

第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病及免疫特性研究

黄永春^{1,2}, 艾华水¹, 殷志新¹, 黄仙德¹, 李色东³, 翁少萍¹, 何建国^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

3. 广东湛江恒兴集团有限公司, 广东 广州 524033)

摘要: 35个第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系和未选育对虾按每克体重注射 10^3 拷贝 WSSV 病毒量, 根据选育家系的抗病性能分 3 个类群: 高抗性类群, 成活率达 $24.45\% \pm 6.56\%$; 中抗性类群, 成活率为 $10.70\% \pm 1.41\%$; 敏感类群, 成活率为 $2.72\% \pm 2.76\%$, 各类群间差异显著 ($P < 0.01$)。对分别代表高抗、中抗和敏感类群的 12、7 和 3 号家系以及未选育对虾按每克体重注射 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 拷贝 WSSV, 高抗性对虾在 10^2 、 10^3 、 10^4 及 10^5 感染水平下的存活率分别为 100% 、 $23.3\% \pm 3.5\%$ 、 $7.8\% \pm 1.9\%$ 和 0% ; 中抗对虾分别为 $87.7\% \pm 3.9\%$ 、 $12.2\% \pm 1.9\%$ 、 0% 和 0% ; 敏感对虾分别为 $54.4\% \pm 3.9\%$ 、 $2.2\% \pm 1.9\%$ 、 0% 和 0% ; 未选育对虾分别为 $51.1\% \pm 5.1\%$ 、 0% 、 0% 和 0% 。在 10^3 拷贝组感染过程中免疫相关因子的变化表明, 高抗对虾血液中血细胞数分别比中抗、敏感和未选育对虾提高 20.7% ($P > 0.05$), 36.7% ($P < 0.05$) 和 34.4% ($P < 0.05$); PO 活力上述三类对虾提高 40.0% ($P < 0.05$), 76.3% ($P < 0.05$) 和 63.4% ($P < 0.05$); SOD 活力分别比上述三类对虾提高 31.1% ($P > 0.05$), 58.8% ($P < 0.05$) 和 32.0% ($P > 0.05$); POD 活力分别比上述三类对虾提高 29.6% ($P > 0.05$), 44.9% ($P < 0.05$) 和 43.3% ($P < 0.05$); 血清蛋白含量分别比上述三类对虾提高 31.2% ($P > 0.05$), 38.7% ($P < 0.05$) 和 39.3% ($P < 0.05$), 而敏感对虾和未选育对虾之间则无显著差异。结果表明, 经四代选育后的高抗对虾免疫性能明显高于其他对虾, 表现出良好的抗 WSSV 性能。

关键词: 凡纳滨对虾; 白斑综合征病毒; 人工感染; 家系选育; 免疫相关因子

中图分类号: S 941.41

文献标识码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 俗称南美白对虾, 原产于南美洲太平洋赤道南北沿海, 是目前世界养殖产量最高的三大虾种之一^[1], 我国目前凡纳滨对虾养殖产量占对虾总产量的 80% 以上^[2]。由于养殖环境恶化、种质资源的破坏与退化以及非传染性疾病和传染性疾病滋生等一系列问题, 严重地制约着对虾养殖业的进一步发展。特别是由白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 引发的病毒性流行病, 给我国对虾养殖业造成了巨大的经济损失。WSSV 传播迅速, 对虾感染虾后 7 ~ 10 d 内死亡率可达 80% ~

100%, 是迄今为止危害最为严重的一种对虾病毒, 至今仍未得到完全控制, 成为目前对虾养殖业可持续发展的主要障碍之一^[3]。国内外学者从培育出无特异病原 (specific pathogen free, SPF) 的健康虾^[4-6]、改善养殖环境^[7-11] 以及添加中草药制剂^[12-14]、免疫增强剂^[15-22] 等提高对虾非特异免疫力等方面着手来提高凡纳滨对虾抗 WSSV 的感染, 预防 WSSV 的暴发, 但这些措施仍无法从根本上解决对虾养殖中白斑综合征病毒的危害。因此, 采用现代生物技术手段培育抗病力强的对虾新品种, 已成为我国水产科技界必须解决

收稿日期: 2010-04-28 修回日期: 2010-08-05

资助项目: 凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒品系选育——“南方海水养殖种子工程规模化应用技术 (I) 项目 (2002AA603031)

通讯作者: 何建国, E-mail: lshjg@mail.sysu.edu.cn

的重大课题,也是解决对虾白斑综合征病毒危害的根本途径^[23-24]。在凡纳滨对虾抗 WSSV 的良种选育方面,迄今仅见 Pan 等^[25]进行一代个体选育和一代家系选育的报道,以及不同养殖密度条件下的免疫相关因子的变化。有关凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病和免疫特性尚未报道。本实验以第四代选育对虾为材料,经定量注射感染研究选育对虾的抗病和免疫特性,以及感染过程中免疫相关因子(THC、PO、SOD、POD 和血清蛋白的含量)的变化特征,探讨抗病选育对虾抗 WSSV 的机制,为凡纳滨对虾抗 WSSV 良种的选育提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

在一代个体选育(G_1)和一代家系选育(G_2)基础上^[25],2004 年对 G_2 进行 3 次的感染筛选,经人工催熟,采用一雌一雄一一配对方法于 2005 年建立 29 个家系(G_3),同样方法对 G_3 进行感染筛选并于 2006 年建立 35 个家系(G_4)。未选育对虾为按常规育苗方法获得的对虾,各实验对虾规格:体重(10.21 ± 1.05) g,体长(10.2 ± 1.3) cm。

