

血卵涡鞭虫核糖体 18S rDNA 和 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列测定与系统发育分析

施 慧 谢建军 王庚申 许文军

(浙江省海洋水产研究所, 浙江海洋学院海洋与渔业研究所, 浙江省海水增殖重点实验室, 舟山 316100)

THE SEQUENCE AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF 18S rDNA AND ITS1-5.8S rDNA-ITS2 FROM *HEMATODINIUM* SP. INFECTION OF THE MARINE CRUSTACEA

SHI Hui, XIE Jian-Jun, WANG Geng-Shen and XU Wen-Jun

(Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Marine and Fishery Research Institute of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

关键词: 血卵涡鞭虫; 18S rDNA 基因; ITS 基因; 系统发育分析

Key words: *Hematodinium*; 18S ribosomal DNA gene; Internal transcribed spacer gene; Phylogenetic analysis

中图分类号: S945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0560-06

血卵涡鞭虫是一类寄生性的原生动物, 是近年来引起三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、"牛奶病"及锯缘青蟹(*Scylla serrata*)"黄水病"的一种主要病原, 该虫对宿主感染时间长, 流行范围广、发病率、死亡率较高, 危害严重, 给梭子蟹和青蟹的养殖业造成了巨大的经济损失。近年来国内已对该寄生虫病原的生活史、形态学特征、感染途径、诊断及防治技术等方面进行了一些初步研究工作, 积累了一定的基础信息^[1]。

20 世纪 90 年代以来, 随着分子标记技术的发展, DNA 分子技术日益成为区分物种的有效手段。目前应用于寄生虫分类鉴定和系统发生学研究的 DNA 基因主要是核糖体 18S rRNA 和 ITS 基因。由于 18S rDNA 基因在生物进化过程中具有高度保守性, 近年来国外学者根据 18S rDNA 基因序列设计引物, 运用于寄生虫分子生物学鉴定^[2-4]。ITS 区域受外界环境因素的影响较小, 所受选择压力小, 区域序列的进化速度较其他区域快, 具有高变异性, 在物种间表现出极为广泛的序列多态性, 可以从中获得大量的遗传信息, 目前 ITS 序列作为非常有价值的

遗传标记被广泛应用于寄生虫学的分类鉴定上。本研究开展了血卵涡鞭虫 18S rDNA 基因和 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 基因序列的扩增和测定, 经与 GenBank 中相关序列多态性比对分析, 构建了血卵涡鞭虫 18S rDNA 分子系统发育树, 同时对不同宿主来源虫体的 18S rDNA 和 ITS1 进行了同源性分析, 从 DNA 水平探讨了该寄生原虫的分类地位, 为我国血卵涡鞭虫病的分子流行病学提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 血卵涡鞭虫样本

初步诊断为血卵涡鞭虫感染的病蟹来源于浙江舟山佛渡乡养殖的三疣梭子蟹和浙江三门养殖的锯缘青蟹, 取血淋巴, 用 95%乙醇固定, 本实验室保存, 编号为: ZHSH2006-1 和 ZHSH2006-2。

1.2 主要试剂

总基因组 DNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品, Taq 酶、dNTPs、DNA 纯化试剂盒均为宝生物工程(大连)有限

收稿日期: 2012-03-14; 修订日期: 2012-12-07

基金项目: 浙江省科技厅公共服务项目(2011F30017, 2012F30022); 浙江省科技厅项目(2010R50025, 2010F20006); 省海洋与渔业局海域海岛管理利用项目(2011127); 舟山市科技局项目(2012C23003)资助

作者简介: 施慧(1978—), 女, 江苏启东人; 硕士; 主要从事海水养殖病害的研究。E-mail: huishi2002@126.com

通信作者: 许文军, E-mail: xwenjun@sina.com

公司产品。

1.3 血卵涡鞭虫的 PCR 扩增鉴定

将固定的病蟹血淋巴样品, 按 Qiagen DNA zsol kit 说明书提取总基因组 DNA, 用已建立的针对血卵涡鞭虫的 PCR 快速诊断方法进行 PCR 扩增鉴定^[8]。

1.4 病原 18S rDNA 和 ITS1-5.8S-ITS2 序列扩增

根据文献[5—7]设计了两对引物, 引物由生工(上海)生物工程有限公司合成, 引物序列(表 1)。

表 1 血卵涡鞭虫 PCR 扩增用引物
Tab.1 Nucleotide sequence of primers for *Hematodinium* sp.

