文章编号:1005-3832(2026)05-0008-12

黑斑原鲍多子小瓜虫病可视化 LAMP 检测及和厚朴酚防治技术研究

卫明亮[1],王树琪[1,2],张茆[1],周建设[3],匡友谊[1],王壮壮[3],王万良[3],佟广香[1]
(1.中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增养殖重点开放实验室,黑龙江 哈尔滨 150070;
2.大连海洋大学水产与生命学院,辽宁 大连 116000;
3.西藏自治区农牧科学院水产科学研究所,西藏 拉萨 850002)

摘要:为应对黑斑原鲍(*Glyptosternum maculatum*)多子小瓜虫病(ichthyophthiriasis)早期诊断困难与防治手段匮乏的双重挑战,本研究构建了基于环介导等温扩增(LAMP)的可视化快速检测方法,并初步探索和厚朴酚(honokiol)对多子小瓜虫(*Ichthyophthirius muleifiliis*)的抑制效果及其对宿主的安全性。以多子小瓜虫 *18S rRNA* 基因为靶标设计引物,构建的 LAMP 体系在 61~64 ℃恒温条件下反应 20 min 即可通过颜色变化判读结果,对虫体 DNA 的检测灵敏度达 0.01 ng/μL,且与黑斑原鲍、四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)等宿主组织无交叉反应。毒性试验显示,和厚朴酚对多子小瓜虫包囊前体及包囊体的半数致死浓度(LD_{50})低于对黑斑原鲍的 LD_{50},提示其具有一定的选择性毒性。组织病理学观察显示,0.50 mg/L 和厚朴酚处理可引起鱼鳃小片收缩弯曲、线粒体丰富细胞增生及肝脏轻度充血;1.00 mg/L 和厚朴酚处理则导致鳃上皮细胞脱落、肝脏空泡变性及肌纤维溶解等病理损伤。现场防治试验表明,0.50 mg/L 和厚朴酚可降低感染鱼体表滋养体数量并提高存活率;体外试验显示其可通过破坏虫体细胞膜结构实现对包囊前体及包囊体的杀灭作用。本研究构建的 LAMP 检测方法表现出一定的灵敏度与特异性,可为该病原的现场快速筛查提供参考;同时初步探讨了和厚朴酚的抑制效果及其对宿主的安全浓度范围,为黑斑原鲍小瓜虫病的防控策略提供了初步数据支撑。

关键词:黑斑原鲍;多子小瓜虫;环介导等温扩增;和厚朴酚
中图分类号:S 917.4 **文献标识码:** A

Development of Visual LAMP Detection and Honokiol-Based Control of Ichthyophthiriasis in *Glyptosternum maculatum*

WEI Mingliang[1], WANG Shuqi[1,2], ZHANG Yin[1], ZHOU Jianshe[3], KUANG Youyi[1], WANG Zhuangzhuang[3], WANG Wanliang[3], TONG Guangxiang[1]
(1. Key Open Laboratory of Cold Water Fish Germplasm Resources and Breeding of Heilongjiang Province, Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116020, China;
3. Xizang Autonomous Region Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850002, China)

Abstract: To develop a rapid visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early diagnosis of ichthyophthiriasis in *Glyptosternon maculatum*, and to preliminarily evaluate the inhibitory effect of honokiol against the parasite and its safety to the host. A LAMP assay targeting the *18S rRNA* gene of *Ichthyophthirius multifiliis* was constructed, with visual interpretation via color change after 20 min at 61 - 64 ℃. The toxicity of honokiol to parasite tomonts and cysts, as well as to *G. maculatum*, was determined, and its therapeutic effect was assessed in field trials. The LAMP assay achieved a detection limit of 0.01 ng/μL with no cross-reactivity with host tissues. The LD_{50} of honokiol for parasite tomonts and cysts was lower than that for *G. maculatum*, suggesting a certain degree of selective toxicity. Histopathology showed that 0.50 mg/L honokiol caused mild gill lamellar contraction and hepatic congestion, whereas 1.00 mg/L induced severe gill epithelial detachment and hepatic vacuolar degeneration. Field trials indicated that 0.50 mg/L

收稿日期:2026-01-27
基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202409Q);国家重点研发计划(2024YFD1200700);盐碱水域养殖品种开发与利用创新团队项目(2023TD59).
作者简介:卫明亮(1997-),男,硕士,研究实习员,从事水产养殖研究.E-mail: weimingliang@hrfri.ac.cn
通信作者:佟广香(1978-),女,博士,副研究员,从事鱼类遗传育种与繁殖研究.E-mail: tongguangxiang@hrfri.ac.cn

honokiol reduced trophont numbers and improved survival rates of infected fish; in vitro, honokiol destroyed parasite cell membranes and exerted lethal effects on tomonts and cysts. The LAMP assay developed here exhibits good sensitivity and specificity, providing a reference for the rapid on-site screening of this pathogen; in addition, the inhibitory effect of honokiol and its safe concentration range for the host were preliminarily explored, providing preliminary data support for the prevention and control of ichthyophthiriasis in *G. maculatum*.

Key words: *Glyptosternum maculatum*; *Ichthyophthirius multifiliis*; loop-mediated isothermal amplification; honokiol

黑斑原鮡（*Glyptosternum maculatum*）作为青藏高原特有的珍稀冷水鱼类，主要分布于雅鲁藏布江中上游干支流水域[1]。黑斑原鮡具有典型的底栖生态习性，其肉质细嫩、营养成分独特，富含多种人体必需氨基酸与微量元素，在高原渔业经济、水生生物多样性保护及鱼类进化生物学研究领域均具有不可替代的科研价值与开发利用潜力[2]。然而，受水利工程建设导致的栖息地片段化以及过度捕捞等人类活动的严重干扰，该物种野生种群数量在过去数十年间呈急剧衰退趋势，目前已被《中国生物多样性红色名录》评定为极危（Critically Endangered，CR）物种，并被列为国家二级重点保护野生动物[3]。鉴于其自然种质资源的极度稀缺性，系统开展人工繁育技术与规模化健康养殖模式研究，已成为实现该物种自然资源保护与可持续利用的关键路径[4]。

然而，在当前的养殖实践中，黑斑原鮡面临生长速率缓慢与病害频发并存的双重制约瓶颈。其中，由多子小瓜虫（*Ichthyophthirius multifiliis*）寄生引发的白点病（ichthyophthiriasis）是阻碍黑斑原鮡养殖业健康发展的重大疾病因素[5-8]。黑斑原鮡皮肤裸露无鳞，表皮层由复层上皮细胞、黏液细胞及基底细胞构成，缺乏鳞片这一关键物理屏障[8]。组织学研究显示，其表皮厚度虽因部位而异［头部的（66.91 ± 9.73）μm 至腹部的（102.36 ± 3.43）μm］，但真皮层相对薄弱且各部位厚度接近，整体皮肤结构以表皮屏障为主、真皮支撑为辅[8]。这种结构特征使得多子小瓜虫掠食体（theronts）无需穿透鳞片间隙即可直接接触宿主表皮，大幅缩短了侵入路径。一旦感染，滋养体（trophonts）大量埋入皮肤、鳃及鳍条上皮组织，导致上皮细胞增生、黏液分泌紊乱、渗透压调节失衡及运动机能失调，如不及时干预，死亡率可高达 100%[9]。目前，针对该病的防治手段主要集中于水源净化、养殖密度控制等预防性管理措施，尚缺乏能够在感染早期进行精准诊断的快速检测技术，以及针对该病原的特效治疗药物[10,11]。因此，开发一种兼具快速、特异、灵敏及现场可操作性的病原检测技术，同时筛选高效低毒的绿色防控药物，已成为突破黑斑原鮡多子小瓜虫病防治瓶颈的迫切需求。

环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）技术以其在恒温条件下（60~65 ℃）借助特异性引物实现靶标核酸快速指数扩增，并通过钙黄绿素等显色剂实现肉眼可视化判读的显著优势，已广泛应用于水产动物病原体的现场快速诊断与早期监测[12,13]。与此同时，源于传统中药材厚朴（*Magnolia officinalis*）的主要活性成分和厚朴酚（honokiol），因其具有广谱的抗炎、抗菌及抗寄生虫生物活性，且环境友好、不易产生耐药性，在水产病害绿色防治领域展现出广阔的应用前景[14-16]。

