

文章编号: 1000- 0615(2004)05- 0535- 06

病原感染条件下中国对虾二倍体和三倍体血液学变化

张成松^{1,2}, 李富花¹, 于奎杰¹, 吴长功¹, 郭振宇¹, 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 以热休克诱导获得中国对虾三倍体, 通过口服或注射的方式对二倍体和三倍体中国对虾进行了白斑综合征病毒(WSSV)和鳃弧菌感染实验, 研究了病原感染前后二倍体和三倍体中国对虾血液学的变化并首次报道了三倍体中国对虾血细胞的组成。实验结果表明: 三倍体和二倍体中国对虾均对 WSSV 敏感, 三倍体未显示出明显的抗性。WSSV 感染 4d 后, 对虾外周循环系统的血细胞数量明显减少, 三倍体和二倍体对虾血细胞数量均降为对照组的 10% 左右。对虾血细胞组成发生变化, 大颗粒细胞明显减少, 小颗粒细胞相应增加, 而透明细胞所占比例基本不变; 大颗粒细胞和小颗粒细胞内颗粒物质均有所减少, 出现空泡或细胞外突起等异常结构。注射鳃弧菌感染后两种对虾的血细胞数量均有所减少, 血细胞数量的减少与弧菌的注射量呈正相关关系。三倍体中国对虾血细胞组成与二倍体相似, 但其密度仅为二倍体的 40% 左右。本研究结果为三倍体对虾抗逆特性的研究提供了一定依据和参考。

关键词: 中国对虾; 三倍体; 白斑综合征病毒; 鳃弧菌; 人工感染; 血液学

中图分类号: S941.41; S941.4

文献标识码: A

Haematological changes of sibling diploid and triploid *Fenneropenaeus chinensis* after being challenged with pathogens

ZHANG Cheng-song^{1,2}, LI Fu-hua¹, YU Kui-jie¹
WU Chang-gong¹, GUO Zhen-yu¹, XIANG Jian-hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Based on polyploid induction method in shrimp established in our laboratory, triploid Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* was induced by heat shock to inhibit meiosis. Triploid shrimps and their diploid siblings were challenged with white spot syndrome virus (WSSV) through oral administration or with *Vibrio anguillarum* by injection. Shrimps without pathogens challenge were used as controls. Hemocyte count and composition in hemolymph of diploid and triploid shrimp were compared. This is the first time to report the cell count and composition of hemolymph in triploid shrimp. It showed that pathogens challenge resulted in obvious haematological changes. A significant decline for hemocyte count in both diploid and triploid shrimp after 4 days challenge was observed. Hemocyte count of both diploid and triploid shrimp was reduced to about 10% of that of control. The composition of hemocytes either in diploid or triploid shrimp changed after WSSV challenge. The

收稿日期: 2003-06-03

资助项目: 国家重点基础研究(973)资助项目(G 1999012009); 国家自然科学基金资助项目(30140017)

作者简介: 张成松(1977-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事对虾生殖与遗传学研究。Tel: 0532-2898571, 13811806151, E-mail: csongzhang@sohu.com

通讯作者: 相建海(1946-), 男, 山西永济人, 研究员, 主要从事海洋动物生殖与遗传工程学研究。Tel: 0532-2898568, E-mail: jlxiang

@ms.qdio.ac.cn

amount of large granule cells (LGC) decreased, while that of small granule cells (SGC) increased. However, the amount of hyaline cells (HC) remained unchanged. Some abnormal structures such as vacant vacuoles were found in SGC and LGC of the infected shrimp. Hemocyte count of diploid and triploid shrimp decreased too after being infected with *Vibrio anguillarum*, and the range of decline was positively related with the injection dosage of *Vibrio anguillarum*. Triploid shrimp has larger hemocyte volume and lesser total hemocyte counts, which accounts for about 40% of that of diploid, but the hemocyte composition in triploid was the same as that in diploid. Results above provide basis and reference for stress resistance research on triploid shrimp.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; triploid; white spot syndrome virus (WSSV); *Vibrio anguillarum*; infection; haematology

近年来,随着环境污染的加剧,海洋赤潮频繁发生,海水养殖动物病害不断爆发,海水养殖业受到了沉重的打击。利用现代生物技术,培育生长快、品质好、抗逆能力强的优良新品种,将对我国海水养殖业的持续、稳定、健康发展起到重要推动作用。多倍体育种是水产养殖动物遗传改良的途径之一。对虾多倍体的诱导起始于上世纪80年代末, Xiang 等^[1]以锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)为对象开展了虾类染色组操作可行性研究,在国际上首次获得了对虾类的三倍体、四倍体幼体,并以确凿的细胞学证据证明了雌核发育的可行性。但由于对虾繁殖上的特殊性、对虾受精卵发育的高度不同步性以及染色体倍性检测的困难,到目前为止,三倍体对虾的批量诱导成功只在中国对虾中有过报道^[2-4],而有关三倍体对虾的抗逆特性等的研究尚未见任何报道。

一般认为甲壳动物不具有免疫球蛋白,缺乏抗体介导的免疫反应,但具有独特的免疫防御系统,其中血细胞在细胞免疫中具有重要的意义,可以通过吞噬、包囊、形成细胞结、凝集等作用来清除入侵的病原和外来异物^[5],是对虾机体抵御外来病原生物侵袭的主要屏障,因此研究对虾血细胞在病原感染过程中的变化对于阐明对虾免疫机理具有重要的意义。本文选用对中国对虾危害较大的白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)进行人工感染实验,比较了两种病原感染条件下三倍体和二倍体中国对虾血细胞的数量和组成,以期对三倍体中国对虾抗逆特性的研究提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用两批三倍体和二倍体中国对虾均取自

中国科学院海洋研究所生物培育楼实验室培育的当年虾。其中三倍体虾是经热休克诱导获得,通过流式细胞仪检测确认其染色体倍性,检测方法同周岭华等^[6],二倍体系同批三倍体检测过程中检出虾。其中病毒感染用三倍体虾的平均体长为 8.6 ± 0.3 cm,二倍体虾的平均体长为 8.5 ± 0.4 cm,鳃弧菌感染用三倍体虾的平均体长为 8.5 ± 0.4 cm,二倍体虾的平均体长为 8.4 ± 0.5 cm。实验期间水温为 24 ± 2 °C,海水盐度为 25 ± 2 。每天上午换水1次(80%左右),早晚各投喂人工配合饲料1次,投喂量根据实际情况调整。每12尾一组分别放养于 $35 \times 45 \times 75$ cm的玻璃水族缸内,在连续充气的条件下暂养1周后开始病原感染实验。

1.2 病原感染

WSSV感染实验采用低温冰箱保存的患典型白斑病的对虾组织(取自青岛附近对虾养殖场),口服投喂的方式进行感染。将病虾组织取出解冻,剪碎后投喂实验虾。为保证每尾虾均能被感染,在实验前停食1d。实验组连续投喂病虾2d后改为人工配合饲料,对照组持续投喂人工配合饲料。二倍体和三倍体对虾均设1个对照组和2个平行感染组,每组10尾。为检验感染效果,于感染3d后进行PCR检测。

实验用鳃弧菌(*V. anguillarum*)由中科院海洋所郭振宇博士提供。于实验前一天活化菌种,在28°C培养24h,使用前用无菌对虾生理盐水洗下,配成 10^8 、 10^7 和 10^6 cells·mL⁻¹3个浓度梯度备用。采用注射的方法进行感染,二倍体和三倍体对虾均设1个对照组(注射生理盐水)和3个浓度梯度组,每个浓度梯度组均设2个平行,于对虾腹尾交接处肌肉注射菌液,注射量均为50 μL/尾,每组10尾虾。

1.3 血细胞样品的制备、计数和分类

对虾血液用事先加有固定液(10% MAS 福尔马林)的注射器从其第一腹节的腹囊处抽取。迅速混匀后,用固定液按 1:9(血液:固定液)比例稀释 10 倍,4℃保存备用。

血细胞计数采用血球计数板(XB-K-25,上海医用光学仪器长一分厂)。将上述血样装片,在显微镜(Olympus, Japan)下计数 10 个中方格的血细胞数量,每个样品计数两次,取其平均数。采用以下公式计算血细胞数量:

血细胞数/mL= 每个中方格内的平均血细胞数 $\times 25 \times 10^4 \times$ 稀释倍数

血细胞的分类计数采用中性红染色,荧光显微镜(Olympus, Japan)观察拍照。在室温条件下,将经过浓缩的血样用等量的 1% 中性红染色 15min 后装片,在 16 \times 100 倍的荧光显微镜观察拍照,每个样品计数 20 个左右的视野(细胞总数>100),分别计数 3 种类型血细胞的数目。

2 结果

2.1 病原感染实验

在投喂病虾组织 2d 后,三倍体和二倍体对虾均表现出食欲减退、空胃、运动迟缓、反应迟钝等症状。PCR 检测呈阳性,证明人工感染成功。感染后 5~7d 是其死亡高峰期,到第 8d 所有感染虾全部死亡。

三倍体和二倍体中国对虾在感染鳃弧菌后并未表现出明显发病症状,但 3d 后的病理组织观察确认已经感染。

2.2 血细胞类型和形态

中性红染色后,在荧光显微镜下,根据细胞内颗粒的有无及大小、多少,将对虾血细胞分为 3 类,即透明细胞(hyaline cell, HC)、小颗粒细胞

(small-granule cell, SGC) 和大颗粒细胞(large-granule cell, LGC)。透明细胞较小,近球形或卵圆形,核大靠近中央,具有较大的核质比,未发现有荧光颗粒存在。小颗粒细胞比透明细胞稍大,细胞核较小,清晰可见,细胞质中存在较多的小颗粒物质,荧光较强。大颗粒细胞体积较大,胞内充满荧光极强的较大颗粒物质。三倍体对虾血细胞同二倍体一样,也分为 3 种类型,但体积较二倍体的明显大,其它形态学方面未见明显差别。在感染 WSSV 的二倍体和三倍体中国对虾的大颗粒和小颗粒细胞中均发现有结构异常现象,胞质中出现空泡区或明显的细胞表面突起(图 1)。病毒感染后对虾颗粒细胞内的颗粒物质有所减少,甚至有个别细胞的颗粒物质所剩甚少。

2.3 血细胞数量

正常条件下,三倍体对虾血细胞密度明显少于同批二倍体血细胞密度。在 WSSV 实验组,对照二倍体和三倍体中国对虾的血细胞密度分别为 79.58×10^6 和 33.68×10^6 ,三倍体血细胞密度仅为二倍体的 42.32%。而在鳃弧菌实验组,对照二倍体和三倍体中国对虾的血细胞密度分别为 58.38×10^6 和 24.92×10^6 ,三倍体血细胞密度为二倍体的 42.69%。

WSSV 和鳃弧菌感染均引起对虾血细胞数量的减少,WSSV 感染对二倍体和三倍体血细胞数量的影响见图 2。投喂感染 WSSV 的病虾组织 4d 后,对虾血细胞明显减少,二倍体和三倍体血细胞各自降为对照组的 10% 左右。

鳃弧菌感染 4d 后也同样引起血细胞数量的减少,且减少幅度与注射剂量呈明显的正相关关系,即注射剂量越大,血细胞数量的减少的幅度越大(图 3)。鳃弧菌对二倍体血细胞数量的影响要大于三倍体,同剂量注射(10^8 , 50 μ L)鳃弧菌 4d

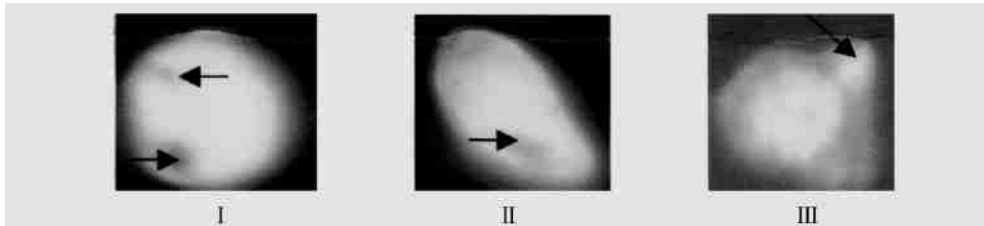


图 1 感染 WSSV 后颗粒细胞结构异常现象(iv、⊕示空泡; ⊕示细胞突起)

Fig. 1 Abnormal structure of granular cells of *F. chinensis* after WSSV infection
iv, ⊕. Vacuole; ⊕ Cellular prominence

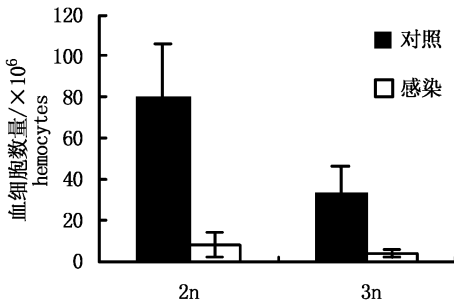


图2 WSSV 感染对二倍体和三倍体对虾血细胞数量的影响($\times 10^6$) (n= 8)

Fig.2 Effect of WSSV challenge on hemocytes mamount in diploid and triploid *F. chinensis* (n= 8)

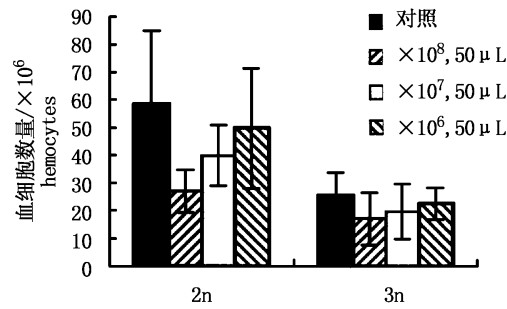


图3 不同剂量鳃弧菌感染对二倍体和三倍体对虾血细胞数量的影响($\times 10^6$) (n= 10)

Fig.3 Effect of *V. anguillarum* challenge on hemocytes amount in diploid and triploid *F. chinensis* (n= 10)

后,二倍体血细胞降为对照组的 30.1%,而三倍体降为对照组的 68.0%。利用中性红染色,荧光显微镜观察,统计了对虾血细胞的组成。其对照组和各实验组血细胞组成见表 1、表 2。

WSSV 感染对对虾颗粒细胞的组成有明显影响,大颗粒细胞明显降低,小颗粒细胞比例相应增加,而透明细胞比例变化不大。

与 WSSV 感染不同,鳃弧菌感染对对虾透明细胞的影响较大。较大剂量的鳃弧菌注射可以引起透明细胞数量减少,而小剂量的鳃弧菌注射则诱导透明细胞数量的增加。

病原感染后,三倍体中国对虾血细胞组成的变化趋势与二倍体的变化趋势基本一致。

3 讨论

3.1 多倍体动物的抗逆性

多倍体生物的抗逆能力是人们所关注的重点之一。佐藤的实验表明虹鳟♀ \times 银大马哈鱼♂获得的杂种三倍体与虹鳟相比对感染性造血组织坏死病毒(IHNV)的抵抗力增加,并对传染性胰坏死病毒(IPNV)的感受性增强^[7];Davis^[8]研究了饥饿对二倍体和三倍体太平洋牡蛎的影响,结果发现,在饥饿 129d 后,三倍体的死亡率明显高于二倍体,说明在缺少食物的情况下,三倍体的生存能力低于正常二倍体。Gaffney 和 Allen^[9]用尼尔氏

表 1 WSSV 感染对二倍体和三倍体中国对虾血细胞组成的影响

组别 groups	2n- 对照 Control for 2n	2n- 感染 Infection for 2n	3n- 对照 Control for 3n	3n- 感染 Infection for 3n
透明细胞(HC)	23.6 \pm 2.9	24.8 \pm 2.6	23.3 \pm 2.1	23.4 \pm 2.2
小颗粒细胞(SGC)	61.1 \pm 2.1	64.0 \pm 2.9	61.2 \pm 1.8	66.3 \pm 1.9
大颗粒细胞(LGC)	15.3 \pm 3.9	11.2 \pm 2.2	15.5 \pm 1.9	11.3 \pm 3.6

表 2 不同剂量的鳃弧菌感染对二倍体和三倍体对虾血细胞组成的影响

血细胞类型 type of hemocyte	透明细胞 HC	小颗粒细胞 SGC	大颗粒细胞 LGC
2n- 对照	18.3 \pm 0.8	66.4 \pm 1.5	15.3 \pm 1.7
2n- 感染 iv(10^8 , 50 μ L)	13.5 \pm 0.9	72.5 \pm 1.0	14.0 \pm 1.1
2n- 感染 ⊖ (10^7 , 50 μ L)	18.6 \pm 2.5	70.4 \pm 1.7	11.0 \pm 1.4
2n- 感染 ⊗ (10^6 , 50 μ L)	19.4 \pm 2.5	69.4 \pm 2.1	11.2 \pm 1.1
3n- 对照	15.3 \pm 1.4	72.9 \pm 1.2	11.8 \pm 1.0
3n- 感染 iv(10^8 , 50 μ L)	13.5 \pm 1.5	74.2 \pm 1.2	12.3 \pm 0.7
3n- 感染 ⊖ (10^7 , 50 μ L)	17.7 \pm 1.6	72.3 \pm 2.2	10.0 \pm 0.9
3n- 感染 ⊗ (10^6 , 50 μ L)	20.0 \pm 1.4	67.5 \pm 0.6	12.5 \pm 1.1

单孢子虫对美洲牡蛎进行了感染, 发现三倍体美洲牡蛎的抵抗力并不比二倍体的强, Meyers 等^[10]也有类似的发现。我们也曾在三倍体中国对虾野外养殖过程中, 观察到在周围虾池全部发病(WSSV)的情况下, 三倍体虾仍取得了较好的成活率。

3.2 对虾血细胞分类

在对虾抵抗外来病原体的免疫应答过程中, 血细胞参与并扮演了极其重要的角色, 是对虾机体内抵御外来病原微生物侵袭的主要“屏障”。关于对虾血细胞的分类已有较多的研究, 但是由于所用材料、方法及分类依据的不同, 目前对于对虾血细胞的分类尚无定论。Martin 等^[11]、李光友等^[12]和于建平^[13]分别根据胞内颗粒特征将加州对虾(*Penaeus californiensis*)、单肢虾(*Sicyonia ingentis*)以及中国对虾(*P. chinensis*)和日本对虾(*P. japonicus*)的血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞; 陈平等^[14]根据血细胞形态、超微结构的特点, 特别是胞质中特征性颗粒的大小和内部结构将对虾血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞和浆样细胞。叶燕玲和陈宽智^[15]对中国对虾血细胞观察发现, 与无颗粒细胞相对应的细胞中存在亚显微结构有变化的颗粒, 故将其血细胞分为 3 类, 即透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。本实验采用叶燕玲等的分类方法, 在观察过程中也发现在极少数细胞中仅有 1 个小颗粒物质的现象, 将其归入透明细胞。利用中性红染色荧光显微镜观察的方法具有比相差显微镜更为清晰明确, 比电子显微镜更为快捷方便, 费用更低的优点^[16], 具有很好的推广价值。

3.3 病原感染对对虾血细胞数量和组成的影响

甲壳动物血细胞的密度受多种因素的影响。Persson 等^[17]对淡水龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)的观察发现, 真菌 *Aphanomces astac* 的寄生将导致其单位体积内血细胞数量的减少; 于建平^[13]对日本对虾的研究表明, 养殖水温变化、养殖密度过高以及镰刀菌感染均能引起对虾血细胞数目的减少; Maeda 等^[18]发现感染对虾杆状 DNA 病毒(*penaeid rod-shaped DNA virus*)的日本对虾血细胞密度明显减少; Braak 等^[19]对斑节对虾(*P. monodon*)进行了 WSSV 感染实验也观察到对虾外周循环系统血细胞密度的明显降低。本次实验结果与此相符。在 WSSV 感染 4d 后, 中国对虾血细

胞密度明显减小, 三倍体和二倍体血细胞降为对照虾的 10.9% 和 10.1%。鳃弧菌对二倍体血细胞数量的影响要大于三倍体, 同剂量注射(10^8 cells·mL⁻¹, 50μL) 情况下二倍体血细胞降为对照的 30.14%, 而三倍体为 68.01%。被感染动物血细胞密度的降低可能与血细胞在受伤或感染部位的修复聚集以及对异物的吞噬有关^[20], 还可能与病毒诱导的自溶以及病毒增殖引起的细胞破裂有关^[21]。另外, Braak 等^[19]研究表明, 一部分血细胞离开循环系统迁移到病毒感染组织。

不同类型血细胞的功能不同。透明细胞具有吞噬活力, 可以被体外活化的酚氧化酶原系统(*prophenoloxidase system*, proPO 系统)组分激活而表现出吞噬活力^[22]。小颗粒细胞具有包裹作用, 对外源物质敏感^[23], 是对虾免疫反应的关键细胞。大颗粒细胞不具有吞噬能力^[22], 但胞内含有大量的颗粒物质及酚氧化酶原组分, 是 proPO 系统的储存所, β-1, 3-葡聚糖结合蛋白与 β-葡聚糖结合后可以引起 proPO 系统的释放、介导血细胞在病原体表面上的扩张^[24]并激活 proPO 系统的活性。

病原感染对对虾血细胞的组成有一定的影响。较大剂量的菌液注射引起透明细胞数量的降低, 提示透明细胞可能参与了对鳃弧菌的吞噬。WSSV 感染对对虾颗粒细胞的组成有明显影响, 大颗粒细胞明显减少, 小颗粒细胞比例相应增加, 而透明细胞比例变化不大, 说明在对病毒粒子的消除过程中透明细胞并不发挥主要作用。WSSV 感染引起的大小颗粒细胞内颗粒的减少、空泡区和异常突起等也表明颗粒细胞在对虾免疫应答过程中, 具有积极的免疫反应, 在病原微生物的刺激下, 颗粒细胞释放酶原物质, 激活吞噬细胞的吞噬活力。张吕平等^[25]在用对虾白斑杆状病毒(*white spot baculovirus*, WSBV)感染斑节对虾时亦发现患病对虾颗粒细胞的结构异常现象, 认为深染区为颗粒的聚集, 突起是颗粒正在释放, 而空白区则是颗粒刚刚释放后留下的痕迹。

3.4 多倍体动物的细胞体积与数目关系

Swarup^[26]认为三倍体动物细胞 DNA 含量的增加必然导致细胞核及细胞体积的增大, 但为了保持器官和动物体体积稳定, 其细胞数量将降低。本实验及以往的研究表明, 三倍体动物具有较大的血细胞体积, 但其数量相对较少^[27, 28], 这在一定程度上支持了上述观点。但在目前尚无法对某

个器官或动物体进行细胞定量的情况下,其准确性还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Xiang J H, Clark W H, Griffin F, *et al.* A study on feasibility of chromosome set manipulations in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis* [A]. Proceedings of the 1990 Intern Crustacean Conference[C]. In: Davie P J F, Quinn R H(Eds), Brisbane, Australia. Rec Q Mus, Brisbane, 1991. 277.
- [2] Xiang J H, Zhou L H, Li F H. Reproductive and genetic manipulation in the Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* (Osbeck, 1765) [A]. Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress[C]. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands, 1998. 987- 995.
- [3] Li F H, Zhou L H, Xiang J H, *et al.* Triploidy induction with heat shocks to *Penaeus chinensis* and their effects on gonad development[J]. Chin J Oceanol Limnol, 1999, 17(1): 216- 220.
- [4] Li F H, Xiang J H, Zhou L H, *et al.* Optimization of triploid induction by heat shock in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Aquac, 2003, 219: 221- 231.
- [5] Ratcliffe N A, Rowley A F, Fitzgerald S W, *et al.* Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances[J]. Int Rev Cytol, 1985, 97: 183- 350.
- [6] Zhou L H, Deng T, Zhang X J, *et al.* Detection of polyploidy in shrimp by flow cytometry[J]. Mar Sci, 1999, 2: 42- 45. [周岭华, 邓田, 张晓军, 等. 利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究[J]. 海洋科学, 1999, 2: 42- 45.]
- [7] Chang J B, Sun F X. New progress on polyploid breeding technology of fish and shellfish overseas [J]. Overseas Fisheries, 1995, 2: 1- 5. [常建波, 孙逢贤. 国外鱼类多倍体育种技术新进展[J]. 国外水产, 1995, 2: 1- 5.]
- [8] Davis J P. Physiology and energetics relating to weight loss and glycogen utilization during starvation in diploid and triploid Pacific oysters[J]. J Shellfish Res, 1988, 17(3): 549.
- [9] Gaffney P M, Allen S K Jr. Genetics of growth and survival in diploid and triploid MSX-disease resistant, susceptible, and hybrid *Crassostrea virginica* [A]. Aquaculture~ '92: growing toward the 21st century[C]. 1992. 98.
- [10] Meyers J A, Burrenson E M, Barber B J, *et al.* 1991. Susceptibility of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*, to *Perkinsus marinus* [J]. J Shellfish Res, 10(1): 304.
- [11] Martin G G, Graves B L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes[J]. J Morph, 1985, 185: 339- 348.
- [12] Li G Y, Wang Q. Studies on haemocytes and cellular immunity in *Penaeus chinensis* [J]. Oceanol et Limnol Sin, 1995, 26(6): 591- 597. [李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591- 597.]
- [13] Yu J P. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus* [J]. J Ocean Univ Qingdao, 1993, 23(1): 107- 114. [于建平. 日本对虾血细胞分类、密度及组成[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(1): 107- 114.]
- [14] Chen P, Huang H, Chi X C, *et al.* The composition and ultrastructure of haemocyte in four species of penaeid shrimps [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1998, 22(2): 158- 163. [陈平, 黄槐, 池信才, 等. 四种对虾血细胞组成及超微结构[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 158- 163.]
- [15] Ye Y L, Chen K Z. Studies on the circulating hemocytes of *Penaeus chinensis* [J]. J Ocean Univ Qingdao, 1993, 23(2): 35- 42. [叶燕玲, 陈宽智. 中国对虾血细胞超微结构、分类及计数[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 35- 42.]
- [16] Guo Z Y. Study on the antimicrobial peptide and heat shock protein in the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [D]. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, 2002. 55- 62. [郭振宇. 中国对虾免疫相关分子抗菌肽和热休克蛋白的研究[D]. 中国科学院海洋研究所, 2002. 55- 62.]
- [17] Persson M, Cerenius L, Söderhäll K. The influence of haemocytes number on the resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* [J]. J Fish Dis, 1987, 10: 471- 477.
- [18] Maeda M, Itami T, Kondo M, *et al.* Characteristics of penaeid rod shaped DNA virus of kuruma shrimp [A]. New approaches to viral disease of aquatic animals NRIA International Workshop [C]. National Research Institute of Aquaculture, Nansai, Mie, Japan, 1997. 218- 228.
- [19] van de Braak C B T, Botterblom M H, Huisman E A, *et al.* Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Org, 2002, 51(2): 149- 155.
- [20] Ratcliffe N A, Rowley A F. Role of hemocytes in defense against biological agents[A]. In: Gupta, A. P. (Ed.), Insect hemocytes-development forms, functions and techniques[M]. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, 1979. 331- 414.
- [21] Cohen J J. Apoptosis[J]. Immunol Today, 1993, 14: 123- 130.
- [22] Söderhäll K, Smith V J, Johansson M W. Exocytosis and uptake of bacterially isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular cooperation in the defence reactions of arthropods[J]. Cell Tiss Res, 1986, 245: 43- 49.
- [23] Persson M, Vey A, Söderhäll K. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish[J]. Cell Tiss Res, 1987, 247: 409- 415.
- [24] Barracco M A, Duvic B, Söderhäll K. The β 1, 3-glucan binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reached with α B43 man, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells[J]. Cell Tissue Res, 1991, 266: 491- 497.
- [25] Zhang L P, Hu C Q, Wu Z H. Blood pathological study on *Penaeus monodon* experimentally infected by WSBV [J]. Tropic Oceanology, 2000, 19(3): 1- 7. [张吕平, 胡超群, 吴灶和. 实验感染白斑杆状病毒(WSBV)的斑节对虾血液病理学研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(3): 1- 7.]
- [26] Swanup H. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* (L.) [J]. J Genet, 1959, 56: 129- 142.
- [27] Sadler J, Wells R M G, Pankhurst P M, *et al.* Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. Aquac, 2000, 184: 349- 361.
- [28] Yamamoto A, Iida T. Haematological characteristics of triploid rainbow trout [J]. Fish Pathol, 1994, 29: 239- 243.