

两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)死亡率、血清 皮质醇和天然免疫因子的影响*

何杰 强俊 朱志祥 徐跑

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081)

摘要 采用两种不同降温方法,进行吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (60.13g)低温应激比较(水温从26℃降至致死温度8℃)。急性低温应激组以9℃/h的降温速度,2h后水温降至8℃;慢性低温应激组以3℃/d的降温速度,6d后水温降至8℃。以水温到达8℃时的时间为0h,比较致死温度下两种低温处理对吉富罗非鱼48h内累积死亡率、血清皮质醇与天然免疫指标的变化。结果表明,致死温度下48h时,急性低温应激组的累积死亡率为53.33%,显著高于慢性低温应激组的26.67% ($P<0.05$);慢性低温应激组血清皮质醇水平低于急性低温应激组,血清溶菌酶、C3和IgM活力以及头肾中C型溶菌酶和抗菌肽基因相对表达水平显著高于急性应激组($P<0.05$)。急性低温应激组相对较高的血清皮质醇水平抑制了机体天然免疫活性,降低了鱼体的抵抗力。因此,在实际养殖生产中,通过适当的低温驯化过程可以有效地提高吉富罗非鱼的低温耐受性。

关键词 吉富罗非鱼;低温应激;死亡率;皮质醇;天然免疫因子

中图分类号 S962.3

低温耐受性是影响罗非鱼产量的重要因素之一。目前,由于几个罗非鱼主养区冬季气温较低、寒流较多,同时,低温持续时间较长,低温环境极大限制了罗非鱼产量。因此,提高罗非鱼的低温耐受性有助于更好地延长生长周期,降低越冬死亡率和提高养殖效益。

许多品种的罗非鱼在水温低于18℃时就停止摄食,而水温低于14℃或12℃时,开始出现死亡(依据罗非鱼的品种和胁迫时间)(Tave, 1990; Tave *et al.*, 1990)。近些年,随着研究的深入,许多学者发现,通过营养调控和低温驯化可以有效地提高鱼类的低温耐受性。Hofer等(2002)将饲养温度为28℃的遗传上全雄罗非鱼分别直接放入20、18、16、14、13和12℃水温下进行急性低温应激,24h后,14℃时罗非鱼的死

亡率为43%,而12℃时全部死亡;然而将28℃水温下的罗非鱼放入20℃中驯化后再放入14℃和12℃中,罗非鱼的成活率分别达到72%和23%。吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)作为中国南方地区主要养殖的罗非鱼种类,在提高渔业增产和渔民增收上发挥着重要作用。因此,研究吉富罗非鱼的低温驯化具有重要意义。然而,低温对吉富罗非鱼的影响研究主要集中于急性低温应激方面,关于低温驯化的研究尚未见到相关报道。

血清皮质醇水平的变化可以作为鱼类应激状态下的重要指标,急性低温应激下血清皮质醇水平显著上升。血清中的一些特殊血清蛋白,如溶菌酶和补体等,随着应激时间的延长,呈现明显的免疫抑制作用。如强俊等(2012a)报道,将吉富罗非鱼从26℃直接

* “十二五”农村领域国家科技支撑计划课题,2012BAD26B03-1号。何杰,在职博士,副研究员, E-mail: hej@ffrc.cn; 同等贡献第一作者: 强俊, 博士, 助理研究员, E-mail: qiangjunn@163.com

通讯作者: 徐跑, 研究员, E-mail: xup@ffrc.cn

收稿日期: 2012-10-19, 收修改稿日期: 2012-12-26

放入 16℃ 环境下进行急性低温应激, 2h 后血清溶菌酶活力呈上升趋势, 24h 后显著下降。Ndong 等(2007)和 Tort 等(1998)在莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)和乌颊鱼(*Sparus aurata*)的研究中也发现, 随着低温应激时间的延长, 血清溶菌酶活力显著下降。免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM)作为硬骨鱼体内存在的一种重要免疫蛋白。尼罗罗非鱼在适温范围内, 血清 IgM 水平随着温度的上升而上升, 低温环境对血清 IgM 水平有明显的抑制作用(Domingueza *et al.*, 2004)。抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)作为鱼体应对细菌感染的第一道屏障, 是机体天然免疫的重要效应因子。不同的应激环境, 如养殖密度、饲料投喂量以及病害等对其表达均有调控作用(Rodrigues *et al.*, 2006; Jiménez-Cantizano *et al.*, 2008; Salas-Leiton *et al.*, 2010)。

