

## 艾美耳混合球虫对高原鼠兔致死毒力的初步研究

边疆晖<sup>1</sup> 曹伊凡<sup>1</sup> 杜寅<sup>1,2</sup> 杨乐<sup>1,2</sup> 景增春<sup>1</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) (2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 球虫是专一性地寄生于宿主体内且对宿主有很强致死性的一种原生动植物。艾美耳球虫是高原鼠兔的主要寄生物。利用艾美耳球虫防治高原鼠兔将具有重要的生态学意义和应用价值。本研究通过人工感染不同剂量的艾美耳混合球虫研究了对高原鼠兔的致死毒力。高原鼠兔的成体死亡率与球虫的感染剂量呈正相关关系, 感染  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量的球虫可导致大部分高原鼠兔成体死亡, 而感染  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量的球虫可导致全部亚成体死亡; 成体和亚成体的死亡率无性别间的差异, 其死亡时间分别为第4 d和第8 d。感染  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量球虫的高原鼠兔随粪便排出的卵囊数量最大。本研究结果表明, 艾美耳球虫对高原鼠兔的非急性致死效应类似于慢性杀鼠剂的作用。如果野外大剂量投放艾美耳球虫制剂后, 不仅有望短期内有效降低高原鼠兔种群数量, 而且其控制效果可具长效性的潜在优点。

**关键词:** 艾美耳球虫; 高原鼠兔; 生物防治; 死亡率

中图分类号: Q958

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2011) 03-0299-07

Effects of Parasitic Eimerians (*Eimeria cryptobarretti* and *E. klondikensis*) on mortality of plateau pika (*Ochotona curzoniae*)BIAN Jianghui<sup>1</sup>, CAO Yifan<sup>1</sup>, DU Yin<sup>1,2</sup>, YANG Le<sup>1,2</sup>, JING Zengchu<sup>1</sup>

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** *Eimeria*, one of several genera of protozoans in the phylum Apicomplexa referred to as coccidian, is highly host specific. Infection with coccidia seriously impairs the growth and survival of hosts. Coccidia, thus, potentially are excellent agents for biological control of rodents. We studied effect of coccidia on mortality of plateau pikas (*Ochotona curzoniae*). Pikas were given  $6000 \times 10^4$ /mL,  $600 \times 10^4$ /mL,  $60 \times 10^4$ /mL,  $6 \times 10^4$ /mL and  $0.6 \times 10^4$ /mL oocysts each of *Eimeria cryptobarretti* and *E. klondikensis* for adults, or  $600 \times 10^4$ /mL,  $60 \times 10^4$ /mL,  $6 \times 10^4$ /mL of each for sub-adults, by stomach intubation. The prepatent period of adult death was 8 days. The mortality rate among infected pikas was dependent on the initial quantity of oocysts administered. Infection with  $600 \times 10^4$ /mL oocysts caused most adults to die. In addition, a majority of sub-adults also died after 4 days when they were infected with  $60 \times 10^4$ /mL oocysts. Not significant difference in mortality was found between males and females. The group infected with  $60 \times 10^4$ /mL oocysts produced more oocysts than other groups. Our results suggest that it is possible that coccidia, as agents of biological rodent control, could reduce the damages of pika to grassland.

**Key words:** Biological control; Coccidian, *Eimeria*; Mortality; Plateau pika

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 为青藏高原特有的植食性小哺乳动物。近几十年来, 高原鼠兔引发的鼠害问题已成为制约青藏高原畜牧业经济可持续发展的瓶颈, 并危及青藏高原的生态环境安全。目前对高原鼠兔的防治工作长期依赖 C 型肉毒梭菌毒素, 该肉毒素对环境和非靶动物存在潜在的危害性, 其防治效果缺乏长效性以及鹰架控制效果见效慢等问题。

在自然环境中, 艾美耳球虫是高原鼠兔的主要寄生物。艾美耳球虫隶属原生动植物门的艾美耳科艾美耳属 (*Eimeria*)。目前, 鼠兔属动物寄生有 18 个艾美耳属球虫种 (Leep *et al.*, 1972, Duszynski and Brunson, 1973; Horrs and Samuel, 1974), 而在高原鼠兔中发现有 7 个艾美耳属球虫种 (Cao *et al.*, 2009, 曹伊凡等, 2011)。球虫具有以下重要的生物学特性: 1) 对宿主具有较强的致死率 (殷佩云

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30970463, 30770351); 中国科学院西部之光联合学者项目

作者简介: 边疆晖 (1964-), 男, 研究员, 主要从事鼠类种群生态学和鼠害防治研究工作。

收稿日期: 2010-11-15; 修回日期: 2011-03-18

等, 1990a, 1990b; 张龙现等, 1999; 杜爱芳, 2001)。在畜牧业中, 球虫病是危害最为严重的寄生虫病之一。美国每年因球虫病对养禽业造成 15 亿美元的损失 (Yun *et al.*, 2000); 2) 球虫对宿主的致死性具有年龄间差异, 对亚成体或幼仔有很高的感染率和致死率 (张龙现等, 1999; Newman *et al.*, 2001; Hakkarainen *et al.*, 2007), 因而, 球虫可作为宿主种群波动的调节因子而影响种群数量 (Fuller and Blaustein, 1996; Newman *et al.*, 2001; Hakkarainen *et al.*, 2007); 3) 球虫对宿主的感染具有很好的种属特异性。虽然球虫对宿主的特异性依宿主不同而有变化, 但都限定在同属不同种或同科不同属间的交叉感染 (Lindsay and Todd, 1993; Wilber *et al.*, 1998; Hnida and Duszynski, 1999)。因而, 将球虫应用于控制高原鼠兔, 对非靶动物具有很好的安全性。

在鼠类防治的实践活动中, 理想的防治技术应具备最大程度地降低对非靶生物及环境的危害、防治效果具有见效快和可持续性等特点。生物控制为有害动物防治的主要发展方向, 如果能将艾美耳球虫应用于控制高原鼠兔种群数量, 可能具控制效果见效快、长效性和安全性等特点, 符合鼠类防治实践活动的要求。

本研究通过人工感染艾美耳球虫以测定对高原鼠兔的致死毒力, 其目的为应用艾美耳球虫控制高原鼠兔提供实验依据和工作基础。本研究预测, 高原鼠兔人工感染艾美耳球虫后, 可显著增加其死亡率; 且亚成体死亡率显著大于成体。此外, 有研究表明, 感染大剂量和低剂量球虫可降低宿主的排卵量 (Fuller and Wrosch, 1995), 因此, 本研究还预测, 感染中剂量球虫的高原鼠兔的排卵量相对较大。

## 1 研究方法

### 1.1 实验动物

高原鼠兔捕自中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站地区。2010年3月和6月分别活捕72只成体 (雄体46只, 体重为  $159.90 \pm 2.37$  g; 雌体26只, 体重为  $146.84 \pm 3.28$  g) 和45只亚成体 (雄体21只, 体重为  $86.43 \pm 7.23$  g; 雌体24只, 体重为  $77.04 \pm 4.33$  g)。将高原鼠兔带回实验室后, 单只饲养于饲养笼内。该笼具为全不锈钢水冲式兔笼 (40 cm  $\times$  30 cm  $\times$  22 cm), 兔笼底层有一可抽取的活动托盘, 可供收集粪便使用。

为准确测定感染剂量对实验个体的致死率, 用于实验的全部个体均为无球虫感染个体。由于在不发生重复感染的情况下, 球虫感染为自限性, 为此, 在实验前, 每天冲洗饲养笼具, 并在  $100^\circ\text{C}$  干烤 1 h。同时收集粪便, 用常规饱和盐水漂浮法检查球虫卵囊。若连续 3 d 未从粪便中监测到球虫的个体, 被认为是无球虫感染个体, 备选用于实验。在实验前和实验期间, 给动物提供充足的兔颗粒饲料 (北京实验动物饲养中心生产) 和饮水, 并附加少量胡萝卜。室温和光周期均为自然环境的温度和光照。

### 1.2 混合球虫

2009年6月在疑似球虫病死亡的2只高原鼠兔的肠道内容物中, 用常规的饱和盐水漂浮法分离出球虫卵囊, 加入 2.5% 的重铬酸钾溶液, 置于  $27^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  的恒温培养箱, 培养至孢子化。之后, 经多次卵囊增殖, 最后获得 *E. cryptobarretti* 和 *E. klondikensis* 的混合球虫卵囊 (在混合卵囊中分别占 69% 和 31%)。

### 1.3 实验处理

为测定球虫对成体的致死率, 将无球虫感染的成体随机分为 6 组, 分别经口感染  $6\ 000 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 6$ ,  $\eta n = 2$ )、 $600 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 7$ ,  $\eta n = 5$ )、 $60 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 7$ ,  $\eta n = 5$ )、 $6 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 6$ ,  $\eta n = 5$ ) 和  $0.6 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 7$ ,  $\eta n = 3$ ) 艾美耳混合球虫卵囊 1 mL。对照组以同样的方法经口灌注 1 mL 水 ( $\delta n = 9$ ,  $\eta n = 5$ )。在亚成体中, 将无球虫感染的实验个体随机分为 4 组, 分别经口感染  $600 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 5$ ,  $\eta n = 5$ )、 $60 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 5$ ,  $\eta n = 7$ ) 和  $6 \times 10^4$  个/mL ( $\delta n = 5$ ,  $\eta n = 8$ ) 艾美耳混合球虫卵囊 1 mL, 对照组个体以同样的方法经口灌注 1 mL 水 ( $\delta n = 5$ ,  $\eta n = 3$ )。

在实验期间, 为排除实验个体感染球虫后排出的卵囊对实验结果的混淆效应, 每天换洗笼具, 并用沸水烫洗。从感染第一天开始, 每日 9:00 ~ 11:00, 对每个个体随机采集 2 g 粪便, 以测定每克粪便中的卵囊数, 并于每天 8:30、11:30、15:00 和 17:30 检查高原鼠兔死亡情况。对死亡个体进行尸体解剖, 取肠道内容物, 采用饱和盐水漂浮法, 显微镜下观察漂浮液中是否存在球虫卵囊。如果死亡个体的肠道内没有检测到球虫, 说明该个体没有被球虫感染, 因而被认为是非球虫感染因素所致死。实验于感染球虫后的第 15 d 结束。

采用麦克马斯特法 (McMaster's method) 计数每克粪便的球虫数, 即取 2 g 粪便, 加 20 mL 饱和盐水混匀, 分别经 20 目、40 目和 100 目滤筛过滤, 取 1 mL 滤液, 再加入 9 mL 水, 将稀释液边摇晃边用吸管吸出少量滴入麦克马斯特氏计数板的计数室内, 置于显微镜台上, 静置几分钟后, 用低倍镜将 2 个计数室内的卵囊全部数完, 取平均值, 再换算为每克粪便中的卵囊数。

#### 1.4 数据分析

致死率 (%) = (实验期间总的死亡个体数/样本数) × 100%。在数据分析中, 首先, 采用  $\chi^2$  分析了不同处理组间的死亡率差异。为进一步分析艾美耳球虫的致死效应, 剔除非球虫致死的个体后, 用相同方法分析不包含对照组的各个感染组间的死亡率差异。检验统计值采用对数似然比方法计算的卡方 (Likelihood ratio, LR)。

为分析艾美耳球虫对实验个体的致死时间, 采用  $\chi^2$  分别测定成体和亚成体各处理组间死亡时间分布的差异。为分析艾美耳球虫感染剂量与死亡率间的关系, 对死亡率和感染剂量分别进行反正弦和对数转换后, 进行了线性回归分析。在该分析中, 尸检后肠道内容物有球虫的个体作为有效样本。对照没有包含在此分析中。为分析不同感染剂量对实验个体排卵量的影响以及探讨艾美耳球虫对高原鼠兔种群的持续效应, 采用单因素 ANOVA 方法测定了不同剂量组在排卵期的平均每天排卵量间的差异, 若处理效应显著, 采用 Tukey 方法进行多重比较分析。排卵量以每克粪便中的卵囊数计。所有统计分析在 SPSS.10 上进行, 统计显著水平为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 高原鼠兔感染艾美耳混合球虫的临床症状

除感染  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组的个体无明显症状外, 其余剂量组个体在感染混合球虫后的第 6 d 逐渐呈现不同程度的精神沉郁、食欲不振。在第 8 ~ 11 d, 精神严重抑郁、被毛逆立、眼球凹陷、食欲极差甚至废绝, 排少量的干粪球或水样稀便或血便。13 d 后, 存活个体的食欲、精神才有不同程度的恢复, 粪便转为正常。死亡个体无急性发病特征。

### 2.2 艾美耳混合球虫对高原鼠兔的致死效应

在成体中, 不同剂量组的高原鼠兔死亡率具有显著差异 (LR  $\chi^2 = 15.369$ ,  $P = 0.009$ , 图 1), 其中,  $6000 \times 10^4$  个/mL 和  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组

的死亡率最高, 分别为 87.50% 和 69.23%, 二者间无显著差异 (LR  $\chi^2 = 0.976$ ,  $P = 0.323$ ), 但分别与对照有显著差异 ( $6000 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 9.7400$ ,  $P = 0.002$ ;  $600 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 6.499$ ,  $P = 0.011$ )。  $6 \times 10^4$  个/mL 和  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组死亡率最低, 分别为 27.27% 和 30.00%, 二者间无显著差异 (LR  $\chi^2 = 0.019$ ,  $P = 0.890$ ); 与对照组也无显著差异 ( $6 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 0.115$ ,  $P = 0.735$ ;  $0.6 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 0.227$ ,  $P = 0.634$ )。  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组的死亡率居中, 为 50.00%, 与对照也无显著差异 (LR  $\chi^2 = 2.358$ ,  $P = 0.125$ )。

对全部死亡个体尸检后发现,  $6000 \times 10^4$  个/mL 剂量组中, 6 只死亡雄性和 2 只死亡雌性中各有 1 只未发现球虫卵囊;  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组中, 4 只死亡雌性中有 1 只未发现球虫卵囊;  $6 \times 10^4$  个/mL 组中, 3 只死亡雄性中有 2 只未发现球虫卵囊;  $0.6 \times 10^4$  个/mL 组中, 只有 1 只雄性死亡, 但无球虫卵囊, 2 只雌性死亡个体中有 1 只未发现球虫卵囊。剔除这些非球虫致死个体后,  $\chi^2$  分析的结果表明, 5 个不同感染剂量组 ( $6000 \times 10^4$  组至  $0.6 \times 10^4$  组) 间的死亡率依然有显著差异 (LR  $\chi^2 = 16.838$ ,  $P = 0.002$ ), 其中,  $6000 \times 10^4$  个/mL、 $600 \times 10^4$  个/mL 和  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组分别与  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组 ( $6000 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 25.008$ ,  $P < 0.001$ ;  $600 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 7.730$ ,  $P = 0.005$ ;  $60 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 4.930$ ,  $P = 0.026$ ) 和  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组 ( $6000 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 24.057$ ,  $P < 0.001$ ;  $600 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 6.964$ ,  $P = 0.008$ ;  $60 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 4.384$ ,  $P = 0.036$ ) 有显著差异, 但没有发现性别间的显著差异 (LR  $\chi^2 = 4.532$ ,  $P = 0.339$ , 图 1)。

