

A3 α 肽聚糖对凡纳对虾幼体生长及抗病毒感染力的影响

陈国福^{1,2}, 宋晓玲¹, 黄 健¹, 周 进^{1,2}, 王秀华¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:用含不同量的 A3 α 肽聚糖(PG)(0.005%、0.01%、0.1%)的幼体饵料投喂凡纳对虾幼体,另在育苗水体中添加不同水平(0.005 mg·mL⁻¹、0.01 mg·mL⁻¹、0.05 mg·mL⁻¹)PG 浸浴并以投喂不添加 PG 的幼体饵料的实验组作为对照,另设投喂活饵的实验组作参考,分别考察 Z1-M1 期、M1-PL1 期、Z1-PL1 期幼体的成活率、M1 期、PL1 期幼体体长、PL1 期幼体体重,另外,PL1 期仔虾经 7 d 饲养后,检测体内酚氧化酶(PO)活性,并用白斑综合症病毒(WSSV)料投喂感染。结果显示:与投喂不添加 PG 幼体饵料组相比,在 Z1-M1 期,活饵组、0.01% PG 添加量的幼体饵料组、0.005 mg·mL⁻¹ PG 的浸浴组幼体的成活率有极显著($P < 0.01$)提高,而在 Z1-PL1、M1-PL1 期,各实验组除 0.05 mg·mL⁻¹ 浸浴组外均有极显著地($P < 0.01$)提高;各实验组除 0.01 mg·mL⁻¹、0.05 mg·mL⁻¹ PG 浸浴组外,M1 期幼体体长、PL1 期幼体体重也有显著($P < 0.01$)增长,且各实验组 PL1 期幼体都有极显著($P < 0.01$)增长;各实验组仔虾 PO 活力均有极显著($P < 0.01$)提高;各实验组除 0.1% PG 添加量的幼体饵料组外,感染 WSSV 后仔虾的存活率有不同程度地提高。

关键词: A3 α 肽聚糖;凡纳对虾;幼体;生长;酚氧化酶;白斑综合症病毒;免疫性

中图分类号: S945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)05-0448-08

对虾苗种的培育是对虾养殖中最重要的一环,提高对虾育苗期的成活率,获得优质健康的虾苗是对虾养成的关键和保障。而生产实践证明,幼体培育的成活率较低,且对虾在幼体阶段对各种病原微生物易感^[1-3],这些都严重地困扰着苗种生产。把免疫促进剂应用于对虾苗种生产有着广阔的前景,近年来国内外学者在这方面作了大量研究^{[4-7][1]}。

肽聚糖是主要存在于革兰氏阳性细菌细胞壁内一类由聚糖链、肽亚单位和间肽桥组成的大分子物质,它对多种生物具有免疫调节作用。近年来,肽聚糖在水产动物养殖中的应用不断得以证明^[8-13],而将其应用于对虾幼体的研究还未见报道。本实验室已将制备的肽聚糖制剂用于凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)成虾养殖实验,研究表明,肽聚糖制剂能促进对虾的生长,提高对虾的成活率、免疫机能及抗 WSSV 感染能力^[14]。本实验采用口服和浸浴的方法,进一步考察在对虾育苗中的作用,以期 PG 在生产中的实际应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用凡纳对虾无节幼体购自青岛枫华水产有限公司;投喂饵料的制备,以凡纳对虾幼体商品饵料与新鲜鸡蛋(质量比 5:1)为基础饵料,添加本实验室研制的 A3 α 肽聚糖(peptidoglycan, PG)制剂,制得肽聚糖质量分数分别为 0、0.005%、0.01%、0.1%的幼体饵料;以白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)料投喂感染,选用-70℃保存的经 T-E 染色^[8]确认已感染 WSSV 对虾的病毒量较集中的头尖。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及投喂方案 实验用容器为 2 000 mL 烧杯,注入海水 1 800 mL,实验开始时每烧杯投放无节幼体 500 尾。实验分 8 组,分别编号为 P、N、O1、O2、O3、I1、I2、I3,每组 3 个重复。其中,P 为活饵组,用作评价 PG 作用的参考;另外,N 为对照组,O1、O2、O3 为口服组,I1、I2、I3 为浸浴组。活饵组在整个实验过程中分别投喂小球藻(*Chlorella vulgaris*)。

