

doi: 10.7541/2014.02

日粮中不同水平维生素 C 对团头鲂幼鱼免疫力的影响

万金娟^{1,2} 刘 波^{1,2} 戈贤平^{1,2} 谢 骏^{1,2} 崔素丽^{1,2} 周 明^{2,3}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081;
3. 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 以酪蛋白和明胶为蛋白源, 豆油为脂肪源配制团头鲂幼鱼基础饲料, 制成维生素 C 水平为 0.2、33.4、65.8、133.7、251.5 和 501.5 mg/kg 的 6 种等氮等能的试验饲料。对均重为(6.40±0.05) g 的团头鲂幼鱼进行为期 90d 的饲养试验, 以血清相关免疫指标、肝脏抗氧化指标、三种 HSPs mRNA 表达以及抗病病原菌能力等指标为依据, 研究 Vc 对团头鲂幼鱼免疫力的影响。试验结果表明, 与对照组相比, 501.5 mg/kg Vc 试验组能显著提高血清补体 3 (C3) 的浓度, 133.7 mg/kg Vc 试验组能显著提高补体 4 (C4) 的浓度; 65.8、133.7 和 251.5 mg/kg Vc 试验组能显著提高肝脏超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 各 Vc 试验组均能显著提高肝脏抗超氧阴离子(ASAFR)的活性; 133.7 和 251.7 mg/kg Vc 试验组能显著提高肝脏 HSP60 基因表达水平, 251.5 mg/kg Vc 试验组能显著提高肝脏 HSP70 和 HSP90 基因表达水平($P<0.05$); 各 Vc 试验组鱼的成活率在感染嗜水气单胞菌后 12h、24h 均显著高于对照组($P<0.05$), 其中以 251.5 mg/kg Vc 试验组效果最佳。在日粮中添加 Vc 对鱼体血清碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、皮质醇(COR)以及肝脏丙二醛(MDA)的水平无显著影响($P>0.05$)。综上所述, 在试验条件下, Vc 作为免疫刺激剂, 其水平为 133.7—251.5 mg/kg 时能有效地增强团头鲂幼鱼的免疫力。

关键词: 团头鲂; 维生素 C; 非特异免疫; HSPs mRNA 表达; 抗病病原感染

中图分类号: S963 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2014)01-0010-09

在集约化水产养殖条件下, 高密度养殖所带来的多种多样的应激、种质资源的破坏、养殖环境的污染等损害了养殖动物的防御系统, 增加了鱼类对病害的易感性, 从而严重制约了鱼类养殖业的健康发展。国内外一些学者已从免疫学角度对鱼类疾病防治进行了研究, 通过应用免疫增强剂来增加鱼类自身的免疫能力, 增强机体自身免疫功能和对疾病的抵抗力^[1], 从而达到防治疾病的目的, 这方面的研究工作正越来越受到人们的重视, 并在鱼类疾病防治中已取得了良好的效果。维生素 C (Vc) 又名 L-抗坏血酸(L- ascorbic acid, AA), 在鱼类生长和免疫^[2-5]等方面起重要作用^[6]; 然而, 因为一般鱼类体内缺乏古洛糖酸内酯氧化酶而使这些种类需要在食物中

添加维生素 C 以满足身体对维生素 C 的需要^[7, 8]。宋学宏等^[9]、Ai, *et al.*^[8]、李桂峰等^[10]、Eo & Jinee^[11]分别报道了维生素 C 能有效地提高异育银鲫、大黄鱼、胡子鲶以及东方红鳍鲌的非特异性免疫能力以及对环境污染、刺激物的耐受力 and 抗感染力。然而迄今为止, 有关 Vc 对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼免疫因子的影响尚未见报道。本研究拟通过分别对团头鲂幼鱼投喂 Vc 含量不同的试验饲料 90d 后, 检测其对非特异性免疫相关的几种重要指标、抗热应激蛋白以及抗病病原菌力的影响, 以期得到维生素 C 对团头鲂幼鱼免疫活性的影响规律, 为鱼类营养免疫学积累基础资料, 并为维生素 C 作为免疫激活剂应用于鱼类养殖业提供理论依据。

收稿日期: 2012-09-07; 修订日期: 2013-06-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46); 公益性行业(农业)科研专项经费(201003020); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2012A0602)资助

作者简介: 万金娟(1989—), 女, 安徽省宣城人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与免疫。E-mail: wanjinjuan.a@163.com

通信作者: 戈贤平, 研究员, 博士生导师; E-mail: gexp@ffrc.cn

1 材料与方法

1.1 试验鱼、添加剂及日粮

团头鲂幼鱼由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心试验场提供。试验选择体质健壮, 规格基本一致的团头鲂鱼种, 初始体重(6.40 ± 0.05) g, 随机分为 6 组, 分别为对照组及试验组, 试验设 F0 (对照)、F1、F2、F3、F4、F5 六组, 每组设 3 个重复, 放入 18 个可控温循环流水圆形蓄养槽(规格为 $\phi 820 \text{ mm} \times 700 \text{ mm}$)内进行养殖, 每个蓄养槽放养 25 尾。

以酪蛋白和明胶为蛋白源, 豆油为脂肪源, 设计了 6 组等氮等能的饲料, 维生素 C 的添加水平分别为: 0、30、60、120、240 和 480 mg/kg 饲料。基础饲料组成及主要营养成分见表 1。饲料中不同的维生素 C 水平是通过在饲料中添加不同剂量的包膜维生素 C (95%, 罗氏公司), 制作后测定各组饲料中维生素 C 实际含量分别为: 0.2、33.4、65.8、133.7、251.5 和 501.5 mg/kg 饲料。各种原料分别充分混匀后, 用 SLP-45 型膨化机(中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所)制成粒径 1.0 mm 的沉性颗粒饲料, 50℃烘干后于 4℃冰柜中保存备用。

1.2 饲养管理

团头鲂在养殖桶驯化 22d 后正式开始投喂试验日粮。每天投喂 3 次, 在早上 8:00 至 9:00 投喂适量, 中午 11:00 至 12:00、下午 15:00 至 16:00 各再投喂一次。日投饵量为鱼体重 2%—4%, 并根据摄食和生长情况作适当调整, 以每次投饲后无残饵为宜。饲养期间水温 27.5℃左右, pH 为 7.2—7.8 (正式饲养 90d 期间), 溶解氧 $>5 \text{ mg/L}$, 氨氮 $<0.01 \text{ mg/L}$, 硫化氢 $<0.01 \text{ mg/L}$ 。减少人为干扰, 保持安静, 防止额外应激, 每日观察鱼摄食及死亡情况, 发现死鱼及时捞出称重记数, 并检查死亡原因。正式养殖 90d 后, 量取鱼体长、称重和采样等。

1.3 攻毒试验

在饲养试验结束后, 用氢氧化钠将养殖槽中水从 pH ≈ 7.8 调制 pH ≈ 9.5 , 15d 后选择体重基本一致的团头鲂进行攻毒试验, 每槽取 6 尾鱼。病原菌采用实验室的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。按 Xie, et al.^[12]所述方法, 将两次活化后的嗜水气单胞菌用无菌生理盐水稀释, 使终浓度约为 $5 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ 。按每 100 g 鱼重腹腔注射菌液 1.0 mL 后, 放养于同样规格的蓄养槽内, 并保证充足的氧气, 观察鱼体死亡情况, 并分别于 0、12、24h 统计死亡率。

1.4 采样与处理

在饲养试验结束后, 禁食 24h, 每槽随机选取 3 尾体重相近的团头鲂, 每组 9 尾鱼, 用浓度为 150 mg/L 的 MS-222 作快速深度麻醉, 用一次性医用注射器从尾静脉采血, 在 4℃条件下离心制备血清, -20℃冻存备用。鱼体采血后立即剖开腹腔, 剥离出内脏和肝胰脏, 取约 0.1 g 肝脏用液氮速冻后于 -80℃保存用于分子生物学测定; 另取适量肝脏用于常规分析, 于 -20℃保存。

1.5 测定指标与方法

血液相关免疫指标的测定 碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白 (TP) 和白蛋白 (Alb) 在深圳迈瑞 BS-400 全自动生化分析仪, 试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 补体 3 (C3)、补体 4 (C4) 采用免疫比浊法, 试剂盒购自浙江伊利康生物技术有限公司; 皮质醇 (COR) 在深圳新产业 MAGLUMI 1000 全自动化学发光免疫分析仪上测定, 试剂盒均购自深圳市新产业生物医学工程有限公司。

肝脏抗氧化指标的测定 在肝脏样品解冻后, 用 4℃生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干后称重, 肝脏与匀浆介质 (pH 7.4) 按 1:9 (w:v) 的比例冰浴匀浆, 制成 10%匀浆液。匀浆液在 4℃, 4000 r/min 离心 10min, 上清液保存于 -70℃冰箱。肝脏上清液蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定; 肝脏上清液超氧化物歧化酶 (SOD)、抗超氧阴离子 (ASA) 和丙二醛 (MDA), 分别采用黄嘌呤氧化酶法、黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定, 所用试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

肝脏三种热休克蛋白 mRNA 表达水平的测定 利用 primer premier 5.0 引物设计软件设计引物, 根据实验室获得的团头鲂 HSP60 全长序列设计特异性引物 F1: 5'-TGCTGTCTACTGCTGAAGCCGTTGT-3'; R1: 5'-CCATCACTCAGTTTCGGCAGGTTT-3'。根据实验室获得的团头鲂 HSP70 全长序列 (GenBank Accession No.: FJ375325) 设计 HSP70 特异性引物 F2: 5'-CGACGCCAACGGAATCCTAAAT-3'; R2: 5'-CTTTGCTCAGTCTGCCCTTGT-3'。根据实验室获得的团头鲂 HSP90 全长序列设计特异性引物 F3: 5'-TGCGGGACAACCTCCACCAT-3'; R3: 5'-TCAATGAGAACCCAGAGGAAAGC-3'。管家基因 β -actin 的引物是基于 GenBank (GenBank Accession No.: AB037865) 的序列设计: F4: 5'-TCTGCTATGTG

表 1 基础饲料配方及化学成分
Tab. 1 Formulation and chemical composition of basal diet (% DM)

原料 Ingredients	含量 Content	营养成分 Chemical composition	含量 Content
酪蛋白(不含 Vc) Casein (vitamin C free)	27.5	粗蛋白 Crude protein	32.12
明胶 Gelatin	6.50	粗脂肪 Crude lipid	6.68
磷酸二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate	2.75	无氮浸出物 ³ Nitrogen-free extract	37.91
豆油 Soybean oil	6.00	赖氨酸 Lysine	2.26
大豆磷脂 Soy lecithin	1.00	蛋氨酸 Methionine	0.79
氯化胆碱(50%) Choline chloride(50%)	0.15		
维生素预混料(不含 Vc) ¹ Vitamin premix (vitamin C free)	0.50		
矿物质预混料 ² Mineral premix	0.50		
糊精 Dextrin	10.00		
α -淀粉 α -starch	25.00		
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	9.05		
羧甲基纤维素 Carboxyl-methy cellulose	11.00		
乙氧基喹啉 Ethoxyquin	0.05		

