

## 毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾的致病性

刘 强<sup>1,2</sup>, 周俊芳<sup>1</sup>, 房文红<sup>1\*</sup>, 王 元<sup>1,2</sup>, 李新苍<sup>1</sup>, 周 帅<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室,上海 200090;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:** 为了评价养殖水环境中毒死蜱对凡纳滨对虾生存的危害性,开展了毒死蜱胁迫下白斑综合征病毒(WSSV)对凡纳滨对虾致死实验,分析了毒死蜱胁迫下凡纳滨对虾鳃组织 WSSV 含量和肌肉组织乙酰胆碱酯酶活性变化。通过急性毒性实验测定了毒死蜱对凡纳滨对虾的半致死浓度(LC<sub>50</sub>),随着暴露时间的延长,LC<sub>50</sub>值显著下降,存在着浓度-反应的正向关系,96 h LC<sub>50</sub>为 0.758 μg/L(0.521~0.987 μg/L)。在此基础上,确定了毒死蜱胁迫实验浓度为 0.2 μg/L,此浓度下药浴 4 d 后对凡纳滨对虾注射 WSSV,结果显示:毒死蜱胁迫下注射 WSSV 组的对虾死亡率(83.33%±4.7%)极显著高于乙醇-WSSV 组(40.00%±0.9%);对虾鳃组织 WSSV 荧光定量 PCR 检测结果显示:感染 72 h 后,毒死蜱-WSSV 组 WSSV 含量约是乙醇-WSSV 组的 4 倍;感染 96 h 后,毒死蜱-WSSV 组 WSSV 含量显著增加,约是 72 h 毒死蜱-WSSV 组的 4.9 倍,是 96 h 乙醇-WSSV 组的 5.9 倍。毒死蜱胁迫下,对虾肌肉组织乙酰胆碱酯酶(AchE)活性低于对照组 20% 左右。由此可见,毒死蜱胁迫下,WSSV 增殖速率加快,导致对虾死亡率升高。

**关键词:** 凡纳滨对虾;毒死蜱;白斑综合征病毒;致病性;乙酰胆碱酯酶

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

毒死蜱(chlorpyrifos)是一种高效、广谱的有机磷杀虫剂,具有良好的触杀、胃毒和熏蒸作用,在我国广泛应用于水稻、棉花、蔬菜等农作物害虫的防治<sup>[1-3]</sup>,其主要是通过抑制体内胆碱酯酶活性引起生物体神经毒性<sup>[4]</sup>。对于哺乳动物而言,毒死蜱是中等毒性<sup>[5]</sup>,而对水生动物却是高毒的<sup>[6]</sup>。种植业在大量使用毒死蜱防治害虫的同时,很容易对周边的水环境和土壤造成残留污染<sup>[7-8]</sup>;养殖水环境中毒死蜱的存在危害着水生动物的生存<sup>[9]</sup>,导致生物体死亡或对外来病原体的抵抗力降低,诱发水生生物疾病暴发<sup>[10]</sup>。有研究表明,水生动物疾病的暴发与环境因子的改变密切相关,环境胁迫增加了水生生物对弧菌和 WSSV 等病原体的易感性<sup>[11-14]</sup>。实验以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为受试动物,探究毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾的致病性,为揭

示对虾 WSSV 病发生与养殖环境之间的关系提供新的研究思路,为制定对虾健康养殖新技术提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

凡纳滨对虾来自东海水产研究所海南琼海研究中心,实验前暂养 7 d,选择活力强、摄食正常、规格一致的对虾进行实验。实验用对虾体长(7.33±0.06) cm,体质量(4.88±0.11) g,实验期间养殖条件维持在盐度 5 左右,水温 28~29 °C,pH 7.2~7.6,24 h 不间断充氧,实验前 1 天暂停喂饵料。

#### 1.2 试剂与仪器

毒死蜱标准品购自国家标准物质网,纯度 98.8%,实验前用无水乙醇配制母液 300 μg/mL,

收稿日期:2012-12-18 修回日期:2013-03-28

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2011T03);公益性行业(农业)科研专项(201203085)

通信作者:房文红,E-mail:whfang06@yahoo.com.cn

4 ℃ 避光保存;碘化硫代乙酰胆碱(ATCh)和 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)购自美国 Alfa 公司;SYBR Premix Ex Taq™ 等购自 TaKaRa 公司;基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;其他试剂均购自国药集团。实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI, StepOne);高速冷冻离心机(日本 HITACHI, CF16R II);紫外可见分光光度计(上海尤尼柯, UV-2802S)。

### 1.3 毒死蜱对凡纳滨对虾急性毒性实验

本实验采用换水式生物测试法,实验期间每 24 h 更换一次药液,根据预实验结果,按照等比数列设置了 7 个浓度梯度,分别为 0.469、0.745、1.184、1.880、2.987、4.745 和 7.500 μg/L,外加乙醇溶剂对照组(乙醇浓度 0.002 5%)和空白对照组,每个浓度组放入受试凡纳滨对虾 15 尾,每组 3 个重复,观察凡纳滨对虾中毒反应症状,及时记录对虾死亡情况,统计 24、48、72 和 96 h 的对虾死亡数。

### 1.4 毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾致死实验

**WSSV 病毒液制备及感染浓度的确定** 病料来自本实验室 -80 ℃ 保存的 WSSV 感染的凡纳滨对虾,病毒液制备参照周俊芳等<sup>[15]</sup>的方法。病料去除头胸甲附肢称重,于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中匀浆,离心,上清液用 0.45 μm 滤膜过滤制成病毒粗提液;注射对虾攻毒,以 7 d 死亡率最高的最大稀释度作为下一步攻毒浓度,感染浓度确定为稀释度  $1 \times 10^{-6}$ 。

**毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾的感染实验** 在上述急性毒性实验的基础上,经过预实验确定对虾药浴 10 d 未发生死亡的最高浓度为毒死蜱胁迫实验浓度(0.2 μg/L)。实验分成 6 组,分别为毒死蜱胁迫下 WSSV 攻毒组(毒死蜱 - WSSV 组)、乙醇 - WSSV 对照组、空白 - WSSV 对照组、毒死蜱胁迫下注射 PBS 组(毒死蜱 - PBS 组)、乙醇 - PBS 组和空白 - PBS 组。每个组设 3 个重复,每个重复 15 尾虾,于 120 L 塑料白桶中进行实验,水体 60 L,每 24 h 更换一次药液,药浴 4 d 后进行 WSSV 攻毒和 PBS 注射实验。3 个 WSSV 组,每尾虾于腹部第一节肌肉注射 25 μL  $10^{-6}$  稀释度病毒液,另外 3 个 PBS 组于每尾虾注射 25 μL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4),继续药浴至 10 d,观察对虾死亡情况并做记录。

### 1.5 毒死蜱胁迫下对虾体内乙酰胆碱酯酶活性测定

**样品采集** 实验分成 3 组,分别为毒死蜱胁迫下注射 PBS 组(毒死蜱 - PBS 组)、乙醇 - PBS 组和空白 - PBS 组,每个组设 3 个重复,每个重复 10 尾虾,实验方法与条件同毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾致死实验。药浴 10 d,每组每个重复随机采集 3 尾虾,于 -80 ℃ 保存,用于乙酰胆碱酯酶活性检测。

**乙酰胆碱酯酶活性测定** 取对虾腹部肌肉 1.0 g,按 1:4(w/v)比例加入预冷的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4),于冰浴中匀浆,然后于 4 ℃、 $10\ 000 \times g$  下离心 30 min,上清液即为粗酶液。酶活性测定参照 Ellman 等<sup>[16]</sup>方法:取 3 mL 0.1 mol/L PBS(pH 8.0)、25 μL 粗酶液和 100 μL DTNB(0.01 mol/L)加入试管内,混匀室温静置 10 min,然后加入 20 μL 0.075 mol/L ATCh,立即混匀,倒入 1 cm 比色皿,于波长 412 nm 处每隔 30 s 读数一次,连续读取 3 min。酶活力单位定义为每毫克组织蛋白每分钟水解底物的 nmol 数,单位为 nmol/(min · mg protein)。蛋白含量测定参照 Bradford 法<sup>[17]</sup>。

### 1.6 毒死蜱胁迫下对虾体内 WSSV 增殖实验

**样品采集** 实验共分 3 组,分别为毒死蜱胁迫下 WSSV 攻毒组(毒死蜱 - WSSV 组)、乙醇 - WSSV 对照组、空白 - WSSV 对照组,每组设 3 个重复,每个重复 20 尾虾,实验方法与条件同毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾致死实验。WSSV 攻毒 48、72 和 96 h 后,每组每个重复各采集 3 尾对虾,保存于 -80 ℃ 冰箱,用于 WSSV 定量检测。

**荧光定量 PCR 检测 WSSV** 取上述对虾的鳃组织,参照 TIANGEN 公司 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书提取对虾鳃总 DNA,普通 PCR 检测对虾是否感染 WSSV<sup>[15]</sup>,2% 琼脂糖凝胶电泳检测。模板稀释 10 倍后用于荧光定量 PCR 检测,检测引物参照表 1。荧光定量 PCR 采用 20 μL 体系:2 × SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL,引物 1(1 μmol/L)4.0 μL,引物 2(1 μmol/L)4.0 μL,DNA 模板 2.0 μL;反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 20 s,82 ℃ 停留 2 s,读板,40 个循环,72 ℃ 延伸 5 min;最后经 60 ℃ 升温至 95 ℃。Plate read/0.5 ℃ 进行融解曲线分析。

表 1 荧光定量 PCR 检测 WSSV Vp28 基因和  $\beta$ -actin 基因所用引物  
Tab. 1 Primers used for quantitative real-time PCR of WSSV Vp28 and  $\beta$ -actin

| 引物<br>primer    | 引物序列(5'-3')<br>primer sequence | 产物长度/bp<br>product length | 来源<br>reference |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Vp28F           | AGCTCCAACACCTCCTCCTTCA         | 162                       | [18]            |
| Vp28R           | TTACTCGGTCTCAGTGCCAGA          |                           |                 |
| $\beta$ -actinF | CCACGAGACCACCTACAAC            | 142                       | [19]            |
| $\beta$ -actinR | AGCGAGGGCAGTGATTTT             |                           |                 |

### 1.7 数据处理与分析

对虾毒死蜱急性毒性  $LC_{50}$  采用 SPSS 19.0 Probit 计算; WSSV 荧光定量数据处理采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法; 不同实验组间的死亡率、乙酰胆碱酯酶活性和 WSSV 量的差异性采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 毒死蜱对凡纳滨对虾的急性毒性

本实验中空白对照组和溶剂对照组的对虾均未出现死亡。在毒死蜱药浴下, 随着毒死蜱浓度升高, 药浴时间延长, 对虾死亡率逐渐升高。毒死蜱对凡纳滨对虾的毒性曲线如图 1 所示, 毒死蜱对凡纳滨对虾的 24、48、72 和 96 h  $LC_{50}$  分别为 3.948、2.695、1.320 和 0.758  $\mu\text{g/L}$ 。暴露于所有毒死蜱浓度组的对虾, 死亡前都出现异常兴奋的症状, 沿实验桶边急速游动, 时而上下垂直旋转运动, 有突然的逃逸行为, 身体颤抖和弯曲, 渐渐地失去平衡, 肌肉的透明度也逐渐降低; 死亡对虾肌肉呈现乳白色, 毒死蜱浓度越高, 死亡时间出现的越早。

### 2.2 毒死蜱胁迫作用下 WSSV 对凡纳滨对虾致死率的影响

根据上述急性毒性结果和预实验, 本实验选择凡纳滨对虾毒死蜱药浴 10 d 未发生死亡的最高浓度 0.2  $\mu\text{g/L}$  为胁迫实验浓度。在毒死蜱胁迫作用下, 凡纳滨对虾感染 WSSV 后 72、96、120 和 144 h 的累计死亡率见图 2。从图中可以看出, 毒死蜱组、乙醇对照组和空白对照组在 WSSV 攻毒后, 随着时间的延长, 3 个组的对虾死亡率逐渐升高; 毒死蜱组的对虾死亡率均高于其它 2 个对照组。攻毒后 72 h, 毒死蜱组的死亡率虽高于 2 个对照组, 但没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 而在攻毒后 120 和 144 h, 毒死蜱组死亡率分别高达  $66.67\% \pm 0.09\%$  和  $83.33\% \pm 4.7\%$ , 显著高于 120 h 乙醇 - WSSV 组死亡率 ( $20.00\% \pm$

$0.14\%$ ) 和 144 h 乙醇 - WSSV 组死亡率 ( $40.00\% \pm 0.09\%$ ) ( $P < 0.01$ ), 乙醇和空白 2 个对照组间没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。另外, 空白 - PBS 组、乙醇 - PBS 组和毒死蜱 - PBS 组的对虾在实验过程中均未出现死亡现象。

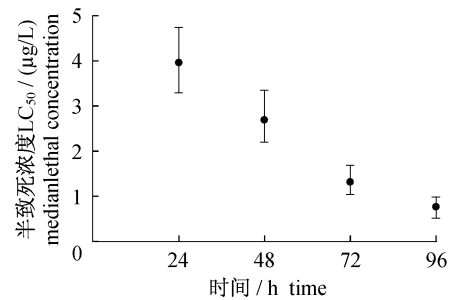


图 1 毒死蜱对凡纳滨对虾的毒性曲线 ( $n = 3$ )

图中黑圆点代表每个时间点的  $LC_{50}$ , 竖线代表各个时间点  $LC_{50}$  95% 置信区间的上下限。

Fig. 1 Chlorpyrifos toxicity curve for *L. vannamei*

The black points stand for  $LC_{50}$  of each time. The bars represent the 95% confidence limits of  $LC_{50}$ .

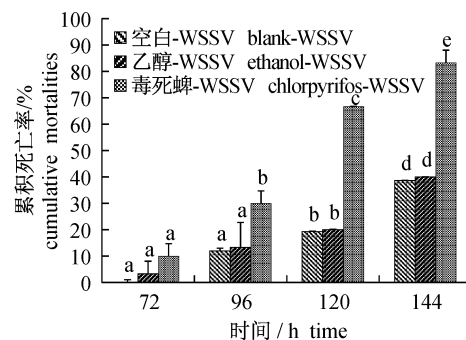


图 2 毒死蜱胁迫作用下 WSSV 对凡纳滨对虾致死率随时间的变化

字母代表了不同处理组间的差异显著性。

Fig. 2 Time-course of mortalities of *L. vannamei* infected by WSSV under chlorpyrifos stress

Letters over the bars indicate the significant differences among the treatments.

### 2.3 毒死蜱药浴对凡纳滨对虾乙酰胆碱酯酶活性的影响

0.2  $\mu\text{g/L}$  毒死蜱药浴组、空白对照组、乙醇对照组在注射 PBS 后,凡纳滨对虾均未出现死亡。实验结束时,3 组对虾肌肉乙酰胆碱酯酶活性测试结果显示,毒死蜱药浴组活性为  $(17.17 \pm 3.81)$   $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ ,显著低于空白组  $(21.67 \pm 5.37)$   $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$  和乙醇组  $(22.83 \pm 4.04)$   $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$  (图 3),分别被抑制了 20.76% 和 24.79% ( $P < 0.05$ )。

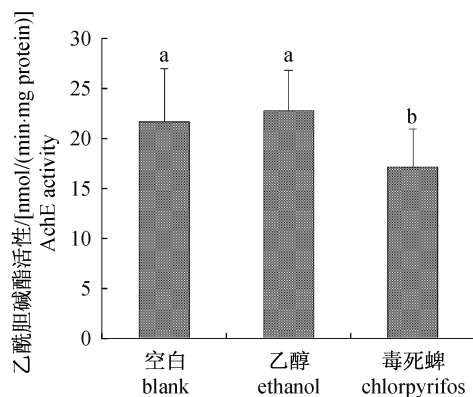


图 3 毒死蜱药浴 10 d 对凡纳滨对虾肌肉组织乙酰胆碱酯酶活性的影响 ( $n = 9$ )

字母代表了不同处理组间的差异显著性。

Fig. 3 Acetylcholinesterase activity in muscle tissue of *L. vannamei* exposed to chlorpyrifos for 10 days

Letters over the bars indicate the significant differences among the treatments.

### 2.4 毒死蜱胁迫下凡纳滨对虾体内 WSSV 的增殖

毒死蜱药浴组、乙醇对照组和空白对照组在注射 WSSV 后,对虾体内 WSSV 增殖量的变化见图 4。实验组和空白组的对虾体内病毒含量均随时间推移呈现出递增趋势,尤其是毒死蜱药浴组的病毒量上升迅速。凡纳滨对虾在注射 WSSV 48 h 后,毒死蜱药浴组对虾体内 WSSV 量虽略高于 2 个对照组但差异并不显著 ( $P > 0.05$ ); 72 h 后毒死蜱药浴组的病毒量明显增加,是 2 个对照组的 4 倍 ( $P < 0.01$ ); 96 h 后毒死蜱药浴组的病毒量陡然上升,已远高于另外 2 个对照组,是乙醇对照组的 5.9 倍,是 72 h 毒死蜱药浴组病毒量的 4.9 倍 ( $P < 0.01$ )。由此可见,在毒死蜱胁迫下,对虾体内 WSSV 增殖速率明显加快。

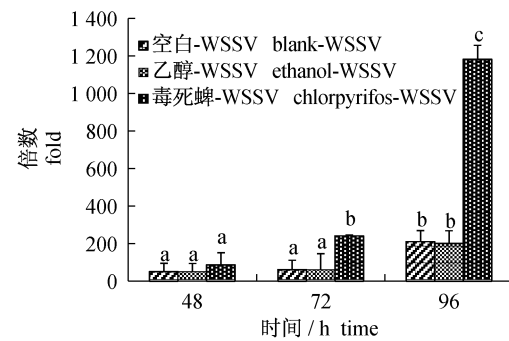


图 4 荧光定量 PCR 检测毒死蜱胁迫下凡纳滨对虾体内 WSSV 含量变化

字母代表了不同处理组间的差异显著性。

Fig. 4 Changes of WSSV quantity of *L. vannamei* under chlorpyrifos stress detected by quantitative real-time PCR

Letters over the bars indicate the significant differences among the treatments.

## 3 讨论

半数致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 一般是作为环境污染物对水生生物毒性的评价指标。针对毒死蜱对水生生物的毒性,国内外已有多篇相关报道,如毒死蜱和对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*) 的 96 h  $LC_{50}$  为  $13.13 \mu\text{g/L}$ <sup>[20]</sup>, 对小长臂虾 (*Palaemonetes argentinus*) 的 96 h  $LC_{50}$  为  $0.49 \mu\text{g/L}$ <sup>[21]</sup>, 对另一种小长臂虾 (*Palaemonetes pugio*) 成体和幼体的 96 h  $LC_{50}$  分别为  $0.37 \mu\text{g/L}$  和  $0.44 \mu\text{g/L}$ <sup>[22]</sup>, 对澳洲淡水虾 (*Paratya australiensis*) 的 96 h  $LC_{50}$  为  $0.06 \mu\text{g/L}$ <sup>[23]</sup>。实验结果显示,毒死蜱对凡纳滨对虾的 96 h  $LC_{50}$  为  $0.758 \mu\text{g/L}$ 。根据张克杰等<sup>[24]</sup> 的农药对水生生物毒性等级划分,毒死蜱对凡纳滨对虾属于剧毒。由于毒死蜱的毒性还受温度、pH、盐度、光照和受试物种等多种因素的影响,导致不同物种在同种条件下或者同一物种在不同的条件下,毒死蜱的毒性有所不同。

自然条件下,有机磷农药主要通过两种途径进入水生动物体内:一是水生动物进食了被污染的饲料,二是有机磷农药污染了水环境,通过水生动物的鳃、体表等进入体内。在农药使用高峰期,周围水域中农药残留浓度甚至超过了水生动物的安全浓度<sup>[25]</sup>。吴长兴等<sup>[25]</sup> 对浙江丘陵地区水稻田进水和排水中的毒死蜱残留进行了监测,在农药使用高峰期,水稻田周边河水已受到毒死蜱的

污染,发现河水毒死蜱最高残留达到 3.23  $\mu\text{g/L}$ 。Jergentz 等<sup>[26]</sup>通过测定大豆种植区内河流中毒死蜱发现,底泥中毒死蜱含量至少 150  $\mu\text{g/kg}$ ,水体中含量至少 0.3  $\mu\text{g/L}$ 。这样的河水一旦进入虾池,严重者直接引起死亡,浓度低时也将对养殖对虾产生胁迫作用。Roque 等<sup>[27]</sup>通过对凡纳滨对虾投喂污染了甲基对硫磷(0.1  $\mu\text{g/g}$ )的饲料,期间注射感染副溶血弧菌,结果显示,甲基对硫磷-弧菌实验组、只含甲基对硫磷对照组和只注射弧菌对照组的死亡率分别为 35.19%、9.26% 和 7.41%,在甲基对硫磷胁迫下,对虾感染弧菌死亡率明显升高。实验结果显示,在毒死蜱的胁迫作用下,凡纳滨对虾感染 WSSV 后的死亡加剧。WSSV 分布范围广,宿主种类多,致病性强,在急性感染下 3~10 d 即出现死亡,同时 WSSV 在对虾体内的潜伏感染非常普遍,当对虾养殖环境发生变化,水体理化因子胁迫下,潜伏感染 WSSV 的对虾极易转为急性感染<sup>[28]</sup>。

乙酰胆碱酯酶广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物体内,通过水解乙酰胆碱介导神经冲动,在神经传导过程中起着重要作用。有机磷农药中毒机制主要是通过抑制乙酰胆碱酯酶活性,导致乙酰胆碱大量积累,使神经冲动持续发生,造成生物体兴奋异常,最终引发死亡。乙酰胆碱酯酶活性受抑制程度常被用作水生生物受到有机磷农药胁迫的生物指标<sup>[29]</sup>。Day 等<sup>[30]</sup>研究认为,鸟、鱼或者水生无脊椎动物乙酰胆碱酯酶活性被抑制 20% 则说明该动物受到了有机磷杀虫剂胁迫作用;也有研究报道,乙酰胆碱酯酶活性被抑制 50%,将会发生生理损伤<sup>[31-32]</sup>。实验中,毒死蜱药浴 10 d,凡纳滨对虾肌肉乙酰胆碱酯酶活性被抑制 20% 以上,说明对虾处于毒死蜱胁迫状态,使得对虾抗 WSSV 感染的的能力下降,从而导致死亡率增加。

为了进一步了解毒死蜱胁迫下 WSSV 在对虾体内的增殖情况,实验检测了对虾鳃组织 WSSV Vp28 蛋白基因的相对表达量。Vp28 蛋白是 WSSV 主要包膜蛋白,Vp28 在 WSSV 感染对虾的起始阶段起到关键作用<sup>[33]</sup>,作为一种接合蛋白,在病毒感染过程中协助病毒进入对虾细胞质<sup>[34]</sup>。实验 WSSV 相对定量结果显示,凡纳滨对虾感染 WSSV 后 72 和 96 h,在毒死蜱胁迫作用下,对虾体内 WSSV 相对含量极显著高于乙醇对

照组和空白对照组,说明在毒死蜱胁迫作用下,对虾体内 WSSV 增殖速度明显加快,病毒快速增殖导致凡纳滨对虾死亡量增加。

毒死蜱在农业虫害防治中的广泛应用,势必对周边水体产生污染,水环境中毒死蜱残留的存在已成为水产养殖的一个胁迫因子。本实验首次研究了凡纳滨对虾在毒死蜱胁迫下,继而感染 WSSV 的对虾死亡情况,发现毒死蜱可增加凡纳滨对虾对 WSSV 的易感性。本实验推测毒死蜱的存在降低了凡纳滨对虾的非特异性免疫,从而导致其对 WSSV 的抗性减弱,具体的影响机制有待进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] 沈咸军,郝绪春. 480 g/L 毒死蜱乳油防治水稻田稻飞虱效果研究[J]. 现代农业科技, 2010(19): 152, 154.
- [2] 李红阳,王永山,徐文华. 40.7% 毒死蜱 EC 对 Bt 棉田棉盲蝽的药效试验[J]. 江西农业学报, 2008, 20(1): 50-51.
- [3] 司升云. 乐斯本防治蔬菜害虫概述[J]. 长江蔬菜, 2006, (5): 35-36.
- [4] Zhao Q Y, Dourson M, Gadagbui B. A review of the reference dose for chlorpyrifos [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006, 44(2): 111-124.
- [5] Farag A T, El Okazy A M, El-Aswed A F, et al. Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats [J]. Reproductive Toxicology, 2003, 17(2): 203-208.
- [6] Lund S A, Fulton M H, Key P B. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition [J]. Aquatic Toxicology, 2000, 48(2-3): 127-134.
- [7] Hall L W, Anderson R D. Parametric and probabilistic analysis of historical chlorpyrifos surface water monitoring data from the San Joaquin River watershed: 1991-2001 [J]. Water Air and Soil Pollution, 2003, 150(1-4): 275-298.
- [8] Kumar Singh B, Walker A, Wright D J. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics [J]. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 2002, 69(2): 181-188.

- [9] 杨先乐,湛嘉,黄艳平. 有机磷农药对水生生物毒性影响的研究进展[J]. 上海水产大学学报,2002, 11(4):378-382.
- [10] Eder K J, Clifford M A, Hedrick R P, *et al.* Expression of immune-regulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25 (5): 508-516.
- [11] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16 (3): 321-334.
- [12] Wang L U, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18 (4): 269-278.
- [13] Guan Y Q, Yu Z M, Li C W. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicas* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 83(3):257-260.
- [14] Tendencia E A, Bosma R H, Usero R C, *et al.* Effect of rainfall and atmospheric temperature on the prevalence of the white spot syndrome virus in pond-cultured *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(4):594-597.
- [15] 周俊芳,杨先乐,万夕和,等. 不同靶点 shRNA 干扰对虾白斑综合征病毒增殖效果分析[J]. 华中农业大学学报,2011,30(1):105-108.
- [16] Ellman G L, Courtney K D, Andres jr V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7(2):88-90.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1-2): 248-254.
- [18] 李新苍,周俊芳,房文红,等. 实用 WSSV 定量检测方法的建立及其应用于脊尾白虾病毒感染规律的研究[J]. 水产学报,2012,36(10):1554-1562.
- [19] Wang Y C, Chang P S, Chen H Y, *et al.* Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23 (6):1161-1177.
- [20] 丁正峰,薛晖,王晓丰,等. 毒死蜱(CPF)对克氏原螯虾的急性毒性及组织病理观察[J]. 生态与农村环境学报,2012,28(4):462-467.
- [21] Montagna M C, Collins P A. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 53(3):371-378.
- [22] Key P B, Fulton M H. Lethal and sublethal effects of chlorpyrifos exposure on adult and larval stages of the grass shrimp, *palaemonetes pugio* [J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 1993, 28 (5): 621-640.
- [23] Kumar A, Correll R, Grocke S, *et al.* Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73 (3):360-369.
- [24] 张克杰,张维平. 环境污染生物监测与评价[M]. 北京:中国环境科学出版社,1991,61-69.
- [25] 吴长兴,赵学平,吴声敢,等. 丘陵地区水稻田使用毒死蜱对水体的污染及其生态风险[J]. 生态与农村环境学报,2011,27(3):108-112.
- [26] Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, *et al.* Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina [J]. *Chemosphere*, 2005, 61 (6): 817-826.
- [27] Roque A, Abad S, Betancourt-Lozano M, *et al.* Evaluation of the susceptibility of the cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* to vibriosis when orally exposed to the insecticide methyl parathion [J]. *Chemosphere*, 2005, 60(1):126-134.
- [28] 何建国,莫福. 对虾白斑综合征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措施[J]. 中国水产,1999,(7):34-41.
- [29] Fulton M H, Key P B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(1):37-45.
- [30] Day K E, Scott I M. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides [J]. *Aquatic Toxicology*, 1990, 18(2):101-113.

- [31] Hill E F, Fleming W J. Anticholinesterase poisoning of birds; field monitoring and diagnosis of acute poisoning [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1982, 1(1): 27 – 38.
- [32] Zinkl J G, Shea P J, Nakamoto R J, *et al.* Technical and biological considerations for the analysis of brain cholinesterase of rainbow trout [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1987, 116(4): 570 – 573.
- [33] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7 – 22.
- [34] Yi G H, Wang Z M, Qi Y P, *et al.* VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(6): 726 – 734.

## Studies of the pathogenicity of WSSV to the cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* under chlorpyrifos stress

LIU Qiang<sup>1,2</sup>, ZHOU Junfang<sup>1</sup>, FANG Wenhong<sup>1\*</sup>, WANG Yuan<sup>1,2</sup>, LI Xincang<sup>1</sup>, ZHOU Shuai<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to evaluate the hazard of chlorpyrifos to the cultured shrimp *Litopenaeus vannamei*, the lethal effect of the shrimp infected with white spot syndrome virus (WSSV) under the chlorpyrifos stress was tested, while the quantity of WSSV in the gill tissue and acetylcholinesterase activity in the muscle tissue were analyzed. The 96 h median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of chlorpyrifos to the shrimp was determined. The results showed that the 96 h LC<sub>50</sub> is 0.758 μg/L (0.521 – 0.987 μg/L), and as time prolonged, the values of LC<sub>50</sub> significantly declined, which showed a positive concentration-response relationship. On this basis, the stress concentration of chlorpyrifos of 0.2 μg/L was determined. After the shrimp were exposed to 0.2 μg/L chlorpyrifos for 4 days, they were infected with WSSV by injection. It showed that the cumulative mortality of chlorpyrifos-WSSV treatment (83.33% ± 4.7%) was significantly higher than that of ethanol-WSSV group (40.00% ± 0.9%). Meanwhile, the amount of WSSV was also determined by Real-time Relative PCR at 48, 72 and 96 h post-injection. WSSV quantity of chlorpyrifos-WSSV treatment was about 4 times that of ethanol-WSSV control at 72 h. WSSV quantity of chlorpyrifos-WSSV treatment was significantly increased at 96 h, which was 4.9 times that of chlorpyrifos-WSSV treatment at 72 h, and 5.9 times that of ethanol-WSSV treatment at 96 h. The acetylcholinesterase (AChE) activity in shrimp muscle tissue under chlorpyrifos stress was 20% lower than that in control group. This showed that the proliferation rate of WSSV in shrimp increased rapidly under chlorpyrifos stress, which raised the mortality rate of the shrimp.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; chlorpyrifos; white spot syndrome virus; pathogenicity; acetylcholinesterase

**Corresponding author:** FANG Wenhong. E-mail: whfang06@yahoo.com.cn