

## 黑褐新糠虾血细胞形态及其与日本新糠虾 对溶藻弧菌敏感性的比较

赵柳兰, 杨筱珍, 范朋, 杨丽丽, 张金彪, 梁攀, 洪宇航, 成永旭\*

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,  
上海市高校水产养殖学E-研究院,上海 201306)

**摘要:** 实验采用 Giemsa 与 Wright's 两种染色方法对黑褐新糠虾血细胞进行染色,根据血细胞大小,所含颗粒与否,颗粒多少和核质比将其分型,并对各型血细胞所占比例进行统计。结果表明,通过比较 Giemsa 染色与 Wright's 染色两种方法的染色时间和效果,Wright's 染色更加适合糠虾血细胞。通过染色,将黑褐新糠虾血细胞分为3种类型,它们分别为透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞。它们的胞体大小依次增大,核质比依次降低。对此3种类型血细胞比例分别统计后发现,颗粒细胞所占比例最多约(48.38% ± 0.05%),其次是半颗粒细胞约为(35.22% ± 0.04%),最少的为透明细胞约为(16.40% ± 0.01%)。对不同浓度溶藻弧菌的感染试验发现,日本新糠虾在较短的时间内出现死亡,即48 h,而黑褐新糠虾72 h出现死亡,各浓度组中日本新糠虾死亡率均高于黑褐新糠虾。黑褐新糠虾相对日本新糠虾来说,对溶藻弧菌具有较低的敏感性,可能与其血细胞中颗粒和半颗粒比例较高有关。

**关键词:** 黑褐新糠虾; 日本新糠虾; 溶藻弧菌; 血细胞; Giemsa 染色; Wright's 染色

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

黑褐新糠虾(*Neomysis awatschensis*)和日本新糠虾(*Neomysis japonica*)均属于糠虾科(Mysidae)新糠虾属(*Neomysis*),是我国广为分布的糠虾类型。目前多见其生态学特性的研究<sup>[1-2]</sup>,而对其基础生物学的研究较少,且仅限于对其消化系统和神经系统的研究<sup>[3-4]</sup>。由于其个体小,生活史短,对外界环境较敏感等因素,其被广泛接受为环境监测生物<sup>[5-7]</sup>。本实验室以往的研究发现重金属和组织胺能影响日本新糠虾和黑褐新糠虾生长和繁殖,且两糠虾间的敏感性存在差异。经过实验室长期观察,发现黑褐新糠虾和日本新糠虾在相同的外界条件下养殖,黑褐新糠虾生长和繁殖速度均较快,并且存活率高,更易养殖<sup>[1-2,8]</sup>。同属于新糠虾类,其差异如此之大的原因,至今未有报道。存活率与免疫防御机制密切相关,因此试图从免疫的角度研究其差异根源。

已经有报道指出免疫防御系统在机体应对外界物质入侵起着非常重要的作用<sup>[9-10]</sup>,而糠虾个体较小,血淋巴难以采集,这直接制约着其免疫机制的研究,而血淋巴细胞在甲壳动物进行非特异性免疫中扮演着关键性的角色,既是细胞免疫的承担者也是体液免疫的基础<sup>[9-10]</sup>。本实验室之前已对成年日本新糠虾血细胞进行了研究,但鉴于其与黑褐新糠虾间在生长、繁殖及敏感性等诸多不同,本实验对黑褐新糠虾的血细胞形态和比例进行了研究,并比较了黑褐新糠虾与日本新糠虾对溶藻弧菌的敏感性,比较两者在抗菌能力方面的差异,拟找出糠虾类甲壳动物血相与糠虾对致病细菌敏感性的关系,为进一步研究甲壳类的免疫防御机制及抗病提供基础资料。

溶藻弧菌为革兰氏阴性菌,是海水环境中常见菌,在一定条件下对海水动物有较强的致病

收稿日期:2011-02-22 修回日期:2011-08-19

资助项目:国家自然科学基金项目(30700609);上海市重点学科建设项目(Y1101);上海高校创新团队(第二期)项目

通讯作者:成永旭,E-mail:yxcheng@shou.edu.cn

性,如养殖贝类、虾类等壳动物,养殖鱼类等均可感染该菌,能够引起动物的免疫力下降,乃至死亡<sup>[11-13]</sup>。本研究用不同染色方法对黑褐新糠虾的血细胞进行了观察,并且比较了其与美国新糠虾感染溶藻弧菌的死亡率,初步探讨其免疫方面的区别。通过比较不同染色方法对糠虾血细胞的染色效果,以期寻求适合于糠虾的染色方法与染色条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

成年黑褐和日本新糠虾(即约为新孵后30 d),体长分别为(0.65±0.03) cm和(0.70±0.02) cm,体质量分别为(3.84±0.62) mg和(4.27±0.94) mg。养殖条件控制如下:光照周期为12 h/12 h,盐度为15,pH为7.6~8.6,24 h充气泵增氧,溶解氧控制在6.0~7.0 mg/L。循环水养殖系统,换水时分别加入曝气好的相同条件的养殖用水,并每天投喂卤虫无节幼体(*Artemia nauplii*)1次。

实验用的溶藻弧菌采用细菌营养琼脂平板涂布,以菌落计数法进行浓度的测定:溶藻弧菌接种到TSB培养基中,27℃振荡(200 r/min)培养24 h,然后将细菌悬液4℃,6 000 r/min,离心30 min,弃上清液,菌体用无菌生理盐水稀释,TSA平板涂布,置于27℃恒温培养24 h,计数菌落,计算菌液浓度,然后取适量的浓度用于本实验。

### 1.2 血涂片的制备及染色

拭干虾体表,并将其置于载玻片上,滴上固定剂(1%戊二醛)和抗凝剂<sup>[14]</sup>(pH为7.0:柠檬酸钠30 mmol/L,NaCl 338 mmol/L,葡萄糖115 mmol/L,EDTA 10 mmol/L),并于解剖镜下迅速用镊子刺破心脏使血液流出,散布于载玻片上,将此载玻片放在4℃冰箱,30 min后取出,室温晾干,用Giemsa(吉姆萨)和Wright's(瑞氏)染色法染色。

Giemsa染色,Giemsa染液由5 mg吉姆萨色素加入50 mL的蒸馏水中配制而成。染色时候,先将血涂片用PBS清洗[(3~5) min×3次],然后放入染色缸染色,自来水冲洗,50%乙醇分色,镜检。

Wright's染色,取瑞士粉末0.1 g溶于50 mL纯甲醇中配制而成。染色时,先将血涂片用

PBS清洗[(3~5) min×3次],然后放入染色缸染色,50%乙醇分色,镜检。

### 1.3 各型血细胞大小的测量与计数

对20只成年黑褐新糠虾血细胞进行涂片和染色后,随机取不同视野观察,每只统计约200个细胞,计算每种类型细胞所占比例,并测量各型细胞以及细胞核长径、短径和核质比(Image-Pro Express 6.0软件)。核质比的计算公式如下:核质比=核长径/细胞长径。血细胞分型参照虾蟹类常用的分型标准<sup>[15-18]</sup>。

### 1.4 溶藻弧菌感染实验

选取健康活泼的黑褐新糠虾和日本新糠虾进行实验,实验容器为500 mL烧杯,实验用水为充分曝气过滤的、各指标相同的养殖用水,实验设水体菌悬液的终浓度为 $10^1$ , $10^3$ , $10^5$ , $10^7$  cfu/mL<sup>[19]</sup>,和对照组(不加菌悬液)共5组,每组4个平行,1个烧杯为一个平行,养殖用水400 mL/杯,密度为8尾虾/杯,每24 h观察并记录死亡率,直至96 h为止。

### 1.5 数据分析

采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计分析,采用One-Way ANOVA对实验结果进行方差分析,采用Tukey's法进行多重比较,取 $P < 0.05$ 为差异显著,在EXCEL上绘制相关图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 Wright's染色与Giemsa染色效果的比较

本实验采用Wright's与Giemsa两种染色方法对黑褐新糠虾血细胞进行染色。根据血细胞细胞大小、所含颗粒与否,颗粒多少和核质比将黑褐新糠虾的血细胞可以分为3种类型细胞,它们分别为透明细胞(hyaline cell, H)、半颗粒细胞(semigranular cell, SG)和颗粒细胞(granular cell, G)(图版)。

Wright's染色的糠虾的血细胞胞核均呈深蓝色,细胞质呈浅蓝色。其中透明细胞较其他两种细胞染色要深,细胞质中少见或者几乎不见蓝色颗粒;而颗粒细胞胞质中蓝色颗粒最多,其次是半颗粒细胞(图版-1~5)。而Giemsa染色的血细胞胞核均呈深紫红色,细胞质呈浅红色。其中透明细胞胞质中的紫红色颗粒几乎不见,而半颗粒和颗粒细胞中存在紫红色颗粒,颗粒小而密集(图版-6~13)。

对两种染色方法着染黑褐新糠虾血细胞的颜色,染色时间(包括着色时间和分色时间)和着色效果以及染液的保存进行比较发现(表1):

Wright's 染色较 Giemsa 染色更加清晰,其染色时间较短,着色程度良好,能够很好的区分3种血细胞,更加适合糠虾血细胞的染色。

表1 Giemsa 染色与 Wright's 染色效果的比较

Tab.1 The dyeing effect of Giemsa stain and Wright's stain

| 染色方法<br>staining method | 着色特点,所着颜色<br>the character of dyeing, staining color  | 染色时间<br>the dyeing time               | 着色程度<br>the degree of staining | 染色液保存<br>conservation |
|-------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Giemsa                  | 胞质为淡红色,<br>胞核为深紫红色,<br>核中可见深浅不一的紫色斑块<br>颗粒呈紫红色,分明,不清晰 | 着色时间<br>较长 15 min<br>分色时间<br>短 30 s   | 一般                             | 可长期保存                 |
| Wright's                | 胞质为淡蓝色,<br>胞核深蓝色,<br>核质染色均匀<br>颗粒呈蓝色,分明,清晰            | 着色时间<br>较短 10 min<br>分色时间<br>较长 2 min | 良好                             | 易挥发,难以保存              |

## 2.2 成年黑褐新糠虾的血细胞形态及组成

在光镜下观察两种染色方法的血细胞,结果发现,黑褐新糠虾血细胞中透明细胞多呈圆形或者椭圆形,有的会带有尾(一个或者两个)(图版-1,4~6),其胞体最小,细胞长径×细胞短径为(7.26 μm×5.93 μm),胞质中少见或者几乎不见颗粒,核为圆形,所占细胞的比例较大,核质比为(0.75±0.10);半颗粒细胞大多呈椭圆形,也有少量带单尾变形的细胞,但是未见双尾细胞

(图版-2,7,9),胞体较透明细胞大,细胞质中颗粒较多,核多为椭圆形,核质比小于透明细胞,为(0.59±0.08);颗粒细胞多呈椭圆形或者圆形,也有呈楔型,核呈椭圆形,也有核呈马蹄形(图版-3,8,10~13),胞体最大,胞质中颗粒较多,核质比最小为0.52±0.11。3种细胞类型所占比例以颗粒细胞所占比例最大,为(48.38%±0.05%),其次为半颗粒细胞,透明细胞的比例最小(表2)。

表2 成年黑褐新糠虾各型血细胞大小及比例

Tab.2 The size and ratio of different haemocytes of the adult *Neomysis awatschensis*

| 细胞类型<br>haemocytes type                     | 透明细胞<br>hyaline cells | 半颗粒细胞<br>semigranular cells | 颗粒细胞<br>granular cells |
|---|-----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 细胞长径/μm the major diameter of haemocytes    | 7.26 ± 1.46           | 7.42 ± 2.12                 | 10.33 ± 2.28           |
| 细胞短径/μm the minor diameter of haemocytes    | 5.93 ± 1.18           | 5.91 ± 1.66                 | 6.29 ± 1.23            |
| 细胞核长径/μm the long diameter of cell nucleus  | 5.22 ± 0.96           | 4.43 ± 1.44                 | 5.30 ± 1.08            |
| 细胞核短径/μm the short diameter of cell nucleus | 4.08 ± 0.68           | 3.67 ± 1.21                 | 4.01 ± 0.89            |
| 核质比 nucleus to cytoplasm(N/C)ratio          | 0.75 ± 0.10           | 0.59 ± 0.08                 | 0.52 ± 0.11            |
| 细胞比例/% the proportion of various haemocytes | 16.40 ± 0.01          | 35.22 ± 0.05                | 48.38 ± 0.05           |

## 2.3 溶藻弧菌致死率的比较

经溶藻弧菌浸泡后,日本新糠虾和黑褐新糠虾的死亡率均有随着时间的延长而上升的趋势,并且高浓度组(10<sup>7</sup> cfu/mL)的死亡率最高。

比较两种糠虾的出现死亡的时间和最终的死亡率发现,黑褐新糠虾各浓度组48 h内均未出现死亡,而日本新糠虾却在48 h出现死亡。在72和96 h,各浓度组的死亡率,日本新糠虾均高于黑褐

新糠虾,并且10<sup>3</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>7</sup> cfu/mL浓度组的两者间的死亡率存在显著性差异(P<0.05)即在72 h高浓度组(10<sup>7</sup> cfu/mL)的死亡率比黑褐新糠虾高28.13%;10<sup>5</sup> cfu/mL组比黑褐新糠虾高15.63%;而10<sup>3</sup> cfu/mL的死亡率是黑褐新糠虾的4.5倍。96 h两者的死亡率均随浓度的增加而升高,而对照组间的死亡率一直无显著性差异(图1)。

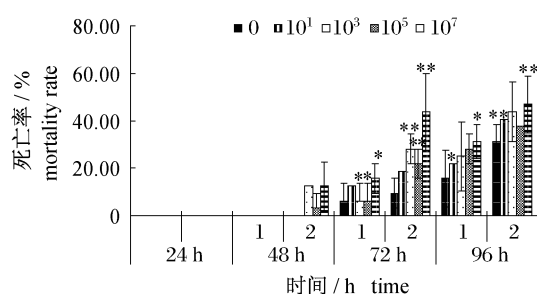


图1 不同浓度的溶藻弧菌对黑褐和日本新糠虾致死率的影响

1. 黑褐新糠虾, 2. 日本新糠虾; \* 和 \*\* 代表相同时间各浓度菌液的两新糠虾间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 1 The effect on the mortality rate of *N. awatschensis* and *N. japonica* susceptible to *V. alginolyticus*

1. *N. awatschensis*; 2. *N. japonica*; within the same time of the test in various concentration of *V. alginolyticus*, \* and \*\* indicate significantly different between the two *Neomysis* ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 血细胞染色方法的探讨

Giemsa 染色和 Wright's 染色是血细胞比较常见的两种染色方法, 影响其着色效果的因素很多, 如甲壳动物的种类、染色的时间等等<sup>[19-20]</sup>。本实验发现同种染色方法对于不同新糠虾其染色效果一致, 但有研究表明用同种 (Wright's 染色) 染色方法对河蟹与青蟹的血细胞的染色效果存在差异: 河蟹血细胞染色后的效果较好, 核、质均清晰; 青蟹血细胞则背景颜色太重, 并有深蓝色树枝状物质来干扰细胞的观察, 且核、质染色模糊不清晰<sup>[21]</sup>, 这可能与甲壳动物的种类不同有关, 本实验表明, Giemsa 染色和 Wright's 染色均可以辨别出 3 种血细胞的形态特征, 可能对糠虾类的染色更具有普遍性。

比较两种染色方法对黑褐新糠虾血细胞的染色发现, 用 Giemsa 染色方法对血细胞的胞质中颗粒的着色较浅, 不分明, 这与之前的研究结果一致<sup>[20-22]</sup>, 但是 Giemsa 却能够对细胞核很好的着色, 有的能看到细胞核内的斑块 (可能是染色质)<sup>[19-20]</sup>。而 Wright's 染色, 细胞质中颗粒比较清晰, 核也分明, 且与 Giemsa 染色相比, Wright's 染色时间较短, 染色的血细胞的细胞核与质均清晰, 各种血细胞的类型更容易区分。因此, 本研究

认为 Wright's 染色更适合糠虾类血细胞的染色。

#### 3.2 血细胞的形态及比例

目前, 有关甲壳动物血细胞的分型, 国外内分类的研究则普遍一致<sup>[18, 20-22]</sup>。多采用光镜和电镜进行观察, 以血细胞所含颗粒与否, 颗粒多少, 核质比和血细胞着色特性等将其分型的方法, 将其分为透明细胞 (无颗粒细胞)、半颗粒细胞 (小颗粒细胞)、颗粒细胞 (大颗粒细胞)<sup>[9, 14]</sup>。黑褐新糠虾采用以往日本新糠虾的血细胞的分类方法进行了分类<sup>[23]</sup>, 黑褐新糠虾的血细胞也由透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞 3 种细胞组成。黑褐新糠虾各类型血细胞在大小上与日本新糠虾存在差异, 即两种虾的颗粒细胞长径有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而透明细胞均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。其中日本新糠虾半颗粒细胞长径 ( $11.08 \pm 2.42$ )  $\mu\text{m}$ , 颗粒细胞的细胞长径 ( $13.07 \pm 2.66$ )  $\mu\text{m}$ , 分别是黑褐新糠虾的 1.49 倍和 1.27 倍, 且 3 种细胞的核质比在数值上均小于黑褐新糠虾。斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 颗粒细胞的大小为 ( $12.8 \times 11.6$ )  $\mu\text{m}$ , 半颗粒细胞大小 ( $11.0 \times 10.1$ )  $\mu\text{m}$ <sup>[20]</sup>, 克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 半颗粒细胞直径为 ( $9.50 \pm 2.08$ )  $\mu\text{m}$  颗粒细胞直径为 ( $12.25 \pm 1.38$ )  $\mu\text{m}$ <sup>[21]</sup>, 说明不同种类其细胞大小也有差异。

本研究发现两种新糠虾半颗粒和颗粒细胞形态更为多样, 常有伪足伸出, 有学者认为这样的形态可能与其免疫或抗菌能力有一定关联<sup>[24-25]</sup>。这样多样性的细胞形态在河蟹<sup>[26]</sup>和虾蛄<sup>[27]</sup>也有相似报道。本实验室研究的日本新糠虾的血细胞形态在光镜下观察其胞体和胞核均多呈圆形或椭圆形<sup>[23]</sup>, 但是黑褐新糠虾与其相比, 血细胞的形态更加多样, 并且黑褐新糠虾的血细胞存在少数的胞体超大的颗粒细胞, 核质比较小, 也出现了变形的半颗粒细胞, 有的还存在哑铃型的细胞 (图版-9, 11, 12), 至于这些细胞的形态与免疫的关系则有待于进一步的研究。

本实验在研究方法和分类依据一致的情况下, 对黑褐新糠虾和日本新糠虾的血淋巴细胞分类计数发现: 黑褐新糠虾同日本新糠虾的血细胞比例相似, 均以颗粒细胞最多, 其次是半颗粒细胞, 而透明细胞最少, 这与黑斑口虾蛄 (*Oratosquilla kempfi*)<sup>[20]</sup> 和日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)<sup>[28]</sup> 相似, 而克氏原



螯虾<sup>[22]</sup>,西部龙虾(*Panulirus cygnus*)<sup>[17]</sup>却以小颗粒细胞比例最多。斑节对虾<sup>[20]</sup>和南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)<sup>[14]</sup>常以透明细胞的比例最多,其次是半颗粒细胞,最少的为颗粒细胞,这说明血细胞比例存在种间差异。本研究比较黑褐新糠虾和日本新糠虾的同类型血细胞比例发现:透明细胞和半颗粒细胞两种血细胞比例存在显著差异。即日本新糠虾透明细胞的比例为(21.24% ± 0.05%)比黑褐新糠虾(16.40% ± 0.01%)高4.84%,而半颗粒细胞(31.23% ± 0.03%)比例却比黑褐新糠虾低4.00%,至于其比例的高低与免疫的关系,仍需要进一步的研究。

### 3.3 溶藻弧菌敏感性比较

溶藻弧菌为革兰氏阴性菌<sup>[29]</sup>是海水环境中常见菌,广泛分布于世界各地海水及河口处<sup>[30]</sup>,并且数量居海水类弧菌之首<sup>[31]</sup>,能够引起凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[32]</sup>,斑节对虾<sup>[12]</sup>等甲壳动物类的免疫力下降,致病乃至死亡。在免疫力的研究中,细菌攻毒后的死亡率常用来最终判断其免疫力的强弱<sup>[14,33-34]</sup>。本实验发现用不同浓度的溶藻弧菌浸泡日本新糠虾,48 h 就开始出现死亡,而黑褐新糠虾则 72 h 出现死亡,并且 72 h 除低浓度组外,各浓度组的死亡率均高于黑褐新糠虾,这说明日本新糠虾对溶藻弧菌更为敏感,并推测可能这种现象与两种新糠虾自身免疫力有关。甲壳动物自身免疫力的高低与各种血细胞的承担功能及所占的比例密切相关。已有研究表明,透明细胞,半颗粒细胞均具有吞噬功能,尤其是半颗粒细胞对外源物质十分敏感,在患病的虾体内染病的靶细胞周围聚集增多,在虾的免疫防御过程中担当着较为重要的角色;也有报道指出,半颗粒细胞是三种血细胞类型中吞噬活性中最强的一种<sup>[35-36]</sup>。黑褐新糠虾的半颗粒细胞的比例比日本新糠虾高4.84%,透明细胞比例低4.00%,这种血细胞比例的差异,可能是导致动物对外源物质敏感性及死亡率不同的原因之一。MIRELLA 等<sup>[37]</sup>研究牡蛎包拉米虫(*Bonamia ostreae*)感染僧帽牡蛎(*Ostrea edulis*)发现血细胞中高比例的颗粒细胞(包括颗粒和半颗粒细胞)具有更强的免疫能力,从而对牡蛎包拉米虫的敏感性降低,而凡纳滨对虾对溶藻弧菌免疫力的研究中也发现此现象<sup>[32]</sup>。这可能也暗示着颗粒细胞比例与对外源物质的敏感性有密切关系。已有研究发现,南美蓝对虾和西部龙虾抵抗弧菌感染与

颗粒细胞(包括半颗粒细胞)比例升高有关<sup>[14,17]</sup>,在其他甲壳动物中也发现该现象,如凡纳滨对虾感染白斑综合征病毒(WSSV)<sup>[38]</sup>;日本对虾(*Penaeus japonicus*)在感染镰刀菌(*Fusarium solani*)<sup>[39]</sup>;罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)注射光合细菌<sup>[40]</sup>,等等。其原因可能是颗粒细胞内含有大量酚氧化酶原,对于病毒侵袭起着重要的作用,通过增加大颗粒细胞数量比例,调节机体免疫防御能力<sup>[25,35]</sup>。而在产生酚氧化酶的过程中,peroxinectin 发挥着重要的作用,它作为一种细胞黏附分子,具有脱颗粒的作用,随着酚氧化酶系统的激活而产生生物活性。有研究证实在颗粒和半颗粒细胞中存在 peroxinectin 的 mRNA,而透明细胞中则没有,并且随着溶藻弧菌的感染,peroxinectin 的转录出现上调的趋势。这种物质(peroxinectin)在其他甲壳类,如罗氏沼虾<sup>[41]</sup>,小龙虾<sup>[42]</sup>和斑节对虾<sup>[43]</sup>等也存在类似的作用,而与日本新糠虾相比,黑褐新糠虾的颗粒和半颗粒细胞的比例高,对溶藻弧菌的感染死亡率低,是否与颗粒细胞中存在这种活性物质有关,还有待于证明。张志栋等<sup>[38]</sup>认为透明细胞可能转化成免疫功能较强的颗粒细胞,从而增强其免疫防御能力。MIRELLA 等<sup>[37]</sup>在统计牡蛎包拉米虫引起不同种类的牡蛎的累积死亡率,DHC,THC 等指标上,发现 DHC(分血细胞密度)可能更有助于反映其免疫的差异性。因此,血细胞比例可能更能够反映机体的免疫能力,且颗粒细胞(包括半颗粒)的比例是健康状况的一个重要指标<sup>[34,36,38]</sup>。因此,本实验中黑褐新糠虾具有比日本新糠虾较高的颗粒细胞比例,可能是溶藻弧菌感染死亡率低的一个的重要因素。

### 参考文献:

- [1] 郑严. 黑褐新糠虾生物学的研究 - I. 种群和生殖特点[J]. 海洋与湖沼, 1982, 13(1): 67-77.
- [2] 郑严. 黑褐新糠虾生物学的研究 - II. 生活史的研究[J]. 海洋与湖沼, 1984, 15(4): 288-298.
- [3] 吴志强, 姜国良, 项鹏. 日本新糠虾消化系统组织学研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(5): 781-784.
- [4] MOREAU X, BENZID D, DE JONG L, et al. Evidence for the presence of serotonin in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) as revealed by fluorescence immunohistochemistry [J]. Cell and Tissue Research, 2002, 310(3): 359-371.
- [5] 窦亚卿, 成永旭, 唐伯平, 等. Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 对黑褐新

- 糠虾(*Neomysis awatschensis*)的毒性作用[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(1): 33-36.
- [6] ROAST S, WIDDOWS J, JONES M. Impairment of mysid (*Neomysis integer*) swimming ability: an environmentally realistic assessment of the impact of cadmium exposure[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 52(3-4): 217-227.
- [7] GHEKIERE A, FOCKEDEY N, VERSLYCKE T, et al. Marsupial development in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) to evaluate the effects of endocrine-disrupting chemicals[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 66(1): 9-15.
- [8] 王金峰. 组织胺对黑褐新糠虾(*Neomysis awatschensis*)和日本新糠虾(*Neomysis japonica*)生长和发育影响的研究[D]. 上海海洋大学硕士论文, .
- [9] SÖDERHÅLL K, CERENIUS L. Crustacean immunity[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1992, 2: 3-23.
- [10] JIRAVANICHPAISAL P, LEE B L, SÖDERHÅLL K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization[J]. Immunobiology, 2006, 211(4): 213-236.
- [11] LIU P C, CHEN Y C, LEE K K. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Microbios, 2001, 104(408): 71-77.
- [12] SELVIN J, LIPTON A P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 57(1): 147-150.
- [13] LIU P C, LIN J Y, HSIAO P T, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cohoia *Rachycentron canadum* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(1): 23-28.
- [14] MOULLAC G L E, GROUMELLE C M L E, ANSQUER D, et al. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus tylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7(4): 227-234.
- [15] HOSE J E, MARTIN G G, NGUYEN V A, et al. Cytochemical features of shrimp hemocytes[J]. The Biological Bulletin, 1987, 173(1): 178-187.
- [16] TSING A, ARCIER J M, BREHELIN M. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 53(1): 64-77.
- [17] JAGO J, TSVETNENKO E, DUNSTAN B, et al. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus* George) under post-harvest stress[J]. Marine and Freshwater Research, 1997, 48(8): 863-868.
- [18] JOHANSSON M W, KEYSER P, SRITUNYALUCKSANA K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 45-52.
- [19] 周晖, 谢数涛, 龙思思, 等. 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)血细胞染色方法的研究[J]. 生态科学, 2003, 22(2): 130-132.
- [20] 廖永岩, 周友广, 叶富良, 等. 斑节对虾与黑斑口虾蛄血相的比较研究[J]. 中山大学学报, 2000, 39(增刊): 271-277.
- [21] 周凯, 房文红, 乔振国. 锯缘青蟹血细胞的形态及分类[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 211-216.
- [22] 陆剑锋, 万全, 吴旭干, 等. 克氏原螯虾血细胞及免疫功能的初步研究[J]. 水产学报, 2009, 33(6): 1018-1024.
- [23] 赵柳兰, 杨筱珍, 成永旭, 等. 成年日本新糠虾血细胞组成、形态及其不同发育阶段的免疫活性酶[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 108-115.
- [24] KUCHEL R P, RAFTOS D A, BIRCH D. Haemocyte morphology and function in the Akoya Pearl Oyster, *Pinctada imbricata* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 105: 36-48.
- [25] PAMPANIN D M, MARIN M G, BALLARIN L. Morphological and cytoenzymatic characterisation of haemocytes of the venus clam, *Chamelea gallina* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 49(3): 227-234.
- [26] 陆宏达, 张明辉. 中华绒螯蟹血细胞数及离体后形态学变化[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 454-462.
- [27] 杭小英, 陈惠群, 叶雪平, 等. 2种虾蛄血淋巴细胞的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2007, 26(2): 155-159.
- [28] 王国江, 张亚娟, 王军霞, 等. 白洋淀日本沼虾血细胞的初步研究[J]. 河北渔业, 2007, 8: 17-20.
- [29] HÖRMANSDORFER S, WENTGES H, NEUGEBAUR BÜCHLER K, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria [J]. International Journal Hygiene and Environmental Health, 2000, 203(2): 169-175.
- [30] KANEKO T, COLWELL R R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay [J]. Journal of

- Bacteriology,1973,113(1):24-32.
- [31] 林业杰,陈亢川,陈拱立,等. 溶藻弧菌噬菌体的分离[J]. 微生物学报,1993,33(4):285-289.
- [32] LI C C, YEH S T, CHEN J C. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress [ J ]. Fish & Shellfish Immunology,2010,28(1):121-127.
- [33] AGUIRRE GUZMÁN G, VÁZQUEZ JUÁREZ R, ASCENCIO F. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species [ J ]. Journal of Invertebrate Pathology,2001,78(4):215-219.
- [34] LIU C H, CHEN J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [ J ]. Fish & Shellfish immunology, 2004, 16 ( 3 ) : 321-334.
- [35] GIULIANINI P G, BIERTI M, LORENZON S, et al. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after *in vivo* artificial non-self challenge [ J ]. Micron, 2007,38(1):49-57.
- [36] GARGIONI R, BARRACCO M A. Hemocytes of the Palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *Macanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis* [ J ]. Journal of Morphology, 1998, 236 ( 3 ) : 209-221.
- [37] MIRELLA DA SILVA P, COMESA A P, FUENTES J, et al. Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology,2008,24(5):551-563.
- [38] 张志栋,战文斌,薛艳红,等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 感染白斑症病毒 (WSSV) 后大颗粒血细胞的变化 [ J ]. 海洋与湖沼,2005,36(1):67-71.
- [39] 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
- [40] 龙思思,谢数涛,周晖,等. 注射光合细菌后罗氏沼虾血细胞组成的变化 [ J ]. 生态科学,2003,22(2):124-126.
- [41] LIU C H, W CHENG, CHEN J C. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesized in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18:431-444.
- [42] SÖDERHÄLL K M W. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells [ J ]. Journal of Cell Biology 1988,106:1795-803.
- [43] SIRITUNYALUCKSANA K, WONGSUEBSANTATI K, SÖDERHÄLL K M W. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [ J ]. Developmental and Comparative Immunology,2001,25:353-363.

**The study on the haemocyte morphology of the adult *Neomysis awatschensis* and the different susceptibility to *Vibrio alginolyticus* compared with *Neomysis japonica***

ZHAO Liu-lan, YANG Xiao-zhen, FAN Peng, YANG Li-li,

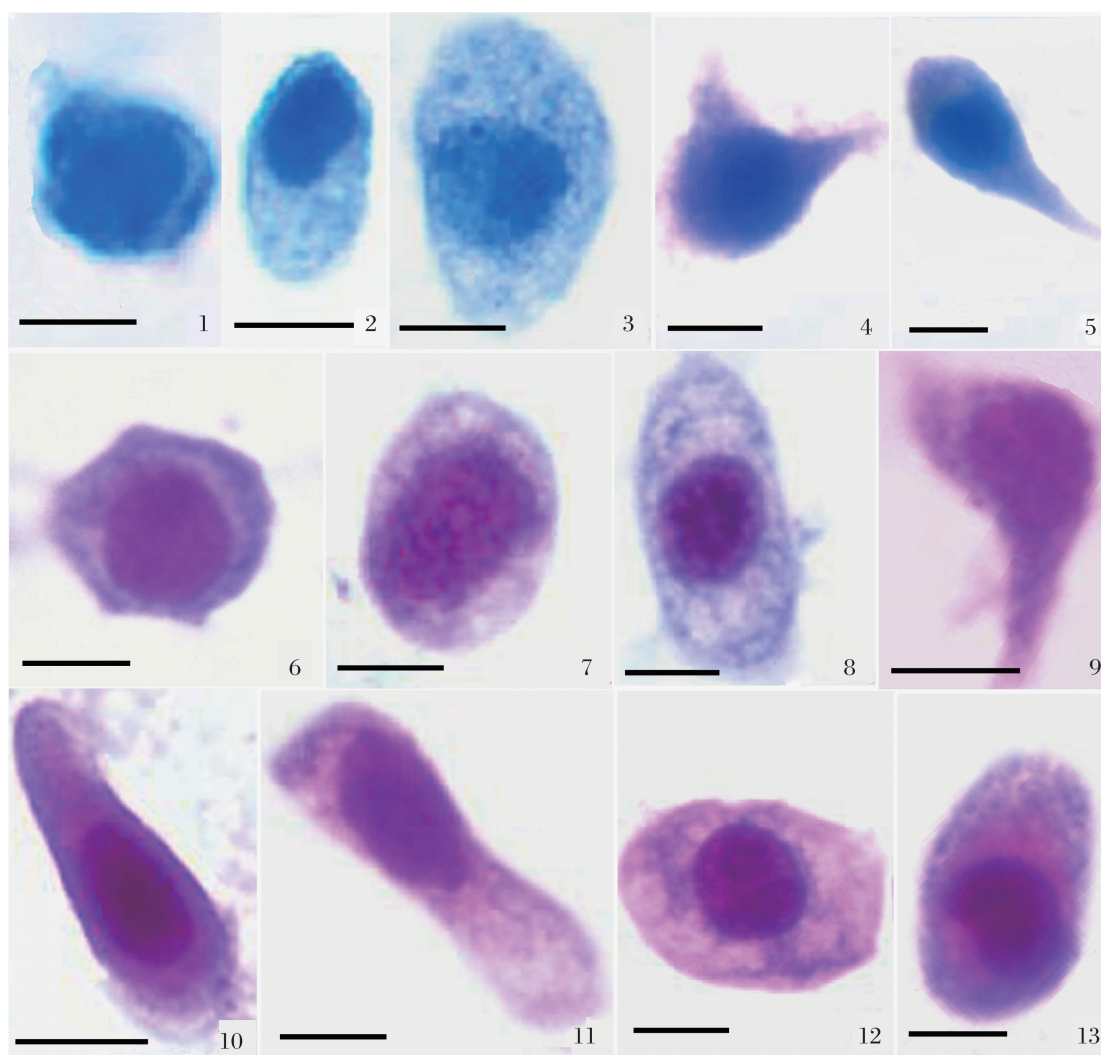
ZHANG Jin-biao, LIANG Pan, HONG Yu-hang, CHENG Yong-xu\*

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Division, Ministry of Education, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In consideration of the differences between *Neomysis awatschensis* and *Neomysis japonica* in the growth, reproduction, susceptibility and other aspects, the susceptibility of two *Neomysis* to *Vibrio alginolyticus* was studied, which could help to explore to the root of the phenomenon in immunology. Two staining methods of Giemsa and wright's were used in this experiment of the haemocytes of the adult *N. awatschensis*, and haemocytes of the mysis were classified base on the large/small size, the presence/absence of cytoplasmic granules, the number of granules, and nucleus to cytoplasm (N/C) ratio and the proportion of various haemocytes were also carried out. The results of these studies showed: three types of haemocytes were identified in *N. awatschensis*-hyaline cells, semigranular cells, granular cells, ascending in the size and declining in the N/C ratio, successively. To further check the statistics of the rate of three types haemocytes, the observations indicated that the highest rate of granular cells was about (48.38%  $\pm$  0.05%), the lowest of hyaline cells about (16.40%  $\pm$  0.01%), the moderate rate of semigranular cells about (35.22%  $\pm$  0.04%). By contrasting the dyeing time and dyeing effect of the two staining methods, Wright's staining was more appropriate for the mysis haemocytes. When exposed in aquaculture water containing various concentration of *V. alginolyticus*, *N. awatschensis* began to die at 72 h while *N. japonica* at 48 h, and had a higher death rate than that of *N. japonica* in all the concentrations. Compared with *N. japonica*, *N. awatschensis* was less susceptible to *V. alginolyticus*, and the reason of such difference could be associated with the higher ratio of granular cells (including semigranular and granular cells) in *N. awatschensis*.

**Key words:** *Neomysis awatschensis*; *Neomysis japonica*; *Vibrio alginolyticus*; haemocytes; Giemsa staining; Wright's staining

**Corresponding author:** CHENG Yong-xu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn



图版 Wright's 染色和 Giemsa 染色的黑褐新糠虾血细胞形态

1~5 为 Wright's 染色; 6~13 为 Giemsa 染色; 其中的 1, 4~6 为透明细胞; 2, 7, 9 为半颗粒细胞; 3, 8, 10~13 为颗粒细胞; 4 和 5 分别为双尾和单尾的透明细胞; 9 为变形的半颗粒细胞; 10 为楔型的颗粒细胞; 11 为哑铃形的颗粒细胞; 12 为巨大的颗粒细胞; 13 为马蹄核颗粒细胞; 比例尺都代表 5  $\mu\text{m}$ 。

**Plate The haemocytes morphology of the adult *Neomysis awatschensis* by Wright's staining and Giemsa staining**

1-5. Wright's staining; 6-13. Giemsa staining; 1, 4-6. hyaline cells; 2, 7, 9. semigranular cells; 3, 8, 10-13. granular cells; 4 and 5, hyaline cells with one or two pseudopods; 9. spreading semigranular cell; 10. wedge-shape granular cell; 11. dumbbell-shaped granular cell; 12. huge granular cell; 13. granular cell with the horseshoe nucleus; bar = 5  $\mu\text{m}$ .