

DOI: 10.11758/yykxjz.20161207002

http://www.yykxjz.cn/

卢霞, 栾生, 曹宝祥, 郝登春, 孟宪红, 曹家旺, 代平, 罗坤, 孔杰. 凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对 WSSV 敏感性的差异分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 83–89

Lu X, Luan S, Cao BX, Hao DC, Meng XH, Cao JW, Dai P, Luo K, Kong J. Investigation on the susceptibility difference to WSSV between ammonia tolerant and sensitive *Litopenaeus vannamei* populations. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 83–89

凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对 WSSV 敏感性的差异分析*

卢霞^{1,2} 栾生^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 郝登春^{1,2,3} 孟宪红^{1,2}
曹家旺^{1,2} 代平^{1,2} 罗坤^{1,2} 孔杰^{1,2①}

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界范围内举足轻重的水产养殖品种,在普遍的高密度养殖活动及环境恶化的情况下,逆境胁迫是影响其养成率的主要因素之一,其中,高浓度氨氮胁迫是最普遍的毒理因子。由于对虾抗病性状的遗传力较低,且在受限于测试场地的低选择强度情况下,抗病选育的进展比较缓慢。而对虾的抗逆性具有较高的遗传力,且不具备传染性的特点使得其不受测试场地的限制。因此,本研究以氨氮急性胁迫应激敏感群体(SP)和耐受群体(TP)为实验材料,对其进行白斑综合征病毒(WSSV)敏感性差异分析,首次探索了通过提高对虾对逆境急性胁迫应激的耐受性,从而间接提高其抗病力的可能性。本研究每个群体设 3 个处理:高浓度氨氮胁迫下(10 mg/L)WSSV 感染组,两群体分别命名为 SPAV 和 TPAV;正常海水条件下(氨氮水平小于 0.01 mg/L)WSSV 感染组,分别命名为 SPV 和 TPV;正常海水条件无 WSSV 感染组(空白对照组),分别命名为 SPC 和 TPC。结果显示,SP 群体(5 h)在 WSSV 感染后开始死亡的时间显著早于 TP 群体(16 h);从感染 60 h 后,SPAV 组的死亡率呈直线上升趋势,到 137 h 时该组全部死亡,其累积死亡率显著高于 SPV(70.42%)和 TP 群体的 2 个组 TPAV(42.67%)和 TPV(18.99%)($P < 0.05$)。在 144 h 实验结束时,SPV 的累积死亡率为 73.67%,显著高于 TP 群体的 2 个组 TPAV(46.15%)和 TPV(18.99%)以及 SP 群体的对照组 SPC(34.79%);此时,TPAV 组的累积死亡率显著高于 TPV 和 TPC 组($P < 0.05$),而 TPV 与 TPC 组间无显著差异。研究表明,逆境毒理因子(氨氮胁迫)会增加对虾对病原的敏感性,而且对氨氮急性胁迫应激耐受力高的群体对病毒的抵抗力也高。本研究为探索提高对虾抗病力而降低养殖过程中的死亡率提供了新的思路和途径。

* 国家自然科学基金青年基金项目(31302179)、泰山学者良种工程项目、山东省重点研发计划项目(2016GSF115030)和中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022016006)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31302179), Taishan Scholar Program for Seed Industry, Key Research and Development Project of Shandong Province (2016GSF115030) and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016006)]. 卢霞, E-mail: luxia@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-12-07, 收修改稿日期: 2017-02-06

