

## 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究

许文军<sup>1</sup> 施慧<sup>1</sup> 徐汉祥<sup>1</sup> Hamish Small<sup>2</sup>

(1 浙江海洋学院海洋与渔业研究所(浙江省海洋水产研究所), 舟山 316100;

2. Virginia Institute of Marine Science, VA USA 23062)

**摘要:** 2004年7—9月,浙江舟山人工养殖梭子蟹相继发生一种被当地渔民称为“牛奶病”的流行性疾病,并引起大量死亡。病蟹蟹体消瘦,肌肉白浊,蟹盖内可见大量乳白色液体。对带有典型病症的濒死病蟹进行细菌分离,未分离到细菌。组织病理学观察发现,病蟹血淋巴急剧下降,代之以大量的寄生原虫,该寄生虫在病蟹的肝胰腺、鳃、心脏、肌肉等部位大量侵袭,并引起这些组织发生以坏死为主的变质性病变,其病理特征主要表现为:细胞肿胀、变性、坏死,某些细胞的细胞核固缩、碎裂或崩解。电镜观察乳白色体液及病变组织,可见大量寄生原虫,该寄生虫大小约5—7 $\mu$ m,多数呈卵圆形,单核或多核,具有2根鞭毛。进一步通过分子生物学方法,确定该寄生虫为血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp.,初步认定其是引起养殖梭子蟹“牛奶病”的一种重要病原。

**关键词:** 梭子蟹; 牛奶病; 病原; 血卵涡鞭虫

中图分类号: S945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0637-06

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国海水大型经济蟹类,由于其肉质鲜美,营养丰富,经济价值高而在国内外享有盛名。近年来,随着梭子蟹养殖业的进一步发展,梭子蟹病害亦呈上升趋势,特别是一种被当地渔民称为“牛奶病”的疾病,由于其发病范围广、死亡率高,给渔民造成较大的经济损失,严重制约了梭子蟹养殖的健康发展。该病主要表现为病蟹蟹体消瘦,肌肉白浊,打开蟹盖有大量乳白色牛奶状液体等症状。2004年7—9月份,浙江舟山的登步、小沙、朱家尖等梭子蟹养殖基地相继暴发此病,发病面积3000多亩,造成大批养殖成蟹死亡,最高死亡率高达60%以上,经济损失严重。针对这一情况,笔者对发病蟹塘进行了现场取样调查,从养殖梭子蟹发病区采集大量典型“牛奶病”病蟹样品,经过病原、组织病理、电镜观察以及分子生物学方法研究,初步确定血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp. 是引起养殖梭子蟹“牛奶病”的重要病原,这在国内尚属首次。本文是相关结果的报道。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料来源 本实验所用病蟹样品是由2004年

7—9月份,采自舟山市登步乡、小沙乡、朱家尖镇等梭子蟹养殖基地的发病蟹塘,对具有典型“牛奶病”症状的垂死病蟹进行取样、解剖、镜检、细菌分离、样品组织固定等,部分样品进行现场处理,部分用塑料桶充气带回实验室进行处理。作为病理组织学研究的对照,正常健康蟹采自同一地区健康梭子蟹养殖塘,经检查确认无病后使用。两者的规格均在每只200—300g之间。

**1.2 病蟹细菌分离** 选择有典型症状的濒死病蟹,用70%酒精棉球擦洗消毒,无菌操作,分别从足部肌肉、心血淋巴、肝胰腺等部位取样,划线培养于Zobell 2216E和TCBS培养基平板上。27℃恒温箱培养2d后观察细菌生长情况。

**1.3 血淋巴检查** 用1mL注射器先吸取10%海水福尔马林固定液0.1mL,再从梭子蟹围心腔内抽取等量血淋巴液混匀,将固定的血淋巴滴少许于玻片上,盖上盖玻片,于显微镜下直接观察;同时制作血涂片,用HE染色进行观察。

**1.4 病理组织切片制备与观察** 活体解剖梭子蟹,分别取患病梭子蟹与健康梭子蟹的肝胰脏、心脏、鳃、肌肉等组织块,10%海水福尔马林固定,常规石

收稿日期: 2006-02-16 修订日期: 2007-01-25

基金项目: 浙江省海洋开发项目(05—08); 浙江省自然科学基金(Y3055045); 浙江省科技厅研究开发项目(2006F13002)资助

通讯作者: 许文军(1970—),男,浙江舟山人;高级工程师,硕士;主要从事海水养殖及病害研究工作。E-mail: xwenjun@sina.com, Tel: 0580-