引物名 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
EukA	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
EukB	5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

18S rDNA 的扩增选择真核生物 18S rDNA 通用扩增引物 EukA 和 EukB, PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min; 94℃ 45s, 55℃ 1min, 72℃ 3min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。ITS1-5.8S-ITS2 区域扩增选择真核生物 ITS 通用扩增引物 ITS1 和 ITS4, PCR 反应条件为 95℃ 变性 5min; 然后 94℃ 45s, 52℃ 45s, 72℃ 45s, 30 个循环后, 于 72℃ 延伸 10min。PCR 反应体系均为 25 μL, 其中超纯水 19.25 μL, 10× Reaction buffer 2.5 μL, 引物(50 pmol/L) 0.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL, 模板 2.5 μL, Taq 酶 0.25 μL。PCR 产物经 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒纯化后, 寄生工(上海)生物工程有限公司进行序列测定。

1.5 18S rDNA 和 ITS1 序列分析

利用 NCBI 在线 BLAST 程序, 对本次获取的基因序

列进行比对分析。将获取的 18S rDNA 和 ITS1 基因序列用 DNAMAN 软件进行排序、比对并辅以人工校正, 同时应用 NCBI 中在线软件 BLAST 对获得的基因序列进行同源检索。从 GenBank 中取得相关血卵涡鞭虫类的序列作参考(表 2), 使用 MEGA 3.1 分析软件, Kimura-2 法计算遗传距离, 并采用 bootstrap(重复次数 1000)检查聚类树各分支置信度, 邻接法(Neighbor Joining, NJ)构建分子发育树。

2 结果

2.1 病蟹血淋巴液显微镜检

病蟹血淋巴中的无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞 3 种血淋巴细胞的量较正常蟹的急剧下降, 代之以大量寄生原虫。从不同病蟹的血淋巴液中可观察到不同发育阶段的虫体, 多数呈卵圆型, 单核或多核, 大小约 5—10 μm 不等, 仔细观察, 有些可见 2 根长度不等的鞭毛(图 1)。

2.2 血卵涡鞭虫的 PCR 鉴定结果

以提取的总基因组为模板, 用血卵涡鞭虫的特异性引物从实验样本中成功扩增出 580 bp 左右的特异条带, 其琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)。

2.3 血卵涡鞭虫的 rDNA 基因序列比较分析

两株虫体的 rDNA 基因序列与血卵涡鞭虫属的序列同源性最高, 经比对 ZHSH2006-1 和 ZHSH2006-2 的 18S rDNA 基因序列同源性为 99.55%, 两者与 GenBank 中登录的 FJ834441 的同源性为 99.5%。上述结果表明, 所获的序列确属拟测定的目标片段。从 GenBank 中下载来源于海水和海水甲壳类的腰鞭毛虫相关序列, 用 MEGA3.1 软件建立系统进化树(图 3)。从进化树可见, 所有收集的血卵涡鞭虫都起源于共同的祖先, 所有序列分为两个集群, 血卵涡鞭虫与其他 Syndinida 目的虫体处于同一集群中, 又与 8 株来自不同十足目的血卵涡鞭虫聚为 *Hema-*

表 2 血卵涡鞭虫核糖体 18S rDNA 和 ITS1 基因序列来源
Tab.2 Origins of 18S rDNA and ITS1 gene sequences of *Hematodinium* ribosome

