washington DC: American Fisheries Society Special Publication. 1970, 5: 231—242
- [7] Pacha R E, Ordal E J. *Myxobacterial diseases of salmonids* [A]. In: Snieszko S F. A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes [C]. Washington DC: American Fisheries Society Special Publication. 1970, 5: 243—257
- [8] Bernardet J F, Segers P, Vancanneyt M, *et al.* Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydati* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978) [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 128—148
- [9] Triyanto, Wakabayashi H. Genotyping of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes [J]. *Fish Pathology*, 1999, 34(2): 65—71
- [10] Darwish A M, Ismaiel A A. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S—23S rDNA spacer [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2005, 19(4): 267—274
- [11] Suomalainen L R, Kunttu H, Valtonen E T, *et al.* Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006, 70: 55—61
- [12] Decostere A, Haesebrouck F, Devriese L A. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish [J]. *Veterinary Microbiology*, 1998, 62(1): 35—45
- [13] Figueiredo H C P, Klesius P H, Arias C R, *et al.* Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28(4): 199—204
- [14] Sun B J, Nie P. Outer membrane protein and lipopolysaccharide of *Cytophaga columnaris* and their immunogenicity to the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(5): 524—527 [孙宝剑, 聂品. 柱状嗜纤维菌的外膜蛋白和脂多糖及其对鳊的免疫原性. 水生生物学报, 2001, 25(5): 524—527]
- [15] Xie J, Xu P, Yin G J, *et al.* Study on dynamic change patterns of *Escherichia coli*, *Flexibacter columnaris* and *Vibrio anguillarum* in fishpond [J]. *Chinese Journal of Microecology*,

- 2004, **16**(1): 18—21 [谢骏, 徐跑, 殷国俊, 等. 池塘中大肠埃希菌、柱状屈挠杆菌和鳃弧菌的动态演变规律的研究. 中国微生物学杂志, 2004, **16**(1): 18—21]
- [16] Xia L, Wang C Z, Chen C F. Immune response of channel catfish to outer membrane protein of three pathogenic bacteria [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, **26**(3): 371—375 [夏露, 汪成竹, 陈昌福. 斑点叉尾鲷对3种致病菌外膜蛋白(OMP)的免疫应答. 华中农业大学学报, 2007, **26**(3): 371—375]
- [17] Chen A P. The monitoring report of aquaculture disorder in China at 2005 [J]. *Science of Culture Fish*, 2006, **8**: 48—49 [陈爱平. 2005 年中国水产养殖病害监测报告. 科学养鱼, 2006, **8**: 48—49]
- [18] Lu Q Z, Ni D S, Ge R F. Studies on the gill diseases of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) I. Isolation of a myxobacterial pathogen [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, **5**(3): 315—334 [卢全章, 倪达书, 葛蕊芳. 草鱼烂鳃病的研究. I. 细菌性病原的研究. 水生生物学集刊, 1975, **5**(3): 315—334]
- [19] Griffin B R. A simple procedure for identification of *Cytophaga columnaris* [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1992, **4**(1): 63—66
- [20] Dong X Z, Cai M Y, et al. General Manual of Systematic and Determinative Bacteriology [M]. Beijing: Science Press. 2001, 9—42 [东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 9—42]
- [21] Bader J A, Shoemaker C A, Klesius P H. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, **52**(2): 209—220
- [22] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface; Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **24**: 4876—4882
- [23] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinformatics*, 2004, **5**: 150—163
- [24] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(2): 697—703
- [25] Jacquet C, Aubert S, Solh N E, et al. Use of rRNA gene restriction patterns for the identification of *Listeria* species [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1992, **15**(1): 42—46
- [26] Eldar A, Lawhon S, Frelie P F, et al. Restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA whole rRNA genes (ribotyping) of *Streptococcus iniae* strains from the United States and Israel [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **151**(2): 155—162
- [27] Schneck J L, Caslake L F. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from fish collected from warm and cold water [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, **29**(4): 245—248
- [28] Thomas-Jinu S, Goodwin A E. Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolated: correlations with virulence in fish [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, **27**(1): 29—35
- [29] Shoemaker C A, Olivares-Fuster O, Arias C R, et al. *Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, **127**(3—4): 353—359
- [30] Soto E, Mauel M J, Karsi A, et al. Genetic and virulence characterization of *Flavobacterium columnare* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, doi: 10.1111/j.1365—2672.2007.03632.x
- [31] Olivares-Fuster O, Baker J L, Terhune J S, et al. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, **30**(8): 624—633
- [32] Liu G Y, Nie P, Zhang J, et al. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Flavobacterium columnare* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, **31**(4): 269—276
- [33] Stringer-Roth K M, Yunghans W, Caslake L F. Differences in chondroitin AC lyase activity of *Flavobacterium columnare* isolates [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, **25**(11): 687—691
- [34] Pacha R E, Ordal E J. Histopathology of experimental columnaris disease in young salmon [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1967, **77**(4): 419—423
- [35] Chen C F. Relationship between the serological type of *Cytophaga columnaris* and the antigenicity of the bacterins [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1997, **16**(6): 585—588 [陈昌福. 柱状嗜纤维菌的血清型与其菌苗抗原性的关系. 华中农业大学学报, 1997, **16**(6): 585—588]

COLUMNARIS DISEASE AND GENETIC DIVERSITY OF ITS BACTERIAL PATHOGEN *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE* IN FRESHWATER FISH IN CHINA

WANG Liang-Fa^{1,2}, XIE Hai-Xia², ZHANG Jin², LI Nan², YAO Wei-Jian², ZHANG Li-Qiang²,
XIONG Chuan-Xi¹ and NIE Pin²

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: *Flavobacterium columnare*, the causative agent of columnaris disease infects a wide range of freshwater fish throughout the world, with major symptoms being gill-rot and caudal rot. Gill-rot disease is also a major disease of freshwater fish in China; although its pathogen has been reported, disputes over its identity still exist. In order to understand the pathogen of gill-rot disease and the columnaris disease in China, bacterial pathogens were isolated from gill-rot diseased fish in fish farms in Hubei, Guangdong, Anhui, Sichuan Provinces and in suburbs of Beijing, China, respectively. The physiological and biochemical characters, growth in tobramycin-contained Shieh agar medium, and the formation of rizoids, as well as the ability in binding Congo red and in degrading gelatin and in production of chondroitinase were examined. These characteristics confirmed that the so-called gill-rot disease pathogen was actually the pathogen of columnaris disease, i.e. *F. columnare*. Furthermore, 16S rDNA sequences were cloned from 16 strains of *F. columnare* in the present study, and those downloaded from the GenBank database, a phylogenetic tree was built with the identification of three well-supported clades, corresponding clearly to the reported three genomovars of *F. columnare*. The first clade contains only three strains, including the most virulent strain G₄ isolated in 1970s from grass carp, and two others from Japan and USA, respectively. The second and third clades contain many more strains, including those from same species of fish hosts, such as some cyprinid fish. But strains isolated from salmonids are clustered in the second clade, with the inclusion of a low-virulence strain G₁₈ isolated in 1970s from grass carp in China. Strains isolated from the so-called Chinese perch, *Siniperca chuatsi* and Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* in China are clustered in the third clade. The bacterium, *Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, 1975 named as the pathogen of gill-rot disease of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* should be the synonym of *F. columnare* in terms of its similarity with *F. columnare* in above-mentioned characters and also in 16S rDNA. Further investigation should be carried out to examine if these strains in different clades differ in their virulence and then in pathogenicity.

Key words: *Flavobacterium columnare*; Synonym; Columnaris disease; 16S rDNA; Phylogeny; Genomovar