

斑石鲷卵鞭虫病原的分子鉴定与系统发育分析

付泉洁^{1,2}, 范超^{2,3}, 谢国驹², 叶仕根¹, 史成银^{2*} (1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海水养殖病害防治重点实验室, 山东青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要 [目的]对严重危害斑石鲷鱼苗的卵鞭虫病原——渤海分离株(Bohai-1407 isolate)进行分子生物学鉴定和系统发育分析。[方法]设计4对特异性引物,应用PCR方法克隆并测定渤海分离株的核糖体DNA(rDNA)序列;应用Blast比对分析渤海分离株rDNA的结构;依据rDNA序列,分别构建10种胚沟科鞭毛虫和19株眼点淀粉卵鞭虫分离株/克隆的系统发育树,分析渤海分离株的系统分类地位。[结果]扩增出了渤海分离株的4个DNA片段,拼接出长度为6530 bp的rDNA操纵子序列;该操纵子由74 bp的部分外转录间隔区(ETS)、1813 bp的小亚基(SSU)、352 bp的内转录间隔区1(ITS1)、159 bp的5.8S、698 bp的内转录间隔区2(ITS2)和3388 bp的大亚基(LSU)串联而成,3'端还有46 bp的部分非转录间隔区(NTS);渤海分离株与眼点淀粉卵鞭虫宁德株(Ningde1412)的rDNA序列相似性高达99.5%;依据SSU序列建立了包含10种胚沟科鞭毛虫的系统发育树,渤海分离株与世界各地分离到的眼点淀粉卵鞭虫聚在一起,将其鉴定为眼点淀粉卵鞭虫;依据ITS1和ITS2序列建立了包含19株眼点淀粉卵鞭虫的2个系统发育树,渤海分离株与从美国佛罗里达盐水池塘中分离到的墨西哥湾分离株FL_21(DQ490260.1)总是聚在一起。[结论]斑石鲷卵鞭虫病的病原——渤海分离株可以鉴定为眼点淀粉卵鞭虫,该分离株与墨西哥湾分离株FL_21的亲缘关系最近。

关键词 斑石鲷;眼点淀粉卵鞭虫;核糖体DNA;分子鉴定;系统发育分析

中图分类号 S941.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)13-0135-06

Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of a Pathogenic Dinoflagellate Isolated from Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)
FU Quan-jie^{1,2}, FAN Chao^{2,3}, XIE Guo-si², SHI Cheng-yin^{2*} et al (1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023; 2. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract [Objective] A pathogenic dinoflagellate (the Bohai-1407 isolate) was isolated from diseased *Oplegnathus punctatus*. To perform molecular identification and phylogenetic analysis of the Bohai-1407 isolate. [Method] Four pair of specific PCR primers were used to amplify the ribosomal DNA (rDNA) fragments of the Bohai-1407 isolate. The rDNA fragments were cloned and sequenced. The sequences of cloned rDNA fragments were assembled and then analyzed by Blast. The systematic taxonomy of the Bohai-1407 isolate was analyzed by constructed phylogenetic trees based on the rDNA sequences of 10 dinoflagellates in family Blastodiniidae and the rDNA sequences of 19 isolates/clones in species *Amyloodinium ocellatum*. [Result] Four ribosomal DNA (rDNA) fragments of the Bohai-1407 isolate were amplified. Sequence analysis showed that the sequenced rDNA operon were 6530 bp in length. The rDNA operon was composed of 74 bp of partial external transcribed spacer (ETS), 1813 bp of 18S (also called small subunit, SSU), 352 bp of internal transcribed spacers 1 (ITS1), 159 bp of 5.8S, 698 bp of internal transcribed spacers 2 (ITS2) and 3388 bp of 23S (also called large subunit, LSU), followed by a 46 bp of partial non-transcribed spacer (NTS) in the 3' end. The sequence identity between the Bohai-1407 isolate and the Ningde1412 strain of *A. ocellatum* was as high as 99.5%. Based on the SSU sequence of 10 dinoflagellates in family Blastodiniidae, a phylogenetic tree was constructed and the Bohai-1407 isolate clustered with isolates of *A. ocellatum*. Two phylogenetic trees based on the ITS1 and ITS2 sequences of 19 isolates/clones in species *A. ocellatum* were also constructed. The Bohai-1407 isolate always clustered with the Gulf of Mexico isolate FL_21 (DQ490260.1). [Conclusion] The pathogenic dinoflagellate (the Bohai-1407 isolate) isolated from diseased *O. punctatus* was *A. ocellatum* according to the molecular identification results of rDNA. The Bohai-1407 isolate was most closely related to the Gulf of Mexico isolate FL_21 of *A. ocellatum*.

