

小瓜虫在澳洲龙纹斑鳃器官上的分布及其影响

任丽花¹, 罗土炎¹, 刘洋¹, 罗钦¹, 饶秋华¹, 翁伯琦^{2*}

¹福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/福建省精密仪器农业测试重点实验室, 福建福州 350003; ²福建省农业科学院农业生态研究所, 福建福州 350013

摘要:【目的】小瓜虫病是澳洲龙纹斑苗种阶段危害巨大的寄生虫病。探究小瓜虫在澳洲龙纹斑鳃器官上的分布及其影响可以丰富小瓜虫的致病性及病理学方面的研究内容,也可以为渔业生产中小瓜虫病的防治提供参考。【方法】采用光镜及扫描电镜技术确定病原,并观察小瓜虫在澳洲龙纹斑鳃丝、鳃小片及鳃盖上的分布情况及这些器官的变化情况。【结果】小瓜虫侵染澳洲龙纹斑的鳃器官后,分布在鳃丝、鳃小片及鳃盖的表面,上皮细胞之下及鳃小片之间,或是包裹在黏液细胞里,但侵染后期在鳃丝及鳃小片上的数量明显少于鳃盖。侵染后期,鳃丝、鳃小片及鳃盖出现一定程度的膨胀变形,黏液细胞分泌增多,鳃小片末端膨大变形甚至黏连融合,顶端充血呈球状或棒状。【结论】对于鳃部而言,侵染后期小瓜虫主要分布在澳洲龙纹斑的鳃盖上。小瓜虫主要通过侵染引发澳洲龙纹斑鳃部器官的变形膨大,使其丧失正常的功能,造成血液循环受阻、渗透压调节失衡,最终导致鱼体缺氧死亡。

关键词: 小瓜虫; 澳洲龙纹斑; 鳃; 鳃盖; 扫描电镜

Distribution and effect of the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* on the gill organs of the Murray cod, *Maccullochella peelii*

REN Lihua¹, LUO Tuyan¹, LIU Yang¹, LUO Qin¹, RAO Qiu-hua¹, WENG Bo-qi^{2*}

¹Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research, Fujian Academy of Agricultural Sciences/
Fujian Precision Instruments Focus on Agricultural Testing Laboratory, Fuzhou, Fujian 350003, China;

²Agriculture Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China

Abstract: 【Aim】The white spot disease, caused by the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* is harmful to the Murray cod, *Maccullochella peelii*. The distribution and influence of *I. multifiliis* on the gills of *M. peelii* were investigated to better understand its pathogenicity and pathology and provide reference for the control of this disease in fish production. 【Method】Light microscope and scanning electron microscope were used to identify the pathogen and describe its distribution on the gill-filaments, gill-lamella and the operculum of *M. peelii*. 【Result】In infected *M. peelii*, *I. multifiliis* was distributed on the surface of gill-filaments, gill-lamella, operculum, under epithelial cells, between the gill-lamella or wrapped in mucus cells. The numbers of *I. multifiliis* on gill-filaments and gill-lamella were significantly fewer than on the operculum during the later period. In the late stage of infection, there was a certain degree of expansion and deformation of the gill-filaments, gill-lamella and operculum. Secretion by mucus cells increased, and the ends of the gills expanded and became deformed, even adhered and fused, and the top was globular or rod-shaped. 【Conclusion】For the gills organs, *I. multifiliis* was mainly distributed on the operculum of *M. peelii* during the later period of infection. *I. multifiliis* caused the deformation of gill organs of *M. peelii*, which lost its normal function, blocking blood circulation and leading to unbalanced osmotic pressure, eventually causing death from hypoxia.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*; *Maccullochella peelii*; gill; operculum; scanning electron microscope

澳洲龙纹斑 *Maccullochella peelii* Mitchell 俗称墨瑞鳕、澳洲鳕鲈等,是一种优质鳕鲈属淡水鱼类,原产于澳大利亚,是澳大利亚最大的纯淡水鱼,也是世界上纯淡水鱼中最大的一种,为最顶级的白肉鱼,有特殊的外型以及鲜美口感,在澳大利亚素有“国宝鱼”美称(Cooley & Rowland, 1993; Seloosse & Rowland, 1990)。该鱼自 2001 年引入中国大陆,经过近 17 年的养殖发展,在浙江、广州、海南、江苏、

