

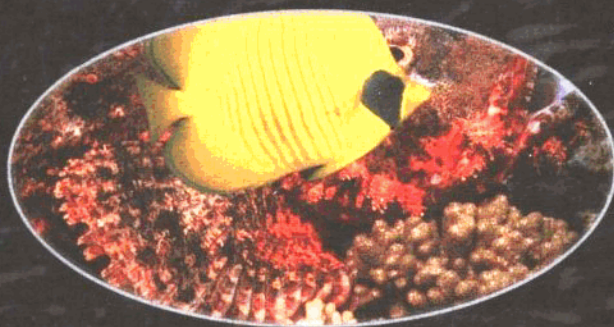
国家攀登计划B类项目

海水增养殖生物优良种质
和抗病力的基础研究

⑥

海水养殖动物的免疫、 细胞培养 and 病害研究

主编 管华诗



山东科学技术出版社

山东省泰山科技专著出版基金会

名誉会长 赵志浩 宋木文 陆懋曾 伍 杰

卢鸣谷 董凤基 宋法棠

会 长 陈光林 石洪印

副 会 长 宋桂植 何宗贵 吕可英 车吉心

孙肇琨 王为珍 (常务副会长)

秘 书 长 王为珍 (兼)

副秘书长 尹兆长

理 事 (以姓氏笔画为序)

王为珍 王凤起 尹兆长 刘韶明

李道生 李德泉 张传礼 陈 刚

蒋玉凤

评审委员会 (以姓氏笔画为序)

王思敬 卢良恕 师昌绪 吴阶平

杨 乐 何祚庥 汪成为 高景德

唐敖庆 蔡景峰 戴念慈

山东省泰山科技专著出版基金会
赞助单位

山东省财政厅
山东省出版总社
山东省科学技术委员会
山东科学技术出版社
山东泰山酿酒饮料集团总公司
 董事长兼总经理 张传礼
山东金泰集团股份有限公司
 董事长兼总裁 刘黎明

国家攀登计划 B 类项目

海水增养殖生物优良种质和抗病力的基础研究

总主编 曾呈奎

总编委 (以姓氏笔画为序)

尤芳湖 何宗贵 李永祺 吴宝铃 张培军
杨丛海 相建海 曾呈奎 董昭和 管华诗

海水养殖动物的免疫、细胞培养和病毒研究

主 编 管华诗

副主编 童裳亮 王文兴 孔 杰

编 委 管华诗 童裳亮 王文兴 孔 杰 李光友
江晓路 王 雷 薛清刚

我们的希望

进行现代化建设必须依靠科学技术。作为科学技术载体的专著，正肩负着这一伟大的历史使命。科技专著面向社会，广泛传播科学技术知识，培养专业人才，推动科学技术进步，对促进我国现代化建设具有重大意义。它所产生的巨大社会效益和潜在的经济效益是难以估量的。

基于这种使命感，自 1988 年起，山东科学技术出版社设“泰山科技专著出版基金”，成立科技专著评审委员会，在国内广泛征求科技专著，每年补贴出版一批经评选的科技著作。这一创举已在社会上引起了很大反响。

1992 年，在山东省委、省政府的支持下，在原“泰山科技专著出版基金”的基础上，由山东省出版总社、山东省科学技术委员会和山东科学技术出版社共同成立了“山东省泰山科技专著出版基金会”，并得到企业界的热情赞助，为资助学术专著的出版提供了更加可靠的保证。

但是，设基金补助科技专著出版毕竟是一件新生事物，也是出版事业的一项改革。它不仅需要在实践中不断总结经验，逐步予以完善；同时也更需要社会上有关方面的大力扶植，以及学术界和广大读者的热情支持。

我们希望，通过这一工作，高水平的科技专著能够及早问世，充分显示它们的价值，发挥科学技术作为生产力的作用，不断推动社会主义现代化建设的发展。愿基金会支持出版的著作如泰山一样，耸立于当代学术之林。

泰山科技专著评审委员会

1992 年 12 月

序

1998年,我国海水养殖生产的总产量已达到860万t,继续居世界各国之首。我为我国海水养殖业已取得的成就感到由衷的高兴。因为这不仅对于振兴沿海地区的经济具有十分重要的意义,而且也向世界表明,中国人民在中国共产党的正确领导下,不仅能养活自己,能吃饱,还能吃好!