基因 Gene	宿主 Host	作者 Author	年份 Year	基因序列 Sequence
18S rDNA	<i>Liocarcinus depurator</i>	Small H J, et al.	2012	EF065718
ITS1	<i>Liocarcinus depurator</i>	Small H J, et al.	2012	EF065716
18S rDNA+ ITS1	<i>Hyas coarctatus</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844412
18S rDNA+ ITS1	<i>Lithodes couesi</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844413
18S rDNA+ ITS1	<i>Chionoecetes bairdi</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844417
18S rDNA+ ITS1	<i>Chionoecetes opilio</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844420
18S rDNA+ ITS1	<i>Chionoecetes angulatus</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844426
18S rDNA+ ITS1	<i>Nephrops norvegicus</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844429
18S rDNA+ ITS1	<i>Callinectes sapidus</i>	Jensen P C, et al.	2011	FJ844431
18S rDNA+ ITS1	<i>Portunus trituberculatus</i>		2012	ZHSH2006-1
	<i>Scylla serrata</i>		2012	ZHSH2006-2

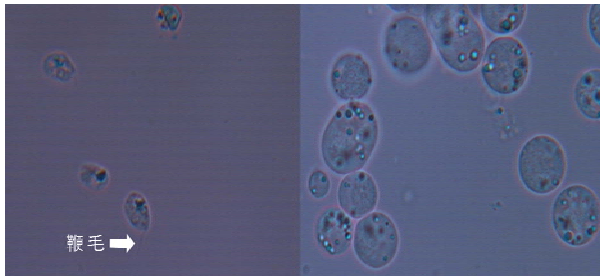


图 1 发病蟹血淋巴中的血卵涡鞭虫 (1000×)

Fig. 1 *Hematodinium* sp. from hemolymph of diseased crab

todinium sp. 分支, 同时显示与分离自 *Liocarcinus depurator* 和蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 的血卵涡鞭虫亲缘关系更加密切。

本次获得的 ZHSH 2006-1 株和 ZHSH2006-2 株 ITS1-5.8S-ITS2 基因片段同源率为 100%, 大小为 888 bp, 包括全部 ITS1 (344 bp)、5.8S rDNA (150 bp) 和 ITS2 (394 bp) (GenBank 登录号: JQ692310、JQ928405)。将获得的 18S rDNA 和 ITS1 部分基因分别与 GenBank 中已有血卵涡鞭虫的相应序列用 DNASTar 软件进行比较分析。从 18S rDNA 同源性分析来看, 不同宿主来源虫体之间差异很小, 虫株 ZHSH2006-1 和 ZHSH2006-2 的 18S rDNA 序列与其他血卵涡鞭虫的 18S rDNA 序列同源性达 99.2% 以上 (表 3); 但不同宿主来源虫体 ITS1 进化速度较快, 获得的 ITS1 序列与其他登录的序列比对有明显差异, 同源性高低不等 (表 4)。而获得的 5.8S rDNA-ITS2 基因序列在 GenBank 中未找到相关的序列 (图 4)。

3 讨论

血卵涡鞭虫 (*Hematodinium*) 隶属于植鞭动物门 (phylum Sarcomastigophora)、腰鞭虫纲 (order Dinoflagellida)、Syndiniceae 科、Syndinida 目、血卵涡鞭虫属。自 1931 年 Chatton, *et al.*^[9] 首次报道法国沿岸绿蟹的血卵涡鞭虫 (*Hematodinium perezii*) 感染以来, 至今国外许多地

区包括澳大利亚、阿拉斯加、苏格兰、加拿大以及美国东部沿岸等地均发现和报道了该寄生虫病的流行, 该病的流行已威胁到挪威龙虾 (*Nephrops norvegicus*)、蓝蟹、白氏雪蟹 (*Chionoecetes bairdi*) 以及蛛雪蟹 (*Chionoecetes opilio*) 等许多重要经济甲壳类的渔业生产^[10-18]。目前国外有不少来自十足目种类血卵涡鞭虫基因片段的 18S rDNA 核酸序列已经确定^[19-21], 但目前这部分工作尚不完善。国内自 2006 年首次报道养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染以来, 已相继在锯缘青蟹、日本蟳和脊尾白虾中发现该寄生虫感染, 但目前为止还没有血卵涡鞭虫 18S rDNA 核酸全序列的报道, ITS 区域也只对部分的 ITS1 序列进行了比对分析^[22]。

ITS 是核糖体 DNA (rDNA) 中介于 18S 和 28S 之间的内转录间隔区, 包括 ITS1 和 ITS2 两段序列, 分别位于 18S—5.8S 和 5.8S—28S 之间。尽管 ITS 序列的非编码区 (ITS1 和 ITS2) 生物学功能目前还不是很清楚, 但越来越多的证据表明, 这 2 个高度可变的区域在核糖体进化中起着重要作用^[23]。虽然 ITS 区碱基数少, rRNA 转录复杂, 但他们没有翻译成有功能的蛋白质序列, 并因此进化速度较快, 具有种内变异小而种间变异大的特性。许多研究表明, ITS 序列是研究寄生虫分类鉴定及遗传变异的理想标记^[24]。目前认为 18S rDNA 序列这类高度保守区域可以用来进行高级类群间系统进化的比较分析, 而 ITS 更适用于解决较低分类群如种间或种内不同株差异的问题。周荣琼等^[25]利用 ITS1 序列测定及分析发现 ITS1 片段可作为隐孢子虫属的种间鉴定种的遗传标记。

本研究对血卵涡鞭虫的 18S rDNA 和 ITS 序列的比对分析显示, 属内 18S rDNA 进化保守, 序列高度同源, 不同宿主来源血卵涡鞭虫的同源性高达 99.2%。获得的两株血卵涡鞭虫宿主分别是三疣梭子蟹和锯缘青蟹, 其 18S rDNA 基因序列之间同源性高达 99.6%, 说明 18S rDNA 序列可以用于血卵涡鞭虫系统进化分析。将 GenBank 中相关 ITS 序列进行比对分析时发现, 所获的两个 ITS1 序列与 GenBank 中相关 ITS1 序列的同源性最高在 97.7%, 最低为 21.2%, 这说明感染我国梭子蟹和青蟹的血卵涡鞭虫与国外分离获得的血卵涡鞭虫属于不同基因型。同时分析结果也显示, 来源于不同宿主的血卵涡鞭虫的 ITS1 高度特异。但获得的两株虫体的 ITS1 序列之间同源性很高, 达 100%, 这可能与宿主所处的地理位置有一定关系。Small, *et al.*^[26]对分离自不同十足目的血卵涡鞭虫 ITS1 序列测定及分析发现不同海域来源的血卵涡鞭虫 ITS1 区核酸存在一定差异。另外 ITS1 分析结果也显示分离自三疣梭子蟹和青蟹的血卵涡鞭虫与国外分离自蓝蟹和 *Liocarcinus depurator* 的血卵涡鞭虫的 ITS1 序列同源性要

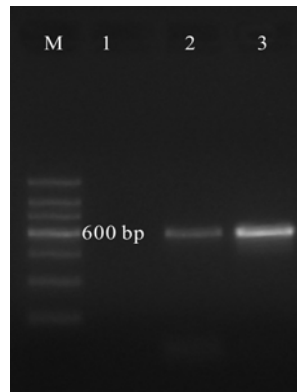


图 2 血卵涡鞭虫 PCR 扩增产物琼脂糖电泳结果

Fig. 2 Sensitivity of PCR assay for detection of *Hematodinium* sp.

1. 三疣梭子蟹 DNA 样本的 PCR 扩增产物; 2, 3. 感染血卵涡鞭虫病蟹的样本 PCR 扩增产物; M. 150 bp 分子量标准

1. PCR amplification of genomic DNA purified from *Portunus trituberculatus*; 2, 3. PCR amplification of genomic DNA purified from the hemolymph from an infected crab; M. 150 bp DNA marker

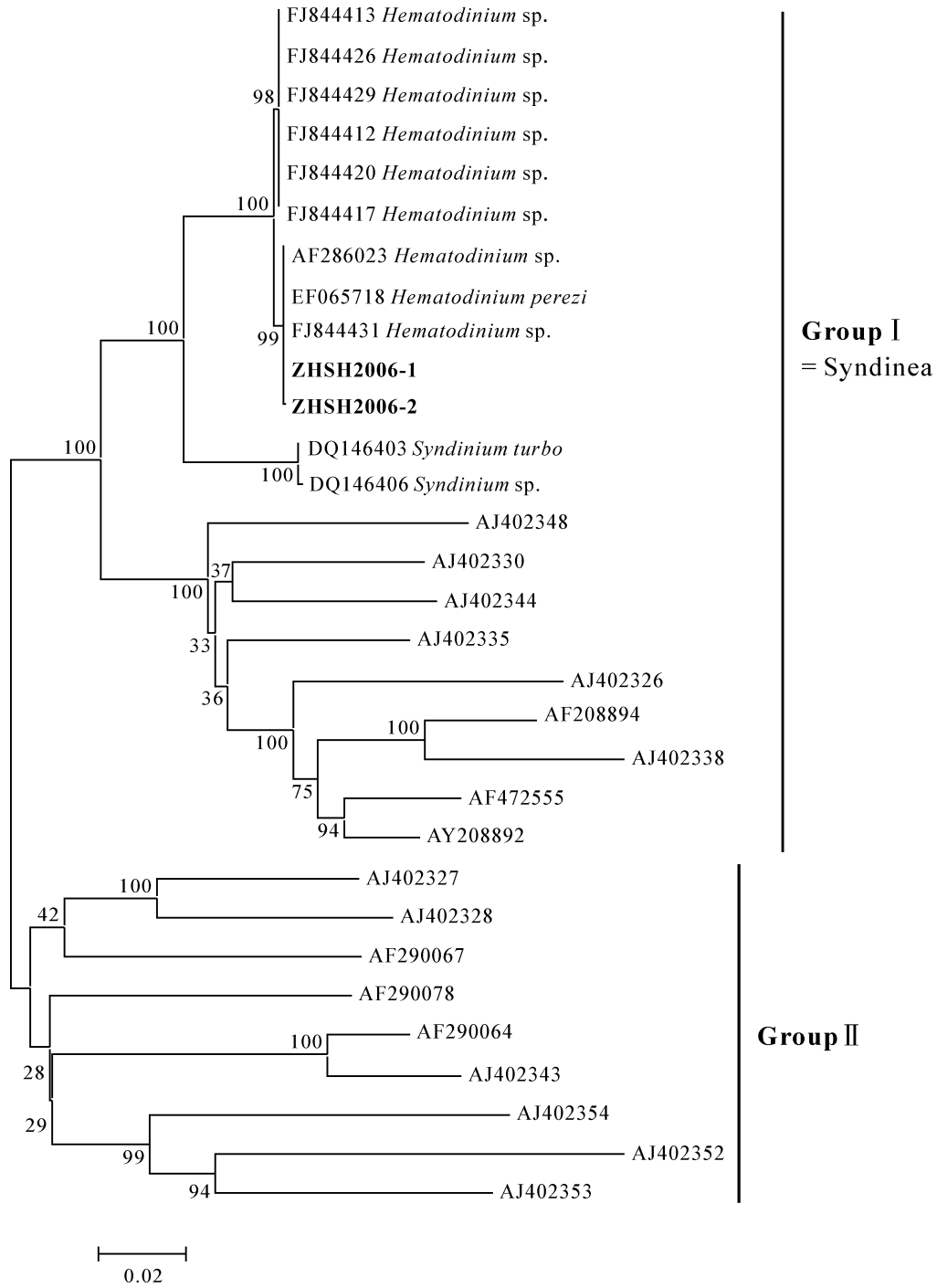


图 3 采用 N-J 法根据腰鞭毛虫类 18S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of dinoflagellata-like organism based on 18S rDNA gene using the Neighbor-Joining method

明显高于其他株系, 达 94%以上, 这可能与寄生的宿主有关, 蓝蟹和 *Liocarcinus depurator* 与我国三疣梭子蟹及锯缘青蟹虽然所产地理位置不同但都属于梭子蟹科。本文根据以上结果初步确定血卵涡鞭虫 *ITS1* 区核酸更适用于血卵涡鞭虫属内的分类学研究。目前国际上关于血卵涡鞭

虫 *ITS* 序列信息不及 18S rDNA 序列丰富, 本研究未根据获得的 *ITS* 区域构建血卵涡鞭虫系统进化树。GenBank 中相关 *ITS2* 基因序列信息不全, 本文也未能对 *ITS2* 序列进行比对分析, *ITS1* 与 *ITS2* 在血卵涡鞭虫虫株进化过程中所起的作用是否一致, 还有待进一步探讨。

表 3 血卵涡鞭虫种内虫株的 18S rDNA 序列同源性比较分析
Tab. 3 Analysis of 18S rDNA sequence similarity between *Hematodinium*

差异率 Divergence	相似度 Percent identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		99.4	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	100.0	99.4	99.3
2	0.6		99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	99.0
3	0.6	0.0		100.0	99.8	100.0	100.0	99.4	99.2	98.7
4	0.6	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	99.0
5	0.6	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.4	99.4	99.0
6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.4	99.4	99.0
7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.4	99.4	98.9
8	0.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6		100.0	99.5
9	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.2		99.9
10	0.5	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.2	0.1	

注:1—10 分别为 EF065718、FJ844412、FJ844413、FJ844417、FJ844420、FJ844426、FJ844429、FJ844431、ZSHS2006-1、ZSHS2006-2
Note: 1—10 represent EF065718, FJ844412, FJ844413, FJ844417, FJ844420, FJ844426, FJ844429, FJ844431, ZSHS2006-1 and ZSHS2006-2

表 4 血卵涡鞭虫种内虫株的 ITS1 全长序列之间同源性比较分析
Tab. 4 Analysis of full-length ITS1 sequence similarity between *Hematodinium*

差异率 Divergence	相似度 Percent identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		22.1	22.1	22.6	22.1	21.6	22.1	95.0	97.9	97.7
2	66.6		100.0	99.4	100.0	100.0	99.4	21.5	21.8	21.8
3	66.6	0.0		99.4	100.0	100.0	99.4	21.5	21.8	21.8
4	64.3	0.0	0.0		99.4	99.4	99.4	22.0	22.3	22.3
5	66.6	0.0	0.0	0.0		100.0	99.4	21.5	21.8	21.8
6	66.6	0.0	0.0	0.0	0.0		99.4	20.9	21.4	21.2
7	66.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		21.5	21.8	21.8
8	5.1	68.4	68.4	66.1	68.4	68.4	68.4		94.4	96.2
9	1.5	64.0	64.0	61.7	64.0	64.0	64.0	5.2		100.0
10	1.5	64.5	64.5	62.2	64.5	64.5	64.5	5.8	0.0	

注: 1—10 分别为 EF065716、FJ844412、FJ844420、FJ844413、FJ844426、FJ844429、FJ844417、FJ844431、ZSHS2006-2、ZSHS2006-1
Note: 1—10 represent EF065716, FJ844412, FJ844420, FJ844413, FJ844426, FJ844429, FJ844417, FJ844431, ZSHS2006-2 and ZSHS2006-1

ATTTTAGCGATGAATGCCTCGGCTCGGGTTACGATGAAGGACGCAGCGAATTGCGATAAGC
AATGCGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCAGATTTTGAACGTACTCTACGCTCTCGGGTA
TCCCTGGGAGCATGTCTGGTCTCAGCG (5.8S)
TCTGTTCAACCTTTGTGCCCTCTGGAGTTGTGAACATTCTCCTTCTTGAAGCGATTTGT
GCACCAGTGAGCCTCTTCCACACACATGCTCTACGACACCTGTTGTTGTAGACAGCGGA
AGATGGCCATGACGCATTAATGTTAAGGGATTGTAGAATGTTGTAGAGAGGGGTTGGTT
GCGTACGTCTACCGTACGCACCAAAAGCTCTGCATGTTCTCCACCAACTTATGACCC
AGTTTAGGTCTAATGCTTGTGGCCGAGAGTTACGCTGCATGGTTATAACCGTACTCTTCTTC
CGCCCTTTATTGTGATAGTACACAGTTTTTCGGACTAGTGGGGCTATTGCAGCAGATATAT
ATATCTCTGAATATATACACAT (ITS2)

图 4 ZSHS2006-1 株和 ZSHS2006-2 株 5.8S rDNA -ITS2 序列
Fig. 4 5.8S rDNA-ITS2 gene sequence of ZSHS2006-1 and ZSHS2006-2
5.8S rDNA: 150 bp; ITS2: 394 bp

参考文献:

[1] Xu W J, Shi H, Xu H X, *et al.* Preliminary study on the *Hematodinium* infection in cultured *Portunus trituberculatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 637—640 [许文军,

施慧, 徐汉祥, 等. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究. *水生生物学报*, 2007, **31**(5): 637—640]

[2] Li M, Wang C, Wang J G, *et al.* PCR amplification, sequencing and analysis of 18S rDNA of *Balantidium ctenopharyngodoni* inhabiting grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica*

- Sinica*, 2011, **35**(2): 203—209 [李明, 王崇, 汪建国, 等. 鲢肠袋虫 18S rDNA 的扩增、测序与分析. 水生生物学报, 2011, **35**(2): 203—209]
- [3] Orlandi P A, Carter L, Brinker A M, *et al.* Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, **68**(8): 4806—4813
- [4] Marina S, Scott U, Joseph O. Sensitivity of PCR detection of *Cyclospora cayetanensis* in raspberries, basil, and mesclun lettuce [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, **54**(1): 277—280
- [5] Medlin L, Elwood H J, Stickel S, *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions [J]. *Gene*, 1988, **71**: 491—499
- [6] Mitchell T G, Freedman E Z, White T J, *et al.* Unique oligo nucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, **32**(1): 253—255
- [7] Skovgaard A, Massana R, Balague V, *et al.* Phylogenetic position of the copepod-infesting parasite *Syndinium turbo* (Dinoflagellata, Syndininea) [J]. *Protist*, 2005, **156**(4): 413—423
- [8] Shi H, Xu W J, Xu H X, *et al.* Development of an ITS1 gene-targeted PCR-based diagnosis for *Portunus trituberculatus* parasite *Hematodinium* sp. [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, **17**(1): 28—33 [施慧, 许文军, 徐汉祥, 等. 三疣梭子蟹感染血卵涡鞭虫 PCR 检测方法的建立. 上海水产大学学报, 2008, **17**(1): 28—33]
- [9] Chatton E, Poisson R. Sur l'existence, dans le sang des crabs, de peridinien parasites: *Hematodinium perezii* n.g., n.sp.(Syndinidae) [C]. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie (Paris)*, 1931, **105**: 553—557
- [10] Shields J D. The parasitic dinoflagellates of marine crustaceans [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1994, **4**: 241—271
- [11] Newnman M W, Johnson C A. A disease of blue crabs (*Callinectes sapidus*) caused by a parasitic dinoflagellate, *Hematodinium* sp [J]. *Parasitology*, 1975, **63**: 554—557
- [12] Meyers T R, Koeneman T M, Bothelho C, *et al.* Bitter Crab Disease: a fatal dinoflagellate infection and marketing problem for Alaskan Tanner crabs *Chionoecetes bairdii* [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 1987, **3**: 195—216
- [13] Appleton P L, Vickerman K. In vitro cultivation and development cycle in culture of a parasitic dinoflagellate (*Hematodinium* sp.) associated with mortality of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* in British waters [J]. *Parasitology*, 1998, **116**: 115—130
- [14] Field R H, Hills J M, Atkinson R J A, *et al.* Distribution and sea-seasonal prevalence of *Hematodinium* sp. infection of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) around the west coast of Scotland [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 1998, **55**: 846—858
- [15] Shields J D. Parasites and symbionts of the crab *Portunus pelagicus* from Moreton Bay, eastern Australia [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1992, **12**: 94—100
- [16] Hudson D A, Adlard R D. PCR-techniques applied to *Hematodinium* spp. and *Hematodinium*-like dinoflagellates in decapod crustaceans [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 1994, **20**: 203—206
- [17] Messick G A. *Hematodinium perezii* infections in adult and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* from coastal bays of Maryland and Virginia, USA [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 1994, **19**: 77—82
- [18] Taylor D M, Khan R A. Observations on the occurrence of *Hematodinium* sp.(Dinoflagellata: Syndinidae): the causative agent of bitter crab disease in the Newfoundland snow crab (*Chionoecetes opilio*) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1995, **65**: 283—288
- [19] Shields J D, Squyars C M. Mortality and hematology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, experimentally infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii* [J]. *Fishery Bulletin*, 2000, **98**: 139—152
- [20] Hudson D, Hudson N, Shields J D. Infection of *Trapezia* spp.(Decapoda: Xanthidae) by *Hematodinium* sp.(Duboscquodina: Syndinidae): a new family record of infection [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1993, **16**: 273—276
- [21] Hudson D A, Lester R J G. Parasites and symbionts of wild mud crabs *Scylla serrata* (Forsk.) of potential significance in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 1994, **120**: 183—199
- [22] Bower S M, Meyer G R, Phillips A, *et al.* New host and range extension of bitter crab syndrome in *Chionoecetes* spp. caused by *Hematodinium* sp. [J]. *European Association of Fish Pathologists*, 2003, **23**: 86—91
- [23] Xu W J, Xu H X, Shields J, *et al.* Progress of studies on *Hematodinium* sp. disease in marine Crustacean [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(4): 695—702 [许文军, 徐汉祥, Shields, 等. 海产甲壳类血卵涡鞭虫病研究进展. 中国水产科学, 2007, **14**(4): 695—702]
- [24] Li X J, Yang Y M. Application of ribosomal DNA internal transcribed spacer in parasites [J]. *Journal of Dali University*, 2008, **7**(4): 79—81 [李晓娟, 杨毅梅. 核糖体 DNA 内转录间隔区序列标记在寄生虫学中的应用. 大理学院学报, 2008, **7**(4): 79—81]
- [25] Chu K H, Li C P, Ho H Y. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic analyses in Crustacea [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, **3**: 355—361
- [26] Zhou R Q, Li G Q, Xiao S M, *et al.* PCR amplification, cloning and sequencing of ITS1 rDNA from cryptosporidium [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, **27**(5): 369—372 [周荣琼, 李国清, 肖淑敏, 等. 安氏隐孢子虫 ITS1 序列的 PCR 扩增、克隆及分析. 中国预防兽医学报, 2005, **27**(5): 369—372]
- [27] Small H J, Shields J D, Reece K S, *et al.* Morphological and molecular characterization of *Hematodinium perezii* (Dinophyceae: Syndiniales), a dinoflagellate parasite of the harbour crab, *Liocarcinus depurator* [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2012, **59**: 54—66