

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ LOÀI *Kudoa scomberomori*
(Myxosporea: Kudoidae) LẦN ĐẦU TIÊN GHI NHẬN Ở CÁ THU CHẤM
Scomberomorus guttatus (Scombridae) TẠI VÙNG BIỂN VEN BỜ
TỈNH QUẢNG BÌNH**

**Nguyễn Ngọc Chính^{1*}, Hà Duy Ngọ¹,
Nguyễn Hữu Đức², Nguyễn Thùy Linh³, Phạm Ngọc Doanh¹**

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Bệnh viện Quân Y 103, Học viện Quân Y

TÓM TẮT: Giống *Kudoa* có khoảng 100 loài đã được mô tả. Ở Việt Nam, cho đến nay chỉ phát hiện một loài *Kudoa monodactyli* ký sinh trên cá Chim khoang (*Monodactylus argenteus*). Trong quá trình nghiên cứu ký sinh trùng ở cá biển ven bờ tỉnh Quảng Bình năm 2017, chúng tôi thu được các mẫu trùng bào tử sợi Myxosporea thuộc giống *Kudoa* ký sinh trong mô cơ vân của 8/15 cá thể cá Thu chấm *Scomberomorus guttatus*. Kết hợp phân tích hình thái và phân tử dựa trên trình tự đoạn gen 18S rDNA đã xác định chúng thuộc loài *Kudoa scomberomori*. Bào tử có hình bông hoa với 6 mảnh van và nang cực. Các bào tử tập trung trong các nang giả màu trắng có kích thước 0,1-0,3 × 0,4-0,7 mm. Kết quả phân tích đoạn gen 18S rDNA cho thấy mẫu *K. scomberomori* thu tại Quảng Bình tương đồng cao (99,88%) với trình tự của loài *K. scomberomori* từ Queensland, Ôxtrâyli. Đây là lần đầu tiên loài *K. scomberomori* được ghi nhận ở Việt Nam và cá Thu chấm (*Scomberomorus guttatus*) được ghi nhận là vật chủ mới của loài này.

Từ khóa: *Scomberomorus guttatus*, *Kudoa scomberomori*, Quảng Bình, 18S rDNA.

MỞ ĐẦU

Giống *Kudoa* Meglitsch, 1947 đặc trưng bởi bốn hoặc nhiều hơn bốn mảnh van (valves), mỗi mảnh van chứa một nang cực (polar capsule) (Whipps et al., 2004). Đây là giống có số lượng loài lớn với khoảng 100 loài đã được ghi nhận và mô tả trên cá biển và cá cửa sông trên thế giới (Eiras et al., 2014). Các loài được phát hiện chủ yếu trên mô cơ vân của cá, đôi khi ở não, màng treo ruột, thành ruột, túi mật, tim và buồng trứng (Mansour et al., 2014). Tùy vào vị trí nhiễm, chúng có thể gây ra chứng viêm màng não, suy tim hoặc vô sinh ở cá. Bên cạnh đó, các loài thuộc giống *Kudoa* có thể làm giảm giá trị thương mại của cá do sản phẩm thịt cá nhiễm các bào tử *Kudoa* này nhanh bị nhũn dưới tác động của enzyme protease do các bào tử này tiết ra (Whipps et al., 2003). Hiện tượng ngộ độc ở người do ăn cá bị nhiễm loài *K. septempunctata* đã được ghi nhận tại Nhật Bản (Kawai et al., 2012).