但在成绩的面前,作为一名老海洋生物科学工作者,我仍感到不满足。因为海水养殖的产量仍未赶上我国淡水养殖,尚落后几百万t。我国有300多万km²的海域,面积比淡水水面大得多;海水养殖每年有望生产出二三十万t的鱼、虾、贝和藻,为人民提供更多质优、味鲜的食品。问题在于在较长时间内,我们对海洋经济动植物的基础研究跟不上生产发展的需要。1993年我国人工养殖对虾大面积死亡,造成重大经济损失。生产上的问题,实际上是技术上的问题,说到底还是基础理论与产业发展不相适应的问题。这再次提醒我们,如不加大基础研究的力度,我国海水养殖业就难以持续、健康地发展。国家科委关注国民经济建设中面临的亟待解决的重大科学问题,1994年经论证正式批准山东省科委组织申报的“海水增养殖生物优良种质和抗病力的基础研究”项目,将其列入国家攀登计划B类项目予以支持,委托山东省科委组织管理,这表明国家对发展海水增养殖业的高度重视。

依据国家科委《国家基础研究重大关键项目管理暂行办法》确定的课题组织原则,从发展我国海洋农牧化的根本需要和长远利益出发,针对我国海水增养殖业存在的突出薄弱环节,围绕种质、病害和生态环境中心问题,设立了7个课题:海水鱼类繁殖、发育和养殖生物学的研究,对虾繁殖和发育生物学的研究,贝类繁殖、变态及附着的有关生物学研究,经济海藻种质种苗生物学研究,增养殖动物的种群和细胞遗传学研究,养殖虾、贝致病机理和病害防治研究,增养殖生态环境的保护与改善研究等。在每个课题下各设立3个专题。组织中国科学院海洋研究所、青岛海洋大学、中国水产科学院黄海水产研究所、国家海洋局第一海洋研究所等4个中央驻鲁单位的优势力量联合开展研究。

5年来,由于各单位领导的大力支持,全体研究人员按照既定目标和计划,齐心协力,力争有所发现,有所创新,因而取得了一批在国际上达到领先或先进水平的研究成果,培养了一批中青年学术带头人,积累了项目管理的丰富经验。研究成果突出表现在以下几个方面:

1. 查明了黑鲷、牙鲆、欧氏六线鱼等鱼类性腺发育过程的形态变化,发现了促进牙鲆性腺发育和成熟的理化因子,以及诱导黑鲷提前性转换的试剂;摸清了盐度、光照、温度和 pH 值等环境因子对真鲷、牙鲆胚胎发育的影响,提出了 Ca^{2+} 在牙鲆精子活动中的作用新假说;通过对鱼胚胎不同发育时期蛋白质成分和含量变化的分析,表明核基因活动的启动以原肠作用开始,新的蛋白质开始合成并进而参加细胞分化过程;查明了真鲷和牙鲆的仔、稚、幼鱼的能量代谢基本特征,掌握了在苗种培育过程中对饲料、温度、促生长剂、密度等的基本要求,为鱼类苗种培育提供了科学的依据。

2. 测定类固醇激素、甲基法泥酯等在对虾组织中的分布及变化,查明了几种常用激素对性腺发育的影响,填补了国内对虾内分泌研究的空白;首次对中国对虾促雄线进行了外部形态和内部结构的研究,表明它对中国对虾雄性外部特征的发育起着重要作用;对中国对虾产卵行为进行了详细观察,发现亲虾心率变化可以准确预报对虾产卵的时间;仔细地观察了对虾精子入卵前的形态变化及胚胎发育全过程,并进行了录像,对胚胎发育的形态学和细胞化学进行了详细观察分析,首次观察到中肠管的形成和胚孔的变化;详细地测定了对虾幼体发育不同阶段对蛋白质、脂肪酸、磷、维生素等的需求,为对虾育苗生产提供了科学依据。

3. 测定了海湾扇贝性腺发育在青岛地区的生物学零度和产卵的有效积温,详细地观察了多种贝类精子和卵子的超微结构,初步建立了鲍的卵黄膜分析模型,研制了贝类卵子去膜剂,为贝类遗传育种提供了关键技术。对从国外引进的墨西哥湾扇贝的发育生物学、生态学进行了全面研究,并将所得结果成功地用于指导广西、海南的该种贝的工厂化育苗生产;成功地得到了泥蚶和毛蚶的杂交稚贝,将泥蚶发育生物学研究成果运用于山东胶南市泥蚶苗种生产,培育出了数千万稚贝;皱纹盘鲍幼虫附着、变态诱导剂的研究,填补了国内的空白。

4. 在国际上首次建立了海带遗传转化模式,并在实验室成功培育出转(蛋白)基因海带,申请了国家发明专利,并在此基础上,进一步优化了海带遗传转化模型中的基因枪转化参数,克隆藻类病毒启动子,构建藻类自身载体,获得海上养成转 CATHB₃ 基因(乙肝病毒表面抗原基因)孤雌海带,DNA 与蛋白质检测显示外源基因得到整合与表达;利用单克隆技术选育出 2 个优良的裙带菜品系,在山东荣成市海带育苗场进行中试,培育出了 300 个健壮的苗帘,约可供 13hm^2 海面养殖用;建成了紫菜细胞种质库,收集、分离和保存的紫菜丝状体细胞品系有 20 种、120 个品系。1998 年紫菜良种导入生产 400hm^2 ,取得了明显的增产效果,并申请了 3 项国家专利;开展了龙须

菜分子遗传学研究,通过诱变得到了青岛产龙须菜 8 株色素突变体,并运用现代分子生物学技术探讨了龙须菜和江蓠的系统发生。

5. 查清了 41 种海洋经济动物的染色体和核型,发现斑头鱼有性染色体,纠正了国外学者对鹰爪虾的染色体和核型观察的错误;利用细胞流式计等技术对对虾染色体的倍性进行检测,为海洋生物 863 重大项目多倍体育种育苗的立项和顺利实施奠定了基础;鱼类生化遗传研究已达到国际同类研究水平,在同工酶、核 DNA 不同水平上,确立了适合我国国情的检测遗传差异的技术体系,为尽早建立我国海洋动物种质资源的背景开了好头;首次采用 RAPD 等新技术,对引进扇贝和对虾放流增殖的遗传后效进行了评估,找出了区分某些鱼类的分子标记;与上海生物化学研究所合作,开始对中国对虾、中华绒螯虾 DNA 测序,初步获得了转基因的中国对虾幼体。

6. 查明了造成我国对虾暴发性流行病的病原体是“对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒 (HHNBV)”,并用人工培养的对虾细胞分离和体外繁殖该病毒获得成功,研制的对虾细胞专用培养基解决了对虾病毒学研究的关键技术问题;对胶东半岛发病的扇贝、鲍进行了大量调查,首次发现、分离了衣原体样生物、原核生物以及几种新的病毒,并对衣原体样生物对栉孔扇贝的致病过程进行了观察和分析;同时对对虾、扇贝、鲍的免疫机能和抗病力开展了深入研究,研制出增强虾、贝免疫机能的饵料和药物。