收稿日期:2004-01-02;修订日期:2004-03-24。

基金项目:国家高技术研究发展计划(2001AA622060)。

作者简介:陈国福(1977-),男,硕士生,主要从事水产动物病害的研究。

通讯作者:宋晓玲。Tel: 0532-5823062。E-mail: aquliao@public.qd.sd.cn

1) 王新霞,谭北平. β -葡聚糖在中国对虾育苗中的应用[A]. 海洋生物高技术论坛论文集[C]. 2003. 156-161。

is) 和扁藻 (*Platymonas* sp.), 褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 及卤虫 (*Artemia*) 幼体; 其余实验组从 Z1 期开始投喂幼体饵料, 其中口服组的 O1、O2、O3 所投幼体饵料中的肽聚糖含量分别为 0.005%、0.01%、0.1%, 而浸浴组与对照组所投幼体饵料肽

聚糖含量均为 0; 浸浴组的 I1、I2、I3 在整个实验过程中, 育苗水体中的肽聚糖浓度分别恒定为 0.005 mg · mL⁻¹、0.01 mg · mL⁻¹、0.05 mg · mL⁻¹。具体投饵参照参考文献[9]进行, 并根据幼体摄食情况及水质情况进行调整(表1)。

表1 实验分组及投喂方案

Table 1 Grouping and feeding of experimental *Penaeus vannamei* larvae

发育期 Development stage	活饵组 Live diet		口服组 Oral		浸浴组/对照组 Immersion/Control	
	种类 Species	密度/(cells · mL ⁻¹) Density	种类 Species	密度/(cells · mL ⁻¹) Density	种类 Species	密度/(cells · mL ⁻¹) Density
N1 - N6	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp.	5 × 10 ⁴	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp.	5 × 10 ⁴	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp.	5 × 10 ⁴
Z1	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp.	(15 - 20) × 10 ⁴	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	(15 - 20) × 10 ⁴ 适量 Optimum	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	(15 - 20) × 10 ⁴ 适量 Optimum
Z2	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 褶皱臂尾轮虫 <i>Brachionus</i> <i>plicatilis</i>	(10 - 20) × 10 ⁴ 2 - 4	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	(10 - 20) × 10 ⁴ 适量 Optimum	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	(10 - 20) × 10 ⁴ 适量 Optimum
Z3	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 褶皱臂尾轮虫 <i>Brachionus</i> <i>plicatilis</i> 卤虫幼体 <i>Artemia nauplii</i>	(10 - 20) × 10 ⁴ 2 - 4 2 - 3	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	(10 - 20) × 10 ⁴ 适量 Optimum	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	(10 - 20) × 10 ⁴ 适量 Optimum
M1 - M3	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 褶皱臂尾轮虫 <i>Brachionus</i> <i>plicatilis</i> 卤虫幼体 <i>Artemia nauplii</i>	5 × 10 ⁴ 1 6 - 16	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	5 × 10 ⁴ 适量 Optimum	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	5 × 10 ⁴ 适量 Optimum
PL	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 卤虫幼体 <i>Artemia nauplii</i>	适量 Optimum 16 - 30	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	适量 Optimum 适量 Optimum	小球藻和扁藻 <i>C. vulgaris</i> and <i>Platymonas</i> sp. 幼体饵料 Artificial feed for larvae	适量 Optimum 适量 Optimum

1.2.2 实验条件及管理 实验用新鲜海水经沉淀、脱脂棉过滤、氯消毒处理, 加入 0.003 ~ 0.005 mg · mL⁻¹ 的 EDTA 和 0.001 mg · mL⁻¹ 的土霉素, 充气并预热。整个实验过程中育苗水体用气石充气, 充气大小随幼体大小进行调整, 水温保持在 28 ~ 30 °C, 投幼体饵料后开始换水, 换水量视水质而

定, 保持水质良好。

1.2.3 幼体成活率、体长、体重计量

1.2.3.1 成活率 分别在 Z1 期、M1 期及 PL1 期计数幼体存活尾数, 计算 Z1 - M1 期、Z1 - PL1 期及 M1 - PL1 期幼体成活率。

1.2.3.2 体长和体重 分别在 M1 期和 PL1 期每

组取幼体 10 × 3 尾,显微相机拍照,在图像处理软件 Photoshop 中测量体长;PL1 期幼体用吸水纸吸干海水,每 10 尾为一个样品,电子天平称重,用以计算体重,作 3 个重复。

1.2.4 酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活力的测定

PL1 期幼体经 7 d 投喂后,每组取 10 × 3 尾(3 个重复),双蒸水反复冲洗,吸水纸吸干水分,称重,收集于盛有预冷 10 倍体积(V/m)去离子水的 Eppendorf 管,充分研磨,10 000 r/min,4 ℃ 离心,上清液用作酶活力的测定。PO 活力的测定采用雷质文^[8]的改进 Asida 的方法,测定上清液在 490 nm 下的吸光值,并用 Bradford 法测定上清液中的蛋白浓度。在本实验条件下,每分钟每毫克蛋白吸光值增加 0.001 定义为一个比活单位。