本研究旨在建立针对多子小瓜虫的 LAMP 现场快速检测体系，并系统评估和厚朴酚对多子小瓜虫的杀灭效果及其对宿主的安全性，进而将 LAMP 检测技术与和厚朴酚绿色防控策略整合应用于黑斑原鮡养殖过程中的疾病监测与防治。通过该技术体系，可在病原体感染初期（即滋养体侵入皮肤但尚未引发明显白点症状的阶段）实现快速准确诊断，为及时采取隔离、消毒及药物干预措施提供关键的技术时间窗口。本研究不仅可为黑斑原鮡这一极危珍稀物种的疾病防控提供新的技术手段与理论支撑，而且对青藏高原特有鱼类资源的保护性养殖与可持续利用具有重要的实践指导意义。

1　材料与方法

1.1　多子小瓜虫可视化 LAMP 检测方法的建立

1.1.1　寄生虫及样品

多子小瓜虫、黑斑原鮡、四膜虫（*Tetrahymena*）、大肠杆菌（*E. coli*）、哲罗鲑（*Hucho taimen* ）以及摇蚊（*Chironomid*）幼虫的样本均来源于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站。利用微量基因组 DNA 抽提试剂盒提取上述样本的基因组 DNA 并作为 LAMP 扩增反应的模板。

1.1.2　引物设计合成

以多子小瓜虫 *18S rRNA* 基因（Genebank 登录号为 KJ690572）为特异靶基因，根据多子小瓜虫 *18S rRNA* 基因的特异性区域，依照环介导等温扩增引物设计原则，利用 Primer Designer 引物设计软件设计 5 组 LAMP 引物，获得 1 组具有 LF/LB 的引物组以及 4 组其他引物组。

1.1.3 *18S rRNA* 基因的重组质粒的构建

将多子小瓜虫的 *18S rRNA* 基因（Genebank 登录号为 KJ690572）进行基因合成。使用 PUB-T 质粒作为载体，通过连接酶的催化，将 *18S rRNA* 基因目标片段连接到 PUB-T 质粒上，构建重组质粒 PUB-T-18S，并将其转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中，经 100 mg/mL 氨苄青霉素筛选出阳性克隆，用质粒试剂盒提取重组质粒，测序检测重组质粒是否构建成功。

1.1.4 LAMP 检测反应体系的建立与优化

基于 BeyoColor™ 等温扩增变色检测试剂盒构建 LAMP 反应体系。反应体系总体积为 40 μL，包括：LAMP Master Mix（2×，含 HNB 显色液）10 μL，8 U Bst DNA 聚合酶 1 μL，PUB-T-18S 质粒 DNA 模板 2 μL，甘油 20 μL，ddH_2O 5 μL；引物组成为 FIP、BIP（10 μmol/L）各 0.7 μL，F3、B3（10 μmol/L）各 0.1 μL，LF、LB（10 μmol/L）各 0.2 μL。

在此基础上，对检测体系进行系统优化与评价。引物组筛选：反应温度优化，设置 60~65 ℃梯度（每 1 ℃为 1 组，以 PUB-T-18S 质粒为模板，无菌水为阴性对照，分别于 10 min 和 20 min 观察结果）；引物浓度优化，设置 10 μmol/L、8 μmol/L、6 μmol/L、4 μmol/L、2 μmol/L、0 μmol /L 6 个梯度。灵敏度评价采用 PUB-T-18S 质粒梯度稀释液（100

表 1 LAMP 引物序列

Tab. 1 LAMP primer sequences

引物组 prime group	名称 name	引物序列（5′-3′） primer sequence (5′-3′)
引物组 1 primer group 1	FIP	CCAAGTCGAACCAGTGAAGGGTTCTCTTAGCTAAAATGGGC
	BIP	TAGAGTGTTTCAGGCAGGTTATAGCACCAATAAAATGGACTCAGTC
	F3	AGCTCGTAGTTGAACTTCTG
	B3	CCCTATTAATCATTACCAAATCCA
	LF	CCGAGTTTGGTTTGCAAACGTAT
	LB	CCGGATACATCAGCATGGAATAA
引物组 2 primer group 2	FIP	CATTTCAATGCCGTAGAGAAGAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGAC
	BIP	AGAACAGTGTAAATCTCTTAGCGAGTTGGAGCAGGAATTACCG
	F3	GGGACGTAAATTACCCAATC
	B3	CTGCAACAACTTTAATATACGC
	LB	GAACAATTGGAGGGCAAGTCAGGT
引物组 3 primer group 3	FIP	CGTTGTTCACAGGTCGACTAGCTGGTTAATTCCGTTAACGAAC
	BIP	TGGAAGTTTAAGGCAATAACAGGTTTTTGAGCCAGCCATTGT
	F3	TCTTAGTTGGTGGAGTGATT
	B3	ACCTTTCCAGGTCAGGAA
	LB	CTGTGATGCCCCTAGACGT
引物组 4 primer group 4	FIP	GCCCGAAGGAGATTGGTTTAATATCATACATGCGAAAAAATCCGT
	BIP	GTAACTGATCGAATCGCGGCCCAATACACTACCATCGAGAG
	F3	GATAACCGAGCTAATTGTTGG
	B3	TTCTCCGTTACCCGTGAG
	LB	GCGATAAATCATCTAAGTTTCTGCC
引物组 5 primer group 5	FIP	TCCCCTAACTTTCGTTCTTGATTAAGGACTAACTAATGCGAAAGCA
	BIP	TCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATTTCTCATACGGTGCCGA
	F3	CAGAGGTGAAATTCTTGGATT
	B3	ACCATACTTCCCCCAGAA

ng/μL、10 ng/μL、1 ng/μL、0.1 ng/μL、0.01 ng/μL、0 ng/μL)作为模板;特异性评价以多子小瓜虫、黑斑原鮡、四膜虫、大肠杆菌、哲罗鲑、摇蚊幼虫基因组 DNA(0.01 ng/μL)及 PUB-T-18S 质粒(阳性对照)作为模板。除温度优化外,其余反应均 61 ℃水浴 20 min。反应结果以天蓝色(阳性)和紫罗兰色(阴性)进行肉眼判定,并以 1.2%琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2　和厚朴酚防治黑斑原鮡小瓜虫病方法的建立

1.2.1　和厚朴酚对黑斑原鮡及多子小瓜虫离体阶段的 LD_{50} 与选择性指数研究

采用静水生物测试法测定和厚朴酚对黑斑原鮡及多子小瓜虫离体阶段的 LD_{50}。实验用黑斑原鮡 F_1 代幼鱼 180 尾[体长为(5.77 ± 0.22) cm,体质量为(1.33 ± 0.01) g,2 龄,健康无伤]来源于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站,于(10.0 ± 0.5) ℃循环水系统中暂养 2 周后随机分组。和厚朴酚经二甲基亚砜(DMSO,终浓度≤0.1%)助溶后,用曝气自来水配制成 0 mg/L(溶剂对照)、0.25 mg/L、0.50 mg/L、0.75 mg/L、1.00 mg/L、1.25 mg/L 6 个浓度梯度。宿主 LD_{50} 试验设 3 个重复,每个重复 10 尾(养殖密度 0.27 g/L),养殖于 50 L 水体中,连续曝气,维持水温(10.0 ± 0.5) ℃,周期 5 d,期间停食并及时移除死亡个体。同步进行病原杀灭试验:设置包囊前体和包囊体两个处理组,每组均按上述 6 个浓度梯度设 3 个平行,分别将 30 个活性包囊前体或 30 个活性包囊体置于 100 mL 对应浓度药液中,培养条件同上。以鱼体呼吸停止、侧翻且无逃避反射,以及多子小瓜虫虫体细胞膜崩解、内容物外泄或囊壁结构消失判定死亡。试验期间,逐日记录死亡数(死亡率),并统计累积死亡率。

采用改良寇氏法计算 LD_{50} 及标准误:

$LD_{50}=\lg^{-1}[X_m-i(\sum p-0.5)]$。

其中,X_m 为最高浓度对数,i 为浓度间距对数,p 为各组死亡率,$\sum p$ 为死亡率总和。

选择性指数(SI):$SI=LD_{50}$(宿主)/LD_{50}(病原)。

1.2.2　不同浓度下的和厚朴酚对黑斑原鮡组织结构的影响

对 0 mg/L(对照组)、0.50 mg/L、1.00 mg/L 3 组黑斑原鮡取样肝脏、肌肉和鳃,用多聚甲醛进行固定。经流水冲洗后,用 70%~95%的乙醇依次进行脱水处理。经二甲苯透明,石蜡包埋、脱蜡处理等步骤后,切片机进行连续切片,切片厚度为 5~6 μm,用苏木精 – 伊红染色法进行染色并用中性树脂封片,显微镜下观察并拍摄记录。

1.2.3　药物防治效果评价

2025 年 7 月于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站开展现场防治试验。鉴于黑斑原鮡为国家二级重点保护野生动物,依据《中华人民共和国野生动物保护法》及实验动物福利伦理审查规范,本研究禁止对其进行人工感染操作,故采用现场自然感染条件下的早期防治策略。试验选取经 LAMP 快速检测粪便 DNA 以及环境 DNA 呈阳性但常规显微镜检未见明显滋养体的养殖试验槽[F_1 代 2 龄,体长(5.97 ± 0.29) cm,体质量(1.49 ± 0.05) g],将其中 270 尾试验鱼随机分入 9 套 50 L 循环水养殖系统(30 尾 / 套),设 0 mg/L(感染对照)、0.25 mg/L、0.50 mg/L 3 个和厚朴酚浓度组,每组设 3 个重复。另外挑选 90 尾健康个体,分入 3 套相同的循环水系统中作为未感染对照(CK)。养殖水温(10.0 ± 0.5) ℃,试验周期 15 d。于第 0 d、第 5 d、第 10 d、第 15 d 对各组试验鱼进行体表(皮肤、鳍条及黏液等)显微镜检,记录滋养体数量动态变化并统计累计死亡率。采用广义估计方程(GEE)分析滋养体数量时间动态,Kaplan-Meier 法与 Log-rank 检验分析存活率,显著性水平 $\alpha=0.05$。感染对照组为参考水平。CK 组因无死亡事件,仅作为基线参照,不参与风险模型。

2　结果与分析

2.1　LAMP 引物组以及反应温度筛选

显色结果显示(图 1-A),仅引物组 1(编号 2)呈阳性(天蓝色),其余均为阴性(紫罗兰色)。反应条件优化(图 1-B)结果表明:61~64 ℃下反应 10 min 即可全部检出;而 60 ℃、65 ℃则需 20 min。经 1.2%琼脂糖凝胶电泳验证,上述结果准确率达 100%。

2.2　LAMP 引物浓度检测、灵敏度检测以及特异性检测

引物浓度筛选(图 2A)结果表明,有效浓度为 4~10 μmol/L(显色阳性,天蓝色),2 μmol/L 显色较弱但电泳确认阳性;灵敏度检测结果表明(图 2B),检测下限为 0.01 ng/μL;特异性检测(图 3)证实,仅多子小瓜虫基因组 DNA 及阳性对照呈阳性,其他物种均无交叉反应。综上可知,引物组 1 在 4~10 μmol/L 浓度范围内,可特异性检出 0.01 ng/μL 及以

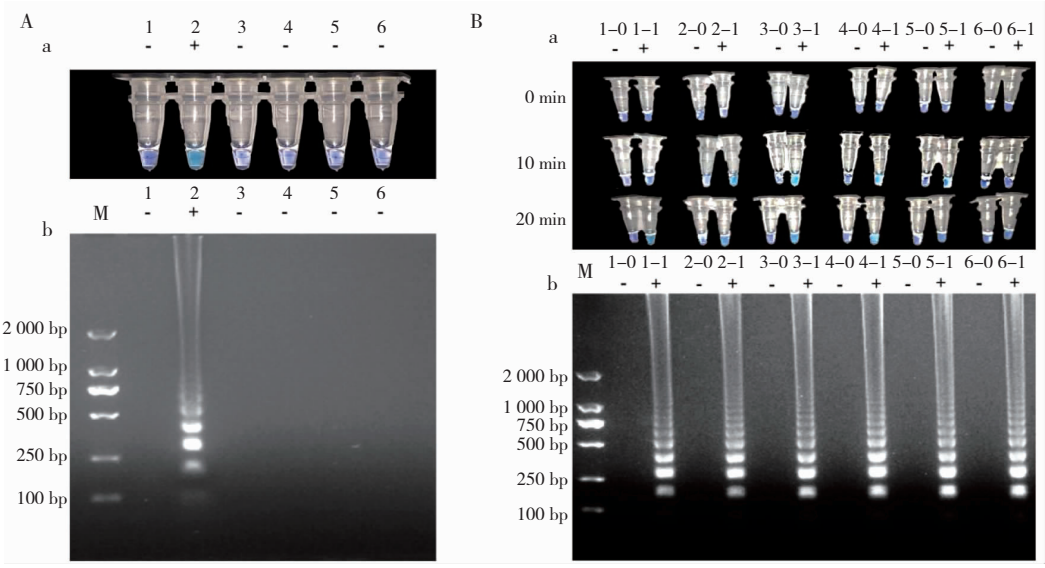


图 1　引物组筛选(A)以及反应温度筛选(B)

Fig. 1　Screening of primer groups (A) and optimization of reaction temperature (B)

注:(A)1.无引物对照组;2.引物组 1;3.引物组 2;4.引物组 3;5.引物组 4;6.引物组 5;M.DL 2 000 Marker。

(B)1–0. 60 ℃对照;1–1. 60℃实验;2–0. 61 ℃对照;2–1. 61 ℃实验;3–0. 62 ℃对照;3–1. 62 ℃实验;4–0. 63 ℃对照;4–1. 63 ℃实验;5–0. 64 ℃对照;5–1. 64 ℃实验;6–0. 65 ℃对照;6–1. 65 ℃实验。a 为 LAMP 反应 EP 管;b 为 1.2%的凝胶电泳检测。阳性(+),阴性(–)。

Notes: (A) 1. no–primer control group; 2. primer set 1; 3. primer set 2; 4. primer set 3; 5. primer set 4; 6. primer set 5; M. DL 2 000 marker.

(B) 1–0.60 ℃ control; 1–1.60 ℃ test; 2–0. 61 ℃ control; 2–1. 61 ℃ test; 3–0. 62 ℃ control; 3–1. 62 ℃ test; 4–0. 63 ℃ control; 4–1. 63 ℃ test; 5–0. 64 ℃ control; 5–1. 64 ℃ test; 6–0. 65 ℃ control; 6–1. 65 ℃ test. a represents the LAMP reaction tubes, and b represents the detection by 1.2% agarose gel electrophoresis. positive (+), negative (–).

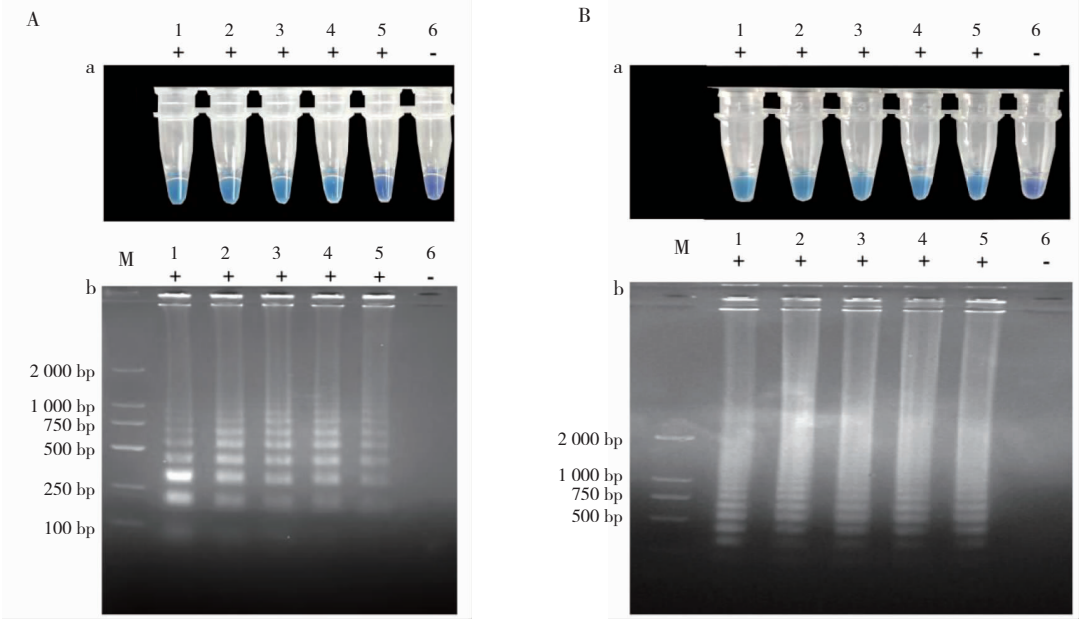


图 2　引物浓度及灵敏度检测

Fig. 2　Primer concentration determination and sensitivity detection

注:(A)1. 10.0 μmol/μL;2. 8.0 μmol/μL;3.6.0 μmol/μL;4. 4.0 μmol/μL;5. 2.0 μmol/μL;6. 0 μmol/μL。

