

感染白斑综合症病毒中国对虾雄性生殖系统的 PCR 检测与电镜观察

张俊儒^{1,2}, 刘 萍¹, 王清印¹, 李 健¹, 刘德月¹, 孔 杰¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:通过人工投喂携带 WSSV 的毒饵, 对性腺发育成熟的中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 雄虾 (♂) 进行感染实验。采用 nest-PCR (巢式 PCR) 技术, 检测感染后的中国对虾雄性生殖系统受 WSSV 感染情况, 同时选取感染严重的虾样进行电镜观察。巢式 PCR 检测结果表明, 感染组中国对虾的精巢、输精管和精囊均被 WSSV 感染, 其中精囊呈阳性的最多, 输精管次之, 精巢最少。通过电镜进一步观察发现, WSSV 粒子只存在于精巢、输精管和精囊的结缔组织中, 而在其他组织和生殖细胞中均未发现病毒粒子。其中, 精巢中 WSSV 粒子存在于精巢内两个生精小管之间的结缔组织; 输精管中 WSSV 粒子存在于管壁的结缔组织; 精囊中 WSSV 粒子也只存在于精囊内壁的结缔组织和精荚膜的结缔组织中。PCR 检测和电镜观察结果均表明, WSSV 粒子能感染中国对虾的雄性生殖系统且对性腺感染存在着一定的组织特异性。[中国水产科学, 2006, 13(2): 263-268]

关键词: 白斑综合症病毒; 中国对虾; 雄性生殖系统; 巢式 PCR; 电镜观察

中图分类号: S945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)02-0263-06

白斑综合症病毒 (White Spot Syndrome Virus, 简称 WSSV), 是导致对虾大量死亡的暴发性流行病的主要病原。其传播方式目前公认的为水平传播。而在垂直传播方面, 近年来, 国内外科研人员进行了大量的研究, 雷质文等^[1]、Lo 等^[2]、常青山等^[3]研究发现, WSSV 能感染对虾的生殖系统, 并在精巢、精荚、卵母细胞、滤泡细胞以及卵巢结缔组织中均有发现。他们认为 WSSV 存在着垂直传播的条件, 可能存在垂直传播途径。而刘萍等^[4]、汝少国等^[5]、江世贵等^[6]在对 WSSV 的垂直传播研究中发现, WSSV 粒子能侵入对虾的卵巢和成熟的卵子, 且其子代检测出有带病毒的个体。江世贵等^[7]在感染 WSSV 的亲虾子代的跟踪检测中发现, 感染 WSSV 的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 亲虾通过产出携带 WSSV 的卵子, 完成受精过程, 能顺利地繁殖发育成携带 WSSV 的幼虾。但是, 对于 WSSV 能否感染对虾各期生殖细胞及其具体部位, 尤其是对虾雄性生殖系统, 均未见有系统的报道。而 WSSV 能否感染对虾雄性生殖系统, 能否通过受感染的精荚把病毒传播给子代等问题对于 WSSV 垂直传播途径的研

究有着重要的意义。

本研究通过人工攻毒感染实验, 用携带 WSSV 的毒饵对性腺发育成熟的中国对虾雄虾 (♂) 进行人工投喂感染, 观察 WSSV 对中国对虾雄性亲虾性腺不同组织 (精巢、输精管和精荚) 的感染情况, 为后期 WSSV 能否通过对虾雄性生殖系统的感染而垂直传播给子代提供更多的科学依据, 为中国对虾白斑综合症 (WSS) 的防治积累更多的科学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 健康虾 2004 年 9 月 23 日, 中国对虾雄虾取自山东省胶南养殖基地, 体长 10 cm 左右, 性腺发育良好、健康, 于实验室中暂养 2 d, 暂养期间不投喂任何饵料。实验用海水为经滤袋过滤并静置 48 h 以上的天然海水。

1.1.2 发病虾 2004 年 10 月 10 日, 从胶南养殖基地带回病死中国对虾雄虾 (WSSV 感染致死) 23 尾。取回后立即取其精巢、输精管和精囊, -20℃ 保存备用。

收稿日期: 2005-06-09; 修订日期: 2005-08-22.

基金项目: 国家“863”高新技术研究发展计划项目 (2004AA603320); 农业结构调整重大专项 (2003-08-04A); 国家科技攻关计划项目 (2004BA526B0101).

作者简介: 张俊儒 (1978-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种学研究. E-mail: vagrant_1780@163.com

通讯作者: 王清印. Tel: 0532-85822959. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

1.2 毒饵的制备

毒饵为经实验室投喂感染 WSSV 后的病死虾和养殖期间的染病虾样,通过巢式 PCR 检测确定为携带 WSSV 粒子。

1.3 人工攻毒感染实验

实验于 2004 年 9 月 26 日开始,感染组健康中国对虾雄虾 20 尾分养于 10 个盛有 10 L 水的整理箱(15 L)中,每箱 2 尾,中央用纱网隔开,每边 1 尾。每天早晚各喂 1 次毒饵,连续投喂 3 d。对照组中国对虾 4 尾,于暂养桶中饲养,投喂配合饵料。实验期间水体均充气,水温保持在 24 ℃。每天观察记录对虾发病情况,挑出濒死的中国对虾,取其精巢、输精管和精囊,分别分成 2 份。一份做巢式 PCR 检测,一份做电镜观察。实验持续 11 d。

1.4 巢式 PCR 检测 WSSV

利用巢式 PCR 技术检测感染组对虾、对照组对虾和胶南养殖基地发病雄虾的精巢、输精管和精囊。PCR 引物序列参照孔杰等^[8]方法,PCR 反应程序参照刘萍等^[9]方法。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,在 BIO-RAD 凝胶成像系统中观察拍照。

1.5 切片的制作及电镜观察

将濒死中国对虾捞出,立即取出精巢、输精管和精囊。精巢取出后置于滤纸上吸干血淋巴,转移至已灭菌的表面皿上,用 2 片锋利的刀片将其切成 1~2 mm³ 小块;输精管取出后置于表面皿上,将其从输精管中段切成 1~2 mm³ 小块;精囊中瓣状体和豆状体分开,分别取样。所有样品于 4 ℃ 下用 2.5% 的戊二醛电镜固定液固定 1 d。用 PBS 缓冲液漂洗样品 3 次,每次 10 min。再用 1% 的锇酸固定液固定 1 h,依前法漂洗。漂洗后样品经丙酮梯度系列脱水,EPON812 环氧树脂渗透包埋。在 Ultracut 型超薄切片机上将样品切成 50 nm 厚的超薄切片,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后在 JEOL-JEM-1200EX 型透射电镜下观察拍照。

2 结果

2.1 中国对虾雄虾感染 WSSV 的 PCR 检测结果

感染实验中,对照组不同组织均未检测出阳性的目的片段,感染组不同组织均检测出阳性的目的片段,但各组织部位感染情况各有不同,具体 PCR

扩增结果见图 1。

感染实验对照组 4 尾虾的性腺各部分(精巢、输精管和精囊)WSSV 检测均呈阴性(图 1-A)。感染组中,精巢样(图 1-B)有 8 尾对虾呈阳性;输精管样(图 1-C)有 9 尾呈阳性;精囊样(图 1-D)有 11 尾呈阳性。胶南养殖基地的发病虾样(♂)中,精巢呈阳性的有 11 尾,输精管呈阳性的有 13 尾,精囊呈阳性的有 14 尾。

性腺各部分感染 WSSV 情况统计(表 1)显示,受 WSSV 感染的精巢、输精管和精囊数目均不一样,其中精囊呈阳性的最多,输精管次之,精巢最少。在同一批次的感染实验中,同一尾雄虾的精巢、输精管和精囊的 PCR 检测结果比较发现,个别对虾的精囊、输精管和精巢检测结果不是一一对应的。

2.2 亲虾各组织感染 WSSV 的电镜观察

电镜观察结果(图版 I)显示,精巢、输精管和精囊中均有 WSSV 粒子的存在。从图版 I-1~4 中发现,在精巢内两相邻的生精小管之间的结缔组织中有 WSSV 粒子,而在其他部位未发现病毒粒子。在图版 I-1 中可以看到病毒粒子存在于生精小管外的海绵状结缔组织中(Cns);而在图版 I-3 中可以看到病毒粒子感染了两相邻生精小管之间的纤维状结缔组织(Cnf)。在图版 I-5 和图版 I-6 中,也发现在输精管管壁的结缔组织中有 WSSV 粒子,而在管壁的肌肉组织和上皮组织以及腔内各期的精细胞和分泌物中均未找到病毒粒子。从图版 I-6 中可以清楚地看到在分泌管道和输精管道之间的隔膜的结缔组织中有各期病毒粒子。对精囊的观察发现,在精囊膜和精囊内精荚膜中的结缔组织中也有病毒粒子,而在囊膜的肌肉组织及其精荚内的精子中均未发现有病毒粒子。

综上观察发现,不管是精巢、输精管和精囊,还是精囊内部的精荚,都能被 WSSV 粒子感染,这与巢式 PCR 检测结果相符。其中只有精巢、输精管和精囊的结缔组织细胞对 WSSV 粒子敏感。生殖细胞、横纹肌细胞和上皮细胞对 WSSV 均不敏感。也就是说在性腺组织中,其结缔组织是 WSSV 粒子发生的基质,WSSV 是通过感染中国对虾性腺的结缔组织而使性腺携带 WSSV 粒子的。

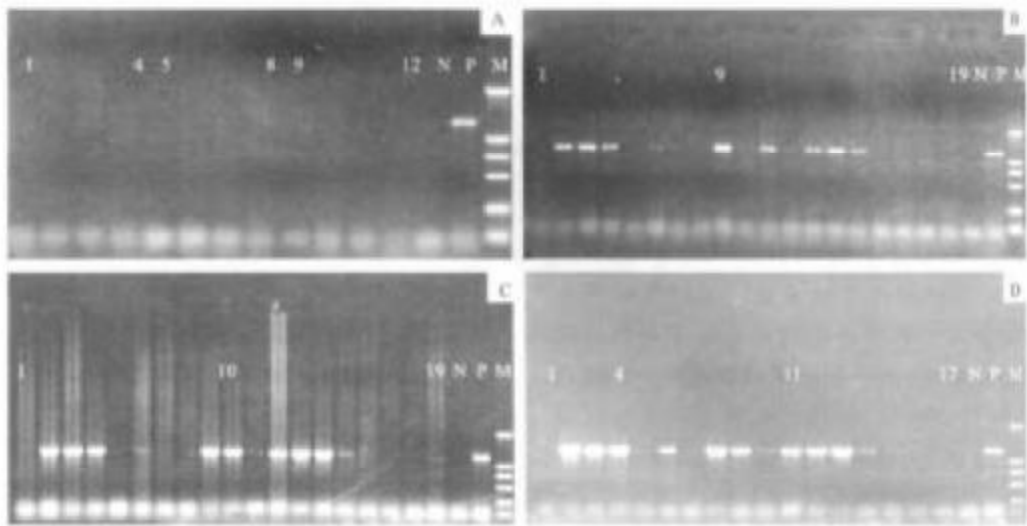


图 1 人工感染中国对虾的雄性生殖系统的 PCR 检测结果
M:DL2000 分子量标准;P:阳性对照;N:阴性对照。
A:未攻毒的对照对虾(1-4 为精囊样,5-8 为输精管样,9-12 为精巢样); B:攻毒对虾的精巢样;C:攻毒对虾的输精管样;D:攻毒对虾的精囊样。

Fig.1 PCR results of gonads of unchallenged and challenged *F. chinensis*
M: DL2000 Maker;P: Positive control;N: Negative control.
A:Unchallenged *F. chinensis*(1-4 Seminal vesicle,5-8 Vas deferens,9-12 Testis); B:Testes of challenged *F. chinensis*; C: Vas deferens of challenged *F. chinensis*; D:Seminal vesicle of challenged *F. chinensis*.

表 1 中国对虾雄性生殖系统感染 WSSV 的 PCR 检测结果

Tab.1 Results detected by nest PCR of male reproductive system of *F. chinensis* infected by WSSV

样 品	精 巢	输精管	精 囊	样 品	精 巢	输精管	精 囊	样 品	精 巢	输精管	精 囊
Sample No.	Teste	Vas deferens	Seminal vesicle	Sample No.	Teste	Vas deferens	Seminal vesicle	Sample No.	Teste	Vas deferens	Seminal vesicle
D01	-	-	-	G13	+	+	+	C09	-	+	+
D02	-	-	-	G14	+	+	+	C10	-	+	-
D03	-	-	-	G15	+	+	-	C11	+	+	+
D04	-	-	-	G16	-	-	-	C12	+	+	+
G01	-	-	-	G17	-	-	-	C13	-	-	+
G02	+	+	+	G18	-	-	-	C14	+	-	+
G03	+	+	+	G19	-	-	-	C15	+	+	+
G04	+	+	+	G20	-	-	-	C16	+	+	+
G05	-	-	-	C01	+	+	+	C17	-	-	+
G06	-	-	+	C02	-	-	-	C18	+	+	+
G07	-	-	-	C03	+	+	+	C19	-	-	-
G08	-	-	+	C04	-	-	-	C20	+	+	-
G09	+	+	+	C05	-	-	-	C21	+	+	+
G10	-	+	+	C06	-	-	-	C22	+	+	+
G11	+	-	+	C07	-	-	-	C23	-	+	+
G12	-	+	+	C08	-	-	-				

注:D为对照组;G为感染组;C为胶南养殖基地病死对虾;+ 为阳性结果;- 为阴性结果。
Note:D—Uninfected group; G—Infected group; C—Culture shrimps; “+”—Positive control; “-”—Negative control.

3 讨论

在感染 WSSV 的中国对虾精巢、输精管和精囊中均发现了 WSSV 粒子。说明 WSSV 能够感染中国对虾的雄性生殖系统, WSSV 存在着经雄性生殖系统感染而垂直传播给子代的可能, 这与 Lo 等^[2]大多数学者的研究结果一致。

在 WSSV 感染雄性生殖系统的特异性研究方面, 大多数学者只对各生殖腺的感染情况进行了研究, 并没有对精巢、输精管和精囊感染情况进行横向的比较。本研究对精巢、输精管和精囊感染情况横向比较发现, 精巢、输精管和精囊对 WSSV 的敏感性略有不同。其中, 精囊对 WSSV 的敏感性最高; 输精管次之; 精巢最低。对精巢、输精管和精囊进一步电镜观察发现, WSSV 只感染了中国对虾雄虾的精巢、输精管和精囊的结缔组织, 其他组织(包括精原细胞和各期的精细胞)均未发现有病毒粒子。这一结果说明, WSSV 对中国对虾雄性生殖系统的感染具有明显的组织特异性, 只感染性腺各组织的结缔组织细胞, 而对其他组织细胞不敏感。这与周化民^[10]在感染 WSSV 的斑节对虾雄性生殖系统中的研究结果一致。

研究中均未见到精母细胞、各期精细胞及成熟的精子中存在病毒粒子, 这与大多数研究者的结果一致。但是要确定雄性生殖细胞是否受 WSSV 感染, 还需要更多的证据来证实。因为电镜观察本身的局限性, 每次只能对样品的很小部分进行观察, 取样和定位的差别都会导致观察结果发生很大的差异。虽然在本实验中对样品的取材尽量考虑涵盖多种组织, 如输精管、近端、远端和中段的形态结构和组成都有所不同; 对输精管中段纵切取样样品涵盖了输精管管壁、输精管道、分泌管道及两管之间的隔膜。再如, 精囊中瓣状体和豆状体区别很大, 本实验中从精囊前端近输精管部纵切, 样品含有两者。因此, 整个实验中观察到的组织较多, 但这相对于整个

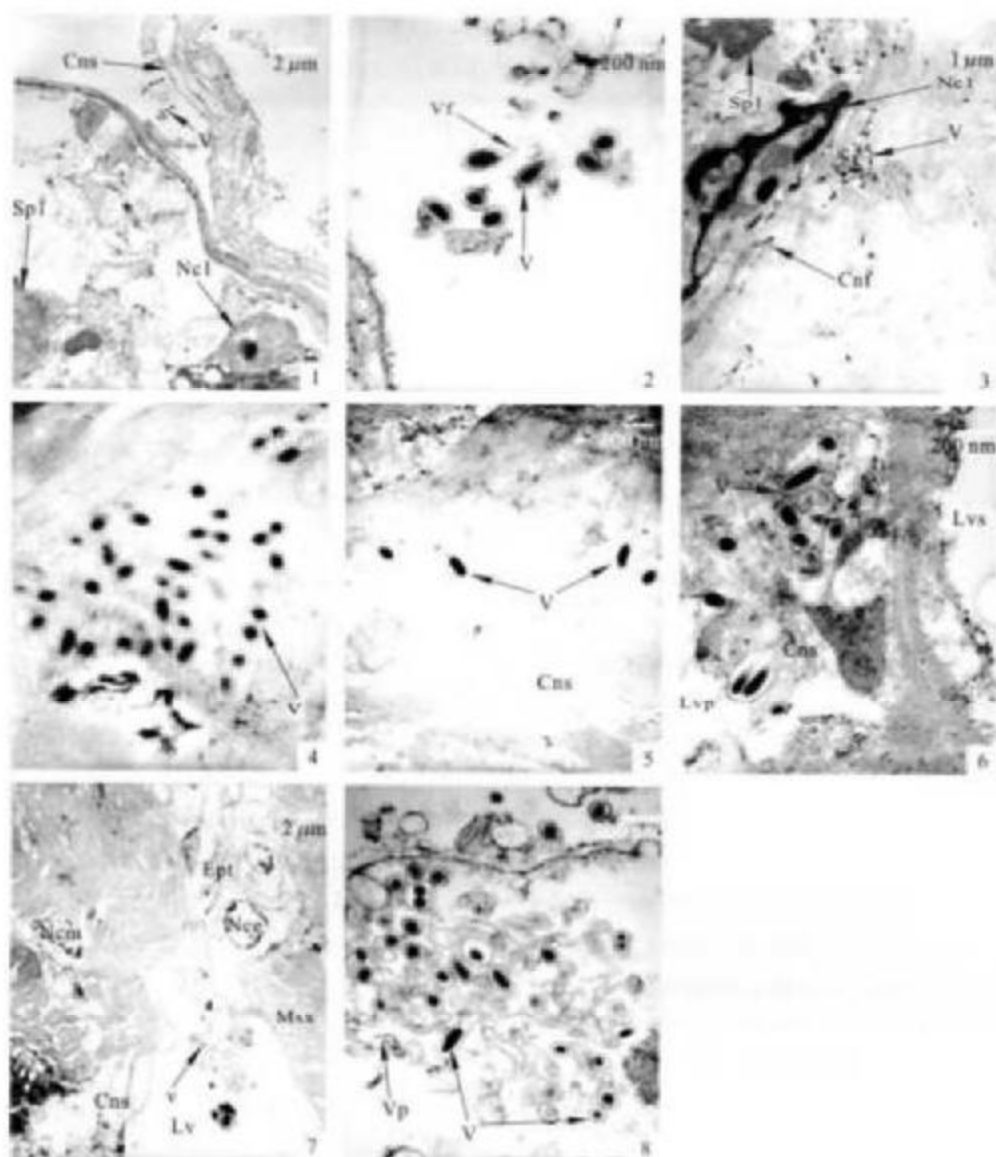
性腺来说, 仍然只是很小的部分。

有关 WSSV 对中国对虾雄性生殖腺感染的研究, 目前报道的不多。本研究用巢式 PCR 技术和电镜观察相结合的方法, 对中国对虾雄性生殖腺进行了系统的研究, 认为 WSSV 粒子能感染中国对虾的雄性生殖系统且对性腺感染存在着一定的组织特异性。这一结果对于 WSSV 能否通过感染的雄性生殖腺而传播给子代, 又是通过怎样的方式传播给子代等这些后续问题有着重要的意义, 还有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 应用原位杂交技术检测感染中国对虾和克氏原麦虾体内的白斑综合症病毒[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(3): 227-230.
- [2] Lo C F, Ho C H, Chen C H, Liu K F, et al. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSSV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J]. Dis Aquat Org, 1997, 30: 53-72.
- [3] 常青山, 包国民, 潘洁, 等. 海捕中国对虾杆状病毒的检测[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 263-266.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 江世贵, 戴少萍, 吕玲, 等. 对感染白斑综合症病毒的亲虾子代的跟踪检测[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 66-69.
- [7] 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.
- [8] 孔杰, 刘萍, 石拓, 等. 中国对虾杆状病毒一个 DNA 片段序列测定[J]. 海洋学报, 2003, 25(增刊 2): 186-189.
- [9] 刘萍, 孔杰, 孟克红, 等. 白斑综合症病毒(WSSV)在对虾养殖过程中传播途径的调查[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3): 9-12.
- [10] 周化民. 斑节对虾白斑综合症杆状病毒(WSSV)感染的组织特异性[J]. 徐州师范大学学报(自然科学版), 2000, 3(18): 54-56.

张俊儒等:感染白斑综合症病毒中国对虾雄性生殖系统的 PCR 检测与电镜观察
 ZHANG Jun-ru et al: Infection of WSSV in the gonad of *Fenneropenaeus chinensis*



图版 I

1:精巢小叶横切面;2:图1中病毒粒子部分放大图;3:精巢内部两生精小管间的纤维状结缔组织感染 WSSV 的情况;4:图版 I - 3 的局部放大图;5:中段输精管纵切面;6:中段输精管横切面;7:精囊近输精管端纵切面;8:图版 I - 7 的局部放大图。

注:Cnf—纤维状结缔组织;Cns—海绵状结缔组织;Ept—上皮细胞;Lv—精囊内腔;Lvp—输精管道;Lvs—分泌管道;Msc—横纹肌;Ncl—营养细胞细胞核;Spl—初级精母细胞;V—WSSV 粒子;VI—病毒粒子的鞭毛;Vp—正在装配的病毒粒子。

Plate I

1:Longitudinal view of the testis; 2:Enlarged view of the wssv particles of the testis; 3:Longitudinal view of the fibrous connective tissue in testis; 4:Enlarged view of the part of Plate I - 3; 5:Longitudinal view of the medial vas deferens; 6:Cross view of the medial vas deferens; 7:Longitudinal view of the terminal ampoule; 8:Enlarged view of the part of Plate I - 7.

Note: Cnf - the fibrous connective tissue; Cns - the spongy connective tissue; Ept - epithelial cells; Lv - lumen; Lvp - the large primary lumen; Lvs - the smaller secondary lumen; Msc - the thin sheath of circular muscle; Ncl - nurse cells; Spl - primary spermatocytes; V - WSSV particle; VI - the flagellum of WSSV particle; Vp - the immature WSSV particle.

Infection of WSSV in the gonad of *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Jun-ru^{1,2}, LIU Ping¹, WANG Qing-yin¹, LI Jian¹, LIU De-yue¹, KONG Jie¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 2666071, China; 2. College of Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In shrimps, the WSSV particles infection is characterized by a wide range of target tissues, including testis, ovary, follicle cells, oögonia, oocytes and connective tissue cells, etc.. Making sure of the gonad infected by WSSV is important to the vertical transmission of the white spot syndrome virus (WSSV). In this experiment, the adult males of *Fenneropenaeus chinensis* were artificially infected by WSSV through oral administration. To confirm the infection of WSSV in the gonads of shrimps infected by WSSV, a combine study was made using currently available tools, including polymerase chain reaction (PCR) and transmission electron microscopy (TEM). The tissue/organ samples detected included testis, vas deferens and seminal vesicle. The primary detecting results by nest PCR showed there existed certain tissue specificities on the different parts of the gonad (testis, vas deferens and seminal vesicle). The infected rate in the seminal vesicles infected by WSSV was the highest, while that in the vas deferens was less, and that in the testis was the least. The results of transmission electron microscope showed that the WSSV particles exclusively existed in the connective tissue of the testis, vas deferens and seminal vesicle, but didn't exist in the other germ cells. In addition, the WSSV particles were found in the connective tissue, which located between two testicular cords in the testis, the duct wall of the vas deferens, the inner membrane of the seminal vesicle and the spermatophores. In brief, the results of the nest PCR and the transmission electron microscope indicated that WSSV particles were able to infect the male reproductive system of *F. chinensis*, and there exist certain tissue specificities on the different parts of the gonad (testis, vas deferens and seminal vesicle). [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 263–268]

Key words: White Spot Syndrome Virus (WSSV); *Fenneropenaeus chinensis*; male reproductive system; nest PCR; transmission electron microscope

Corresponding author: WANG Qing-yin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn