

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170216001

http://www.yykxjz.cn/

冯亚萍, 孔杰, 罗坤, 栾生, 李旭鹏, 史晓丽, 曹家旺, 王明珠, 王军, 董丽君, 孟宪红. 不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑综合征病毒(WSSV)耐受性比较. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 120–127

Feng YP, Kong J, Luo K, Luan S, Li XP, Shi XL, Cao JW, Wang MZ, Wang J, Dong LJ, Meng XH. The difference of tolerance to white spot syndrome virus between *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* at different temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 120–127

不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑 综合征病毒(WSSV)耐受性比较*

冯亚萍^{1,2,3} 孔 杰^{1,2} 罗 坤^{1,2} 栾 生^{1,2} 李旭鹏^{1,2} 史晓丽^{1,2}
曹家旺^{1,2,3} 王明珠^{1,2,3} 王 军^{1,2,3} 董丽君^{1,2,3} 孟宪红^{1,2}①

(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 本研究分别对凡纳滨对虾“壬海 1 号”(*Litopenaeus vannamei* “Renhai No.1”)和中国明对虾“黄海 2 号”(*Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”)在 3 种温度条件下(24℃、28℃和 32℃), 采用单尾定量口饲感染白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的方法进行感染实验, 比较 2 种对虾在不同温度情况下对 WSSV 的耐受性差异(L 代表凡纳滨对虾, F 代表中国明对虾)。结果显示, L-24℃和 F-24℃组的平均存活时间分为(184.05±69.56) h 和(101.68±38.45) h; L-28℃和 F-28℃组的平均存活时间分别为(100.25±26.79) h 和(73.38±22.22) h, 相同温度组内均存在显著性差异($P<0.05$); 截至第 15 天, L-32℃和 F-32℃组的存活率分别为 45.74%和 23.47%。3 个温度组对虾在 50%的死亡率时的存活时间分别为 178 h 和 98 h、98 h 和 74 h、292 h 和 78 h; 死亡高峰时间分别为第 5 天和第 4 天、第 5 天和第 4 天、第 10 天和第 4 天。另外, 分别在感染后的 12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、15 d 共 9 个时间点对每组对虾进行活体取样, 利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对其进行病毒载量检测, 从对虾体内肌肉组织病毒载量的角度探寻不同对虾抗病性能的差异。6 d 时, L-24℃和 F-24℃组对虾肌肉内病毒载量分别达到(2.97×10⁶±7.44×10⁶)和(8.08×10⁶±3.22×10⁶) copies/ng DNA, 差异极显著($P<0.01$), L-28℃和 F-28℃组分别达到(6.73×10⁶±1.49×10⁶)和(1.20×10⁷±6.15×10⁵) copies/ng DNA, 差异极显著($P<0.01$); 15 d, L-32℃和 F-32℃组分别达到(5.18×10³±4.32×10³)和(3.78×10⁴±8.97×10³) copies/ng DNA, 差异显著($P<0.05$)。研究表明, 2 种对虾在 3 种温度环境下感染 WSSV 后, 凡纳滨对虾耐受 WSSV 能力要高于中国明对虾; 不同温度下同

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017001)、国家自然科学基金(41676148)、泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS(20603022017001), National Natural Science Foundation of China (41676148), Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System (CARS-48)]. 冯亚萍, E-mail: 505390349@qq.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-16, 收修改稿日期: 2017-03-10

种对虾肌肉体内 WSSV 的增殖能力从强到弱依次为 28℃组、24℃组和 32℃组。

关键词 凡纳滨对虾; 中国明对虾; 不同温度; 白斑综合征病毒(WSSV); 耐受性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0120-08

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是迄今对虾养殖业危害最大的一种病毒。其具有很强的感染力, 被感染对虾在 3~10 d 内的死亡率高达 100%, 致使全球对虾养殖业遭受了巨大的经济损失(薛晖等, 2010; Cavalli *et al.*, 2008)。为了解和控制疾病的发生, 减少经济损失, 诸多学者投身于对虾 WSSV 的研究中, 探究 WSSV 的防治措施(闫冬春, 2006)。然而, 这些方法都不能有效控制 WSSV 的大规模暴发(Verbruggen *et al.*, 2016)。病毒的大量增殖以及疫情大规模暴发受许多因素的影响, 包括传播媒介、宿主种类以及外界环境等, 其中, 温度与白斑综合征发生密切相关(李侃等, 2013)。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)在人工注射感染 WSSV 后, 其病毒复制的时间和抵抗力存在明显差异(孙成波等, 2006)。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)人工感染 WSSV 后, 日本囊对虾的存活时间长于中国明对虾(Jiang *et al.*, 2006)。盖春雷等(2013)研究发现, 在人工投喂感染 WSSV 后, 中国明对虾比日本囊对虾的发病时间早并且发病率高。本文研究凡纳滨对虾与中国明对虾在不同温度条件下人工感染 WSSV 后的存活时间、累积死亡率以及对虾肌肉内的病毒载量变化情况, 以期阐明不同温度条件下这 2 种对虾抗 WSSV 性能的差异, 可为实践中优化养殖条件和选育策略, 以及为减少和控制对虾疾病的暴发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在中国水产科学研究院黄海水产研究所对虾性状测试车间进行。实验所用凡纳滨对虾群体来自河北海壬水产种业科技有限公司, 为凡纳滨对虾新品种“壬海 1 号”; 中国明对虾群体来自青岛海水养殖引种育种中心的“黄海 2 号”。选取凡纳滨对虾平均体长和体重约为 48.99 mm 和 1.34 g, 中国明对虾平均体长和体重约为 38.82 g 和 0.41 g, 数量均为 1200 尾。实验用水为经砂滤的自然海水, 海水盐度为 30±1。养殖水箱体积为 130 L, 保证 24 h 充气。实验前暂养 8 d, 每日投喂 3 次(06:00、14:00、22:00)配合饲料(日投饵量占对虾总体重 3%~5%), 吸污 1 次, 换水 1 次

