

doi: 10.7541/2018.116

## 南海石斑鱼苗种肠道微孢子虫病病原的鉴定

颜远义<sup>1</sup> 刘新华<sup>2,3</sup> 徐力文<sup>4</sup> 章晋勇<sup>2,3</sup>

(1. 广东省水生动物疫病预防控制中心, 广州, 511453; 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, 农业部淡水养殖病害防治重点实验室, 淮安研究中心, 武汉 430072; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

**摘要:** 研究通过组织病理分析、超微结构观察以及分子特征分析对石斑鱼(*Epinephelus* spp.)苗种肠道微孢子虫病病原进行了鉴定。其为一肠孢虫属新种, 命名为石斑鱼肠孢虫(*Enterospora epinepheli* sp. n.), 专性寄生于细胞核内, 发育过程与肠孢虫属模式种黄道蟹肠孢虫(*Enterospora canceri*)一致。早期单核裂殖体通过一层简单的电子薄膜与宿主细胞核质隔离。随后, 单核裂殖体发育形成多核裂殖原质团。此时, 细胞核出现明显肥大, 有的甚至被裂殖子胀破。裂殖原质团进一步发育形成多核产孢体, 并开始出现许多高电子密度的囊泡状结构。这些与极丝及锚状盘有关的囊泡状结构聚集在藕核周围, 并组装形成微孢子虫特征性结构(挤出装置)前体。随后, 产孢体原生质团通过连续分裂形成一个个孢子母细胞。孢子母细胞与细胞核直接接触, 并直接发育形成成熟孢子。成熟孢子椭圆形, 孢子长(1.56±0.31) μm (1.07—1.96 μm), 宽(1.08±0.98) μm (0.93—1.28 μm)。孢壁分为3层, 外壁电子密度高, 厚(15.51±0.95) nm (9.87—26.18 nm), 内壁为电子透明层, 较外层更厚(81.13±2.71) nm (57.16—110.81 nm), 最里面为孢质膜。极丝为同型极丝, 共5—6圈, 分2排排列。组织病理学分析发现该微孢子虫寄生于肠道上皮杯状细胞核内, 肠壁脱落的内容物中也发现大量的微孢子虫。序列比对发现该种与之前报道的石斑鱼肠道微孢子虫待定种(*Microsporidium* sp.)序列基本一致, 与其他相似性较高的种类的遗传距离在0.162—0.225。系统发育关系分析显示肠孢虫科的种类明显分为两支, 石斑鱼肠孢虫和肠孢虫属其他种类及毕氏肠孢虫聚为一个独立分支, 但不与该分枝中任何种类形成姊妹支。

**关键词:** 瘦身病; 肠道微孢子虫病; 石斑鱼; 肠孢虫科; 白便

**中图分类号:** S941.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2018)05-0942-08

微孢子虫是一类泛在的、成孢子的、单细胞专性细胞内寄生虫, 宿主范围广泛, 可寄生于从原生动物到哺乳动物(包括人类)几乎所有动物类群<sup>[1]</sup>。至今, 已报道187属1500余种。鱼类是微孢子虫的主要宿主之一, 目前已报道21属160余种, 绝大部种类感染硬骨鱼类, 迄今仅报道一种可感染软骨鱼类<sup>[2]</sup>。石斑鱼(*Epinephelus* spp.)隶属鲷形目(Perciformes), 鲷科(Serranidae), 是一类重要的海水经济鱼类, 尤其是在东南亚地区, 因其肉质鲜美, 深受人们喜爱。随着苗种人工繁育的成功及配合饲料的使用, 已成为东南亚最重要的海水养殖品种之一,

仅我国南海区域(主要包括福建、两广、海南等地)年产量就达 $8 \times 10^7$  kg<sup>[3]</sup>。目前, 在我国养殖的石斑鱼种类有10属超过50种, 包括青石斑鱼(*E. awoara*)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)、点带石斑鱼(*E. malabaricus*)、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)、褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、杂交石斑鱼(珍珠龙胆, *E. lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)等。然而, 随着集约化养殖发展, 石斑鱼养殖病害频发, 给养殖生产造成了严重的经济损失。其中, 已报道3种石斑鱼微孢子虫病, 病原分别为寄生于清水石斑鱼(*Epinephelus polyphekadion*)肠壁的

**收稿日期:** 2018-05-21; **修订日期:** 2018-06-26

**基金项目:** 2017广东省鱼病防治专项基金; 国家自然科学基金(31772411); 中国科学院水生生物研究所自主探索课题资助 [Supported by the Special Fund of Control and Prevention of Fish Diseases of Guangdong Province in 2017; the National Natural Science Foundation of China (31772411); the Independent Exploration Fund of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences]

**作者简介:** 颜远义(1962—), 男, 湖北黄冈人; 高级工程师; 主要从事鱼病学研究。E-mail: yyyd88@126.com

**通信作者:** 章晋勇(1980—), 博士, 副研究员; E-mail: zhangjy@ihb.ac.cn

阿拉伯格留虫(*Glugea arabica*)、寄生于网纹石斑鱼(*E. chlorostigma*)腹腔的匹里虫待种(*Pleistophora* sp.)、寄生于赤点石斑鱼(*E. akaara*)腹腔的石斑鱼格留虫(*G. epinephelus*)<sup>[4-6]</sup>。