收稿日期(Received): 2018-03-24 接受日期(Accepted): 2018-05-05

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2015R1025-6); 福建省发改委五新项目(闽发改投资[2016]482号)

作者简介: 任丽花, 博士。研究方向: 细胞生物学。E-mail: 1272547936@qq.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: wengboqi@163.com

青岛、福建等地逐步试养成功。本项目组自 2014 年开始澳洲龙纹斑的养殖实验。通过对国内澳洲龙纹斑养殖的几家主要企业或科研单位进行跟踪调查,发现对澳洲龙纹斑威胁最大的病害为小瓜虫病;经多次反复感染,鱼体鳃、皮肤和鳍密布由小瓜虫与上皮组织增生形成的肉眼可见的白色孢囊,严重时可导致澳洲龙纹斑苗种 2 周内全部死亡(郭松等,2012)。

小瓜虫病是由寄生在鱼体表面的多子小瓜虫 *Ichthyophthirius multifiliis* D. 所引起。多子小瓜虫亦称小瓜虫,隶属原生动物门寡膜纤毛纲膜口目凹口科小瓜虫属,常寄生在鱼类的皮肤、鳍、鳃、头、口腔及眼等处,形成的孢囊呈白色小点状,肉眼可见,故所致疾病俗称“白点病”。多子小瓜虫在世界范围内分布广泛,从欧亚大陆向北至北极圈附近都有分布。小瓜虫对寄主的种类及年龄均无严格选择性,分布很广,尤其不流动的小水体、高密度养殖的幼鱼及观赏性鱼类易被感染,给淡水鱼养殖业造成巨大经济损失 (Abowei *et al.*, 2011; Mallik *et al.*, 2015)。

近几十年来国内外对小瓜虫的研究多集中在其致病性、防治及组织病理方面(陆英杰等,2014;罗钦等,2017;罗士炎等,2015,2016;倪达书和李连祥,1960;王哲等,2016;章海鑫等,2016);但是少见小瓜虫侵染宿主的扫描电镜观察,且对小瓜虫病的病理报道主要集中在皮肤、鳃丝及眼等虫体寄生的部位,有关鳃盖的病理变化未见报道。小瓜虫幼虫在宿主身上发育成熟后脱离宿主,黏附到水底或池壁上,或水底的物体上。澳洲龙纹斑游动慢,喜底栖与附壁,所以其苗种极易感染小瓜虫。本实验就小瓜虫侵染澳洲龙纹斑的鳃盖、鳃丝及鳃小片的表面形态变化情况进行研究,以期能丰富小瓜虫的致病性及病理学方面的研究内容,并为渔业生产中小瓜虫病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用澳洲龙纹斑健康幼鱼及感染小瓜虫的幼鱼均由福建省农业科学院邵武养殖基地提供。鱼体大小基本一致,体长 8~10 cm,平均体重(10±2) g。

1.2 方法

将带回的澳洲龙纹斑幼鱼培养 1 周后,进行小

瓜虫感染,感染前幼鱼禁食 24 h。选择 30 尾健康的无小瓜虫感染的鱼养殖在 50 L 水族箱里,水族箱的水温设置在 24.5~27.0 °C,每天水体交换率 50%,配合饲料投饵率为鱼体重的 3%。将感染小瓜虫的澳洲龙纹斑幼鱼投放进去,观察鱼身上是否出现白点,如有白点,将白点刮下,显微镜观察到小瓜虫虫体即确定感染成功,在其感染严重时取样,作为实验组,以健康鱼为对照组。

1.2.1 白点病病原确定方法 用吸管吸取适量灭菌水,轻轻冲洗去鳃丝上多余的黏液和血液,多次冲洗后,取患病鱼的鳃丝放入无菌培养皿中并加水没过,静置 5~10 min 后,在室温 18 °C 的条件下,吸取少量病体置于凹玻片中,轻轻盖上盖玻片于显微镜下观察。