蜡切片技术包埋, 切片厚度 5—6 $\mu$ m, HE 染色后, 用 Olympus 显微镜观察拍照。

**1.5 电镜样品制备与观察** 根据组织切片观察结果, 将具有典型病理变化的组织块(肝胰腺、腮)切成 1—2mm<sup>3</sup>的小块, 2.5% 戊二醛溶液固定, 用常规电镜样品制备方法处理样品并观察拍照。

**1.6 寄生虫的分子生物学鉴定** PCR 模板 DNA 的制备: 将用 95% 酒精固定的病蟹寄生虫样品, 按 DNAAzol kit 说明书提取总基因组 DNA。参照 Hudson 等<sup>[1]</sup> 血卵涡鞭虫的 18S rDNA 序列设计引物。扩增正向引物 P1: 5' GTT CCC CTT GAA GGA ATT C 3'; 反向引物 P2: 5' CGC ATT TCG CTG CGT TCT TC 3'。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 超纯水: 19.25  $\mu$ L; 10× Reaction buffer: 2.5  $\mu$ L; 引物(50 pmol/L): 0.5  $\mu$ L; dNTP(10 mmol/L): 0.5  $\mu$ L; 模板: 2.5  $\mu$ L; Taq 酶: 0.25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s → 52 °C 退火 45 s → 72 °C 延伸 1 min; 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 Roche High pure PCR product purification Kit 纯化, 寄上海生物工程有限公司进行序列测定。

## 2 结 果

### 2.1 病蟹临床与解剖症状

病蟹摄食下降或停止摄食, 行动迟缓, 病重者在水面或于池边缓游, 有时静伏于池边浅水处, 病蟹反应能力很差, 离开水体后不久即死亡。病蟹体色暗淡, 部分附肢关节的外壳上可见呈粉红色的病变, 灯光下可隐约透视到足部肌肉呈白浊样。步足或大螯肌肉以感染轻重而出现不同程度的白浊液化; 打开前盖, 可见肝胰腺模糊呈红棕色或乳白色, 胃肠空, 鳃呈土黄色或黑褐色, 甲壳腔内的血淋巴由正常时的蓝青色与具较强凝聚性转变为呈浊白色牛奶状不能凝固的变性液体(图版 I -1, 2)。

### 2.2 细菌分离结果

多数病蟹的血液以及肝胰腺未分离到细菌, 少数分离到细菌, 但细菌种类较杂, 且未见有明显的优势菌落。

### 2.3 血淋巴检查

正常梭子蟹血液涂片, 可见血液中含有无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞 3 种血淋巴细胞(图版 I -3)。病蟹血液由正常时的蓝青色转变为浊白色, 对乳白色液体进行涂片镜检, 发现血淋巴急剧下降, 代之以大量的寄生原虫。观察到的寄生虫多数呈卵圆型, 单核或多核, 大小约 5—7 $\mu$ m, 仔细观察, 有些能见到 2 根长度不等的鞭毛(图版 I -4)。

### 2.4 组织病理变化

与正常梭子蟹比较, 患病梭子蟹内脏及肌肉组织均表现出极显著的组织病理变化。在 HE 染色的肝胰腺、心脏、肌肉、鳃的组织切片中均见有大量寄生原虫, 被寄生虫侵袭的组织出现以坏死为主的变质性病变。

**肝胰腺** 健康梭子蟹肝胰腺组织由众多分支的肝小管构成, 肝小管具完整的纤毛柱状上皮、肌肉层及结缔组织, 排列整齐(图版 I -5)。病蟹肝细胞大部分水肿、变性, 细胞排列可见轻度紊乱, 部分细胞核坏死消失; 随后肝管上皮细胞间界线模糊消失, 细胞核多数碎裂, 少数萎缩或溶解, 乃至整个肝管细胞都坏死, 肝管间的血隙及结缔组织间充满大量寄生原虫(图版 I -6)。

**鳃组织** 健康梭子蟹鳃组织由鳃轴及鳃丝组成(图版 I -7)。患病梭子蟹鳃丝变性、坏死, 鳃上皮细胞水肿变性, 鳃腔扩张, 并且鳃腔内寄生大量寄生原虫(图版 I -8)。

**足部肌肉** 梭子蟹步足肌属横纹肌, 肌纤维呈长筒状, 排列紧密而规则, 明暗带清晰(图版 I -9)。病蟹足部肌肉肌纤维断裂, 横纹消失, 呈均质样变性或坏死; 肌束间空隙扩大并渗含有大量虫体(图版 I -10)。

**心脏** 正常的心肌纤维有横纹, 且分支, 彼此相连成网(图版 I -11)。病蟹心肌纤维浊肿, 呈现与步足肌相同的肌纤维断裂溶解现象, 大部分横纹消失, 心肌纤维弯曲、断裂和局部坏死, 其间寄生有大量原虫(图版 I -12)。

### 2.5 电镜观察

对病蟹肝胰腺组织、鳃的电镜观察发现, 这些组织器官均寄生有大量寄生原虫。肝胰腺, 出现许多细胞溶解的空泡结构, 在肝管的管腔中, 可见坏死物, 管腔缩小或阻塞, 肝管间的血隙及结缔组织间充满大量寄生虫(图版 II -1)。肝组织发生脂肪变性, 微绒毛损伤脱落, 肝胰腺组织结构模糊(图版 II -3)。鳃毛细血管内充满大量的虫体, 血管内血细胞含量明显减少(图版 II -2)。

对该寄生原虫的扫描和透视电镜观察, 进一步确定其具有 2 条鞭毛, 呈卵圆形, 同时, 不同阶段的虫体具有一个或多个细胞核(图版 II -2, 4, 5)。组织细胞内未发现有病毒颗粒。

### 2.6 寄生虫的分子生物学鉴定

取 3 $\mu$ L PCR 扩增产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果发现所有取样牛奶病病蟹的血淋巴样品均能扩增出 580 bp 左右的条带, 而对照的健康蟹血淋巴样品则没出现条带(图 1)。

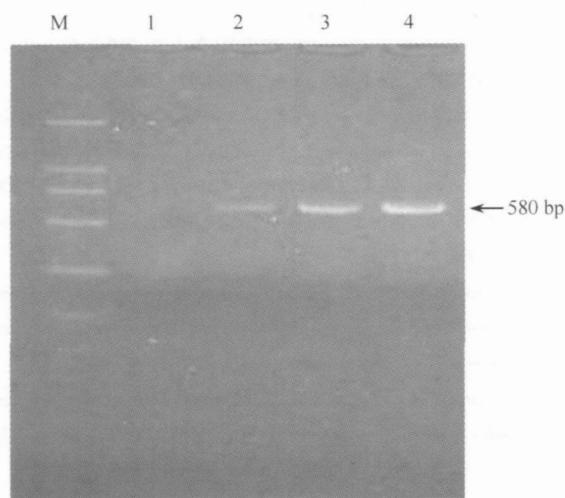


图1 寄生原虫的基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of PCR amplification for gene of the parasites

M: DNA 标记; 1: 阴性对照; 2: 感染蟹 1; 3: 感染蟹 2

4: 感染蟹 3

M: DNA marker; 1: Uninfected crab; 2: Infected crab1; 3: Infected crab2; 4: Infected crab3

取 50 $\mu$ L 病蟹寄生虫的 PCR 产物进行测序, 结果如下:

AGCGCGAGTCATCAGCTCGTGTGATTACGTCCCTGCC  
 CTTTGTACACACCCGCCCCGTCGCTCCTACCGATTGAGTC  
 ATCCGGTGAATAATTCCGACGGCAGCCTTTCCAGTT  
 CTGGAAGCGGCAGCTGAAGTTAGTGAACCTTATCAC  
 TTAGAGGAAGGAGAACTCTAACAAAGCTTCCCTACGCT  
 GAACCTGCGGAAGGATCATTGCAAGATAATAATATA  
 TTTTATTATTTCACACACAAACATTCAACCGTGAACCT  
 TAGCCATTAGCTACGACGACTACTAGCTAGCTACTGAG  
 TGGGGCGGTGTGTTGTTCTACAGCTANTTACCCG  
 TAGCTGNANTACACACACTAGTACCTGTCTTTGCTGG  
 TAGGAGAAGTAGCTTCTACGGGGTGTGAGGGTACGGTG  
 GTAGTACACGCCCTACCACTGAACCTCCATCCCACGT  
 TTGCTTCCATAAACACAAACATCTCTAATTCAATTAT  
 TCATCTTGTCTGCTCCCTTACGGGGTTAGGGTTT  
 TTTCAACGTATGACTAGAAAATTAGCGATGAATGC  
 CTCGTCTCAG

### 3 讨 论

“牛奶病”是目前梭子蟹病害研究中的一大热点。许文军等<sup>[2]</sup>曾从秋冬季海捕暂养梭子蟹牛奶病蟹当中分离到假丝酵母菌(*Candida oleophila*), 并通过感染试验、组织病理研究证实该酵母菌是引起梭子蟹牛奶病症的一种病原。李圣雄<sup>[3]</sup>、纪荣兴<sup>[4]</sup>、毛芝娟等<sup>[5]</sup>曾报道过引起锯缘青蟹肌肉白浊的病原是微孢子虫和弧菌感染。根据我们的对 2004 年 7—9 月份人工养殖梭子蟹“牛奶病”病蟹取样的调查结

果, 大部分濒死“牛奶病”病蟹均有典型的症状, 即病蟹蟹体消瘦, 肌肉白浊, 蟹盖内充满大量乳白色液体。镜检乳白色液体可见, 血淋巴急剧下降, 代之以大量的寄生原虫。高倍显微镜及电镜观察, 可清楚看到该寄生原虫带有 2 根鞭毛, 根据该寄生虫的大小、形态、内部结构、寄生部位以及宿主表现的症状, 其与 Stentiford 等<sup>[6]</sup>描述的血卵涡鞭虫的腰鞭孢子相类似。进一步通过分子生物学方法研究, 采用 Hudson 等<sup>[1]</sup>血卵涡鞭虫特异引物, 所有这些样品均能扩增出分子量为 580bp 左右的条带, 由此确定该寄生原虫为一种血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp.。

组织病理观察发现, 所有“牛奶病”病蟹肝胰脏、心脏、足部肌肉以及鳃等部位均充满上述寄生血卵涡鞭虫, 而作为对照组健康梭子蟹的各器官组织中则未发现有血卵涡鞭虫寄生, 表明该寄生虫与梭子蟹的牛奶症有密切的关系。研究发现, 发病中后期, 由于血卵涡鞭虫的大量寄生, 导致血淋巴数量急剧下降, 使体液表现出浊白色和不能凝聚等症状; 同时病蟹各重要组织器官均发生严重病变, 导致主要生理功能丧失, 如鳃组织病变, 导致呼吸功能受阻, 病蟹往往浮游于水面或池边浅水处, 进而死亡; 心肌纤维病变, 导致血淋巴循环障碍; 肝胰腺病变, 导致新陈代谢紊乱, 病蟹摄食、活动能力减弱, 反应迟钝, 行动缓慢等, 进一步导致病蟹死亡。对“牛奶病”病蟹的细菌分离结果发现, 多数病蟹的血淋巴以及肝胰腺未分离到细菌, 少数分离到细菌, 但种类较杂, 且不同病蟹缺少共性, 认为细菌是在梭子蟹体质下降, 感染寄生虫的同时或之后感染, 作为继发感染, 其可能促进病蟹的死亡, 但并非此次“牛奶病”的主要病原; 同时, 电镜观察结果显示, 病蟹的肝胰腺、心肌、血淋巴以及鳃丝等组织均未发现有病毒颗粒, 而寄生血卵涡鞭虫则在所有的组织当中大量侵袭。由此初步确定血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp. 是导致 7—9 月份养殖梭子蟹“牛奶病”暴发死亡的主要病原。也表明血卵涡鞭虫是引起梭子蟹“牛奶病”的又一种重要病原。

有关血卵涡鞭虫感染养殖梭子蟹并引起暴发性死亡的报道国内尚属首次。Newman<sup>[7]</sup>, Messick<sup>[8,9]</sup>, Field<sup>[10,11]</sup>, Shields<sup>[12]</sup>等年曾报道过引起自然海区龙虾(*Nephrops norvegicus*)、兰蟹(*Callinectes sapidus*)等甲壳类动物疾病, 并导致一定死亡的血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp. 寄生虫。Stentiford<sup>[6]</sup>等认为, 血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp. 是海水甲壳类的重要病原寄生虫, 危害可与对虾病毒病、龙虾高夫败血症相提并论, 由于该寄生虫的流行, 已威胁到挪威龙虾、雪蟹、美国兰蟹等经济种类的生产。但血卵涡鞭虫的生活史至今尚不是很清楚, 其通常具有原生质期、营

养体期和孢子生殖阶段, 其中孢子生殖阶段会产生带有双鞭毛的两种形态的大小腰鞭孢子, 大量感染可导致宿主血淋巴急剧下降, 血液不能凝聚, 出现牛奶状白浊等症状<sup>[6]</sup>。笔者已通过大量的资料证实血卵涡鞭虫 *Hematodinium* sp. 不但是引起近年来养殖梭子蟹规模性死亡“牛奶病”的主要病原, 同时其也是引起养殖青蟹“黄水病”的重要病原, 应引起足够的重视。有关该寄生鞭毛虫的生活史、感染途径以及防治方法等方面研究工作目前正在进行当中。

致谢:

本文的完成得到中科院水生生物研究所聂品研究员、美国弗吉尼亚海洋科学研究所 Shields, J. D. 教授以及浙江大学电镜室黎军英老师、普陀人民医院病理科应功武等的热忱帮助和指导, 谨致谢忱。

## 参考文献:

- [ 1 ] Hudson D A, Adlard R D. PCR-techniques applied to *Hematodinium* spp. and *Hematodinium*-like dinoflagellates in decapod crustaceans [ J ]. *Dis. Aquat. Org.*, 1994, **20**: 203—206
- [ 2 ] Xu W J, Xu H X, Jin H W. Study on pathogen of *Portunus* “emulsification” disease of *trituberculatus* [ J ]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 2003, (3): 209—213 [ 许文军, 徐汉祥, 金海卫. 梭子蟹“乳化病”病原的研究. 浙江海洋学报, 2003, (3): 209—213]
- [ 3 ] Zhuang S X. Microsporidium infection of mud crab *Scylla serrata* [ J ]. *Scientific Fish Farming*, 1994, **18**(5): 75—78 [ 圣雄. 锯缘青蟹之微孢子虫感染症. 科学养鱼, 1994 **18**(5): 75—78]
- [ 4 ] Ji R X, Huang S T. Studies on pathogenic bacteria of “Yellow Body” disease of mud crab *Scylla serrata* [ J ]. *Journal of Oceanography in TaiWan Strait*, 1998, **17**(4): 473—476 [ 纪荣兴, 黄少涛. 锯缘青蟹“黄体病”病原菌的研究. 台湾海峡, 1998, **17**(4): 473—476]
- [ 5 ] Mao Z J, Zhuo H L, Yang J F, et al. Studies on pathogen of *Hematodinium* spp. and *Hematodinium*-like dinoflagellates in decapod crustaceans [ J ]. *Journal of Oceanography in TaiWan Strait*, 2001, **20**(2): 187—192 [ 毛芝娟, 卓华龙, 杨季芳, 等. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡, 2001, **20**(2): 187—192]
- [ 6 ] Stentiford G D, Shields J D. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans [ J ]. *Dis. Aquat. Org.*, 2005, **66**: 47—70
- [ 7 ] Newman M W, Johnson C A. A disease of blue crabs (*Callinectes sapidus*) caused by a parasitic dinoflagellate, *Hematodinium* sp. [ J ]. *J. Parasitol.* 1975, **61**: 554—557
- [ 8 ] Messick G A, Sindeman C J. Synopsis of principal diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus*. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. 1992, NMFS-F/NEC—88
- [ 9 ] Messick G A. *Hematodinium perezi* infections in adult and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* from coastal bays of Maryland and Virginia [ J ]. *USA. Dis. Aquat. Org.*, 1994, **19**: 77—82
- [ 10 ] Field R H, Appleton P L. A *Hematodinium*-like dinoflagellate infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*: observations on pathology and progression of infection [ J ]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, **22**: 115—128
- [ 11 ] Field R H, Chapman C J, Taylor A C, et al. Infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by a *Hematodinium*-like species of dinoflagellate on the west coast of Scotland [ J ]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992, **13**: 1—15
- [ 12 ] Shields J D. The parasitic dinoflagellates of marine crustaceans [ J ]. *Ann. Rev. Fish Diseases*, 1994, **4**: 241—271

## PRELIMINARY STUDY ON THE *HEMATODINIUM* INFECTION IN CULTURED *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

XU Wen-Jun<sup>1</sup>, SHI Hui<sup>1</sup>, XU Han-Xiang<sup>1</sup> and Hamish Small<sup>2</sup>

(1. *Marine and Fishery Research Institute of Zhejiang Ocean University (Marine Fishery Institute of Zhejiang Province)*, Zhoushan 316100;

2. *Virginia Institute of Marine Science, VA USA 23062*)

**Abstract:** An epidemic disease named “milky disease” happened in cultured swimming crab *Portunus trituberculatus* from July to September during the year 2004 in Zhoushan, Zhejiang Province and lead to high mortality. The disease crab is usually thin and has the symptom of muscle white, milky liquid can be seen when open the lid. No predominance bacteria colonies were isolated from the typical milky crab. The study of the histopathology showed that the haemolymph in the disease crab decreased sharply, and was replaced by large amount of parasites, which was observed in muscle, heart and hepatopancreas from the disease crab. The pathological characteristics mainly appeared as cells swelling, necrosis, nucleus condensation and collapse. The opalescent hemolymph and abnormal tissues were observed under electron microscope, masses of the parasite were observed but no virosome had been found. The parasite is 5—7 $\mu$ m in size, and oval in shapes with two flagellums. Preliminary study showed that the dinoflagellate *Hematodinium* sp was the main pathogen of the milky disease of *Portunus trituberculatus*.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; Milky disease; Pathogen; *Hematodinium* sp.