

杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析

王江勇¹, 孙秀秀^{1,2}, 王瑞旋¹, 苏友禄¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 华南农业大学, 广东 广州 510642)

摘要: 近几年中国南方杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve) 养殖场频繁爆发严重的肌肉萎缩症, 该病能感染各种规格杂色鲍, 死亡率很高。病鲍症状主要表现为外套膜和内脏团萎缩、无生气, 附着力下降, 最终死亡。该试验从病鲍组织分离到1株优势菌WS, 人工感染试验证实其对健康杂色鲍有很强致病性, 且与自然发病的杂色鲍症状相同。对菌株WS进行形态学观察和生理生化检测, 结果显示与哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 最为接近。为了进一步确定其分类地位, 采用1对通用引物扩增其16S rDNA序列片段进行序列分析和同源性对比, 构建系统发育树, 结果表明, 菌株WS与弧菌属的 *V. harveyi* [AY750577] 聚为1个分支, 且同源性达99.70%。综合上述3种鉴定结果, 确定该菌为哈维氏弧菌。

关键词: 杂色鲍; 肌肉萎缩症; 哈维氏弧菌; 生理生化; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号: S 944.4; S 941

文献标志码: A

文章编号: 1673-2227-(2010)05-0021-06

Isolation, identification and phylogenetic analysis of pathogen from *Haliotis diversicolor* Reeve with withering syndrome

WANG Jiangyong¹, SUN Xiuxiu^{1,2}, WANG Ruixuan¹, SU Youlu¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In recent years, there have often been serious withering syndrome in many breeding farms of *Haliotis diversicolor* Reeve in South China. It is infectious to all sizes of abalones with high mortality. The symptoms of sick abalones are: mantle and visceral mass shrink and become lethargic, weak in adhesion and finally die. A bacterial strain WS was isolated from the tissues of cultured *H. diversicolor* with withering syndrome. Artificial infection test proves that it has strong pathogenicity to healthy *H. diversicolor* and has symptoms similar to those which get sick spontaneously. We carried out a morphological observation and a test on the physiological and biochemical characteristics of strain WS, which indicates that it is most similar to *Vibrio harveyi*. In order to define its phylogenetic position, we sequenced, analyzed and compared the 16S rDNA genes whose partial fragments were amplified by a pair of universal primers, and finally constructed a molecular phylogenetic dendrogram based on the genetic distance. The result shows that strain WS and *V. harveyi* [AY750577] group into one cluster, with a 99.70% homology. According to morphological, physiological, biochemical and phylogenetic analyses, strain WS is proved to be *V. harveyi*.

Key words: *Haliotis diversicolor* Reeve; withering syndrome; *Vibrio harveyi*; physiological and biochemical characteristics; 16S rDNA; phylogenetic analysis

收稿日期: 2010-03-17; 修回日期: 2010-05-04

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycyt47); 广东省科技推广项目 (2006B40101003); 广东省重大科技兴海项目 (A2008899E01); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (中国水产科学研究院南海水产研究所) 资助项目 (2007ZD09)

作者简介: 王江勇 (1971-), 男, 研究员, 从事渔业生物病害防治研究。E-mail: wjy104@163.com

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve), 又称九孔鲍、珍珠鲍等, 是一种热带和亚热带暖水性小型鲍, 在中国主要分布于东南沿海省市。中国杂色鲍养殖历史较短, 20 世纪 90 年代开始大规模工厂化养殖并迅速发展, 成为中国南方海水养殖主要经济品种之一^[1]。随着鲍高密度立体养殖模式的推广和生态环境的日益恶化, 其病害也接踵而至, 并呈现逐年加重的趋势, 严重威胁中国鲍鱼养殖业的发展^[2-4]。近年来, 中国南方杂色鲍养殖场陆续出现一种名为“肌肉萎缩症”的疾病, 据笔者调查, 该病发生于高温季节, 幼鲍及成鲍均可发病, 在感染的 1~2 个月内, 养殖场杂色鲍死亡率达 80% 以上。症状主要表现为足部肌肉异常消瘦, 颜色加深, 部分腹足变得僵硬, 内脏团和外套膜萎缩, 反应较为迟钝, 触角伸向壳内, 用手轻触即从养殖笼内壁脱落; 与正常相同日龄的杂色鲍相比, 鲍软体部分与壳长比例严重失调; 濒死鲍脱落于养殖笼底部, 足肌朝上, 但无明显病灶。为了弄清该病的病因, 笔者对广东深圳多家患肌肉萎缩症的杂色鲍养殖场进行现场考察, 并从病鲍组织分离到 1 株优势菌, 经人工回归感染试验证实其具有很强的致病性, 对该菌株进行形态学观察和常规的生理生化检测, 通过测定 16S rDNA 序列构建系统发育树。