1.2.2 扫描电镜样品制备方法 活体取鳃盖、鳃小块样品,置于 2.5% 戊二醛溶液中 4 °C 固定过夜,之后倒掉固定液,用 0.1 mol·L⁻¹、pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次,每次 15 min,之后用 1% 锇酸溶液固定样品 1~2 h,倒掉固定液,用蒸馏水漂洗样品 3 次,每次 15 min;用梯度浓度(包括 30%、50%、70%、80%、90% 和 95% 等 5 种浓度)的乙醇溶液对样品进行脱水处理,每种浓度处理 15 min,再用 100% 乙醇处理 2 次,每次 20 min,然后用环氧丙烷处理 2 次,临界点干燥,EIKO 离子溅射仪镀膜,处理好的样品在 JSM-6380LV 型扫描电镜中观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 病原确定

通过显微镜观察到有持续旋动、圆形的大小为 20~100 μm 的纤毛虫,可以确定寄生虫为多子小瓜虫(图 1)。



图 1 显微镜下澳洲龙纹斑鳃部的小瓜虫
Fig.1 *Ichthyophthirius multifiliis* on the gill of *Maccullochella pealii* under microscope

2.2 澳洲龙纹斑感染小瓜虫的症状

在病鱼的体表、鳍条、鳃上均发现有 0.5~1.0 mm 的白色小点状凸起,个别重度病鱼全身皮肤和鳍条布满白点,全身体表如同覆盖着一层白色薄膜。受害早期病鱼体表和鳃丝黏液增多,体色暗淡无光,病鱼消瘦,且沿池边游动;受害较为严重的澳洲龙纹斑鳃丝溃烂,体表红肿、溃烂,有烂鳍及机械摩擦损伤的痕迹,病鱼多呈浮头状漂浮于水面不游动或缓慢游动。用载玻片刮取病鱼尾鳍或体表白点涂片,可发现小瓜虫成虫在活动。

2.3 健康澳洲龙纹斑鳃丝及鳃盖的扫描电镜观察

由图 2 可见,健康澳洲龙纹斑鳃丝呈梳状整齐

排列,鳃丝表面由单层扁平上皮细胞覆盖,表面有少许黏液组织,鳃丝顶端的鳃小片结构清晰(图 2A)。呈书页状排列在鳃丝上的 2 列鳃小片间隔等距离,鳃小片厚 4~10 μm ,间距为 10~40 μm ,鳃小片表面呈褶皱状、凹凸不平,但基本结构保持完整(图 2B-D);同时,在鳃丝和鳃小片上存在各种复杂的环形微嵴、沟状或坑状凹陷以及孔洞等结构(图 2E-F)。由图 3 可知,健康澳洲龙纹斑鳃盖表面较光滑(图 3A),鳃盖骨表面可见疏松排列的胶原纤维束(图 3C),且在矿化的胶原蛋白束之间有大量孔洞,孔的直径从几微米到几十微米不等(图 3B,D)。

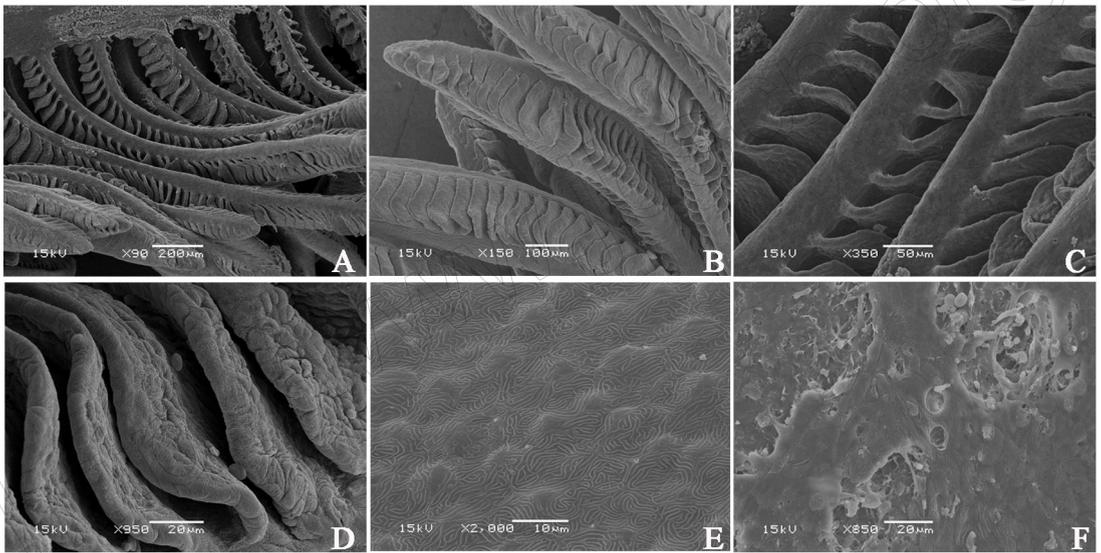


图 2 健康澳洲龙纹斑鳃丝及鳃小片的扫描电镜观察

Fig.2 Scanning electron microscope observation of gill-filaments and gill-lamella of healthy Murray cod, *Maccullochella peelii*

A: 鳃丝整体观; B: 鳃丝末端; C: 鳃丝及鳃小片; D: 鳃小片; E: 微嵴; F: 鳃上皮细胞及孔洞。

A: Total view of gill-filaments; B: The end of gill-filaments; C: Gill-filaments and gill-lamella;

D: Gill-lamella; E: Microridge; F: Gill epithelial cells and pores.

2.4 澳洲龙纹斑被小瓜虫侵染后鳃丝、鳃小片及鳃盖的扫描电镜观察

对实验组的澳洲龙纹斑鳃丝、鳃小片及鳃盖的表面形态进行观察,发现重度感染小瓜虫的澳洲龙纹斑鳃丝出现一定程度的膨胀变形,鳃丝小骨裸露变形,顶端充血(图 4A-C),鳃丝表层单细胞增生,结构粗糙(图 4C, J),还有的鳃丝出现断裂(图 4L)。鳃小片上皮细胞肿大(图 4B, K),末端呈球状或棒状,表层单细胞也有增生现象,结构变得粗糙(图 4H, K),鳃小片脱落(图 4G)、缺失甚至断裂,呈现不完整状态(图 4I),鳃小片间距缩小甚至

黏连,鳃小片结构消失(图 4I, K)。另外,鳃丝及鳃小片的表皮组织明显增厚,形成明显的凸起。鳃盖骨的内表皮肿胀变形,黏液细胞增多,孔洞明显减少(图 4M-O)。同时,鳃丝、鳃小片及鳃盖上的黏液细胞分泌增多(图 4D, N)。

2.5 侵染后期小瓜虫在澳洲龙纹斑鳃丝及鳃盖上的分布情况

实验组的澳洲龙纹斑可见小瓜虫寄生于鳃的扁平上皮细胞之下以及鳃丝表面、鳃丝边缘和间隙中,鳃小片之间分布较少(图 5A-D)。在鳃盖上的分布最多,大多数藏在黏液细胞、胶原纤维束的下

面,在断裂的鳃盖细胞的间隙里也有小瓜虫分布(图 5E-I)。小瓜虫的大小 20~100 μm 不等,呈扁平状或马蹄状,有的小瓜虫的纤毛上沾满了黏液组

织或红细胞,尤其鳃盖上,黏液细胞里面包裹着许多小瓜虫。

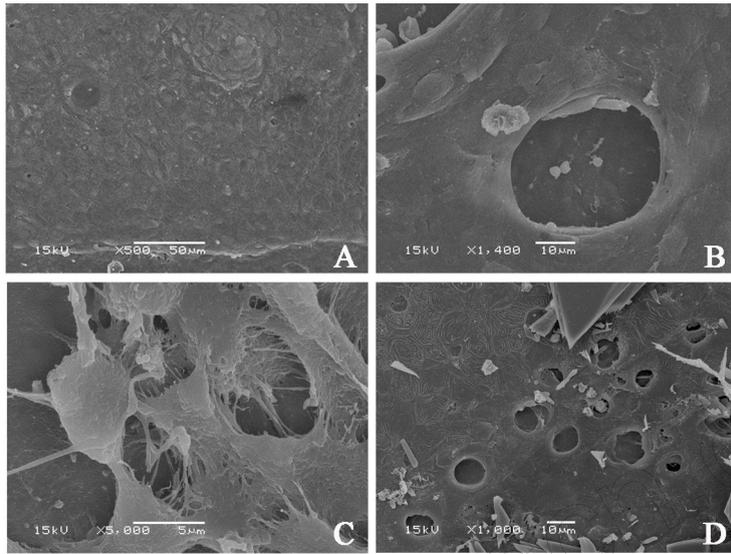


图 3 健康澳洲龙纹斑鳃盖的扫描电镜观察

Fig.3 Scanning electron microscope observation of operculum of healthy Murray cod, *Maccullochella peelii*

A: 鳃盖表面; B: 鳃盖上的孔洞; C: 胶原纤维束; D: 鳃盖表面及孔洞。

A: The surface of the operculum; B: The pores on the operculum; C: Collagen cellulose; D: Operculum surface and pores.

3 讨论

3.1 小瓜虫对澳洲龙纹斑鳃部的影响

鱼类鳃的主要功能是呼吸,其呼吸运动主要是依靠鳃节肌的收缩,造成口的开关及鳃盖的扩张与收缩以促使水的通入与流出。鱼在水中时,每个鳃片、鳃丝、鳃小片都完全张开,使鳃和水的接触面积扩大,增加摄取水中溶解氧的机会。鳃小片中有微血管,其表皮很薄,当血液流过这里时就完成了气体交换:将带来的二氧化碳透过鳃小片的薄壁,送到水中;同时吸取水中的氧,氧随血液循环输送到身体各部分。口部和鳃盖的交替开闭,可以使水不断地由口进入口腔,经咽到达鳃腔,与鳃丝接触,然后由鳃孔排到外面,鱼类的呼吸作用就是在这个过程中完成的(吴志强,1993)。此外,鳃还具有排泄氮代谢废物和参与渗透压调节的重要功能(王哲等,2016)。本实验中,由于小瓜虫的寄生,澳洲龙纹斑鳃丝、鳃小片及鳃盖均出现一定程度的肿胀变形,鳃小片末端膨大甚至黏连融合在一起,鳃小片的主要功能是气体交换,肿胀变形加上黏液的堆积影响了澳洲龙纹斑鳃部器官的正常功能,造成血液

循环受阻、渗透压调节失衡,最终导致鱼体缺氧死亡。

不少学者对鱼类黏液细胞的作用及其分泌物的存在部位和形态特征进行了研究,发现分泌的黏液不仅可为水的微循环提供适宜的表面,而且可以保护其覆盖的结构不受机械损伤。本实验中,澳洲龙纹斑感染小瓜虫后鳃丝、鳃小片及鳃盖上黏液分泌增多且各组织明显增厚,可见,受到刺激后由于黏液薄膜极易破裂,迅速排出大量黏液,以减少鳃丝的损伤,此特点与白甲鱼 *Onychostoma sima*、鲢鱼 *Hypophthalmichthys molitrix*、鲫鱼 *Carassius auratus* 的情况相似(王志余和董双林,1990;郑曙明和吴青,2005)。此外,从感染严重的澳洲龙纹斑的鳃丝、鳃小片及鳃盖上观察到小瓜虫的纤毛上沾满了黏液细胞及红细胞,且小瓜虫被包裹在黏液细胞中。在生活史的某一阶段,利用纤毛或纤毛器作为运动和摄食的细胞器是纤毛虫最基本的特点,所以黏液的增多在一定程度上限制了小瓜虫的运动及营养吸收,是澳洲龙纹斑应对外来伤害的一种应激反应。

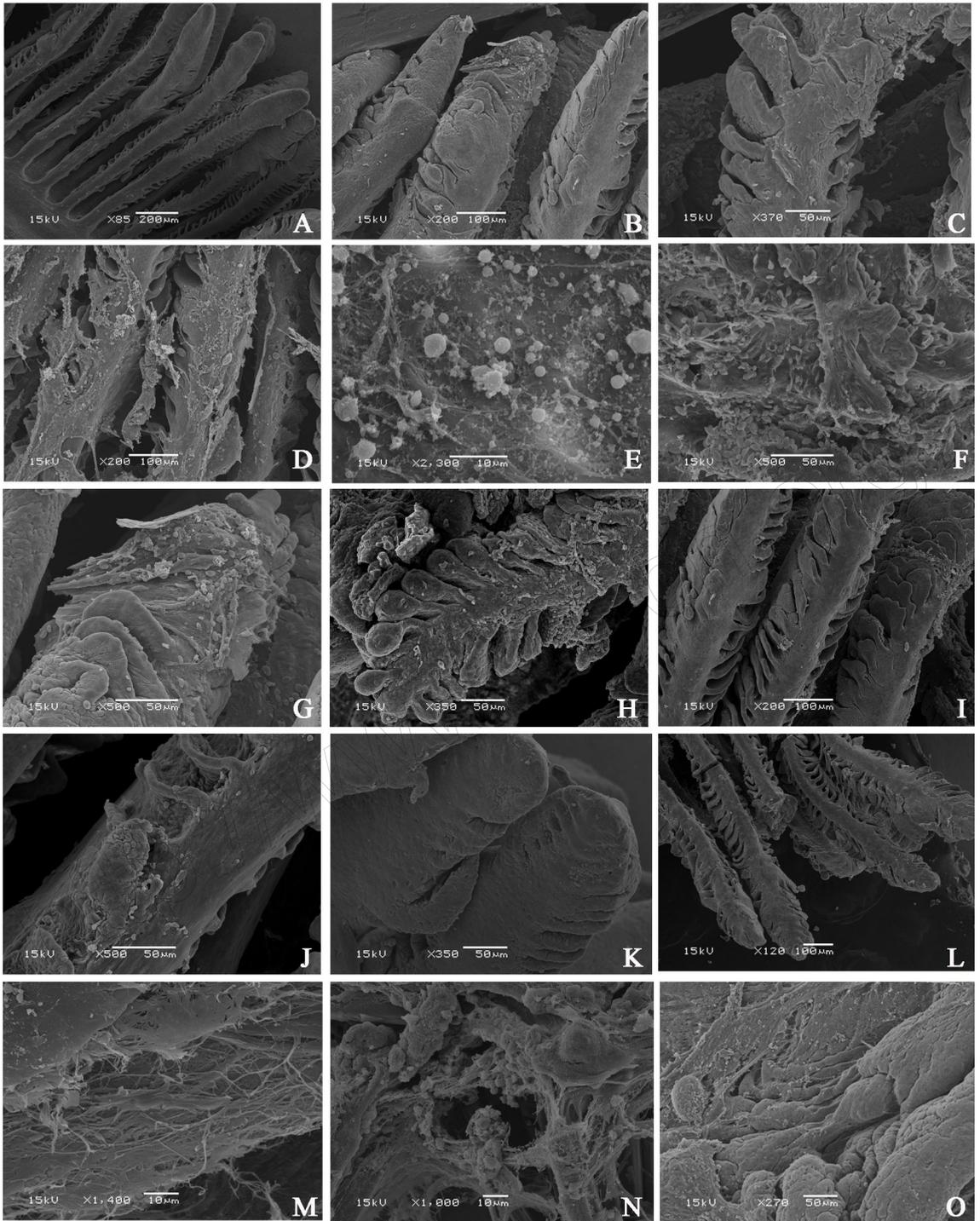


图4 澳洲龙纹斑被小瓜虫侵染后鳃丝、鳃小片及鳃盖的扫描电镜观察

Fig.4 Scanning electron microscope photographs of gill-filaments, gill-lamella and operculum of *Maccullochella peelii* infected by *Ichthyophthirius multifiliis*

A: 鳃丝整体观; B: 肿胀的鳃丝末端; C: 鳃丝表面; D: 黏液布满鳃丝的表面; E: 鳃丝表面的黏液; F: 鳃丝表面的红细胞; G: 鳃小片缺失; H: 鳃小片末端膨大; I: 鳃小片缺失、变形; J: 鳃丝表层单细胞增生; K: 鳃小片增生; L: 断裂的鳃丝;

M: 鳃盖上的胶原纤维; N: 鳃盖上的黏液; O: 鳃盖肿胀。

A: The overall view of the silk; B: The swollen ends of the gill; C: The surface of gill-filaments; D: The surface of the gill-filaments covered with mucus; E: The mucus on the surface of gill-filaments; F: Red blood cells on the surface of the gill-filaments; G: The gill-lamella missing; H: The ends of the gill-lamella expanded; I: Loss and deformation of gill-lamella; J: The proliferation of single-cell surface; K: The proliferation of the gill-lamella; L: The broken gill-filaments; M: Collagen on the operculum; N: The mucus on the operculum; O: The lid is swollen.

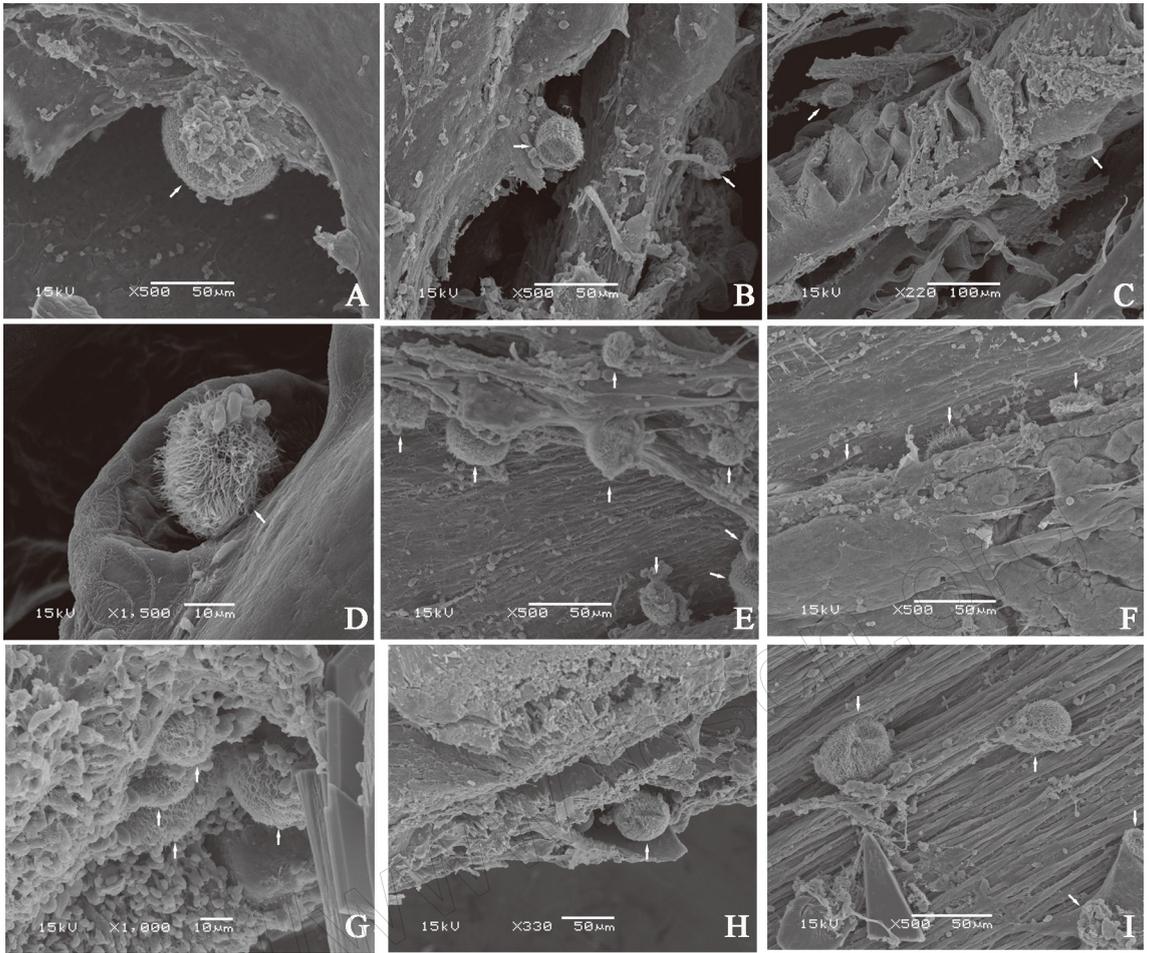


图 5 小瓜虫在澳洲龙纹斑鳃上的分布情况

Fig.5 The distribution of *Ichthyophthirius multifiliis* on the gills of the Murray cod, *Maccullochella peelii*

A: 寄居在鳃丝的扁平上皮细胞之下; B: 在鳃丝表面; C: 在鳃丝之间; D: 在鳃小片间; E: 在鳃盖上;
 F: 在鳃盖上皮细胞之下; G: 包裹在鳃盖上的黏液细胞里; H: 在鳃盖的断裂截面里; I: 在鳃盖表面。

A: *I. multifiliis* under the flat epithelial cells of the gill-filament; B: On the surface of the gill-filament; C: Among the gill-filaments;
 D: Among the gill-lamella; E: On the operculum; F: Under the epithelial cells of the operculum; G: Parcelled in the mucus cell on the operculum; H: In the fracture section of the operculum; and I: On the surface of the operculum.

3.2 侵染后期小瓜虫在澳洲龙纹斑鳃上的分布情况

以往的研究多发现小瓜虫主要寄生在鳃丝及鳃小片上,有关鳃盖上寄生的报道极少,可能学者们在研究小瓜虫的时候,习惯性地只观察鳃丝而忽略了鳃盖。本研究发现,侵染后期寄生在澳洲龙纹斑鳃盖上的小瓜虫的数量明显多于鳃丝及鳃小片上的数量。这可能是由于侵染后期鳃丝及鳃小片的肿胀变形甚至鳃小片的黏连成片,再加上黏液分泌的增多,不适宜小瓜虫的活动,致使其迁移至活动范围相对较大的鳃盖上。这一结果应该在以后的研究中引起重视,需进一步验证。

参考文献

郭松,王广军,方彰胜,余德光,刘邦辉,龚望宝,郁二蒙,李志斐,蔡晓丹,2012. 澳洲鲑鲈的生物学特征及人工繁殖技术. *江苏农业科学*, 40(12): 242-243.
 陆英杰,王志彪,韦进钟,于辉,2014. 多子小瓜虫感染对草鱼免疫相关器官影响的病理学观察. *畜牧与兽医*, 46(10): 64-66.
 罗钦,饶秋华,李巍,涂杰峰,罗士炎,翁伯琦,2017. 小瓜虫对澳洲龙纹斑不同生长阶段苗种的感染与致病性研究. *中国预防兽医学报*, 39(5): 379-383.
 罗士炎,罗钦,涂杰峰,刘洋,翁伯琦,陈华,2015. 澳洲龙纹斑养殖过程中主要疾病诊断及其防治. *福建农业学报*, 30(6): 562-566.

- 罗士炎, 罗钦, 饶秋华, 涂杰锋, 林虬, 刘洋, 于凯, 翁伯琦, 2016. 不同药物对澳洲龙纹斑幼鱼小瓜虫病的治疗效果. 福建农业学报, 31(1): 102-105.
- 倪达书, 李连祥, 1960. 多子小瓜虫的形态、生活史及其防治方法和一新种的描述. 水生生物学报 (2): 197-225.
- 王哲, 刘春雷, 顾泽茂, 翟艳华, 2016. 多子小瓜虫的形态发生及其寄生导致翘嘴鲌鳃组织病理变化. 水生生物学报, 40(5): 935-941.
- 王志余, 董双林, 1990. 鲢鲫鳃丝的扫描电镜观察. 大连水产学院学报, 5(2): 69-73.
- 吴志强, 1993. 鱼鳃的构造及其生理机能. 生物学通报, 28(11): 6-7.
- 章海鑫, 王静娟, 张爱芳, 黄江峰, 余智杰, 周智勇, 徐先栋, 2016. 淡水小瓜虫的研究现状. 江西水产科技 (2): 38-43.
- 郑曙明, 吴青, 2005. 白甲鱼鳃的扫描电镜观察. 西南农业大学学报(自然科学版), 27(6): 413-415.
- ABOWEI J F N, BRIYAI O F, BASSEY S E, 2011. A review of some basic parasite diseases in culture fisheries flagellids, dinoflagellides and ichthyophthiriasis, ichtyobodiasis, coccidiosis trichodiniasis, heminthiasis, hirudinea infestation, crustacean parasite and ciliates. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(5): 213-226.
- COOLEY G, ROWLAND S J, 1993. Murray-Darling finfish current developments and commercial potential. *Austasia Aquaculture*, 7(3): 35-38.
- MALLIK S K, SHAHI N, DAS P, PANDEY N N, HALDAR R S, KUMAR B S A, CHANDRA S, 2015. Occurrence of *Ichthyophthirius multifiliis* (White spot) infection in snow trout, *Schizothorax richardsonii* (Gray) and its treatment trial in control condition. *Indian Journal of Animal Research*, 49(2): 227-230.
- SELOSSE P M, ROWLAND S J, 1990. Use of common salt to treat *Ichthyophthiriasis* in Australian warmwater fishes. *The Prog Fish-Culturist*, 52(2): 124-127.

(责任编辑:杨郁霞)