

白斑综合症病毒(WSSV)的宿主调查^{*}

雷质文 黄¹⁾ 史成银 张立敬 俞开康¹⁾

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 青岛 266071)
(¹⁾青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

提要 用地高辛(DIG)标记的WSSV DNA 探针斑点杂交与原位杂交技术,在中国对虾、斑节对虾、南美白对虾、刀额新对虾、脊尾白虾、天津厚蟹、日本大眼蟹体内检测到了WSSV,它们是WSSV的天然宿主;在经人工感染的哈氏美人虾、短脊鼓虾、克氏原螯虾、肉球近方蟹、膝壶体内检测到了WSSV;在球形侧腕水母、病虾池的桡足类等浮游生物、卤虫无节幼体以及人工浸泡感染卤虫成体体内没有检测到WSSV。经原位杂交检测,虾类的甲壳下上皮、胃上皮、附肢、造血组织、鳃等组织器官均可被WSSV侵染,其中甲壳下上皮和鳃对WSSV敏感;蟹类的甲壳下上皮和鳃对WSSV敏感;在中国对虾、南美白对虾、脊尾白虾、注射感染的克氏原螯虾的精巢中,精英的结缔组织细胞和血细胞呈阳性,在中国对虾、脊尾白虾以及注射感染的短脊鼓虾的卵巢中,结缔组织细胞和滤泡细胞被WSSV感染。

关键词 白斑综合症病毒,核酸探针,宿主

中图分类号 Q789

白斑综合症病毒(WSSV)在已报道的所有对虾病毒中,毒力最强,危害最大,且其地域分布及宿主范围广泛(ightner, 1996; 雷质文等, 2000);到目前为止还不能完全控制对虾暴发病的疫情,人们只能采取措施进行综合预防,其中最重要的措施是尽早发现和消灭传染源,切断传播途径,因此,查清该病毒的宿主和传播途径,对于有效控制对虾暴发病的疫情有着十分重要的现实意义。本文用地高辛(DIG)标记的WSSV DNA 探针,采用核酸探针技术检测16种海洋生物,进一步调查WSSV的宿主,以期为其诊断、预防和控制提供一定的资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

短脊鼓虾 (*Alpheus brevicristatus* de Haan)、哈氏美人虾 (*Callinassa harmandi* Bouvier) 于1999年7月13日采自山东省乳山市邹格大坝潮间带;中国对虾 (*Penaeus chinensis* Osbeck)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、肉球近方蟹 (*Hemigrapsus sanguineus*)、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)、天津厚蟹 (*Helice tridens tientsinensis* Rathbun)、日本大眼蟹

^{*} 国家重点基础研究规划项目“对虾病毒病流行的细胞与分子学机理课题”资助, G1999012002号; 国家“九五”攻关项目“对虾病毒生态发病原因及检测技术研究子专题”资助, 96-005-03-01-02号。雷质文, 男, 出生于1969年8月, 硕士, 曾医师, 现工作单位: 中华人民共和国青岛出入境检验检疫局, 地址: 青岛市瞿塘峡路70号, 邮编: 266002

1) 通讯作者, 黄, E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

收稿日期: 2000-09-01, 收修改稿日期: 2001-10-15

(*Macrophthalmus japonicus* de Haan)、浮游生物(plankton)、球形侧腕水母(*Pleurobrachia globo*) 于 1998 年 8 月 12 日和 1999 年 7 月 13 日采自山东省乳山市第一养虾场病虾池; 南美白对虾(*Penaeus vannamei* Boone) 于 1999 年 10 月 3 日采自全国水产技术推广总站日照基地; 刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*) 于 1999 年 6 月 29 日采自河北省衡水对虾养殖池; 中国对虾仔虾于 1999 年 4 月 29 日采自山东省乳山市秦家庄育苗场; 卤虫(*Artemia*) 无节幼体于 1999 年 4 月 29 日采自山东省乳山市邹格育苗场; 卤虫成体于 1999 年 10 月 19 日采自青岛市东风盐场; 克氏原螯虾(*Procambarus darkii*) 于 1999 年 7 月 18 日购自青岛市南山市场; 藤壶(*Balanus* sp.) 于 1999 年 8 月 29 日采自青岛市第二海水浴场。

1.2 样品固定

对于中国对虾、斑节对虾、刀额新对虾、南美白对虾、脊尾白虾, 揭开鳃盖, 取鳃丝, 保存于 SEMP-Tris 采样液¹⁾中, 然后用洁净锋利的刀片将其头胸部切为两半, 把没有取鳃的一侧置于 Davidson's AFA 固定液(Bell *et al.*, 1988) 中固定。对于卤虫无节幼体, 取 0.3g 左右个体保存于 SEMP-Tris 采样液中, 再取 20g 左右个体固定于 Davidson's AFA 固定液中。对于侧腕球形水母、日本大眼蟹、天津厚蟹, 将其个体切为两半, 一半保存于 SEMP-Tris 采样液中, 另一半固定于 Davidson's AFA 固定液中。保存于 SEMP-Tris 采样液中的样品用于核酸探针斑点杂交; 固定于 Davidson's AFA 固定液中的样品 24h 后置于 70% 酒精中, 用于组织切片。

1.3 感染用病料的制备

取 2 只-70℃保存的人感染 WSSV 死亡的克氏原螯虾 2 只, 该虾经 WSSV 核酸探针斑点杂交证实为强阳性(魏静等, 1998)。称取 40 克除去头胸甲、附肢和肝胰腺的头胸部组织, 加入 100ml PPB(Huang *et al.*, 1999), 于 4℃充分研磨, 匀浆液按 1.5ml/支分装, 保存于 -20℃, 待作为浸浴用病料。

另取上述 1 只克氏原螯虾的头胸部, 称取 20g 除去附肢、肝胰腺以及头胸甲的组织, 加少量 PPB, 4℃研磨, 于 4℃离心 7000r/min 10min, 沉淀加等体积 PPB, 再次研磨和离心两次, 合并上清液, 铺于蔗糖梯度(25%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, W/W) 上, 20000r/min 4℃离心 4h, 取出梯度中的病毒条带用 5 倍体积 PPB 稀释, 于 4℃离心 20000r/min 1h, 沉淀悬浮于 150μl PPB 中, 分装(50μl/支)置于 -70℃保存, 待作为注射用病料。

1.4 人工感染

把采回的卤虫成体分养于 2 个 25 泡沫塑料箱中, 充气暂养 2 天后, 每 2 天向实验组中加入 1 支(1.5ml/支)浸浴用病料, 20 天后取出, 用自来水冲洗浸泡 10min。3 尾卤虫保存于 SEMP-Tris 采样液中, 20—30 尾卤虫固定于 Davidson's AFA 固定液中。

把克氏原螯虾置于有适量自来水的 $\phi 14\text{cm}$ 结晶皿中; 分别把短脊鼓虾、哈氏美人虾、肉球近方蟹置于有适量海水的 $\phi 14\text{cm}$ 结晶皿中。50 倍稀释注射用病料。从克氏原螯虾、短脊鼓虾和哈氏美人虾从第二腹节注射(15μl/只); 从肉球近方蟹螯基部注射(25μl/只)。死亡样品保存于 SEMP-Tris 采样液和 Davidson's AFA 固定液中。

从两块栖有藤壶的岩石上取 10 只藤壶保存于 SEMP-Tris 中后, 将岩石置于盛适量海

1) 史成银, 黄, 1998. 一种新型核酸探针采样液 SEMP-Tris(个人交流)

水的 6 泡沫塑料箱中, 暂养 2 天后, 每天加入 1.5ml 浸浴用病料, 10 天后对其中一块岩石上的藤壶进行注射感染(10 μ l/只), 继续投喂浸浴用病料, 第 20 天取出在自来水下冲洗 10min, 藤壶保存于 SEMP-Tris 采样液和 Davidson's AFA 固定液中。

1.5 组织切片制备

将 Davidson's AFA 固定的样品制备成厚度 5 μ m 石蜡切片, 分别展片于用 500 μ g/ml 多聚赖氨酸(Sigma, MW205000) 预包的载玻片(奥斯白等, 1998) 和用蛋白甘油预包的载玻片上, 42 $^{\circ}$ C 烘烤 30min。前者用于原位杂交, 后者进行常规 H-E 染色。中性树胶封片, 光镜观察并拍照。

1.6 核酸探针斑点杂交检测实验样品

按史成银等(1999) 和本实验室研制的“对虾暴发性流行病原核酸探针点杂交检测试剂盒(I 型)” 操作步骤, 用 PCR 法制备的地高辛(DIG) 标记 WSSV 核酸探针(雷质文等, 2001) 检测样品, 显色终止后, 晾干杂交膜, 在暗室用 50W 聚光灯透过膜进行观察照相, 根据杂交膜上点样斑点显色的强度定为“-”、“+”、“++”、“+++”、“++++” 5 个等级。

1.7 原位杂交

按 Bruce 等(1993) 的方法进行。组织切片经脱蜡、复水和蛋白酶 K 溶液(0.1mg/ml) 消化; 在 42 $^{\circ}$ C 湿盒中预杂交 30min; 湿盒内加变性核酸探针(30—50ng/ml), 40—42 $^{\circ}$ C 下杂交 16—18h; 用 2 \times SSC、1 \times SSC、0.5 \times SSC、Buffer I 漂洗组织切片; 加碱性磷酸酶联抗 DIG 抗体(B. M. in Germany); 用 Buffer I、Buffer III 漂洗玻片; 加 NBT、X-phosphate, 黑暗中显色; 组织切片依次通过蒸馏水、0.5% Bismark Brown Y、95% 酒精、纯酒精、二甲苯。中性树胶封片。制片在明视野显微镜下寻找蓝黑色到黑色细胞沉淀物并拍照。

每次实验以临床症状和病理变化明显并经本实验室所研制的“对虾流行病学核酸探针点杂交试剂盒(I 型)” 诊断为强阳性的中国对虾为阳性对照, 同时以健康中国对虾和克氏原螯虾为阴性对照, 相应样品未加入探针杂交和未加入地高辛抗体杂交为空白对照。

2 结果

2.1 人工感染结果

人工注射感染的短脊鼓虾、哈氏美人虾、克氏原螯虾及肉球近方蟹, 在本实验条件下 3—4 天内死亡, 发病初期无明显症状, 后期反应迟钝, 螯肢无力, 甲壳内面没有出现与 WSSV 感染对虾相似的白斑; 浸泡感染的卤虫和藤壶生活正常; 注射感染的藤壶在固定前, 一部分个体因注射或不适应养殖条件而死亡, 以经注射感染 10 天的活藤壶为实验材料。

2.2 核酸探针斑点杂交检测实验样品

感染 WSSV 发病的中国对虾、刀额新对虾、脊尾白虾及克氏原螯虾等显色最强, 天津厚蟹、日本大眼蟹、南美白对虾及短脊鼓虾等次之, 哈氏美人虾、中国对虾仔虾和经注射感染的藤壶显色较弱; 肉球近方蟹和病虾池尚未发病的斑节对虾有显色, 但很弱; 球形侧腕水母和浸浴感染的藤壶、卤虫、卤虫无节幼体以及发病虾池的桡足类等浮游生物在杂交膜上不显色(表 1)。

表 1 实验样品的感染方式及检测结果

Tab. 1 The results of infective way and diagnosis

样品种类	感染方式	斑点杂交	原位杂交
中国对虾(<i>P. chinensis</i>)	自然	++++	++++
仔虾(postlarval of <i>P. chinensis</i>)	自然	++	+
斑节对虾(<i>P. monodon</i>)	自然	+	+
短脊鼓虾(<i>Alpheus brevicristatus</i>)	注射	+++	++++
哈氏美人虾(<i>Callinassas harmandi</i>)	注射	++	+++
南美白对虾(<i>P. vannamei</i>)	自然	+++	++++
脊尾白虾(<i>Exopalaemon carinicauda</i>)	自然	++++	++++
刀额新对虾(<i>M. ensis</i>)	自然	++++	++++
克氏原螯虾(<i>Procambarus darkii</i>)	注射	++++	++++
天津厚蟹(<i>Helice tridens tientsinensis</i>)	自然	+++	++
日本大眼蟹(<i>Macrophthalmus japonicus</i>)	自然	+++	++
肉球近方蟹(<i>Hemigrapsus sanguineus</i>)	注射	+	+
藤壶(<i>Balanus</i> sp.)	注射	++	+
	浸浴	-	-
卤虫(<i>Artemia</i> sp.) 成虫	浸浴	-	-
卤虫无节幼体(nauplius of <i>Artemia</i> sp.)	自然	-	-
球形侧腕水母(<i>Plaurotachia globo</i>)	自然	-	-
桡足类等浮游生物(plankton)	自然	-	-