关键词 凡纳滨对虾; 急性胁迫应激; 白斑综合征病毒(WSSV); 耐受群体; 敏感群体
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0083-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾,是世界上产量最高的对虾种类之一,在我国年产量高达 158 万 t(农业部渔业渔政管理局, 2015),占世界对虾总产量的 45%(FAO, 2015)。因其具有广盐性、生长快、高抗病性、适合高密度养殖等特点,成为了半集约化和集约化养殖的最佳选择,是最受欢迎的养殖品种之一(Lu *et al.*, 2015)。然而,目前凡纳滨对虾养殖中普遍采用的集约化或半集约化养殖模式常常会导致水质恶化,来自恶化水质中的毒理因子的胁迫应激作用致使在对虾养殖中出现高死亡率现象,严重影响了对虾的产量和质量(Alagappan *et al.*, 2010)。在众多毒理因子中,氨氮超标是最普遍的现象之一,其在多种对虾中被检测到具有致死作用,包括凡纳滨对虾、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)等(Cobo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1991; 冉繁华等, 1991; Wajsbro *et al.*, 1990; Ostrensky *et al.*, 1995)。除了对对虾有直接的致死作用外,氨氮胁迫还会抑制对虾的免疫系统并增加其对病原的敏感性(Liu *et al.*, 2004),而且在贝类和鱼类中也发现了相同现象(Cheng *et al.*, 2004; Hurvitz *et al.*, 1997)。然而,随着人类活动范围和影响深度的逐渐扩大,加上多变的气候和全球变暖的趋势,使得水产养殖环境不断恶化。因此,探索培育对环境胁迫应激具有较高耐受性的优良对虾品种,将可能成为降低死亡率和病原感染率的有效办法。我们已经对核心育种群体的氨氮急性胁迫应激的耐受性进行了遗传评估,其较高的遗传力(0.575)表明,凡纳滨对虾的抗逆性可通过选育得到快速的改良(Lu *et al.*, 2017a)。

环境毒理因子会对对虾养殖业造成一定的影响,病害问题更是制约其可持续发展的一个重要因素,如白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)。WSSV 是造成养殖对虾死亡的重要病毒(朱卫卫等, 2015),给全球对虾养殖业带来了巨大的经济损失(Verbruggen *et al.*, 2016)。为了控制疾病的发生,减少经济损失,诸多学者探究 WSSV 的防治措施(曹家旺等, 2017)。然而,迄今尚未找到可有效控制 WSSV 的方法。本团队通过遗传选育的方式对中国对虾开展了十几代的抗 WSSV 选育,极大地提高了感染 WSSV 对虾的存活时间,但对虾抗病性状遗传力较低,选育

进展缓慢(Gitterle *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2017b)。另外,由于病原感染测试的传播性、测试场地紧缺,受试个体感染实验耗时耗力且很难达到同时感染的大规模测试要求,使得选择强度不够高,进一步延缓了选育进程。若通过提高对虾对逆境胁迫的耐受性能来间接提高其抗病力,将会加快对虾抗病力选育的进程、克服抗病测试受场地限制的问题、降低对人力和物力的需求。目前,对虾对逆境胁迫应激的耐受性与对病原的抵抗力之间的关系尚不清楚。因此,本研究利用氨氮急性胁迫应激测试获得耐受群体和敏感群体,开展凡纳滨对虾对氨氮急性胁迫应激的耐受性与 WSSV 抗性之间的关系,探索对虾对逆境急性胁迫应激的耐受性与对病原抵抗力的关系,研究结果将对培育抗逆抗病优良新品种具有指导作用。

1 材料与方法

1.1 氨氮急性胁迫应激测试

实验所用材料来源于在 2011 年启动的凡纳滨对虾育种项目核心群体的第 5 代,参与测试的共 94 个家系,这些家系构建于 2016 年 6 月。为了测试此核心群体对急性毒理胁迫带来的应激抗逆能力,利用 94 个全同胞家系对其进行高浓度氨氮胁迫测试,对虾平均体重为 0.5 g,平均体长为 3.77 cm。测试实验于河北省黄骅市鑫海水产生物技术有限公司进行,由于实验时对虾太小无法进行物理标记,因此,从每个家系中随机选取 40 尾对虾,置于容量为 100 L 的独立白色桶中。测试条件为氨氮浓度 34 mg/L,实验期间 pH 为 8.05,温度为(27.0±0.5)℃,盐度为 30, 24 h 充气。实验期间,每隔 1 h 收集 1 次死虾,判定对虾死亡的标准为失去平衡、侧躺于桶底、对外界刺激无反应。在整个实验期间,每小时的初期利用捞网捞取死亡对虾,并且记录每个个体的家系编号、体长和死亡时间。每日投喂 2 次(06:00、22:00)配合饲料(日投饵量占对虾总体重的 3%),吸污 1 次。为了保持家系间的测试环境一致,整个实验期间各个桶之间的环境维持一致。在实验开始后的第 72 小时,胁迫测试实验结束。

1.2 WSSV 感染测试群体

氨氮急性胁迫应激测试实验结束后,根据每个家

系的平均存活时间对其进行排序。在家系间体长无显著差异的前提下, 从中分别挑选 5 个存活时间较长和 5 个存活时间较短的家系组成耐受群体(TP)和敏感群体(SP), 用于 WSSV 感染测试。

