



刺参养殖池塘中新敌害生物澳洲异尾涡虫的鉴定及其危害

孔 淼^{1,2}, 廖梅杰^{1,2,3}, 王印庚^{1,2,3*}, 杨振茂⁴, 李 彬^{2,3}, 荣小军^{1,2,3},
张 正^{1,2,3}, 于永翔^{2,3}, 李欣容^{1,2}, 张永刚²

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

4. 辽宁省海洋水产养殖协会, 辽宁 大连 116000)

摘要: 为了对导致辽宁大连、山东东营的2家养殖场池塘养殖刺参大量化皮死亡的新的敌害生物进行鉴定并确定其对养殖刺参的危害。本实验通过形态学观察、分子鉴定及系统发育分析确定了涡虫的分类地位, 通过生态学方法确定了其生态适应条件, 通过切割后培养的方法观测了其再生能力, 通过与刺参苗种的共培养实验测试了该物种对刺参的危害及其危害方式。形态学观察结果显示, 该涡虫体长0.96~3.26 mm, 体宽0.49~1.93 mm, 外观黄色或黄褐色, 头部钝圆, 具一对暗红色棒状眼点, 尾部具两条并列的尾垂; 显微镜镜检发现其表皮下分布密集的虫黄藻, 体表周生纤毛, 雌雄同体, 口后具有两个生殖孔; 对该物种 *CO I* 及 *18S rDNA* 基因片段扩增测序结果进行分析, 并构建基于 *18S rDNA* 基因的系统发育树, 结果显示该生物与澳洲异尾涡虫序列同源性达99.64%, 根据其形态学特征, 并结合 *18S rDNA* 分子鉴定结果, 将该生物鉴定为澳洲异尾涡虫; 进一步对其生活习性进行了研究, 结果显示, 该生物具有避光性, 其适宜温度为18~24 °C, 适宜 pH 为5.5~8.0, 适宜盐度为20~40; 再生实验表明, 该物种具有很强的前后轴极性再生能力; 该生物与刺参的共培养实验表明, 澳洲异尾涡虫对刺参体表表现出很强的趋向性, 可以吸附在刺参体表导致刺参苗种溃疡、化皮甚至死亡, 但刺参的体腔、肠道、呼吸树内均未发现虫体寄生。研究表明, 澳洲异尾涡虫是营自由生活的池塘养殖刺参的一种新的敌害生物, 在养殖过程中需要密切关注并防范该敌害生物。

关键词: 刺参; 澳洲异尾涡虫; 敌害生物; 形态学; 再生; 组织病理; 危害

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

近年来, 伴随着我国刺参 (*Apostichopus japonicus*) 养殖业的发展, 刺参疾病多发, 新的敌害生物也不断出现。已报道的刺参病原多种多样, 不仅包括细菌、真菌、寄生虫、病毒, 还有其他敌害生物^[1]。目前, 已报道的敌害生物有麦秆虫^[1]、桡足类^[2]、海星^[3]、海鞘^[4]、海绵动物^[5-6]等。

然而, 未曾有涡虫类病害的报道。涡虫主要生活在淡水和海洋中, 多营自由生活, 少数共生或寄生。国外有过从自然水域采集的棘皮动物、贝类及鱼类体内分离到共生和寄生涡虫类的报道^[7-10], 且寄生性涡虫一定程度上能够造成海参的损伤, 但未见有营自由生活的涡虫能对海参

收稿日期: 2020-03-25 修回日期: 2020-05-10

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901603, 2019YFD0900105); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD40, 2020ZX0101); 山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)

通信作者: 王印庚, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

造成严重危害的报道。

2019年10月,山东东营和辽宁大连的2家刺参养殖场池塘养殖的刺参出现大量化皮、死亡现象。对养殖系统进行采样和分析,在养殖池塘水体、底泥和化皮刺参的溃烂处均采集到一种涡虫类生物。为解析该生物的生理生态学特征及其对刺参的危害,本研究开展了该物种的形态学观察、分子鉴定、生态因子适应性分析,并完成了其再生能力测试。同时,采用共培养的方式解析了其刺参的危害,旨在确证此类涡虫对刺参的危害,并对其防控研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 发病特征调查及样本采集

发病特征调查在分别位于辽宁大连和山东东营的2家暴发大规模化皮的刺参养殖场进行。调查内容包括池塘养殖背景、养殖密度、养殖池水的理化指标、养殖场的发病情况、发病过程以及养殖系统中潜在敌害生物的分。肉眼观察病参的临床表现,在无菌条件下对病参进行解剖,取参苗体表、肠道、呼吸树等组织器官制作水浸片进行显微观察和记录,确定是否有寄生虫、霉菌和细菌。调查过程中,自发病池塘水体、底泥及刺参体表均发现一种营自由生活的涡虫类生物,虫体密布池塘底泥中。

涡虫样本的采集 用于病原学研究的涡虫样品采集自大连某养殖场,为保障样本的活性,采集含有大量涡虫的发病池海水与底泥,4℃冷链运回实验室。

涡虫样本的分离与培养 向采集的底泥及海水样品中加入适量的洁净海水,静置,等待底泥沉淀,涡虫游入海水。利用100目滤网及一次性吸管,将涡虫分离出,放入12.5 L方形养殖箱中室温(16±1℃)培养。每隔1 d加入碾碎且

经100目滤网过筛的熟蛋黄作为饵料,喂食4 h后换水^[11]。所暂养的虫体作为后续实验材料。

1.2 形态学特征观察

活体水镜片观察 随机取50只涡虫置于一次性培养皿中,加入少许硫酸镁结晶进行麻醉;依次取2~3只涡虫置于载玻片上,经Nikon E800光学显微镜观察其外部形态结构并拍照,测量其体长、体宽、眼点长、纤毛长及体内虫黄藻直径。

石蜡切片标本观察 随机取10只涡虫置于一次性培养皿中,等待其完全舒展,吸去多余海水,加入Bouin氏固定液固定16 h,水洗后用酒精梯度脱水、二甲苯透明和浸蜡,将浸蜡完毕的虫体在石蜡包埋机上进行包埋,使用石蜡切片机进行切片,切片厚度设置为4 μm。将切片置于载玻片上,滴加体积分数为30%的酒精溶液,待舒展后再置于展片机上,用42℃的蒸馏水将其充分展开,最后置于烤片机上45℃烘烤6 h,苏木精—伊红(H.E)染色并封片后,利用光学显微镜观察、拍照。

