

壶菌病与两栖动物的种群衰退

于业辉 张守纯* 赵玉军 石 娇 于立辉 吕秋凤

(沈阳农业大学畜牧兽医学院 沈阳 110161)

摘要 :两栖类种群全球性衰退是 21 世纪最紧迫的环境问题之一。越来越多的证据表明壶菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*) 与澳大利亚、美洲北部、中部、南部及欧洲的两栖类种群衰退有关。由壶菌引起的壶菌病是变态后的无尾类所患的一种显性传染病,其令人质疑的快速传播及广泛爆发对世界范围内的两栖类种群构成重大威胁。本文对这种致病壶菌的病理学、生态学、生物地理学及其治疗方面的进展进行了综述。

关键词 :壶菌病,两栖动物,种群衰退

中图分类号 :Q494 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)03-118-05

Chytridiomycosis and Amphibian Population Declines

YU Ye-Hui ZHANG Shou-Chun ZHAO Yu-Jun SHI Jiao YU Li-Hui LÜ Qiu-Feng

(College of Veterinary & Animal Science, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract :Global decline in amphibian population is perhaps one of the most urgent environmental problems that need to be resolved in the 21st Century. Accumulating evidence suggests that a chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, is responsible for recent decline in amphibian populations in Australia, North, Central and South America, and Europe. Chytridiomycosis is an emerging infectious disease (EID) of post-metamorphic anurans caused by the chytrid fungus. The rapid expansion and widespread occurrence of Chytridiomycosis is supposed to be a significant risk for amphibian populations worldwide. In this paper, we have reviewed recent researches on the pathology, ecology, biogeography and therapy of this pathogenic chytrid.

Key words :Chytridiomycosis, Amphibian, Population decline

目前,全球两栖类的种类和数量正在急剧下降,其衰退速度比鸟类和哺乳类还快。近几十年,34种两栖类已经灭绝,88种可能灭绝,至少43%的两栖类物种经历了衰退。在世界范围内,93种两栖类的衰退与壶菌病有关^[1],在澳大利亚昆士兰未受人类干扰的高海拔雨林区域,壶菌病至少已导致14种雨林蛙类灭绝或严重衰退^[2]。对于这种衰退的真正原因,人们知之甚少,由于保护方法的缺乏,数以百计的两栖类物种正面临灭绝的危险^[3]。作为衡量生态环境优劣的标志动物,两栖动物数量的减少表明我们周围的环境正在恶化^[4],这最终将会对人类和其他生物构成威胁。因此,两栖动物的衰

退、消失引起了人们极大的关注。目前认为引起两栖动物衰退的因素有(1)生境被毁(2)食肉动物和竞争者的引入(3)紫外线辐射增强;(4)气候恶化(5)环境污染(6)疾病传播(7)各种影响因素联合作用等^[5]。许多科学家对上述多种因素进行了深入研究。本文仅对国际上关于两栖动物壶菌传染病方面的研究作一介绍。

* 通讯作者;

第一作者介绍 于业辉,女,副教授,主要研究方向:分子生物学;E-mail:yyhzsc317@163.com。

收稿日期:2005-09-02,修回日期:2006-03-19

1 两栖类壶菌病(Chytridiomycosis)的发现

1998 年 Berger 等首次报道壶菌门(Phylum Chytridiomycota)的真菌寄生在脊椎动物无尾两栖类。在 1993 ~ 1998 年,澳大利亚、巴拿马等地两栖类发生大量异常死亡,Berger 等从这些地点收集了两栖动物的尸体和将要死亡的成体,对组织样品进行常规性的寄生虫学、细菌学、病毒学、真菌学检查,没有发现明显的病原菌,但在新鲜皮肤涂片和表皮组织切片中却发现存在大量、正在发育和成熟的壶菌孢子。超微结构研究与 DNA 分析表明,这种壶菌是壶菌门(Chytridiomycota)壶菌纲(Chytridiomycetes)壶菌目(Chytridiales)的一个新属^[6]。壶菌(*Batrachochytrium dendrobatidis*)分布极为广泛,生活在水和潮湿土壤里,能分解、利用环境中的角蛋白、壳质、植物碎屑等,在外界环境中能短期存活和进行无性繁殖,壶菌还能寄生在维管植物、藻类、轮虫、线虫、昆虫等无脊椎动物体内,在脊椎动物中只感染两栖类^[5,6]。在感染的两栖类,致病壶菌分布在蝌蚪角质化的上下颌^[7],当蝌蚪变态为成体蛙时,随着上下颌蜕皮,壶菌孢子迅速重新分布到蛙的角质化皮肤,利用角蛋白为营养,在皮肤表层细胞内生长^[5]。进一步的研究发现,壶菌引起的蛙类壶菌病是导致澳大利亚热带雨林、美洲中部、北部、南部及欧洲的两栖类近期衰退的主要原因^[8]。

2 两栖类壶菌病的来源

研究者对衰退前 1 ~ 10 年的澳大利亚和美洲中部馆藏两栖类标本进行了组织学检测,发现没有壶菌感染的证据,这意味着壶菌是近年才在两大陆出现的^[6]。

壶菌病引起的两栖类种群衰退表现出 3 个主要特点(1)衰退的发生是迅速、严重的(2)衰退有独特的地理和时间顺序,如两栖类在澳大利亚的衰退是以每年 100 km 的平均速度向北移动^[9],在美洲中部是由北向西发生,在新西兰太古蛙(*Leiopelma archeyi*)的衰退以每年 12

km 平均速度由南向北进行^[10](3)在衰退期间,死蛙、病蛙身体上有壶菌感染的证据。上述特点符合引入有毒病原菌通过群体传播的特点^[11,12,9]。另外,壶菌能感染澳大利亚南部 34 种两栖类^[13],说明壶菌具有低的宿主特异性,这种能感染很多宿主的能力也是许多入侵病原体的特点^[12]。而地方性疾病的特点是宿主对病原菌具有一定程度的免疫性,两者具有协同进化关系,病原菌具低毒性,其传染率、死亡率均低。因此,推测在澳大利亚和美洲中部等地区的两栖类最初没接触到这种壶菌病,这种病可能是一种引入性疾病^[6]。

对 1879 ~ 1999 年在非洲收集的 3 种两栖类 697 只馆藏标本的检测中,发现了最早一例 1938 年患壶菌病的南非爪蟾(*Xenopus laevis*),并统计出总感染率为 2.7%,当在非洲以外地区发现该病病例时,这种病在非洲已稳定流行了 23 年,这说明壶菌病在南非是稳定的地方性传染病。在 20 世纪 30 年代中期,当南非爪蟾的国际贸易开始时,壶菌病由南非向世界各地如澳大利亚、美洲、欧洲、新西兰、大洋洲扩散,因此,非洲可能是这种病的发源地^[14]。

壶菌病成为稳定的地方性传染病不仅存在于南非,Richard 在对衰退的澳大利亚两栖类湍流蛙(*Taudactylus eungellensis*)的进一步研究发现,壶菌仍存在于湍流蛙残余群体中,标记捕获实验显示:感染壶菌病的湍流蛙占取样的 15% ~ 18%,感染率年年都保持稳定。随后的研究又发现感染壶菌病的蛙同未感染壶菌病的蛙生存率是相似的。这一研究显示了湍流蛙残存群体数量持续稳定的原因:蛙类似乎已演化出对抗壶菌的免疫力,壶菌引起的疾病已成为地方性疾病,使蛙类能同壶菌共存,而不是因为壶菌消失导致湍流蛙残存群体恢复^[2]。

3 两栖类壶菌病的临床症状及致死机理

患病的成体蛙腹部、髁部、腿部皮肤出现弥散性红肿、局部轻度增厚和变色症状^[15,16],并伴随着异常的表皮脱落现象。患病蛙有异常的行

为和体态,厌食、精神沉郁、对外界刺激丧失反射。两栖类幼体蝌蚪是病原菌的携带者,在被壶菌感染时,外观健康,不表现明显的临床症状,是病原菌的宿主库^[5]。

疾病致死机理还不十分清楚,可能有^[6,17]:

(1)表皮增厚影响皮肤呼吸和渗透(2)壶菌毒素被全身吸收(3)这些因素相互联合起作用。根据这一机理可从壶菌在成体蛙、蝌蚪分布区域的特点,解释成体蛙有很高的死亡率,而蝌蚪表现正常,只有较低的死亡率。

4 壶菌病流行病学

4.1 传染源 壶菌病的传染源主要为患病两栖类成体、外观健康的感染蝌蚪等。

4.2 传播途径 壶菌病主要通过水传播。患病蛙表皮层的壶菌游动孢子随表皮角质层脱落被释放到水中,健康蛙接触了含壶菌游动孢子的水而感染壶菌病。实验证明壶菌病可在物种内传播,山区黄腿蛙(*Rana muscosa*)的蝌蚪能被游动的壶菌孢子感染,蝌蚪间能彼此感染,也能感染给变态后的成体^[18]。患病蛙还可以通过身体接触(如繁殖季节的抱对等行为)直接将壶菌的孢子传递给群体中的其他个体^[1]。

壶菌病在世界范围内广泛传播和人类的活动有密切关系,由于人类活动的机动性不断提高,导致部分含壶菌的野生植物、动物、土壤、水等在世界范围移动^[19-21],促进了壶菌病的传播。如在国际贸易中,北美牛蛙(*R. catesbeiana*)将壶菌病传播到了世界许多地方^[22]。在澳大利亚从被广泛引入的两栖类中也发现有感染壶菌病的个体^[23]。

4.3 两栖类的易感性 壶菌对不同的蛙类有不同的影响。壶菌病已使2种胃孵蛙(*Rheobatrachus* spp.)灭绝^[5],使湍流蛙经历剧烈种群衰退,而在同地域的其他种类没有发现壶菌感染^[2]。这表明一些蛙类可能对病原体有耐受性。研究表明,蛙类体温升高能清除其身体上的壶菌,由于体温升高与蛙类体温调节、行为方式的改变有关,因此一些学者提出不同蛙类患病几率的差异受蛙类行为差别和体温调节改

变的影响^[24]。近来研究发现,两栖类皮肤腺体能产生抗菌肽,可高效抑制壶菌在体外生长,两栖类对壶菌病感染产生的抵抗力和宿主产生抗菌肽之间具有相关性^[25]。实验还发现壶菌单独存在时,灰树蛙(*Hyla chrysoscelis*)蝌蚪的体重降低34%,但蝌蚪存活率及幼体发育期长短无显著变化。而当壶菌和捕食者东方蝾螈(*Notophthalmus viridescens*)同时存在时,幼体发育期延长。这说明壶菌病可以通过群落的复杂性而影响两栖动物的幼体发育期^[26]。

4.4 季节性与地域性 壶菌病的流行通常具有季节性,在冬季发病率较高,并多发生在某些热带雨林山区或高海拔地区^[5]。实验室感染实验提供了低温死亡率增高的证据:接触壶菌的大条纹蛙(*Mixophyes fasciolatus*)在17、23℃全部死亡,27℃只有一半死亡^[14]。推测在寒冷的地区,壶菌在环境中的腐生存活能力和持续致病能力强;在温暖的低海拔地区,壶菌在两栖类皮肤上的生长速度慢,游动孢子在宿主外的存活机率可能较低^[5]。但是,近来的研究发现澳大利亚东部,在高海拔和低海拔区域、海岸边都有感染壶菌的两栖类分布,并且在阿根廷接近海平面、气候温和的低地,也发现壶菌病能导致阿根廷细趾蟾(*Leptodactylus ocellatus*)死亡^[27],这些证据表明壶菌在野生动物群体中的分布极其广泛,已不存在原有的地域性限制。

5 壶菌病的诊断与防治

壶菌病诊断目前主要依赖组织学、免疫组织化学检查,这些技术手段对感染早期是不敏感的,而且对蛙体的正常生存是有影响的。用普通PCR或改进的实时TaqMan探针PCR技术,灵敏性和特异性高,有助于在野生和饲养的两栖类群体中及早发现壶菌^[28,29]。另外,制备多克隆抗体,利用免疫过氧化物酶染色也是有效的检测手段^[30]。化学消毒剂、紫外线、加热对消灭壶菌均有显著效果。如化学消毒剂漂白粉、KMnO₄、甲醛、农药(DDAC)等,在特定的浓度和时间能使体外培养的壶菌达到100%死亡^[31]。壶菌对热非常敏感,在37℃加热4h,

47℃加热 30 min, 60℃加热 5 min 致死率均为 100%^[32]。在实验中, 将澳大利亚树蛙 (*Litoria chloris*) 放在 37℃条件下, 在 16 h 内就能清除身体上的壶菌, 这表明在两栖类正常体温调节范围内, 适当应用提高体温的处理手段, 可根除两栖类身体上的壶菌, 防止两栖类在运输和放归时壶菌的随机蔓延^[24]。

6 壶菌病引起地区性宿主群灭绝的原因

6.1 壶菌具有在低于临界点的群体中传播、生存的能力 流行病学模型认为, 高毒性寄生菌会迅速降低宿主的群体密度, 在达到维持传播所需要的临界密度之后, 最终导致病原菌灭绝和群体恢复^[11, 12]。寄生的微生物通常还具有相对短的传染期和比较高的致死率, 但通常不能持续存在下去^[10]。而壶菌却具有在低临界点的群体中传播、生存的机制, 导致地区性宿主灭绝。壶菌能在低于临界密度的群体中传播、生存的原因有 (1) 两栖类幼体蝌蚪是壶菌的宿主库。很多热带两栖类幼体生活期很长, 为 12 ~ 18 个月, 有一些生活 3 年才完成变态^[6] (2) 染病未死的个体成为病原体的携带者 (3) 壶菌的腐生发育使其持续生存能力进一步增强。壶菌可在胰蛋白琼脂培养基中体外培养^[33, 34], 在干净的角化上皮或死于感染的两栖类尸体上至少能存活一代^[34]。实验还表明, 壶菌在自来水和去离子水中能存活 3 ~ 4 周, 在湖水中的传染性能持续到 7 周^[35]。这种宿主、寄生菌的流行病学模式表明, 低于临界群体密度的群体也能允许病原菌生存而最终导致宿主的灭绝。

6.2 种群衰退的两栖类生态学特点 (1) 多生活在某些热带雨林地区 (2) 多生活在高海拔地区 (3) 产卵能力低 (4) 卵产在溪流里^[36]。在溪流里繁殖的物种与陆地种类相比更易感染水中的病原菌, 高海拔地区温度低, 更适于壶菌生长, 低的产卵率与栖息地的特殊性表明, 当随机因素如疾病等被引入导致这些物种衰退后, 它的恢复能力降低。可见作为宿主的两栖类生态学特性加强了疾病对它造成的影响, 这进一步

阐明了壶菌能导致地区性宿主灭绝的原因。

综上所述, 多数学者认为壶菌病是近年来引起两栖类种群严重衰退的主要原因之一, 也有学者对此持有异议^[37]。因目前尚未掌握足够的壶菌病病理学和流行病学资料, 对两栖类易受感染的因素了解不多, 所以这方面工作尚需进一步深入。我国在两栖动物种群衰退方面的研究, 主要集中在生境破坏和环境污染等方面, 在疾病传播等其他方面未见报道。因此, 开展我国两栖动物资源调查, 对两栖动物种群进行长期动态监测, 了解我国两栖动物的种群状况, 深入研究衰退原因, 对两栖动物多样性的保护、维持生态系统平衡具有重大作用。

参 考 文 献

- [1] Lips K R, Brem F, Brenes R, *et al.* Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 **103**(9): 3 165 ~ 3 170.
- [2] Retallick R W, McCallum H, Speare R. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *Plos Biol*, 2004 **2**(11): e351.
- [3] Stuart S N, Chanson J S, Cox N A. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 2004, **306**(5 702): 1 783 ~ 1 786.
- [4] 周州, 谢锋. 两栖动物种群衰退研究进展. 应用与环境生物学报 2004, **10**(1): 128 ~ 132.
- [5] Daszak P, Berger L, Cunningham A A. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Infect Dis*, 1999, **5**(6): 735 ~ 748.
- [6] Berger L, Speare R, Daszak P, *et al.* Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, **95**: 9 031 ~ 9 036.
- [7] Olsen V, Hyatt A D, Boyle D G, *et al.* Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Dis Aquat Organ* 2004, **61**(1-2): 85 ~ 88.
- [8] Rollins-Smith L A, Carey C, Longcore J, *et al.* Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Dev Comp Immunol* 2002, **26**(5): 471 ~ 479.
- [9] Laurance W F, McDonald K R, Speare R. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology* 1996 **10**: 406 ~ 413.

- [10] Ben D Bell , Scott Carver , Nicola J. *et al.* The recent decline of a New Zealand endemic : how and why did populations of Arcey 's frog *Leiopelma arceyi* crash over 1996 ~ 2001 ? *Biological Conservation* , 2004 **120** :189 ~ 199 .
- [11] Dobson A P , May R M. Conservation Biology : The Science of Scarcity and Diversity. Sunderland (MA) : Sinauer Assoc Inc , 1986 345 ~ 365 .
- [12] Anderson R M , May R M. The invasion , persistence and spread of infectious diseases within animal and plant communities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* , 1986 **314** : 533 ~ 570 .
- [13] Berger L , Speare R , Hines H B. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust Vet J* , 2004 **82** (7) : 434 ~ 439 .
- [14] Weldon C , du Preez L H , Hyatt A D , *et al.* Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg Infect Dis* , 2004 , **10** (12) : 2 100 ~ 2 105 .
- [15] Bradley G A , Rosen P C , Sredl M J , *et al.* Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *J Wildl Dis* , 2002 **38** (1) : 206 ~ 212 .
- [16] Nichols D K , Lamirande E W , Pessier A P , *et al.* Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *J Wildl Dis* , 2001 **37** (1) : 1 ~ 11 .
- [17] Jancovich J K , Davidson E W , Morado J F , *et al.* Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi* . *Diseases of Aquatic Organisms* , 1997 **31** : 161 ~ 167 .
- [18] Rachowicz L J , Vredenburg V T. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Dis Aquat Organ* , 2004 , **61** (1-2) : 75 ~ 83 .
- [19] Daszak P , Cunningham A A , Hyatt A D. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* , 2000 **287** (5 452) : 443 ~ 449 .
- [20] Vitousek P M , D 'Antonio C M , Loope L L , *et al.* Biological invasions as global environmental change. *American Scientist* , 1996 **84** : 468 ~ 478 .
- [21] Scott N J. Postmetamorphic death syndrome. *Froglog* , 1993 , **7** : 1 ~ 2 .
- [22] Mazzoni R. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerg Infect Dis* , 2003 **9** (8) : 995 ~ 998 .
- [23] Berger L , Speare R , Hyatt A D. Chytrid fungi and amphibian declines : Overview , implications and future directions. In : Campbell A , ed. Declines and Disappearances of Australian Frogs. Canberra , Australia : Environmental Australia , 2000 , 21 ~ 31 .
- [24] Woodhams D C , Alford R A , Marantelli G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis Aquat Organ* , 2003 **55** (1) : 65 ~ 67 .
- [25] Rollins-Smith L A , Conlon J M. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis , an emerging infectious disease of amphibian populations. *Dev Comp Immunol* , 2005 , **29** (7) : 589 ~ 598 .
- [26] Parris M J , Beaudoin J G. Chytridiomycosis impacts predator-prey interactions in larval amphibian communities. *Oecologia* , 2004 , **140** (4) : 626 ~ 632 .
- [27] Herrera R A , Steciow M M , Natale G S. Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura : Leptodactylidae) in Argentina. *Dis Aquat Organ* , 2005 **64** (3) : 247 ~ 252 .
- [28] Annis S L , Dastoor F P , Ziel H , *et al.* A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J Wildl Dis* , 2004 , **40** (3) : 420 ~ 428 .
- [29] Boyle D G , Boyle D B , Olsen V , *et al.* Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Organ* , 2004 **60** (2) : 141 ~ 148 .
- [30] Berger L , Hyatt A D , Olsen V , *et al.* Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis Aquat Organ* , 2002 , **48** (3) : 213 ~ 220 .
- [31] Parker J M , Mikaelian I , Hahn N , *et al.* Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp Med* , 2002 , **52** (3) : 265 ~ 268 .
- [32] Johnson M L , Berger L , Philips L , *et al.* Fungicidal effects of chemical disinfectants , UV light , desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* . *Dis Aquat Organ* , 2003 **57** (3) : 255 ~ 260 .
- [33] Pessier AP , Nichols DK , Longcore JE , *et al.* Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White 's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J Vet Diagn Invest* , 1999 **11** : 194 ~ 199 .
- [34] Longcore J E , Pessier A P , Nichols D K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp. nov. , a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* , 1999 **91** : 219 ~ 227 .
- [35] Johnson M L , Speare R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water : quarantine and disease control implications. *Emerg Infect Dis* , 2003 **9** (8) : 922 ~ 925 .
- [36] Williams S E , Hero J M. Rainforest frogs of the Australian Wet Tropics : guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* , 1998 **265** : 597 ~ 606 .
- [37] Shelley BURGIN , C. B. SCHELL , Candida BRIGGS. 真菌 *Batrachochytrium dendrobatidis* 是蛙类种群衰退的近因吗 ? *动物学报* 2005 , **51** (2) : 344 ~ 348 .