

晏云涛,吕瑞青,项 勋,等.紫茎泽兰处理鸡球虫卵囊的免疫效果评价[J].江苏农业科学,2019,47(16):171-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.038

紫茎泽兰处理鸡球虫卵囊的免疫效果评价

晏云涛¹,吕瑞青²,项 勋¹,李 朝¹,杨建发¹,段 纲¹

(1. 云南省高校兽医公共卫生重点实验室/云南农业大学动物医学院,云南昆明 650201; 2. 成都大熊猫繁育研究基地,四川成都 610057)

摘要:为了评价紫茎泽兰对鸡柔嫩艾美尔球虫卵囊活性的抑制效果,采用不同浓度紫茎泽兰提取液处理新鲜的鸡球虫卵囊,计算各组的孢子化率,并将处理后的孢子化卵囊接种幼鸡,再进行攻毒保护试验,通过测克卵囊数(指 1 g 粪便中含有的卵囊数)、抗球虫指数等指标,综合评价紫茎泽兰对鸡球虫卵囊活性的影响。结果显示,紫茎泽兰处理组的球虫孢子化率受到不同程度的抑制,与对照组存在显著差异($P < 0.05$),对处理组幼鸡进行免疫攻毒,其存活率(100%)、抗球虫指数(186.6)、增质量率(99.6%)和病变记分(+0.7)均优于阳性对照组,且免疫组与阳性对照组抗球虫指数之间差异极显著($P < 0.01$),表明紫茎泽兰可致弱鸡球虫卵囊活性,为紫茎泽兰研制成病原致弱剂或杀虫剂奠定了基础,也为球虫致弱和球虫基因缺失苗的研究提供了新思路。

关键词:鸡球虫;紫茎泽兰;孢子化率;抗球虫指数

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)16-0171-03

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng)是一种外来入侵植物,具有极强的适应性和侵占能力,会破坏生态的多样性^[1]。紫茎泽兰危害性极强,可以引起人皮肤红肿,甚至出现接触性皮炎,牲畜容易误食紫茎泽兰,从而引起腹泻、脱毛、流产甚至死亡^[2],牛、马等动物吸入紫茎泽兰带有纤毛的种子和花粉后容易引起哮喘,用紫茎泽兰垫羊圈,可引起羊蹄腐烂^[3]。在国家生态环境部公布的首批入侵国内的 16 种外来物种黑名单中,紫茎泽兰名列第一,被称为“生物癌症”^[4]。因此,许多科研工作者将目光投向紫茎泽兰的生态利用,周世敏等研究表明,以紫茎泽兰为原料制成的生物炭的燃烧值(4.42×10^7 J/kg)明显大于以德国橡木为原材料生产的生物炭的燃烧值(3.4×10^7 J/kg)^[5];田果廷等用紫茎泽兰作栽培原料可栽培出田头菇、平菇、金针菇、柳松茸、香菇和鸡腿菇等多种食用菌,其产量高、成本低、营养丰富、食用安全^[6];王凤等以紫茎泽兰草粉为载体制成的芳香防蛀缓释剂外形完好且香味持久,可达 3 个月以上^[7]。

鸡感染球虫病(coccidiosis)主要通过摄入有活力的孢子化卵囊,凡被带虫鸡的粪便污染了的饲料、饮水、用具和土壤等,都可能传播球虫^[8-9],导致家畜饲养环境的污染。目前,鸡球虫病的防治多采用化学药物,其产生的耐药性、肉蛋产品药物残留、环境污染等问题也日趋严重^[10]。

本试验选用紫茎泽兰作用于鸡球虫卵囊,通过攻毒保护试验,观测处理后的卵囊对鸡的免疫保护效果,为将紫茎泽兰

开发为兽医临床实践的植物抑制剂、消毒剂,替代其他化学消毒药品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 球虫虫株 本试验所用鸡球虫卵囊为云南农业大学寄生虫实验室保存的鸡柔嫩艾美耳球虫,于 2017 年 11 月通过感染小鸡获得新鲜卵囊。

1.1.2 试验动物 7 日龄白羽肉鸡,2017 年 11 月购自云南省昆明市某市场,在严格消毒的无球虫环境下饲养,器具使用前严格消毒,所用饲料为自行配制,不含驱虫药物。试验前镜检粪便,确定无球虫感染。