近年来,一种引起石斑鱼苗种培育阶段的肠道微孢子虫病在海南广泛传播,损失严重,其主要症状为厌食、肠壁变薄、鱼体极度消瘦、排白便等症状,造成苗种的大量死亡,死亡率最高可达100%,危害仅次于石斑鱼神经坏死病毒病,由于其最直观的临床症状为患病鱼极度消瘦,故当地渔民也称其为“瘦身病”,但由于引起石斑鱼瘦身的原因众多且由于这是石斑鱼肠道感染微孢子虫的首次发现,故我们认为称其为石斑鱼肠道微孢子虫病更为合适。我们前期虽对该病例、流行病学及分子特征等进行了报道,但并未对其病原鉴定至种<sup>[7]</sup>。本文详细报道了其引起的组织病理变化、超微结构以及分子特征等微孢子虫分类特征,确定了该病原为肠胞虫科,肠胞虫属(*Enterospora*)一新种,命名为石斑鱼肠胞虫(*Enterospora epinepheli* sp. n.)。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集及处理

于2017年5月在海南文昌冯家湾珍珠龙胆苗种培育场发现大量苗种出现患病症状,主要表现为鱼苗停止摄食并伴有白便,鱼体消瘦,头骨和腹腔凹陷,背脊肌肉消瘦,严重的为刀刃状,体重仅为正常鱼苗的20%—40%。采集患病症状的鱼苗50尾(体重11.3—20.9 g),活体运回实验室解剖观察。

### 1.2 活体检查

将带回的石斑鱼进行解剖,取少量肠道组织并刮取部分内容物进行涂片观察,在1000×倍下对新鲜孢子进行观察、测量、拍照。

### 1.3 组织病理

剪取症状明显鱼体的部分肠道组织,并刮取肠道内容物分别保存于10%中性福尔马林进行固定,样品固定48h后,经乙醇和丙酮梯度脱水后移入到二甲苯透明,浸蜡包埋后切片,切片厚度4—6 μm,经苏木精-伊红染色(H&E染色)后用Olympus BX53拍照观察并保存。

### 1.4 超微结构观察

将感染的肠道及内容物保存到2.5%中性戊二醛中,4℃固定24h,磷酸缓冲液冲洗,经1% 饿酸固定、磷酸缓冲液漂洗后,再经系列丙酮脱水,渗透、包埋、切片后经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, HITACHI H-7700透射电镜观察超微结构,工作电压为80千伏。

### 1.5 DNA提取、18SrDNA序列的扩增和测定

取部分95%酒精保存的组织,剪成碎片并用PBS离心洗涤2次以除去残余酒精。先用组织研磨仪(MP, FastPrep-24 5G)6.0速率振荡4次,每次20s,然后用光学显微镜观察孢子是否完全破碎。破碎后利用细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(Qiagen, 德国)提取样品基因组DNA。18S rDNA序列片段扩增采用引物EnterF125 (5'-AACTAACCACGGTAACCTGTGGCTAA-3')和EnterR1153 (5'-CATTCACCATGCCTTGATGAGGCACCGTT-3')<sup>[7]</sup>。PCR反应体系包括1 μL DNA, 12.5 μL 1× PCR mixture (康为, 北京), 正反引物各1 μL (10 μm), 加双蒸水至25 μL体系。反应程序为94℃ 预变性3min, 35个循环: 94℃ 变性40s; 59℃ 退火30s; 72℃ 延伸90s; 72℃ 终延伸10min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒(康为, 北京)纯化回收,将目的片段连接到pMD18-T载体(TaKaRa, 日本),再转化到感受态细胞DH5α中,50 μL/mL氨苄青霉素的LB 固体培养基均匀涂布并培养过夜,挑取阳性克隆,用于测序。测序在自动测序仪ABI PRISM® 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems USA)上完成。测序结果通过BioEdit<sup>[8]</sup>进行拼接,并根据测序峰图人工校正(DNASTAR INC., Madisom, Wis),将拼接完毕的序列提交至GenBank。

### 1.6 系统发育关系及遗传距离分析

将所获得序列通过NCBI网站进行BLAST搜索,并从GenBank上选取肠胞虫科以及其他序列相似性较高种类的18S rDNA序列数据进行系统发育树的构建。选取*Glugea arabica* (KT005391)和*Glugea epinephelus* (AY090038)为外群。利用CLUSTAL 1.8<sup>[9]</sup>对选取的序列进行多重比对。分别利用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian Inferences, BI)进行系统发育关系分析。通过jModelTest<sup>[10]</sup>确定最佳核苷酸替代模型应用于ML和BI分析。ML分析利用PhyML 3.0<sup>[11]</sup>软件进行运算100代。BI分析利用Mr. Bayes<sup>[12]</sup>软件进行操作,以随机树(Random)为起始树,替换模型参数 $N_{st}$ 为6,马尔可夫链的蒙特卡洛方法(Markov chain Monte Carlo process)设置为4条链同时运行1000000代。获得的系统发育树用Treeview1.6<sup>[13]</sup>和Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc.美国)编辑、注释。

选取肠胞虫科所有种类进行遗传距离分析,用MEGA (6.0) 软件选择Kimura 2-parameter 模型进行计算<sup>[14]</sup>。



## 2 结果

### 2.1 组织病理

在所检查的50尾鱼苗中,均不同程度的感染了该微孢子虫。组织病理分析发现,大量的孢子定殖在肠道上皮的杯状细胞核内,造成细胞核肥大,甚至胀破核膜流出到细胞质中(图1a)。同时,由于感染细胞坏死、脱落,肠腔中肠道内容物中孢子的丰度也非常大(图1b)。