(B)1. 100.00 ng/μL;2. 10.00 ng/μL;3. 1.00 ng/μL;4. 0.10 ng/μL;5. 0.01 ng/μL;6. 0 ng/μL。a 为 LAMP 反应 EP 管,b 为 1.2%的凝胶电泳检测。阳性(+),阴性(–)。

Notes: (A) 1. 10.0 μmol/μL; 2. 8.0 μmol/μL; 3. 6.0 μmol/μL; 4. 4.0 μmol/μL; 5. 2.0 μmol/μL; 6. 0 μmol/μL.

(B) 1. 100.00 ng/μL; 2. 10.00 ng/μL; 3. 1.00 ng/μL; 4. 0.10 ng/μL; 5. 0.01 ng/μL; 6. 0 ng/μL. a represents the LAMP reaction tubes, and b represents detection by 1.2% agarose gel electrophoresis. positive (+), negative (–).

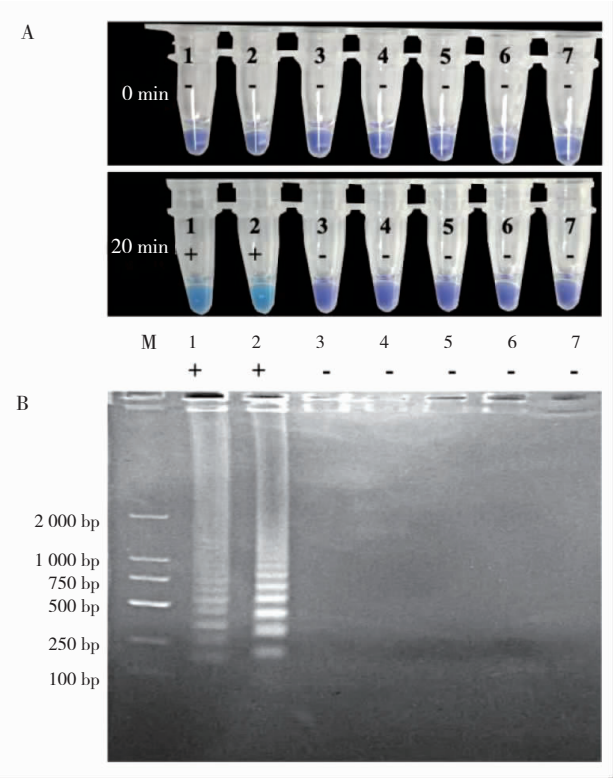


图 3　特异性检测

Fig. 3　Specificity test

注：1.PUB–T–18S 质粒阳性对照；2.多子小瓜虫；3.黑斑原鲍；4.四膜虫；5.大肠杆菌；6.哲罗鲑；7.摇蚊幼虫。A 为 LAMP 反应 EP 管，B 为 1.2%的凝胶电泳检测。阳性(+)，阴性(–)。

Notes: 1. PUB–T–18S plasmid (positive control); 2. *I. multifiliis*; 3. *G. maculatum*; 4. *Tetrahymena*; 5. *E. coli*; 6. *Hucho taimen*; 7. *Chironomid* larvae. A represents the LAMP reaction tubes, and B represents detection by 1.2% agarose gel electrophoresis. positive (+), negative (–).

上的多子小瓜虫 DNA。

2.3　和厚朴酚对黑斑原鲍及多子小瓜虫离体阶段的 LD_{50} 与选择性指数研究

剂量 – 效应关系显示(图 4A)，和厚朴酚对黑斑原鲍及多子小瓜虫的致死率随浓度递增而升高，1.25 mg/L 处理 5 d 后致死率均达 100%。LD_{50} 测定结果表明(图 4B)，在 10 ℃条件下，黑斑原鲍的 LD_{50} [(0.79 ± 0.08) mg/L]显著高于包囊体[(0.67 ± 0.03) mg/L(P< 0.05)]及包囊前体[(0.53 ± 0.01) mg/L，P< 0.001)]，且包囊前体对药物的敏感性显著高于包囊体(P<0.01)。据此计算的选择性指数(SI)显示，和厚朴酚对包囊前体(SI=1.49)和包囊体(SI=1.18)均具有正向选择性毒力(SI>1)，且对包囊前体的选择毒性优于包囊体。

2.4　不同浓度的和厚朴酚对黑斑原鲍的肝脏、鳃以及肌肉组织结构的影响

组织病理学观察表明(图 5)，对照组(0 mg/L)肝细胞呈卵圆形，细胞连接紧密，核大而圆且居中央或偏位；鳃丝血管清晰，鳃小片两侧对称分布，血窦明显，线粒体丰富细胞聚集于基部，扁平上皮细胞排列整齐；肌纤维呈规则长柱状。0.50 mg/L 组肝细胞结构完整，仅见轻度充血(血细胞增多)；鳃小片收缩变细并弯曲；肌纤维间隙增宽，肌原纤维间出现空隙。1.00 mg/L 组呈现显著剂量依赖性损伤：肝脏广泛空泡化，核固缩或消失，结构破碎；鳃上皮细胞大量脱落，鳃小片断裂萎缩；肌原纤维散乱、溶解，核外露。

2.5　和厚朴酚对多子小瓜虫的包囊前体阶段以及包囊体阶段的影响

和厚朴酚对多子小瓜虫包囊前体及包囊体均具显著杀灭效应。包囊前体经 0.50 mg/L 处理 5 d 后，鞭毛脱落，细胞核结构模糊畸形，胞质内容物外泄(图 6A–3)，而对照组形态完整(图 6A–1)并正常发育(图 6A–2)。包囊体经同等浓度处理后，外层细胞膜破裂，内部掠食体停止发育且丧失逃逸能力(图 6B–3)，对照组则正常产生大量具感染力的掠食体(图 6B–1、6B–2)。

2.6　防治效果评价

多子小瓜虫可视化 LAMP 检测(图 7A–a)可于镜检阴性时(图 7A–b)通过粪便及环境 DNA 检出阳性，较镜检（5 d 方见体表滋养体）更灵敏。GEE Poisson 分析显示，时间因素对滋养体数量具有显著正向效应（IRR=1.170，95%CI：1.151~1.191，P<0.001)。与对照组相比，0.25 mg/L 组基线滋养体数量显著较低(IRR=0.362，95%CI：0.254~0.516，P<0.001)，但时间趋势与对照组平行(交互项 IRR=0.983，P=0.305)。0.50 mg/L 组的时间 – 浓度交互效应极显著(IRR=0.754，95% CI：0.741~0.768，P<0.001)，至 15 d 时滋养体数量降至 0(mean ± SE：0.00 ± 0.00，n=3)，而 0 mg/L 组升至(53.33 ± 4.48)个 / 尾(图 7B–a)。Kaplan–Meier 生存曲线显示 3 组间差异极显著(Log–rank χ^2=150.86，df=2，P<0.001)(图 7B–b、c)。Cox 模型显示，0.25 mg/L 组死亡风险显著降低(HR=0.327，95%CI：0.231~0.462，P<0.001)，0.50 mg/L 组降低更显著(HR=0.072，95% CI：0.043~0.120，P< 0.001)；相对保护率(RPS)分别为 35.6%与 78.9%。

