

文章编号: 1000-0615(2019)05-1326-12

DOI: 10.11964/jfc.20180311206

刺激隐核虫对大黄鱼致病力及中草药抑制其世代繁殖的研究

焦恺强^{1,2}, 王印庚^{2*}, 荣小军², 陈佳³, 张正²,
廖梅杰², 李彬², 孙陆宇⁴, 苏跃中⁵

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 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, 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室, 山东青岛 266071;

3. 福建福鼎海鸥水产食品有限公司, 大黄鱼育种国家重点实验室, 福建宁德 352103;

4. 福建大北农水产科技有限公司, 福建漳州 363502;

5. 福建省海洋环境与渔业资源监测中心, 福建福州 350003)

摘要: 由刺激隐核虫寄生感染而引起的“白点病”成为大黄鱼养殖生产中危害最为严重的病害之一。为研究刺激隐核虫对大黄鱼的致病力及复方中草药HD-2对刺激隐核虫世代繁殖的抑制和阻断其感染的效果, 本研究在测定了患病大黄鱼产生刺激隐核虫包囊数量、大小、孵化率和幼虫产率的基础上, 测定了幼虫体外存活时间和感染力。同时, 研究了HD-2中草药液对刺激隐核虫幼虫、滋养体和包囊的杀除效果以及口服复方中草药HD-2对患病大黄鱼的治疗效果。结果显示, 自然患病大黄鱼体型规格与产生包囊总数呈正相关, 包囊直径为(340.8±64.9) μm, 平均孵化率为76.4%, 每个包囊可产生280±42.5个幼虫; 幼虫体外最长存活时间超过24 h, 幼虫孵化20 h后便丧失感染力。幼虫感染大黄鱼7 d的LD₉₀为9 712个幼虫/尾, LD₅₀为4 366个幼虫/尾。HD-2中草药液可有效杀灭刺激隐核虫幼虫, 分别口服含复方中草药5、10和15 g/kg饲料30 d的实验组大黄鱼在LD₅₀攻毒剂量下其相对感染强度较对照组分别下降32.0%、44.5%和51.8%, 包囊体积较对照组分别减少35.4%、36.1%和37.3%, 孵化率分别下降16.3%、23.3%和27.9%; 在LD₉₀攻毒剂量下3个实验组大黄鱼的存活率分别达到40.0%、55.0%和58.3%, 显著高于对照组(8.3%), 且鳃丝、胸鳍上滋养体数量较对照组显著下降。口服复方中草药HD-2对自然患病大黄鱼的治疗效果表明, 采集口服15 d的3组大黄鱼的包囊数量分别较对照组下降73.1%、87.7%和93.8%, 鱼体死亡率分别为58.3%、36.7%和21.7%, 较对照组83.3%的死亡率明显降低, 且用药组大黄鱼的生理状态明显优于对照组。由此可见, 口服复方中草药HD-2能有效阻断刺激隐核虫的二次感染, 抑制包囊的形成和发育, 降低包囊孵化率和幼虫孵化数量, 从而有效抑制了虫体的世代繁殖。

关键词: 大黄鱼; 刺激隐核虫; 复方中草药HD-2; 阻断感染; 世代繁殖; 致病力

中图分类号: S 943

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)俗称黄瓜鱼、黄花鱼, 隶属于鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Larimichthys*), 广泛分布于我国黄海南部至南海雷州半岛以东海域, 是我

国特有的地方性鱼种, 其肉质细腻, 味道鲜美, 具有极高的营养价值^[1]。自1985年大黄鱼人工繁殖育苗技术突破以后, 至2010年该品种成为全国第二大海水鱼养殖品种^[2], 2016年以17万t的

收稿日期: 2018-03-14 修回日期: 2018-04-29

资助项目: 福建省科技重大专项(2013NZ0002-5); 国家科技支撑计划(2012BAD17B03); 山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205); 闽海渔合同[2009]2-12号

通信作者: 王印庚, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

总产量跃居海水养殖鱼类产量第一位^[3]。随着大黄鱼养殖产业的快速发展, 各种病害也随之频繁发生, 给产业造成了巨大的经济损失, 其中由刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)寄生感染而引起的“白点病”成为大黄鱼养殖生产中危害最为严重的病害之一^[4-5]。该病的传染速度极快, 且具有非常高的发病率和死亡率, 控制不及时, 1~2 d内即可造成85%养殖鱼类死亡^[6]。刺激隐核虫俗称“海水小瓜虫”, 是一种纤毛虫类寄生虫, 主要以细胞、组织碎屑及组织液等为食, 其整个生活史主要经历4个阶段, 分别为滋养体(trophont)、包囊前体(protomont)、包囊(tomont)和幼虫(theront)^[7]。鳃和皮肤是刺激隐核虫主要寄生的部位, 也是鱼体受到直接损害的组织器官^[8]。

目前, 养殖者多使用化学药物浸泡的方法来防治由刺激隐核虫引起的“白点病”, 福尔马林、盐酸奎宁、硫酸铜、亚甲基蓝、乙酸、双氧水、孔雀石绿、次氯酸钠、盐霉素、磺胺类抗生素等都被证实对刺激隐核虫具有一定杀伤效果^[9-13], 但在临床应用上存在很多问题: ①长期过量使用化学药物会引发水体污染和水产品质量安全问题; ②上述药物大部分属于外用药品, 施用成本较高, 且不能口服使用, 因此, 不能有效解决寄生虫在鳃丝内部感染的问题; ③孔雀石绿等高效药物已被列为水产禁药^[14]。因此, 寻找一种无污染、安全有效、成本低、方便使用的杀虫药物势在必行。中草药具有不易产生耐药性、天然环保、无残留等优点, 不仅对病原微生物或者寄生虫有直接的抑制和杀灭作用, 还能调节养殖鱼类的抗应激能力和免疫机能以提高其抗病力, 用中草药来防治鱼病已成为今后水产养殖疾病防控的发展重点之一^[5, 15]。

本研究通过对刺激隐核虫包囊的收集培养, 结合其生活史对其致病力进行研究, 并利用实验室前期筛选的复方中草药HD-2对抑制刺激隐核虫世代繁殖和阻断感染的效果进行研究, 以期为预防和治疗刺激隐核虫病提供科学依据和有效方法。

1 材料与方法

实验所用的健康大黄鱼购自福建宁德富发水产有限公司, 患刺激隐核虫病的大黄鱼采自该公司海水网箱; 实验用颗粒饲料购自福建大北农饲料有限公司, 中草药为本实验室前期筛选出的复方中草药HD-2^[16], 主要成分为槟榔(*Ar-*

eca catechu)、川楝子(*Meliae toosendan*)、绵马贯众(*Rhizoma dryopteridis crassirhizomatis*)、大青叶(*Isatisidis*)、穿心莲(*Herba andrographis*)等。实验用海水均经过沙滤, 水温为27~28 °C, 盐度为29~33, pH为7.9~8.1, 溶解氧 ≥ 5.0 mg/L, 亚硝酸盐 < 0.2 mg/L。

