

长江刀鲚寄生的异钩铈虫分子鉴定及形态学研究

徐钢春¹, 聂志娟¹, 张守领¹, 张 勇², 金 武¹, 徐 跑¹, 顾若波^{1*}

(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. 南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为了获知长江刀鲚寄生的异钩铈虫的分类学地位, 采用光学、扫描电子显微镜和分子遗传扩增 28S rRNA 基因 5'端部分序列相结合的方法, 对长江刀鲚寄生的异钩铈虫进行种属鉴定和形态学研究。结果显示, 后吸器与体前区分不明显, 含有四对不对称的吸铈, 其中一侧的前 2 个开放几丁质吸铈明显大于其余 6 个封闭的吸铈, 虫体尾部带有二对端钩, 卵两端具有较长的极丝。序列分析显示, 林氏异钩铈虫与六棘异钩铈虫相似度为 100%, 邻接法构建分子进化树中处在同一分支。经形态及分子综合分析鉴定, 此寄生虫为林氏异钩铈虫。

关键词: 刀鲚; 林氏异钩铈虫; 形态学; 寄生

中图分类号: Q 958.9; S 917.4

文献标志码: A

刀鲚 (*Coilia nasus*) 隶属鲱形目 (Clupeiformes) 鳀科 (Engraulidae) 鲚属, 俗称刀鱼, 分布于北太平洋西部, 中国东海、渤海和黄海^[1-2], 为长江中重要的洄游性鱼类, 享有“长江三鲜”美誉, 其肉质鲜美, 营养丰富, 极受人们喜爱, 但因生态环境恶化导致刀鲚资源急剧下降。自 2003 年以来, 刀鲚“灌江纳苗”人工养殖方法的应用, 使其成熟繁殖、苗种培育技术逐步完善^[3-5], 大规模养殖已初具规模, 并逐渐成为淡水养殖的优质资源。

生物与其周围的生长环境形成有机的统一体, 环境条件的改变对生物产生一定的影响。早在 1978 年, 徐炳南等^[6]对长江流域各段及周边若干湖泊进行不定期采样检查, 以刀鲚体上的寄生虫作为“生物指标”, 对刀鲚在长江流域的生殖洄游情况进行探讨。Mollaret 等^[7]对 3 种生态型刀鲚中寄生蠕虫的群落结构和陈氏刺棘虫的种群遗传结构进行了研究, 结果表明, 寄生虫群落结构主要与刀鲚的生活环境相关, 但都未利用分子生物学与形态学相结合手段开展系统学、分类学等方面的研究。本实验发现了

长江流域刀鲚鳃部寄生蠕虫, 并分析了刀鲚寄生虫的感染率、形态和遗传结构等重要特征值, 以为刀鲚室内大规模养殖条件下的蠕虫流行病学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

样品宿主刀鲚捕自长江流域江苏靖江段, 采集时间 2012 年 9 月。随机抽取 60 条刀鲚, 平均体长 12.14 cm, 体质量 4.5 g, 在显微镜下观察鳃部寄生虫并统计其数量, 部分虫体清水冲洗干净放至 95% 的酒精保存。

1.2 形态结构观察

肉眼观察, 将带有寄生虫刀鲚的鱼鳃取出并置载玻片上, 解剖镜下观察并将有虫体的鳃丝挑出, 放入离心管清水清洗数次后再置 Olympus0.5X 光学显微镜下观察拍照。用于扫描电镜观测的样品, 清水冲洗干净后加入 2.5% 的戊二醛固定 2 d 以上, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 无水乙醇梯度脱水, 叔丁醇置换, 真空冷冻干燥, 粘片并镀金, 之后 S-3000N 扫描电镜下观察拍照。

收稿日期: 2013-03-20 修回日期: 2013-05-05

资助项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD26B05); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2013A0903); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203065); 江苏省科技支撑计划项目 (BE2011411)

