

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0172-05

白斑综合症病毒对斑节对虾 幼体和仔虾的致病性^{*}

江世贵¹, 何建国¹, 马之明², 陈怡飙², 王维部², 江静波¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所)

摘 要: 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的蚤状幼体和糠虾幼体经人工感染 WSSV 后, 部分幼体的发育变态受到影响, 其死亡率略高于对照组, 但 PCR 二步法检测的结果为 WSSV 阴性。仔虾经人工感染 WSSV 后, 部分个体的游动方式异常, 感染 60 h 后的死亡率达 100%, 样品经 PCR 二步法检测呈 WSSV 阳性。

关键词: 斑节对虾 (*Penaeus monodon*); 白斑综合症病毒; 蚤状幼体; 糠虾; 幼体; 仔虾; 致病性

中图分类号: S945.4⁺7 文献标识码: A

90 年代以来, 亚洲许多国家和地区因虾病流行, 对虾养殖产量锐减, 造成了重大经济损失。其中危害最严重的就是白斑综合症 (white spot syndrome, 简称 WSS), 其病原体为白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, 简称 WSSV)。因此关于 WSS 的研究已成为近年来水产养殖病害研究的热点。随着 WSSV 研究的深入, 有关 WSS 的病原、病理、诊断方法、检测技术、传播途径及综合防治技术方面取得了一定进展^[1~7], 对养殖生产的恢复起到了一定的作用。由于 WSSV 存在水平传播, 并有可能存在垂直传播, 因此, 培育无特定病原 (SPF) 苗种是预防养殖过程中发生 WSS 流行的有效措施之一。研究 WSSV 对对虾亲虾及幼体的致病性, 则对对虾育苗期的病害预防具有一定的指导作用, 尤其是对于无特定病原苗种生产具有重要意义。关于 WSSV 对对虾亲虾及幼体的致病性的研究, 以往的工作主要集中在对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 的研究上^[8~12]。作者针对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的 WSS 的流行问题进行研究, 在对广东沿海几个斑节对虾育苗场进行 WSSV 病原调查的基础上, 对斑节对虾幼体和仔虾进行了人工感染实验。

1 材料与方法

1.1 病原调查

在进行感染实验前, 挑选广东沿海的 3 个斑节对虾育苗场, 对其亲虾、卵、幼体和仔

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670577); 中国水产科学研究院重点资助项目 (99-01-02); 国家教育部博士点基金资助项目; 广东省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-09-15 通讯联系人: 何建国

虾的病原情况进行调查取样, 进行 PCR 检测。亲虾以个体为单位取样, 对于死亡的个体或已产卵的个体, 取其鳃样和肌肉样; 对于未产卵的个体, 取其催熟时剪下的眼柄。对卵、幼体及仔虾, 则以育苗池为单位取样。几个虾苗场的亲虾由东南亚国家进口。

1.2 对幼体和仔虾的人工感染

从育苗生产池中取蚤状幼体 1 000 尾、糠虾幼体及仔虾各 500 尾, 放在 50 L 的水桶中进行养殖, 海水盐度为 30 ‰, pH 8.0~8.1。将水桶置于有控温设备的水池中, 使水桶内的水温保持在 29~30 °C。使幼体饥饿 3 h 后 (以正常投喂时间为参考标准), 投喂患 WSS 的病虾匀浆液。1 h 后换水, 按育苗生产规程养殖, 观察幼体的活动状况, 并取样进行 PCR 检测。蚤状幼体和糠虾幼体实验的取样时间是感染后 60 h, 仔虾感染实验则在感染后 48 h 取样 (其中实验样品为刚死的仔虾)。实验均设相应的对照组。

1.3 PCR 检测

按 Lo 等 WSSV 的套式 PCR 二步检测法检测^[3], 电泳后凝胶成像。PCR 试剂盒、蛋白酶 K 等试剂购自华美生物工程公司, 其它试剂为国产分析纯。PCR Marker 由中山大学生物工程中心周惠老师赠送。

2 结 果

2.1 3 个育苗场 WSSV 病原现状

在 1998 年 4~6 月的抽样调查中, 从南海水产研究所深圳基地的第一虾苗场和第二虾苗场、以及深圳农科中心的大鹏虾苗场共获得亲虾样品 62 份, 卵子样品 8 份, 无节幼体样品 8 份, 糠虾幼体样品 8 份, 仔虾样品 51 份。这些样品经过 PCR 检测, 均为 WSSV 阴性。

2.2 经 WSSV 感染的斑节对虾幼体及仔虾的发育情况、死亡率及 PCR 检测结果

经 WSSV 感染的斑节对虾幼体的发育情况、死亡率见表 1。蚤状幼体和糠虾幼体经过投喂感染后, 其发育情况较对照组略为迟缓, 其死亡率比对照组稍高, 但 PCR 检测结果为 WSSV 阴性。

仔虾经过投喂感染后, 12 h 即可观察到少部分个体出现游动异常, 主要有 3 种情况: ①头部朝上, 尾部朝下, 以其身体纵轴为轴心旋转; ②在水平方向游动, 游动路线呈圆弧形, 或者呈圆形轨迹; ③身体倾斜, 向前侧方向游动, 游动路线呈螺旋形。仔虾幼体感染后的死亡率, 在 24 h 时达 50%, 48 h 后的死亡率达 99% 以上, 60 h 时死亡率达 100%。对照组虽然也有部分幼体死亡, 但其死亡率很低, 在 60 h 时的累计死亡率为 20.4%, 该死亡率与生产上的情况比较, 属于正常范围。仔虾样品经套式 PCR 检测, 对照组为阴性, 实验组一扩结果为 WSSV 阴性, 二扩结果为 WSSV 阳性 (图 1)。

3 讨 论

经过调查, 在 3 个斑节对虾育苗场中均未检测到自然状态下亲虾及其卵、幼体和仔虾携带 WSSV。但这些育苗场的虾苗出售后, 在养殖过程中有一部分养殖场发生了 WSS。出现这种情况, 主要原因应该是在养殖过程中出现了 WSSV 的水平传播, 尽管还不能排除 WSSV 存在潜伏感染的可能性。

表 1 WSSV 感染斑节对虾幼体及仔虾的结果

组别	实验材料	幼体感染 WSSV 时间/h				
		12	24	43	48	60
对照 1	蚤 状 幼 体 (Z2 期), 1000 尾	Z2 期, 部分 发育到 Z3 期, 活动正 常	部分幼体发 育变态为 M1 期. 有少量幼 体死亡	有部分幼体 未发育到 M1 期; 有少量幼 体死亡	Z3、M1 期. 活动 基本正常, 但有 部分幼体死亡	M1、M2 期. 累 计死亡率为 56%
实验 1	蚤 状 幼 体 (Z2 期), 1000 尾	Z2 期, 部分 发育到 Z3 期, 活动正 常	部分幼体发 育变态为 M1 期. 抽样发现 死亡数比对照 组多	抽样检查, 死 亡率与对照 组无明显区 别	Z3、M1 期. 活动 基本正常, 抽样 检查的死亡率 与对照组无明 显区别	Z3、M1、M2 期 均有. 累计死 亡率为 63%
对照 2	糠 虾 幼 体 (M2 期), 500 尾	M3 期, 正 常	正常, M3 期, 有少量幼体 死亡	P1 期. 有少量 幼体死亡	抽样计数, 死亡 率约 30%	存活数 202 尾, 累计死亡 率为 59.6%
实验 2	糠 虾 幼 体 (M2 期), 500 尾	M3 期, 与 对照组无 明显区别	M3 期, 有少 量幼体死亡; 游动方式无 异常, 但行动 较迟缓	P1 期. 有少量 幼体死亡	抽样计数, 死亡 率约为 50%	存活数 160 尾, 累计死亡 率为 68%
对照 3	仔 虾 (P7), 500 尾	P8 期, 极个 别个体歪 头、死亡	正常, 投喂的 丰年虫已吃 尽	P9 期. 正常, 仅有少量个 体死亡	大部分幼体存 活	共存活 398 尾, 累计死亡 率为 20.4%
实验 3	仔 虾 (P7), 500 尾	P8 期, 部分 个体游动 方式异常	投喂的丰年 虫未吃完; 抽 样检查的死 亡率约为 50%	P9 期. 抽样检 查的死亡率 约为 90%	仅剩 3 尾幼体 存活, 累计死亡 率为 99.4%	幼体全部死 亡, 累计死亡 率为 100%

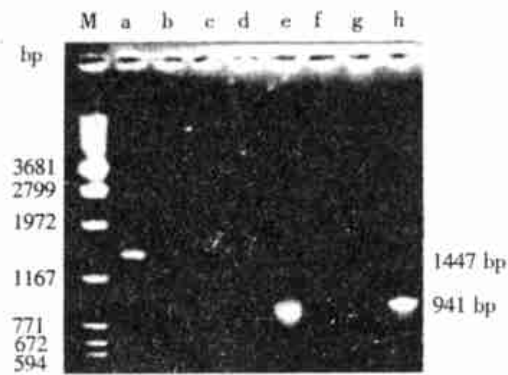


图 1 经过感染的斑节对虾仔虾的 WSSV 的 PCR 检测
M PCR 相对分子质量标准; a 一扩阳性对照;
b 一扩阴性对照; c 对照组仔虾的一扩结果, 阴性;
d 经感染的仔虾的一扩结果, 阴性;
e 二扩阳性对照; f 二扩阴性对照;
g 对照组仔虾的二扩结果, 阴性;
h 经感染的仔虾的二扩结果, 阳性

在作者所调查的几个育苗场中, 未发现斑节对虾亲虾携带 WSSV. 不过, 黄^[13]等曾报道斑节对虾越冬亲虾患 WSS^[13]; Lo 等报道的病原调查结果是亲虾(♀)带毒率高达 75%^[13]. 这些结果差别较大, 其原因可能与调查取样有关. Lo 等的材料取自台南的斑节对虾自然分布区, 并立即运送到实验室内进行 PCR 检测, 因此其检测结果所反映的是该亲虾产地的 WSSV 的情况. 事实上, 该地区是 WSS 的高发区, 有多种甲壳类动物携带 WSSV, 因此, 该地区亲虾带毒率高是可以理解的; 黄^[13]报道的患病亲虾取自广东 WSS 病发区的养殖场, 因此也存在受感染的机会; 而本实验调查的对象是来自东南亚(印尼, 马来

西亚)的野生的斑节对虾亲虾,在出售到育苗场前已经过了长时间的运输,并经过了人工挑选,其中的病、伤、以及弱的个体已经死亡、淘汰.经过这一过程,育苗场的亲虾的质量有了初步的保障.因此,育苗场在购买斑节对虾亲虾时,一定要考虑亲虾产地来源,有所选择.

从幼体感染实验可知,斑节对虾仔虾容易感染上 WSSV,感染后 2~3 d 内死亡.如果是在仔虾的早期感染上 WSSV,这些幼体所带病毒可能因死亡而无法进入养殖塘中;但如果是在出售前受到 WSSV 感染,或者 WSSV 具有潜伏感染的特性,那么 WSSV 就很容易随着虾苗进入养殖虾塘,进而在一定条件下发生 WSS 的流行.因此,建立科学的对虾苗种质量监控体系(尤其是病原检测体系),对于对虾养殖的正常进行是很有必要的.

作者在对斑节对虾幼体的人工感染实验中,仅发现仔虾被感染上病毒.这一结果与在中国对虾中研究的结果类似^[9~11],但感染后的幼体的死亡率与中国对虾实验中的结果有区别,即斑节对虾仔虾从受感染到死亡的时间较短.出现区别的原因是由于实验水温不同引起,或是实验对象不同、病毒株不同引起,抑或是由于 3 者的共同作用所致,则需进一步研究.另外,蚤状幼体、糠虾幼体经 WSSV 感染后,虽然 PCR 检测呈 WSSV 阴性,但幼体的死亡率要比其对照组高.这究竟是由于 WSSV 不能感染该发育阶段的幼体,还是由于在这一发育阶段 WSSV 只能潜伏其中而不能扩增,以至于病毒数量太少而检测不出,都是值得进一步探讨的问题.尽管有许多问题(如垂直传播、潜伏感染等)还需要深入研究,但现有的数据资料已经说明, WSSV 是一个致病力很强的病毒,不仅在养成期内能导致 WSS 的暴发流行,在育苗期内既能感染亲虾(结果另文发表),也能感染仔虾.因此,在斑节对虾鱼苗生产中,要想培育出无特定病原的健康苗种,必须严格把握在育苗期的各个环节以切断 WSSV 的传播途径,尤其是要保证亲虾不带病毒,以及保证出售时的仔虾不带病毒,这样可以减少对虾养殖期 WSS 爆发流行的机会.

参考文献:

- [1] 黄贻, 蔡生力, 宋晓玲, 等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 51~58.
- [2] 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[J]. 中山大学学报论丛, 1996(增刊): 16~22.
- [3] 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.
- [4] LIGHTER D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp[J]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- [5] 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.
- [6] 何建国, 周化民, 姚泊, 等. 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.
- [7] 何建国, 周化民, 江静波. 白斑综合症杆状病毒致病性特征[J]. 热带海洋, 1999, 18(1): 59~67.
- [8] 黄贻, 于佳, 宋晓玲, 等. 1993~1994 年山东省中国对虾育苗期病毒感染的流行病学调查[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 83~90.
- [9] 宋晓玲, 王崇明, 黄贻, 等. 对虾暴发性流行性病原对中国对虾幼体及仔虾的人工感染研究[J]. 海洋水

产研究, 1998, 19(1): 8~13.

- [10] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 暴发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的 PCR 检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 139~144.
- [11] 刘萍, 孔杰, 李健, 等. 暴发性流行病病原对中国对虾子虾的人工感染实验研究[J]. 海洋科学, 1998 (1): 1~3.
- [12] 王运涛, 徐洪涛, 李晨曦, 等. 暴发性流行病病原对中国对虾越冬亲虾人工感染的研究. 海洋科学, 1999(3): 3~5.
- [13] 黄, 王秀华, 宋晓玲, 等. 首例斑节对虾越冬亲虾发生杆状病毒的皮下及造血组织坏死症研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 76~82.

The Infectivity of White Spot Syndrome Virus (WSSV) to Larvae and Postlarvae of *Panaeus monodon*

JIANG Shi-gui^{*}, HE Jian-guo, MA Zhi-ming, CHEN Yi-biao,
WANG Wei-bu, JIANG Jing-bo

Abstract: Artificial infection of white spot syndrome virus (WSSV) to healthy zoea larvae, mysis larvae and postlarvae of black tiger prawn, *Panaeus monodon* was carried out. The postlarvae could be infected by WSSV with death rates 100%, the movement conditions of the postlarvae infected were abnormal, and the PCR detection results were WSSV positive. The metamorphosis of both zoea and mysis larvae infected were delayed, and the death rates were more than the corresponding controls, although their PCR detection results were WSSV negative.

Keywords: white spot syndrome virus (WSSV); infectivity; *Panaeus monodon*; zoea larvae; mysis larvae; postlarvae

^{*} School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China