Ở Việt Nam, cho đến nay mới ghi nhận một loài *K. monodactyli* trên cá Chim khoang (*Monodactylus argenteus*) (Nguyễn Ngọc Chính

và nnk., 2015). Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp nghiên cứu hình thái học và phân tích đoạn gen 18S rDNA, chúng tôi lần đầu tiên ghi nhận loài *K. scomberomori* ký sinh trên cá Thu chấm (*Scomberomorus guttatus*) ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu thập mẫu nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 15 con cá Thu chấm (*S. guttatus*) được thu tại vùng biển ven bờ tỉnh Quảng Bình vào tháng 5 năm 2017. Cá được mổ khám và ép cơ bằng lam kính để tìm kiếm ký sinh trùng Myxosporea dưới kính hiển vi Olympus CH40 (Olympus, Tokyo, Japan). Mẫu nhiễm bào tử Myxosporea được bảo quản trong dung dịch formalin 10%, dung dịch cồn 70% và ở tủ lạnh sâu (-20°C) để nghiên cứu hình thái và phân tử.

Phân tích hình thái học

Các nang giả chứa các bào tử Myxosporea được tách ra khỏi cơ cá chuyển sang lam kính khác có chứa giọt nước muối sinh lý và đặt

bằng lamén. Hình ảnh các bào tử được chụp trên kính hiển vi Olympus CH40 bằng máy ảnh kỹ thuật số Canon 750D ở độ phóng đại 1.000 lần. Kích thước của các bào tử được đo trên hình ảnh bằng phần mềm Corel DRAW X6® theo phương pháp của Lom và Dyková trên 30 bào tử khác nhau (Lom & Dyková, 1992). Hình ảnh của các bào tử được xử lý bằng phần mềm Photoshop CS (Adobe, San Jose, CA) và được vẽ lại bằng phần mềm Illustrator CS2.

Phân tích mô học

Mẫu cơ cá chứa các nang giả của trùng bào tử Myxosporea bảo quản trong dung dịch formalin 10% được rửa dưới vòi nước chảy trong 5 phút. Sau đó, chúng được loại nước bằng cách ngâm trong dung dịch cồn ở các nồng độ tăng dần từ 60% đến 100%. Sau khi loại nước, mẫu cơ được ngâm trong dung dịch xylene và đúc trong sáp nến. Mẫu cơ đúc trong sáp nến được cắt thành các lát mỏng dày 5 µm bằng máy cắt LEICA RM2125 RTS. Các lát cắt mỏng có chứa các nang bào tử Myxosporea được gắn lên lam kính và nhuộm bằng dung dịch Hematoxylin-Eosin (Luna, 1968). Tiêu bản được gắn lamén bằng nhựa Canada. Hình ảnh các lát cắt được chụp trên kính hiển vi Olympus CH 40 ở độ phóng đại 400 lần bằng máy ảnh kỹ thuật số Canon 750D.

Phân tích DNA

DNA của Myxosporea được tách chiết từ khối cơ có trọng lượng 10 mg và chứa các bào tử nằm trong nang giả bằng kit tách chiết QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen 18S rDNA (small subunit ribosomal DNA-18S rDNA) được nhân bản bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) với hai cặp mồi 18e (5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3')-Kud6R (5'-TCCAGTAGCTACTCATCG-3') và Kud6F (5'-TCACTATCGGAATGAACG-3')-18g (5'-GGTAGTAGCGACGGGCGGCGTG-3') (Hillis & Dixon, 1991; Whipps et al., 2003) trong hai phản ứng PCR. Phản ứng được thực hiện trong ống PCR có thể tích 50 µl có chứa 25 µl Master Mix Thermo Scientific DreamTaq Green (1X), 1 µl mỗi loại primer (10 pmol), 1 µl DNA tổng số và 22 µl nước cất. Chu trình nhiệt phản ứng PCR đã được hiệu