### 2.2 石斑鱼肠孢虫超微结构特征和发育过程

图2—图4展示了该石斑鱼肠孢虫在细胞核内是如何发育为成熟孢子。早期单核裂殖体,颜色较浅,藕核,通过一层薄膜与核质隔离,无寄生泡或产孢囊结构,细胞核周围围绕较多线粒体(图2a)。单核裂殖体继续发育形成多核裂殖原质团,此时,裂殖原质团颜色较深,藕核明显,且绝大部分聚集在细胞核周围,原质团薄膜与细胞核膜基本重合。裂殖原质团发育导致细胞核出现明显肥大,甚至直接将细胞核膜胀破(图2b—d)。裂殖原质团进一步发育形成多核产孢原质团,并开始出现许多高电子密度的囊泡状结构(图3a—d)。囊泡状结构聚集在细胞核周围,并组装形成微孢子虫挤出装置前体(图3c、3d)。随后,产孢体原生质团通过连续分裂形成一个孢子母细胞,孢子母细胞可见微孢子虫的典型特征,如极丝、后泡及三层孢壁结构等(图3e)。值得注意的是,整个孢子发育并不是同步完成(图3f)。孢子母细胞与细胞核直接接触,并进一步发育形成成熟孢子(图4a—d)。成熟孢子为椭圆形,孢子长 $(1.56\pm 0.31)\mu\text{m}$  ( $1.07\text{—}1.96\mu\text{m}$ ),宽 $(1.08\pm 0.98)\mu\text{m}$  ( $0.93\text{—}1.28\mu\text{m}$ ),具一个蘑菇状锚状盘(图4a)。极质体由两部分组成,均呈薄膜状,外层部分排列紧密,内层较为稀疏(图4b—c)。同型极丝5—6圈,分两列排列(图4d)。孢壁分为3层,外壁电子密度高,厚 $(15.51\pm 0.95)\text{nm}$  ( $9.87\text{—}26.18\text{nm}$ ),内壁为电子透明层,较外层更厚 $(81.13\pm 2.71)\text{nm}$  ( $57.16\text{—}110.81\text{nm}$ ),最里面为孢质膜(图4c)。

分类学信息:

石斑鱼肠孢虫 *Enterospora epinepheli* sp. n.

宿主: 石斑鱼 *Epinephelus* spp.

采样地点: 海南文昌冯家湾养殖区 ( $19^{\circ}24'31''\text{N}$ ,  $110^{\circ}42'29''\text{E}$ )

寄生部位: 肠道上皮杯状细胞核内

宿主大小: 体重11.3—20.9 g

感染率: 100% (50/50)

样本保存: 10%福尔马林、2.5%戊二醛及95%酒精固定标本保存于中国科学院水生生物研究所鱼病研究室,标本号: MTR201705181、MTR201705182、MTR201705183。

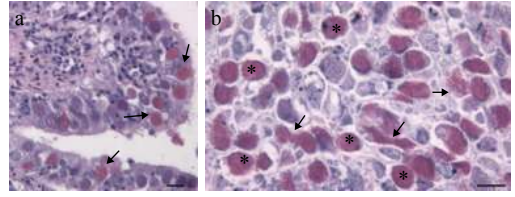


图1 石斑鱼肠孢虫感染肠道组织和肠道内容物病理切片  
Fig. 1 Photomicrographs of *Enterospora epinepheli* sp. n. from histological sections of intestine and intestinal contents of hybrid grouper, *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀

a. 肠道组织切片, 示大量孢子在肠道上皮杯状细胞核内(箭头), 标尺为40  $\mu\text{m}$ ; b. 肠道内容物组织切片, 示大量孢子寄生在细胞核内(星号), 孢子胀破核膜后弥散到细胞质中(箭头), 标尺为40  $\mu\text{m}$

a. H&E stained section of intestinal tissues, showing numerous spores (arrow) in the nuclei of goblet cell in the epithelial layer, scale bar=40  $\mu\text{m}$ ; b. H&E stained section of intestinal contents, showing numerous spores within the nuclei (asterisk) and shedding spores in the host cell cytoplasm from ruptured nuclei (arrowhead), scale bar =40  $\mu\text{m}$

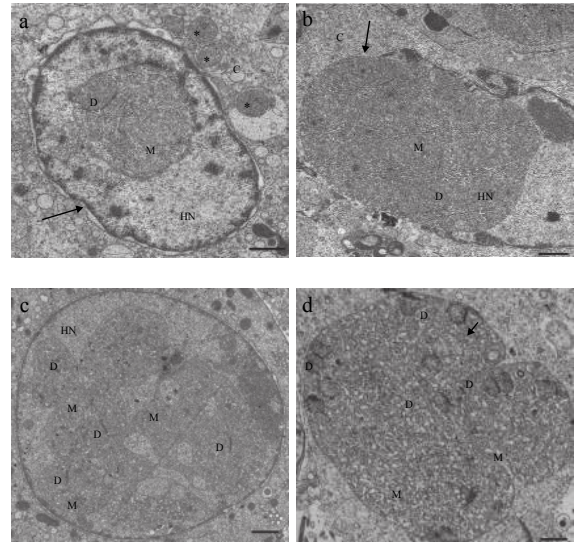


图2 石斑鱼肠孢虫裂体生殖时期超微结构

Fig. 2 Ultrastructure of merogony in *Enterospora epinepheli* sp. n. in the intestines of *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀

a. 示早期单核裂殖体, 标尺为1  $\mu\text{m}$ ; b. 示多核裂殖体胀破细胞核膜弥散到细胞质中, 标尺为1  $\mu\text{m}$ ; c. 示单核内出现多个多核裂殖原质团, 标尺为1  $\mu\text{m}$ ; d. 示后期多核裂殖原质团, 标尺为1  $\mu\text{m}$

a. An early uninucleate meront (M) within the nucleoplasm of host nucleus (HN), arrow: the margin of host cell cytoplasm; b. A meront (M) rupture the hypertrophic nucleoplasm of host cell nucleus (HN) and releasing in the host cell cytoplasm (C); c. Several diplokaryotic meronts within nucleoplasm of host cell nucleus; d. Later diplokaryotic meronts with several diplokaryotic nuclei (D) and thicken cell envelop (arrowhead). Scale bar=1  $\mu\text{m}$ , C, host cytoplasm; asterisk: mitochondrion; D, diplokaryotic nuclei

