

亚致死温度热休克对凡纳滨对虾的保护作用^{*}

谢数涛, 吴 任, 许忠能, 林小涛, 张其中

(暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘 要: 以亚致死温度(35℃)热休克凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 2 h, 再进行致死温度(40℃)热刺激, 凡纳滨对虾的存活率为54.2%。以亚致死温度对凡纳滨对虾热休克2 h, 正常水温(25±0.5)℃下分别恢复2、6、12和24 h, 再对其进行白斑综合症病毒(white spot syndrome virus WSSV)注射感染, 得到凡纳滨对虾的平均存活时间分别为101.43、98.07、76.92和63.28 h, 与未经35℃热休克的对照组的平均存活时间(46.89 h)相比, 均存在极显著差异性($P < 0.01$)。证明了适当的热休克应激, 不仅能提高凡纳滨对虾对高温的热耐受性, 还显著地增强了凡纳滨对虾对WSSV感染的抵抗性。

关键词: 热休克; 白斑综合症病毒; 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*; 亚致死温度

中图分类号: Q958.11, S968.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2005)06-0087-03

现今, 对虾养殖业的病害依然十分严重, 特别是对虾白斑综合症病毒(whit spot syndrome virus, WSSV)的广泛性危害至今尚未得到有效控制。对虾WSSV的潜伏感染现象仍较为普遍^[1], 因环境变化导致对虾应激发病已成为白斑综合症的一种主要发病方式; 目前生产上多用药防治, 收获甚微, 且药物残留导致对虾品质下降、出口受阻, 致使WSSV的防治成为国内外对虾养殖业的一大难题。因此通过养殖水环境的调节和控制来有效防治对虾白斑综合症的方法, 日益受到广泛重视。

热休克(heat shock)能保护细胞、组织以及整个生物体减轻和抵抗继后的致死温度或其它有害因子的损伤^[2-4]。例如, 热休克能够减轻人胃细胞腺毒症引起的损伤^[5]; 大西洋鲑 *Salmo salar* 先以亚致死温度热休克处理, 再暴露于高盐海水, 表现出很好的交叉保护现象^[6]。可见, 经适当的热休克处理, 生物体内会产生一种明显的抗病、抗逆或抗损伤的生理保护反应。国内外关于对虾热休克的研究始于近几年, 报道的相关文献非常少^[4, 7], 至今还没有利用热休克来研究对虾抗WSSV感染的报道。本实验选择世界上重要的经济养殖对虾——凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 为实验动物, 研究凡纳滨对虾在适度热刺激诱导后, 在抗高温以及抗WSSV感染能力的变化, 为进一步阐明热休克对于对虾生命活动的影响打下基础, 也为对虾白斑综合症的防

治探索新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验对虾

实验所用的凡纳滨对虾购自广州黄沙水产市场, 选择体长约7.0 cm, 体质量约3.5 g健康活泼的个体, 置循环水族缸中暂养1周以上。随机抽取5只对虾, 经WSSV PCR二步法检测^[8], 均为阴性。

1.2 养殖与管理

养殖海水购自黄沙水产市场, pH7.5~8.0, 盐度21~24, 24 h不间断充气。实验期间每天投喂对虾饲料2次, 吸污1次, 每天交换5%新的海水, 温度维持在(25±0.5)℃。

1.3 亚致死温度、致死温度的确定及热休克对凡纳滨对虾热耐受性的影响

用自动控温加热器设置温度梯度34、35、36、37、38、39、40和41℃。每个温度组对虾8尾, 进行热刺激2 h, 然后移入100 L圆桶正常水温下恢复暂养3 d。

实验对虾分为实验组和对照组。实验组以亚致死温度热休克2 h, 正常水温恢复6 h后, 再用致死温度热刺激2 h, 正常水温下暂养3 d^[9]。

1.4 WSSV粗提液的制备与注射感染^[9]

病虾为凡纳滨对虾, 采自广东湛江市东海岛某对虾养殖场。

* 收稿日期: 2004-12-14

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(04300664); 暨南大学人才科研启动基金资助项目(51204019)

作者简介: 谢数涛(1968年生), 男, 副教授; E-mail: tstxie@jnu.edu.cn

1.5 4 个不同恢复时间对急性感染 WSSV 凡纳滨对虾平均存活时间的影响

以亚致死温度热休克 2 h, 分别恢复 2, 6, 12 和 24 h 后, 注射等量 WSSV 粗提液, 记录 4 组感染对虾的存活时间。对照组与 2、6、12、24 h 恢复组共 5 组各设 3 个平行组, 每个平行组 8 尾虾。

2 结 果

2.1 亚致死温度、致死温度的确定及热休克对凡纳滨对虾热耐受性的影响

8 个温度梯度实验结果见图 1。34、35 ℃热休克 2 h, 以及在继后 3 d 恢复中, 都没有死亡; 40 与 41 ℃热休克 0.5 h, 实验对虾全部死亡。确定在本实验条件下, 南美白对虾热休克 2h 的半致死温度是 38 ℃, 致死温度为 40 ℃, 本实验选择亚致死温度为 35 ℃。

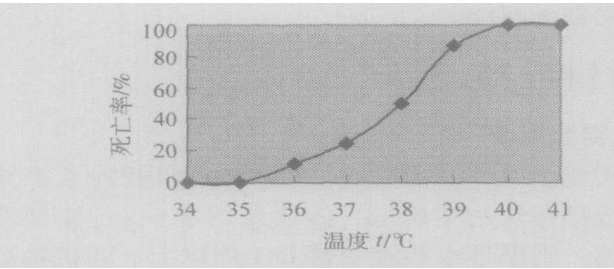


图 1 凡纳滨对虾在不同温度热休克 2 h 过程中, 及继后 3 d 恢复期内的死亡率曲线
Fig. 1 The mortal curve of *Litopenaeus vannamei* exposure to different temperature for 2h and then recovered for 3 days

未经亚致死温度 (35 ℃) 热休克的凡纳滨对虾直接接受 2 h 的致死温度 (40 ℃) 热刺激, 全部死亡; 而经受亚致死温度热激诱导的试验组, 3 个平行组的存活率为 50%, 50% 和 62.5%, 平均存活率为 54.2%。

2.2 不同恢复时间对急性感染 WSSV 凡纳滨对虾平均存活时间的影响

经 WSSV 感染的病死虾甲壳易剥落, 头胸甲有大量 1~2 mm 大小的白斑点, 腹甲也有同样的白色斑点, 与有关文献中的观察结果相似^[10]。死亡对虾经 PCR 检测, 均为 WSSV 阳性。空白组的对虾在实验过程中无死亡, 对照组及 4 个实验组的对虾平均存活时间如表 1。

经单因素方差分析, 对照组及 4 个实验组的各平行组间均不存在显著性差异 ($P>0.05$)。

对 5 个组 (对照组、2 h 恢复组、6 h 恢复组、12 h 恢复组和 24 h 恢复组) 的平均存活时间进行多重方差比较分析。结果表明, 除 2 h 恢复组与 6

h 恢复组的平均存活时间不存在显著差异性 ($P>0.05$) 外, 其余各组间都存在极显著差异 ($P<0.01$)。

表 1 不同恢复时间对急性感染 WSSV 凡纳滨对虾平均存活时间的影响

Tah 1 The effects of different recovery time after heat shock on the average survival time of WSSV infected *Litopenaeus vannamei*

组类别	养殖桶号	实验样本数	最早死亡时间/h	最迟死亡时间/h	平均存活时间/h
空白组	O1	10	—	—	—
对照组	C1	8	38.4	52	45.55
	C2	8	42.5	49.2	49.05
	C3	8	43.3	52.8	46.08
	合计	24	38.4	52.8	46.89
2 h 恢复组	1	8	50.5	131.8	101.85
	2	8	51	141.5	98.04
	3	8	53	140	104.41
	合计	24	50.5	141.5	101.43
6 h 恢复组	4	8	48.8	125.3	97.06
	5	8	54.6	119.2	100.23
	6	8	55	121	96.93
	合计	24	48.8	125.3	98.07
12 h 恢复组	7	8	38	101.5	80.78
	8	8	38.7	107.6	74.06
	9	8	40	98.5	75.93
	合计	24	38	107.6	76.92
24 h 恢复组	10	83	7.5	80.7	61
	11	8	39.1	75.8	63.56
	12	8	40.3	82.7	65.29
	合计	24	37.5	82.7	63.28

3 讨 论

在注射实验中, 2 h 恢复组和 6 h 恢复组凡纳滨对虾的平均存活时间无显著差异性, 说明 2~6 h 的恢复时间对急性感染 WSSV 凡纳滨对虾的保护作用无太大影响, 而 6~24 h 内, 凡纳滨对虾的平均存活时间开始逐渐下降, 表明热休克应激保护对凡纳滨对虾具有一定时效性。

本文实验结果表明, 热刺激可明显提高凡纳滨对虾对致死温度的热耐受性 (与对照组相比, 热激诱导组的对虾存活率达 50% 以上)。另外, 本文对凡纳滨对虾进行预先热休克胁迫, 在 1 d 的恢复期内, 急性感染凡纳滨对虾的平均存活时间均显著高于不经热休克应激的对照组, 表明热休克应激不但可提高凡纳滨对虾对致死温度的热耐受性, 而且还诱导凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的交叉保护作用。Venzon 等人^[7] 对凡纳滨对虾虾苗作预先热休克处理, 也发现对虾对桃拉综合症病毒 (taura syndrome

virus TSV) 的抗性显著提高。说明热休克可以促发对虾产生一种应激保护机制, 使生物体最大限度地适应于环境恶化、机械损伤和病害入侵。

参考文献:

[1] HE J G, DENG M, LING Q X, et al. Theory and strategies for controlling white spot syndrome(WSS) of cultured Penaeus monodon in south China[J]. Acta scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000, 39(suppl): 147—153.

[2] TEDENGREN M, OLSSON B, REIMER O, et al. Heat pretreatment increase cadmium resistance and HSP70 levels in Baltic Sea mussels[J]. Aquat Toxicol, 2000, 48: 1—12.

[3] SHAMSELDIN A A, CLEGG J S, FRIEDMAN C S et al. Induced thermotolerance in the pacific oyster, Crassostrea gigas[J]. J shellfish Res, 1997, 16(2): 487—491.

[4] RAVAUX J, GAILL F, IE BRIS N, et al. Heat—shock response and temperature resistance in the deep—sea vent shrimp Rimicaris exoculata[J]. J Exp Biol, 2003, 206(14): 2345—2354.

[5] VILLAR J, EDELSON J D, POST M, et al. Induction of heat shock response reduces mortality rate and organ damage

in a sepsis—induced acute lung injury model[J]. Crit Care Med, 1994, 22: 914—921.

[6] DUBEAU S F, PAN F, TREMBLAY G C, et al. Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein hsp70 and confers protection against osmotic shock [J]. Aquaculture, 1998, 168: 311—323.

[7] VENZON N C, BROCK D M, ZACARIOS D T, et al. Effect of temperature on Taura syndrome virus challenge of juvenile Litopenaeus vannamei[J]. FASEB journal, 2002, 16(5): A967.

[8] 谢数涛, 何建国, 杨晓明, 等. 套式 PCR 检测斑节对虾白斑症病毒(WSSV) [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 220—224.

[9] ZHAN W B, ZHANG L F, and WANG Y H. White spot syndrome virus (WSSV) infection to crabs [J]. Acta scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000, 39(suppl): 154—158.

[10] RODRIGUEZ J, BAYOT B, AMANO Y, et al. White spot syndrome virus infection in cultured Penaeus vannamei (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure [J]. J Fish Dis, 2003, 26(8): 439—450.

Induced Protection of Sublethal Temperature Heat Shock in *Litopenaeus vannamei*

XIE Shu tao, WU Ren, XU Zhong neng, LIN Xiao tao, ZHANG Qi zhong
(Institution of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: *Litopenaeus vannamei* was treated by sublethal temperature (35 °C) for 2 hours and then exposed to the lethal temperature (40 °C), the survival rate increased to 54. 2%. After exposed to the sublethal temperature for 2 hours, four divided groups of *Litopenaeus vannamei* were maintained at room temperature (25±0. 5) °C for 2, 6, 12 and 24 hours, respectively. Subsequently, the shrimps were injected with white spot syndrome virus (WSSV). The result showed that the mean survival time of the infected shrimps of four experiment groups kept at room temperature for 2, 6, 12 and 24 hours was 101. 43, 98. 07, 76. 92 and 63. 28 hours respectively. The mean survival time of the control group, which was directly injected with WSSV without treatment of sublethal temperature, was 46. 89 hours. The mean survival time of the experiment groups were significantly higher than that of the control group ($P<0. 01$). The distinction suggested that the treatment of sublethal temperature can increase *Litopenaeus vannamei*'s thermotolerance against threat of lethal temperature and enhance resistance to infection of WSSV.

Key words: heat shock; white spot syndrome virus; *Litopenaeus vannamei*; sublethal temperature