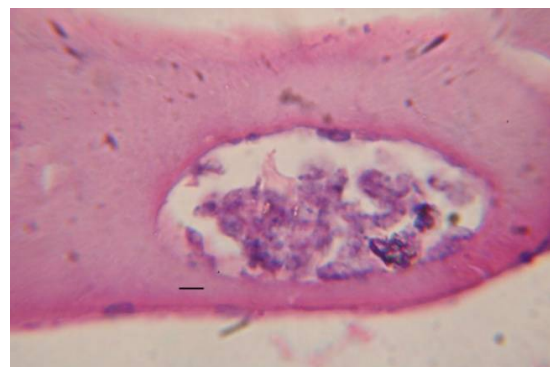
chỉnh so với Whipps et al. (2003) cho phản ứng đạt tối ưu: 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ với: 95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút; 72°C trong 5 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%. Sản phẩm PCR rõ băng vạch được gửi đến công ty MacroGen (Hàn Quốc) để tinh sạch và giải trình tự. Dùng chương trình BLAST để so sánh mức độ tương đồng của trình tự thu được với các trình tự trên Genbank. Phân tích mối quan hệ tiến hóa phân tử của các trình tự thu được với các trình tự tương đồng trên Genbank bằng phần mềm MEGA 6 theo phương pháp Neighbor Joining (Tamura et al., 2013).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong số 15 con cá Thu chấm (*S. guttatus*) được kiểm tra, có 8 cá thể bị nhiễm trùng bào tử sợi Myxosporea. Các bào tử này có đặc điểm của giống *Kudoa* với 6 mảnh van nằm đối xứng tỏa tròn qua tâm, mỗi mảnh van có chứa một nang cực.

Nang giả (Pseudocyst)

Nang giả màu trắng có dạng hình elip dài, kích thước 0,1-0,3 × 0,4-0,7 mm. Phân tích mô bệnh học thấy các nang giả nằm giữa các sợi cơ và được bao bọc bởi một lớp màng mỏng. Bên trong nang giả là các bào tử nằm xem kẽ nhau và không theo một hướng xác định (hình 1).



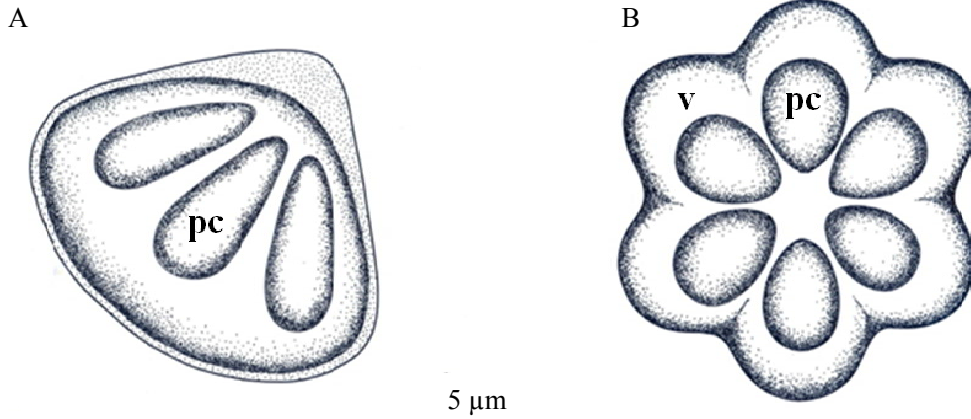
Hình 1. Hình ảnh tiêu bản mô cá chứa nang giả được nhuộm bằng dung dịch Hematoxylin-Eosin (Thước đo = 10 µm)

Bào tử

Bào tử có hình nón khi quan sát từ mặt bên và có hình bông hoa khi quan sát từ trên xuống

(hình 2). Bào tử dài $6,65 \pm 0,09$ ($6,53-6,76 \mu\text{m}$), rộng $7,42 \pm 0,13$ ($7,29-7,58 \mu\text{m}$), dày $6,55 \pm 0,11$ ($6,40-6,65 \mu\text{m}$). Bào tử có 6 mảnh van, tương ứng với 6 nang cực nằm đối xứng tỏa tròn quanh trục của bào tử. Các nang cực giống nhau có dạng hình thoi kéo dài và có kích thước

bằng nhau, rộng $1,30 \pm 0,14$ ($1,14-1,46 \mu\text{m}$), dài $3,42 \pm 0,09$ ($3,32-3,48 \mu\text{m}$), chiều dài đường nối của bào tử là $5,88 \pm 0,21$ ($5,72-6,19 \mu\text{m}$) (bảng 1). Các nang cực có xu hướng chụm lại phía trên và tỏa ra phía dưới (hình 2).