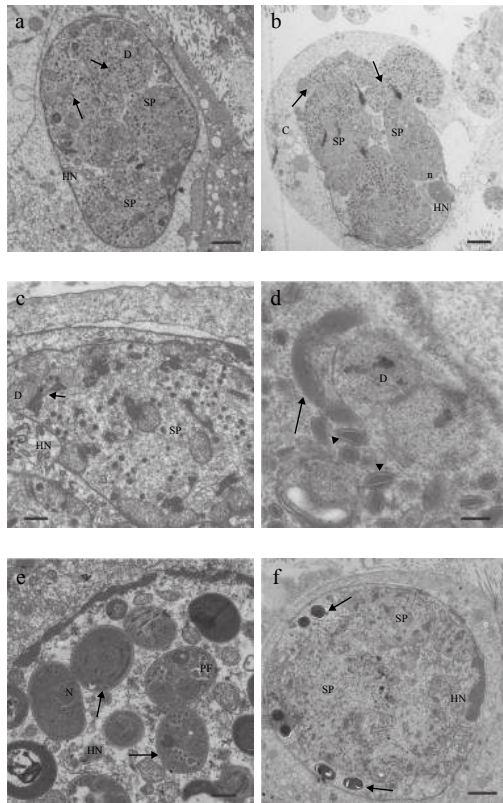


图3 石斑鱼肠孢虫孢子生殖时期超微结构

Fig. 3 Ultrastructure of sporogony in *Enterospora epinepheli* sp. n. in the intestines of *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀

a. 示多核产孢体原质团阶段, 出现大量高电子密度囊泡状结构, 标尺为2 μm; b. 示多核产孢体胀破宿主细胞核膜弥散到细胞质中, 标尺为2 μm; c. 示单个多核产孢原质团中高电子密度囊泡状结构围绕藕核周围开始组装形成孢子挤出装置, 标尺为0.5 μm; d. 示囊泡状结构围绕藕核形成孢子挤出装置的放大图, 标尺为0.2 μm; e. 示大量孢子母细胞在细胞核中, 标尺为0.5 μm; f. 示孢子不同发育阶段存在与同一个细胞核内中, 标尺为2 μm

a. Several presumptive early sporogonial plasmodium (SP) containing diplokaryotic nuclei (D) and small membrane-bound vesicles (arrowhead), HN, host nucleus, C, host cell cytoplasm, scale bar=2 μm; b. Sporogonial plasmodia within the host cell cytoplasm (C) by rupturing the host hypertrophic nucleus, SP, sporogonial plasmodium, D, diplokaryotic nuclei, scale bar=2 μm; c. Later-stage sporogonial plasmodium (SP) with precursors of the polar filaments and anchoring disk (arrow) observed in mature spores, scale bar=0.5 μm. d. Magnification of assembled units of spore precursor (arrow) showing the diplokaryotic nuclei associating with membrane-bound vesicles (arrowhead), scale bar=0.2 μm; e. Numerous sporoblasts (arrow) located in the host hypertrophic nucleus (HN), scale bar=0.5 μm; f. Multiple parasite life stages in single infected hypertrophic host nucleus (HN) showing several mature spores (arrow) and several sporogonial plasmodia (SP), scale bar=2 μm

序列号: 模式标本18S rDNA序列在GenBank数据库中登录号为MH345732。

种名来源: 因其感染多种石斑鱼属石斑鱼而将

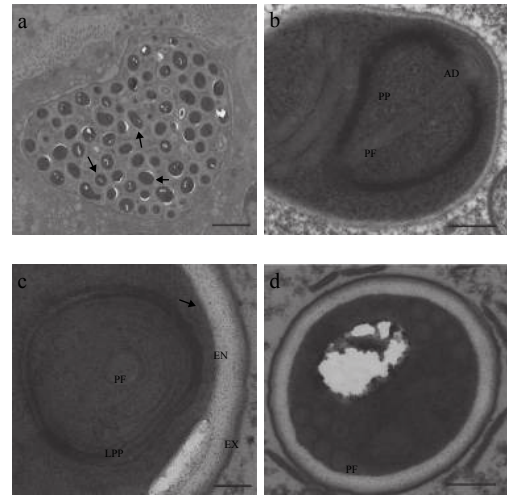


图4 石斑鱼肠孢虫成熟孢子超微结构

Fig. 4 Ultrastructure of mature spores of *Enterospora epinepheli* sp. n. in the intestines of *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀

a. 大量的成熟孢子(箭头)在肥大的细胞核内, 标尺为1 μm; b. 成熟孢子可见锚状盘(AD)、极质体(PP)以及极丝(PF), 标尺为0.2 μm; c. 成熟孢子可见三层孢壁结构, 标尺为0.1 μm; d. 成熟孢子横切可见5—6圈极丝, 标尺为0.2 μm

a. Hypertrophic host nucleus containing numerous mature spores (arrow), scale bar=1 μm; b. Mature spore showing anchoring disk (AD), polarplast (PP) and polar filament (PF), scale bar=0.2 μm; c. Mature spore showing the trilaminar wall and lamellar polarplast (LPP), EX, exospore, EN, endospore, arrowhead, cell plasmembrane, scale bar=0.1 μm; d. Transection of a mature spore showing the 5—6 turns of polar filaments (PF), scale bar=0.2 μm