1.1 刺激隐核虫致病力研究

包囊收集 分别取(250.0 \pm 25.0) g、(100.0 \pm 16.0) g、(40.0 \pm 7.0) g 3个规格的自然感染刺激隐核虫的大黄鱼各60尾, 置于9个深1 m、容积为1 m³的玻璃钢水槽中饲养, 每个规格的大黄鱼分装到3个水槽内, 每个水槽20尾; 2 d后可见包囊落于水槽底部, 轻轻刷起包囊并利用虹吸法将其收集到烧杯中, 冲洗干净后计数。之后, 每2 d收集1次, 共收集5次。

包囊大小、孵化率及产率测定 随机选取72个2 h内脱落的包囊, 在显微镜下测量其直径(或长直径)后分别转入3个24孔培养板中, 27 °C恒温培养并观察记录包囊发育情况。待包囊孵化后滴加少量甲醛溶液将幼虫全部杀死, 在显微镜下进行计数并计算包囊产率, 即单个包囊产生幼虫的数量。实验周期为7 d, 每天更换海水, 7 d后未孵化且分裂不正常的包囊记为死亡。

刺激隐核虫幼虫体外存活时间测定 收集30 min内孵化出的新鲜幼虫, 用灭菌海水将幼虫浓度调整为50个/mL。在24孔培养板中每孔加入1 mL虫液后27 °C恒温培养, 每隔4 h吸取2个培养孔中的虫液, 观察并统计死亡幼虫的数量后滴入5 μ L甲醛溶液对总虫数计数并计算相应时间点的幼虫存活率。虫体死亡判断标准为30 s内虫体不运动、纤毛不抖动。

幼虫感染率测定 收集30 min内孵化出的新鲜幼虫, 分别在收集后的0、4、8、12、16、20和24 h时检测其存活率并计算存活虫体密度, 存活率计算方法同“刺激隐核虫幼虫体外存活时间测定”。用每个时间节点的虫液进行感染大黄鱼实验, 实验用大黄鱼鱼苗规格为(50.0 \pm 7.0) g, 感染剂量为1 000个虫体/尾, 感染实验在直径为20 cm的水桶中进行, 感染时水体为3 L, 感染2 h后加入灭菌海水至10 L, 每个感染节点设3个生物学重复。在虫体感染60 h时收集鱼体产生的包囊, 计数并计算幼虫的感染率。

$$\text{感染率(\%)} = \frac{\text{每尾鱼产生包囊数量}}{\text{每尾鱼感染幼虫的剂量}} \times 100\%$$

刺激隐核虫对大黄鱼的致死、半致死浓度测定 收集30 min内同期孵化的刺激隐核虫幼虫,分别以每尾鱼1 000、3 000、5 600、8 000、10 500、12 000个幼虫剂量感染规格为(82.0±8.5)g的大黄鱼,每组感染20尾,感染时水体中鱼的密度为每5L海水中1尾鱼,2h后加水至800L。统计7d内大黄鱼死亡数量,根据寇氏法^[17]计算半致死浓度LD₅₀: $\lg LD_{50} = X_k - d(\sum P_i - 0.5)$,其中X_k为最大对数剂量,d为相邻两组对数剂量之差数,P_i为死亡率,i为组号。90%致死浓度LD₉₀通过SPSS 17.0软件回归分析各致死概率的幼虫量。

1.2 中草药抑制刺激隐核虫世代繁殖效果

中草药对刺激隐核虫幼虫药浴杀灭实验 收集刺激隐核虫包囊,在27℃条件下连续充气培养。待包囊孵化后,收集30 min内同期孵化的高活力幼虫。将收集到的虫液加灭菌海水稀释至200个幼虫/mL,同时用灭菌海水调节中草药终浓度分别为50、80、100、200和400 mg/L备用。在24孔培养板上每孔加0.5 mL虫液,药物处理组添加0.5 mL HD-2中草药药液,对照组加0.5 mL 灭菌海水,每个浓度设置3个平行组,置于27℃恒温培养箱培养,每隔1 h,将培养板于倒置显微镜下观察,统计沉底死亡的幼虫数量,从而计算幼虫的存活率。

中草药抑制滋养体发育实验 选取未感染刺激隐核虫的规格为(82±8.5)g健康大黄鱼共480尾,随机分到对照组(control)、G1组、G2组、G3组,每组120尾,分别投喂含有0、5、10、15 g/kg复方中草药HD-2的饲料30 d。第31天,每组随机抽取20尾大黄鱼,并用LD₅₀剂量幼虫感染大黄鱼,在大黄鱼的体表和鳃上出现白色滋养体后,每组随机抽取5尾大黄鱼,称体质量,剪取右侧第二鳃片并在显微镜下计算鳃片两侧的滋养体总数。参照但学明等^[17]的方法,用相对感染强度(relative infection intensity, RII)来表示寄生虫的感染程度,用相对感染强度下降率来表示鱼的抗感染能力:

$$RII(\text{个/g}) = \text{第二鳃片上滋养体数量/鱼体质量(g)}$$

$$\text{相对感染强度下降率}(\%) = (\text{对照组RII} - \text{实验组RII}) / \text{对照组RII} \times 100\%$$

投喂中草药30 d后,在第31天从各实验组随机选取80尾大黄鱼按照LD₉₀剂量对大黄鱼进行刺

激隐核虫感染实验,每个组分4个水槽饲养,每个水槽内20尾。其中1个水槽的大黄鱼用于计算感染60 h后各实验组大黄鱼胸鳍和鳃上滋养体数量,剩余3个水槽用于计算感染7 d的大黄鱼的存活率。

中草药对包囊发育的影响 取“中草药抑制滋养体发育实验”中对照组(control)、G1、G2和G3组每组各10尾大黄鱼用LD₅₀剂量刺激隐核虫幼虫进行感染,60 h后,在每平行组水槽中固定位置中放入6个直径90 mm的培养皿收集掉落包囊,期间继续投喂药物。12 h后取出,在每个平行组中随机选取50个包囊,显微镜下测量其直径,并于24孔培养板中孵化,统计包囊孵化个数并计算孵化率。体积相对减小率(计算过程将刺激隐核虫包囊看作球形处理)、孵化率下降率来表示口服复方中草药HD-2对刺激隐核虫包囊发育的影响。

$$\text{体积相对减小率}(\%) = (\text{对照组包囊体积} - \text{实验组包囊体积}) / \text{对照组包囊体积} \times 100\%$$

$$\text{孵化率下降率}(\%) = (\text{对照组孵化率} - \text{实验组孵化率}) / \text{对照组孵化率} \times 100\%$$

1.3 中草药对已患病鱼的治疗及其抑虫作用

选取患病时间约2周、规格为(82.0±8.5)g的自然患病大黄鱼240尾,随机分为对照组、E1组、E2组和E3组4组于玻璃钢水槽中暂养,每组3个平行,每个平行20尾鱼;分组后立即投喂含有0、5、10和15 g/kg复方中草药HD-2的饲料,连续投喂15 d,统计每组大黄鱼死亡数量及其存活鱼的健康程度。在实验第0、5、10和15天于水槽底部随机放置3个直径90 mm培养皿,24 h后取出统计包囊数量,根据培养皿与水槽底部面积的倍数推算总包囊数量。实验结束时每组随机抽取5尾大黄鱼,取右侧第二鳃片和右侧胸鳍在显微镜下计算寄生滋养体的数量。

1.4 数据分析

实验数据用SPSS 17.0和Microsoft Excel统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 包囊采集

对采集于不同规格自然患病大黄鱼鱼体的

表 1 自然患病不同规格大黄鱼携带刺激隐核虫包囊的数量分析

Tab. 1 Quantitative analysis of *C. irritans* tomonts collected from nature infected *L. crocea* with different specifications

| 实验次数 experiment times | 鱼体规格/g fish specification | 不同收集时间刺激隐核虫包囊的数量/个 <i>C. irritans</i> tomont number at different collection time | | | | | 总包囊数量/个 the total number of tomonts. | 单位体质量包囊数量/(个/g) the average tomont carried by each body weight unit |
|------------------------------------|---------------------------------|---|--------|-------|-----|------|--|---|
| | | 2 d | 4 d | 6 d | 8 d | 10 d | | |
| 第1次实验 the 1 st expt. | 250.0±25.0 | 21 140 | 14 780 | 2 080 | 35 | 0 | 38 035 | 7.6 |
| | 100.0±16.0 | 12 450 | 4 940 | 1 120 | 30 | 0 | 18 540 | 9.3 |
| | 40.0±7.0 | 2 835 | 1 280 | 210 | 0 | 0 | 4 325 | 5.4 |
| 第2次实验 the 2 nd expt. | 250.0±25.0 | 27 400 | 15 600 | 1 240 | 72 | 0 | 43 196 | 8.6 |
| | 100.0±16.0 | 15 370 | 7 200 | 1 120 | 40 | 0 | 23 730 | 11.9 |
| | 40.0±7.0 | 3 050 | 1 750 | 300 | 0 | 0 | 5 100 | 6.4 |

注: 1. 鱼体表面积难以计算, 仅用体质量来进行分析; 2. 总包囊数量为每组20尾鱼所产生的
Notes: 1. since fish body surface area is difficult to calculate, the analysis was calculated based on the body weight; 2. the total tomonts collected from each group were produced by 20 fish

包囊数量统计后发现, 体质量分别为(250.0±25.0)、(100.0±16.0)和(40.0±7.0) g的大黄鱼平均产生包囊分别为40 616、21 135和4 713个; 按照单位体质量来计算, 上述3种规格的大黄鱼产生包囊的平均数量为8.1、10.6和5.9个/g(表1)。

2.2 包囊大小、孵化率及产率研究

利用显微观察测定所采集包囊的直径为198.6~512.6 μm, 平均直径为(340.8±64.9) μm, 包囊大小主要集中在300~400 μm之间, 占到总个体数量的54.2%, 其次是直径小于300 μm的包囊, 占总个体30.6%, 直径大于400 μm包囊占15.3%。所采集的72个包囊中观测到17个死亡样本, 包囊的平均孵化率为76.4%, 按照包囊大小统计可以得出, 直径小于300 μm的包囊死亡率达到54.6%, 小于260 μm的包囊全部死亡, 而直径大于300 μm的包囊死亡率为10%。孵化实验结果显示, 单个包囊孵化幼虫数量为178~343个, 平均孵化幼虫数量为(280±42.5)个。相关性分析结果发现, 包囊直径的大小与孵化幼虫数量呈正相关, 包囊直径越长, 孵化幼虫数量越多(图1)。

2.3 刺激隐核虫幼虫体外存活时间及感染率研究

在27 °C条件下, 体外培养4 h的幼虫平均存活率达97.0%, 平均感染率达80.6%, 16 h平均存活率达到42.5%, 但平均感染率下降至9.5%, 20 h之后感染率为0(表2)。通过在显微镜下观察幼虫的运动和纤毛打动情况发现, 幼虫最长存活时间超过了24 h, 但已不具备感染能力。

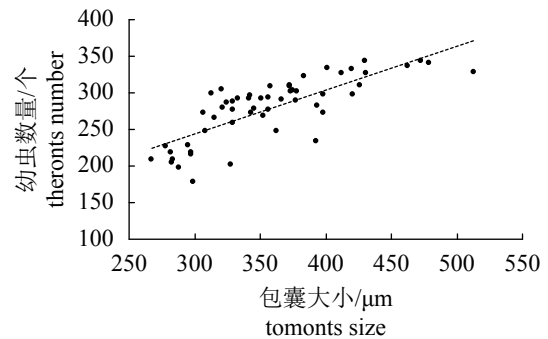


图 1 不同大小包囊孵化幼虫的数量

Fig. 1 Number of hatched theronts from each tomont in different sizes

2.4 刺激隐核虫幼虫对大黄鱼的致死、半致死浓度测定

采用SPSS 17.0软件对各实验组大黄鱼7 d的死亡率回归分析得出, 对于规格为80 g大黄鱼, 刺激隐核虫幼虫感染7 d的LD₉₀为9 712个幼虫/尾, 寇氏法得到LD₅₀为4 366个幼虫/尾(表3)。

2.5 中草药对刺激隐核虫幼虫杀灭效果

中草药HD-2对刺激隐核虫幼虫杀灭结果显示, 在27 °C条件下作用4 h内, 50 mg/L组幼虫无死亡, 经80, 100, 200和400 mg/L的HD-2复方中草药药物处理4 h后, 幼虫的死亡率分别为20%、40%、80%和100%(表4)。

2.6 中草药抑制滋养体的形成

经LD₅₀剂量攻毒后, G1、G2和G3组的大黄鱼相对感染强度较对照组显著下降, 相对感染强度分别下降32.0%、44.5%和51.8%(表5)。利用

表2 体外幼虫存活时间及感染率统计表

Tab. 2 The survival time and infection rate of *C. irritans* in vitro

| 感染时间/h infection time | 存活率/% survival rate | 感染率/% infectivity |
|--------------------------|------------------------|----------------------|
| 0 | 100.0 | 91.6±4.3 |
| 4 | 97.0±2.1 | 80.6±6.0 |
| 8 | 90.0±1.7 | 57.2±5.4 |
| 12 | 73.0±1.4 | 31.4±7.8 |
| 16 | 42.5±1.4 | 9.5±1.2 |
| 20 | 18.5±3.0 | 0 |
| 24 | 10.5±2.0 | 0 |
| 28 | 0 | 0 |

表3 不同浓度刺激隐核虫幼虫感染大黄鱼的死亡率统计

Tab. 3 Mortality of *L. crocea* infected by different concentration of theronts

| 感染用幼虫浓度/(个/mL) dose of theronts | 死亡率/% mortality |
|------------------------------------|--------------------|
| 对照 control | 0 |
| 1 000 | 0.1±0.03 |
| 3 000 | 0.2±0.05 |
| 5 600 | 0.5±0.06 |
| 8 000 | 0.8±0.06 |
| 10 500 | 0.9±0.05 |
| 12 000 | 1.0 |

表4 中草药HD-2对刺激隐核虫幼虫的杀灭效果

Tab. 4 The killing effect of drug HD-2 to *C. irritans* theronts in vitro %

| 时间/h time | 浓度/(mg/L) concentration | | | | | |
|--------------|-------------------------|----|-----|-----|-----|-------------|
| | 50 | 80 | 100 | 200 | 400 | 海水 seawater |
| 1 | 0 | 0 | 20 | 20 | 60 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 20 | 40 | 80 | 0 |
| 4 | 0 | 20 | 40 | 80 | 100 | 0 |

LD₉₀剂量的幼虫感染投喂过相应浓度中草药的健康大黄鱼的实验结果显示, 对照组、G1、G2和G3各组大黄鱼鳃片上各有107.3±16.9、63.5±13.7、47.3±4.7和45.3±3.9个滋养体, 胸鳍上各有144.3±11.3、88.5±2.7、73.8±7.3和75.8±8.2个滋养体, 投喂中草药实验组鱼体上滋养体数量较对照组显

表5 LD₅₀剂量攻毒后各实验组大黄鱼的感染情况

Tab. 5 The infection rate of each group *L. crocea* after LD₅₀ challenge

| 组别 group | 相对感染强度/% RII | 相对感染强度下降率/% reduction rate of RII |
|-------------|-----------------|--------------------------------------|
| 对照 control | 2.5±0.3 | |
| G1 | 1.7±0.2* | 32.0 |
| G2 | 1.4±0.1* | 44.5 |
| G3 | 1.2±0.3* | 51.8 |

注: “*”表示与对照组差异显著(P<0.05); 下同
Notes: “*” represents significant difference with control (P<0.05); the same below

著下降(P<0.05), G1、G2、G3组7天存活率分别达到40.0%、55.0%和58.3%, 显著高于对照组8.3%的存活率(P<0.05)(表6)。

表6 LD₉₀剂量攻毒后鳃丝、胸鳍滋养体数目及大黄鱼存活率统计表

Tab. 6 Calculation for the trophont number in gill filaments/pectoral fin and the survival rate of *L. crocea* after LD₉₀ challenge

| 组别 group | 鳃丝滋养体个数/个 trophont number in gill filaments | 胸鳍滋养体个数/个 trophont number on pectoral fin | 存活率/% survival rate |
|-------------|--|--|------------------------|
| 对照 control | 107.3±16.9 | 144.3±11.3 | 8.3 |
| G1 | 63.5±13.7* | 88.5±2.7* | 40.0 |
| G2 | 47.3±4.7* | 73.8±7.3* | 55.0 |
| G3 | 45.3±3.9* | 75.8±8.2* | 58.3 |

2.7 中草药对包囊发育的影响

投喂HD-2中草药的各实验组G1、G2和G3在进行LD₅₀攻毒后, 采集各组鱼体身上脱落的包囊, 对包囊直径和孵化率的测定结果发现, 投喂中草药组的实验组G1、G2和G3组包囊体积较对照组分别减少35.4%、36.1%和37.3%, 孵化率分别下降16.3%、23.3%和27.9%, 即包囊直径较对照组显著变短(P<0.05), 包囊的孵化率明显降低(P<0.05)(表7)(图版1-1~6)。

2.8 中草药对自然患病鱼体中虫体的抑制作用及其治疗效果

不同剂量中草药HD-2治疗自然患病大黄鱼的实验效果表明, 投喂HD-2中草药的各实验组大黄鱼掉落包囊数量在整个实验期间均呈下降趋势, 对照组却呈上升趋势。在实验第15天结束

表 7 自投喂中草药HD-2后大黄鱼所采集的刺激隐核虫包囊发育情况

Tab. 7 The diameter and hatchability of tomonts collected from *L. crocea* administered by oral HD-2

| 组别 group | 孵化率/% rate of hatchability | 孵化率下降率/% reduction in hatchability | 包囊直径/ μm tomont diameter | 体积相对减小率/% reduction in volume |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------------|
| control | 86.0 | | 359.6 \pm 62.2 | |
| G1组 | 72.3 | 16.3 | 310.4 \pm 25.3* | 35.4 |
| G2组 | 66.1 | 23.3 | 310.8 \pm 34.5* | 36.1 |
| G3组 | 62.0 | 27.9 | 307.8 \pm 28.1* | 37.3 |

时, 实验组E1、E2、E3组大黄鱼采集到的包囊数量分别较对照组下降73.1%、87.7%、93.8%($P < 0.05$)(图2)。此外, 取大黄鱼鳃丝和胸鳍观察寄生滋养体的数量发现, 口服HD-2中草药各实验组的大黄鱼鳃丝上白点(滋养体)均显著减少($P < 0.05$), 且白点萎缩变小, 肉眼难以观察, 胸鳍上有少量虫体寄生。而对照组剩余存活的大黄鱼鳃丝、胸鳍上有大量虫体寄生, 滋养体较大且容易观察(图3)。口服中草药各组大黄鱼的死亡率分别为58.3%、36.7%和21.7%, 且投喂药量高的组中鱼体活力较好; 而对照组死亡率高达83.3%, 即使是存活个体, 其健康状况较差, 呈濒死状态(图版I-7~9及图版II)。

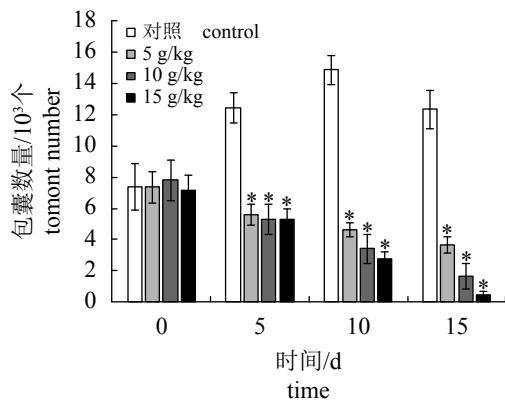


图 2 投喂不同剂量中草药HD-2各组大黄鱼产生包囊数量变化

Fig. 2 The number of tomonts collected from *L. crocea* administered by different doses of HD-2

3 讨论

3.1 刺激隐核虫的致病力分析

本实验在27 °C条件下孵化包囊, 7 d的孵化率为76.4%, 低于但学明^[17]、周旻曦^[18]报道的孵化率最大值97%, 结果的差异可能是由于虫株的来源(宿主、地理区域)、虫株营养状况和孵化时间

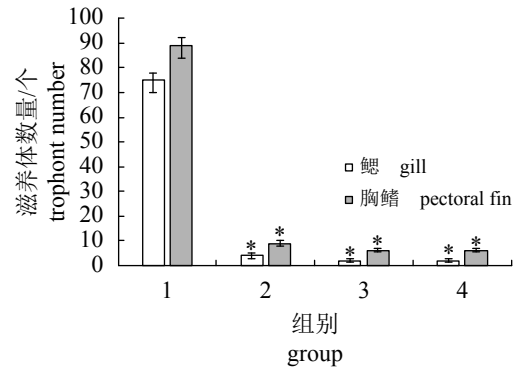


图 3 投喂不同剂量中草药HD-2各组大黄鱼鳃丝、胸鳍寄生滋养体的数量

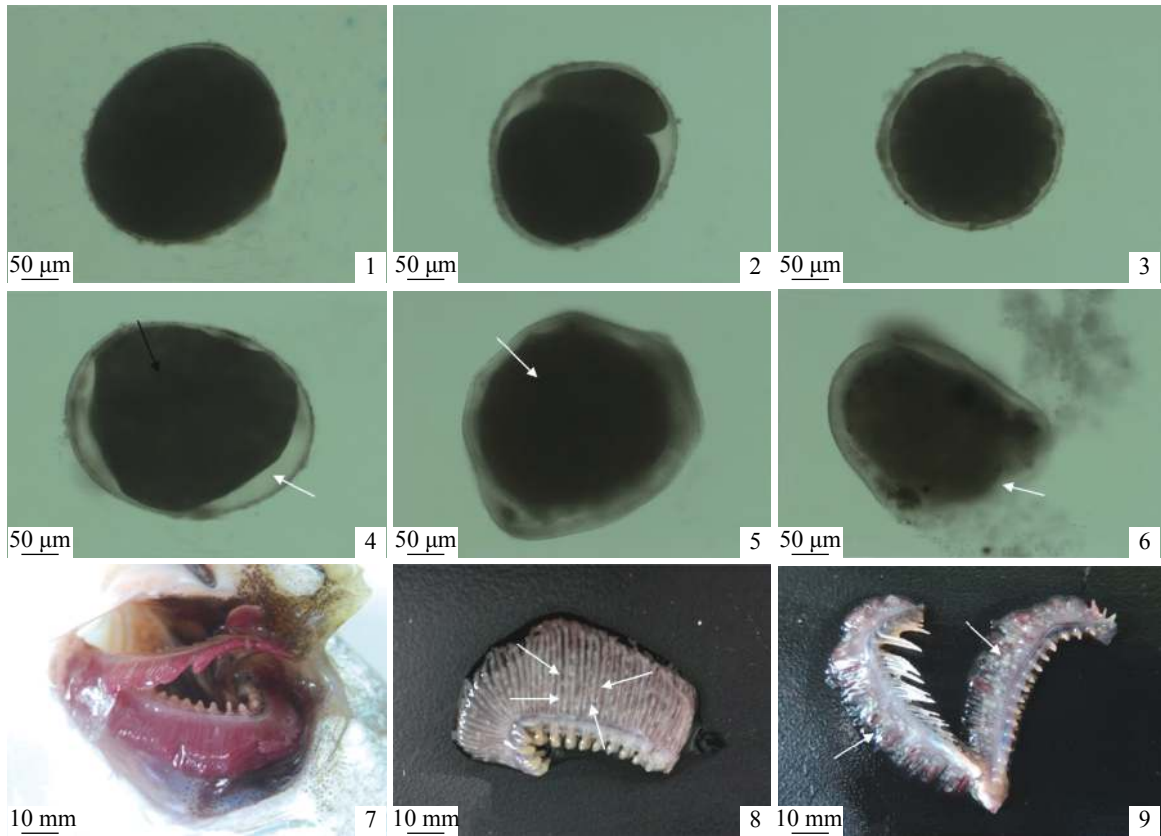
1. 对照组; 2. 2.5 g/kg组; 3. 10 g/kg组; 4. 15 g/kg组

Fig. 3 The number of trophonts parasitized in/on gill filament and pectoral fin of *L. crocea* administered by different doses of HD-2

1. control group; 2. 5 g/kg group; 3. 10 g/kg group; 4. 15 g/kg group

长短不同所致。收集的刺激隐核虫包囊直径主要集中在300~400 μm 之间, 约占到总个体的54.2%; 直径长短与孵化幼虫数量呈现正相关, 包囊直径越长, 孵化幼虫数量越多。本实验结果显示, 每个包囊的幼虫产量达到(280 \pm 42.5)个, 与Burgess等^[19]报道的结果基本相符即一个包囊可以分裂产生约292个幼虫。

刺激隐核虫幼虫虫体呈梨形, 大小在50 μm 左右, 周身布满纤毛, 能在水中快速游动。据Yoshinaga等^[10]和Nigrelli等^[20]的报道, 刺激隐核虫幼虫的存活时间分别为15和24 h, 而但学明^[17]、Colorni^[21]报道的存活时间最长达到了36 h。本实验发现, 刺激隐核虫幼虫在脱包后的存活时间最长超过了24 h, 与Nigrelli等^[20]的结果一致。幼虫感染能力随时间推移呈迅速下降趋势, 在脱包4 h后的平均感染率达80.6%, 但12 h后平均感染率下降到仅有31.4%, 20 h后虽然部分幼虫尚存活, 但已经丧失感染能力。本实验用不同浓度的刺激隐核虫幼虫感染规格为80 g的大黄鱼,



图版 I HD-2中草药对刺激隐核虫包囊发育及大黄鱼鳃组织观察

1. 正常刺激隐核虫包囊，虫体饱满、几近圆形；2. 正常刺激隐核虫包囊不对称二分裂；3. 正常刺激隐核虫包囊分裂后期，包囊内充满大小相似的小细胞；4. 口服中草药大黄鱼产生的包囊呈畸形，包囊内质结构萎缩(黑箭头)，与包囊壁有较大空隙(白箭头)；5. 口服中草药大黄鱼产生的包囊，发育过程中包囊壁坏死，内质混沌(白箭头)，不能正常发育；6. 口服中草药大黄鱼产生的包囊后期停止发育，逐渐裂解(白箭头)；7. 口服中草药大黄鱼感染刺激隐核虫后鳃丝整齐，仅有少量滋养体；8. 未服药个体感染刺激隐核虫的鳃丝，鳃丝贫血发白，有大量滋养体寄生(白箭头)；9. 未服药个体的鳃丝感染刺激隐核虫后期鳃丝呈糜烂状态(白箭头)，且有大量白色滋养体

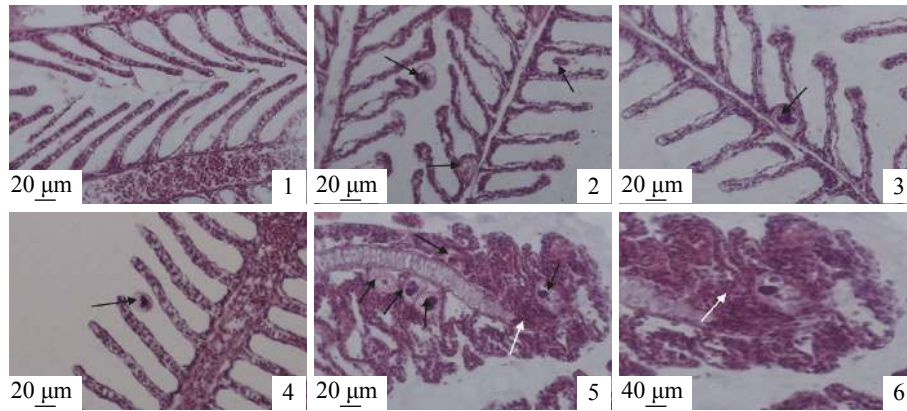
Plate I Effec of Chinese herbal medicine HD-2 on the development of *C. irritans* tomont and infected gill filaments of *L. crocea*

1. a normal tomont of *C. irritans*, round and plump; 2. a normal tomont at asymmetric fission; 3. a normal tomont filled with small cells in later fission period; 4. a tomont being malformation after HD-2 treatment, the substantial structure atrophy (black arrow) and having a large gap (white arrow); 5. a tomont could not normally developed after HD-2 treatment, the substantial structure was turbid (white arrow); 6. a tomont dead and disintegrated after HD-2 treatment (white arrow); 7. after HD-2 treatment, the gill filaments were almost normal with a few trophonts; 8. without HD-2 treatment, the gill filaments were infected with numerous trophonts (white arrow), being damaged in whitish color; 9. without HD-2 treatment, the gill filaments with numerous trophonts, was ulcerated and eroded gradually (white arrow)

结果显示，7 d的LD₉₀为9 712幼虫/尾，LD₅₀为4 366幼虫/尾，而崔晓翠^[6]等得到的LD₉₀为10 267幼虫/尾，LD₅₀为6 750幼虫/尾，江飏^[22]得到的LD₉₀为6 928~7 789幼虫/尾，结果差异可能是由虫株来源、鱼体规格及感染条件等不同引起的。

通过收集患病大黄鱼携带的刺激隐核虫数量发现，不同规格大黄鱼携带的刺激隐核虫数量不同，体型规格越大，携带数量越多；100 g规格大黄鱼产生包囊数量为10.6个/g，大于250 g和40 g 2个规格大黄鱼所产生的数量分别为8.1个/g

和5.9个/g。1尾250 g大黄鱼产生的隐核虫包囊数量可达2 025个。按照每7~10 d为刺激隐核虫的一个发育周期^[18]，刺激隐核虫病暴发期间(6—8月、10—11月)大黄鱼可重复感染并产生包囊约10次，以2016年福建省大黄鱼产量15万t(不包括幼鱼)估算^[3]，在刺激隐核虫病发生期间福建海区所产生的包囊大约是10¹³数量级。根据每个包囊约孵化280个幼虫推算，这一海区存在极大数量的幼虫，揭示了该地区多年发生刺激隐核虫病的重要原因。当然，每年包囊、幼虫产生的实际数



图版 II HD-2中草药治疗大黄鱼白点病的鳃丝组织的显微观察

1. 健康大黄鱼鳃丝, 其鳃小叶整齐, 呈梳形排列, 组织结构清晰; 2. 5 g/kg剂量HD-2服药后感染刺激隐核虫的大黄鱼鳃丝, 略有弯曲变形, 鳃丝顶部局部增生, 滋养体附着较多(黑箭头); 3. 10 g/kg剂量HD-2服药后感染刺激隐核虫的大黄鱼鳃丝排列基本整齐, 滋养体少黏附在鳃丝表皮细胞外侧(黑箭头); 4. 15 g/kg剂量HD-2服药后感染刺激隐核虫的大黄鱼鳃丝排列整齐, 组织结构清晰, 虫体未附着到鳃丝(黑箭头); 5. 未服药感染刺激隐核虫的大黄鱼鳃丝弯曲变形严重, 组织增生(白箭头), 滋养体较大且数量较多(黑箭头), 附着在表皮细胞内侧; 6. 未服药感染刺激隐核虫的大黄鱼鳃丝组织增生肿胀黏连成团状(白箭头), 结构模糊, 后期细胞坏死脱落, 组织糜烂萎缩

Plate II Microscopic observation of the gill filaments from sick *L. crocea* treated with Chinese herbal medicine HD-2

1. healthy gill filaments were neat and clearly, arranged in a comb-shaped; 2. after 5 g/kg HD-2 oral treatment to cryptococcosis *L. crocea*, the gill filaments were slightly deformed and hyperplastic, with a few trophonts parasitized (black arrow); 3. after 10 g/kg HD-2 oral treatment to cryptococcosis *L. crocea*, the gill filaments arranged orderly, a trophont adhesion outside of the epidermal cells (black arrow); 4. after 15 g/kg HD-2 oral treatment to cryptococcosis *L. crocea*, the gill filaments clearly and neatly arranged, a trophont in the middle of the gill filaments (black arrow); 5. without HD-2 treatment, the gill filaments of *L. crocea* showed serious deformed and hyperplastic (white arrow), with numerous bigger trophonts parasitized (black arrow); 6. without HD-2 treatment, the gill filaments showed serious adhesive (white arrow), ulcerated and eroded gradually

量与养殖海域的气候、水质条件、鱼体健康程度和养殖管理密切相关。

3.2 中草药抑制刺激隐核虫的世代繁殖效果

幼虫阶段是刺激隐核虫生活史4个时期中具有感染能力的关键时期, 也是自我保护能力最弱的时期^[5]。刘婷婷等^[23]发现药物浓度为4.5~9.1 g/L的槟榔、苦参(*Sophorae flavescens radix*)、大黄(*Rhei radix rhizoma*)、绵马贯众、野菊花(*Flos chrysanthemi indicis*)在1 h内对幼虫有明显的杀灭作用。本研究所用中草药HD-2将槟榔、川楝子、穿心莲等作为组方的主要成分, 当药物浓度达到400 mg/L时, 在4 h内即可将海水中刺激隐核虫的幼虫全部杀死, 具有良好的杀灭效果。

刺激隐核虫滋养体大量寄生在鳃丝上, 被一层源于上层细胞的薄膜包围, 造成鳃丝损伤、增生及充血等症状, 严重破坏鱼体的呼吸机能, 最终导致大黄鱼窒息死亡^[24]。川楝、苦楝皮(*Cortex meliae*)、绵马贯众、南瓜子(*Semen cucurbitae*)等中草药有效成分使虫体活动剧增, 出现痉挛

性收缩, 进而引起能量供应的不足, 导致其附着力下降而被驱逐^[25-26]。刘婷婷等^[23]发现药物浓度为4.5 g/L时, 槟榔对滋养体有明显的杀灭作用。本实验大黄鱼通过口服复方中草药HD-2并感染刺激隐核虫后发现, 对照组、G1、G2和G3各组大黄鱼鳃片上各有107.3±16.9、63.5±13.7、47.3±4.7、45.3±3.9个滋养体, 胸鳍上各有144.3±11.3、88.5±2.7、73.8±7.3和75.8±8.2个滋养体, 滋养体数量较对照组显著下降, 且大黄鱼的存活率显著提高; 各实验组相对感染强度较对照组分别下降了32.0%、44.5%和51.8%。

刺激隐核虫滋养体在离开宿主后发育为包裹前体, 包裹前体在很短的时间即发育形成包裹, 包裹是刺激隐核虫快速分裂增殖时期^[5]。包裹具有较强的自我保护能力, 耐受性较好, 难以被药物杀死, 成为刺激隐核虫自由生活阶段中最难防控的时期^[27-28]。Hirazawa等^[29]用中链脂肪酸处理刺激隐核虫包裹和幼虫, 表现出很强的杀灭作用。Yoshinaga等^[10]用200 mg/L盐霉素钠拌料连续投喂牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)2周, 检测到

包囊前体和包囊数目减少。本实验发现,服用中草药5、10和15 g/kg各实验组大黄鱼较对照组产生的包囊数量减少,包囊直径变小,相对体积减小率最高达37.3%;包囊孵化率较对照组分别下降16.3%、23.3%和27.9%。产生包囊当中,出现畸形包囊率升高,包囊内质结构萎缩、变形,包囊壁增厚,组织混沌等,畸形包囊不能发育或发育不良。

综上所述,大黄鱼口服复方中草药HD-2可有效减少鳃丝、鱼鳍上的滋养体数量,显著降低相对感染强度,并抑制包囊的形成和发育,降低包囊孵化率,减少幼虫的孵化数量;同时,复方中草药HD-2对海水中刺激隐核虫的幼虫具有良好的杀灭效果。由此看出,复方中草药HD-2可有效抑制刺激隐核虫的世代繁殖。

3.3 中草药对自然患病鱼体中虫体的抑制作用及其治疗效果分析

王印庚等^[16]发现由大青叶、槟榔、绵马贯众、穿心莲、川楝子等草药制成的复方中草药对大菱鲆刺激隐核虫有较好的防治效果。Kawono等^[13]使用植物提取物治疗刺激隐核虫病,取得了一定的效果。本实验发现,口服复方中草药HD-2的实验组大黄鱼鱼体掉落包囊数量均呈下降趋势,且明显少于对照组。实验第15天,对照组剩余存活大黄鱼鳃丝和体表有大量虫体寄生,游动缓慢,处于濒死状态;而服用复方中草药HD-2各实验组的大黄鱼活力较好,鳃丝上未检出滋养体,有效阻断了幼虫的二次感染,大黄鱼死亡率明显降低。因此,口服复方中草药HD-2可有效治愈感染刺激隐核虫的病鱼,降低病鱼的死亡率。

综上所述,通过口服复方中草药HD-2能够有效减少鳃丝、鱼鳍上滋养体的数量,显著降低相对感染强度,同时抑制了包囊的形成及发育,降低包囊孵化率和幼虫孵化数量,从而有效抑制刺激隐核虫的世代繁殖。从口服药物有效阻断二次感染的效果来看,其在预防和治疗大黄鱼刺激隐核虫病方面具有良好的前景。近年来,在福建地区连续多年大规模流行刺激隐核虫病,并呈现出向沿海各地蔓延的趋势,且态势愈来愈猛,造成了鱼类养殖巨大的经济损失。因此,对刺激隐核虫的流行病学研究仍需加强,掌握病原生态学与疾病暴发规律,探索

环境与生物作用机制;同时应尽快建立有效阻断刺激隐核虫感染的技术方法,为鱼类健康养殖提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 刘家富. 大黄鱼养殖与生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2013: 1-6.
Liu J F. Culture and Biology of Large Yellow Croaker[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2013: 1-6(in Chinese).
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 2011中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 28.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 28.
- [3] 农业部渔业渔政管理局. 2017中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 26.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 26(in Chinese).
- [4] 樊海平, 林煜, 钟全福, 等. 大黄鱼口服硝唑尼特后抗刺激隐核虫感染试验[J]. 福建农业学报, 2015, 30(6): 558-561.
Fan H P, Lin Y, Zhong Q F, et al. Efficacy of orally administrated nitazoxanide in treating *Cryptocaryon irritans* infection on *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(6): 558-561(in Chinese).
- [5] 崔晓翠, 王印庚, 陈霞, 等. 槟榔、川楝子复方中草药对大黄鱼4种酶活性的影响及对刺激隐核虫的杀灭效果分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 362-373.
Cui X C, Wang Y G, Chen X, et al. Effects of a Chinese herbal compound on non-specific immune activities and extermination of parasite *Cryptocaryon irritans* in *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 362-373(in Chinese).
- [6] Colorni A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* brown 1951, the cause of 'white spot disease' in marine fish: an update[J]. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1997, 1(4): 217-238.
- [7] 尹飞, 龚頌杨, 施兆鸿, 等. 刺激隐核虫感染对褐菖鲉的胁迫及鱼体的免疫应答[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4): 681-688.

- Yin F, Gong X Y, Shi Z H, *et al.* Stress and immune response of the marbled rockfish *Sebastes marmoratus* infected with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 681-688(in Chinese).
- [8] 刘振勇, 谢友侓, 林小金, 等. 感染刺激隐核虫的大黄鱼对低溶氧量的耐受力研究[J]. *福建水产*, 2012, 34(6): 471-475.
- Liu Z Y, Xie Y Q, Lin X J, *et al.* Research on tolerance of *Pseudosciaena crocea* suffered from *Cryptocaryon irritans* disease to low dissolved oxygen[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, 34(6): 471-475(in Chinese).
- [9] Pironet F N, Jones J B. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish[J]. *Aquaculture International*, 2000, 8(4): 349-361.
- [10] Yoshinaga T, Im H J, Nishida S, *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacies of ionophores against *Cryptocaryon irritans*[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(3-4): 167-172.
- [11] Hirazawa N, Goto T, Shirasu K. Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cysts and theronts[J]. *Aquaculture*, 2003, 223(1-4): 1-13.
- [12] 郑晓叶, 刘顺, 周旻曦, 等. 几种理化因子对刺激隐核虫包囊及幼虫活力的影响[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2015, 28(1): 15-20.
- Zheng X Y, Liu S, Zhou M X, *et al.* Influence of environmental factors and chemotherapeutants on *Cryptocaryon irritans* tomont and theront[J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2015, 28(1): 15-20(in Chinese).
- [13] Kawano F, Hirazawa N, Gravningen K, *et al.* Antiparasitic effect of dietary Romet[®]30(SDMX-OMP) against ciliate *Cryptocaryon irritans* infection in the red sea bream *Pagrus major* and tiger puffer *Takifugu rubripes*[J]. *Aquaculture*, 2012, 344-349: 35-39.
- [14] 邬阳, 牛素芳, 金媛, 等. 闽东海域刺激隐核虫的生活史观察及乙酸杀虫效果[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2013, 52(2): 281-288.
- Wu Y, Niu S F, Jin Y, *et al.* Observation on the life history of *Cryptocaryon irritans* in eastern sea of Fujian and research on antiparasitic effect of acetic acid[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2013, 52(2): 281-288(in Chinese).
- [15] 胡梁及, 朱盛山, 张雄飞, 等. 中草药防治寄生性鱼病的研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48(9): 66-69.
- Hu L J, Zhu S S, Zhang X F, *et al.* Research progress of Chinese herbal medicine prevention and control of parasitic diseases[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2014, 48(9): 66-69(in Chinese).
- [16] 王印庚, 刘志伟, 林春媛, 等. 养殖大菱鲆隐核虫病及其治疗[J]. *水产学报*, 2011, 35(7): 1105-1112.
- Wang Y G, Liu Z W, Lin C Y, *et al.* Cryptocaryoniosis in cultured turbot and its treatment[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 1105-1112(in Chinese).
- [17] 但学明. 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的传代、保存及刺激隐核虫病的防治研究[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- Dan X M. The propagation, preservation of *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, and control of cryptocaryoniosis[D]. Guangzhou: Jinan University, 2006(in Chinese).
- [18] 周旻曦. 大黄鱼刺激隐核虫病病原生物学特性的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
- Zhou M X. Study on the biological characteristics of *Cryptocaryon irritans* on *Pseudosciaena crocea*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012(in Chinese).
- [19] Burgess P J, Matthews R A. A standardized method for the *in vivo* maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host[J]. *Journal of Parasitology*, 1994, 80(2): 288-292.
- [20] Nigrelli R F, Ruggieri G D S J. Enzootics in the New York Aquarium caused by *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951(=*Ichthyophthirius marinus* Sikama, 1961), a histophagous ciliate in the skin, eyes and gills of marine fishes[J]. *Zoologica*, 1966, 51(9): 97-102.
- [21] Colorni A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1985, 1: 19-22.
- [22] 江飏. 大黄鱼刺激隐核虫病的防治措施研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- Jiang B. Study on prevention and treatment of *Cryptocaryon irritans* infection of cultured large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016(in Chinese).
- [23] 刘婷婷, 唐小千, 周丽. 15种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的杀灭效果及包囊破裂的条件[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 113-120.
- Liu T T, Tang X Q, Zhou L. The pesticidal effects of

- Chinese herbal medicine on the trophonts and the theronts of ciliate *Cryptocaryon irritans* and the influence of temperature and salinity on the cyst rupture[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 113-120(in Chinese).
- [24] 刘振勇, 谢友佺, 林小金, 等. 福建宁德海水鱼类刺激隐核虫病流行病学研究[J]. *福建水产*, 2014, 36(5): 351-358.
- Liu Z Y, Xie Y Q, Lin X J, *et al.* Research on the Cryptocaryoniosis of marine fishes from the perspective of epidemiology in Ningde of Fujian[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2014, 36(5): 351-358(in Chinese).
- [25] 刘松岩, 向方华, 邹忠生. 常见中草药的药理作用及其在鱼病防治中的应用[J]. *信阳农业高等专科学校学报*, 2001, 11(3): 24-25.
- Liu S Y, Xiang F H, Zou Z S. Pharmacological actions of the common medicinal herbs and the applications in prevention and control of fish diseases[J]. *Journal of Xinyang Agricultural College*, 2001, 11(3): 24-25(in Chinese).
- [26] Goto T, Hirazawa N, Takaishi Y, *et al.* Antiparasitic effects of *Sophora flavescens* root extracts on the ciliate, *Cryptocaryon irritans*[J]. *Aquaculture*, 2015, 435: 173-177.
- [27] 徐润林, 江静波, 陈毕生. 刺激隐核虫生活史的光镜观察[J]. *海洋科学*, 1992, 16(3): 42-44.
- Xu R L, Jiang J B, Chen B S. Light microscopy observation on the life cycle of the *Cryptocaryon irritans*[J]. *Marine Sciences*, 1992, 16(3): 42-44(in Chinese).
- [28] 黄玮, 马跃, 李安兴. 人工感染的刺激隐核虫各期虫体的超微结构[J]. *水产学报*, 2005, 29(5): 635-642.
- Huang W, Ma Y, Li A X. Ultrastructural study on *Cryptocaryon irritans* throughout the life cycle of artificially infecting *Trachinotus blochi*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(5): 635-642(in Chinese).
- [29] Hirazawa N, Oshima S I, Hara T, *et al.* Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocaryon irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major*[J]. *Aquaculture*, 2001, 198(3-4): 219-228.

Pathogenicity of *Cryptocaryon irritans* to *Larimichthys crocea* and Chinese herbal inhibition on the parasitic generation reproduction

JIAO Kaiqiang^{1,2}, WANG Yingeng^{2*}, RONG Xiaojun², CHEN Jia³, ZHANG Zheng²,
LIAO Meijie², LI Bin², SUN Luyu⁴, SU Yuezhong⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Fujian Fuding Seagull Fishing Food Co. Ltd., Ningde 352103, China;

4. Fujian Da Bei Nong Aquatic Technology Co., Ltd., Zhangzhou 363502, China;

5. Fujian Marine Environment & Fishery Resources Monitoring Center, Fuzhou 350003, China)

Abstract: The "white spot disease" caused by the parasitic infection of *Cryptocaryon irritans* has become one of the most serious diseases in the production of *Larimichthys crocea*. This study aims to investigate the pathogenicity of *C. irritans* to *L. crocea*, as well as the effect of Chinese herbal compound HD-2 on inhibiting the generation reproduction of parasite *C. irritans*. The number, size, the hatching rate and number of hatched theronts of tomonts produced by natural sick *L. crocea* were investigated. Then the survival time and infectivity of theront was determined *in vitro*. The effects of Chinese herbal compound HD-2 on theront, trophont, and tomont, and the therapeutic effects of oral HD-2 on diseased *L. crocea* were studied. The results showed that the total number of tomonts produced by *L. crocea* was positively correlated to the fish body weight; the average diameter of tomonts were $(340.8 \pm 64.9) \mu\text{m}$ and the hatching rate was 76.4%, and each tomont could produce (280 ± 42.5) theronts; the theront could survive for more than 24 h *in vitro* and lost their infectivity in 20 h after hatching. The 90% lethal dose (LD_{90}) of *L. crocea* infected with *C. irritans* in 7 days was 9 712 theronts/fish and the median lethal dose for 50% (LD_{50}) was 4 366 theronts/fish. HD-2 could kill theront effectively. After oral administration with different doses of HD-2 (control, 0; G1, 5 g/kg; G2, 10 g/kg; G3, 15 g/kg) for 30 days, the relative infection intensity of the *L. crocea* groups challenged with LD_{50} decreased by 32.0%, 44.5% and 51.8%, respectively. Meanwhile, the volume of tomonts reduced by 35.4%, 36.1% and 37.3% and the hatching rate reduced by 16.3%, 23.3% and 27.9%, respectively. The fish survival rate of G1, G2 and G3 challenged with LD_{90} was 40.0%, 55.0% and 58.3%, which was significantly higher than the control group (only 8.3%). Using HD-2 oral treatment for 15 d, the tomonts produced from diseased fish reduced 73.1%, 87.7% and 93.8%, and the fish mortality rate of the three groups were 58.3%, 36.7% and 21.7%, which were significantly lower than the control group (83.3%). The physiological status of *L. crocea* in the treated group was significantly better than that of the control group. Therefore, HD-2 oral treatment could effectively interrupt the secondary infection of *C. irritans*, suppress the formation and development of tomonts, reduce the tomont hatching rate and the number of hatching theronts, and then inhibit the generation reproduction of parasite *C. irritans*.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Cryptocaryon irritans*; Chinese herbal compound HD-2; interrupt infection; generation reproduction; pathogenicity

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

Funding projects: Major Science & Technology Specific Projects of Fujian Province (2013NZ0002-5); National Key Technology R&D Program of China (2012BAD17B03); Special Independent Innovation and Achievement Transformation of Shandong Province (2014ZZCX06205); Fujian Marine Fishery Programme[2009]2-12