在亚成体中, 不同剂量组的死亡率也具有显著差异 (LR  $\chi^2 = 16.820$ ,  $P = 0.001$ , 图 2), 其中,  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组和  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组的死亡率均为 100.00%, 分别与对照有显著差异 ( $600 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 10.689$ ,  $P = 0.001$ ;  $60 \times 10^4$  组: LR  $\chi^2 = 11.908$ ,  $P = 0.001$ )。  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组的死亡率为 75.00%, 也与对照有显著差异 (LR  $\chi^2 = 5.032$ ,  $P = 0.025$ )。对全部死亡个体的尸检发现, 在  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组中的 5 只雄性个体全部死亡, 其中, 仅 1 只未发现球虫感染。在剔除该非球虫致死个体后, 3 个不同感染剂量组间的死亡率无显著差异 (LR  $\chi^2 = 4.633$ ,

$P = 0.099$ ), 也无性别间差异 ( $LR \chi^2 = 0.257$ ,  $P = 0.879$ ) (图2)。

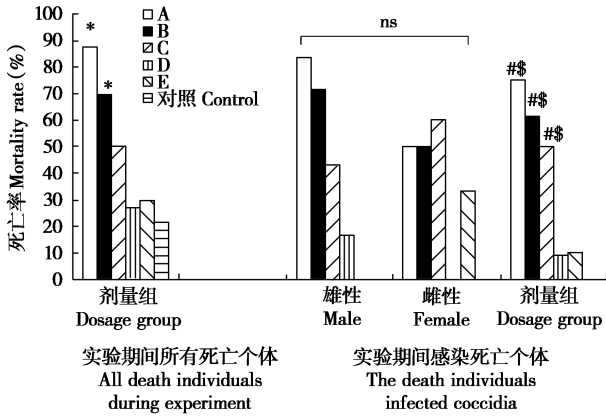


图1 艾美耳混合球虫对高原鼠兔成体的致死率. \*: 与对照有显著差异; #: 与  $6 \times 10^4$  组有显著差异; \$: 与  $0.6 \times 10^4$  组有显著差异; ns: 性别间无显著差异. A:  $6000 \times 10^4$  个/mL 剂量组; B:  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组; C:  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组; D:  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组; E:  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组  
Fig. 1 Mortality rates of adults among plateau pikas infected with a mix of coccidia including two Eimerians. \*:  $P < 0.05$  vs Control; #:  $P < 0.05$  vs  $6 \times 10^4$  /mL group; \$:  $P < 0.05$  vs  $0.6 \times 10^4$  /mL group; ns: no significant difference. A:  $6000 \times 10^4$  /mL group; B:  $600 \times 10^4$  /mL group; C:  $60 \times 10^4$  /mL group; D:  $6 \times 10^4$  /mL group; E:  $0.6 \times 10^4$  /mL group

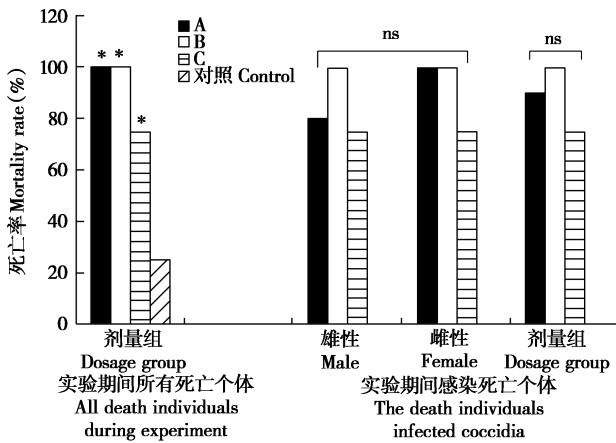


图2 艾美耳混合球虫对高原鼠兔亚成体的致死率. \*: 与对照有显著差异; ns: 无显著差异. A:  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组; B:  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组; C:  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组  
Fig. 2 Mortality rate of sub-adult plateau pikas infected with a mix of coccidia including two Eimerians. \*:  $P < 0.05$  vs Control; ns: no significant difference. A:  $600 \times 10^4$  /mL group; B:  $60 \times 10^4$  /mL group; C:  $6 \times 10^4$  /mL group

### 2.3 高原鼠兔不同年龄死亡率比较

对感染同一剂量的成体和亚成体死亡率的  $\chi^2$  分析结果表明,  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组中, 成体和亚成体间的死亡率无显著差异 ( $LR \chi^2 = 2.577$ ,  $P = 0.108$ , 图1, 2), 但是,  $60 \times 10^4$  个/mL 和  $6 \times$

$10^4$  个/mL 剂量组的亚成体死亡率分别显著大于成体死亡率 ( $60 \times 10^4$  组:  $LR \chi^2 = 10.357$ ,  $P = 0.001$ ;  $6 \times 10^4$  组:  $LR \chi^2 = 11.294$ ,  $P = 0.001$ , 图1, 2)。

### 2.4 艾美耳混合球虫感染剂量与高原鼠兔死亡率间的关系

在成体中, 球虫感染剂量与个体死亡率之间存在显著的回归关系 ( $F_{1,3} = 31.778$ ,  $P = 0.011$ ), 但在亚成体中, 二者之间无显著相关关系 ( $F_{1,1} = 0.156$ ,  $P = 0.761$ )。

### 2.5 艾美耳混合球虫对不同年龄高原鼠兔的致死时间分布

成体感染球虫后, 第8 d开始出现死亡, 各剂量组间的死亡时间分布无显著差异 ( $LR \chi^2 = 34.412$ ,  $P = 0.188$ , 图3a)。亚成体第4天开始出现死亡, 各剂量组间的死亡时间分布也无显著差异 ( $LR \chi^2 = 23.043$ ,  $P = 0.060$ , 图3b)。但是, 亚成体与成体之间的死亡时间分布有显著差异 ( $LR \chi^2 = 33.379$ ,  $P < 0.001$ )。

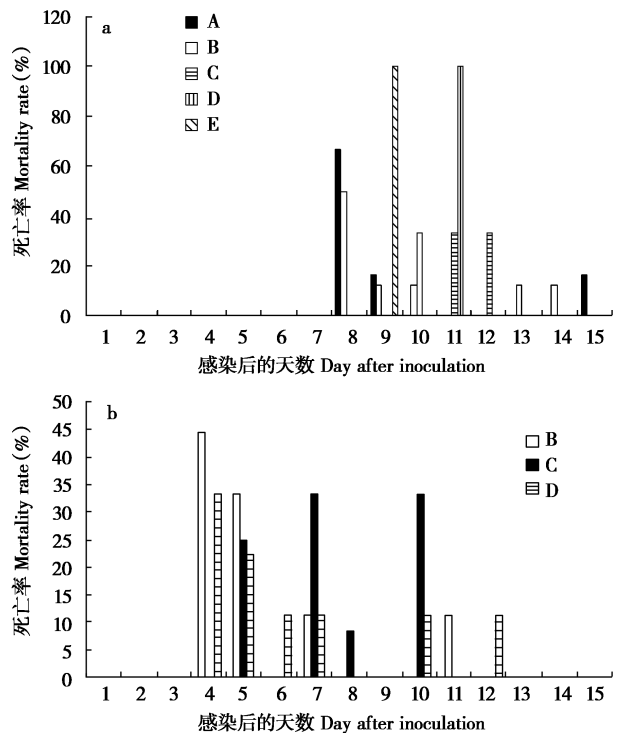


图3 艾美耳混合球虫对高原鼠兔的成体 (a) 和亚成体 (b) 的致死时间分布. A:  $6000 \times 10^4$  个/mL 剂量组; B:  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组; C:  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组; D:  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组; E:  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组  
Fig. 3 Time to death distributions for a) adults and b) sub-adults in plateau pika infected with a mix of coccidia including two Eimerians. A:  $6000 \times 10^4$  /mL group; B:  $600 \times 10^4$  /mL group; C:  $60 \times 10^4$  /mL group; D:  $6 \times 10^4$  /mL group; E:  $0.6 \times 10^4$  /mL group

## 2.6 不同感染剂量的艾美耳混合球虫对高原鼠兔排卵量影响

高原鼠兔成体在感染艾美耳球虫后的第 5 d 开始排卵，亚成体从第 4 d 开始排卵。不同感染剂量对成体的排卵量有显著影响 ( $F_{4,41} = 2.844$ ,  $P = 0.036$ , 图 4)，其中， $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组的排卵量最高， $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组最低，二者有显著差异 ( $P < 0.05$ )。虽然其余组别间无显著差异，但在  $6000 \times 10^4$  个/mL 至  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组之间，呈现出随感染剂量的增加而排卵量降低的趋势。

在亚成体中，虽然  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组的排卵量最高，但与其他组间无显著差异 ( $F_{2,31} = 3.112$ ,  $P = 0.060$ , 图 4)。

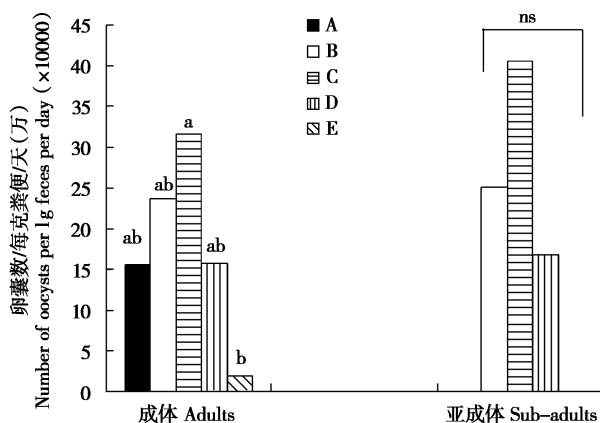


图 4 艾美耳混合球虫不同感染剂量组高原鼠兔的排卵量。A:  $6000 \times 10^4$  个/mL 剂量组; B:  $600 \times 10^4$  个/mL 剂量组; C:  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组; D:  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组; E:  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组。ns: 无显著差异。柱图上字母表示 Tukey 多重比较结果 ( $P < 0.05$ )

Fig. 4 Oocyst output in plateau pikas infected with different numbers of a mix of coccidia including two Eimerians. A:  $6000 \times 10^4$  /mL group; B:  $600 \times 10^4$  /mL group; C:  $60 \times 10^4$  /mL group; D:  $6 \times 10^4$  /mL group; E:  $0.6 \times 10^4$  /mL group. ns: no significant difference. Bars sharing the same letters are statistically equivalent at the 0.05 significance level using the Tukey method for multiple pairwise comparisons.