1.3 分子鉴定及系统发育分析

随机取若干只饥饿处理的涡虫,纯水清洗2~3遍,液氮处理15 s后,选用E. Z. N. A. TMO-MEGA Mollusc DNA KIT(Omega, USA)提取涡虫DNA。利用无脊椎动物通用CO I引物扩增该物种的CO I序列,利用18S rDNA特异引物扩增该物种的18S rDNA序列。PCR扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。PCR扩增体系:DNA模板1 μL,上游引物(10 μmol/L)0.5 μL,下游引物(10 μmol/L)0.5 μL,2×PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL,总体系25 μL。PCR反应条件:94℃预变性1 min;94℃30 s,52℃30 s,72℃3 min,循环30次;72℃延伸10 min。PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司

表1 用于扩增18S rDNA、COI基因的PCR引物

Tab. 1 PCR primers used to amplify 18S rDNA genes and COI genes

引物名称 primers name	引物名称 primers name	序列5'-3' sequences 5'-3'	参考文献 references
18S rDNA	CY18S(F)	GCGAATGGCTCATTAAAT CAG	[12]
	CY18S(R)	CTTGTTACGACTTTTACTTCC	[12]
COI	LCO1490(F)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	[13]
	HCO2198(R)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	[13]

进行双向测序。

将测序获得的 *CO I* 序列和 *18S rDNA* 基因序列通过 NCBI 数据库的 Blast 检索系统进行序列同源性分析, 从中选取与所获序列同源性较高的基因序列, 用 Mega 7.0 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 获得系统发育树, 并通过 Bootstrap 法 (1 000 次重复) 检验。

1.4 主要环境因子对涡虫生理活动的影响

温度 采用温度渐变的方法逐渐升高和降低温度, 升温采用恒温水浴锅加热, 降温采用在培养箱中设置水浴实验控温。升温组和降温组每组 3 个平行, 每个实验平行测试方法为 1 L 的玻璃烧杯中放入 50 只涡虫, 升温组每 12 h 升温 2 °C, 设置 16、18、20、22、24、26、28、30、32、34 °C 共 10 个梯度; 降温组每 12 h 降温 2 °C, 设置 16、14、12、10、8、6、4 °C 共 7 个梯度。实时观察每组涡虫在相应温度下的活动状态。

pH 在室温条件 (16±1) °C 下配制相应 pH 的海水, 先用 NaOH 将备用水调至 pH 值为 10.0, 再用稀 HCl 和 NaOH 溶液调至所需的 pH 值, 保证了 Na⁺浓度的一致性^[14], 设置 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5(±0.1) 共 13 个 pH 梯度实验组。每个实验组设置 3 个平行, 向每个测试组的海水中放入 30 只涡虫, 实时观察涡虫状态。

盐度 分别利用 NaCl 或纯水调整自然海水盐度, 配制盐度分别为 4、6、8、10、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、58、60、62(±0.1) 的 19 个盐度梯度海水, 每组 3 个平行, 向每个测试组中加入 30 只涡虫, 实时观察涡虫状态。

光照对涡虫的影响 在一个长、宽、高分别为 40 cm×20 cm×30 cm 的密闭纸箱 (图 1) 底部中央放置一个加有自然海水的直径为 10 cm 的一次性培养皿, 将 30 只活力旺盛的涡虫放入培养皿内, 用一块不透光纸板将箱子分为明室 (L) 和暗室 (D) 两部分, 根据 10 月份室外阳光的照射强度, 设置 1 200 lx 的光源, 观察涡虫状态及运动方向。

1.5 涡虫的再生能力测试

随机挑选 3 只涡虫, 分别放入 3 个一次性培养皿中, 待涡虫完全舒展, 迅速用手术刀垂

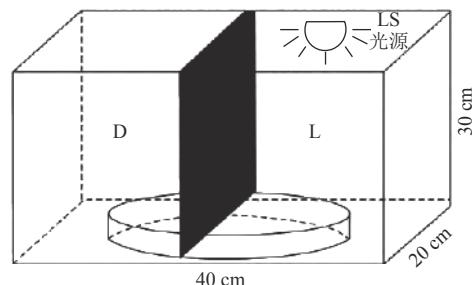


图 1 光照对涡虫的影响实验示意图

D. 暗室, L. 明室, LS. 光源

Fig. 1 Schematic diagram of the influence of light on planarians

D. darkroom, L. light room, LS. light source

直于体轴将涡虫分割为头部 (T)、中段 (Z)、尾部 (W) 3 部分, 分别标记为 T1、T2、T3 及 Z1、Z2、Z3 和 W1、W2 和 W3 (图 2)。9 组进行单独培养, 停止喂食, 每 2 天换水 1 次, 实时观察涡虫状态, 每天利用显微镜观察涡虫形态变化。

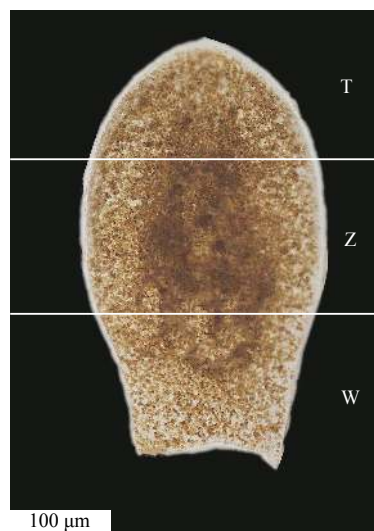


图 2 再生实验的切割方式示意图

T. 头部, Z. 中段, W. 尾部

Fig. 2 Schematic diagram of cutting mode in regeneration experiment

T. head, Z. middle section, W. tail

1.6 涡虫对刺参的危害

通过设置涡虫与刺参苗种的共培养实验, 测试涡虫对刺参的危害及其危害方式。实验所用健康刺参采自青岛某刺参育苗场, 苗种规格为 (10.00±0.95) g, 实验在 3 L 的 PVC 水槽中进行, 每个水槽中放置 10 头刺参苗种, 涡虫与刺参的共培养比例分别设置为 0 : 10、1 : 10、1 : 1、

2.5 : 1、5 : 1、10 : 1 和 15 : 1 共 7 个梯度实验组, 每个实验组 3 个平行, 观察涡虫聚集情况以及刺参是否发生化皮等发病现象。同时解剖患病及健康刺参, 观察体壁、呼吸树及肠道的健康状况并镜检是否有涡虫寄生, 同时将各组织在 Davidson 氏液 (无水乙醇 330 mL、甲醛 220 mL、冰醋酸 115 mL、蒸馏水 335 mL, 总体积 1 000 mL) 中固定 24 h, 后经各梯度乙醇脱水、浸蜡、包埋、切片、H.E 染色后封片, 显微镜观察、拍照。