1.3 WSSV 毒饵的制备

取甲壳有明显白斑、濒死的对虾, 实时荧光定量 PCR 检测肌肉中 WSSV 拷贝数, 制成病毒载量为 10^7 copies/mg 的毒饵。在充分预冷的组织匀浆机中搅匀, 加入可食用红色素, 制成混合均匀、颜色醒目的毒饵, 毒饵制备过程在低温环境中快速进行, 并置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.4 WSSV 人工饲喂感染

当 TP 群体和 SP 群体每个家系的对虾个体的平均体重达到 3 g 左右时, 进行 VIE 荧光标记, 以便于混养测试。标记完成、暂养恢复后, 运回中国水产科学研究院黄海水产研究所, 暂养 4 d, 每日投喂 2 次 (06:00、22:00) 配合饲料 (日投饵量占对虾总体重的 3%), 期间利用吸污器将养殖整理箱中的水排出, 添加应激灵后补充干净海水。暂养后, 从每个家系中选取大小相近的 50 尾虾, 用于 WSSV 感染测试。每个群体设置 3 个处理水平: ①高浓度氨氮水平 (10 mg/L) 下 WSSV 感染组, TP 群体和 SP 群体的命名分别为 TPAV 和 SPAV; ②正常海水条件下 (氨氮水平小于 0.01 mg/L) WSSV 感染组, TP 群体和 SP 群体的命名分别为 TPV 和 SPV; ③正常海水无 WSSV 感染的空白对照组, TP 群体和 SP 群体的命名分别为 TPC 和 SPC。

每个家系平均分在 6 个 200 L 的塑料整理箱, 即每个处理有 2 个平行。饲喂毒饵前, 对虾饥饿处理 24 h, 保证其胃肠排空。用 WSSV 毒饵进行单尾人工口饲感染, 将制备的毒饵置于冰上, 用镊子夹取等量的毒饵 (约 10 mg) 轻轻送至对虾口器处, 待抱食后的对虾胃部出现明显的红色, 将其放到装有海水的整理箱。1 h 内完成所有个体的毒饵饲喂工作。根据预实

验结果, 选取 1 周内不会导致对虾显著死亡的氨氮浓度 (10 mg/L), 在 TPAV 和 SPAV 组的整理箱内同时加入 NH_4Cl , 使总氨氮浓度为 10 mg/L。实验期间, pH 为 7.8, 温度为 27°C , 盐度为 30, 24 h 充气, 进行正常的日常管理, 正常投饵、换水, 观察对虾死亡情况。利用同样的方式每隔 1 h 收集 1 次死虾, 记录每个个体的颜色号 (用于区别家系)、体重和死亡时间。为了保持家系间的测试环境一致, 整个实验期间各个桶之间的环境尽量保持一致。

1.5 数据统计及分析

以存活时间和家系半致死存活率为指标, 评价家系对氨氮胁迫的耐受能力。个体存活时间是从胁迫开始到死亡的时间 (h), 家系存活时间是家系内所有个体的平均存活时间 (h), 家系半致死存活率是全部测试个体死亡 50% 时各个家系的存活率 (SS_{50})。以存活率作为 2 个群体的 WSSV 抵抗力高低的指标。采用 SAS 软件对数据进行相关描述性统计分析, 利用 R 绘制箱线图, 利用 SPSS19.0 软件对数据进行其他统计分析。

2 结果

2.1 核心群体氨氮急性胁迫应激耐受能力

本研究中共有 3688 个个体参与高浓度氨氮急性胁迫实验, 氨氮胁迫后的个体水平和家系水平的存活时间以及家系半致死存活率见表 1。结果显示, 在个体水平上, 个体间的存活时间表现出较大的差异, 最短存活时间为 2.00 h, 最大存活时间为 78.00 h, 平均存活时间为 36.61 h; 在家系水平上, 家系间的平均存活时间同样表现出较大的差异, 存活时间最短的为 15.63 h, 最长的为 64.56 h; 无论在个体水平还是在家系水平, 存活时间的标准差和变异系数均较大, 且个体水平的变异系数 (46.90%) 比家系水平 (28.50%) 高出近一倍。家系间半致死存活率同样表现出较大的差异, 最小存活率是 0, 最大是 94.87%, 且变异系数较高 (54.71%)。由图 1 可见, 无论是家系存活率 SS_{50}

表 1 氨氮急性胁迫后存活时间和家系半致死存活率
Tab.1 The survival time and survival rate at half lethal time (SS_{50}) after acute ammonia stress

指标 Indices		均值 Mean	最小值 Minimum	最大值 Maximum	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient variation
存活时间 Survival time (h)	个体水平 Individuals (3688 尾)	36.61	2.00	78.00	17.17	46.90
	家系水平 Families (94)	36.61	15.63	64.56	10.44	28.50
半致死存活率 SS_{50} (%)	家系水平 Families (94)	50.63	0	94.87	27.70	54.71

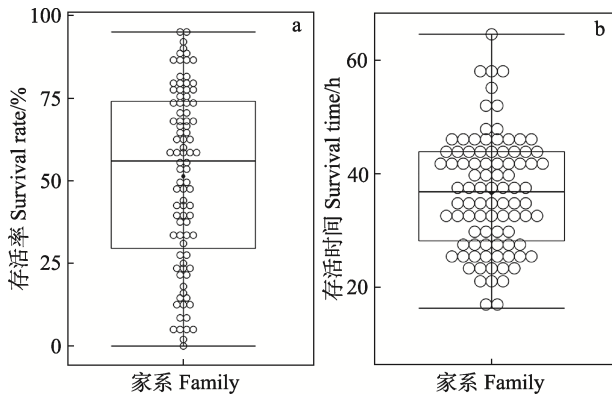


图1 家系半致死存活率 SS_{50} (a)及平均存活时间(b)

Fig.1 The survival rate at half lethal time (SS_{50}) (a) and the average survival time of the families (b)

25%、50%、75%的家系分别组成了箱子的下、中、上线；最小值、最大值和观测值分别为-、-和○
The 25th (up line), median (inside line) and 75th (bottom line) percentiles of the families were plotted as boxes. The minimum, maximum, and the observed values were shown as -, -, and ○, respectively

(图1a)还是家系平均存活时间(图1b)，家系间的差异都比较大，表明家系间在氨氮急性胁迫耐受力方面具有较大的选育潜力，获得的氨氮耐受性差异较大的2个群体为WSSV感染测试提供了较为理想的材料。

2.2 氨氮敏感群体和耐受群体存活差异

根据平均存活时间对所有家系进行排序，结合半致死存活率，从性能表现的两个极端分别选取5个家系组成敏感群体和耐受群体(表2)。结果显示，敏感家系的存活时间范围是20.13~27.33 h，显著低于耐受家系的51.21~64.56 h；敏感家系的半致死存活率范围是2.38%~17.78%，显著低于耐受家系的86.36%~94.87%。由这10个家系组成的敏感群体和耐受群体用于后续

表2 氨氮敏感群体和耐受群体的存活时间和半致死存活率

Tab.2 The survival time and survival rate at half lethal time of the ammonia sensitive and tolerant families

家系类型 Family types	平均存活时间 Average survival time (h)	半致死存活率 率 SS_{50} (%)
敏感家系 Sensitive family	20.13	5.26
	23.02	2.38
	23.36	7.69
	25.24	4.76
	27.33	17.78
耐受家系 Tolerant family	51.21	89.74
	55.13	87.50
	57.66	86.36
	57.79	86.84
	64.56	94.87

的WSSV感染测试。

2.3 WSSV感染后敏感群体和耐受群体存活差异

氨氮耐受群体(TP)和敏感群体(SP)在3个处理水平下的存活水平见表3，实验结束时每个处理最终的存活率见图2。结果显示，SP群体在WSSV感染后的5 h开始出现死亡，而TP群体在WSSV感染后出现死亡的时间较晚，约为感染后的16 h。实验结束时，SPAV的存活率显著低于SPV和SPC，同样地，TPAV的存活率显著低于TPV和TPC。SPAV在137 h时全部死亡，而此时TPAV的平均存活率为57.33%，而且在144 h实验结束时的存活率仍然高达53.85%，显著高于SPAV，但显著低于TPC($P<0.05$)。在正常海水条件下WSSV感染后，SPV在实验结束时的平均存活率为26.32%，显著低于SPC($P<0.05$)；此时TPV的存活率为81.01%，显著高于SPV($P<0.05$)，而且与TPC之间无显著差异。表明氨氮急性胁迫应激会增加对虾对病毒的敏感性，而且对氨氮急性胁迫应激耐受力高的群体对WSSV的抵抗力也高。

