

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0164-08

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^{*}

江世贵¹, 何建国¹, 吕 玲¹, 邓 敏¹, 江静波¹,
王维部², 陈怡飙², 马之明²

(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: 白斑综合症病毒 (WSSV) 对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 亲虾的致病力强, 其致病性特征与对未成熟个体的致病性特征相同; 经 WSSV 感染的斑节对虾亲虾的死亡率为 100%。感染了 WSSV 的亲虾的 PCR 检测结果均呈阳性, 组织切片观察可见到明显的组织病变, 电镜观察发现病变组织 (包括卵巢) 的细胞内有大量病毒粒子; 原位杂交结果证明, 患白斑综合症的斑节对虾亲虾的卵巢中不仅卵母细胞感染上病毒, 卵细胞也感染上了病毒。这些结果表明, WSSV 在斑节对虾中具备垂直传播的条件。

关键词: 白斑综合症病毒; 垂直传播; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*); 亲虾; 致病性

中图分类号: Q945.4⁺7 **文献标识码:** A

白斑综合症 (white spot syndrome, 简称 WSS) 是目前对虾养殖中的主要病害之一, 其病原体为白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, 简称 WSSV)。由于还没有有效的药物来防治 WSSV, 因此控制 WSS 暴发的主要方法在于预防。在阐明 WSSV 传播途径的基础上, 通过切断传染源来防止病原传播, 则是预防的有效措施之一。关于 WSSV 的传播途径的研究, 国内外文献主要报道了 WSSV 的水平传播途径, 关于 WSSV 垂直传播的研究不多; 是否存在 WSSV 的垂直传播, 也一直未能阐明^[1~5], 尽管在中国对虾中有关于对虾杆状病毒 (有包涵体) 和球形病毒的垂直传播的研究报道^[6,7]。本文针对这个问题, 用 WSSV 对斑节对虾亲虾进行了人工注射感染, 观察了 WSSV 对斑节对虾亲虾的致病性, 并对 WSSV 的垂直传播途径进行了初步探讨, 以期对斑节对虾 WSS 的防治积累更多的科学资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

12 尾斑节对虾亲虾由东南亚国家进口, 与广东沿海大多数虾苗厂生产所用的亲虾来

^{*} 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

源相同, 体长 26~28 cm, 体质量 144~190.5 g. 患白斑病的斑节对虾材料取自廉江市龙营围对虾养殖场, 体长 8~10 cm, 具典型的白斑综合症症状 (PCR 检测呈阳性). 病虾材料保存于 -70°C 冰箱, 携带时保存于冰壶中. 用病虾材料制备 WSSV 粗提液, 用健康斑节对虾 (经 PCR 检测证明不携带 WSSV 者) 制备对照注射液, 制备方法参考文献 [8].

1.2 试剂

PCR 试剂盒、地高辛标记试剂盒及原位杂交试剂、Tris、NP-40、蛋白酶 K 购自华美生物工程公司, 其它试剂为国产分析纯. PCR 产物电泳的 Marker 由中山大学生物工程中心周慧老师赠送.

1.3 亲虾养殖、催产及人工感染方法

将购回的 12 尾健康亲虾置于容积 4 m^3 的圆柱形水桶中养殖, 海水盐度为 30‰, pH 为 8.0. 用温控器调节水温, 使水温保持在 $29\sim 30^{\circ}\text{C}$. 每天投喂蟹肉, 及时排除残饵与粪便. 为了促进亲虾性腺成熟, 保证其产卵, 对亲虾进行了人工催产处理. 除了投喂优质饵料外, 还使用黑布覆盖水桶以遮住光线, 并剪去亲虾一侧的眼柄. 感染后, 每天傍晚将亲虾移到容积 100 L 的产卵桶中, 用黑布覆盖产卵桶, 产卵水温比养殖桶的水温提高 1°C . 将产出的卵子按常规生产方法收集, 一部分取样检测, 一部分用于孵化.

人工感染采用注射感染方法. 先后挑选了 8 尾斑节对虾亲虾 (♀), 分 2 组逐尾注射 WSSV 粗提液, 第 1 组注射 $400\text{ }\mu\text{L}$ /尾, 第 2 组注射 $500\text{ }\mu\text{L}$ /尾. 对照组则用对照注射液来注射. 对感染后的亲虾进行病征观察, 濒死时取样, 用于 PCR 检测、原位杂交、组织病理检测和电镜观察. 在感染实验结束时, 收集对照组样品.

1.4 组织切片及电镜样品的制备

解剖濒死的亲虾, 分离其卵巢、肝胰腺、鳃、表皮、胃、中肠、肌肉等器官、组织, 剪碎后用 Davison's AFA 液固定. 固定 24 h 后更换 70% 的酒精 2 次, 之后按常规技术制备组织切片, 包括酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, HE 染色, 封片后光镜观察. 选取卵巢、胃、鳃、表皮等器官, 按翁少萍等的方法制备电镜样品^[9].

1.5 PCR 检测与原位杂交

按 Lo 等 WSSV 的套式 PCR 二步检测法检测^[10].

原位杂交方法在 Lightner 的方法^[11]基础上改良、简化: 组织样品的固定、包埋与上述的组织切片方法相同. 将样品切片 (厚度 $5\sim 6\text{ }\mu\text{m}$), 贴于硅化后的载波片上, 烘片 (60°C , 45 min). 脱蜡后经过酒精梯度系列入蒸馏水、 $1\times\text{TNE}$, 再用 $1\times\text{TNE}$ 配制的 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶 K (Pr. k) 在湿盒中消化 (37°C , 10 min), 0.4% 甲醛后固定 (室温, 5 min), 在 $2\times\text{SSC}$ 中水洗 5 min, 然后杂交. 杂交前, 先将探针煮 10 min, 后置于冰上 5 min. 探针 DNA 片段大小为 413 bp, 由所在实验室从 WSSV 基因组中克隆, 用地高辛标记. 杂交液中的探针量为 $10\sim 25\text{ ng}/\text{mL}$. 每张玻片加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的杂交液, 于 95°C , 6 min, 冰上 5 min, 在湿盒中 42°C 杂交、过夜. 杂交后, 按 Lightner 的方法^[11]操作, 但不经复染即封片、观察. 每次实验均用已知的健康对虾作阴性对照, 以确保实验体系无假阳性结果.

2 结果

2.1 人工感染了 WSSV 的斑节对虾亲虾的病征

在感染初期, 实验组的亲虾常在池内游动或爬行, 一段时间后, 多伏于水桶底部, 很

少活动。此时的亲虾对外界刺激的反应比正常对虾迟钝，但逃避反应能力仍较强，捕捉时有较大的弹跳力。感染后第一个症状是不摄食，接着虾体变红。红体虾的活动能力仍然较强，不易捕捉。在之后的较长一段时间内，除红色加深外，观察不到红体虾有何变化。对于不同的个体，其红体症状表现不一，有暗红色、红色或淡红色，有的红体现象不明显，需要与对照组的亲虾比较才可观察到。待红体虾甲壳出现白斑后，亲虾逃避反应的能力逐渐变弱。濒死时的亲虾有静伏变为侧卧。因其头胸甲较厚，且甲壳颜色浅淡、不够亮泽，其白斑症状不易观察，需仔细辨别。濒死时，甲壳易与其下的真皮剥离，且红体和白斑症状越明显，甲壳越易剥离。解剖时揭开其头胸甲后，可见甲壳内侧的白斑，其大小不等、分布不匀，有点状（直径 0.1~2 mm）和片状，成片者则边沿较模糊。病虾普遍存在空胃现象，肠道中无粪便。鳃和肝胰腺外观则无明显变化，但将鳃置于显微镜下观察时，可见粘附的污物、碎片。对照组的斑节对虾亲虾则未出现病征。

2.2 WSSV 对斑节对虾亲虾的致病力

感染了 WSSV 的亲虾，在一定时间内全部死亡（表 1）。从感染到死亡的时间，第 1 组平均为 53 h，第 2 组平均为 47 h。在相应的观察时间内，对照组的亲虾未出现死亡。

表 1 WSSV 感染斑节对虾亲虾的结果

组别	体质量 g	体长 cm	数量 尾	注射量 mL	死亡时间/h			死亡率 %
					最早	最终	平均	
对照 1	161.0±1.0	27.3±0.3	2	0.4	—	—	—	0
实验 1	170.3±20.3	27.0±1.0	4	0.4	19	132	53	100
对照 2	152.0±4.0	26.1±0.0	2	0.5	—	—	—	0
实验 2	150.0±6.0	26.3±0.3	4	0.5	44	49	47	100

2.3 样品的 PCR 检测结果

对所有经注射感染的亲虾的鳃样品进行 PCR 检测，其结果呈 WSSV 阳性，对照组则为阴性。取其中一尾亲虾的不同组织器官检测，除肝胰腺、中肠在二扩时才呈阳性外，其余的检测样品（包括表皮、胃、鳃、肌肉、卵巢等）皆在一扩时即呈阳性。在经过感染的亲虾中，有 2 尾产卵，2 份卵子样品在一扩时为阴性，二扩时一个为阳性，另一个为阴性（图版 I—1）。

2.4 组织病理与组织特异性

亲虾感染了 WSSV 后，产生广泛的外胚层和中胚层来源的组织器官坏死。组织切片观察到的典型症状为细胞核肿大及深染（图版 I—2）。因这些结果与养成期斑节对虾感染实验的结果相同，在此不予赘述。

原位杂交结果（图版 II）显示，注射感染了 WSSV 的亲虾，其鳃、胃、表皮上皮细胞以及各部位的结缔组织的细胞感染严重，腹部肌肉中有少量细胞被感染；但内胚层来源的肝胰腺上皮细胞、中肠上皮细胞不感染。卵巢受 WSSV 感染的程度虽不及表皮、鳃、胃严重，但能观察到卵母细胞和卵细胞均受到 WSSV 感染。

有 1 尾亲虾经 WSSV 感染后的存活时间特别长，达 132 h，经原位杂交检测，显示其受感染程度较轻。将感染了 WSSV 的亲虾所产出的卵子进行原位杂交检测时，因卵子样品在处理过程中从玻片上脱落，未能取得实验结果。

2.5 电镜观察确认 WSSV 的感染

在组织切片观察、PCR 及原位杂交检测的基础上，通过电镜（TEM）观察确认了

WSSV 对各部位的感染 (图版 I—3, 4, 5). 在鳃、胃和表皮的上皮细胞中, 可观察到细胞核中存在大量的病毒粒子. 肌肉、肝胰腺样品虽然在 PCR、原位杂交中出现明显的 WSSV 阳性信号, 但在电镜下难以观察到病毒粒子. 在卵巢中, 卵母细胞的细胞核中可见到病毒粒子, 但未见到卵细胞中的病毒粒子. 虽然有一尾亲虾产出的卵子在 PCR 二扩检测时呈 WSSV 阳性, 但在电镜下未观察到病毒粒子.

2.6 受到 WSBV 感染的亲虾的产卵情况

经过注射感染的亲虾只有 2 尾产卵, 其余的未产卵即死亡. 这 2 尾亲虾的注射病毒液的时间是下午 4: 00, 产卵时间在次日凌晨 3: 00~5: 00 之间. 产卵时间距感染时间不超过 13 h. 次日 6: 00, 将产卵后的亲虾移出产卵桶继续培养, 未能再次产卵, 48 h 后濒临死亡.

3 讨论

在发病的养殖虾塘中, 患白斑综合症的濒死斑节对虾的显著的外观病症为空胃、红体、甲壳白斑、头胸部肿大和甲壳易剥离等症状. 但就亲虾而言, 患白斑综合症的濒死斑节对虾无明显的头胸部肿大的症状, 只有甲壳白斑、空胃、红体、和甲壳易剥离等症状. 但由于亲虾正常脱壳前其甲壳也很容易与真皮剥离, 故甲壳易剥离的现象难以作为鉴别亲虾是否患白斑综合症的外观症状; 另外, 亲虾出现红体症状有多种病因, 如枝原体感染即可引起, 在生产中也很常见; 空胃更是病虾普遍出现的病症. 因此, 如果要根据外观症状来判断亲虾是否患有白斑综合症, 应以出现白斑为主要依据, 然后进一步确诊.

注射感染了 WSSV 的亲虾的死亡率为 100%, 说明 WSSV 的致病力很强. 从感染到死亡的时间最短 19 h, 最长在 132 h, 平均为 47~53 h; 我国南方养殖池塘发病情况的观察结果与此相似; 对稚虾 (体长 4.6~7.2 cm) 注射感染的结果也是如此, 平均死亡时间为 47.2~51.1 h^[8]. 从上述结果可以看出, 斑节对虾亲虾受到 WSSV 感染后, 其死亡时间与稚虾感染后的死亡情况基本一致. 这一结果说明, WSSV 的致病性与斑节对虾的个体大小无关, 斑节对虾亲虾并未因其个体较大而比稚虾的抗病力强. 需要指出的是, 斑节对虾感染了 WSSV 后, 其病程的发展与水温有关, 还与病毒数量和感染方式有关 (未发表资料). 本实验所采用的水温 (29~30 °C) 条件是根据我国南方斑节对虾苗种生产规程来设置的. 本文报道的数据是在这一水温条件下, 采用注射感染方式取得的结果.

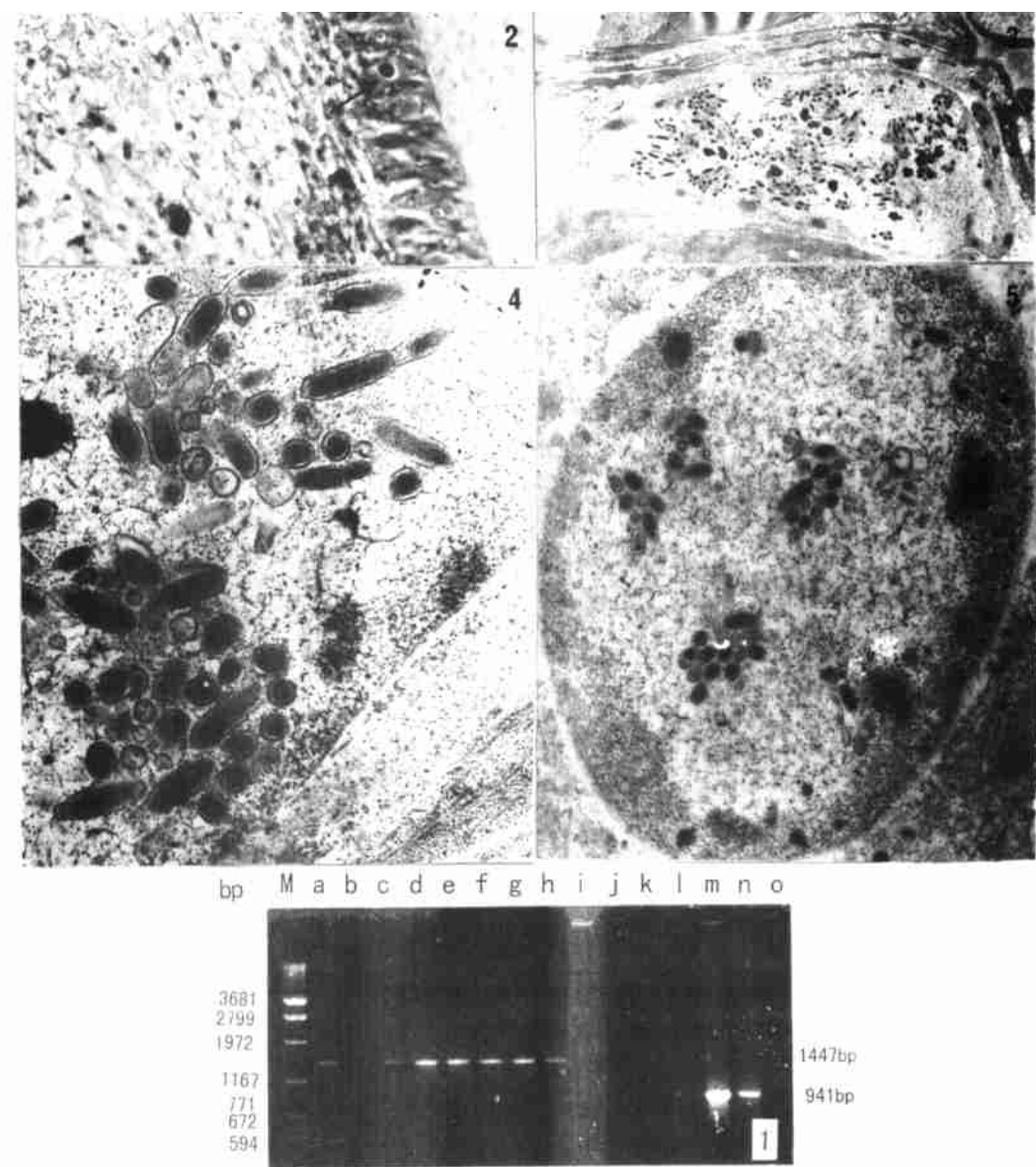
在检测方法方面, 使用原位杂交技术研究 WSSV 感染的组织特异性, 其检测的灵敏度较之组织切片方法大大提高, 所显示出的病变程度比用组织切片方法研究所得的结果更客观. 虽然原位杂交方法的灵敏度不及 PCR 方法, 但由于该方法能对病变的组织、细胞准确定位, 其结果更为直观. 在实验中, 用组织切片方法不易观察到受 WSSV 感染的卵巢组织的病理变化, 但用原位杂交技术可以检测到卵巢被 WSSV 感染的情况. 对于取自不同组织器官的样品 PCR 检测的灵敏性的区别, 用原位杂交结果可以作出直观、明了的解释. 电镜检测的优点是可以直接观察到细胞中的病毒, 但不足之处是当切片数量有限时容易出现漏检. 在本实验中, 对于 PCR 二扩才呈阳性的样品, 在电镜下都未能观察到病毒.

本文的实验结果证实, 受感染的斑节对虾卵巢经 PCR 检测为 WSSV 阳性, 产出的卵子部分为阳性, 说明卵巢及卵子已携带病毒; 电镜观察结果证明在卵母细胞中有大量病毒粒子; 原位杂交的结果证明 WSSV 既感染卵母细胞, 也感染卵巢中的卵细胞, 这一实验结果

对 Lo 等 (1997) 的结果提出了修正. 由于被感染的亲虾能够完成产卵过程, 且产出了带 WSSV 的卵子, 因此, 作者认为, WSSV 具备垂直传播的必要条件, 理由是: (1) 由于在育苗场中不可避免地存在 WSSV 传播所需的生物载体和非生物载体, 因此, WSSV 在产卵和孵化过程中, 借助于各种载体通过水体从亲虾传递到幼体的条件已经具备; (2) 虽然受感染较严重的卵子难以孵化出无节幼体 (例如本文的结果), 但如果卵子受 WSSV 感染的程度较轻, 则有可能通过潜伏感染完成经卵垂直传播的过程, 将亲虾所携带的病毒直接带到幼体. 但是, WSSV 垂直传播的实现, 还必须依赖于对虾卵子成熟时间、产卵时间、产卵习性、产卵的环境条件与对虾受 WSSV 感染程度、产卵时的体力状况的协调一致. 至于仔虾期以前的各期幼体未检测到 WSSV, 则可能是因病毒数量较少以及检测方法灵敏度的局限所致. 因此, WSSV 的潜伏感染问题有待于深入研究.

参考文献:

- [1] 黄捷, 于佳, 王秀华, 等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 40~50.
- [2] 黄捷, 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.
- [3] 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.
- [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] 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影响的 PCR 检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 139~144.
- [6] 汝少国, 姜明, 李永祺, 等. 中国对虾杆状病毒垂直传播途径的初步探讨[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 49~55.
- [7] 汝少国, 姜明, 李永祺, 等. 中国对虾育苗期球形病毒的感染及垂直传播途径的初步探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 255~260.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] LIGHTER D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp[M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- [12] 何建国, 翁少萍, 邓敏, 等. 养殖斑节对虾红体病病原及组织病理研究[J]. 中山大学学报论丛, 1996(增刊): 6~11.



图版I 感染了 WSSV 的斑节对虾亲虾的 PCR 检测以及光镜和电镜观察

1 PCR 检测结果；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~j 分别为 8 尾经 WSSV 感染的亲虾样品的一扩结果（其中，c 为卵巢样品，阳性；d 为胃样品，阳性；e 为表皮样品，阳性；f~h 为鳃样品，阳性；i 为肌肉样品，其阳性信号较弱；j 为中肠样品，为阴性）；

k~l 受 WSSV 感染的亲虾产生的卵的一扩结果，为阴性；

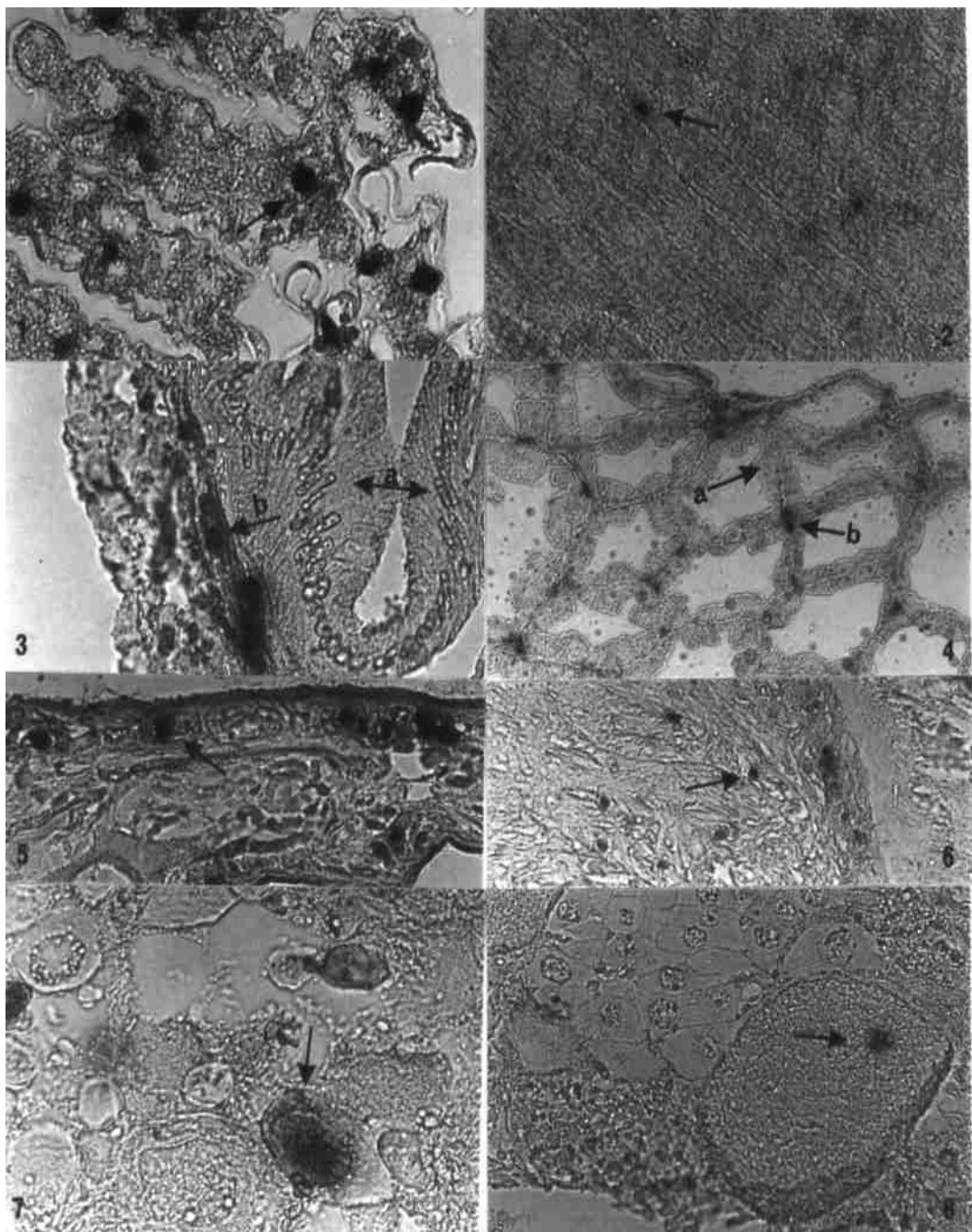
m 为 j 的二扩结果，呈阳性；n 为 k 的二扩结果，阳性；o 为 l 的二扩结果，阴性。

2 胃的组织切片，示上皮细胞的细胞核肿大、深染， $\times 150$ ；

3 甲壳表皮的电镜观察，示表皮细胞核内存在大量病毒粒子， $\times 5\,000$ ；

4 甲壳表皮的电镜观察，为版图 I-3 的局部放大， $\times 32\,700$ ；

5 卵巢，示感染程度较轻的卵母细胞核， $\times 13\,900$



图版 II 感染了 WSSV 的斑节对虾亲虾的原位杂交检测

- 1 鳃, 示细胞核大量感染, $\times 350$; 2 肌肉, 示少量细胞感染, $\times 175$;
3 中肠, a 示内胚层来源的中肠上皮细胞不感染, b 示结缔组织的细胞感染, $\times 350$;
4 肝胰腺, a 示内胚层来源的肝胰腺上皮细胞不感染, b 示结缔组织的细胞感染, $\times 175$;
5 附肢, 示甲壳之下的表皮细胞感染, $\times 350$; 6 胃, 示结缔组织的细胞感染, $\times 175$;
7 卵巢, 示卵母细胞感染, $\times 350$; 8 卵巢, 示卵细胞感染, $\times 350$;

The Infectivity of White Spot Syndrome Virus to the Brooders of *Penaeus monodon* and Vertical Transmission of the Virus

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

Abstract: The infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) to the brooders of black tiger prawn, *Penaeus monodon*, was studied by means of injection of prawn virus extract. The result indicated that WSSV infection was characterized by a wide range of target tissues originating from both the mesoderm and the ectoderm, rapid diseases onset and high mortality in brooder, just like as in immature. To identify the vertical transmission route of WSSV, we conducted a combine study using currently available nucleic acid diagnostic tools, including polymerase chain reaction (PCR) and *in situ* hybridization, and conventional histological observations using light (LM) and transmission electron (TEM) microscopy to examine the sites for virus multiplication. The tissue/organ samples detected included gills, stomach, abdominal muscle, ovary, midgut, hepatopancreas, pleopods, etc. The most significant result was that both oocytes and mature egg cells were WSSV positive in the ovaris of brooders infected by WSSV. This result represented that the vertical transmission of WSSV might exist in *Penaeus monodon*.

Keywords: white spot syndrome virus (WSSV); infectivity; vertical transmission; *Penaeus monodon*; brooder

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