1.2.5 数理统计方法 用 SPSS 统计软件分别对成活率、体长、体重及 PO 活力进行方差分析和显著性检验。

1.2.6 仔虾攻毒实验 PL1 期仔虾经 7 d 投喂后,每组随机取 60 尾,平均分成两组。其中一组投喂经切碎并充分混匀的 WSSV 料,并去除对虾饱食后剩余的 WSSV 料;另一组正常投喂作平行对照。感染开始后各组正常投喂,第 10 天结束实验。在攻毒之前随机抽取仔虾,确定仔虾攻毒之前未携带 WSSV 病原;感染实验开始后,并每日取部分死虾作 WSSV 感染确定;感染实验结束后对剩余仔虾作病毒检测。仔虾带毒状态的确定均采用斑点杂交法(具体方法参照黄海水产研究所病害室核酸探针试剂盒标准步骤)。考虑到仔虾有一定的自然死亡率,肽聚糖的免疫保护效果用攻毒感染 10d 后仔虾的相对存活率来评价,相对存活率计算式为:

$R_i = (N_i/N_e) \times 100\%$, 其中 R_i 表示相对存活率, N_i 表示感染组仔虾存活尾数, N_e 表示相应对照组仔虾尾数。

2 结果

2.1 PG 对凡纳对虾幼体生长的影响

2.1.1 PG 对各期幼体成活率的影响 PG 对各期幼体成活率的影响见图 1。与对照组(N)相比,在幼体的两个发育阶段(Z1-M1 期和 M1-PL1 期)及整个幼体发育阶段(Z1-PL1),PG 经浸浴和口服两种作用方式均能提高幼体的成活率。其中,P、

O2、I1 的成活率在 Z1-M1 期,P、O1、O2、O3、I2、I3 的成活率在 M1-PL1 期,P、O1、O2、I1、I2 的成活率在 Z1-PL1 期均有显著提高($P < 0.01$)。O2、I1 在 Z1-M1 期,O1、O2、O3、I2 在 M1-PL1 期及 O2 在 Z1-PL1 期与活饵组(P)成活率相当。就口服组来说,中浓度 PG 添加量(O2)成活率最大,高浓度(O3)却降低了成活;而就浸浴组来说,在 Z1-M1 期,在实验范围内,成活率与浸浴 PG 浓度成负相关,而在 M1-PL1 和 Z1-PL1 期,中浓度(I2)成活率最大,高浓度(I3)幼体的成活率又减小。可见,高浓度的 PG 经口服和浸浴作用对对虾的成活率均有一定的抑制作用。

表 2 凡纳对虾 M1-PL1 期幼体体长平均增长率

Table 2 Increment percentage of body length in *Penaeus vannamei* larvae from Mysis-1-stage to Postlarvae-1-stage

								%
P	N	O1	O2	O3	I1	I2	I3	
39.32	28.02	38.46	38.52	35.63	29.63	38.67	38.14	

注:P-活饵组;N-对照组;O1-PG 浓度为 0.005% 的口服组;O2-PG 浓度为 0.01% 的口服组;O3-PG 浓度为 0.1% 的口服组;I1-PG 浓度为 0.005mg · mL⁻¹ 的浸浴组,I2-PG 浓度为 0.01mg · mL⁻¹ 的浸浴组,I3-PG 浓度为 0.05mg · mL⁻¹ 的浸浴组。

Notes: P-Group for live diet, N-control group, O1-oral group with addition of 0.005% PG, O2-oral group with addition of 0.01% PG, O3-oral group with addition of 0.1% PG, I1-immersion group with PG concentration of 0.005mg · mL⁻¹, I2-immersion group with PG concentration of 0.01mg · mL⁻¹, I3-immersion group with PG concentration of 0.05mg · mL⁻¹.

2.1.2 PG 对幼体体长和体重的影响 PG 对幼体体长和体重的影响分别见图 2 和表 2。到 M1 期,除 I3 外,各实验组幼体体长均较对照组(N)有不同程度的增长,且其中的 P、O1、O2、O3、I1 幼体的体长增长极显著($P < 0.01$);而到 PL1 期,各实验组幼体体长均较对照组有极显著($P < 0.01$)增长;PG 作用浓度同幼体体长的关系与成活率的关系相似(图 2)。幼体在 M1-PL1 期体长增长率较对照组依次增加 10.65% (I2)、10.50% (O2)、10.44% (O1)、10.12% (I3)、8.10% (P)、7.63% (O3)、1.61% (I1)。