1.1.3 主要试剂 紫茎泽兰初提液;0.5% 重铬酸钾;3% NaOH;饱和食盐水;95% 乙醇。

1.2 试验方法

1.2.1 紫茎泽兰初提液的制备 称取 500 g 紫茎泽兰粉末,加 10 倍量的 95% 乙醇,于 50 ℃ 加热浸提 4 h;依次使用 60 目、200 目网筛将浸提液过滤到灭菌广口瓶中,用布氏漏斗过滤,滤渣用 95% 乙醇再次浸提 4 h,过滤,如此重复过滤 3 次,再将每次过滤后的滤液混合;滤液经 60 ℃ 水浴旋转蒸发仪减压蒸馏至黑褐色膏状物且质量不再变化为止;将得到的膏状浓缩物用电子天平准确称质量,然后用灭菌水将膏状浓缩物配成 1 g/mL 的母液,配好的母液密封、避光,于 4 ℃ 保存备用^[11]。

1.2.2 新鲜鸡球虫卵囊的准备 用笔者所在实验室保存的鸡柔嫩艾美耳球虫卵囊接种 15 日龄鸡,接种量为 7 000 个/羽,严格消毒,分笼饲养,感染后 7 d 进行粪检,连续收集 7~9 d 的粪便,收集未孢子化的卵囊。

1.2.3 试验分组设计 在培养皿内分别加入 10 mL 0.5% 重铬酸钾溶液和 10^4 个分离的球虫卵囊,1~5 号加入一定量的紫茎泽兰液,调整其终浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、2.5% 和 5.0%,每个浓度组做 3 个平行试验;6 号加入 0.5 mL 蒸馏水

收稿日期:2018-05-09

基金项目:国家重点研发计划专项(编号:2017YFD0501405、2017YFD0501303)。

作者简介:晏云涛(1994—),女,云南昆明人,硕士研究生,主要从事畜禽寄生虫病研究,E-mail:18313958757@163.com;共同第一作者:吕瑞青(1987—),女,重庆人,硕士,初级兽医师,主要从事畜禽寄生虫病研究,E-mail:281289535@qq.com。

通信作者:段 纲,硕士,教授,主要从事畜禽药理毒理学研究。
E-mail:2396841876@qq.com。

作为阴性对照;7 号加入 0.5 mL 3% NaOH 作为阳性对照。将各培养皿放入 29 ℃ 温箱中进行孢子化培养,每天用胶头吸管间断性吹气 3 次,36 h 后显微镜下计数具有感染性卵囊的孢子化率^[12]。

1.2.4 紫茎泽兰处理后的孢子化卵囊感染动物试验 将上述试验中 5 个不同浓度处理后试验组、阴性和阳性对照组的孢子化卵囊分别接种 15 日龄幼鸡,接种剂量按照 2 000 个/羽,每组接种 20 羽幼鸡,同时设接种 0.5 mL 蒸馏水作为空白对照,接种前称取每组鸡的体质量。攻毒后 6 d 进行卵囊计数,10 d 后记录鸡死亡和增质量情况,剖杀所有鸡,进行病变记分、计算抗球虫指数(ACI)。

1.2.5 攻毒保护试验 用紫茎泽兰液处理的最佳浓度组孢子化卵囊接种(首次免疫)20 羽 15 日龄的小鸡,免疫接种剂量为 2 000 个/羽,接种后 15 d,试验组小鸡再用强毒球虫攻毒,攻毒剂量为 10⁵ 个孢子化球虫卵囊/羽,攻毒后 6 d 进行卵囊计数,10 d 后记录鸡死亡和增质量情况,剖杀全部鸡进行病变记分、计算 ACI;同时设立阳性对照组(不免疫攻毒组)、阴性对照组(不免疫不攻毒空白组)。通过上述指标综合评价紫茎泽兰液致弱球虫的免疫保护力。

1.2.6 评价指标 克卵囊数(OPG)、病变记分、血粪值和 ACI 的计算参照文献[13]。

2 结果与分析

2.1 紫茎泽兰对鸡球虫孢子化的影响

球虫卵囊孵化 3 d 后,收集各组球虫卵囊,并计算各组孢子化率,每组计算 3 次,求平均值。结果发现,与对照组相比,各紫茎泽兰处理组的球虫孢子化受到了不同程度的抑制(表

1),且通过 SPSS 22.0 数据分析软件进行方差分析显示,试验组与对照组间孢子化存在显著差异($P=0.029<0.05$)。

表 1 试验组及对照组的孢子化情况

紫茎泽兰液 终浓度(%)	培养液用量 (μL)	孢子化卵囊数 (个)	卵囊总数 (个)	孢子化率 (%)
5.0	2	40	88	45.45
2.5	2	38	75	50.67
1.0	2	52	81	64.20
0.5	2	63	94	67.02
0.1	2	64	79	81.01
阳性对照	2	105	112	93.75
阴性对照	2	77	82	93.90

2.2 紫茎泽兰处理后孢子化卵囊感染动物的结果

攻毒后 6 d,收集各组鸡粪便,用改良麦克斯特计数板计算粪便中的 OPG,结果发现,各试验组单位质量粪便卵囊数均小于阳性对照组,且随着紫茎泽兰液浓度的增加,单位质量卵囊数有逐渐减小的趋势。攻毒后 10 d,统计各组鸡的存活率、相对增质量率,剖杀鸡,进行病变记分,统计血粪值、ACI,见表 2。结果显示,与对照组相比,各试验组和阴性对照组的鸡未有死亡;阴性对照组鸡肠道无病变发生,各试验组鸡肠道病变程度较阳性对照组轻,详见图 1 至图 7。说明紫茎泽兰液对鸡具有一定的免疫保护性。各试验组的相对增质量率和抗球虫指数均高于阳性对照组,各相对增质量率和抗球虫指数随着紫茎泽兰液终浓度的增加也呈提高的趋势,且 5.0% 和 2.5% 浓度组表现出了中等抗球虫效果。SPSS 22.0 数据分析显示,试验组与阳性对照组间抗球虫指数存在显著差异($P=0.018<0.05$)。



图1 3% NaOH 阳性对照组



图2 蒸馏水阴性对照组



图3 0.1% 紫茎泽兰处理组



图4 0.5% 紫茎泽兰处理组



图5 1% 紫茎泽兰处理组



图6 2.5% 紫茎泽兰处理组

2.3 紫茎泽兰处理后孢子化卵囊的免疫保护结果

在免疫攻毒后 6 d,收集紫茎泽兰 5% 浓度试验组与对照组鸡粪便,用改良麦克斯特计数板计算 OPG,结果发现,试验组的克卵囊数显著少于阳性对照组,阴性对照无球虫卵囊检出,详见表 3。免疫攻毒后 10 d,统计各组鸡存活率、相对增质量率,剖杀鸡,进行病变记分,统计血粪值,计算 ACI,发

现试验组鸡未有死亡,肠道病变较轻微,只有少量出血,见图 8 至图 10。相对增质量率和抗球虫指数都显著高于阳性对照组,且抗球虫指数 > 180,属于高效抗球虫,经 SPSS 22.0 数据分析显示,免疫组与阳性对照组抗球虫指数之间差异极显著($P=0<0.01$)。由此可见,经紫茎泽兰处理的球虫卵囊对鸡有良好的免疫保护性。



图7 5% 紫茎泽兰处理组

3 讨论

已有报道表明,紫茎泽兰具有抑制动物寄生虫虫体或虫卵活性的效果。在 26 ℃ 条件下,紫茎泽兰花叶提取液作用于马圆线虫虫卵,隔天取样 5 g 用漂浮法记录虫卵孵化情况,表明高浓度浸泡液中虫卵的检出率较低,孵出的幼虫不能正常发育^[14];不同分子质量的紫茎泽兰液作用于未孢子化的孔雀球虫卵囊会抑制其卵囊活性^[15];椎实螺放入紫茎泽兰不同浓

表 2 各组抗球虫活性

评价指标	紫茎泽兰液终浓度(%)					阳性	阴性
	5.0	2.5	1.0	0.5	0.1		
OPG(× 100)	26	48	106	120	156	196	0
存活率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	64.5	100.0
相对增质量率(%)	99.2	98.3	96.9	82.8	79.7	75.0	100.0
卵囊值	10	10	20	20	20	40	0
平均病变记分	+1.2	+1.4	+1.7	+2.3	+2.8	+3.6	0.0
血粪值	1	1	2	5	8	10	0
ACI	176.2	173.7	157.9	134.8	123.7	53.5	200.0

表 3 各组抗球虫活性

评价指标	免疫组	阳性对照组	阴性对照组
OPG(× 100)	18	179	0
存活率(%)	100.0	70.4	100.0
相对增质量率(%)	99.6	72.0	100.0
卵囊值	5	40	0
平均病变记分	+0.7	+3.8	0
血粪值	1	10	0
ACI	186.6	54.4	200.0

度不同部位的浸泡液中,根茎花叶都具有杀灭螺的效果,仅作用时间长短不同^[16];紫茎泽兰 95% 乙醇提取物对兔痒螨和疥螨具有较强的离体杀灭活性;紫茎泽兰石油醚萃取物对牛足螨也有较强的离体杀灭活性^[17];紫茎泽兰经甲醇石油醚丙酮萃取后对黏虫触杀效果较好的部位是花和叶^[18]。

云南省多样的气候环境,导致云南省很多养鸡场时有球虫病发生,据报道,云南省多数养鸡场球虫病的防治成本占全部防治疾病成本的 30%^[19]。在临床上,抗球虫药分为聚醚类离子载体抗生素和化学合成药,其对球虫的防控和治疗发挥



图8 阴性对照组



图9 未免疫攻毒组



图10 免疫攻毒组

了重要的作用,但由于药物滥用,导致耐药虫株产生、药物残留、污染环境等问题;部分鸡场联合使用多价球虫疫苗,而疫苗使用不当导致鸡发病的情况时有发生,多价疫苗的使用也有可能给当地带来以前没有的球虫新种。为此,开发新型植物抗球虫药就显得尤为迫切。袁铭雅用紫茎泽兰治疗鸡球虫病,能干扰虫卵的正常孵化过程,抑制卵囊的生长繁殖^[20];谭文彪等用紫茎泽兰花的第三级提取物治疗鸡球虫病,其抗球虫指数为 180.20,疗效达到高效^[21];和晓银用紫茎泽兰的异丙醇提取物 2 级分离物对鸡球虫病的治疗效果 ACI 为 174,属于中效偏上^[22]。

结果表明,各试验组 ACI 随紫茎泽兰液浓度的增加而增大,各试验组 OPG 随紫茎泽兰液浓度的增加有逐渐减小的趋势,提示紫茎泽兰提取物能有效抑制鸡球虫卵囊的活性。

4 结论

本试验用紫茎泽兰提取液处理后的球虫孢子化率显著低于对照组,紫茎泽兰作用的试验组抗球虫指数显著高于阳性对照组,且抗球虫指数 > 180,属于高效抗球虫,说明紫茎泽兰抑制了鸡球虫孢子化阶段的活性。

参考文献:

[1]刘选富,张亚奇. 紫茎泽兰(*Eupatorium adenophora*)对云南松林生物多样性的影响[J]. 四川林勘设计,2016(2):39-44.
[2]刘伯言. 入侵植物紫茎泽兰的资源化利用研究[D]. 北京:中国科学院大学,中国科学院过程工程研究所,2017.
[3]李霞霞,张钦弟,朱珣之. 近十年入侵植物紫茎泽兰研究进展

张燕萍,章海鑫,傅义龙,等. 黄尾鲮的胚胎发育[J]. 江苏农业科学,2019,47(16):174-178.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.039

黄尾鲮的胚胎发育

张燕萍¹, 章海鑫¹, 傅义龙¹, 崔 瑾², 刘志放², 范鸿潮²

(1. 江西省水产科学研究所, 江西南昌 330000; 2. 江西省萍乡市水产科学研究所, 江西萍乡 337000)

摘要:以人工繁殖获得的黄尾鲮受精卵为材料,运用 Olympus 倒置荧光显微镜对黄尾鲮胚胎发育过程进行连续观察。结果显示,成熟黄尾鲮卵的卵径为 (1.1 ± 0.04) mm,吸收膨胀后卵膜径为 (1.50 ± 0.08) mm。在水温为 (25.0 ± 0.5) °C 的条件下,黄尾鲮受精卵历时 26 h 35 min 孵化出膜,出膜仔鱼全长 (4.60 ± 0.12) mm。从受精到孵化出膜的总积温为 763.35 °C · h。根据胚胎发育过程形态特征,将黄尾鲮胚胎发育过程分为受精卵期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官发生期和出膜期 7 个阶段 36 个发育时期。

关键词:黄尾鲮;胚胎发育;时序;分期;特征

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)16-0174-05

黄尾鲮(*Xenocypris davidi* Bleeker)俗称黄尾、黄片、黄姑子、黄瓜鱼等,隶属于鲤科(Cyprinidae)鲮亚科(Xenocyprininae)鲮属(Xenocypris),属底层鱼类,通常生活在江河、湖泊的中下层,尤其喜生活在多水草、软泥底质的水域底层,是一种中小型淡水鱼类^[1]。由于其具有肉厚、质实,味

道鲜美、营养价值高和调控水质等特点,已成为当前水产养殖品种结构调整中首选优良品种之一。

目前,国内有关黄尾鲮,在育苗与养殖方面已有很多不同层面的研究与报道,如凌志勇等在人工繁殖、育苗及养殖技术等方面的报道,但未见黄尾鲮胚胎发育生物学方面的研究报道,其胚胎发育过程中的形态特征观察及相应阶段发育时序仍为研究空白^[2-4]。本研究于 2017 年 5 月对萍乡市水产科学研究所引进的黄尾鲮亲鱼进行人工催产,获得了黄尾鲮受精卵并孵化出膜,并对其胚胎发育全过程进行观察,阐明了黄尾鲮胚胎的发育规律,丰富了黄尾鲮早期的生活史资料,并为进一步开展黄尾鲮人工养殖和野生资源保护提供基础资料和

收稿日期:2018-05-11

基金项目:江西省科技计划(编号:20141BBF60036);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303056-6)。

作者简介:张燕萍(1979—),女,江西吉安人,博士,副研究员,主要从事鱼类遗传育种、渔业生态环境和渔业资源调查研究。E-mail: zhangyanpingxie@163.com。

[J]. 草业科学,2017,34(2):283-292.

[4]李永明,李正跃,叶 敏. 紫茎泽兰不同部位的化学成分及其生物活性[J]. 云南农业大学学报,2008,23(1):42-46,72.

[5]Zhou S M, Ou G T. Technology in utilization of Eupatorium adenophorum biomass energy [J]. Agricultural Engineering & Agricultural Machinery, 2014, 15(6): 1037-1038, 1057.

[6]田果廷,徐学忠,杨琼芬,等. 利用紫茎泽兰栽培田头菇的研究[J]. 中国食用菌,2004(4):13-15.

[7]王 凤,赵 静,刘 强,等. 紫茎泽兰基芽香防蚊缓释剂的制备与性能研究[J]. 中国农学通报,2013,29(18):175-179.

[8]Wattarang E, Thebo P, Lunden A, et al. Monitoring of local CD8 β -expressing cell populations during Eimeria tenella infection of naive and immune chickens[J]. Parasite Immunology, 2016, 38(8): 453-467.

[9]夏维福,郭冬生,李龙辉,等. 不同抗球虫药物对鸡球虫病疗效对比试验[J]. 江苏农业科学,2009(3):256-258.

[10]陈希文,房春林,郭晓萍,等. 鸡柔嫩艾美耳球虫绵阳地方株的分离鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学,2010(6):315-317.

[11]张妙直,田兆丰,刘佳磊,等. 紫茎泽兰提取物对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学,2010,38(12):6090-6091,6105.

[12]周作勇,王芝英,胡世君,等. 6 种杀虫剂对鸡柔嫩艾美耳球虫卵

囊孢子化率及致病力的影响[J]. 中国兽医杂志,2015,51(3): 91-94.

[13]索 勋. 鸡球虫学[M]. 北京:中国农业大学出版社,1998:257.

[14]赵 平,王荣琼,杨晓乾,等. 恒温条件下紫茎泽兰花、叶提取液对马圆线虫虫卵的孵化试验[J]. 山东畜牧兽医,2010,31(11): 2-3.

[15]王荣琼,袁飞洲,吕瑞青,等. 紫茎泽兰液对孔雀球虫活性的影响[J/OL]. 云南农业大学学报(自然科学版),2013,28(6): 917-919.

[16]李 兵,赵 平,陈 娟,等. 紫茎泽兰浸泡液对椎实螺杀灭效果观察[J]. 安徽农业科学,2009,37(9):4069-4070.

[17]农 向. 紫茎泽兰提取物对动物寄生螨类的杀灭效果及杀虫活性成分研究[D]. 雅安:四川农业大学,2013.

[18]王云海,付立会,黄修芬,等. 紫茎泽兰提取物对粘虫触杀作用研究初探[J]. 中国农学通报,2016,32(2):61-67.

[19]王 昊,路义鑫. 禽类球虫病的防治[J]. 畜牧兽医科技信息, 2013(4):96-97.

[20]袁铭雅. 用紫茎泽兰治疗鸡球虫病的研究[J]. 当代畜牧,2015(23):64-65.

[21]谭文彪,朱玉苹,王李松,等. 利用紫茎泽兰花第三级提取物治疗鸡球虫病试验[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):227-229.

[22]和晓银. 用紫茎泽兰叶异丙醇提取物二级组分治疗鸡球虫病的实验[J]. 畜禽业,2016(7):14-15.