注: 1. 维生素预混料 Vitamin premix (IU or per kg premix): 维生素 A Vitamin A, 900000 IU; 维生素 D Vitamin D, 250000 IU; 维生素 E Vitamin E, 4500 mg; 维生素 K₃ Vitamin K₃, 220 mg; 维生素 B₁ Vitamin B₁, 320 mg; 维生素 B₂ Vitamin B₂, 1090 mg; 维生素 B₆ Vitamin B₆, 5000 mg; 泛酸 Pantothenate, 1000 mg; 叶酸 Folic acid, 165mg; 胆碱 Choline, 60000 mg; 2. 矿物添加剂 Mineral premix (per kg premix): CuSO₄·5H₂O, 2.5 g; FeSO₄·7H₂O, 28 g; ZnSO₄·7H₂O, 22 g; MnSO₄·4H₂O, 9 g; Na₂SeO₃, 0.045 g; KI, 0.026 g; CoC₁₂·6H₂O, 0.1 g; 3. 无氮浸出物(NFE, %)=100%-(水分 Moisture+粗蛋白 CP+粗脂肪 EE+粗纤维 CF+粗灰分 Ash)%

GCTCTTGACTTCG-3'; R4: 5'-CCTCTGGGCACCTGAACCTCT-3'。所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 扩增片段长度为123—152 bp。

取每条团头鲂肝脏50—100 mg左右, 按照RNAiso Reagent (Takara有限公司)说明书提取总RNA, 一般 $A_{260/280}$ 为1.8—2.0。并以DNAase I酶处理过的RNA以及RT液为模板, 用 β -actin的定量引物分别进行PCR反应。结果显示, 以RT液为模板有所需产物, 而以RNA为模板则无条带(未列出), 说明处理过的RNA无DNA污染。反转录反应使用SYBR ExScriptTM RT-PCR Kit (Takara公司)获得单链cDNA。

HSP60、*HSP70*、*HSP90* mRNA 相对量采用SYBR ExScriptTM RT-PCR Kit (Takara 公司), 利用SYBR Green I 嵌合荧光法进行Real Time PCR 扩增反应(ABI 7500 荧光定量PCR, USA), 采用嵌合荧光法进行Real Time PCR 扩增反应。PCR 反应条件为: Holding stage (50°C 2min; 95°C 3min); Cycling stage (95°C 15s; 60°C 60s, 循环40次); Melt curve stage [95°C 15s, 60°C 60s (Data collection), 95°C 30s, 60°C 15s]。

随机取样品 cDNA, 设三个重复, 获得 *HSP60* 的标准方程是 $y = -0.310x + 10.65$, 相关系数 $R^2 = 0.991$; 获得 *HSP70* 的标准方程是 $y = -0.361x + 13.38$, 相关系数 $R^2 = 0.995$; 获得 *HSP90* 的标准方程是 $y = -0.314x + 10.29$, 相关系数 $R^2 = 0.996$; β -actin 的标准方程是 $y =$

$-0.304x + 9.817$, 相关系数 $R^2 = 0.990$; 其中 y 代表起始模板浓度以10为底的对数, x 代表 C_t 值。

HSP60、*HSP70*、*HSP90* mRNA 水平计算以团头鲂 β -actin 为内参, 对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理, 应用各自的标准曲线方法确定其相对水平^[13]。

饲料中维生素 C 的测定 每组饲料分别称取0.5 g并粉碎, 每组5个重复。饲料与匀浆介质(pH 7.4)按1:9 (w:v)的比例冰浴匀浆, 然后4°C 10000 r/min 离心 20min, 取上清液用于分析。抗坏血酸(维生素C)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 具体测定方法参照试剂盒说明书。

1.6 数据统计与分析

实验数据用SPSS 16.0 统计软件包中的单因素方差分析(One-way ANOVA)和Duncan氏多重比较, 检验各组间的差异, 不同的小写字母表示各组之间比较差异显著($P < 0.05$)。所有的结果均以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示。

2 结果

2.1 维生素 C 对团头鲂幼鱼血清免疫相关指标的影响

由表3可知, 随着日粮中维生素C添加量的增加, 团头鲂幼鱼血清中补体C (C3)的浓度呈增加趋势, 补体4 (C4)的浓度呈先增加后降低趋势; 其中,

表 2 在日粮中添加不同水平的 Vc 对团头鲂幼鱼血清免疫指标的影响
Tab. 2 Effects of various levels of Vc on serum immunological indices of juvenile *M. amblycephala*

Vc 添加量 Supplement Vc in diet (mg/kg)	碱性磷酸酶 ALP (U/L)	总蛋白 TP (g/L)	白蛋白 Alb (g/L)	补体 3 C3 (g/L)	补体 4 C4 (g/L)	皮质醇 GOR (ng/mL)
0.2	41.33±4.31	18.05±1.19	4.37±0.14	0.035±0.006 ^a	0.010±0.0010 ^a	514.69±19.30
33.4	46.07±7.91	14.62±0.67	4.37±0.09	0.039±0.004 ^a	0.011±0.0001 ^{ab}	442.64±11.79
65.8	41.77±3.24	17.27±1.71	4.37±0.43	0.040±0.007 ^a	0.013±0.0008 ^{ab}	502.26±10.44
133.7	43.25±1.50	16.50±0.87	4.32±0.25	0.040±0.005 ^a	0.014±0.0012 ^b	489.45±59.73
251.5	46.20±7.17	19.99±0.78	4.97±0.09	0.042±0.003 ^{ab}	0.011±0.0013 ^{ab}	519.81±10.19
501.5	43.30±4.02	20.41±1.22	4.95±0.39	0.057±0.007 ^b	0.011±0.0006 ^{ab}	556.18±10.43

注: 同一列数据中有不同上标英文字母表示有显著差异 ($P<0.05$); 下同

Note: Values with different superscript letters in the same column are significantly different ($P<0.05$); the same applies below

表 3 在日粮中添加不同水平的 Vc 对团头鲂幼鱼肝脏抗氧化指标的影响
Tab. 3 Effects of various levels of Vc on liver antioxidant indices of juvenile *M. amblycephala*

Vc 添加量 Supplement Vc in diet (mg/kg)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	抗超氧阴离子 ASAFR (U/g prot)	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)
0.2	149.58±11.20 ^a	346.73±30.29 ^a	13.13±1.07
33.4	179.38±12.05 ^a	516.62±37.40 ^b	12.47±0.50
65.8	191.47±9.72 ^b	565.12±12.43 ^b	12.39±1.31
133.7	192.11±17.66 ^b	586.32±3.38 ^b	12.12±0.88
251.5	195.27±11.51 ^b	513.52±21.98 ^b	12.55±0.49
501.5	160.64±15.43 ^a	490.05±26.23 ^b	12.51±1.23

与对照组相比, 501.5 mg/kg 试验组血清 C3 浓度显著增加了 62.86%, 133.7 mg/kg 试验组血清 C4 浓度显著增加了 40.00% ($P<0.05$)。在饲料中添加维生素 C 对血清碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)和皮质醇(GOR)浓度均无显著影响($P>0.05$), 但是 TP、Alb 含量略有增加趋势, GOR 含量略有降低趋势。

2.2 维生素 C 对团头鲂幼鱼肝脏抗氧化指标的影响

由表 2 可知, 随着日粮中维生素 C 添加量的增加, 肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性和抗超氧阴离子(ASAFR)活性呈现先升高后降低的趋势, 其中, 与对照组相比, 65.8、133.7 和 251.5 mg/kg 试验组 SOD 活性显著提高了 28.01%、28.43%和 30.55% ($P<0.05$); 33.4、65.8、133.7、251.5 mg/kg 和 501.5 试验组 ASA 活性显著提高了 48.99%、62.98%、69.09%、48.10%和 41.33% ($P<0.05$)。各组间肝脏中丙二醛(MDA)含量无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 维生素 C 对团头鲂幼鱼肝脏三种 HSPs mRNA 表达水平的影响

由图 1 可知, 随着日粮中维生素 C 添加量的增加, 3 种肝脏 HSPs 基因表达水平均呈先增加后降低的趋势, 其中 HSP90 基因表达最高, HSP60 基因表达次之, HSP70 基因表达最低。与对照组相比, 133.7

和 251.5 mg/kg 试验组肝脏 HSP60 基因表达显著增加了 520.54%、708.72%; 251.5 mg/kg 试验组肝脏 HSP70 基因表达显著增加了 814.59%; 251.5 mg/kg 试验组肝脏 HSP90 基因表达显著增加了 107.12% ($P<0.05$)。

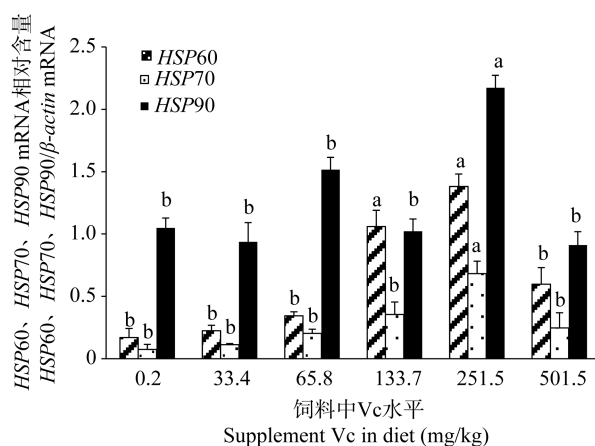


图 1 在饲料中 Vc 添加量对团头鲂幼鱼三种 HSPs mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of various levels of Vc on three HSPs mRNA expression levels in liver of juvenile *M. amblycephala*

2.4 维生素 C 对团头鲂幼鱼感染嗜水气单胞菌后的保护作用

在攻毒试验中, 团头鲂幼鱼都不同程度地表现

出由嗜水气单胞菌引起的典型出血性败血症,如腹部、鳍基部、鳃裂后有充血或出血症状,部分濒死状态的鱼腹部膨大,肛门红肿,解剖后发现腹腔内积水,肠部充血发炎。

团头鲂幼鱼人工注射感染嗜水气单胞菌后,维生素 C 添加组组的成活率在 12h、24h 均显著高于对照组($P<0.05$),其中 24h 时,0.2、33.4、65.8、133.7、251.5 和 501.5 mg/kg 组的存活率依次为:0、38.89%、38.89%、55.56%、61.66%和 55.56%,可以看出 251.5 mg/kg 试验组效果最好(图 2)。

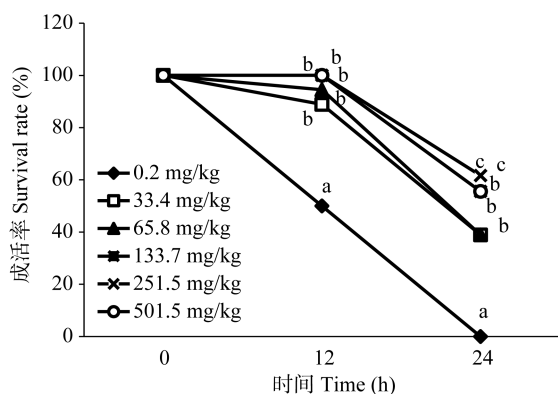


图2 在饲料中 Vc 添加量对团头鲂幼鱼感染嗜水气单胞菌后成活率的影响

Fig. 2 Effects of various levels of Vc on survival rate of juvenile *M. amblycephala* challenged with *A. hydrophila*