2 结果

2.1 发病特征调查结果

对 2 家发病刺参养殖场的养殖池塘进行发病特征调查, 结果显示, 2 家养殖场池塘均为刺参单养池塘, 刺参自 2019 年 9 月下旬开始发病, 发病时养殖池水温 15~18 °C, 海水盐度 32, pH 为 8.3。患病池塘中各种规格的刺参均有化皮死亡的现象, 死亡率超过 50%, 从发病到化皮死亡时间较短, 一般为 2~3 d。患病刺参体壁、养殖池水和养殖池底泥中均发现一种营自由生活的涡虫类生物, 尤其以底泥中的密度最大, 达到 2~12 只/g 底泥。池底的患病刺参体表附着有大量涡虫, 从池底将刺参捞出的过程中会有大量涡虫游动到水体或池底, 取出后刺参体表滞留附着的涡虫数为 1~10 只/头刺参, 且附着虫体数越多, 化皮程度越高, 死亡越快。刺参患病初期体色稍变浅, 多有摇头现象, 口部肿胀, 不能收缩或闭合; 中期失去附着力, 肉刺变小或秃钝不明显; 末期体表可肉眼观察到点状腐烂, 后扩散呈大面积化皮, 最后死亡。对患病刺参进行解剖镜检, 体腔、呼吸树及肠道内均未发现虫体寄生和霉菌。

2.2 形态学特征

对分离自大连及东营的 2 批刺参样本的形态结构进行比较分析, 二者形态结构相同。显微观察的形态学统计特征见表 2。涡虫整体呈黄色或黄褐色, 长 0.96~3.26 mm, 宽 0.49~1.93 mm, 左右对称; 尾后两侧有两条并列的尾垂, 其尾垂的形状和大小与涡虫的游动和舒展状态有关 (图版 I-1~2); 涡虫体内密集地分布有与其共生的虫黄藻 (*Zooxanthella*) (图版 I-3), 虫黄藻的直径为 23~40 μm; 涡虫头部钝圆, 具有一对长柄状眼点, 呈暗红色, 左右眼点呈“八”字形排列, 长 71~89 μm, 位于身体前 1/10 的位置 (图版 I-4~6; 图版 II-2); 口紧挨虫体腹中线后, 雌雄同体, 具有 2 个生殖孔, 雌生殖孔位于腹中线后 1/2 处, 雄生殖孔位于雌生殖孔后 (图版 I-1、I-7, 图版 II-1), 但并不是所有个体均能观察到生殖孔; 虫体体表周生纤毛, 长 6~8 μm (图版 I-8, 图版 II-4), 涡虫通过纤毛的高速摆动在海水中运动, 或呈波浪式游动。光学显微镜下观察, 部分虫体内可看到未消化完成的桡足类 (图版 I-9)。根据其形态学特征, 可将此涡虫分类到扁形动物门 (Platyhelminthes)、涡虫纲 (Turbellaria)、无肠目 (Acoela)。

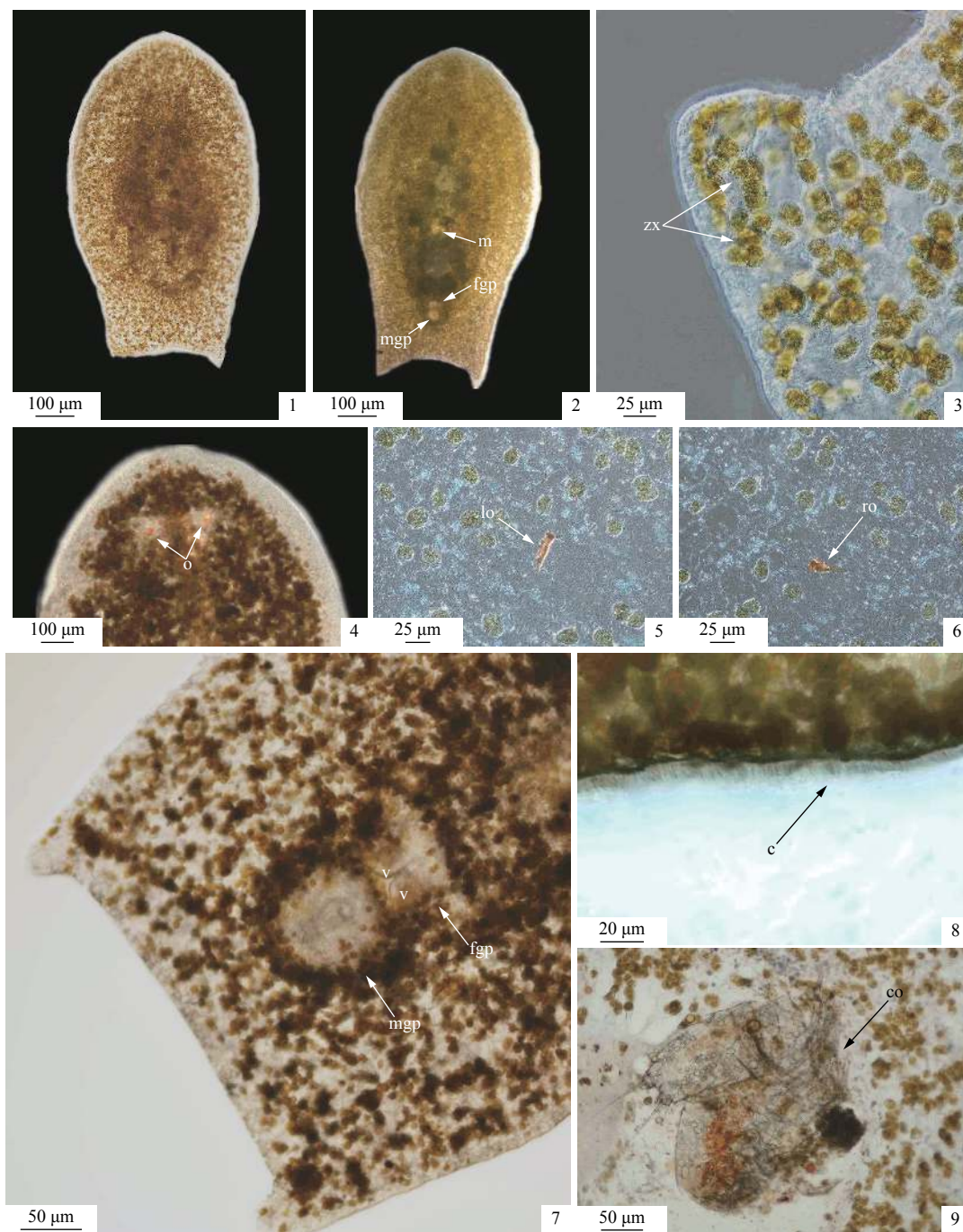
2.3 分子鉴定及系统发育分析

用无脊椎动物通用 CO I 引物扩增后, 测序获得长度为 713 bp 的序列, 通过 Blast 检索发现其归类于盘旋科 (Convolutidae)。在此基础上, 利用 18S *rDNA* 引物 CY18SF 和 CY18SR 扩增虫体的 18S *rDNA* 基因序列, 获得有效基因序列 (编号为 HA1910) 长度为 1 664 bp, 通过 Blast 检索发现其与澳洲异尾涡虫 (*Heterochaerus australis*) 序列同源性最高, 为 99.64%。从 NCBI 数据库中选取