通信作者: 顾若波, E-mail: gurb@ffrc.cn

1.3 分子鉴定

模板 DNA 的制备 从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 95% 的酒精保存液中取出虫体,置于 2 mL 无菌离心管中,无菌水清洗并放置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱置换过夜,再次清洗并采用 QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒进行 DNA 的提取,最后定容至 $25\text{ }\mu\text{L}$ 无菌水中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 扩增及扩增片段克隆 参照 Mollaret 等^[7],以 CD1:(GTAGGTGAACCTGCGGAAGGA-TCATT) 和 CD2-(TTAGTTTCTTTTCTCCGCT) 为扩增林氏异钩铗虫 (*Heteromazocraes lingmueni*) 28S 序列引物,由上海杰瑞有限公司合成。扩增 28S 序列 PCR 反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$: $10\times$ PCR buffer $5\text{ }\mu\text{L}$, 2.5 mmol/L dNTP $4.0\text{ }\mu\text{L}$, 25 mmol/L MgCl_2 $4.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 引物各 $2.0\text{ }\mu\text{L}$, *Taq* 酶 ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板液 $4.0\text{ }\mu\text{L}$, 灭菌双蒸水 $30.5\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s , 循环 35 次。扩增产物经 1% 浓度琼脂糖凝胶电泳检测分析。

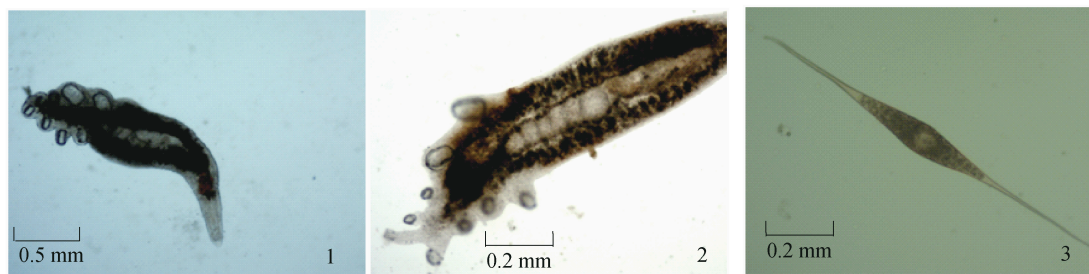
将剩余 PCR 产物跑回收胶并用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化,纯化产物酶连到 pMD18-T 载体上进行 TA 克隆,筛选阳性克隆子提质粒送上海杰瑞测序。

序列分析 DNA 序列拼接后,登录 NCBI 进行 blast 比对分析,并下载相似性较高的序列。Clustal X 多序列比对后采用 MEGA 软件中邻接法构建了 28S rDNA 分子进化树。

2 结果

2.1 形态描述

在长江流域捕获野生刀鲚中,发现其鳃部寄生蠕虫,经形态观察鉴定,此寄生虫为林氏异钩铗虫。虫体较大,近纺锤形,肉眼可见(图版 I-1),体表角质层较厚并有细密的环纹。林氏异钩铗虫雌雄同体,具有 7 个睾丸,身体两侧具有发达的盲肠,卵黄腺发达,布满肠两侧(图版 I-2)。虫体前端钝圆,较窄,向后逐渐增宽(图版 II-1)。体前端具向前凸口吸盘(图版 II-2),口吸盘正下方为一椭圆形生殖孔(图版 II-3),咽呈长筒型。虫体腹面后端具高度分化的后吸器,后吸器与体前区分不明显。后吸器不对称,具有 4 对,两侧边缘各自平行排列,其中一侧 2 个为特大的开放几丁质吸铗,其余为 6 个小的封闭型吸铗(图版 I-1,图版 II-1,4,5)。虫体尾部带有 2 对尖锐的弯钩,其中边缘 1 对小钩较中间大(图版 II-6)。



图版 I 林氏异钩铗虫的光学显微图

1. 林氏异钩铗虫腹面观全貌 ($4\times$); 2. 林氏异钩铗虫的后吸器 ($10\times$); 3. 虫卵 ($10\times$)。

Plate I Morphological observation of *H. lingmueni* by light microscope

1. Overall view of *H. lingmueni* ($4\times$); 2. Haptor of *H. lingmueni* ($10\times$); 3. Egg of *H. lingmueni* ($10\times$).