Hình 2. Ảnh vẽ bào tử *Kudoa scomberomori*
A. Mặt bên; B. Mặt ngang; pc. Nang cực; v. Mảnh van

Bảng 1. So sánh kích thước của quần thể *Kudoa scomberomori* thu từ Quảng Bình với quần thể thu ở Ôxtrâyli và loài *Kudoa grammatorcyni* (đơn vị đo: μm)

Loài	<i>Kudoa grammatorcyni</i>	<i>Kudoa scomberomori</i>	<i>Kudoa scomberomori</i>
Vật chủ	<i>Grammatorcynus bicarinatus</i>	<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Scomberomorus guttatus</i>
Nơi phát hiện	Queensland, Ôxtrâyli	Queensland, Ôxtrâyli	Quảng Bình, Việt Nam
Số lượng mẫu đo (n)	30	30	30
Số nang cực	6	6	6
Chiều dài bào tử	(6,3-6,7) 6,5	5,0-6,2 (5,4)	6,5-6,7 (6,6)
Chiều rộng bào tử	(8,0-8,9) 8,6	6,8-8,2 (7,6)	7,2-7,5 (7,4)
Độ dày bào tử	(7,6-8,6) 8,1	6,2-7,6 (6,8)	6,4-6,6 (6,5)
Chiều dài đường nối	(7,2-8,1) 7,7	5,3-6,3 (5,9)	5,7-6,1 (5,8)
Chiều dài nang cực	(3,5-3,8) 3,6	3,0-3,6 (3,2)	3,3-3,4 (3,4)
Chiều rộng nang cực	1,7 (1,6-1,8)	1,3-1,5 (1,4)	1,1-1,4 (1,3)
Tài liệu tham khảo	Adlard et al., 2005	Adlard et al., 2005	Nghiên cứu này

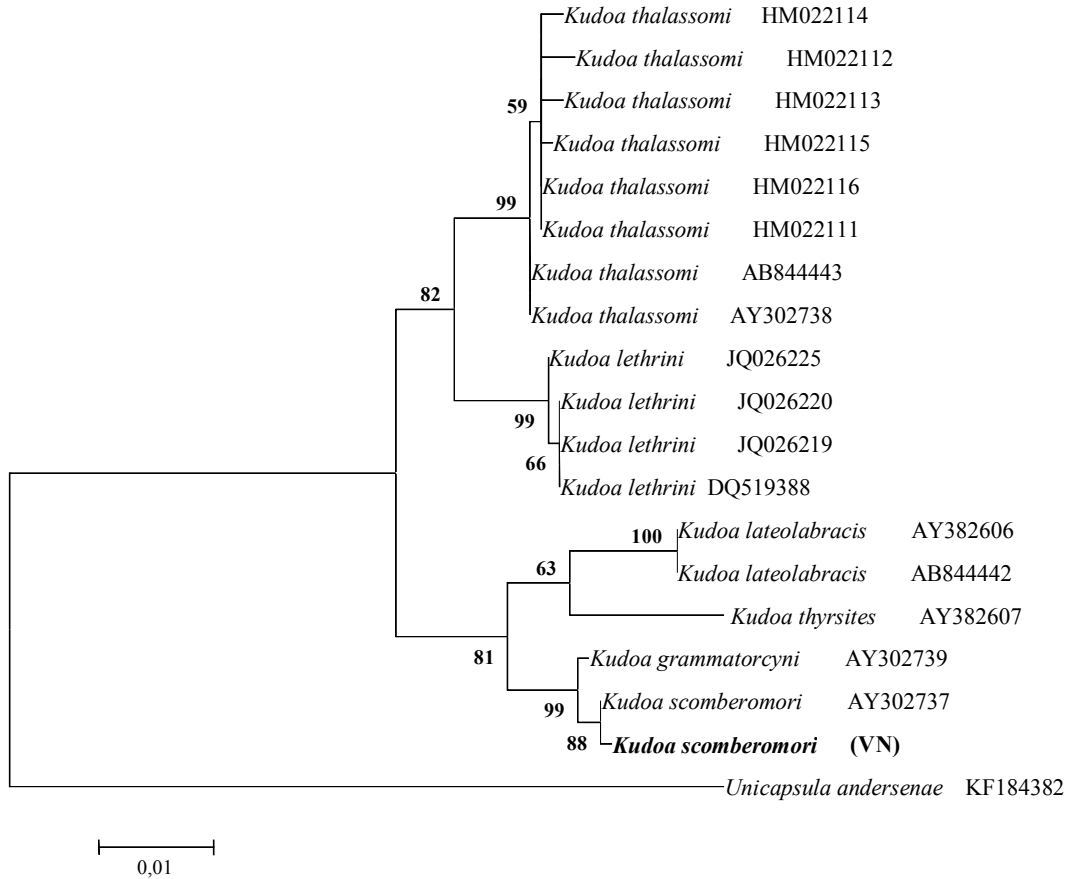
Phân tích phân tử

Trình tự đoạn gen 18S rDNA của bào tử nghiên cứu dài 1649 bp. Kết quả BLAST cho thấy trình tự chúng tôi thu được tương đồng cao nhất (99,88%) với trình tự AY302737 của loài *K. scomberomori* từ cá Thu vạch

(*S. commerson*) ở Ôxtrâyli. So sánh và phân tích khoảng cách di truyền cho thấy, trình tự của loài *K. scomberomori* thu tại Việt Nam sai khác với trình tự của loài này thu từ Ôxtrâyli ở 2 vị trí nucleotide, tương đương 0,12%; sai khác so với trình tự AY302739 của loài

K. grammatorcyni ký sinh trên cá Thu hai vạch (*Grammatorcynus bicarinatus*) ở 11 vị trí nucleotide tương đương với 0,67%. Trên cây phát sinh chủng loại, trình tự của mẫu

K. scomberomori thu từ Việt Nam nằm cùng nhánh với trình tự loài này thu ở Ôxtrâyliya và có quan hệ gần với loài *K. grammatorcyni* (hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen 18S của một số loài thuộc giống *Kudoa* với giá trị Bootstrap ở gốc mỗi nhánh

Hệ thống phân loại Myxosporea truyền thống được xây dựng dựa trên đặc điểm hình thái học. Tuy nhiên, do cấu trúc tế bào nhỏ và đơn giản cùng với số lượng các loài được phát hiện ngày càng nhiều, phương pháp định loại dựa vào hình thái gặp rất nhiều khó khăn. Mặt khác, phương pháp hình thái học không phản ánh mối quan hệ phát sinh loài (Bartosová et al., 2009). Vì vậy, kết hợp phân tích dữ liệu hình thái học và phân tử cho kết quả định loại chính xác, đồng thời xác định được mối quan hệ tiến hóa phân tử của các loài. Trong nghiên cứu này, trên cơ sở phân tích hình thái học và trình tự