为进一步比较成体和亚成体间的排卵量，对成体和亚成体相同剂量组的排卵量进行双因素方差分析结果表明，成体和亚成体间的排卵量无显著差异 ( $F_{3,1} = 1.395$ ,  $P = 0.243$ )，但是， $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组的平均排卵量显著大于  $6 \times 10^4$  个/mL 剂量组 ( $F_{1,2} = 4.171$ ,  $P = 0.021$ )。

## 3 讨论

生物控制 (Biological control) 通过利用种群调节因子或种间相互作用而达到降低并控制有害生物种群的数量。该方法一般存在见效慢的缺点，难以满足短期内迅速降低害鼠数量的防治要求。然而，球虫对宿主具有较高致死性和致病性的特点，使其具备了作为生物控制载体的良好条件。对畜禽的研究表明，在自然状态下，当人工感染 1 万个球虫卵囊时，可引起家兔 60% 的死亡率；感染 100 万个球虫卵囊时，死亡率达 100% (殷佩云等, 1990a)。在野生高原鼠兔寄生虫调查及实验室驯化研究中发现，球虫不仅是高原鼠兔的主要寄生物，而且也是导致高原鼠兔在室内驯化过程中大批死亡的重要原因 (范微, 2007)。本研究结果则表明，大剂量感染艾美耳混合球虫后，高原鼠兔有较高的死亡率，其成体和亚成体的死亡时间分别为第 8 d 和第 4 d。该结果说明，艾美耳球虫对高原鼠兔的非急性致死效应类似于慢性杀鼠剂的作用，野外大剂量投放艾美耳球虫后，有望在短期内有效降低高原鼠兔种群数量。

Newman 等 (2001) 对欧洲獾 (*Meles meles*) 的研究结果表明，球虫 (*E. melis*) 对幼仔的感染强度显著大于成体。Hakkarainen 等 (2007) 对西岸田鼠 (*Clethrionomys glareolus*) 的研究发现，繁殖期亚成体的球虫感染强度显著大于非繁殖期成体的感染强度。畜禽中普遍存在球虫感染率有显著年龄间差异的现象 (张龙现等, 1999)。本研究结果则表明，高原鼠兔人工感染艾美耳混合球虫后，亚成体的死亡率显著大于成体。特别是在亚成体中，剔除非球虫致死个体后，不同剂量对其死亡率无显著差异的结果说明，小剂量的球虫感染便可导致亚成体大量死亡。这种不同年龄间的死亡率差异可能与成体在自然界已感染低剂量球虫而产生的免疫反应有关。在本研究中，高原鼠兔的成体死亡率与感染剂量呈正相关关系。正是球虫对不同年龄宿主的致死效应为其防治效果的长效性提供了作用途径。在青藏高原地区，高原鼠兔一般繁殖 1~3 胎，当年出生的个体一般不参加当年的繁殖 (王学高, 1990; 殷宝法等, 2004)，第二年繁殖初期 (4~5 月) 的种群主要为上年出生的越冬个体 (梁杰荣和戚根贤, 1989)，参加繁殖的主要成员来自上年出生的第 1 胎和第 2 胎个体 (王学高和戴克华, 1991)。因此，大面积大剂量投放艾美耳球虫后，

不仅有望降低高原鼠兔种群来年的繁殖基数,而且可使种群年龄结构趋于老龄化,继而导致其种群数量较长时间维持在低密度水平(Boonstra, 1994)。

Fuller 和 Wrosch (1995) 的研究结果表明,艾美耳混合球虫 (*E. arizonensis*, *E. delicata*) 感染拉布拉多白足鼠 (*Peromyscus maniculatus*) 后,宿主的排卵量随感染剂量的增加而降低。类似地,许多研究也得出类似的结果 (Tilahun and Stockdale, 1981; Higgs and Nowell, 1988; Lillehoj, 1988)。艾美耳属球虫的生活史特征通常为在宿主体内的裂殖生殖和配子生殖以及体外的孢子生殖(孢子化)。在宿主排卵过程中,如果感染剂量太低,在配子生殖阶段,宿主则无法有效地进行有性生殖,但感染剂量过高,球虫则经过多次裂殖后可产生大量的裂殖子,造成感染肠上皮细胞的过饱和现象,使许多裂殖子无法感染肠上皮细胞,加之肠内营养供给不足,从而无法进行有性生殖 (Fuller and Wrosch, 1995)。本研究结果表明,高原鼠兔在  $60 \times 10^4$  个/mL 剂量组中的排卵量最高,  $0.6 \times 10^4$  个/mL 剂量组则最低。但高中感染剂量中,高原鼠兔排卵量呈现出随感染剂量的增加而降低的趋势。该结果与上述研究相一致。

宿主与寄生物的关系是长期协同进化的结果。2010年7月我们对高原鼠兔种群球虫感染率的测定结果显示,高原鼠兔每克粪便中的全部球虫卵囊数仅约为474个(未发表数据),说明高原鼠兔种群对球虫的感染强度较低。许多研究也表明,在小哺乳动物自然种群中,寄生物对宿主种群的作用仅为密度制约性调节作用 (Stanton *et al.*, 1992; Seville *et al.*, 1996; Laakkonen *et al.*, 1998)。本研究结果提示,当人工大剂量野外投放艾美耳球虫后,由于人为打破了寄生物与宿主间的传播与感染间的动态平衡关系,无论死亡或存活个体,都可在感染期排出大量球虫卵囊。而高原鼠兔营家庭生活(王学高和 Smith, 1989; 曲家鹏等, 2008),具取食软便的习性(刘全生和王德华, 2004),在此情形下,残存高原鼠兔成体的第2胎甚至第3胎新生断乳子代,通过食粪及取食被球虫污染的食物,可使其死亡率维持在较高的水平。因此,艾美耳球虫感染剂量与高原鼠兔排卵量间的复杂关系对球虫生物控制的长效性将具有重要的作用。

大面积释放球虫不可能引起高原鼠兔种群灭绝的危险,并引发生态安全的问题。原因如下:1) 如果不发生重复感染,球虫对宿主的感染为自限

性;2) 重复感染球虫后,宿主可产生一定的免疫力;3) 球虫为非外来物种,其源自高原鼠兔种群,大面积释放不会对环境产生污染。

目前,有关寄生物成功控制害鼠的工作已有报道。Jäkel 等 (2006) 应用原生动肉孢子虫 (*Sarcocystis singaporensis*) 对农田稻田家鼠 (*Rattus argentiventer*) 和黄毛鼠 (*R. losea*) 的防治结果表明,在投放肉孢子虫毒饵 10~14 d 后,灭效率达到 70%~90%,显著降低了对稻田的危害。这表明,应用寄生物控制鼠害是可行的。

综上所述,艾美耳混合球虫对亚成体的致死率显著高于成体,感染大剂量球虫可导致大部分高原鼠兔成体死亡,且高原鼠兔感染中剂量艾美耳球虫后的排卵量最大。该结果验证了本文提出的预测,说明艾美耳球虫对高原鼠兔的非急性致死效应类似于慢性杀鼠剂的作用,具备将其研发为控制高原鼠兔生物控制剂的条件。本研究结果还提示,如果野外大剂量投放艾美耳球虫后,不仅有望在短期内有效降低高原鼠兔种群数量,而且其控制效果可具有长效性的潜在优点。

#### 参考文献:

- Boonstra R. 1994. Population cycles in microtines; the senescence Hypothesis. *Evolutionary Ecology*, **8**: 196-219.
- Cao Y F, Du Y, Yang L, Bian J H. 2011. Two newly record species of *Eimeria* (Apicomplexa, Eimeriidae) from plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in China. *Sichuan Journal of Zoology*, **30** (3): 402-403. (in Chinese)
- Cao Y F, Ye R R, Wu J H, Bian J H, Duszynski D. 2009. *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the plateau pika, *Ochotona curzoniae*, from Haibei area, Qinghai province, China, with the description of two new species. *Journal of Parasitology*, **95**: 1192-1196.
- Duszynski D W, Brunson J T. 1973. Structure of the oocysts and excystation process of four *Eimeria* spp from the Colorado pikas, *Ochotona princeps*. *The Journal of Parasitology*, **59**: 28-34.
- Fan W. 2007. Observation on the effects of combined application of compound ivermectin and Tianziqichongfen in expelling coccidian of altitude pika. *Laboratory Animal Science*, **24**: 50-51. (in Chinese)
- Fuller C A, Blaustein A R. 1996. Effects of the Parasite *Eimeria Arizonaensis* on survival of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Ecology*, **77**: 2196-2202.
- Fuller C A, Wrosch J H. 1995. Oocyst output, periodicity, and immunity of two deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) Eimerians (*Eimeria arizonensis* and *Eimeria delicata*). *The Journal of Parasitology*, **81**: 187-194.
- Hakkarainen H, Huhta E, Koskela E, Mappes T, Soveri T, Suorsa P. 2007. *Eimeria* - parasites are associated with a lowered mother's and offspring's body condition in island and mainland populations of

- the bank vole. *Parasitology*, **134**: 23 - 31.
- Higgs S, Nowell F. 1988. Laboratory studies with clones of *Eimeria hungaryensis*, a parasite of the wood mouse *Apodemus sylvaticus*. *Parasitology*, **97**: 213 - 220.
- Hnida J A, Duszynski D W. 1999. Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis*, *E. arizonensis* - like oocysts and *E. langebarteli*: host specificity within the Muridae and other rodents. *Journal of Parasitology*, **85**: 873 - 877.
- Horns R P, Samuel W M. 1974. Coccidia of the pikas *Ochotona collaris*, *O. princeps*, and *O. hyperborean yesoensis*. *Canadian Journal of Zoology*, **52**: 1079 - 1085.
- Jäkela T, Khoprasertb Y, Promkerdb P, Hongnark S. 2006. An experimental field study to assess the effectiveness of bait containing the parasitic protozoan *Sarcocystis singaporensis* for protecting rice crops against rodent damage. *Crop Protection*, **25**: 773 - 780.
- Laakkonen J, Oksanen A, Soveri T, Henttonen H. 1998. Dynamics of intestinal coccidia in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomus glareolus* population in finland. *Ecography*, **21**: 135 - 139.
- Leep D L, Todd E S, Samuel W M. 1972. Four new species of *Eimeria* from the pika *Ochotona princeps* from Alberta and *O. pallasi* from Kazakhstan. *J Protozool*, **19**: 195 - 199.
- Liang J R, Qi G X. 1989. The population age structure and dynamics of the plateau pika (*Ochotona cruzonlae*). *Acta Theriologica Sinica*, **9** (3): 228 - 230. (in Chinese)
- Lillehoj S. 1988. Influence of inoculation dose, inoculation schedule, chicken age, and host genetics on disease susceptibility and development of resistance to *Eimeria tenella* infection. *Avian Diseases*, **32**: 437 - 444.
- Lindsay D S, Todd Jr K S. 1993. Coccidia of mammals. In: Kreier J P ed. *Parasitic Protozoa*. New York: Academic Press, Inc., Vol. 4. 89 - 131.
- Liu Q S, Wang D H. 2004. Coprophagy in Herbivorous small mammals. *Acta Theriologica Sinica*, **24** (3): 333 - 338. (in Chinese)
- Newman C, Macdonald D W, Anwar M A. 2001. Coccidiosis in the European badger, *Meles meles* in Wytham Woods; infection and consequences for growth and survival. *Parasitology*, **123**: 133 - 142.
- Qu J P, Yang M, Li W J, Li K X, Zhang Y M, Smith A T. 2008. Seasonal variation of family group structure of plateau pikas (*Ochotona curzonlae*). *Acta Theriologica Sinica*, **28** (2): 144 - 150. (in Chinese)
- Seville R S, Stanton N L, Gerow K. 1996. Stable parasite guilds: coccidia in spermophiline rodents. *Oikos*, **75**: 365 - 372.
- Stanton N L, Shults L M, Parker M, Seville R S. 1992. Coccidian assemblages in the Wyoming ground squirrel, *Spermophilus elegans elegans*. *The Journal of Parasitology*, **78**: 323 - 328.
- Tilahun G, Stockdale G H. 1981. Oocyst production of four species of murine coccidia. *Canadian Journal of Zoology*, **59**: 1796 - 1800.
- Wang X G. 1990. A study on the mating season and the pattern of copulation behavior in plateau pika. *Acta Theriologica Sinica*, **10** (1): 60 - 65. (in Chinese)
- Wang X G, Dai K H. 1991. Studies on the population reproduction ecology of plateau pika. *Zoological Research*, **12**: 149 - 161. (in Chinese)
- Wang X G, Smith A T. 1989. Studies on the mating system in plateau pikas (*Ochotona curzonlae*). *Acta Theriologica Sinica*, **9** (3): 210 - 215. (in Chinese)
- Wilber P G, Duszynski D W, Upton S J, Seville R S, Corliss J O. 1998. A revision of the taxonomy and nomenclature of the *Eimerians* (Apicomplexa: Eimeriidae) from rodents in the tribe marmotini (Sciuridae). *Systematic Parasitology*, **39**: 113 - 135.
- Yin B F, Wang J L, Wei W H, Zhang Y M, Cao Y F. 2004. Population reproductive characteristics of plateau pika in alpine meadow ecosystem. *Acta Theriologica Sinica*, **24** (3): 222 - 228. (in Chinese)
- Yun C H, Lillehoj H S, Lillehoj E P. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*, **24**: 303 - 324.
- 王学高. 1990. 高原鼠兔交配期及交配行为模式的研究. 兽类学报, **10** (1): 60 - 65.
- 王学高, Smith A T. 1989. 高原鼠兔交配关系的研究. 兽类学报, **9** (3): 210 - 215.
- 王学高, 戴克华. 1991. 高原鼠兔种群繁殖生态的研究. 动物学杂志, **12**: 149 - 161.
- 刘全生, 王德华. 2004. 草食性小型哺乳动物的食粪行为. 兽类学报, **24** (3): 333 - 338.
- 曲家鹏, 杨敏, 李文靖, 李克欣, 张堰铭, Smith A T. 2008. 高原鼠兔家群结构的季节变异. 兽类学报, **28** (2): 144 - 150.
- 张龙现, 殷佩云, 林昆华, 刘群, 索勋. 1999. 我国家兔球虫的研究现状. 动物学杂志, **34**: 45 - 52.
- 杜爱芳. 2001. 中草药复方制剂对鸡柔嫩艾美耳球虫的疗效研究. 中兽医医药杂志, **3**: 9 - 11.
- 范薇. 2007. 复方伊维菌素和球虫粉联合应用于高原鼠兔球虫的驱治效果观察. 实验动物科学, **24**: 50 - 51.
- 殷佩云, 蒋金书, 刘伯义, 张伟薇. 1990a. 人工感染肠艾美耳球虫致病力研究. 中国兽医杂志, **16**: 5 - 7.
- 殷佩云, 王云飞, 薛水玲, 张伟葇, 狄伯雄, 高得仪. 1990b. 人工感染肠艾美耳球虫的药物预防试验. 中国兽医杂志, **16**: 14 - 15.
- 殷宝法, 王金龙, 魏万红, 张堰铭, 曹伊凡. 2004. 高寒草甸生态系统中高原鼠兔的繁殖特征. 兽类学报, **24** (3): 222 - 228.
- 曹伊凡, 杜寅, 杨乐, 边疆晖. 2011. 高原鼠兔寄生艾美耳球虫(顶复器门, 艾美耳科)二中国新记录. 四川动物, **30** (3): 402 - 403.
- 梁杰荣, 戚根贤. 1989. 高原鼠兔种群年龄结构和动态. 兽类学报, **9** (3): 228 - 230.