

斑节对虾体长与中肠腺细胞数相关性研究

李贵生* 何建国 江静波

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘要 通过现场测定养殖日龄为16~18 d的斑节对虾的体长、体重和全长,并应用石蜡切片技术对被测虾的中肠腺中部进行细胞计数,研究了斑节对虾体长与中肠腺细胞数的相关性。结果表明,对虾体长与中肠腺中部每个高倍视野的平均细胞数呈密切负相关($r = -0.947$),公式为: $C = 330.362\ 323 e^{-0.087\ 384 L}$ 。对虾体长与体重密切相关($r = 0.948$),可用对数回归方程描述: $\lg W = -1.923\ 578 + 3.082\ 832 \lg L$ 。对虾体长与全长密切相关($r = 0.995$),其线性回归方程为: $Y = -0.187\ 137 + 1.316\ 705 X$ 。通过这些公式,中肠腺中部每个高倍视野的平均细胞数可由体长直接推算出或由体重和全长间接算出,使斑节对虾杆状病毒感染度的计算更加简单和准确。

关键词 斑节对虾, 体长, 中肠腺, 细胞数量, 病毒感染度, 相关分析

目前所发现的对虾病毒中,有5种主要感染对虾的中肠腺,它们是:对虾杆状病毒(BP)、斑节对虾杆状病毒(MBV)、中肠腺坏死杆状病毒(BMNV)、肝胰腺细小病毒(HPV)和类呼肠孤病毒(REO)。这些病毒可造成敏感宿主大量死亡,在我国尤以MBV为甚。MBV于1981年由Lightner等人在斑节对虾(*Penaeus monodon*)中发现^[1],随后,我国也相继在斑节对虾、日本对虾(*P. japonicus*)、中国对虾(*P. chinensis*)、长毛对虾(*P. penicillatus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)和短沟对虾(*P. semisulcatus*)中发现^[2,3]。MBV感染度的计算对MBV病的防治具有指导意义,是深入研究MBV病不可缺少的一项指标。MBV感染度常用MBV感染细胞数在总细胞数中所占的百分比或千分比来表示,而传统的细胞总数计算工作量很大,1994~1996年进行的本研究目的在于找出简便、准确、客观的细胞总数计算方法,并探讨中肠腺细胞数与体长的关系。

1 材料与方法

1.1 样本的采集

收稿日期:1998-09-17

* 现在暨南大学生物工程学系工作

1994年7月~10月在广东省廉江市龙营围对虾养殖场采样。选取4个虾池,每个虾池的面积约1.33 hm²,水深约90 cm,投苗密度 $9 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ 尾/hm²,投放的均为斑节对虾,人工饵料饲养,于养殖16 d开始取样,每池每次取样10尾,每隔5 d取1次样。先测出样本体长及全长(精确到0.1 mm),然后用吸水纸吸干虾体,扭力天平称量(精确到0.01 g)。称重后解剖出中肠腺,置于洁净小瓶中,Bouin's液固定,编号,实验室切片观察。

1.2 切片标本的制备

不同龄期虾各取10个中肠腺标本,取其中部,用70%乙醇溶液充分洗涤,经乙醇系列脱水及二甲苯透明后石蜡包埋,切片,切片厚5 μ m,H-E染色,中性树胶封片。

1.3 中肠腺细胞数的计算方法

切片标本在Olympus双目显微镜的高倍镜(10 $\times$ 45)下观察。每个标本选3个切片,每个切片选3个切面,每个切面取不同平面(上、中、下或外侧、近内侧、内侧)计算3个高倍视野的细胞数,最后求出其平均数。

1.4 对虾体长与体重及体长与全长的相关性分析

根据测量数据,分别作体长与体重及体长与全

长的相关分析及相关系数的显著性检验,有显著意义后分别作散点图,根据图形及参考前人的研究结果,选取适宜的回归分析方法,建立回归方程式。

1.5 对虾体长与中肠腺细胞数的相关性分析

根据实验数据的变化趋势选择适宜的分析方法。

2 结果

2.1 体长与中肠腺中部每个高倍视野平均细胞数

表1 斑节对虾稚虾体长与中肠腺中部每个高倍视野细胞数的关系

Table 1 Relationships between body length and each microscopic sight(10×45) cell numbers of middle midgut gland in juvenile *P. monodon*

合并样号 sample	体长/cm body length	细胞数 cell numbers	合并样号 sample	体长/cm body length	细胞数 cell numbers	合并样号 sample	体长/cm body length	细胞数 cell numbers
1	2.84±0.68	257±33.37	6	6.32±0.82	197±8.15	11	7.13±0.93	178±28.66
2	3.84±0.74	235±22.55	7	6.76±0.94	181±44.46	12	7.52±0.97	164±12.47
3	4.36±0.62	230±12.24	8	6.94±0.80	178±22.14	13	7.65±1.16	162±13.24
4	5.34±0.61	225±39.56	9	7.02±0.83	171±22.15	14	9.04±1.57	168±12.82
5	5.38±1.03	206±45.83	10	7.06±1.15	163±4.96			

注:表中数据为均数±标准差。All data in table are average value ± standard deviation.

如表1所示,养殖早期虾的中肠腺中部每个高倍视野细胞计数较多,随着稚虾长大而细胞数逐渐减少,但到一定生长期,中肠腺细胞计数变化很少,基本稳定在一定数值。

表中也反映出体长与中肠腺中部每个高倍视野的平均细胞数的密切负相关关系($r = -0.947$),相关检验高度显著($P < 0.001$),两者的关系可用下式

的关系

分别对养殖日龄为16、21、26、30、35、40、45、50、56、61、66、71、76、81 d的不同龄期的140尾稚虾进行了体长的测量及中肠腺中部细胞数的计算(高倍镜下),先求出同一日期所采10尾稚虾的测量结果和计算结果的平均值,然后利用两者的平均值进行分析,结果见表1,

表示; $C = 330.362323 e^{-0.087384L}$ 。式中: C 为每个高倍视野的细胞数(个), L 为体长(cm)。

2.2 养殖斑节对虾体长与体重的相关性

对采自4个虾池的380尾稚虾测量了体长、全长并称重,然后把同一虾池同一日期采集的稚虾的检测数据进行合并,求出平均值,在此基础上进行分析。各项指标的平均值及其对应关系见表2。

表2 斑节对虾稚虾体长、全长及体重的测量数据

Table 2 Body length, whole length and body weight of juvenile *P. monodon*

合并样号 sample	体长/cm body length	全长/cm whole length	体重/g body weight	合并样号 sample	体长/cm body length	全长/cm whole length	体重/g body weight	合并样号 sample	体长/cm body length	全长/cm whole length	体重/g body weight
1	2.84	3.48	0.27	14	6.32	8.19	3.35	27	7.46	9.73	5.93
2	3.79	4.60	0.84	15	6.52	8.33	3.36	28	7.51	9.83	6.10
3	3.84	5.46	0.65	16	6.55	8.49	4.26	29	7.52	9.82	6.11
4	4.36	5.32	1.08	17	6.62	8.42	4.13	30	7.65	9.96	6.20
5	4.74	6.47	1.50	18	6.76	8.75	4.45	31	7.76	9.95	6.46
6	4.98	6.03	1.52	19	6.85	8.86	4.45	32	7.77	9.97	6.62
7	5.34	6.41	1.82	20	6.94	9.05	4.68	33	7.81	10.00	6.48
8	5.38	6.53	2.03	21	7.02	9.08	5.00	34	8.36	10.92	8.74
9	5.40	7.28	2.61	22	7.05	9.26	5.33	35	8.83	11.36	7.15
10	5.46	7.17	2.48	23	7.06	9.22	5.30	36	9.04	11.74	11.50
11	5.58	7.24	3.28	24	7.13	9.21	5.10	37	9.23	11.93	11.19
12	5.60	7.18	2.50	25	7.38	9.51	5.62	38	9.63	12.38	12.54
13	5.84	7.09	2.33	26	7.39	9.57	5.80				

注:表中数据均为10尾稚虾的平均值。All data in table are average value of 10 juvenile shrimps.

从表 2 可知, 稚虾的体重与体长密切相关($r = 0.948$), 相关检验高度显著($P < 0.001$)。体长—体重关系方程为: $W = 0.011\ 924L^{3.082\ 832}$, 对数回归方程: $\lg W = -1.923\ 578 + 3.082\ 832 \lg L$ 。

2.3 体长与全长的相关性

从表 2 还可知, 体长与全长呈高度相关($r = 0.995$), 相关检验高度显著($P < 0.001$), 且两者为直线相关, 其直线回归方程为: $Y = -0.187\ 137 + 1.316\ 705X$ 。式中 Y 为全长(cm), X 为体长(cm)。

2.4 体重与中肠腺重的关系

通过对 15 尾养成期斑节对虾的研究, 其体重与中肠腺重的关系可用下式表示: $H = 0.035\ 561 + 0.044\ 233B$ 。式中 H 为中肠腺重/g, B 为体重/g。

3 讨论和结论

3.1 对虾体长与体重的关系

据报道, 海区生长对虾体长和体重之间是曲线相关关系^[4], 我们对斑节对虾稚虾的研究结果与之相符。雌雄对虾生长在晚期(养殖 90 d, 体重 28.5 g)可出现不同的增长率, 但在早期则无明显差别^[4,5], 鉴于此, 实验时我们未区分雌雄。对虾的生长速度可影响体长与体重的关系, 在体长相同的情况下, 养殖时间长的(生长较慢)比养殖时间短的要重。对虾的生长不仅受本身遗传因素的影响, 还受环境因素(如水质、温度)、饵料、病害等的影响, 故不同养殖条件下其体长与体重的关系可出现变化, 但其相关的性质均为曲线相关。

3.2 对虾体长与中肠腺细胞数的关系

体长是从对虾眼眶基部至尾扇末端的直线长度, 而全长则为对虾额剑顶端至尾扇末端的直线长度。对虾体长测量较易且较准确。而全长受额剑的影响(磨损和折断等), 不如体长准确可靠。体重影响因素较多, 如吸干的程度、称量的仪器等。因此, 我们选取体长作为一个变量。病毒包涵体(如 MBV、HPV 等)一般在高倍镜下计数, 故选取每个高倍视野的中肠腺平均细胞数作为另一个变量, 然后通过数学拟合法建立起经验公式, 可从体长推算出中肠腺每个高倍视野的平均细胞数。体重和全长则可通过和体长的关系, 间接推算出中肠腺每个高倍视野的平均细胞数。

3.3 细胞计数时中肠腺部位的选择

斑节对虾中肠腺分 2 叶, 一端较尖, 另一端较平坦。两端中间的腹面有中肠腺总管通出, 与中肠相连。通过对整个中肠腺连续切片的研究表明, 中肠腺各个部位细胞计数有差异, 病毒感染度也有差异, 以中部最高(结果另文发表)。故我们统一选取中部进行细胞计数。

3.4 对虾病毒感染度的计算标准

对虾病毒感染度的计算, 目前尚无统一标准, 文献报道有分等级算法^[6]和高倍视野算法^[3]。前者过于粗糙, 不够准确。后者虽简单易行, 且有一定的准确度, 但选择视野时主观影响较大, 而且 MBV 在中肠腺中各个部位的分布有差别, 故需寻找更客观和更精确的计算方法。鉴于此, 我们先通过一定数量的观察, 求出不同养殖期中肠腺每个高倍视野的平均细胞数, 并统一在中肠腺中部取材, 观察时选取几个有代表性的切面, 计算每个切面中的所有 MBV 感染细胞数及总的高倍视野数, 然后求出每个高倍视野下的 MBV 感染细胞数, 再根据每个高倍视野下的平均细胞数计算出 MBV 感染度。这种方法虽然较客观和较精确, 但工作量大且繁琐。应用上述建立的体长与中肠腺平均细胞数的经验公式, 通过体长即可求出中肠腺中部每个高倍视野的平均细胞数。因体长的测量简单易行, 既可统一标准, 又减少了大量的工作量。

参 考 文 献

- 1 Lightner D V, Redman R M. A baculovirus - caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. J Invertebr Pathol, 1981, 38: 299 ~ 302
- 2 何建国, 等. 斑节对虾杆状病毒病的组织病理观察. 中山大学学报论丛(生物学论文集), 1992, 3: 178 ~ 179
- 3 何建国, 等. 斑节对虾杆状病毒流行病学研究. 中山大学学报(自然科学版), 1993, 32(增刊): 241 ~ 246
- 4 Cheng C S, Chen L - C. Growth characteristics and relationships among body length, body weight and tail weight of *Penaeus monodon* from a culture environment in Taiwan. Aquaculture, 1990, 91: 253 ~ 263
- 5 Liao I C. A culture study on grass prawn, *Penaeus monodon*, in Taiwan - the patterns, the problems and the prospects. J Fish Soc Taiwan, 1977, 5(2): 11 ~ 29
- 6 Bell T A, Lightner D V. IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. J Fish Dis, 1987, 10: 165 ~ 170

Study on the relationship between body length and cell numbers of midgut gland in *Penaeus monodon*

Li Guisheng He Jianguo Jiang Jingbo

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract The relationship between body length and cell numbers of midgut gland of *Penaeus monodon* which were cultured for from 16 to 81 days was studied by measuring the body length, body weight and whole length at the site and investigating the average cell numbers of middle midgut gland under microscopy. The results show that the relationship between body length and average cell numbers of middle midgut gland is highly related ($r = -0.947$), and it can be described by the equation: $C = 330.362\ 323\ e^{-0.087\ 384L}$. The relationship between body length and body weight is highly related too ($r = 0.948$), and it is described by the logarithmic regression formula as: $\lg W = -1.923\ 578 + 3.082\ 832\ \lg L$. The relationship of body length and whole length is also highly related ($r = 0.995$), and it is described by the linear regression formula as: $Y = -0.187\ 137 + 1.316\ 705\ X$. With these equations, the average cell numbers of middle midgut gland can be computed directly from body length, or indirectly from body weight and whole length. The count of severity grade of MBV becomes more simple and accurate by these equations.

Key words *Penaeus monodon*, body length, midgut gland, cell numbers, severity grade of virus, analysis of relationship