**分类号** 密 **级**

**U D C**   **编 号**



**硕 士 学 位 论 文**

草鱼主要寄Th虫动态变化与水Th态因子关系研究

夏润林

**（1114042）**

指导教师姓名 吴淑勤 研究员 李 华 教授\_

专 业 名 称 水产养殖 \_

论文答辩日期 2014 年 6 月 3 日 \_

学位授予日期 2014 年 6 月 日 \_

**MASTER DISSERTATION**

**Analyses of relationship between main Grass carp parasites dynamic changes and water ecological factors**

**Supervisor: Prof .Wu Shuqin Prof. Li Hua**

**Master candidate: Xia Runlin**

**LIFE SCIENCE AND TECHNOLOGY INSTITUTE, DALIAN OCEAN UNIVERSITY, DALIAN, LIAONING, P. R. CHINA**

**JUNE2014**

摘 要

草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*）是一种重要的水产养殖鱼类，约占中国淡水鱼养殖总量的20%，然而，草鱼的病害较多，其中危害草鱼的寄生虫主要有：车轮虫、指环虫、斜管虫、小瓜虫、绦虫等。本文对草鱼集约化养殖的广东省清远市清新县地底下村养殖场、中ft市广成围养殖场2个场及草鱼散养的广州市西朗养殖池塘及草鱼寄生虫病进行了初步的调查，旨在摸清草鱼寄生虫种类和数量与池塘中水质因子、自由生活的纤毛类原生动物数量之间的关系。同时在调查的过程中，对指环虫在鳃片上的寄生特点及动态变化进行了研究；在不同硬度碱度水质中对多子小瓜虫孢囊孵化及幼虫活力的影响研究。在实验室条件下，感染草鱼，进行组织病理观察；对在调查中收集到的一株多子小瓜虫对热应激的分子机理进行了初步研究。主要结果和结论如下：

1. 调查发现，草鱼的寄生虫与季节和温度密切相关，在温度较高（15℃～32℃）的

5～11月，草鱼的寄生虫主要为车轮虫、指环虫；在气温变化的交替时节，车轮虫更容易暴发。分析数据显示，集约化养殖草鱼纤毛类寄生虫平均感染率、丰盛度分别为71%和

‗++（5~10）‘；散养的平均感染率、丰盛度分别为20%和‗+（1~5）‘。集约化养殖草鱼纤毛类寄生虫感染率、丰盛度比散养化的高。对广州西朗养殖草鱼塘的调查发现，散养的草鱼鳃上指环虫感染率高，都在0.93以上，在温度较高的7、8月，鳃上指环虫的丰盛度分别达到33.5和31.5。指环虫种群方差和平均数之比*DI*，负二项参数*K*值，扩散性指数

*I*§大于1，表明指环虫种群在宿主种群呈聚集分布，在6～11月调查期间，发现草鱼鳃上指环虫右侧第1对鳃片丰盛度小于左侧的外，其余的都大于左侧鳃片上的丰盛度。

2. 调查采得一株在28~30℃水体中依然能感染草鱼的多子小瓜虫，对多子小瓜虫的*HSP70*（热激蛋白70）基因进行了克隆以及在不同温度下多子小瓜虫不同阶段的表达分析，发现其ORF为1995bp，编码664 aa。多子小瓜虫HSP70（Im HSP70）的基因结构分析发现，Im HSP70的二级结构主要为以α-螺旋和无规卷曲为主，空间构型包括N 端

ATPase功能域和C端多肽结合功能域。与其它物种HSP70蛋白序列进行同源性比较发现，Im HSP70与螅状独缩虫（*Carchesium polypinum*）HSP70的同源性最高为78.08%。系统发育分析显示，Im HSP70与分类地位同为纤毛门的螅状独缩虫、嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)、变藓棘毛虫(*Sterkiella histriomuscorum*)的HSP70聚在一个分支。采用荧光定量RT-PCR检测了多子小瓜虫在三种不同温度中（20℃、25℃和30℃），Im HSP70基因在三个不同发育阶段（幼虫、滋养体和包囊）的表达量情况。结果显示，幼虫在3种温度下表达量均最低；在20℃和25℃时，滋养体中的表达量高于幼虫和包囊；而在30℃时，包囊中的表达量高于滋养体和幼虫；幼虫和包囊在30℃时的表达量均高于25℃。

3. 在适温20℃条件下，通过硬度、碱度对多子小瓜虫孵化及活力的影响研究发现，在水体硬度和碱度都为0 mmol/L时，多子小瓜虫包囊壁的厚度最大为70.5μm，当硬度和碱度增大到4 mmol/L时，包囊壁厚度变薄为21.4μm。多子小瓜虫孵化时间在硬度、碱度为0.5 mmol/L和0.1 mmol/L显著的低于其他实验组；幼虫保持活力时长，硬度、碱度分别为0 mmol/L组显著的低于其他组；其次是硬度、碱度分别为4mmol/L和0.1 mmol/L组。

本论文结果表明，草鱼寄生虫的发生与生态因子中的水温、碱度、硬度等有着一定的相关性，在30℃，多子小瓜虫HSP70在滋养体中表达最低，但是在包囊中表达最高，进一步的说明了包囊是多子小瓜虫度过不利环境的主要方式。水体中的碱度、硬度对多子小瓜虫壁厚、孵化出幼虫的时间、幼虫保持活力的时长及孵化率都有着一定的影响，对于水体中的Mg2+, Ca2+浓度与水温的交叉作用对多子小瓜虫的影响需要深入研究。草鱼纤毛类寄生虫感染率、丰盛度与水体中纤毛类原生动物的关系也待进一步研究。

**关键词**多子小瓜虫 ；草鱼；生态因子； HSP70；硬度及碱度

Abstract

Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) is an important aquaculture species, accounting for about 20% of gross freshwater fish product in China. However, during recent years, the grass carp has suffered from more serious diseases, the mainly parasitic harm for grass carp are

*Trichodina*, *Dactylogyrus, Chilodonella cyprini*, *Ichthyophthirius muhifiliis, Gowkongensis*. In

This paper, a preliminary survey of the grass carp's parasitic diseases in the ponds in three different places of Guangdong Province, QingYuan Didixia village, ZhongShan Guangchengwei and GuangZhou Xilang was conducted, to find the relationship between the grass carp's parasites and the water quality, physical and chemical factors as well as the number of ciliated protozoan. While in the course of the investigation, the characteristics and dynamics of the parasite- *Dactylogyrus* on the gills were studied; in different hardness and alkalinity water, the impact of hatchability and vitality of theront of *Ichthyophthirius multifiliis* (Im) were studied. Histopathological changes of parasite was observed when Im infected grass carp juvenile under laboratory conditions. *HSP70* gene was cloned from Im strain that collected on grass carp in Qingyuan and heat stress molecular mechanism of Im was preliminary studied. The main results and conclusions are as follows:

1. During the period of investigation, Grass carp parasites was closely related to the seasonal change, from May to November which the temperature is high(15℃~ 32℃), Grass carp mainly infected *Trichodina* and *Dactylogyrus,* at the climate changed season, *Trichodina* was more likely to break out. Analysis of data showed that infection rate, abundance of Grass Carp's Trichodina parasite in intensive cultivation were 0.71 and‗++(5~10) ' respectively, in the natural breeding were 0.2 and‗+(1~5) ' respectively, the intensive cultivation higher than the natural breeding. To survey GuangZhou Xilang ponds that was found, the *Dactylogyrus* infection rate on the gills of grass carp is high, all over 0.93, In July and August, the two highest temperature months, the abundance of *Dactylogyrus* on gills reached 33.5 and 31.5, respectively. The *Dactylogyrus* population standard variance average ratio, the negative binomial, diffusion index are greater than one. That show the *Dactylogyrus* was aggregated in the host populations. During the period of investigation, except that the *Dactylogyrus*' abundance on the the first gill lamellae in the right side is smaller than that of the left side, the rest are larger than the left.

2. In the survey, a strain of *Ichthyophthirius multhifiliis* was found that in higher water temperatures, 28~30℃was still able to infect grass carp. To analyse the heat stress molecular mechanism, the *HSP70* gene ORF (open reading frame) of *Ichthyophthirius multiﬁliis* was

Cloned and its expression in following different experimental conditions of different temperature was analysed. Im *HSP70* gene ORF is 1995 bp, encoding a putative protein of 664 amino acid residues. According to the gene structure analysis, Im HSP70 secondary structure was mainlyα- helix and randon coil-based, and spatial configuration included the N-terminal ATPase domain and C-terminal peptide-binding domain. Compared with other known HSP70 protein, Im HSP70 was most similar to that of *Carchesium polypinum* (78.08% identity). Phylogenetic analysis

Revealed that *I. multiﬁliis* clustered into a branch with *C. polypinum*, *T. thermophila* and *S. histriomuscorum*, whose classification status were the same. Im HSP70 gene expressions in three different development stages (theront, trophont and tomont) at three different temperatures (20℃，25℃and 30℃) were detected by fluorescence quantitative RT-PCR. The results showed as follows: the gene expression levels of Im HSP70 were lowest in theront stage at all three experimental temperature, the levels in trophont were higher than that in theront and tomont at 20℃and 25℃, while at 30℃the levels in tomont were highest among the three stages. Additionally, the gene expression levels in theront and trophont stages were higher in 30℃than that in 25℃respectively.

3. In the optimal temperature, the paper investigated the influence of hardness and alkalinity on cyst formation, hatchability, and activity power of theront under experimental condition. The results are as follows. When the water hardness and alkalinity were 0 mmol / L, the cyst wall of *Ichthyophthirius muhifiliis* up to 70.5μm, when the hardness and alkalinity increased to 4 mmol / L, the cyst wall thinning to 21.4μm. The hatch period in hardness, alkalinity of 0.5 mmol / L and 0.1 mmol / L was significantly shorter than other groups; the time of larvae's keeping activity power in hardness, alkalinity was 0 mmol / L group significantly lower than other groups; followed by hardness and alkalinity were 4mmol / L and 0.1 mmol / L group.

This paper shows that, the occurrence of grass carp parasites had a certain correlation with the water temperature, alkalinity, hardness, etc of ecological factors, At 30℃，the trophont *HSP70* expression levels was lower than that at 20℃and 25℃，but higher in tomont, which showed the cyst was the main way through adverse environment. Alkalinity and hardness in the water had a certain correlation with the thickness of cyst wall, incubating time, the time of theront's keeping activity and hatch rate. However, the cross effects of the concentration of Mg2

+, Ca2 + and temperature affect *Ichthyophthirius multhifiliis* needs further study, Grass carp

Infusorians parasite infection rates, abundance and the relationship of infusorians protozoa in water also need further study.

**KEY WORDS**: *Ichthyophthirius multifiliis*; Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*); Ecological factors; *HSP70*; Hardness and alkalinity

目 录

[摘 要](#_Toc686602004) 2

[Abstract](#_Toc686602005) 3

[目录](#_Toc686602006) 3

[第一章 文献综述](#_Toc686602007) 4

[引 言](#_Toc686602008) 5

[1. 物理因子](#_Toc686602009) 5

[1.1 水温](#_Toc686602010) 5

[1.2 地理水流](#_Toc686602011) 5

[1.3 季节变化](#_Toc686602012) 5

[1.4 声波](#_Toc686602013) 5

[2. 化学因子](#_Toc686602014) 5

[2.1 溶氧](#_Toc686602015) 5

[2.2 盐度](#_Toc686602016) 5

[2.3 PH](#_Toc686602017) 5

[2.4 离子](#_Toc686602018) 5

[2.5 药物](#_Toc686602019) 5

[3. Th物因子](#_Toc686602020) 5

[3.1 宿主鱼](#_Toc686602021) 5

[3.2 中间宿主](#_Toc686602022) 6

[3.3 寄主的食性](#_Toc686602023) 6

[4. 本研究的目的和意义](#_Toc686602024) 6

[第二章 池塘系统草鱼主要寄Th虫与水Th态关系研究](#_Toc686602025) 6

[前 言](#_Toc686602026) 6

[1 材料和方法](#_Toc686602027) 6

[1.1 草鱼寄Th虫采集](#_Toc686602028) 6

[1.2 水Th态因子检测](#_Toc686602029) 6

[1.3 纤毛类原生动物的采集](#_Toc686602030) 6

[1.4 数据处理](#_Toc686602031) 6

[2. 结果](#_Toc686602032) 7

[2.1 水Th态因子及纤毛类原Th动物量](#_Toc686602033) 7

[2.2 草鱼主要寄Th虫的感染率及丰盛度](#_Toc686602034) 13

[2.3 相关性分析](#_Toc686602035) 18

[2.4 草鱼鳃上指环虫的感染率和丰盛度](#_Toc686602036) 20

[2.5 草鱼指环虫的聚集强度参数](#_Toc686602037) 25

[3. 讨论](#_Toc686602038) 26

[3.1 养殖模式对池塘系统的水Th态因子的影响](#_Toc686602039) 26

[3.2 池塘系统草鱼养成期间寄Th虫的季节动态](#_Toc686602040) 27

[3.3 草鱼车轮虫及指环虫与水Th态因子的关系](#_Toc686602041) 27

[3.4 车轮虫与纤毛类原Th动物的相关性](#_Toc686602042) 27

[3.5 指环虫种群在宿主草鱼鳃上的寄Th特点分析](#_Toc686602043) 27

[3.6 自然条件下宿主-寄Th虫系统](#_Toc686602044) 27

[第三章 硬度及碱度对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响](#_Toc686602045) 27

[前 言](#_Toc686602046) 27

[1. 材料与方法](#_Toc686602047) 27

[1.1 实验鱼](#_Toc686602048) 27

[1.2 多子小瓜虫成虫的收集](#_Toc686602049) 27

[1.3 碱度与硬度的设置](#_Toc686602050) 27

[1.4 不同碱度及硬度对幼虫孵化的影响](#_Toc686602051) 28

[1.5 包囊形成的判断标准及其包囊壁厚度的测量](#_Toc686602052) 28

[1.6 幼虫活力判断及分级](#_Toc686602053) 28

[2. 结果](#_Toc686602054) 28

[2.1 病鱼症状](#_Toc686602055) 28

[2.2 多子小瓜虫孵化](#_Toc686602056) 28

[2.3 碱度及硬度对多子小瓜虫包囊的影响](#_Toc686602057) 29

[2.4 多子小瓜虫包囊孵化所需时间及幼虫保持活力与水碱度及硬度的关系](#_Toc686602058) 29

[3. 讨论](#_Toc686602059) 31

[3.1 硬度及碱度对多子小瓜虫孵化的影响](#_Toc686602060) 31

[3.2 水体硬度及碱度对控制多子小瓜虫的探讨](#_Toc686602061) 31

[图版](#_Toc686602062) 32

[第四章 温度对多子小瓜虫](#_Toc686602063)*[HSP70](#_Toc686602063)*[的影响](#_Toc686602063) 32

[前 言](#_Toc686602064) 32

[1. 材料和方法](#_Toc686602065) 32

[1.1 多子小瓜虫来源](#_Toc686602066) 32

[1.2 试验鱼](#_Toc686602067) 32

[1.3 不同温度下多子小瓜虫成虫、包囊和幼虫的获得](#_Toc686602068) 33

[1.4](#_Toc686602069) *[HSP70](#_Toc686602069)*[的克隆与表达](#_Toc686602069) 33

[1.5 h。](#_Toc686602070) 35

[2 结果](#_Toc686602071) 36

[2.1 多子小瓜虫HSP70基因ORF序列分析](#_Toc686602072) 36

[2.2 同源性及系统进化分析](#_Toc686602073) 38

[2.3 不同温度下IM HSP70 MRNA不同发育阶段的相对表达水平的比较](#_Toc686602074) 38

[3 讨论](#_Toc686602075) 39

[参考文献](#_Toc686602076) 39

[攻读学位期间发表的学术论文](#_Toc686602077) 43

[独创性说明](#_Toc686602078) 43

[学位论文版权使用授权书](#_Toc686602079) 44

# 第一章 文献综述

引 言

草鱼(*Ctenopharynodon idellus*)，隶属鲤形目、鲤科雅罗鱼亚科、草鱼属，是我国主要的淡水经济养殖品种之一，2011年我国淡水养殖产量2471.93 万吨，其中草鱼产量为

444.22万吨，占淡水总产量的17.97%。2012年我国淡水养殖产量2644.54万吨，其中草鱼的产量为478.17万吨，占淡水总产量的18.08%，同比增长7.64%[1-2]。随着农业产业结构不断的调整和水产养殖技术逐步的完善和发展，我国淡水养殖业得到迅速的发展，水产养殖密度也是越来越大，由此，由水质和养殖环境的变化所导致养殖鱼类的病虫害问题日趋严重，这成为制约我国水产养殖业可持续发展的因素之一。其中由寄生虫引起的鱼类寄生虫病及其防治问题，一直是国内外水产养殖业及渔业资源保护学所进行的主要研究课题。以寄生虫为病原的疾病是继病毒型和细菌型疾病后养殖鱼类疾病的一大类型，病原的种类繁多，生活方式复杂，严重地危害着水生动物的健康，在寄生虫病发生及流行过程中，鱼体（寄主）、寄生虫（病原）和外界环境的关系十分密切，相互影响，这三者相互影响的结果决定疾病的发生和发展，水产养殖动物疾病的发生机理可用

―三环体‖关系来概括。寄生虫和寄主相互间的影响，是人们经常见到的，它们相互间的作 用往往取决于寄生虫的种类、发育阶段、寄生的数量和部位，同时也取决于寄主有机体的状况；而寄主的外界环境条件，也直接或间接地影响着寄主、寄生虫及它们间的相互关系[3, 4]。本章综述鱼类寄生虫与环境之间关系的研究进展，对寄生虫影响的生态因子作以概述，并阐述本学位论文的研究目标、目的和意义。

## 1. 物理因子

### 1.1 水温

养殖鱼类寄生虫作为水生生物受到水温的严格制约，不同的寄生虫有其特定的最适水温，在最适水温下，寄生虫的活力及对寄主的感染能力都处于较高状态，在此情况下，如果其它条件比较适宜，则容易导致寄生虫的大量暴发。另外水温也影响鱼类的代谢，当水温较高时，鱼类及中间宿主的代谢增强，随着取食能力增强，寄生虫的丰盛度增大，寄生虫的多样性也会增加。温度对自由生活阶段的寄生虫幼虫及体表外的寄生虫具有相当直接的影响[5]。在12℃～28℃的实验温度区间内，海洋微型异养鞭毛虫（*Flagell-*

*ate*）的生长速率随温度升高而加快[6]。在5℃～30℃范围内，小瓜虫（*Ichthyophthirius*

*multifiliis*）的出膜时间随温度的升高而缩短，膜的厚度随温度的升高而减薄，幼虫的个数先随温度的升高而增加，之后又下降[7]。在15℃低温下对斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)腹腔注射活体小瓜虫时，其免疫力比在温度为20℃～30℃时的小，且其死亡率也是较高的[8]。Chris[9]研究三代虫(*Gyrodactylus*)发现，感染率、数量和丰盛度随着季节温度的升高而增大；对于单殖吸虫如锚首虫(*Gyrodac-tylus sp.*)，高温却成了限制性因子，它们的感染率、数量、丰盛度在较低温度下达到高峰[10]。原因有可能是因为温度的增加有利于产卵量的增加，加快卵的发育和快速生长，而在秋冬季的温度更适合于虫产卵和卵的发育，

因此导致感染水平在冬季和早春的上升。Eure[11]发现温度因素和温度相关的宿主摄食强度变化是引起圆桶新棘吻虫(*Neoechinorhynchus cylindratus*)季节动态差异的主要因素；典型海湾水虱(*Alitropus typus*)种群在鲮鱼(*Cirrhinus molitorella*)中的感染参数与水温呈显著的正相关[12]。当然这种随温度的升高而增大的趋势也不是无限的，会随着寄生虫诱导宿主的死亡、宿主免疫反应的增强、寄生中的生存对策等而下降[13]。

### 1.2 地理水流

营养水平、纬度、栖息地的温度和降水之间的相互作用都影响着寄生虫的丰度，同样，生物地理因素也影响寄生生物的多样性[14]。Akoll 等[15]发现罗非鱼（*Oreochromis*

*niloticus*）在不同的生境类型（水库、溪流、池塘、网箱），感染寄生虫的鱼数量及其鳃上

寄生的单殖吸虫（*Cichlidogyrus tilapiae*和*C. sclerosus*）在数量上都有显著的差异，罗非鱼的寄生虫数量在水库的底栖鱼类中最高，在溪流中寄生虫的数量最少。Wootten[16]利用水道水流流速的控制来研究匙形复口吸虫*(Diplostomum grande)*对鱼的感染率，实验发现水流速率与实验鱼的匙形复口吸虫感染率呈负相关。Mdegela[17]对城市和农村小养鱼规模系统进行研究发现，罗非鱼肠道寄生虫的患病率在农村里面的土池（18.7%）比在城市

（6.7%）的显著高；池塘中用河水的（18.8%）显著高于用雨水养殖的（0%）；同时发现池塘类型是寄生虫发病率高的一个重要因素，土池的感染率（20.9%）显著高于水泥池

（4.7%）。孙军[18]认为，池塘的水体很少发生流动可能是养殖场中复口吸虫病暴发的原因，可以通过增大水流速率和生成涡流来限制复口吸虫病的流行和暴发。Costa等[19]对不同栖息地的短头鮈塘鳢(*Gobiomorphus breviceps*)寄生吸虫用广义的线性模型分析发现，顺着河流从下游到上游随着介质的连续下降，其吸虫丰度有着纵向坡度的存在。单向流动的河和主要过程像漂流的激流系统，影响着寄主的动态性和无脊椎动物的分布，进而影响到寄生虫的丰度。Lucía 等[20]对欧洲水域的琵琶鱼(*Anglerfish*)的桡足类寄生虫（*Lophius*

*piscatorius*）调查，用零修改模型和广义可加模型来评估寄生虫的感染率和强度的相关变量发现，最大的影响因子是宿主的大小和寄生虫的地理区域。

### 1.3 季节变化

部分寄生虫的感染具有明显的季节变化，在我国北方，养殖鱼类易被车轮虫、小瓜虫等原虫寄生，夏秋季节，易受锚头鳋（*Lernaea*）等桡足类寄生虫侵袭。聂品[21]对水库中寄生鲇固着鳋的感染率和丰盛度的研究中发现其有明显的季节变化。习丙文等[22]等对丹江口水库马口鱼（*Opsariichthys bidens*）肠道寄生蠕虫也表现出同样的规律。但是锚首虫科单殖吸虫在埃及罗非鱼鱼胃中的种群动态在春季和冬季其寄生虫的密度和感染水平很高[10]。Alam等[23]对孟加拉国白鲢（*Hypophthalmichthys molitrix*）调查发现在冬季（11月-2月）寄生虫的感染水平最高。也有的研究表明，某些寄生虫感染没有没有明显季节变化。杨延宝[24]对青海湖鱼类寄生棘头虫的种群生态学及其在宿主肠中的位置选择做了分析，结果表明：种群的感染率，丰盛度和平均丰度都没有明显季节变化。[Karvonen[](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Karvonen%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20580904)25]对鱼场养殖的大口黑鲈（*Micropterus salmoide*）疾病长期观察发现鱼豆波 虫

（*Ichthyobodo*）和斜管虫（*Chilodonella cyprini*）并没有明显的季节变化。同样Lucía 等[20]

对琵琶鱼的桡足类寄生虫（*Lophius piscatorius*）调查发现，其季节变化不明显。寄生虫区系的季节变化，一般可归纳成四种曲线类型：第一类为U形曲线，主要包括部分耐寒性种类；第二类为倒U形曲线，包括多数消化道寄生虫，夏季增高，主要由于寄主摄食增强；第三类属于四季出现的种类，如一些原生动物、单殖吸虫、线虫等生活史直接的种类；第四类为逐季上升类型，如血居吸虫，由于逐季感染积累的结果[4]。

### 1.4 声波

声波对寄生虫也有一定的影响，对于海洋浮游动物（甲壳类动物、软体动物、桡足类及棘皮类动物），运用超声波技术可以控制其生长、繁殖或杀死幼虫[26]。用60%频幅超声波破碎饼形碘泡虫孢子在十分钟就出现了破碎[27]。高强度的紫外线也能杀灭水体中的寄生虫[28]。

## 2. 化学因子

### 2.1 溶氧

研究表明，水中溶解氧的高低与寄生虫的感染力有直接关系，然而其对寄生虫的直接影响尚未查明[4]。Dickerson[29]研究发现在水中溶氧0.6～0.8 mg/L时，影响离开鱼的小瓜虫成虫形成胞囊（Sporocyst），所有生长阶段的小瓜虫在溶氧浓度低于0.2 mg/L的水中都会死亡。在缺氧情况下，仅健壮多子小瓜虫能在鱼体中生存[30]。但是Garcia等[31]研究发现低的溶氧浓度可以增加车轮虫(*Trichodina*)的感染。通过流行病学调查初步表明，富含溶解氧的水体，鱼类寄生单殖吸虫(*Monogenetic trematoda*)较多[4]。但那些具有特殊呼吸器的鱼类，如乌鳢(*Northern snakehead*)、刺鳅（*Mastacembelus aculeateus*）、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)等，在相同环境中单殖吸虫寄生则较少，这说明单殖吸虫一般是需要有充足氧气供应[32]。但是海水刺激隐核虫（*Cryptocaryon irritans*）对溶解氧以及化学需氧量的相关性不明显[33]。

### 2.2 盐度

一般来说：水体中盐度的升高，可减少鱼类寄生虫的危害，这是因为，盐度升高，提高了水体的导电率[31]，使得鱼体表粘液细胞数量增多，增强了鱼体表的免疫活性物质，对鱼体起到了保护作用[34]，使鱼体有更好的防控寄生虫入侵能力。盐度也可限制中间寄主的存活，间接影响寄生虫的存活，软水及咸淡水（含氯化物、硫酸盐较多），因其中碳酸盐较少，因而影响软体动物中的腹足类及双壳类，这些种类是吸虫的中间宿主，所以吸虫就相对较少[5]。

盐度也可以直接对寄生虫产生影响。不同种类的寄生虫，盐度的影响不一样。

L. Aihua[7]研究发现盐度大于5ppt时，小瓜虫的发育完全受到抑制，即使5ppt时，小瓜虫的发育时间也明显延长，出膜幼虫的数目明显减少。当提高水体中的盐度，能明显的抑制小瓜虫及其它寄生虫的生长[31、35、36]。在半咸水的水域中，指环虫(*Dactylogyrus*)的感染率为80%，而在海水水域仅为40%，淡水中则为99.3%。不过也有一些种类在淡水海水中均可以寄生，如三代虫。而对于刺激隐核虫，本尼登虫(*Benedenia spp.*)全部寄生在海水鱼上[4]。刺激隐核虫浸泡在淡水中80分钟，就会全部死亡[37]。

### 2.3 PH

鱼的最适生长pH为6.5～8.5，而寄生虫生长pH变化范围较大。饼形碘泡虫(*Myxobolus artus*)孢子对酸和弱碱反应不敏感，当在浓度较高的碱性溶液作用下，会放出极丝，而且在高浓度的酸性溶液中忍受性较强，促使孢子极丝放出与氢氧根离子的浓度有关[27]。Mancogliese[38]对美洲鳗的后生动物寄生虫调查发现，不同的pH条件下，美洲鳗寄生虫的种类不同，在pH<5.4 的水区域中，寄生虫头槽绦虫（*Bothriocephalus*

*claviceps*）、鲑棘吻虫（*Echinorhynchus salmonis*）、鳋（*Ergasilus celestis*）等的丰度较高；而在pH> 5.4 的水区域中，指环虫（*Pseudodactylogyrus anguillae*）、双穴吸虫

（*Diplostomum sp.*）的丰度较高。水体中pH在5-7之间变化时，并不影响小瓜虫的存活率和繁殖，同样在缓冲液体中对小瓜虫的影响不大[39]，提高水体中的pH可以降低小瓜虫的感染[31]。pH与硬度有着协同的作用，银鲶鱼养殖在pH5和硬度20 mg/L CaCO3中可以比较少的感染小瓜虫，高的水硬度可导致小瓜虫滋养体密度增高，但是当在pH7中，滋养体的密度下降，鱼的生存率上升[40]。

### 2.4 离子

水体中的离子在一定程度上也影响着寄生虫的动态，水硬度（即水中钙、镁离子总浓度）对小瓜虫独立游动阶段有着明显的影响，当水体中的硬度较高时，小瓜虫滋养体密度增高，其感染率相对较高[40]。同样在生态环境中的研究也得出同样的结果，Mark[41]从加拿大地盾湖泊中的12 种鱼类研究发现，在湖泊中钙离子浓度低时，复口吸虫

（*Diplostomum*）的感染率少甚至不存在。但是当钙含量高时，其复口吸虫的丰度就会显著的升高。水体中重金属离子的浓度也影响复口吸虫尾蚴(Cercaria)的寿命，高浓度的金属离子会使尾蚴和其囊蚴(Diplostomule)的生活期限缩短[18]。对鲤科鱼类（*Rastrineobola argentea*）的寄生虫舌型绦虫(*Ligula intestinalis*)特定金属分区的研究表明，一些元素

（钙、锶、镁）反映了骨形成、离子平衡和鱼入侵的生理差异。其必需元素铜和钴受到鱼和寄生虫的竞争，而微量元素铬和非必需元素就在寄生虫中高度的集中[42]。

### 2.5 药物

化学药物对寄生虫的影响大[43]，大量的药物如甲醛、孔雀石绿、硫酸铜、亚甲基蓝等被用来治疗寄生虫病，用有效氯和农药杀藻胺能有效的杀死单殖吸虫、冈本异沟吸虫(*Okamoto ditch trematode*)和纤毛虫[44]。Marta等[45]发现寄生虫丰度大小与多氯联苯水平呈负比例的关系。化学药物进入水体，对水生生物都将产生一定的影响，从而可能破坏水体生态系统的平衡。单甲脒在杀寄生虫的同时，对水生生物群落都会产生不同程度的影响，多氯联苯通过食物链在寄生虫体内沉积。化学药物也会使得水体中敏感种类减少或消失，杀死寄生虫中间宿主等，从而间接影响寄生虫。

## 3. Th物因子

### 3.1 宿主鱼

在同一水体内，寄主本身也对寄生虫产生影响。在感染水平上，鱼的表面积越大，感染寄生虫的几率就越大[46]。吴金英从鲻（*Flathead mullet*）体内的惠东拟囊腔吸虫

（*Saccocoedioides huidongensis*）的种群动态中发现不同体长宿主体内惠东拟囊腔吸虫的感染率，随宿主体内增长没有明显的变化规律，而丰盛度和平均密度则随着宿主体长的生长而增加[47]。水环境中寄生虫和寄主的密度及他们的分布情况，可直接影响寄生现象的发生机率，在单位空间及一定时间内，寄生虫、寄主接触的机会越多，寄生现象越易发生，而接触机会取决于在特定的时间内和空间内二者的密度及分布，一般情况下，池塘水环境中病原数量及养殖对象放养密度越大，越易暴发流行寄生虫疾病；但是有时与其相关性不大。Hallett[48]研究发现寄生虫的密度并不影响大鳞大马哈鱼（*Oncorhynchus*

*tshawytscha*）的死亡日梯度，但是对银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)有着负相关性，在银大马哈鱼个体之间有着很大的变异性。Pampoulie[49]调查发现在虾虎鱼（*Eucyclogobius*

*newberryi*)的腹腔和肌肉组织中分别发现了吸虫(*Aphalloides coelomicola*)和粘孢子虫(*Kudoa*

*camarguensis*），这两种寄生虫丰度在每月的同一时期达到高峰，研究发现这种相关性与它们宿主的生命周期有着正相关。同样对于转基因或者注射疫苗的鱼，没有表现出此规律，可能转基因鱼对寄生虫有着显著的免疫功能[46]。

### 3.2 中间宿主

多种鱼类寄生虫需要中间宿主。鱼类寄生蠕虫的生活史比较复杂，如复殖吸虫生活史中要求一定的中间寄主，第一中间寄主一般为腹足类，第二中间寄主或终末寄主有软体动物、环节动物、甲壳类、昆虫、鱼类、两栖类、爬行类、鸟类及哺乳类，有的种类要求多个中间寄主[4、5、50]。Ondrackova[51]对水泛滥区双穴吸虫（*Diplostomulum*）与其宿主关系的调查发现，吸虫病的暴发与第一中间宿主蜗牛和终宿主鸟及鱼群落结构相关，同时也发现潮汐带和洪水历时是第一宿主和终宿主出现的主要因素。寄生虫感染成鱼和稚鱼与河堤的坡度及河底的形状有关，特别是在稚鱼聚群地蜗牛宿主的密度有极显著相关。终宿主鸟出现的时间也与成年鱼宿主的密度相关，发现感染了双穴吸虫鱼的地方也是许多鸟光顾的地方。

许多鱼类寄生虫以低特异性的浮游动物作为中间寄主，鱼类寄生虫与浮游动物在宿主鱼中组合成一条途径通过掠夺性的相互作用转移宿主的能力[52]。脑粘体虫（*Myxobolus*

*cerebralis*）是造成鲑科鱼类回旋病的寄生虫，它具有两个宿主，分别为寡毛纲类和鲑科鱼类[53]。Adam[54]在北美的河流和溪流的调查发现，正颤蚓（*Tubifex tubifex*）的分布和丰富度是了解虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）暴发脑粘体虫引起的回旋病地方和区域差异的关键。Marcogliese[55]调查发现在单个的寄生虫种类中，在两个砍伐严重的湖泊中没有发现线虫（*R. canadensis*）的存在，但是在另外两个没有砍伐或部分砍伐的湖泊中却大量的存在，砍伐干扰可能影响到了线虫（*R. canadensis*）的中间寄主蜉蝣动物的生存。

### 3.3 寄主的食性

寄主的食性之不同，其寄生虫的组成也有明显的差别。草食性（包括一些杂食性鱼类）的鲤科鱼类，往往有鲫吸虫（*Carassotremaclupanodonaesp*）的寄生，而肉食性的鲤科鱼类和鲶类则往往又有牛首科吸虫（*Bucephalus heptanematodes*）的寄生，尾睾吸虫

（*Urorchis*）之类的吸虫经常可在鮈亚科鱼类肠道中采得[56]。黄鳝（*Monop-terus albus*）体内

的鳗鲡独孤吸虫（*Azygia Anguilla-e*）的感染率有着明显的季节性，但是其丰盛度差异并不显著，这一流行动态与其中间宿主的生活习性有关[57]。Valtonen[58]调查发现杂食性鱼类寄生虫的种类最高，滤食性和底食性鱼寄生虫丰度少，说明了寄生虫的传播通过捕食-被捕食，可能被用来作为生物指标的营养之间的关系。鱼类季节性的捕食强度的变化影响着湖中浮游动物群落的演替，Duffy[59]发现水蚤的一种细菌寄生虫（*Spirobacillus*

*cienkowskii*）是季节性流行同步，发生在许多湖泊的秋天。原位觅食捕获浮游动物占主导地位的鱼，蓝鳃太阳鱼对受真菌寄生的水蚤有高度的选择性，分析表明寄生在水蚤上的寄生虫种群可能受到鱼类捕食的季节性限制。食性的改变对肠道内寄生蠕虫的种群变化影响较大，马口鱼肠道中的寄生蠕虫卡斯杆咽线虫（*Rhabdochona cascadilla*）和据头槽绦虫（*Bothriocephalus acheilognathi*）的感染率和丰盛度的变化与其食性随体长的变化非常吻合[52]。

## 4. 本研究的目的和意义

草鱼是一种重要的水产养殖鱼类，约占中国淡水鱼养殖总量的20%，然而，近年来草鱼的病害越来越严重，特别是寄生虫感染造成的危害越来越大。寄生虫感染严重时，可引起鱼大量死亡，或造成机体损伤、引起继发或并发细菌、病毒感染，给鱼类造成更大的经济损失。对于鱼类寄生虫的防治，以往人们使用大量化学合成的农药类、重金属类药物防治鱼类寄生性疾病，由于寄生虫耐药性增加，药物对人类健康安全造成隐患等问题，人们意识到寻找其他替代方法防治鱼类寄生虫病已势在必行。

本学位论文通过在广东省三个不同地区的养殖池塘草鱼寄生虫车轮虫、指环虫、多子小瓜虫以及肠道绦虫进行调查，同时对养殖池塘水生态因子pH、氨氮、亚硝酸、纤毛类原生动物进行分析，以期揭示草鱼寄生虫动态变化与水生态之间的关系，为采取相应的生态防控措施提供依据。本学位论文进行了草鱼多子小瓜虫孵化与水生态因子碱度、硬度、温度的关系室内试验，对多子小瓜虫在不同的硬度、碱度水体中，其包囊的形成、孵化及幼虫活力进行了探讨，并采用分子生物学技术研究热应激对多子小瓜虫3个不同发育阶段幼虫、成虫和包囊HSP70基因表达的影响，为多子小瓜虫的防治提供研究基础，也为室内其他鱼类寄生虫与生态模拟试验提供新的方法。

# 第二章 池塘系统草鱼主要寄Th虫与水Th态关系研究

前 言

草鱼的主要有车轮虫、指环虫、斜管虫、小瓜虫、绦虫等，在寄生虫病发生及流行过程中，鱼体（寄主）、寄生虫（病原）和外界环境的关系十分密切，相互影响[2]。在一个寄主种群中，寄生虫的分布受多种因素的影响，包括寄主的行为，在感染期寄主种群的空间积累和宿主的易感性。寄生虫依赖寄生于宿主而生活，它对宿主有多方面的影响，它或者摄食宿主的营养，对附着组织产生一定的损伤，从而影响宿主的生长发育；或者改变宿主的行为，引发继发性感染，使宿主易于被捕食者捕食，或者使宿主不能充分的获得生存资源等[60]。鱼类寄生虫已成为生态学特别是群落生态学研究对象，其空间分布是生态研究的一个重要方面，关联到寄生虫的生态位、生长曲线、及对寄主的风险评估等的物理和化学特征[61]。水域生态环境的特殊性也会影响到鱼类寄生虫的发育与繁殖，因此寄生虫的种类和感染特点存在诸多区别。许多的学者对寄生虫群落结构的形成及其影响因子进行过探讨[33,62]。水生态因子对寄生虫的寄生、浮游植物叶绿素含量也有着明显的相关性，多子小瓜虫（*Ichthyophthirius muhifiliis*）在pH为7及硬度低的水体中，繁殖率增强[40]；刺激隐核虫发生周年变化的主要因素就是水温，其次就是与亚硝酸盐含量[33]；水体中COD及钙离子含量对浮游植物叶绿素合成影响大[65]。为此，本文通过对养殖草鱼池塘水生态因子的测定和草鱼寄生虫的调查，探索寄生虫生物种群之间，水生态与寄生虫之间的关系，旨在为鱼类寄生虫病防治及其基础研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 草鱼寄Th虫采集

宿主草鱼于2013年5月15日至11月30日采自中ft广成围（中ft），清远地底下村

（清远）及广州西朗（广州）草鱼养殖池塘，其中中ft、清远是集约化养殖，有肥水、投饵、施药，广州是散养，养殖过程中没有施药。草鱼用抛网捕获，随机选取实验所需要的数量后，将活鱼运回实验室进行解剖检查。测量材料鱼的体长，剪下鱼体两侧的鳃，置于载玻片上，滴加生理盐水，按《鱼病调查手册》[66]及《高级寄生虫学实验指导》[67]方法在显微镜下检查寄生虫的种类和数量，并记录。记录腮部寄生虫的种类及数目量。然后取出肠道，用体视显微镜检查草鱼肠道中的寄生蠕虫，鉴定寄生虫的种类，统计数量，并收集部分寄生虫保存在70%的酒精中。

### 1.2 水Th态因子检测

水样的采集与草鱼寄生虫检查在同天进行，水样的采集时间为上午7: 00-8:00，水温和

pH在现场进行测定，氨氮、亚硝酸氮、总碱度和总硬度测定依据GB3838- 88。水质综合指数评价参照王亚军[68]，以pH，氨氮，亚硝酸为综合评价的指标，

*Pi*  *S* min/ max

*S* min/ max

pH在7.5~8.5范围内为1，*P*pH

=1+

，*Pi*为检测值，*S* min =7.5, *S* max =8.5

氨氮以0.1为最低值，检测值<0.1, *P*NH4+=1, 检测值> 0.1, *P*NH4+=Pi/0.1;

亚硝酸氮以0.01为最低值，检测值<0.01, *P*NO2-=1, 检测值> 0.01, *P*NO2-=*Pi*/0.01;

*P*= *P*pH+ *P*NH4++ *P*NO2-

### 1.3 纤毛类原生动物的采集

采用聚氨酯泡沫塑料块（Polyurethane foam block unit, PFU）法采集纤毛类原生生物，PFU大小为8cm×8cm×5cm，孔径为100～150μm，16:00～18:00将PFU定点悬于池塘水体中部，36小时后收集样品，带上塑料手套，将PFU原生生物挤入收集管中，摇匀后，用0.1mL的浮游动物计数框，计数纤毛类原生动物的数量。每个样重复计数5次，每次计数10个小方格。

### 1.4 数据处理

草鱼寄生虫感染率、丰盛度和水质因子及纤毛类原生动物数量的相关性用SPSS17.0

双变量相关（Spearman相关数）的方法进行分析。感染率：就是某种寄生虫出现的概率。

|  |  |
| --- | --- |
| 感染某种寄生虫的鱼尾数 | |
| 寄生虫的感染率= | × 100% |
| 检测寄生虫的鱼尾数 | |

丰盛度：是某种寄生虫出现在宿主上的数目。

|  |
| --- |
| 所检测鱼体上寄生虫总个数 |
| 寄生虫的感染丰盛度= |
| 检测有寄生虫的鱼尾数 |

寄生虫的分布类型及其检验：方差*S* 2，均值*x*；*DI* =方差( *S* 2) /均值( *x* ),如*DI*> 1

为聚集分布，*DI* =1为随机分布，*DI* < 1 为均匀分布。

聚集强度负二项分布参数*k*值；*k**x*2 /*S* 2 *x*

平均拥挤度

*X* \*  *x*  *S* 2 / *x* 1

扩散性指标

*n*

*n*

*I* *n**Xi**Xi*1/ *T* (*T*1)

*i*0

*T**Xi i*0

式中：*n* ---样本数，*T* --寄生虫总数，*X i* ---第*i*个样本的虫数。

## 2. 结果

### 2.1 水Th态因子及纤毛类原Th动物量

调查显示2013年5月到11月，主要水质因子的变化范围（如表2-1）：水温随着季节的变化而变化，三地都是在7月份达到最高；pH值变化范围不大，7.1~8.4之间；广州池塘

中的亚硝酸几乎没有；硝酸盐在中ft和清远池塘在11月份有着一定的升高，中ft、清远在11月份达到最高，分别为1.25 mmol·L -1和1.05mmol·L -1；广州的≤0.35 mmol·L-1，水质综合指数显示中ft和清远池塘呈现―W‖型。中ft和清远池塘的总碱度和总硬度都比广州池塘的高，中ft总碱度和总硬度最高分别为10月份2.50 mmol·L -1和5月份的2.85

mmol·L -1；清远总碱度和总硬度最高分别为11月份2.67 mmol·L -1和11月份2.67 mmol·L -

1；广州的总碱度和总硬度最高分别为6月份1.07 mmol·L -1和1.43 mmol·L -1。纤毛类原生

动物数量变化如表2，中ft和清远池塘中的纤毛类原生动物相对比广州的多，其中中ft和清远池塘都是在10 月份纤毛类原生动物的数量达到最高，分别为10.0×10 3 个/mL，

3.75×10 3个/mL.而广州池塘纤毛类原生动物数量在9月份达到最高点，为0.92×10 3 个

/mL。

表2-1 中ft、清远和广州池塘水质检测

Tab 2-1 Water physicochemical factoers in ZhongShan, QingYuan and GuangZhou ponds

| 地名  Address | 月份  Month | 温度  T(℃) | 2.3 pH | 亚硝酸氮  Nitrite- N(mg·L -1 | 氨氮  Ammonium- N (mg·L -1) | 水质综合指数  Water qulity index | 总碱度  TALK  （mmol·L  -1) | 总硬度  TH  （mmol·L  1) | 纤毛类原生  动物  Cliiated Protozoon  （103 个/ml） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 中ft ZS | 5 | 28.5 | 8.2 | 0.008 | 0.80 | 10.00 | 1.96 | 2.85 | 1.37 |
|  | 6 | 31.0 | 8.0 | 0.005 | 0.10 | 3.00 | 1.56 | 2.26 | 1.51 |
|  | 7 | 32.0 | 8.0 | 0.004 | 0.10 | 3.00 | 1.63 | 1.78 | 2.26 |
|  | 8 | 28.0 | 8.0 | 0.023 | 1.20 | 15.3 | 1.78 | 1.73 | 2.52 |
|  | 9 | 29.0 | 7.5 | 0.004 | 0.18 | 3.80 | 1.94 | 1.43 | 1.54 |
|  | 10 | 24.0 | 7.1 | 0.009 | 0.13 | 3.35 | 2.50 | 2.50 | 3.75 |
|  | 11 | 18.5 | 7.2 | 0.014 | 1.25 | 14.94 | 2.28 | 2.44 | 3.00 |
| 清远 QY | 5 | 26.3 | 7.8 | 0.008 | 0.90 | 11.0 | 1.62 | 1.78 | 1.20 |
|  | 6 | 29.5 | 8.2 | 0.008 | 0.43 | 6.30 | 1.69 | 1.89 | 2.65 |
|  | 7 | 30.0 | 8.1 | 0.009 | 0.10 | 3.00 | 2.35 | 2.09 | 3.35 |
|  | 8 | 30.0 | 8.0 | 0.015 | 0.53 | 7.80 | 2.14 | 1.60 | 1.33 |
|  | 9 | 23.0 | 7.2 | 0.008 | 0.20 | 4.00 | 2.00 | 1.43 | 0.80 |
|  | 10 | 18.0 | 7.2 | 0.008 | 0.23 | 4.30 | 1.69 | 2.23 | 10.0 |
|  | 11 | 13.0 | 7.1 | 0.029 | 1.05 | 13.45 | 2.67 | 2.67 | 8.96 |
| 广州 GZ | 5 | 27.0 | 8.2 | / | 0.10 | 3.00 | 0.89 | 1.36 | 0.58 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 6 | 30.0 | 8.0 | / | 0.10 | 3.00 | 1.07 | 1.43 | 0.49 |
| 7 | 31.0 | 7.8 | 0.008 | 0.35 | 5.50 | 1.00 | 1.25 | 0.68 |
| 8 | 30.0 | 8.4 | / | 0.20 | 4.00 | 1.07 | 1.30 | 0.92 |
| 9 | 29.0 | 7.5 | / | 0.35 | 5.50 | 0.98 | 1.02 | 0.47 |
| 10 | 20.0 | 7.6 | / | 0.35 | 5.50 | 0.98 | 1.02 | 0.35 |
| 11 | 16.0 | 7.2 | / | 0.20 | 4.04 | 1.07 | 1.25 | 0.30 |

### 2.2 草鱼主要寄Th虫的感染率及丰盛度

在5~11月的调查期间，车轮虫在中ft池塘的感染率都在20%以上（如表2-2），在

10和11月份，车轮虫感染率在96%以上，丰盛度也达到了―+++(> 10)‖；在清远池塘，车

轮虫在5月份的感染率为0，但是在7和10月份的感染率为100%，丰盛度也达到了

―+++(> 10)‖；但是对于广州池塘，车轮虫的感染率几乎都在22%以下，在7~9月份，其感染率为0，调查期间，车轮虫的丰盛度低为―+（1~5）‖。指环虫感染率中ft在7月份最高为83%，清远在6月份最高为80%，丰盛度较低；但是在广州池塘，指环虫感染率较高，都在93%以上，丰盛度在7和8月份达到最高，分别为33.5和31.5。绦虫在中ft和清远池

塘的感染率低；中ft池塘在5-9月份，没有检测到绦虫，在清远池塘，7和9月份，绦虫的丰盛度达到9和7；广州池塘，草鱼在5月份绦虫的感染率为100%，丰盛度也达到最大为7.6，但是在8、10和11月份，没有检测到绦虫。同时5月采样之前，清远养殖场暴发过小瓜虫病，有些池塘的死亡率高达90%。

表2-2 中ft市、清远市、广州市草鱼主要寄生虫感染参数

Tab 2-2 Index of parasites infection of Grass Carp in Zhong Shan、QingYuan and GuangZhou ponds

| 地名  Address | 月份  Month | 车轮虫  Trichodina | |  | 指环虫  Dactylogyrus | | 绦虫  Cestode | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 感染率(%)  Prevalence | 丰盛度  Intensity | | 感染率(%)  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率(%)  Prevalence | 丰盛度  Intensity |
| 中ft  ZS | 5 | 75 |  | ++ | 75 | 1.1 | 0 | 0 |
| 6 | 20 |  | + | 20 | 1.0 | 0 | 0 |
|  | 7 | 100 |  | + | 83 | 1.0 | 0 | 0 |
|  | 8 | 100 |  | + | 25 | 1.0 | 0 | 0 |
|  | 9 | 60 |  | + | 20 | 1.0 | 0 | 0 |
|  | 10 | 95 |  | +++ | 19 | 1.0 | 5 | 3.0 |
|  | 11 | 100 |  | +++ | 26 | 2.0 | 5 | 3.0 |
| 清远  QY | 5 | 0 |  | 0 | 10 | 1.0 | 0 | 0 |
| 6 | 30 |  | + | 80 | 6.63 | 20 | 1.5 |
|  | 7 | 96 |  | +++ | 39 | 1.9 | 12 | 9.0 |
|  | 8 | 22 |  | + | 22 | 1.25 | 0 | 0 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 9 | 38 | + | 38 | 1.0 | 4 | 7.0 |
|  | 10 | 100 | +++ | 55 | 1.1 | 29 | 4.86 |
|  | 11 | 100 | ++ | 32 | 1.1 | 0 | 0 |
| 广州  GZ | 5 | 20 | ＋ | 100 | 5.00 | 100 | 7.6 |
| 6 | 20 | ＋ | 100 | 10.2 | 40 | 2.5 |
|  | 7 | 0 | 0 | 100 | 33.5 | 30 | 4 |
|  | 8 | 0 | 0 | 100 | 31.5 | 0 | 0 |
|  | 9 | 0 | 0 | 100 | 4.09 | 27 | 4.67 |
|  | 10 | 22 | ＋ | 100 | 19.4 | 0 | 0 |
|  | 11 | 21 | ＋ | 93 | 5.57 | 0 | 0 |

注：丰盛度：车轮虫在100 倍（目镜10×，物镜10×）显微镜下，―+‖表示≤5 个；―++‖ 表示 5~10

（含10个）；―+++‖表示＞10个。

### 2.3 相关性分析

对中ft、清远和广州池塘草鱼车轮虫、指环虫及绦虫的发生与水温、pH值、水质综合指数、总碱度、总硬度及纤毛类原生动物量进行双变量相关分析，所得的相关系数见表2-3。结果表明，清远草鱼鳃上的车轮虫与纤毛类原生动物量有着显著的正相关；广州池塘的草鱼鳃上的车轮虫与水温有着显著的负相关。草鱼鳃上指环虫与所检测的生态因子没有明显的相关性。中ft池塘的草鱼肠道绦虫与水温、pH值、总碱度及纤毛类原生动物量有着极显著的相关性，另两地池塘与此生态因子没有明显的相关性。

表2-3 中ft、清远和广州草鱼寄生虫感染率与水生态因子的相关性

Tab. 2-3 The correlation between infection rate of parasite in the ponds of ZhongShan、QingYuan and GuangZhou Grass Carps and water quality factors

| 寄生虫  parasite | 地名  Address | 表层水温  Water temperature | pH 值 | 水质综合指数  Water qulity index | 总碱度  Total alkalinity | 总硬度  Total hardness | 纤毛类原生动物数量  Number of infusorians' protozoon |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 中ft ZS | -0.371 | -0.152 | 0.334 | 0.222 | -0.037 | 0.630 |
| 车轮虫  Trichodina | 清远 QY | -0.582 | -0.518 | -0.216 | 0.518 | 0.739 | 0.775\* |
|  | 广州 GZ | -0.784\* | -0.356 | -0.098 | -0.078 | -0.076 | -0.730 |
|  | 中ft ZS | 0.270 | 0.598 | 0.072 | -0.234 | 0.090 | -0.306 |
| 指环虫  Dactylogyrus |  |
| 清远 QY | -0.018 | 0.324 | -0.571 | -0.054 | 0.321 | 0.464 |
|  | 广州 GZ | 0.618 | 0.612 | 0 | -0.428 | 0.104 | 0.612 |
|  | 中ft ZS | -0.791\*\* | -0.82\*\* | 0.316 | 0.791\*\* | 0.474 | 0.791\*\* |
| 绦虫  B．gowkongensis |  |
| 清远 QY | -0.019 | 0.280 | -0.667 | -0.280 | 0.259 | 0.445 |
|  | 广州 GZ | 0.347 | 0.371 | -0.485 | -0.388 | 0.585 | 0.334 |

注：数值表示Spearman相关系数；\*表示差异显著；\*\*表示差异非常显著

### 2.4 草鱼鳃上指环虫的感染率和丰盛度

在调查期间的6～11月，对广州池塘草鱼鳃弓每对鳃片上指环虫的感染率和丰盛度

（如表2-4和2-5）显示，草鱼左右鳃弓的每对鳃片感染率都大于21%，7、8、9和10月份的感染率和丰盛度都较大。左右两侧第1和4对鳃片的感染率相差不大（图2-1），左

第2对鳃片的感染率大于右侧的，但是右侧的第3对鳃片的感染率大于左侧的。丰盛度右侧除了第1对鳃片的（图2-2），其余的都大于左侧鳃片上的丰盛度。

表2-4 草鱼左侧鳃片指环虫感染参数

Tab. 2-4 Index of*Dactylogyrus* infection on the left gill archs of Grass carp *s*

|  | 第一对鳃  Gill I | | 第二对鳃  Gill II | | 第三对鳃  Gill III | | 第四对鳃  Gill IV | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 月份  month | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity |
| 6 | 60 | 1.30 | 80 | 2.00 | 80 | 2.00 | 40 | 1.5 0 |
| 7 | 100 | 6.40b | 80 | 3.90 a | 90 | 2.90 a | 90 | 3.3 0a |
| 8 | 75 | 3.67 | 87 | 3.71 | 87 | 3.00 | 87 | 5.43 |
| 9 | 45 | 1.00 | 36 | 1.00 | 27 | 1.33 | 27 | 1.67 |
| 10 | 89 | 3.13 | 66 | 3.83 | 77 | 3.86 | 77 | 2.57 |
| 11 | 43 | 1.14 | 57 | 1.75 | 43 | 1.33 | 36 | 1.60 |

表2-5 草鱼右侧鳃片指环虫感染情况

Tab. 2-5 Grass carps infection of the right gill arches of *Dactylogyrus*

|  | 第一对鳃  Gill I |  | 第二对鳃  Gill II |  | 第三对鳃  Gill III |  | 第四对鳃  Gill IV |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 月份  month | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity | 感染率  （%）  Prevalence | 丰盛度  Intensity |
| 6 | 40 | 1.00a | 60 | 4.00b | 80 | 2.00ab | 80 | 1.50a |
| 7 | 80 | 3.88a | 80 | 6.75b | 80 | 5.75ab | 90 | 4.56ab |
| 8 | 87 | 4.71 | 87 | 4.14 | 100 | 5.75 | 87 | 5.29 |
| 9 | 55 | 1.50 | 36 | 1.75 | 36 | 2.00 | 18 | 1.50 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 10 | 78 | 2.57a | 78 | 4.29b | 78 | 2.22a | 100 | 2.00a |
| 11 | 64 | 1.56 | 29 | 1.50 | 50 | 2.00 | 21 | 2.00 |

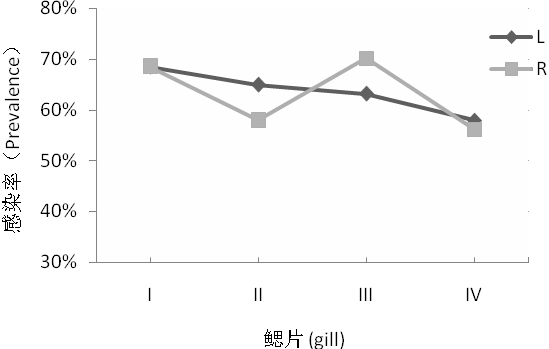


图2-1 草鱼鳃片上指环虫的感染率

Pig.2-1 The prevalences of *Dactylogyrus* on the gill archs of Grass Carp



图2-2 草鱼鳃片上指环虫的丰盛度

Pig.2-2 The infection intensity of *Dactylogyrus* on the gill archs of Grass Carp

### 2.5 草鱼指环虫的聚集强度参数

对广州池塘草鱼指环虫种群在草鱼种群中的聚集强度参数见表3-6。指环虫种群方差和平均数之比*DI*，负二项参数*K*值，扩散性指数*I*大于1，根据种群生态学衡量其分布类型的判断方法，表明指环虫种群在宿主种群呈聚集分布。方均比和平均拥挤度*M* \* 在

7、8和10月份值较大，这说明指环虫在草鱼鳃上的的聚集强度大。

表2-6 指环虫感染草鱼的聚集强度参数

Tab. 2-6 The aggregation index of*Dactylogyrus* infecting Grass carps

| 月份  Month | 方均比  Standard variance Average ratio | 负二项参数Negative binomial | 平均拥挤度  Mean crowding | 扩散性指数  Diffusion index |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 6 | 6.00 | 2.04 | 15.20 | 1.40 |
| 7 | 6.00 | 6.69 | 38.51 | 1.13 |
| 8 | 8.34 | 4.29 | 38.84 | 1.20 |
| 9 | 3.49 | 1.64 | 6.58 | 1.57 |
| 10 | 7.23 | 3.11 | 25.63 | 1.29 |
| 11 | 2.19 | 4.43 | 6.48 | 1.21 |

## 3. 讨论

### 3.1 养殖模式对池塘系统的水Th态因子的影响

珠江是我国长江、黄河后的第三大水系，流域面积453690平方公里。它由西江、北江、东江及珠江三角洲诸河等四个水系所组成[69]。中ft、清远、广州池塘都是处在珠江水系流域，中ft池塘（N:22.247, E:113.386）处在北江北岸，清远池塘（N:23.699, E:112.947）处在西江的北岸，广州池塘（N:23.067, E:113.220）处在珠江中部。珠江水系流域的鱼类资源非常丰富，在从自然生态环境向集约化和大水面养殖方向发展的过程中，鱼的种类越来越多。

在调查的三个地点中，中ft和清远池塘是集约化养殖，有人工外源能量的输入；广州池塘是自然养殖池塘，几乎没有外源能量的输入。水质综合指数、总碱度、总硬度及原生动物量中ft和清远池塘要高于广州池塘。胡锐等[70]调查也表明，在精养鱼池塘中原生动物较丰富，而且密度也大。王亚军[68]对池塘系统中的原生动物多样性研究发现，当水质综合指数增大时，原生动物量有着相对的升高，但是水体中的原生动物种类多样性与水质综合指数有着负相关。外源能量物质的输入，增加了N、P营养物质的含量，武士蓉等[71]，孙志强等[72]研究发现，总氮和总磷是影响水生生物的主要水质因子，对原生动物群落的影响较大。中ft和清远池塘中的氨氮和亚硝酸氮含量都比广州池塘的高，这也进一步说明了养殖过程中饲料能量的输入，对水体中的影响较大，不仅是在水质上，还有对水生生物的影响。在对三地池塘的调查监测中，池塘中的总碱度在0.89~2.67 mmol/L之间，总硬度在1.02~2.85 mmol/L之间。胡锐等[70]对东北的长春市湖泊及池塘水体监测显示，水体中的总碱度在1.03~5.29 mmol/L之间，总硬度在2.01~8.13 mmol/L之间。杨秀兰等[73]对在黄河下游的盐碱池塘研究显示，水体中的碱度在2.26~4.07 mmol/L之间，但是硬度有显著的升高，达到了12.0~36.5 mmol/L。广东地区的池塘中的碱度及硬度偏低，可能是由地理因素引起。池塘系统在养殖过程中，有向水体中泼洒石灰，这在一定程度上能提升水体中的总碱度和总硬度[74]，这也可能是导致中ft、清远和广州池塘水体中的总碱度和总硬度不同的原因。

### 3.2 池塘系统草鱼养成期间寄Th虫的季节动态

本研究中显示，水体中的水温明显的随着季节的变化而变化，温度是影响生物生长、发育、繁殖的主要环境因子，车轮虫的最适宜水温为22~29℃[75]。在气温交替的10~11月期间，中ft、清远和广州三地池塘草鱼的车轮虫感染率和丰盛度达到一个高峰。Moghaddam等[76]将鲟鱼苗放入土池中后，在饲养的过程的加深，鱼苗感染车轮虫的程度就加深，研究发现一是因为饲养过程中水温的升高，二是池塘中的可溶解性的有机质增加，为单细胞纤毛类的传播提供了理想条件。由此可以推测，三地池塘养殖草鱼车轮虫的感染与水体中的水温及水体中有机质含量有着一定的关联。

从调查可以看出，池塘养殖草鱼是全年都可感染的，在高温的7月，感染率和丰盛度相对较高。姚卫建等[77]对人工池塘系统中鲢指环虫研究发现，指环虫对鲢具有全年的感染性，其丰盛度在2~3月逐渐上升，4月份达到高峰，随后逐渐下降。在洪湖自然水体中，鲢指环虫的感染率和丰盛度在6月份达到高峰，其余月份都保持在较低水平[78]。与本研究相似，都是随着水温呈现明显的相关性。Eure[79]发现温度因素和温度相关的宿主摄食强度变化是引起圆桶新棘吻虫(*Neoechinorhynchus cylindratus*)季节动态差异的主要因素。聂品[80]研究表明，复口吸虫在自然条件下或养殖条件下的鱼类中间宿主种群中表现明显的季节变化。对草鱼肠道绦虫的调查显示，感染率较小，集中的月份也少，规律性不是很明显，寄生虫病的传播存在着一定的地域性、季节性，甚至不同的气象条件对其病的传播有着一定的影响。掌握及生态控制寄生虫病的传播还要进一步的研究。

### 3.3 草鱼车轮虫及指环虫与水Th态因子的关系

调查发现，中ft池塘的车轮虫在10、11月及清远池塘7、11月份的感染率和丰盛度都较大。相关性分析广州池塘草鱼鳃上车轮虫感染率与温度有着负相关，清远池塘的与原生动物有着显著的正相关性。Moghaddam等[76]将鲟鱼苗放入土池中后，在饲养的过程的加深，鱼苗感染车轮虫的程度就加深，研究发现一是因为饲养过程中水温的升高，二是池塘中的可溶解性的有机质增加，为单细胞纤毛类的传播提供了理想条件。广州池塘和中ft及清远的养殖模式不同，广州池塘的水生态指标在监测期间都较低，推测此水体处于贫营养化，水体中的有机质少，降低了单细胞纤毛类的传播。而中ft和清远池塘，外源输入能量大，水体一直处在富营养化的状态之中，水体中的有机质多，这可能是集约化养殖池塘车轮虫感染率和丰盛度大于散养池塘的原因之一。Prost [81]对伸展指环虫

（*Dactylogyrus extensus*）的观察发现，指环虫卵的发育与水温有着密切的关系，在水温为22~26℃时，3天孵出，在18~19℃时需5~6天，在16~17℃时需8~9天，在3℃不发育；温度的高低不仅影响发育速度，而且发育率也有关，张效平等[82]对中型指环虫

（*Dactylogyrus intermedius*）研究发现，在水温为22℃时，中型指环虫卵的孵化率为72.7%，在30、35℃时，其孵化率为50%左右；而且温度对指环虫的产卵量和繁殖速度有关，在水温4℃时的中型指环虫产卵量显著的低于30℃时的，产卵速率随着温度的升高而加快，在4℃水温中，产卵维持的时间为4天，但是在35℃时，产卵只维持11小时。

本研究结果表明在高温的6~7月份，指环虫的感染率较高；广州池塘鳃上指环虫的丰盛度在高温的7、8月份高，推测温度的变化是导致指环虫动态变化的因素之一。

鱼的最适生长pH为7.5～8.5，而寄生虫生长pH变化范围较大。调查显示，三地池塘中的pH值变化在7.1~8.4的范围之间，变化的范围幅度不大，Mancogliese[38]对美洲鳗的后生动物寄生虫调查显示，在不同的pH水域中，寄生虫的优势种有不同。Garcia等研究显示，提高水体中的pH值可以降低小瓜虫的感染。也有研究显示pH与硬度有着协同作用[40]。王亚军[68]对鳜鱼池塘中的水质进行跟踪调查发现，鳜鱼的健康指数与水体中的水质综合指数有着显著的正相关。赖子尼等[63-64]研究也发现水生态因子对鱼类健康有着一定的相关性。对中ft、清远和广州三地池塘进行调查显示，集约化养殖的中ft及清远池塘综合水质指标和水体的碱度、硬度数值都是要高于散养的广州池塘。池塘系统中，水体中水质综合指数对草鱼寄生虫的影响，还有待长期的跟踪调查。

### 3.4 车轮虫与纤毛类原Th动物的相关性

车轮虫是海水与淡水环境中常见的危害性纤毛虫类群之一，一年四季均可检查到，流行于5~7月，适宜温度在20~28℃，以夏、秋为流行盛季[4]。王亚军[68]研究发现，水体中的原生动物种类多样性与水质综合指数有着负相关，而且不同养殖密度的池塘水质综合指数和浮游生物群落丰富度不同，高密度养殖会对池塘环境造成损伤，导致浮游生物群落的丰富度减少。在调查中，集约化养殖的中ft、清远池塘有着大量能源物质—蛋白饲料的输入，增加了池塘系统中N、P物质的含量。武士蓉等[71]，孙志强等[72]研究发现，总氮和总磷是影响水生生物的主要水质因子；这也表明，能量物质的输入，在一定程度上决定了水体中纤毛类原生动物的种类和数量。从表2-1中可以看出，中ft、清远池塘中水体综合指数相对广州池塘要高，从而可以推测出前者的水体中原生动物种类数要低于广州池塘。广州池塘为散养模式，没有外源能量物质的输入，纤毛类原生动物的量明显的少于前者集约化养殖池塘，这也可以表明：在池塘的养殖过程中，水体中的纤毛类原生动物的种类和数量并不是成正比的，随着养殖程度的增强，纤毛类的数量会增加，种类却在减少。原生生物栖息在不同沉积物层面的特定生态位中，纤毛虫通过纤毛摆动加速溶解态营养物质和气体在液态微生境中的循环，增强对细菌的吞噬能力[83]。对此在同一生境的生物就会存在着竞争的关系，同是纤毛类的原生生物就会分化出不同的微生

境。张翔等[84]对污水处理厂长中浮游生物种群研究发现，纤毛类原生动物在厌氧池、缺氧池、曝气池中出现的种类和数量有着很大的差别，说明纤毛类原生生物对水体中的氧气梯度是不同的。在散养的广州池塘中，纤毛类原生动物量与车轮虫感染率、丰盛度明显的对于集约化养殖池塘，说明水体中的有机质的含量对纤毛类生物有着明显的影响，然而处在高温的7~9月份，车轮虫的感染率为0，但是水体中纤毛类原生动物并没有明显的减少，由此推测纤毛类原生动物对车轮虫的生境有着竞争的关系。

### 3.5 指环虫种群在宿主草鱼鳃上的寄Th特点分析

寄生虫在鱼类鳃上所表现出的寄生部位的选择性已有很多的报道[21, 77, 85]。从属的水平上看，单殖吸虫表现出强烈的对它们的宿主种群的专一性，不少的研究也表明了单殖吸虫宿主专一性的程度。有研究显示60%以上的单殖吸虫只有1种宿主，约75%的单殖吸虫的宿主仅为1属，超过97%的单殖吸虫的宿主在1科之内[86]。指环虫属，拟指环虫属，多基虫属，锚首虫属和双身虫属只出现在鲤科鱼类上[89]。聂品[21]对鲇鱼鳃上的固着鳋研究发现，除12月份以外，50%以上的固着鳋都寄生在第2和第3对鳃片上，当种群

的丰盛度高时，固着鳋更集中分布于第2和第3片鳃上。Buchman[88]研究发现，不同的指环虫属对鳃的选择特异性不同。姚卫建等[77, 87]研究也发现，草鱼鳃片指环虫主要寄生在第2和第3对鳃上。Hao等[85]调查发现，温氏指环虫（*Dactylogyrus wunderi*）在宿主东方欧鳊( *Abramis brama orientalis*)除左侧第1对鳃上的感染率大于右侧的外，其余的都是右侧的大于左侧的。Arme等[90]调查发现，在第一对鳃片上寄生着单一的吸虫，但是高强度的寄生虫感染时，寄生虫更趋向寄生在第2、3和4对鳃片上，由此认为鳃片上的水流能够影响吸虫在宿主鳃上的分布，另外宿主的免疫反应可能起了很大的作用。Wootten[91]认为中间的鳃片具有更大的面积可以让更多的寄生虫附着。在本研究中草鱼鳃上指环虫的寄生没有明显的特异性，但是从总体上来看，左侧的第2对鳃片上指环虫的感染率大于右

侧的，但是右侧第3对鳃片上的感染率大于左侧的；而感染的丰盛度，右侧除了第1对鳃片的，其余的都大于左侧鳃片上的丰盛度。对于指环虫在宿主草鱼鳃上寄生的规律性变化，还需在养殖过程中对其种群变化做进一步长时间的研究。

### 3.6 自然条件下宿主-寄Th虫系统

寄生虫在宿主种群中的分布模式可以分为3种类型，即均匀分布、随机分布和聚集分布。对散养广州池塘调查发现，草鱼鳃上指环虫种群的方均比均大于1，分布类型为聚集分布；指环虫负二项分布指数*k*值在7、8和11月份相对较高，说明指环虫在7、8和11月份的聚集强度较高。在自然条件下，寄生虫中的绝大多数种群在它们宿主种群内呈现聚集分布，即大量的寄生虫寄生于少数几个宿主体内，这样也就使寄生虫对宿主种群的影响减到最小[61]。寄生虫调节宿主种群的各种条件和因素不是互相孤立的，它们之间是相互促进和相互制约的。聚集分布有助于加强寄生虫的密度制约调节和过程以及寄生虫引起的宿主死亡又能引起寄生虫聚集分布程度的下降，寄生虫引起宿主的非线性死亡是一种密度制约的反应[60]。郝翠兰等[92]研究结果表明东方欧鳊的温氏指环虫聚集强度较

高，但是未发现由于该寄生虫的感染而导致宿主死亡的现象。赵江ft等[93]研究也表明，单肠四钩虫在宿主种群中表现为聚集分布，而且这种高度的聚集分布是与宿主种群的调节相适应的。在本实验中，未发现因指环虫的感染致使宿主大量死亡的现象，说明长期的自然选择，寄生虫和宿主之间是相互作用、相互调节、共同进化的、它们之间长期以来形成了一种稳定的、动态的平衡系统，共同维持着宿主，寄生虫系统的平衡[61]。

# 第三章 硬度及碱度对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响

前 言

多子小瓜虫（*Ichthyophthirius multifiliis*）是淡水和咸淡水鱼类的重要寄生纤毛虫，引起被寄生鱼类体表和鳃上出现白点，被称为白点病，该病常引起养殖鱼类大量死亡，是世界范围内主要的病原之一，造成重大经济损失[94-95]；特别是近年来，生产规模的增强使得水质的破坏和密度的增加从而导致了疾病的增加，在这密集的养殖业中，现实中单个的病原导致的鱼类死亡的损失或许是很小，更有可能的是许多的病原（病毒、细菌、真菌和寄生虫）都存在，并导致疾病[96]。在小瓜虫与细菌中的混合感染中鱼的死亡率显著的提高[97]，这表示小瓜虫可能是某些细菌的潜在载体，寄生虫对宿主造成的刺激及损伤，导致了寄主免疫力的下降，降低了宿主的抵抗力[98-99]，这也导致了细菌及病毒的继发感染。目前对防治小瓜虫病的研究主要集中在药物的筛选及其免疫预防的理论基础上

[41]，现在能够治疗小瓜虫病的化学药物很有限，化学药物加到水中通常需要很多处理，

而且很多药物仅对杀灭自由游泳阶段的虫体有效，对于寄生阶段的虫体无效[100]，中草药一般认为安全环保，但目前也存在着某些争议，如疗效不稳定，使用量比较大，有待进一步研究。因而，鱼类寄生虫的生态防治方法受到了人们的普遍关注。

硬度、碱度是养殖用水的重要指标，主要对池塘养鱼生产有重要作用。碱度是反映水结合质子的能力，也就是指水中所含能与强酸发生中和反应的全部物质的量。天然水中这些物质有HCO3-、CO32-、OH-、H4BO4-、以及H2PO4-、HPO42-、NH3等，对于大多数天然水，以HCO3-和CO32-为主[101]。养鱼要有一定的碱度，碱度过高又有害，碱度能够络合重金属和一些过渡金属离子，从而降低其毒性[102]。碱度对天然水的pH起缓冲作用。另外关键因子是水体的硬度，总硬度反映的是水中二价和多价金属离子的总量，天然水的硬度主要就是由Ca2+、Mg2+离子形成的，生物不仅在一定的生活阶段对钙、镁的含量有一定的要求与适应性，并且要求有相对稳定的比例关系[103-104]. Ca2+、Mg2+离子是水生生物生长必需的营养元素，可以降低重金属离子的毒性，还可以增加水体的缓冲性。银鲶鱼在pH为8.0-8.5及硬度为30-70mg/L CaCO3中生长最好[105-106]。多种硬骨鱼种类在酸或碱性水体中，在硬水体中存在比较高的存活率[102]。而鱼在硬度为20~300 mg/L CaCO3时水体中都能暴发寄生虫病，在pH为5，水硬度为20 mg/L CaCO3时，叉尾鮰感染小瓜虫的致死率就较低[107]。饼形碘泡虫孢子对高浓度的酸性溶液忍受性强，促使孢子极丝放出与氢氧根离子的浓度有关[27]。

多子小瓜虫的生活史分成以下三阶段，即感染性幼虫（Theront），寄生的滋养体

（Trophont）和繁殖的包囊（Tomont）[108]。本论文研究了多子小瓜虫生活史的二个阶段

（感染性幼虫和包囊）在水体中的发育过程受水体理化指标的影响，采集基本一致的虫体材料，分析了其在不同的硬度和碱度下对小瓜虫包囊的形成、孵化及幼虫活力的影响。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验鱼

金鱼全长8.6±1.2cm，20尾，来自花地湾观赏鱼市场，无任何疾病的迹象，暂养在

250L的暂养桶中，自来水24小时曝气，每天按照其体重的3%投喂配方饲料，暂养一个星期之后与患小瓜虫病的金鱼混养，接种多子小瓜虫，养在50L的玻璃缸中，24小时流水曝气。

### 1.2 多子小瓜虫成虫的收集

将用成熟成虫（滋养体）的鱼用桶中的水冲洗其体表，轻轻的刮掉鱼皮肤上的白色囊泡，将囊泡连同其内的多子小瓜虫成虫收集到培养皿中，在培养皿中用无菌蒸馏水分离成虫，运动型的成虫用巴德士吸管提取，用无菌蒸馏水洗三遍，洗掉鱼碎片和除去大部分的粘液，将成虫移入另一装有无菌蒸馏水的培养皿中，用于形成包囊和孵出幼虫。

### 1.3 碱度与硬度的设置

将实验组中的pH设置为6.0, 7.5和9.0，碱度的调节用NaHCO3和HCl（1M），硬度的调节用CaCl2•2H2O. 实验设置如（表3-1），电离平衡如下：

H2CO3↔H+ + HCO3- K1=10-6.681

HCO3-↔H+ + CO3 K2=10 [DIC] =[H2CO3] +[HCO3-] + [CO32-]

2- -10.329

由此可以计算出

[H2CO3] =[DIC]×[H +] 2 / ([H+] 2 + [H+] \*K1 + K1\*K2) [HCO3-] =[DIC]×[H +] \* K1 / ([H+] 2 + [H+] \*K1 + K1\*K2) [CO3 ] =[DIC]×K 1\* K2 / ([H ] + [H ] \*K1 + K1\*K2) 碱度[ALK] = [HCO3-] + 2[CO3 ] +[OH ]

2- -

2- + 2 +

表3-1 实验水的物理化学参数

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 |  | 碱度 Alkalinity mmol/L | 硬度 Hardness mmol/L | |
|  | 设定值 | 实践值 | 设定值 | 实践值 |
| Ⅰ | 0.5 | 0.5±0.002 | 0.1 | 0.1±0.0007 |
| Ⅱ | 0.5 | 0.5±0.001 | 4.0 | 4.0±0.002 |
| Ⅲ | 2.0 | 2.0±0.05 | 2.0 | 2.0±0.007 |
| Ⅳ | 4.0 | 4.0±0.06 | 0.1 | 0.1±0.001 |
| Ⅴ | 4.0 | 4.0±0.02 | 4.0 | 4.0±0.001 |

Tab. 3-1 Physicochemical parameters of water in the experiment.

对照组为未加任何试剂的去离子水；碱度硬度设为0。

### 1.4 不同碱度及硬度对幼虫孵化的影响

将收集的成虫在不同碱度及硬度水下静置，比较在不同碱度及硬度下包囊内虫体孵出幼虫所需时间及幼虫活力和维持时间，分析确定幼虫孵化碱度、硬度和时间。

### 1.5 包囊形成的判断标准及其包囊壁厚度的测量

方法按到张其中[109]所述，成虫外有一层透明薄膜，虫体在内旋转运动，这时可认为已开始形成包囊。将包囊放在凹玻片上，用NiKon2000显微镜用测微尺测量包囊壁厚度。

### 1.6 幼虫活力判断及分级

方法按照张其中[109]所述。幼虫活力以―活力指数‖为度量标准，将幼虫向前运动速度和每秒钟旋转圈数综合定义为―活力指数‖，观察表明幼虫向前运动越快，其每秒的旋转圈 数就越多，也就是说幼虫每秒的旋转圈数反映了幼虫的活力，因此，本研究以每秒的旋转圈数来量化该参数。―活力指数‖1、2、3分别代表幼虫活力弱（幼虫平均旋转≤1圈·S -

1）、中强（1<幼虫平均旋转圈数・S -1≤3）和强（幼虫平均旋转> 3圈·S -1）。

## 2. 结果

### 2.1 病鱼症状

病鱼全身皮肤、鳍条、鳃遍布白点，游动缓慢，对外界刺激的反应迟钝，鱼体消瘦，病灶部位组织疏松，破损部位常伴有细菌和水霉继发感染（图A）。

### 2.2 多子小瓜虫孵化

成虫期的虫体又称为滋养体，主要指成熟后寄生在鱼表皮内及脱离鱼体而未形成胞囊的这段时期的虫体。刚离开鱼体的小瓜虫的身体较大，肉眼就能看到，在水体中游

动，忽急忽缓的，虫体大小一般为300～400μm×300～500μm之间（图C），当水体温度较低时，成虫就会黏附在缸低。显微镜观察，全身披有均匀的纤毛，大核呈马蹄形或香肠形（图B）。当净化的成虫形成包囊后，再放置一定的时间就会以二分裂方式形成成百上千的幼虫包在包囊内，待成熟就释放出来成为感染性幼虫（图D, E, F, G, H）。在水温为19℃±1℃条件下，多子小瓜虫分裂时间如表3-2，多子小瓜虫一般在24小时能孵化出具有感染性的幼虫。

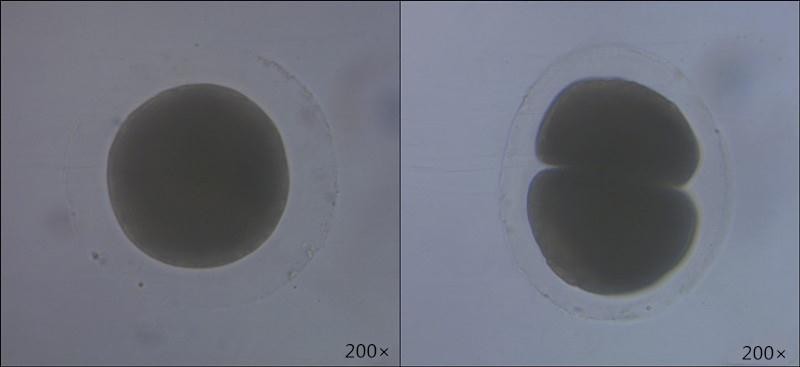
表3-2 多子小瓜虫孵化时间

Tab. 3-2 The hatching time of I. multifiliis

|  | 二分裂  Binary fission | 四分裂  Quadripar-tition | 幼虫  Theronts |
| --- | --- | --- | --- |
| 时间(h) Time | 4.85±0.785 | 5.9±1.13 | 25.5±5. 86 |

### 2.3 碱度及硬度对多子小瓜虫包囊的影响

从金鱼的体表刮取和纯化的成虫，分别放在不同碱度及硬度水体中静置培养，观察包囊形成情况，将净化的成虫放置一定时间后，发现成虫表面形成一层透明膜状物，这就是多子小瓜虫的包囊壁（图3-1）。其形成包囊壁厚度如表3-3所示，碱度硬度为去离子水时，多子小瓜虫的厚度最大，为70.5μm，当碱度硬度增加到4mmol/L时，包囊的厚



度为21.4μm。碱度为0.5mmol/L或4.0 mmol/L时，硬度增大，多子小瓜虫的包囊壁由厚变薄；同样当硬度为0.1 mmol/L或4.0 mmol/L时，碱度增大，多子小瓜虫的包囊壁也是由厚变薄。

图3-1 多子小瓜虫形成的包囊（注：粗箭头所指为包囊壁）

Pig.3-1 The cyst of *I. multifiliis* (the cyst wall pointed by a dumpy arrow)

表3-3 多子小瓜虫包囊壁厚度与碱度和硬度关系

Tab 3-3 The cyst wall thickness of I. multifiliis in different alkalinity and alkalinity of water.

| 硬度 mmol/L alkalinity | 0 | 0.5 | 0.5 | 2.0 | 4.0 | 4.0 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 碱度 mmol/L hardness | 0 | 0.1 | 4.0 | 2.0 | 0.1 | 4.0 |
| 包囊厚度 μm  Mean thickness of cyst wall | 70.5±19.7 a | 65.1±14.9 a | 23.4±2.9 b | 39.4±9.0 c | 34.4±7.5 c | 21.4±4.0 b |

### 2.4 多子小瓜虫包囊孵化所需时间及幼虫保持活力与水碱度及硬度的关系

当净化成虫放置一定时间后，就会以二分裂的方式形成成百上千的幼虫包在包囊内，待成熟就释放出来成为感染性幼虫。多子小瓜虫孵化、幼虫活力时间及幼虫活力与碱度、硬度（如表3-4）显示，在恒温15℃条件下，在不同的硬度、碱度中，多子小瓜虫幼虫孵化出来的时间不同，在硬度、碱度为0.5 mmol/L和0.1 mmol/L时，其孵化时间最短，平均为28.7 h，显著的低于其他组；在硬度、碱度为4 mmol/L和4 mmol/L时，幼虫

孵化出的时间最长，平均为33.8 h。幼虫在硬度、碱度都为0时的活力保持时间显著的低

于其他组；在硬度、碱度为0.5 mmol/L和0.1 mmol/L时，幼虫活力保持时间最长为41.8

h. 在碱度为4.0 mmol/L，硬度为0.1及4 mmol/L时，幼虫的活力指数为1，其余的活力指数为2。多子小瓜虫包囊在不同的碱度、硬度中都能孵化出来，在碱度较大的组，包囊没有完全的孵化，且在在硬度，碱度为4.0和4 mmol/L时的孵化率最低为60%左右。

表3-4 多子小瓜虫包囊孵化所需时间及幼虫保持活力与碱度和硬度关系

Tab 3-4 The relationship between both incubating time and period for keeping activity of I. multifiliis theront in different alkalinity and alkalinity of water.

| 硬度 alkalinity | 0 | 0.5 | 0.5 | 2.0 | 4.0 | 4.0 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| mmol/L |  |  |  |  |  |  |
| 碱度 hardness  mmol/L | 0 | 0.1 | 4.0 | 2.0 | 0.1 | 4.0 |
| 孵化时间（h）  Incubating time | 32.2±0.76 a | 28.7±0.58 b | 32.7±0.58 a | 33.0±1.00 a | 32.5±0.87 a | 33.8±0.76 a |
| 幼虫保持活力时间  (h)  Time of theront's keeping activity | 15.3±0.58 c | 41.8±4.85 a | 37.5±4.92 ab | 35.2±2.75 ab | 27.5±5.89 b | 33.7±2.52 ab |
| 感染性幼虫指数Activity index of theront | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 孵化率 % Hatch rate | 100 | 100 | 70 | 85 | 100 | 60 |

## 3. 讨论

### 3.1 硬度及碱度对多子小瓜虫孵化的影响

从表3-3可见，当硬度、碱度浓度在0~4 mmol/L时，随着浓度的增大，多子小瓜虫形成包囊的厚度变薄，但是孵化出幼虫及幼虫保持活力的时间，硬度及碱度对多子小瓜虫的影响不大。张其中等[109]研究发现在不同的温度下，多子小瓜虫的包囊壁厚度也不同，当温度升高时，其包囊壁厚度减小，当水温在4℃左右时，所形成的包囊壁为55μm左右，而当水温在30℃左右时，所形成的包囊壁仅为6μm厚。温度为13~20℃时，孵化的时间为19~27小时，幼虫活力指数在1~2。倪达书等[110]研究也显示在水温为15~20℃时，多子小瓜虫从包囊开始形成幼虫至破囊而出，一般须经23~25小时，本实验的温度在15℃左右，幼虫孵化出来活力与前者研究大致相似，但是其幼虫孵化出的时间与前者研究较长。房文红等[111]研究发现，碳酸盐碱度对中国对虾的毒性随着pH的增大而增大。推测影响多子小瓜虫孵化时间在水体温度之外还跟水体中的碱度有关。Garcia等[107]研究显示在pH为5，硬度在一定程度增大时，多子小瓜虫滋养体就会增多。在本研究中，多子小瓜虫包囊的孵化率随着碱度增大而降低，且包囊壁变薄、感染性幼虫指数降低，说明碱度对多子小瓜虫的孵化率有着一定的影响。

### 3.2 水体硬度及碱度对控制多子小瓜虫的探讨

不同的水生生物以及同种生物的不同发育阶段对总碱度都有一定的适应范围，硬度和碱度是影响鱼类的生长指标，且由于鱼品种以及大小的不同，对碱度和硬度的耐受范围也有一定的差异[112]。水体碱度与pH具有一定的联系，通常高碱度会伴随着高pH，而高pH也可能是由于高碱度引起的。pH是水体中水生生物重要的生长和发育因子之一，大多数鱼类的最佳适应范围为6.0—9.0，水体环境中pH的下降可能是水体中酸性阳离子的存在[113-114]，pH 的下降也能导致碱度的降低。足够的碱度值可以促进有机悬浮物及胶

体物质的絮凝，也可以中和底质中多余的有机酸以促进微生物的活动，加速有机物的分解，增强水质的肥力[102]。Ca2+，Mg2+离子是水生生物生长必需的营养元素，这两种元素是水体硬度的主要离子，过高和过低的硬度都能降低革胡子鲶卵的孵化率[115]。Garcia 等

[107]研究表明，水体中的硬度对多子小瓜虫孵化率有着一定的影响。本研究显示，多子小

瓜虫的包囊壁随着碱度、硬度的增大而厚度变薄。多子小瓜虫包囊壁上并没有出口，成熟的幼虫破囊壁而出，是成熟的幼虫一方面能分泌出一种溶化包囊的酶，使其衰弱，失去弹性，同时又利用其前方尖顶或钻孔器（perforatorioum）穿破包囊而出[110]。本研究初步表明：碱度对多子小瓜虫包囊的孵化有一定影响，碱度增加，包囊孵化率降低，感染性幼虫指数也降低，显示控制多子小瓜虫也许可以通过提高碱度而实现，但需要对碱度影响下多子小瓜虫生活史发育、感染鱼的全程进行分析，需要很多更深入的研究。

# 图版



**A**



**B**

图A. 患小瓜虫病的金鱼，箭头所示为多子小瓜虫引起的白点

Fig. A Goldfish parasitized by *I. multifiliis*, a white spot pointed with a thin arrow

图B. H&E染色多子小瓜虫，箭头所示为内核

（×200）

Fig. B *I. multifiliis* dyed by H&E, nucleus pointed with a thin arrow(×200 )



**C**



**D**

图C.多子小瓜虫，箭头所示为内核（×200）Fig. C *I. multifiliis*, nucleus pointed with a thin arrow（×200 ）

图D.多子小瓜虫二分裂（×200）Fig. D *I. multifiliis* binary fission（×200 ）



**E**



**F**

图E.多子小瓜虫四分裂（×200 ）

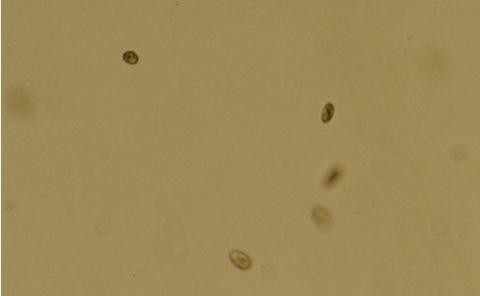
Fig. E *I. multifiliis* quaternary fission（×200 ）

图F.多子小瓜虫八分裂（×200 ）

Fig. F *I. multifiliis* eight division（×200 ）



**G**



**H**

图G.多子小瓜虫形成的包囊（×200）Fig. G Cyst of *I. multifiliis*（×200 ）

图H.孵化出的感染性幼虫（×100）Fig. H The theronts of *I. multifiliis*（×100 ）

# 第四章 温度对多子小瓜虫*HSP70*的影响

前 言

多子小瓜虫（*I. multifilii*）是一种感染淡水鱼类的重要纤毛虫，主要寄生于鱼的体表和鳃，引起―白点病‖，对鱼的种类及年龄均无严格选择性，分布很广，在世界范围内能引 起养殖鱼类的大量的死亡，在水产养殖和观赏鱼贸易中造成重大经济损失[75, 116]。多子小瓜虫的生活史分成以下三阶段，即感染性幼虫（Theront），寄生的滋养体（Trophont）和繁殖的包囊（Tomont）[117]。多子小瓜虫的幼虫阶段和包囊阶段都是在水体中完成，水温是其生存和繁衍后代最重要的因素之一。水温的变化对多子小瓜虫的包囊孵化、幼虫活力[109]、感染率[118]及繁殖率[119]都有一定的影响。多子小瓜虫分为两种型，即温带型和热带型，温带型的适宜水温为16℃，热带型多子小瓜虫在16~24℃温度范围内其感染水平随着温度的升高而升高[119]。多数研究者[2,108,120-121]认为，小瓜虫病适宜发生的水温为15~25℃，当水温在30℃左右时，多子小瓜虫包囊的存活率仅约10%，而且包囊都不能孵化[109]，因而在多子小瓜虫的防控实践中，有将水温调高到28℃以上防治小瓜虫的报道[122-124]。而也有研究者发现，多子小瓜虫在26~29℃时，小瓜虫病依然发生，能感染淡水鱼，使其发病[125]。笔者最近在养殖的过程中发现亦有多子小瓜虫在30℃左右水温时仍大量感染草鱼的现象。因此揭示在高温环境中多子小瓜虫感染和存活的生理机制成为寄生虫防治中迫切需要解决的问题。张其中等[109]的研究表明，水温在4℃左右或28~32℃，多子小瓜虫都不能孵化，但有少部分虫体以包囊形式存活下来，推测温度降到适宜时，包囊能孵化为幼虫，为再次暴发小瓜虫病的根源。但多子小瓜虫高温应激的分子机制仍未见研究。

热激蛋白（Heat-shock proteins, HSPs）是生物适应环境温度变化的重要媒介分子，过高或过低的温度都会诱导细胞或机体产生应激反应，迅速合成HSP作为分子伴侣参与蛋白质的合成、折叠、装配、运转和降解等过程，以维持细胞蛋白自稳，提高细胞对应激源的耐受性，增强抗氧化作用，使细胞维持正常的生理功能[126-127]. HSP70为HSPs中最保守、最重要的**一**簇，其在大多数生物中含量最多，在应激反应中最敏感[128]，在调节细胞凋亡[129-130]、细胞衰老[131-132]及生育[133]过程中都起重要的作用。

研究表明，环境温度升高时，可以增强HSP70的表达，进而促进细胞的存活，抑制细胞凋亡[134]。当温度升高时，嗜热四膜虫（*T. thermophila*）在生长、饥饿和接合生殖3种生理发育状态下，*HSP70*基因的表达水平随温度的升高而增加[127]。同样，用*HSP70*可以检测不同地域生物的耐热能力[126]。选用保守的*HSP70*作为分子标记来研究同种生物在不同温度诱导下的表达变化规律，可以更好地认识物种耐热的机制。本研究克隆了寄生于草鱼的多子小瓜虫*HSP70*基因的ORF，并研究了多子小瓜虫在3种不同温度下发育，

*HSP70*基因在幼虫、滋养体和包囊3个不同阶段的表达情况，旨为在分子水平探讨多子小瓜虫温度适应的机理提供方法和依据。

## 1. 材料和方法

### 1.1 多子小瓜虫来源

寄生有多子小瓜虫的草鱼（*Ctenopharynodon idellus*）来源于广东省清远市某草鱼苗种场，苗种场的水温为29±3℃，草鱼体长8.5±0.53cm，体重13.35±2.51g。运回实验室暂养于用活性碳除氯后的自来水中，水温设置为25±1℃。

### 1.2 试验鱼

RR-B系剑尾鱼（*Xiphophorus hellerii*），体长5.64±0.41cm，体重6.05±2.12g，来源于珠江水产研究所水生实验动物研究中心，120尾，分别养在0.1m3的除氯水的小池中适应5 d。再与寄生有多子小瓜虫的草鱼，在不同温度（20±1℃、25±1℃、30±1℃）的除氯水中混养，1尾携带多子小瓜虫的草鱼混养5~8尾剑尾鱼。

### 1.3 不同温度下多子小瓜虫成虫、包囊和幼虫的获得

取被多子小瓜虫严重感染的剑尾鱼（体表有很多的白点），轻轻刮起鱼体表面，将一定量的水连同多子小瓜虫滋养体倒入培养皿中，轻轻转动培养皿，用吸管将集聚在中央的滋养体吸到另一个培养皿中，用蒸馏水反复清洗3次，直至除去大部分粘液。将滋养体移入装有灭菌蒸馏水的离心管中，参照张其中等[109]方法将收集的滋养体分别在恒温中（20±1℃、25±1℃、30±1℃）用于形成包囊和孵化出幼虫。分别将不同温度下得到的多子小瓜虫滋养体、幼虫和包囊富集于离心管底部，每个样品加入1 mL的TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), -70℃保存。

### 1.4 *HSP70*的克隆与表达

（1）引物设计根据GenBank中已报道的纤毛类嗜热四膜虫（*T. thermophila*, GeneBank: JQ697041）, 螅状独缩虫(*Carchesium polypinum*, GeneBank: AY561304) *HSP70*的mRNA序列，将该基因在多子小瓜虫基因组数据库ImDB（[www. ich. ciliate. org/blast/](http://www.ich.ciliate.org/blast/)）进行 BLAST 比对，找到同源序列，再把获得的序列通过NCBI

（[www. ncbi. nlm. nih. gov/Blast/）中进行再次比对确认，得到多子小瓜虫*HSP70*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/%E9%94%9B%E5%A4%89%E8%85%91%E6%9D%A9%E6%B6%9C%EE%94%91%E9%8D%90%E5%B6%86%EE%82%BC%E5%A7%A3%E6%96%BF%EE%87%AE%E7%BA%AD%EE%86%BF%EE%85%BB%E9%94%9B%E5%B1%BD%E7%B7%B1%E9%8D%92%E6%9D%BF%E7%9A%AC%E9%90%A1%E6%BB%86%E6%AB%95HSP70)的预测基因序列，用Primer Premier 5.0软件设计引物PCR扩增*HSP70*基因的ORF，引物为F1:5'- ATGGCTTCTGAAAAAAAATACG -3'和R1:5'- TCAATCTACTTCATCGACATTAGAG -

3'；利用Beacon Designer 8.0软件设计*HSP70*特异引物(F: 5'- ACTACACTTATTCGGTCAGA -3'; R: 5'- CATATTCTTCAGGTTCAGCAT -3')进行实时荧

光定量PCR扩增，18SRNA作为内参基因，引物分别IMRf1 (5'- AGTGACAAGAAATAGCAAGCCAGGAG-3')和IMRr1 (5'-ACCCAGCTAAATAGGCAGA AGTTCAA-3')[117]。

（2）总RNA提取对保存样品进行总RNA的提取，方法参照TRIzol Reagent说明书，

1）每个组织加入1ml Trizol试剂，采用匀浆器进行匀浆处理，室温放置5min，使核酸蛋白复合物完全分离。

2）加入0.2ml的氯仿，立即剧烈震荡15s，并将其在室温下放置2-3min。

3）4℃12000g离心15min，样品分为三层，底层为红色有机相，上层为水相和一个中间相。RNA主要在水相中。

4）小心移取0.3ml的水相到新的1.5ml无RNA酶离心管中，加入等体积的异丙醇沉淀水相中的RNA，室温放置10min。

5）4℃12000g离心10min，倒掉上清。

6）加入预冷的1ml 70-80%乙醇洗涤RNA沉淀。

7）4℃7500g离心5min，倒掉上清。

8）室温放置干燥RNA，加入25ul无RNA酶水，溶解RNA, RNA立刻进行反转录或者保存在-80℃。

9）提取的RNA/DNA样品用AG22331 Hamburg核酸蛋白分析仪（德国Eppendorf）测定其浓度和OD260/OD280比值，再用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的DNA的降解程度以及纯度，将高质量的总RNA保存于-70℃备用。

（3）RNA反转录成cDNA取1μg的总RNA通过Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit（Roche, Germany）进行cDNA第一链的合成。

1）去除总RNA样品中的基因组DNA污染：按到以下反应体系在RNase- free 的

PCR离心管中添加试剂，混匀，短暂离心。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量（µL） |
| Dnase I | 1 |
| Dnase I buffer  DNA inhibitor | 1  0.5 |
| Total RNA | 1 |
| RNase-ree H2O | To 11 |

反应程序：37℃中孵育30 min，然后每个反应体系中加1µL EDTA (25 mM)，在

65℃孵育10 min，再在各个反应体系中加入1µL Oligo(dT) 20(10pmol/µL) 1µL，继续在

65℃孵育10 min。

2）cDNA合成：具体操作步骤如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量（µL） |
| 第（1）步变性的 RNA 溶液 | 13 |
| 5× RT Buffer  Rnase Inhibitor (10U/µL) | 4  0.5 |
| dNTP Mixture (10 mM) | 2 |
| Transcriptase | 0.5 |

按以下反应体系（20µL）添加试剂，混匀，短暂离心。

反应程序：25℃，10 min；55℃，30 min；85℃，5 min。得到的cDNA模板-20℃保存，备用。

（4）基因片段的PCR扩增利用反转录得到的cDNA样本为模板，按以下PCR反应体系（50µL）添加试剂，混匀，短暂离心。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量（µL） |
| 5×Phusion HF Buffer | 10 |
| DNTP Mixture (10 mM) | 1.0 |
| 上游引物 P1 (20 μM) | 1.0 |
| 下游引物 P2 (20 μM) | 1.0 |
| Phusion DNA polymerase(50U/µL) | 0.5 |
| 模板 cDNA | 0.2 |
| DdH2O Total | 36.3  50.0 |

PCR反应程序为98℃预变性3 s，94℃变性10 s，60℃退火30 s，72℃延伸2min，

33个循环，最后72℃延伸7 min. PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测，用PCR琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段，-20℃保存备用。

（5）纯化PCR产物使用E. Z. N. ATM Gel Extraction Kit（Omega公司）纯化PCR产物，按照试剂盒说明书进行，具体操作步骤如下：

1）用TAE（5×）缓冲液按常规方法制备浓度为2%（w/v）的琼脂糖凝胶

2）将PCR产物与上样缓冲液混匀加入点样孔中，120V电压，常温下电泳约25

min。

3）用紫外灯观察DNA带迁移位置，当目标带分离清楚时，在凝胶成像仪中用干净刀片将所需DNA目的片段凝胶条带切下，放入1.5mL离心管中。

4）称取空离心管的重量，切下带目的片段的凝胶放入1.5mL离心管中。并称其总重量，近似确定凝胶的体积。一般情况下，凝胶密度为1g/mL，于是凝胶体积与质量的关系可按下面的方法换算：0.1g胶块重=0.1 mL胶体积。

5）加入等倍凝胶体积的Binding Buffer（XP2），

6）把混合物置于55℃-65℃水浴中温浴7min至胶块完全融化，其间每隔2-3min振荡离心管一次，使胶块充分融化。

7）将HiBind DNA柱子安置在2 mL的收集管中。将胶溶解液加到HiBind DNA柱子中，室温下，10,000×g离心1min，弃滤液。如果DNA-琼脂糖混合物的体积大于700μL，可先转移700μL溶液进行过柱，然后再将余下的溶液过柱。

8）将柱子重新套回收集管中，加入300μL Binding Buffer（XP2）至HiBind DNA柱子中；室温下，10,000×g离心1min，倒掉滤液。

9)重新将柱子套回收集管中，加入700μL SPW Wash buffer至HiBind DNA柱子中，室温下10，000×g离心1min，弃滤液。

10）重复步骤（9）一次。

11）将空柱子重新套回收集管中，10,000×g离心2min以甩干柱基质残余的液体。

12）把柱子装在一个新的1.5mL离心管上，加入30μL洗脱液或灭菌水至柱子中，

10,000×g离心1min，收集洗脱液，保存于-20℃备用。

（6）PCR纯化产物的克隆

1）按到pMD 18-T Vector（TaKaRa, Dalian）试剂盒说明书进行，其反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量（µL） |
| PMD 18-T Vector | 1.0 |
| PCR 纯化产物 | 4.0 |
| Solution I Total | 5.0  10 |

反应产物混匀后于16℃连接过夜。

2）将50μL感受态细胞（*E. coli* DH5α）加入盛有连接产物的离心管中混匀，冰浴

30min，42℃热激90s后，迅速将其置于冰上2-3min。

3）将400μL LB培养基（无抗生素）加入离心管，37℃摇床中，120 rpm振荡培养

### 1.5 h。

4）取200μL转化菌液均匀涂布于LB固体平板（Amp+）上，37℃过夜培养。

（7）阳性菌落检测及测序

1）挑取过夜培养的LB平板上的单菌落于LB液体培养基（Amp+），37℃摇床中，

120 rpm振荡培养过夜。

2）进行菌液PCR检测，鉴定含插入片段的菌株，按菌液PCR反应体系（25µL）添加试剂，混匀，短暂离心：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量（µL） |
| ddH2O | 17.25 |
| 10×PCR Buffer （Mg2+ PluS） | 2.5 |
| DNTP Mixture (10 mM) | 2.0 |
| 上游引物 P1 (10 mM) | 1.0 |
| 下游引物 P2 (10 mM) | 1.0 |
| Taq 酶（50U/µL） | 0.25 |
| 模板 cDNA | 1.0 |

|  |  |
| --- | --- |
| Total | 25.0 |

反应条件：94℃预变性3 min，94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸2min（，

33个循环，最后72℃延伸7 min。

3）挑选3个阳性克隆送生工生物工程股份有限公司进行测序。

（8）序列分析

用BLAST程序[(http: //blast. ncbi. nlm. nih. gov/Blast. cgi)](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))对测序结果进行同源性检索。使用在线软件SMART [(http: //smart. embl](http://smart.embl-heidelberg.de/))-[heidelberg. de/)](http://smart.embl-heidelberg.de/))对氨基酸序列进行结构和功能域分析。蛋白质的二级结构经predictprotein (https: //[www. predictprotein. org/)](http://www.predictprotein.org/))进行在线预测, 3-D结构利用Swiss-model ([http: //swissmodel. expasy. org/)](http://swissmodel.expasy.org/))服务器进行预测。使用Clustal W软件将克隆的多子小瓜虫及其它物种*HSP70*基因的氨基酸序列进行多重比对，然后用MEGA 4.1软件构建NJ系统发育树。

（9）荧光定量RT-PCR

实时定量PCR检测各基因在各样品中的表达量。反应体系（20μL）如下：10μL SYBR®Premix Ex TapTM (Takara, Dalian), 0.4μL ROX Reference Dye (Takara, Dalian)，引物各0.4μL, cDNA 1μL, ddH2O 7.8μL；反应程序为95℃，30 s；95℃5 s，60℃31 s，72℃30s, 40个循环；95℃15 s，60℃30 s，95℃15 s。

以各温度点的幼虫、滋养体和包囊的cDNA为样品，每个样品设置3个平行样，用实时荧光定量PCR扩增仪7300测定目的基因的丰度，应用2-△△CT分析方法，通过

ABI7300系统初步统计，用SPSS 17.0进行差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 多子小瓜虫HSP70基因ORF序列分析

以多子小瓜虫滋养体cDNA为模板，采用引物F1和R1, PCR扩增得到一条1995 bp的条带，符合预期大小。经BLAST比对及开放阅读框（ORF）分析后，确认该序列为多子小瓜虫*HSP70*的ORF（GenBank登录号: KF626379）；将其与多子小瓜虫基因组序列比对，发现Im *HSP70*无内含子，ORF全长为1995 bp，预测编码664个氨基酸，理论分子量和等电点为72.51 kD和5.42。正电荷残基(Arg+Lys) 85个，负电荷残基(Asp+Glu) 112个，整个蛋白质带-27价电荷，为膜外蛋白。

经predictprotein分析，Im HSP70的二级结构以α-螺旋和无规卷曲为主（图4-1）；经Swiss-model及SMART预测分析，Im HSP70蛋白的空间结构在N段含有一个高度保守的

ATP酶功能域，C段含有一个高度保守的多肽结合功能域（图4-2,4-3）。



图4-1 Im HSP70蛋白分子的二级结构预测图

菱形为蛋白结合区域、红色方框为α-螺旋、蓝色方框为β-折叠，其余为无规卷曲Fig 4-1 Secondary structure prediction of the deduced HSP70 from *I. multifiliis.*

Rhombus as Protein binding region、red box asα- helix、blue box asβ-sheet、other as randon coil



图4-2 Im HSP70蛋白分子功能域预测图

Fig 4-2 Domains of deduced HSP70 from *I. multifiliis.*



图4-3 Im HSP70蛋白分子三级结构预测图

绿色表示ATPase domain, 粉红色表示peptide-binding domain, 橙色表示C-terminal subdomain Fig 4-3 Tertiary structure of the deduced HSP70 from *I. multifiliis*

Green as ATPase domain, pink as peptide-binding domain, orange as C-terminal subdomain

表4-1. Im HSP70氨基酸序列与其他物种相似性

Tab 4-1 Identity of HSP70 amino acid of *I. multifiliis* and other species

| 物种名  Species name |  | 登录号  GenBank Accession no. | 相似性  Identity |
| --- | --- | --- | --- |
| 螅状独缩虫 | Carchesium polypinum | AAS68531 | 78.08% |
| 变藓棘毛虫 | Sterkiella histriomuscorum | AED86994 | 73.77% |
| 嗜热四膜虫 | Tetrahymena thermophila | AAK29100 | 69.00% |
| 捻转血矛线虫 | Haemonchus contortus | AEO14648 | 68.73% |
| 指状腹腔丝虫 | Setaria digitata | AAD13154 | 68.68% |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 旋毛形线虫 | *Trichinella spiralis* | AAO63753 | 67.83% |
| 原鸡 | *Gallus gallus* | AAN18282 | 67.82% |
| 斑马鱼 | *Danio rerio* | AAH5656709 | 67.65% |
| 底鳉 | *Fundulus heteroclitus* | ABB17041 | 67.24% |
| 小家鼠 | *Mus musculus* | NP\_034609 | 66.46% |
| 果蝇 | *Drosophila melanogaster* | NP\_731651 | 62.15% |
| 光滑爪蟾 | *Xenopus laevis* | CAA25576 | 66.31% |
| 人类 | *Homo sapiens* | NP\_005518 | 66.15% |
| 小腔游仆虫 | *Euplotes aediculatus* | AAC33421 | 57.31% |
| 草履虫 | *Paramecium tetraurelia* | AAC33429 | 56.86% |

### 2.2 同源性及系统进化分析

将得到氨基酸序列与GenBank中其他寄生虫比较，并通过软件Clustal W计算同源性。结果显示Im HSP70与其他物种的相似性为54.94%～78.08%（表4-1），其中与螅状独缩虫相似性最高（78.08%）。将上述比对结果用MEGA 4.1软件，NJ法重复1 000次构建bootstrap验证的系统发育树（图4-4）。结果显示：哺乳类、两栖类、爬行类、鸟类聚在一个分支，无脊椎动物果蝇（*D. melanogaster*）、旋毛形线虫（*T. spiralis*）等聚在另外一个分支；纤毛类的螅状独缩虫(*C. polypinum*)、多子小瓜虫（*I. multifiliis*）、嗜热四膜虫(*T. thermophila*)、变藓棘毛虫(*S. histriomuscorum*)聚在一个分支。



图4-4 Im HSP70与其他物种HSP70的系统进化树

Fig. 4-4 Phylogenetic tree of HSP70 from*I. multifiliis* and other species

其物种分别为：人(*H. sapiens*),家鼠(*M. musculus*), 光滑爪蟾(*X. laevis*), 原鸡(*G. gallus*), 斑马鱼

（*D. rerio*）, 底鳉(*F. heteroclitus*), 果蝇(*D. auraria*), 旋毛形线虫(*T. spiralis*), 捻转血矛虫(*H. contortus*), 指状腹腔丝虫(*S. digitata*)，螅状独缩虫(*C. polypinum*), 多子小瓜虫（*I. multifiliis*）, 嗜热四膜虫(*T. thermophila*), 变藓棘毛虫(*S. histriomuscorum*), 日本血吸虫(*S. japonicum*), 草履虫(*P. tetraurelia*), 游仆虫(*E. aediculatus*)

### 2.3 不同温度下IM HSP70 MRNA不同发育阶段的相对表达水平的比较

实时荧光定量PCR分析多子小瓜虫*HSP70*基因分别在20℃、25℃和30℃的3个不同发育阶段（幼虫、滋养体和包囊）中的相对表达量，结果显示*HSP70*基因在20℃和25℃时，在滋养体表达量最高，其次是包囊，在幼虫中表达量最低；在30℃时，包囊中表达量最高，滋养体其次，幼虫中最低（图4-5）。三个阶段表达量最大的为25℃滋养体中*HSP70*的表达量，分别是其幼虫、包囊的179和54倍。

分别对多子小瓜虫幼虫、滋养体和包囊在20℃、25℃和30℃的表达情况进行分析，发现幼虫中*HSP70*基因在30℃时表达增强，分别是25℃和20℃的1.75倍和1.28倍；滋养体中*HSP70*的表达量在25℃时增强，在30℃时降低，呈先升再降趋势；*HSP70*在包囊中呈现先降后升趋势，在25℃时表达量降低，30℃时表达量升高。



图4-5 小瓜虫不同阶段*HSP70* mRNA在不同温度下的相对表达量不同字母表示同组内差异显著（P <0.01)。

Fig 4-5 Relative expression levels of Im*HSP70* mRNA in *I. multifiliis*' different stages of different

temperature.

Different letters indicate significant differences(P<0.01).

## 3 讨论

有研究表明，*HSP70*可能是寄生虫-宿主相互作用的一个重要的分子[135]。HSP70的存在，可以促进感染的宿主细胞成为自然杀伤细胞（NK-cell）介导毒性的靶细胞[136] 。

HSP70的家族中，共有21种蛋白质，主要包括诱导型HSP70、热激同源蛋白70（heat shock cognate 70, HSC70）、葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein78, GRP78)、葡萄糖调节蛋白75等[137]，其中诱导型HSP70基因的一个显著特征是不含内含子[138]。本次克隆到多子小瓜虫*HSP70*基因的ORF与多子小瓜虫基因组序列比对发现，多子小瓜虫

*HSP70*基因不含内含子，克隆出来的可能属于诱导型*HSP70*基因。冯立芳等[127]克隆出嗜热四膜虫的*HSP70*基因，明建华等[139]克隆出的团头鲂*HSP70*基因也验证了这个特征。

ImHSP70蛋白的二级结构主要以α-螺旋和β-折叠为主，这跟脊椎动物HSP70的相似

[140]. 同源性分析表明，多子小瓜虫HSP70与其它原生动物HSP70的氨基酸序列相似性高，与同为纤毛门的螅状独缩虫、嗜热四膜虫、变藓棘毛虫聚在一个分支上，而与哺乳类、鸟类等相距甚远，说明根据HSP70序列分析的结果与传统的分类结果是一致的。而冯立芳等[127]克隆出嗜热四膜虫的5个*HSP70*，编码序列各不相同；Raphaela等[141]分析发现，*HSP70*家族中有着不同的基因型成员，说明*HSP70*具有多态性，而且在功能上也是有差异的。多子小瓜虫*HSP70*是否存在其他的型，还有待进一步的研究。

多数寄生虫生活史复杂，具有不同的发育阶段。*HSP70*基因在不同发育阶段的表达量是否有差异，是人们感兴趣的问题，也是揭示寄生虫抵抗不同环境条件而生存的关键。前人的研究表明，在寄生虫的不同发育阶段，*HSP70*的表达存在差异。del Cacho 等

[142]对柔嫩艾美耳球虫（*Eimeria tenella*）的研究发现，在球虫的发育、成熟和入侵过程中，孢子生殖阶段的*HSP70*表达量呈递增水平，利用*HSP70*的特异性单克隆抗体通过免疫组化等技术分析显示，*HSP70*表达于孢子形成阶段；*HSP70*出现在早期感染阶段可能与虫体在宿主体内受到的应激有关，也可能与子孢子的形成有关。Neumann等[143]对曼氏血吸虫（*Schistosoma mansoni*）在不同发育阶段的*HSP70*研究发现，*HSP70*只表达于胞蚴、童虫和成虫，在尾蚴中不表达，在胞蚴和尾蚴的转型期*HSP70*转录终止；但尾蚴转化为童虫和成虫受42℃热应激处理后，*HSP70*表达升高，6 h达到最高水平。冯立芳等[127]的研究也发现嗜热四膜虫在接合生殖等生理或发育状态下，*HSP70*的表达量也是不同的。与其结果相似的是，本研究通过对三种不同温度下，多子小瓜虫的三个发育阶段的*HSP70* mRNA的表达量研究发现，幼虫、包囊和成虫三个不同的发育阶段，*HSP70*表达量显示出显著的差异，而且在幼虫阶段表达量最低。Abernathy等[144]等利用多子小瓜虫表达序列标签信息比较发现，多子小瓜虫在幼虫、滋养体、包囊的转录因子包括固定抗原和表质蛋白均表达不同。Yi等[145]发现木兰科植物厚朴（*Magnolia officinalis*）和槐属植物苦豆子（*Sophora alopecuroides*）的甲醇提取物对小瓜虫幼虫有着很强的杀灭活性，且提取物对幼虫阶段的毒力要显著强于包囊阶段；Ling等[146]也得出同样的结论。本研究结果表明多子小瓜虫在幼虫阶段*HSP70*的表达量低，可能与不同生活史阶段有关。

多子小瓜虫对温度的耐受性存在着明显的差异，被分为温带型和热带型[119]。冯立芳等[126]对螅状独缩虫耐热能力研究发现，不同纬度地域的螅状独缩虫，其*HSP70*高表达的阀值也是不同的。本研究的多子小瓜虫来源于水温为29℃的感染草鱼，显示多子小瓜虫在29℃仍对草鱼具有致病性，推测该多子小瓜虫为热带型。del Cacho等[147]对柔嫩艾美耳球虫（*Eimeria tenella*）的野生株和2种早熟株的子孢子阶段的*HSP70*表达研究发现，随着虫株毒力减弱其子孢子的*HSP70*表达水平呈递减趋势，表明*HSP70*在柔嫩艾美耳球虫子孢子的表达与其致病性相关。*HSP70*在不同的生物中作为一种抗应激相关因子，当受到外界刺激时，以合成表达HSP70来提高自身的抵抗力。本研究中剑尾鱼在30℃水温中仍能感染上多子小瓜虫，可能是多子小瓜虫与其高表达的*HSP70*可能有一定的关系。随着孵育温度的升高，在滋养体中的表达量先上升后降低，在包囊中的表达量先降低后上升。多子小瓜虫受到热刺激时，*HSP70*mRNA转录水平随之出现明显的增加。而当热刺激超过HSP70蛋白的耐受能力范围，高HSP70的表达量可能反馈调节抑制*HSP70*基因的表达[148]。多子小瓜虫的幼虫和包囊阶段是生活在水体中，包囊的形成是多子小瓜虫对不良环境一种很好的适应性，而幼虫却没有这种保护机制，这也可能是包囊与幼虫*HSP70*表达量不同的原因之一。水温30℃，滋养体中*HSP70*也有一定的表达量，说明在30℃时多子小瓜虫滋养体仍具有生物活性。而在包囊中*HSP70*表达量显著高于滋养体和幼虫，说明包囊的形成有利于抵抗高温的环境。*HSP70*在包囊中的大量表达也许是多子小瓜虫病在大约30℃的高温时，仍能暴发的重要分子机制。所以，有必要对不同温度型的多子小瓜虫在不同温度下以及不同型*HSP70*在耐热机制中的功能作进一步的探讨。

全文总结与展望

本文本文对草鱼集约化养殖的广东省清远市清新县地底下村养殖场、中ft市广成围养殖场2个场及草鱼散养的广州市西朗养殖池塘草鱼寄生虫病进行了初步的调查；分析了草鱼常见寄生虫：车轮虫、指环虫及肠道绦虫与池塘水生态因子水温、pH、氨氮、亚硝酸、硬度、碱度及纤毛类原生动物数量之间的相关性；研究了在散养条件下，草鱼鳃上指环虫的寄生动态特征；分析了硬度、碱度对多子小瓜虫孵化及活力的影响；成功克隆一株耐高温多子小瓜虫的热激蛋白70基因，研究了在三个不同的温度下，多子小瓜虫在三个不同的发育阶段*HSP70*基因的表达。主要结果如下：

1. 清远市养殖草鱼鳃上车轮虫与纤毛类原生动物量的Spearman相关系数为0.775，有着显著的相关性；广州养殖池塘鳃上车轮虫在调查期间与水体温度有着显著的负相关性；散养的草鱼鳃上指环虫感染率高，且在宿主种群中呈聚集分布，鳃上指环虫感染率与水温，pH值、水质综合指数、总碱度、总硬度和纤毛类原生动物量并没有显著的相关性。草鱼鳃上指环虫右侧第1对鳃片丰盛度小于左侧的外，其余的都大于左侧鳃片上的丰盛度。

2. 多子小瓜虫在水体硬度和碱度都为0 mmol/L时，包囊壁的厚度最大，当硬度和碱度增大到4 mmol/L时，包囊壁厚度显著性的变薄。多子小瓜虫包囊在硬度、碱度分别为

0.5 mmol/L和0.1 mmol/L的孵化时间最短；幼虫保持活力时间在硬度、碱度分别为 0

mmol/L组显著的低于其他组；其次是硬度、碱度分别为4mmol/L和0.1 mmol/L组。

3. 从一株耐高温的多子小瓜虫种克隆出*HSP70*基因的ORF序列，运用生物信息学方法从核酸和蛋白水平综合分析了*HSP70*基因的分子组成、结构特征和功能位点等。系统发育分析，Im HSP70与分类地位同为纤毛门的螅状独缩虫、嗜热四膜虫（Tetrahymena

thermophila)、变藓棘毛虫(Sterkiella histriomuscorum)的HSP70聚在一个分支。

4. 采用荧光定量RT-PCR检测了多子小瓜虫在三种不同温度中（20℃、25℃和30℃），Im HSP70基因在三个不同发育阶段（幼虫、滋养体和包囊）的表达量情况。结果显示，幼虫在3种温度下表达量均最低；在20℃和25℃时，滋养体中的表达量高于幼虫和包囊；而在30℃时，包囊中的表达量高于滋养体和幼虫；幼虫和包囊在30℃时的表达量均高于25℃。

总结已有的实验结果，在未来可以从以下方面进行研究：

1. 进一步对草鱼寄生虫与生态因子关系进行研究，特别是水体中纤毛类原生动物种类及数量对寄生虫动态变化的影响。深入研究在池塘养殖系统中，水体中硬度、碱度对池塘寄生虫动态的影响，对水体硬度、碱度影响较大的元素，例如钙离子和镁离子进行定量性的研究。

2. 进一步对耐高温的多子小瓜虫热激蛋白基因研究，弄清在相对较高温度中暴发的原因，同时用温带型的多子小瓜虫进行一个系统性的比较。

参考文献

[1] 2011年渔业统计年鉴

[2] 2012年渔业统计年鉴

[3]杨凯，冯守明. 水产养殖动物寄生虫及环境的相互关系[J]. 天津农林科技, 2009，(2)：4～6

[4]战文斌. 水产动物病害学[M]. 北京：中国农业出版社，2004. 6～35.

[5]张剑英，邱兆祉，丁雪娟等. 鱼类寄生虫与寄生虫病[M].北京：科学出版社，1999: 6～10

[6]黄凌风，汪文澜，林施泉，潘科，贾晓燕，朱致盛. 温度对一种海洋微型异养鞭毛虫生长影响的初步研究

[J].寄生虫与医学昆虫学报，2010, 17(1)：10～15.

[7] Aihua L, Buchmann K. Temperature- and salinity-dependent developpment of a Nordic strain of Ichthyophthirius multifiliis from rainbow trout[J]. Applied Ichthyology. 2001, 17(6): 273～276.

[8] Martins ML, Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish Ictalurus punctatus vaccinated with live therontsof Ichthyophthirius multifiliis[J]. Fish & Shellﬁsh Immunology, 2011, 31(6): 774～780.

[9] Chris A. Population dynamics of Gyrodactylus sp. (Monogenea) infecting the sand goby in the Oslo Fjord, Norway[J]. Journal of fish biology, 1996, 49(3): 402～410.

[10] Khidr AA. Population dynamics of Enterogrus cichidarum (monogenea: Ancyrocephalinae) from the stomach of Tilapia spp. in Egypt[J]. International Journal for Parasitolgy, 1990, 20(6): 741～745.

[11] Eure H. Seasonal abundance of Neoechinorhynchus cylindratus taken from largemouth bass (Micropterus salmoides) in a heated reservoir[J]. Parasitology, 1976, (73): 353～370.

[12] 王方华, 邹为民, 李安兴. 广东贺江水域野生鲮鱼体表寄生虫典型海弯水虱的种群动态[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 407～415.

[13] Anderson PS, Buchrnann K. Temperature dependent population growth of Gyrodactylus derjavini on rainbow trout, Oncorhynchus mykiss[J]. Journal of Helminthology, 1998, 72(1): 9～14.

[14] Garrido OL, Arita HT, Perez PDLG. The influence of host ecology and biogeography on the helminth species richness of freshwater fishes in Mexico[J]. Parasitology, 2012, 139(12): 1652～1665.

[15] Akoll P, Fioravanti ML, Konecny R, Schiemer F. Infection dynamics of Cichlidogyrus tilapiae and C. sclerosus (Monogenea, Ancyrocephalinae) in Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.) from Uganda[J]. Journal of Helminthology, 2012, 86(3): 302～310.

[16] Wootten R. Observations on strigeid metacercariae in the eyes of fish from Hanningfield reservoir, Essex, England[J]. Journal of Helminthology, 1974,48(1):73～83.

[17] Mdegela RH, Omary AN, Mathew C, Nonga HE. Effect of Pond Management on Prevalence of Intestinal Parasites in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) under Small Scale Fish Farming Systems in Morogoro, Tanzania[J]. Livestock Research for Rural Development, 2011, 23(6):127.

[18] 孙军.复口吸虫的研究进展[J].生态科学，2005，24(2)：168～172.

[19] Blasco-Costa I, Koehler AV, Martin A, Poulin R. Upstream-downstream gradient in infection levels by fish parasites: a common river pattern[J]. Parasitology, 2013, 140(2):266～274.

[20] LucaíCañás, Paz Sampedro, A. Celso Fariña, Jorge Landa. Spatial, temporal and bathymetric distribution patterns of the parasite Chondracanthus lophii of anglerfish, Lophius piscatorius, in the northeast Atlantic[J].

Marine Biology Research,2013, 9(2):145～156

[21]聂品. 对鲇鱼鳃部寄生的固着鳋的生态研究[J]. 水生生物学报, 1998, 22(1)：48～53.

[22]习丙文，王桂堂，吴ft功，高典，邹红，姚卫建，聂品. 丹江口水库马口鱼肠道寄生蠕虫群落结构[J].水生生物学报, 2009, 33 (2)：177～182.

[23] Alam MM, Khan MA., Hussain MA, Moumita D, Mazlan AG, Simon KD. Intensity of parasitic infestation in silver carp, Hypophthalmichthys molitrix[J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2012, 13(12):1024～1028.

[24]杨延宝. 青海湖鱼类寄生棘头虫在宿主肠中的位置选择[J]. 中ft大学学报（自然科学版）, 1995, 34(2):79～83.

[25] Karvonen A, Rintamäki P, Jokela J, Valtonen ET. Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases[J]. International Journal for Parasitology, 2010, 40(13):1483～1488.

[26] Praso L, Cartagena AS. Controlling growth or reproduction or removal of larval marine zooplankton comprises binding to surfaces immersed in sea water without physical contact, and applying ultrasonic waves under water. CL, WO2012027859-A1[P].2010.9.1.

[27]陈信廉， 邹为民. 几种因子对草鱼饼形碘泡虫离体孢子影响的试验[J]. 动物学杂志，1994，

29(4):17～19.

[28]王忠华，张辰仓，王印庚. 海水网箱养殖鱼类刺激隐核虫病的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(12)：45~46

[29] Dickerson HW, Lohr AL, Gratzek JB. Experimental intraperitoneal infection of channel catfish,

Ictalurus punctatus (Rafinesque), with Ichthyophthirius multifiliis (Fouquet) [J]. Fish diseases, 1985, 8(1):139～142.

[30] Reichenbach-Klinke H, Landolt M. The principal diseases of lower vertebrates[M]. Now York: academic press. 1965.

[31] Garcia F, Fujimoto RY, Martins ML, Moraes FR. Protozoan parastites of Xiphophorus spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics[J] Arquivo Brasileiro de Medicina Veterináriae Zootecnia, 2009, 61(1): 156～162.

[32] Whittington ID, Ctibb BW, Hamwood TE, Halliday JA. Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas[J]. International Journal for Parasitology, 2000,30(3):305～320.

[33]陈添铮. 福建罗源湾海区刺激隐核虫发生周年变化以及与水质因子的相关性研究[J].广州农业科学, 2012, 39(13)：174~176.

[34]沈旭明， 汤敏. 低浓度氯化钠溶液对淡水鱼类抗病机理的探讨[J]. 江苏教育学院学报（ 自然科学），

2011, 27(4):33～35.

[35] Charlie M, Rowland SJ. Use of salt to control ichthyophthiriosis and prevent saprolegniosis in silver perch, Bidyanus bidyanus [J]. Aquaculture Research, 2008, 39(1):1175～1180.

[36] Silva AL da, Alves FCM., Talmelli EF de A, Ishikawa CM., Nagata MK, Rojas NET. Utilization of sodium chloride, formalin and the association of these products in the control of ectoparasites in tilapia (Oreochromis niloticus) larve[J]. Boletim do Instituto de Pesca, 2009, 35(4): 597～608

[37]闫茂仓，邵鑫斌，单乐州， 谢起浪. 福尔马林防治鮸鱼Miichthys miiuy(Basilewsky)刺激隐核虫

（Cryptocaryon irritans）的研究[J].现代渔业信息，2008，23(11)：16~19.

[38] Marcogliese DJ, Cone DK. On the Distribution and Abundance of Eel Parasites in Nova Scotia: Influence of pH[J]. parasitology, 1996,82(3):389～399.

[39] Xu DH, Craig A. S, Klesius PH.. Effect of tricaine methanesulfonate on survival and reproduction of the fish ectoparasite Ichthyophthirius multifiliis[J]. Parasitology Research, 2008, 103(4):979～982.

[40] Luciano de O. Garcia, Alexssandro G. Becker, Mauro AC, Bernardo B, Carlos EC, Daiani K. Effects of Water pH and Hardness on Infection of Silver Catfish, Rhamdia quelen, Fingerlings by Ichthyophthirius multifiliis[J]. Journal of the world aquaculture society, 2011, 42(3):399～405.

[41] Mark AC, Manfred ER. The geographical distribution of diplostomiasis (Trematoda: Strigeidae) in fishes from northern Quebec, Canada, in relation to the calcium ion concentrations of lakes[J]. Canadian Journal of Zoology, 1980, 58(7):1390～1394.

[42] Oyoo-Okoth E, Admiraal W, Osano O, Hoitinga L, Kraak MH. Metal specific partitioning in a parasite–host assemblage of the cestode Ligula intestinalis and the cyprinid fish Rastrineobola argentea[J]. Science of The Total Environment, 2010, 408(7):1557～1562.

[43]陈达丽. 淡水鱼小瓜虫病的病原、病理及药物和免疫预防研究[D].重庆：西南师范大学，2004.

[44] Noritaka H, Tsuyoshi G, Kunio S. Killing effect of various treatmentson the monogenean Heterobothrium okamotoi eggs and oncomiracidia and the ciliate Cryptocaryon irritans cysts and theronts[J]. Aquaculture, 2003, 223(1-4):1～13.

[45] Marta CA, Francisco EM, Aneta KD, Maite C. Parasite communities in the red mullet, Mullus barbatus L., respond to small-scale variation in the levels of polychlorinated biphenyls in the Western Mediterranean[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012,64(9):1853～1860.

[46] Ling F, Luo Q, Wang JG, Wang YP, Wang WB, GongXN. Effects of the―all-fish‖GH (growth hormone) transgene expression on resistance to Ichthyophthirius multifiliis infections in common carp, Cyprinus carpio L[J]. Aquaculture, 2009, 292(1-2):1～5.

[47]吴金英，吕军仪，曾华，陈志胜，杨大伟. 惠东拟囊腔吸虫种群动态研究[J]. 中国水产科学，2000, 7(1)：46～50.

[48] Hallett SL, Ray RA, Hurst CN, Holt RA, Buckles GR, Atkinson SD, Bartholomew JL. Density of the Waterborne Parasite Ceratomyxa shasta and Its Biological Effects on Salmon[J]. Applied and environmental microbiology, 2012, 78(10): 3724～3731.

[49] Pampoulie C, Morand S. Nonrandom association patterns in parasite infections caused by the host life cycle: empirical evidence from Kudoa camarguensis (Myxosporea) and Aphalloides coelomicola (Trematoda)[J]. The Journal of Parasitology,2002,88(4):817～819.

[50] KN de Kock, Joubert PH. Suitability of tropical fish foods for laboratory culture of four species of freshwater snails acting as intermediate hosts for economically important helminth parasites in south africa[J]. Southern African Journal of Aquatic Sciences,1989,15(1):91～102.

[51] Ondrackova M, Simkova A, Gelnar M, Jurajda P. Posthodiplostomum cuticola (Digenea: Diplostomatidae) in intermediate fish hosts: factors contributing to the parasite infection and prey selection by the definitive bird host[J]. Parasitology,2004,129 (6):761～770.

[52] David JM. The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries,1995, 5(3):336～371.

[53] Gilbert MA, Granath WOJ. Whirling disease of salmonid fish: life cycle, biology, and disease[J]. The Journal of Parasitology,2003,89(4):658～667.

[54] Adam JK, William ES. Patterns of Distribution and Abundance of Tubifex tubifex and Other Aquatic Oligochaetes in Myxobolus cerebralis Enzootic Areas in Pennsylvania[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2006, 18(1):64～78

[55] Marcogliese DJ, Ball M, Lankester MW. Potential impacts of clearcutting on parasites of minnows in small boreal lakes[J]. folia parasitologica, 2001,48(4):269～274.

[56]潘炯华，张剑英，黎振昌等.鱼类寄生虫学[M].北京：科学出版社，1990: 3～16.

[57]方建平，赵小华. 黄鳝感染鳗鲡独孤吸虫的季节动态[J]. 水产渔业, 2000, 20(1)：29～30.

[58] Valtonen ET, David JM, Julkunen M. Vertebrate diets derived from trophically transmitted fish parasites in the Bothnian Bay[J]. Oecologia, 2010,162(1):139～152.

[59] Duffy MA, Spencer RH, Alan JT, Marianne H. Selective predators and their parasitized prey: Are epidemics in zooplankton under top-down control[J] OssociationfortheSciencesofLimnologyandOceanography, 2005, 50(2):412～420.

[60] 李文祥，王桂堂. 寄生虫对宿主种群的调节[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 550~ 554.

[61] 聂品. 寄生虫种群生态研究的综述[J]. 水生生物学报，1990,14(4)：359~367

[62]高典，王桂堂，吴ft功，邹红，习丙文，李文祥. 丹江口水库鲤肠道寄生蠕虫群落结构与季节动态[J]. 水生生物学报, 2012, 36(3)：482~488.

[63]赖子尼，余煜棉，吴淑勤，杨婉玲，石存斌，庞世勋．影响池养鳜健康的关键水生态因[J]水产学报，2008, 32(4)：601～607.

[64]赖子尼，余煜棉，庞世勋，万俊杰，杨婉玲．水生态因子与鳜的健康关系[J]. 水产学报，

2004,28(3):273~278.

[65]赖子尼，余煜棉，庞世勋，杨婉玲，魏泰莉，夏莲. 鳜鱼养殖池塘水体叶绿素a与16项水生态因子的关系[J]. 中国水产科学，2004,11(5)：427~432.

[66]中国科学院水生生物研究所鱼病学研究室. 鱼病调查手册[D]. 上海市，上海科学技术出版社, 1981。

[67]索勋，杨晓野. 高级寄生虫学实验指导[J].北京，中国农业科学出版社, 2005。

[68]王亚军. 鳜塘浮游生物多样性和水质变化与病害发生的关系[D].上海，上海海洋大学，2003.

[69]张修杰. 广东省水系简介[J]. 广东公路勘察设计, 2009, (2):32~34.

[70]胡锐，赵文，夏艳洁. 长春市各种水体中原生动物的研究[J]. 吉林农业大学学报, 1995, 17(1)：82~87.

[71]武士蓉，徐梦佳，赵彦伟，徐菲，梁振明，钟祖林. 白洋淀湿地水质与水生物相关性研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33 (11) 3160~3165

[72]孙志强，施心路，徐琳琳，孟祥玮，刘桂杰. 景观湿地夏季原生动物群落结构与水质关系[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2)：290~299.

[73]杨秀兰，王爱敏，桑艳丽，毕玉杰，吕永红，曲惠. ClNaIII盐碱地鱼池八种离子的周年变化及其与各生态因子的关系[J]. 淡水渔业, 2005, 35(1)：23~25.

[74]唐文联. 池塘养鱼话石灰[J]. 渔业致富指南, 2001, (11):29

[75]黄琪琰.水产动物疾病学[D]. 上海：上海科学技术出版社，1993, 189~192.

[76] Moghaddam SB, Mokhayer B, Masoumian M, Masouleh AS, Jalilpour J, Masoumzadeh M, Alizadeh

M. Parasitic infection among larvae and fingerlings of the Persian sturgeon (Acipenser persicus) in Vniro tanks and earthen ponds[J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2010, 9(3):342~351.

[77]姚卫建， 聂品. 鲢和草鱼腮部寄生单殖吸虫的种群分布和季节动态[J]. 水生生物学报, 2004，

28(6):664~667.

[78]陈宜瑜，许藴玕，等. 洪湖水生生物及其资源开发[M]. 北京：科学出版社，1995, 335~344.

[79] Eure H. Seasonal abundance of *Neoechinorhynchus cylindratus* taken from largemouth bass (Micropterus salmoides) in a heated reservoir[J]. Parasitology, 1976, (73):353～370.

[80]聂品. 寄生鲢、鳙和草鱼复口吸虫的频率分布和季节动态[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1996, 3(4)：256~259.

[81] Prost M. Investigations on the development and pathogenicity of *Dactylogynts anchoratus* (Duj., 1845) and *D. extensus* Mueller et v. Cleave, 1932 for breeding carps[J]. Acta Parasitologica Polonica, 1963, 11(1):17~47.

[82]张效平，李文祥，艾桃ft，吴ft功，邹红，王桂堂. 温度对中型指环虫产卵和孵化的影响[J]. 水生生物学

报, 2013, 37(3):495~500.

[83] K. Hausmann, N. Huelsmann, R. Radek著，宋微波等译. 原生生物学[M]. 青岛：中国海洋大学出版社, 2007, 307~341.

[84] Zhang X, Yu Y H, Feng W S, et al. Relationship between DNA fingerprints of plankton community and indicators of waste water in waste water treatment plant[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008. 28(8): 1526~1533.

[85] Hao Cuilan, Yue Cheng, Yao Weijian, Yin Jianguo, Jiao Li, Zhu Mengying, Jia Shu'an, Wang Na, Wang Xin. Spatial distribution of *Dactylogyrus wunderi* Bychowsky on gills of *Abramis brama orientalis* Berg (Leuciscinae) in Irtysh River, China[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31(5):979~987.

[86]夏晓勤，王伟俊，姚卫建. 我国内陆水体单殖吸虫的宿主特异性分析[J]. 生态学报, 2000, 20（4）：

594~598.

[87]姚卫建，聂品. 寄生于鲢和草鱼鳃上指环虫种群的季节动态[J]. 中国科学院水生生物研究所, 92。

[88] Buchmann K. Spatical distribution of *Pseudodactylogyms anguillae* and *P. bini*(Monogenea) on the gills of the European eel. *Anguilla snguilla*[J]. Journal of Fish Biology, 1988,32(5):801~802.

[89] Lim LHS. Diversity of monogeneans in Southeast Asia[J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28(10):1495~1515.

[90] Arme C, Halton DW. Observations on the occurrence of *Diclidophora merlangi* (Trematoda: Monogenea) on the gills of whiting, Gadus merlangus[J]. Journal of Fish Biology, 1972, 4(1):27~32.

[91] Wootten R. The spatial distribution of *Dactylogyrus amphibothrium* on the gills of ruffe *Gymnocephalus cernua* and its relation to the relative amounts of water passing over the parts of the gills[J]. Journal of Helminthlolgy, 1974, 48(3):167~174.

[92]郝翠兰，焦丽，汪博良，贾舒安，岳城. 额尔齐斯河温氏指环虫的种群生态学研究[J]. 水生态学杂志，

2012, 3(3):107~111.

[93]赵江ft，焦丽，汪博良，古丽加玛・买买提，岳城. 额尔齐斯河白斑狗鱼寄生单肠四钩虫的种群生态学研究[J]. 干旱区研究, 2011, 28(4)：665~668.

[94] Traxler G S, Richard J, and McDonland T E. *Ichthyophthirius multifiliis*(Ich) epizootics in spawning sockeye salmon in British Canada[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*,1998,10:143-151.

[95] Naylor RL, Hardy RW, et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources[J]. Proc Natl AcadSci,2009, (106):15103-15110.

[96] Craig A. Shoemaker, Maurcíio L. Martins, et al. Effect of *Ichthyophthirius multifiliis* parasitism on the survival, hematology and bacterial load in channel catfish previously exposed to *Edwardsiella ictalur*[J]. Parasites Research,2012,111:2223-2228.

[97] Xu D-H, Shoemaker CA, Klesius PH. *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish[J]. FEMS Microbiology Lettters,2012,329:160-167.

[98] Bowers JM, Mustafa A, et al. The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*[J]. Journal of Fish Disease,2000,23:165-172.

[99] Tully O, Nolan DT. A review of the population biology and host–parasite interactions of the sea louse

*Lepeophtheirus salmonis*(Copepoda: Caligidae). Parasitology,2002,124:16-182.

[100] Clark TG, Lin T. L, DiekersonH. W. Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: their role in Protective immubity Annu. Rev[J]. Fish Disease,1995,5:113 -131.

[101]吕妍，田洁莉，臧淑梅. 浅谈碱度与水产养殖[J]. 黑龙江水产，2010, (120):17~19.

[102]王大鹏，何安尤，谢达祥，李长伙，陈晓汉. 凡纳滨对虾养殖池塘pH值，碱度，硬度和CO2浓度作用机理与调控[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5)：352~356.

[103]臧维玲，江敏，戴习林，朱正国，沈林坐，王建良， 王建忠， 刘招坤，张士宏. 中华绒螯蟹育苗用水中Mg 2 +与Ca 2 +含量及Mg2+／Ca 2 +对出苗率的影响[J]. 水产学报, 1998, 22(2):111~116.

[104]臧维玲，戴习林，张建达，朱正国. 罗氏沼虾育苗用水中Mg 2 +与Ca 2 +含量及Mg2+／Ca 2 +对出苗率的影响[J]. 水产学报,1995, 26(5): 552~557.

[105] Townsend CR, Silva LVF, Baldisserotto B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposes to different levels of water hardness[J]. Aquaculture,2003, 215:103–108.

[106] Lopes JM, Silval VF, Baldisserotto B.. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH[J]. Aquaculture International,2001, 9:73~80.

[107] Garcia L de O, Becker A G, Cunha M A, Baldisserotto B. Effects of Water pH and Hardness on Infection of Silver Catﬁsh, *Rhamdia quelen*, Fingerlings by *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 2011, 42(3):399~405.

[108] Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA, et al. The early development of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish in vitro [J]. Journal of aquatic animal health, 2000, 12: 290-296.

[109]张其中，张占会，等.水温对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响[J].生态科学，2010,29(2)：116~120.

[110]倪达书，李连祥. 多子小瓜虫的形态、生活史及其防治方法和一新种的描述[J].水生生物学集刊，1960, 1(2)：197~226.

[111]房文红，王慧，来琦芳. 碳酸盐碱度、pH对中国对虾幼虾的致毒效应[J]. 中国水产科学, 2001，

7(4):78~81.

[112]黄瑾，熊邦喜，陈洁，朱玉婷，王琴，施培松. 鱼类消化酶活性与体长，体重和水质的相关性研究[J]. 水生态学杂志, 2013, 33(2)：121~126.

[113] Parra JEG, Baldisserotto B. Effect of water pH and hardness on survival and growth of freshwater teleosts[M]. Fish osmoregulation. Science Publishers, Enﬁeld, NewHampshire, USA.2007.

[114]雷衍之. 养殖水环境化学[M].中国农业出版社，2004.

[115] Molokwu CN, Okpokwasili GC. Effect of water hardness on egg hatchability and larval viability of

*Clarias gariepinus*[J]. Aquaculture International, 2002, 10:57~64.

[116] Dickerson H, Clark T. *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes [J]. Immunol reviews: immune systems of ectothernic vertebrates, 1998, 166(1): 377-384.

[117] Olivier J, Carlo P, Domenica DB, et al. Non-invasive detection and quantification of the parasitic ciliate

*Ichthyophthirius multifiliis* by real time PCR[J]. Diseases of aquatic organisms, 2005, 65(3): 251~255.

[118] Mojtaba A, Kurt B. Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunization of rainbow trout using live theronts[J]. Diseases of aquatic organisms, 2006, 72(3): 269~273.

[119] Price DJ, Clayton MG. Genotype–environment interactions in the susceptibility of the common carp, Cyprinus carpio, to *Ichthyophthirius multifiliis* infections[J]. Aquaculture, 1999, 173(1~4):149~160.

[120] Xu DH, Klesius PH. Two year study on the infectivity of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish

*Ictalurus punctatus*[J]. Diseases aquatic of organisms, 2004,59:131~134.

[121] Noe JG, Dickerson HW. Sustained growth of *Ichthyophthirius multifiliis* at low temperature in the laboratory[J]. Internation journal for parasitology, 1995, 81(6): 1022~1024.

[122]钱龙，艾涛，谢恒修．温室培育乌鳢鱼苗对小瓜虫病的防治[J]．中国水产,1999, 10: 33。

[123]邓永强，汪开毓，黄小丽. 鱼类小瓜虫病的研究进展大连水产学院学报[J]. 2005, 20(2): 149~153.

[124] 陈爱平，江育林，钱冬，等.小瓜虫病[J].中国水产,2011, (8):37~38.

[125]梁长辉. 盛夏小瓜虫病的防治探讨[J]. 渔业致富指南, 2011，(10)：11

[126]冯立芳，缪伟. 不同纬度螅状独缩虫耐热能力及Hsp70 mRNA表达水平的比较[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 525~530.

[127]冯立芳，畅悦， 袁冬霞，等. 嗜热四膜虫五个hsp70基因的表达分析[J]. 动物学研究, 2011, 32(3):

267~276.

[128] 黄芬，何彰华，李存，等. 热激蛋白70的研究进展[J].生物技术通讯，2011, 22(6)：883~886.

[129] Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome[J]. Nature cell biology, 2000,2(8):469~475.

[130] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing

Factor[J]. Nature cell biology, 2001, 3(9): 839~843.

[131] Kumar Y, Tatu U. Stress protein flux during recovery from simulated ischemia: Induced heat shock protein 70 confers cytoprotection by suppressing JNK activation and inhibiting apoptotic cell death[J]. proteomics, 2003,3(4):513~526.

[[132] Zhao](http://www.cqvip.com/Main/Search.aspx?w=Zhi-GangZhao) ZG, [Shen](http://www.cqvip.com/Main/Search.aspx?w=Wen-LuShen) WL. Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901[J]. World journal of gastroenterology, 2005,11 (1):73~78.

[133] Aruda AM, Baumgartner MF, Reitzel AM, et al. Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanusﬁnmarchicus*[J]. Journal of insect physiology, 2011, 57(5):665~675.

[134]韩燕，王淑红，孟照俊，等. 热处理对HeLa细胞增殖、凋亡及HSP70表达的影响[J]. 陕西医学杂

志, 2011,40(4): 394~396.

[135] Yang J, Yang LL, Lv ZY, et al. Molecular cloning and characterization of a HSP70 gene from

*Schistosoma japonicum*[J]. Parasitology research, 2012, 110(5): 1785~1793.

[136] Bottger E, Multhoff G, Kun JFJ, et al. *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes Induce Granzyme B by NK Cells through Expression of Host-Hsp70[J]. Plose one, 2012, 7(2):1~11.

[137] 杨秉芬，孙启鸿，曹诚. 热激蛋白70研究进展[J].生物技术通讯, 2009, 20 (5):716~719.

[138] Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the *Mediterranean mussel* exposed to various stressors [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2005,336 (4):1157~1163.

[139]明建华，谢骏，刘波，等. 团头鲂HSP70 cDNA的克隆、序列分析以及热应激对其mRNA表达的影

响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(5):635~648.

[140]田照辉，徐绍刚，王巍，等. 西伯利亚鲟热休克蛋白HSP70cDNA的克隆、序列分析和组织分布[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2)：150~157.

[141] Raphaela de CG, Suely LG. Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*[J]. Gene, 2007, 386(1):24~34.

[142] del Cacho E, Gallego M, Pereboom D, et al. *Eimeria tenella*: hsp70 expression during sporogony[J]. J Parasitol. 2001,87(5):946~950.

[143] Neumann S, Ziv E, Lantner F, et al. Regulation of HSP70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*[J]. European journal of biochemistry, 1993,212(2):589~596.

[144] Abernathy J, Xu DH, Peatman E, et al. Gene expression proﬁling of aﬁsh parasite *Ichthyophthirius multiﬁliis*: Insights into development and senescence-associated avirulence[J]. Comparative biochemistry and physiology, Part D, 2011, 6(4):382·392.

*[145]* Yi YL, Lu C, Hu XG, et al. Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis*

In goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Parasitol researcch,2012(111):1771~1778.

[146] Ling F, Wang JG, Lu C, et al. Effects ofaqueous extract of *Capsicum frutescens*(Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. Parasitol research,2012(111):841~848.

[147] del Cacho E, Gallego M, López -Bernad F, et al. Differences in Hsp70 expression in the sporozoites of the original strain and precocious lines of *Eimeria tenella*[J]. Parasitology. 2005,91(5):1127~1131.

[148] Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology[J]. Pharmacology & Therapeutics, 1998,80(2):183~201.

# 攻读学位期间发表的学术论文

[1] 第一作者. 南昌青ft湖浮游植物种群特征分析[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(5): 1023～1029.

[2]第一作者. 多子小瓜虫HSP70基因ORF的克隆及表达分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014. 已录用

# 独创性说明

作者郑重声明：本硕士论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得大连海洋大学或其他单位的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

作者签名：

年月日

# 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者和指导教师完全了解大连海洋大学有关保留、使用学位论文的规定：即学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人同意大连海洋大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索、交流。

学位论文作者签名：导师签名：

签字日期：签字日期：

致 谢

三年硕士生涯就要结束了，回想着这三年来的点点滴滴，我心中充满了感激之情。我是大连海洋大学与中国水产科学研究院珠江水产研究所联合培养生，第一年的理

论学习在大连海洋大学，在这一年中，我遇到了让我印象深刻的笑容，英语老师陈峰老师的笑容，那种流露心底的笑，深深的感染着我，“对万物充满感激”这句话我永远留在我的心底！

我要感谢校内导师，大连海洋大学生命科学学院的李华教授！她指导我校内的理论学习，每个星期我们都有讨论课，在课堂上，李华老师都提供了最直接的指导和帮助，让我们从“朦胧”走向“明朗”，教我们怎样阅读文献，怎么来把握文献中的内容。她渊博的知识、敏锐的思想以及独到的眼光，令我终身受益。李教授不光在课堂，而且在生活上也给予我们关怀，在公园，在海边上，都留下了我们与李教授的身影。李老师，我由衷的感谢您！

我要感谢我的导师，中国水产科学院首席科学家吴淑勤研究员，是她给了我一次继续深造的机会。我第一次进到她的办公室，她亲自泡了一杯茶给我，她那和蔼可亲的印象深深的烙在我的脑海里。感谢她在百忙之际，仍不断的抽出时间对我的论文进行指导，吴老师精深的学术造诣和宽厚的人格魅力深深的感染了我，让我受益匪浅。在此，我要对吴老师致以最崇高的敬意和最衷心的感谢！

我要由衷的感谢我的导师潘厚军研究员，在珠江所这两年来，都是她一步一步的指导着我的实验，从论文选题开始以后，潘老师就指导着我的试验设计和研究进展，结果分析到文章写作，有时她自己亲自跟我一起下到基地采样，当我在试验中遇到困难，总能得到她的及时帮助和支持。潘老师严谨的治学态度和诲人不倦的师长风范让我终身受益！在此，我要对潘老师说声：“谢谢老师！您辛苦了！”

感谢大连海洋大学的“养殖楼望海豪宅”——鱼病防控实验室中的叶仕根，李强老师；感谢杨晓斌、徐祥、戚瑞荣、费阳春等师兄师姐；感谢刘志强、魏畅、胡潜、李洋、张家林同学；感谢珠江所石存斌、赵飞、方翔、林文辉、王庆、林强、曾伟伟、刘春等老师，感谢实验室的杨淞、张志新、米彦飞、邓美英、雷雪冰师兄师姐，感谢殷亮、李永刚、胡钱东同学，感谢时云朵、王片片师妹，他们对我的学习和试验给予了很多的帮助。我要衷心的感谢他们。

最后我要感谢我的家人，尤其是我的父母，是他们的勤劳和理解解决了我的后顾之忧。感谢我的女友吴芳，她给予了我很多生活和试验上的关心和帮助，我衷心的谢谢她！

另外，还有很多关心和帮助过我的老师、朋友、同学，谢谢您们！

夏润林