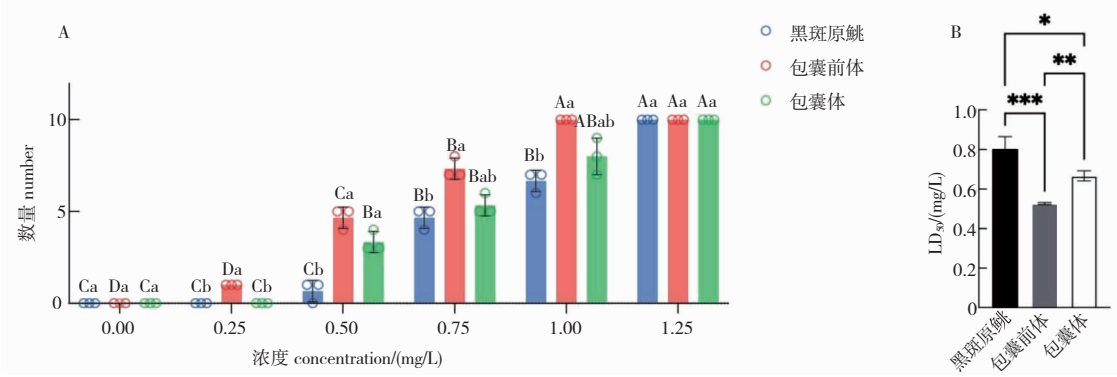


图 4　不同浓度的和厚朴酚对黑斑原鲍、多子小瓜虫包囊前体以及包囊体阶段的影响

Fig. 4　Effects of different concentrations of honokiol on *G. maculatum*, and on the tomont and theront stages of *I. multifiliis*

注：A. 不同浓度下的和厚朴酚对黑斑原鲍、多子小瓜虫包囊前体以及包囊体阶段的死亡数量比较分析；B.和厚朴酚对黑斑原鲍以及多子小瓜虫离体阶段的 LD_{50} 比较分析。* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$，不同的大写字母代表组间比较具有显著性差异（$P<0.05$）；不同的小写字母代表组内比较具有显著性差异（$P<0.05$）。

Notes: A. Comparative analysis of mortality in *G. maculatum*, and in the tomont and theront stages of *I. multifiliis* under different concentrations of honokiol. B. Comparative analysis of the LD_{50} of honokiol for *G. maculatum* and for the in vitro stages of *I. multifiliis*. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$, *** indicates $P < 0.001$. Different uppercase letters represent significant differences between groups ($P < 0.05$); different lowercase letters represent significant differences within groups ($P < 0.05$).

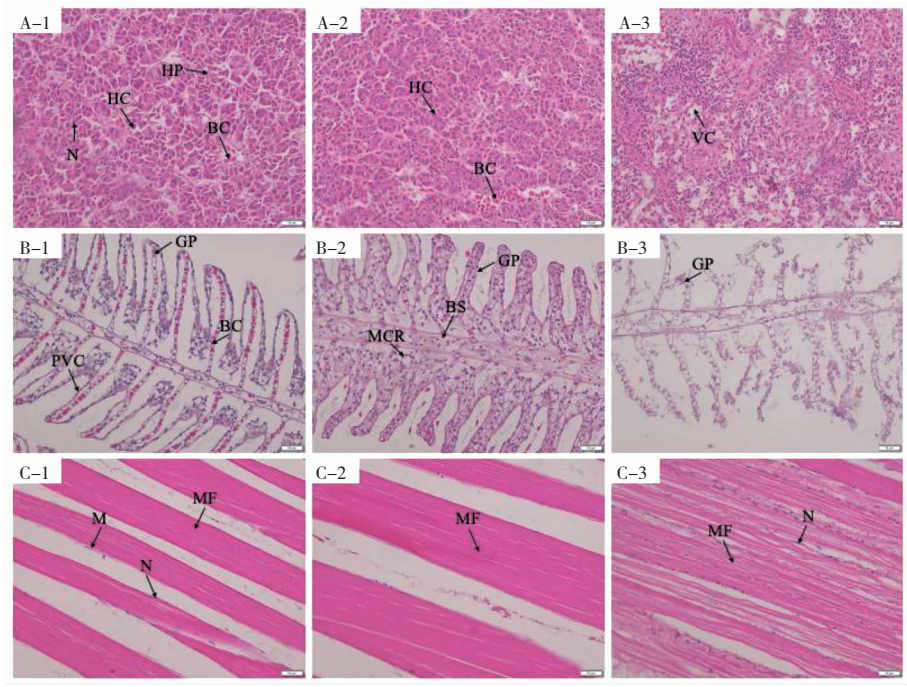


图 5　不同浓度的和厚朴酚对黑斑原鲍肝脏、腮、肌肉组织结构的影响（10×40 倍）

Fig. 5　Effects of different concentrations of honokiol on the histological structure of the liver, gill, and muscle of *G. maculatum* (10 × 40 magnification)

注：A–1. 肝脏，0 mg/L 对照组；A–2. 肝脏，0.50 mg/L 处理组；A–3. 肝脏，1.00 mg/L 处理组；B–1. 鳃，0 mg/L 对照组；B–2. 鳃，0.50 mg/L 处理组；B–3.鳃，1.00 mg/L 处理组；C–1. 肌肉，0 mg/L 对照组；C–2. 肌肉，0.50 mg/L 处理组；C–3. 肌肉，1.00 mg/L 处理组。BC.红细胞；BS.血窦；BV.血管；GP.鳃小片；M.肌原纤维；ME.肌纤维；MRC.线粒体丰富细胞；HC.肝细胞；HP.肝板；VS.空泡；N.细胞核；PVC.扁平上皮细胞。

Notes: A–1. liver, 0 mg/L control group; A–2. liver, 0.50 mg/L treatment group; A–3. liver, 1.00 mg/L treatment group. B–1. gill, 0 mg/L control group; B–2. gill, 0.50 mg/L treatment group; B–3. gill, 1.00 mg/L treatment group. C–1. muscle, 0 mg/L control group; C–2. muscle, 0.50 mg/L treatment group; C–3. muscle, 1.00 mg/L treatment group. BC. blood cell; BS. blood sinusoid; BV. blood vessel; GP. gill lamellae; M. myofibril; ME. muscle fiber; MRC. mitochondria–rich cell; HC. hepatocyte; HP. hepatic plate; VS. vacuole; N. nucleus; PVC. pavement epithelial cell.

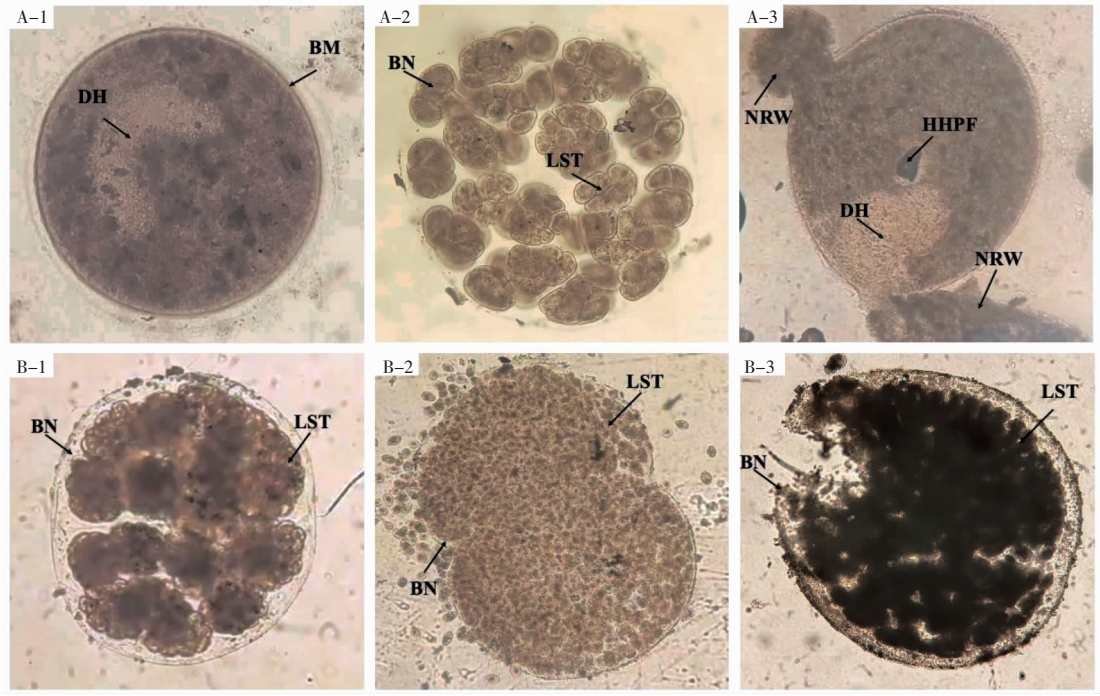


图 6　和厚朴酚（0.50 mg/L）对多子小瓜虫的包囊前体阶段以及包囊体阶段的影响（4×10 倍）

Fig. 6　Effects of honokiol (0.50 mg/L) on the tomont and theront stages of *I. multifiliis* (4 × 10 magnification)