đoạn gen 18S rDNA, mẫu Myxosporea ký sinh trên cá Thu chấm (*S. guttatus*) thu tại Quảng Bình được xác định là loài *K. scomberomori*. Hầu hết các số đo của quần thể *K. scomberomori* ở Việt Nam tương đồng với kích thước mô tả gốc (Adlard et al., 2005), ngoại trừ chiều dài của bào tử nghiên cứu dài hơn so với mô tả gốc và gần giống với chiều dài của loài *K. grammatorcyni* (bảng 1). Khi so sánh kích thước của loài *K. scomberomori* trong nghiên cứu này với loài *K. grammatorcyni* cho thấy chúng khác nhau về chiều rộng và độ dày bào tử; chiều dài đường nối; chiều dài và chiều

rộng của viên nang cực (Adlard et al., 2005) (bảng 1). Sự sai khác này có thể do đa dạng về hình thái của loài *K. scomberomori* thu từ các vật chủ và các vùng địa lý khác nhau. Mẫu chúng tôi thu được từ Cá Thu chấm (*S. guttatus*), còn mẫu ở Ôxtrâyliya thu từ cá Thu vạch (*S. commerson*). Các loài Myxosporea có tính chuyên biệt vật chủ. Tuy nhiên, khoảng 1/3 số loài thuộc giống *Kudoa* được phát hiện ký sinh ở hơn một loài vật chủ (Mansour et al., 2014). Loài *K. scomberomori* trước đây phát hiện ở cá Thu vạch (*S. commerson*) tại Ôxtrâyliya. Đây là lần đầu tiên ghi nhận loài này trên cá Thu chấm (*S. guttatus*). Đây cũng là loài thứ hai thuộc giống *Kudoa* được ghi nhận tại Việt Nam, sau đó loài *K. monodactyli* với 5 mảnh van ký sinh trên cơ của cá Chim khoang (*Monodactylus argenteus*) (Nguyễn Ngọc Chính và nnk., 2005).

KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ghi nhận loài *K. scomberomori* ký sinh ở mô cơ vân cá Thu chấm (*S. guttatus*) tại vùng biển ven bờ tỉnh Quảng Bình, Việt Nam. Kích thước của quần thể loài *K. scomberomori* ở Việt Nam có chiều dài lớn hơn chiều dài của quần thể loài này ở Ôxtrâyliya. Quần thể loài *K. scomberomori* thu từ Quảng Bình có sự tương đồng cao (99,88%) với quần thể loài này ở Ôxtrâyliya dựa trên trình tự gen 18S rDNA.

Cá Thu chấm (*S. guttatus*) được ghi nhận là vật chủ mới cho loài *K. scomberomori*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ về kinh phí từ Đề án 47 với mã số VAST.DA47.12/16-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adlard R. D., Bryant M. S., Whipps C. M., Kent M. L., 2005. Multivalvulid myxozoans from eastern Australia: three new species of *Kudoa* from scombrid and labrid fishes of the great barrier reef, Queensland, Australia. *J. Parasitol.*, 91(5): 1138-1142.

Bartosová P., Fiala I., Hypsa V., 2009. Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and

provide an effective tool for their molecular phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 53(1): 81-93.

- Nguyễn Ngọc Chính, Nguyễn Văn Đức, Nguyễn Văn Hà, Hà Duy Ngọc, Đặng Xuân Nghiêm, 2015. Loài đơn bào *Kudoa monodactyli* Genter, 2006 (Multivalvulida: kudoidea) ký sinh trong cơ cá biển vùng biển ven bờ tỉnh Quảng Bình. Hội nghị ký sinh trùng học toàn quốc lần thứ 42. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ: 978-604-913-380-0.
- Eiras J. C., Saraiva A., Cruz C., 2014. Synopsis of the species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Myxosporea: Multivalvulida). *Syst. Parasitol.*, 87(2): 153-180.
- Ferguson J. A., Atkinson S. D., Whipps C. M., Kent M. L., 2008. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *J. Parasitol.*, 94(6): 1322-1334.
- Hillis D. M., Dixon M. T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.*, 66(4): 411-53.
- Kawai T., Sekizuka T., Yahata Y., Kuroda M., Kumeda Y., Iijima Y., Kamata Y., Sugita-Konishi Y., Ohnishi T., 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin Infect Dis.*, 54(8): 1046-1052.
- Lom J., Dyková I., 1992. Protozoan parasites of fishes, Volume 26 (Developments in aquaculture and fisheries science) 1st Edition. Elsevier Science, Amsterdam, NY.
- Luna L. G., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed. Mac Graw-Hill Book Company, New York. 251.
- Mansour L., Harrath A. H., Abd-Elkader O. H., Alwasel S., Abdel-Baki A. A., Al Omar S. Y., 2014. Structural and molecular characterization of *Kudoa quraishii* n. sp. from the trunk muscle of the Indian mackerel *Rastrelliger kanagurta*

