

中国沿海寄生性病原血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.)的遗传多样性研究*

肖洁^{1,2} 张学雷^{1,2} 刘瑞娟^{1,2} 李才文³

(1. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061; 2. 海洋生态环境科学与工程国家海洋局重点实验室 青岛 266061;
3. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 血卵涡鞭虫是一类感染海洋甲壳类动物的寄生性甲藻。本研究通过对我国山东、浙江和广东三地的血卵涡鞭虫群体进行 rDNA 基因(包括 5.8S, ITS1 和 ITS2)的测序和遗传分析,研究了我国沿海养殖蟹类中血卵涡鞭虫群体的遗传多样性以及与美国和欧洲群体的亲缘关系。结果表明,流行于我国沿海地区养殖蟹类中的血卵涡鞭虫群体存在一定的遗传多态性,共发现 14 个单倍型,其中单倍型 ST041a 在各个群体中均有出现,且发生频率较高;而三个地理群体之间无明显遗传差异,侵染不同宿主(三疣梭子蟹和拟穴青蟹)的株系间也无显著遗传差异。另外,我国的上述群体在遗传上是不同于国际上其他地区的独立分支,属于 *Hematodinium perezi* 基因型 II; 其亲缘关系与美国兰蟹中的株系较近(遗传距离 $D=0.027$),而与欧洲冷水株系稍远($D=0.236$)。本研究肯定了血卵涡鞭虫是一类“泛宿主”型病原生物,即在同一地区可侵染不同的甲壳类宿主。我国沿海地区的蟹类养殖应避免不同种类间的混养,以及不同地区间的引种交换,以防止血卵涡鞭虫流行病的进一步扩散。

关键词 寄生性甲藻; 甲壳动物; 遗传多样性; 地理分布; 核糖体 DNA

中图分类号 P735 doi: 10.11693/hyh20140800216

血卵涡鞭虫(*Hematodinium* sp.)是一类感染蟹、虾等海洋甲壳动物中的寄生性甲藻(parasitic dinoflagellate); 该寄生性甲藻能够在宿主的血淋巴和心脏、肝胰腺等器官的血腔内大量繁殖,进而导致宿主呼吸、代谢等机体功能紊乱直至死亡(Stentiford *et al*, 2005)。自 20 世纪 30 年代,法国科学家 Chatton 等(1931)首次在我国近海的绿蟹(*Carcinus maenas*)和港口蟹(*Liocarcinus depurator*)中发现并报道了该类寄生性甲藻以来,研究人员相继在欧洲英吉利海峡和大西洋沿岸、美国东部沿海、阿拉斯加沿岸和加拿大西海岸,以及澳大利亚等海域的 40 多种甲壳动物宿主发现该寄生性甲藻感染 (Shields, 1994; 李才文等, 2014)。血卵涡鞭虫在多种重要的海洋经济甲壳动物中的大规模流行,造成了巨大的经济损失(Field *et al*,

1992; Messick *et al*, 2000; Sheppard *et al*, 2003; Stentiford *et al*, 2005)。2004 年,许文军等(2007a, b)在我国浙江沿海的养殖三疣梭子蟹以及广东汕头海域的青蟹中发现了血卵涡鞭虫感染,并发现该寄生性病原是造成养殖三疣梭子蟹“牛奶病”和青蟹“黄水病”的主要病原之一。随后,研究人员在我国沿海其他地区的养殖虾蟹类中发现和报道了这类寄生性甲藻的流行(Li *et al*, 2008, 2013; 吴清洋等, 2010; Xu *et al*, 2010; 刘顺等, 2014)。

近年来,基于 DNA 序列的分子标记为鉴定和诊断该寄生性甲藻提供了新的技术手段; 并且,随着国际基因数据库(Genbank)中 *Hematodinium* 相关基因序列数据日益增多,一些种间或株系间的遗传差异逐渐被发现。Hudson 等(1996)最早发现不同宿主中的

*国家自然科学基金青年基金项目, 41206162 号, 41206145 号; 国家海洋局第一海洋研究所基本科研业务费专项项目, 0214G33 号。肖洁, 博士, E-mail: jxiao@fio.org.cn

通讯作者: 张学雷, 研究员, E-mail: zhangxl@fio.org.cn

收稿日期: 2014-08-12, 收修改稿日期: 2014-12-18

Hematodinium spp.有着较大的遗传差异; 随后, 研究人员通过对 ITS1 和 SSU 这两个位点的测序和分析, 发现不同宿主和不同地区的株系在这两个位点上有一定的碱基序列差异(Hamilton *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2010; Small *et al.*, 2012)。