Key words *Oplegnathus punctatus*; *Amyloodinium ocellatum*; rDNA; Molecular identification; Phylogenetic analysis

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)是一种具有较高经济价值的海水鱼类,其抗逆性强,生长迅速,营养价值高,具有良好的发展前景。2014年斑石鲷的规模化人工繁育在我国获得成功。因养殖时间较短,目前国内对其病害的报道较少。2014年夏季在山东某斑石鲷育苗场,多个养殖池的斑石鲷幼鱼突然发病,3 d之内全部死亡。通过病理切片、病原形态的光镜和电镜观察,初步判断该病为斑石鲷卵鞭虫病^[1],其病原为眼点淀粉卵鞭虫,命名为渤海分离株(Bohai-1407 isolate)。

眼点淀粉卵鞭虫(*Amyloodinium ocellatum*)有时也被称为淀粉卵甲藻,是一种鞭毛虫类的原生动物,在动物分类系

统中属于植鞭纲(Phytmastigophora)腰鞭目(Dinoflagellida)胚沟科(Blastodiniidae)。眼点淀粉卵鞭虫是常见的鱼类寄生虫之一,能导致养殖鱼类大量死亡,是重要的海洋鱼类病原之一^[2]。其生活史包括3个阶段:营养体阶段、分裂前体阶段、孢子阶段。营养体用假根状的凸起附着在鱼体的鳃和皮肤上^[3]。环境条件适宜时,该寄生虫可快速分裂繁殖,几天内即可造成养殖及观赏鱼大量死亡^[4-7]。该寄生虫分布范围广,在太平洋、大西洋、墨西哥湾、红海、地中海等海域均有发现;其宿主范围广泛,可感染20多种经济鱼类^[8]。

对病原进行准确的鉴定,是有效控制寄生虫病的前提。鉴定卵鞭虫的传统方法是通过光镜或电镜观察,依据孢子的形态特征或甲壳结构进行判断,但这种方法准确性不高。近年来,许多学者开始通过分子系统发育分析对鞭毛虫进行分类鉴定^[9-10]。核糖体RNA是核糖体的重要组分,具有关键的生物学功能,由位于染色体上的核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)编码。在真核生物基因组中,18S、5.8S和

基金项目 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016HY-ZD0505, 2017HY-ZD0303)。

作者简介 付泉洁(1991—),男,辽宁丹东人,硕士研究生,研究方向:水产动物医学。*通讯作者,研究员,博士,硕士生导师,从事鱼类病害研究。

收稿日期 2017-03-12

28S rDNA 串联在一起,中间被 2 个内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 隔开。18S rDNA 也被称为小亚基 rDNA (small subunit rDNA, SSU rDNA), 28S rDNA 也被称为大亚基 rDNA (large subunit rDNA, LSU rDNA)。SSU rDNA 已被广泛用于鞭毛虫物种间的分类鉴定,而 ITS 通常被用于物种内的系统发育分析^[9-11]。

国内关于眼点淀粉卵涡鞭虫的研究较少,且多集中在防治方面^[12-15],对该病原的分子鉴定和系统发育分析缺乏研究。该研究针对感染斑石鲷的眼点淀粉卵涡鞭虫渤海分离株,测定了其 rDNA 的序列,依据 SSU 和 ITS 序列对其分类地位进行了分子鉴定,探讨了眼点淀粉卵涡鞭虫各分离株的系统发育关系。

1 材料与与方法

1.1 材料 取病症严重的濒死病鱼鱼苗,放在培养皿中。用无菌海水轻轻洗脱鱼鳃上附着的寄生虫营养体,使营养体脱落到水中并沉淀。用吸管反复轻轻吸除水中的杂质,直至用显微镜观察几乎看不到杂质。转移底部的营养体至含无菌海水的培养皿中,25℃ 恒温培养,培养至分裂后期加入 70% 乙醇于 -20℃ 保存备用^[1]。

1.2 引物设计 参考 GenBank 中眼点淀粉卵涡鞭虫的 rDNA 序列设计 4 对 PCR 引物,引物序列见表 1。4 对引物扩增的 PCR 产物前后衔接且有部分重叠,最后可以拼接成完整的 rDNA 序列。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 扩增眼点淀粉卵涡鞭虫渤海分离株 rDNA 的引物

Table 1 The primers for rDNA amplification of the Bohai-1407 isolate

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增片段大小 Fragment size//kb
AO-SSU-F	CAGACATCTTCGGAGACTTA	1.4
AO-SSU-R	CGTAGGCAACTTCTTAGAGG	
AO-231F	GCTACCACATCTAAGGAAGG	2.7
AO-2934R	GTTGATTCGCCATTACTAAGG	
AO-2874F	GCATATAAGTAAGCGGAGGA	2.1
AO-4961R	CAGTCTGAGTTGGTTGTTC	
AO-LSU-F	GAATCAGATTGCCTGGAGAT	1.7
AO-LSU-R	AAGTCTTCGCCAACCATC	

1.3 渤海分离株 DNA 的提取与 rDNA 的 PCR 扩增 取保存的眼点淀粉卵涡鞭虫,用天根生化科技(北京)有限公司

海洋生物组织 DNA 提取试剂盒制备 PCR 模版,具体操作依据试剂盒说明书进行。采用 50 μL 体系进行 PCR 扩增:10 × Taq Buffer 5 μL, 5 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 2 mmol/L 的 dNTP Mix 4 μL, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 4 μL, 10 μmol/L 正反向引物各 2 μL, DNA 模板 1.5 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 61℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。反应结束后取产物 10 μL, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增结果并拍照。

1.4 扩增产物的克隆、测序和序列分析 使用北京全式金生物技术有限公司的 pEASY-T5 Zero Cloning Kit 试剂盒对 PCR 扩增产物进行克隆,具体操作依据试剂盒说明书进行。将阳性克隆菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,用 DNAMAN 8 软件对测序结果进行拼接,用 Blast 程序对拼接的序列在线分析和序列比对。

1.5 眼点淀粉卵涡鞭虫的分子鉴定和系统发育分析 从 GenBank 中下载有代表性的 9 种胚沟科鞭毛虫的 SSU 序列,与拼接后得到的渤海分离株 SSU 序列一起(表 2),用 Mega 6.0 软件构建最大可能性法(Maximum Likelihood)系统发育树,分析渤海分离株在胚沟科鞭毛虫中的分类地位。从 GenBank 中下载 18 个眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆的 ITS 序列,与拼接后得到的渤海分离株 ITS 序列一起(表 3),用 Mega 6.0 软件构建最大可能性法系统发育树,分析渤海分离株与眼点淀粉卵涡鞭虫各分离株的系统发育关系。

表 2 用于构建 SSU 系统发育树的 9 种胚沟科鞭毛虫和渤海分离株
Table 2 Nine dinoflagellates in family Blastodiniidae and Bohai-1407 isolate used for constructing the SSU phylogenetic tree

分离株/克隆 Isolate/clone	GenBank 号 GenBank number	参考文献 Reference
<i>Cryptoperidiniopsis brodyi</i>	AF080097.1	[9]
<i>Pfiesteria piscicida</i>	AF077055.1	[16]
<i>Oodinium pouchetii</i> isolate 23	KM879217.1	[10]
<i>Oodinium pouchetii</i> isolate 58	KM879219.1	[10]
<i>A. ocellatum</i> strain Mediterranean Sea	DQ490256.1	[11]
<i>A. ocellatum</i> isolate DC-1	AF080096.1	[11]
<i>A. ocellatum</i> isolate Red Sea	DQ490257.1	[11]
<i>A. ocellatum</i> isolate Adriatic Sea	DQ490258.1	[11]
<i>A. ocellatum</i> strain Ningde1412	KU761581.1	[17]
Bohai-1407 isolate	—	—

表 3 用于构建 ITS 系统发育树的 18 个眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆和渤海分离株

Table 3 Eighteen isolates/clones of *A. ocellatum* and Bohai-1407 isolate used for constructing the ITS1 and ITS2 phylogenetic tree

分离株/克隆 Isolate/clone	感染宿主 Host	分离地域 Geographic source	GenBank 号 GenBank number	参考文献 Reference
AoeITS 6-10-13	<i>Amphiprion ocellaris</i>	美国宠物交易市场	AF352362.1	[11]
AoeITS 3-8-11	<i>Amphiprion ocellaris</i>	美国宠物交易市场	AF352361.1	[11]
AoeITS 18	<i>Amphiprion ocellaris</i>	美国宠物交易市场	AF352360.1	[11]
AoeITS 15	<i>Amphiprion ocellaris</i>	美国宠物交易市场	AF352359.1	[11]
FL_16	<i>Sciaenops ocellatus</i>	美国佛罗里达池塘	DQ490259.1	[11]
FL_21	<i>Sciaenops ocellatus</i>	美国佛罗里达池塘	DQ490260.1	[11]
Italy_3-2	<i>Dicentrarchus labrax</i>	意大利亚得里亚海	DQ490261.1	[11]
Italy_3-4	<i>Dicentrarchus labrax</i>	意大利亚得里亚海	DQ490262.1	[11]

续表 3

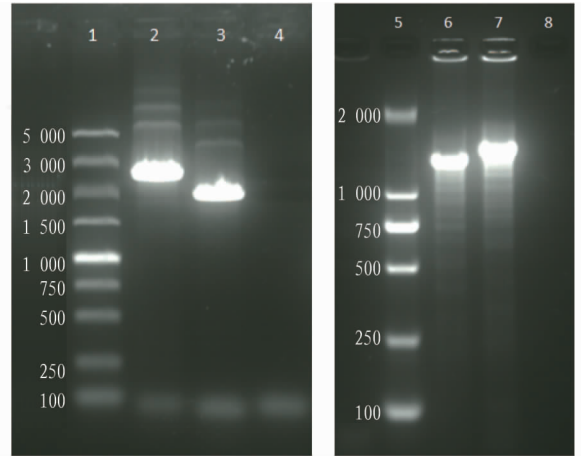
分离株/克隆 Isolate/clone	感染宿主 Host	分离地域 Geographic source	GenBank 号 GenBank number	参考文献 Reference
Italy_3-7	<i>Dicentrarchus labrax</i>	意大利亚得里亚海	DQ490263.1	[11]
Med_Sea_1-4	<i>Sparus aurata</i>	以色列地中海	DQ490264.1	[11]
Med_Sea_2-1	<i>Sparus aurata</i>	以色列地中海	DQ490265.1	[11]
Med_Sea_2-4	<i>Sparus aurata</i>	以色列地中海	DQ490266.1	[11]
Med_Sea_3-1	<i>Sparus aurata</i>	以色列地中海	DQ490267.1	[11]
RedSea_clone_2-1	<i>Morone saxatilis</i>	以色列埃拉特海	DQ490268.1	[11]
Redsea_clone_2-5	<i>Morone saxatilis</i>	以色列埃拉特海	DQ490269.1	[11]
Redsea_clone_2-6	<i>Morone saxatilis</i>	以色列埃拉特海	DQ490270.1	[11]
Redsea_clone_2-7	<i>Morone saxatilis</i>	以色列埃拉特海	DQ490271.1	[11]
Ningde1412	<i>Larimichthys crocea</i>	中国宁德	KU761581.1	[17]
Bohai-1407	<i>Oplegnathus punctatus</i>	中国渤海	—	—

2 结果与分析

2.1 渤海分离株 rDNA 的 PCR 扩增 使用该研究设计的 4 对 PCR 引物,成功地从渤海分离株的 DNA 样品中扩增出 4 段产物。琼脂糖凝胶电泳结果显示,引物对 AO-231F/AO-2934R 的 PCR 产物大小约为 2.7 kb,引物对 AO-2874F/AO-4961R 的 PCR 产物大小约为 2.1 kb,引物对 AO-SSU-F/AO-SSU-R 的 PCR 产物大小约为 1.4 kb,引物对 AO-LSU-F/AO-LSU-R 的 PCR 产物大小约为 1.7 kb(图 1),均与预期扩增片段大小相符。

2.2 渤海分离株 rDNA 的序列分析 将挑选出的阳性克隆进行序列测定,对测序结果进行序列拼接,得到长度为 6 530 bp 的渤海分离株 rDNA 序列。分析发现,该序列包含了完整的 18S、5.8S、28S rDNA 操纵子,由 74 bp 的部分外转录间隔区(extra transcribed sequence, ETS),1 813 bp 的 SSU(18S rDNA),352 bp 的 ITS1,159 bp 的 5.8S rDNA,698 bp 的 ITS2 和 3 388 bp 的 LSU(28S rDNA)依次串联而成,在 3'端还含有 46 bp 的部分非转录间隔区(non-transcribed spacer, NTS)(图 2)。通过 Blast 比对这一段 6 530 bp 的序列,发现渤海分离株(Bohai-1407 isolate)与眼点淀粉卵涡鞭虫宁德株(Ningde1412)的序列相似性为 99.5%。

2.3 眼点淀粉卵涡鞭虫的系统发育分析 依据 SSU 序列构建的 10 种胚沟科鞭毛虫系统发育树见图 3。可以看出,渤海分离株(Bohai-1407 isolate)与眼点淀粉卵涡鞭虫各分离株聚类在一起,与胚沟科其他鞭毛虫亲缘关系较远,因此可以将渤海分离株鉴定为眼点淀粉卵涡鞭虫。该发育树还显示,



注:1. DNA 分子量标准 DL 5000(TaKaRa);2. 引物对 AO-231F/AO-2934R 的 PCR 产物;3. 引物对 AO-2874F/AO-4961R 的 PCR 产物;4. 阴性对照;5. DNA 分子量标准 DL2000(TaKaRa);6. 引物对 AO-SSU-F/AO-SSU-R 的 PCR 产物;7. 引物对 AO-LSU-F/AO-LSU-R 的 PCR 产物;8. 阴性对照

Note:1. DNA marker of DL 5000;2. amplicon by primer pairs AO-231F/AO-2934R;3. amplicon by primer pairs AO-2874F/AO-4961R;4. negative control;5. DNA marker of DL2000;6. amplicon by primer pairs AO-SSU-F/AO-SSU-R;7. amplicon by primer pairs AO-LSU-F/AO-LSU-R;8. negative control

图 1 渤海分离株 rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The amplified rDNA fragments of the Bohai-1407 isolate by PCR



注:上方为各结构的名称;下方的数字表示各结构的起始核苷酸位置

Note:The letters above were names of each structure;the numbers below were the initial nucleotide position of each structure

图 2 渤海分离株的 rDNA 结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the Bohai-1407 isolate rDNA

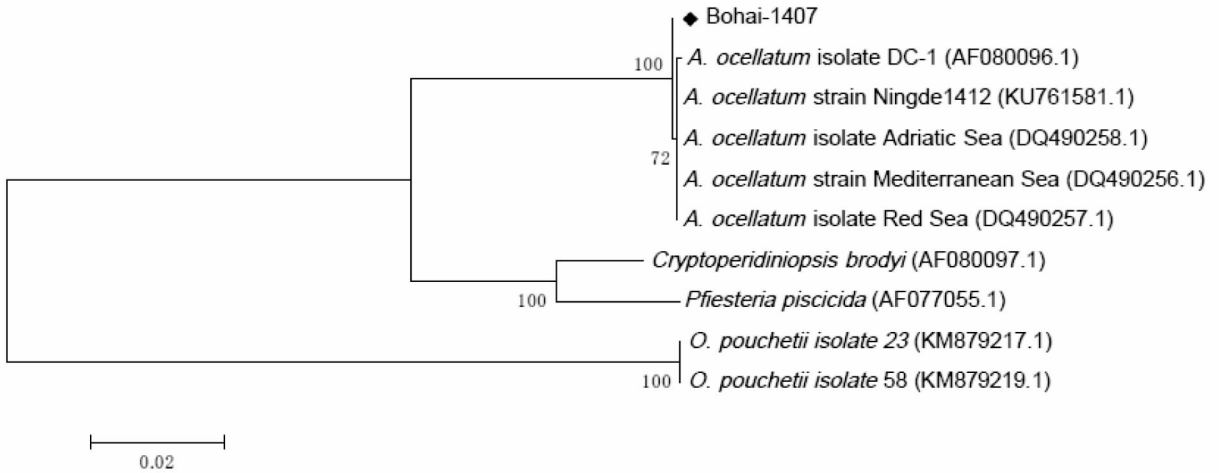


图3 依据10种胚沟科鞭毛虫SSU序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the SSU sequences of 10 dinoflagellates in family Blastodiniidae

渤海分离株作为一个单独的分支,与其他眼点淀粉卵涡鞭虫分离株所在的分支区别开来。这意味着与其他眼点淀粉卵涡鞭虫分离株相比,渤海分离株的独特性更强。

由于SSU序列变异很小,不适合用于眼点淀粉卵涡鞭虫各分离株的种内分析。因此,该研究依据变异性相对较高的ITS1和ITS2序列,分别构建了包含19个眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆的系统发育树。

根据ITS1序列构建的系统发育树见图4。图中显示,19个眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆聚类为2个大的分支A和B。大分支A由13个分离株/克隆组成,包含渤海分离株(Bohai-1407)、宁德株(Ningde1412)、1个DC-1克隆(AocITSC 15)、4个红海克隆(Red Sea 2-1、2-5、2-6、2-7)、1个墨西哥湾克隆(FL₂₁)、2个亚得里亚海克隆(Adriatic Sea 3-4、3-7)、3个地中海克隆(Mediterranean Sea 1-4、2-4、3-1)。渤海分离株与从美国佛罗里达盐水池塘分离到的1个墨西哥湾克隆(FL₂₁)亲缘关系最近,在大分支A中又聚类为一个小的分支。大分支B由6个克隆组成,包含3个DC-1克隆(AocITSC 6-10-13、3-8-11、18)、1个墨西哥湾克隆(FL₁₆)、1个亚得里亚海克隆(Adriatic Sea 3-2)和1个地中海克隆(Mediterranean Sea 2-1)。

根据ITS2序列构建的系统发育树见图5。图中显示,19个眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆也聚类为2个大的分支A和B。大分支A由10个分离株/克隆组成,包含宁德株(Ningde1412)、4个红海克隆(Red Sea 2-1、2-5、2-6、2-7)、2个亚得里亚海克隆(Adriatic Sea 3-4、3-7)、3个地中海克隆(Mediterranean Sea 1-4、2-4、3-1)。大分支B由9个克隆组成,包含渤海分离株(Bohai-1407)、4个DC-1克隆(AocITSC 6-10-13、3-8-11、15、18)、2个墨西哥湾克隆(FL₁₆、21)、1个亚得里亚海克隆(Adriatic Sea 3-2)和1个地中海克隆(Mediterranean Sea 2-1)。渤海分离株与从美国佛罗里达盐水池塘分离到的1个墨西哥湾克隆(FL₂₁)亲缘关系最近,在大分支B中又聚类为一个小的分支。

在上述2个系统发育树中,渤海分离株总是与墨西哥湾

株FL₂₁聚成一个小的分支,表明该渤海分离株与墨西哥湾分离株FL₂₁的亲缘关系最近。但这个小分支在2个树中的相对位置不同,分别处于不同的大分支上。此外还有1个DC-1克隆(AocITSC 15)在2个树中的相对位置也不同,分别处于不同的大分支上。除上述3个分离株/克隆之外,其余的各分离株/克隆在2个系统发育树中,均处于相同的大分支上,可以明显区分为2个大的类群。

3 讨论与结论

卵鞭虫病是一种在全球范围内广泛流行的鱼类寄生虫病,对鱼苗的致死率高,危害严重。该研究针对新发现的斑石鲷卵鞭虫病,测定了其病原的rDNA序列,应用生物信息学方法对病原进行了分子鉴定,确认其病原是眼点淀粉卵涡鞭虫。该研究结果为有效控制斑石鲷卵鞭虫病提供了重要依据。

真核生物的rDNA已被广泛应用于物种的分类鉴定和系统发育分析^[10,16],眼点淀粉卵涡鞭虫的rDNA序列也已成为病原分子鉴定的重要依据^[9,11]。在GenBank中已公开了眼点淀粉卵涡鞭虫10余个分离株/克隆的rDNA序列20余条。然而,除感染大黄鱼的宁德株(Ningde1412, KU761581.1)外,绝大多数分离株/克隆的rDNA序列是不足2000 bp的短序列,未涵盖完整的SSU和LSU序列。该研究测定了渤海分离株(Bohai-1407 isolate)的rDNA序列,长度达6530 bp。该序列涵盖了渤海分离株完整的SSU、ITS1、5.8S、ITS2和LSU序列,为深入研究眼点淀粉卵涡鞭虫rDNA的变异提供了参考资料。

比对眼点淀粉卵涡鞭虫渤海分离株与宁德株的rDNA序列,二者的相似性高达99.5%,这表明感染斑石鲷的渤海分离株和感染大黄鱼的宁德株是同一种寄生虫。依据10种胚沟科鞭毛虫SSU序列构建的系统发育树也显示,渤海分离株与世界各地分离到的眼点淀粉卵涡鞭虫聚类在一起。因此,斑石鲷卵鞭虫病的病原可以鉴定为眼点淀粉卵涡鞭虫。

与SSU、5.8S和LSU相比,rDNA中的ITS面对较小的选择压力,因此序列变异更大。在该研究测定的6350 bp的眼

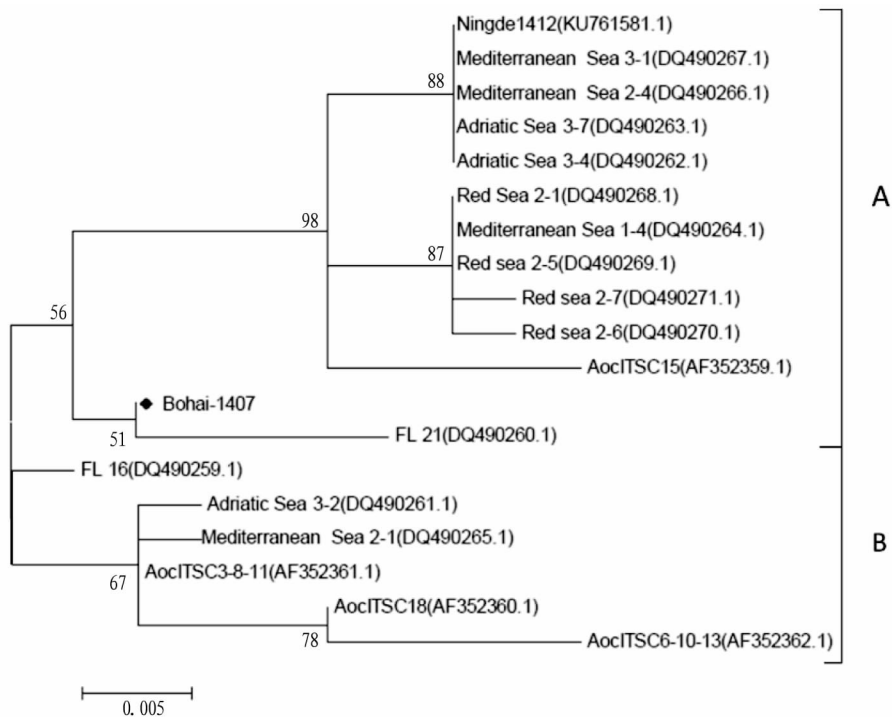


图 4 依据 19 种眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆 ITS1 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the ITS1 sequences of 19 isolates/clones in species *A. ocellatum*

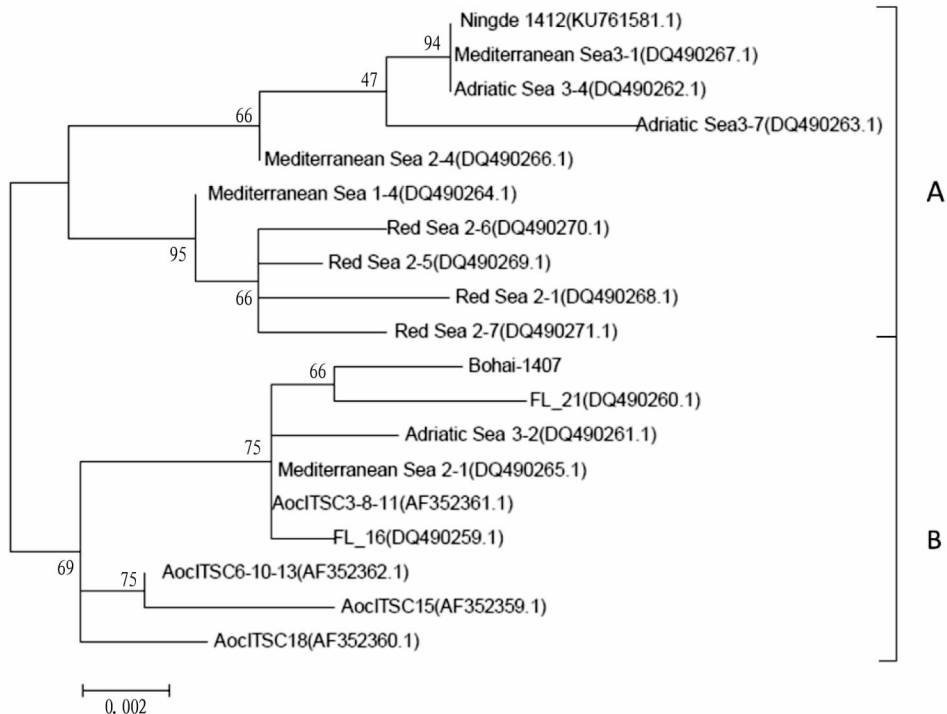


图 5 依据 19 种眼点淀粉卵涡鞭虫分离株/克隆 ITS2 序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the ITS2 sequences of 19 isolates/clones in species *A. ocellatum*

点淀粉卵涡鞭虫 rDNA 序列中,渤海分离株与宁德株在 34 个位点处存在差异,ITS1 和 ITS2 分别占 10 个和 16 个。因此,ITS 更适用于眼点淀粉卵涡鞭虫种内的系统发育分析^[18-19]。该研究依据眼点淀粉卵涡鞭虫 ITS1 和 ITS2 序列构建的 2 个系统发育树,其形态基本相同。来自世界不同地域的眼点淀粉卵涡鞭虫 19 个分离株/克隆,分别处于 2 个大的分支上,

即可以明显区分为 2 个大的类群。但另一方面,系统发育树也显示,来自同一地域的不同分离株/克隆分散于不同的大类群中。上述研究结果与此前文献的报道基本一致^[10-11]。这意味着 ITS1 和 ITS2 序列反映的眼点淀粉卵涡鞭虫种内变异与寄生虫的分离地域关系不大。值得注意的是,在依据 ITS1 和 ITS2 构建的 2 个系统发育树中,渤海分离株总是与

墨西哥湾株 FL_21 聚成一个小的分支。但这个分支在 2 个树中的相对位置不同,分别处于不同的大分支上。造成这种现象的原因,还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 范超. 斑石鲷卵鞭虫病和上皮囊肿病的研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2016:26-30.
- [2] PAPERNA I, ROSS B, COLORNI A, et al. Diseases of marine fish cultured in Eilat mariculture project based at the Gulf of Aqaba, Red Sea[J]. European mariculture society special publication, 1981(6):81-91.
- [3] NOGA E J. Propagation in cell culture of the dinoflagellate *Amyloodinium*, an ectoparasite of marine fishes [J]. Science, 1987, 236 (4806): 1302-1304.
- [4] BROWN E M, HOVASSE R. *Amyloodinium ocellatum* (Brown), a peridinium parasitic on marine fishes[J]. Proceedings of the zoological society of London, 1946, 116(1):33-46.
- [5] SARAIVA A, JERÓNIMO D, CRUZ C. *Amyloodinium ocellatum* (Chromalveolata; Dinoflagellata) in farmed turbot[J]. Aquaculture, 2011, 320 (1/2): 34-36.
- [6] 周胜利, 陈慧. 闽东大黄鱼人工养殖主要病害调查[J]. 中国水产, 2002 (1):52-54.
- [7] 徐绍刚, 朱华, 田照辉, 等. 漠斑牙鲆淀粉卵甲藻病的防治[J]. 科学养鱼, 2008(7):48-49.
- [8] WOO P T K. Fish diseases and disorders: Volume 1: Protozoan and metazoan infections[M]. 2nd ed. Oxon, UK: CABI Publishing, 2006:17-18.
- [9] LITAKER R W, TESTER P A, COLORNI A, et al. The phylogenetic relationship of *Pfiesteria piscicida*, Cryptoperidiniopsis sp. *Amyloodinium ocellatum* and a *Pfiesteria*-like dinoflagellate to other dinoflagellates and apicomplexans [J]. Journal of phycology, 1999, 35(6):1379-1389.
- [10] GÓMEZ F, SKOVGAARD A. The molecular phylogeny of the type-species

of *Oodinium* Chatton, 1912 (Dinoflagellata: Oodiniaceae), a highly divergent parasitic dinoflagellate with non-dinokaryotic characters[J]. Systematic parasitology, 2015, 90(2):125-135.

- [11] LEVY M G, POORE M F, COLORNI A, et al. A highly specific PCR assay for detecting the fish ectoparasite *Amyloodinium ocellatum*[J]. Diseases of aquatic organisms, 2007, 73(3):219-226.
- [12] 范超, 史成银. 硫酸铜对斑石鲷幼鱼的急性毒性及对眼点淀粉卵鞭虫的杀灭效果[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(11):98-102.
- [13] 张艺, 黄伟卿, 韩坤煌, 等. 眼点淀粉卵鞭虫包裹阶段生活史的观察及防治[J]. 水产科学, 2015, 34(11):722-725.
- [14] 杜庆红, 陈栩, 朱长寿, 等. 海马卵甲藻病的防治研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(11):4-7.
- [15] 熊向英, 徐力文, 董兰芳, 等. 网箱养殖卵形鲳鲹鱼体寄生虫初步调查[J]. 广西科学院学报, 2015(4):281-285.
- [16] OLDACH D W, DELWICHE C F, JAKOBSEN K S, et al. Heteroduplex mobility assay-guided sequence discovery: Elucidation of the small subunit (18S) rRNA sequences of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates from complex algal culture and environmental sample DNA pools [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2000, 97(8):4303-4308.
- [17] 黄殿盛, 池洪树, 黄河, 等. 眼点淀粉卵甲藻 ITS 和核糖体大亚基基因 (28S) 片段序列分析[C]//福建水产学会学术年会. 福州:福建省水产学会, 2015:370-380.
- [18] PICON-CAMACHO S M, THOMPSON W P, BLAYLOCK R B, et al. Development of a rapid assay to detect the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Vet Parasitol, 2013, 196(3/4):265-271.
- [19] SHAO P, CHEN Y Q, ZHOU H, et al. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: Implications for species identification and phylogenetic analysis[J]. Marine biology, 2004, 144(2):215-224.

(上接第 132 页)

下来,所以流速对吸附有影响,提取时要选择合适的流速;乙醇体积分数对白藜芦醇提取也有影响,通常 70% 乙醇提取的白藜芦醇最高;提取时间对提取率也有影响,在 3 h 时提取率最高,时间超过 3 h 时,提取率基本不变,可能乙醇对白藜芦醇的提取是一个慢慢浸提的过程,超过一定时间可以达到充分提取,所以在提取白藜芦醇时根据具体称量的原材料克数,需要摸索最佳提取时间;提取温度对白藜芦醇提取率也有一定影响,在 60 ℃ 时提取率最高,高于或低于 60 ℃ 提取率都不佳,可能白藜芦醇在这个温度下溶解性更好,超过这个温度可能会破坏白藜芦醇的结构;pH 为 4 时吸附率最高,可能在这个 pH 时白藜芦醇和大孔树脂之间的引力最大,所以在提取纯化白藜芦醇时要控制好 pH,否则会造成白藜芦醇的流失。

白藜芦醇溶液在中性和碱性条件下长期保存浓度会降低,而在酸性条件下保存,浓度基本保持不变。白藜芦醇是一种多酚类物质,可能在酸性条件下保存时,有助于保护其结构,所以在具体保存白藜芦醇溶液时要控制合理 pH,否则

会造成白藜芦醇损失。

参考文献

- [1] 田凤, 徐德生, 冯怡, 等. 虎杖药渣中白藜芦醇的提取和纯化[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(10):824-826.
- [2] 肖林霞, 卢其能, 李润根. 白藜芦醇的研究进展[J]. 现代农业科技, 2015 (24):264-265.
- [3] 汶海花, 李梦耀, 王莉莉, 等. LS-303B 大孔树脂吸附白藜芦醇的研究[J]. 应用化工, 2010, 39(7):1060-1073.
- [4] 佟瑞利, 赵娜娜, 刘成蹊, 等. 无机、有机高分子絮凝剂絮凝机理及进展[J]. 河北化工, 2007, 30(3):3-6.
- [5] 罗艳玲, 欧仕益. 大孔树脂在食品活性成分分离中的应用[J]. 食品与机械, 2005, 21(5):81-83.
- [6] 李燕, 刘军海. 大孔树脂对虎杖白藜芦醇的静态吸附动力学研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(5):82-86.
- [7] 吴朝霞, 吴朝晖. 大孔树脂纯化葡萄籽原花青素的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(4):46-48.
- [8] 王伏超, 任育萱, 张磊. 葡萄籽的成分开发利用与研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015(7):151-155.
- [9] 汶海花. 葡萄废渣中白藜芦醇的提取与分离纯化研究[D]. 西安:长安大学, 2012.
- [10] 马绍英, 苏利荣, 李胜, 等. 葡萄籽中原花青素、葡萄籽油和白藜芦醇的联合提取[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(5):145-149.
- [11] 黄卫文, 黎烈烈, 姜瑞清, 等. 大孔树脂纯化花生根中白藜芦醇工艺及其动力学研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(11):120-126.
- [12] 冯艳芸, 岳田利, 王周利. 葡萄皮中白藜芦醇提取工艺优化[J]. 农产品加工, 2015(12):35-39.