7. 建立了几种有毒赤潮生物的室内培养、分子生物学测定和赤潮毒素的分析测定技术,对主要有毒赤潮生物与水体富营养化的关系研究取得了突破性进展,开拓了海洋细菌与赤潮藻类相互作用的研究新领域;实验结果表明,有机污染和氨氮增加了对虾对病原体的易感性,也能激活虾体内潜伏的病原体,诱发病害发生,并对其机理进行了探讨,提出了改善环境的生物措施;比较了藻、贝、虾和鱼对有机磷农药的敏感性差异,首次用自由基学说探讨了有机磷农药对海洋生物伤害的机理,发现对虾幼体对某些农药的抗性大于成体,并全面、系统地观察了久效磷农药对对虾各组织细胞超微结构的影响;基本摸清了虾病暴发前后虾池生态系基本要素的变动规律,在能流和物流分析的基础上建立了虾池生态系统框图和数模;对对虾封闭式综合养殖的种类结构优化、生物能量学、氮和磷的利用率等进行了深入研究,提出了最佳综合养殖模式,初步建立了各结构优化系统的能流分析数模。

上述研究成果已陆续撰写成几百篇论文在学术会议上交流、在国内外学术刊物上发表,并得到了好评,不仅对我国当前海水增养殖生产起了指导作用,为我国海洋 863、海洋生物技术的立项和实施奠定了基础,而且扩大了在国际学术界的影响。为满足沿海有关部门生产、科研和教学人员的需要,

我们决定按课题的研究成果编写出版系列专著共 7 卷。

尽管我们取得了上述研究成果，但由于海洋增养殖生物的多样性、海洋生态系统的复杂性、海洋环境的多变性，已取得的成绩还仅仅只能说是好的开头，生产中已有的问题我们还未完全了解，新的问题也将不断出现。可喜的是国家和各级领导已给予了高度的关注，而且通过本项目的实施，一大批中青年科研人员已成长为学术带头人、骨干。

非常感谢国家科技部、山东省科委、各承担单位领导和所有研究人员；感谢李永祺、相建海同志和项目专家委员会、项目办公室全体同志；特别要感谢山东科学技术出版社为保证系列专著出版质量所付出的辛勤劳动！

项目首席科学家

曾呈奎

1999 年 8 月于青岛

前 言

我国是海水养殖起步最早、发展最快的国家之一。到 1991 年,我国海水养殖总产量达 180 万 t,占全国渔业总产量的 13.64%,居世界第一。其中,对虾的养殖总产量突破 20 万 t,贝类总产量高达 120 万 t。海水鱼的养殖业虽然起步较晚,但发展较快。

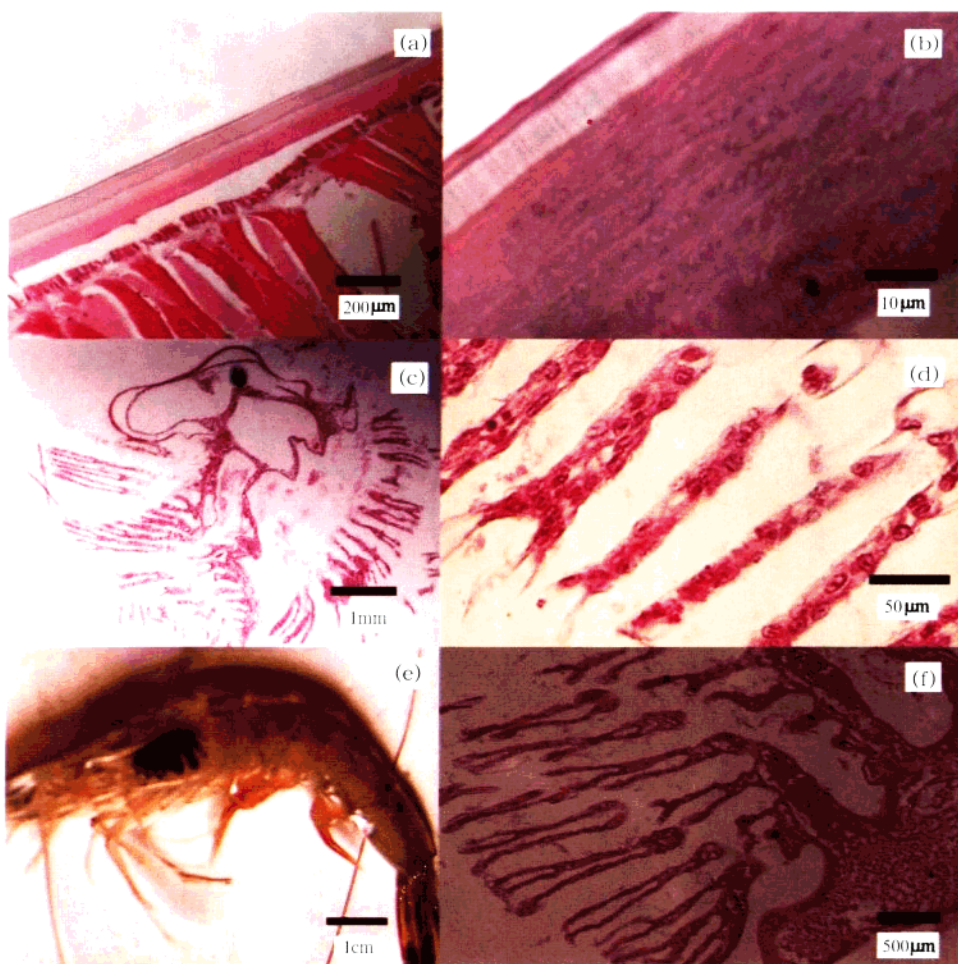
自 1993 年起,养殖对虾的传染病在我国沿海蔓延,造成大批对虾死亡,给对虾养殖业带来巨大损失。不久,养殖扇贝又出现种质退化、疾病肆虐的局面,整个海水养殖业面临严重的考验。在此紧急关头,国家科委及时组织科技人员攻关,开展了“海水增养殖生物优良种质和抗病力的基础研究”,并把此项研究列入国家攀登计划 B 类项目。本书是 5 年来在海水养殖动物免疫学、细胞培养技术和病害学的研究总结,同时也介绍了国内外在这方面的研究进展。

全书共分 8 章,可分为三大部分。第一部分(第一、二章)主要介绍对虾和贝类免疫系统的组成、免疫机理以及增强虾、贝免疫力的方法。第二部分(第三章)介绍海水鱼、虾、贝的细胞培养方法与应用。第三部分,从第四章至第八章介绍对虾和贝类的各种疾病,包括疾病的病因、诊断方法与防治技术。

本书可供从事海水养殖研究的科技人员、大专院校相关专业的师生阅读参考。书中有不当之处望读者批评指正。

作 者

1999 年 8 月



图版 1 中国对虾甲壳结构和鳃结构

(a)中国对虾头胸甲甲壳横切的显微结构

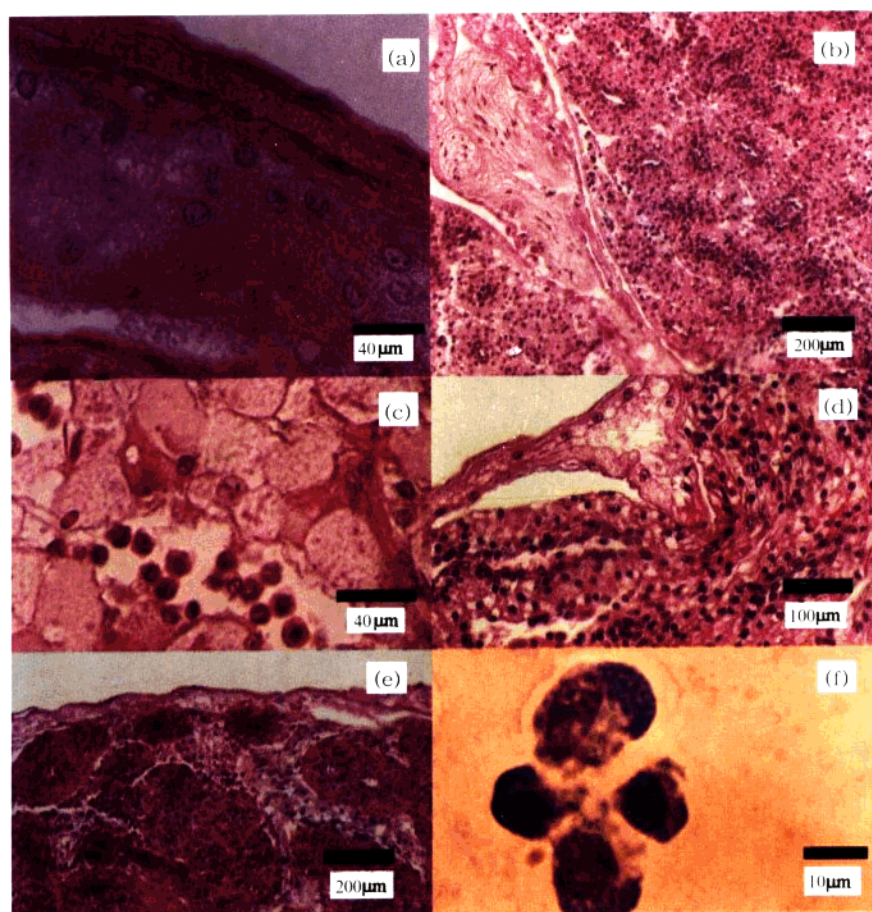
(b)中国对虾甲壳层横切面的显微结构

(c)中国对虾枝鳃横切面的显微结构

(d)中国对虾鳃丝纵切显微结构

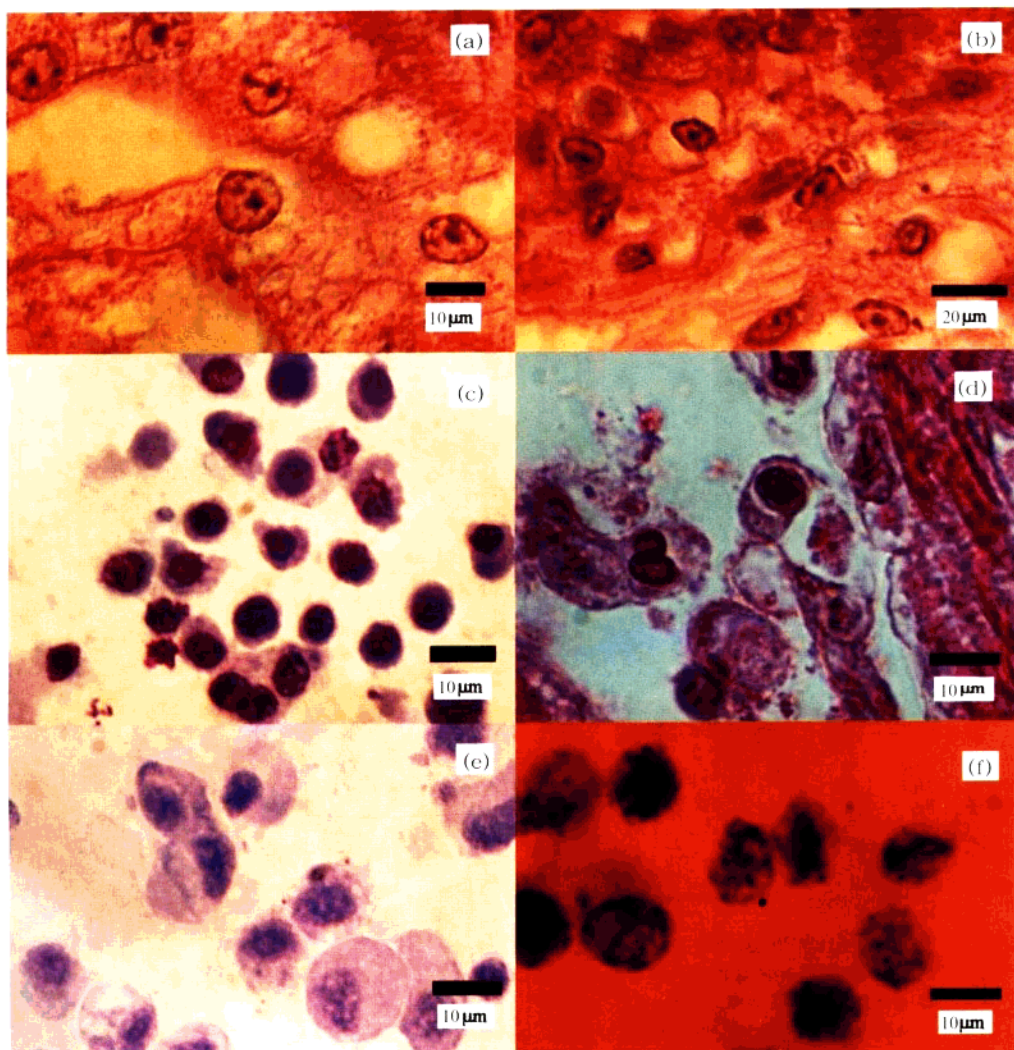
(e)显示中国对虾鳃滤过碳素颗粒

(f)中国对虾二级鳃丝结构及滤过四联球菌的鳃血窦(显微照片)



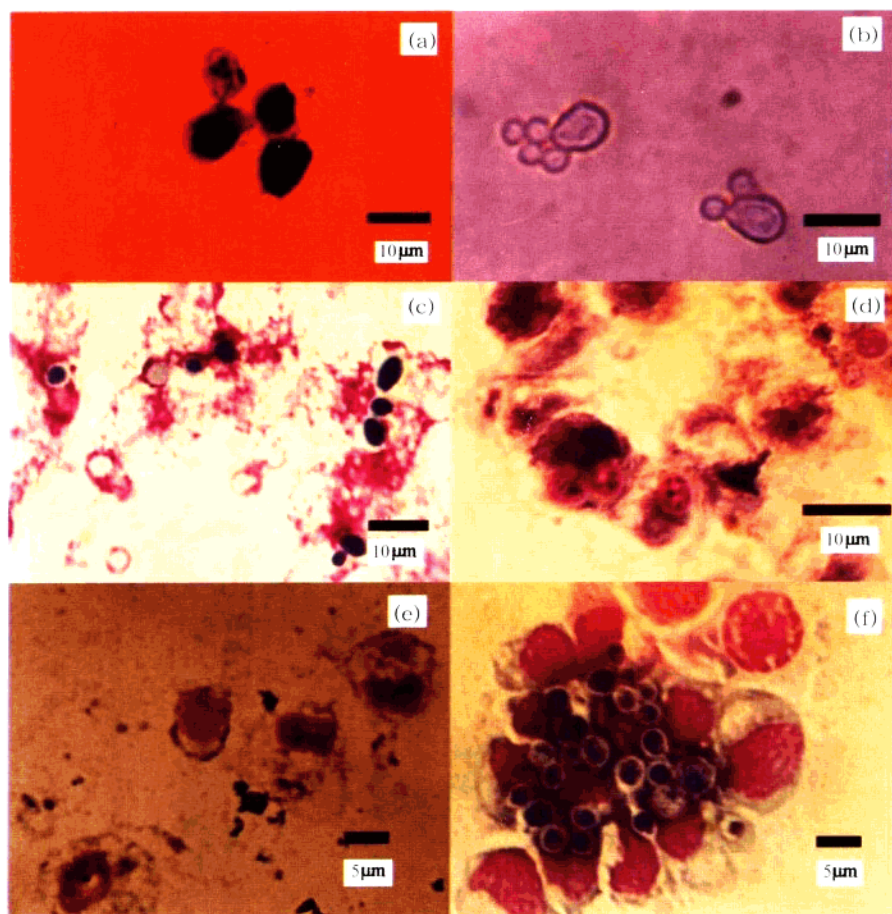
图版 2 中国对虾淋巴器官的组织 and 细胞 (显微照片)

- (a) 淋巴器官的输入淋巴管, 示周细胞及膜下血管
- (b) 淋巴器官的实质部分切片及连接肝胰腺的输出淋巴管
- (c) 充填小管间的血管
- (d) 淋巴器官的实质及深入到实质中的小梁
- (e) 淋巴器官的被膜和实质中的小管
- (f) 正在分裂的淋巴细胞



图版 3 中国对虾血淋巴细胞染色的显微照片

- (a) 毛细血管中循环的血细胞
- (b) 血窦中的血细胞
- (c) 心脏血细胞常规染色
- (d) 心脏组织经 HE 染色显示的血细胞
- (e) 吉姆萨染色的血细胞
- (f) 吞噬碳素颗粒的心脏血细胞



图版 4 中国对虾血细胞及吞噬作用（显微照片）

(a)中国对虾体内吞噬中的吸附作用（Giemsa 染色）

(b)血淋巴流中的血细胞吸附作用

(c)吸附前血清中糖蛋白对异物的识别，示白色念珠菌被糖蛋白包裹

(d)血细胞吞入白色念珠菌

(e)血细胞吞噬 TTC

(f)淋巴细胞吞噬白色念珠菌



管华诗 1939年8月生，山东夏津人，长期从事海洋生物资源的综合开发利用及海洋药物与食品工程的教学和科研工作，先后研制发明了具有国际先进水平的海洋新药藻酸双酯钠(PSS)、甘糖酯、保肝抗癌的海力特、降糖宁和海洋保健系列食品；获国内外发明专利10项，获国家级及省部级科技进步奖7项；建立了我国唯一的海洋药物化学专业，从而形成了本科、硕士、博士高层次人才培养和研究开发体系；为海洋生物资源综合开发及中国海洋制药业雏形的形成奠定了基础。

1991年获全国“五一”劳动奖章和政府特殊津贴；1992年获山东省委、省政府重奖，并获美国世界成就奖；1995年获全国先进工作者称号，并被评为中国工程院院士。现任山东省政协副主席，山东省科协主席，第九届全国人大代表，青岛海洋大学党委书记、校长。

目 录

第一章 对虾的免疫系统及免疫机理	1
第一节 对虾的免疫系统	1
第二节 对虾的免疫机理	5
第三节 对虾免疫系统及免疫机理的研究方法	21
第二章 贝类的免疫系统及免疫机理	32
第一节 鲍鱼免疫性的研究	32
第二节 扇贝免疫性的研究	37
第三节 提高贝类抗病力的初步研究	41
第三章 鱼、虾、贝的细胞培养与应用	44
第一节 概论	44
第二节 海水鱼的细胞培养	51
第三节 对虾的细胞培养	64
第四节 贝类的细胞培养	76
第四章 对虾病毒性疾病	81
第一节 对虾病毒性疾病的种类与危害	81
第二节 对虾病毒的分离与纯化	86
第三节 对虾病毒病的诊断与检测	88
第五章 对虾的细菌性疾病和其他疾病	92
第一节 细菌性疾病	92
第二节 真菌性疾病	100
第三节 原虫性疾病	102
第四节 营养、环境与中毒性对虾疾病	107
第六章 海水养殖贝类疾病的研究现状	114
第一节 疾病流行对世界贝类养殖业的冲击	114
第二节 病原体作用的基本机制	116
第三节 影响贝类疾病发生的因素	118
第七章 贝类的病毒性疾病	122
第一节 概论	122
第二节 葡萄牙牡蛎的虹彩病毒感染	124
第三节 牡蛎面盘病毒病	126
第四节 太平洋牡蛎的疱疹病毒感染	127
第五节 皱纹盘鲍中的病毒样颗粒	129

第八章 贝类的细菌性和原虫性疾病	130
第一节 细菌性疾病	130
第二节 立克次体和衣原体感染	138
第三节 原虫性疾病	149
参考文献	162