

5-溴尿嘧啶处理受精卵对中国对虾抗病和生长的影响

张天时^{1,2} 赖光艳^{2,3} 孔杰² 王清印^{2*} 罗坤² 黄雪芹^{2,3}

(¹中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³上海海洋大学生命科学与技术学院, 200090)

摘 要 以 5-溴尿嘧啶(5-Bromouracil, 5-BrUra)为诱变剂, 分别以前期实验在半致死条件下获得的处理浓度、时间组合 0.5 mg/ml 9 h(0.5~9)、0.3 mg/ml 16 h(0.3~16)来处理受精卵, 培养获得诱变材料, 对处理群体抗病力和生长性状进行分析, 探讨化学诱变剂对中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 抗白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)能力和生长的影响。WSSV 攻毒实验结果表明, 0.5~9 处理组、0.3~16 处理组和对对照组存活时间分别为 77.20±3.71 h、74.57±2.88 h 和 81.45±2.98 h, 三者之间不存在显著差异, 说明在本实验条件下, 5-溴尿嘧啶处理受精卵不能显著提高中国对虾对 WSSV 的抵抗能力($P>0.05$)。生长实验结果表明, 在实验开始第 21 天至第 60 天之间, 两处理组特定生长率(SGR)显著高于对照组; 实验结束时, 经过 5-溴尿嘧啶处理的中国对虾群体的体长、体重日增长率显著高于对照组, 且两个处理组之间没有显著差异, 表明经 5-溴尿嘧啶处理可能促进中国对虾的生长。但这些生长特性能否稳定遗传给后代尚需进一步研究。

关键词 中国对虾 5-溴尿嘧啶 抗病 生长

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0037-07

Influence of 5-bromouracil treatment on disease resistance and growth performance of *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Tian-shi^{1,2} LAI Guang-yan^{2,3} KONG Jie²
WANG Qing-yin^{2*} LUO Kun² HUANG Xue-qin^{2,3}

(¹College of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, 200090)

ABSTRACT 5-Bromouracil (5-BrUra) was utilized to investigate the influence of chemical mutagen on disease resistance and growth performance of *Fenneropenaeus chinensis*. Embryos of *F. chinensis* were treated by 5-BrUra at different concentrations and time periods, including 0.5 mg/ml for 9 hours (0.5~9 group) and 0.3 mg/ml for 16 hours (0.3~16 group). After WSSV challenge test, survival time of 0.5~9 treated group, 0.3~16 treated group and the control

黄海水产研究所基本科研业务专项探索类基金项目(2008-ts-09)、国家自然科学基金项目(30871919)和国家高技术研究发展计划项目(863计划)(2006AA10A406)共同资助

* 通讯作者。E-mail: qywang@public.qd.sd.cn, Tel: (0532)85822959

收稿日期: 2008-05-15; 接受日期: 2010-02-09

作者简介: 张天时(1976-), 男, 博士, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: zhangts@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291

group were 77.20 ± 3.71 h, 74.57 ± 2.88 h and 81.45 ± 2.98 h, respectively, which showed that there were no significant difference between the treated and non-treated groups. It indicated that 5-BrUra could not significantly improve *F. chinensis* resistance to WSSV. For growth performance test, body length and body weight were obtained at every 20 days from the July 20th to the October 7th. The results showed that the Special Growth Rate (SGR) of treated groups were significantly higher than non-treated group from the 21th day to the 60th day. At the end of the experiment, the daily increments of body length and body weight of the treated groups were significantly higher than the control group, but no difference was found between groups treated with 5-BrUra, which indicated that 5-BrUra could improve the growth performance of *F. chinensis*. However, further investigation should be carried out to resolve the question that whether the high growth performance was heritable.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis* 5-Bromouracil(5-BrUra)
Disease resistance Growth

中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 养殖业是我国重要的海水养殖产业。但在过去的 10 余年里, 传染病已成为限制该产业发展的主要因素(Moss 2002)。其中, 白斑综合征(White spot syndrome, WSS)是主要病害之一, 其病原——白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)已成为对虾养殖业分布范围最广和危害最大的病原体之一(Wang *et al.* 1999)。自 WSSV 发现至今, 人们进行了大量研究企图控制该病(Huang *et al.* 2002; Tsai *et al.* 2006), 但是效果并不显著。研究发现, 病毒与宿主细胞膜间的结合是由病毒吸附蛋白与膜上受体蛋白的特异性相互作用所介导(易志刚等 2006), 作者希望通过引入诱变剂来提高基因突变的频率, 从而干扰受体蛋白基因表达来阻断病毒的吸附。

本文以核酸类似物 5-溴尿嘧啶(5-Bromouracil, 5-BrUra)作为诱变剂, 采用野生海捕亲虾受精卵作为诱变材料, 对诱变获得的材料进行抗 WSSV 能力和生长性状的检验, 探讨了 5-溴尿嘧啶对中国对虾抗病和生长的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国对虾亲虾于 2007 年 4 月 17 日捕自山东省乳山湾, 暂养于 9 m^3 的水泥池中。培育条件: 沙滤海水, 水温 $12 \sim 13 \text{ }^\circ\text{C}$; 每天投喂新鲜蛤肉或沙蚕, 按对虾体重的 $8\% \sim 10\%$ 投喂, 常规管理。

1.2 诱变材料的获取和管理

2007 年 5 月 7 日开始, 将性腺发育成熟的亲虾移入 2.8 m^3 ($2 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 1.4 \text{ m}$) 玻璃方缸中, 水温控制在 $14 \text{ }^\circ\text{C}$, 自然产卵。取同一尾亲虾原肠期受精卵为实验材料。将受精卵等量取出 3 份, 一份以 0.5 mg/ml 5-溴尿嘧啶处理 9 h (0.5~9 处理组), 一份以 0.3 mg/ml 处理 16 h (0.3~16 处理组), 另一份作为对照。处理条件 0.5 mg/ml 9 h 和 0.3 mg/ml 16 h 均根据前期摸索所得半致死条件浓度和处理时间组合并略作修正, 具体参照赖光艳等(2008)的文献。处理后分别以自然海水洗涤 3 次, 置于水温为 $16 \sim 18 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 200 L 孵化桶中孵化。孵化后, 将每个试验组的无节幼体平均分成 3 份, 于 3 个相互隔离并统一管理的 200 L 孵化桶中继续培养。

按照各期幼体的营养需求, 分别投喂叉鞭金藻 *Dicrateria* sp.、褶皱臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis*、卤虫 *Artemia* sp. 无节幼体以及人工配合饲料(大乐牌饲料, 烟台大乐饲料有限公司生产)等。每天投喂次数、投喂量以及投喂比例根据幼体不同的发育阶段进行调整。日常管理按常规方法进行。

2007 年 7 月 3 日, 对虾体长为 $3 \sim 4 \text{ cm}$ 时, 采用不同颜色组合, 将不同试验组的幼虾用 VIE (Visible Im-

plant Elastomer)进行荧光标记(Godin *et al.* 1996),标记后放回原桶培养至无个体死亡,以备病毒感染实验和生长实验使用。

1.3 病毒感染实验

从市场上购得具有明显 WSSV 症状的日本对虾 *Penaeus japonicus*,经巢式 PCR 和组织学鉴定,呈 WSSV 阳性,置于-20 ℃条件下备用。感染实验前将 WSSV 阳性日本对虾剁碎至合适大小的颗粒,制成毒饵,以备实验投喂。

7月20日将标记的处理组和对照组中国对虾混养,进行 WSSV 感染实验。实验程序如下:8月10日停止投饵,对虾全部胃空时,按照对虾总重的 10%~15%一次性投喂毒饵,1 h 后有少量残饵,说明毒饵充足,抽样检查发现每尾对虾都摄食了毒饵。从发现第 1 尾对虾死亡开始,每小时检查 1 次,从养殖池内捞出死亡或者濒死的虾,吸干体表水分,记录死虾的标记颜色、死亡时体重和取出时间,在-20 ℃冰冻保存,以备进一步分析。

日常管理:实验用海水均经过沙滤,整个实验水温控制在 22±1 ℃。感染期间每天投喂两次配合饵料,每次投喂量为实验对虾总重的 2%。实验废水全部用 10 mg/L 有效氯消毒处理后排放。

1.4 生长实验

将标记的不同处理的中国对虾按 350 尾/池混养于 3 个 40 m² 的水泥池中。每个处理设置 3 个重复。指标测量由 2007 年 7 月 20 日开始至 2007 年 10 月 7 日结束,期间每隔 20 d 测量每尾对虾的体长和体重。

1.5 统计分析

1.5.1 各试验组对虾存活时间的差异性比较

利用统计软件 SPSS 13.0 中 Kaplan-Meier 方法进行生存分析,估计各试验组存活率,绘制存活曲线。该方法属于非参数估计法(Nonparametric methods),是利用 t 时刻之前对各时间点上的生存概率(即个体在经历 t_k 个单位时间后仍存活的概率)的乘积来估计在 t 时刻的存活率,故称为累积存活率(Cumulative survival),不需要对被估计的数据分布作任何假设。用对数秩检验(Log-Rank)比较不同试验组存活时间的差异显著性。

1.5.2 各试验组对虾生长的差异性比较

以特定生长率(Special Growth Rate,SGR:%/d)来衡量各组虾的生长速度,其计算公式如下:

$$SGR=100\times(\ln W_t-\ln W_0)/t$$

式中, W_0 (g)和 W_t (g)分别为某个实验阶段的初始体重和终体重, t 为两次测量间隔时间。各个生长阶段不同试验组 SGR 的差异利用统计软件 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,SGR 进行方差分析前先经过反正弦转换,采用 LSD 方法进行多重比较。各阶段的各个试验组体长、体重差异用单因素方差分析法检验,同时采用协方差分析来估算不同养殖池可能产生的系统差异。

2 结果

2.1 各个试验组 WSSV 感染存活时间的比较

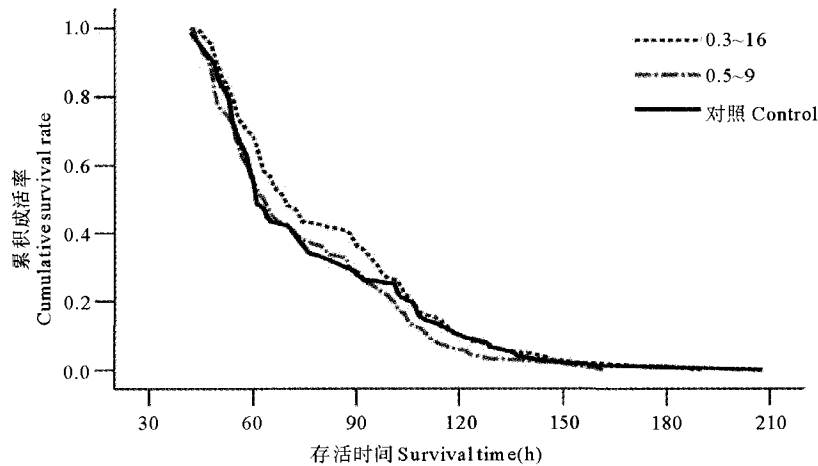
感染实验从 8 月 11 日开始到 8 月 20 日结束。实验对虾在感染 WSSV 后分别在 42 h(对照组)、43 h(0.5~9 处理组)和 45 h(0.3~16 处理组)开始出现死亡,整个实验过程持续 162 h(0.5~9 处理组)至 208 h(对照组和 0.3~16 处理组)。所有对虾从接触 WSSV 到感染死亡的平均存活时间为 77.99±1.83 h(平均值±标准误)。具体实验结果见表 1。

利用生存分析中的 Kaplan-Meier 方法对 3 个试验组的存活率进行生存估计分析,生成存活分布曲线如图 1 所示。采用对数秩检验(Log-Rank test)对 3 个试验组存活时间的差异程度进行显著性检验,其结果如表 2 所示。0.5~9 处理组、0.3~16 处理组和对照组存活时间之间不存在显著差异($P>0.05$),说明在本实验条件下,5-溴尿嘧啶的处理并不能使中国对虾对 WSSV 抵抗力显著改变。

表 1 各试验组对虾摄食毒饵后的存活时间

Table 1 Survival time of different groups after being challenged with WSSV

试验组 Group	实验动物个数 Animal number	第 1 个死亡动物存活时间 Survival time of the animal that first died(h)	最后一个死亡动物存活时间 Survival time of the animal that last died(h)	平均成活时间 Average survival time(h) (mean±S. E.)
对照组 Control group	105	42	208	77.20±3.71
0.5~9 处理组 0.5~9 treated group	105	43	162	74.57±2.88
0.3~16 处理组 0.3~16 treated group	105	45	190	81.45±2.98



注：“0.5~9”表示实验组以 0.5 mg/ml 处理 9 h；“0.3~16”表示实验组以 0.3 mg/ml 处理 16 h

Note: “0.5~9” shows treatment with the concentration of 0.5 mg/ml for 9 hours;

“0.3~16” shows treatment with the concentration of 0.5 mg/ml for 16 hours

图 1 不同时间累积存活率比较

Fig. 1 Comparison of cumulative survival rate of *F. chinensis* at different time

表 2 不同处理组对虾存活时间的比较

Table 2 Pairwise comparison of survival time between treatments

检验方法 Test method	组 Group	对照 Control		0.5~9		0.3~16	
		卡方值 χ^2 -value	显著性 Significance	卡方值 χ^2 -value	显著性 Significance	卡方值 χ^2 -value	显著性 Significance
对数秩检验 Log-Rank test	对照组 Control group	—	—	0.527	0.468	0.406	0.524
	0.5~9 处理组 0.5~9 treated group	0.527	0.468	—	—	2.884	0.089
	0.3~16 处理组 0.3~16 treated group	0.406	0.524	2.884	0.089	—	—

2.2 各试验组生长比较

以 7 月 20 日开始混养为起始时间(图 2、图 3 中坐标轴“0”点),研究 5-溴尿嘧啶处理组和对照组中国对虾体长、体重,比较其结果,如图 2、图 3 所示。从中国对虾孵化至混养时,对照组和 0.5~9 处理组体长、体重显著低于 0.3~16 处理组,而至混养后 20 d 时,两个处理组体长、体重均显著低于对照。自混养后 40 d 开始,两个处理组体长、体重显著高于对照($P < 0.05$)。

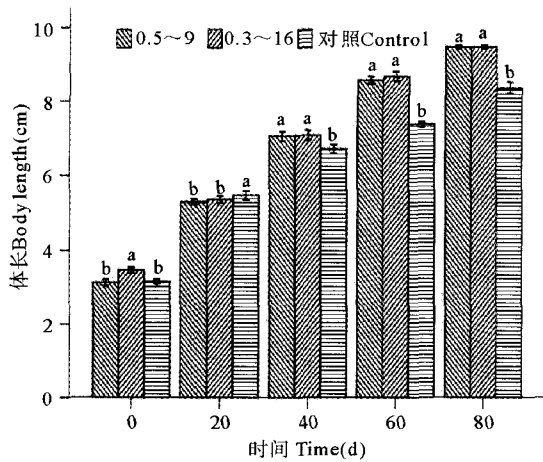


图 2 实验期间不同试验组的平均体长
Fig. 2 Mean body length of *F. chinensis* in different groups

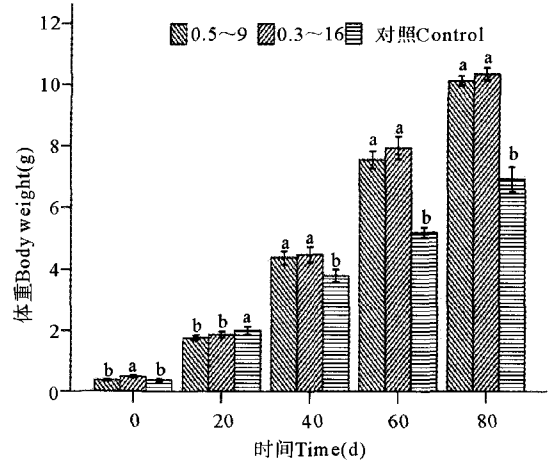
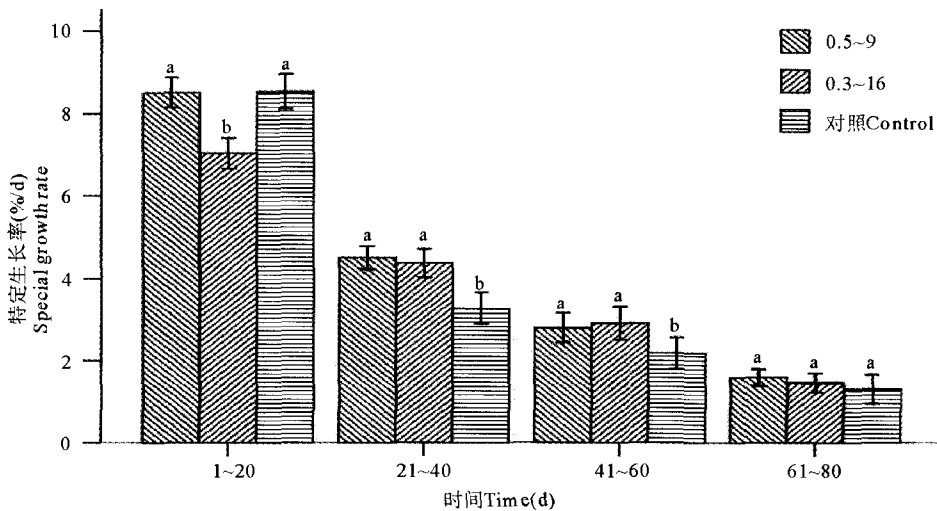


图 3 实验期间不同试验组的平均体重
Fig. 3 Mean body weight of *F. chinensis* in different groups

经 5-溴尿嘧啶处理过的中国对虾各期生长情况如图 4 所示。在混养后第 1 天开始至第 20 天, 0.3~16 处理组特定生长率(SGR)显著低于 0.5~9 处理组和对照组($P < 0.05$)。从混养第 21 天开始至混养 60 d, 0.5~9 处理组和 0.3~16 处理组之间 SGR 不存在显著差异, 而两个处理组 SGR 均显著高于对照组, 说明两个处理组生长速度显著高于对照组生长速度($P < 0.05$), 而混养 61 d 至实验结束, 处理组与对照组之间 SGR 两两差异不显著($P > 0.05$)。整个实验过程中, 两个处理组体长、体重日增长均显著高于对照组体长、体重日增长($P < 0.05$), 至实验结束时, 两个处理组体长、体重平均值均显著高于对照组($P < 0.05$) (表 3), 说明 5-溴尿嘧啶处理可能对中国对虾生长存在影响。



注:“0.5~9”表示实验组以 0.5 mg/ml 处理 9 h;“0.3~16”表示试验组以 0.3 mg/ml 处理 16 h;
竖线表示标准误;同一时间不同字母表示差异显著($P < 0.05$)
Note:“0.5~9”shows treatment with the concentration of 0.5 mg/ml for 9 hours;
“0.3~16”shows treatment with the concentration of 0.5 mg/ml for 16 hours;
Error bars denoting S. E. columns at the same time with different letters are significantly different($P < 0.05$)

图 4 实验期间不同试验组的特定生长率
Fig. 4 Special growth rate of *F. chinensis* in different groups

表3 不同处理方式下中国对虾的生长(平均值±标准误)

Table 3 Growth of *F. chinensis* under different treatments(mean±S. E.)

组 Group	初始体长 Initial length(cm)	初始体重 Initial weight(g)	终体长 Final body length(cm)	终体重 Final body weight(g)	体长日增长 Daily increment of body length(mm/d)	体重日增长 Daily increment of body weight(mg/d)
对照组 Control group	0	0	8.35±0.08 ^b	6.92±0.20 ^b	0.63±0.01 ^b	51.98±1.52 ^b
0.5~9 处理组 0.5~9 treated group	0	0	9.47±0.02 ^a	10.11±0.07 ^a	0.71±0.00 ^a	76.04±0.56 ^a
0.3~16 处理组 0.3~16 treated group	0	0	9.47±0.03 ^a	10.34±0.10 ^a	0.71±0.00 ^a	77.74±0.77 ^a

注:“初始体长”、“初始体重”为实验开始时刻的体长、体重,定义为“0”

Note:“Initial body length”and “Initial body weight”showing body length and body weight at the beginning stage of the experiment,defined as“0”

3 讨论

3.1 5-溴尿嘧啶对中国对虾抗病力的影响

外界因子是诱发 WSSV 暴发的主要因素。研究表明,一定范围的盐度变化能改变中国对虾的免疫能力和 WSSV 增殖能力,从而使 WSS 可由潜伏感染转为急性感染(Liu *et al.* 2006)。在盐度不变的情况下,温度对 WSSV 影响最大,其次是氨氮和 pH(刘昌彬等 2001)。水温升高,WSSV 在对虾体内的增殖加快,加快了 WSS 的发生(Jiravanichpaisal *et al.* 2004)。宋晓玲等(1996)在对不同温度下中国对虾感染实验中发现 17~19 °C 是对虾 WSS 发生的最低温度,认为 17 °C 是 WSS 在中国对虾体内增殖的最低温度。另外,饵料好坏直接影响中国对虾的营养水平,从而影响 WSSV 毒性实验中对虾的存活率。董世瑞等(2006)用 4 种饵料投喂感染 WSSV 对虾,发现投喂卤虫成体和鱼肉可以显著提高攻毒存活率。本实验,中国对虾均处于同一个池子中,实验过程中严格地控制水温变化,消除了环境因子造成的差异,很好地控制了外界条件的一致性,为实验结果的准确性提供了保证。

WSSV 感染实验是病毒与中国对虾机体相互作用的过程。雷质文等(2001)在不同染毒状态下对免疫指标的活性进行分析。其结果表明,不同虾池各免疫因子差异显著,发病虾池虾样各免疫指标平均值均低于其他虾池,因此 WSSV 感染对中国对虾机体产生了影响。而在本实验初期,存活率为 100% 时,说明病毒对对虾的作用还没达到致死程度,随着实验时间的延长,中国对虾因感染的 WSSV 病毒在体内大量增值而逐渐死亡。因此,各时间点的样本总体存活率一方面反应了 WSSV 对中国对虾的作用程度,另一方面也体现了本时间点中国对虾对 WSSV 的抵抗能力。本实验利用 Kaplan-Meier 方法对各个时间点存活率进行分析,并采用对数秩检验(Log-Rank test)对不同试验组存活时间进行差异性检验。结果显示,处理组 0.5~9、0.3~16、对照组 WSSV 感染平均存活时间分别为 77.20±3.71 h、74.57±2.88 h 和 81.45±2.98 h,三者之间差异不显著($P > 0.05$),表明在本实验条件下,5-溴尿嘧啶并不能显著影响中国对虾对 WSSV 的抵抗力。

3.2 5-溴尿嘧啶对中国对虾生长的影响

利用化学诱变剂处理中国对虾受精卵,诱变后生长性状能否显著提高也是我们一直致力探索的问题。国外曾于 20 世纪 60 年代对鲤鱼精子进行化学诱变处理(Kirpichnikov *et al.* 1981),发现利用化学诱变剂处理鲤鱼精子,可使当年鲤的生长速度显著提高,其中以半致死浓度处理效果最佳,诱变效果最好,其生长速度可比对照快一倍(Tzoy *et al.* 1973)。本实验利用 5-溴尿嘧啶为诱变剂,以前期研究获得的两个半致死剂量与时间处理中国对虾受精卵,得到中国对虾诱变群体。对其生长性状的研究发现,处理组中国对虾体长、体重日增长显著高于对照,结果与前人相似。刘世英(1988)认为,生长速度加快可能是由某些非遗传因子(如竞争食物能力的提高)引起的,也有可能诱变剂提高了某些不可遗传的生长变异的概率。因此,5-溴尿嘧啶能促进当代中国对虾生长,但在后代中是否仍具有促进生长的效果还尚未可知。

4 小结

本实验利用核酸类似物 5-溴尿嘧啶对中国对虾进行了诱变处理,初步探讨了该诱变剂对中国对虾抗病能力和生长性能的影响,为下一步的诱变选育提供了基础资料和数据。5-溴尿嘧啶处理是否产生突变以及该诱变剂对中国对虾后代的影响还有待进一步研究,利用诱变进行中国对虾选育还需要进一步的细化完善。

参 考 文 献

- 刘世英. 1988. 鱼类化学诱变的研究. 水产学报, 12(1): 81~86
- 刘昌彬, 王金星, 刘存仁, 吴中华, 陈忠科, 张红卫. 2001. 非生物环境因子对用暴发性流行病原实际感染的中国对虾发病的影响. 水产学报, 25(1): 58~63
- 宋晓玲, 黄 健, 王崇明, 于 佳, 陈碧鹃, 杨丛海. 1996. 皮下及造血组织坏死杆状病毒对中国对虾亲虾的人工感染. 水产学报, 20(4): 374~378
- 易志刚, 黄 健, 解飞霞, 贾佩侨, 李 筠. 2006. 对虾白斑综合征病毒与虾鳃细胞膜特异性结合关系的确立. 中国病毒学, 18(3): 295~297
- 董世瑞, 高 焕, 孔 杰, 王如才. 2006. 不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响. 中国水产科学, 13(1): 52~58
- 赖光艳, 孔 杰, 王清印, 张天时, 罗 坤. 2008. 5-溴尿嘧啶对中国明对虾受精卵的处理条件. 中国水产科学, 15(5): 680~685
- 雷质文, 黄 健, 杨 冰, 俞开康. 2001. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学, 8(4): 46~51
- Huang, C., Zhang, X., Lin, Q., Xu, X., Hu, Z., and Hew, C. 2002. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. Mol. Cell. Proteomics, 1: 223~231
- Godin, D. M., Carr, W. H., Hagino, G., Segura, F., Sweeney, J. N., and Blankenship, L. 1996. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 139: 243~248
- Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, K., and Söderhäll, I. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus(WSSV) in freshwater crayfish. Fish & Shellfish Immunol. 17: 265~275
- Kirpichnikov, V. S. 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 18-19: 302~303
- Liu, B., Yu, Z. M., Song, X. X., Guan, Y. Q., Jian, X. F., and He, J. G. 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome(WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 253: 163~170
- Moss, S. M. 2002. Marine shrimp farming in the western hemisphere: past problems, present solutions, and future visions. Reviews in Fisheries Science, 10(3-4): 601~602
- Wang, Q., White, B. L., Redman, R. M., and Lightner, D. V. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Fa fan te penaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. Aquaculture, 170: 179~194
- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Wang, A. H., Zhuang, Y., Walker, P. J., Kou, G. H., and Lo, C. F. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. J. Virol. 80(6): 3 021~3 029
- Tzoy, R. M., Golodov, Y. F., and Menshova, A. I. 1973. Influence of chemical mutagens on variability of morphological and physiological traits in carp (*Cyprinus carpio* L.). In: Biochem. Genet. Fish. Inst. Cytol. Acad. Sci. USSR, Leningrad, 97~103