注：BM. 鞭毛；DH. 细胞核；HHPF. 和厚朴酚；NRW. 内容物；BN. 包囊体；LST. 掠食体。A–1 为 0 mg/L 0 d 包囊前体；A–2 为 0 mg/L 5 d 包囊前体；A–3 为 0.50 mg/L 5 d 包囊前体处理组；B–1 为 0 mg/L 5 d 包囊体；B–2 为 0 mg/L 5 d 包囊体；B–3 为 0.50 mg/L 5 d 包囊体处理组。

Notes: BM. basal membrane; DH. dense homogenous material; HHPF. honokiol; NRW. non–refractile water; BN. brownian movement of particles; LST. larval stage trophont. A–1 means tomont, 0 mg/L control, 0 d; A–2 means tomont, 0 mg/L control, 5 d; A–3 means tomont, 0.50 mg/L honokiol treatment group, 5 d. B–1 means theront, 0 mg/L control, 5 d; B–2 means theront, 0 mg/L control, 5 d; B–3 means theront, 0.50 mg/L honokiol treatment group, 5 d.

对照组 15 d 存活率维持 100%。结构观察显示，与未感染对照组（图 7C–a）相比，感染 15 d 后，感染对照组滋养体结构完整、马蹄形大核清晰（图 7C–b）；0.25 mg/L 组部分细胞膜破裂、内容物外泄（图 7C–c）；0.50 mg/L 组普遍异常膨胀、内容物大量漏出、大核固缩呈圆形（图 7C–d）。

3　讨论

3.1　多子小瓜虫可视化 LAMP 检测方法的建立

多子小瓜虫病对于养殖周期长的冷水鱼类（如黑斑原鮸等）表现出极难的临床防治。传统意义上的物理、化学以及生物防治均受限于运营成本、耐药性与环境药物残留等问题[17–20]。因此，开发一种能够在多子小瓜虫病感染初期进行快速、精准检测的技术，对实现黑斑原鮸多子小瓜虫病的早期防控具有重要意义。本研究初步构建了多子小瓜虫的 LAMP 检测体系，在现有测试条件下，对多子小瓜虫 DNA 的检测灵敏度可达 0.01 ng/μL，且检测结果具有良好的重复性。这些特性与已应用于石斑鱼肠孢虫（*Enterospora epinepheli*）[21]、弗氏柠檬酸杆菌（*Citrobacter freundii*）[13]、哈维氏弧菌（*Vibrio harveyi*）[22] 等水产病原的 LAMP 快速检测方法具有方法学上的相似性。相较于传统的 PCR 检测技术，LAMP 反应无需复杂的热循环仪，在恒温条件下即可完成扩增，且对模板 DNA 质量要求相对较低[23,24]，为现场快速筛查提供了技术可能。然而，本研究目前仅针对实验室保存的多子小瓜虫模板进行了方法学验证，临床样本及养殖车间样本的检测数据仍较为有限，后续需扩大样本量以进一步评估该方法的临床适用性。

关于靶标基因的选择，本研究选取多子小瓜虫的 *18S rRNA* 基因作为检测靶标，该基因在物种鉴定中具有高度保守性与特异性，是区分多子小瓜虫与其他相近纤毛虫的常用分子标记[25]。在引物设计策略上，本研究参考了针对石斑鱼肠孢虫及虾肝肠胞虫（*Enterocytozoon hepatopenaei*）等病原所建立的 LAMP 方法[26,27]，上述研究均针对 *SSU rRNA* 基因设

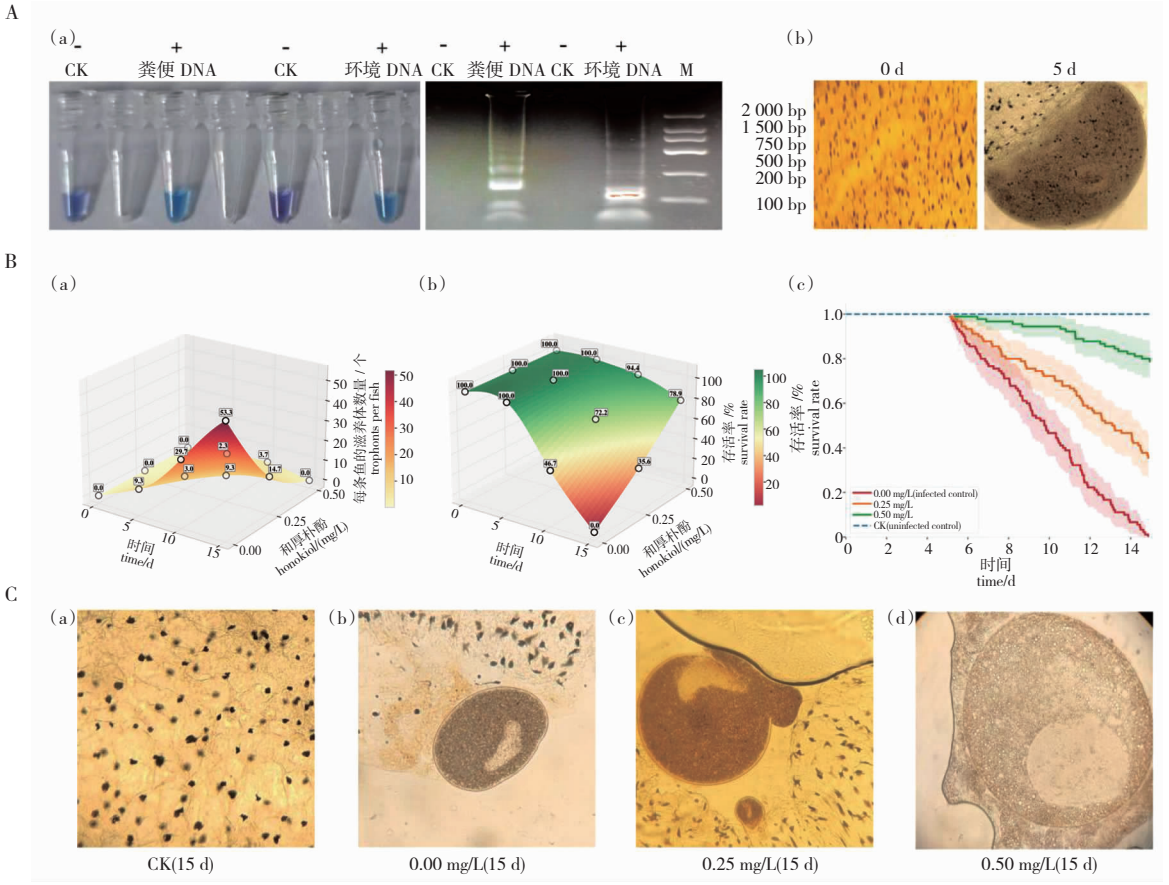


图 7 黑斑原鲍防治效果评价

Fig. 7 Evaluation of the therapeutic efficacy in *G. maculatum*

注:(A)a. LAMP 检测黑斑原鲍养殖中的粪便 DNA 以及环境 DNA;b. 40 倍光学显微镜下检出有多子小瓜虫阳性的黑斑原鲍的皮肤。(B)a. 不同浓度和厚朴酚处理下黑斑原鲍体表多子小瓜虫滋养体数量动态变化(均值 ± 标准误,n=3);b. 不同浓度和厚朴酚处理下黑斑原鲍存活率动态变化(均值 ± 标准误,n=3);c.不同浓度和厚朴酚处理下黑斑原鲍Kaplan–Meier 生存曲线。(C)a. 15 d 时 0 mg/L 和厚朴酚处理下黑斑原鲍体表的多子小瓜虫滋养体;b. 15 d 时 0.25 mg/L 和厚朴酚处理下黑斑原鲍体表的多子小瓜虫滋养体;c. 15 d 时 0.50 mg/L 和厚朴酚处理下黑斑原鲍体表的多子小瓜虫滋养体。