林氏异钩铗虫背、腹面体表均有明显的横向皱褶,皱褶中发现有结节,结节表面含有分布较均匀小孔,具有感觉和物质代谢交换的功能。此寄生虫只发现于刀鲚鳃丝上,后吸器张开并吸铗鳃丝上鳃小片(图版 II-7),吸附后不移动,只是虫体

前端向前伸缩。破坏鳃丝的上皮细胞,引起其他病原菌的入侵,造成炎症,引发烂鳃病症。9 月份,刀鲚寄生林氏异钩铗虫较多,感染率高达 72%,刀鲚最高时寄生 7 条。林氏异钩铗虫喜栖息于氧气充足的淡水或低盐度海水环境中,在合

适的温度,低盐度水域中可促使其产卵并孵化。卵两端具有较长的极丝(图版 I -3,图版 II -8),易于漂浮和传播。

2.2 分子系统学分析

实验以林氏异钩铯虫 DNA 为模板,PCR 扩增 28S rDNA 5'端序列,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,显示扩增基因片段大小与预期一致(如图 1)。后经 TA 克隆测序得出,序列总长度为 949 bp, G + C = 53.32%, 基因登陆号为 KC412069.1。曹姍妹^[8]在南海鱼类钩铯虫科单殖吸虫研究中测定了六棘异钩铯虫 28S 序列,总长度 890 bp, G + C = 53.03%, 寄生于七丝鲚鳃丝上。从 28S 分子进化树可以看出,参与比对 16 种单殖吸虫在整体上被分成了 2 支,林氏异钩铯虫与六棘异钩铯虫处在同一分支并且 Bootstrap 值为 100(图 2),同时两者之间 Kimura 2-parameter distance 距离为 0.002,并与其他微杯虫科、鲩铯虫科等虫体遗传距离较大,结果显示,林氏异钩铯虫与六棘异钩铯虫亲缘关系最近,进一步明确了林氏异钩铯虫的分类地位。

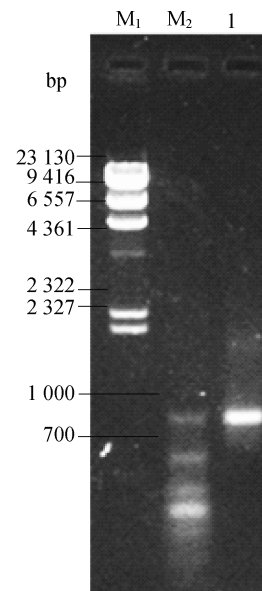


图 1 林氏异钩铯虫 28S rDNA PCR 产物的电泳结果
M1. Marker; M2. DL1000; 1. 林氏异钩铯虫 28S rDNA。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR for 28S rDNA of *H. lingmueni*

M1. λ DNA/Hind III Marker; M2. DL1000; 1. 28S rDNA of *H. lingmueni*.

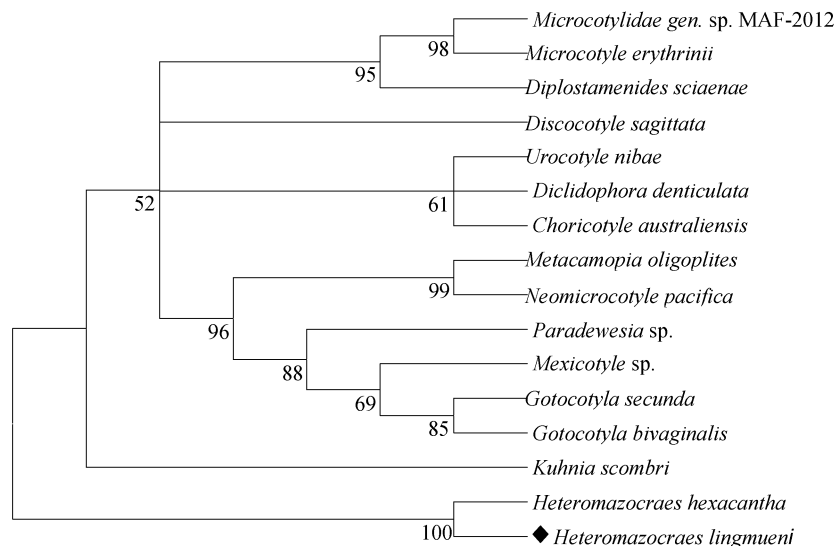


图 2 林氏异钩铯虫及 GenBank 下载虫种 28S rDNA 序列 NJ 树

图中数字代表 Bootstrap 值。

Fig. 2 The MP tree of *H. lingmueni* and worms from GeneBank based on the 28S rDNA sequence

The number indicates Bootstrap values.

