

文章编号: 0529-6579 (1999) 02-0065-05

白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类^{*}

何建国, 周化民, 姚 伯, 杨晓明, 邓 敏

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 利用生物检测、PCR、组织病理和电镜技术, 通过投喂和浸泡感染方式, 结果表明口和消化道是斑节对虾感染白斑综合症杆状病毒 (WSBV) 的主要途径; 宿主经口摄食携带 WSBV 媒介生物是 WSBV 传播的主要途径; 确定了 21 种较大型的 WSBV 宿主种类, 其中以虾蟹为主; 桡足类可携带 WSBV 并起媒介生物的作用。

关键词: 白斑综合症杆状病毒; 感染途径; 宿主范围

中图分类号: S 945.2 **文献标识码:** A

白斑综合症杆状病毒 (white spot syndrome baculovirus, 简称 WSBV)^[1] 因其地理分布广, 流行范围大, 传染性强, 在养殖对虾中发病致死过程短, 易暴发以及目前没有有效的预防和治疗药物, 给我国乃至亚洲养虾业造成巨大损失, 从而成为养殖对虾的主要病原^[2~3]。WSBV 也是我国对虾养殖业 1993 年以来大滑坡的主要病因^[6~8], 对 WSBV 的预防与控制的研究直接关系到我国对虾养殖业的恢复和发展。

WSBV 对养殖对虾的巨大危害与它的致病性、感染途径、传播途径和宿主范围有直接的关系。本文着重研究了 WSBV 的感染途径和宿主种类。

1 材料与方法

1.1 实验条件

实验用海水为天然海水, 盐度为 14, pH 8.0~8.6, 使用前 200 目网过滤。水族箱体积 60 L, 使用前 $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二氧化氯消毒 6 h。注射感染和投喂感染养殖水体 40 L, 浸泡感染水体根据病毒浓度不同有所不同, 水温 28~32 °C, 24 h 充气。每天吸污换水 1 次, 换水量 80%。

1.2 材 料

健康养殖期斑节对虾取自广东省廉江市龙营围养虾场未发病虾池, 在水族箱中暂养 7 d, 1 d 2 次投喂对虾人工配合饲料, 无病症和死亡批次斑节对虾用于受试材料。

发病和未发病虾池感染材料的收集。收集到的种类包括未发病虾池斑节对虾, 发病虾

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670577); 广东省科委“八五”攻关项目

收稿日期: 1998-10-26 作者简介: 何建国, 男, 1962 年生, 教授。

池对虾和其它种类, 包括其他虾类、蟹类、鱼类、软体动物、环节动物、腔肠动物、蜃、藤壶等, 以及海区乳斑虎头蟹和虾蛄。浮游生物网收集 WSBV 暴发对虾养殖池和未发病对虾养殖池浮游动物, 一部分浮游生物液氮保存用于 WSBV PCR 检测, 一部分用于生物感染实验, 一部分用 $\varphi=4\%$ 的甲醛固定用于分类鉴定。

1.3 WSBV 粗提液的制备

白斑明显濒死斑节对虾去甲壳和肝胰腺之头胸, 剪碎混匀, 按 0.1 g 组织加 1.0 mL、pH 7.4、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液比例加缓冲液, 于匀浆器中匀浆, 匀浆液 200 目网过滤, 最后经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 其滤液为 WSBV 粗提液。1 mL WSBV 原液所得 WSBV 粗提液按 1 mL 计算, 其病毒浓度确定为 1, 加磷酸缓冲液稀释。WSBV 粗提液一部分用于注射和浸泡感染, 一部分液氮保存, 用于细菌培养。在所有实验中 WSBV 粗提液在营养琼脂细菌培养基中未能培养出细菌。WSBV 粗提液室温 2 h 制备完毕。

1.4 投喂感染

采集的各种生物, 个体大者切成碎块直接投喂受试斑节对虾。取自 WSBV 病暴发高峰期病发池之浮游动物, 浓集后等分投喂 2 个受试斑节对虾感染组。采集未发病池浮游动物一部分直接投喂健康斑节对虾, 一部分用 WSBV 粗提液感染 48 h 后浓集投喂健康斑节对虾。实验观察时间视 WSBV 感染情况而定。

1.5 注射感染

WSBV 粗提液于斑节对虾第 2 和第 3 腹节间侧面向心浅层肌肉注射, 每尾 0.05 mL。

1.6 浸泡感染

粗提 WSBV 按实验养殖水体计算病毒浓度直接投入水族箱中, 有 3 种情况: 第 1 种情况是以斑节对虾为受试生物, WSBV 浸泡后立即投喂对虾人工配合饲料; 第 2 种情况是以斑节对虾为受试生物, WSBV 浸泡 48 h 后投入人工配合饲料; 第 3 种情况是 WSBV 浸泡未发病对虾养殖池之浮游生物 48 h, 浓集后投喂斑节对虾。

1.7 WSBV PCR 检测

按 Lo 等^[9] WSBV PCR 二步检测法检测被测生物。

2 结 果

2.1 WSBV 的感染途径

2.1.1 经口感染 结果显示, 对照 2 组投喂人工配合饲料的 22 尾斑节对虾在 36 d 观察时间里没有出现白斑综合症症状和死亡; 用感染了 WSBV 斑节对虾分别投喂 6 组健康斑节对虾 60 尾, 各组最早死亡个体时间相近, 48~57 h, 在 4 d 内死亡率各组均为 100%, 表现白斑综合症症状(表 1)。

2.1.2 体表感染 没有浸泡 WSBV 粗提液的 2 组 22 尾斑节对虾在 15 d 观察时间里没有出现白斑综合症症状和死亡; WSBV 粗提液投浸感染 2 组斑节对虾 22 尾, 同时投喂人工配合饲料, 73 h 斑节对虾开始死亡, 至 168 h 死亡率 100%; WSBV 粗提液投浸感染 2 组斑节对虾 20 尾, 浸泡 WSBV 48 h 后再投喂人工配合饲料, 在 15 d 观察时间里没有出现死亡和白斑综合症症状(表 2)。

2.2 WSBV 宿主种类

WSBV 的宿主种类见表 3。WSBV 宿主中以甲壳纲十足目种类为主, 虾蛄和蜃对 WSBV

表 1 WSBV 投喂感染对斑节 对虾
Tab 1 WSBV infected *P. monodon* by oral

组别	数量/ 尾	体长/ cm	感染材料	最早死亡时间/h	4 d 死亡率/ %
1	10	4.2~8.3	人工配合饲料	—	0 ¹⁾
2	12	5.2~8.2	人工配合饲料	—	0 ¹⁾
3	10	4.7~7.0	白斑褪色斑节对虾	48	100
4	10	5.1~7.0	白斑褪色斑节对虾	50	100
5	10	4.7~7.7	白斑褪色斑节对虾	52	100
6	10	3.0~7.8	红体斑节对虾	52	100
7	10	4.7~6.8	红体斑节对虾	52	100
8	10	4.4~7.5	红体斑节对虾	57	100

1) 为 36 d 的死亡率

表 2 WSBV 粗提液浸泡感染斑节对虾
Tab 2 Partial purified WSBV infected *P. monodon* by immersion

组别	体长/ cm	数量/ 尾	感染材料和方式 ¹⁾	病毒浓度	最早死亡时间/ h	死亡率/ %
1	6.2±0.5	10	海水+ 饲料	—	—	15 d/0
2	6.4±0.6	10	海水+ 饲料	—	—	15 d/0
3	6.7±0.3	12	粗提液+ 饲料	1×10 ⁻³	96	168 h/100
4	7.0±0.5	10	粗提液+ 饲料	1×10 ⁻³	73	154 h/100
5	6.8±0.5	10	粗提液+ 48 h 饲料	1×10 ⁻³	—	15 d/0
6	6.2±0.4	10	粗提液+ 48 h 饲料	1×10 ⁻³	—	15 d/0

1) “粗提液”为 WSBV 粗提液;“饲料”为人工配合饲料;“粗提液+ 饲料”为斑节对虾投浸 WSBV 粗提液同时投喂饲料;“粗提液+ 48 h 饲料”为斑节对虾投浸 WSBV 粗提液 48 h 以后投喂饲料

表 3 WSBV 宿主种类
Tab 3 WSBV host range

种 类	生物 检测	组织 病理	电镜	PCR	种 类	生物 检测	组织 病理	电镜	PCR
斑节对虾(<i>Penaeus monodon</i>)	+	+	+	+	中国对虾(<i>P. chinensis</i>)	+	+	+	+
日本对虾(<i>P. japonicus</i>)	+	+	+	+	墨吉对虾(<i>P. merguensis</i>)	+	+	+	\
长毛对虾(<i>P. penicillatus</i>)	+	+	+	\	刀额新对虾(<i>Metapenaeus ensis</i>)	+	+	+	\
周氏新对虾(<i>M. joyneri</i>)	\	\		+	近缘新对虾(<i>M. affinis</i>)	\	\		+
东方白虾(<i>Exopalaemon orientalis</i>)	+	+	+	\	长臂虾(<i>Palaemonidae</i>)	+	+	\	\
日本樱虾(<i>Acetes japonicus</i>)	+	+	\	+	武氏厚蟹(<i>Helice wuana</i>)	+	+	+	\
测足厚蟹(<i>H. latimera</i>)	+	+	+	\	带纹相手蟹(<i>Sexuma fasciata</i>)	+	+	\	\
褶痕相手蟹(<i>S. plicata</i>)	+	+	\	\	双齿相手蟹(<i>S. bidens</i>)	+	+	\	\
少疣长方蟹(<i>Metaplex takahashii</i>)	+	+	\	\	巨缘青蟹(<i>Scylla serata</i>)	\	\	\	+
乳斑虎头蟹(<i>Oriithya mammillaris</i>)	+	\	\	+	虾蛄(<i>Stomatopoda</i>)	+	\	\	+
螯(<i>tachypleidue</i>)	\	\	\	+	藤壶(<i>Balanus</i>)	—	\	\	—
鱼	—	\	\	—	软体动物	—	\	\	—
环节动物	—	\	\	—	腔肠动物	—	\	\	—

+ 表示 WSBV 阳性; — 表示 WSBV 阴性; \ 表示未检测

也敏感。藤壶、腔肠动物、环节动物、软体动物、鱼类对 WSBV 不敏感, 不是 WSBV 宿主。

4 口暴发 WSBV 的斑节对虾养殖池小型浮游动物 WSBV PCR 二步法检测, 第 1 口, 阳性/ 阴性为 2/8。种类为桡足类幼体、双齿许水、猛水、短尾类; 第 2 口, 阳性/ 阴性为 0/8。种

类为桡足类幼体、许水 幼体;第 3 口阳性/阴性为 2/8,种类为桡足类幼体、双齿许水 、火腿许水 、歪水 、多毛类;第 4 口,阳性/阴性为 2/8,种类为双齿许水 、多毛类.3 口池小型浮游生物 8 次 PCR 二步法检测 2 次阳性,6 次阴性.1 口池 8 次检测均为阴性.4 口池小型浮游动物以许水 、猛水 等为主,双齿许水 是其优势种类.在 1 口 PCR 检测阳性池中桡足类仅获取双齿许水 1 个种.

未暴发 WSBV 虾池之浮游动物 7 d 16 次投喂斑节对虾 10 尾,15 d 观察时间里受试斑节对虾没有出现白斑综合症症状和死亡.来源同一个病虾池中浮游动物等分投喂 2 组斑节对虾,其中一组在 15 d 观察时间里受试斑节对虾未出现死亡和白斑综合症症状,另一组在 80 h 死亡 1 尾,其余 9 尾对虾摄食死亡对虾,7 d 内死亡率为 100%(表 4).

表 4 白斑病虾池浮游生物和 WSBV 浸泡未发病池的浮游生物感染斑节对虾

Tah 4 Plankton in diseased cultured and nomal cultured *P. monodin* ponds infectect *P. monodon*

组别	大小 cm	数量 尾	感染材料	投喂时间 d	次数	最早死亡 时间/h	死亡率 %
1	7.5±0.4	10	未发病池之浮游生物	7	16	\	0
2	7.3±0.5	10	病发池浮游生物	4	4	80	100(7 d)
3	7.6±0.3	10	病发池浮游生物	4	4	\	0
4	7.2±0.5	10	WSBV 粗提液浸泡的浮游生物	4	4	\	0
5	7.6±0.3	10	WSBV 粗提液浸泡的浮游生物	4	4	\	0
6	7.5±0.6	5	WSBV 粗提液注射感染(0.05 mL)	\	39	60	100(3 d)
7	7.4±0.3	10	4 组受试斑节对虾	1	1	\	0

3 讨 论

WSBV 的横向传播途径已经得到广泛的证明^[9].本文结果显示,在 WSBV 横向传播途径中,相同物种之间和不同物种之间经口摄食感染是 WSBV 感染斑节对虾的主要途径.海水中游离状态的 WSBV 不能通过体表感染健康斑节对虾.游离状态的 WSBV 在较高浓度的条件下可通过污染饲料经口感染斑节对虾,但有许多条件限制:游离 WSBV 在海水中具有感染活性时间短,4 h 就失去感染活性;游离 WSBV 通过污染饲料经口感染斑节对虾又存在与病毒浓度的依存关系,高浓度病毒感染,低浓度病毒不感染;WSBV 病发池水长期饲养健康斑节对虾,受试斑节对虾不出现白斑综合症症状和死亡^[11].由此可见在养殖条件下,游离状态的 WSBV 通过污染饲料经口感染斑节对虾的机会很少.口和消化道是宿主感染 WSBV 的主要途径;宿主经口摄食媒介生物是 WSBV 主要的传播途径.

WSBV 流行范围广,是亚洲养殖对虾主要病原.WSBV 宿主种类众多是 WSBV 流行范围广的主要原因,在甲壳类、桡足类和昆虫类中均有其敏感宿主^[9].从我们在我国南方确定的 21 种 WSBV 宿主和其他学者^[12,13]在北方确定的宿主来看,WSBV 宿主多为甲壳纲十足目的种类,并以虾蟹为主.随着对虾养殖业的发展,野生虾蟹在对虾养殖区大量富集,其种类和数量大量增加,因而在传统的建池在海湾的连片的依潮差纳排水式的养殖模式的养殖区养殖对虾极易暴发 WSBV.

有关桡足类 WSBV 宿主属性问题,本文结果与 Lo 等^[9]结果相符.通过人工感染和 PCR 方法证明桡足类是 WSBV 的宿主,而且进一步证明桡足类是 WSBV 传播的媒介生物之一.

参考文献:

- [1] LIGHTNER D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp[M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- [2] INOUE K, MIWA S, OSEKO N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus[J]. Fish Pathology, 1994, 29, 14 ~ 158.
- [3] WANG C H, LO C F, LEU J H, et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome(WSBV) of *Penaeus monodon*. [J] Diseases of Aquatic Organism, 1995, 23: 239 ~ 242.
- [4] WONGTEERASUPAYA C, VICKERS J E, SRIURAIRATANA S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. [J] Diseases of Aquatic Organism, 1995, 21: 69 ~ 77.
- [5] 何建国, 翁少萍, 邓敏, 等. 斑节对虾白斑病病原与病理[J]. 中山大学学报论丛, 1996(增刊): 12 ~ 15.
- [6] 黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下与造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1 ~ 10.
- [7] 胡超群. 广东沿海养殖对虾疾病流行特点及病因[J]. 海洋科学, 1994, 6: 9 ~ 10.
- [8] 翁少萍, 何建国, 钟慰, 等. 斑节对虾白斑综合症杆状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.
- [9] LO C F, HO C H, PENG S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, Crabs and other arthropods[J]. Diseases of Aquatic Organism, 1996, 27: 215 ~ 225.
- [10] LO C F, HO C H, CHENG C H, et al. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus(WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J]. Diseases of Aquatic Organism, 1997, 30: 53 ~ 72.
- [11] 何建国. 白斑综合症杆状病毒致病性特征[A]. 南海海洋资源开发利用与可持续发展战略研讨会论文集[C]. 湛江: 广东经济出版社, 1998, 611 ~ 624.
- [12] 王文兴, 罗挽涛, 宋庆云, 等. 脊尾白虾感染和传播中国对虾暴发性病毒的初步研究[A]. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集[C]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1996, 89 ~ 93.
- [13] 孙伯伦, 刘家贵, 张国清, 等. 天津原蟹感染对虾杆状病毒及对虾暴发性流行病防治途径的初步研究[J]. 水产科学, 1997, 16(2): 3 ~ 6.

White Spot Syndrome Baculovirus(WSBV)

Host Range and Transmission Route

HE Jian-guo^{*}, ZHOU Hua-min, YAO Bo, YANG Xiao-ming, DENG Min

Abstract: Using bioassay, polymerase chain reaction (PCR) and artificial infective experiments methods, we proved that WSBV transmission route is oral. WSBV hosts include *Penaeus monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. penicillatus*, *Metapenaeus ersis*, *M. joyneri*, *M. affinis*, *Exopalaemon orientalis*, *palaemonoidea*, *Acetes japonicus*, *Helice wuana*, *H. latimera*, *Sesarma fasciata*, *S. plicata*, *S. bidens*, *Metaplex takahashii*, *Scylla serrata*, *Orithyia manmilleris*, *omatopoda*, *Tachyleidie*.

Keywords: WSBV; host range; transmission route

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