(约为 50%)。实验前 2 种对虾各随机抽取 3 尾对虾经绝对实时荧光定量 RT-PCR 检测其体内 WSSV 病毒载量, 结果均为阴性。文中 L 代表凡纳滨对虾, F 代表中国明对虾。

1.2 WSSV 毒饵的制备

取甲壳有明显白斑、发病濒死的对虾肌肉组织, 并加入可食用红色素, 在充分预冷的组织匀浆机中搅拌, 制成混合均匀、颜色醒目的毒饵。其制备过程须在低温环境中快速进行, -80℃冰箱保存。经实时荧光定量 PCR 检测毒饵 WSSV 拷贝数, 毒饵病毒载量为 1×10^6 copies/mg。

1.3 分组及管理

凡纳滨对虾与中国明对虾各设置 3 个温度环境(24℃、28℃和 32℃), 每个温度各设置 3 个平行实验组和 1 个空白对照组, 每组各 100 尾。实验前暂养期间, 海水自然温度为 24℃, 28℃和 32℃组均用加热棒进行升温, 每天升温 0.5℃, 直至各组水温均达到实验所需温度, 并且每日均用相应温度的海水分别进行换水处理。

1.4 人工饲喂感染

饲喂毒饵前, 对虾饥饿处理 6 h, 保证其胃肠排空, 用 WSSV 毒饵进行人工口饲感染。分别将不同实验组的虾捞出放入单独容器中, 将新鲜制备的毒饵置于冰上, 用镊子夹取毒饵(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, 将其放回养殖水箱; 对照组饲喂经检验为 WSSV 阴性的健康对虾肌肉。饲喂完毕后, 正常投饵、换水, 观察对虾死亡情况。

1.5 样品采集及处理

实验开始分别在 12、24、48、72、96、120、144、168 h 共 8 个时间点活体取样, 每组各取 3 尾对虾肌肉组织用于检测其病毒载量。第 15 天, 在 32℃组再各取 3 尾对虾肌肉组织(24℃和 28℃两组对虾已全部死亡), 并置于-80℃保存, 实验共进行 15 d。

1.6 WSSV 载量检测方法

取 8 个时间点的各组对虾肌肉组织按照王伟继

(2008)的方法进行 DNA 提取。DNA 经 1%的琼脂糖凝胶电泳,利用凝胶成像系统(BioImaging Systems)检测其完整性,使用微量紫外分光光度计(Biodropsis BD-2000)测定 DNA 质量及浓度,并将其稀释至 40 ng/ μ l。WSSV 载量测定采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法(Durand *et al.*, 2002),目标片段长度为 69 bp,引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。荧光定量 PCR 反应体系(20 μ l): 1 \times Premix Ex TaqTM (Probe qPCR)、正反向引物各 0.25 μ mol/L(表 1)、ROX Reference Dye II 0.25 μ mol/L、探针 0.125 μ mol/L、病毒 DNA 模板 2 μ l,灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 34 s; 共 40 个 PCR 循环。以本实验室自行制备含有目的片段的重组质粒 pUCm-T/WSSV69 为标准品,将 WSSV 标准品进行 10 倍系列梯度稀释,共 7 个梯度,分别为(1.02 \times 10³)~(1.02 \times 10⁸) copies/ μ l,无菌双蒸水作为阴性对照,每个稀释度设置 3 个平行,用作阳性对照及标准曲线的构建。每个 DNA 样品平行检测 3 次,取其平均值作为该样品的 WSSV 载量。

表 1 实验所用引物

Tab.1 PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
WSS probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA
WSS1011F	TGGTCCCCTCCTCATCTCAG
WSS1079R	GCTGCCTTGCCGAAATTA

1.7 数据统计及分析

从实验出现第 1 尾对虾死亡开始,每隔 1 h 进行观察,捞出死亡对虾并记录其死亡时间、组别、体长和体重,装入取样管并放置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中,直至实验结束。统计感染 WSSV 后每组对虾的平均存活时间,结果表示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)。采用 SPSS

19.0 软件和 Origin 9.0 进行数据统计分析,并用单因素方差(One-way ANOVA)分析对虾平均存活时间和体内肌肉组织病毒载量的差异。

2 结果

2.1 WSSV 感染后对虾各性状描述性统计

经 WSSV 感染后,2 种对虾 24 $^{\circ}$ C 组和 28 $^{\circ}$ C 组死亡率均为 100%。L-24 $^{\circ}$ C 组和 F-24 $^{\circ}$ C 最大存活时间分别为 324 h 和 214 h, L-28 $^{\circ}$ C 和 F-28 $^{\circ}$ C 最大存活时间分别为 198 h 和 130 h, 2 种对虾 28 $^{\circ}$ C 组最大存活时间均小于 24 $^{\circ}$ C 组;而 L-32 $^{\circ}$ C 和 F-32 $^{\circ}$ C 截至实验结束,均有存活对虾,存活率分别为 45.74%和 23.47%。24 $^{\circ}$ C 组和 28 $^{\circ}$ C 组中凡纳滨对虾最大存活时间均长于中国明对虾;在 32 $^{\circ}$ C 组中,凡纳滨对虾存活率大于中国明对虾(表 2)。

2.2 WSSV 感染后各组对虾到达不同死亡率的时间

L-24 $^{\circ}$ C 和 F-24 $^{\circ}$ C、L-28 $^{\circ}$ C 和 F-28 $^{\circ}$ C 和 L-32 $^{\circ}$ C 和 F-32 $^{\circ}$ C 各组到达死亡率为 10%的时间分别为 108 h 和 48 h、68 h 和 38 h、128 h 和 38 h;到达死亡率为 50%的时间分别为 178 h 和 98 h、98 h 和 74 h、292 h 和 78 h。在相同温度、相同死亡率时,凡纳滨对虾的存活时间均大于中国明对虾。

凡纳滨对虾和中国明对虾到达相同死亡率时的时间,28 $^{\circ}$ C 组均小于 24 $^{\circ}$ C 组和 32 $^{\circ}$ C 组。中国明对虾 32 $^{\circ}$ C 组到达不同死亡率时的时间均小于 24 $^{\circ}$ C 组(图 1)。

2.3 WSSV 感染后各组对虾不同时间段死亡尾数

在 24 $^{\circ}$ C 组中, L-24 $^{\circ}$ C 组和 F-24 $^{\circ}$ C 组第 2 天死亡尾数分别为 4 尾和 23 尾; F-24 $^{\circ}$ C 组第 3 天死亡尾数较高,第 4 天达到死亡高峰,为 56 尾; L-24 $^{\circ}$ C 组前 4 d 死亡尾数一直较少,到第 5 天出现死亡高峰,为

表 2 凡纳滨对虾和中国明对虾经 WSSV 感染后各性状描述性统计

Tab.2 The characteristics of *L. vannamei* and *F. chinensis* after WSSV infection

项目 Items	24 $^{\circ}$ C		28 $^{\circ}$ C		32 $^{\circ}$ C	
	L	F	L	F	L	F
平均体长 Mean length (mm)	50.49	39.16	49.91	38.81	46.57	38.49
平均体重 Mean weight (g)	1.49	0.47	1.36	0.37	1.16	0.39
最大存活时间 Max survival time (h)	324	214	198	130	/	/
最小存活时间 Min survival time (h)	24	28	24	28	32	28
平均存活时间 Mean survival time (h)	184.05 \pm 69.56	101.68 \pm 38.45 ^b	100.25 \pm 26.79 ^b	73.38 \pm 22.22 ^a	/	/
存活率 Survival rate (15 d) (%)	0	0	0	0	45.74	23.47

注:不同的字母表示组间显著性差异($P < 0.05$)

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

33 尾; F-24℃组从第 5~8 天死亡数量持续下降, 至第 9 天全部死亡; L-24℃组第 6~9 天死亡数量持续保持较高的水平(平均值约为 25 尾), 第 10 天迅速下降, 到第 15 天全部死亡(图 2 上)。

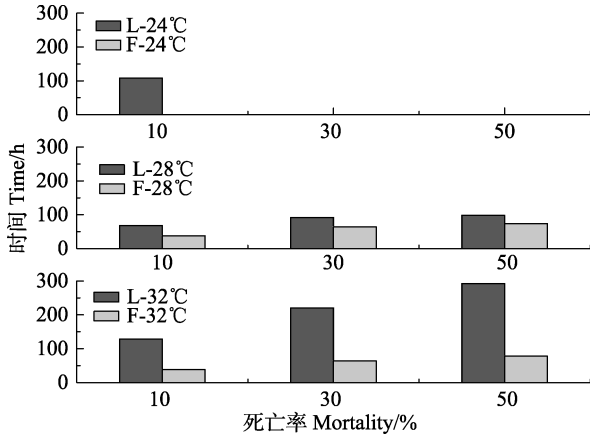


图 1 不同温度下 2 种对虾 WSSV 感染后到达不同累积死亡率的时间

Fig.1 The time vs mortality of two shrimps after the WSSV infection at different temperature