3 讨论

钩铯虫科具有 11 个属^[8],根据检索表中异钩铯虫属吸器一侧的前 2 个吸铯特别大的特征,本

研究中虫体含有 4 对不对称的后吸器,具短柄,其中一侧的前 2 个开放几丁质吸铯明显大于其余 6 个封闭的吸铯,虫体尾部带有 2 对尖锐的弯钩,符合异钩铯虫属的特征,其它特征与张剑英等^[9]和

湖北省水生生物研究所^[10]描述一致,初步可确认为林氏异钩铤虫。卵两端具有较长的极丝,与六棘异钩铤虫无极丝的谷壳状卵不同^[11]。

由于寄生虫形态特征的有限性,以及固定方法差异等因素^[12],从形态特征上鉴定寄生虫比较繁琐和困难。近年来,分子系统学的兴起和发展给传统形态鉴定分类注入了新的活力,28S rDNA 较为保守,具有可变区,可用于确定科之间及科以下水平的系统分类地位^[13-14]。丁雪娟等^[15]测定了伪指环虫属、异钩虫属和三钩虫属 28S rRNA 基因 5'端序列,明确了这 3 个属的分类地位。Zhai 等^[16]采取形态和分子研究 *Triactinospomyxon*, 并鉴定此寄生虫为一新种。本实验通过测定 28S rRNA, 序列比对分析得出: 林氏异钩铤虫与六棘异钩铤虫亲缘关系最近, 相似度为 100%, 无明显差异, 2 种处于相同的进化地位, 其进化速率相差不大。进一步明确了林氏异钩铤虫的分类地位。目前, ITS 序列也是寄生虫系统与进化研究中重要的分子标记, 具有进化速率快, 长度较保守的特点^[17]。分子水平上, 林氏异钩铤虫与六棘异钩铤虫核糖体 DNA 是否存在差异, 将通过扩增的 ITS 序列进一步分析, 并从分子水平探讨其种内的系统发育关系。

林氏异钩铤虫最早发现于 1973 年^[8], 是刀鱼一种特异性寄生虫, 在刀鱼寄生虫群落结构中起主要作用。宋锐^[18]通过对不同生态环境刀鱼采集, 在鳃和消化道中共发现了 10 种寄生蠕虫, 3 种生态型刀鱼林氏异钩铤虫感染率和平均丰度都比较高, 是淡水定居型和洄游型的优势种, 其中淡水洄游型安庆段感染率高达 78%, 本研究靖江段林氏异钩铤虫感染率 72%, 两者较吻合。Li 等^[19]通过采集崇明和舟山刀鱼, 得出林氏异钩铤虫在 8 月感染率和丰度比较低, 显示刀鱼从淡水向河口迁移洄游。其刀鱼样品为 1 龄以上, 体长大于 170 mm^[20], 本研究采集的刀鱼较小, 均未达标, 尚未洄游至海洋, 所得数据填补了首次将洄游至河口刀鱼幼鱼寄生林氏异钩铤虫感染情况, 对于已洄游至崇明等河口刀鱼幼鱼寄生虫感染数据有待研究统计。

感谢华南师范大学丁雪娟教授、淡水渔业研究中心刁丙文博士在实验形态鉴定及序列分析过程中给予的支持和帮助。

参考文献:

- [1] 黄仁术. 刀鱼的生物学特性及资源现状与保护对策[J]. 水利渔业, 2005, 25(2): 33, 37.
- [2] 袁传宓, 林金榜, 秦安龄, 等. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状—兼谈改造旧鱼类分类学的几点体会[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1976(2): 1-12.
- [3] 张呈祥, 陈平, 郑金良. 长江刀鲚灌江纳苗与养殖[J]. 科学养鱼, 2006(7): 26, 10001.
- [4] 徐钢春, 聂志娟, 顾若波, 等. 一种野生长江刀鲚鱼种驯食人工饲料配方及驯食的方法: 中国, 201210140779[P]. 2012-08-22.
- [5] Xu G C, Tang X, Zhang C X, et al. First studies of embryonic and larval development of *Coilia nasus* (Engraulidae) under controlled conditions [J]. Aquaculture Research, 2011, 42(4): 593-601.
- [6] 徐奶南, 孙超白, 童远瑞, 等. 长江流域刀鲚鱼生殖洄游的“生物指标”[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1978(3): 85-91.
- [7] Mollaret I, Lim L H, Justine J. Phylogenetic position of the monogeneans *Sundanonchus*, *Thaparocleidus*, and *Cichlidogyrus* inferred from 28S rDNA sequences [J]. International Journal for Parasitology. 2000, 30(5): 659-662.
- [8] 曹姝妹. 南海鱼类钩铤虫科单殖吸虫研究[D]. 广东: 华南师范大学, 2010.
- [9] 张剑英, 邱兆祉, 丁雪娟, 等. 鱼类寄生虫与寄生虫病[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 211-220.
- [10] 湖北省水生生物研究所, 湖北省鱼病病原区系图志[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 153.
- [11] Zhang J Y, Ding X J, Pang Q H, et al. Two new species of the family Mazocraeidae Price, 1936 (Monogenea) on clupeiform fishes from Guangdong, China [J]. Systematic Parasitology, 1998, 41(2): 115-122.
- [12] Pool D W, Chubb J C. A critical scanning electron microscope study of the scolex of *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934, with a review of the taxonomic history of the genus *Bothriocephalus* parasitizing cyprinid fishes [J]. Systematic Parasitology, 1985, 7(3): 199-211.
- [13] Mollaret I, Lim L H, Justine J. Phylogenetic position of the monogeneans *Sundanonchus*, *Thaparocleidus*, and *Cichlidogyrus* inferred from 28S rDNA sequences [J]. International Journal for Parasitology. 2000, 30(5): 659-662.
- [14] Chisholm L A, Morgan J A, Adlard R D, et al. Phylogenetic analysis of the Monocotylidae

- (Monogenea) inferred from 28S rDNA sequences [J]. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31 (13): 1537 - 1547.
- [15] 丁雪娟, 廖翔华. 伪指环虫、异钩虫和三钩虫的系统位置 [J]. *动物分类学报*, 2005, 30 (2): 244 - 251.
- [16] Zhai Y H, Zhou L, Gui J F. Identification and characterization of one novel type of *Triactinospomoxon* with short spore axis [J]. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 110 (6): 2385 - 2393.
- [17] 董晓波, 李冬梅, 花丽茹, 等. 旋毛虫 ITS II 区基因的克隆及其在分类学上的应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(2): 173 - 175.
- [18] 宋锐. 刀鲚寄生蠕虫的生态学研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2011.
- [19] Li W X, Song R, Wu S G, *et al.* Seasonal occurrence of helminths in the anadromous fish *Coilia nasus* (Engraulidae): parasite indicators of fish migratory movements [J]. *The Journal of Parasitology*, 2011, 97 (2): 192 - 196.
- [20] 袁传宓. 刀鲚的生殖洄游 [J]. *生物学通报*, 1987 (12): 1 - 3.

Morphological and molecular identification of *Heteromazocraes* parasitizes in *Coilia nasus* of the Yangtze River

XU Gangchun¹, NIE Zhijuan¹, ZHANG Shouling¹, ZHANG Yong², JIN Wu¹, XU Pao¹, GU Ruobo^{1*}

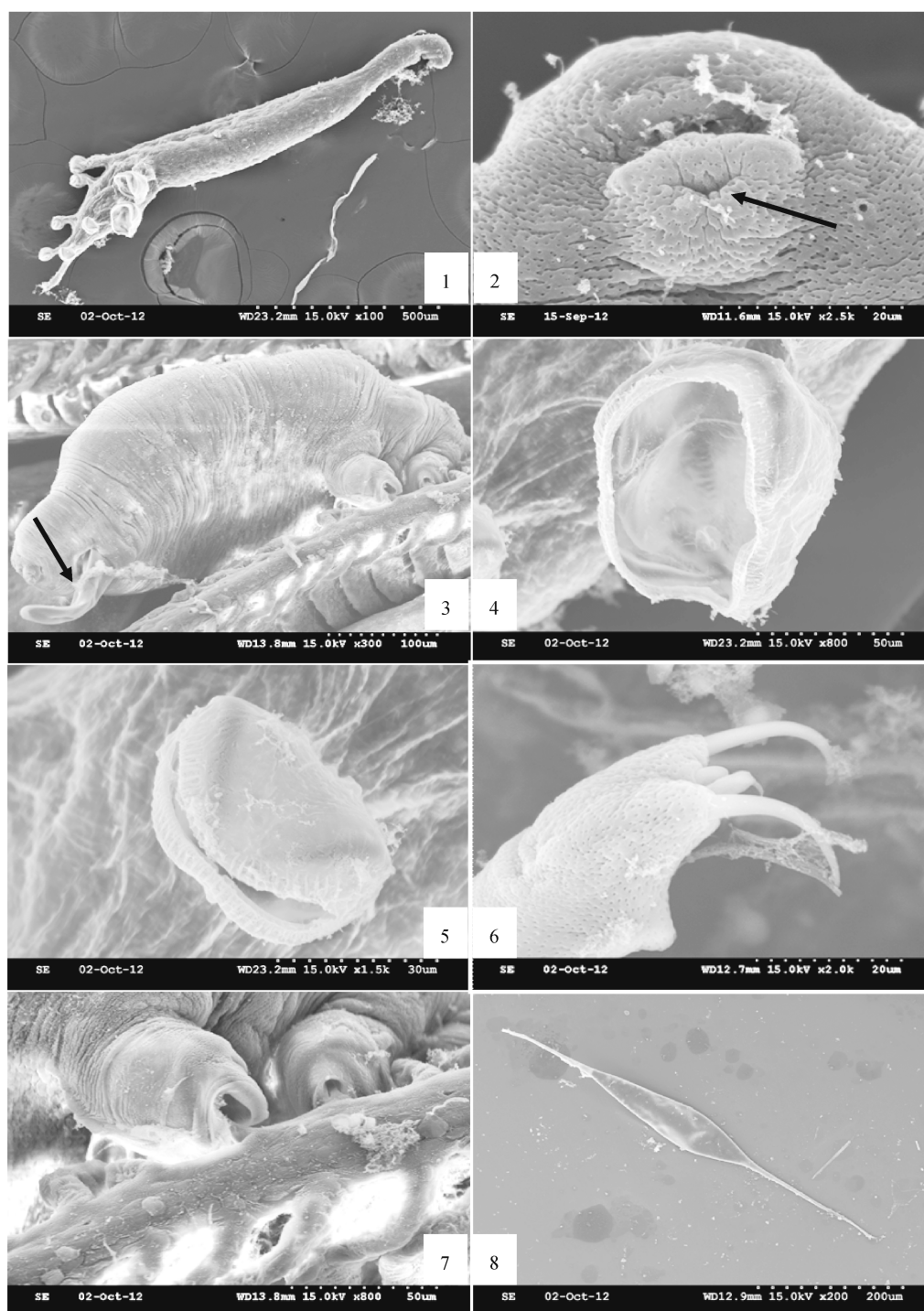
(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: A parasite was isolated from *Coilia nasus* collected from Yangtze River. Morphological (light, scanning electron microscopes) and molecular (28S rRNA amplification) methods were used to identify the species of the isolates. Their typical characteristics: haptor not clearly distinguished from body proper, provided with 4 pairs of heteromorphic clamps. Two clamps on one side are larger than other six clamps. Narrow posterior appendage with 2 pairs of sharp hooks and egg with long filament. The results of sequence alignment showed 100% homology to 28s of *Heteromazocraes hexacantha*. Neighbor-joining methods of phylogenetic tree also showed that the isolates were in the same clade with *H. hexacantha*, These results suggested that this parasite is *Heteromazocraes lingmueni*, and its 28S rRNA was measured for the first time in this study.

Key words: *Coilia nasus*; *Heteromazocraes lingmueni*; morphology; parasitism

Corresponding author: GU Ruobo. E-mail: gurb@ffrc.cn



图版 II 林氏异钩铗虫的扫描电子显微镜图

1. 林氏异钩铗虫腹面观全貌; 2. 林氏异钩铗虫头部, 示口吸盘(箭头); 3. 后吸器局部放大, 示开放吸铗; 4. 后吸器局部放大, 示关闭吸铗; 5. 侧部观察, 示生殖孔产卵状态(箭头); 6. 寄生鳃丝部后吸器放大, 示寄生部位; 7. 虫体尾部, 示端钩; 8. 虫卵, 示极丝。

**Plate II Morphological observation of *H. lingmueni*
by scanning electron microscope**

1. Overall view of *H. lingmueni*; 2. Oral suckers on the head of *H. lingmueni*(arrow head); 3. Haptor magnified partly, showing the open clamp; 4. Haptor magnified partly, showing the closed clamp; 5. Viewed from the side, the state of genital atrium spawning(arrow head); 6. Haptor with gill filament, magnified partly, showing parasitic site; 7. sharp hooks on the posterior of parasite; 8. Egg with long filament.