其命名为石斑鱼肠孢虫。

### 2.3 分子特征分析

通过分子克隆成功扩增出石斑鱼肠孢虫小核糖体RNA部分序列, 序列长1043 bp, GC含量为41.71%。将其在NCBI中进行BLAST发现, 与之前报道的石斑鱼肠孢虫待定种 *Microsporidium* sp. (100%, KR263870) 序列一致, 其他较相似的种类还有: 虾肝肠孢虫 *Enterocytozoon hepatopenaei* (85%, KX981865)、核肠孢虫 *Enterospora nucleophila* (83%, KF135645)、黄道蟹肠孢虫 *Enterospora canceri* (83%, HE584634)、三文鱼核孢虫 *Nucleospora salmonis* (82%, AF185998)、毕氏肠孢虫 *Enterocytozoon bieneusi* (81%, AF023245) 等, 相似性最高的为85%, 低于种间的范围。与已报道的其他石斑鱼寄生的微孢子虫相似性都较低, 如 *Glugea epinephelus* (55%, AY090038), *G. Arabica* (56%, KT-000539), *Pleistophora* sp. (30%, JN205118), 显著低于种间范围。基于贝叶斯法以及最大似然法所构建出的系统发育关系树拓扑结构一致, 尽管各进化枝支持率有些许差异。因此, 本研究用贝叶斯树展



示代表石斑鱼肠胞虫的系统发育关系。从系统发育关系树显示, 肠胞虫科的种类可分为2个枝系 (Clade I 和 Clade II), 石斑鱼肠胞虫与对虾肝胞虫、核肠胞虫、黄道蟹肠胞虫以及毕氏肠胞虫聚为一枝 (Clade II), 且支持率较高, 但不与其中任何一种形成姊妹枝。中华绒螯蟹肝胰腺坏死相关的绒螯蟹肝胞虫 (*Hepatospora eirocheir*) 与肠胞虫科分枝聚为姊妹枝 (图 5)。

选取所有肠胞虫科的种类进行遗传距离分析发现, 遗传距离范围在 0.000—0.225 (表 1), 最小的为石斑鱼微孢子虫待定种, 其他已经鉴定的种类遗传距离最近的为 0.162, 超出种间范围。

### 3 讨论

肠胞虫科的典型特征为孢子在发育过程中, 孢子的挤出释放装置 (包括锚状盘、极丝、后泡等) 在产孢体分裂形成孢子母细胞前已经开始发育并形成, 而几乎所有的微孢子虫的挤出装置一般都是产孢体分裂形成孢子母细胞后才开始形成<sup>[15, 16]</sup>。目前, 肠胞虫科主要包含 5 个属, 即 *Nucleospora*、*Paranucleospora*、*Obruspora*、*Enterocytozoon* 以及

*Enterospora*<sup>[17]</sup>, 其中毕氏肠胞虫 (*Enterocytozoon bienensi*) 是重要的人源微孢子虫之一, 尤其对免疫缺陷病患者危害严重<sup>[15]</sup>。石斑鱼肠胞虫的许多特征与 *Enterospora* 属的模式种 *E. canceri* 极为相似, 主要包括: (1) 均为细胞核内寄生; (2) 裂殖体以及产孢体阶段均是通过薄膜与细胞核分离, 但成熟孢子却与细胞核直接接触; (3) 均形成裂殖原质团和产孢原质团, 且单个核内可形成多个; (4) 孢子大小、形状以及极丝圈数极为相似。与该属已报道的其他种类进一步形态特征比较分析发现, 石斑鱼肠胞虫具有显著的差异性特征 (表 2)。核肠胞虫 (*E. nucleophila*) 和黄道蟹肠胞虫 (*E. canceri*) 均是感染细胞核的种类, 前者是近几年在西班牙报道的金头鲷“白便瘦身病”病原, 也造成宿主厌食、消瘦、白便等临床症状, 但与石斑鱼肠胞虫不同的是, 其整个发育过程中都与宿主细胞核直接接触, 极丝排列只有一列, 一个核内的成熟孢子数只有不到 13 个<sup>[18]</sup>。此外, 核肠胞虫还能寄生于细胞质中, 而石斑鱼肠胞虫虽也在细胞质中有发现, 但超微结构显示其是由于孢原质发育引起细胞核肥大并胀破细胞核膜而弥散到细胞质中, 这也证实了石斑鱼肠胞虫为核内

