

对感染白斑综合症病毒的亲虾子代的跟踪检测^{*}

江世贵¹, 翁少萍¹, 吕 玲¹, 苏天风², 何建国¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘 要: 感染白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 的斑节对虾 *Penaeus monodon* 亲虾能产出携带 WSSV 的卵子, 这些卵子可完成胚胎发育过程、孵化出无节幼体, 并可以培育出糠虾幼体和仔虾。在确认只有亲虾作为 WSSV 传染源的情况下, 培育出的部分幼体和部分仔虾携带 WSSV; 在相同的条件下, 不带 WSSV 的亲虾产出的卵及幼体、仔虾未检测到 WSSV。

关键词: 白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV); 斑节对虾 *Penaeus monodon*; 检测; 子代; 亲虾

中图分类号: Q947.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 01-0066-04

在对虾育苗期, 对虾的亲虾和仔虾可以经口摄食感染白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)^[1-3], 除了无节幼体不摄食外, 糠虾幼体、糠虾幼体都有可能摄食育苗水体中含 WSSV 的微小颗粒物, 因此, WSSV 在对虾育苗期存在水平传播是没有异议的。但在对虾育苗期是否存在 WSSV 的垂直传播, 则因资料不足、证据缺乏而未有结论。Lo 等^[1]推测 WSSV 不能从亲虾经卵传播给子代, 认为亲虾所携带的 WSSV 释放到水体进而感染发育中的幼体。刘萍等^[2]用 WSSV 感染中国对虾亲虾 (*P. chinensis*), 发现有 2 尾亲虾产出的卵子为 WSSV 阳性, 未获得 WSSV 阳性的无节幼体、糠虾幼体、仔虾。江世贵等^[3]观察到斑节对虾卵巢中的卵母细胞和成熟的卵均携带 WSSV, 其受精卵呈 WSSV 阳性, 推测存在 WSSV 垂直传播。此外, 在 WSSV 检测中常发现对虾受精卵和仔虾呈 WSSV 阳性, 但病原调查结果无法判断 WSSV 的来源。在切断孵化和幼体培育过程中的其它可能的传播途径的条件下, 令受 WSSV 感染的斑节对虾亲虾产卵并培育出仔虾, 同时跟踪检测其受精卵、幼体和仔虾携带 WSSV 的情况, 迄今未有完整的实验资料, 也未见到正式报道。

作者在 2000 年工作的基础上^[3,5], 切断其它可能的 WSSV 传播途径、确保实验系统内只有斑节对虾亲虾作为 WSSV 传播源, 使用人工感染了 WSSV 的亲虾催产, 获得了携带 WSSV 的受精卵, 并孵

化、培育出体长 1 cm 以上的携带 WSSV 的仔虾, 并对受精卵、幼体和仔虾携带 WSSV 的情况进行了跟踪检测。

1 材料与方法

1.1 材料的获取

斑节对虾亲虾由马来西亚进口, 体长 26 ~ 28 cm, 体质量 144 ~ 190.5 g。先用这些亲虾进行对虾苗种生产, 待其产卵后继续培育, 待其性腺再次成熟后用于实验。病虾材料为人工注射感染了 WSSV 的斑节对虾, 已检测确认携带有 WSSV。用该病虾材料制备 WSSV 粗提液, 制备方法参考何建国等^[4]。将性腺发育良好、预计当晚即可产卵的亲虾用于实验。实验组的斑节对虾亲虾 (♀) 用 WSSV 粗提液注射感染, 先后人工注射感染了 14 尾亲虾, 注射量为 500 μ L/尾; 根据对虾产卵时间的特点, 将人工注射感染的时间安排在下午 4:00—5:00, 使人工感染到产卵的时间为 13 h 以内, 以避免亲虾因感染后的病理反应导致无体力产卵。对照组的亲虾注射等体积的缓冲溶液。因 14 尾亲虾的成熟时间不一致, 故人工感染分批进行, 每批设一个对照组。待对照组和实验组亲虾产卵后, 对亲虾逐尾取样 (未产卵的实验组亲虾在濒死时取样), 用于对亲虾组织的病原检测, 以确认实验组亲虾确已感染了 WSSV, 以保证选取的对照组亲虾确未携带 WSSV。

* 收稿日期: 2002-04-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2001AA621030); 中国水产科学研究院重点资助项目 (99-01-02)

作者简介: 江世贵 (1964 年生), 男, 博士, 研究员, 通讯联系人: 何建国; E-mail: lsbrc05@zsu.edu.cn

将每尾亲虾分别置于产卵桶中产卵。实验组的 14 尾中有 7 尾亲虾产卵，按产卵的先后顺序依次编号为 1—7 号。1 号、2 号、3 号、4 号组为同一批次的实验组，设一个对照组（对照组 1—4 号）。5 号、6 号、7 号分属于不同批次，各有一个对照组（分别为对照组 5 号、对照组 6 号、对照组 7 号）。

