

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00301

高位池养殖过程凡纳滨对虾携带 WSSV 情况的动态变化

王奕玲^{1,2}, 李卓佳¹, 张家松¹, 文国樑¹, 曹煜成¹, 罗亮^{1,2}, 张华军^{1,2}, 韩宁^{1,2}

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300

2. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023

摘要: 为了更好地预防对虾白斑综合征(WSS)的暴发, 探讨该病毒病的流行规律, 笔者针对养殖过程中对虾的携带 WSSV 情况展开调查。调查于 2010 年 7 月-2010 年 11 月广东省汕尾市红海湾养殖场进行, 从 10 口凡纳滨对虾高位养殖池中随机抽取 6 口进行跟踪采样。收集指标包括对虾生长状况、基本环境指标、浮游微藻种群结构和对虾病毒携带量等。本文重点报道利用实时定量 PCR-TaqMan 探针法检测 6 口精养池塘对虾体内 WSSV 的携带量变化情况, 检测结果显示: 1-3 号虾池苗种携带 WSSV, 其波动范围在 $1.3 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^4$ copy/g 之间; 对虾在养殖过程中均带毒, 鳃组织中的平均病毒携带量(2.3×10^9 copy/g)多于肌肉组织中的平均病毒携带量(3.2×10^8 copy/g), 且变化趋势一致, 但没有显著性差异($P > 0.05$); 在整个养殖过程中对虾 WSSV 携带量总体呈现波动上升的趋势, 期间各池出现过数次高值。前期 WSSV 拷贝数的波动范围在 $1.3 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^7$ copy/g 之间, 后期上升到 $1.5 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^{11}$ copy/g, 使得某些池塘养殖对虾 WSS 暴发。调查结果说明: 1)对虾携带 WSSV 可以进行养殖生长; 2)WSSV 在对虾体内的含量是变化的, 且其变化存在着一定的规律性; 3)这种变化规律主要体现在带毒量随着养殖时间的进行及外界水环境中某些主要因子的变化而变化, 如: 养殖时间越长, 带毒量越高; 养殖环境中某些关键环境因子的改变, 如: 温差较大, 不良藻相转换, 天气骤变等均可引起对虾体内病毒含量较大的波动。鉴此, 作者提出, 构建并维持良好的浮游微藻的群落结构, 注意有害藻相改变时保持养殖水体环境稳定, 对环境突变前后都做好应对对虾应激的措施等可以极大程度地减少 WSS 暴发的可能。本研究通过对 WSSV 的密切跟踪, 旨在更好的反映其在养殖环境下的动态变化规律, 以及受各种环境因子影响的情况, 从而为预防对虾 WSS 提供依据和参考。

关键词: 凡纳滨对虾; WSSV; TaqMan real-time PCR; 病毒携带量

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)02-0301-09

白斑综合征(white spot syndrome, WSS)是全球对虾养殖业所面临的危害性最大的病害之一, 是国际兽医局(OIE)规定需要报告的重要水生动物传染病^[1]。WSS 由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起, 由于其给全世界对虾养殖业带来的危害巨大, 且到现在仍无有效控制措施, 所以世界各国都给以重点关注^[2-5]。综合国内外文献报道, 针对对虾体内 WSSV 在养殖全

程中动态变化的调查较少, 而现有报道研究也存在采样时间间隔较长, 所体现的规律性不显著, 未能详尽地反映其在整个养殖过程中的变动趋势。本研究旨在通过利用实时定量 PCR 技术, 对精养池塘凡纳滨对虾体内 WSSV 携带情况进行跟踪, 以期更有效和精确地反映对虾体内 WSSV 携带量的变动规律, 了解实际养殖生产中影响 WSSV 流行的因素, 从而增加对该疾病可控性的

收稿日期: 2011-07-26; 修订日期: 2011-10-19.

基金项目: 国家十二五科技支撑计划(2011BAD13B10); 现代农业(虾)产业技术体系建设专项(ARS-47); 公益性行业(农业)科研专项(201103034); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010YD05); 广东省科技计划(2010B020309001); 广东省自然科学基金项目(10151030002000008); 广东省鱼病防治专项(2130108); 广东省海洋渔业科技推广专项(A200901B02, A201001B02).

作者简介: 王奕玲(1985-), 女, 硕士研究生, 从事对虾生态防病研究. E-mail: wangyiling20082002@yahoo.com.cn

通信作者: 李卓佳, 研究员, 主要从事对虾健康养殖及养殖生态环境调控与修复研究. E-mail: zhuojiali609@163.com

认识,为预防养殖对虾病毒病暴发提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验场地选择

2010年7月–2010年11月,在广东省汕尾市红海湾鸿泰养殖场,从10口凡纳滨对虾高位精养池塘中随机抽取6口池塘进行采样。各池塘面积约为 (0.45 ± 0.1) hm²。池底铺设土工膜,无泥沙层,水深1.8~2.2 m,养殖用海水经沙滤并过滤所得。每口池塘配备12~15 kW/hm²的增氧设备(增氧机和底部增氧曝气管)。放养凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)虾苗体长 (1.0 ± 0.1) cm,放苗量为270万尾/hm²。

1.2 材料及方法

1.2.1 样品采集 采样时间和频率按照养殖时间划分。在第一批放苗的五口池塘中随机选取1–3号3口池塘。从放苗日起,跟踪其养殖全程,时间从2010年7月31日到同年11月24日,约14 d取一次样,跟踪时长116 d。根据第一批的调查结果,在第二批放苗的5口池塘中随机选取4–6号3口池塘从放苗后的第10天起,进行养殖密集采样跟踪,时间从2010年9月18日到同年11月20日,采样时间为7天1次,跟踪时长63 d。第二批采样池塘均因WSS暴发而中断养殖。所取虾样均为活虾,每次每塘随机采集对虾不少于15尾,分别采集对虾的鳃和肌肉组织,用浓度为75%的酒精固定。

1.2.2 DNA的提取 将每次采集的15尾对虾随机分成3组,每组5尾。任选一组,并分别取5尾虾的鳃或者肌肉组织混合成一个样品,鳃组织样品总质量为 (15 ± 2) mg,肌肉组织样品总克数为 (20 ± 3) mg。各组织样品DNA采用“天根海洋动

物组织DNA提取试剂盒”(天根生物技术有限公司制造)提取。所提取的DNA样于–20℃保存待测。

1.2.3 Real-time PCR 引物和探针 引物和探针的选择。根据 Durand and Lightner^[6]设计,由 Invitrogen 公司合成(表1)

1.2.4 Real-time PCR 反应 参照 Lightner 等^[6]建立的实时荧光定量PCR法检测WSSV,使用Eppendorf 荧光定量PCR仪(Eppendorf Mastercycler Realplex)进行定量PCR检测。选取20 μL PCR反应体系:10 μL 2×TaqMan Universal PCR Master Mix(TAKARA 公司,代号 DRR039A),上下游引物各0.5 μL(终浓度为10 μmol/L),探针0.5 μL(终浓度为5 μmol/L),模板DNA 2 μL,补充水至20 μL。PCR反应参数:95℃ 30 s;95℃ 5 s,55℃ 15 s,72℃ 30 s,40个循环,每个样品重复4次,每批样品设置空白对照和阳性对照。空白对照用灭菌超纯水作模板,阳性对照用已知病原虾提取的DNA调整浓度后作模板。

1.2.5 标准品的制备和标准曲线的建立 阳性质粒标准品制备根据 Lightner^[6]利用插入外源目的基因的方法得到纯化阳性质粒DNA,其浓度为 1.618×10^8 copy/μL。用10倍稀释阳性质粒至7个梯度作模板并对其进行扩增,其平均C_T值依次为34.90、31.04、27.65、24.57、20.24、17.11、13.66,标准曲线如图1所示, $R^2=0.9991$ 。

2 结果与分析

2.1 第一批放苗1[#]–3[#]池塘养殖全程对虾携带WSSV检测结果

2.1.1 1[#]–3[#]池塘对虾鳃组织中WSSV携带量 在养殖全程中,1[#]–3[#]池塘对虾鳃组织中WSSV携带量的动态变化如图2所示。从图中可以看出,3口池塘的对虾苗种均携带WSSV,且其携带量均达

表1 引物和探针的合成及序列

Tab. 1 Sequences of white spot syndrome virus (WSSV) primers and TaqMan probes

引物 primer	WSSV	序列 sequence
上游 forward	WSS1011F	5'-TGGTCCCCTCCTCATCTCAG-3'
下游 reverse	WSS1079R	5'-GCTGCCTTGCCGAAATTA-3'
探针 probe	TaqMan	5'-AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA-3'

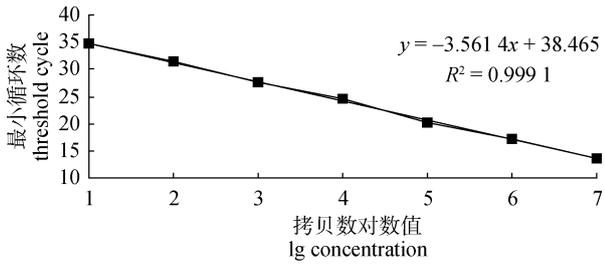


图 1 阳性质粒拷贝数与最小循环数(C_T)的标准曲线

Fig.1 Standard curve of positive plasmid copy and threshold cycle(C_T)

到了 10³ copy/g 以上。随着养殖的进行, 对虾鳃组织中 WSSV 的携带量整体呈现波动上升的趋势。

养殖前期上升幅度较小, 最高携带量为 1.0×10⁵ copy/g; 到养殖 60 d 左右, 2[#]、3[#]池塘出现第一个波动高峰, 此时鳃中 WSSV 携带量最高可达到 3.0×10⁷ copy/g。随后其病毒携带量有所下降; 到养殖后期, 1[#]-3[#]池塘的 WSSV 携带量均有较大幅度的上升, 均在养殖末期达到最大峰值。养殖全程中, 1[#]池对虾鳃组织 WSSV 携带量的波动范围为 1.6×10³~8.6×10⁶ copy/g, 平均值 1.1×10⁶ copy/g; 2[#]池对虾鳃组织 WSSV 携带量的波动范围为 1.9×10³~2.1×10⁷ copy/g, 平均值 4.4×10⁶ copy/g; 3[#]池对虾鳃组织 WSSV 携带量的波动范围为 6.2×10³~

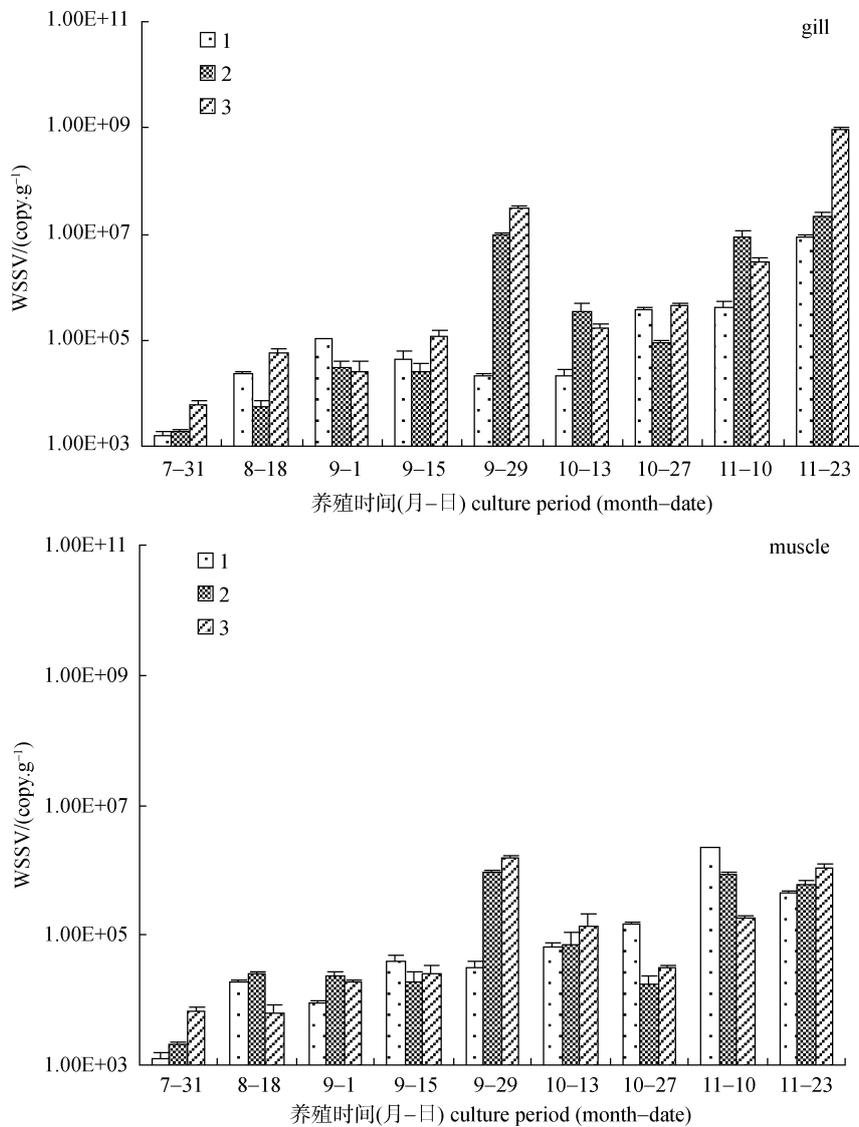


图 2 1[#]-3[#]养殖池不同养殖时期对虾鳃和肌肉组织中 WSSV 携带量及变化情况

Fig.2 Variations of the copy numbers of WSSV carried in the gill and muscle during culture periods in shrimp ponds 1[#]-3[#]

9.7×10^8 copy/g, 平均值 1.1×10^8 copy/g。

2.1.2 1[#]-3[#]池塘对虾肌肉组织中 WSSV 携带量在养殖全程中, 1[#]-3[#]池塘对虾肌肉组织中 WSSV 携带量如图 1 所示, 其动态变化情况与鳃组织中的趋势相似, 均呈现波动上升的趋势, 但整体低于鳃组织。结果显示, 1[#]养殖池对虾肌肉组织 WSSV 携带量的波动范围为 $1.3 \times 10^3 \sim 4.4 \times 10^5$ copy/g, 平均值 3.2×10^5 copy/g; 2[#]养殖池对虾肌肉组织 WSSV 携带量的波动范围为 $2.1 \times 10^3 \sim 6.1 \times 10^5$ copy/g, 平均值 2.8×10^5 copy/g; 3[#]养殖池对虾肌肉组织 WSSV 携带量的波动范围为 $6.5 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6$ copy/g, 平均值 3.3×10^5 copy/g。

1[#]-3[#]池塘病毒含量(取对虾鳃和肌肉组织带毒量的平均值), 环境指标及养殖环境状况见表 2。

2.2 第二批放苗 4[#]-6[#]池塘加密采样对虾携带 WSSV 的检测结果

2.2.1 4[#]-6[#]池塘对虾鳃组织 WSSV 携带量4[#]-6[#]池塘对虾鳃组织 WSSV 携带量在养殖过程中的动态变化如图 2 所示。从图中可以看出, 前期病毒携带量均较低, 随着养殖的进行, 3 个池塘对虾鳃组织中 WSSV 携带量逐渐升高, 30 d 左右各池出现第一个波动高峰, WSSV 最高携带量为 1.21×10^6 copy/g, 随后有所稳定和下降, 但 11 月 6 日即养殖 53 d 后, 携带量快速增长。其中 5[#]池塘携带量在 5 天之内从 2.3×10^5 copy/g 升高至 8.2×10^{10} copy/g, 最终暴发 WSS, 导致中断养殖, 最后一次采样缺失; 4[#]、6[#]池对虾 WSSV 携带量在后两次采样中迅速增加, 最后一次采样 11 月 20 日(即养殖 63 d)时均达到各池检测的最大值(分别为 6×10^6 copy/g 和 5×10^7 copy/g), 虽未达到发病阈值但两池最终也因暴发 WSS 而于 11 月 27-30 日停止养殖。调查结果显示, 在整个养殖过程中, 4[#]池对虾鳃组织 WSSV 携带量的波动范围为 $8.1 \times 10^3 \sim 6 \times 10^6$ copy/g, 平均值 8.6×10^5 copy/g; 5[#]养殖池对虾鳃组织 WSSV 携带量的波动范围为 $1.7 \times 10^4 \sim 8.2 \times 10^{10}$ copy/g, 平均值 7.0×10^9 copy/g; 6[#]养殖池对虾鳃组织 WSSV 携带量的波动范围为 $5.7 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^7$ copy/g, 平均值 4.3×10^6 copy/g。

2.2.2 4[#]-6[#]池塘对虾肌肉组织中 WSSV 携带量4[#]-6[#]池塘对虾肌肉组织 WSSV 携带量在养殖过程中的动态变化如图 2 所示, 其变化情况与鳃组织的趋势相似, 均随养殖时间的进行逐渐波动上升, 且无显著性差异。调查结果显示, 4[#]池对虾肌肉组织 WSSV 携带量的波动范围为 $8.1 \times 10^3 \sim 9.4 \times 10^7$ copy/g, 平均值 1.1×10^7 copy/g; 5[#]池对虾肌肉组织 WSSV 携带量的波动范围为 $1.7 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^{10}$ copy/g, 平均值 1.1×10^9 copy/g; 6[#]池对虾肌肉组织 WSSV 携带量的波动范围为 $5.7 \times 10^3 \sim 5.5 \times 10^5$ copy/g, 平均值 1.1×10^5 copy/g。

4[#]-6[#]池塘病毒含量(取对虾鳃与肌肉组织带毒量的平均值), 环境指标及养殖环境状况见表 3。

3 讨论

TaqMan 探针法荧光定量 PCR 是实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)的一种, 可以针对微量的病毒进行检测并实时监测病毒的复制情况, 其特异性更强, 准确度更高, 被广泛用于微量病毒复制的定量研究^[7]。本研究采取实时定量 PCR-TaqMan 探针法, 对高密度精养池塘对虾 WSSV 携带量进行跟踪调查, 以期能够更加准确的了解对虾养殖过程中体内 WSSV 携带量的变化。

本次检测结果表明, 被测对虾苗种携带微量 WSSV, 范围在 $1.3 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^4$ copy/g。虾苗携带病原体, 说明了苗种生产过程中的病害控制还需加强, 对育苗场销售的苗种病害监控还需严格^[8]。整个检测结果表明, 对虾鳃组织中的 WSSV 携带量整体多于肌肉组织, 且两者变动趋势一致, 但没有显著性差异($P > 0.05$)。在对 1[#]-3[#]池塘整个养殖过程的调查中, WSSV 携带量在养殖前期(47 d 前)都有不同程度的增加, 但均处于一个较稳定的水平, WSSV 拷贝数总体保持在 10^4 copy/g 左右, 个别值高于 10^5 copy/g; 养殖中后期(60~116 d)携带量呈现波动上升的趋势, 并在最后一次采样中达到相对最大值。

根据 1[#]-3[#]池塘中对虾体内 WSSV 前期携带情况的调查, 对第二批采样的 4[#]-6[#]号 3 口池塘进

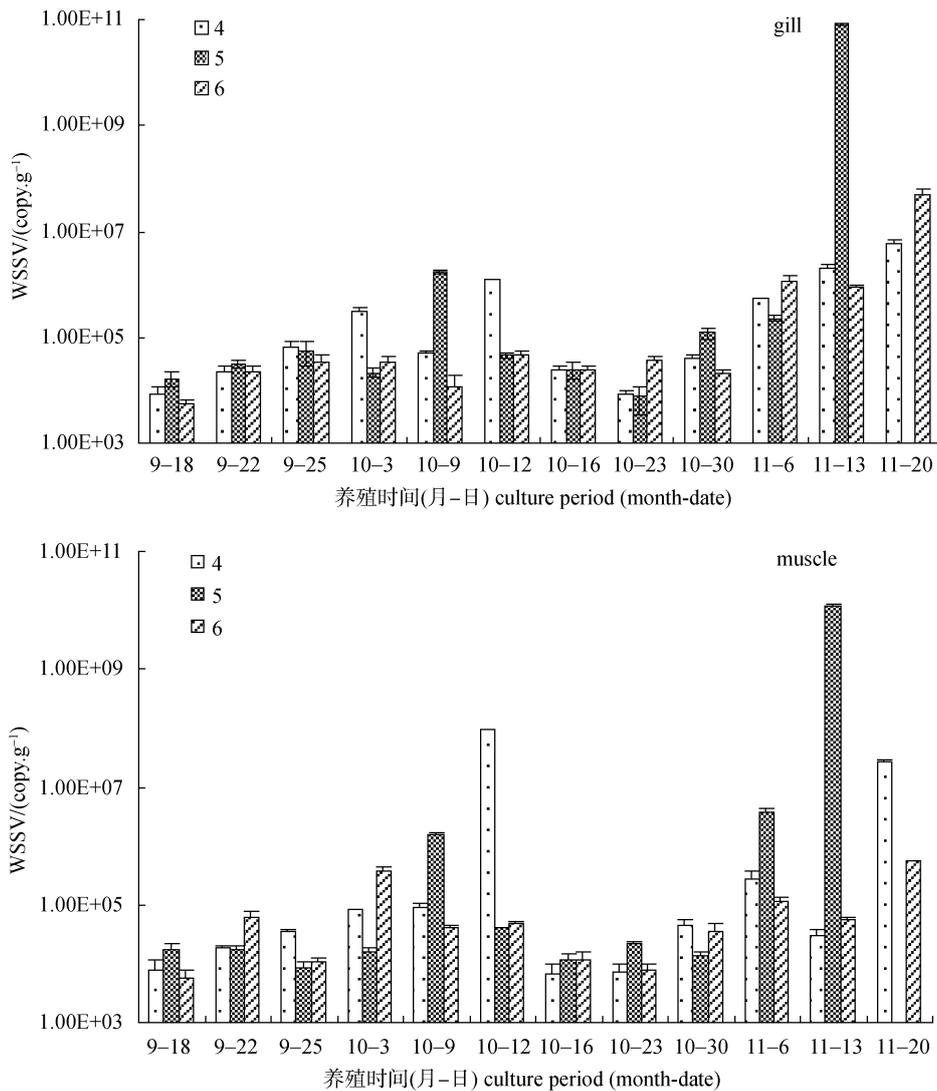


图 3 4[#]-6[#]养殖池养殖前中期加密采样对虾鳃及肌肉组织中 WSSV 携带量及变化情况

Fig.3 Variations of the copy numbers of WSSV carried in the gill and muscle during culture periods in shrimp ponds 4[#]-6[#]

行密集采样, 缩短了采样时间, 增加了采样次数, 以期更好的反应 WSSV 的变化规律及其受各种环境因素影响所表现出的动态变化。在对 4[#]-6[#]池塘养殖的调查中发现, 这 3 口池塘对虾携带 WSSV 的情况与 1[#]-3[#]池塘较为相似, 前期病毒含量有一定程度的上升, 但均处于一个较稳定的水平, 除个别池塘外, WSSV 拷贝数多保持在 10^5 copy/g 以下。然而 53 d 后急剧上升, 其中 5[#]池塘升高至 10^9 copy/g 以上, 导致 WSS 暴发。4[#]和 6[#]池塘也紧急收获, 致使养殖中断。

探讨本次调查检测中发病池塘对虾 WSSV 携带量急剧上升并率先暴发 WSS 的原因, 笔者发现,

池塘水体中浮游微藻及水体温差变化大是主要原因。其中浮游微藻的种群结构不良是重要因素; 冬棚搭建后造成水体温差变化大是主要诱因。有研究表明, 良好的浮游微藻种群结构可以提高对虾养殖生态系统的稳定性, 增强系统的抗干扰能力, 有利于对虾健康安全的生长^[9-10]。对虾疾病的暴发与水体中浮游微藻群落结构的变化具有一定的相关性, 虾池中浮游微藻的种类和数量尤其是赤潮生物的种类和数量与对虾发病的程度呈正相关, 其多样性指数与对虾的发病程度呈负相关^[11-13]。由表 2、表 3 可知, 在对以上各池塘的养殖环境指标中浮游微藻种群结构的检测结果显示: 2[#]、3[#]池塘

养殖初期均以赤潮藻为优势种,在凡亚比台风过境后的 1 周左右,2[#]、3[#]池塘均出现大量死虾的情况,台风后的第一次采样,对虾体内的病毒含量也出现急剧的升高。4[#]-6[#]池塘养殖前中期的浮游微藻种类单一,且均以颤藻为优势种,当池塘优势种由颤藻演替为其他藻类时,对虾带毒量均出现较大的波动。水温也是影响 WSSV 复制的重要因素之一^[14,16],搭建冬棚前后,养殖水体在短时间内的最大温差可达 7℃,由原来的 20℃左右升高到 26℃左右,达到病毒复制的最佳温度范围。搭建冬棚后的采样与之前采样相比带毒量有较大幅度的升高。所以笔者认为,当池塘浮游微藻群落结构长期不良,尤其是以颤藻等赤潮藻长期作为优势种时,会致使对虾免疫系统受到影响,使对虾一直处于亚健康状态,间接促进了 WSSV 在体内的复制,而环境因素改变如水温在适宜病毒复制的温度范围或冬棚的搭建使水温在短时间内变化较大。使得对虾产生应激反应,抵抗力有所下降,从而诱发了病害的发生。

综上所述,笔者认为,对虾可以在携带 WSSV 的情况下养殖生长,并成功上市,但前提是一个良好的养殖生态环境的构建和保持。降低或控制 WSSV 的含量,使其低于发病阈值。影响 WSSV 复制或暴发的关键因素有以下几点:①对虾免疫力的下降;②环境因子不稳定和恶化,如盐度突变,温度突变或者长期处于病毒最佳复制温度 25~28℃之间、pH 突变、氨氮和亚硝酸盐浓度突变或长期处于高值范围^[15-16];③池塘水体中浮游微藻和细菌的群落结构不良^[17]等。对虾养殖前中期是各种对虾病暴发的关键时期,更应注重对这些养殖时期对虾抵抗力的增强。鉴于此,有效预防 WSS 病毒病的关键点在于生态防控:构建优良的藻相,为对虾生长提供适宜的环境,增强对虾抵抗力,同时也可以减少不良藻相分泌的藻毒素等有害物质对对虾的伤害;定期投放微生物制剂改良养殖生态环境,如益生菌中芽孢杆菌的施放,有效调节池塘环境,利于对虾生长^[18-19];

针对台风暴雨等天气,要提前积极做好预防工作,缓解台风暴雨给虾体和养殖环境带来的不良

影响,如台风暴雨前后加强投放微生态制剂,维持良好浮游微藻和细菌的群落结构;提高对虾自身免疫力,如在饲料中增加 Vc、葡聚糖和中草药等物质^[20];采用混养模式^[21],增加捕食性动物,如少量混养罗非鱼、石斑鱼和虾虎鱼等凶猛鱼类,可以捕食病弱对虾,减少对虾因残食而导致的病害水平传播。总之,笔者认为应对 WSS,防大于治,在本调查的结果中发现并总结,在高位池对虾养殖环境中,藻相的优劣直接或间接的影响着对虾抵抗力的高低,同时反映了对虾抗病能力的强弱。构建良好的浮游微藻和细菌的群落结构,保持养殖水体环境稳定,可以最大程度的减少 WSS 暴发。

参考文献:

- [1] OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 2006, CHAPTER 2.3. 2. White spot disease.
- [2] Inouye K, Miwa S, Oseko N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus [J]. Fish Pathol, 1994, 29: 149-158.
- [3] 黄捷,于佳,王秀华,等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原其传播途径[J]. 海洋水产研究, 1995, 16 (1): 40-50.
- [4] Cock J, Gitterle T, Salazar M, et al. Breeding for disease resistance of penaeid shrimps [J]. Aquaculture, 2009, 286: 1-11.
- [5] Lightner D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimps [M]. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 1996.
- [6] Drand S V, Lightner D V. Quantitative realtime PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp [J]. J Fish Dis, 2002, 25: 381-389.
- [7] Ryncarz A J, Goddard J, Wald A, et al. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1941-1947.
- [8] 张家松,李卓佳,文国樑,等. 广东和福建地区不同养殖模式下凡纳滨对虾成虾携带 WSSV 的调查[J]. 中国动物检疫, 2010 (27): 40-41.
- [9] 曹煜成,李卓佳,杨莺莺,等. 浮游微藻生态调控技术在对虾养殖应用中的研究进展[J]. 南方水产, 2007 (3): 70-73.
- [10] 彭聪聪,李卓佳,曹煜成,等. 虾池浮游微藻与养殖水环境调控的研究概况[J]. 南方水产, 2010 (6): 74-80.

- [11] 郭皓, 于占国. 虾池浮游植物群落特征及其与虾病的关系[J]. 海洋科学, 1996 (1): 39-451.
- [12] 李卓佳, 郭志勋, 张汉华, 等. 斑节对虾养殖池塘藻-菌关系初探[J]. 中国水产科学, 2003, 10 (3): 262-264.
- [13] 李奕雯, 曹煜成, 李卓佳, 等. 养殖水体环境与对虾白斑综合症关系的研究进展[J]. 海洋科学进展, 2008, 26 (4): 532-538.
- [14] 何建国, 莫福. 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控制措施[J]. 中国水产, 1997 (7): 34-41.
- [15] You Xin-xin, Su Yong-quan, Yong Mao, et al. Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults [J]. Aquaculture, 2010, 305: 133-137.
- [16] Huan Gao, Jie Kong, Zhanjun Li, et al. Quantitative analysis of temperature, salinity and pH on WSSV proliferation in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by real-time PCR [J]. Aquaculture, 2011, 312: 26-31.
- [17] 刘孝竹, 李卓佳, 曹煜成, 等. 珠江三角洲低盐度虾池秋冬季浮游微藻群落结构特征的研究[J]. 农业环境科学, 2009, 28(5): 1-5.
- [18] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 160: 177-203.
- [19] 李卓佳, 郭志勋, 冯娟, 等. 应用芽孢杆菌调控虾池微生物的初步研究[J]. 海洋科学, 2006, 30 (11): 28-31.
- [20] 李卓佳, 林黑着, 郭志勋, 等. 中草药对斑节对虾生长、饲料利用和肌肉营养成分的影响[J]. 南方水产, 2007 (3): 20-24.
- [21] Tendencia E A, Bosma R H, Verreth J A J. White spot syndrome virus (WSSV) risk factors associated with shrimp farming practices in polyculture and monoculture farms in the Philippines [J]. Aquaculture, 2011, 311: 87-93.

Variation in WSSV in *Litopenaeus vannamei* during the period of culture in ponds above sea level

WANG Yiling^{1,2}, LI Zhuojia², ZHANG Jiasong², WEN Guoliang², CAO Yucheng², LUO Liang^{1,2}, ZHANG Huajun^{1,2}, HAN Ning^{1,2}

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

2. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

Abstract: The commercial culture of shrimp has expanded rapidly in China in recent decades and is now one of the most important agricultural industries. However, shrimp production decreased significantly between 1992-1997 due to the outbreak of white spot syndrome (WSS). WSS is of serious concern to shrimp farming throughout the world as mortality can approach 100% within 3-10 d of infection with WSSV. There is currently no effective treatment for this disease. We measured the variation in infection intensity of WSSV carried by shrimp (*Litopenaeus vannamei*) among six ponds in Hongtai Farm in Shanwei of Guangdong province between July and November 2010. In addition, we measured several environmental indices, water quality indicators, and the population structure of planktonic algae. We used real-time PCR to quantify the number WSSV copies in each shrimp. All the shrimp larvae carried WSSV at concentrations ranging from 1.3×10^3 to 1.7×10^4 copies/g. Furthermore, the shrimp were infected with WSSV throughout the entire farming period. The mean number of WSSV copies was higher in the gill tissue (2.3×10^9 copies/g) than in the muscle tissue (3.2×10^8 copy/g), but the difference was not significant ($P > 0.05$). The number of WSSV copies tended to increase in both tissues throughout the farming period, and was characterized by a number of peaks. During the early rearing period, the number of copies ranged from 1.3×10^3 - 3×10^7 copies/g, whereas in the mid and latter stages of rearing the number of copies increased to 1.5×10^6 - 1.2×10^{11} copies/g. In some ponds, outbreaks of WSS forced an end to farming. Rapid changes in water temperature, algae population structure, and weather were also associated with changes in the number of WSSV copies in shrimp. Our results suggest that shrimp can be cultured even when infected with WSSV. The intensity of infection with WSSV varied temporally and was affected by culture time and environmental factors. We suggest that maintaining the population structure of planktonic algae, keeping water quality constant, and decreasing stress can significantly reduce the likelihood of WSS outbreak.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; white spot syndrome virus; TaqMan real-time PCR; variation;

Corresponding author: LI Zhuojia. E-mail: zhuojiali609@163.com