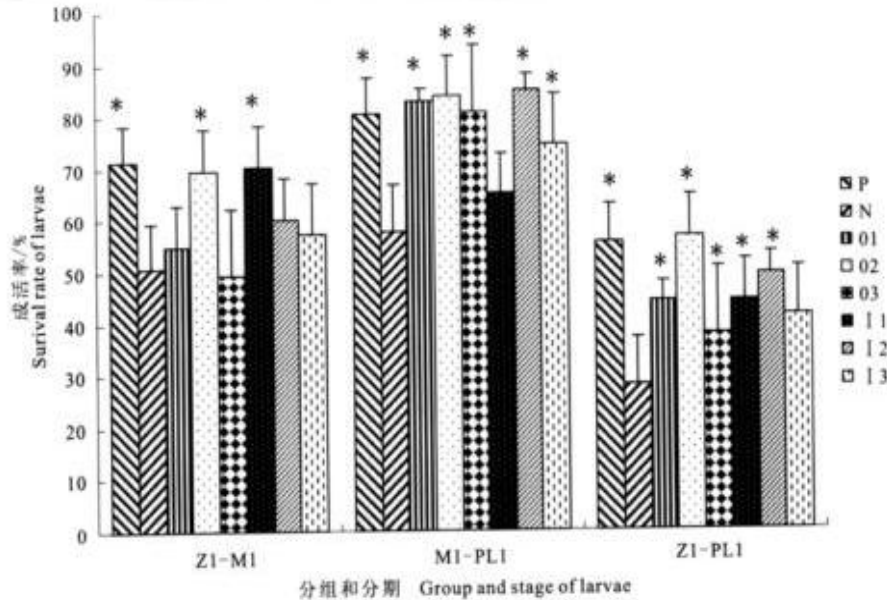


图1 PG 对凡纳对虾幼体成活率的影响

注:1)数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,“*”表示统计差异;

2)P-活饵组;N-对照组;O1-PG浓度为0.005%的口喂组;O2-PG浓度为0.01%的口喂组;O3-PG浓度为0.1%的口喂组;I1-PG浓度为0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I2-PG浓度为0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I3-PG浓度为0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组

Fig.1 Effect of PG on survival rate of *Penaeus vannamei* larvae

Note: 1) Data are represented as mean $\pm$ SD, and “*” represent statistical difference.

2) P-Group for live diet, N-control group, O1-oral group with addition of 0.005% PG, O2-oral group with addition of 0.01% PG, O3-oral group with addition of 0.1% PG, I1-immersion group with PG concentration of 0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I2-immersion group with PG concentration of 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I3-immersion group with PG concentration of 0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$.

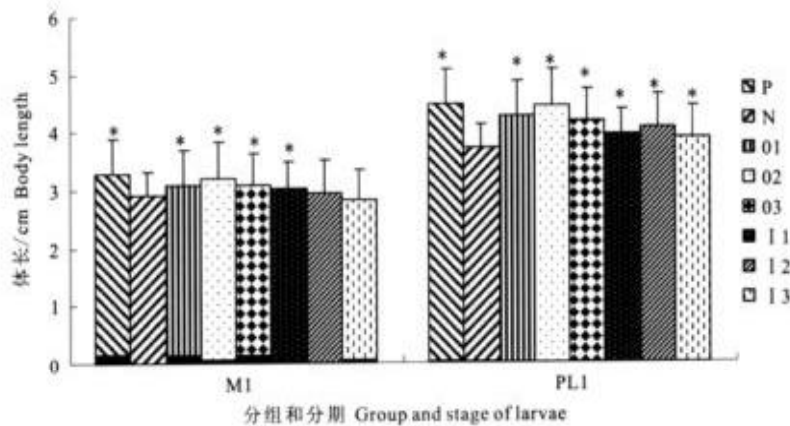


图2 PG 对凡纳对虾幼体体长的影响

注:1)数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,“*”表示统计差异;

2)P-活饵组;N-对照组;O1-PG浓度为0.005%的口喂组;O2-PG浓度为0.01%的口喂组;O3-PG浓度为0.1%的口喂组;I1-PG浓度为0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I2-PG浓度为0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I3-PG浓度为0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组。

Fig.2 Effect of PG on the length of *Penaeus vannamei* larvae

Note: 1) Data are represented as mean $\pm$ SD, and “*” represents statistical difference.

2) P-Group for live diet, N-control group, O1-oral group with addition of 0.005% PG, O2-oral group with addition of 0.01% PG, O3-oral group with addition of 0.1% PG, I1-immersion group with PG concentration of 0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I2-immersion group with PG concentration of 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I3-immersion group with PG concentration of 0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$.