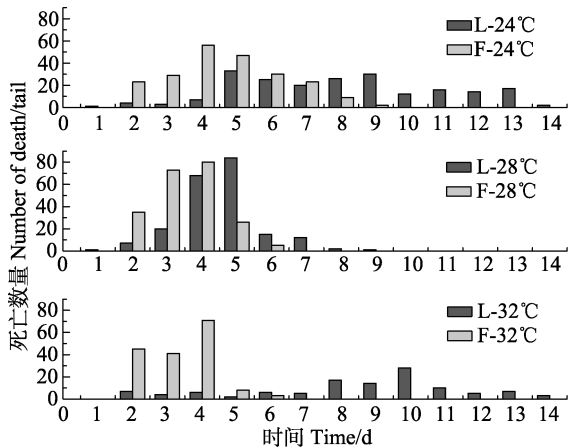


图 2 WSSV 感染后不同时间段对虾死亡数量

Fig.2 The time point vs death of shrimps after the WSSV infection

在 28℃组中, L-28℃组和 F-28℃组第 2 天死亡尾数分别为 7 尾和 35 尾; F-28℃组第 3 天死亡尾数急剧上升, 到第 4 天达到死亡高峰, 为 80 尾; L-28℃组第 3 天死亡尾数急剧上升, 到第 5 天达到死亡高峰, 为 84 尾; 第 6 天 2 组死亡尾数均迅速下降, L-28℃组到第 7 天全部死亡, F-28℃组到第 10 天全部死亡(图 2 中)。

在 32℃组中, L-32℃组从第 1~7 天的死亡尾数保持较低水平, 第 8 天开始上升, 到第 10 天达到死亡高峰, 为 28 尾; F-32℃组死亡尾数从第 2 天迅速

上升, 到第 4 天达到死亡高峰, 为 71 尾, 第 7 天后无死亡对虾(图 2 下)。

2.4 WSSV 感染后各组对虾累积死亡率

在 24℃组中, L-24℃组和 F-24℃组在 3 d 时累积死亡率分别为 3.81%和 24.06%;8 d 时分别达到 56.57%和 99.00%; 2 组分别在 14 d 和 9 d 累积死亡率达到 100%。在 28℃组中, L-28℃组和 F-28℃组在 3 d 时累积死亡率分别为 13.36%和 49.32%; 5 d 时分别达到 85.74%和 97.54%; 2 组分别在 9 d 和 6 d 累积死亡率达到 100%。在 32℃组中, L-32℃组和 F-32℃组在 3 d 时累积死亡率分别为 5.21%和 39.23%; 4 d 分别达到 8.07%和 71.51%; 到 14 d 时, 2 组累积死亡率分别为 54.26%和 76.53%(图 3)。

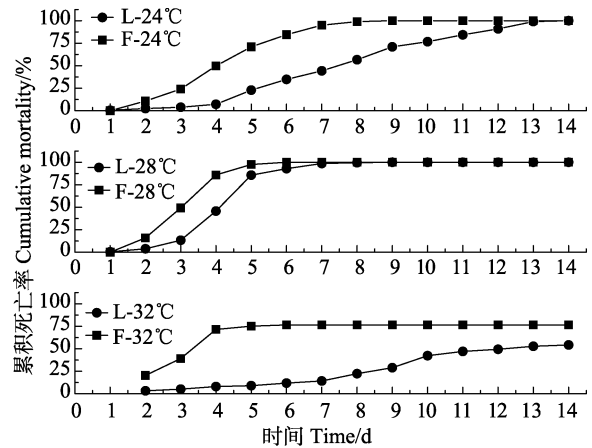


图 3 WSSV 感染后对虾累积死亡率

Fig.3 The cumulative mortality of shrimps after the WSSV infection

2.5 WSSV 感染后各组对虾肌肉组织内病毒载量

在 24℃组中, L-24℃组和 F-24℃组在 24 h 之前对虾肌肉组织病毒载量分别为 $(8.61 \times 10^2 \pm 1.08 \times 10^3)$ 和 $(9.74 \times 10^1 \pm 6.70 \times 10^1)$ copies/ng DNA; 2 d 时, L-24℃组为 $(8.12 \times 10^2 \pm 1.01 \times 10^3)$ copies/ng DNA, F-24℃组已达到 $(2.45 \times 10^6 \pm 2.92 \times 10^6)$ copies/ng DNA, 2 组差异显著($P < 0.05$); 至 6 d, 2 组分别达到 $(2.97 \times 10^6 \pm 7.44 \times 10^6)$ 和 $(8.08 \times 10^6 \pm 3.22 \times 10^6)$ copies/ng DNA, 差异极显著($P < 0.01$)。

在 28℃组中, L-28℃组和 F-28℃组在 24 h 对虾肌肉组织病毒载量分别为 $(1.65 \times 10^2 \pm 1.92 \times 10^2)$ 和 $(1.23 \times 10^3 \pm 1.73 \times 10^3)$ copies/ng DNA, 2 组差异不显著($P > 0.05$); F-28℃组在 2 d 首先达到 $(1.51 \times 10^6 \pm 2.49 \times 10^6)$ copies/ng DNA, L-28℃组在 4 d 达到 $(4.40 \times 10^6 \pm 2.31 \times 10^6)$ copies/ng DNA; 至 6 d, L-28℃组和 F-28℃

组分别达到 $(6.73 \times 10^6 \pm 1.49 \times 10^6)$ 和 $(1.20 \times 10^7 \pm 6.15 \times 10^5)$ copies/ng DNA, 2组差异极显著($P < 0.01$)。

在32℃组中, L-32℃组和F-32℃组在前48 h对虾肌肉组织病毒载量较低; F-32℃组在3 d首先达到 $(5.53 \times 10^4 \pm 4.78 \times 10^4)$ copies/ng DNA; L-32℃组5 d达到 $(1.04 \times 10^4 \pm 1.12 \times 10^4)$ copies/ng DNA; 至15 d, L-32℃组和F-32℃组分别为 $(5.18 \times 10^3 \pm 4.32 \times 10^3)$ 和 $(3.78 \times 10^4 \pm 8.97 \times 10^3)$ copies/ng DNA, 2组差异显著($P < 0.05$) (图4)。

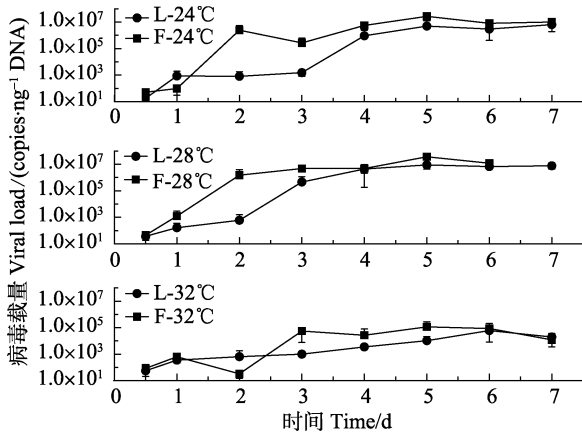


图4 WSSV感染后对虾肌肉组织病毒载量变化
Fig.4 The change of viral load in muscle tissue of shrimps after WSSV infection

3 讨论

在感染对虾的众多病原中, WSSV 的危害最为严重(Escobedo-Bonilla *et al*, 2007)。研究不同种类对虾对 WSSV 的敏感性, 对于虾的遗传选育有重要意义(刘庆慧等, 2005)。现已有中国明对虾和日本囊对虾(盖春蕾等, 2013)、凡纳滨对虾和斑节对虾(Wongtavatchai *et al*, 2010)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)、凡纳滨对虾(戚兰等, 2003)、中国明对虾和凡纳滨对虾(冯亚萍等, 2017)以及不同家系的中国明对虾(董世瑞等, 2015)对疾病的敏感性差异研究。

3.1 对虾自身特点

宿主对 WSSV 的敏感性和抵抗力因种而异, 如 WSSV 引起印度对虾(*Penaeus indicus*)、斑节对虾、巨掌沼虾(*Macrobrachium superbum*)100%死亡率的时间分别为感染后的72 h、48 h、5 d 和 8 d, 而罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在注射感染 WSSV 15 d 后没有死亡(Sahul Hameed *et al*, 2000)。吴仲庆等(2003)研究表明, 日本囊对虾和凡纳滨对虾在感染 WSSV 后 20 d 的累积死亡率分别是 100.00%和

83.33%, 存在统计学差异。Syed 等(2006)研究表明, 通过对波纹龙虾(*Panulirus homarus*)和锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)肌肉注射相同剂量的 WSSV 病毒粒子, 其达到 100%累积死亡率的时间分别是 168 h 和 120 h。李素红等(2007)研究表明, 即使同一种属不同家系之间的中国明对虾, 对 WSSV 的敏感性也存在较大差异。黄永春等(2013)对凡纳滨对虾进行 WSSV 感染实验, 发现不同家系的对虾对 WSSV 的抗性不同。本研究中, 凡纳滨对虾和中国明对虾对 WSSV 的耐受性存在差异, 其在平均存活时间、累积死亡率和对虾体内病毒载量均存在显著差异。

3.2 选育效果

90 年代以前, 我国北方对虾养殖品种主要是中国明对虾。2001 年后, 由于凡纳滨对虾性状优良, 在我国沿海养殖规模迅速扩大, 成为我国对虾养殖的绝对优势种(黄永春等, 2013)。本研究所用凡纳滨对虾是中国水产科学研究院黄海水产研究所与青岛海壬水产种业科技有限公司合作, 培育出生长优势显著、存活率高的凡纳滨对虾"壬海 1 号"。其平均存活时间长, 各时间点累积死亡率低, 并且随着实验时间的延长其肌肉内病毒载量增殖速度慢。而中国明对虾是采用群体、家系与多性状复合育种技术, 培育出中国明对虾养殖新品种(品种登记号: GS01-002-2008)。其表现出明显的抗病性, 能有效阻止 WSSV 的感染规模以及感染进程(逢锦菲等, 2013)。作者曾就中国明对虾抗病新品种"黄海 2 号"与中国明对虾野生群体进行抗 WSSV 性能实验, "黄海 2 号"与之相比表现出了明显的抗病优势, 在一定程度上说明中国明对虾的选育工作取得了一定的进步和成果。通过抗病良种选育, 可提高对虾的免疫机能和抗病能力, 是有效预防对虾白斑病的重要措施之一(纪荣兴等, 2008)。