已有研究和报道表明, 在我国发现的这种血卵涡鞭虫的发生、流行与其他国家和地区相比存在明显差异。例如: 在广东汕头牛田洋养殖基地感染青蟹的血卵涡鞭虫株系发生在低盐水体中(<9ppt), 这与国际上普遍认为的 *Hematodinium* spp.流行于高盐水体中(>18ppt)有明显分歧。另外, Xu 等(2010)首次在对虾中发现了该寄生性甲藻感染, 初步研究表明其与感染该区域梭子蟹和青蟹的血卵涡鞭虫具有相近的遗传关系(相似度为 99%)。随后, Li 等(2013)发现山东沿海的株系存在一定的遗传多态性, 且在我国沿海流行的这种血卵涡鞭虫(*Hematodinium* sp.)与寄生于美国东海岸兰蟹(*Callinectes sapidus*)中的株系遗传关系比较接近。然而, 以上研究中涉及的遗传信息有限, 相关分析尚不足以阐明我国发现的血卵涡鞭虫群体是否存在遗传多样性以及不同地理群体间是否存在遗传差异等问题。

因此, 本研究采用核糖体基因中突变频率相对较高的分子标记(5.8S、ITS1 和 ITS2 核糖体间区序列), 研究我国沿海不同地理群体和不同宿主群体的血卵涡鞭虫种下水平的遗传差异, 并进一步分析了我国沿海血卵涡鞭虫群体的遗传多样性和遗传结构, 及其与其他国家和地区血卵涡鞭虫群体的遗传关系, 以期明确我国沿海血卵涡鞭虫株系的分类地位提

供一定的科学依据, 并为渔业生产中预防和控制该病害的发生提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 血卵涡鞭虫 DNA 样品采集

感染血卵涡鞭虫的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*, 曾用名锯缘青蟹 *S. serrata* [林琪, 2008])样本, 于 2012 年 6—9 月分别采自山东省、浙江省、广东省沿海的养殖池塘(表 1); 美国得克萨斯沿岸的兰蟹样本由德克萨斯农工大学(Texas A&M University) J. Gain 博士采集。采集的螃蟹样本经血淋巴中性红染色方法(Stentiford *et al.*, 2005)确认感染后, 用无菌注射器抽取病蟹血淋巴于 95%酒精固定, 冷藏保存。提取 DNA 时, 取 200 μ L 酒精固定的血淋巴, 低速(约 8000r/min)离心 3 分钟后弃上清; 加 500 μ L 双蒸水洗涤沉淀, 再低速离心 3 分钟, 弃上清; 然后加定量裂解液, 根据 E.Z.N.A.TM 动物组织 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek, USA)说明书提取样品基因组 DNA。

1.2 分子标记目标片段扩增和测序

利用特异性引物(正向: 5'-CCTGGCTCGATAGA GTTG-3'; 反向: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; Hamilton *et al.*, 2010)扩增血卵涡鞭虫核糖体 5.8S rDNA 基因和核糖体间区 1、2 基因(ITS1, ITS2)。PCR 扩增反应体系包括: 1 \times PCR 反应缓冲液, 终浓度为 1.5mmol/L 的 MgCl₂, 0.4mmol/L 的 dNTPs, 0.1mg/mL BSA, 0.02U/ μ L Taq 酶(TaKaRa, 中国大连), 引物终浓度各为 0.5 μ mol/ μ L, 1 μ L DNA 模板(约 50ng)。PCR 反

表 1 本研究所用 rDNA 序列来源、宿主及样本数量
Tab. 1 Sources, hosts, and sample sizes of rDNA sequences used in this study

来源	宿主	样本数量	序列总数	参考文献	序列编号(数量)
中国, 山东(SD)	三疣梭子蟹 Pt(<i>Portunus trituberculatus</i>)	12	19	本研究	C001(5), C015(5), C019(9)
	三疣梭子蟹 Pt(<i>Portunus trituberculatus</i>)	18	23	本研究	050909(2), 051017(8), 060922(7), 080920(6)
中国, 浙江(ZJ)	拟穴青蟹 Sp(<i>Scylla paramamosain</i>)	6	8	本研究	060921(8)
	三疣梭子蟹 Pt(<i>Portunus trituberculatus</i>)		2	Shi <i>et al.</i> , unpubl.	JQ692310, JQ928405
中国, 广东(GD)	拟穴青蟹 Sp(<i>Scylla paramamosain</i>)	20	46	本研究	ST009(8), ST010(9), ST020(8), ST035(12), ST041(9)
美国, 得克萨斯(US)	兰蟹 Cal(<i>Callinectes sapidus</i>)	6	18	本研究	457(10), 462(8)
	挪威龙虾 Nep(<i>Nephrops norvegicus</i>)		1	Hanif <i>et al.</i> , 2013	JQ815886
欧洲, 苏格兰西海岸(EU)	黄道蟹 Can(<i>Cancer pagurus</i>)		4	Hamilton <i>et al.</i> , 2010	DQ871209, 12, EU096124, 15
	寄居蟹 Pag(<i>Pagurus bernhardus</i>)		1	Hamilton <i>et al.</i> , 2010	DQ871211
	绿蟹 Car(<i>Carcinus maenas</i>)		2	Hamilton <i>et al.</i> , 2010	EU096216, DQ871213
			13	Hamilton <i>et al.</i> , 2010	DQ871210, EF675760—65, EU096220—25