表 2 本研究分离涡虫的形态学特征统计学结果

Tab. 2 Statistical results of morphological characteristics of turbellarian worm isolated in this study

项目 items	最小值 minimum	最大值 maximum	平均值 mean	标准差 standard deviation	标准误 standard error	变异系数/% coefficient of variation
体长/μm body length	960.00	3 260.00	1 838.67	620.44	20.68	33.74
体宽/μm body width	490.00	1 930.00	1 054.33	343.58	11.45	32.59
眼点长/μm ocellus length	71.00	89.00	80.13	4.60	0.15	5.74
纤毛长/μm cilia length	6.00	8.00	6.90	0.76	0.03	11.00
虫黄藻直径/μm diameter of <i>Zooxanthellae</i>	23.00	240.00	27.67	4.00	2.13	14.47



图版 I 澳洲异尾涡虫的显微观察

1. 腹面观, 2-9. 背面观; c. 纤毛, co. 桡足类, fgp. 雌生殖孔, lo. 左眼点, m. 口, mgp. 雄生殖孔, o. 眼点, ro. 右眼点, v. 阴道, zx. 虫黄藻, 下同

Plate I Microscopic observation of *H. australis*

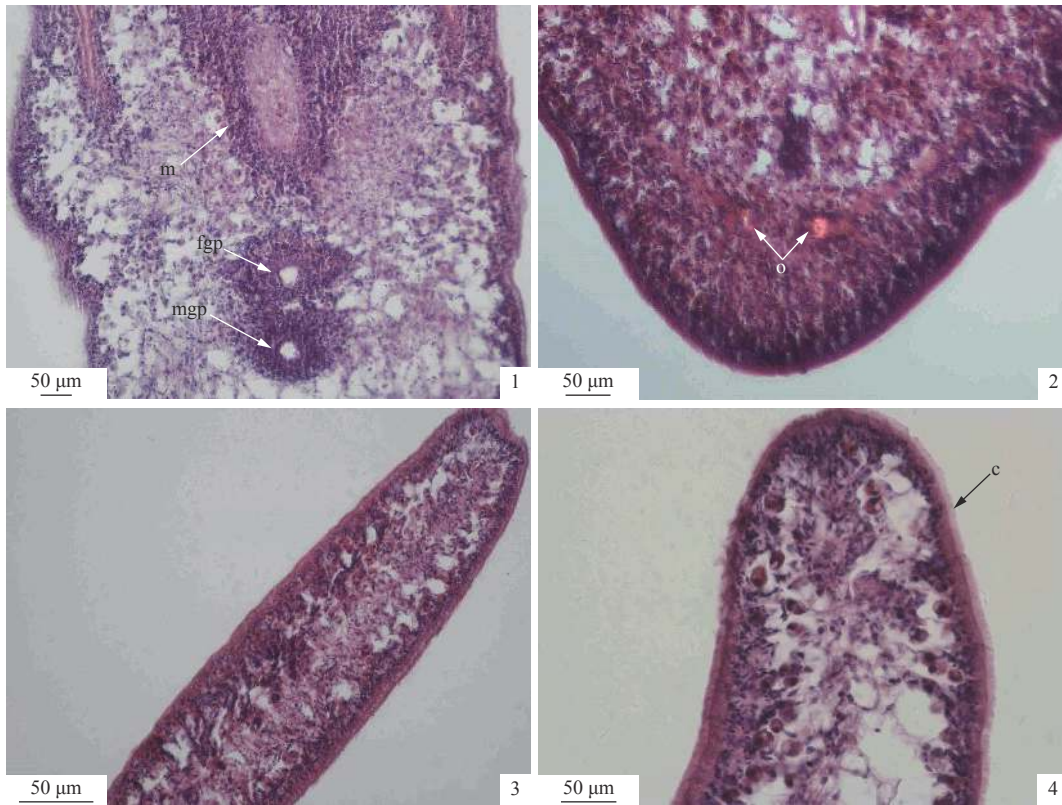
1. ventral view. 2-9. dorsal view; c. cilium, co. copepods, fgp. female gonopore, lo. left ocellus, m. mouth, mgp. male gonopore, o. ocellus, ro. right ocellus, v. vagina, zx. *Zooxanthella*, the same below

相似度最高的 12 个物种的 18S *rDNA* 基因序列构建系统发育树, 发现其与澳洲异尾涡虫聚为一支 (图 3)。结合其形态学特征和分子系统鉴定结果, 确定本实验所分离的涡虫为无肠目 (Acoela)、盘旋科 (Convolutidae)、异尾属 (*Heterochaerus*)、

澳洲异尾涡虫。

2.4 主要环境因子对澳洲异尾涡虫的影响

温度 通过观察所采集的涡虫在 4~34 °C 不同温度梯度下存活率和活力可以看出, 水温



图版 II 澳洲异尾涡虫的石蜡切片标本显微观察

1~2. 整体水平横向切片, 3~4. 整体水平纵向切片

Plate II Microscopical observation of paraffin section of *H. australis*

1-2. horizontal section of whole, 3-4. longitudinal section of whole

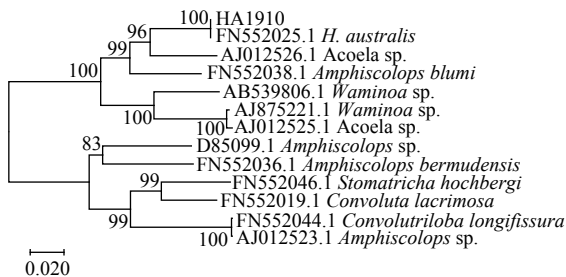


图 3 基于 18S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 18S rDNA gene sequence

在低于 4 °C 时, 涡虫蜷缩并在 4 h 后全部死亡, 4~6 °C 时, 涡虫丧失贴壁能力聚于水底; 6~16 °C, 虫体贴壁或沉底, 身体舒展但活力不高; 水温为 18~22 °C 时, 涡虫活力旺盛; 随着水温继续升高, 涡虫活力逐渐减弱, 当水温升至 34 °C 时, 大部分涡虫身体开始蜷缩成球状, 3 h 后全部死亡、分解。由实验结果可知, 澳洲异尾涡虫生存温度的下限为 4 °C, 上限为 34 °C, 适宜温度为 18~24 °C。

pH 对该涡虫的 pH 耐受实验可以看出, 在 pH 为 3.5 和 9.5 的实验组中, 涡虫立即死亡并分解; pH 分别为 4.0、4.5 和 9.0 时, 涡虫分别从 2、9 和 10 min 开始死亡, 最终完全分解; pH 为 5.0 或 8.5 时, 虫体沉于杯底, 虽然虫体没有分解, 但是活力很低; pH 为 5.5~8.0 时, 涡虫形态无明显变化, 活力正常。由实验结果可知, 澳洲异尾涡虫耐受 pH 为 4.5~9.0, 适宜 pH 为 5.5~8.0。

盐度 观察该涡虫在不同盐度下的活力和存活情况可以看出, 在盐度为 20~40 时, 涡虫活力正常。盐度低于 16 时, 盐度越低, 虫体肿胀越透明, 盐度为 8 时开始出现死亡。当盐度高于 48 时, 盐度越高, 虫体蜷缩状态越明显, 盐度为 56 时虫体蜷缩呈球状并开始出现死亡。由实验结果可知, 澳洲异尾涡虫耐受的盐度范围为 8~56, 适宜盐度为 24~40。

光照对涡虫的影响 当进行强光照射时, L 区 (1 200 lx) 涡虫出现身体翻转、扭曲等对光不适应的行为, 并向 D 区游动, 表现出明显的避光性。

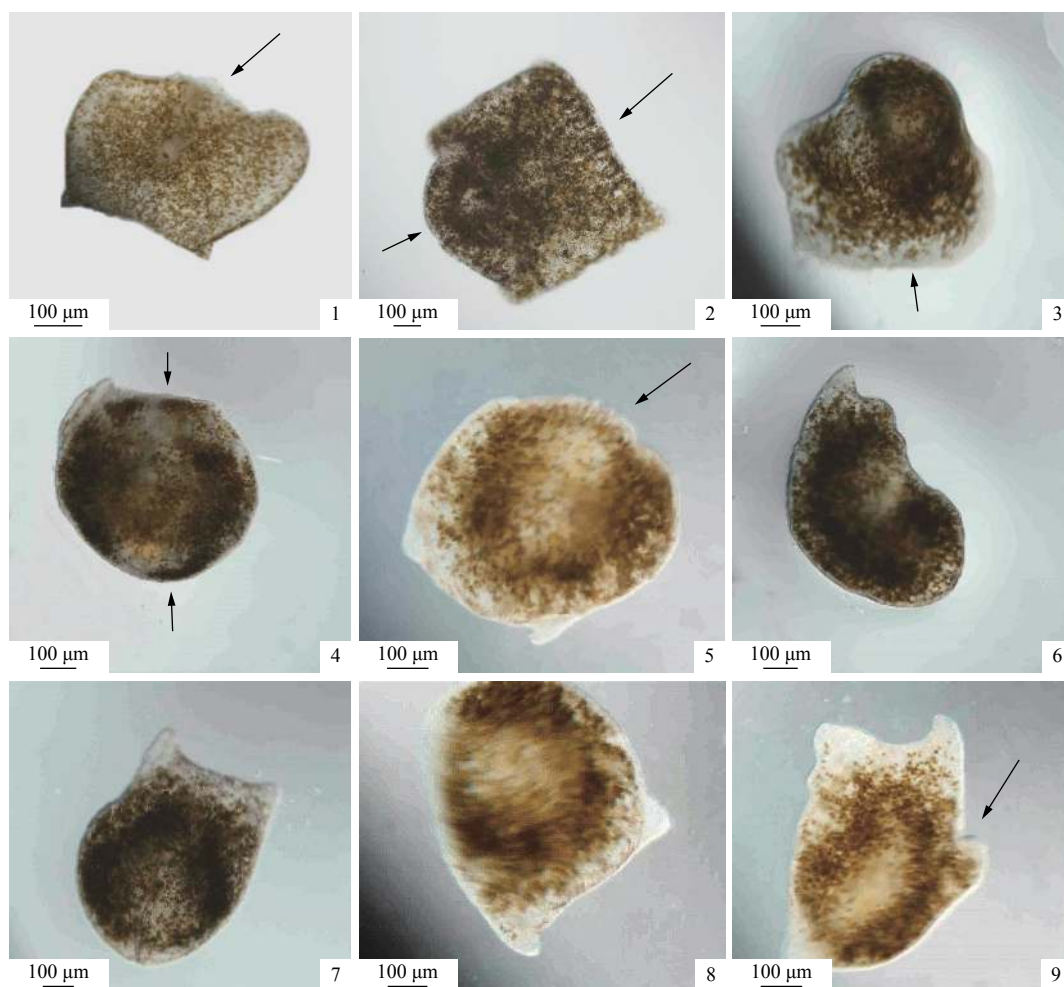
2.5 再生能力测试

涡虫垂直于体轴被分割为3份, 加入海水以后, 头部、中部和尾部3部分均立即拥有活力, 四散游动到培养皿底部蜷缩不动, 显微镜下观察, 切痕明显, 维持不完整形态(图版 III-1, 箭头)。切割后的第2~5天, 各部分形态蜷缩, 活力依旧较低, 但显微镜下可以观察到中部(Z组)切痕逐渐愈合(图版 III-2, 箭头); 头部(T组)的切痕变得圆润, 有向原体型变化的趋势(图版 III-3, 箭头), Z组和W组形态变化不明显。自第6天各部分运动活力开始增强, 可以观察到游动。第7~9天, 各组身体形态逐渐向原始形态恢复, 但内部结构模糊(图版 III-4、III-5, 箭头)。到第

10~12天, 头部组(T组)已基本恢复到原有形态(图版 III-6)。到第13~14天, 头、中、尾各部分各组皆可恢复为活力旺盛但体态较小的澳洲异尾涡虫(图版 III-7, III-8)。实验观察过程中, 发现W3组个体恢复过程中出现体型畸形(图版 III-9, 箭头), 提示可能是切割时刀口不整齐造成的。以上实验表明, 澳洲异尾涡虫具有涡虫的普遍特征, 即前后轴极性再生能力。

2.6 涡虫对刺参的危害

通过设置不同比例的涡虫与刺参苗种的共培养实验, 结果见表3。涡虫对刺参体表具有很强的趋向性(图4), 且趋向性与二者个体比例无相关性, 但刺参体表上附着的涡虫数量与二者



图版 III 再生能力测试中各组分割块的形态变化

1. W2组第1天, 2. Z2组第5天, 3. T1组第5天, 4. Z1组第9天, 5. W1组第9天, 6. T3组第12天, 7. T2组第13天, 8. Z3组第14天, 9. W3组第14天; 1~5. 箭头指向切割处, 9. 箭头指向畸形处

Plate III Morphological changes of each group (tissue section) in the regeneration experiment

1. 1 d in W2 group, 2. 5 d in Z2 group, 3. 5 d in T1 group, 4. 9 d in Z1 group, 5. 9 d in W1 group, 6. 12 d in T3 group, 7. 13 d in T2 group, 8. 14 d in Z3 group, 9. 14 d in W3 group; 1-5. arrow points to the cut, 9. arrow points to malformation

个体的比例呈显著正相关性。共培养4 h后各实验组中60%~80%涡虫聚集于刺参体表, 涡虫附着后会沿刺参体表游动, 体表附着虫体较多的刺参初期出现扭曲、摇头等生理反应, 随着涡虫在刺参体表的聚集及活动, 刺参逐渐出现化皮死亡等现象。在涡虫比例较低的实验组, 刺参没有出现化皮死亡现象, 而随着共培养系统中涡虫数量的增加, 刺参化皮比例逐渐增加, 从16.67%±0.06% (2.5 : 1组) 增加到73.33%±0.06% (15 : 1组)。在化皮最严重的15 : 1组中, 刺参个体体表最多附着涡虫数为39只, 9 h时体壁虫体数量较多的刺参出现身体扭曲、嘴部肿胀等

症状; 14 h时, 刺参失去附着力, 体色变淡, 肉刺秃钝; 20 h时部分刺参体壁出现白色点状腐烂, 然后很快化皮死亡, 其发病症状与自然发病症状基本一致。患病刺参解剖后, 体腔、肠道及呼吸树内均未发现虫体, 各组织形态无明显变化。对患病及健康刺参各组织进行石蜡切片观察, 肠道、呼吸树切片中未观察到明显病灶。而体壁组织切片对比发现, 与健康刺参体壁结缔组织致密、细胞排列均匀相比, 患病刺参体壁结缔组织稀疏, 纤维细胞排列杂乱, 空隙增大(图版IV), 患病刺参体壁与发生腐皮综合征的刺参体壁组织出现相同的组织病理学现象。

表3 共培养实验中涡虫对刺参危害的统计结果

Tab. 3 Statistical results of the harm of turbellarian worm to *A. japonicus* in the co-cultivation experiment

涡虫与刺参数量之比 the ratio of turbellarian worm to <i>A. japonicus</i>	涡虫的数量/只 the number of turbellarian worm	刺参的数量/头 the number of <i>A. japonicus</i>	附着于刺参体表的涡虫总数/只 the number of turbellarian worm attached to the body surface of <i>A. japonicus</i>	刺参个体体表最多附着涡虫数/只 the maximum number of turbellarian worm on the surface of <i>A. japonicus</i>	刺参化皮起始时间/h starting time of the skin ulceration of <i>A. japonicus</i>	刺参化皮率/% the ratio of <i>A. japonicus</i> with skin ulceration
0 : 10	0	10	0	0		0.00±0.00
1 : 10	1	10	1	1		0.00±0.00
1 : 1	10	10	9	3		0.00±0.00
2.5 : 1	25	10	21	6	76	16.67±0.06
5 : 1	50	10	43	11	61	33.33±0.06
10 : 1	100	10	84	21	43	56.67±0.06
15 : 1	150	10	127	39	20	73.33±0.06

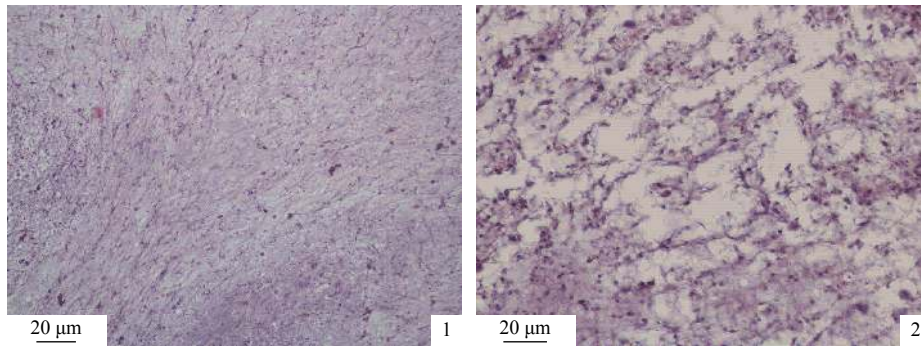


图4 涡虫与刺参共培养实验中涡虫大量聚集于刺参体表

Fig. 4 A large number of turbellarian gathered on the body surface of *A. japonicus* in the co-culture experiment

3 讨论

涡虫类是一群最原始的三胚层动物, 生活在海洋、淡水和潮湿的土壤中, 目前已记录的涡虫类有5 000余种^[15]。近年来, 随着对涡虫类系统进化研究的深入, 对涡虫纲内各类群的分类地位出现很大变化, 尤其对“无肠目”类群的争议最大, 近期研究提出设立“异无肠动物门”(Phylum Xenacoelomorpha), 获得不少学者支持^[16-18]。把原无肠类涡虫从扁形动物门内移出, 已经形成共识。全球已记录的无肠目有11科90属360余种, 而我国目前记录描述的仅澳洲异尾涡虫1科1属1种^[19]。目前对于该物种的分布记录仅在澳洲界和埃塞俄比亚界以及我国深圳沿海, 没有在黄渤海地区的报道。本研究从大连、东营2地出现刺参大量化皮死亡的池塘中采集到一种涡虫类生物, 通过形态学观察和分子生物学鉴定, 将该物种确定为澳洲异尾涡虫, 这是



图版 IV 刺参体壁组织的病理观察(横切)

1.健康刺参体壁, 2.患病刺参体壁

Plate IV Pathological observation of the body wall of *A. japonicus* (horizontal section)

1. body wall of healthy *A. japonicus*, 2. body wall of diseased *A. japonicus*

本物种在黄渤海海域的首次报道。另外, 由于本实验研究的样本采自我国大连、东营刺参养殖池塘, 为点状分布, 未见周围地区有该物种的报道。因此, 本实验所采集物种是自然分布的本地种还是由于养殖苗种等活动的跨物种流通过携带到样品采集地区的, 还需要进一步调研论证。

