

中国对虾 6 项免疫相关组分的估计遗传力和遗传相关

杨翠华 孔杰 王清印* 田焱 罗坤 张天时 刘庆慧

(中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛 266071; 中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003; 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071. * 联系人, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn)

摘要 大量研究证明, 血液中的某些免疫组分在对虾抗病和抗逆过程中发挥重要的调节作用, 精确的估计这些性状的遗传参数, 特别是遗传力和遗传相关, 对开展遗传育种工作是非常重要的. 本研究在控制条件下建立了中国对虾 51 个全同胞家系(分别是 23 个父本亲虾和 51 个母本亲虾的后代), 并养殖到平均体重 7.64 g, 每个家系随机取 15 尾满足条件的对虾抽取血液, 在相同条件下测定了 765 尾对虾个体血清中的总蛋白浓度(PC)、氧合血蓝蛋白浓度(HC)、酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)等血液中与免疫相关性状的活性, 并以最优线性无偏估计(BLUP)理论为基础, 计算了上述 6 项免疫相关组分的估计遗传力、各个性状间的遗传相关和表型相关. 结果显示, 当中国对虾平均体重 7.64 g 时, 血清中上述 6 项免疫组分的正常含量分别是(153.88 ± 1.65) mg/mL, (36.04 ± 0.71) U/mL, (165.24 ± 4.93) U/mL, (333.33 ± 2.74) U/mL, (52.51 ± 2.15) U/100 mL 和(61.68 ± 2.61) U/100 mL. 并且雌雄中国对虾 6 种免疫相关组分间均不存在显著差异($P > 0.05$). 6 项血液免疫相关组分的遗传力估计值(h^2)分别是 0.00 ± 0.13, 0.09 ± 0.22, 0.03 ± 0.20, 0.30 ± 0.20, 0.63 ± 0.32 和 0.39 ± 0.25. 对遗传参数剖分结果同时显示, 在不同缸中隔离养殖对虾对家系间个体的影响很大, 6 项血液免疫相关组分除加性遗传以外的共同环境效应(c^2)分别为 0.10 ± 0.06, 0.20 ± 0.11, 0.21 ± 0.10, 0.00 ± 0.00, 0.02 ± 0.01 和 0.04 ± 0.01. 本研究中, 除 SOD 活性外, 几乎所有其他性状间的遗传相关、环境相关和表型相关均为正. 本研究结果表明, 虽然中国对虾血液中某些免疫相关组分的遗传力估计值很低, 但是大多数免疫性状通过选择育种能够得到改善, 从而使选育群体抗病和抗逆能力整体水平得到提高.

关键词 中国对虾 估计遗传力 遗传相关 表型相关 免疫 血清

由于养殖面积的扩大和养殖密度的提高, 在过去的 20 年间, 对虾产量在世界范围内迅速增长^[1]. 但是, 不合理的养殖环境和过高的养殖密度同时打破了对虾体内的免疫平衡系统, 降低了对生活环境的适应性、对外来病原体及病毒感染的抵抗力, 导致了最近十几年中对虾细菌和病毒疾病的不断暴发^[2]. 因此, 了解对虾体内的免疫系统组成, 弄清免疫作用机理, 并据此设计有效的方案辅助预防和控制疾病, 对于对虾养殖业的长远发展具有重要的意义^[3].

与脊椎动物相比, 甲壳类动物的免疫系统并不发达, 机体完全依赖于先天性、非获得性机制防御外来物的入侵. 对虾免疫反应主要发生在血液或其他某些特定的组织, 如鳃和肝胰腺, 由细胞免疫反应和体液免疫反应组成. 细胞免疫反应是甲壳类动物免疫的最重要的手段, 主要通过吞噬作用、结节形成和包裹作用等方式破坏外来病原体和细胞毒性分子.

一般说来, 血细胞通过吞噬作用清除进入到血淋巴中的外来异物, 而当入侵的病原体或寄生虫的个体过大以至无法被单个的血细胞吞噬时, 就以多个血细胞的包裹作用或结节形式来完成^[4]. 体液免疫反应是由几种免疫反应组成的, 如黑色素的形成、超氧化物歧化酶(SOD)系统、磷酸酶作用系统、导致凝血作用的蛋白水解酶的级联反应、调理作用和抗菌肽的合成等, 与细胞免疫反应协作共同发挥抗病和抗逆作用. 体液免疫因子主要是在防御反应中发挥作用的分子而不需要血细胞的直接参与, 尽管很多因子最初是由血细胞合成并储存在血细胞内^[5-7].

许多固体蛋白参与了甲壳类动物的免疫反应. 其中, 血蓝蛋白, 又称呼吸蛋白, 是对虾血清总蛋白的主要组分, 在体内发挥着呼吸作用, 为机体活动提供充足的氧量, 并在机体抵御外来物和适应环境等方面发挥着重要的作用^[8]. 最近研究表明, 血蓝蛋白

还具有抑制真菌和类酚氧化酶原的功能^[9,10]。

参与无脊椎动物的免疫防御反应而导致黑色素产生、细胞黏附、包裹作用和吞噬作用的多种蛋白组成了酚氧化酶原(proPO)系统。proPO级联反应是甲壳类动物免疫反应机制研究得最深入的系统之一。大量研究已经从蛋白和基因水平上证明, proPO系统与机体疾病感染和环境变化密切相关, 因此该系统可以作为机体是否健康和环境是否适宜的指标^[11]。proPO系统可以被G⁻细菌壁的脂多糖、真菌细胞壁的β-1,3-葡聚糖及肽聚糖、胰蛋白、加热或Ca²⁺浓度下降等多种因素活化, 生成酚氧化酶(PO)等一系列活性物质, 通过多种方式参与机体防御反应, 提供调理素, 促进血细胞吞噬作用、包裹作用、结节形成、凝固现象, 产生杀菌物质等^[12,13]。甲壳动物中, 该系统位于粒细胞或半粒细胞颗粒中。

吞噬是细胞防御最普通的反应, 在吞噬过程中, 颗粒或微生物被吞入细胞中, 形成吞噬泡, 然后通过释放降解酶到吞噬泡中及产生活性氧对吞入的颗粒进行清除, 后者即为呼吸暴发。这个过程先产生超氧阴离子(O₂⁻), 随后再产生其他活性氧, 如H₂O₂, ¹O₂和⁻OH等。活性氧具有重要的活性功能, 如参与新陈代谢及储能作用、防御和解毒作用等, 但是过多的自由基会损伤细胞结构和功能。SOD是超氧阴离子的清除剂, 是机体抗氧化系统的第一道防线, 在机体自由基清除作用中处于关键地位, 它主要分布于胞浆和线粒体的基质中, 一些免疫细胞膜上也有一定的分布^[14-16]。

非特异性的酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)广泛地存在于动植物的各种组织中, 对于磷酸化和去磷酸化的各种代谢过程都非常重要。与脊椎动物相反, 甲壳类动物体内的ACP和ALP活性可以直接反映机体的非特异性免疫状态。ACP是溶酶体的标志性酶, 胞内消化被吞噬的外源物质, 在体内被当作表征吞噬细胞活性大小的标志酶。ALP是一类对底物专一性较低的磷酸单酯水解酶, 是重要的解毒体系, 并与一些营养物质的消化吸收有关^[17]。Zhang等人^[18]报道, 绿蟹(*Scylla serrata*)中ALP是参与细胞磷酸酯代谢的重要酶, 并与钙磷等元素的吸收, 蟹壳的蜕皮等有直接关系, 环境的污染、重金属离子或有机质过多等都可能影响ALP活性的变化, 进一步影响个体的生长和存活。

遗传力是数量遗传学的最重要的特征值之一,

是指加性遗传方差占表型方差(总方差)的百分率。在育种研究中, 遗传力一方面指出了在所研究的群体及所处的环境中, 在一个性状的表型变异中遗传因素和环境因素的相对重要性; 另一方面对于育种值估计、选择指数的制定、选择反应预测、选择方法比较以及育种规划决策等具有重要的作用。遗传相关是不同性状间基因型的相关程度, 不受环境的干扰, 能真实地反映出性状间遗传效应的相互关系, 是间接选择的重要依据。在选育计划中, 为了保证选育工作最优化和控制可能的相关反应, 明确许多重要性状间的遗传相关是非常重要的^[19]。

目前许多研究已经报道了对虾血液中大量免疫相关组分的含量及许多体内外条件对其的影响^[20,21], 但是仍未见任何免疫相关组分遗传力和遗传相关等遗传参数的报道。虽然许多血液及体液组分对于机体抗病和抗逆性发挥重要的作用, 但由于受每个虾采血量的限制, 本文仅同步测定了血清中已证明与免疫密切相关的总蛋白浓度(PC)、氧合血蓝蛋白浓度(HC)、酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)共6项组分的活性, 统计了中国对虾平均体重7.64 g时上述6个性状的估计遗传力和遗传相关。

1 材料与方法

() 父系半同胞家系的建立和培育。从中国青岛和乳山及朝鲜半岛南海岸捕获野生中国对虾, 分别命名为青岛(QD)群体、乳山(RS)群体、朝鲜半岛南海岸(SK)群体; 中国水产科学院黄海水产研究所多年选育的生长快群体称为黄海一号(HH1)。这3个野生群体和1个具有优良性状的人工选育群体亲本共同组成选育计划的基础群体。本实验所有数据来自于51个全同胞家系, 它们是23尾雄虾和51尾雌虾的后代(表1)。为了产生全同胞和半同胞家系, 两或三尾性成熟的留种雌虾通过人工授精分别接受成熟雄虾的两个完整或切块精英, 然后放在隔离的产卵缸内。幼体孵化后, 从每一个全同胞家系中随机选取

表1 组成中国对虾基础群体亲本的地理来源及数目

群体	来源	雄虾数	雌虾数
乳山群体(RS)	山东乳山湾	16	29
青岛群体(QD)	山东青岛海域	0	1
朝鲜半岛南海岸群体(SK)	朝鲜半岛南海岸	6	21
黄海一号(HH1)	选育群体	1	0
总计		23	51

大约 20000 个无节幼体, 放入统一管理并相互隔离的 200 L 幼体孵育桶中. 小球藻、硅藻、轮虫、卤虫和扇贝肌肉柱等都可以作为幼体的饵料. 在仔虾第 10 期(PL10)时, 每个家系随机选取 350 尾转移到室外相互隔离的 3 m³ 养殖缸内, 整个实验过程施行 24 h 流水饲养, 所有的实验用水均经过砂滤, 直到稚虾生长平均体重 0.60 g. 每个家系随机取 10 尾稚虾用于安全性分析, 即用巢式 PCR 法检测白斑综合征病毒(WSSV)含量, 所有个体检测结果均为阴性. 同时每个家系随机留 30 尾稚虾在缸内继续养殖 80 d, 所有个体的平均体重达 7.64 g. 每个家系随机取 15 尾符合条件的成虾, 51 个全同胞家系共取 765 尾个体, 用于实验. 上述所有实验均在未出现对虾白斑综合征的黄海水产研究所即墨岙山卫育种基地进行.

() 血液采集和血清制备. 仅处于蜕皮间期的对虾用于实验. 在采血前将对虾放在 18 ℃ 海水中 5 min 麻醉, 以减少操作引起的误差. 用预冷的 1 mL 一次性无菌注射器自对虾头胸甲后部插入围心腔采血, 每个对虾大约采血 0.6~1.0 mL, 血液立即放入预冷的一次性无菌 1.5 mL Eppendorf 管中, 于 4 ℃ 冰箱中过夜, 然后 2000×g 离心 10 min, 取上清液作为待测血清, 分装, -20 ℃ 保存备用. 整个采血和血清析出过程历时 36 h. 包括血液采集和血清制备, 6 种血清免疫相关组分的测定共历时 65 d, 并且所有实验操作均在冰盒上进行.

() 血清免疫相关组分测定. 采用考马斯亮蓝染色法(Broadford法)对血清总蛋白进行定量^[22]. 配制牛血清白蛋白系列浓度梯度的标准溶液, 各加考马斯亮蓝(G-250)染料, 振荡混匀, 用 TECAN SAFIRE 多通道酶标仪分别测定 A₅₉₅ 值, 以牛血清白蛋白浓度值和吸光值作图, 绘制标准曲线. 血清蛋白的定量是在 2 μL 血清中立即加入 150 μL G-250 染液, 测定 595, 850 和 997 nm 处的吸光值, 从牛血清白蛋白系列梯度的标准曲线中确定血清蛋白浓度.

将 5 μL 血清迅速用 95 μL 双蒸水稀释, 在 96 孔酶标板上测定 335, 850 和 997 nm 处的 A 值, 以其近似地表示氧合血蓝蛋白的含量. 氧合血蓝蛋白含量表示为: A×血清稀释倍数^[23].

根据 Perazzolo 和 Barracco 的方法略作改动测定 PO 活性^[24]. 以 L-苯丙氨酸(L-DOPA)为底物, 将 90 μL 磷酸钾缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.0)、90 μL L-DOPA (0.1 mol/L)和 5 μL 血清混匀, 室温下孵育 30 min, 测定 490, 850 和 997 nm 处的光密度值. 以本实验条件下

每毫升血清中 A 值增加 0.001 定义为一个酶活力单位.

SOD 活性用 SOD 测定试剂盒测定(南京建成生物工程研究所). 当被测样品中含 SOD 时, 则对超氧阴离子有专一性抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 通过测定样品组和对照组吸光度的差值来确定 SOD 值大小. 本方法通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者与氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂作用下呈现紫红色, 测定 A₅₅₀, A₈₅₀ 和 A₉₉₇ 值, 计算血清中的 SOD 活性. 一个酶活力单位定义为: 每毫升血清中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量. 总 SOD 活性(U/mL 血清)=(A_{550 对照}-A_{550 样品})/A_{550 对照}/50%×总反应体积/样品体积.

ACP 和 ALP 活性均采用特定试剂盒测定(南京建成生物工程研究所). ACP 和 ALP 都能分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸酚. 酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色酪衍生物, 根据红色深浅可以测定酶活力的高低. 100 mL 血清在 37 ℃ 与底物作用 30 min 产生 1 mg 酚定义为一个金氏单位.

本研究中每个性状的吸光度均通过 850 和 997 nm 处的吸光值进行校正, 以消除测定误差, $A = (A_x - A_{850}) / (A_{997} - A_{850}) \times 0.1554$, 其中 x 是指每个性状的吸光峰值.

() 统计分析. 使用双变量混合线形动物模型估计变异组分对于 6 项研究性状的随机影响. 该模型用矩阵符号表示为

$$y = Xb + Za + Wc + e. \quad (1)$$

其中 y 是每个个体免疫相关组分的观察变量; b 是由于测定个体性别和亲本来源不同引起的固定效应变量, 但是未考虑不同杂种组合间的杂种优势; $a \sim (0, A\sigma_a^2)$ 是加性遗传变量; $c \sim (0, I\sigma_c^2)$ 是除加性遗传效应外的共同环境效应(如单独养殖全同胞家系产生的环境效应, 非加性遗传效应和母系效应等)变量; $e \sim (0, I\sigma_e^2)$ 是指随机误差变量. X , Z 和 W 分别指与观察值 b , a 和 c 对应的设计矩阵. A 是指加性遗传相关矩阵, I 是单位矩阵. 通过公式 $h^2 = \sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2)$ 估计遗传力, $c^2 = \sigma_c^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2)$ 计算除加性效应以外的共同环境效应组分, $e^2 = \sigma_e^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2)$ 计算环境方差占总方差的组分. 由于个体大小可能影响各种免疫相关组分在血清中的含量, 每个对虾的体重作为协变量校正 6 项性状的测定值.

所有数据采用 MTDFREML (非求导约束最大似然法)批处理程序分析.

() 遗传相关和表型相关. 不同性状之间由于各种遗传原因造成的相关程度称为遗传相关. 本文借助 MTDFREML 批处理程序中的双变量混合线型动物模型(模型 1), 分析了 6 项免疫相关组分间的协方差、遗传相关和环境相关. 采用 SPSS11.5 软件相关分析法, 对 6 项性状进行了表型相关分析. 0.05 和 0.01 分别表示比较性状间的显著性和极显著性差异.

2 结果

2.1 血清内 6 项免疫相关组分的正常含量

本实验共测定了 51 个全同胞家系分别属于 23 个半同胞的 765 尾中国对虾血清中 PC, HC, PO, SOD, ACP 和 ALP 共 6 项免疫相关组分活性的正常含量, 结果分别为 (153.88 ± 1.65) mg/mL, (36.04 ± 0.71) U/mL, (165.24 ± 4.93) U/mL, (333.33 ± 2.74) U/mL, (52.51 ± 2.15) U/100mL 和 (61.68 ± 2.61) U/100 mL. 表 2 显示, ACP 和 ALP 的变异系数较其他性状高, 分别为 112.81% 和 116.62%. PC, SOD, ACP 和 ALP 活性在雌虾体内的含量较雄虾含量高, HC 和 PO 活性在雄虾的体内含量较高, 但是经 Tukey 检验, 各项性状在雌雄虾体内的含量差异均不显著 ($P > 0.05$).

2.2 遗传方差和估计遗传力

表 3 列出了中国对虾血清中 6 项免疫相关性状的遗传方差、估计遗传力和家系共同环境效应组分. ACP 活性在 6 项性状中估计遗传力最高, 为 0.63. SOD 活性和 ALP 活性的估计遗传力属于中等高度, 分别为 0.30 和 0.39. 但是 PC 的遗传力估计值约为 0, 表明该性状并不能通过遗传育种得到有效改变. 除 SOD 活性以外, 其余 5 项免疫组分的共同环境效应均大于 0, 并在 PC, HC 和 PO 活性 3 项性状中大于各自的估计遗传力. PC 环境方差占总方差的比重较高, 为 0.90, 而其他 5 项性状在 0.36 到 0.76 之间. 与遗传力估计值和家系共同环境效应组分相比, 本研究中各项参数的标准误差偏高, 从 0.00 到 0.32 不等.

2.3 遗传相关、环境组分相关及表型相关

除 SOD 活性与 HC, PO 活性, ACP 活性及 ALP 活性间呈现遗传负相关外, 大多数性状间的遗传相关为正. 表 4 显示, 与理论推论不符, PC 和 ALP 活性间的遗传相关为 -0.16. 所有性状中, ACP 和 ALP 间的遗传相关最高, 为 0.78. SOD 活性与 ACP 和 ALP 活性两者间的遗传相关也非常高, 分别为 -0.73 和 -0.69. 而 HC 和 SOD 活性间的遗传相关系数在所有

性状间最低, 仅为 -0.02.

除了 SOD 活性与其他性状间呈现负环境相关外, 其他所有性状间的环境相关均为正. ACP 和 ALP 活性间的环境相关系数最高, 为 0.61, 而 PC 和 SOD 活性间的环境相关系数仅为 -0.34.

所有性状间的表型相关系数及显著性比较见表 5. 与遗传相关和环境相关一致, 除 SOD 活性外, 其他所有性状间的表型相关均为正. 其中, ACP 和 ALP 活性间的表型相关最高, 为 0.74, 两者极显著性相关 ($P < 0.01$). SOD 活性与 ACP 活性、ALP 活性间也呈现高的负相关, 分别为 -0.51 和 -0.53. 大多数性状间呈现显著性表型相关, 但是 PC 与 SOD 活性、ALP 活性间及 HC 与 SOD 活性、ALP 活性间的表型相关不表现显著性 ($P > 0.05$).

3 讨论

过去的数十年间, 由于对虾养殖业一直面临着水质污染和感染传染病, 特别是细菌性和病毒性传染病的危险, 并已经造成了巨大的经济和社会损失, 越来越多的人们开始关注该产业的可持续性发展^[25]. 但是, 传统的养殖环境很难保证对虾在无病原菌的条件下养殖. 因此, 为了提高养殖产量和质量, 最近几年来, 对虾的免疫系统成为新的研究热点. 本研究一方面测定了中国对虾平均体重 7.64 g 时血清中的 PC, HC, PO 活性, SOD 活性, ACP 活性和 ALP 活性的正常含量; 另一方面, 根据最优线性无偏估计 (BLUP) 理论, 利用非求导约束最大似然法原理, 分析了在控制条件下养殖的 23 个半同家系血清中上述 6 项性状的估计遗传力、家系共同环境效应组分、遗传相关、环境相关和表型性状相关等参数. 这对于进一步研究对虾免疫机制, 设计合理的育种计划提高养殖对虾的免疫能力具有重要的意义.

与其他甲壳类动物相同, 对虾主要依赖非特异性免疫反应识别、杀灭并清除外来的病原体, 从而抵抗疾病感染^[26]. 许多实验已证明, 血清总蛋白在机体免疫反应中发挥重要的作用, 并能对生活环境和生理状态及时做出反应^[27,28]. Chisholm 和 Smith^[29] 报道, 对虾血清中的总蛋白浓度与水温 and 机体所处的蜕皮周期有关, 水温较高或较低都能使蛋白浓度降低. Chen 和 Cheng^[30] 报道, 日本囊对虾血清中的总蛋白浓度在蜕皮前比蜕皮后更高, 两者分别是 74.90 和 41.37 mg/mL. 同时总蛋白浓度可能也与饵料中蛋白的含量有关, Rodríguez 等人^[31] 在实验室内养殖的凡

表 2 中国对虾血清中 6 种免疫相关组分的正常含量

父本	母本	PC/mg·mL ⁻¹	HC/U·mL ⁻¹	PO 活性/U·mL ⁻¹	SOD 活性/U·mL ⁻¹	ACP 活性/U·100 mL ⁻¹	ALP 活性/U·100 mL ⁻¹
1	1.1	138.24 ± 9.60	31.94 ± 4.38	88.88 ± 11.53	322.09 ± 14.59	23.37 ± 14.50	15.86 ± 3.65
	1.2	163.65 ± 10.37	42.71 ± 6.07	152.26 ± 12.85	351.20 ± 11.91	21.95 ± 3.88	25.18 ± 5.20
	1.3	155.84 ± 5.54	33.63 ± 3.21	52.39 ± 4.61	365.21 ± 9.50	21.62 ± 2.71	9.37 ± 1.66
2	2.1	141.84 ± 3.58	37.81 ± 3.92	170.92 ± 20.16	323.00 ± 8.59	42.13 ± 4.99	37.73 ± 4.68
	2.2	166.78 ± 5.86	31.05 ± 2.34	119.07 ± 11.87	371.60 ± 6.47	14.84 ± 1.90	24.84 ± 3.96
	2.3	118.91 ± 10.88	28.80 ± 3.52	19.09 ± 0.78	356.28 ± 11.86	19.68 ± 1.73	28.75 ± 5.12
3	3.1	137.14 ± 2.55	24.85 ± 3.07	84.58 ± 11.52	350.62 ± 12.38	22.32 ± 2.48	23.32 ± 3.33
	3.2	170.96 ± 7.62	50.94 ± 5.51	291.75 ± 45.37	353.83 ± 15.42	40.17 ± 4.40	36.19 ± 4.06
4	4.1	138.44 ± 12.38	38.18 ± 3.57	240.89 ± 18.44	377.19 ± 2.08	17.57 ± 2.33	19.92 ± 1.79
	4.2	185.63 ± 34.67	41.10 ± 2.83	93.00 ± 9.53	368.94 ± 8.56	14.10 ± 1.43	6.67 ± 0.81
5	5.1	152.91 ± 9.99	34.49 ± 3.26	210.11 ± 18.29	312.64 ± 16.40	108.48 ± 16.56	149.89 ± 23.61
	5.2	179.09 ± 15.88	42.94 ± 3.93	213.10 ± 18.33	327.37 ± 22.86	40.39 ± 5.45	62.41 ± 6.76
6	6.1	125.16 ± 9.57	29.82 ± 2.08	138.88 ± 16.17	327.62 ± 12.92	27.50 ± 3.51	39.66 ± 5.62
	6.2	196.07 ± 14.07	15.83 ± 3.10	156.70 ± 24.59	270.05 ± 16.31	15.34 ± 2.39	23.52 ± 2.04
	7.1	134.57 ± 8.68	45.01 ± 3.93	163.18 ± 29.64	361.01 ± 11.97	45.25 ± 5.16	42.56 ± 7.58
7	7.2	178.46 ± 14.70	43.29 ± 5.51	76.89 ± 14.34	319.93 ± 22.82	44.70 ± 11.76	49.90 ± 14.76
	7.3	174.94 ± 12.83	59.54 ± 9.89	193.54 ± 37.83	337.50 ± 20.00	78.75 ± 5.44	110.16 ± 18.34
8	8.1	135.60 ± 3.01	34.83 ± 1.51	68.00 ± 10.30	335.85 ± 9.13	18.56 ± 1.85	25.54 ± 4.08
	8.2	123.08 ± 14.13	38.40 ± 3.08	182.32 ± 36.25	305.31 ± 20.91	47.28 ± 5.65	46.19 ± 11.41
9	9.1	120.69 ± 14.06	48.00 ± 7.11	144.37 ± 13.76	185.53 ± 27.48	168.74 ± 10.97	194.16 ± 15.72
	9.2	148.62 ± 4.40	35.48 ± 3.18	270.05 ± 36.08	301.90 ± 17.43	79.89 ± 17.97	199.56 ± 23.36
10	10.1	171.20 ± 6.85	36.59 ± 2.72	287.66 ± 17.83	253.22 ± 24.11	151.57 ± 25.87	130.73 ± 24.72
	10.2	142.87 ± 12.75	32.00 ± 3.09	181.04 ± 19.93	237.05 ± 23.36	101.38 ± 16.63	119.99 ± 22.74
11	11.1	143.71 ± 7.09	22.91 ± 2.65	130.49 ± 30.40	377.88 ± 6.11	16.19 ± 3.10	19.44 ± 4.18
	11.2	162.44 ± 8.34	25.82 ± 1.79	37.34 ± 7.10	365.99 ± 3.47	11.66 ± 2.40	13.55 ± 2.83
12	12.1	144.52 ± 10.84	46.68 ± 5.38	285.14 ± 47.11	312.80 ± 29.20	109.29 ± 24.60	76.28 ± 17.93
	12.2	156.68 ± 9.71	38.77 ± 3.34	133.36 ± 29.00	312.89 ± 20.40	54.42 ± 15.09	73.84 ± 19.44
	12.3	142.82 ± 7.71	10.98 ± 3.03	176.51 ± 37.65	312.29 ± 22.35	81.53 ± 11.90	98.16 ± 20.67
13	13.1	162.17 ± 14.21	21.75 ± 6.42	190.69 ± 27.14	369.49 ± 6.91	57.70 ± 9.46	75.12 ± 16.02
	13.2	181.95 ± 5.35	36.37 ± 3.00	140.95 ± 28.32	332.00 ± 19.15	54.08 ± 9.39	36.42 ± 8.12
	14.1	148.85 ± 6.23	1.36 ± 0.23	156.41 ± 27.27	341.76 ± 20.04	59.30 ± 13.24	55.15 ± 7.35
14	14.2	148.38 ± 15.10	39.75 ± 2.90	308.49 ± 50.77	340.90 ± 23.33	49.54 ± 8.66	31.73 ± 7.81
	14.3	176.68 ± 6.74	23.09 ± 6.48	283.86 ± 59.90	331.98 ± 27.65	77.58 ± 15.39	106.81 ± 20.81
15	15.1	140.37 ± 13.77	43.98 ± 4.33	275.49 ± 34.86	229.15 ± 23.43	111.27 ± 16.49	180.25 ± 29.18
	15.2	152.96 ± 9.71	34.06 ± 3.92	132.13 ± 26.15	369.19 ± 5.60	15.37 ± 3.92	26.30 ± 7.57
16	16.1	156.09 ± 8.75	58.58 ± 9.77	303.61 ± 58.02	356.36 ± 21.62	42.74 ± 8.89	61.36 ± 16.88
	16.2	144.06 ± 5.05	37.85 ± 6.10	163.63 ± 34.11	329.90 ± 11.04	49.93 ± 11.52	60.77 ± 14.22
17	17.1	139.45 ± 18.37	36.11 ± 3.32	153.02 ± 29.05	335.76 ± 21.03	66.69 ± 21.24	56.31 ± 17.15
	17.2	151.16 ± 14.55	39.00 ± 3.69	86.70 ± 14.25	388.17 ± 3.74	13.57 ± 2.16	15.04 ± 4.78
18	18.1	166.29 ± 8.22	42.66 ± 4.72	172.12 ± 47.65	354.32 ± 6.48	46.84 ± 11.07	54.90 ± 12.85
	18.2	160.23 ± 10.26	45.17 ± 4.91	120.02 ± 18.41	356.92 ± 7.77	23.98 ± 4.20	41.29 ± 7.89
19	19.1	194.87 ± 11.39	47.54 ± 3.11	236.54 ± 58.10	333.48 ± 26.48	168.25 ± 30.92	90.00 ± 17.57
	19.2	150.77 ± 3.92	26.02 ± 2.51	79.46 ± 18.29	339.25 ± 16.69	55.06 ± 18.12	42.37 ± 17.71
20	20.1	183.23 ± 11.26	38.35 ± 5.49	99.64 ± 18.55	328.16 ± 24.43	68.34 ± 18.67	55.57 ± 18.24
	20.2	154.55 ± 5.65	37.18 ± 5.29	103.31 ± 22.20	340.34 ± 17.05	38.34 ± 13.18	54.77 ± 16.88
21	21.1	161.14 ± 3.28	33.79 ± 3.33	115.03 ± 25.58	366.30 ± 12.58	52.46 ± 15.50	39.10 ± 15.24
	21.2	146.44 ± 6.73	40.20 ± 5.49	201.48 ± 33.26	360.77 ± 4.53	45.91 ± 10.03	74.84 ± 12.23
22	22.1	137.29 ± 3.58	26.37 ± 3.22	90.56 ± 29.47	307.28 ± 18.01	36.72 ± 11.53	65.64 ± 25.24
	22.2	157.71 ± 8.64	37.26 ± 3.12	94.54 ± 18.05	362.20 ± 21.83	40.16 ± 13.87	88.52 ± 39.23
23	23.1	127.16 ± 11.25	46.64 ± 2.94	233.88 ± 35.77	372.58 ± 10.10	28.30 ± 4.77	72.83 ± 14.44
	23.2	147.57 ± 8.44	38.26 ± 2.98	289.55 ± 51.85	344.82 ± 18.07	28.75 ± 4.12	59.05 ± 12.96
平均值	雄虾	151.34 ± 2.32	37.69 ± 1.04	171.71 ± 7.23	332.86 ± 4.04	52.91 ± 3.10	63.56 ± 3.91
± 标准	雌虾	155.48 ± 2.37	34.86 ± 0.97	158.43 ± 6.83	334.85 ± 3.77	52.94 ± 3.03	60.74 ± 3.56
误差	总体	153.88 ± 1.65	36.04 ± 0.71	165.24 ± 4.93	333.33 ± 2.74	52.51 ± 2.15	61.68 ± 2.61
变异系	雄虾	29.01	52.61	79.74	22.98	111.03	116.56
	雌虾	30.22	55.13	85.45	22.29	113.46	116.08
数(%)	总体	41.74	54.29	82.24	22.92	112.81	116.62

表3 中国对虾血清中6项免疫相关组分的遗传参数

	PC	HC	PO 活性	SOD 活性	ACP 活性	ALP 活性
遗传方差	0.00	34.62	483.40	1565.22	2059.87	1684.00
随机方差	204.99	76.12	3605.12	0.01	53.50	181.00
环境方差	1857.80	273.65	7909.45	3660.13	1179.69	2479.00
表型方差	2062.80	384.39	18471.56	5225.36	3293.06	4344.00
估计遗传力 h^2	0.00 ± 0.13	0.09 ± 0.22	0.03 ± 0.20	0.30 ± 0.18	0.63 ± 0.32	0.39 ± 0.25
共同环境效应组分 c^2	0.10 ± 0.06	0.20 ± 0.11	0.21 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01
环境方差占总方差组分 e^2	0.90 ± 0.08	0.71 ± 0.13	0.76 ± 0.12	0.70 ± 0.12	0.36 ± 0.21	0.57 ± 0.16

表4 中国对虾血清中6项血液免疫性状间的遗传相关和环境组分相关^{a)}

	PC	HC	PO 活性	SOD 活性	ACP 活性	ALP 活性
PC	-	0.14 ± 0.20	0.09 ± 0.20	0.20 ± 0.20	0.04 ± 0.19	-0.16 ± 0.19
HC	0.07 ± 0.08	-	0.48 ± 0.13	-0.02 ± 0.18	0.26 ± 0.16	0.15 ± 0.16
PO 活性	0.18 ± 0.09	0.10 ± 0.14	-	-0.16 ± 0.17	0.47 ± 0.13	0.48 ± 0.13
SOD 活性	-0.18 ± 0.08	-0.16 ± 0.11	-0.34 ± 0.11	-	-0.73 ± 0.09	-0.69 ± 0.09
ACP 活性	0.18 ± 0.12	0.08 ± 0.18	0.06 ± 0.21	-0.21 ± 0.15	-	0.78 ± 0.07
ALP 活性	0.26 ± 0.11	0.22 ± 0.16	0.19 ± 0.16	-0.31 ± 0.11	0.61 ± 0.13	-

a) 对角线以上表示各性状间的遗传相关, 对角线以下表示各性状间的环境相关

表5 中国对虾血清中6项血液免疫性状间的表型相关^{a)}

	PC	HC	PO 活性	SOD 活性	ACP 活性	ALP 活性
PC	-	0.08* ± 0.03	0.13** ± 0.00	-0.06 ± 0.12	0.10** ± 0.00	0.06 ± 0.09
HC		-	0.13** ± 0.00	-0.06 ± 0.13	0.10** ± 0.00	0.06 ± 0.09
PO 活性			-	-0.26** ± 0.00	0.33** ± 0.00	0.38** ± 0.00
SOD 活性				-	-0.51** ± 0.00	-0.53** ± 0.00
ACP 活性					-	0.74** ± 0.00
ALP 活性						-

a) *和**分别表示差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)

纳对虾血液中蛋白的正常含量约为 120 mg/mL. 本研究测定中国对虾血清内的正常含量约为 153.88 mg/mL, 并且含量在家系内和家系间变化较小. 虽然养殖环境和性状测定条件不同, 但也可推断中国对虾体内总蛋白浓度略高于日本囊对虾和凡纳对虾. 但是本研究统计中国对虾血清中总蛋白浓度的估计遗传力约为 0, 说明外界环境及机体状态的变化能够较大影响该性状的表达, 掩盖了遗传效应的展示, 从而使该性状不易通过选育得到提高. 该性状较大的家系共同环境效应组分也充分说明了这一点. 同时由于总蛋白浓度与除 ALP 活性外的所有性状间均表现遗传正相关, 因此该性状可能会随其他性状的改变而变化. 在依赖免疫性状进行的群体选育计划中, 建议较少的单独考虑该性状的变化. 总蛋白浓度与大多数性状间的遗传相关、环境相关和表型相关为正, 表明中国对虾血清中许多免疫相关组分相互作用, 共同维持机体的免疫平衡.

血蓝蛋白是机体蛋白和营养物质的重要来源, 并具有抗真菌和在一定条件下转化为类酚氧化酶物质的作用, 已成为对虾是否健康的重要指示指标之一. 血蓝蛋白在体外极易被氧化, 由于分子中含有 Cu 元素, 氧化了的血蓝蛋白在 335 nm 处有较高的吸光值, 可利用这一特性检测其含量. 本研究中, 中国对虾血清中的血蓝蛋白正常含量约为 36.04 U/mL, 个体间变异系数为 54.29%, 低于张明等人^[17]报道的蛋白含量 0.43 U/mg, 这可能与实验材料的养殖环境、饲喂饲料和样品测定方法不同有关. 中国对虾血清中血蓝蛋白浓度的遗传力估计值较低, 而家系共同环境效应组分较高, 说明隔离养殖环境对家系的影响很大, 环境效应部分掩盖了遗传效应. 为了准确测定遗传参数, 制定合适的选育计划, 需要混合养殖所有家系, 从而消除环境误差. 血蓝蛋白与除 SOD 以外的所有性状间的遗传相关、环境相关和表型相关均为正, 表明机体为了维持正常的免疫平衡, 各种组分

含量相互消长,通过某一性状的选育,能够使群体的所有性状都得到改变。

proPO系统是一种非常有效的进行非己识别的免疫系统,在遭受病原体入侵时,可以迅速通过识别真菌的 β -1,3-葡聚糖、 G^- 细菌的脂多糖、 G^+ 细菌的肽聚糖等微生物壁成分及病毒的某些组分而激活,在伤口附近和病原体周围产生黑色素,促进伤口愈合,抑制甚至杀死病原体^[32]。与PC和HC相似,PO活性的遗传力估计值小于家系共同效应组分,但由于该性状群体内变异系数较高,为 82.24%,说明该基础群体PO活性的遗传变异较大,并且该性状与除SOD活性外的所有性状均为正相关,因此经过选育很有可能提高群体整体PO活性。

SOD存在于全部有氧呼吸的真核生物的细胞质和线粒体中,是一种重要的抗氧化酶,作为活性氧清除剂参与清除体内的自由基,在防御机体衰老及生物分子损伤等方面具有极为重要的作用^[33]。正常情况下,由于细胞内活性氧的产生与清除处于一种动态平衡状态,活性氧含量很低,不会引起伤害。一旦这种平衡被打破,就有可能产生伤害作用。本研究测得中国对虾血清中的SOD活性为 333.33 U/mg,个体间差异很小。家系共同环境效应组分约为 0,说明养殖环境对SOD活性的影响较小,在选择育种过程中,如果不满足混合养殖的条件,可以将该性状作为遗传改良的指标。健康状况下,中国对虾血清中的SOD活性与除PC外的所有性状间的相关系数均为负,说明正常情况下,虽然适量的SOD有利于增强机体的免疫能力,但是过量时容易对机体产生毒害作用。

ACP和ALP由许多磷酸单酯酶组成,在甲壳类动物免疫系统中发挥重要的作用。ACP是巨噬细胞内溶酶体的标志性酶,已有研究结果证明,在甲壳类动物血细胞进行吞噬和包围化的免疫反应中,会伴随有ACP的释放。而ALP是生物体内的一种重要代谢控制酶,不仅可以直接参与磷酸基团的转移,还可参与机体蛋白质的合成,对钙磷吸收、骨骼形成及磷酸钙沉淀有重要的作用^[7]。与高等动物不同,ACP和ALP来自于颗粒细胞的颗粒体,是溶酶体酶的重要组成部分,两者活性的升高标志着机体处于积极免疫状态。本研究测定中国对虾每 100 mL血清中ACP活性和ALP活性分别为 52.51 和 61.68 U,两性个体间的变异系数分别为 112.81%和 116.62%,这主要由群体内两性状的遗传变异系数较大引起。与SOD活性相似,

ACP和ALP活性的家系共同环境效应组分远远小于性状的遗传力估计值,并且由于上述 3 个性状遗传力估计值和遗传变异系数较大,与机体免疫能力相关性较高,在育种计划中可以考虑将三者作为免疫相关性状进行选育。

虽然许多血液及体液组分对于机体抗病和抗逆性发挥重要的作用,但本研究测定的血清中 6 项免疫相关组分几乎参与了甲壳类动物免疫反应的全过程。当被外来病原体激活时,血细胞表现出迅速的、协同的一系列反应,通过吞噬、包囊和结节作用将病原体限制在一定范围内,利用氧化性和非氧化性杀菌机制杀灭病原体。其中氧化性杀菌机制主要是指具有强大的杀灭微生物活性的活性氧的产生,而非氧化性杀菌机制主要是指包括溶菌酶、过氧化物酶类和磷酸酶类等水解酶类的水解作用。在上述细胞免疫的过程中,proPO系统、凝血系统及抗菌肽的合成等体液免疫系统在机体防御反应中也发挥重要作用。当然,所有免疫性状都受养殖环境温度、盐度、溶氧量、pH 和营养状况等外界因素及其性别、蜕皮周期和发育时期等内部因素的影响,并且每项免疫性状都是相互联系,共同维持免疫平衡,抵御外来细菌和病毒的感染^[27]。据此,本研究建立了 23 个半同胞家系,测定了 765 尾对虾血清中 6 项免疫相关组分的正常含量,确保较准确的估计各性状的遗传参数,为制定合适的遗传育种计划提供基础。

近几十年的养殖经验和教训告诉我们,对虾养殖业的再次发展应该依赖于育种技术的改进,为生产提供高质量的种苗和养殖技术,目前最紧要的是通过选择育种提高种苗的抗病抗逆能力。农作物和家畜育种历程表明,依据免疫性状进行选择育种也是提高选育群体抗病抗逆能力的重要手段^[34]。但是由于免疫性状易受群体来源、个体状态和外界环境等因素的影响,至今未见免疫相关性状遗传参数的报道^[35]。本研究首次在控制环境条件下建立大量的家系,并利用非求导约束最大似然法剖分遗传力和隔离养殖家系产生的共同环境效应组分,估计了中国对虾血清中 6 项免疫相关组分的遗传力、遗传相关等遗传参数。所有家系未感染WSSV和在控制环境条件下养殖确保了本实验在对虾健康状态下测定各项性状;在采血过程中,预先麻醉对虾有效降低了应激反应,减少了操作误差。

对虾对外源物的敏感性反应了机体的免疫状态。

为了更好地利用各性状间的相关性提高整体的免疫能力,建立合适的动物模型,准确测定各项性状间、甚至各项性状与抗病能力间的遗传相关是非常重要的。本研究中,SOD作为血清总蛋白的组分,SOD活性与PC间的遗传相关系数为0.20,但是与其他4项性状间呈现负的遗传相关,表明当外源物入侵或机体处于不良环境中时,SOD可能与其他4项组分激活机制不同,机体需要降低SOD浓度,提高活性氧的含量消除不良影响。ALP也是血清总蛋白的组分之一,但由于总蛋白组分复杂,同时家系养殖受环境影响较大,本实验中PC与ALP活性遗传相关系数为-0.16,还需要以后实验进一步证明。血蓝蛋白是血清总蛋白的重要组分之一,但是本研究中,血蓝蛋白与其他性状相似,与PC间的各项相关系数较低,这可能由于血清总蛋白组分复杂,在机体处于不利环境中时,很多免疫系统共同激活,抵消了血蓝蛋白浓度升高对总蛋白浓度升高的贡献。总之,各项免疫相关组分间的相关性表明,当对虾受到外源物入侵时,机体可能通过降低SOD的活性,升高血蓝蛋白,PO,ACP和ALP等组分的活性提高免疫反应,抑制甚至杀死外来病原体。

同时考虑多项免疫相关性状的遗传育种计划有利于选育群体多项免疫性状的同步提高。本实验结果表明,中国对虾血清中绝大多数的免疫相关组分都受遗传因素影响,其中,SOD活性、ACP活性和ALP活性属于中高等遗传力,因此可以通过选择育种得到较大改善,而PC,HC和PO活性的遗传力估计值较低,这也与机体的免疫反应与抗病能力成正相关的结论相符,因为大多数疾病的抗性属于中低遗传力。由于各项免疫相关性状间具有一定的遗传相关性,也可以根据某一性状提高选育群体的免疫能力,但各性状为了获得较高、较准确的遗传进展,要求每世代建立相对更多的家系,测定较多的个体。

致谢 感谢黄海水产研究所育种室所有人员的帮助。

参 考 文 献

- Pérez-Jar L, Rodríguez-Ramos T, Ramos L, et al. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*, 2006, 252: 591—597[DOI]
- Pascual C, Gaxiola G, Rosas C. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: The effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar Biol*, 2003, 142: 735—745
- Muñoz M, Vandenbulcke F, Gueguen Y, et al. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27: 283—289[DOI]
- Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immun*, 2004, 16: 321—334[DOI]
- Pascual C, Sánchez A, Zenteno E, et al. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2006, 251: 416—429[DOI]
- Rosas C, Cooper E L, Pascual C, et al. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild population (Crustacea, Penaeidae). *Mar Biol*, 2004, 145: 401—413
- 王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响. *浙江大学学报(理学版)*, 2005, 32(6): 698—705
- Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, et al. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 2004, 236: 431—450[DOI]
- Destoumieux D, Saulnier D, Garnier J, et al. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem*, 2001, 276: 47070—47077[DOI]
- Adachi K, Hirata T, Nishioka T, et al. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp Biochem Physiol*, 2003, 134: 135—141[DOI]
- Ye X, Zheng Q M, Bai J J, et al. cDNA cloning and sequence analysis of prophenoloxidase in *Penaeus semisulcatus* and *Penaeus monodon*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2003, 34(5): 533—540
- Yeh S T, Lee C S, Chen J C. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun*, 2006, 20: 332—345[DOI]
- López N, Cuzon G, Gaxiola G, et al. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β -1,3-glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 2003, 224: 223—243[DOI]
- Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2000, 191: 89—107[DOI]
- Neves C A, Santos E A, Bainy A C D. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis Aquat Organ*, 2000, 39: 155—158
- Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comp Biochem Physiol*, 2002, 133: 557—565
- 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. *海洋科学*, 2004, 28(7): 22—25

- 18 Zhang R Q, Chen Q X, Zheng W Z, et al. Inhibition kinetics of gree crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32: 865—872[DOI]
- 19 Gitterle T, Salte R, Gjerde B, et al. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2005, 246: 139—149[DOI]
- 20 宋理平, 黄旭雄, 周洪琪, 等. Vc, β -葡聚糖和藻粉对中国对虾幼虾生长、成活率及免疫酶活性的影响. *上海水产大学学报*, 2005, 14(3): 276—281
- 21 Liu D H, He J G, Liu Y J, et al. Effects of dietary protein levels on growth performance and immune condition of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles at very low salinity. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(Suppl 2): 217—223
- 22 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- 23 Nickerson K W, van Holde K E. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin. *Comp Biochem Physiol*, 1971, 39: 855—872
- 24 Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21: 385—395[DOI]
- 25 Kautsky N, Ronnback P, Tedenqren M. Ecosystem perspectives on the management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 2000, 191: 145—161[DOI]
- 26 Alavandi S V, Vijayan K K, Santiago T C, et al. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM11 and *Vibrio fluvialis* PM17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immun*, 2004, 17: 115—120[DOI]
- 27 Song Y L, Yu C, Lien T W, et al. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immun*, 2003, 14: 317—331[DOI]
- 28 Chen J C, Chen C T, Cheng S Y. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar Ecol Prog Ser*, 1994, 10: 85—94
- 29 Chisholm J R S, Smith V. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *J Mar Biol Assoc UK*, 1994, 74: 979—982
- 30 Chen J C, Cheng S Y. Studies on hemocyanin and haemolymph proteins levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Biochem Mol Biol*, 1993, 106 (2): 293—296[DOI]
- 31 Rodríguez J, Moullac G L. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 2000, 191: 109—119[DOI]
- 32 Cheng W, Chieu H T, Tsai C H, et al. Effect of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun*, 2005, 19: 375—385[DOI]
- 33 Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, De Phippis R, et al. Generations of superoxide anion and SOD activity in haemolymph and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immun*, 2002, 12: 353—366[DOI]
- 34 Bachère E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 2000, 191: 3—11[DOI]
- 35 Rutten M J M, Komen H, Bovenhuis H. Longitudinal genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) body weight using a random regression model. *Aquaculture*, 2005, 246: 101—113[DOI]