应循环: 95°C 预变性 2 分钟, 然后 94°C 变性 30 秒、57°C 退火 45 秒、72°C 延伸 30 秒、共 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 分钟。反应产物经 1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶(EtBr)染色后, 于紫外灯下观察并成像。

用 E.Z.N.A.TM 割胶回收试剂盒(Omega Bio-Tek, USA), 将目标片段(约 1.2 kb)割胶回收。然后利用 TaKaRa T 载体连接试剂盒将回收的目标片段连接至 pMDTM 19 T-Vector, 并转化至感受态大肠杆菌 DH5 α 。重组子经含有 X-Gal 和 IPTG 的平板蓝白斑筛选后, 选择含有目标片段的菌落进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.3 基因序列比对和遗传关系分析

为比较我国发现的血卵涡鞭虫(*Hematodinium* sp.)与其他国家、地区株系的遗传差异, 从 NCBI 基因数据库(www.nlm.nih.gov)中下载同时包含有 ITS1 和 ITS2 的代表性序列(表 1), 其中包括 2 条来自中国的序列(Accession nos. JQ928405, JQ692310), 20 条欧洲的序列(DQ871209—DQ871213, EF675760—EF675765, EU096214—EU096225), 和 1 条来自美国的序列(JQ815886)。用 MacVector 13.0 软件包(MacVector Inc., 美国)中的 Muscle 方法(Edgar, 2004)对下载序列以及本研究所得序列进行比对分析。

比对后的序列导入 PAUP 4.0(Swofford, 2002)软件, 计算遗传距离, 并用邻接法(Neighbor-joining, NJ)和最大似然法(Maximum-likelihood, ML)构建分子系统树, 并进行 1000 次自举分析(bootstrapping)检验系统树的可信度。

另外, 选取来源于我国的血卵涡鞭虫的代表性序列, 依据统计简约法(Statistical Parsimony Network, SPN)原理, 用 TCS 软件(Clement *et al*, 2000)构建序列的单倍型(Haplotype)网络图。

2 结果

2.1 血卵涡鞭虫基因型和出现频率

利用特异性 PCR 扩增, 从 56 个来自我国沿海的感染血卵涡鞭虫的螃蟹样本中共获得 96 条序列; 获得的特异性片段总长 1203—1208bp (不包括引物), 其中包含 ITS1 约 427bp, ITS2 约 393bp。从美国兰蟹样本扩增产生 18 条序列, 片段总长为 1218—1221bp。通过序列比对, 本研究得的中国株血卵涡鞭虫的序列与施慧等(Shi *et al*, unpubl.)提交 GenBank 的两条序列(JQ928405, JQ692310)相似度达 99.1%—

99.9%; 而本研究所得的美国株血卵涡鞭虫的序列与 Hanif 等从美国东海岸环境样品中测得的序列(JQ815886; Hanif *et al*, 2013)基本一致(相似度为 99.8%—99.9%)。统计分析显示, 来自我国沿海的血卵涡鞭虫序列可以分成 14 个单倍型(Haplotype); 其中单倍型 ST041a 有 45 条序列, 在我国沿海的出现频率为 45.9%, 单倍型 060922 和 ST030 分别有 15 条和 13 条, 发生频率为 15.3%和 13.3%, 其他的出现频率较低(<10%)。

根据样本采集的不同地理位置, 将本研究获得的序列分成山东(SD)、浙江(ZJ)和广东(GD)三个群体, 结果表明: 山东群体的序列多态性最低, 总共只发现 3 种单倍型, 其中单倍型 ST041a 出现频率最高, 达 52.6%; 浙江群体共有 8 个单倍型, 出现频率最高的两个单倍型为 ST041a 和 060922, 频率分别为 24.2%和 45.5%; 广东群体共有 5 个单倍型, 出现频率最高的是 ST041a 和 ST030, 频率分别为 58.7%和 28.3%。按宿主种类不同, 将这些序列分成三疣梭子蟹(Pt)和拟穴青蟹(Sp)两个群体。寄生于三疣梭子蟹的血卵涡鞭虫序列中共发现 10 个不同的单倍型, 其中单倍型 ST041a 和 060922 出现频率较高, 分别为 22.7%和 34.1%; 而宿主为青蟹的群体中, 共有 5 个单倍型, 其中 ST030 和 ST041a 的出现频率最高, 分别为 24.1%和 64.8%(表 2)。