本研究对该物种的生态因子适应性调查显示, 其适宜温度为 18~24 °C, 适宜 pH 为 5.5~8.0, 适宜盐度为 20~40, 环境适应范围较广。孙婷等^[19]报道的澳洲异尾涡虫采集自广东深圳湾体育中心海边水下泥土表面, 水深 25~50 cm, 水温 24 °C, 盐度 22, 相应的环境因子与本研究测试所获得的该物种的适宜因子基本相仿。本研究对该病例的发病特征调查结果显示, 池塘养殖刺参化皮大面积暴发时的环境因子为 15~18 °C, 盐度为 30~32, pH 8.3, 水温正好到达该物种的适宜温度, 由此可以推测是在环境因子条件(尤其是温度条件)到达该物种最适环境因子条件时, 该物种活力旺盛并在池塘中大量增殖, 对养殖刺参产生攻击而引发的伤害。

涡虫多数营自由生活, 少数为共生或寄生生活。国内也曾有涡虫危害水产生物的报道。汪彦愷等^[20-21]发现, 拟格拉夫涡虫(*Pseudograffilla* sp.)可寄生于眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)和横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)等海水养殖鱼类的鳃、鳍及体表, 造成寄生部位的严重损伤, 继而导致鱼类大量死亡。以上研究提示涡虫可以作为潜在的寄生性敌害生物。本研究所采集到的澳洲异尾涡虫仅分布于养殖系统水体及底泥

和刺参体表, 在刺参的内脏器官内均未分离观察到, 为自由生活的涡虫种类。国外有寄生性涡虫危害野生海参纲动物的报道, 且寄生性涡虫的种类包括无肠目(Acoela)、单肠目(Umagillidae/Rhabdocoela), 寄生部位包括海参的体腔、呼吸树及消化道^[22-24], 但未见到有自由生活的涡虫类对海参产生危害的报道。自然界中对涡虫的摄食习性观察显示, 涡虫喜欢摄食底栖型原生动物、轮虫、水蚤等。孙婷等^[19]发现所分离的澳洲异尾涡虫喜捕食海栖类等单肠目涡虫。本研究在单独培养的澳洲异尾涡虫体内观察到有未消化完的桡足类。但在与刺参共培养系统中, 该物种表现出对刺参体表有很强的趋向性, 聚集在刺参体表引发刺参化皮。这与发病养殖池塘中观察到的刺参体表有大量涡虫附着且养殖刺参大量化皮死亡现象一致。相应结果说明该涡虫对刺参具有较强的攻击性, 且是造成养殖池塘中刺参大规模化皮死亡的直接原因。这是自由生活类涡虫对刺参产生攻击并导致其化皮死亡的首次报道, 也说明刺参腐皮综合征的致病原除细菌、原生动物外, 敌害生物亦是引发该疾病的重要原因之一。因此, 可以将该物种列为一种新的养殖刺参敌害生物。

澳洲异尾涡虫的大量增殖是引起池塘养殖刺参暴发化皮死亡的重要原因, 因此, 需要对该物种的繁殖及扩增方式进一步解析。涡虫类是雌雄同体、异体受精的动物, 大多数类群营有性生殖方式, 约 10% 的类群具无性与有性 2 种生殖方式。同时, 涡虫普遍具超强的再生能力, 切割下来的组织块能够再生出一条涡虫^[25]。本研究发现所采集的澳洲异尾涡虫也是雌雄同

体,亦具有很强的再生能力,提示其具有强大的繁殖潜能。后期将继续对该物种的生态和繁殖习性进行深入观察,解析其生活史并开展防控药物筛选研究,为养殖刺参病害防控提供技术支撑和参考。

参考文献 (References):

- [1] 王印庚,荣小军,廖梅杰,等.刺参健康养殖与病害防控技术从解[M].北京:中国农业出版社,2014.
Wang Y G, Rong X J, Liao M J, et al. SEA cucumber culture and disease control technology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014 (in Chinese).
- [2] 李爽,宋坚,罗耀明,等.桡足类在刺参育苗及保苗中的防治[J].齐鲁渔业,2008,25(12):17.
Li S, Song J, Luo Y M, et al. Prevention and control of copepods in the breeding system of *Apostichopus japonicus*[J]. Shandong Fisheries, 2008, 25(12): 17(in Chinese).
- [3] 姜洪涛,刘雨新,辛晓东,等.海参敌害——海星(海燕)[J].齐鲁渔业,2008,25(9):22-23.
Jiang H T, Liu Y X, Xin X D, et al. Sea cucumber enemy-Asteroidea (Hydrobatidae)[J]. Shandong Fisheries, 2008, 25(9): 22-23 (in Chinese).
- [4] 周书珩,王印庚,李胜忠,等.刺参育苗系统中的敌害生物——玻璃海鞘的药物杀除试验[J].渔业科学进展,2009,30(2):14-19.
Zhou S H, Wang Y G, Li S Z, et al. Lethal effect of ten chemicals to sea squirt *Ciona intestinalis* in sea cucumber hatchery[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(2): 14-19(in Chinese).
- [5] 单红云,赫崇波,李晓冬,等.一种海绵动物对室内养殖海参危害的初步研究[J].水产科学,2008,27(12):645-647.
Shan H Y, He C B, Li X D, et al. Sponge *Haliclona subarmifera*-a harmful organism for sea cucumber culture[J]. Fisheries Science, 2008, 27(12): 645-647(in Chinese).
- [6] 荣小军,廖梅杰,李彬,等.室内刺参育苗池中新发现的一种敌害生物——日本毛壶[J].海洋科学,2014,38(5):60-65.
Rong X J, Liao M J, Li B, et al. A new harmful organism found in *Apostichopus japonicus* indoor breeding seeding-*Grantia nipponica*[J]. Marine Sciences, 2014, 38(5): 60-65(in Chinese).
- [7] Jennings J B. Parasitism and commensalism in the Turbellaria[J]. *Advances in Parasitology*, 1971, 9: 1-32.
- [8] Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Sluys R. The turbellarian *Urastoma cyprinae* from edible mussels *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus* in Baja California, NW México[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, 72(3): 214-219.
- [9] Woods C M C, Hayden B J. An observation of the turbellarian *Paravortex* sp. in the New Zealand scallop *Pecten novaezelandiae* (Bivalvia: Pectinidae)[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1998, 32(4): 551-553.
- [10] Cannon L R G, Lester R J G. Two turbellarians parasitic in fish[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1988, 5: 15-22.
- [11] 刘昌利,韦传宝,胡道升.日本三角涡虫摄食行为的影响因素[J].生物学杂志,2007,24(1):50-52.
Liu C L, Wei C B, Hu D S. The factors influencing *Dugesia japonica* feeding behaviors[J]. *Journal of Biology*, 2007, 24(1): 50-52(in Chinese).
- [12] 张吕,蔡慧,鲍思全,等.铲形杰氏涡虫(单肠目,达氏科)新纪录的形态学描述及其分子系统学分析[J].四川动物,2017,36(1):65-74.
Zhang L, Cai H, Bao S Q, et al. *Gieysztorina knipovici*, a new record of turbellarian species (Rhabdozoa, Dalyelliidae) from China with morphological description and molecular phylogenetic analysis[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2017, 36(1): 65-74(in Chinese).
- [13] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [14] 杨承忠,张强,喻梅辉.孵化液pH值对卤虫卵孵化率及无节幼体存活率的影响[J].八一农学院学报,1994,17(2):25-28.
Yang C Z, Zhang Q, Yu M H. The pH effect of hatching solution on hatching percentage of *Artemia* cysts and on survive percentage of *Artemia Larvae*[J]. Journal of August 1st Agriculture College, 1994, 17(2): 25-28(in Chinese).
- [15] Tyler S, Schilling S, Hooge M, et al. Turbellarian taxonomic database Version 1.8 [EB/OL]. (2006-2019)[2020-03-20]. <http://turbellaria.umaine.edu>.

- [16] Philippe H, Brinkmann H, Copley R R, *et al.* Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*[J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 255-258.
- [17] Achatz J G, Hooge M, Wallberg A, *et al.* Systematic revision of acoels with 9+0 sperm ultrastructure (Convolutida) and the influence of sexual conflict on morphology[J]. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2010, 48(1): 9-32.
- [18] Çinar M E. Checklist of the phyla platyhelminthes, xeno-coelomorpha, nematoda, acanthocephala, myxozoa, tardigrada, cephalorhyncha, nemertea, echiura, brachiopoda, phoronida, chaetognatha, and chordata (Tunicata, Cephalochordata, and Hemichordata) from the coasts of Turkey[J]. *Turkish Journal of Zoology*, 2014, 38(6): 698-722.
- [19] 孙婷, 汪安泰. 澳洲异尾涡虫(无肠目, 盘旋科)新纪录及描述[J]. *动物学杂志*, 2014, 49(3): 415-422.
Sun T, Wang A T. *Heterochaerus australis*, a new record of Turbellarian (Acoela, Convolutidae) from China[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2014, 49(3): 415-422(in Chinese).
- [20] 汪彦愷, 郭果为, 高如承, 等. 一种危害眼斑拟石首鱼的寄生涡虫及其防治[J]. *水产学报*, 2002, 26(4): 379-381.
Wang Y Y, Guo G W, Gao R C, *et al.* Turbellarian parasitised in *Sciaenops ocellatus* and its control[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(4): 379-381(in Chinese).
- [21] 汪彦愷, 郭果为, 高如承, 等. 寄生海水养殖鱼类的拟格拉夫涡虫的流行、危害与防治[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 260-263.
Wang Y Y, Guo G W, Gao R C, *et al.* The epidemic, harm and control of the *Pseudograffilla* sp. in marine cultured fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 260-263(in Chinese).
- [22] Jangoux M. Diseases of echinodermata[M]//Kinne O. Diseases of marine animals. Biologische Anstalt Helgoland, Hambourg. 1990: 439-567.
- [23] Shinn G L. *Anoplodium hymanae* sp. n., an umagillid turbellarian from the coelom of *Stichopus californicus*, a northeast Pacific holothurian[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1983, 61(4): 750-760.
- [24] Doignon G, Jangoux M, Féral J P, *et al.* Seasonal release of the egg capsules of *Anoplodium parasita* Schneider, 1858, intracoelomic turbellarian (Platyhelminthes, Rhabdocoela) symbiotic of the sea cucumber *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1788 (Echinodermata, Holothuroidea)[C]//Proceedings of the 6th European Conference on Echinoderm Research. Swets: IMIS, 2001: 261-264.
- [25] Elliott S A, Alvarado A S. The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2013, 2(3): 301-326.

Identification of *Heterochaerus australis* as a new enemy species in the cultured ponds of *Apostichopus japonicus* and its harm

KONG Miao^{1,2}, LIAO Meijie^{1,2,3}, WANG Yingeng^{1,2,3*}, YANG Zhenmao⁴, LI Bin^{2,3},
RONG Xiaojun^{1,2,3}, ZHANG Zheng^{1,2,3}, YU Yongxiang^{2,3}, LI Xinrong^{1,2}, ZHANG Yonggang²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,
National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

4. Liaoning Marine Aquaculture Association, Dalian 116000, China)

Abstract: There was an outbreak of Bacterial Ulceration Syndrome (BUS) of *Apostichopus japonicus* in two culture ponds located in Dalian, Liaoning Province and Dongying, Shandong Province, in October 2019. Epidemiological investigation detected a kind of free-living turbellarians in the culture system including the body surface of *A. japonicus*, the water and the sediment. Morphological observation of this species revealed that the body length ranged from 0.96 to 3.26 mm and the body width range from 0.49 to 1.93 mm. The body color was yellow or yellowish-brown. Its head was blunt round shape, with a pair of dark red rodlike ocellus. Two caudal lappets lay coordinately on both sides of its tail. Microscopic examination revealed that symbiotic *Zooxanthella* within the epidermis and its body was covered with cilia. It was hermaphrodite, with two genital openings behind the mouth. The 18S *rDNA* gene sequence showed 99.64% identity with *Heterochaerus australis*. Based on the morphological and genetic analysis, it was identified as *H. australis*. The ecological study showed that this species was photophobic, its suitable temperature was 18-24 °C, its suitable pH was 5.5-8.0 and its suitable salinity was 20-40. This species also showed strong ability of polar regeneration. The co-cultivation experiment of this species and *A. japonicus* showed that *H. australis* can adsorb on the surface of sea cucumber, causing ulceration on the body wall and eventually the death of sea cucumber. However, there was no parasitic phenomenon in the body cavity, intestine and respiratory tree of the sea cucumber. All the results indicate that *H. australis* is a new enemy species for *A. japonicus* in pond culture.

Key words: *Apostichopus japonicus*; *Heterochaerus australis*; enemy species; morphology; regeneration; histopathology; harm

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901603, 2019YFD0900105); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (CAFS) (2020TD40, 2020ZX0101); Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2017LZGC010)