

海产贝类尼氏单孢子虫病害的研究进展

王中卫¹ 梁玉波² 梁斌² 吕昕¹

(1 大连水产学院 辽宁大连 116023; 2 国家海洋环境监测中心 辽宁大连 116023)

摘要:日前,我国形成规模养殖的经济贝类有近 20 种,贝类增养殖已经成为沿海海水养殖业的支柱产业。资料显示,2004 年全国海水贝类产量为 1024 万吨,占海水养殖总产量的 77.82%。但是目前,由于气候变化、海洋环境污染、外来生物入侵等因素导致我国海产贝类病害越来越重,寄生虫就是主要病原之一,其中尼氏单孢子虫就是其中的一种原生动物寄生虫,寄生于很多种海产贝类体内。这种病害在很多地区都有暴发,国外对其研究较多,国内梁玉波等对这一病害进行了研究。因此,系统阐述国外贝类尼氏单孢子虫病害的研究现状与进展,对我国海产贝类病害的研究具有现实意义。本文对尼氏单孢子虫的分类、病害的流行情况、尼氏单孢子虫的形态学,病害的主要症状,尼氏单孢子虫的检测方法,尼氏单孢子虫与寄主之间的交互作用,环境因素对病害流行的影响等方面进行了论述,为我国贝类病害的研究和防治提供参考。

关键词:海产贝类;尼氏单孢子虫;病害

中图分类号:S944.3 **文献标识码:**A

Progress of Studies on Haplosporidium Nelsoni Disease of Marine Mollusks

WANG Zhong-wei¹, LIANG Yu-bo², LIANG Bin², LV Xin¹,

(1 Dalian Fishery University, Dalian, Liaoning 116023;

2 National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian, Liaoning 116023, China)

ABSTRACT: At present, there are nearly 20 species of shellfish which has been formed a certain scale, and shellfish aquaculture industry has become an important industry in coastal aquaculture in China. Some information showed that the yield of marine mollusk was 10.24 million tons, seawater aquaculture output accounted for 77.82% in 2004. Now shellfish diseases in China are getting more and more serious due to climate change, pollution of the marine environment, the invasion of foreign species and other factors, and parasites were the most important pathogen. Haplosporidium nelsoni was a protozoan which was found in many marine mollusks. Haplosporidium nelsoni was found in some overseas countries and many scholars attached importance to it. Liang Yu-bo et al were researching it in China. Therefore, systemic review of Haplosporidium nelsoni researched progress oversea was very helpful to the shellfish disease studies in China. Haplosporidiosis was introduced in detail, including taxonomy of Haplosporidium nelsoni, history of disease outbreaks, morphology, primary symptom of disease, detection assays of Haplosporidium nelsoni, in vitro interactions between hemocytes and Haplosporidium nelsoni, environmental effects of disease prevalence. The basic references were provided for the mollusk diseases research and prevention in China.

Key words: Marine mollusks; Haplosporidium nelsoni; Disease

前言

尼氏单孢子虫病是由一种原生动物 - 单孢子虫门的尼氏单孢子虫(Haplosporidium nelsoni, MSX)感染无脊椎动物导致的疾病,主要感染贝类的结缔组织、鳃和消化腺上皮细胞,严重影响寄主的能量代谢,降低生化能量的储备,影响摄食和生殖能力。单孢子虫门包括很多体内寄生虫,其中主要是来自于海产无脊椎动物^[1],而有些寄生虫是在淡水的无脊椎动物中发现的。日前在这一门中已经有 36 个已经确定的种类,还有一些寄生虫是在其它无脊椎动物中发现的,已经报道了但是还没有确定,其中有几个种类与重要经济贝类的死亡有关系。日前研究发现,尼氏单孢子虫主要是牡蛎的一大病原,主要感染北美的美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* 和日本、韩国、北美及法国的太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*。

1 尼氏单孢子虫的分类地位

自从 19 世纪初后期第一次发现这一种类以来,单孢子虫在分类学和系统发生方面很难进行分类,曾经有很多观点认为其应该被划分为原生动物。早期的学者将其划分为原生动物门、孢子虫纲、单孢子虫目。随着 20 世纪 50 年代的电子显微镜检测方法的诞生,以及近几年发展起来的分子系统发生分析方法进一步证明,单孢子虫在分类上是单源的,并且认定其与原生动物门处于并列的分类地位,也就是单孢子虫单独作为一个门 - 单孢子虫门^[2],包括 3 个属: *Urosporidium*, *Haplosporidium*, *Minchinia*, 其中尼氏单孢子虫就属于单孢子虫属(*Haplosporidium*)。

2 病害的流行情况

MSX 发病季节主要为 5 月中旬到 9 月份,发病时的盐度为 15~35‰,但大多数为 20~25‰。在非流行季节中,此病的潜伏期很长,一般为几个月,最长达 9 个月,6~7 月份牡蛎的发病明显,一般从 8 月份开始死亡,9 月份死亡达高峰。但有时在冬末,瘦弱的牡蛎的死亡也可达到高峰,感染率有的地方可

作者简介:王中卫,(1980-),男,硕士研究生,

研究方向:海产贝类寄生虫病害

通讯作者:梁玉波, E-mail: yblian@nmemc.gov.cn

(收稿日期:2006-09-17 接受日期:2006-10-26)

达 30%~60%。死亡率在低盐度区一般为 50%~70%,在高盐度区则为 90%~95%。

近几十年来,在国外很多地区都曾爆发过 MSX 病害,如 1957 年春季,位于美国新泽西州的特拉华湾的东部牡蛎首次爆发了 MSX 疾病^[1];1965 年出现在纽约长岛南部海滨的大南湾^[1],1967 年出现于马萨诸塞州的科德海角北部的维弗利海湾^[1];1980 年 MSX 的分布已经遍及美国整个东部沿岸,从缅因州到佛罗里达州都有出现^[6-8];在这期间,最严重的一次爆发性流行是在纽约的长岛北部海滨的牡蛎湾和马萨诸塞州南部^[1];1990 年以后的 10 多年里,在切萨皮克湾 MSX 和帕金虫不断传播,使大量牡蛎受到感染并导致了严重的死亡^[10]。

3 尼氏单孢子虫的形态学

尼氏单孢子虫的孢子是呈卵形,长度为 6~10 微米,一端具盖,盖的边缘延伸到孢子壁之外。在病牡蛎的各种内部组织中,都有尼氏单孢子虫的多核质体。多核质体的大小很不一致,一般为 4~25 微米,最大的可达 50 微米,有数个至许多核。核内有 1 个偏心的核内体^[11]。虽然国外对尼氏单孢子虫的研究已经有几十年了,但是对其生活史还不是很清楚,研究人员怀疑可能有中间寄主的存在^[12]。

4 病害的主要症状

尼氏单孢子虫感染牡蛎后,牡蛎的病灶组织会发生变化,主要表现为:病牡蛎肌肉消瘦,外套膜萎缩,肉色暗淡有裂口,有时在鳃和外套膜上有红紫色斑点。严重时病牡蛎全身组织都受感染,细胞萎缩,组织坏死,含有大量的孢子,组织中有白细胞状细胞浸润,组织水肿。肝小管中因充满大量的成熟孢子而呈微白色,色素细胞增加,最终导致生长停止,在环境条件较差时则引起死亡^[13]。

被尼氏单孢子虫感染后,外部的贝壳也会有些明显的变化,主要表现为:牡蛎贝壳内部有很多污垢,外套膜退化;在贝壳珍珠层表面形成黄褐色贝壳硬蛋白沉积物(贝壳浓疱),含有乳白色的液体;在闭壳肌附近经常出现水泡(贝壳水泡),水泡内含有泥和海水;才女虫(Polydora sp.)通过外面的两个孔在贝壳内表面做一个 U 型的泥管,不久贝壳硬蛋白就会堆积形成水泡;穿贝海绵(Cliona sp.)在贝壳表面形成圆形小洞,在小洞对面形成黑色脓疱;在牡蛎卵附近形成绿色坚硬的胶囊物,在贝壳上造成均匀的小洞;机体某一部分分泌过量的钙石灰化,

形成石灰质畸形^[14]。

5 尼氏单孢子虫的检测方法

目前,贝类体内尼氏单孢子虫的检测的方法有贝类软体体表观察、涂片、压片、组织切片、电镜观察、病原生物培养、免疫检测、DNA 探针等。近些年来发展起来的多克隆和单克隆免疫检测技术,以及 DNA 探针检测技术,已在尼氏单孢子虫检测方面得到了广泛的应用^[15-21]。以下针对牡蛎体内尼氏单孢子虫的检测介绍了几种方法:

5.1 通过抽取牡蛎血淋巴来检测 MSX 的方法

在收集血淋巴之前,将牡蛎置于温度为 12-14℃,盐度为 18-20ppt 的循环海水中暂养 1-2 天。取出后将牡蛎的贝壳凿个缺口,用含有 1ml 结核菌素的注射器从牡蛎内收肌肉凹处吸取血淋巴^[23,24]。用等渗透压的海水(19ppt),将血淋巴稀释到 1.0ml,放入一个塑料瓶中,封口。放置 20-30min 后用 200 倍显微镜观察,记录寄生虫的数量。在观察完新鲜的样品之后,倒出浮在表面的一层,将细胞从瓶中移出,放在 3%的戊二醛或 Davidson's 中固定 5 分钟,然后用 Wright's 染色,在镜下观察。通过抽取牡蛎血淋巴来诊断 MSX 的方法,和组织学方法一样,可以作为检测 MSX 的一种有效方法。

5.2 牡蛎体内 MSX 的浓缩方法

牡蛎体内 MSX 的浓缩方法^[25],可以从被感染牡蛎的血淋巴中的 MSX 分离并纯化,是对最原始的分离 T 和 B 淋巴细胞的浓缩技术的改进^[26]。此法充分考虑了血细胞比 MSX 原生质体更容易黏附于培养皿的特点,粒状血细胞在前两次浓缩之后就被留在培养皿上,而 MSX 的原生质体由于不具有黏附作用而被转移出来(图 1)。这样得到的浓缩 MSX 的原生质体可以用来研究寄生虫和牡蛎血细胞在体外的互相影响,并且可以作为浓缩寄生虫抗原和提取 DNA 的样品来源。这种浓缩方法仅仅需要很少量的药品和简单设备就能够检测,因此在大多数实验室都可以进行,是一种很有效的方法。

5.3 MSX 的组织学检测

按照常规的组织学检测程序,横向切开牡蛎内脏团,包括外套膜、鳃、消化腺,然后将样品放在 Davidson's 中固定,固定剂的量是组织量的十倍。这个经过处理的切片可以用组织学程序观察。MSX 可以用较常用的染料染色,象苏木精和曙红等。图 2 为美洲牡蛎的组织切片图,箭头所示为原生质体,可以清楚地看到原生质体里面有多个核子。

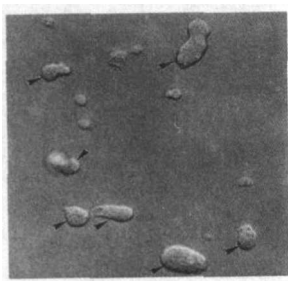


图 1 牡蛎血淋巴中的 MSX 原生质体

Fig.1 MSX Plasmodia in Hemolymph of Oysters

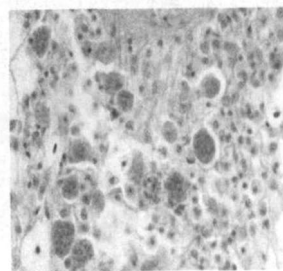


图 2 美洲牡蛎的组织切片

Fig.2 MSX Plasmodia in *C. virginica*

5.4 MSX 的原位杂交方法检测

原位杂交是确定尼氏单孢子虫的一种方法,因为它用特异性探针与目标生物体进行杂交。最近,通过寡核苷酸标记特异性种类的探针和寄生虫亚单位核糖体 RNA 进行杂交,可以在组织切片上区分 MSX 和与其同属的沿岸单孢子虫 SSO^[27,28]。通过识别标记的探针,可以检测抗体的变化。通过抗体变化的酶作用物的增加,会看见探针与寄生虫原位杂交产生的颜色变化,此时的 MSX 呈紫黑色。

6 尼氏单孢子虫与寄主之间的交互作用

众所周知,在脊椎动物和无脊椎动物中,对不同种类进行识别、黏附、吞噬并将其杀死是良好的细胞防御机制的关键要素。但是如果寄生虫防御机制或寄主应答响应存在问题,就会导致寄主细胞防御系统遭到破坏。过去几十年对寄生虫的体外研究表明,寄主响应成功与否与运动迟缓的血淋巴细胞成分和可溶解的成分^[29,30]、寄生虫的表面特征^[31,32]、寄生虫排泄物^[33,34]对血细胞影响有关。同时,寄生虫的生理特征^[35]和寄主是否其它吸虫类动物寄生^[36]也会影响寄主-寄生虫间的交互作用。

研究结果表明,通过自然和选择性育种可以提高对由 MSX 而导致的牡蛎疾病的抵抗力,但是通过组织切片检测,并没有发现噬菌细胞。对比研究表明,对于 MSX 疾病的抵抗力来讲,从美洲牡蛎中得到的血细胞,一开始血细胞与活的原生质体发生接触,然后血细胞迅速离开,最后血细胞就几乎不动了,说明美洲牡蛎的血细胞不能吞噬 MSX 的原生质体,除非寄生虫被破坏或杀死。太平洋牡蛎对 MSX 病害有抗性,但是其体内的血细胞也不能吞噬活的原生质体。而罗纹贻贝 *Geukensia demissa* 与美洲牡蛎生活在同一地区的,还未见被 MSX 感染,其血细胞却能迅速吞噬原生质体。这说明,MSX 可能产生一种对血细胞有抑制作用的物质,虽然寄主血细胞不能成功地吞噬寄生虫,但是寄主对疾病的抵抗力却在不断增强。

7 环境因素对病害流行的影响

从首次发现到 20 世纪 80 年代,MSX 很少出现在中大西洋以外的区域。从 80 年代进入 90 年代,在大西洋东北出现新一轮的爆发:据报道 1983 年在长岛北部沿岸,1986 年在科德角南部沿岸,1995 年在缅因州和新汉普郡的边界的皮斯卡塔夸河口,1997 年整个长岛海峡。MSX 向北方蔓延的根本原因还不清楚,但是环境条件的变化可能是最大的原因。温度、盐度、食物是影响感染周期的重要因素,其中温度是寄生虫生活史及其传播的主导因素。温度影响 MSX 的生长率和死亡率,是 MSX 流行及强度的重要的环境变量。随着温度的升高,寄生虫呈指数生长,冬季温度低,寄生虫生长慢,不易观察。MSX 细胞容易受长期寒冷低温的影响,这样能使其血细胞受到影响直到第二年春季,这种影响在温度低于 5℃ 时最明显。

实验室和野外观察表明,盐度是 MSX 流行及强度的调节

因素。此外,盐度对 MSX 在河口区的分布有很大的影响。盐度在 5—15ppt 之间寄生虫的生存能力降低,低于 5ppt 不能生存。同样 MSX 在 5-15ppt 之间生长速率降低,低盐度时在上皮和全身组织的传播速率提高。

食物供给是 MSX 流行及强度的增强的重要因素,由于丰富的食物营养以及高温度这样好的条件,使其容易在春季发生。春季海藻量和牡蛎滤水量都很高,MSX 的数量也就很大,使寄生虫细胞保持很长时间的指数生长期。但是,仅仅是食物这一单一的因素变化对 MSX 的影响不大。

8 未来展望

我国海域辽阔,气候和生态环境多样,海洋生物种类也很丰富。随着国际交流的增多和国家开放程度的日益扩大,各种海洋微生物在世界范围内更加频繁地流动,这就给外来病原生物入侵提供了机会。这其中,寄生虫的危害较为严重。在国内,梁玉波等^[37]首次在辽宁省石城岛、东港滩涂养殖的菲律宾蛤仔中观察到了帕金虫孢子体,并对其致病性进行了研究。据报道,在我们邻国的韩国和日本两地的相继发现了尼氏单孢子虫,因此,我们要研究寄主-尼氏单孢子虫-环境三者之间的紧密关系,对尼氏单孢子虫在我国的出现甚至爆发做好充分的准备工作,把损失降到最低,为我国的海产贝类尼氏单孢子虫病害的监测与防治提供前提。

参考文献

- [1] Perkins F O. An illustrated guide to the protozoa [J]. Society of Protozoologists, 2000, 1328-1341
- [2] Burreson E M, Ford S E. A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to Haplosporidium nelsoni (MSX disease) [J]. Aquat. Living Resour, 2004, 17:499-517
- [3] Haskin H H, Stauber L A, Mackin J A. Minchinia nelsoni. sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae): causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic[J]. Science, 1966, 153:1414-1416
- [4] Andrews J D, Wood J L. Oyster mortality studies in Virginia. VI. History and distribution of Minchinia nelsoni, a pathogen of oysters, in Virginia[J]. Ches. Sci, 1967, 8:1-13
- [5] Krantz E L, Buchanan L R, Farley C A, et al. Minchinia nelsoni in oysters from Massachusetts waters [J]. Proc. Nat. Shellfish Assoc, 1972, 62:83-88
- [6] Hillman R E, Boehm P D, Freitas S Y. A pathology potpourri from the NOAA mussel watch program[J]. Shellfish Res, 1988, 7:216
- [7] Kern F G. Recent changes in the range of "MSX" Haplosporidium nelsoni[J]. Shellfish Res, 1988, 7:543
- [8] Lewis E J, Kern F G, Rosenfield A, et al. Lethal parasites in oysters from coastal Georgia, with discussion of disease and management implications[J]. Mar. Fish. Rev, 1992, 52:1-6
- [9] Matthiessen G C, Feng S Y, Leibovitz L. Patterns of MSX (Haplosporidium nelsoni) infection and subsequent mortality in resistant

- and susceptible strains of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in New England[J]. *Shellfish Res.* 1990,9:359-366
- [10] Ragone L M, Calvo, Dungan C F, et al. Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay[J]. *Dis. Aquat. Org.* 2003,56:75-86
- [11] MSX DISEASE (*Haplosporidium nelsoni*). Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, 2003,5:1-2
- [12] Haskin HH, Andrews JD. Uncertainties and speculations about the life cycle of the eastern oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX) [J]. *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs*, 1988, 18:5-22
- [13] Jones B. *Haplosporidiosis*[J]. *ASDT*, 2000,7:2-3
- [14] Bobo M Y, Richardson D L, Coen L D et al. A report on the protozoan pathogens *Perkinsus marinus* (Demo) and *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in south carolina shellfish populations, with an overview of these shellfish pathogens[J]. *Protozoan Pathogens in South Carolina Shellfish*, 1995,50:5-6
- [15] Kleeman S N, Roux Le, Berthe F, et al. Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*[J]. *Parasitology*, 2002,125:131-141
- [16] Roux Le, Audemard F C, Berthe F. DNA Probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens* [J]. *Marine Biotechnology*, 1999,1:588-597
- [17] Stokes N A, Bureson E M. A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* [J]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1995,42:350-357
- [18] Choi K D, Lewis H, Powell E N, et al. A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus*. Hypnospores fails to cross react with other life stanges of *P. marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1991,10:411-415
- [19] Dungan C F, Roberson B S. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1993,15:9-22
- [20] Cochennec N D, Hervio, Panatier B, et al. A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Acetosporea) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992,12:129-134
- [21] Carnegie R B, Barber B J, Culloty S C, et al. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000,42:199-206
- [22] Rogier H D, Hervio, Boulo V, et al. Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1991,11:135-142
- [23] Feng S Y, Feng J S, Burke C N, et al. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda) [J]. *Zellforsch.* 1971,120:222-245
- [24] Ford S E. Effect of repeated hemolymph sampling on growth, mortality, hemolymph protein and parasitism of oysters, *Crassostrea virginica* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1986,85A:465-470
- [25] Ford S E, M. Ferris S A, Ashton K A. "Panning", a technique for enrichment of the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) from hemolymph of infected oysters [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1990,56:347-352
- [26] Wysocki L J, Sato V L. "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection [J]. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1978,75:2844-2848
- [27] Stokes N A, Bureson E M. A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* [J]. *Euk. Microbiol.* 1995,42: 350-357
- [28] Stokes N A, Bureson E M. Differential diagnosis of mixed *Haplosporidium costale* and *Haplosporidium nelsoni* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using DNA probes [J]. *Shellfish Res.* 2001,20:207-213
- [29] Bayne. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro [J]. *Journal of Parasitology*, 1980a,66:413-419
- [30] Bayne. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata* [J]. *Experimental Parasitology*, 1980b,50:409-416
- [31] Loker, Bayne. In vitro encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata* [J]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1982,31:999-1005
- [32] Loker. Differential adherence of M line *Biomphalaria glabrata* hemocytes to *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* larvae, and experimental manipulation of hemocyte binding [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989,54:260-268
- [33] Connors, Yoshino. In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata* [J]. *Journal of Parasitology*, 1990,76:895-902
- [34] Fryer, Bayne. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata* [J]. *Journal of Parasitology*, 1990,76:45-52
- [35] Font W F. Effects of hemolymph of the American oyster, *Crassostrea virginica*, on marine cercariae [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1980,36:41-47
- [36] Loker. *Echinostoma paraensei* hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni* [J]. *Experimental Parasitology*, 1986,62:149-154
- [37] 梁玉波, 张喜昌, 王立俊, 等. 北黄海菲律宾蛤仔派金虫流行病害的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2001,32(5):567-575