1 材料与方法

1.1 材料来源

自然发病的杂色鲍取自广东深圳某杂色鲍养殖场, 用于病原分离; 健康杂色鲍采自另一家鲍养殖场, 暂养于玻璃缸供人工回归感染试验用。细菌分离用 Zobell 2216E 培养基 (酵母膏 1 g, 蛋白胨 5 g, 磷酸铁 0.1 g, 氯化钠 30 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.6~7.8, 琼脂 20 g); 细菌微量生化鉴定管购自广东环凯生物科技有限公司; 16S rDNA 扩增通用引物由上海英俊生物技术有限公司合成; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒为 TIANGEN 产品; *Taq* DNA 聚合酶及 PMD18-T 载体等为 TaKaRa 产品。

1.2 病鲍解剖观察和病原分离

取不同病程的患肌肉萎缩症杂色鲍, 取体表粘液、鳃、肝胰腺和消化道等组织制成水浸片, 置于光学显微镜下观察寄生虫和细菌等微生物的情况; 将腹足、外套膜、肝胰腺、鳃和消化道加入液氮碾磨后, 经梯度离心后制成负染样品, 电镜检查有无

病毒; 在无菌条件下取上述病鲍组织, 碾磨成浆, 灭菌海水梯度稀释后, 涂抹 ZoBell 2216E 平板, 28 ℃ 培养 48 h, 把形态特征一致的优势菌落重复划线纯化, 直至获得 1 株纯培养菌 (编号 WS), 接种于斜面培养待用。

1.3 人工感染试验

菌株 WS 经纯化培养, 挑取单菌落接种至 DoBell 2216E 液体培养基, 28 ℃ 生化培养箱振荡培养 24 h, 离心后采用活菌平板计数和比浊法, 利用过滤海水将活菌浓度调至 2.5×10^6 cfu·mL⁻¹。试验共分 3 组, 每组 20 只健康杂色鲍, 放入预先由患病杂色鲍体内分离到的优势菌株 WS 制备的 2.0×10^6 cfu·mL⁻¹ 菌液中浸泡养殖, 同时设平行组, 每日更换新鲜海水并添加菌液, 以保持养殖水体中菌体浓度, 并设不加菌对照组。感染期间不投喂饲料, 全天候充气, 水温控制在 (25 ± 1) ℃, 盐度 25~30, 时间 2 周。每天记录鲍鱼的发病情况和死亡数量, 若有濒死鲍, 则进行病原菌再分离, 并挑选与原感染病原菌一致的菌株进行再感染试验。

1.4 病原菌形态学观察和生理生化特征检测

将优势菌株 WS 划线接种于 TCBS 平板培养基, 28 ℃ 培养 24 h 观察生长情况和菌落形态, 同时进行革兰氏染色和电镜负染, 观察菌体形态特征, 其他各项生理生化指标的测定参照文献 [5] 进行。

1.5 病原菌 16S rDNA 序列测定和分析

1.5.1 PCR 模板的制备 按照 TIANGEN 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行总 DNA 制备, 并取 DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳检查制备的 DNA 完整性, 若符合要求置于 -20 ℃ 保存备用。

1.5.2 16S rDNA 序列扩增、克隆及测序 用于 16S rDNA 扩增的通用引物, 其正向引物 8F: 5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 第 8~27 个碱基位置), 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rDNA 的第 1492~1510 个碱基位置)^[6]。24 μL PCR 反应体系中: 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL; MgCl₂ 1.5 mmol·L⁻¹; 4 × dNTP 混合物各 200 μmol·L⁻¹; 引物各 10 μmol·L⁻¹; *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL (2.5 U·μL⁻¹) 和 DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s; 52 ℃ 复性 40 s;

70 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 70 ℃ 温育 10 min。琼脂糖凝胶电泳获得特异性条带, 凝胶产物回收后经进一步 PCR 验证与 pMD18-T 载体连接, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞进行培养, 经蓝白斑筛选, 挑取若干白色菌落至液体培养基过夜培养, 提取重组质粒, 酶切和 PCR 验证后, 产物交由上海英俊生物技术公司进行纯化和测序。

1.5.3 序列分析和系统发育树构建 将获得的 16S rDNA 基因序列提交到 GenBank 核苷酸序列数据库进行同源序列检索, 选取同源性较高的已知菌株, 调出其 16S rDNA 基因序列, 用 DNASTAR 软件进行多序列对比和系统发育树构建。

2 结果

2.1 病鲍解剖观察和病原分离结果

病鲍各组织的水浸片显微观察结果显示, 大多数病鲍鳃、消化道和肝胰腺组织处有活动的短杆状细菌存在, 另外除发现少量纤毛虫和车轮虫外, 未见其他微生物存在。多次电镜负染结果均未发现病毒粒子。利用平板涂抹法从病鲍组织分离到 1 株优势菌株, 经多次纯化后接种于斜面保存, 并利用优势菌株 WS 进行人工感染试验。

2.2 人工感染试验

WS 菌液浸泡感染期间, 杂色鲍从第 5 天开始出现发病症状, 表现为运动缓慢, 反应迟钝, 附着力下降, 腹足和外套膜萎缩, 内脏团收缩, 养殖水也变得较为混浊; 第 7 天开始部分鲍鱼从水族箱内壁脱落, 腹足朝上, 最终死亡。后期死亡的杂色鲍萎缩症状非常明显, 与自然发病症状相似, 对照组无发病和死亡情况。从濒死鲍体内分离到菌株 WSA 和再感染分离到菌株 WSA1, 其菌落和菌体形态均与从自然发病杂色鲍体内分离到的菌株 WS 一致, 充分证明菌株 WS 为此次南方杂色鲍肌肉萎缩症的病原菌 (浸泡感染试验结果见图 1)。

2.3 菌形态特征和理化特性

菌株 WS 在 TCBS 培养基上生长良好, 菌落呈绿色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 稍隆起; 革兰氏染色阴性, 短杆状, 稍弯曲; 电镜负染极生单鞭毛 (图 2)。各项生理生化反应结果见表 1。

2.4 16S rDNA 序列测定和系统发育树构建

DNA 模板经 16S rDNA 通用引物扩增, 琼脂糖凝胶电泳得到约 1 500 bp 条带 (图 3), PCR 产物凝

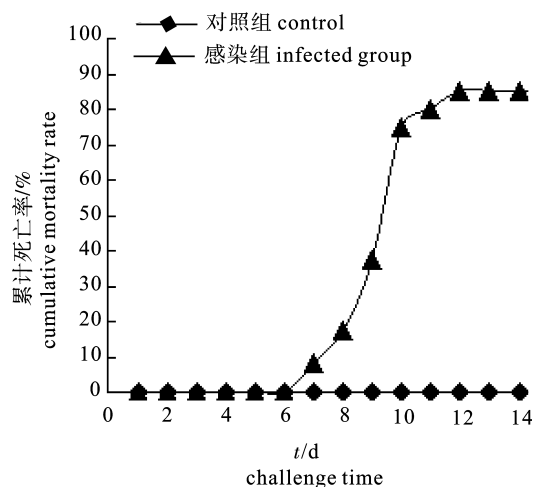


图 1 WS 浸泡感染试验结果

Fig. 1 Immersion infection test of WS

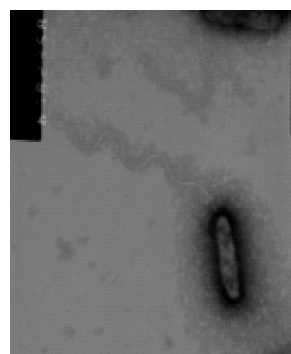


图 2 菌株 WS 电镜照片 (×10 000)

Fig. 2 Electron micrograph of bacterial strain WS (×10 000)

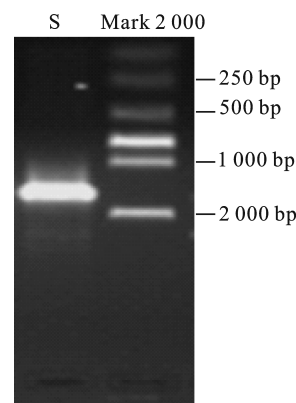


图 3 16S rDNA 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 3 PCR amplified product of 16S rDNA

胶回收纯化后经载体连接、转化后扩增培养, 提取重组质粒, 阳性克隆双酶切后电泳得到 2 条带 (图 4)。

表 1 菌株 WS 的生理生化特性与哈维氏弧菌标准菌株 ATCC14126^[7] 比较Tab. 1 Comparison of physiological and biochemical characteristics between WS and *V. harveyi* ATCC14126