2.2 单倍型网络图

单倍型网络图(图 1)明确显示了在我国沿海发现的 14 个血卵涡鞭虫单倍型之间的碱基差异(1 个节点代表 1 个碱基差异)。常见单倍型 ST041a 处于网络中心位置。另外, 这些单倍型的变异顺序没有呈现明显的规律, 即来源于同一地理群体或宿主的单倍型随机分布于单倍型网络中, 没有集中于某一或某几个分支中; 而且, 单倍型 ST041a 在各个地理群体和宿主群体中均有出现。

2.3 遗传距离与系统进化树

遗传距离分析表明, 我国沿海的血卵涡鞭虫株(CH)与美国株(US)遗传上较为相近, 遗传距离(D)为 0.027; 而欧洲冷水株(EU)与中美两个群体的遗传差异较大, 遗传距离分别为 0.236 和 0.259, 约为中美之间的十倍; 相较而言, 三个群体内部的遗传距离明显较小, 只有 0.001—0.003, 远小于中国群体与美国或欧洲群体之间遗传距离(表 3)。

对于我国沿海三个群体(SD、ZJ 和 GD)的进一步分析后发现(表 3), 这三个群体之间的遗传距离(0.001—

表 2 14 个单倍型在不同群体中的发生频率
Tab. 2 The frequencies of 14 haplotype in all geographic and host populations

来源	序列数量	单倍型 (Haplotype)													
		ST030	ST041a	080920a	080920b	ST010b	ST041b	050909a	050909b	060922	ST009c	C015	C001	JQ692310	JQ928405
SD	19	0.0%	<u>52.6%</u>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21.1%	<u>26.3%</u>	0.0%	0.0%
ZJ	33	0.0%	<u>24.2%</u>	12.1%	6.1%	0.0%	0.0%	3.0%	3.0%	<u>45.5%</u>	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	3.0%
GD	46	<u>28.3%</u>	<u>58.7%</u>	0.0%	0.0%	4.3%	4.3%	0.0%	0.0%	0.0%	4.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Pt	44	0.0%	<u>22.7%</u>	9.1%	4.5%	0.0%	0.0%	2.3%	2.3%	<u>34.1%</u>	0.0%	9.1%	11.4%	2.3%	2.3%
Sp	54	<u>24.1%</u>	<u>64.8%</u>	0.0%	0.0%	3.7%	3.7%	0.0%	0.0%	0.0%	3.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
总计	98	13.3%	<u>45.9%</u>	4.1%	2.0%	2.0%	2.0%	1.0%	1.0%	<u>15.3%</u>	2.0%	4.1%	5.1%	1.0%	1.0%

注: 下划线数字代表各群体中出现频率较高的两个单倍型的发生频率; SD, 山东; ZJ, 浙江; GD, 广东; Pt, 三疣梭子蟹; Sp, 拟穴青蟹

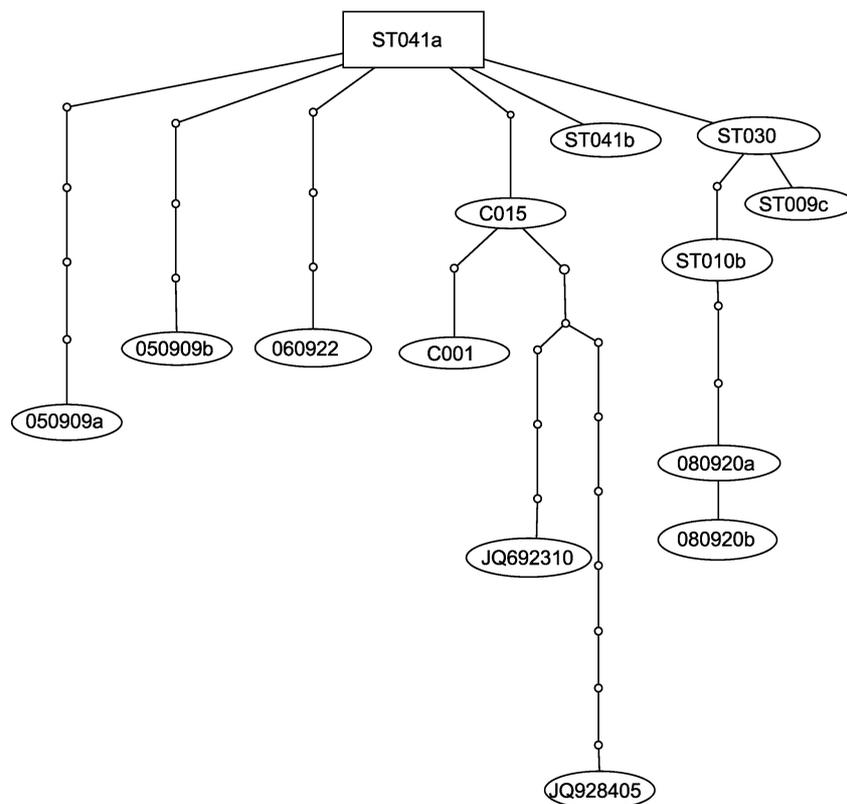


图 1 14 个在中国沿海发现的 rDNA 基因单倍型的 TCS 网络图
Fig. 1 The TCS network of the 14 rDNA haplotypes observed along Chinese coast

0.003)与三个群体内部的遗传距离(0.001—0.004)无明显差异;另外,按宿主群体划分后的进一步分析结果表明,三疣梭子蟹(Pt)和青蟹(Sp)两个群体之间的遗传差异(0.002)与各自群体内部的(0.001—0.003)遗传差异也没有明显不同。

本研究中用最大似然法(ML)和邻接法(NL)构建的系统进化树基本一致,都可以将所有血卵涡鞭虫序列分成三个独立的类群;其中,来源于欧洲的序列组成一支,来源于中国和美国的序列各组成亲缘关

系较近的姊妹支(图2)。然而,来源于不同宿主的序列无明显聚类规律,例如,欧洲分支中来源于四种不同宿主(挪威龙虾、黄道蟹、寄居蟹和绿蟹)的序列相互交叉,没有进一步分化聚类(图2)。

3 讨论

本研究对我国山东、浙江和广东三地感染不同宿主的血卵涡鞭虫样本进行 rDNA 测序和遗传分析。结果表明,我国沿海不同地理群体和侵染不同宿主的

表 3 不同群体之间的遗传距离(D)
Tab.3 The pairwise genetic distances (D) among populations from different geographic locations and hosts

		遗传距离		
		CH	US	群体内
不同国家地区 ^a	CH			0.002
	US	0.027		0.001
	EU	0.236	0.259	0.003
中国群体不同省份 ^b	SD		ZJ	0.001
	ZJ	0.002		0.004
	GD	0.001	0.003	0.001
中国群体不同宿主 ^c	Pt			0.003
	Pt			0.003
	Sp	0.002		0.001

注: ^aCH, 中国; US, 美国; EU, 欧洲; ^bSD, 山东; ZJ, 浙江; GD, 广东; ^cPt, 三疣梭子蟹; Sp, 拟穴青蟹

血卵涡鞭虫不存在明显的遗传差异, 应来源于同一自然群体; 我国沿海的血卵涡鞭虫群体为一独立的遗传株系, 与寄生于美国兰蟹的 *H. perezii* 基因型 有显著的遗传差异(遗传距离 $D=0.027$), 而与寄生于苏格兰龙虾和阿拉斯加雪蟹等冷水型动物中的株系遗传差异更大($D=0.236$)。根据 Small 等的分类体系 (Small *et al* 2013), 我国沿海养殖蟹类中的血卵涡鞭虫可暂定为 *H. perezii* 基因型 , 这与前人的研究结果一致(许文军等, 2007a; Xu *et al*, 2010; Li *et al*, 2013)。

然而, 目前国际上对于血卵涡鞭虫的系统分类还存在一定的分歧。如前所述, *H. perezii* 种下的三个基因型群体存在明显的遗传差异, 核糖体基因序列的差异高达 2.7%—4.3% (Hudson *et al*, 1996; Jensen *et al*, 2010; Small *et al*, 2013), 与甲藻纲中众多常见种之间的遗传差异相当(Litaker *et al*, 2007; Stern *et al*, 2012)。Small 等人根据宿主类型、地理分布和遗传差异, 曾一度建议将感染美国兰蟹的血卵涡鞭虫定为独立的种, 不同于来源于欧洲黄道蟹的模式种 *H. perezii*(基因型), 但终因缺少形态、生活史等方面的证据, 而将其定义为 *H. perezii* 种下的一个基因型(*H. perezii* 基因型 ; Small *et al*, 2012; Small, 2013)。Jesen 等(2010)也发现感染阿拉斯加雪蟹的 *H. sp.*, 在核糖体小亚基基因的保守区核酸序列和二级结构上, 与感染苏格兰龙虾的类似, 而与来自温带地区的两个基因型(*H. perezii* 基因型 和)存在明显的区别, 暗示着流行于这些冷水地区的血卵涡鞭虫可能是不

同于 *H. perezii* 的新种或类型。然而, *Hematodinium* 属和 *H. perezii* 种下的确切分类地位, 还有待于在形态学、生活史和交叉感染实验等方面的进一步研究。在生活史研究方面, 仅有寄生于苏格兰龙虾和美国兰蟹中的株系完成了连续体外培养, 也发现了一些生活史阶段的差异(Appleton *et al*, 1998; Li *et al*, 2011)。对我国株系的研究, 以及与 *H. perezii* 另外两个基因型 (和)的对比研究, 将有助于明确这几个基因型是否存在遗传信息以外的差异; 另外, 交叉感染实验可以研究这些地理株系是否存在明显的生殖隔离, 从而探讨这些群体的遗传差异的起因。这些研究可以为 *Hematodinium* 属下种或基因型的界定提供一定的依据和帮助。

我国的血卵涡鞭虫株系可以感染多种甲壳类宿主。本研究发现取自各个地理群体或宿主群体的株系, 遗传相似度达 99.7%—99.9%, 远高于中国群体与美国或欧洲群体之间的相似度(分别为 97.3%、76.4%), 表明我国养殖蟹类中的血卵涡鞭虫群体遗传差异较小, 属于同一个群体。我们进一步分析了我国血卵涡鞭虫群体单倍型遗传关系及发生频率, 发现该群体存在一定的遗传多态性, 总共发现了 14 个不同的单倍型, 其中单倍型 ST041a 在各个群体中都有出现, 且频率较高。然而, 根据这些单倍型的变异顺序(图 1)以及各个群体的发生频率(表 2), 发现这些单倍型的变异和分布, 没有明显的规律。因此, 可推断我国沿海三地和不同宿主中的 *Hematodinium* 群体未发生明显的遗传隔离, 应为同一株系、同一群体。与此类似, Pagenkopp Lohan 等(2012; 2013)发现流行于美国东海岸兰蟹中的 *Hematodinium* 株(即 *H. perezii*, Genotype), 分布南至得克萨斯、北至麻塞诸塞州沿岸, 能够感染寄居蟹、桡足类等其它 7 种甲壳类, 而且无明显遗传差异; 另外, 在欧洲大西洋沿岸也发现报道了能侵染多种宿主的 *Hematodinium* 株系 (Hamilton *et al*, 2010)。由此, 有学者认为血卵涡鞭虫是一类“泛宿主(host generalist)”寄生性病原 (Hamilton *et al*, 2010; Pagenkopp Lohan *et al*, 2012)。另外, 国外其它地区的 *Hematodinium* spp. 普遍流行于高盐度水体环境中(>18ppt; Stentiford *et al*, 2005), 而我国发现的血卵涡鞭虫株能够在低盐水域(<9ppt) 流行(Li *et al*, 2008)。我国发现的这类寄生性甲藻病原为何对盐度有如此广泛的适应性, 以及这类病原如何规避不同种类甲壳动物宿主的免疫机制而导致感染等, 都值得进一步探讨。相关科学问题的阐释有助

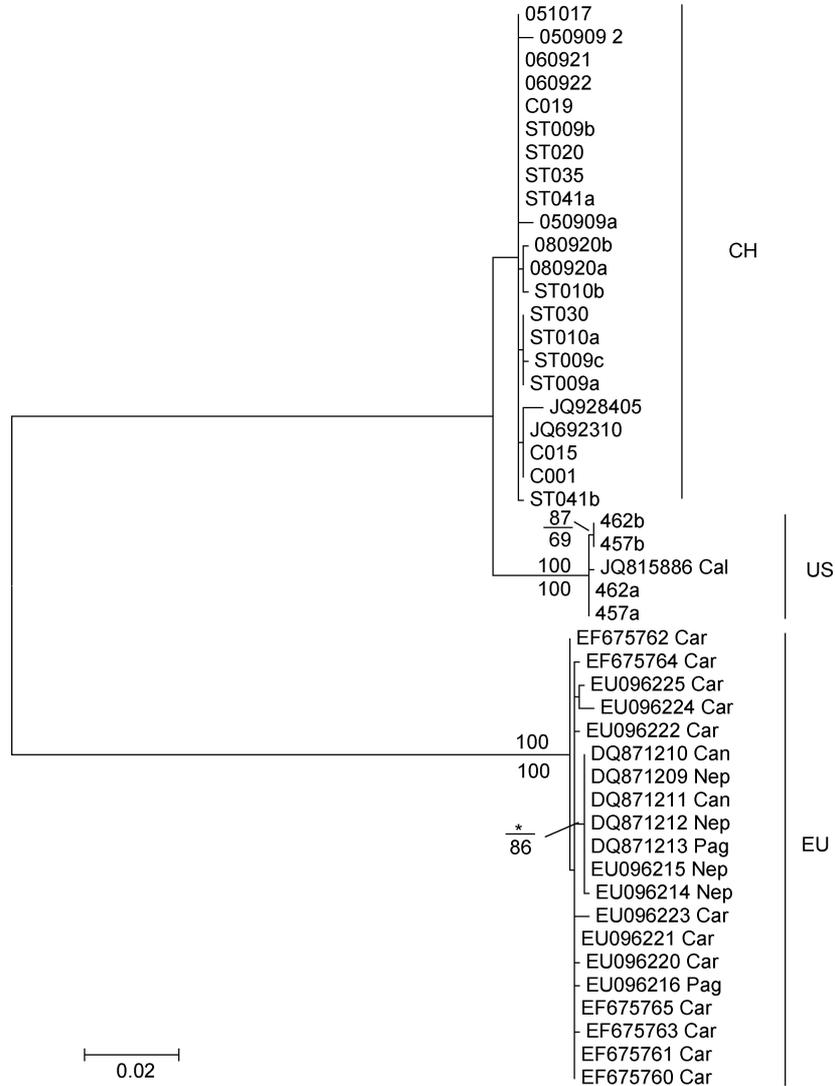


图 2 基于 rDNA 序列构建的 *Hematodinium* spp. 系统进化树。

Fig.2 Phylogenetic analysis on *Hematodinium* spp. in rDNA sequence

注: 横线上的数字代表 NJ 分析法的自举值, 横线下的为 ML 分析法自举值

于针对现行养殖模式提出合理建议, 进而避免这类“泛宿主”型流行性病原在不同种类养殖动物中进一步传播扩散。

参 考 文 献

- 刘 顺, 戴瑜来, 周素明等, 2014. 拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) 血卵涡鞭虫病的流行病学分析. 海洋与湖沼, 45(3): 595—601
- 许文军, 施 慧, 徐汉祥等, 2007a. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究. 水生生物学报, 31(5): 637—640
- 许文军, 绳秀珍, 徐汉祥等, 2007b. 血卵涡鞭虫在养殖锯缘青蟹中的寄生. 中国海洋大学学报, 37(6): 916—920
- 李才文, 许文军, 2014. 海水甲壳类寄生性甲藻 *Hematodinium* spp. 研究进展. 海洋与湖沼, 45(1): 1—11
- 吴清洋, 李远友, 夏小安等, 2010. 汕头牛田洋沿海围垦区锯缘青蟹病害爆发的环境因素. 生态学报, 30(8): 2043—2048
- Appleton P L, Vickerman K V, 1998. 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. Parasitology, 116(Pt 2): 115—130
- Chatton E, Poisson R, 1931. Sur l'existence, dans le sang des Crabes, de Péridiniens parasites: *Hematodinium perezi* n. g., n. sp. (Syndinidae). Comptes Rendus Seances Soc Biol Paris, 105: 553—557
- Clement M, Posada D, Crandall K A, 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology, 9(10): 1657—1659
- Edgar R C, 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32(5): 1792—1797
- Field R H, Chapman C J, Taylor A C *et al*, 1992. Infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by a *Hematodinium*-

- like species of dinoflagellate on the west coast of Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 1—15
- Hamilton K M, Morrill D, Shaw P W, 2010. Genetic diversity of the crustacean parasite *Hematodinium* (Alveolata, Syndinea). *European Journal of Protistology*, 46(1): 17—28
- Hanif A W, Dyson W D, Bowers HA *et al*, 2013. Variation in spatial and temporal incidence of the crustacean pathogen *Hematodinium perezii* in environmental samples from Atlantic Coastal Bays. *Aquatic Biosystem*, 9(1): 11
- Hudson D A, Adlard R D, 1996. Nucleotide sequence determination of the partial SSU rDNA gene and ITS1 region of *Hematodinium* cf. *perezii* and *Hematodinium* like dinoflagellates. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24(1): 55—60
- Hudson D A, Shields J D, 1994. *Hematodinium australis* n. sp., a parasitic dinoflagellate of the sand crab *Portunus pelagicus* from Moreton Bay, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19: 109—119
- Jensen P C, Califf K, Lowe V *et al*, 2010. Molecular detection of *Hematodinium* sp. in Northeast Pacific *Chionoecetes* spp. and evidence of two species in the Northern Hemisphere. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89(2): 155—166
- Li C, Miller T L, Small H J *et al*, 2011. *In vitro* culture and developmental cycle of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Parasitology*, 138(14): 1924—1934
- Li C W, Song S Q, Liu Y *et al*, 2013. *Hematodinium* infections in cultured Chinese swimming crab, *Portunus trituberculatus*, in northern China. *Aquaculture*, 396—399: 59—65
- Li Y Y, Xia X A, Wu Q Y *et al*, 2008. Infection with *Hematodinium* sp. in the mud crabs *Scylla serrata* cultured in low salinity water in southern China. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(2): 145—150
- Litaker R W, Vandersea M W, Kibler S R *et al*, 2007. Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 43(2): 344—355
- Messick G A, Shields J D, 2000. Epizootiology of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. in the American blue crab *Callinectes sapidus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(2): 139—152
- Pagenkopp Lohan K M, Reece K S, Miller T L *et al*, 2012. The role of alternate hosts in the ecology and life history of *Hematodinium* sp. a parasitic dinoflagellate of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Journal of Parasitology*, 98(1): 73—84
- Pagenkopp Lohan K M, Small H J, Shields J D *et al*, 2013. Conservation in the first internal transcribed spacer (ITS1) region of *Hematodinium perezii* (genotype) from *Callinectes sapidus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103(1): 65—75
- Sheppard M, Walker A, Frischer M E *et al*, 2003. Histopathology and prevalence of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. in crabs (*Callinectes sapidus*, *Callinectes similis*, *Neopanope sayi*, *Libinia marginata*, *Menippem ceraria*) from a Georgia estuary. *Journal of Shellfish Research*, 22: 873—880
- Shields J D, 1994. The parasitic dinoflagellates of marine crustaceans. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 241—271
- Small H J, 2013. Advances in our understanding of the global diversity and distribution of *Hematodinium* spp.—significant pathogens of commercially exploited crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2): 234—246
- Small H J, Shields J D, Reece K S *et al*, 2012. Morphological and molecular characterization of *Hematodinium perezii* (Dinophyceae: Syndiniales), a dinoflagellate parasite of the harbour crab, *Liocarcinus depurator*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(1): 54—66
- Stentiford G D, Shields J D, 2005. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1): 47—70
- Stern R F, Andersen R A, Jameson I *et al*, 2012. Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate dinoflagellate barcode marker. *PLoS ONE* 7(8): e42780. doi: 10.1371/journal.pone.0042780
- Swofford D L, 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), Version 4. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Xu W J, Xie J J, Shi H *et al*, 2010. *Hematodinium* infections in cultured ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture*, 300(1—4): 25—31

GENETIC DIVERSITY OF PARASITIC DINOFLAGELLATE *HEMATODINIUM* SP. ALONG CHINESE COAST

XIAO Jie^{1,2}, ZHANG Xue-Lei^{1,2}, LIU Rui-Juan^{1,2}, LI Cai-Wen³

(1. *The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China*; 2. *Key Lab of Science and Engineering for Marine Ecological Environment, Qingdao 266061, China*; 3. *Key Lab of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*)

Abstract Parasitic dinoflagellate *Hematodinium* spp. infects marine crustaceans worldwide. We studied the nucleotide sequence variations of rDNA genes (5.8S, ITS1, and ITS2) and investigated the genetic variations among *Hematodinium* populations from three geographic locations in China (Shandong, Zhejiang, and Guangdong) and two hosts (*Portunus trituberculatus* and *Scylla paramamosain*). We observed 14 haplotypes in total, and one haplotype (ST041a) was detected in all geographic and host populations in relatively high frequency. Further genetic analysis revealed that the genetic difference among the three geographic populations and those infecting different hosts were not significant. Furthermore, the Chinese strain was a monophyletic clade and assigned tentatively as *H. perezi* Genotype II. It was genetically closer to the strain infecting blue crabs in the eastern coasts of the U.S. (genetic distance $D=0.027$), while divergent from the European populations ($D=0.236$). It can be confirmed that *Hematodinium* spp. was a “host generalists”, which may infect various crustaceans in an epidemic region. Therefore, cautions shall be taken in aquaculture practice, such as culturing different crustacean species in the same ponds and introduction among crab stocks along the coasts of China.

Key words parasitic dinoflagellate; crustacean; genetic variation; geographic distribution; ribosomal DNA