1.2 方法

感染实验 取经 PCR 检验为 WSSV 感染的病虾肌肉组织,并定量检测样品 WSSV 的拷贝量^[26],低温保存备用。

实验前将 300 L 实验桶清洗干净,用 5% 高锰酸钾溶液浸泡 1 h 消毒后冲洗干净。实验海水为经三级(沙井→滤池→过滤罐)过滤的天然海水,盐度 28.15, pH 7.8~8.2,水温 26.2~28.5 °C。放虾前 1 天注入过滤海水,微充气。

从每个家系随机取样健康对虾,每天早中晚各投喂 1 次,投饵量为体重的 2%~3% (恒兴牌),每天吸污 1 次,换水 1 次,换水量约 30%,保持良好的生长环境。经暂养 5~7 d 后,每一家系三组,每组 30 尾,共取 90 尾,每尾按每克体重注射 10^3 拷贝 WSSV 病毒量,注射部位为第 2 腹节与第 3 腹节连接处。实验期间,每天 6:00,9:00,12:00,15:00,18:00,21:00,24:00 时检查虾的活动情况,及时收集、编号、保存(-80 °C)死亡对虾,并作 PCR 检测,每天正常投喂、吸污、换水。并设未选育对虾为参照组,注射方法和实验管理同上。

不同感染水平的应答 以 12、7 和 3 号家系分别代表高抗、中抗和敏感家系以及参照组未选育对虾,实验对虾经暂养 5~7 d 后,按每克体重注射 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 拷贝 WSSV 设 4 个感染水平,每个水平分 3 组,每组 30 尾。

免疫相关因子的检测 高抗、中抗和敏感家系(12、7 和 3 号家系)实验对虾经暂养 5~7 d 后,每一家系取 100 尾,每克体重注射 10^3 拷贝 WSSV 病毒量,并未选育对虾为参照组,注射方法和实验管理同上。分别在感染 0、24、48、72、96、120、168 h 7 个时段随机取各 5 尾活虾,从血窦中取血,一部分计数血细胞,另一部分 4 °C 保存,过夜,待血清析出后在冷冻离心机 2 500 r/min 离心 10 min,取上清液做血清样品进行免疫相关因子的测定。

血细胞计算^[27] 用血球计数板在显微镜下进行血细胞计数,每个家系每时段取 5 尾对虾,每尾对虾 3 个样品,取均值,计算每毫升血淋巴中所含血细胞总量。

酚氧化酶的活力(PO)的测定方法^[27-29] 以 L-dopa 为底物,采用改进的 Ashida 方法,将 300 μ L 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸钾缓冲液与 10 μ L 0.01 mol/L L-dopa 及 10 μ L 对虾血清于室温下混匀,每隔 2 min 读取 490 nm 波长下的光密度值(OD_{490}),测量 10 次,以 OD_{490} 对反应时间作图,以实验条件下每分钟 OD_{490} 增加 0.100 1 为 1 个酶活力单位。

超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定^[27-28] 超氧化物歧化酶测定试剂盒测定(南京建成生物工程研究所生产),按其标准步骤,在 96 孔酶标板中加样,用酶标仪(BioRad, Safire)进行微量测定,样品及试剂的加样量为标准步骤的 1/10。

过氧化物酶(POD)相对活力的测定方法^[27-28] 过氧化物酶测定试剂盒测定(南京建成生物工程研究所生产),按其标准步骤在 96 孔酶标板中加样,用酶标仪(550, BioRad)进行微量测定,样品及试剂的加样量为标准步骤的 1/10。

血清蛋白含量测定^[27] 以标准蛋白作曲线采用考马斯亮兰蛋白法测量(南京建成生物工程研究所生产),按其标准步骤在 96 孔酶标板中加样,用酶标仪(550, BioRad)进行微量测定,样品及试剂的加样量为标准步骤的 1/10。

1.3 数据分析

采用 SPSS 10.0 统计分析软件对不同实验组间数据的比较采用单因素多重方差分析方法进行,差异的显著性设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 第四代选育对虾对 WSSV 感染的敏感性

各家系对虾感染 WSSV 病毒 24 h 内尚无异常,感染 30 h 后各家系对虾表现出不同的状态,抗病性能差的家系对虾出现明显厌食和活动迟缓等症状,感染后第 31.5 小时出现第一例对虾死亡,36 ~ 72 h 间抗病性能差的家系对虾累计死亡率达 56.7% ~ 70.0%,感染后 148 h 后 8、9、13、14、19、29、33、35 号家系和未选育对虾全部死亡,个别家系成活率在 3.3% ~ 6.7%。

抗病性能中等的家系对虾在感染 33.5 h 后,部分对虾出现摄食下降、活动变缓;感染后第 38.5 小时出现第一例对虾死亡,72 ~ 120 h 间累

计死亡率达 50.0% ~ 66.7%;第 171 小时最后一例死亡对虾,存活对虾的活动、摄食等逐渐恢复正常,家系存活率为 6.7% ~ 16.67%。

抗病性能强的家系对虾在感染 38 h 后部分对虾摄食下降、活动变缓;第 41.2 小时出现第一例对虾死亡;96 ~ 168 h 间累计死亡数率达 43.3% ~ 63.3%,第 243 小时最后一例死亡对虾;存活率 20.00% ~ 36.67%,其中 31 号家系成活率为 36.67%,表现出良好的抗 WSSV 性能。

以未选育对虾为参照,经多重比较和方差分析,35 个选育家系按成活率划分可分为三个类群:高抗家系群——12、21、23、28、30 和 31 号家系,成活率为 $24.45\% \pm 6.56\%$;中抗家系群——6、7、10、15、16、20、22、26、27、32 和 34 号家系,成活率为 $10.70\% \pm 1.41\%$;其余为敏感家系群,成活率为 $2.72\% \pm 2.76\%$ 。且各抗性群之间差异显著 ($P < 0.01$)。

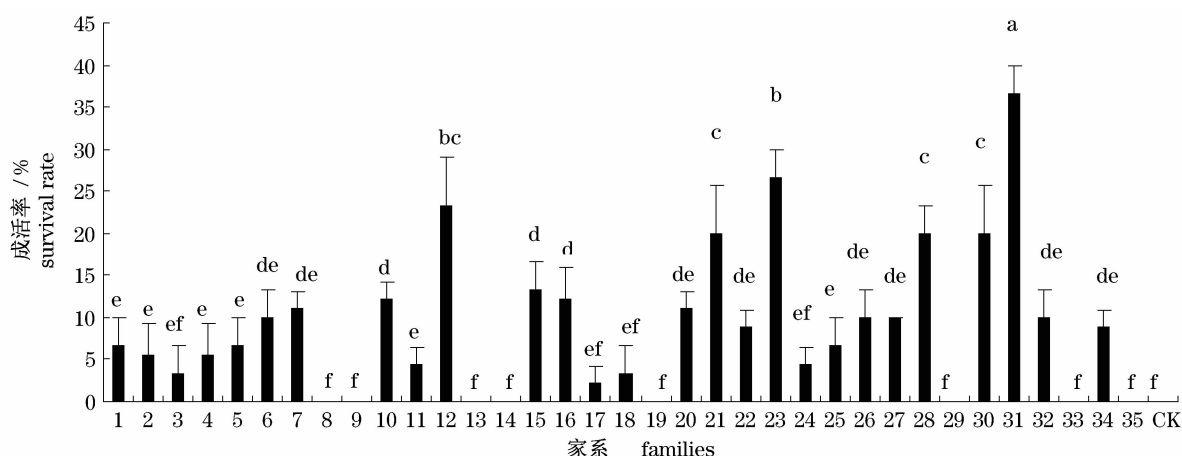


图1 第四代选育家系与未选育对虾人工感染 10^3 拷贝 WSSV 后成活率的比较

1. CK 表示未选育对虾; 2. 图中标不同字母平均值间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Comparison of survival rate of selective breeding families (G_4) and non-selected shrimp post infection with 10^3 copies WSSV/g (body weight)

1. CK indicates that non-selected shrimp; 2. Means \pm SD with the different letter are significantly different ($P < 0.05$).

2.2 不同抗性家系对虾对不同 WSSV 感染水平的应答

由图 2 可知,分别代表高抗、中抗和敏感群的 12、7 和 3 号家系对虾以及未选育对虾在不同感染水平下反应不一,人工注射 10^2 拷贝组的高抗性对虾在实验早期活动稍有异常,但很快恢复正常,成活率 100%;中抗性对虾成活率 $87.7\% \pm 3.9\%$;敏感对虾成活率 $54.4\% \pm 3.8\%$;未选育

对虾成活率 $51.1\% \pm 5.1\%$,除敏感对虾与未选育对虾无明显差异外 ($P > 0.05$),其他各抗性对虾间差异明显 ($P < 0.05$)。

注射 10^3 拷贝组的高抗性对虾,成活率 $23.3\% \pm 3.5\%$;中抗性对虾成活率 $12.2\% \pm 1.9\%$;敏感对虾成活率 $2.2\% \pm 1.9\%$;未选育对虾成活率 0,各组间成活率差异明显 ($P < 0.05$)。

注射 10^4 拷贝组的高抗性对虾成活率 $7.8\% \pm$

1.9% ;其余对虾成活率均为0。

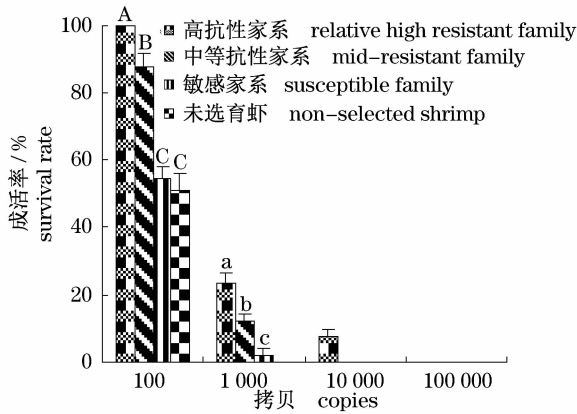


图2 第四代选育家系对虾和未选育对虾感染不同 WSSV 剂量的成活率

不同字母平均值间差异显著 ($P < 0.05$), 以下同。

Fig. 2 Survival rate of selective breeding family (G_4) and non-selected shrimp infected by WSSV with different dosages

Means \pm SD with the different letter are significantly different ($P < 0.05$). The follows are the same.

注射 10^5 拷贝组的各抗性对虾成活率均为0, 但高抗性对虾感染 10^5 拷贝后, 在第 (42.3 ± 2.3) 小时第一例死亡对虾, 第 (74.8 ± 4.0) 小时对虾累计死亡率达 50%; 第 (192.2 ± 5.4) 小时对虾全部死亡; 中抗性对虾在感染后第 (40.5 ± 1.9) 小时第一例死亡对虾, 第 (68.9 ± 4.0) 小时对虾累计死亡率达 50%; 第 (121.3 ± 5.8) 小时对虾全部死亡; 敏感对虾在感染后第 (30.3 ± 1.8) 小时第一例死亡对虾, 第 (48.3 ± 4.9) 小时对虾累计死亡率达 50%; 第 ($105.5 \pm$) 小时对虾全部死亡; 未选对虾在感染后第 (28.8 ± 1.2) 小时第一例死亡对虾, 第 (47.5 ± 4.3) 小时对虾累计死亡率达 50%, 第 (98.7 ± 6.8) 小时对虾全部死亡。除敏感对虾与未选育对虾在第一例死亡对虾时间、死亡一半时间和全部死亡时间上无明显差异外 ($P > 0.05$), 其他各抗性对虾之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 不同抗性家系对虾感染 WSSV 后免疫相关因子的变化

血细胞 (THC) 感染前 (0 h) 各实验对虾血液中血细胞数的比较发现: 高抗性家系对虾分别比中等抗性家系对虾、敏感家系对虾和未选育对虾提高 3.05%、23.15% 和 25.89% (图 3)。

人工感染 WSSV 后, 各抗性对虾血细胞数迅速增加, 24 h 达到高峰; 尔后血细胞数开始下降; 高抗性家系对虾到 96 h 时趋于平稳; 其他对虾则一直呈下降趋势。感染前后高抗、中抗、敏感和未选育对虾血细胞数分别为 $(3.32 \pm 0.527) \times 10^6$ 、 $(2.75 \pm 0.85) \times 10^6$ 、 $(2.43 \pm 0.76) \times 10^6$ 和 $(2.47 \pm 0.67) \times 10^6$ cell/mL。高抗对虾血细胞数分别比中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾高 20.7% ($P > 0.05$)、36.7% ($P < 0.05$) 和 34.4% ($P < 0.05$); 中抗对虾分别比敏感对虾和未选育对虾高 13.2% ($P > 0.05$) 和 11.3% ($P > 0.05$); 未选育对虾比敏感对虾高 1.6% ($P > 0.05$)。

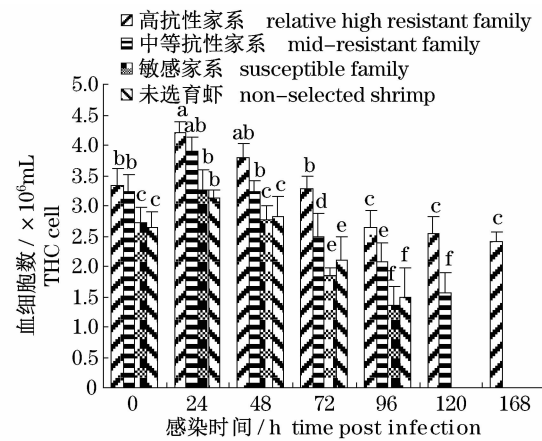


图3 人工感染 WSSV 后对虾血细胞的变化
Fig. 3 THC variation of the breeding selective families (G_4) and non-selected shrimp post WSSV-infected

PO 活力 由图 4-A 可见, 感染前 (0 h) 各实验对虾血液中的 PO 活力的比较发现, 高抗性家系对虾分别比中等抗性对虾、敏感对虾和未选育对虾提高 23.02%、30.53% 和 29.05%。

人工感染 WSSV 后至 24 h, 各抗性对虾血液中 PO 活力急剧下降; 48 h 达到最低后, 敏感对虾和未选育对虾 PO 活力缓慢上升; 中等抗性对虾血液中 PO 活力在 48 h 后逐步上升, 72 h 后又稍有下降, 96 h 时又开始回升; 高抗性对虾血液中 PO 活力在 48 h 后则稳步上升, 特别在 120 ~ 168 h 间迅速上升。感染前后高抗、中抗、敏感和未选育对虾血液中 PO 活力分别为 (0.67 ± 0.12) 、 (0.48 ± 0.13) 、 (0.38 ± 0.16) 和 (0.41 ± 0.15) 。高抗对虾血液中 PO 活力分别比中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾高 40% ($P < 0.05$)、76.3% ($P < 0.05$) 和 63.4% ($P < 0.05$); 中抗对虾分别比敏感

对虾和未选育对虾高 26.3% ($P > 0.05$) 和 17.1% ($P > 0.05$); 未选育对虾比敏感对虾高 7.9% ($P > 0.05$)。

SOD 活力检测与比较 由图 4-B 可见, 感染前(0 h)各实验对虾血液中的 SOD 活力比较发现, 高抗性家系对虾分别比中等抗性对虾、敏感对虾和未选育对虾提高 22.83%、32.88% 和 28.13%。

人工感染 WSSV 后至 24 h, 各抗性对虾血液中 SOD 活力急剧下降, 72 h 达到最低; 高抗性对虾和中等抗性对虾血液中 SOD 活力在 96 h 后逐步上

升; 敏感对虾和未选育对虾血液中 SOD 活力上升缓慢。感染前后高抗、中抗、敏感和未选育对虾血液中 SOD 活力分别为 (32.59 ± 8.86)、(24.58 ± 8.07)、(20.53 ± 8.66) 和 (24.90 ± 7.77) U/mg。高抗对虾血液中 SOD 活力分别比中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾高 31.1% ($P > 0.05$)、58.8% ($P < 0.05$) 和 32.01% ($P > 0.05$); 中抗对虾比敏感对虾高 21.0% ($P > 0.05$); 比未选育对虾低 0.2% ($P > 0.05$); 未选育对虾比敏感对虾高 21.2% ($P > 0.05$)。

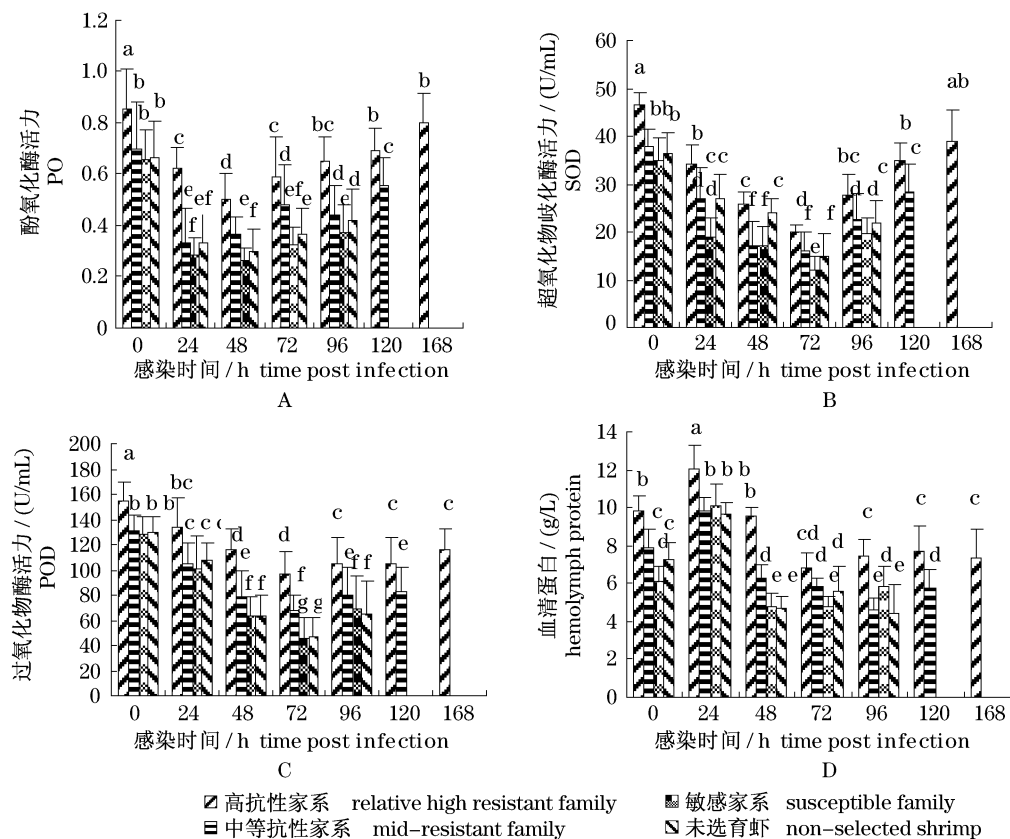


图 4 选育家系对虾与未选育对虾感染 WSSV 后血液中 PO(A)、SOD(B)、POD(C) 活力和血清蛋白含量(D) 的变化

Fig. 4 PO(A), SOD(B), POD(C) activities and hemolymph protein content of selective breeding family (G_4) and non-selected shrimp

POD 活力检测与比较 由图 4-C 可见, 感染前(0 h)各实验对虾血液中的 POD 活力比较发现, 高抗性家系对虾分别比中等抗性对虾、敏感对虾和未选育对虾提高 17.53%、20.15% 和 19.73%。

人工感染 WSSV 后至 24 h, 各抗性对虾血液中 POD 活力开始下降, 72 h 达到最低; 高抗性对虾和中等抗性对虾血液中 POD 活力在 96 h 后逐步上

升; 敏感对虾和未选育对虾血液中 POD 活力上升缓慢。感染前后高抗、中抗、敏感和未选育对虾血液中 POD 活力分别为 (117.89 ± 20.11)、(90.93 ± 23.31)、(81.34 ± 32.91) 和 (82.24 ± 34.34) U/mg。高抗对虾血液中 POD 活力分别比中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾高 29.64% ($P > 0.05$)、44.93% ($P < 0.05$) 和 43.33% ($P < 0.05$); 中抗对虾分别比敏感对虾和未选育对虾

高 11.8% ($P > 0.05$) 和 10.4% ($P > 0.05$); 未选育对虾比敏感对虾高 1.1% ($P > 0.05$)。

血清蛋白含量比较 由图 4-D 可见, 感染前(0 h)各实验对虾血液中的血清蛋白含量比较发现, 高抗性家系对虾分别比中等抗性对虾、敏感对虾和未选育对虾提高 24.25%、60.98% 和 35.23%。

人工感染 WSSV 后至 24 h, 各抗性对虾血液中血清蛋白含量迅速上升, 24 h 达到最高, 尔后开始下降, 敏感对虾和未选育对虾在 48 h 时血清蛋白含量达到最低, 并维持较低水平; 中等抗性对虾在 96 h 时血清蛋白含量达到最低, 尔后缓慢上升; 高抗性对虾血液中血清蛋白含量在 72 h 后逐步上升。感染前后高抗、中抗、敏感和未选育对虾血液中血清蛋白含量分别为 (8.79 ± 1.82)、(6.70 ± 1.87)、(6.34 ± 2.17) 和 (6.31 ± 2.19) mg/L。高抗对虾血液中血清蛋白含量分别比中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾高 31.2% ($P > 0.05$)、33.7% ($P < 0.05$) 和 39.3% ($P < 0.05$); 中抗对虾分别比敏感对虾和未选育对虾高 5.7% ($P > 0.05$) 和 6.2% ($P > 0.05$); 未选育对虾比敏感对虾高 0.5% ($P > 0.05$)。

3 讨论

选择育种是新品种培育的有效方法, 已经在动植物的育种中取得广泛的成功。其中, 建立家系并进行系统选择是选择育种的重要手段和遗传育种工作中非常重要的方法之一^[30-31]。因此, 每一代家系选育获得的优良家系既可以作为下一代选育的亲本, 也可以直接进行生产, 并抑制遗传衰退^[32]。

研究的结果表明, 35 各选育家系可明显划分三个不同的抗病类群: 高抗、中抗和敏感群。高抗对虾在 10^4 拷贝感染水平与中抗对虾 10^3 拷贝感染水平下存活率基本相近; 同时能抵御 10^2 拷贝低浓度的感染, 且无死亡现象。高抗和中抗对虾感染 WSSV 后的死亡高峰比敏感对虾和未选育对虾推迟 2~3 d, 从而进一步反映了选育对虾强劲的抗病性能。因此, 对虾经一代个体选育和三代抗病家系选育的高抗对虾能有效阻止 WSSV 的感染规模、感染进程, 延缓对虾 WSSV 暴发时间, 这对对虾养殖采取相应预防和治疗措施提供了宝贵的时机, 也可在养殖过程中减少渔药使用, 确

保对虾的健康养殖。研究的结果充分表明家系选育的有效性, 通过家系选育确实能选择抗病强的家系。另外, 这些在抗病性能上差异明显的不同家系为下一步筛选抗病性状相关分子标记以及选育凡纳滨对虾抗 WSSV 新品种提供了选育材料。

由于血细胞是抵御侵略者的第一道防线, 在防卫机制中扮演着重要角色^[33]。当病原体的侵入或环境因子的变化均导致宿主血细胞数量的变化, 血细胞的数量反映了对虾的健康状况和细胞免疫的潜力, 是对虾细胞免疫系统的重要参数^[16]。对虾感染 WSSV 后, 机体出于抵抗外来病原的需要, 血细胞会聚集在 WSSV 密集处使造血组织和血淋巴循环系统中的血细胞数量下降, 或聚集在其它靶细胞周围, 从而导致参与体循环的血细胞数量减少^[17]。另外, 由于病毒寄生或诱导而致细胞破裂和凋亡, 造成血细胞坏死、溶血等一系列病理变化, 进而导致血细胞总数急剧减少, 血细胞数量的降低反过来加剧了对虾免疫机能的下降, 使对虾整体机能下降直至死亡^[34-36]。本实验结果表明, 高抗性家系和中等抗性家系对虾经四代抗病选育后, 血液中的血细胞数明显高于敏感家系对虾和未选育对虾 ($P < 0.05$)。各抗性对虾在人工感染 WSSV 后, 血细胞数在早期的变化趋势基本一致, 即先增后降, 但高抗对虾到 96 h 时趋于平稳, 而其他对虾则一直呈下降趋势, 说明随着病毒感染的加强, 敏感家系对虾和未选育对虾血细胞大量崩解, 其承担的重要免疫防御任务也随之减弱, 出现大量死亡; 而高抗性对虾自始至终保持较高的血细胞数量, 表现出强劲的抗 WSSV 性能。

酚氧化物酶(PO)是一种含铜的氧化还原酶, 十分类似于高等动物的补体激活途径, 在甲壳动物中起识别和防御作用, 在伤口愈合、抑制甚至杀死病原体方面发挥着重要作用, 可以作为一个衡量对虾免疫功能大小的指标^[28]。江晓路等^[37]认为酚氧化物酶以酶原形式存在血细胞中, 当微生物入侵后刺激血细胞, 使该酶释放到血淋巴并激活表现活性, 它与血细胞的吞噬、包裹以及血淋巴的抗菌活性和对外源物质的识别有关。本实验结果显示, 高抗性对虾的 PO 活性明显高于其他对虾 ($P < 0.05$)。

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内非常重要的一种抗氧化酶, 它能清除超氧阴离子自由基,

将超氧阴离子自由基转化为过氧化氢进而由过氧化氢酶分解,以保护功能大分子不被氧化破坏、防御机体衰老等方面具有极为重要的作用^[38]。当 SOD 酶活性降低时,生物体内会出现过多自由基,从而扰乱和破坏了体内一些重要的生化过程,导致代谢混乱,正常生理功能失调,体内免疫水平下降,潜在的病原被激活暴发疾病。敏感对虾和未选育对虾感染 WSSV 后 SOD 酶活性迅速降低,这与宋林生等^[39]报道凡纳滨对虾感染 WSSV 后其体内超氧化物歧化酶显著降低相符。由于敏感对虾和未选育对虾体内免疫水平下降,从而造成大量死亡。高抗性对虾和中等抗性对虾经调整后,SOD 酶活性逐步恢复并行使正常的生理功能从而保持较高的成活率。

过氧化物酶(POD)通过过氧化氢酶的作用,将有害于细胞的代谢产物(H_2O_2)分解成水和氧,防止 H_2O_2 在细胞内堆积,起到保护细胞的作用,并通过氧化反应来氧化多种有害的底物,使之成为没有毒性的物质^[18,39]。因此,过氧化物酶被看作一种具有免疫功能的酶,与其他一些酶共同作为检测甲壳动物免疫功能的指标酶。雷质文等^[28]将对虾受 WSSV 感染的程度分为潜伏感染、轻度感染、中度感染和严重感染,且过氧化物酶(POD)活性由大到小依次为潜伏感染对虾样 > 中度感染对虾样 > 严重感染对虾样。本实验在相同的感染条件下,高抗对虾血液中 POD 活力均高于中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾,从而表现出抗 WSSV 的性能。

对虾血蓝蛋白含量与免疫有密切联系,当病原体侵入后会导致对虾血蓝蛋白含量的下降^[36,40],刘树青等^[41]和周遵春等^[42]证实血清蛋白含量的提高可以使血清中溶菌物质、杀菌物质含量升高,从而提高虾的自身抗病能力。Nagai 等^[43]报道鲨的凝集酶能将血蓝蛋白转化成酚氧化酶。章跃陵等^[44]进一步证实凡纳滨对虾血蓝蛋白在一定范围内确实可以正反馈调节酚氧化酶活性对酚氧化酶活。因此,血清蛋白是抗病蛋白的储库,它综合地反映了对虾与病原体之间的相互作用,可以作为免疫学指标来评价对虾对病原体的免疫反应。WSSV 感染初期对虾血细胞中迅速合成一些免疫蛋白,以抵御 WSSV 的侵袭^[27]。与其他抗性对虾相比,高抗对虾血液中血清蛋白含量均高于中抗对虾、敏感对虾和未选育对虾。

总之,对虾血细胞数量、血清中蛋白质含量以及 PO、SOD、POD 等活性的高低均能反映对虾抗病力的强弱,在一定程度上可以作为衡量对虾免疫功能及机体状态的指标^[45]。因此,来自高抗性家系的对虾,当低浓度的病毒侵入时可通过自身的抗病机制,抵御和控制病毒的复制,使其处在潜伏状态,而保持其正常生理状态;当高剂量的病毒侵入时,尽管无法全面控制病毒,但死亡时间后延,这与其血细胞数、免疫相关因子的活性优越等密切相关,同时也表明本实验抗病品种选育的有效性,这为凡纳滨对虾抗病、高产新品种的培育开辟一条新途径。

研究得到广东湛江恒兴集团有限公司“八六三”基地亲虾养殖场杨才勇、陈浩明、陈龙、王兴柏等技术员的帮助,在此一并致谢!

参考文献:

- [1] 张伟权. 世界重要养殖品种—南美白对虾生物学简介[J]. 海洋科学,1990,3:69-73
- [2] 中国农业部. 中国渔业年鉴[M]. 北京:海洋出版社,1995-2005.
- [3] 许雅香,许悼荣,鲁兴萌. 对虾白斑综合征研究进展[J]. 中国兽医科技,2002,31(1):12-14.
- [4] Carpenter N, Brock J A. Growth and survival of virus-infected and SPF *Penaeus vannamei* on a shrimp farm in Hawaii[M]//Fulk S W, MAIN K L. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Waimanalo, Hawaii,1992:285-294.
- [5] Pantoja C R, Song X L, Lee X, et al. Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the Chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* Part 1: Disease pre-screening and primary quarantine[J]. Aquaculture,2005,250:573-578.
- [6] Wyban J A, Swingle J S, Sweeney J N, et al. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei* [C] // Wyban J A. Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana,1992:254-260.
- [7] 何建国,莫福. 对虾白斑综合征病毒暴发流行与传播途径,气候和水体理化因子的关系及基本控制措施[J]. 中国水产,1999,7:34-41.
- [8] 何建国,莫福. 对虾高位池养殖模式及其与病害控

- 制的关系[J]. 中国水产, 1998, 12: 30-31.
- [9] 李卓佳, 陈康德, 张庆, 等. 有益活性微生物在对虾健康养殖中的应用[J]. 中国水产, 1999, 11: 34-35.
- [10] 黄翔鹤, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池环境增强凡纳对虾抗病力的研究[J]. 水生生物学学报, 2002, 26(4): 342-347.
- [11] 孙成波, 何建国. 沙滤对白斑综合征病毒和细菌的过滤效果[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(4): 70-73.
- [12] 董晓慧, 李明, 叶继丹. 复方中草药对凡纳滨对虾生长性能和血清非特异免疫因子的影响[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(2): 162-165.
- [13] 周歧存, 罗从彦, 韩兆红. 复方中草药对凡纳滨对虾生长及抗病力的影响[J]. 饲料研究, 2006(9): 53-56.
- [14] 郭文婷, 李健. 中草药制剂对凡纳滨对虾生长及血淋巴中免疫因子的影响[J]. 饲料工业, 2005, 26(6): 6-10.
- [15] 刘恒, 李光友. 免疫多糖对南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(2): 113-118.
- [16] Chang C F, Su M S, Chen H Y, et al. Effect of dietary beta-1, 3 glucanase resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Organ, 1999, 36: 163-168.
- [17] Van de Braak C B, Botterblom M H, Huisman E A, et al. Preliminary study on haemocyte response to white spots syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Org, 2002, 51: 149-155.
- [18] 王秀华, 宋晓玲, 黄健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 26-30.
- [19] 陈国福, 宋晓玲, 黄健, 等. A3a-肽聚糖对凡纳滨对虾生长、免疫机能和抗病毒感染的影响[J]. 高技术通讯, 2005, 15(8): 100-106.
- [20] Wang S H, Chen J C. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2005, 19(3): 191-204.
- [21] 曹俊明, 刘晓华, 周萌, 等. 饲料中添加谷胱甘肽对凡纳滨对虾非特异性免疫因子和相关酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(4): 528-553.
- [22] 胡琳琳, 房文红, 高露姣, 等. 壳聚糖硫酸酯提高凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒感染力的研究[J]. 海洋渔业, 2008, 30(3): 250-255.
- [23] 李健, 刘萍, 何玉英, 等. 快速生长的新品种“黄海一号”的人工选育[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 1-5.
- [24] 李刚, 刘小林, 黄皓, 等. 虾类遗传育种研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(9): 525-529.
- [25] Pan Z C, He J G, Weng S P, et al. Changes in mortality and immunological variables of *Litopenaeus vannamei* parents and their filial families infected with white spot syndrome under different experimental conditions [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2008, 25(5): 459-471.
- [26] 简旭凤. 白斑综合征病毒(WSSV)原位PCR及定量PCR检测技术的建立[D]. 广州: 中山大学, 2003.
- [27] 刘庆慧, 黄健, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体WSSV感染相关免疫与生化因子的变化[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22-27.
- [28] 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46-54.
- [29] Ashida M. Purification and characterization of propionoxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144: 749-762.
- [30] 沈俊宝, 刘明华. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 10-39.
- [31] 吴仲庆. 水产生物遗传育种学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2000: 146-186.
- [32] 李鸿鸣, 孙效文. 应用大规模家系选育技术促进辽宁海水养殖业的可持续发展[J]. 沈阳农业大学学报(社会科学版), 2002, 4(1): 7-10.
- [33] 王建平, 吴雄飞. 虾类血细胞及体液免疫的研究现状[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000(19): 354-360.
- [34] 冯守明, 杨先乐, 李军, 等. 凡纳滨对虾白斑综合征血液病理研究[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 108-112.
- [35] Cohen J J. Apoptosis. Immunol [J]. Today, 1993, 14: 123-13.
- [36] Wongprasert K, Khanobde K E, Glunukarn S S, et al. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 55: 3-10.
- [37] 江晓路, 刘树青, 张朝晖, 等. 多糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 66-68.
- [38] 张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾

- 血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响 [J]. 海洋科学,2004,28(7):22-25.
- [39] 宋林生,苏建国,蔡中华,等. 正常与感染白斑病的凡纳滨对虾几项免疫指标变化的初步研究 [C] // 甲壳动物学论文集(第四辑). 北京:科学出版社,2003:335-340.
- [40] Song Y L, Yu C I, Lien T W, *et al.* Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taurasyndrome virus [J]. Fish & Shellfish Immunol,2003,14(4):317-319
- [41] 刘树青,江晓路,牟海津,等. 免疫多糖对日本对虾血清酶活性的影响 [J]. 中国水产科学,1999,6(3):111-113
- [42] 周遵春,刘建明,吴垠,等. 不同饲养条件下中国对虾血清蛋白、血脂、血糖含量变化的初步研究 [J]. 水产科学,1994,13(5):9-11
- [43] Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides [J]. Journal of Biological Chemistry,2001,276:27166-27170.
- [44] 章跃陵,王三英,刘光明,等. 南美白对虾血蓝蛋白对酚氧化酶活性的影响 [J]. 中国水产科学,2005,12(4):402-406.
- [44] 李光友,王青. 中国对虾血细胞及免疫研究 [J]. 海洋与湖沼,1995,26(6):591-597.

欢迎订阅 2011 年《上海海洋大学学报》

《上海海洋大学学报》为上海海洋大学主办,面向全国的以海洋、水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要刊登研究论文,少量刊登综述、评述、简讯等。目前学报是《中国科学引文数据库》来源期刊,《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,万方数据-数字化期刊群全文收录期刊,中国科技论文统计源核心期刊,水产渔业类中文核心期刊。

本刊为双月刊,大 16 开,国内外公开发行。每期单价:10.00 元。国际标准刊号:ISSN 1674-5566,国内统一刊号:CN 31-2024/S。国内邮发代号:4-604,国际发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部联系地址:上海市临港新城沪城环路 999 号,上海海洋大学 201 信箱

邮政编码:201306

联系人:张海宁

联系电话:021-6190022

传真:021-61900227

E-mail:xuebao@shou.edu.cn

**Studies on WSSV-resistant and immune characteristics of the
4th generation selective breeding families for resistance to
the white spot syndrome virus (WSSV) of *Litopenaeus vannamei***

HUANG Yong-chun^{1,2}, AI Hua-shui¹, YIN Zhi-xin¹, HUANG Xian-de¹,
LI Se-dong³, WENG Shao-ping¹, HE Jian-guo^{1*}

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Guangdong Evergreen Ltd. Corporation, Zhanjiang 524033, China)

Abstract: In this paper, in comparison with their WSSV-resistant characteristics, 35 selective breeding families of the 4th generation and no-selected shrimp of *Litopenaeus vannamei* were divided into three groups; relatively high resistant families, mid resistant families and susceptible families, with the average survival rates of $24.45\% \pm 6.56\%$, $10.70\% \pm 1.41\%$ and $2.72\% \pm 2.76\%$, respectively after 10^3 copies WSSV/g (body weight) infection, which were significantly different among the three groups ($P < 0.01$). Injected WSSV of 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 copies WSSV/g, the survival rate of the relative high resistant family 12 was 100% , $23.3\% \pm 3.5\%$, $7.8\% \pm 1.9\%$ and 0% , respectively; and the survival rate of the mid resistant family 7 was $87.7\% \pm 3.8\%$, $12.2\% \pm 1.9\%$, 0% and 0% , respectively; and the survival rate of the susceptible family 4 was $54.4\% \pm 3.8\%$, $2.2\% \pm 1.9\%$, 0% and 0% , respectively; and the survival rate of non-selected was $51.1\% \pm 5.1\%$, 0% , 0% and 0% , respectively. In comparison with mid-resistant family 7, susceptible family 3 and non-selected shrimp, the THC in relatively high resistant family 12 increased by 20.7% ($P > 0.05$), 36.7% ($P < 0.05$) and 34.4% ($P < 0.05$) compared with that of the above-mentioned shrimps, respectively after 10^3 copies WSSV/g (body weight) infection; the PO activities increased by 40.0% ($P < 0.05$), 76.3% ($P < 0.05$) and 63.4% ($P < 0.05$) compared with that of the above-mentioned shrimps, respectively; the SOD activities compared with 31.1% ($P > 0.05$), 58.8% ($P < 0.05$) and 32.0% ($P > 0.05$) increased by that of the above-mentioned shrimps, respectively; the POD activities compared with 29.64% ($P > 0.05$), 44.9% ($P < 0.05$) and 43.3% ($P < 0.05$) increased by that of the above-mentioned shrimps, respectively; the content of plasma protein compared with 31.2% ($P > 0.05$), 38.7% ($P < 0.05$) and 39.3% ($P < 0.05$) increased by that of the above-mentioned shrimps, respectively. However, there were no significant differences of the THC, PO, SOD, POD and content of hemolymph protein among mid-resistant family, susceptible family and non-selected shrimp. After 4 generations of selection, the immune capability of the shrimp from relatively high resistant family was much higher than that of the other groups and non-selected shrimp, with apparent powerful capability of WSSV resistance. These findings would help to direct the future selective breeding of shrimp for WSSV resistance.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; white spot syndrome virus (WSSV); artificial infection; family selection; immune parameters

Corresponding author: HE Jian-guo. E-mail: lsshjg@mail.sysu.edu.cn