3.3 不同温度环境对 WSSV 增殖以及对对虾耐受性的影响

对虾白斑综合征的暴发与水温密切相关(Withyachumnarnkul *et al*, 2003)。Rahman 等(2007)研究水温变化(27℃、33℃)对斑节对虾幼体感染 WSSV 的影响, 发现 33℃组死亡率很低。You 等(2010)分析了高温(31℃)对感染 WSSV 的日本对虾幼体和成体的死亡率、免疫反应和病毒复制的影响, 发现 31℃能大幅度降低死亡率(与 27℃相比), 高温组对虾成体的 PO 活性、血细胞总数与未感染对虾无显著差异($P > 0.05$), 证实高温抑制病毒复制, 而不是提高对虾免疫反应。吴晓果等(2012)研究表明, 高水温($\geq 32^\circ\text{C}$)

能不同程度地降低和减缓对虾白斑综合征引起的死亡。李侃等(2013)通过研究环境温度与病毒增殖速度的相关性, 得出高温(33℃)对病毒的增殖具有一定的抑制作用, 并且明显改变了病毒基因的转录。

本研究中, 凡纳滨对虾 24℃组和 28℃组最大存活时间分别为 324 h 和 214 h, 中国明对虾分别为 198 h 和 130 h, 28℃组最大存活时间均小于 24℃组(表 2)。3 个温度组中, 2 种对虾 28℃组死亡高峰时的尾数均大于 24℃和 32℃, 并且均最先达到 100%的累积死亡率(图 2 和图 3)。至第 15 天时, 2 种对虾 24℃组和 28℃组累积死亡率均为 100%, 而 32℃组依然有 45.74% 和 23.47%的对虾存活。从对虾肌肉内病毒载量的增殖情况来看, 凡纳滨对虾 24℃组和 28℃组病毒载量最大值为 6.40×10^6 和 8.94×10^6 copies/ng DNA, 32℃组为 6.04×10^4 copies/ng DNA; 中国明对虾 24℃组和 28℃组病毒载量最大值为 2.71×10^7 和 3.67×10^7 copies/ng DNA, 32℃组为 1.15×10^5 copies/ng DNA(图 4)。综上所述, 3 组温度相比较, 28℃组最大存活时间最短、病毒复制速度最快; 32℃组 15 d 后依然有存活对虾, 且病毒复制水平低, 表现出对 WSSV 增殖速度的抑制, 减缓了白斑综合征引起的死亡。

3.4 体型规格对对虾抗病性的影响

本研究所使用的 2 种对虾由于其对生长季节的要求不同等原因, 致使相同时间段凡纳滨对虾与中国明对虾相比规格较大, 其平均体长相差约 1.02 cm。黄旭雄等(2006)研究不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平, 表明实验用中国明对虾的免疫水平与体长或体重基本无关。董世瑞等(2015)研究不同家系中国对虾形态性状与抗病力的关系, 表明体长、全长和体重均不是影响各家系对虾感染 WSSV 存活时间的主要相关性状。而李优等(2016)对 3 种规格凡纳滨对虾抗 WSSV 进行了初步研究, 表明其具有规格越大抗 WSSV 性能越弱的趋势。凡纳滨对虾规格相对较大, 而表现出的抗 WSSV 性能与中国明对虾相比较强, 推断 2 种对虾完全相同规格的情况下, 凡纳滨对虾对 WSSV 的耐受性更强。

3.5 对虾的争胜行为

通过观察实验, 发现中国明对虾的争胜行为要强于凡纳滨对虾, 并且温度越高, 对虾间相互啃食现象越严重。张沛东等(2008)通过研究中国明对虾和凡纳滨对虾仔虾的行为, 发现中国明对虾仔虾自残行为高发, 攻击频率高; 凡纳滨对虾仔虾自残现象少, 攻击频率低。李玉全(2014)研究发现, 日本囊对虾的争斗

性行为发生的概率随着温度的升高而增加。赵玉超等(2016)研究发现, 凡纳滨对虾个体在密度越高的环境下争斗次数越高。本研究中, 中国明对虾 32℃组前期残食现象严重, 死亡数量较多; 随着密度的减小, 死亡数量逐渐减少。

本研究中, 2 种对虾在 3 种温度条件下感染 WSSV 后, 凡纳滨对虾耐受 WSSV 能力要高于中国明对虾, 凡纳滨对虾选育群体“壬海 1 号”在人工感染 WSSV 条件下表现出了较好的抗病性能, 为我国对虾抗病良种选育工作提供有价值的参考。

参 考 文 献

- Cavalli LS, Marins LF, Netto S, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, southern Brazil. *Atlantica*, Rio Grande, 2008, 30(1): 45–52
- Dong SR, Lü YF. Path analysis of effects of morphometric traits on resistance to WSSV among different families in *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2015, 5(2): 15–21 [董世瑞, 吕瑜峰. 不同家系中国对虾形态性状与抗病力的关系. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(2): 15–21]
- Durand SV, Lightner DV. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381–389
- Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, *et al.* A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 31(1): 1–18
- Feng YP, Kong J, Luo K, *et al.* The comparison of the sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 78–84 [中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)对白斑综合征病毒的敏感性比较. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 78–84]
- Gai CL, Xu L, Ye HB, *et al.* The difference of sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science & Technology Information*, 2013, 40(4): 207–209 [盖春蕾, 许拉, 叶海斌, 等. 中国对虾和日本对虾对白斑综合征病毒(WSSV)敏感性的比较. *水产科技情报*, 2013, 40(4): 207–209]
- Huang XX, Zhou HQ. The innate immune activity of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* with different sizes. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 7–11 [黄旭雄, 周洪琪. 不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 7–11]
- Huang YC, Ai HS, Pan ZC, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for

- resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 359–366 [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性. 水产学报, 2013, 37(3): 359–366]
- Ji RX, Zou WZ, Yan QP, *et al.* Immunogenicity and WSSV resistance of anti-WSSV *Penaeus japonicus* F₃. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1): 98–104 [纪荣兴, 邹文政, 鄢庆彬, 等. 日本对虾抗白斑病子三代的抗白斑综合征病毒感染能力及免疫特性. 水产学报, 2008, 32(1): 98–104]
- Jiang G, Yu R, Zhou M. Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection. Nitric Oxide, 2006, 14(3): 219–277
- Li K, Luo SY, Xu LM, *et al.* A study on the mechanism of temperature impact on the proliferation of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Applied Oceanography, 2013, 32(1): 61–66 [李侃, 罗淑娅, 徐丽美, 等. 温度影响对虾白斑综合征病毒增殖机制的研究. 应用海洋学学报, 2013, 32(1): 61–66]
- Li SH, Zhang TS, Meng XH, *et al.* Analysis of the resistance of heterosis in *Fenneropenaeus chinensis* to natural infection with white spot syndrome virus. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 68–75 [李素红, 张天时, 孟宪红, 等. 中国对虾杂交优势对自然感染白斑综合征病毒的抗病力分析. 水产学报, 2007, 31(1): 68–75]
- Li Y, Chen LZ, Yu XY, *et al.* Preliminary study on resistance to WSSV of three species of *Litopenaeus vannamei*. Shandong Fisheries, 2016(8): 1–4 [李优, 陈禄芝, 余霞艳, 等. 三种规格凡纳滨对虾抗 WSSV 性能的初步研究. 齐鲁渔业, 2016(8): 1–4]
- Li YQ. The relationship with *Penaeus japonicus* winning behavior and temperature. Journal of Jiangsu Agricultural Sciences, 2014(8): 231–232 [李玉全. 日本囊对虾的争胜行为及其与温度的关系. 江苏农业科学, 2014(8): 231–232]
- Liu QH, Huang J, Yang B, *et al.* Changes of immune and biochemical factors in two selected populations of prawn (*Fenneropenaeus chinensis*) infected by white spot syndrome virus. Marine Fisheries Research, 2005, 26(6): 22–27 [刘庆慧, 黄捷, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22–27]
- Pang JF, Kong J, Meng XH, *et al.* Real-time assay for quantifying WSSV load in *Fenneropenaeus chinensis* “Huang hai No.2”. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(3): 782–787 [逢锦菲, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 2 号”人工感染 WSSV 的荧光定量分析. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 782–787]
- Qi L, Ke HF, Zheng CY, *et al.* Studies on immunological factors of *Macrobrachium nipponense* and *Penaeus vannamei*. Journal of Shaoxing University, 2003, 23(10): 65–67 [戚兰, 柯慧芬, 郑春燕, 等. 日本沼虾和南美白对虾免疫因子的比较研究. 绍兴文理学院学报, 2003, 23(10): 65–67]
- Rahman MM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, *et al.* Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 2007, 269(1–4): 107–113
- Sahul Hameed AS, Charles MX, Anilkumar M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. Aquaculture, 2000, 183(3–4): 207–213
- Sun CB, He JG, Li ZL, *et al.* Sensitivity Difference to WSSV of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2006, 26(3): 17–20 [孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较. 广东海洋大学学报, 2006, 26(3): 17–20]
- Syed MS, Sudhakaran R, Balasubramanian G, *et al.* Experimental transmission and tissue tropism of white spot syndrome virus (WSSV) in two species of lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*. Journal of Invertebrate Pathology, 2006, 93(2): 75–80
- Verbruggen B, Bickley L, van Aerle R, *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. Viruses, 2016, 8(1): 23
- Wang WJ. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008, 66–73 [王伟继. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状 QTL 定位. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 66–73]
- Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Chomsoong R, *et al.* Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53(2): 167–171
- Wongtavatchai J, Lópezdóriga MV, Francis MJ. Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 2010, 308(3–4): 75–81
- Wu XG, Xiong HT, Du HH, *et al.* Advances on possible mechanism of hyperthermia inhibition of white spot syndrome in shrimp. Fisheries Science, 2012, 31(9): 568–572 [吴晓果, 熊海涛, 杜华华, 等. 高温抑制对虾白斑综合征的机理研究进展. 水产科学, 2012, 31(9): 568–572]
- Wu ZQ, Lin XG, Miu S, *et al.* The study of sensitivity to the white spot syndrome virus between *Penaeus japonicus* and *Litopenaeus vannamei*. China Fisheries Society National Conference on Seawater Cultured Facilities, 2003 [吴仲庆, 林学国, 缪嵩, 等. 日本囊对虾和凡纳滨对虾对白斑易感程度的比较研究. 中国水产学会全国海水设施养殖学术研讨会, 2003]

- Xue H, Ding ZF, Zhou G, *et al.* Survey and research of the white spot syndrome virus (WSSV) infection in several kinds of economic types of freshwater crustaceans. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010(3): 294–297 [薛晖, 丁正峰, 周刚, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)在几种经济类淡水甲壳动物中的感染与流行调查研究. *江苏农业科学*, 2010(3): 294–297]
- Yan DC. Prevention and cure of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 25(4): 202–204 [闫冬春. 防治对虾白斑综合征病毒(WSSV)的主要措施. *水产科学*, 2006, 25(4): 202–204]
- You XX, Su YQ, Mao Y, *et al.* Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture*, 2010, 305(1): 133–137
- Zhang PD, Zhang XM, Li J, *et al.* Observation of behavior in *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 223–228 [张沛东, 张秀梅, 李健, 等. 中国明对虾、凡纳滨对虾仔虾的行为观察. *水产学报*, 2008, 32(2): 223–228]
- Zhao YC, Qin H, Li YQ, *et al.* Effects of stocking density and food types on growth and agonistic behavior in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(3): 44–48 [赵玉超, 秦浩, 李玉全, 等. 密度和饲料种类对凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 争胜行为和生长的影响. *水产学杂志*, 2016, 29(3): 44–48]

(编辑 冯小花)

The Difference of Tolerance to White Spot Syndrome Virus Between *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* at Different Temperatures

FENG Yaping^{1,2,3}, KONG Jie^{1,2}, LUO Kun^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, LI Xupeng^{1,2}, SHI Xiaoli^{1,2}, CAO Jiawang^{1,2,3}, WANG Mingzhu^{1,2,3}, WANG Jun^{1,2,3}, DONG Lijun^{1,2,3}, MENG Xianhong^{1,2①}

(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 present study evaluated the effects of white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Litopenaeus vannamei* ‘Renhai No.1’ and *Fenneropenaeus chinensis* ‘Huanghai No.2’ at various temperatures (24°C, 28°C, and 32°C) using quantitative feeding method (L represents *L. vannamei*, and F represents *F. chinensis*). The results showed that the average survival time of group L-24°C, F-24°C, L-28°C, and F-28°C was (184.05±69.56) h, (101.68±38.45) h, (100.25±26.79) h, and (73.38±22.22) h, respectively. The survival time between two kinds of shrimps at same temperature was significantly different ($P<0.05$). At the 15th d, the survival rate of group L-32°C and F-32°C was 45.74% and 23.47%, respectively. The time of 50% mortality rate of two shrimps at three temperatures was 178 h and 98 h, 98 h and 74 h, 292 h and 78 h, respectively. The time of death peak of two shrimps among three temperatures was 5 d and 4 d, 5 d and 4 d, 10 d and 4 d, respectively. The virus loads in muscle of L-24°C and F-24°C at 144 h was ($2.97\times 10^6\pm 7.44\times 10^6$) and ($8.08\times 10^6\pm 3.22\times 10^6$) copies/ng DNA with the highly significant difference ($P<0.01$). The virus loads in muscle of L-28°C and F-28°C at 144 h was ($6.73\times 10^6\pm 1.49\times 10^6$) and ($1.20\times 10^7\pm 6.15\times 10^5$) copies/ng DNA with highly significant difference ($P<0.01$). The virus loads of muscle of L-32°C and F-32°C at the 15th d was ($5.18\times 10^3\pm 4.32\times 10^3$) and ($3.78\times 10^4\pm 8.97\times 10^3$) copies/ng DNA with a significant difference ($P<0.05$). These results indicates that *L. vannamei* are more tolerant to WSSV infection than *F. chinensis*, and the ability of multiplication of WSSV in muscle at different temperatures was 28°C>24°C>32°C.

Key words *Litopenaeus vannamei*; *Fenneropenaeus chinensis*; Different temperatures; White spot syndrome virus (WSSV); Tolerance

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn