

盐度变化对携带白斑综合症病毒(WSSV)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的影响*

向 赞¹ 王 刚¹ 叶国锋¹ 陈兆明¹ 杨世平^{1,2} 王成桂¹ 孙成波^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524025; 2. 广东高校热带海产无脊椎动物养殖工程技术研究中心 湛江 524025)

提要 研究盐度渐变和突变对 WSSV 在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)体内增殖的影响。结果表明, 盐度由起始盐度(23 ± 1)往高盐度(32 ± 1)和低盐度(14 ± 1)突变在整个实验中对凡纳滨对虾的累积死亡率和对虾体内病毒增殖的影响显著($P < 0.05$), 先感染 WSSV 实验, 高盐度、起始盐度、低盐度累积死亡率分别为(61.1 ± 10.7)%、(48.9 ± 1.9)%、(63.3 ± 12.0)%, 病毒含量分别为 6.0×10^7 、 3.7×10^6 、 5.3×10^7 copy/g; 后感染 WSSV 实验, 分别为(75.6 ± 3.8)%、(52.2 ± 13.4)%、(63.3 ± 3.3)%; 病毒含量分别为 5.7×10^7 、 2.3×10^6 、 2.8×10^7 copy/g。盐度渐变实验各组至 24h 对虾死亡率低于 18.9%, 48h 出现死亡高峰, 72—96h 存在显著差异($P < 0.05$), 先感染 WSSV 实验, 高盐度、起始盐度、低盐度最大死亡率分别为(75.6 ± 5.1)%、(38.9 ± 5.1)%、(69.3 ± 6.9)%, 病毒含量分别为 7.6×10^7 、 5.3×10^6 、 2.4×10^6 copy/g; 后感染 WSSV 实验分别为(46.7 ± 10)%、(45.6 ± 18.9)%、(74.4 ± 13.9)%; 病毒含量分别为 5.1×10^6 、 4.8×10^5 、 1.0×10^7 copy/g。因此盐度变化会影响对虾的抗病能力, 可造成对虾体内 WSSV 快速增殖; 对携带 WSSV 对虾, 盐度变化会大大提高 WSSV 从潜伏感染转为急性感染的可能, 盐度是引起 WSSV 从潜伏感染转为急性感染的关键影响因子之一。

关键词 盐度; 凡纳滨对虾; 白斑综合症病毒; 实时荧光定量 PCR; 病毒含量

中图分类号 S968 doi: 10.11693/hyhz20140300076

白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是一种对虾高致死性病毒, 其宿主广泛, 传染性强, 感染后出现症状 6—7d 死亡率可达 80%—100%, 造成的危害极大(Momoyana *et al*, 1994)。已使世界 30 多个国家对虾养殖业蒙受巨大损失, 部分地区对虾养殖业濒临绝境, 严重制约了全球对虾养殖业的发展(Tapay *et al*, 1999; Flegel *et al*, 2009), 而在我国 1993 年开始大规模暴发流行。近年很多研究发现引起白斑综合症暴发的原因不仅与虾体的免疫水平、病毒数量、感染方式有关, 还与环境因子密切相关, 例如温度、盐度、pH、氨氮含量等(吴信忠, 2005; 孙成波等, 2006)。如高温或者低温可以抑制 WSSV 在对虾体内增殖(Jiravanichpaisal *et al*, 2004; Du *et al*,

2006; Granja *et al*, 2006)。pH 升高可能提高斑节对虾死亡率(Gunalan *et al*, 2010)。盐度在 1h 内突变大于 4, 会引起中国对虾体内 WSSV 迅速增殖和抗病能力降低(Liu *et al*, 2006)。环境中盐度只有在对虾体液的等渗点附近, 对虾才能保证正常的生理和生长状况。徐丽美等(2001)通过定量 PCR 方法初步将每毫克组织含 10^3 个病毒粒子作为疾病暴发的危险临界值; 何建国等(1999)认为 WSSV 的潜伏期感染具有很大的危害性, 且潜伏期感染转为急性感染受众多气候和水环境因子影响。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国乃至全世界最主要的对虾养殖品种, 本文研究不同盐度变化对感染 WSSV 的凡纳滨对虾的影响, 对其产业的健康可持续发展具有重要意义。

*广东省海洋渔业科技推广专项, A201301D02 号; 广东省良种体系项目, 湛财农[2012]221 号。向赞, 硕士研究生, E-mail: x418312@126.com

通讯作者: 孙成波, 博士, 教授, E-mail: suncb@gdou.edu.cn

收稿日期: 2013-01-15, 收修改稿日期: 2013-06-06

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 健康对虾来源 健康凡纳滨对虾取自广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地, 体长为 (7.71 ± 0.98) cm。实验前随机抽取 10 尾对虾进行荧光定量 PCR 检测, 检测结果为阴性。实验前暂养 5d, 投喂对虾人工配合饵料 2 次/d, 换水 1 次/d, 日换水量接近 100%。

1.1.2 WSSV 粗提液制备 取感染 WSSV 症状明显的凡纳滨对虾, 去除甲壳, 按 1:1 ($W:V$) 加入高盐 PBS, 冰浴中匀浆, 将匀浆液于 4°C、7000r/min 离心 15min; 离心后的上清液加入蔗糖至终浓度为 30% (W/W), 4°C、16000r/min 超速离心 50min, 弃上清, 沉淀用 PBS (pH 7.4) 重悬, 将重悬液用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 分装后 -80°C 冰箱保存。

1.1.3 DNA 模板提取和引物设计 DNA 模板提取方法参照 Sun 等(2013)的方法, PCR 引物参照 You 等(2010)的引物设计, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.4 标准品的制备 参照程晓燕等(2010)的方法制备重组质粒标准品, 用核酸分析仪测定重组质粒的 DNA 浓度, 根据拷贝数公式计算重组质粒的拷贝数。

拷贝数($\text{copy}/\mu\text{L}$) = 质粒浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $\times 10^{-6} \times$ 阿伏加德罗常数 / 重组质粒分子量

式中, 阿伏加德罗常数为 6.02×10^{23} , 重组质粒分子量 = 1 个碱基对的平均分子量(660g/mol) \times 重组质粒的总长度(bp)。

1.2 实验方法

1.2.1 感染方式 本实验采用人工注射感染, 在凡纳滨对虾第 2 腹节与第 3 腹肌之间往心脏方向注射 40 μ L 用 PBS 缓冲液稀释 10^4 倍的病毒粗提液。

1.2.2 盐度变化实验 盐度变化为起始盐度($23 \pm$

1) 往高盐度(32 ± 1) 和低盐度(14 ± 1) 进行突变和渐变, 突变时间为 6h, 渐变时间为 72h; 病毒感染分为变化前和变化后感染两种方式, 实验组和对照组均设置 3 个平行组, 每组对虾各 30 尾; 实验组注射 40 μ L PBS 缓冲液稀释 10^4 倍的病毒粗提液, 对照组注射 40 μ L PBS 缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料 2 次/日, 24h 充气, 定时吸出排泄物, 日换水量 50%。及时取出死亡对虾放入 -20°C 冰箱保存。各组在感染后 0h、6h、12h、24h、48h、72h、96h 取样保存。观察记录对虾发病及死亡率, 定期检测对虾组织中病毒含量, 并对死亡对虾进行病毒检测。

1.2.3 病毒检测方法 参考程晓燕等(2010)采用荧光定量 PCR 方法检测 WSSV。

2 结果

2.1 盐度突变

2.1.1 盐度先突变后感染 WSSV 的结果

(1) 盐度先突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾死亡情况的影响

盐度先突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾死亡情况的影响见图 1, 同一盐度感染 WSSV 组对虾累计死亡率显著高于未感染 WSSV 组, 且感染 WSSV 后不同盐度组的对虾累积死亡率显著提高, 24h 出现死亡高峰, 此时低盐度 14 ± 1 突变组的累计死亡率(54.1 ± 3.8)% 明显高于高盐度 32 ± 1 突变组的(36.7 ± 5.8)% 和起始盐度 23 ± 1 组的(24.4 ± 5.1)%。在整个实验过程中起始盐度 23 ± 1 组累积死亡率显著低于另外两突变组($P < 0.05$), 各组累计死亡率至 96h 达到最大, 起始盐度 23 ± 1 为(52.2 ± 13.5)%, 高盐度 32 ± 1 突变组为(75.6 ± 3.8)%, 低盐度 14 ± 1 突变组为(63.3 ± 3.3)%。

(2) 盐度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾携带 WSSV 情况的影响

盐度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾携带 WSSV

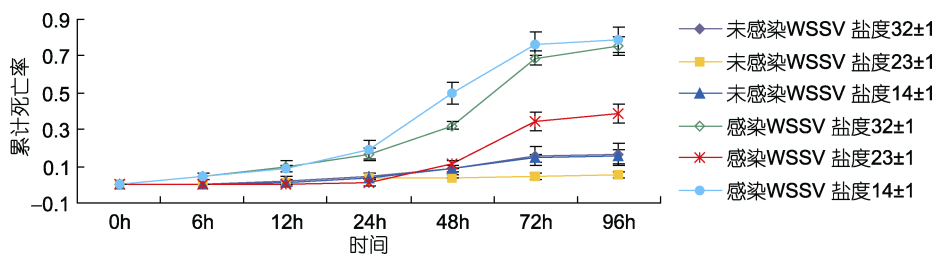


图 1 盐度突变对凡纳滨对虾累积死亡率的影响

Fig.1 Effects of salinity acute changes on the mortality of *L. vannamei*

情况的影响见表 1, 不同盐度下病虾体内病毒含量随感染时间推移逐渐升高。在整个实验过程中, 在 6h、24h、48h、96h 时高盐度 32 ± 1 突变组与起始盐度 23 ± 1 组存在显著差异($P < 0.05$); 在 6h、12h、48h、72h 时低盐度 14 ± 1 突变组与起始盐度 23 ± 1 组存在显著差异($P < 0.05$)。高盐度 32 ± 1 突变组和起始盐度 23 ± 1 组对虾体内病毒含量都在 96h 达到最高值, 分别为 5.7×10^7 copy/g, 2.3×10^6 copy/g, 低盐度突变组在 72h 达到最高值为 2.8×10^7 copy/g。

2.1.2 先感染 WSSV 后盐度突变实验结果

(1) 先感染 WSSV 后盐度突变对凡纳滨对虾死

亡情况的影响

先感染 WSSV 后盐度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响见图 2, 同一盐度感染 WSSV 组对虾累计死亡率显著高于未感染 WSSV 组, 感染 WSSV 后盐度突变导致对虾累积死亡率显著提高, 在整个实验过程中高盐度 32 ± 1 突变组与起始盐度 23 ± 1 组之间不存在显著差异($P > 0.05$); 低盐度 14 ± 1 突变组与起始盐度 23 ± 1 组之间在 12h、24h、48h、72h 存在显著差异($P < 0.05$); 各组累计死亡率至 96h 达到最大, 起始盐度 23 ± 1 为 $(48.8 \pm 1.9)\%$, 高盐度 32 ± 1 突变组为 $(61.1 \pm 10.7)\%$, 低盐度 14 ± 1 突变组为 $(63.3 \pm 12.0)\%$ 。

表 1 盐度突变后感染 WSSV 凡纳滨对虾携带白斑综合症病毒量的情况

Tab.1 Effects of salinity acute changes on white spot syndrome virus copy number in *L. vannamei* infected with WSSV

时间(h)	盐度	WSSV 携带量(copy/g)			
		最小值	最大值	平均值	标准差
0	32 ± 1	1.2×10^1	1.3×10^1	1.2×10^1	1.0×10^0
	23 ± 1	1.2×10^1	2.4×10^1	1.6×10^1	7.0×10^0
	14 ± 1	1.0×10^1	1.5×10^1	1.3×10^1	3.0×10^0
6	32 ± 1	2.0×10^3	3.1×10^3	2.4×10^3	6.2×10^2
	23 ± 1	9.0×10^1	2.2×10^2	1.4×10^2	6.5×10^1
	14 ± 1	1.4×10^3	4.0×10^3	2.5×10^3	1.3×10^3
12	32 ± 1	5.0×10^3	9.0×10^3	7.0×10^3	2.0×10^3
	23 ± 1	2.9×10^2	5.6×10^2	4.0×10^2	1.5×10^2
	14 ± 1	3.7×10^4	7.3×10^4	5.2×10^4	1.9×10^4
24	32 ± 1	2.7×10^5	6.8×10^5	5.2×10^5	2.2×10^5
	23 ± 1	1.4×10^3	7.0×10^3	4.4×10^3	2.9×10^3
	14 ± 1	3.2×10^4	7.7×10^4	5.1×10^4	2.3×10^4
48	32 ± 1	1.5×10^6	1.9×10^6	1.6×10^6	2.1×10^5
	23 ± 1	1.1×10^4	4.8×10^4	3.0×10^4	1.9×10^4
	14 ± 1	8.7×10^5	1.0×10^6	9.4×10^5	8.8×10^4
72	32 ± 1	7.4×10^5	8.4×10^5	8.0×10^5	5.3×10^4
	23 ± 1	3.2×10^4	7.2×10^4	5.3×10^4	2.0×10^4
	14 ± 1	1.2×10^7	4.3×10^7	2.8×10^7	1.6×10^7
96	32 ± 1	4.2×10^7	8.6×10^7	5.7×10^7	2.5×10^7
	23 ± 1	3.2×10^5	5.9×10^6	2.3×10^6	3.1×10^6
	14 ± 1	1.1×10^6	2.4×10^6	1.7×10^6	6.7×10^5

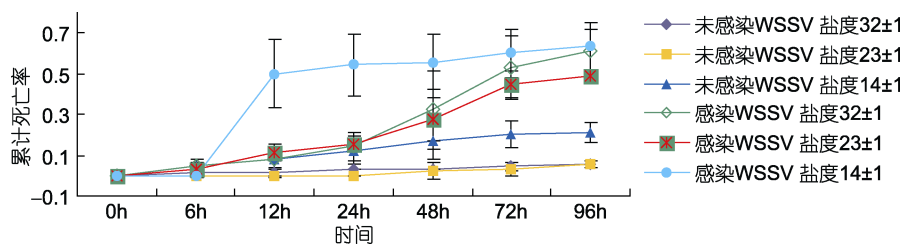


图 2 先感染 WSSV 后盐度突变对凡纳滨对虾累积死亡率的影响

Fig.2 Effects of salinity acute changes on the mortality of *L. vannamei* infected with WSSV

(2) 先感染 WSSV 后盐度突变对 WSSV 在凡纳滨对虾体内增殖的影响

表 2 中不同盐度下的病虾体内携带病毒量随时间推移而逐渐增多。整个实验过程中, 高盐度 32 ± 1 突变组与起始盐度 23 ± 1 组在 12h、24h、72h、96h 存在显著差异($P < 0.05$); 低盐度 14 ± 1 突变组与起始盐度 23 ± 1

组在 6h、12h、72h、96h 存在显著差异($P < 0.05$), 两盐度突变组病毒复制高峰期出现在盐度突变后 6h, 而起始盐度 23 ± 1 组出现在 48h。在 0h 各组病毒含量差异不大, 至 12h 高盐度 32 ± 1 突变组病毒含量高出起始盐度 23 ± 1 组的 30 倍, 低盐度 14 ± 1 突变组高出起始盐度 23 ± 1 组的 400 倍, 到 48h 后各组病毒含量相差不显著。

表 2 感染 WSSV 后盐度突变对凡纳滨对虾携带白斑综合症病毒量的影响
Tab.2 Effects of salinity acute changes on white spot syndrome virus copy number in *L. vannamei* infected with WSSV

时间(h)	盐度	WSSV 携带量(copy/g)			
		最小值	最大值	平均值	标准差
0	32 ± 1	2.0×10^0	6.0×10^0	4.0×10^0	2.0×10^0
	23 ± 1	3.0×10^0	5.0×10^0	4.0×10^0	2.0×10^0
	14 ± 1	9.4×10^1	1.5×10^2	1.2×10^2	3.0×10^1
6	32 ± 1	1.8×10^3	2.9×10^3	2.3×10^3	5.4×10^2
	23 ± 1	9.1×10^1	1.2×10^2	1.1×10^2	1.5×10^1
	14 ± 1	3.3×10^3	8.9×10^3	6.3×10^3	2.8×10^3
12	32 ± 1	1.8×10^4	3.6×10^4	2.6×10^4	9.7×10^3
	23 ± 1	4.9×10^2	9.9×10^2	7.7×10^2	2.6×10^2
	14 ± 1	1.5×10^5	6.5×10^5	3.4×10^5	2.7×10^5
24	32 ± 1	2.9×10^4	6.1×10^4	4.9×10^4	1.7×10^4
	23 ± 1	2.9×10^3	6.2×10^3	4.1×10^3	1.8×10^3
	14 ± 1	3.2×10^4	7.7×10^4	5.4×10^4	2.2×10^4
48	32 ± 1	1.6×10^5	3.4×10^5	2.3×10^5	1.0×10^5
	23 ± 1	3.2×10^4	4.8×10^5	2.1×10^5	2.4×10^5
	14 ± 1	2.4×10^4	6.1×10^4	4.8×10^4	2.1×10^4
72	32 ± 1	4.3×10^7	8.6×10^7	6.0×10^7	2.2×10^7
	23 ± 1	4.4×10^5	7.2×10^5	5.6×10^5	1.5×10^5
	14 ± 1	3.2×10^7	9.2×10^7	5.3×10^7	3.3×10^7
96	32 ± 1	1.7×10^7	4.7×10^7	2.9×10^7	1.7×10^7
	23 ± 1	2.1×10^6	5.7×10^6	3.7×10^6	1.9×10^6
	14 ± 1	1.7×10^6	2.5×10^6	2.0×10^6	4.4×10^5

2.2 盐度渐变

2.2.1 先盐度渐变后感染 WSSV 实验结果

(1) 不同盐度对感染 WSSV 凡纳滨对虾死亡情况的影响

不同盐度对感染 WSSV 对虾累积死亡率的影响见

图 3, 感染 WSSV 组, 在整个实验过程中, 在 0—24h 各组对虾累积死亡率差异不显著($P > 0.05$), 高盐度 32 ± 1 渐变组累积死亡率与起始盐度 23 ± 1 组在 48h、72h 存在显著差异($P < 0.05$); 低盐度 14 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组在 48h、72h、96h 存在显著差异($P < 0.05$)。

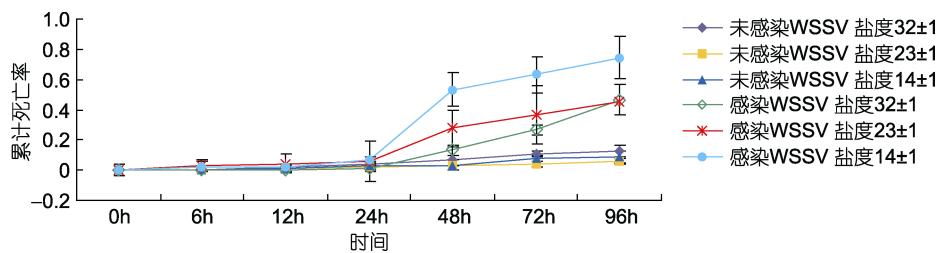


图 3 不同盐度对感染 WSSV 凡纳滨对虾累积死亡率的影响
Fig.3 Effects of different salinity on the mortality of *L. vannamei* infected with WSSV

(2) 盐度渐变至相应盐度后感染 WSSV 对 WSSV 在凡纳滨对虾体内增殖的影响

不同盐度对 WSSV 在对虾体内增殖的影响见表 3, 在整个实验过程中, 0—24h 凡纳滨对虾体内病毒平均含量较低, 在 6h 时低盐度 14 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组存在极显著性差异($P < 0.01$), 至 12h 时

高盐度 32 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组存在极显著差异($P < 0.01$); 至 48h 出现病毒增殖高峰期, 并伴随死亡高峰期, 且高盐度 32 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组存在显著差异($P < 0.05$); 到 72—96h 时凡纳滨对虾体内 WSSV 平均含量趋于平稳, 并伴随着对虾死亡。

表 3 不同盐度对感染 WSSV 凡纳滨对虾体内病毒含量的影响
Tab.3 Effects of different salinity on white spot syndrome virus copy number in *L. vannamei* infected with WSSV

时间(h)	盐度	WSSV 携带量(copy/g)			
		最小值	最大值	平均值	标准差
0	32 ± 1	3.4×10^2	1.1×10^3	7.4×10^2	3.8×10^2
	23 ± 1	4.9×10^2	9.7×10^2	6.6×10^2	2.7×10^2
	14 ± 1	5.7×10^2	7.4×10^2	6.4×10^2	8.8×10^1
6	32 ± 1	5.8×10^1	7.4×10^1	6.7×10^1	8.0×10^0
	23 ± 1	2.4×10^1	3.5×10^1	2.7×10^1	6.0×10^0
	14 ± 1	3.1×10^2	8.8×10^2	5.8×10^2	2.9×10^2
12	32 ± 1	9.5×10^1	2.6×10^2	1.8×10^2	8.1×10^1
	23 ± 1	2.0×10^1	5.7×10^1	4.1×10^1	2.0×10^1
	14 ± 1	2.1×10^1	5.7×10^1	2.4×10^2	1.8×10^1
24	32 ± 1	1.8×10^3	2.2×10^3	1.9×10^3	2.5×10^2
	23 ± 1	2.1×10^2	7.6×10^2	5.1×10^2	2.8×10^2
	14 ± 1	1.4×10^4	6.9×10^4	3.2×10^4	3.1×10^4
48	32 ± 1	7.0×10^4	4.8×10^5	3.2×10^5	2.2×10^5
	23 ± 1	1.1×10^4	2.1×10^4	1.4×10^4	5.8×10^3
	14 ± 1	8.1×10^4	3.3×10^5	2.4×10^5	1.4×10^5
72	32 ± 1	2.8×10^5	1.3×10^7	5.1×10^6	6.6×10^6
	23 ± 1	2.1×10^5	9.6×10^5	4.8×10^5	4.2×10^5
	14 ± 1	2.9×10^5	4.6×10^5	3.6×10^5	8.9×10^4
96	32 ± 1	7.0×10^5	6.3×10^6	2.7×10^6	3.1×10^6
	23 ± 1	4.5×10^4	1.2×10^5	8.7×10^4	3.8×10^4
	14 ± 1	1.6×10^6	1.9×10^7	1.0×10^7	9.1×10^6

2.2.2 先感染 WSSV 后盐度渐变实验结果

(1) 盐度渐变对携带 WSSV 的凡纳滨对虾死亡情况的影响

先感染 WSSV 后盐度渐变对对虾累积死亡率的影响见图 4, 在整个实验过程中, 感染 WSSV 组中高

盐度 32 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组在 6h、12h、24h 存在显著差异($P < 0.05$); 低盐度 14 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组在整个实验过程中都存在显著差异($P < 0.05$); 在盐度渐变过程中, 渐变组伴随死亡率升高, 至 24 h 后死亡明显加快, 并出现死亡高峰期。

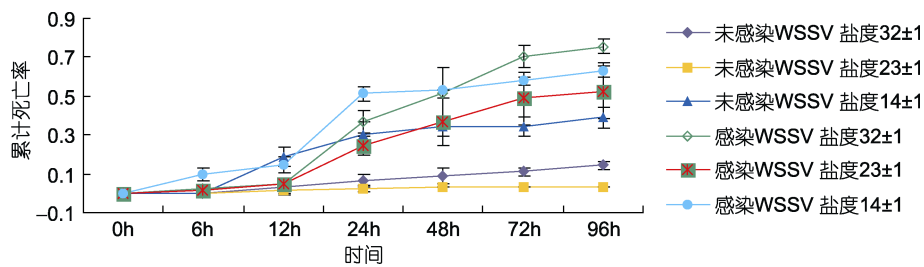


图 4 先感染 WSSV 后盐度渐变对凡纳滨对虾累积死亡率的影响

Fig.4 Effects of salinity gradual changes on the mortality of *L. vannamei* infected with WSSV

(2) 盐度渐变对凡纳滨对虾携带 WSSV 情况的影响
不同盐度下的病虾体内携带病毒量随时间推移而逐渐增多见表 4, 高盐度 32 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组在 6h、48h 存在显著差异($P < 0.05$); 低盐度

14 ± 1 渐变组与起始盐度 23 ± 1 组在 6h、48h、96h 存在显著差异($P < 0.05$); 在整个实验中盐度渐变组对虾体内病毒增殖速度与起始盐度组的差不多, 但后期死亡率明显比起始盐度高。

表 4 感染 WSSV 后盐度渐变至相应盐度凡纳滨对虾携带白斑综合症病毒量的情况

Tab.4 Effects of salinity gradual changes on white spot syndrome virus copy number in *L. vannamei* infected with WSSV

时间(h)	盐度	WSSV 携带量(copy/g)			
		最小值	最大值	平均值	标准差
0	32 ± 1	2.7×10^1	6.9×10^1	4.2×10^1	2.3×10^1
	23 ± 1	5.3×10^1	1.1×10^2	8.7×10^1	3.1×10^1
	14 ± 1	3.4×10^1	4.1×10^1	3.7×10^1	4.0×10^0
6	32 ± 1	2.1×10^3	4.3×10^3	3.1×10^3	1.1×10^3
	23 ± 1	3.3×10^2	8.9×10^2	6.3×10^2	2.8×10^2
	14 ± 1	1.7×10^3	2.7×10^3	2.1×10^3	5.1×10^3
12	32 ± 1	4.1×10^4	6.6×10^4	5.4×10^4	1.2×10^4
	23 ± 1	1.5×10^4	6.5×10^4	3.4×10^4	2.7×10^4
	14 ± 1	1.8×10^4	2.7×10^4	2.2×10^4	4.5×10^3
24	32 ± 1	5.0×10^4	1.3×10^6	4.9×10^5	7.2×10^5
	23 ± 1	3.2×10^3	7.7×10^3	5.4×10^3	2.2×10^3
	14 ± 1	2.5×10^4	6.7×10^4	4.9×10^4	2.2×10^4
48	32 ± 1	1.1×10^6	1.3×10^6	1.2×10^6	9.0×10^4
	23 ± 1	2.4×10^4	6.1×10^4	4.8×10^4	2.1×10^4
	14 ± 1	1.6×10^6	1.9×10^6	1.7×10^6	1.5×10^5
72	32 ± 1	4.3×10^6	8.0×10^6	5.8×10^6	1.9×10^6
	23 ± 1	3.2×10^6	9.2×10^6	5.3×10^6	3.3×10^6
	14 ± 1	1.1×10^6	4.4×10^6	2.4×10^6	1.7×10^6
96	32 ± 1	5.7×10^6	9.6×10^6	7.6×10^6	2.0×10^6
	23 ± 1	1.6×10^6	2.5×10^6	2.0×10^6	4.4×10^5
	14 ± 1	4.6×10^4	7.4×10^4	6.2×10^4	1.4×10^4

2.3 各处理组中不同时期死亡对虾病毒含量检测

表 5 中对死亡个体病毒定量检测结果可知, 每个处理组的初期死亡个体病毒含量都低于死亡高峰期和后期, 在感染 WSSV 后盐度突变处理组中, 死亡初期的高盐度 32 ± 1 组与起始盐度 23 ± 1 组存在显著差异($P < 0.05$), 死亡高峰中低盐度 14 ± 1 组与起始盐度 23 ± 1 组存在显著差异($P < 0.05$), 且起始盐度 23 ± 1 组病毒含量明显高于另外两盐度组病毒含量; 死亡后期不存在差异性。在先感染 WSSV 后盐度渐变和先盐度渐变后感染 WSSV 处理组中的不同盐度组在不同死亡时期死亡个体病毒含量不存在显著性差异; 在盐度突变后感染 WSSV 处理组中, 死亡初期和死亡高峰期的起始盐度 23 ± 1 组与另外两盐度组中死亡个体的病毒含量都存在显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

叶建生等(2008)报道盐度突变会引起对虾体内产生一系列应激反应, 在短时间内调节血液渗透压, 如对虾体内的超氧阴离子产量随着盐度突变值增加而增加, 血清中酚氧化酶活性随着盐度突变值增加活性升高越快, 血清中 SOD 活性随着盐度突变值增加而降低, 血清蛋白含量随着降低。Perazzolo 等(2002)也报道在盐度从 34 降低至 22 或 13 会引起圣保罗对虾(*Farfantepenaeus paulensis*)体内血淋巴中血细胞数量减少了 20%, 而且抗菌活力也下降了。Sudha 等(1998)已将 WSSV 与印度对虾(*Penaeus indicus*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)的关系简单分为 3 种类型: 第 1 种为早期急性感染, 对虾感染症状为出现大

表 5 不同处理组死亡凡纳滨对虾个体 WSSV 定量检测结果
Tab.5 WSSV amounts in the dead *L. vannamei* of different management group

处理方式	死亡时期	WSSV 携带量(copy/g)		
		盐度(32 ± 1)	盐度(23 ± 1)	盐度(14 ± 1)
感染 WSSV 后 盐度突变	初期	$(2.1 \pm 2.6) \times 10^4$	$(7.7 \pm 1.2) \times 10^4$	$(3.1 \pm 2.7) \times 10^4$
	高峰	$(3.6 \pm 3.3) \times 10^5$	$(6.4 \pm 1.5) \times 10^5$	$(1.6 \pm 0.88) \times 10^5$
	后期	$(4.5 \pm 1.3) \times 10^6$	$(4.3 \pm 2.1) \times 10^6$	$(1.7 \pm 1.3) \times 10^6$
感染 WSSV 后 盐度渐变	初期	$(2.5 \pm 3.2) \times 10^4$	$(1.2 \pm 1.1) \times 10^4$	$(1.3 \pm 1.0) \times 10^5$
	高峰	$(4.2 \pm 2.7) \times 10^5$	$(3.0 \pm 1.7) \times 10^5$	$(3.9 \pm 3.6) \times 10^5$
	后期	$(2.8 \pm 2.0) \times 10^6$	$(4.9 \pm 4.4) \times 10^5$	$(1.7 \pm 2.1) \times 10^7$
盐度突变后 感染 WSSV	初期	$(1.6 \pm 2.5) \times 10^4$	$(8.5 \pm 1.4) \times 10^4$	$(3.8 \pm 4.0) \times 10^3$
	高峰	$(1.4 \pm 1.0) \times 10^4$	$(2.1 \pm 3.2) \times 10^5$	$(6.6 \pm 5.9) \times 10^4$
	后期	$(9.6 \pm 6.9) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.27) \times 10^6$	$(8.9 \pm 7.5) \times 10^5$
盐度渐变后 感染 WSSV	初期	$(1.7 \pm 1.1) \times 10^4$	$(3.9 \pm 5.4) \times 10^4$	$(7.7 \pm 6.4) \times 10^4$
	高峰	$(5.7 \pm 3.6) \times 10^5$	$(4.9 \pm 3.3) \times 10^5$	$(7.0 \pm 1.7) \times 10^5$
	后期	$(8.2 \pm 5.3) \times 10^6$	$(3.4 \pm 2.1) \times 10^6$	$(1.6 \pm 2.3) \times 10^7$

面积红体, 机体组织高度感染 WSSV, 将在 2—3d 内出现大面积死亡; 第 2 种为急性或亚急性感染, 对虾组织感染程度为中度到高度之间, 会在 7—10d 内出现高的死亡率, 主要的临床症状为被感染的对虾甲壳有明显的白斑; 第 3 种类型为慢性感染(潜伏感染), 组织仅被轻度感染, 不会伴随有白斑和红体等症状, 将在 15—28d 内出现死亡。有研究认为盐度改变会引起对虾体内相关免疫指标变化, 特别是盐度降低能引起对虾血细胞数量明显降低, 导致酚氧化酶活性升高。血细胞计数作为对虾免疫指标的重要参数之一, 是因为对虾血细胞具有溶菌作用、凝集作用, 而且能合成与免疫相关的许多酶类如溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、酚氧化酶等(Le Moullac *et al*, 2000)。

两组盐度突变实验中都发现盐度突变对健康凡纳滨对虾存活影响显著, 特别是低盐度 14 ± 1 突变组累积死亡率明显高于另两组($P < 0.05$), 原因可能是盐度突变幅度已超出部分体质较弱对虾的渗透调节能力。在先盐度突变后感染 WSSV 实验发现各盐度组对虾的累积死亡率在前期较低; 病毒检测也发现前期对虾体内病毒含量维持在较低水平, 未达到对虾体内病毒含量的濒死临界值, 而且起始盐度 23 ± 1 组对虾累积死亡率都显著低于另外两突变组($P < 0.05$), 说明感染初期由起始盐度 23 ± 1 突变至 14 ± 1 和 32 ± 1 提高了对虾对病原体的易感性; 感染后期由起始盐度 23 ± 1 突变至 14 ± 1 和 32 ± 1 促使病毒在对虾体内迅速扩增, 伴随着对虾大量死亡。说明盐度突变造成对虾体质损伤, 抗病力下降, 为病毒的扩增提供了

温床。

对携带 WSSV 的对虾进行盐度突变实验结果可知低盐度 14 ± 1 突变组在 12 h 突然出现大量死亡, 且与另外两组存在显著差异($P < 0.05$); 盐度 14 ± 1 组累计死亡率比盐度 32 ± 1 突变组高, 此结果与 Joseph 等(2007)报道的盐度突变改变中国对虾血淋巴代谢和降低了对 WSSV 免疫力的死亡结果相似。从病毒检测结果中发现 12h 后低盐度 14 ± 1 突变组对虾体内病毒含量是起始盐度 23 ± 1 组的 400 倍, 高盐度 32 ± 1 突变组是它的 30 倍, 也说明了此时各组之间累积死亡率的差异性; 至实验后期病毒含量已经高于简旭凤(2003)报道的对虾感染 WSSV 死亡时携带病毒的数量 1×10^5 copy/g, 促使对虾大量死亡。综上可知: 盐度未突变时, 病毒在对虾体内处于潜伏感染期, 未有大量死亡和明显病症出现; 盐度突变后, 对虾出现大量死亡, 期间伴随着红体, 空胃、空肠、肝胰腺肿大等症状。盐度突变引起对虾与 WSSV 之间的关系发生转变, 从潜伏感染转为急性感染。

两组盐度渐变实验中都发现盐度渐变过程中对对虾存活影响不显著; 将对虾驯化至不同盐度后感染 WSSV 实验结果发现 0—24h 各盐度组对虾累积死亡率无明显差异, 而且 0—12h 内检测到对虾体内的病毒含量有下降趋势, 到 24h 时病毒含量开始升高, 但是病毒含量明显低于简旭凤(2003)报道对虾感染 WSSV 粗提液后死亡时携带病毒的数量超过 1×10^5 copy/g, 所以未见大量对虾死亡; 48h 至实验结束盐度 14 ± 1 组累积死亡率与其它组存在显著差异($P < 0.05$),

且高于其它组的累积死亡率,这与李才文等(2002)研究不同盐度条件下感染 WSSV 日本对虾累积死亡结果相似。48h 后病毒在对虾体内出现增殖高峰期,此后对虾体内病毒含量为 (3.6×10^5) — (1.01×10^7) copy/g,这与孙成波等(2009)研究的斑节对虾在高位池养殖过程中体内病毒含量(9.5×10^5 copy/g)相似,表明随着病毒含量升高,对机体造成严重损伤,最终导致对虾出现大量死亡。

先感染 WSSV 后盐度渐变实验结果发现 0—24h 起始盐度 23 ± 1 组与另外两盐度渐变组存在显著性差异,在 24h 时感染组的累计死亡率都低于 18.9%,未出现大量死亡,而且 0—12h 内对虾体内病毒含量较低,但累积死亡率存在差异,可能是个别对虾感染 WSSV 后对虾机体已有损伤,外界环境稍有变化,即出现个别死亡。48h 时两盐度渐变组对虾出现死亡高峰,起始盐度 23 ± 1 组死亡率有升高,到 96h 达到最大值 78.9%。产生这样的结果可能是对虾长期处于连续较大的盐度渐变,导致对虾必须长时间进行盐度适应调节降低了自身免疫能力,使 WSSV 在体内复制累积,当累积到一定值时出现大量死亡。不管盐度怎么变化,都会影响到对虾与 WSSV 之间的关系,在未感染 WSSV 时,盐度突变和渐变都会提高对虾对 WSSV 的易感性,在感染 WSSV 后,盐度变化可能引起对虾与 WSSV 之间的关系发生转变,从潜伏感染转为急性感染,因此盐度是引起白斑综合症暴发的关键影响因子。

参 考 文 献

- 叶建生,王兴强,马 牲等,2008. 盐度突变对凡纳滨对虾非特异性免疫因子的影响. 海洋水产研究, 29(1): 38—43
- 孙成波,李 婷,王 平等,2009. 高位池养殖对虾携带白斑综合症病毒变化. 海洋通报, 28(2): 116—120
- 孙成波,何建国,黎子兰等,2006. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较. 湛江海洋大学学报, 26(3): 17—20
- 李才文,管越强,俞志明,2002. 盐度变化对日本对虾暴发白斑综合症病毒病的影响. 海洋环境科学, 21(4): 6—9
- 吴信忠,2005. 中国海洋病害主流研究的进展. 太平洋学报, 10: 49—59.
- 何建国,莫 福,1999. 对虾白斑综合症病毒暴发流行与传播途径,气候和水体理化因子的关系及其控制. 中国水产, (007): 34—37
- 徐丽美,杨 丰,2001. 利用定量 PCR 方法研究对虾白斑杆状病毒感染与发病的关系. 高技术通讯, 11(12): 9—11
- 程晓燕,刘庆慧,黄 捷,2010. 实时荧光定量 PCR 检测对虾白斑综合症病毒方法的建立. 安徽农业科学, (26): 14265—14267
- 简旭凤,2003. 白斑综合症病毒(WSSV)原位 PCR 及定量 PCR 检测技术的建立. 广州: 中山大学硕士学位论文, 1—67
- Du H H, Li W F, Xu Z R *et al*, 2006. Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. Diseases of Aquatic Organisms, 71(2): 175—178
- Flegel T W, Lio-Po G, 2009. Current status of viral diseases in Asian shrimp aquaculture. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 61(3): 229—239
- Granja C B, Vidal O M, Parra G *et al*, 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms, 68(2): 175—180
- Gunalan B, Soundarapandian P, Dinakaran G K, 2010. The effect of temperature and pH on WSSV infection in cultured marine shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). Middle East J Sci Res, 5(1): 28—33
- Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I, 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish & Shellfish Immunology, 17(3): 265—275
- Joseph A, Philip R, 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. Aquaculture, 272(1): 87—97
- Le Moullac G, Haffner P, 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 191(1): 121—131
- Liu B, Yu Z, Song X *et al*, 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 253(1): 163—170
- Momoyana K, Nakano H, Koube H, 1994. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. Fish Pathology, 29(2): 135—139
- Perazzolo L M, Gargioni R, Ogliari P *et al*, 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, 214(1): 19—33
- Sudha P M, Mohan C V, Shankar K M *et al*, 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. Aquaculture, 167(1): 95—101
- Sun Y, Li F, Xiang J, 2013. Analysis on the dynamic changes of the amount of WSSV in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during infection. Aquaculture, 376: 124—132
- Tapay L M, Nadala Jr E C B, Loh P C, 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. Journal of Virological Methods, 82(1): 39—43
- You X, Su Y, Mao Y *et al*, 2010. Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. Aquaculture, 305(1): 133—137

EFFECTS OF SALINITY CHANGES ON LATENT INFECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

XIANG Yun¹, WANG Gang¹, YE Guo-Feng¹, Chan Siu-Ming¹, YANG Shi-Ping^{1,2},
WANG Cheng-Gui¹, SUN Cheng-Bo^{1,2}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Tropical Invertebrates Aquaculture Research Center of Guangdong Colleges and Universities, Zhanjiang 524025, China)

Abstract We explored the effect of gradual or sudden salinity change on proliferation of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei*. Results show that a sudden salinity change from initial (23 ± 1) to (32 ± 1) or at a low salinity (14 ± 1) could affect significantly ($P < 0.05$) the mortality of and WSSV proliferation in *L. vannamei*. In pre-WSSV-infection experiment, the largest cumulative mortality rates at high, initial lethal, and low salinities were $61.1\% \pm 10.7\%$, $48.9\% \pm 1.9\%$, and $63.3\% \pm 12.0\%$; and the virus content were 6.0×10^7 , 3.7×10^6 , and 5.3×10^7 copy/g, respectively. However, in post-WSSV-infection experiment, the maximum cumulative mortality rates were $75.6\% \pm 3.8\%$, $52.2\% \pm 13.4\%$, and $63.3\% \pm 3.3\%$; and the virus contents were 5.7×10^7 , 2.3×10^6 , and 2.8×10^7 copy/g, respectively. In the experiment of gradual salinity change, the mortality in each group was below 18.9% in 12h, reached mortality peak in 48h, and varied significantly in 72—96h. In the pre-WSSV-infection experiment, the largest cumulative mortality rates of high, initial-lethal, and low salinities were $75.6\% \pm 5.1\%$, $38.9\% \pm 5.1\%$, and $69.3\% \pm 6.9\%$; the virus content were 7.6×10^7 , 5.3×10^6 , and 2.4×10^6 copy/g, respectively. In the post-WSSV-infection, the largest cumulative mortality rates were $46.7\% \pm 10\%$, $45.6\% \pm 18.9\%$, and $74.4\% \pm 13.9\%$; the virus contents were 5.1×10^6 , 4.8×10^5 , and 1.0×10^7 copy/g, respectively. Therefore, salinity change could affect the disease resistance of the shrimp for causing rapid WSSV proliferation *in vivo* in shrimp. For those WSSV-borne shrimp, salinity changes could increase greatly the risk of latent to acute WSSV-infection. Therefore, salinity increase in both gradual and sudden ways could be a key reason for causing WSSV outbreak.

Key words salinity; *Litopenaeus vannamei*; White Spot Syndrome Virus; Real-time quantitative PCR; viral content