产出的卵子经过洗卵处理后继续孵化、育苗。孵化得到的无节幼体一直培育至仔虾（或培育至幼体全部死亡、实验中断为止）。从产卵开始直到仔虾阶段，在各个发育阶段均抽取一定数量的样品，分别用组织固定液保存组织切片样品、用电镜固定液保存电镜样品、-20℃保存 PCR 样品，供病原检测使用。

在实验过程中，亲虾培育及催产、产卵过程的控制、人工孵化及育苗均按斑节对虾工厂化育苗规程进行。海水盐度为 30，pH 为 8.0。用温控器调节水温，使水温保持在 29~30℃。亲虾产卵、受精卵孵化及育苗过程中，所使用的水均经过灭菌处理，保证海水中的生物被灭活；实验器材均经过消毒；自亲虾人工感染开始，海水、亲虾饵料（蛭子、花蟹）、幼体和仔虾的生物饵料（扁藻、轮虫、丰年虫）及人工饲料（虾片）均收集样品，进行 WSSV 的 PCR 检测，以排除外源 WSSV 对实验体系的干扰。

1.2 试 剂

PCR 试剂、原位杂交试剂购自华美生物工程有限公司，其它试剂为国产分析纯。

1.3 WSSV 的检测

按翁少萍等^[6]的方法制备电镜样品。按 Lo 等^[7] WSSV 的套式 PCR 二步检测法检测。原位杂交按吕玲、江世贵等的方法^[3,8]。

2 结 果

2.1 受到 WSBV 感染的亲虾的产卵情况及对卵子的 WSSV 检测

人工注射了 WSSV 粗提液的 14 尾亲虾，经过 PCR 检测，证实均被 WSSV 感染，对照组则为 WSSV 阴性。实验组的 7 尾亲虾产卵（1—7 号）后，分别对上述 7 份受精卵的样品及对照组样品进行 WSSV PCR 二步法检测，1—7 号实验组的受精卵的一扩结果均呈阴性，二扩结果均呈阳性；3 个对照组样品均为阴性（图 1）。

2.2 感染了 WSSV 的亲虾子代的发育情况及 WSSV 检测

分别孵化对照组的受精卵及上述的 1—7 号组

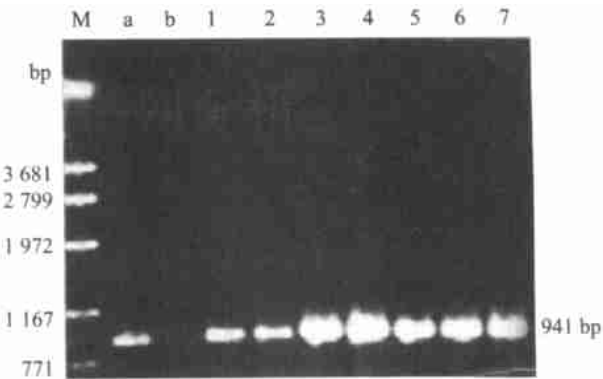


图 1 感染了 WSSV 的斑节对虾亲虾的受精卵的 PCR 二步法检测

Fig 1 2-step PCR for diagnosing WSSV in the fertilized eggs from the infected brooder of *Penaeus monodon*
M: PCR 相对分子质量标准;
a: PCR 阳性对照的二扩结果;
b: 1—4 号对照组样品的二扩结果，阴性;
1—7 号：分别为 7 尾经 WSSV 感染的亲虾的受精卵样品的二扩结果，阳性

卵子，除 6 号组的卵子外，均孵化得到了无节幼体。因 1、2、3、4 号组的无节幼体数量较少，考虑到水体大小、幼体密度、水质控制以及为了方便饵料密度控制等问题，遂将这 4 个组的无节幼体合并为一个组（用 1—4 号表示）。从 1—4 号组的无节幼体培育得到了体长 1 cm 左右的仔虾共约 4 万尾，其对照组也培育出了仔虾，因而该批次的实验完成了从亲虾到仔虾的全过程的 WSSV 跟踪检测。5 号组的无节幼体在糠虾期相继死亡，未能发育到仔虾阶段；7 号组的无节幼体也在糠虾期相继死亡，仅有个别个体发育变态至仔虾 P1 期；因此 5 号组和 7 号组的实验提前终止。

将 1—4 号实验组的发育情况与其对照组的比较，在无节幼体、糠状幼体阶段未观察到明显的病征；在糠虾幼体阶段，发育变态较对照组迟缓，或不能变态为仔虾。在仔虾期，抽样观察发现实验组中约有 10% 的个体游动状态异常，位于头胸部前端的第 1 附肢分开，左右两附肢不能合拢，症状与作者用 WSSV 人工感染后的仔虾的病征相似^[5]，对照组的仔虾未见类似的状况。

对各个实验组的发育卵、各期幼体、仔虾取样，进行了 PCR 二步法检测，对照组的结果均为 WSSV 阴性，实验组的结果列于表 1。

从实验组 1—4 号中挑出仔虾病态个体进行原位杂交检测，发现 WSSV 阳性信号明显（图 2），电镜确认仔虾带有大量病毒粒子（图 3）。

表 1 各期幼体及仔虾的 WSSV PCR 检测¹⁾

Tab. 1 PCR detection on WSSV of larvae and postlarvae from the infected brooders of *P. monodon*

样品	WSSV PCR 检测结果	
	一扩	二扩
1—4 号受精卵	+	+
1—4 号无节幼体	—	+
1—4 号糠状幼体	—	—
1—4 号糠虾幼体	—	—
1—4 号仔虾 (P1)	—	+
1—4 号仔虾 (P4)	—	+
1—4 号仔虾 (P8, 随机取样)	—	+
1—4 号仔虾 (P8, 病态个体)	+	+
5 号受精卵	—	+
5 号无节幼体	—	+
5 号糠状幼体	—	—
5 号糠虾幼体	—	+
7 号受精卵	—	+
7 号无节幼体	—	—
7 号糠状幼体	—	—
7 号糠虾幼体	—	—

1) 1—4 号、5 号、7 号的对照组的各期样品的检测结果均为阴性；+ 表示阳性；— 表示阴性



图 2 感染了 WSSV 的斑节对虾亲虾培育出的仔虾的鳃部原位杂交检测 (× 150)

Fig. 2 Detection of WSSV DNA in gill of post larvae from the infected brooder of *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization (× 150)

2.3 对养殖过程中的海水、饵料生物及人工饲料的 WSSV 检测

对实验过程所使用的海水、亲虾饵料（蛭子、花蟹）、幼体及仔虾的饵料（扁藻，轮虫，丰年虫无节幼体）及人工饲料（虾片）均进行了 WSSV PCR 第二步法检测，其结果均为阴性。

3 讨 论

在受精卵和幼体样品的病毒数量很少的情况下，使用电镜观察、原位杂交等方法难以检测到

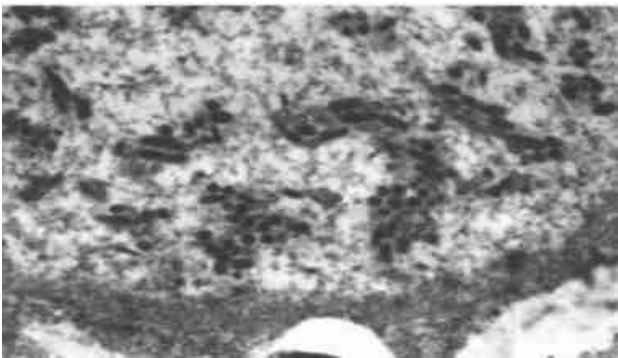


图 3 感染了 WSSV 的斑节对虾亲虾培育出的仔虾的鳃部电镜观察 (× 8 900)

Fig. 3 Detection of WSSV in gill of post larvae from the infected brooder of *Penaeus monodon* by EM (× 8 900)

WSSV，而针对 WSSV 的原位 PCR 检测方法还不是很稳定，因此对受精卵及幼体的 WSSV 检测，目前较成熟的技术还只能是 PCR 检测。为了排除 PCR 检测中可能出现的假阳性问题，本实验的 PCR 检测除了用本文介绍的方法在中山大学进行外，还在中国水产科学研究院南海水产研究所进行了重复验证，此外，还请另一个课题组的人员左涛用她所使用的另一套 WSSV PCR 方法体系对实验结果进行了验证。因此作者认为本实验的 PCR 假阳性问题可以排除。

在已发表的文献 [3] 中，使用 WSSV 粗提液注射感染斑节对虾亲虾后，亲虾卵巢 100% 带毒，并在一定时间内死亡，但有部分被 WSSV 感染的亲虾可在死亡前完成产卵过程，产出的卵子也携带 WSSV。在本文的实验中，作者不仅再次证实了受 WSSV 感染后的亲虾能产出携带 WSSV 的受精卵，而且用这些带 WSSV 的受精卵孵化出了 PCR 检测呈 WSSV 弱阳性的无节幼体，并最终培育出了体长 1 cm 左右的仔虾。在这批培育出的子虾中，有部分个体携带 WSSV。因为在用这些携带 WSSV 的受精卵孵化、育苗时，所使用的海水、亲虾饵料（蛭子、花蟹）、幼体及仔虾的饵料（扁藻，轮虫，丰年虫无节幼体）及人工饲料（虾片）均不带 WSSV，所使用的实验器具均经消毒处理，即本实验已排除了系统外的 WSSV 传染源的影响（作者认为无需考虑实验室内空气作为 WSSV 传播媒介的可能性），因此，育苗过程中唯一的传染源是受精卵所携带的 WSSV，而受精卵所携带的 WSSV 来源于亲虾。简言之，在此实验系统中，仔虾所携带的 WSSV 来自其亲虾。

在实验中观察到，亲虾产卵后卵巢中未排尽的卵子携带 WSSV，与作者早前报道的结果一致^[3]，

该结果说明卵内携带了 WSSV；虽然不能排除卵表携带 WSSV 的可能，但由于 WSSV 在盐度 30，pH 8.1、温度 30.5℃的条件下，最多只能存活 4 h^[9]，而从卵子产出到 1 状幼体开口摄食的时间在 30 ~ 40 h，因此卵表携带的 WSSV 在海水中浸泡 30 多个小时后应已失活，在 1 状幼体开口摄食时来源于卵表的 WSSV 已不再具有感染能力。因此，无节幼体中的 WSSV 应来源于受精卵内。在这一前提下，在保证不存在其他 WSSV 传染源的条件下（即排除了实验系统外的 WSSV 传入），1 状幼体、糠虾幼体和仔虾中的病毒也必然是来自于受精卵内。基于这一分析，认为 WSSV 存在垂直传播途径。不过，本实验的结果还只能作为 WSSV 垂直传播的旁证，要想下最后结论，还应该进一步研究，获得无节幼体中存在 WSSV 的电镜证据。

参考文献：

[1] LO C F, HO C H, CHEN C H, et al. Detection of tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSSV) in penaeid brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J] . Diseases of Aquatic Organism,

1997, 30: 53—72.
[2] 刘 萍, 孔 杰, 石 拓, 等. 暴发性流行性病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代的影响的 PCR 检测[J] . 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 139—144..
[3] 江世贵, 何建国, 吕 玲, 等. 白斑综合症病毒对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究[J] . 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(增刊): 164—171.
[4] 何建国, 周化民, 姚 泊, 等. 白斑综合症杆状病的感染途径和宿主种类[J] . 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 65—69.
[5] 江世贵, 何建国, 马之明, 等. 白斑综合症病毒对斑节对虾幼体和仔虾的致病性[J] . 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(增刊): 172—176.
[6] 翁少萍, 何建国, 钟 慰, 等. 斑节对虾白斑综合症病毒致病性及组织细胞特异性研究. 中山大学学报论丛, 1996(增刊): 16—22.
[7] LO C F, HO C H, PENG S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J] . Diseases of Aquatic Organism, 1996, 27: 215—225.
[8] 吕玲, 何建国, 邓敏, 等. 核酸探针原位杂交检测白斑综合症病毒的组织特异性[J] . 热带海洋, 2000, 19(4): 86—91.

The Detection of WSSV in the Filial Generation of the Effected Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) Brooder

JIANG Shi-gui^{1,2}, WENG Shao ping¹, L ÜLin¹, SU Tian feng², HE Jian guo¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China)

Abstract: To find out the transmission route of the white spot syndrome virus (WSSV) during the nursing period of the tiger prawn, *Penaeus monodon*, we conducted a combined study using currently available nucleic acid diagnostic tools, including polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization, and transmission electron (TEM) microscopy to examine the sites for virus multiplication. Upon condition that other transmission source of WSSV was removed in our experiment system except brooder with WSSV, the fertilized eggs from the infected brooder could fulfil the embryo development, metamorphosed into nauplius, zoea, mysis and post-larvae. The 2-steps WSSV PCR detection showed that the effected fertilized eggs spawned from the infected brooder were WSSV positive, and some of nauplius, mysis and post-larvae from the effected fertilized eggs were also WSSV positive. The WSSV molecular probe detection (*in situ*) showed that the gills of the post-larvae from the effected fertilized eggs were WSSV positive, and the result was reconfirmed by TEM. These results represent that WSSV can be transmitted from the brooders to their post-larvae during the nursing period of the tiger prawn. At the same time, the results of the PCR detection on control were WSSV negative.

Key words: WSSV; *Penaeus monodon*; filial generation; brooder; detection