

# 秉伪指环虫生活史形态观察及发育条件研究<sup>\*</sup>

刘晓东 陈强 柯翎 林天龙<sup>\*\*</sup>

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003)

**摘要** 伪指环虫病是严重危害鳗鲡养殖的寄生虫病。为了寻找其生活史薄弱环节, 给生产实践提供防制思路, 本研究对寄生于欧洲鳗鲡的秉伪指环虫的生活史进行了细致的观察, 证实温度是影响虫卵孵化的决定因素, 还有以下新发现: 纤毛幼虫具正趋光性; 成虫在排卵过程中, 有新卵同时开始形成; 纤毛幼虫以头端或尾端出卵的方式孵化; 显微镜和SEM观察均显示虫体中部的纤毛主要分布在腹部, 并非完全环绕; 高盐溶液短暂处理能终止虫卵的发育。

**关键词** 欧洲鳗鲡; 秉伪指环虫; 纤毛幼虫; 生活史

秉伪指环虫 (*Pseudodactylogyrus bini* Gussev, 1965) 在分类上隶属于扁形动物门 (Platyhelminthes), 单殖吸虫纲 (Monogenea), 多钩亚纲 (Polyonchoinea), 锚首虫科 (Ancyrocephalidae), 伪指环虫属 (*Pseudodactylogyrus*) (张剑英等, 1999)。伪指环虫病是严重危害鳗鲡的寄生虫病, 常常由秉伪指环虫和鳗鲡伪指环虫 (*P. anguilla* Gussev, 1965) 引起, 全年均可发生, 可感染日本鳗、欧洲鳗、美洲鳗, 是养殖鳗鲡的主要病害之一。伪指环虫的寄生不仅影响鳗鲡摄食, 而且导致鳗鲡鳃丝充血, 时常引起继发性细菌感染, 造成大量死亡 (俞伏松等, 2000)。由于伪指环虫易反复感染, 用药频繁, 导致伪指环虫产生耐药甚至出现多重耐药, 使得伪指环虫病的防治成为鳗鲡养殖的一个棘手难题。

单殖吸虫的生活史无需经过中间宿主, 水体理化条件对虫卵孵化的影响将直接关系到这类寄生虫在宿主间传播的成功率 (Kearn, 1986), 目前已有国内外学者对伪指环虫的虫卵发育和生物学特性进行了初步研究 (Golovin and Shukhgalter, 1979; 钱宝珍和吴宝华, 1984; 黄翠琴, 2004), 因此本研究试图通过对秉伪指环虫生活史形态进一步观察, 深入了解虫体各发育阶段的形态和特性, 以期伪指环虫病的科学防治提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

患伪指环虫病的欧洲鳗鲡 *Anguilla anguilla* 取自福建长乐海林鳗场, 经鉴定为秉伪指环虫病。其余仪器与材料包括体视显微镜 (江南XTL-1)、光学显微镜 (Olympus CX21-BM)、倒置显微镜 (重庆光学XSZ-D2)、96孔细胞培养板 (Costar)、扫描电子显微镜 (日本电子JSM-6380LV)。

### 1.2 方法

**1.2.1 秉伪指环虫产卵过程观察:** 剪下鳗鲡部分鳃丝于光学显微镜下镜检, 将含有较多成虫的鳃丝加入盛有少量纯水的玻璃平皿中, 显微镜下观察成虫的活动及产卵过程。

**1.2.2 秉伪指环虫卵的孵化过程:** 在实验室内的50L塑料方桶内饲养三尾感染秉伪指环虫的欧洲鳗鲡, 待鳗鲡适应环境后开始少量投喂鳗鲡配合饲料, 每隔2天换水1/2, 将桶底沉积物收集至烧杯中沉淀2h后弃掉上层清水, 吸取1mL沉积物至培养皿中, 纯水稀释5倍后于体视显微镜下大量收集虫卵, 纯水洗涤数遍后移至预先加有300μL纯水的96孔板中, 每孔约20个虫卵, 置生化培养箱27℃培养, 每天观察虫卵的孵化情况, 并拍照。

收稿日期: 2007-01-24

\* 基金项目: 福建省农业科学院预试课题 (2005256 预-13)

\*\*通讯作者: E-mail: Lint05@163.com

**1.2.3 盐度对虫卵孵化的影响:** 在收集虫卵的 Eppendorf 管中加入 15% NaCl 溶液短时间浸泡 (约 1 min), 然后吸去高盐溶液, 纯水洗涤 2 遍并将虫卵逐一移入 96 孔板的 2 个培养孔中 (预先加有 300  $\mu$ L 的纯水), 同时设未经处理的虫卵作对照, 每日观察 3 次。

**1.2.4 纤毛幼虫的趋光性:** 将 100 个虫卵置于含有去离子水的平皿中孵化, 当大多数虫卵孵化出纤毛幼虫时, 先在自然光下观察纤毛幼虫的运动, 然后移至暗室中, 将平皿置于白炽灯旁边, 再观察纤毛幼虫的运动情况。

**1.2.5 纤毛幼虫形态特征的 SEM 观察:** 收集刚孵化出的纤毛幼虫, 用 5% 戊二醛预固定, 1% 锇酸再固定, 酒精逐级脱水, 临界点干燥, 离子溅射喷镀样品, 扫描电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 秉伪指环虫产卵过程

实验中观察到, 在一个完整的虫卵排出体外的过程中, 另一虫卵同时在其后方逐渐形成, 显微镜下可见虫体两侧的卵黄囊中的卵黄颗粒向卵膜移动。

### 2.2 秉伪指环虫卵的孵化过程

秉伪指环虫虫卵在 27 $^{\circ}$ C 下培养, 刚排出的虫卵为灰黑色 (图版 I-1), 卵壳透明; 在排卵后 24 h 内, 虫卵开始出现灰白色胚体和眼点 (图版 I-2), 在排卵后 24~48 h 内, 虫卵中的胚体细胞继续分裂, 并开始盘曲, 少数卵中胚体伸长弯曲, 不时伸缩蠕动 (图版 I-3); 在排卵后 48~96 h 内, 胚体各部分的轮廓逐渐明显 (图版 I-4), 可见钩的基本形状及其在后吸器上的规则排列, 同时, 胚体逐渐加快蠕动直至顶破卵盖而出 (图版 I-6), 留下一个空空的卵壳 (图版 I-5); 在排卵后 96 h 后, 有 85% 以上的虫卵都孵化成游动的纤毛幼虫。另一组置于室温下 (10~15 $^{\circ}$ C) 的虫卵 1 个月内未见幼虫孵出, 原先出现胚体的虫卵也停止了生长发育, 1 个月后将该组虫卵移至 27 $^{\circ}$ C 培养, 次日即可见到虫卵内的胚体恢复生长发育, 有的出现眼点, 有的活力恢复, 第 3 日起陆续有纤毛幼虫孵出。虫卵孵化时, 纤毛幼虫出卵的方式有头部先出卵和尾部先出卵 2 种方式, 尾部先出卵更易造成难产, 即虫体卡在卵盖开口处, 出不了卵壳。

### 2.3 盐度对虫卵孵化的影响

实验 40 天后 NaCl 处理组仍未见虫卵孵化, 而未处理组均正常孵化。

### 2.4 纤毛幼虫的趋光性

在自然光条件下, 纤毛幼虫在平皿中的运动情况是随机分布的。而在暗室中, 大多数的纤毛幼虫逐渐向平皿靠近灯光的部位集中, 其余光线较弱的部位仅有少数纤毛幼虫游动, 可见纤毛幼虫具有正趋光性。

### 2.5 纤毛幼虫形态特征的 SEM 观察

纤毛幼虫的尾吸器具有 7 对小锚钩, 1 对大锚钩尚处于锥形收缩在体内 (图版 I-7B), 7 对小锚钩呈手指状伸缩运动 (钩尚未完全形成), 尾部的环形纤毛是位于小锚钩的背面。钱宝珍和吴宝华 (1984) 报道了纤毛幼虫身体亚前端、中部和后部有三环纤毛, 本实验中除了观察到头部和尾部的环形纤毛以外 (图版 I-11, 12 箭头所示), 还观察到孵出的纤毛幼虫其身体中部的纤毛并不是闭合的环形 (图版 I-8), 而主要分布于腹部, 纤毛幼虫虫体中部的背面无纤毛分布, SEM 观察也证实了这一点 (图版 I-13, 14 箭头所示)。

## 3 讨论

本实验观察到, 在新生虫卵排出体外的过程中, 有另一个新卵在逐渐形成, 这一繁殖策略使得秉伪指环虫在水温适宜的季节能够迅速扩大种群数量。当成虫在不利的环境或者环境条件改变等应激状态下, 会加快产卵速度以保持种群繁衍。将成虫从鳃鳃上剥离移至体外后, 成虫有加速产卵的迹象, 这一现象提示, 在临床治疗的过程中, 养殖水体中加入杀虫药以后, 成虫很可能受到刺激而加速产卵, 这时加大换水量, 尽量把这些新生虫卵排出养殖水体, 可能有助于对伪指环虫病进行控制。

Buchmann (1988) 报道秉伪指环虫卵在 20 $^{\circ}$ C 以上发育加快, 30 $^{\circ}$ C 达最佳孵化温度, 与钱宝珍等 (1984) 报道的一致, 本实验也证实温度是伪指环虫虫卵孵化最为关键的因素。Naoko 等 (2006) 测定了高锰酸钾、敌百虫、亚甲基蓝、氯化钠等药物对鳃鳃伪指环虫和秉伪指环虫的纤毛幼虫和虫卵孵化的影响, 结果表明敌百虫不适于控制伪指环虫感染且易产生耐药性, 亚甲基蓝

对纤毛幼虫的影响甚微，但 10 mg/L 亚甲基蓝处理 12 h 能有效降低虫卵孵化率，2~20 mg/L 高锰酸钾和 2.5%~3.4% 氯化钠处理 5 h 对纤毛幼虫有一定的杀虫效果，但上述所有处理组均未能完全杀死纤毛幼虫和虫卵。本研究中高盐溶液似乎能够阻断虫卵发育，提供了一个防治鳗鲡伪指环虫病的新思路，能否在 Naoko 的研究基础上继续筛选一些既能完全阻断虫卵发育又对养殖鱼类无害的化学药物，与常规杀虫药配合，既杀成虫又阻止了虫卵的发育，从而克服了以往化学药物只对成虫有效而对虫卵无效的缺点。

刚孵化的秉伪指环虫纤毛幼虫在水中呈直线或弧线快速游动，寻找适合的寄主，首先与鳃丝表面的粘液吸附，然后逐步移至寄生较为牢固的部位，开始吸食寄主粘液，经过数日长成幼虫（图版 I-9），最终发育成成虫（图版 I-10），成虫产卵开始新一轮的生活史。而未感染寄主的纤毛幼虫则逐渐丧失活力，其体表纤毛成片脱落，趋向死亡。

本研究观察到刚孵出的秉伪指环虫纤毛幼虫有明显的正趋光性，这与夏晓勤和王伟俊（1997）对单殖吸虫的描述一致，这符合纤毛幼虫分散寻找宿主的需要，因此有可能利用趋光性来诱杀纤毛幼虫，为伪指环虫病的防治提供新的思路。

致谢 承蒙福建师范大学生命科学学院汪彦愷副

教授和福建省农业科学院生物技术研究所龚晖副研究员对本文提出中肯的意见和建议，敬表谢意。

### 参考文献

- 张剑英, 刘琳, 丁雪娟, 等. 1999. 寄生于鱼类的单殖吸虫与单殖吸虫病. 见: 张剑英等. 鱼类寄生虫与寄生虫病. 北京: 科学出版社, 145-147.
- 俞伏松, 林天龙, 龚晖, 等. 2000. 福建省欧洲鳗寄生虫病调查初报. 福建农业科技, 185 (1): 18-19.
- 夏晓勤, 王伟俊. 1997. 单殖吸虫生物学及生态学. 水生生物学报, 21 (1): 75-84.
- 钱宝珍, 吴宝华. 1984. 鳗鲡寄生伪指环虫 (单殖吸虫) 的危害性、生物学和治疗试验. 动物学报, 30 (2): 173-180.
- 黄翠琴. 2004. 福建欧洲鳗拟指环虫生物学特性研究和 SSR-PCR 分析. 福建农林大学硕士论文.
- Buchmann, K. 1988 Temperature dependent reproduction and survival of *Pseudodactylogyrus bini* (Mnogenea) on the European eel (*Anguilla anguilla*). *Parasitol. Res.*, 75: 162-164.
- Golovin, P. P. and O. A. Shukhgalter 1979 The biology of the mnogean parasites of eels from the genus *Pseudodactylogyrus*. *Sbornik Nauchnykh Trudov. Vsesoyuznyi Nauchno Issledovatel'skii Institut Prudnogo Rybnogo Khozyaistva Bolezni ryb I bor'ba s nimi.* 23: 107-116.
- Kearn, G. C. 1986 The eggs of Mnogeanes. *Adv. Parasitol.*, 25: 175-273.
- Naoko, U., N. Harunao, H. Takashi et al. 2006 Effects of various treatments on hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the mnogean *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. *Aquaculture*, 253: 1-4, 148-153.

## MORPHOLOGICAL OBSERVATION ON LIFE CYCLE AND EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *PSEUDODACTYLOGYRUS BINI*

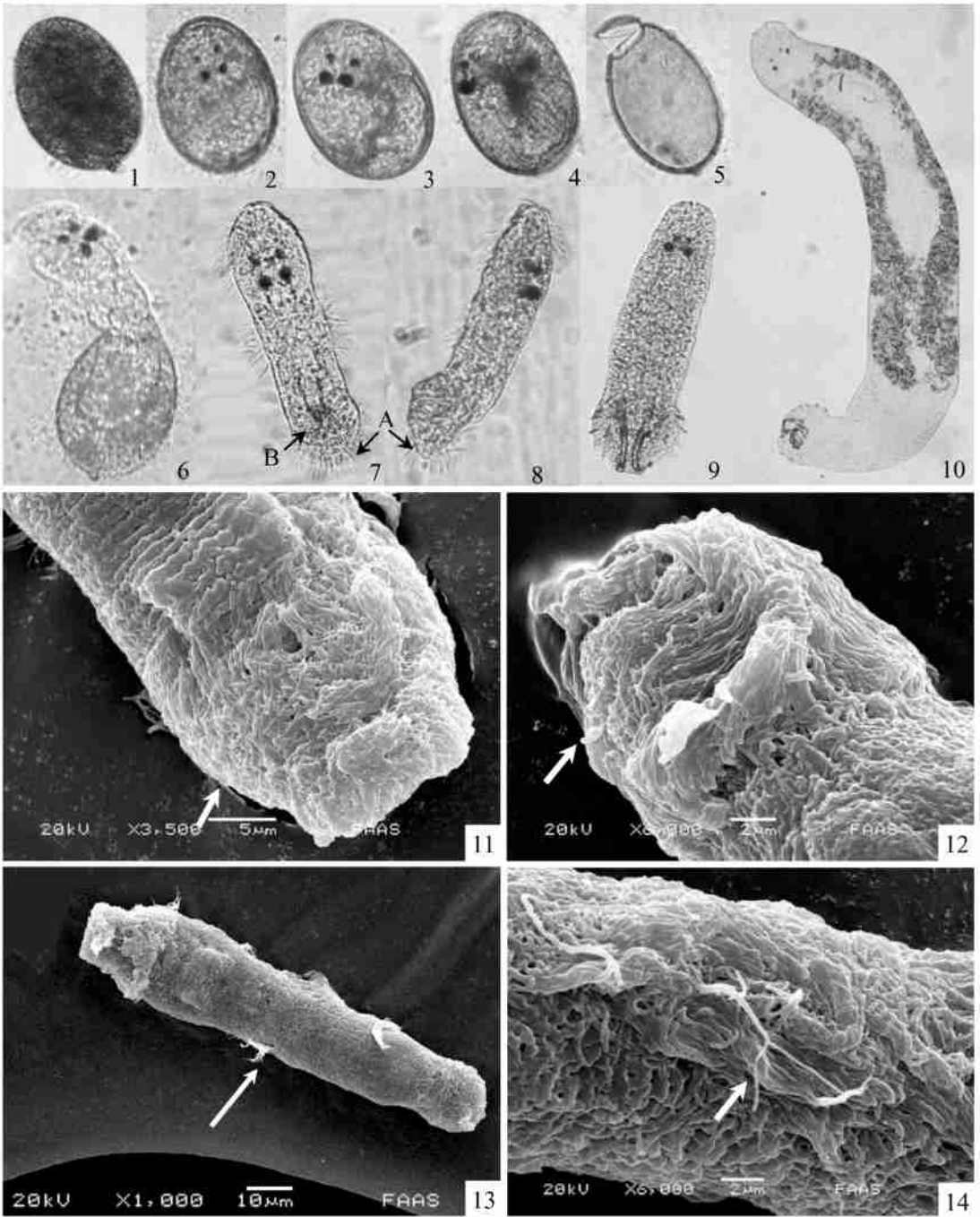
LIU Xiao-Dong CHEN Qiang KE Ling LIN Tian-Long\*

(Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

**Abstract** Pseudodactylogyrosis threatens the eel industry seriously. In order to seek changes in its life cycle for prophylaxis of Pseudodactylogyrosis in practice, life cycle of *Pseudodactylogyrus bini* was observed in laboratory. The results proved the temperature was the critical factor for hatching of *P. bini*. The positive phototaxis of oncomiracidia of *P. bini* were also found. New eggs were formed in the course of oviposition. Oncomiracidia hatching was started with rents in head or rear end of oncomiracidia. SEM found that cilia of oncomiracidia was mainly on the ventral side instead of around the waist. Embryonic development of *P. bini* can be ceased by transient treatment with high concentration salt solution.

**Key words** *Anguilla anguilla*; *Pseudodactylogyrus bini*; Oncomiracidia; Life cycle

\* Author for correspondence



图版 I：1~10 鳃鲮秉伪指环虫孵化及发育过程略图；11~14 秉伪指环虫纤毛幼虫的扫描电镜观察。

Plate I：1~10 The hatching and growing process about *Pseudodactylogyrus bini* from eel；11~14 Observation of *Pseudodactylogyrus bini* by SEM.

A. 环形纤毛 Girdle surround the body；B. 7 对小锚钩 Seven couples of hamuli

- 1. 刚排出的卵 Egg 0h after laying；2. 一日龄虫卵 Egg 24h after laying；3. 二日龄虫卵 Egg 48h after laying；4. 三日龄虫卵 Egg 72h after laying；5. 卵壳 Egg shell；6. 正在出卵的纤毛幼虫 Oncomiracidia hatching out；7. 纤毛幼虫腹面观 Ventral view of the oncomiracidia；8. 纤毛幼虫侧面观 Profile view of the oncomiracidia；9. 幼虫 Larvae；10. 成虫 Adult；11. 头部 Anterior region；12. 尾部 Haptor；13. 全虫 Whole body；14. 腹部侧面 Ventral profile. 箭头指向纤毛 Arrows show cilia.