本研究采取两种不同的低温应激方法——急性低温与慢性低温应激, 通过对吉富罗非鱼致死温度下(8℃)的累积死亡率、血清皮质醇以及天然免疫响应的比较, 分析不同应激下的免疫调控机制, 同时也为低温驯化是否能提高吉富罗非鱼的抗应激能力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

试验用鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴试验基地, 运回实验室后放置于水循环养殖系统中, 约 480 尾鱼用于本试验。利用自动控温仪将鱼置于 26℃ 的水环境下驯养 3 周。每天早晚各投喂 3 次(7:00、11:30 和 16:00), 饲料蛋白 28%, 脂肪 6%。试验用鱼的平均体质量为(60.13±5.43)g。试验期间水中溶氧高于 5mg/L, pH 为 7.6±0.2, 氨氮与亚硝酸盐低于 0.01mg/L。

1.2 试验设计

1.2.1 降温设置 试验在 1.2m³ 的养殖桶中进行, 每个桶添加 1m³ 曝气 3d 后的自来水。每个桶中放入 80 尾鱼, 两种低温应激下分别设置 3 组重复, 降温期间正常投喂。

(1) 急性低温应激: 通过冷凝系统, 将水温 26℃ 下吉富罗非鱼以 9℃/h 速度进行急速降温, 2h 后, 水温降至 8℃, 然后利用水循环系统将水温保持在(8±0.3)℃。选取活力较好的吉富罗非鱼, 以到达试验所需温度(8℃)时的时间为试验开始试验时间(0h)。

(2) 慢性低温应激: 通过加冰的方法, 将水温 26℃

下吉富罗非鱼以 3℃/d 速度进行慢性降温, 6d 后, 水温降至 8℃, 然后利用水循环系统将水温保持在(8±0.3)℃。选取活力较好的吉富罗非鱼, 以驯化至试验所需温度(8℃)时的时间为试验开始试验时间(0h)。

1.2.2 试验安排

低温应激试验 : 温度降至 8℃ 后, 每个养殖桶选取 10 尾鱼, 分别放入 6 个 450L 的养殖桶中, 利用水循环系统将水温保持在(8±0.3)℃。统计 0h、2h、6h、24h 和 48h 的死亡率。

低温应激试验 : 另从每个养殖桶中选取 40 尾鱼, 置于 6 个 450L 的养殖桶中, 利用水循环系统将水温保持在(8±0.3)℃。用于分析致死温度下不同时间天然免疫指标的变化。

1.3 采样与处理

分别于 0h、2h、6h、24h 和 48h 进行采样。每个养殖桶随机选取 3 尾鱼, 用 200mg/L 的 MS-222 作快速深度麻醉, 尾静脉采血, 血样于 4℃ 冰箱中静置 2h, 在 4℃, 3500g 离心 10min 制备血清, 上清液移置-80℃ 冰箱中保存备用, 并取适量的头肾用液氮速冻后, 于-80℃ 保存, 用于分子生物学分析。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 血液生化指标的测定 皮质醇采用电化学发光法, 使用罗氏电化学发光免疫分析仪 E170 测定; 溶菌酶、补体 C3、C4 和 IgM 均在罗氏全自动生化分析仪上测定, 试剂盒均购自购自上海朗顿生物科技有限公司。

