

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 22420061152307

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

养殖青蟹几种常见疾病病原和病理学
研究

Studies on Pathogens and Pathology of Several Common Diseases in
Cultured Mud Crab, *Scylla paramamosain*

李 君 华

指导教师姓名: 朱 小 明 副 教 授

专 业 名 称: 海 洋 生 物 学

论文提交日期: 2009 年 08 月

论文答辩时间: 2009 年 09 月

学位授予日期: 2009 年 月

2009 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要	1
Abstract	5
第一章 绪 论	9
1.1 养殖拟穴青蟹病害发生概况	9
1.1.1 生物学特征.....	9
1.1.2 我国青蟹养殖现状及病害发生概况.....	10
1.2 蟹类病害的研究进展	12
1.2.1 细菌性疾病.....	12
1.2.2 病毒性疾病.....	16
1.2.3 真菌性疾病.....	19
1.2.4 原核生物多样性疾病.....	20
1.2.5 侵袭性疾病.....	20
1.2.6 环境变化引起的疾病.....	21
1.3 蟹类疾病病原菌检测方法的研究	22
1.3.1 病原体检测的研究现状.....	22
1.3.2 病原细菌检测方法.....	23
1.4 本研究的目 的和内容	28
第二章 青蟹“红芒病”和“白芒病”的病原及病理分析	31
2.1 材料与方 法	31
2.1.1 材料来源.....	31
2.1.2 药品和仪器.....	32
2.1.3 病原体的分离及鉴定.....	32
2.1.4 人工感染.....	36
2.1.5 石蜡切片制作.....	36

2.2 结果	37
2.2.1 病蟹症状.....	37
2.2.2 病原体的分离和鉴定.....	37
2.2.3 人工感染实验.....	43
2.2.4 组织病理学观察.....	44
2.3 讨论	46
2.3.1 分离菌株的鉴定.....	46
2.3.2 人工感染.....	47
2.3.3 组织病理学观察.....	48
第三章 青蟹“斑点病”的病原分离及鉴定	51
3.1 材料与方法	51
3.1.1 材料来源.....	51
3.1.2 药品和仪器.....	51
3.1.3 病原体的分离及鉴定.....	51
3.1.4 人工感染.....	51
3.1.5 石蜡切片制作.....	52
3.2 结果	52
3.2.1 病蟹症状.....	52
3.2.2 病原体的分离和鉴定.....	53
3.2.3 人工感染实验.....	63
3.2.4 组织病理学观察.....	64
3.3 讨论	64
3.3.1 鲍曼不动杆菌.....	65
3.3.2 蜡状芽孢杆菌.....	66
3.3.3 奇异变形杆菌.....	66
第四章 青蟹“亲体不明死亡病”的病原分离及其致病性	69
4.1 材料与方法	69
4.1.1 材料来源.....	69
4.1.2 药品和仪器.....	69

4.1.3 病原体分离及提取.....	70
4.1.4 人工感染实验.....	71
4.1.5 石蜡切片制作.....	72
4.2 结果	72
4.2.1 病蟹症状.....	72
4.2.2 病原体分离及提取.....	72
4.2.3 人工感染实验结果.....	73
4.2.4 组织病理学观察.....	74
4.3 讨论	77
结 语.....	81
一、本研究的主要成果.....	81
二、本研究的创新点与特色.....	81
三、本研究的不足及今后需开展的工作.....	82
附 录.....	83
图 版 说 明	85
参 考 文 献	92
致 谢.....	112

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	5
Chapter 1. Preface	9
1.1 Occurring situation of diseases of cultured mud crab	9
1.1.1 Biological characteristics	9
1.1.2 Aquaculture and disease occurrence of the mud crab in China	10
1.2 Advances on the research of diseases of crab	12
1.2.1 Bacterial diseases	12
1.2.2 Viral diseases	16
1.2.3 Fungicidal diseases	19
1.2.4 Diseases caused by RLOs	19
1.2.5 Invasive diseases	20
1.2.6 Diseases caused by environmental changes.....	21
1.3 Detection methods of pathogen of crab diseases	22
1.3.1 Research of pathogenic detection	22
1.3.2 Detection of pathogenic bacteria	23
1.4 Objective and significance of the research	28
Chapter 2. Pathogenic and histopathological analysis of Hongmang and Baimang diseases of <i>Scylla paramamosain</i>	31
2.1 Material and method	31
2.1.1 material source	31
2.1.2 Reagents and instruments	32
2.1.3 Isolation and identification of pathogen	32
2.1.4 Artificial infection.....	36
2.1.5 Production of paraffin tissue slice.....	36
2.2 Results	37

2.2.1 Symptoms of diseased crabs	37
2.2.2 Isolation and identification of pathogen	37
2.2.3 Results of artificial infection	43
2.2.4 Histopathological observation	44
2.3 Discussion	46
2.3.1 Identification of isolated strains	46
2.3.2 Artificial infection	47
2.3.3 Histopathological observation	48
 Chapter 3. Isolation and identification of pathogens of shell-spot disease of <i>Scylla paramamosain</i>	 51
3.1 Material and method	51
3.1.1 material source	51
3.1.2 Reagents and instruments	51
3.1.3 Isolation and identification of pathogen	51
3.1.4 Artificial infection	51
3.1.5 Production of paraffin tissue slice	52
3.2 Results	52
3.2.1 Symptoms of diseased crabs	52
3.2.2 Isolation and identification of pathogen	53
3.2.3 Results of artificial infection	63
3.2.4 Histopathological observation	64
3.3 Discussion	64
3.3.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	65
3.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	66
3.3.3 <i>Proteus mirabilis</i>	66
 Chapter 4. Pathogenic isolation and pathogenicity of unknown-death disease of <i>Scylla paramamosain</i>	 69
4.1 Material and method	69
4.1.1 material source	69

4.1.2 Reagents and instruments	69
4.1.3 Isolation and extraction of pathogenic virus.....	70
4.1.4 Artificial infection.....	71
4.1.5 Production of paraffin tissue slice.....	72
4.2 Results	72
4.2.1 Symptoms of diseased crabs	72
4.2.2 Isolation and extraction of pathogenic virus.....	72
4.2.3 Results of artificial infection.....	73
4.2.4 Histopathological observation	74
4.3 Discussion.....	77
Epilogue	81
1. Main achievements of research.....	81
2. Innovation and characteristic of research	81
3. The future research plan.....	82
Appendix	83
Plates	85
References.....	92
Acknowledgements	112

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

本文对养殖拟穴青蟹3种常见疾病的病原和病理变化进行了研究,依照发病症状和养殖户的习惯,将3种常见疾病分别称为“红芒病”、“白芒病”和“斑点病”。采用细菌16S rRNA基因检测技术,并结合分离菌株的菌落、菌体的形态学观察,对患病青蟹体内分离到的4株异常菌进行了分类鉴定,并通过人工感染实验确定分离菌株的致病性,进一步分析青蟹3种常见疾病的病因。同时,从病原的分离纯化、人工感染和组织病理观察等方面初步性地研究了一例青蟹亲体疾病,以期对青蟹的疾病诊断与防治提供理论指导。本实验的主要结果和结论如下:

1 青蟹“红芒病”和“白芒病”的病因探讨及组织病理学观察

传统的细菌分离培养实验结果表明,患“白芒病”青蟹体内无异常细菌存在,从患“红芒病”青蟹体内分离出1株异常菌S09051。以细菌通用引物27F和1492R对分离菌株S09051的16S rRNA基因进行PCR扩增,获得分离菌株S09051的16S rRNA基因序列片段大小为959bp,通过GenBank程序、Clustal X和MEGA4.0软件进行同源性搜索、分析并构建系统进化树,发现该分离菌株与芽孢杆菌属(*Bacillus*)中的*Bacillus* sp. M403菌种亲缘关系最近,其同源相似性99%,结合菌落形态和革兰氏染色结果,确定分离菌株为芽孢杆菌属中的*Bacillus* sp. M403菌种。通过人工感染实验发现,该菌株不具有致病性,高浓度组(1.2×10^7 个·mL⁻¹)的青蟹活力较好,加之病蟹体内无其它病原菌以及该菌已有的相关报道,推测该菌对一些病原菌有拮抗作用,初步认定该菌为益生菌,这也是“红芒病”可能是由环境突变引起的而无细菌继发感染的原因。而患“白芒病”青蟹体内不存在该可能益生菌,推测此为“白芒病”病程较短的原因。由以上分析可见,青蟹“红芒病”和“白芒病”无病原菌继发性感染可能是由环境变化引起的疾病,与已有的推测相似。组织病理学观察发现,“红芒病”主要造成青蟹肝胰腺严重变性、细胞空泡化、结构混乱;肌纤维断裂、排列紊乱、胞核聚缩。而“白芒病”主要危害青蟹鳃和肝胰腺,鳃和肝胰腺上皮细胞变性坏死、崩解,鳃腔内血细胞异常聚集,鳃叶弯曲变形,肝小管结构消失。

2 青蟹“斑点病”的病原菌分离鉴定、致病性及组织病理学分析

从患“斑点病”青蟹体内分离获得3株异常菌S09052、S09053和S09054，经细菌16S rRNA基因的PCR扩增获得各分离菌株的16S rRNA基因片段，测序结果显示其大小分别为1459bp、1474bp和1465bp。所得序列输入BLAST程序进行同源性搜索，选取相似性较高的已知菌并下载其16S rRNA基因序列，采用Clustal X和MEGA4.0软件以邻接法构建系统进化树，结果显示，分离菌株S09052、S09053和S09054分别与鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 的AB307-0294菌株、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的03BB102菌株和奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 的HI4320菌株自然地聚类为一支，其同源相似性分别为：99.79%、99.86%和98.98%，结合分离菌株菌落形态和革兰氏染色结果观察，鉴定分离菌株S09052、S09053和S09054分别为鲍曼不动杆菌、蜡状芽孢杆菌和奇异变形杆菌。人工感染实验结果显示，3株菌均有较强的致病性，其中菌株S09052菌悬液高浓度 (2.4×10^7 个·mL⁻¹) 与菌株S09053 (3.0×10^7 个·mL⁻¹) 和S09054 (3.6×10^7 个·mL⁻¹) 的低浓度相近，但此组青蟹在第4 d便全部死亡，其低浓度组青蟹也在第6 d全部死亡，而菌株S09053和S09054低浓度组青蟹在第12 d死亡率仅为85.7%。由上可见，菌株S09052的致病性最强，3株分离菌均为青蟹“斑点病”的病原菌，这与以往甲壳溃疡病是由弧菌、假单胞菌、气单胞菌、黄色杆菌等引起的报道有所不同。组织病变主要表现在肝小管外基膜变形、上皮细胞多层；肌纤维松散、变形，部分断裂。

3 青蟹“亲体不明死亡病”的病原分离、致病性和病理变化分析

通过对青蟹“亲体不明死亡病”细菌分离培养及镜检，未发现细菌和寄生虫感染，病蟹的病原提纯结果不理想，给该病的病原确定带来一定困难。以注射和浸泡病蟹组织粗体液的方式人工感染健康青蟹，结果发现，注射方式能够有效感染青蟹，第7 d青蟹死亡率达100%，而浸泡感染方式结果不明显。由此可推断该病对体质较强且体表完好的青蟹亲体感染效果不明显，而对创伤性或体质较弱的青蟹亲体有较强的感染性。以人工感染青蟹和养殖场采集的濒死病蟹制作石蜡切片进行组织病理学检测，结果表明，两种材料的肝胰腺具有相似的病理变化，病蟹鳃、肝胰腺、肌肉、肠道、卵巢均有异常或病变。病变肝胰腺细胞肿大、变性、坏死，造成卵巢小叶边界模糊，部分卵母细胞崩解消失，

滤泡细胞排列异常；肠道上皮细胞崩解、其上微绒毛遭到破坏；肿大鳃腔内聚集大量血细胞，推测该病原主要靶组织为肝胰腺和肠道。

关键词：拟穴青蟹 病原生物 16S rRNA 组织病理学

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

A survey was conducted in three cases of common diseases and the unknown-death disease of mud crabs, *Scylla paramamosain*, which were cultured in farms located along the coast of Fujian Province. The pathogens and pathology of diseased crab were studied using the classical methods of isolating the microorganisms and virus from their hosts. Furthermore, the 16S rRNA gene technique, artificial infection tests and clinical and histological observations were used to analyse this question. Four strains of bacteria were isolated from the diseased mud crabs. The main results of the present study are presented as follows:

1. Pathogenic and histopathological analysis of Hongmang and Baimang diseases of *S. paramamosain*

A strain was isolated from the *S. paramamosain* suffering from the Hongmang disease. The bacteria are Gram-positive and in the shape of long rod. The part of 16S rRNA gene sequence of the bacteria was obtained following PCR amplification using 16S rRNA gene universal primers 27F and 1492R. The length of target fragment was 959bp. The sequence was aligned with those available *Bacillus* and phylogenetic tree inferred using Neighbor-joining method. The organism and the type strain of *Bacillus* sp. M403 consistently formed a monophyletic clade with a distant sequence similarity of 99%. According to morphological features and 16S rRNA phylogenetic analysis, the isolated bacteria were identified as *Bacillus* sp. M403. An artificial infection revealed that the isolates strain was not lethal to mud crabs by injecting intramuscularly. The histopathology research conducted with paraffin tissue slice technology, hematoxylin and eosin staining. The results showed that the hepatopancreas cells were necrocytosis serious, the nucleus were karyolysis and disappeared, and the empty bubble had changed its nature. The muscle fibers were fractured and the nucleus were karyolysis. Besides, no strain was isolated from Baimang diseased crabs. The pathological changes were serious in the gills and

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库