- (Perciforme, Scombridae) in Saudi Arabia coasts. Parasitol. Res., 113(4): 1361-70.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol., 30(12): 2725-2729.
- Whipps C. M., Gossel G., Adlard R. D., Yokoyama H., Bryant M. S., Munday B. L., Kent M. L., 2004. Phylogeny of the multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporidia) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. J. Parasitol., 90(3): 618-622.
- Whipps C. M., Adlard R. D., Bryant M. S., Kent M. L., 2003. Two unusual myxozoans, *Kudoa quadricornis* n. sp. (Multivalvulidae) from the muscle of goldspotted trevally (*Carangoides fulvoguttatus*) and *Kudoa permulticapsula* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) from the Great Barrier Reef, Australia. J. Parasitol., 89(1): 169-173.

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS
OF *Kudoa scomberomori* (Myxosporidia: Kudoidae) FIRSTLY FOUND FROM THE
INDO-PACIFIC KING MACKEREL *Scomberomorus guttatus* (Scombridae)
IN QUANG BINH PROVINCE, VIETNAM**

**Nguyen Ngoc Chinh^{1*}, Ha Duy Ngo¹,
Nguyen Huu Duc², Nguyen Thuy Linh³, Pham Ngoc Doanh¹**

¹Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR), VAST

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

³103 Military Hospital - Military Medical University

SUMMARY

The genus *Kudoa* includes about 100 described species. In Vietnam, so far, only one species, *Kudoa monodactyli*, has been reported. During survey for parasites of marine fish in Quang Binh province, Vietnam in 2017, we found Myxozoan samples in 8 out of 15 Indo-Pacific king mackerel (*Scomberomorus guttatus*). They are identified as *K. scomberomori* based on the results of morphological and molecular analyses. A great number of individual spores form white pseudocysts with thin membrane within the muscle fibre. The pseudocysts were 0.1-0.3 × 0.4-0.7 mm. The shape of fresh spore like a flower petal. The spore of *K. scomberomori* was 6.65 ± 0.09 (6.53-6.76) µm in length, 7.42 ± 0.13 (7.29-7.58) µm in width and 6.55 ± 0.11 (6.40-6.65) µm in thickness. Each spore has six shell valves with same size. Each shell valve contained one polar capsule measuring 3.42 ± 0.09 (3.32-3.48) µm in length and 1.30 ± 0.14 (1.14-1.46) µm in width. This is the first report of *K. scomberomori* in Vietnam and Indo-Pacific king mackerel is recorded as a new host for this species.

Keywords: *Scomberomorus guttatus*, *Kudoa scomberomori*, Vietnam, 18S rDNA.

Citation: Nguyen Ngoc Chinh, Ha Duy Ngo, Nguyen Huu Duc, Nguyen Thuy Linh, Pham Ngoc Doanh, 2018. Morphological and molecular characteristics of *Kudoa scomberomori* (Myxosporidia: Kudoidae) firstly found from the Indo-Pacific king mackerel *Scomberomorus guttatus* (Scombridae) in Quang Binh province, Vietnam. Tap chi Sinh hoc, 40(1): 1-6. DOI: 10.15625/0866-7160/v40n1.10671.

*Corresponding author: chihn89@gmail.com

Received 13 September 2017, accepted 2 December 2017