鉴定项目 test items	WS	<i>V. harveyi</i> ATCC14126	鉴定项目 test items	WS	<i>V. harveyi</i> ATCC14126
革兰氏染色 gram stain	(	(	明胶酶 gelatinase	(	+
运动性 motility	+	+	尿素酶 urease	(	(
氧化酶 oxidase	+	+	淀粉酶 amylase	(	+
接触酶 catalase	+	+	脂酶 lipase	+	+
O/129 (150 μg)	s	s	几丁质酶 chitinase	+	+
发光 luminescence	(	(	H ₂ S	(	(
TCBS 生长 growth on TCBS	g	g	V-P test	(	(
色素产生 pigmentation	(	(	水杨素 salicin	(	(
0% NaCl 生长 growth at 0% NaCl	(	(	吲哚 indole	(	(
3% NaCl 生长 growth at 3% NaCl	+	+	柠檬酸盐 citrate	+	+
6% NaCl 生长 growth at 6% NaCl	+	+	肌醇 inosito	(	(
8% NaCl 生长 growth at 8% NaCl	+	+	纤维二糖 cellobio	(	+
10% NaCl 生长 growth at 10% NaCl	(	(	阿拉伯糖 arabinose	(	(
4 ℃ 生长 growth at 4 ℃	(	(	木糖 xylos	(	(
30 ℃ 生长 growth at 30 ℃	+	+	蔗糖 saccharose	(	(
35 ℃ 生长 growth at 35 ℃	+	+	乙醇 ethanol	(	(
42 ℃ 生长 growth at 40 ℃	(	(	葡萄糖 glucose	+	+
β-半乳糖苷 β-galactosid	+	+	甘露糖 mannose	+	+
葡萄糖产气 gas from glucose	(	(	甘露醇 mannitol	+	+
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	+	乳糖 lactose	(	(
赖氨酸脱羧酶 lyadecarboxylaes	+	+	蜜二糖 melibiose	(	(
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	(	+	鼠李糖 rhamnose	(	(
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	(	(	山梨糖 sorbitol	(	(
色氨酸脱氨酶 tryptophane deaminase	(	(	半乳糖 galactose	(	+

注：+，阳性；（，阴性；S，敏感；G，绿色

Note: +, positive; (, negative; S, sensitive; G, green

挑取阳性克隆经双向测序得到的 16S rDNA 片段长度为 1 548 bp，登陆 GenBank 数据库进行同源性检索，登陆序号为 lc112069，结果与弧菌属细菌的 16S rDNA 基因序列自然聚类。在相近的 100 个检索结果中，弧菌占 89%。从中选取同源性较高的弧菌属菌株，从 GenBank 下载其 16S rDNA 序列，用 DNASTar 软件构建系统树（图 5）。结果表明该菌与 *V. harveyi* [AY750577] 聚为 1 个分支，其相似性达 99.70%，结合形态学和生理生化特征

鉴定其为哈维氏弧菌（*Vibrio harveyi*）。

3 讨论

笔者对多家患肌肉萎缩症的杂色鲍养殖场进行现场调查发现，杂色鲍发病期间养殖海水的温度、盐度、pH、溶解氧和氨氮（NH₃-N）等各种理化因子与以往养殖周年相比较，均未出现异常变化，重金属含量检测也未超出水质检测标准，因此，基本可以排除非生物因素作为杂色鲍发病主要病因的

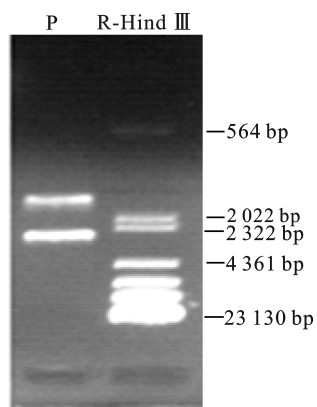


图4 重组质粒双酶切验证

P. 酶切质粒

Fig. 4 Restriction digestion identification of recombinant plasmid

P. Plasmid of restriction digestion

可能。中国南方杂色鲍肌肉萎缩症爆发期为每年的8~9月,此时期养殖水温较高,哈维氏弧菌代谢旺盛、生长迅速^[8],粘附作用相关基因的表达能力和毒力基因表达产物的活性随之增强^[9],加之现今的高密度立体养殖模式导致鲍抵抗力减弱,当水中致病菌含量达到一定值时便可能引起鲍鱼发病。BEVERLY等^[10]认为升高水温能显著加速鲍肌

肉萎缩症的进程, 而环境因素不会直接引起鮑发病, 而厄尔尼诺现象、不合理的饲养管理和环境的污染也可加速肌肉萎缩症进程, 由此可见, 环境因素对杂色鮑肌肉萎缩症的发生起外在诱导作用。

2005年5月,中国北方养殖的皱纹盘鲍(*H. discus hannai* Ino)发生肌肉萎缩症,造成大规模死亡^[11]。近几年来,中国南方杂色鲍养殖场陆续爆发肌肉萎缩症,死亡率很高,许多养殖场面临关闭的困境,给鲍养殖业造成巨大经济损失。笔者对患病杂色鲍进行解剖观察,并从体内分离到1株优势菌WS,首先对菌株WS进行形态学观察和生理生化测定,与哈维氏弧菌标准菌株做比较,结果在是否发光、尿氨酸脱羧酶、淀粉酶、明胶酶、纤维二糖和半乳糖等几个方面存在差异,无法鉴定到种。目前,PCR技术广泛应用于水产动物细菌性病原鉴定,16S rDNA分子量适中,具有普遍性、保守性和相对可变性等特点,序列变化与进化距离相适应,序列分析的重复性极高,在细菌分子鉴定中应用普遍^[12-13]。因此,对菌株WS的16S rDNA进行PCR扩增、克隆和测序,与相似菌株的16S rDNA序列进行同源性比较和分析,并构建系统发育树,结果与*V. harveyi* [AY750577]聚为1个分支,且同源性达99.70%,最终将该菌株鉴定为哈

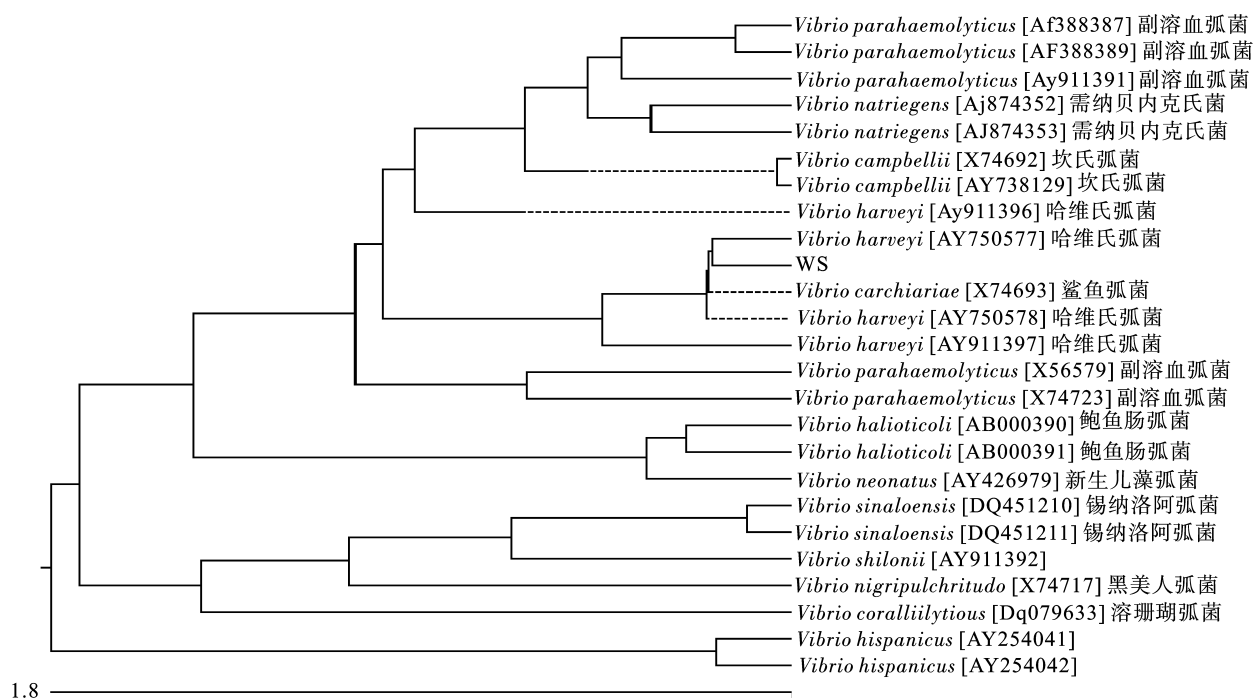


图5 以16S rDNA基因构建的弧菌系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *V. harveyi* based on 16S rDNA

维氏弧菌。

哈维氏弧菌广泛分布于自然海水环境和养殖海水环境,并以养殖环境的数量居多,是海水养殖动物的重要致病原^[14],由于可遗传的毒力因子不同,哈维氏弧菌不同菌株间的致病力存在很大差异^[15]。THOMPSON 等^[16]研究证实,哈维氏弧菌在暖水季节数量尤为丰富,通过入侵机体引起生理机能发生紊乱导致生物体发病。对杂色鲍肌肉萎缩症进行病理学研究时发现,病鲍的肝胰腺、鳃和肠道均呈现不同程度的病变,这使鲍正常的消化、吸收和呼吸等生理功能受到障碍,新陈代谢能力减弱,最终死亡^[17]。在国外,哈维氏弧菌曾引起日本一家皱纹盘鲍养殖场大规模发病,鲍发病前除摄食量减少外,无其他征兆,该病集中发生在每年的8、9月,水温低于20℃时不会发生^[18]。另有报道哈维氏弧菌引起法国自然海域欧洲鲍(*H. tuberculata*)大量死亡^[19]。到目前为止,国内未见哈维氏弧菌引起鲍发病的相关报道,此次从患肌肉萎缩症杂色鲍组织分离到哈维氏弧菌,并通过人工感染试验证实其对健康鲍具有很强致病性,在国内尚属首例,说明哈维氏弧菌对中国鲍养殖业具有潜在危害性,应引起相关部门和水产养殖业的重视。

参考文献:

- [1] 苏天凤. 杂色鲍与九孔鲍种质资源研究进展 [J]. 南方水产, 2006, 2 (2): 8-12.
- [2] 李太武, 丁明进, 相建海, 等. 皱纹盘鲍对河流弧菌-II 苗免疫的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1997, 28 (1): 27-32.
- [3] FRIEDMAN C S, GRINDLEY R, KEOGH J A. Isolation of a fungus from shell lesions of New Zealand abalone, *Haliotis iris* Martyn and *H. australis* Gmelin [J]. Mollus Res, 1997, 18: 313-324.
- [4] WANG Jiangyong, GUO Zhixun, FENG Juan, et al. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong province, China [J]. J Shellfish Res, 2004, 23 (4): 1163-1168.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
- [6] POILZ M F, CAVANAUGH C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (10): 3724-3730.
- [7] LIU P C, LEE K K, YIH K C, et al. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Curr Microbiol, 1996, 33 (2): 129-133.
- [8] LOPEZ L M, TYLER P A, VIANA M T. The effect of temperature and artificial diets on growth rates of juvenile *Haliotis tuberculata* [J]. J Shellfish Res, 1998, 17 (3): 657-662.
- [9] GOARANT C, HERLIN J, BRIZARD R, et al. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp [J]. Dis Aquat Org, 2000, 40 (2): 101-107.
- [10] BEVERLY A B, JAMES D M, THEA T R. Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply, and exposure to the agent of withering syndrome [J]. Invertebr Pathol, 2005, 89 (3): 219-231.
- [11] 于金海, 王品虹, 李春艳, 等. 皱纹盘鲍“足萎缩症”幼鲍超微结构研究 [J]. 海洋环境科学, 2007, 26 (5): 461-465.
- [12] YOSHIVUKI Y, YOSHIKO K, HISATSUGU W. Phylogenetic intrarelationships of a typical *Aeromonas salmonicida* isolated in Japan as determined by 16S rDNA sequencing [J]. Fish Pathol, 2000, 35 (1): 35-40.
- [13] GAUGER E G, GOMEZ C M. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae* [J]. Dis Aquat Org, 2002, 52 (1): 39-46.
- [14] 陈吉祥, 杨慧, 杨显辉, 等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测 [J]. 中国水产科学, 2005, 12 (5): 580-587.
- [15] MONTERO A B, AUSTIN B. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne) [J]. J Fish Dis, 1999, 22 (5): 377-386.
- [16] THOMPSON J R, RANDA L A, MARCELINO A, et al. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 4103-4110.
- [17] 孙秀秀, 苏友禄, 冯娟, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症的组织病理学研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (3): 1098-1101.
- [18] NISHIMORI E, HASEGAWA O, NUMATA T, et al. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supertexta* [J]. Fish Pathol, 1998, 33 (4): 495-502.
- [19] NICHOLAS J L, BASUYAUX O, MAZURIE J, et al. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata* [J]. Dis Aquat Org, 2002, 50 (1): 35-43.