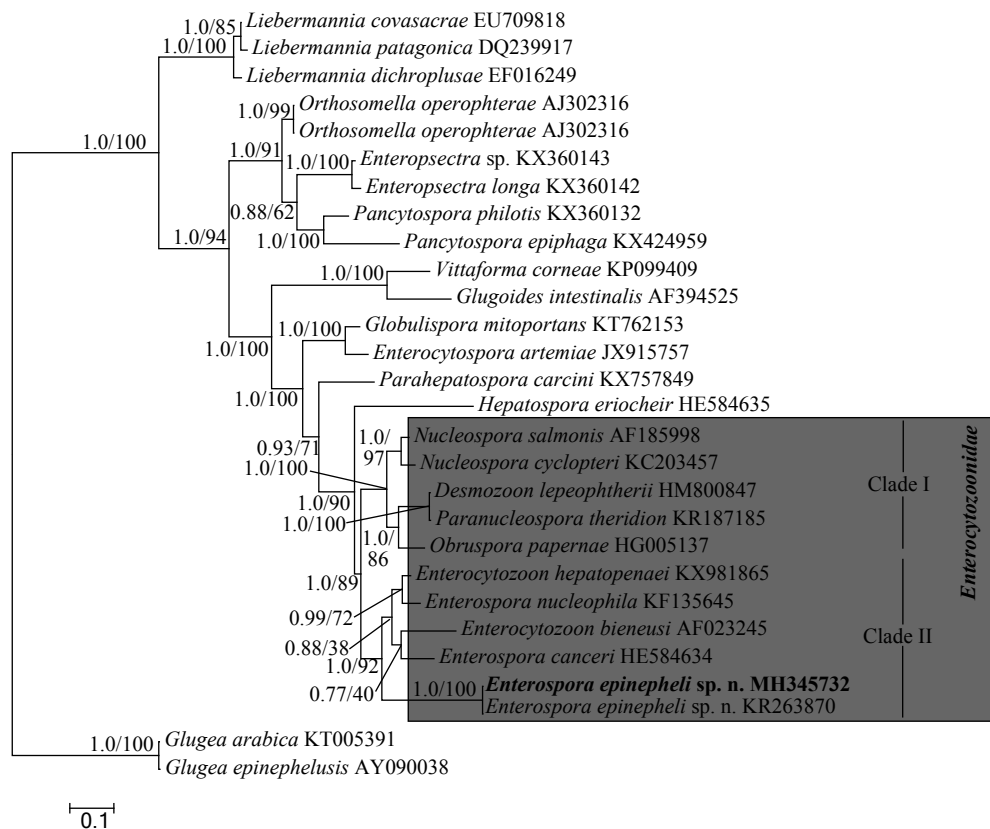


图 5 基于 18S rDNA 基因序列构建的贝叶斯法 (BI) 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree generated by Bayesian inferences (BI) based on the partial 18S rDNA sequences

分子节点数值分别表示 BI 和 ML 的分支支持率

Numbers at branch nodes indicate the support values for Bayesian inferences (BI) and maximum likelihood (ML)

专性寄生。黄道蟹肠孢虫整个发育过程均为离核, 寄生在肝胰脏上皮细胞核内, 单个核内孢子个数比石斑鱼肠孢虫要多(>100 vs. >60)。此外, 黄道蟹肠孢虫的内层孢壁厚度显著低于石斑鱼肠孢虫 [内层: (14.8±0.65) nm vs. (81.13±2.71) nm(57.16—110.81 nm)]。对虾肝肠孢虫寄生于南美白对虾和斑节对虾肝胰脏管状上皮细胞质内, 大量寄生时会导致对虾出现生长缓慢综合症<sup>[19]</sup>, 其孢子大小(0.7 μm×1.1 μm)和孢壁厚度(外壁: 2 nm; 内壁: 10 nm)都较石斑鱼肠孢虫小, 此外极质体类型也有显著的区别(表 2)。

随着分子生物学的发展, 分子标记对微孢子虫的鉴定及其系统发育生物学分析发挥了重要作用<sup>[17—21]</sup>。本研究中所扩增获得的石斑鱼肠孢虫 18S rDNA 部分序列经 BLAST 比较分析发现, 其与

之前报道的石斑鱼肠孢虫待种几乎 100% 相似, 只有 2 个碱基缺失的差异。而已报道感染石斑鱼的其他 3 种微孢子虫, 即 *G. epinephelus*、*G. arabica* 及 *Pleistophora* sp., 与石斑鱼肠孢虫的相似性均在 60% 以下, 表明这些种类与石斑鱼肠孢虫亲缘关系相差甚远。与其他相似性较高的种类进行遗传距离分析发现, 遗传距离在 0.162—0.225, 其中与肠孢虫属其他种的遗传距离在 0.162—0.182, 均远超出种内范围, 从而在分子水平上进一步证实了石斑鱼肠孢虫有别于已报道的肠孢虫属种类(表 1)。

系统发育关系分析发现, 肠孢虫科整个类群的拓扑结构与之前报道的类似, 明显聚为两个分支 (Clade I 和 Clade II)<sup>[17]</sup>。其中石斑鱼肠孢虫与肠孢虫属种 (*E. canceri*, *E. hepatopenaei*, *E. nucleiphila*) 及毕氏肠孢虫聚为一支 (Clade II)。而西班牙学

表 1 石斑鱼肠孢虫与其他肠孢虫科种类基于 18S rDNA 的相似性(上面对角)和遗传距离(下面对角)

Tab. 1 Comparison of similarities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) of *Enterospora epinepheli* sp. n. with other Enterocytozoonidae species based on the partial 18S rDNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>Enterospora epinepheli</i> sp. n. (MH345732)		100	84.8	82.9	81.8	78.9	80.3	78.2	77.7	77.5	77.6
2 <i>Microsporidium</i> sp. (KR263870)	0.000		84.8	82.9	81.8	78.9	80.3	78.2	77.7	77.5	77.6
3 <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (KX981865)	0.162	0.162		90.8	94.5	87.9	87.8	86.0	85.4	85.5	85.7
4 <i>Enterospora canceri</i> (HE584634)	0.171	0.171	0.092		90.0	87.1	84.4	83.5	83.7	83.5	82.3
5 <i>Enterospora nucleophile</i> (KF135645)	0.182	0.182	0.045	0.100		85.8	85.9	84.6	83.7	83.9	84.1
6 <i>Enterocytozoon bieneusi</i> (AF023245)	0.211	0.211	0.121	0.129	0.142		85.4	83.5	82.6	82.9	84.0
7 <i>Nucleospora salmonis</i> (AF185998)	0.197	0.197	0.122	0.156	0.141	0.146		96.7	91.2	91.2	92.8
8 <i>Nucleospora cyclopteri</i> (KC203457)	0.218	0.218	0.140	0.165	0.154	0.165	0.033		90.5	90.8	92.3
9 <i>Desmozoon lepeophtherii</i> (HM800847)	0.223	0.223	0.146	0.163	0.163	0.174	0.088	0.095		99.6	92.3
10 <i>Paranucleospora theridion</i> (KR187185)	0.225	0.225	0.145	0.165	0.161	0.171	0.088	0.092	0.004		92.4
11 <i>Obruspora papernae</i> (HG005137)	0.224	0.224	0.143	0.177	0.159	0.160	0.072	0.077	0.077	0.076	

表 2 已报道的肠孢虫属种类形态特征

Tab. 2 Taxonomic characters of *Enterospora* spp. reported previously

特征 Character	<i>Enterospora epinepheli</i> sp. n.	<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>	<i>Enterospora canceri</i>	<i>Enterospora nucleophila</i>
宿主	石斑鱼( <i>Epinephelus</i> sp.)	斑节对虾( <i>Penaeus monodon</i> )	黄道蟹( <i>Cancer pagurus</i> )	金头鲷( <i>Sparus aurata</i> )
寄生细胞	肠道杯状细胞(细胞核)	肝胰脏上皮细胞(细胞质)	肝胰脏上皮细胞(细胞核)	肠道棒状细胞(细胞核和细胞质)
界面联系方式	通过界面薄膜与细胞核分开	通过界面薄膜与细胞质分开	通过界面薄膜与细胞核分开	与细胞核直接接触
孢子形状	椭圆形	椭圆形	椭圆形	椭圆形
孢子大小(μm)	长: 1.56±0.31(1.07—1.96) 宽: 1.08±0.98(0.93—1.28)	长: 0.7 宽: 1.1	长: 1.3±0.02 宽: 0.7±0.01	长: 1.67 宽: 1.05
极丝圈数(排列列数)	5—6 (2)	5—6 (2)	4—5 (2)	5—6 (1)
单个细胞核/质内孢子数量	>60	>20	>100	≤13(细胞核); >40(细胞质)
极质体类型	两部分(薄膜状-薄膜状)	两部分(薄膜状-囊泡状)	两部分(薄膜状-囊泡状)	两部分(薄膜状-囊泡状)
孢壁厚度(nm)	外壁: 15.51±0.95(9.87—26.81) 内壁: 81.13±2.71(57.16—110.81)	外壁: 2 内壁: 10	外壁: 16.9±0.51 内壁: 14.8±0.65	外壁: 22.8±5.7 内壁: 44.5±10.6

者报道的金头鲷核肠孢虫与对虾肝胞虫形成姊妹枝。另外,有学者报道对虾肝胞虫与肠孢虫属模型种黄道蟹肠孢虫相似性较高(94%),认为应将虾肝肠孢虫划分到肠孢虫属中,并提出肠孢虫属应为一个单系群<sup>[18,19]</sup>。然而,在本研究中,石斑鱼肠孢虫处于Clade II的基部,不与该属其他种类形成姊妹枝,肠孢虫属枝系中还包含了毕氏肠孢虫,表明肠孢虫属应为并系类群。此外,寄生于细胞核内的微孢子虫都属于肠孢虫科,但核内寄生的肠孢虫科种类并没有单独聚为一支,而是与细胞质内寄生的种类(*E. hepatopenaei*、*Obruspora papernae*、*E. bienesi*)分散在整个肠孢虫科的两个支系中,表明细胞核和细胞质内寄生在肠孢虫科种类适应进化历程中出现多次,并交替出现。有趣的是,在其他微孢子虫科属中尚未发现细胞核内寄生种类。同时,细胞核内寄生对微孢子虫的生存、繁殖以及与宿主间互作关系等方面有怎样的影响,目前仍不清楚。但有研究表明,肠孢虫科的种类在基因组水平上丢失了糖酵解途径的大量基因,通过ATP转运体从宿主中转运能量和营养物质,说明肠孢虫科种类对宿主具有高度的依赖性<sup>[22]</sup>。从而导致虫体与宿主竞争营养成分以及能量物质,这可能是对虾肝肠孢虫、核肠孢虫以及石斑鱼肠孢虫寄生导致宿主出现生长速度慢、瘦身等症状的原因。

综上所述,本研究整合病理、各发育阶段超微结构及分子特征,鉴定了近年来暴发于我国中南沿海石斑鱼苗种肠道微孢子虫病的病原为一肠孢虫新种,命名为石斑鱼肠孢虫(*Enterospora epinepheli* sp. n.)。

#### 参考文献:

- [1] Stentiford G D, Feist S W, Stone D M, *et al.* Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems [J]. *Trends in Parasitology*, 2013, **29**(11): 567—578
- [2] Diamant A, Goren M, Yokes M B, *et al.* *Dasyatispora levantinae* gen. et sp. nov., a new microsporidian parasite from the common stingray *Dasyatis pastinaca* in the eastern Mediterranean [J]. *Diseases of Aquatic Organism*, 2010, **91**(2): 137—150
- [3] Lin H R. The establishment of grouper culture technology and the ideas for sustained development of grouper aquaculture industry [J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, **34**(1): 1—10 [林浩然. 石斑鱼鱼类养殖技术体系的创建和石斑鱼养殖产业持续发展的思考. 福建水产, 2012, **34**(1): 1—10]
- [4] Abdel-Ghaffar F, Abdel-Rahman B, Mehlhorn H, *et al.* Microsporidian parasites: a danger facing marine fishes of the Red sea [J]. *Parasitology Research*, 2011, **108**: 219—225
- [5] Azevedo C, Abdel-Baki A A S, Rocha S, *et al.* Ultrastructure and phylogeny of *Glugea Arabica* n. sp. (Microsporidia) infecting the marine fish *Epinephelus polyphkadion* from the Red sea [J]. *European Journal of Protistology*, 2016, **52**: 11—21
- [6] Wu H B, Wu Y S, Wu Z H. Occurrence of a new *Microsporidium* in the abdominal cavity of *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 150—154 [吴后波, 吴英松, 吴灶和. 微孢子虫一新种的描述及分子鉴定. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 150—154]
- [7] Xu L W, Liu X H, Zhang J Y, *et al.* Outbreak of enteric microsporidiosis of hatchery-bred juvenile groupers, *Epinephelus* spp., associated with a new intranuclear microsporidian in China [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, **40**(2): 183—189
- [8] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, **41**: 95—98
- [9] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4876—4882
- [10] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**: 1253—1256
- [11] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. *Systematic Biology*, 2010, **59**: 307—321
- [12] Ronquist F, Huelsenbeck J P. Mr Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**: 1572—1574
- [13] Page R D M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. *Computer Application in Biosciences: CABIOS*, 1996, **12**: 357—358
- [14] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725—2729
- [15] Weiss L M, Becnel J J. Microsporidia pathogens of opportunity [A]. In: Elizabeth S D (Eds.), *Mammalian Animal Model of Human Microsporidiosis* [C]. Wiley online. 2014, 327—340
- [16] Weiss L M, Becnel J J. Microsporidia pathogens of opportunity [A]. In: Stentiford G D, Dunn A M (Eds.), *Microsporidia in Aquatic Invertebrates* [C]. Wiley online. 2014, 579—604
- [17] Palenzuela O, Redondo M J, Cali A, *et al.* A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophile* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of family Enterocytozoonidae [J]. *International Journal of Parasitology*, 2014,

- 44: 189—203
- [18] Stentiford G D, Bateman K S, Longshaw M, *et al.* *Enterosporea canceri* n. gen., n. sp., intranuclear within the hepatopancreatocytes of European edible crab *Cancer pagurus* [J]. *Diseases of Aquatic Organism*, 2007, **75**: 61—72
- [19] Bojko J, Clark F, Bass D, *et al.* *Parahepatosporea carcini* n. gen., n. sp., a parasite of invasive *Carcinus maenas* with intermediate features of sporogony between the *Enterocytozoon* clade and other microsporidia [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, **143**: 124—134
- [20] Stentiford G D, Bateman K S, Dubuffet A, *et al.* *Hepatospora eriocheir* (Wang and Chen 2007) gen. et comb. Nov. infecting invasive Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in Europe [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, **108**: 156—166
- [21] Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford G D, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationship [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, **102**: 21—29
- [22] Boakye D W, Jarpenlak P, Prachumwat A, *et al.* Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within *Enterocytozoonidae* microsporidia [J]. *Environmental Microbiology*, 2017, **19**(5): 2077—2089

## THE TAXONOMIC POSITION OF CAUSATIVE AGENT OF ENTERIC MICROSPORIDIOSIS OF HATCHERY-BRED JUVENILE GROUPEL, *EPINEPHELUS* SPP., CULTURED IN THE AREA OFF COAST OF SOUTH CHINA SEA

YAN Yuan-Yi<sup>1</sup>, LIU Xin-Hua<sup>2,3</sup>, XU Li-Wen<sup>4</sup> and ZHANG Jin-Yong<sup>2,3</sup>

(1. Centers of Disease Control and Prevention of Aquatic Animals of Guangdong Province, Guangzhou, 511453, China; 2. Huai'an Research Center, Key Laboratory of Aquaculture Diseases Control, Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. South China Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** The enteric microsporidiosis of hatchery-bred juvenile grouper, *Epinephelus* spp., is the most important in the mariculture area off coast of South China Sea in recent years, however, the taxonomy of the causative agent remains unknown. In this study, histopathological, ultrastructural and molecular evidences were provided to identify the aetiological agent, designated herein as *Enterosporea epinepheli* sp. n.. The intranuclear development of the present species was consistent with *Enterosporea canceri*, the type species of *Enterosporea* genus. The early stages of uninucleate meronts were observed within the infected nuclei, separating from the host nucleus by a simple electron dense membrane. Later, the uninucleate meronts transformed into multinucleate plasmodia (merogonial plasmodia). At this stage, the infected nuclei were hypertrophic, or even ruptured by the multinucleate plasmodia. Sporogonial plasmodia were characterized by the appearance of multiple, small, spherical, membrane-bound vesicles. Then, multiple copies of these membrane-bound vesicles developed into the precursors of the polar filament and anchoring disk of mature spore which surrounded the diplokaryotic nuclei. With the development, sporoblasts separated from the plasmodia by successive division and direct development to mature spores. Mature spores were oval, in direct contact with host nucleus. Spores measured  $1.56 \pm 0.31$  ( $1.07$ — $1.96$ )  $\mu\text{m}$  in length and  $1.08 \pm 0.98$  ( $0.93$ — $1.28$ )  $\mu\text{m}$  in width. The spore walls were trilaminar, including an electron dense exospore coat [ $15.51 \pm 0.95$  nm ( $9.87$ — $26.18$  nm) thick], surrounding a thick electron lucent endospore [ $81.13 \pm 2.71$  nm ( $57.16$ — $110.81$  nm) thick] and the plasma membrane. The polar filaments were isofilar, coiled with 5—6 turns in two rows. Histopathological analysis clearly revealed that the spores located in the nucleus of goblet cell of the intestinal epithelial and a large amount of spores appeared in the intestinal contents with the shedding necrotic infected enterocytes. Molecular analysis indicated that genetic distances of *Enterosporea epinepheli* sp. n. from the species of Enterocytozoonidae ranged from 0.162 to 0.225 which was generally out of intraspecies variation. Phylogenetic analysis revealed that the species of Enterocytozoonidae could separate into Clade I and Clade II, and *Enterosporea epinepheli* sp. n. was an independent lineage, clustering with *Enterosporea hepatopenaei*, *E. nucleophilia*, *E. canceri* and *Enterocytozoon bieneusi* within the Clade II.

**Key words:** Emaciation disease; Enteric microsporidiosis; Grouper; Enterocytozoonidae; White faeces syndrome