PL1 期各实验组仔虾体重均较对照组仔虾有所增长,其中 P、O1、O2、O3、I3 幼体的体重增长极显著 ($P < 0.01$), O1、O2、O3、I3 与 P 差异不显著 ($P < 0.01$);口服组 O2 的幼体的体重最大,高浓度的 O3 的幼体的体重较 O2 小,浸浴组幼体体重则与 PG 浓度正相关(图 3)。

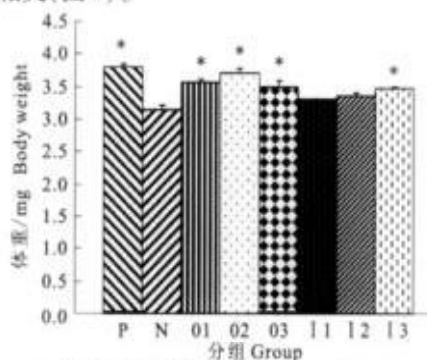


图3 PG 对凡纳对虾幼体体重的影响

注:1)数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,“*”表示统计差异;

2)P-活饵组;N-对照组;O1-PG 水平为 0.005% 的口服组;O2-PG 水平为 0.01% 的口服组;O3-PG 水平为 0.1% 的口服组;I1-PG 质量浓度为 0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I2-PG 质量浓度为 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I3-PG 质量浓度为 0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组。

Fig.3 Effect of PG on body weight of *Penaeus vannamei* larvae

Note: 1) Data are represented as mean $\pm$ SE, and “*” represent statistical difference.

2) P - Group for live diet, N - control group, O1 - oral group with addition of 0.005% PG, O2 - oral group with addition of 0.01% PG, O3 - oral group with addition of 0.1% PG, I1 - immersion group with PG concentration of 0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I2 - immersion group with PG concentration of 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I3 - immersion group with PG concentration of 0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$.

2.2 PG 对 PO 活性的影响

PG 对 PO 活性的影响见图 4。各实验组仔虾体内 PO 活性均较对照组(N)高,并有显著差异($P < 0.01$);就口服组来说,中浓度的 O2 仔虾酶活力最高,高浓度的 O3 酶活力反而下降,而浸浴组酶活力则随着 PG 浓度的增大而相应提高。

2.3 WSSV 感染结果

WSSV 感染结果见表 3。仔虾感染 WSSV 10 d 后的相对成活率大小依次为 O2 > P、I3 > O1 > I2 > I1 > N > O3;与对照组(N)相比,各实验组除 O3 外,仔虾的抗 WSSV 能力均有不同程度的增强,感染 WSSV 仔虾的相对成活率依次提高 29.65% (O2)、

25.65% (P)、25.65% (I3)、17.43% (O1)、9.73% (I2)、3.79% (I1)。

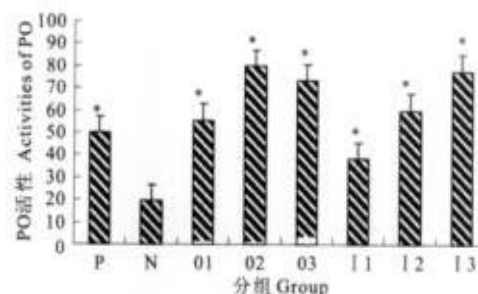


图4 PG 对凡纳对虾幼体 PO 活性的影响

注:1)数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,“*”表示统计差异;

2)P-活饵组;N-对照组;O1-PG 水平为 0.005% 的口服组;O2-PG 水平为 0.01% 的口服组;O3-PG 水平为 0.1% 的口服组;I1-PG 质量浓度为 0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I2-PG 质量浓度为 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组;I3-PG 质量浓度为 0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浸浴组。

Fig.4 Effect of PG on activities of PO in *Penaeus vannamei* postlarvae

Note: 1) Data are represented as mean $\pm$ SE, and “*” represents statistical difference.

2) P - Group for live diet, N - control group, O1 - oral group with addition of 0.005% PG, O2 - oral group with addition of 0.01% PG, O3 - oral group with addition of 0.1% PG, I1 - immersion group with PG concentration of 0.005 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I2 - immersion group with PG concentration of 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, I3 - immersion group with PG concentration of 0.05 mg $\cdot$ mL $^{-1}$.

仔虾的带病毒状况检测如图 5 所示。感染之前各实验组仔虾未携带 WSSV (D3);投喂带 WSSV 病毒料后的仔虾,第 2 天开始死亡,用斑点杂交法证实了仔虾确是感染 WSSV 致死 (C1 - C3);存活仔虾,除 N (B4) 与 I3 (D5) 外,检测不到病毒,说明感染 10 d 后的成活率能代表 PG 的免疫保护能力。

3 讨论

3.1 PG 的作用方式及作用机制

免疫增强剂的作用方式主要有口服、浸浴和注射 3 种方式,而在幼体的应用中只有口服和浸浴可行。本实验同时采用了后两种作用方式,并以模拟幼体自然条件下摄食的活饵组作参考,综合考察了 PG 对凡纳对虾幼体的作用效果。实验证明,采用这两种 PG 作用方法均能取得较好的育苗效果,且部分实验组的作用效果略优于活饵组,其中 O2 的作

表3 感染 WSSV 10 d 后仔虾的相对存活率

Table 3 Relative survival rate of *Penaeus vannamei* postlarvae infected by WSSV after 10 days

P	N	O1	O2	O3	I1	I2	I3
36.00	10.35	27.78	40.00	3.57	13.79	20.08	36.00

注: P - 活饵组; N - 对照组; O1 - PG 水平为 0.005% 的口喂组; O2 - PG 水平为 0.01% 的口喂组; O3 - PG 水平为 0.1% 的口喂组; I1 - PG 质量浓度为 0.005 mg · mL⁻¹ 的浸浴组; I2 - PG 质量浓度为 0.01 mg · mL⁻¹ 的浸浴组; I3 - PG 质量浓度为 0.05 mg · mL⁻¹ 的浸浴组。

Note: P - Group for live diet, N - control group, O1 - oral group with addition of 0.005% PG, O2 - oral group with addition of 0.01% PG, O3 - oral group with addition of 0.1% PG, I1 - immersion group with PG concentration of 0.005 mg · mL⁻¹, I2 - immersion group with PG concentration of 0.01 mg · mL⁻¹, I3 - immersion group with PG concentration of 0.05 mg · mL⁻¹.

用效果最为显著。PG 经注射和口服两种方式促进对虾生长和提高抗病力的作用机制, 一些学者已进行了相关探索。研究证明, PG 能促进对虾细胞活性及相关免疫机能^[9,11,13,15]。关于浸浴的作用机制研

究较少, Sung 等^[7]认为, 葡聚糖浸浴促进幼虾的生长来源于幼虾抗病力的增强, 而庄承继等^[18]研究证明, 育苗水体中加入壳多糖提高幼虾的成活率是因为壳多糖提高了水体透明度, 而水体透明度的提高主要是因为壳多糖能絮凝水体中残余的悬浮饵料, 使水体保持新鲜, 并减少了氨氮等有毒物质的产生和耗氧。在本实验中, 虽然在整个幼体培育过程中 (Z1 - PL1), O2 的成活率优于其他实验组, 但浸浴组 I1、I2 的成活率分别在 Z1 - M1 期和 M1 - PL1 期优于其他 PG 实验组的幼体, 这可能是因为 PG 不但可以促进幼体的非特异性免疫功能, 还起到类似壳多糖的作用, 即能改善水质、提高培育水体透明度。在育苗过程中, 将育苗烧杯在阳光下透射下仔细观察, 可发现口服组烧杯中的水体较浸浴组烧杯中的水体混浊, 浸浴组幼体的体长及体重较口服组的小, 由此可知 PG 浸浴对幼体的成活率的影响比对体长、体重的影响更明显, 这意味着 PG 改善水质的功能较为重要。

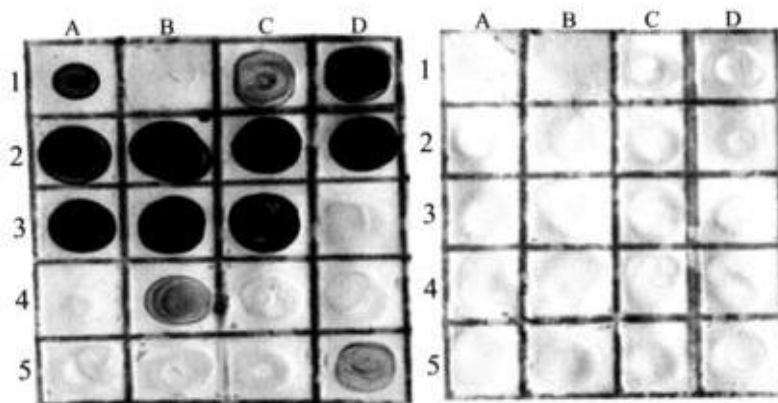


图5 斑点杂交法检测仔虾的带病毒状况

注: a 为测试膜; b 为对照膜; A1 为阳性对照; B1 为阴性对照; C1 - C3 分别为第 2 天至第 10 天死亡仔虾样品; D3 为感染 WSSV 前的仔虾样品; A4 - D5 分别为 P、N、O1、O2、O3、I1、I2、I3 感染组感染 WSSV 后的存活仔虾样品。

Fig. 5 Detecting WSSV of *Penaeus vannamei* postlarvae by dot-blot hybridization

Note: "a" is test membrane and "b" is control membrane; "A1" is positive control and "B1" is negative control; C1 - C3 are the dead post-larvae sampling from the second day to the tenth day, respectively; "D3" is the post-larvae sampling before WSSV infection experiment; A4 - D5 are the post larvae sampling from groups P, N, O1, O2, O3, I1, I2 and I3, which survived after WSSV infection experiment.

3.2 PG 的作用浓度

免疫增强剂有一定的最佳作用浓度, 过高的浓

度对动物体有免疫抑制作用。庄承继等^[18]的研究结果表明, 罗氏沼虾育苗水体中的壳多糖在较低浓

1) 王新霞, 谭北平. β -葡聚糖在中国对虾育苗中的应用 [A]. 海洋高技术论坛论文集 [C], 2003. 156 - 161.

度下($0.025 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 虾苗的成活率和抗病力与壳多糖浓度正相关, 而较高浓度($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)则对成活率和抗病力有明显的抑制作用; Sung 等^[7]、王新霞等^[1]用葡聚糖分别浸浴斑节对虾(*Penaeus monodon*)仔虾及中国对虾(*P. chinensis*)蚤状和糠虾幼体, 也发现高浓度的葡聚糖有一定的抑制作用; Sitdhi 等^[13]用不同水平(0.005% 、 0.01% 、 0.1%)肽聚糖添加量的饵料饲喂日本对虾, 结果发现, 0.01% PG 的添加浓度最能促进对虾的生长、提高对虾免疫能力及抗环境胁迫和抗病能力, 而 0.1% PG 的添加量又使这些效果减小。本实验得到了相似的结果。在整个幼体培育期内, 口服3个组中, 中浓度(0.01%)PG 添加量幼体饵料组幼体, 其成活率、生长、PO 酶活力及抗病力皆优于低浓度组(0.005%)和高浓度组(0.1%), 但最佳添加量还需在 $0.01\% \sim 0.1\%$ 内进一步实验确定; 而浸浴组 PG 浓度与作用效果的关系在幼体的不同发育阶段则表现出差异性: 在 Z1 - M1 期, 低浓度(0.005%)作用效果最佳, 而在 M1 - P1 期, 中浓度(0.01%)的作用效果最佳, 仔虾体内 PO 活力则与 PG 浓度成正相关。究其原因, 可能是因为在幼体的早期发育阶段, 对虾的免疫系统处于较原始的发育阶段, 稍高的 PG 作用浓度即可能产生免疫抑制作用, 而随着虾体的进一步发育, 免疫系统的相对完善, 较高的 PG 浓度会有更好的效果。关于免疫增强剂的免疫抑制机制, Sung 等^[7]报道, 高浓度的葡聚糖浸浴幼虾后, 对虾的鳃有萎缩现象, 这可能是导致幼虾成活率较低的原因。本实验高浓度 PG 浸浴下的幼虾成活率也较低, 是否由相同的原因引起, 因幼虾太小, 所以无法用组织学方法证明。

3.3 仔虾体内 PO 活性与抗 WSSV 感染力的关系

酚氧化酶原系统是对虾的重要防御和识别系统, PO 活力在一定程度上体现对虾的健康状况及免疫能力, 因此常常用来评价免疫增强剂的作用效果^[19-20]。考虑到 WSSV 对对虾养殖的危害, 本实验采用其作为病原来考察 PG 对凡纳对虾仔虾的抗病力的作用。本实验证明了 PG 能显著提高幼虾体内的 PO 活性, 而 PO 酶活性与抗病力呈现较复杂的关系: 一方面, PO 活性有显著提高的各 PG 作用组(除 O3 外), 其抗病毒免疫保护能力优于对照组(N)的仔虾, PO 活力与免疫保护力呈现正相关, 说明 PO 与凡纳对虾的抗病力有着十分重要的关系, 在一定程度上体现着对虾的抗病力; 另一方面, 活饵组(P)

仔虾 PO 活力虽然较低, 但其却表现出仅次于 O2 的较高免疫保护效果, 而其中 PO 活力较高的 O3, 其抗免疫保护效果差于 PO 活力较低的 N, 这也提示了不能单用 PO 活性评价幼体的抗病能力。

参考文献:

- [1] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Observations on the geographic-distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius[J]. Aquaculture, 1983, 32: 209 - 223.
- [2] Sano T, Nishimura T, Fukuda H, et al. Baculoviral infectivity trials in Kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus* of different ages [A]. Fish and shellfish pathology [C]. New York: Academic Press. 1985, 397 - 403.
- [3] Overstreet R M, Stuck K C, Krol R A, et al. Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* as a bioassay [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1988, 19: 175 - 187.
- [4] Huang C C, Song Y L. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 23: 545 - 552.
- [5] Alabi A O, Jones D A, Latchford J W. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi* [J]. Aquaculture, 1999, 178: 1 - 11.
- [6] Vici V, Bright Singh S, Bhat G. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10: 559 - 563.
- [7] Sung H H, Kou G H, Song Y L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Fish Pathology, 1994, 29: 11 - 17.
- [8] 雷质文, 黄 捷, 杨 冰, 等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46 - 51.
- [9] 孟凡伦, 马桂荣, 孔 健. 乳链球菌 SB900 肽聚糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 山东大学学报, 1999, 34(1): 88 - 93.
- [10] Matsw K, Miyazono I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1998, 59, 1: 377 - 379.
- [11] Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, et al. Activation of phenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants [J]. Fish Shellfish Immunology, 1999, 9: 21 - 30.
- [12] Itami T, Kondo M, Uozu M, et al. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J].

- Journal of Fish Diseases, 1996, 19: 185–187.
- [13] Boonyaraptalin S, Boonyaraptalin M. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, Immune response and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [A]. Diseases in Asian Aquaculture II [C]. Manila: Fish Health Section, 1998. 469–477.
- [14] 王秀华. 肽聚糖对对虾免疫因子的作用及在对虾养殖中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [15] Itami T, Asano M, Tokushige K, et al. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. Aquaculture 1998, 164: 277–288.
- [16] 黄 健, 蔡生力, 宋晓玲, 等. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断[J]. 海洋科学, 1995(1): 29–34.
- [17] 廖承义. 繁殖生物学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. 1–238.
- [18] 庄承纪, 刘劲科, 杨清友, 等. 壳多糖对罗氏沼虾、斑节对虾苗稚生长和抗菌防病作用研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(3): 29–34.
- [19] Sirirat R, Sombat R, Somkiat P, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*) [J]. Aquaculture, 2000, 191: 271–288.
- [20] 刘 恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(2): 113–118.

Effects of A3 α peptidoglycan on growth of *Penaeus vannamei* larvae and resistance to virus

CHEN Guo-fu^{1,2}, SONG Xiao-ling¹, HUANG Jie¹, ZHOU Jin^{1,2}, WANG Xiu-hua¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The cultivation of larvae is the first and foremost step in shrimp farming which is directly related to the success or failure of the whole culture. Consequently, high quality of larvae is a guarantee to succeed in successive culture. There is now low survival rate in larvae cultivation of shrimp just because larvae are vulnerable to most pathogen, such as virus, bacteria, et al, which pose a menace to the production and quality of larvae. The use of immunostimulants to facilitate larvae culture is widely promising. Recently, more and more evidences show that peptidoglycan (PG) is helpful for aquatic animals to enhance the immunocompetence and resistance to pathogens, nevertheless, no evidence is given to shrimp larvae. In this experiment, *Penaeus vannamei* larvae were fed with steamed egg custard with the supplement of 0.005%, 0.01%, 0.1% peptidoglycan (PG), and immersed in the seawater containing 0.005 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL PG, while larvae fed with egg custard without PG were designed as the control. The other larvae fed with living diet during the experiment are included, too. The survival rates of larvae at stages Z1–M1, stages M1–PL1, stages Z1–PL1, and the body length of larvae at stages M1 and PL1 and the body weight of larvae at stage PL1 were evaluated, respectively. The activities of phenoloxdase (PO) were tested after PL1 were fed for another 7 d, then the larvae were challenged by white spot syndrome virus (WSSV). The results showed that compared with control, the survival rates of larvae in the other groups (fed with living diet and steamed egg custard with 0.01% PG supplement, immersed in the seawater containing 0.005 mg/mL PG) at stage Z1–M1 increased significantly ($P < 0.01$); at stages of Z1–PL1 and M1–PL1, only the group immersed in the seawater containing 0.05 mg/mL PG did not show higher ($P > 0.01$) survival rate, and all other groups showed much higher ($P < 0.01$) survival rates; both body length of larvae at stage M1 and body weight of larvae at stage PL1 of the groups immersed in the seawater containing 0.01 mg/mL and 0.05 mg/mL PG did not increase significantly ($P > 0.01$), while other groups increased significantly ($P < 0.01$); the body length of larvae at stage PL1 increased significantly ($P < 0.01$) too; the larvae of all groups showed much higher ($P < 0.01$) PO activities; the group fed with steamed egg custard with a supplement of 0.1% PG challenged by WSSV did not show higher ($P > 0.01$) survival rates, and all other groups challenged by WSSV showed higher ($P < 0.01$) survival rates.

Key words: peptidoglycan; *Penaeus vannamei*; larvae; growth; phenoloxdase; white spot syndrome virus; immunity

Corresponding author: SONG Xiao-ling. E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn