

文章编号:1001-7380(2017)04-0040-03

马鸡属球虫的形态学鉴定及其与宿主协同进化探讨

吕思絮¹, 凌 桑¹, 余永帆¹, 施静宇¹, 何 清¹, 程王琨², 陈 蓉², 刘宏毅^{1*}

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心 生物与环境学院, 江苏 南京 210037;

2. 南京市红山森林动物园兽医院, 江苏 南京 210028)

摘要:以南京市某动物园圈养的蓝马鸡和褐马鸡为研究对象,使用显微摄影技术与图谱比对的方法鉴别马鸡属(*Crossoptilon*)动物感染的球虫种类。结果表明,马鸡粪便中分离到的球虫种类均属于原鸡属(*Gallus*)动物中发现的艾美球虫(*Eimeria*),不同于火鸡属(*Meleagris*)动物携带的艾美球虫,其中蓝马鸡携带球虫为布氏艾美球虫,褐马鸡携带球虫属于堆型艾美球虫。球虫寄生宿主特异性与马鸡属、原鸡属、火鸡属动物的系统进化关系相对应,这可能是球虫与宿主协同进化的结果。因此,动物园需加强原鸡属与马鸡属动物间球虫交叉感染的防治工作。

关键词:马鸡属; 原鸡属; 球虫; 宿主特异性; 协同进化

中图分类号:Q959.115⁺3;S852.72⁺3

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2017.04.009

Morphological identification of *Eimeria* sp. parasitizing Genus *Crossoptilon* and discussion on co-evolution between coccidia and their hosts

LYU Si-xu¹, LING Shen¹, YU Yong-fan¹,

SHI Jing-yu¹, HE Qing¹, CHENG WANG Kun², CHEN Rong², LIU Hong-yi^{1*}

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Veterinary Hospital, Nanjing Hongshan Forest Zoo, Nanjing 210028, China)

Abstract: *Crossoptilon auritum* and *C. mantchuricum* in a zoo of Nanjing were used as experimental animals. Micrography and pictures of coccidial species were adopted to figure out which species parasitizing *Crossoptilon*. The experiment results showed that the *Eimeria* species isolated from *Crossoptilon* were in accordance with species in *Gallus*, different from the species from *Meleagris*. To be specific, *Eimeria brunetti* and *E. acervulina* were respectively isolated from *C. auritum* and *C. mantchuricum*. The host specific of *Eimeria* species from Family Phasianidae was in keeping with the evolutionary relationships among *Crossoptilon*, *Gallus* and *Meleagris*, which might be caused by co-evolution between the *Eimeria* species and their hosts. So the zoos need preventing and controlling the occurrence of cross infection of coccidia between *Crossoptilon* and *Gallus* in future.

Key words: *Crossoptilon*; *Gallus*; Coccidia; Host specificity; Co-evolution

球虫病是危害雉科(Phasianidae)动物健康的主要疾病,该病是由球虫寄生宿主消化道所引发^[1]。

收稿日期:2017-05-10;修回日期:2017-07-03

基金项目:南京林业大学大学生创新训练计划项目“鹤类球虫的分离与鉴定研究”(2016NFUSPITP202);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介:吕思絮(1995-),女,河南郑州人,大学本科生。主要从事濒危野生动物病原生态学 research。

*通信作者:刘宏毅(1984年-),男,广西桂林人,讲师,博士。主要从事动物生态学与保护遗传学研究。

因宿主消化道上皮细胞大量破坏和机体中毒,患病动物常会出现共济失调、腹泻带血等症状,死亡率极高^[2]。目前对雉科动物球虫的研究大都集中在原鸡属(*Gallus*)和火鸡属(*Meleagris*)等经济动物上,对于雉科其他成员的研究尚不多见。在对原鸡与火鸡的研究中发现,两属间感染球虫的种类及其对各种球虫的敏感度存在显著差异,雉科球虫寄生具有较强的宿主特异性,这可能与球虫和宿主间的协同进化相关^[3-5]。

马鸡属(*Crossoptilon*)是雉科中体形较大的一类,是典型的山区森林地带鸟类,其中蓝马鸡(*C. auritum*)与褐马鸡(*C. mantchuricum*)是我国特有种^[6]。蓝马鸡分布于青海东北部、甘肃西北祁连山一带及南部、宁夏贺兰山及四川北部,主要栖息在以云杉、油松为主的亚高山针叶林和以山柳、腊梅为主的灌木丛中^[6-7]。褐马鸡则分布于河北和山西的西北部,主要栖息在以落叶松、云杉、次生林为主的林区和落叶松、云杉、杨树、桦树次生针阔混交森林中^[6,8]。蓝马鸡与褐马鸡虽为同属近缘种,但其分布范围互不交错,且栖息地生态环境相差较大,故其所面对的自然选择压力应存在差异,2者携带的球虫种类和对各种球虫的敏感度可能有所不同^[9-11]。

本研究以动物园内饲养的蓝马鸡和褐马鸡为研究对象,使用显微摄影技术与图谱比对的方法鉴别2种动物携带球虫的种类,以揭示马鸡属球虫与近缘属球虫间的联系,并在此基础上探讨球虫与宿主间的协同进化问题,为马鸡的球虫病预防研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 南京市某动物园圈养的蓝马鸡和褐马鸡各1群。收集其粪便共11份,其中蓝马鸡粪便6份,褐马鸡粪便5份。

1.1.2 试验卵囊 采用饱和食盐水漂浮法收集并镜检蓝马鸡和褐马鸡粪便中可能存在的球虫卵囊。11份粪便均发现球虫卵囊,用于后续试验。

1.1.3 试验试剂 饱和食盐水(氯化钠380 g溶解于1 L水中)、2.5%重铬酸钾溶液(25 g重铬酸钾溶解于1 L蒸馏水中)。

1.1.4 试验器材 电子显微镜、恒温培养箱、高速离心机、分析天平、筛子(40目,0.45 mm;260目,0.058 mm)、载玻片、盖玻片、锥形瓶、量筒、胶头滴

管、离心管、培养皿等。

1.2 方法

1.2.1 粪检 用牙签挑取黄豆大的粪便样品,将其置于含少量饱和食盐水的小瓶中,充分搅拌后,缓慢添加饱和食盐水至瓶口,在瓶口处覆盖载玻片1块,静置20 min,后将载玻片迅速上提放平镜检。

1.2.2 球虫卵囊收集 将含球虫卵囊的粪便与蒸馏水充分混合成糊状,用40目和260目筛子先后过滤1次。滤液置于离心管中,以3 000 r/min离心10 min,收集沉淀弃上清液。向沉淀物中加蒸馏水再次离心。最后收集沉淀并镜检拍照,记录卵囊个数、大小及形态指数(卵囊长度/卵囊宽度)等。

1.2.3 沉淀法培养 将收集到的沉淀物置于培养皿中,加入10倍体积2.5%重铬酸钾溶液,置于温度为28℃,相对湿度为33%的恒温箱中培养,期间不时用胶头滴管进行吹打。培养24,48 h后,观察卵囊分化率,测量孢子大小并照相。

1.2.4 形态学鉴定 综合卵囊和孢子囊的大小、形态结构、形态指数以及孢子的形态结构及个数等信息,对比参照文献中记录的原鸡属和火鸡属球虫特征,从形态学角度鉴定马鸡属球虫种类^[3]。

2 结果与分析

2.1 球虫卵囊分化率

对培养后的蓝马鸡和褐马鸡球虫进行镜检,结果发现,培养24 h的蓝马鸡球虫分化率为7.07%,褐马鸡球虫分化率为28.57%;培养48 h的蓝马鸡球虫分化率为69.5%,褐马鸡球虫分化率为85.0%(见表1)。

表1 蓝马鸡和褐马鸡球虫卵囊培养24, 48 h后的分化率

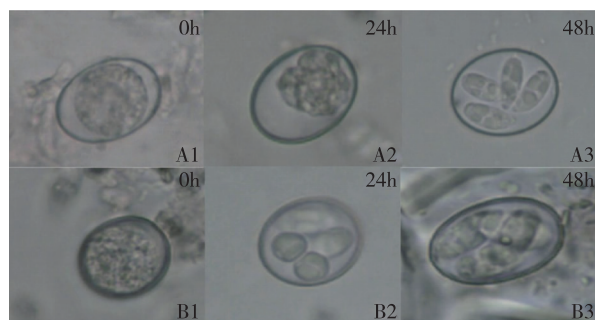
类别	24 h			48 h		
	检查数	分化数	分化率/%	检查数	分化数	分化率/%
蓝马鸡	99	7	7.07	243	169	69.5
褐马鸡	42	12	28.57	80	68	85.0

2.2 球虫种类形态学特征

2.2.1 蓝马鸡球虫形态学特征 卵囊呈卵圆形,大小为24.61 μm(22.25—28.58 μm)×18.27 μm(16.01—21.48 μm),卵囊壁光滑,无胚孔,无卵囊余体。卵囊形态指数为1.35(1.04—1.79)(见图1A1)。孢子囊为长椭圆形或卵圆形,大小为11.34

μm (9.40—14.22 μm) \times 5.01 μm (3.13—7.27 μm), 子孢子具斯氏体和孢子囊余体, 且具有折光球 (见图 1A2, A3)。与已公布的原鸡球虫和火鸡球虫图谱进行对比, 初步鉴定为布氏艾美球虫 (*Eimeria brunetti* Levine, 1942)。

2.2.2 褐马鸡球虫形态学特征 卵囊呈卵圆形或近球形, 大小为 18.56 μm (16.88—21.36 μm) \times 14.41 μm (12.97—16.52 μm), 壁光滑, 有 2 层卵囊壁, 无胚孔, 有极粒, 无卵囊余体。卵囊形态指数为 1.29 (1.02—1.65) (见图 1B1)。孢子囊为卵圆形或近球形, 大小为 8.16 μm (6.14—11.28 μm) \times 4.94 μm (3.33—5.96 μm), 具有斯氏体, 无孢子囊余体 (见图 1B2, B3)。与已公布的原鸡球虫和火鸡球虫图谱进行对比, 初步鉴定为堆型艾美球虫 (*Eimeria acervulina* Tyzzer, 1929)



A1. 蓝马鸡球虫未孢子化卵囊; A2. 蓝马鸡球虫培养 24 h 后卵囊; A3. 蓝马鸡球虫培养 48 h 后卵囊; B1. 褐马鸡球虫未孢子化卵囊; B2. 褐马鸡球虫培养 24 h 后卵囊; B3. 褐马鸡球虫培养 48 h 后卵囊

图 1 蓝马鸡和褐马鸡球虫卵囊孢子化前后形态结构 ($\times 400$)

3 讨论

目前关于雉科球虫的研究主要针对原鸡属和火鸡属等经济物种, 而对雉科其他成员球虫的报道甚少。本研究从形态学角度鉴定了马鸡属中蓝马鸡和褐马鸡所感染的球虫种类。蓝马鸡感染的球虫特征与近缘属原鸡寄生的布氏艾美球虫特征基本一致^[3], 褐马鸡所感染的球虫特征与原鸡寄生的堆型艾美球虫特征基本吻合^[3]。马鸡属所感染的球虫与原鸡属的球虫相同, 而与火鸡属感染球虫种类相差较大。该结果与马鸡、原鸡、火鸡的系统进化关系相对应, 为球虫与宿主协同进化提供了有力依据^[12-13]。

蓝马鸡和褐马鸡虽然为同属近缘物种, 但其栖息地范围和野外生态环境存在较大差异, 其所面对由球虫介导的自然选择压力可能不尽相同^[9-11]。2 种马鸡在动物园内的饲养环境较为统一, 而鉴定结果显示其所感染的球虫种类并不相同, 所以推测 2 种马鸡对各种球虫的敏感度可能存在一定差异。但由于马鸡属国家保护动物, 本研究未进行饲喂试验, 其对各种球虫的敏感度和耐受度仍需进一步验证。而宿主对球虫的敏感度和耐受度是 2 者相互作用, 协同进化的结果^[14]。

本研究仅采用形态学标记对马鸡属球虫进行了分类鉴定, 鉴定精度稍显不足。随着分子标记技术的发展, 诸如 ITS 和 18S rDNA 序列已被广泛应用于球虫分类学研究中^[15-17]。此外, 在确定球虫新种株, 研究其毒性方面, 分子标记技术亦发挥着重要作用^[18]。因此, 还需从分子角度对马鸡属球虫的分类及系统进化关系进行深入研究。

参考文献:

- [1] 索 勋, 李国清. 鸡球虫病 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2] 崔 宁. 禽白血病毒和柔嫩艾美耳球虫共感染致病机制研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [3] 左仰贤. 畜禽和人体的球虫与球虫病 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [4] OGEDENGBE J D, OGEDENGBE M E, HAFEEZ M A, et al. Molecular phylogenetics of eimeriid coccidia (Eimeriidae, Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata): A preliminary multi-gene and multi-genome approach [J]. Parasitology Research, 2015, 114 (11): 4149-4160.
- [5] VRBA V, PAKANDL M. Host specificity of turkey and chicken *Eimeria*: controlled cross-transmission studies and a phylogenetic view [J]. Veterinary Parasitology, 2015, 208 (3-4): 118-124.
- [6] 赵正阶. 中国鸟类志 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001.
- [7] 李志刚, 胡天华, 翟 昊. 贺兰山蓝马鸡春夏季对栖息地的选择 [J]. 野生动物学报, 2009, 30 (6): 310-313.
- [8] 张国钢, 张正旺, 郑光美, 等. 山西五鹿山褐马鸡不同季节的空间分布与栖息地选择研究 [J]. 生物多样性, 2003, 11 (4): 303-308.
- [9] BORGHANS J A, BELTMAN J B, DE BOER R J. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution [J]. Immunogenetics, 2004, 55 (11): 732-739.
- [10] 韩晓卓. 进化过程中的生态位构建理论及其空间模拟研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [11] 孟繁星. 鲢鱼三种先天免疫基因克隆及分子进化研究 [D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2012.

(下转第 48 页)

3 结语

初步引种和造林试验表明,对节白蜡在徐州地区有较好的适应性。通过短期苗木生长情况观察和石灰岩山地造林试验,可以初步确定,对节白蜡苗木适应性较强,栽植时运用聚丙烯酰胺型保水剂、ABT3 号生根粉等辅助造林措施,促进了苗木生长,长势良好,是石灰岩山地造林的优良树种,可以进一步扩大在徐州地区的引种试验和观察,为全面推广对节白蜡在石灰岩山地造林的应用提供科学、可靠的依据。

参考文献:

- [1] 苏丕林,明 军,胡功强,等.对节白蜡资源综合开发利用价值与展望[J].湖北林业科技,1995(4):1-5.
- [2] 杨湘虹,赵荣秋,刘乐承.对节白蜡的应用与繁殖研究进展[J].

长江大学学报(自然科学版),2016,13(27):4-7.

- [3] 高学锋.对节白蜡的引进及应用[J].甘肃林业,2011(4):39-40.
- [4] 苏丕林.对节白蜡的繁殖[J].湖北林业科技,1995(3):14-20.
- [5] 袁继功,张东林.对节白蜡在京津地区的引种栽培[J].林业实用技术,2002(8):22-23.
- [6] 徐州市农业区划委员会.徐州市农业资源与综合区划[M].南京:江苏科技出版社,1991.
- [7] 王 丽,徐排胜,张承敏,等.美国白蜡、绒毛白蜡引种育苗试验初报[J].江苏林业科技,2006,33(6):26-27.
- [8] 谢留运,徐洪成.对节白蜡幼苗移栽育苗试验初报[J].湖北林业科技,1995(3):25-26.
- [9] 刘 英,马宇鹏,陈凤芝,等.新疆小叶白蜡育苗造林试验初报[J].内蒙古林业科技,2007,33(3):11-12.
- [10] 王文才,刘 蓉,易明兵.对节白蜡种子育苗技术[J].湖北林业科技,2013,42(6):87-88.
- [11] 秦 飞,关庆伟,陈 平.石灰岩山地工程造林技术设计及效果调查[J].林业科技,2009,34(4):27-31.

(上接第 42 页)

- [12] BUSH K L, STROBECK C. Phylogenetic relationships of the phasianidae reveals possible non-pheasant taxa [J]. Journal of Heredity, 2003, 94(6): 472-489.
- [13] 包新康,刘洒发,顾海军,等.鸡形目鸟类系统发生研究现状[J].动物分类学报,2008,33(4):720-732.
- [14] MORAND S, MANNING S D, WOOLHOUSE M E. Parasite-host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility [J]. Proceedings Biological Sciences, 1996, 263(1366):119-128.
- [15] KAWAHARA F, ZHANG G H, MINGALA C N, et al. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on

ITS-1 region of rRNA in bovine Eimeria parasites [J]. Veterinary Parasitology, 2010, 174(1-2):49-57.

- [16] EL-SHERRY S, OGEDENGBE M E, HAFEEZ M A, et al. Divergent nuclear 18S rDNA paralogs in a turkey coccidium, *Eimeria meleagridis*, complicate molecular systematics and identification [J]. International Journal for Parasitology, 2010, 40(8):679-685.
- [17] YAN W, WANG W, WANG T, et al. Simultaneous identification of three highly pathogenic Eimeria species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments [J]. Veterinary Parasitology, 2013, 193(1-3):284-288.
- [18] 夏延富.鸡球虫不同种株的 ITS 序列及 RAPD 分析[D].长沙:湖南农业大学,2009.