2.3 原位杂交检测实验样品

光镜下观察原位杂交的组织切片,感染 WSSV 的细胞核呈蓝黑色,颜色深浅指示细胞核内病毒数量,着色细胞核数量指示被感染的细胞数量。用甲壳下上皮组织作观察对象,着色细胞数超过该组织总细胞数的 1/2 者,定为“++++”,1/4—1/2 者定为“+++”,小于 1/4 但病灶明显者定为“++”,病灶不明显,只有很少着色细胞者定为“+”,没有观察到病变者定为“-”,以判断 WSSV 在样品体内感染的程度(表 1)及是否为 WSSV 的宿主。在中国对虾及其仔虾、斑节对虾、南美白对虾、刀额新对虾、脊尾白虾、天津厚蟹以及日本大眼蟹体内出现杂交阳性细胞(图 1a—k; 图 2d, e),说明他们是 WSSV 的天然宿主;在人工注射感染的短脊鼓虾、哈氏美人虾、克氏原螯虾、肉球近方蟹以及藤壶体内亦出现杂交阳性细胞(图 1l, m; 图 2a—c, f, g),说明他们可被 WSSV 感染,但不一定是 WSSV 的天然宿主;原位杂交检测浸泡感染的卤虫、卤虫无节幼体、发病虾池的桡足类等浮游生物以及球形侧腕水母,没有显示阳性信号(图 2h, i)。

2.4 病理组织切片和原位杂交的比较

WSSV 感染的中国对虾、斑节对虾、刀额新对虾、脊尾白虾、南美白对虾、哈氏美人虾、短脊鼓虾、克氏原螯虾等,病灶在甲壳下上皮、结缔组织、造血组织等组织中,病变胞核肿大,核内 H-E 染色着色深且均匀,染色质与核仁消失(图 1h', 图 2c')。原位杂交时这些病

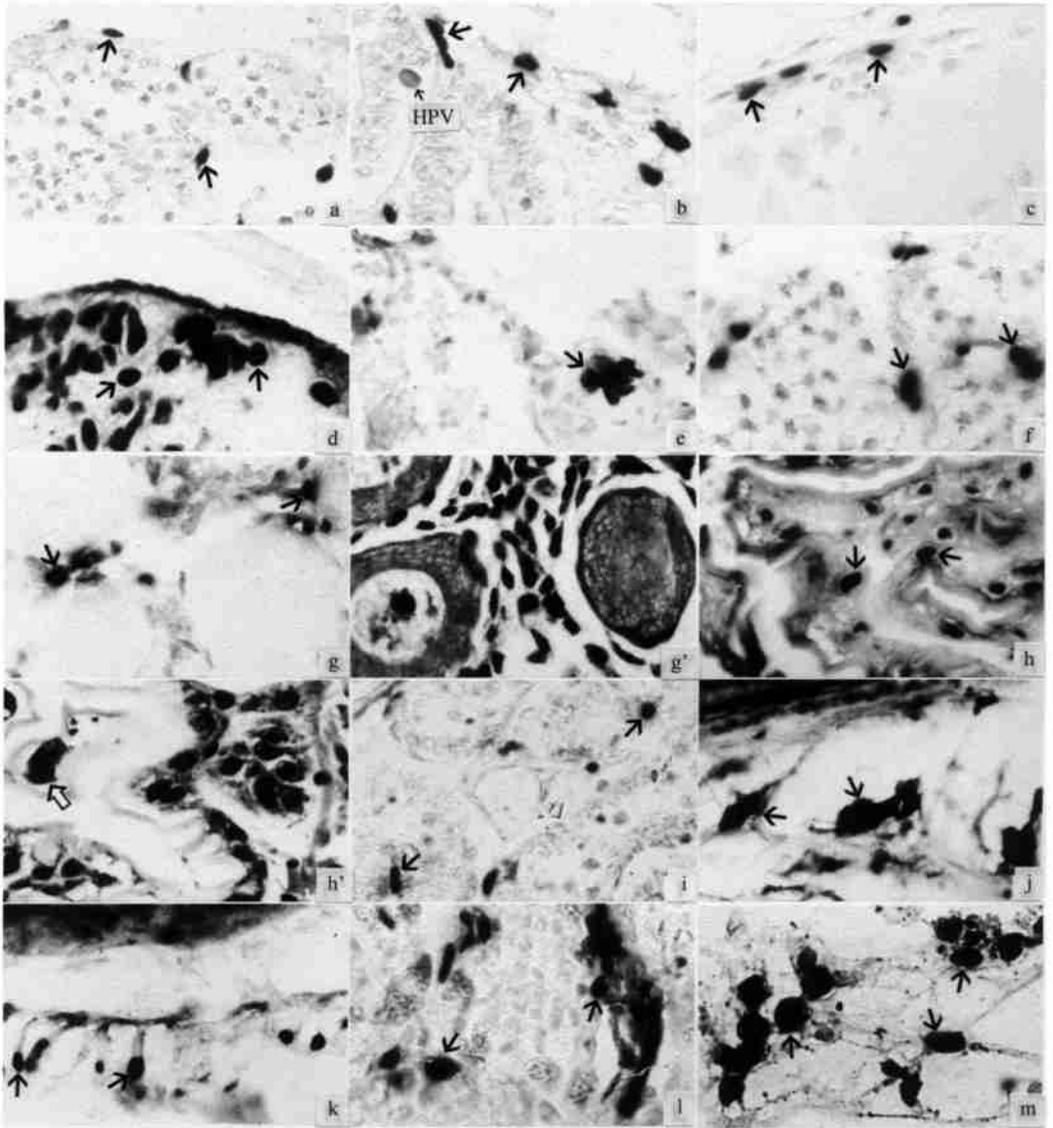


图1 WSSV 病灶的原位杂交(单一字母)和H-E染色(带'的字母)图(I)

Fig. 1 *In situ* hybridization (letter) and H-E staining (letter with ') of WSSV lesions (I)

各子图分别表示: 中国对虾的精巢(a)、肝胰腺(b)、卵巢(c)和胃上皮(d), 中国对虾仔虾的甲壳下上皮(e), 脊尾白虾的精巢(f)、卵巢(g, g')和胃上皮(h, h'), 南美白对虾的精巢(i), 刀额新对虾的甲壳下上皮(j), 斑节对虾的甲壳下上皮(k), 克氏原螯虾的精巢(l)和鳃(m)。“→”表示原位杂交阳性细胞(×400), “⇨”表示H-E染色阳性细胞(×400), 无箭头者表示H-E染色阴性细胞(×400)

变细胞显示强阳性反应(图 1e, h, j, k, m; 图 2b, c)。有些组织, 如脊尾白虾和短脊鼓虾的卵巢(图 1g', 图 2a'), 用常规H-E法难以区别正常与病变细胞, 而原位杂交可清楚显示感染情况(图 1g, 图 2a)。

根据原位杂交和病理组织制片的结果可以看出, WSSV 对虾蟹类的甲壳下上皮和造

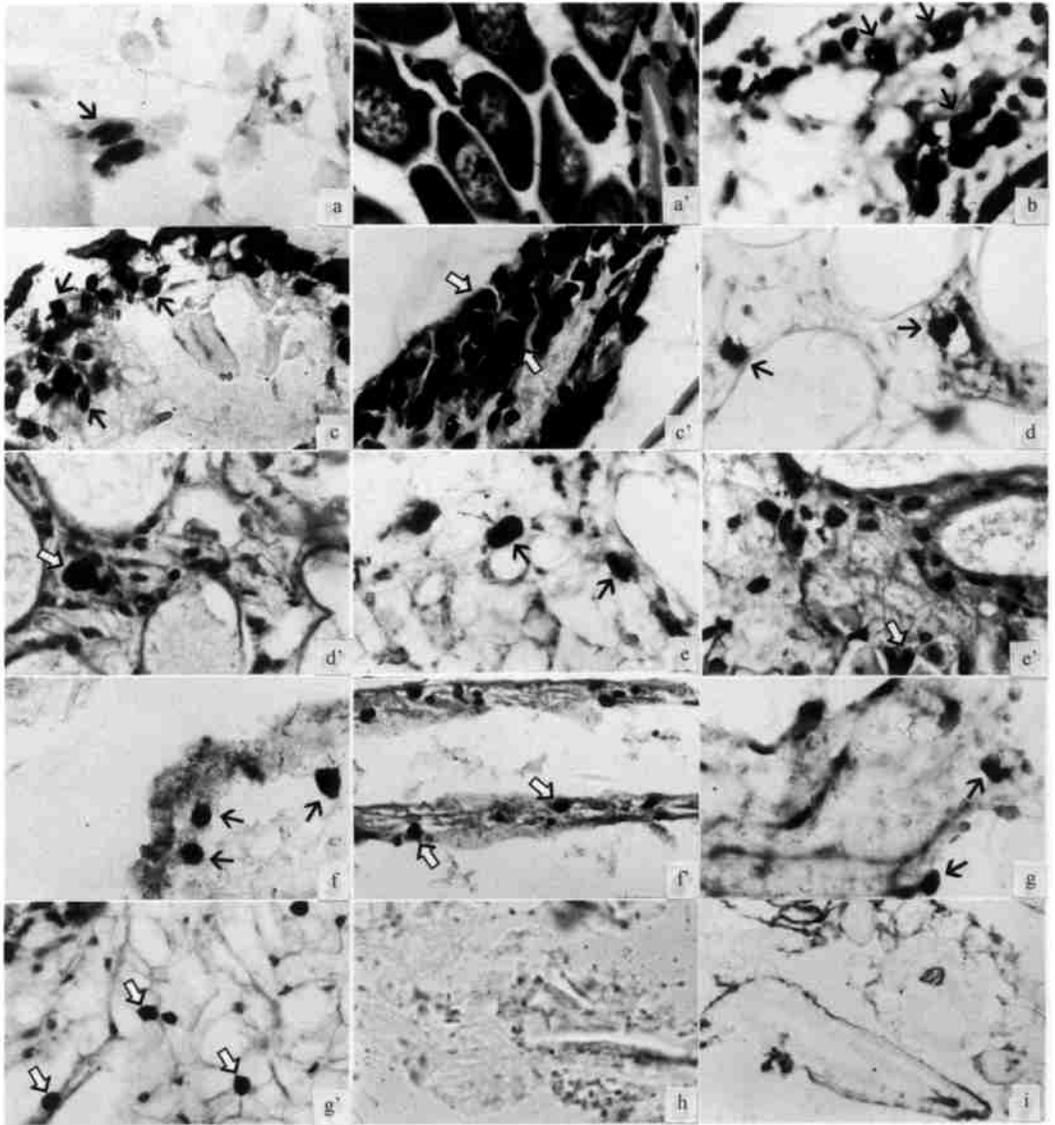


图 2 WSSV 病灶的原位杂交(单一字母)和 H-E 染色(带'的字母)图(II)

Fig. 2 *In situ* hybridization(letter) and H-E staining(letter with a') of WSSV lesions(II)

各子图分别表示: 短脊鼓虾的卵巢(a, a')和甲壳下上皮(b), 哈氏美人虾的甲壳下上皮(c, c'), 天津厚蟹的鳃(d, d'), 日本大眼蟹的鳃(e, e'), 肉球近方蟹的鳃(f, f'), 藤壶的结缔组织(g, g'), 卤虫成体(h), 卤虫无节幼体个体(i)。“→”表示原位杂交阳性细胞(×400), “↔”表示 H-E 染色阳性细胞(×400), 无箭头者表示 H-E 染色阴性细胞(×400)

血组织有较强的组织嗜性(tissue tropism), 其中甲壳下上皮细胞和血淋巴中的血细胞呈现最强的阳性反应(图 1d, h, j, k; 图 2b-f)。

在中国对虾及其仔虾切片中观察到 HPV 和 WSSV 的混合感染(图 1b), HPV 包涵体在 WSSV 探针原位杂交呈深棕色阴性反应, WSSV 感染呈典型阳性信号(图 1b, e), 统计 20 尾虾体内的 HPV 和 WSSV 的感染情况, 得出 HPV 感染的中国对虾仔虾的比率为 40%, 而

WSSV 感染的中国对虾仔虾的比率为 10%。

3 讨论与结语

3.1 组织病理切片与原位杂交的比较

自 1993 年以来,有关 WSSV 的很多研究是凭借组织病理学和电子显微镜的方法来获得的。这类方法可揭示 WSSV 复制位置、病变特征、病毒粒子及核衣壳的大小形态、致病性、宿主和传播途径(黄 等, 1995b; 姜静颖等, 1997; Nadala *et al*, 1998; 何建国等, 1999; Wang *et al*, 1999)。但这类检测或诊断技术的耗时长、操作繁琐、灵敏度低,不适于对大批样品进行流行病学调查。而核酸探针技术可弥补上述方法的某些不足,斑点杂交技术能测定样品带毒程度,此方法容易操作,仅需少量设备,一次可以对大量样品检测,可在条件一般的实验室进行(Lo *et al*, 1999; 史成银等, 1999)。原位杂交技术操作较复杂,但可灵敏、准确地定位病毒靶细胞,非常适于查验病毒的宿主和传播途径(Chang *et al*, 1996, 1998; Lo *et al*, 1997)。

本实验先用斑点杂交和组织病理学方法来初步确定样品带毒状况和病变程度,然后对典型样品进行原位杂交。比较原位杂交和 H-E 染色,虾类性腺被 WSSV 侵染后,细胞无明显病变现象,但是通过原位杂交后,可以精确而灵敏地确定它们已被 WSSV 侵染(图 1g, g'; 图 2a, a')。说明原位杂交可特异性地检测病毒早期及潜伏感染,其比以受染细胞核肿大为依据的 H-E 染色灵敏、准确、直观。

3.2 关于 WSSV 的宿主

南美白对虾、斑节对虾、日本对虾、墨吉对虾、长毛对虾、中国对虾、印度对虾、桃红对虾、蓝对虾、白对虾、褐对虾等大部分养殖对虾皆可被 WSSV 侵染(Lightner, 1996)。黄 等(1995a)用单抗 E ISA 还在浮游生物、海葵、糠虾、白虾、毛虾等动物中检测出 WSSV。Lo 等(1996)用 PCR 法在虾池的蟹(*Helice tridens*)、桡足类和昆虫(Ephydriidae)体内检出 WSSV。Richman 等¹⁾用电镜法在动物园养殖的淡水小龙虾(*Orconects punctimanus*, *Procambarus* sp.)体内发现 WSSV。魏静等(1998)首次证实 WSSV 可在克氏原螯虾体内增殖,且染毒克氏原螯虾与对虾组织病理学相似。

本实验结果表明, WSSV 可自然感染南美白对虾、脊尾白虾、中国对虾、刀额新对虾、斑节对虾、天津厚蟹、日本大眼蟹,说明以上生物是 WSSV 的宿主,此结果与 Lightner (1996)、Chang(1998)等人的实验结果一致;克氏原螯虾、肉球方蟹、哈氏美人虾、短脊鼓虾可被 WSSV 人工注射感染,它们是否是 WSSV 的天然宿主有待进一步研究。

何建国等(1999)用 PCR、生物检验(Bioassay)、组织病理和电镜技术在藤壶体内未检出 WSSV。本文实验中,在浸浴感染的藤壶体内未检出 WSSV,而在注射感染 10 天的藤壶体内可检出 WSSV,这提示 WSSV 可在藤壶体内复制,但自然条件下它不是 WSSV 宿主。

黄 等(1995a)用单抗 E ISA 在卤虫、桡足类等样品中检出 WSSV。本实验用浸浴法感染卤虫,原位杂交却未在其体内检出 WSSV;此外,用核酸探针斑点杂交在卤虫无节幼

1) Richman K, Montali R J, Nichols D K *et al*, 1997. A newly recognized fatal baculovirus infection in freshwater crayfish. Proc Am Assoc Zoo Veter (Personal communication)

体和浮游生物样品中未检测出 WSSV, 而用 PCR- 核酸探针斑点杂交可在卤虫无节幼体和浮游生物样品中检测出 WSSV(见另文发表), 原位杂交亦未观察到 WSSV 复制的病灶。卤虫和桡足类等生物在单抗 E ISA、斑点杂交、PCR 等检测中出现阳性的详细情况还有待进一步研究。

3.3 关于 WSSV 的垂直传播途径

o 等(1997)用 PCR 和原位杂交技术证实雄虾生精小管外围结缔组织、雌虾卵巢滤泡细胞、卵原细胞和初级卵母组织等可被 WSSV 侵染, 但在发育成熟的卵细胞中没有发现 WSSV, 推测被侵染的初级卵母细胞在发育成熟过程中被清除。包振民等(1997)用电镜发现亲虾卵巢内有 WSSV。江世贵等(2000)用病理制片、电镜、PCR 和原位杂交发现 WSSV 可感染斑节对虾亲虾卵母细胞及卵细胞。

本实验原位杂交结果表明, 中国对虾和短脊鼓虾卵巢滤泡细胞和上皮细胞内有 WSSV(图 1c, g; 图 2a), 在哈氏美人虾、克氏原螯虾、中国对虾精巢结缔组织细胞内有 WSSV(图 1a, f, i, l), 尚未观察到阳性精母细胞和卵母细胞, 这些证据仍然只能支持 WSSV 的垂直传播可能是虾苗在后天获得的观点。笔者认为患病亲虾后代的虾卵和无节幼体带毒与否, 是论证 WSSV 是否存在内源性垂直传播的突破口。

致谢 青岛海洋大学水产学院战文斌教授对本文悉心审阅, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 史成银, 宋晓玲, 黄 等, 1999. 核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV). 海洋与湖沼, 30(5): 486—490
- 包振民, 胡景杰, 姜 明等, 1997. 杆状病毒感染越冬亲虾(*Penaeus chinensis*)的研究——越冬亲虾感染及其垂直传播的可能性. 青岛海洋大学学报, 27(3): 437—351
- 江世贵, 何建国, 吕 玲等, 2000. 白斑综合症对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究. 中山大学学报(自然科学版), 39(增刊): 164—171
- 何建国, 周化民, 姚 泊等, 1999. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类. 中山大学学报(自然科学版), 38(2): 65—69
- 姜静颖, 李 霞, 李 华等, 1997. 无包涵体杆状病毒在中国对虾主要器官组织中的分布. 中国病毒学, 12(3): 270—277
- 黄 , 于 佳, 王秀华等, 1995a. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死的病原及其传播途径. 海洋水产研究, 16(1): 40—50
- 黄 , 宋晓玲, 于 佳等, 1995b. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究, 16(1): 1—10
- 雷质文, 黄 , 杨 冰等, 2000. 对虾病毒病的研究现状. 海洋水产研究, 21(2): 75—85
- 雷质文, 黄 , 2001. PCR 法快速制备地高辛标记的 WSSV DNA 探针斑点杂交检测 WSSV. 青岛海洋大学学报, 31(2): 201—210
- 魏 静, 陆承平, 黄 等, 1998. 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾. 南京农业大学学报, 21(4): 78—82
- 奥斯白 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 等著, 1998. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1—544
- Bell T A, ightner D V, 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, A. USA, 2—6
- Bruce D, Redman R M, ightner D V *et al*, 1993. Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using in situ hybridization. Dis Aquat Org, 17: 215—221

- Chang P-S, o G-F, Wang Y-C *et al.*, 1996. Identification of white spot syndrome associated (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis Aquat Org*, 27: 131—139
- Chang P-S, o G-F, Wang Y-C *et al.*, 1998. Detection of white spot syndrome associated virus (WSSV) in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, 164: 233—242
- Huang J, Song X- , Yu J *et al.*, 1999. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis*. *Methods in Cell Sci*, 21: 225—230
- Lightner D V, 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 304
- o G-F, Ho G-H, Peng S-E *et al.*, 1996. White Spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org*, 27: 215—225
- o G-F, Ho G-H, Chen G-H *et al.*, 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org*, 30: 53—72
- o G-F, Hsu H-C, Tsai M-F *et al.*, 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org*, 35: 175—185
- Nadala E C B Jr, oh P C, 1998. A comparative study of three different isolates of white spot virus. *Dis Aquat Org*, 33: 231—234
- Wang Q, White B , Redman R M *et al.*, 1999. Per os challenge *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Fafant penaeus duroraran* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 170: 179—194

INVESTIGATION INTO THE HOSTS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS(WSSV)

EI Zhi-Wen, HUANG Jie, SHI Cheng-Yin, ZHANG Ji-Jing, YU Kai-Kang

(The Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea

Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

Abstract Specimens of 16 aquatic species were examined by dot blot and *in situ* hybridization with DIG labeled WSSV DNA probe. WSSV positive cases were found in the native specimens of *Penaeus chinensis*, *Penaeus monodon*, *Exopalaemon carinicauda*, *Penaeus vannamei*, *Metapenaeus ensis*, postlarval *P. chinensis*, *Helice tridens tientsinensis*, and *Macrophthid japonicus*. Other positive cases were also observed by dot blot and *in situ* hybridization in the WSSV inoculum-injected crustaceans *Alpheus brevirostratus*, *Callinassa hamandi*, *Hemigrapsus sanguineus*, *Balanus* sp., and *Procambarus clarkii*. No positive case was found in the specimens of WSSV inoculum-soaked *Artemia*, native nauplii of *Artemia* and native *Pleurobrachia globe* by *in situ* hybridization. Contrasty WSSV infected lesions were present, as detected by *in situ* hybridization, in some tissues, such as gills, pleopods, stomach, and cuticular epidermis, of shrimps, gills and epithelium of crabs, and few cells in connective tissue of *Balanus* sp.. The epithelial cells and gills are the most sensitive to WSSV. In the spermary of *P. chinensis*, *P. vannamei*, *Exopalaemon carinicauda* and artificially infected *P. clarkii*, WSSV positive cells were located in the connective layers surrounding the seminiferous tubules and spermatophore according to *in situ* hybridization; WSSV positive cells were also found in the follicle cells and connective cells of the ovaries of *P. chinensis*, *E. carinicauda* and artificially infected *A. brevirostratus*.

Key words White spot syndrome virus(WSSV), DNA probe, Host