3 讨论

3.1 维生素 C 对团头鲂幼鱼血清免疫指标的影响

鱼类是较低等的脊椎动物,体内可能只存在 IgM 一种抗体,且抗体形成期较长,抗体滴度增高缓慢,它特异性免疫机制还很不完善^[21]。因此,非特异性免疫防御机制是鱼类抵抗病原的第一道屏障,在维持鱼类机体健康和抗病原防御中具有更为重要的作用^[22]。除了 SOD 等抗氧化指标外,血清中碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)和补体等也是重要的非特异性免疫指标,被广泛地用来评价鱼类的健康状况、营养状况以及对环境的适应状况^[23—25]。

其中,ALP 是生物体内的一种重要的代谢调控酶,直接参与磷酸基团的转移和钙磷代谢,在鱼类对营养物质的吸收与利用过程中发挥着重要作用;另外,ALP 能够通过改变病原体的表面结构而增强被侵袭机体对病原体的识别和吞噬能力,有助于提高鱼的抗病力^[26]。血清中 TP 主要包括球蛋白(Glo)和白蛋白(Alb),TP 具有维持血液正常胶体渗透压,维持 pH 恒定,参与运输脂肪酸等物质和保护机体

的作用,也是间接地反映机体非特异性免疫水平的高低、衡量鱼虾类免疫健康与否的重要指标^[24, 25]。在本试验中:日粮中维生素 C 的添加对团头鲂幼鱼血清中 ALP、TP 和 Alb 的含量没有显著的影响,这与 Ren, *et al.*^[26]结果不一致。可能是由于在幼鱼期,ALP、TP 和 Alb 主要参与营养物质的吸收和利用,具体关于其对团头鲂幼鱼的作用机制还有待进一步研究。

研究表明,在捕捉、惊吓、拥挤、温度和盐度等的剧烈变化情况下,血清中皮质醇(COR)水平均有上升趋势^[27—29],因而其常被看作是鱼类应激的灵敏信号^[30]。在本实验中维生素 C 未显著影响团头鲂幼鱼血清中 COR 的含量,这可能是因为在长期慢性刺激过程中,由于鱼类已经适应了某些刺激,所以慢性胁迫对血清中 COR 水平并未产生显著影响^[31, 32]。这与刘海燕等^[33]报道表明饲料中添加维生素 C 对鱼类在正常养殖过程中血清 COR 没有显著影响结果一致。

补体系统广泛参与机体抗微生物防御反应以及免疫调节,而补体 3 (C3)、补体 4 (C4)为补体系统中固有的成分,是体内一组具有酶原活性的球蛋白,存在于体液中,可通过免疫复合物、调理吞噬细胞等机制对机体发挥免疫调节等功能,其水平是衡量体液免疫的重要指标^[34, 35]。Li, *et al.*^[36]、Hardie, *et al.*^[37]、秦启伟等^[38]用维生素 C 分别投喂美洲沙鲶、大麻哈鱼和青石斑鱼,均发现鱼体血清中补体活性明显提高。本实验也表明:与对照组相比,试验组 C3、C4 的浓度显著增加了。这说明维生素 C 在一定程度上提高了血清 C3、C4 的浓度,这有助于增强鱼体的非特异性免疫力。本试验同时发现 C3、C4 的浓度分别在不同维生素 C 添加量达到活力高峰,这表明不同的免疫指标对维生素 C 添加量的反应是不同的;此结果在 Ortuno, *et al.*^[31]对金头鲷、Ai, *et al.*^[8]对大黄鱼的研究中也有类似发现。

3.2 维生素 C 对团头鲂幼鱼肝脏抗氧化指标的影响

动物机体在新陈代谢过程中,活性氧自由基的产生和消除保持着动态平衡。当自由基的生成量超过了细胞的抗氧化消除能力时,将会导致氧化胁迫^[14],氧化机体的脂类、蛋白质、酶和 DNA,最终造成机体损伤^[15—17]。其中丙二醛(MDA)是脂质过氧化物的主要成分,具有很强的生物毒性,会破坏细胞的结构和功能;超氧化物歧化酶(SOD)和抗超氧阴离子

(ASAFR)等组成的抗氧化酶系统可清除过多的自由基,对氧化胁迫的清除、增强吞噬细胞防御能力和机体免疫功能有重要作用^[18]。其中 SOD 是最先与活性氧自由基作用的酶,能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,一直被认为是生物体内最重要的抗氧化酶,在机体自身防御系统和免疫系统中起重要作用^[19]。因此, SOD、ASAFR 和 MDA 可作为机体非特异性免疫指标,来评判免疫剂对机体非特异性免疫力的影响。在本试验中各组间 MDA 活性无显著性差异。Zhou, *et al.*^[19]、谢一荣等^[20]分别比较了不同梯度维生素 C 对军曹鱼和大口黑鲈 SOD 活性的影响,研究结果显示血清中超氧化物歧化酶活性随饲料维生素 C 含量的增加而显著升高,随后有所降低,表明饲料中添加一定量的维生素 C 能显著提高超氧化物歧化酶活性,但添加量应该掌握在一定范围内,过量反而会抑制超氧化物歧化酶活性。本试验结果与上述研究结果一致。各组间 ASAFR 活性与 SOD 活性的变化趋势类似。这说明维生素 C 在鱼体内也能很好地发挥抗氧化作用,维持自由基的产生与消除平衡,保护机体免遭氧化物的损伤。此外,不同剂量的维生素 C 对团头鲂幼鱼的 SOD、ASAFR 活性刺激作用间有差异,这可能是不同剂量维生素 C 对其机体的抗氧化作用不同。

3.3 维生素 C 对团头鲂幼鱼肝脏三种 HSPs mRNA 表达水平的影响

热休克蛋白是鱼类在环境胁迫下的应激指标^[39],其中,热应激蛋白 60 是一个分子伴侣,每个亚基分子量约为 60 kD。在应激条件下, HSP60 在胞质中 HSP70 作用下迅速从胞质中转移到线粒体基质,以修复线粒体基质中的变性蛋白^[40];热应激蛋白 70,能增加机体的自身保护反应,可以清除应激所造成细胞内的异常或变性蛋白质^[41—44];热应激蛋白 90 是平均分子量为 90 kD 的一类热激蛋白,在进化上高度保守,广泛参与了细胞周期和信号传导等重要过程^[45]。它们为维持细胞生存和内环境的稳定起重要作用。明建华等^[46]报道表明了高剂量的维生素 C 能诱导提高鱼体 HSP70 mRNA 的基础表达水平;韩喜彬等^[47]发现在饮水中添加维生素 C 能使小鼠肝脏 HSP70 的表达趋于稳定,对热应激有一定的缓解作用。目前,维生素 C 对鱼类肝脏 HSP60、HSP90 mRNA 表达的影响还未见报道。

本实验也表明团头鲂幼鱼肝脏中 HSP60、HSP70、HSP90 的基因表达模式是都是随着日粮中

维生素 C 添加量的增加呈现先增加后降低的趋势,在 240 mg/kg 试验组达最大值,与对照组相比,120 和 240 mg/kg 试验组显著增加了肝脏 HSP60 基因表达;240 mg/kg 试验组显著增加了肝脏 HSP70 基因表达。这说明在一定维生素 C 添加范围内,维生素 C 能够显著提高肝脏中 HSP60、HSP70、HSP90 基因基础表达水平,从而增强对机体的保护作用^[48,49]。这与以上报道也是基本一致的。本试验同时发现, HSP90 基因表达最高, HSP60 基因表达次之, HSP70 基因表达最低;但是各组间 HSP70 基因表达变化是最大的,这是因为本试验中 HSP70 属于诱导型 HSP70,通常在正常细胞中并不表达或表达量很少,但是在热应激或其他应激原的作用下,则表达迅速增加^[49]。正是由于 HSP70 这种“全或无”的表达特点,所以它是 HSP 中研究最多的一个家族^[50]。

3.4 维生素 C 对团头鲂幼鱼感染嗜水气单胞菌后的保护作用

动物的成活率是其疾病抵抗力高低的综合反映指标,尤其是攻毒后的成活率可以综合反映水生动物的免疫能力^[51]。本实验结果表明,团头鲂感染嗜水气单胞菌后不同程度地表现出典型的出血症状,这与徐磊等^[52]的报道是一致的。本研究发现,各维生素 C 试验组比对照组较迟出现以上病症;攻毒试验也表明,各维生素 C 试验组的成活率在 12h、24h 均显著高于对照组($P < 0.05$),这说明维生素 C 可在一定程度上降低嗜水气单胞菌的危害。在其他的鱼种上也有类似的报道,如文华等^[53]报道饲料中添加高水平维生素 C 能显著提高草鱼感染嗜水气单胞菌后的成活率;Navarre, *et al.*^[54]的研究也表明,在每千克饲料中添加 500 mg 的维生素 C 能显著增加虹鳟感染鳟弧菌(注射或浸泡)后的成活率。同时由于大多数鱼类特异性抗体的产生需要长期的适应并通过产生记忆而形成^[55],因此本试验中添加维生素 C 组团头鲂幼鱼成活率的提高,可能与前文所述,维生素 C 提高了机体超氧化物歧化酶、补体 C、补体 4 的活性以及热应激蛋白的表达有关。

参考文献:

- [1] Ai C X, Chen L Q, Liu X L, *et al.* Effect of dietary vitamin C on the non-specific immunity of *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 249—256 [艾春香, 陈立桥, 刘晓玲, 等. 维生素 C 对中华绒螯蟹非特异性免疫的影响. 水产学报, 2008, 32(2): 249—256]

- [2] Anbarasu K, Chandran M R. Effects of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2001, **11**(4): 347—355
- [3] Ortuno J, Cuesta A, Esteban A, *et al.* Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, **79**: 167—180
- [4] Ai Q H, Mai K S, Zhang C X, *et al.* Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2004, **242**: 489—500
- [5] Lin M F, Shiau S Y. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. *Aquaculture*, 2005, **244**: 215—221
- [6] Fracalossi D M, Allen M E, Yuyama L K, *et al.* Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes [J]. *Aquaculture*, 2001, **192**: 321—332
- [7] Bae J Y, Park G H, Yoo K Y, *et al.* Re-evaluation of the optimum dietary vitamin C requirement in juvenile eel, *Anguilla japonica* by using L-Ascorbyl-2-monophosphate [J]. *Asian-australasian Journal of Animal Sciences*, 2012, **25**(1): 98—103
- [8] Ai Q H, Mai K S, Tan B P, *et al.* Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**: 327—336
- [9] Song X H, Cai C F, Pan X F. Determining the vitamin C requirement of allogynogenetic silver crucian carp with growth and non-specific immunity [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, **26**(4): 351—356 [宋学宏, 蔡春芳, 潘新法. 用生长和非特异性免疫力评定异育银鲫维生素 C 需要量. 水产学报, 2002, **26**(4): 351—356]
- [10] Li G F, Qian P F, Sun J J, *et al.* Effects of vitamin C on Cellular activities and serum factors of *Claris fuscus* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, **44**(5): 75—78 [李桂峰, 钱沛峰, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶细胞活性和血清因子的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2005, **44**(5): 75—78]
- [11] Eo J, Lee K J. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, **25**(5): 611—616
- [12] Xie J, Liu B, Zhou Q L, *et al.* Effects of anthraquinones extract from *rhubarb* *R. officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Aquaculture*, 2008, **281**: 5—11
- [13] Tang Y K, Jia Y Y. The processing method study of real-time PCR data [J]. *Biotechnology*, 2008, **18**(3): 89—91 [唐永凯, 贾永义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨. 生物技术, 2008, **18**(3): 89—91]
- [14] Sun Y Y, Yin Y, Zhang J F, *et al.* Bioaccumulation and ROS generation in liver of freshwater fish, goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No. 1 exposure [J]. *Environmental Toxicology*, 2007, **22**(3): 256—263
- [15] Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau J C, *et al.* Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**(11): 3972—3980
- [16] Stobrawa K, Lorene P G. Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra* L.) and cottonwood (*Populus deltoids* Bartr.) in a heavy-metal-polluted environment [J]. *Plant and Soil*, 2007, **298**(1): 57—68
- [17] Yu X G, Gu J D. Accumulation and distribution of trivalent chromium and effects on hybrid willow (*Salix matsudana* Koidz × *Salix alba* L.) metabolism [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, **52**(4): 503—511
- [18] He F L, Xiang J G, Li C J, *et al.* Preliminary study on the effect of water temperature on hematology indices of rainbow trout [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(3): 363—369 [何福林, 向建国, 李常健, 等. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. 水生生物学报, 2007, **31**(3): 363—369]
- [19] Zhou Q C, Wang L G, Wang H L, *et al.* Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, **32**(6): 969—975
- [20] Xie Y R, Wu R Q, Xie J, *et al.* Effect of dietary vitamin C on growth and non-specific immunity in largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, **22**(4): 249—254 [谢一荣, 吴锐全, 谢骏, 等. 维生素 C 对大口黑鲈生长与非特异性免疫的影响. 大连水产学院学报, 2007, **22**(4): 249—254]
- [21] Tang M, Ma G Z, Xu J. Advances in research of fish immunology [J]. *Immunological Journal*, 2002, **18**(3): 112—116 [唐玫, 马广智, 徐军. 鱼类免疫学研究进展. 免疫学杂志, 2002, **18**(3): 112—116]
- [22] Jian J C, Wu Z H. Effects of Chinese herbal medicine on non-specific immunity of Jian common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2002, **17**(2): 114—119 [简纪常, 吴灶和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响. 大连水产学院学报, 2002, **17**(2): 114—119]
- [23] Affonso E G, Silva Eda C, Tavares-Dias M, *et al.* Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinx (*Brycon amazonicus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, **147**(2): 383—388
- [24] Holland M C, Lambris J D. The complement system in teleosts [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, **12**(5): 399—420

- [25] Polstra K, Bakker W W, Klok P A, *et al.* Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase *in vivo* [J]. *American Journal of Pathology*, 1997, **151**(4): 1163—1169
- [26] Ren T J, Shunsuke K, Manabu I, *et al.* Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Aquaculture*, 2007, **267**: 31—37
- [27] Sun L T, Chen G R, Chang C F. Acute responses of blood parameters and comatose effects in salt-acclimated tilapia exposed to low temperatures [J]. *Journal of Thermal Biology*, 1995, **20**(3): 299—306
- [28] Fevolden S E, Roed K H, Fjalestad K T. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness [J]. *Aquaculture*, 2003, **216**: 67—76
- [29] Liu B, Wang M Y, Xie J, *et al.* Effects of acute cold stress on the biochemical, immune parameter and level of HSP70 gene expression in liver of GILT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Ecology*, 2011, **31**(14): 1—9 [刘波, 王美姝, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化、免疫以及肝脏 HSP70 基因表达的影响. 生态学报, 2011, **31**(14): 1—9]
- [30] Hsieh S L, Chen, Y N, Kuo C M. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation [J]. *Aquaculture*, 2003, **220**: 903—918
- [31] Procarione L S, Barry T P, Malison J A. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout [J]. *North American Journal of Aquaculture*, 1999, **61**: 91—96
- [32] Ruane N M, Komen H. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 2003, **218**: 685—693
- [33] Liu H Y, Lei W, Zhu X M, *et al.* Effects of different dietary vitamin C levels on Chinese longsnout catfish (*Leiostomus xanthurus* Gunther) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(4): 682—689 [刘海燕, 雷武, 朱晓鸣, 等. 饲料中不同维生素 C 含量对长吻鲢的影响. 水生生物学报, 2009, **33**(4): 682—689]
- [34] Holland M C H, Lambris J D. The complement system in teleosts [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, **12**(5): 399—420
- [35] Ellis A. E. Immunity to bacteria in fish [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1999, **4**(9): 291—308
- [36] Meng H, Li, Michael R, Johnson, Edwin H, Robinson. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection [J]. *Aquaculture*, 1993, **117**(3-4): 303—312
- [37] Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture*, 1991, **95**(3-4): 201—214
- [38] Qin Q W, Wu Z H, Zhou Y C, *et al.* Non-specific immunomodulatory effects of dietary vitamin C on grouper *Epinephelus awoara* [J]. *Tropic Oceanology*, 2000, **19**(1): 58—63 [秦启伟, 吴灶和, 周永灿, 等. 饲料维生素 C 对青石斑鱼的非特异性免疫调节作用. 热带海洋, 2000, **19**(1): 58—63]
- [39] Iwama G K, Afonso L O B, Todgham A A, *et al.* Are hsp's suitable for indicating stressed states in fish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, **207**: 15—19
- [40] Hideaki I, Atsushi K, Hiroshi O, *et al.* Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, **269**(23): 5931—5938
- [41] Lindquist S, Craig E A. The heat shock proteins [J]. *Annual Review of Genetics*, 1988, **22**: 631—677
- [42] Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, *et al.* Heat shock protein expression in fish [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1998, **8**(1): 35—56
- [43] Forsyth R B, Candido E P M, Babich S L, *et al.* Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1997, **9**: 18—25
- [44] Encomio V G, Chu F L. Characterization of heat shock protein expression and induced thermotolerance in *P. marinus* parasitized eastern oysters: lab and field studies [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, **23**: 289—290
- [45] Wang W, Vinocur B, Shoseyou O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, **9**(5): 244—252
- [46] Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin, vitamin C and their combination on growth, physiological and biochemical parameters, disease resistance and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, **34**(9): 1447—1459 [明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂生长、生理生化指标、抗病原感染以及两种 HSP70s mRNA 表达的影响. 水产学报, 2010, **34**(9): 1447—1459]
- [47] Han X B, Xie J Z, Ba C F, *et al.* Effects of vitamin C on the liver HSP70 mRNA and protein expression of under heat stress [J]. *Shandong Medical Journal*, 2011, **51**(8): 42—44 [韩喜彬, 谢建中, 巴彩凤, 等. 维生素 C 对热应激小鼠肝脏 HSP70 mRNA 及蛋白表达的影响. 山东医药, 2011, **51**(8): 42—44]
- [48] Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1 [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, **13**(4): 2486—2496
- [49] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular

- chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, **61**(1): 243—282
- [50] Huang H F, Ma F. The molecular evolution of heat shock protein [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, **43**(z 1): 166—170 [黄慧芳, 马飞. 热激蛋白的分子进化研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**(z 1): 166—170]
- [51] Erdal J L, Evensen O, Kaustad O K, *et al.* Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) after feeding various levels of ascorbic and omega-3 fatty acids [J]. *Aquaculture*, 1991, (98): 363—379
- [52] Xu L, Liu B, Xie J, *et al.* Effect on mannose oligosaccharides on growth performance, immunity and HSP70 expression of juvenile crucian carps (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(4): 656—664 [徐磊, 刘波, 谢骏, 等. 甘露寡糖对异育银鲫生长性能、免疫及 HSP70 基因表达的影响. 水生生物学报, 2012, **36**(4): 656—664]
- [53] Wen H, Yan A S, Yong W Y, *et al.* Effect of dietary vitamin C on immunity and disease resistance of Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Feed Industry Magazine*, 2005, **26**(18): 56—59 [文华, 严安生, 雍文岳, 等. 饲料维生素 C 水平对草鱼的免疫功能和抵抗病菌感染的影响. 饲料工业, 2005, **26**(18): 56—59]
- [54] Navarre O, Halver J E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C [J]. *Aquaculture*, 1989, **79**: 223—224
- [55] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carrier in fish: application to aquaculture [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, **2**: 281—307

EFFECTS OF DIETARY VITAMIN C ON THE NON-SPECIFIC IMMUNITY, THREE HSPs mRNA EXPRESSION AND DISEASE RESISTANCE OF JUVENILE WUCHANG BREAM (*MEGALOBrama AMBLYCEPHALA*)

WAN Jin-Juan^{1,2}, LIU Bo^{1,2}, GE Xian-Ping^{1,2}, XIE Jun^{1,2}, CUI Su-Li^{1,2} and ZHOU Ming^{2,3}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A 90-day feeding trial was conducted to determine the effects of vitamin C on the non-specific immunity, three HSPs mRNA expression and disease resistance of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) [initial mean body weight of (6.40±0.05) g]. The fish was selected and randomly divided into six groups and Vc supplemented at 0.2, 33.4, 65.8, 133.7, 251.5 and 501.5 mg/kg diet, respectively. The fish was fed for 90 day. Compared with the control, the contents of serum C3 of the 501.5 mg/kg Vc group were increased, the contents of serum C4 of the 133.7 mg/kg Vc group were improved; the hepatic SOD activities of 65.8—251.5 mg/kg Vc groups were enhanced and the hepatic ASAFR activities of all treated groups were enhanced; the expression level of HSP60 mRNA of 133.7 and 251.5 mg/kg Vc groups were improved, the expression levels of HSP70 and HSP90 mRNA of 251.5 mg/kg Vc group were significantly improved ($P<0.05$); the survival rates in all treated groups were significantly higher than that of the control at 12 h and 24 h after injecting *Aeromonas hydrophila* ($P<0.05$), and the survival rate of the 251.5 mg/kg Vc group was the highest. Other indices, such as total protein, albumin, serum cortisol and MDA were not significantly different from the control ($P>0.05$). Therefore, the basal diet supplemented with 133.7—251.5 mg/kg doses of Vc could improve the immunity of juvenile Wuchang bream effectively.

Key words: Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*); Vitamin C; Non-specific immunity; Three HSPs mRNA expression; Disease resistance