Notes: (A) a. LAMP detection of fecal DNA and environmental DNA (eDNA) in *G. maculatum* culture systems; b. skin of *G. maculatum* positive for *I. multifiliis* observed under 40 × optical microscope. (B) a. dynamics of *I. multifiliis* trophonts on *G. maculatus* under different honokiol concentrations (mean ± SE, n = 3); b. survival dynamics of *G. maculatum* under different honokiol concentrations (mean ± SE, n = 3); c. Kaplan–Meier survival curves of *G. maculatum* exposed to different honokiol concentrations. (C) a. trophonts of *I. multifiliis* on the body surface of *G. maculatum* at 0 mg/L honokiol on day 15; b. trophonts at 0.25 mg/L honokiol on day 15; c. trophonts at 0.50 mg/L honokiol on day 15.

计引物并表现出较好的特异性。经初步筛选,本研究针对多子小瓜虫 *18S rRNA* 基因设计的 LAMP 引物组在现有测试范围内能够特异性地检出多子小瓜虫 DNA,凝胶电泳验证结果与预期相符。但需指出的是,本研究目前仅与黑斑原鲍养殖水环境中常出现的有限物种进行了交叉反应测试,尚未与现有文献中报道的多子小瓜虫 PCR 检测方法[28]进行系统的平行比较,因此尚不能充分论证该方法在普适性与特异性上具有绝对优势。后续研究需选取更多近缘物种及临床阳性样本,并与常规 PCR、qPCR 等检测技术开展方法学比对,以全面评估该 LAMP 体系的检测性能。

3.2 和厚朴酚防治多子小瓜虫病方法的建立

传统防治多子小瓜虫的方法主要依赖化学药物,但普遍存在阶段局限性与安全窗口狭窄的双重瓶颈。孔雀石绿与硝酸亚汞虽曾作为广谱抗寄生虫剂使用,但因其具有致癌、致畸、遗传毒性及环境生物富集性已被主要水产养殖国家禁用[29,30]。现行替代药物中,甲醛(25 mg/L)与硫酸铜(0.2 mg/L 以铜计)仅能有效作用于离体阶段(掠食体、包囊前体),

对寄生于宿主上皮内的滋养体几乎无效[31,32]；高锰酸钾、氯胺 -T 及过氧化氢等对离体阶段的杀灭效果不稳定，也存在无法穿透宿主表皮的问题[32]。天然活性分子如小檗碱、姜黄素、苦参碱等亦具有类似局限，抗虫谱集中于掠食体与包囊前体，难以作用于深层滋养体[33,34]。上述药物失效的共同根源在于其较高的水溶性或极性特征，难以被动扩散穿越鱼体角质层及虫体细胞膜脂质双层，导致滋养体阶段成为现有防治手段的防治瓶颈[35]。更为严峻的是，传统化学药物的安全浓度与有效浓度严重重叠，甲醛等化学物质在商业养殖中的使用会导致 100%宿主死亡事故[32]，而斑马鱼（*Danio rerio*）毒性研究表明和厚朴酚在 0.6 mg/L 即出现组织损伤[36]，这些研究均表明多子小瓜虫防治的候选化合物的宿主，安全性必须建立在严格的浓度控制之上。

本研究表明，和厚朴酚通过其独特的疏水亲脂特性突破了上述双重瓶颈，具备替代传统禁用药物的潜力。与甲醛等化学物质仅作用于离体阶段的药物不同，本研究发现和厚朴酚具有靶向滋养体、包囊前体及包囊体，实现对小瓜虫生活史全覆盖的药用潜力。针对包囊前体阶段，其因缺乏保护性囊壁，单层细胞膜直接暴露于水环境，对药物最为敏感[37]；和厚朴酚的疏水结构插入细胞膜脂质双层后，扰乱脂质排列，导致细胞膜通透性激增及离子失衡，最终引发渗透压崩溃[38]。针对传统药物无法触及的滋养体阶段进一步研究发现，0.50 mg/L 和厚朴酚处理 15 d 可穿透鱼体上皮组织，导致虫体异常膨胀、细胞膜破裂及马蹄形大核崩解。这种透皮能力源于其疏水特性，通过被动扩散穿越角质层，直接杀灭皮下寄生的滋养体，从根本上区别于甲醛等因无法穿透宿主表皮而难以直接作用于滋养体的传统模式[38,39]。相比之下，包囊体因外部糖蛋白胶质囊壁的物理屏障，表现出显著更高的耐药性（LD_{50}：0.67 mg/L vs. 0.53 mg/L，$P<0.01$），但 0.50 mg/L 持续作用 5 d 仍可破坏囊壁，使内部掠食体丧失游动与寄生能力[40]。这种对滋养体、包囊前体及包囊体的多节点干预，同步阻断了病原的体内寄生与体外传播环节，弥补了传统药物只能分段打击、无法阻断病原生活史的结构性缺陷[41]。

本研究亦发现，宿主安全性及环境风险评估揭示和厚朴酚与其他化学制剂一样存在显著的剂量依赖性毒性，其有效杀虫浓度与安全浓度之间间距有限，治疗窗口同样狭窄。0.50 mg/L 和厚朴酚暴露下，黑斑原鮡鳃组织呈现鳃小片收缩、弯曲及线粒体丰富细胞（MRC）数量增加，此为鱼类应对渗透压胁迫的典型代偿反应[42]；上述鳃损伤模式在其他酚类物质中同样存在。例如，邻甲酚暴露后，斑马鱼鳃小片末端同样出现弯曲肿大充血，上皮细胞肿胀、坏死脱落等病理变化[43]。在此浓度下，黑斑原鮡的肝脏出现血细胞数量增加（代谢性充血），但肝细胞结构仍保持完整；其肌肉组织仅见肌纤维间隙轻度增宽[44]。上述改变均属于可逆性生理应答，表明该浓度下宿主出现可耐受性。浓度升至 1.00 mg/L 时，鳃上皮细胞大量脱落、鳃小片断裂，严重损害呼吸功能；肝脏出现广泛空泡化及核固缩，与二苯甲酮和奎宁磷等化合物所致肝损伤情况相似[45-47]；肌肉组织出现肌原纤维溶解，出现肌肉病变最终导致鱼体应激、运动机能丧失[48-50]。这些不可逆性结构破坏是宿主死亡的主要病理基础。因此，和厚朴酚作为外源性酚类化合物，其环境归趋、生物降解速率及尾药排放生态效应尚需系统评估。和厚朴酚在 0.50 mg/L 时虽可杀灭各生活阶段虫体，但已接近宿主耐受上限，治疗窗口有限。因此，其临床应用必须以精准剂量调控与养殖水体药残监控为前提，在确保宿主安全的同时降低环境释放风险。

参 考 文 献

[1] 武梦雨，黄建盛，何昊明，等.野生、驯养和养殖黑斑原鮡肌肉营养成分分析与评价[J].上海海洋大学学报，2026，35(1)：84–95.

[2] 张颖，马波，李雷，等.黑斑原鮡肝脏与副肝代谢差异比较[J].中国水产科学，2022，29(3)：435–445.

[3] 郑启泽.雅鲁藏布江中上游四种国家二级保护鱼类生态适宜区影响因素分析[D]. 拉萨：西藏大学，2024：10–12.

[4] 陈美群，李宝海，周建设，等.黑斑原鮡的生物学研究进展[J].安徽农业科学，2016，44(3)：59–61.

[5] 丁城志，陈毅峰，何德奎，等.雅鲁藏布江黑斑原鮡繁殖生物学研究[J].水生生物学报，2010，34(4)：762–768.

[6] 何昊明，周建设，王壮壮，等.黑斑原鮡幼鱼的生长特性[J].甘肃农业大学学报，2025，60(2)：64–70.

[7] 周建设，潘虎，陈美群，等.病死黑斑原鮡表皮和肠道微生物群落研究[J].安徽农业科学，2018，46(8)：80–85.

[8] 张颖，尹家胜，马波，等.黑斑原鮡皮肤组织结构及其 COL1A1 基因的克隆与分析[J].高原科学研究，2021，5(3)：1–10.

[9] 郑春茹,孟佑致,沈宇航,等.患小瓜虫病黄鳝的组织病理学特征及小瓜虫株系的遗传多样性[J]. 中国水产科学,2025,32(10):1534-1545.

[10] 李雪菡,齐红莉,吕湘琳,等.多子小瓜虫对三种化学药物的敏感性研究[J].天津农学院学报,2021,28(3):69-74.

[11] 曹泽艺,周庆杰,陈凯,等.多子小瓜虫 PCR 和 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J].水产学报,2024,48(10):109415.

[12] Chen Qiang, Zhang Lijuan, Song Tieying, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and visual detection of *Anguillid herpesvirus* 1[J]. Journal of Virological Methods, 2024, 330: 115014.

[13] 公翠萍,娄剑锋,孙威,等.弗氏柠檬酸杆菌可视化 LAMP 检测方法的建立[J].水产学杂志,2025,38(1):76-81.

[14] 董靖,胥宁,刘永涛,等.和厚朴酚对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用[J].水生生物学报,2020,44(3):541-545.

[15] 郭治家,崔亚玺,夏溪延,等.和厚朴酚对水霉孢子抑制效果的研究[J].畜牧兽医杂志,2024,43(4):37-41,56.

[16] 赵子晨.刺激隐核虫丰度周年变化与水质因子的相关分析及和厚朴酚诱导其凋亡作用研究[D].海口:海南大学,2022:6-8.

[17] 秦蕾,徐静,张晓君.泥鳅的凡隆气单胞菌感染[J].中国人兽共患病学报,2008,24(12):1100-1102.

[18] Wu C-J, Wu J-J, Yan J-J, et al. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan[J]. Journal of Infection, 2007, 54(2):151-158.

[19] 吕爱军,李槿年,余为一.嗜温气单胞菌研究进展[J].中国动物检疫,2000,17(11):42-43.

[20] 姚嘉赟,张成赛,尹文林,等.N- 取代四氢异喹啉衍生物的合成及杀多子小瓜虫研究[J].水产科学,2021,40(5):768-773.

[21] 解恩佩,万晓媛,要菲,等.石斑鱼肠孢虫环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用[J].渔业科学进展,2026,47(1):151-160.

[22] 于劼豪,黄郁葱,孙良娟,等.哈维氏弧菌 LAMP 可视化检测方法的建立[J].海洋渔业,2025,47(1):29-39.

[23] Hayashida K, Kajino K, Hachaambwa L, et al. Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for human african trypanosomiasis[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015, 9(3): e0003578.

[24] Camille P, Flora K, Thomas P, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a nonendemic setting[J]. Parasite, 2017, 24: 53.

[25] Kumar V, Das B K, Swain H S, et al. Outbreak of *Ichthyophthirius multifiliis* associated with *Aeromonas hydrophila* in *Pangasianodon hypophthalmus*: the role of turmeric oil in enhancing immunity and inducing resistance against co-infection[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 16643224.

[26] Sathish K T, Suvetha S, Meenakshi P S, et al. Point-of-care detection of shrimp pathogens WSSV and EHP using multiplex LAMP integrated lateral flow strips [J]. Aquaculture International, 2026, 34:30.

[27] 邹莹,郭晓萌,万晓媛,等.十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用[J].渔业科学进展,2020,41(6):156-164.

[28] Siddique F, Yang Mingxiu, Xu Xiaofeng, et al. Comparative genomic analysis and rapid molecular detection of *Xanthomonas euvesicatoria* using unique ATP-dependent DNA helicase *recQ*, *hrpB1*, and *hrpB2* genes isolated from *Physalis pubescens* in China [J]. Plant Pathology Journal, 2023, 39(2): 191-206.

[29] 桂英爱,王洪军,刘春林,等.孔雀石绿及其代谢产物在水产动物体内的残留、危害及检测研究进展[J].大连水产学院学报,2007(4):293-298.

[30] 沈盎绿,沈新强,邵留,等.汞对水生动物的危害及机理[J].水利渔业,2005(4):105-107.

[31] Forwood J M, Harris J O, Los M, et al. Minimum effective concentrations of formalin and sodium percarbonate on the free-living stages of an Australian isolate of *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. Parasitology Research, 2014, 113 (9): 3251-3258.

[32] Picón-Camacho S M, Marcos-Lopez M, Bron J E, et al. An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish[J]. Parasitology, 2012, 139(2):149-190.

[33] Meng Youzhi, Yang Hao, Tu Xiao, et al. In vitro and in vivo assessment of *Nelumbo nucifera*, *Glycines testa*, and *Agrimonia eupatoria* extracts against different developmental stages of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Aquaculture, 2025, 604:742465.

[34] 胡洋,张旭,王欢,等.药用植物资源在水产动物疾病控制中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2022,42(11):43-58.

[35] Riviere J E, Brooks J D. Predicting skin permeability from complex chemical mixtures: dependency of quantitative structure permeation relationships on biology of skin model used[J]. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 2011, 119(1): 224–232.

[36] Lin Jue, Liu Hongli, Huang Xiaoli, et al. Toxicological effects of Honokiol on zebrafish and its underlying mechanism [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2024, 38(8): e23789.

[37] 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(2)：197–225.

[38] 张瑞涛，吴振刚，赵军，等.厚朴酚与和厚朴酚透皮吸收的差异性[J].医药导报，2018，37(6)：654–658.

[39] 张明发，沈雅琴.和厚朴酚的药动学研究进展[J].药物评价研究，2022，45(8)：1689–1696.

[40] 德布罗国 J，拉艾马克思 J M，布克曼 K.鱼类体表寄生虫感染的治疗：中国，CN111787937A[P]. 2020–10–16.

[41] 黄璐熹，明成玥，玉洁莹，等.植物源药物防治水产动物纤毛虫病的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医，2023(17)：49–54.

[42] Zhao Zichen, Jiang Manyi, Huang Jihui, et al. Honokiol induces apoptosis–like death in *Cryptocaryon irritans* Tomont[J]. Parasites & Vectors, 2023, 16(1): 287.

[43] 宋兴超，江倩倩，甘真博，等.邻甲酚对斑马鱼成鱼急性毒性及组织显微结构的影响[J].南方农业学报，2024，55(1)：290–298.

[44] Alsubaie N, Abd–Elhakim M Y, Mohamed A, et al. Protective role of purslane supplementation against cadmium–induced renal and gill toxicity in nile tilapia: insights into antioxidant defense and ion transport regulation[J]. Biological Trace Element Research, 2026, 204(3): 1466–1482.

[45] 柯怀泱，张彦坤，张纪亮，等.二苯甲酮(BP–3)对黄尾蓝魔鱼(*Chrysiptera parasema*)的生态毒理效应[J].生态毒理学报，2022，17(5)：75–81.

[46] Kunhiraman D P, Binitha R N. Histopathology as a tool for assessing the extent of toxicity of quinalphos in fish[J]. International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Topics, 2022, 3(5): 204–208.

[47] Cardoso–Vera J D, Gómez–Oliván L M, Islas–Flores H. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of phenytoin damages early development and induces oxidative stress in zebrafish embryos[J]. Comparative Biochemistry Physiology C: Toxicology & Pharmacology, 2022, 253: 109265.

[48] Nimmy M V, Pawlin V J. Effect of bioaccumulation on fish histopathology in the *Mugil cephalus* and O*reochromis mosambicus*, inhabiting lake Chakkamkandam, Kerala [J]. International Journal of Entomology Research, 2023, 8(2): 103–108.

[49] Othmène Y B, Hamdi H, Amara I, et al. Tebuconazole induced oxidative stress and histopathological alterations in adult rat heart[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 170: 104671.

[50] 罗智文，董志祥，林连兵，等.鱼类重要免疫器官抗菌机制的研究进展[J].水产科学，2021，40(4)：624–634.