表3 WSSV感染后氨氮敏感群体和耐受群体的存活水平

Tab.3 The survival level of the ammonia sensitive and tolerant families post WSSV challenge

组别 Groups	起始数 Starting number (ind.)	存活数 (存活率) Survival number (Survival rate) (%)	最小 存活时间 Minimum survival time (h)	最大 存活时间 Maximum survival time (h)
SPAV	77	0 (0) ^a	5	137
SPV	76	20 (26.32) ^b	5	Alive
TPAV	78	42 (53.85) ^c	18	Alive
TPV	79	64 (81.01) ^d	16	Alive
SPC	71	46 (65.22) ^{cd}	14	Alive
TPC	72	53 (73.61) ^d	16	Alive

注：不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters showed significant differences between groups ($P<0.05$)

2.4 WSSV感染后累积死亡率的差异

SP群体和TP群体的3个处理在实验期间不同时间的累积死亡率见图3。实验开始40 h内，各个组间的累积死亡率无显著差异；随着实验进行，在60 h后SPAV组的死亡率呈直线上升趋势，到137 h时该组个体全部死亡，其累积死亡率显著高于SPV(70.42%)、TPAV(42.67%)、TPV(18.99%)和SPC(34.78%)($P<0.05$)。在整个实验期间，TPAV、TPV、TPC和SPC的死亡率比较平缓，SPV在40~100 h期间死亡率急剧上升，在100 h后开始趋于平缓；在144 h实验结束时，SPV

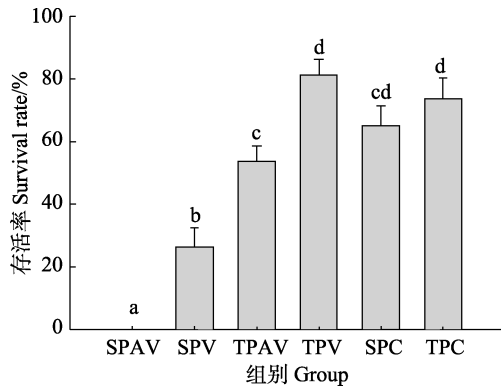


图 2 氨氮耐受和敏感群体感染 WSSV 144 h 的存活率
Fig.2 The survival rate of the ammonia tolerant and ammonia sensitive populations at 144 h post WSSV challenge

不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)
Different letters showed significant differences between groups ($P<0.05$)

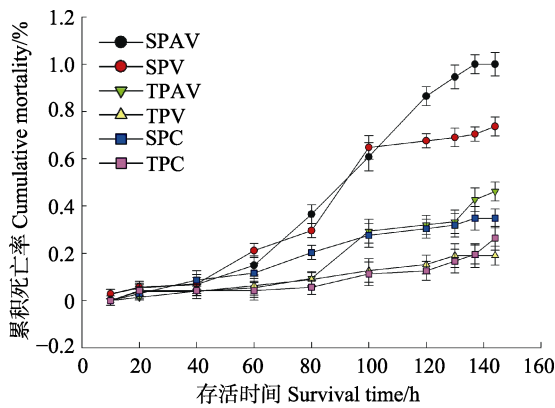


图 3 各组别感染后对虾累积死亡率
Fig.3 Cumulative mortality of infected shrimp of the groups from the two populations

的累积死亡率为 73.67%，显著低于 SPAV 组，但显著高于 TPAV(46.15%)、TPV(18.99%)和 SPC(34.79%) ($P<0.05$)；此时，TPAV 组的累积死亡率显著高于 TPV 和 TPC 组($P<0.05$)，而 TPV 与 TPC 组间无显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

本研究中，无论氨氮急性胁迫应激耐受群体还是敏感群体，在氨氮急性胁迫应激条件下 WSSV 感染组的死亡率显著高于正常海水条件下 WSSV 感染组(图 2, 图 3)，表明养殖水环境中的氨氮胁迫会增加对虾对病原的敏感性，进而带来较高死亡率，与前期的研究报道一致。Liu 等(2004)利用 0、1、5、10、20 mg/L 浓度的氨氮胁迫凡纳滨对虾 120 h 内，不同浓度氨氮处理间的累积死亡率无显著差异，而且 0~20 mg/L 浓度的氨氮不会影响溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的生

长。在 0.01 (对照)、1.10、5.24、11.10、21.60 mg/L 浓度氨氮的条件下进行弧菌感染测试时，当感染 48~168 h 后，氨氮胁迫组的死亡率显著高于对照组，而且死亡率随着氨氮浓度升高和胁迫时间的延长逐渐升高，表明氨氮胁迫会抑制对虾的免疫防御功能，增加宿主对病原的敏感性。Cheng 等(2004)在 0.01 (对照)、1.12、3.22、5.25、10.18 mg/L 浓度氨氮的条件下对鲍鱼(*Haliotis diversicolor supertexta*)进行副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后，鲍鱼的累积死亡率随着氨氮浓度的升高显著增加，当弧菌感染 12 h 后，氨氮浓度为 3.22 mg/L 处理组的死亡率显著高于 1.12 mg/L 处理组及对照组，表明氨氮胁迫会增加鲍鱼对病原的敏感性，死亡率增加。另外，Lu 等(2016)利用来自同一家系的个体进行比较转录组分析，揭示氨氮急性胁迫应激对凡纳滨对虾毒理作用的分子机制，结果显示，应答氨氮胁迫的 6 条 KEGG 通路中有 5 条与免疫防御功能有关，而且被显著富集到 GO 类别和 KEGG 通路的绝大多数基因(75%)与免疫功能相关，这些被影响的基因的表达变化基本会降低对虾的免疫防御功能，这从分子水平证明了氨氮胁迫会抑制对虾的免疫防御功能。

既然氨氮胁迫会抑制对虾的免疫防御功能、增加其对病原的敏感性，而且已明确凡纳滨对虾的氨氮耐受性具有较高的遗传力(0.575)，那么能否通过提高凡纳滨对虾的氨氮急性胁迫应激的耐受性而间接地提高其抗病力呢？本研究的结果给予了肯定的答案。由于所在课题组的技术和材料的优势，本研究对遗传多样性丰富的凡纳滨对虾核心群体的氨氮急性胁迫的耐受性进行了遗传评估，结果显示，家系间对氨氮急性胁迫应激的耐受性存在较大的差异(表 1、图 1)，基于评估结果获得了氨氮急性胁迫耐受群体和敏感群体，为本研究的 WSSV 敏感性差异分析提供了重要的材料。通过对 2 个群体进行 WSSV 感染测试发现，氨氮急性胁迫耐受性高的群体同样对 WSSV 的抵抗力也高。本研究将有助于解决由于抗病测试场地匮乏、耗时耗力而抗病选育进展缓慢的问题。本研究由于场地和样本量的限制，仅设置 2 个平行；由于密度相对较高，1 天 1 次的换水也无法保证正常海水条件处理的氨氮水平一直维持在安全范围；另外，由于残食现象，导致部分个体的缺失。以上几个原因会导致本研究的结果在一定程度上偏离真实值，但仍然具有一定的参考价值。在未来的研究中，将继续利用已有的耐受群体和敏感群体，增加平行设置并扩大水体，进行进一步的验证工作，并逐步增加对其他病原开展感染测试来证实其普遍性。

参 考 文 献

- Alagappan KM, Deivasigamani D, Somasundaram ST, *et al.* Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Current Microbiology*, 2010, 61(4): 235–240
- Cao JW, Kong J, Luo K, *et al.* Immune priming response induced by heat-inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* at different temperature. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 128–136 [曹家旺, 孔杰, 罗坤, 等. 热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在不同温度下的免疫致敏反应. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 128–136]
- Chen JC, Lei SC. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1990, 21(4): 300–306
- Chen JC, Lin CY. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991, 100(3): 466–482
- Chen JC, Lin CY. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1992, 156(1): 139–148
- Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(3): 193–202
- Cobo MDL, Sonnenholzner S, Wille M, *et al.* Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 2014, 45(3): 470–475
- FAO. FAO fishery and aquaculture statistics yearbook. 2015
- Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2015 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2015]
- Gitterle T, Johansen H, Erazo C, *et al.* Response to multi-trait selection for harvest weight, overall survival, and resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2007, 272(1): S262
- Hurvitz A, Bercovier H, Rijn JV. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 1997, 7(1): 45–53
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(3): 321–334
- Lu X, Kong J, Luan S, *et al.* Transcriptome analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under acute ammonia stress. *PLoS One*, 2016; 11(10): e0164396
- Lu X, Luan S, Cao BX, *et al.* Estimation of genetic parameters and genotype-by-environment interactions related to acute ammonia stress in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles at two different salinity levels. *PLoS One*, 2017a, 12(3): e0173835
- Lu X, Luan S, Cao BX, *et al.* Heterosis and heritability estimates for the survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under the commercial scale ponds. *Acta Oceanologica Sinica*, 2017b, 36(2): 62–68
- Lu X, Luan S, Luo K, *et al.* Genetic analysis of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Heterosis and heritability for harvest body weight. *Aquaculture Research* 2015, 47(11): 3365–3375
- Ostrensky A, Wasielesky Jr W. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 1995, 132(3–4): 339–347
- Ran FH, Chen JC. Lethal effect of ammonia to juvenile *Metapenaeus ensis*. *Journal of Taiwan Fishery Society*, 1991, 18(1): 41–46 [冉繁华, 陈建初. 氨对沙虾(*Metapenaeus ensis*)幼虾之致死影响. *台湾水产学会会刊*, 1991, 18(1): 41–46]
- Verbruggen B, Bickley LK, van Aerle R, *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses*, 2016, 8(1): 23–52
- Wajsbrodt N, Krom MD, Samocha TM, *et al.* Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1990, 9(4): 497–504
- Zhu WW, Qiu DQ, Gan Z, *et al.* Antivirus effects of *Vibrio alginolyticus* peptidoglycan on *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2015, 35(6): 40–46 [朱卫卫, 邱德全, 甘桢, 等. 溶藻弧菌肽聚糖对凡纳滨对虾白斑综合征病毒的抑制作用. *广东海洋大学学报*, 2015, 35(6): 40–46]

(编辑 马瑾艳)

Investigation on the Susceptibility Difference to WSSV between Ammonia Tolerant and Sensitive *Litopenaeus vannamei* Populations

LU Xia^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, CAO Baoxiang^{1,2}, HAO Dengchun^{1,2,3}, MENG Xianhong^{1,2},
CAO Jiawang^{1,2}, DAI Ping^{1,2}, LUO Kun^{1,2}, KONG Jie^{1,2}^①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The deterioration of water quality from the intensive culture system and environmental pollution are common problems in the practical farming of *Litopenaeus vannamei*. The toxicity from deteriorating water, such as ammonia accumulation, has lethal effect on shrimp and can increase the susceptibility to pathogens, which might cause frequent high mortality in the period of early stage of *L. vannamei* cultured in the farms. The high heritability of acute ammonia stress in *L. vannamei* (0.575) indicated its ammonia tolerance could be improved largely by selection. However, the genetic gain of the disease resistance is very slow in shrimp because of the low heritability of disease resistance traits and low selection intensity by the limitation of pathogen infection test. To explore and improve the ability of disease resistance, we performed the WSSV infection test with ammonia-sensitive population (SP) and ammonia-tolerant population (TP) under ammonia stress (10 mg/L), named SPAV and TPAV, the normal ammonia level (<0.01 mg/L), named SPV and TPV, and no ammonia stress without WSSV infection as the control group (<0.01 mg/L), named SPC and TPC. The results showed that SP started to die at 5 h after WSSV infection, which was significantly earlier than that of TP (about 16 h). The mortality rate of SPAV increased rapidly after 60 h and reached 100% at 137 h, which was significantly higher than SPV (70.42%), TPAV (42.67%), and TPV (18.99%). The cumulative mortality rate of SPV was 73.67% at 144 h, which was significantly lower than SPAV, but significantly higher than TPAV (46.15%), TPV (18.99%) and SPC (34.79%). The cumulative mortality rate of TPAV at 144 h was significantly higher than TPV and TPC, but there was no significant difference between TPV and TPC. These results indicated that ammonia stress increases the susceptibility to pathogens, and that the population with high ammonia tolerance have high WSSV disease resistance, which will provide new ideas to improve the disease resistance and reduce mortality.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Acute ammonia stress; White spot syndrome virus (WSSV); Ammonia-tolerant population; Ammonia-sensitive population

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn