

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) “黄海 2 号”人工感染 WSSV 的 荧光定量分析*

逢锦菲^{1,2} 孔杰² 孟宪红² 栾生²
罗坤² 曹宝祥² 刘宁²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 200090; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

摘要 采用人工投喂的方法对人工选育的 104 个“黄海 2 号”中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)家系的 5557 尾个体[体重(2.1±0.7)g]进行 WSSV 感染实验,分别选取存活时间最长(342h)和存活时间最短(45h)的 48 尾个体,定义为抗病组和敏感组。用荧光定量 PCR 方法检测两组对虾体内 WSSV 含量,结果表明,抗病组和敏感组对虾体内 WSSV 含量范围分别为(2.64×10⁴)—(3.13×10⁶)和 23.2—1.92×10⁶ copies/ng DNA,平均值分别为 8.71×10⁵和 3.19×10⁵ copies/ng DNA,抗病组对虾 WSSV 含量显著高于敏感组($P < 0.05$),显示抗病组比敏感组具有更强的抗病性能。对感染测试的所有对虾的死亡情况进行统计分析,结果表明,其死亡曲线不符合数量性状的正态分布特征,提示中国对虾对 WSSV 的抗性可能由少数几个主基因决定。本研究可为揭示中国对虾抗 WSSV 性状的基因决定机制提供依据。

关键词 中国对虾; WSSV; 人工感染; 荧光定量 PCR

中图分类号 S945.4+6

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)又称东方对虾、中国明对虾,主要分布在黄、渤海海域,是我国重要的海水养殖物种。但是,20 世纪 90 年代初以来,由白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)引起的对虾白斑综合症病毒病大规模暴发,该病严重阻碍了我国乃至全球对虾养殖业的持续健康发展(蔡生力等,1995; Flegel, 1997)。为了了解和控制疾病的发生,减少经济损失,诸多学者都投身于对虾白斑综合症病毒病的研究中,探究了很多 WSSV 的防治措施(闫冬雪,2006),然而,这些方法都不能有效控制白斑病的大规模暴发。

经过多年的养殖实践和人工感染 WSSV 实验,

作者发现中国对虾对 WSSV 存在一定的抗性,即经 WSSV 感染后总会有少量对虾个体存活,因此,作者尝试采用对中国对虾进行抗病品种选育的方法来解决这一问题。Durand 等(2002)采用人工注射和浸泡感染的方法对对虾进行 WSSV 感染实验,发现注射或浸泡不同剂量的 WSSV 对虾的半致死时间(50%的对虾死亡)不同,表明不同 WSSV 感染方法及感染量下对虾对 WSSV 表现出的抗性不同;Huang 等(2011)对凡纳滨对虾进行 WSSV 感染实验,研究结果发现不同家系的对虾对 WSSV 的抗性不同,高抗家系的存活率最高;黄永春等(2010)为三个凡纳滨对虾类群注射不同拷贝 WSSV,高抗性、中抗性、敏感类群的死

* 国家自然科学基金资助项目,31072206 号,31172402 号;青岛市关键技术攻关类项目,11-1-1-11-hy 号。逢锦菲, E-mail: pangjinfei126com@126.com

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

收稿日期:2012-07-28, 收修改稿日期:2012-09-23

亡率依次增大, 结果证明经四代选育后的高抗对虾具有良好的抗 WSSV 性能; 孙成波等(2006)对斑节对虾和凡纳滨对虾注射感染不同剂量 WSSV 后, 发现凡纳滨对虾死亡时间随病毒浓度降低而延长, 低剂量的 WSSV 感染时, 凡纳滨对虾对 WSSV 表现更明显的抗性, 存活时间更长; 对日本对虾注射不同稀释倍数的白斑综合症病毒粗提液, 结果显示注射 10^4 、 10^6 倍稀释液组的死亡率明显低于 10 、 10^2 、 10^3 倍组(刘波等, 2003)。相关研究均表明对虾对不同感染方法下感染不同剂量的 WSSV 可以表现出不同抗性, 此发现对开展中国对虾抗病品种的选育工作具有重要意义。

目前, 本课题组已经获得了两个中国对虾养殖新品种——“黄海 1 号”(品种登记号: GS01001-2003)(李健等, 2005)和“黄海 2 号”(品种登记号: GS01002-2008)(Wang *et al.*, 2010)。其中中国对虾“黄海 2 号”是采用群体、家系与多性状复合育种技术, 经 10 代连续选育获得的品种, 该品种生长速度快, 收获体重比未经选育的野生种提高 30% 以上, 适合大规模商品虾的养殖; 具有明显的抗病性, WSSV 感染后表现为不发病、染病后死亡慢等特点, 存活时间延长 10% 以上, 抗病性显著高于商品苗种, 新品种的推广和应用大大缓解了 WSSV 疾病的危害。

本实验以中国对虾“黄海 2 号”为研究对象进行了大规模 WSSV 的人工投喂感染实验, 结合实时荧光定量 PCR(Quantitative Real Time PCR)技术, 从对虾存活时间和体内病毒含量的角度探寻不同对虾个体抗病性能, 揭示中国对虾“黄海 2 号”的抗病决定机制, 以期为中国对虾的抗病遗传育种提供参考, 并为以后从分子水平上探明 WSSV 与对虾抗性的相互关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以 2011 年中国水产科学研究院黄海水产研究所青岛鳌山卫海水养殖引种育种中心培育的“黄海 2 号”中国对虾为实验材料。共计 104 个家系[包括感染存活家系、耐低温家系、抗病家系以及生长家系 4 个类型, (2.1 ± 0.7) g], 每家系随机选取 60 尾, 进行 VIE(visible implant elastomer)荧光标记后于室外圆池暂养, 2d 后转移至山东省海阳市黄海水产有限公司进行人工感染 WSSV 测试。

1.2 人工感染方法

将所有待测试对虾随机分为 4 组, 于测试池(水

泥池, 内径 5m, 高 1.27m)中暂养, 稳定 5d 后采用单尾、等量、口饲 WSSV 方法(专利申请中)进行对虾人工感染。每尾对虾摄食等量病毒后人工感染结束。每小时观察对虾生长、摄食情况。当出现对虾死亡时及时捞出并记录荧光颜色标记、死亡时间、体重及水温等, 置于 -20°C 冰柜冷冻保存、备用。实验期间投喂鲜活大卤虫及配合饲料至实验结束。每天吸底 1 次, 换水 2 次, 每次换水 $1/3$ — $1/2$ 水体体积, 保持水质清新。水温控制在 $(25 \pm 4)^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 WSSV 含量检测方法

选取 WSSV 感染实验中早期濒死的 48 尾和 30d 后死亡的 48 尾对虾, 组成敏感组和抗病组, 按照 TIANGEN 基因组 DNA 提取试剂盒的方法进行基因组 DNA 的提取, 用 NanoDrop 2000c 核酸浓度测定仪进行核酸定量, 将核酸统一稀释成 $20\text{ng}/\mu\text{L}$ 备用。WSSV 含量采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法(Durand *et al.*, 2002), 目标片段长度为 69bp, 引物及探针由大连宝生物公司(TaKaRa)合成。荧光定量 PCR 反应参数如下, PCR 反应体系($20\mu\text{L}$)为: $1 \times$ 体积的 Perfect Real Time premix(大连宝生物公司 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™])、正反引物各 $0.25\mu\text{mol/L}$ 、探针 $0.125\mu\text{mol/L}$ 、病毒 DNA 模板 $2\mu\text{L}$ 、灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 10s; 95°C 变性 5s, 60°C 退火及延伸 34s; 共 40 个 PCR 循环, 在退火及延伸过程中采集荧光信号。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 (8.51×10^6) — (8.51×10^0) copies/ μL , 每个稀释度做 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 含量值。

人工感染测试数据处理与分析采用 SPSS17.0 统计分析软件, 显著性检验水平为 0.05。

2 实验结果

2.1 人工投喂感染 WSSV 后对虾死亡情况

实验共进行 36d, 测试对虾 5557 尾, 平均每尾对虾摄食毒饵 16.09mg 。在人工感染 48h 后开始有个别对虾出现白斑综合症的典型症状, 行动迟缓、摄食量减少, 甲壳出现直径为 0.5 — 2.0mm 的白色斑点。统计对虾死亡情况, 在 67h 出现第一个死亡小高峰, 140h 出现死亡最高峰, 死亡数达到 872 尾, 累计死亡率为 61.4%。300h 之后对虾死亡速度越来越慢, 基本

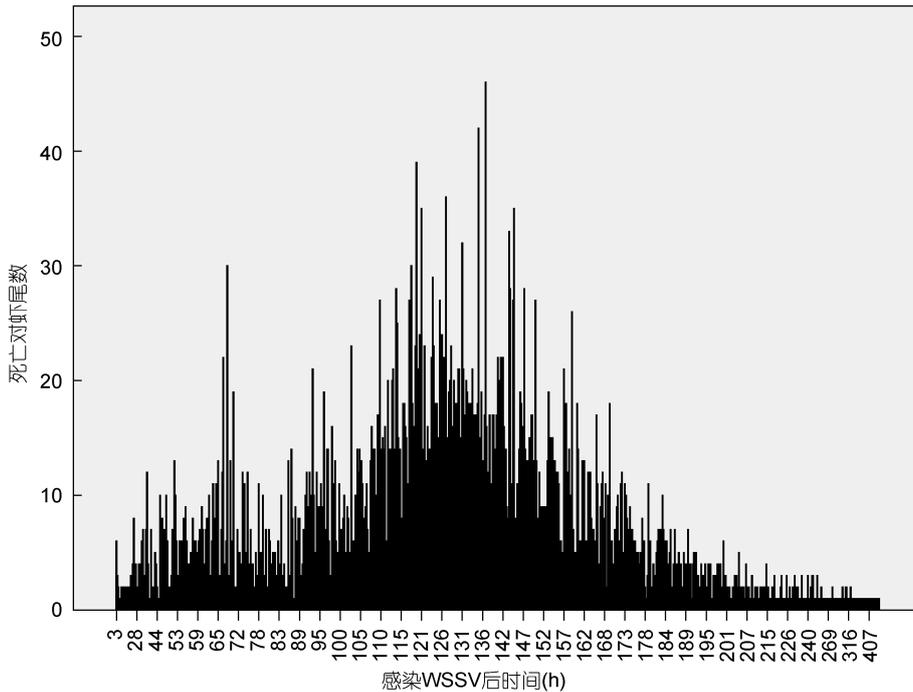


图1 中国对虾“黄海2号”感染 WSSV 后的死亡曲线

Fig.1 Mortality curve of *F. chinensis* “Huanghai No.2” infected by WSSV

不再死亡。实验结束时，对虾存活最长时间达 602h (图 1)。

综合所有感染 WSSV 后对虾死亡情况，每 12.5h 为一个区间段，统计每个区间段对虾死亡数目，得出对虾死亡情况的柱形次数分布图。用 SPSS17.0 软件 Kolmogorov-Smirnov 单一样本检验方法对对虾的死亡数目作正态性检验，结果表明该组资料不符合正态分布规律($P < 0.001$)。

2.2 对虾体内 WSSV 含量检测结果

以 7 个已知标准品拷贝数的对数值为横坐标，以测得的 Ct 值为纵坐标，绘制标准曲线，线性相关值为 0.995842，斜率为-3.241346 (图 2)。

对虾体内 WSSV 含量见表 1。抗病组对虾体内病毒含量在(2.64×10^4)—(3.13×10^6) copies/ng DNA 范围内，平均值为 8.71×10^5 copies/ng DNA，敏感组病毒含量在(2.32×10^4)—(1.92×10^6) copies/ng DNA 范围内，平均值为 3.19×10^5 copies/ng DNA。感染 WSSV 后对虾体内 WSSV 的含量均比较高，平均值达到 10^5 copies/ng DNA。应用独立样本 T 检验分析两组对虾体内 WSSV 含量，抗病组和敏感组对虾体内 WSSV 含量差异显著($P = 0.013$)，抗病组对虾体内 WSSV 含量显著高于敏感对虾 WSSV 含量。

分别统计抗病组和敏感组在不同病毒含量区间的

对虾尾数，结果见表 2。其中，抗病组中 47(97.92%)尾对虾体内病毒含量均高于 1.0×10^5 copies/ng DNA，抗病组中病毒含量大于 1.0×10^6 copies/ng DNA 的对虾尾数极显著高于敏感组($P = 0.000$)；敏感组中有 11(22.92%)尾对虾体内病毒含量低于 1.0×10^5 copies/ng DNA，敏感组对虾病毒含量小于 1.0×10^5 copies/ng DNA 的对虾尾数极显著高于抗病组中对虾尾数($P = 0.004$)。

2.3 抗病组和敏感组对虾所在家系特点

对抗病组和敏感组对虾所在家系类型进行分析(表 3)，“抗病”家系和“感染存活”家系在抗病组中占 35.42%，在敏感组中占 27.03%，两者差异不显著($P = 0.178$)；“生长”家系在抗病组中占 58.33%，在敏感组中占 70.27%，两者差异亦不显著($P = 0.307$)。

比较抗病组和敏感组中各家系类型所携带病毒含量(图 3)，抗病组中“抗病”家系所携带病毒含量

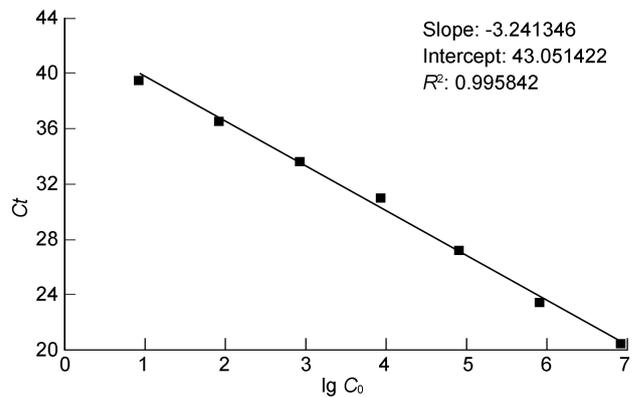


图2 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve with fluorescence quantitative PCR

表 1 抗病组和敏感组中国对虾 WSSV 含量

Tab.1 WSSV loads of *F. chinensis* in resistant group and susceptible group

组别	样本数(尾)	WSSV 含量(copies/ng DNA)			
		最小值	最大值	平均值	标准差
抗病组	48	2.64×10^4	3.13×10^6	8.71×10^5	5.11×10^5
敏感组	48	2.32×10^4	1.92×10^6	3.19×10^5	3.27×10^5

表 2 抗病组和敏感组中国对虾 WSSV 含量比较

Tab.2 Comparison of WSSV loads between resistant group and susceptible group

病毒含量	抗病组 [尾(%)]	平均值 (copies/ng DNA)	敏感组尾 [尾(%)]	平均值 (copies/ng DNA)
$<10^4$	0	0	3(6.25%)	1.39×10^3
10^4-10^5	1(2.08%)	2.64×10^4	8(16.67%)	5.00×10^4
10^5-10^6	28(58.33%)	5.93×10^5	36(75.00%)	3.60×10^5
$>10^6$	19(39.58%)	1.33×10^6	1(2.08%)	1.92×10^6
合计	48		48	

表 3 抗病组和敏感组中国对虾所在家系类型

Tab.3 Types of family in resistant group and susceptible group

家系类别	抗病组[尾(%)]	敏感组[尾(%)]
抗病	10(20.83%)	7(18.92%)
生长	28(58.33%)	26(70.27%)
耐低温	3(6.25%)	1(2.70%)
感染存活	7(14.58%)	3(8.11%)
合计	48	37

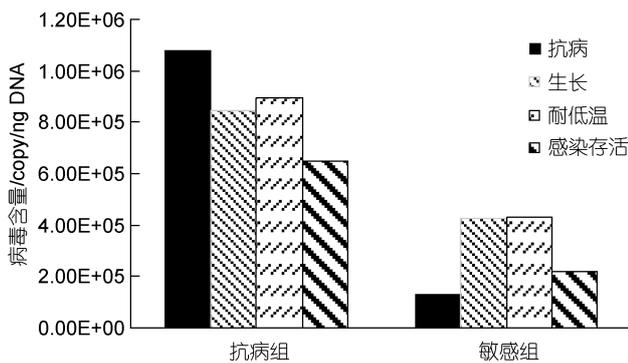


图 3 抗病组和敏感组中各家系病毒含量

Fig.3 WSSV loads of different families in resistant group and susceptible group

均值(1.08×10^6 copies/ng DNA)最高,“感染存活”家系所携带病毒含量均值(6.49×10^5 copies/ng DNA)最低,两者差异不显著($P=0.200$);敏感组中“生长”和“耐低温”家系的对虾病毒含量较“抗病”和“感染存活”家系高,两者差异显著($P=0.032$)。

3 讨论

3.1 中国对虾“黄海 2 号”人工感染 WSSV 的死亡特征

人工感染 WSSV 的方式有投喂、浸泡、注射等,注射 WSSV 对虾死亡较快,并且对对虾的机械损伤较大;而游离状态的 WSSV 在海水中 4h 就失去感染活性(何建国等, 1999),所以浸泡感染效果不是很显

著。自然环境下对虾主要是通过摄食携带 WSSV 的对虾或投喂的卤虫等而感染 WSSV,本实验采用人工投喂的方式进行 WSSV 感染,符合自然条件下养殖对虾白斑综合症病毒病发生的正常情况。本实验采用单尾口饲感染的方式,确保实验个体能独立地同时感染同等剂量的病毒。投喂毒饵的剂量及方法都较之前的研究(黄捷等, 1995; 江世贵等, 2000; 刘萍等, 2001)有很大的改进,并且,在整个感染实验过程中,及时取出死亡或濒死个体,有效的防止了对虾之间的相互残食,保证了感染实验的准确性、有效性。

Lightner(1996)发现中国对虾感染 WSSV 后 3—10d 内死亡率可达到 100%;注射感染 WSSV 后斑节对虾和凡纳滨对虾的存活时间最长分别为 123h 和 210h (孙成波等, 2006); Jiang(2010)研究发现日本对虾和中国对虾感染后 WSSV 分别在 196h 和 66h 死亡率达到 100%,在本实验中感染 WSSV 后中国对虾存活最长时间达 602h,充分证明“黄海 2 号”中国对虾感染 WSSV 后存活时间更长,存活率得到极大提高,具有一定的抗病能力,暗示“黄海 2 号”中国对虾能够耐受的 WSSV 含量更高。

虽然国内外许多免疫学家尝试从中和抗体、免疫增强剂、疫苗、RNAi 等(罗展等, 2007)方面防治 WSSV 的暴发,为深入认识对虾的免疫机制及调控等作用机理提供了丰富的基础信息,但尚无有效的药物和防治方法。也有很多学者致力于寻找中国对虾抗病相关分子标记或基因,如 AFLP、RAPD、SSR 和 SNP 等分子标记技术、基因芯片等(孟宪红等, 2005; 岳志芹等, 2005; Dong *et al.*, 2008),目前尚无突破性的进展。Meng 等(2011)研究发现中国对虾感染 WSSV 后的死亡曲线呈“双峰”或“多峰”(即一个高峰加多个小峰)形式,并不符合数量性状的正态分布特征。Huang 等(2011)在凡纳滨对虾对 WSSV 抗性研究中发现使用投喂感染的方式得到的对虾死亡曲线会出现 3 个死亡高峰,而注射感染法得到的死亡曲线只有一个单峰,并且其死亡率呈现正态分布,这说明不同的感染方式所诱导的对虾防御机制不同,从而对对虾的死亡时间及死亡率等会产生不同的效果,也证明了感染同等剂量的毒饵或 WSSV 病毒量对实验结果有至关重要的影响。统计本次感染实验对虾的死亡情况,发现感染 WSSV 后中国对虾的死亡曲线有两个死亡高峰,不符合数量性状的正态分布特征,表明该抗病性状并非由微效多基因控制,可能由少数几个主基因决定,为进一步开展对虾抗 WSSV 基因决定

机制的研究提供依据。

3.2 WSSV 荧光定量结果分析

本实验采用灵敏性较高的实时荧光定量 PCR 技术对感染实验中早期濒死与 30d 后死亡的对虾体内 WSSV 含量进行定量检测,发现敏感组对虾 WSSV 含量平均值为 3.19×10^5 copies/ng DNA,抗病组对虾 WSSV 含量平均值为 8.71×10^5 copies/ng DNA,抗病对虾体内 WSSV 含量显著高于敏感对虾的 WSSV 含量 ($P < 0.05$),充分证实感染实验中存活时间长的对虾对 WSSV 的抵抗力显著强于存活时间短的对虾,表明其具有一定的抗病能力。作者发现敏感组中 WSSV 含量最小的仅 23.2 copies/ng DNA,而抗病组中 WSSV 含量最小的为 2.64×10^4 copies/ng DNA,并且抗病组中 47(97.92%)尾对虾体内病毒含量均高于 1.0×10^5 copies/ng DNA,表明早期濒死对虾对 WSSV 敏感性高,30d 后死亡的对虾对 WSSV 的耐受力更强,这些病毒含量差异显著、抗病力明显不同的两个对虾群体的获得为进一步开展抗 WSSV 的相关分子生物学研究奠定了重要基础。

3.3 对虾“抗感染”与“抗病”假说的分析

在实际生产过程中,作者发现中国对虾经 WSSV 感染实验后总会有少量个体存活,此类对虾对 WSSV 表现出一定抗性,而且存活的个体病毒含量呈现“抗感染”(病毒含量很低, < 100 copies/ng DNA)和“抗病”(病毒含量很高, $> 10^6$ copies/ng DNA)两极分化趋势。Huang 等(2011)发现高抗家系存活对虾 WSSV 含量 [$(23.87 \pm 2.56) \times 10^6$ copies/g] 显著低于其它家系,而死亡对虾 WSSV 含量 [$(54.1 \pm 3.9) \times 10^6$ copies/g] 显著高于其它家系,表明高抗性对虾一方面阻止了 WSSV 在其体内复制,另一方面能够耐受一定高水平的 WSSV 剂量。

本实验中“抗病”家系和“感染存活”家系在抗病组中的分布比例多于分布在敏感组中的(表 3),说明“抗病”和“感染存活”家系的选育,即抗病力强或抗感染的家系对虾对 WSSV 有一定的抵抗力。抗病组中“抗病”家系病毒含量最高(图 3),“抗病”家系与其它家系相比表现出较高的对 WSSV 的抵抗力(耐受力),即“抗病”家系能够耐受 WSSV 拷贝量比较高(3.13×10^6 copies/ng DNA)。人工感染 WSSV 后,与“生长”和“耐低温”家系相比,“抗病”和“感染存活”家系的存活时间最长,存活率也最高,说明作者选育的抗性家系具有较高的抗病能力,而且抗病能力可遗传,进一步证实了对虾具备抗病的遗传

基础。同时,通过人工感染 WSSV 实验,还可进行各家系间的存活时间对比分析,为下一年抗病品种培育选取合适的家系和个体。

3.4 结论及意义

本实验以中国对虾“黄海 2 号”为实验材料,人工投喂感染 WSSV 后,部分对虾能存活 600h 以上,表现出明显的抗病性,能有效阻止 WSSV 的感染规模、感染进程,延缓对虾 WSSV 暴发时间,可以在一定程度上缓解和控制 WSSV 疾病的发生,实际对虾养殖生产中一旦白斑综合症暴发能有效减少养殖户的经济损失。

本实验证明了中国对虾养殖新品种“黄海 2 号”在人工感染 WSSV 实验中表现出了较强的抗病力,表明通过抗病选育获得对虾新品种是防治白斑综合症病毒病的一个有效途径。本研究结果可以为进一步开展对虾优良性状选育的研究及抗病相关分子标记的筛选工作提供基础数据和实验材料。

参 考 文 献

- 刘 波,俞志明,2003. 建立白斑综合症病毒在日本对虾体内潜伏性感染的方法研究. 海洋科学, 27(8): 72—76
- 刘 萍,孔 杰,李 健,2001. 白斑综合症病毒(WSSV)对中国对虾及各期幼体人工感染的试验研究. 海洋水产研究, 22(1): 1—8
- 闫冬雪,2006. 防治对虾白斑综合症杆状病毒(WSSV)的主要措施. 水产科学, 25(4): 202—204
- 江世贵,何建国,马之明等,2000. 白斑综合症病毒对斑节对虾幼体和仔虾的致病性. 中山大学报: 自然科学版, 39: 172—176
- 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 健,刘 萍,何玉英等,2005. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育. 水产学报, 29(1): 1—5
- 何建国,周化民,江静波,1999. 白斑综合症杆状病毒致病性特征. 热带海洋, 18(1): 59—67
- 罗 展,黄 健,周 丽,2007. 抗白斑综合症病毒(WSSV)感染途径研究进展. 海洋水产研究, 28(5): 116—122
- 岳志芹,王伟继,孔 杰等,2005. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异. 水产学报, 29(1): 13—19
- 孟宪红,孔 杰,刘 萍等,2005. 中国明对虾抗白斑综合症病毒分子标记的筛选. 中国水产科学, 12(1): 14—19
- 黄 健,蔡生力,宋晓玲等,1995. 对虾爆发性流行病原的人工感染研究. 海洋水产研究, 16(1): 51—58
- 黄永春,艾华水,殷志新等,2010. 第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病及免疫特性研究. 水产学报, 34(10): 1549—1558
- 蔡生力,黄 健,王崇明等,1995. 1993—1994 年对虾爆发病的流行病学研究. 水产学报, 19(2): 112—117

- Dong Shirui, Kong Jie, Meng Xianhong *et al*, 2008. Microsatellite DNA markers associated with resistance to WSSV in *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. *Aquaculture*, 282(1—4): 138—141
- Durand S V, Lightner D V, 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25: 381—386
- Flegel T W, 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Microbiol Biotechnol*, 13: 433—442
- Huang Yongchun, Yin Zhixin, Ai Huashu *et al*, 2011. Characterization of WSSV resistance in selected families of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 311: 54—60
- Jiang Guojian, 2010. Comparison of defence ability against the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture Research*, 41: 1322—1330
- Lightner D V, 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Section 3: Virus World Aquaculture. Louisiana: Baton Rouge, 4—27
- Meng Xianhong, Wang Qingyin, Kong Jie *et al*, 2011. Tolerance of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2” to white spot syndrome virus. *Journal of Shellfish Research*, 30(2): 375—380
- Wang Qingyin, Li Jian, Kong Jie *et al*, 2010. Genetic Improvement and Farming Technological Innovation on Fleshly Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in China. *Asian Fisheries Science*, 23: 583—601

REAL-TIME PCR ASSAY FOR QUANTIFYING WSSV LOAD IN *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* “HUANGHAI No.2”

PANG Jin-Fei^{1,2}, KONG Jie², MENG Xian-Hong², LUAN Sheng²,
LUO Kun², CAO Bao-Xiang², LIU Ning²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 200090; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract A total of 5557 shrimp individuals [(2.1±0.7)g] from 104 families of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2” obtained by selective breeding were artificially infected with WSSV. 48 samples with the longest survival time were defined as the WSSV-resistant group and 48 samples with the shortest were defined as the WSSV-susceptible group. The average survival time of the resistant and the susceptible group was 342h and 45h, with the difference in time of 297h. The WSSV loads in shrimp were quantified by real time PCR. The WSSV loads in the resistant and susceptible group were (2.64×10⁴)—(3.13×10⁶) and 23.2—1.92×10⁶ copies/ng DNA, with the average of 8.71×10⁵ and 3.19×10⁵ copies/ng DNA, respectively. WSSV loads of the resistant group was significantly higher than the susceptible group ($P<0.05$), which showed higher disease resistance ability of resistant group. The death curve of the shrimp didn't accord with the normal distribution of quantitative trait, suggesting that the trait of WSSV resistance may be controlled by several major genes. This study will be helpful to reveal the genetically determined mechanism of WSSV-resistance trait of *F. chinensis*.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; WSSV; artificial infection, Real-time PCR