1.4.2 头肾中 C 型溶菌酶和 HAMP1 相对表达量的测定 罗非鱼 C 型溶菌酶和 HAMP1 的引物设计与试验所采用的内参基因引物见表 1。所有引物由上海基康生物技术有限公司合成, 扩增的片段为 100—110bp, 取罗非鱼头肾 20mg 左右, 参照 RNeasy Mini Handbook (QIAGEN 公司)说明书用试剂盒提取总 RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.90 左右。

根据 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time(大连 TaKaRa 公司)进行 RT 反应, 然后采用 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 的 SYBR Green 渗入法进行实时定量 PCR 扩增反应, 以 β -actin 为内参。PCR 反应体系(50μL)包括: 高压灭菌去离子水 19μL、SYBR Green PCR Master Mix (2×) 25μL、正向及反向引物(10μmol/L)各 2μL、cDNA 工作液 4μL。反应条件为: 95℃ 5min, 然后 40 个循环(95℃ 15s, 60℃ 60s, 读板记录荧光量), 反应结束后制备溶解曲线, 反应条件为: 95℃ 15s, 60℃ 15s, 95℃ 15s。每

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

目标基因	序列	NCBI GenBank 序列号
抗菌肽 HAMP1	F: 5'-TGCAGTTGCAGTGACACTCGTG-3'	XM_003450530.1
	R: 5'-TGTCATTGCTCCCTGCCTCCTC-3'	
C 型溶菌酶	F: 5'-AATCGCTGGTGGTGCAATGACA-3'	XM_003440253.1
	R: 5'-GCAGTTGATTGCCACGGTGACA-3'	
内参基因 β -actin	F: 5'-CCACACAGTGCCCATCTACGA-3'	EU_887951.1
	R: 5'-CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA-3'	

个反应设 3 复孔。所有检测样品均包含 1 个无模板的阴性对照以排除假阳性结果。

1.5 数据处理

在 C 型溶菌酶、HAMP1 与 β -actin 的定量 PCR 扩增效率基本一致的前提下, 计算 C 型溶菌酶和 HAMP1 相对表达量。以罗非鱼 β -actin 为内参, 对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理, 以慢性应激组 0h 时基因相对表达量为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak *et al.*, 2001)确定不同时间点各处理组 mRNA 的相对表达量。数据结果用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 试验数据用 SPSS15.0 统计软件进行方差分析, 同一组不同时间点之间的比较采用配对样本 *T* 检验, 不同组同一时间点之间的比较采用 Duncan 多重比较。

2 结果与分析

2.1 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下累积死亡率的影响

致死温度下, 急性低温应激组 6h 后的累积死亡率显著上升, 达到 33.33%(图 1)。48h 时, 急性低温应激组的累积死亡率为 53.33%, 显著高于慢性低温应激组的 26.67% ($P < 0.05$)。

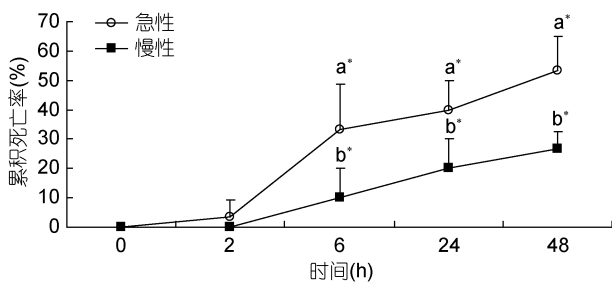


图 1 两种不同应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的累积死亡率(n=10)

Fig.1 Cumulative mortality of GIFT tilapia under lethal low temperature by use of two kinds of stress methods (n=10)

注: 星号表示同一试验组应激前与应激后相比有差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同试验组在同一时间点差异显著 ($P < 0.05$)。下同

2.2 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清皮质醇水平的影响

0h 时, 急性低温应激组血清皮质醇水平显著高于慢性应激组 ($P < 0.05$)(图 2)。随着应激时间的增加, 慢性低温应激组呈先上升后下降的变化, 2h 时, 皮质醇水平达到峰值; 48h 后, 血清皮质醇显著下降 ($P < 0.05$), 但仍高于 0h 的。急性低温应激组血清皮质醇水平在 48h 内始终保持在较高值, 介于 860.299—1242.563ng/mL。

2.3 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清溶菌酶活力的影响

两试验组血清溶菌酶活力均呈先上升后下降的变化趋势(图 3)。6h 时, 两试验组血清溶菌酶活力达

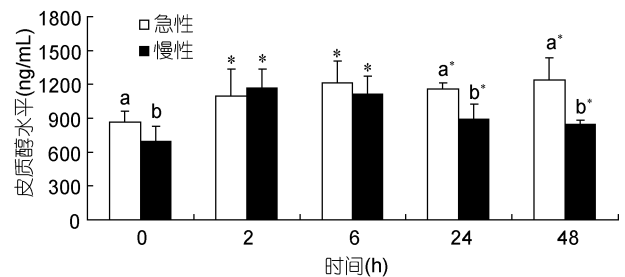


图 2 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的血清皮质醇水平的影响(n=9)

Fig.2 Effects of two kinds of low temperature stress on serum cortisol level in GIFT tilapia under lethal low temperature (n=9)

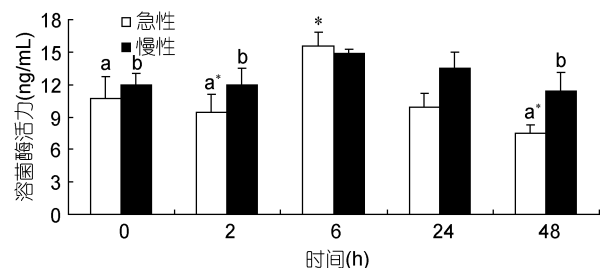


图 3 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的血清溶菌酶活力的影响(n=9)

Fig.3 Effects of two kinds of low temperature stress on serum lysozyme activity in GIFT tilapia under lethal low temperature (n=9)

到峰值。除 6h 外，慢性低温应激组的溶菌酶活力在其他各时间点都高于急性应激组的。

2.4 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清 C3 和 C4 水平的影响

急性低温应激组血清 C3 水平随应激时间的延长而显著下降($P<0.05$)(图 4)。然而，慢性低温应激组血清 C3 水平在 48h 内虽然也呈下降趋势，但是各时间点变化幅度较小，介于 82.72—114.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；48h 时，慢性低温应激组的 C3 水平显著高于急性应激组的($P<0.05$)。

两试验组血清 C4 水平的变化基本呈下降趋势(图 5)。48h 时，两试验组血清 C4 水平显著低于 0h 的；慢性低温应激组 C4 水平与急性应激组相比无显著差异($P>0.05$)。

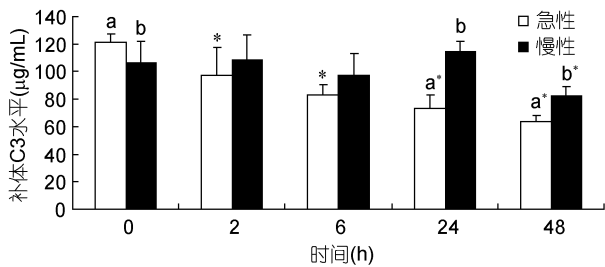


图 4 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的血清 C3 水平的影响($n=9$)

Fig.4 Effects of two kinds of low temperature stress on serum C3 level in GIFT tilapia under lethal low temperature ($n=9$)

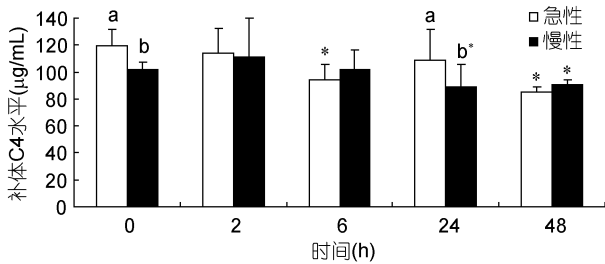


图 5 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的血清 C4 水平的影响($n=9$)

Fig.5 Effects of two kinds of low temperature stress on serum C4 level in GIFT tilapia under lethal low temperature ($n=9$)

2.5 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清 IgM 水平的影响

0h 时，急性低温应激组血清 IgM 水平显著高于慢性低温应激组(图 6)。两试验组在 48h 内基本呈先上升后下降变化。48h 时，慢性低温应激组血清 IgM 水平与 0h 时相比无显著差异，然而，显著高于急性应激组的。

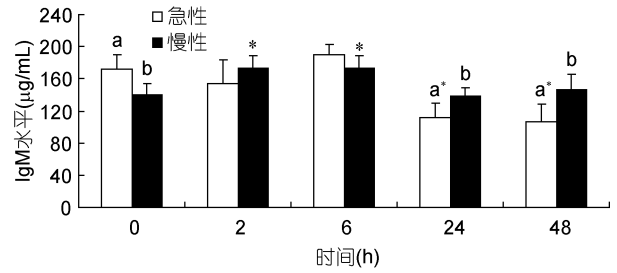


图 6 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的血清 IgM 水平的影响($n=9$)

Fig.6 Effects of two kinds of low temperature stress on serum IgM level in GIFT tilapia under lethal low temperature ($n=9$)

2.6 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下头肾 C 型溶菌酶和 HAMP1 相对表达量的影响

慢性低温应激组 C 型溶菌酶基因表达水平在 24h 内始终处于上升趋势(图 7)；48h 时，表达水平显著低于 24h 时的，但仍显著高于 0h 的水平($P<0.05$)。急性低温应激组头肾 C 型溶菌酶基因表达水平呈先上升后下降的变化，48h 时的表达水平显著低于 0h 的($P<0.05$)。

急性低温应激组头肾 HAMP1mRNA 的表达水平呈下降变化(图 8)；48h 时，相对表达量显著低于 0h

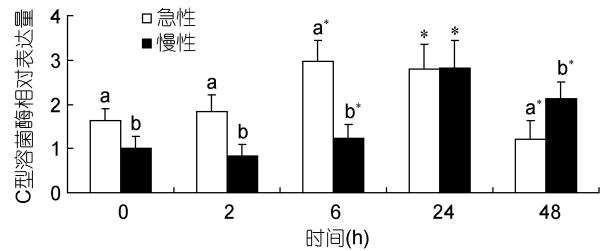


图 7 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的头肾 C 型溶菌酶相对表达量的影响($n=9$)

Fig.7 Effects of two kinds of low temperature stress on relative expression of head kidney c-type lysozyme mRNA in GIFT tilapia under lethal low temperature ($n=9$)

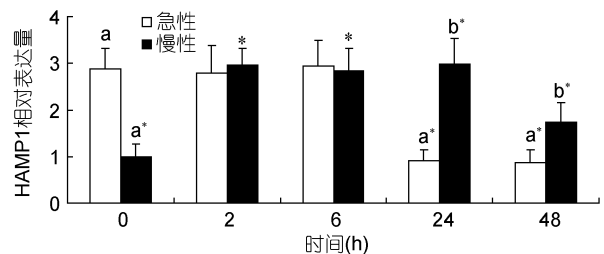


图 8 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下的头肾抗菌肽相对表达量的影响($n=9$)

Fig.8 Effects of two kinds of low temperature stress on relative expression of head kidney HAMP1 mRNA in GIFT tilapia under lethal low temperature ($n=9$)

的。慢性低温组的 HAMP1mRNA 的表达水平呈先上升后下降的变化; 48h 时, mRNA 水平虽然低于 24h 时的, 但仍显著高于 0h 的水平($P < 0.05$)。

3 讨论

在众多影响罗非鱼低温耐受性的因素中, 驯化温度被认为是关键的因素之一。通过适当的低温驯化可以改变鱼体的生理反应与免疫机能, 增强鱼体的低温耐受性(段志刚等, 2011)。本研究中, 慢性低温应激试验组采取每天降低水温 3°C 的方法。经过 6d 的降温处理, 水温由 26°C 降至 8°C 。慢性低温应激组的吉富罗非鱼在 8°C 水环境中 48h 后的累积死亡率为 26.33%, 仅为急性低温应激组的一半。因此, 通过低温驯化可以有效提高罗非鱼致死温度下的存活率。

3.1 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清皮质醇水平的影响

皮质醇是肾上腺在应激反应里产生的一种类激素。通常, 应激下鱼类血清皮质醇水平开始呈上升趋势, 随着时间的延长而逐渐下降, 显示鱼体对新环境进行了适应(Qiang *et al.*, 2013)。急性低温应激下, 鱼体血清皮质醇水平会显著升高(刘波等, 2011; 强俊等, 2012a)。本研究中, 在急性低温应激组的血清皮质醇的变化中也发现类似现象。高水平的皮质醇可能会抑制机体的免疫功能, 从而使急性低温应激组吉富罗非鱼的死亡率在 48h 内持续上升。慢性应激组鱼体血清皮质醇水平在 48h 时虽然仍高于 0h 的, 但是, 显著低于急性应激组 48h 时的皮质醇水平。低温驯化可能有助于吉富罗非鱼对低温环境的适应。

3.2 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清溶菌酶活力的影响

溶菌酶(LSZ)是水生动物的淋巴细胞酶系统中的重要组成部分, 反映了机体天然免疫水平的变化(Ellis, 1999)。鱼体受到急性应激时, 肝脏受损, 血清中 LSZ 活力会显著上升。Saurabh 等(2008)报道, 鱼体溶菌酶活性与众多环境因子密切相关, 如水温、盐度、细菌等。强俊等(2012a, b)同样也在罗非鱼中发现胁迫环境与血清高溶菌酶活力之间的相关性。本试验中, 8°C 低温环境下, 急性与慢性低温应激组血清 LSZ 活力在应激后 6h 时显著上升。罗非鱼在急性低温应激下, 血清中皮质醇浓度升高, 促进血糖的合成, 脂肪降解加速, 从而促使鱼体在短期内获得更多的能量用于增加血清中一些特定免疫蛋白如 LSZ 或补体等的含量, 从而提高机体的免疫力(Möck *et al.*,

1990)。然而, 本研究结果与刘波等(2011)的结果有较大差异。刘波等(2011)研究发现, 将 177g 的吉富罗非鱼进行急性低温应激, 水温在 30min 内由 25°C 降至 9°C , 血清 LSZ 活力在 12h 内始终处于下降趋势。水温对血清 LSZ 活力的影响可能与鱼体规格、降温速度等密切相关。随着低温应激时间的延长, 48h 时, 两试验组血清 LSZ 活力均呈下降趋势, 慢性低温应激组的 LSZ 活力显著高于急性组的。应激后期的死亡率上升可能与 LSZ 活力下降有关。

3.3 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清 C3 和 C4 水平的影响

低温应激 48h 后, 两试验组血清 C3 和 C4 水平均显著低于 0h 的, 这可能与血清皮质醇的升高对机体产生免疫抑制作用有关(Ndong *et al.*, 2007)。同样, 在乌颊鱼的低温应激(水温从 18°C 降至 11°C)的试验中也发现, 血清 LSZ 活力和补体在应激后显著下降(Tort *et al.*, 1998, 2004)。同时, 本试验中发现, 急性低温应激组血清 C3 水平在应激 48h 内始终处于下降趋势; 急性组的 C3 水平在 48h 时显著低于慢性组的。C3 是血清中含量最高的补体成分, 在机体免疫应答与生理调节上发挥着重要作用。急性低温应激下, 水温抑制了吉富罗非鱼的 C3 活性, 从而导致其抵抗力下降。慢性低温应激组血清 C4 水平在应激 2h 后略微上升, 而后随着时间的延长而降低。刘波等(2011)也发现了类似现象。鱼类受到持续低温应激后, 抑制了机体的免疫活性。

3.4 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下血清 IgM 水平的影响

与 LSZ 和补体相似, IgM 也是鱼类天然免疫应答中的重要组成之一。不同鱼类血清 IgM 随温度的变化有较大差异。在适温范围内, 尼罗罗非鱼(Domingueza *et al.*, 2004)、大马哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)(Alcorn *et al.*, 2002)和鳕鱼(*Gadus morhua*)(Magnadóttir *et al.*, 2001)的血清 IgM 水平较高, 升高或降低水温时 IgM 水平均下降。相反, Klesius(1990)发现, 温度变化对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)血清 IgM 水平无影响。本试验中, 血清 IgM 水平的变化与 LSZ 相似, 应激 6h 时, 两试验组血清 IgM 水平高于 0h 的, 短期生理应激可能有助于增加血清循环蛋白; 48h 时, 急性低温应激组血清 IgM 水平显著下降。

3.5 两种不同低温应激方法对吉富罗非鱼致死温度下头肾 C 型溶菌酶和 HAMP1 相对表达量的影响

C 型溶菌酶和 HAMP1 基因在防御病原细菌入侵

时发挥着重要作用。细菌感染(Douglas *et al*, 2003; 高焕等, 2011)或注射多糖(Martin-Antonio *et al*, 2009; 汤菊芬等, 2011)均可在短期内增加这些基因的表达水平。然而, 长期应激下 C 型溶菌酶和 HAMP1 基因的转录水平可能会随机体免疫活性下降而降低。如 Salas-Leiton 等(2010)发现, 将塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)在高密度或低投喂量下饲养一段时间后, 肝脏 C 型溶菌酶和 HAMP1 基因表达水平显著下降。头肾位于肾脏的前段, 具有重要的免疫功能。因此, 本研究选取头肾来研究目标基因的表达变化。试验中发现, 应激 48h 后, 两试验组吉富罗非鱼的头肾 C 型溶菌酶和 HAMP1 mRNA 相对表达水平显著降低。血清中较高的皮质醇水平能够对鱼体的天然免疫系统进行负调控(Weyts *et al*, 1999)。慢性低温应激组头肾 C 型溶菌酶和 HAMP1 mRNA 水平在 48h 时显著高于急性应激组的, 这可能与吉富罗非鱼的低温适应能力有关。

4 小结

本文研究了两种不同低温应激方法对吉富品系尼罗罗非鱼累积死亡率、血清皮质醇以及天然免疫指标的影响。结果表明, 通过慢性低温应激可以在一定程度上减少低温环境对血清皮质醇的影响; 放缓血清溶菌酶、C3 和 IgM 活力的下降速度。同时, 慢性低温应激 48h 后头肾 C 型溶菌酶和 HAMP1 mRNA 表达也明显高于急性低温应激组。相对较高的天然免疫活性可能有助于增加低温应激时的存活率。然而, 急性低温应激组血清较高的皮质醇水平能够抑制机体免疫活性, 降低了鱼体的抵抗力。

参 考 文 献

- 刘 波, 王美垚, 谢 骏等, 2011. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响. 生态学报, 31(17): 4866—4873
- 汤菊芬, 吴灶和, 简纪常等, 2011. 注射黄芪多糖对吉富罗非鱼 c 型溶菌酶基因表达量的影响. 广东海洋大学学报, 31(1): 58—61
- 段志刚, 吴金英, 李文笙, 2011. 低温对罗非鱼类影响的相关研究进展. 南方水产科学, 7(6): 77—82
- 高 焕, 赖晓芳, 孟宪红等, 2011. 中国明对虾抗菌肽基因应答 WSSV 侵染的表达及其 SNP 分析. 中国水产科学, 18(3): 646—653
- 强 俊, 杨 弘, 王 辉等, 2012a. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响. 海洋与湖沼, 43(5): 943—953
- 强 俊, 杨 弘, 王 辉等, 2012b. 海豚链球菌感染对不同品系罗非鱼血液生化指标和肝脏 HSP70 表达的影响. 水产学报, 36: 958—967
- Alcorn S W, Murray A L, 2002. Effect s of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Fish & Shellfish Immunology, 12: 303—334
- Domingueza M, Takemura A, Tsuchiya M *et al*, 2004. Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 241: 491—500
- Douglas S E, Gallant J W, Liebscher R S *et al*, 2003. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. Developmental and Comparative Immunology, 27: 589—601
- Ellis A E, 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology, 9: 291—308
- Hofer S C, Watts S A, 2002. Cold tolerance in genetically male tilapia (GMT), *Oreochromis niloticus*. World Aquaculture, 33(2): 19—21
- Jiménez-Cantizano R M, Infante C, Martin-Antonio B *et al*, 2008. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). Fish & Shellfish Immunology, 25: 57—65
- Klesius P H, 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 24: 187—195
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402—408
- Möck A, Peters G, 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. Journal of Fish Biology, 37(6): 873—885
- Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S *et al*, 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). Fish & Shellfish Immunology, 11(1): 75—89
- Martin-Antonio B, Jimenez-Cantizano R M, Salas-Leiton E *et al*, 2009. Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the redbanded seabream (*Pagrus auriga*). Fish & Shellfish Immunology, 26: 483—491
- Ndong D G, Chen Y Y, Lin Y H *et al*, 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. Fish & Shellfish Immunology, 22: 686—694
- Qiang J, Yang H, Wang H *et al*, 2013. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding. Aquaculture Research, doi:10.1111/are.12189
- Rodrigues P N, Vazquez-Dorado S, Neves J V *et al*, 2006. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron

- overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 1156—1167
- Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B *et al*, 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 296—302
- Saurabh S, Sahoo P K, 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39: 223—239
- Tave D, 1990. Cold tolerance in tilapia. *Aquaculture Magazine*, 4: 86
- Tave D, Jayaprakas V, Smitherman R O, 1990. Effects of intraspecific hybridization in *Tilapia nilotica* on survival under ambient winter temperature in Alabama. *Journal of World Aquaculture Society*, 21: 201—204
- Tort L, Rotllant J, Liarte C *et al*, 2004. Effect of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229: 55—65
- Tort L, Rotllant J, Roviva L, 1998. Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the north-west Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 120: 175—179

EFFECT OF TWO KINDS OF LOW TEMPERATURE STRESS ON MORTALITY, SERUM CORTISOL AND INNATE IMMUNE FACTORS IN GIFT TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) JUVENILES

HE Jie, QIANG Jun, ZHU Zhi-Xiang, XU Pao

(Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081)

Abstract Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) tilapias (*Oreochromis niloticus*) (60.13g) reared at 26°C were treated at 8°C (lethal low temperature) by two kinds of low temperature stress: acute temperature stress and chronic temperature stress. Water temperature of acute stress group was reduced to 8°C at the rate of 9°C/h, and that of chronic stress group was reduced to 8°C at the rate of 3°C/d. Setting the beginning of water temperature at 8°C and 0h, we examined the changes in cumulative mortality, serum cortisol and some innate immune factors under lethal low temperature over 0—48h in the tilapia. The results showed that cumulative mortality (53.33%) of acute stress group was significantly higher than that of chronic stress group (26.67%) at 48h after stress ($P < 0.05$). The serum cortisol level of chronic stress group was lower than the level of acute stress group at 48h; but the activities of serum lysozyme, C3 and IgM and the level of c-type lysozyme and HAMP1 mRNA in head kidney were higher than those of acute stress group. The higher level of serum cortisol in acute stress group inhibited innate immune activity of fish body, and thus the resistance ability reduced. It is suggested that in the course of the tilapia culture, the capability of cold tolerance by the tilapia can be improved by use of cold acclimation.

Key words GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*; low temperature stress; mortality; cortisol; innate immune factor