

我国一株新型黄头病毒的分子流行病学*

朱罗罗^{1,2} 张庆利^{1,3} 万晓媛¹ 邱亮^{1,2}
马芳^{1,2} 黄健^{1,2,3①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为查明黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)在我国的存在和变异情况,本研究采用世界动物卫生组织(OIE)《水生动物诊断手册》中 YHV 套式 RT-PCR 检测方法对 2012–2014 年采集的 299 份样品进行了 YHV 监测,并对部分 YHV 阳性样品基因进行了克隆测序及系统发育分析。流行病学调查显示,299 份样品中 YHV 的阳性率为 11%,我国养殖的中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾以及罗氏沼虾的部分样品中均检出了 YHV,中国明对虾和罗氏沼虾是本次调查中新发现的 YHV 自然宿主,而且 YHV 在中国明对虾中的检出率最高。对 6 份较强阳性样品 YHV 基因组 ORF1b 内 1002 bp 的分型片段进行克隆测序和序列分析,序列比对结果显示,阳性样品的 YHV 与国外报道的 YHV 的 6 个基因型相似度为 81.0%–90.5%;系统发育分析显示,6 份阳性样品归于同一分支,但与已知 YHV 的 6 个基因型均不在同一分支内,其与 YHV 基因 1 型(YHV-1)亲缘关系较近。对阳性样品 YHV 基因组 ORF3 内编码 gp116 蛋白的一段序列进行克隆测序,得出其序列长度为 509 bp,与 YHV-1a 的 545 bp、YHV-1b 的 383 bp 和 YHV-2 (即鳃联病毒 GAV)的 476 bp 均不同;依据该片段构建的系统发育树显示,6 份阳性样品归于同一分支,与 YHV 已知的 6 个基因型不同,与 YHV-1 亲缘关系较近,且与 YHV-1a 相似度大于 YHV-1b。对其中两份样品的 ORF2 序列进行比对显示,两份样品序列相似性为 99.8%,蛋白序列完全相同,与 YHV-1 的序列相似度为 85.9%,与 YHV-2 相似性为 80.9%。样品调查结果对增补 YHV 的宿主范围有重要意义;YHV 核酸检测和序列比对结果表明,感染我国养殖对虾的 YHV 为一种新的致病株型。

关键词 黄头病毒;新基因型;系统发育树;对虾;流行病学

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0068-10

黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)属于单链 RNA 病毒的套式病毒目、杆套病毒科、头甲病毒属(Cowley *et al.*, 2012)。黄头病毒群分为黄头病毒(YHV-1 型)、鳃联病毒(Gill-associated virus, GAV)(YHV-2 型)及其他至少 4 种基因型(YHV-3 型–YHV-6 型)(Wijegoonawardane *et al.*, 2009)。

2010 年起,越南、马来西亚、泰国和我国海南等地养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)相继出现不明原因的疫病,并导致较高的死亡率。目前,已经确定对虾早期死亡综合征能感染凡纳滨对虾、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等。Tran 等(2013)证实,一

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-47)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2014A06XK01)、山东省“泰山学者”建设工程专项经费、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。朱罗罗, E-mail: zhuluoluo666@163.com

① 通讯作者:黄健,研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-30, 收修改稿日期: 2015-06-05

种高毒力的副溶血弧菌是导致早期死亡综合征(EMS)或急性肝胰腺坏死病(AHPND)的病原。2012年在疑似EMS的中国明对虾样品中用PCR方法检测出了YHV(刘群等, 2014)。随后, 3年持续的流行病学监测表明, 我国沿海对虾养殖省市都存在YHV感染, 通过ORF1、ORF3部分序列的比对发现, 我国对虾中检出的YHV与现有YHV、GAV的基因型不同。这为我国对虾新发疫病的病原学研究提供了重要信息, 该结果也表明我国养殖对虾正面临着新的病害威胁。

研究者已报道了世界各地的患病对虾中YHV的6个基因型。根据刘群等(2014)发表的部分基因序列, 将此YHV的基因型编号为YHV-9。我国各地检出的YHV与这些已知基因型的YHV在进化上的亲缘关系如何, 感染的对虾种类和地区分布均尚无报道。本研究在流行病学调查及YHV-9基因测序的基础上, 对我国不同地区YHV样品ORF1、ORF2和ORF3序列与已知YHV株系的同源性进行分析, 以期阐明我国流行的YHV株系与已知YHV株系在进化上的关系, 丰富对YHV基因组变异和进化的认识, 为YHV的有效防治提供基础理论知识。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

2012–2014年从天津、河北、山东和浙江等地的对虾养殖场采集或送检的凡纳滨对虾、中国明对虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)等样品共计299份(表1)。用于核酸检测的样品采用RNALater保存或冻存于-80℃冰箱, 用于组织病理学检查的样品采用RNA

Friendly固定液(Hasson *et al.*, 1997)和Davidson's AFA固定液, 固定方法参考Lightner(1996)。

1.2 RNA的提取

取RNALater保存的或冰冻虾肝胰腺和鳃丝10–50 mg, 加入800 μl TRIzol试剂(Invitrogen)。用RNase-free研磨棒将样品匀浆, 加入160 μl 氯仿, 振荡混匀后室温静置15 min, 然后12000 r/min 4℃离心15 min, 取上层水相, 加入等体积异丙醇, 混匀后放置5 min, 12000 r/min 4℃离心10 min, 弃上清液, 于沉淀中加入1 ml 冰冷75%乙醇, 轻轻混匀, 静置5 min, 12000 r/min 4℃离心10 min, 沉淀晾干, 加入50 μl RNase-free水溶解, 经核酸蛋白测定仪(NanoDrop 2000, 美国)测定其浓度与纯度, 置于-80℃保存。

1.3 YHV的套式RT-PCR检测

1.3.1 cDNA的合成 根据世界动物卫生组织(OIE)《水生动物诊断手册》(OIE, 2012)推荐的YHV套式RT-PCR检测方法对样品进行检测。取2 μl样品模板, 加入50 μmol/L引物GY1和GY5(表2)各1.0 μl、0.5 μl 10 mmol/L dNTP和2.5 μl无RNase水, 混匀, 70℃反应5 min后, 置于冰上2 min, 向体系内加入2 μl 5×MMLV Buffer、0.5 μl 40 U/μl RNase inhibitor (TaKaRa)和0.5 μl 200 U/L MMLV反转录酶(TaKaRa), 42℃保温60 min, 72℃反应10 min, 以此合成cDNA作为模板。

1.3.2 第一步PCR反应 第一步PCR用25 μl反应体系, 含2.5 μl 10× Ex Taq PCR Buffer (Mg²⁺-free, TaKaRa)、1.5 μl 25 mmol/L MgCl₂、0.5 μl 10 mmol/L dNTP、50 μmol/L引物GY1和GY4各0.35 μl(表2)、0.25 μl 5 U/μl Ex Taq DNA聚合酶(TaKaRa), 85℃预热3 min, 加入1.0 μl cDNA, 18.55 μl ddH₂O。扩增反应程序为: 95℃ 30 s, 66℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环; 72℃ 7 min; 4℃保存。

1.3.3 第二步PCR反应 第二步PCR采用25 μl反应体系, 含2.5 μl 10× Ex Taq PCR Buffer (Mg²⁺-free, TaKaRa)、1.5 μl 25 mmol/L MgCl₂、0.5 μl 10 mmol/L dNTP、50 μmol/L引物GY2和Y3各0.35 μl(表2)、0.25 μl 5 U/μl Ex Taq DNA聚合酶(TaKaRa), 85℃预热3 min, 加入1.0 μl第一步PCR反应产物。扩增反应程序为: 95℃ 30 s, 66℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环; 72℃ 7 min; 4℃保存。反应产物于1%琼脂糖凝胶电泳, 并采用凝胶成像仪(培清JS-380)拍照。

1.4 ORF1b部分基因片段的扩增

根据Wijegoonawardan等(2008)和已测序YHV序列

表1 样品信息

Tab.1 The information of samples

省市 Province/city	2012	2013	2014
山东 Shandong	8	16	52
广东 Guangdong	7	9	10
浙江 Zhejiang	3	12	18
河北 Hebei	10	15	24
天津 Tianjin	3	7	3
江苏 Jiangsu	7	7	31
广西 Guangxi	/	6	6
海南 Hainan	/	15	8
辽宁 Liaoning	2	/	8
新疆 Xinjiang	/	6	/
福建 Fujian	/	1	4
湖南 Hunan	/	/	1
总计 Total	40	94	165

表2 PCR 扩增引物序列
Tab.2 Sequences of primers used in PCR amplification

引物 Primer ^a	序列 Sequence (5'-3')	产物大小 Size of product (bp)
GY1	GAC ATC ACT CCA GAC AAC ATC TG	794
GY4	GTG AAG TCC ATG TGT GTG AGA CG	
GY2	CAT CTG TCC AGA AGG CGT CTA TGA	
Y3	ACG CTC TGT GAC AAG CAT GAA GTT	
GY5	GAG CTG GAA TTC AGT GAG AGA ACA	277
1b-F1	CTT GAC AAG ATG GC	
1b-R1	ACT GTG AGT GTA GGA G	
1b-F2	CTA GCA YTC AAA CAT CAT CAA YAA YCA	
1b-R2	GAG ATG ATY TGR TKC TTG AAT TTC TG	1630
116-F1	CTA TCA ACG TGC YAC AAC ACA A	
116-R1	TGG AAT CTG CGT CAT GAT ACT CT	
116-F2	CCT ATT GCT AAA TCT TTC AT	
116-R2	GTG TAT TTG ATA GCC TGA GT	1002
P20-S	ACT TCT GCT AGC ATG AAC CGT CGT CCT CGC ACC GCC	
P20-A	ATT TAG CTC GAG TTA TGA TGT TTC CTC GGC TTC	
		1300
		509
		445

a: 检测引物参见 OIE《水生动物诊断手册》中 YHV 套式 RT-PCR 部分。Y=C/T; R=A/G; K=G/T

a: OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. World Organisation for Animal Health. 2012. YHV, RT-PCR. Y=C/T; R=A/G; K=G/T

(编号 20120706, 未发表)设计 ORF 1b 扩增引物(表 2)。

1.4.1 cDNA 的合成 所用反转录的引物为 10 μmol/L 1b-F1/R1(表 2), 其余操作方法与 1.3.1 相同。

1.4.2 第一步 PCR 反应 第一步 PCR 反应采用 25 μl 反应体系, 含 2.5 μl 10×LA *Taq* PCR Buffer (Mg²⁺-free, TaKaRa)、2.5 μl 25 mmol/L MgCl₂、4.0 μl 10 mmol/L dNTP、10 μmol/L 引物 1b-F1/R1 各 0.5 μl (表 2)、0.25 μl 25 U/μl LA *Taq* DNA 聚合酶, 1.0 μl cDNA, 13.75 μl ddH₂O。扩增反应程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s、46℃ 30 s、72℃ 100 s, 30 个循环; 72℃ 7 min; 4℃ 保存。

1.4.3 第二步 PCR 反应 第二步 PCR 反应体系与第一步相同, 取 1.0 μl 第一步 PCR 产物作为模板, 引物为 1b-F2/R2 (表 2) (10 μmol/L)。扩增反应程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 7 min, 4℃ 保存。反应产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并采用凝胶成像仪拍照。

1.5 ORF3 部分基因片段的扩增

根据 Gangnonngiw 等(2009)和 Senapin 等(2010)以及已测序 YHV-9(20120706)序列(未发表)设计 ORF3 扩增引物(表 2)。

1.5.1 cDNA 合成 方法参照 1.3.1, 引物为 116-F1/R1 (表 2)。

1.5.2 套式 RT-PCR PCR 反应体系参照 1.4.2, 第一步扩增反应中, 引物为 116-F1/R1 (表 2), 扩增反

应退火温度为 55℃, 其余扩增反应参数与 1.4.2 中反应程序相同。第二步扩增反应中, 引物为 116-F2/R2 (表 2), 退火温度为 50℃, 扩增 35 个循环, 其余扩增反应参数与 1.4.3 相同。反应产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并采用凝胶成像仪拍照。

1.6 ORF 2 片段的扩增

根据 Wijegoonawardan 等(2008)和已测序 YHV-9 (20120706)序列(未发表)设计引物(表 2)。

cDNA 合成参照 1.3.1, 引物为 p20-S/A (表 2)。PCR 反应体系与 1.4.2 相同扩增反应, 退火温度为 60℃, 扩增 35 个循环, 其余扩增反应参数与 1.4.3 相同。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 DNA 的回收和连接转化

采用胶回收试剂盒(QIAGEN)回收电泳后的 PCR 扩增目的产物片段, 按照试剂盒说明书操作, 加 10 μl 无菌水, 溶解后离心, 取 2 μl 胶回收产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 取条带明亮、单一的样品进行连接转化。NanoDrop 2000 测定浓度, 取 pMD18-T 载体(TaKaRa) 1 μl, 胶回收产物(0.1–0.3 pmol) 4 μl, Solution I 5 μl, 16℃ 连接 30 min, 置于冰上, 加入 50 μl *E. coli* DH5α 感受态细胞, 冰浴转化 30 min, 于 42℃ 热激 45 s, 置于冰上 2 min, 接入 LB 液体培养基于 37℃ 摇床培养。

1.8 挑取单克隆菌落及菌落 PCR

摇菌 1 h 后, 取 50 μ l 菌液涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板, 倒置培养 16 h 后, 挑取单克隆, 每个样品挑选 10 个平行于含 Amp 的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 培养, 2 h 后取 2 μ l 作为模板进行菌落 PCR。体系与 1.3.2 相同, 加入 10 μ mol/L 通用引物 M13-47 和 RV-M 各 0.5 μ l, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。反应产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 挑选 3 份平行的单克隆样品至上海生工生物工程有限公司测序。

1.9 序列比对和系统发育分析

采用 Bioedit 软件对核酸序列进行拼接、比对, 采用 Geneious 软件进行多序列比对分析, 并构建 NJ 系统发育树。

2 结果

2.1 阳性样品 RT-PCR 检测结果

299 份样品两步法共检出阳性样品 33 个, 有 6 份样品第一步 RT-PCR 产物电泳就能出现明亮的 794 bp 的目的条带(图 1-a, b), 其中, 两份来自山东的中国

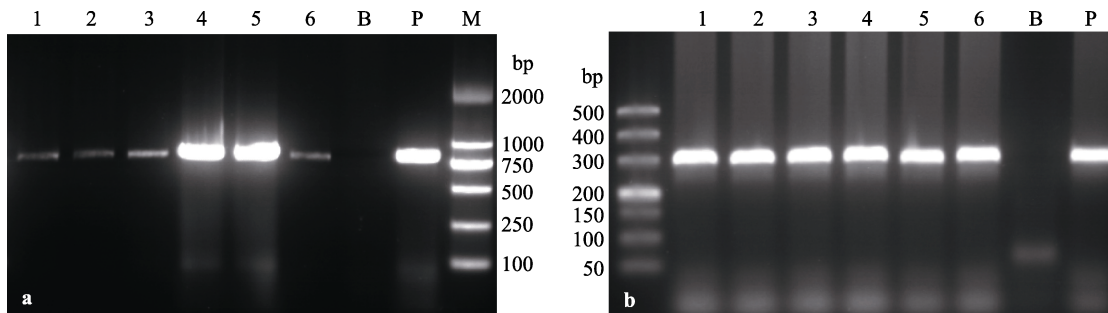


图 1 YHV 套式 RT-PCR 检测结果
Fig.1 Results of nested-RT-PCR of YHV

a: 样品第一步 PCR 结果 Result of first-step PCR; b: 样品第二步 PCR 结果 Result of second-step PCR
M: Marker; B: 空白对照 Blank control; P: 阳性对照 Positive control; 1: 20130301-ZJ; 2: 20130902-JX; 3: 20120706-TH; 4: 20140707-JM; 5: 20121018-JM; 6: 20120628-HG

明对虾样品阳性强, 其他 4 份样品阳性较弱。6 份样品编号分别为 20130301-ZJ(广东, 凡纳滨对虾)、20130902-JX(浙江, 罗氏沼虾)、20120706-TH(河北, 中国明对虾)、20140707-JM(山东, 中国明对虾)、20131018-JM(山东, 中国明对虾)和 20120628-HG(天津, 凡纳滨对虾)。

2.2 YHV 的流行病学调查

对来自辽宁、河北、天津、山东、江苏、浙江、福建、广东、广西、海南等省市的凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、罗氏沼虾、斑节对虾、脊尾白虾、克氏原螯虾、梭子蟹、卤虫等样品进行了套式 RT-PCR 检测。结果显示, 在凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾和罗氏沼虾部分样品中检测到 YHV 阳性, 其中, 中国明对虾的阳性检出率最高, 21 份样品中有 11 份为阳性, 185 分凡纳滨对虾中有 13 份为阳性(图 2)。在 2.1 中的 6 份第一步 RT-PCR 样品中, 有 3 份是中国明对虾, 提示 YHV 可能对我国中国明对虾养殖存在严重风险。

从阳性样品的分布地区来看, 我国沿海省市均检出

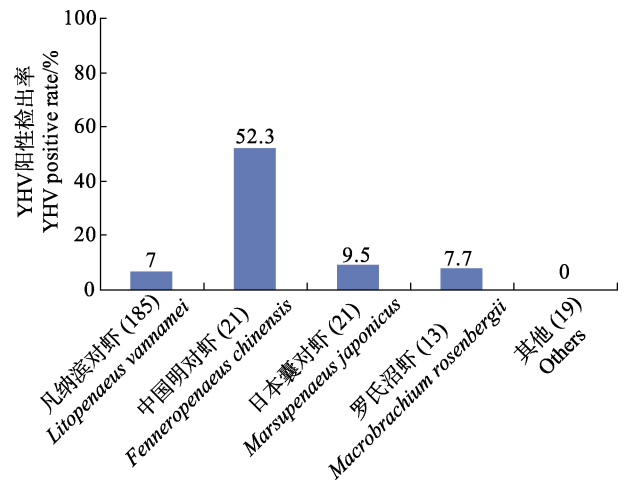


图 2 YHV 在不同宿主样品中的检出情况 (2013.03-2014.12)

Fig.2 Detection of YHV in different hosts (March 2013–December 2014)

括号内为检测样品总数, 其他包括斑节对虾、脊尾白虾、克氏原螯虾、梭子蟹、卤虫等

The number in parentheses is the total number of samples. "Others" includes *Penaeus monodon*, *Palaemon carinicauda*, *Procambarus clarkia*, Portunidae and *Artemia* sp. etc

YHV 阳性样品,新疆也检出 YHV 阳性样品,说明 YHV 在我国已经广泛蔓延(表 3)。YHV 虽然在我国多个省市检出,但作为主要养殖品种的凡纳滨对虾检出率低于平均水平且样品多采集健康状态不佳的对虾,其他品种受采样数量等因素的影响,实际检出率可能更低。

2.3 ORF1b、ORF3 部分片段和 ORF2 片段的序列分析

对上述 6 份阳性样品 ORF1b 部分片段第二步扩

增所得的 1002 bp 产物进行测序。其序列与 YHV 已知 6 个基因型 24 份样品的 ORF1b 片段进行多重序列比对,结果显示,6 份样品的 ORF1b 序列长度与 YHV-1 的相同,比 YHV-2-YHV-6 少 3 bp。6 份样品间差异很小,相似度为 97.6%-98.5%。6 份样品共有序列与 YHV-1-YHV-6 型共有序列相似度为 90.5%-80.9%,与 YHV-1 相似度较高(图 3)。

6 份样品 ORF3 片段套式 PCR 扩增目的条带经测

表 3 不同省市的样品中 YHV 检出情况(2012.05-2014.12)

Tab.3 Detection of YHV in samples from different provinces and cities (May 2012-December 2014)

省市 Province/city	样品总数 Total sample number	阳性样品数 Positive sample number	阳性检出率 Positive sample percentage (%)
山东 Shandong	76	9	13
广东 Guangdong	26	1	4
浙江 Zhejiang	38	3	8
河北 Hebei	49	7	14
天津 Tianjin	13	2	15
江苏 Jiangsu	50	5	10
广西 Guangxi	12	2	17
海南 Hainan	23	1	4
辽宁 Liaoning	10	1	10
福建 Fujian	5	1	20
湖南 Hunan	1	0	0
新疆 Xinjiang	6	1	17

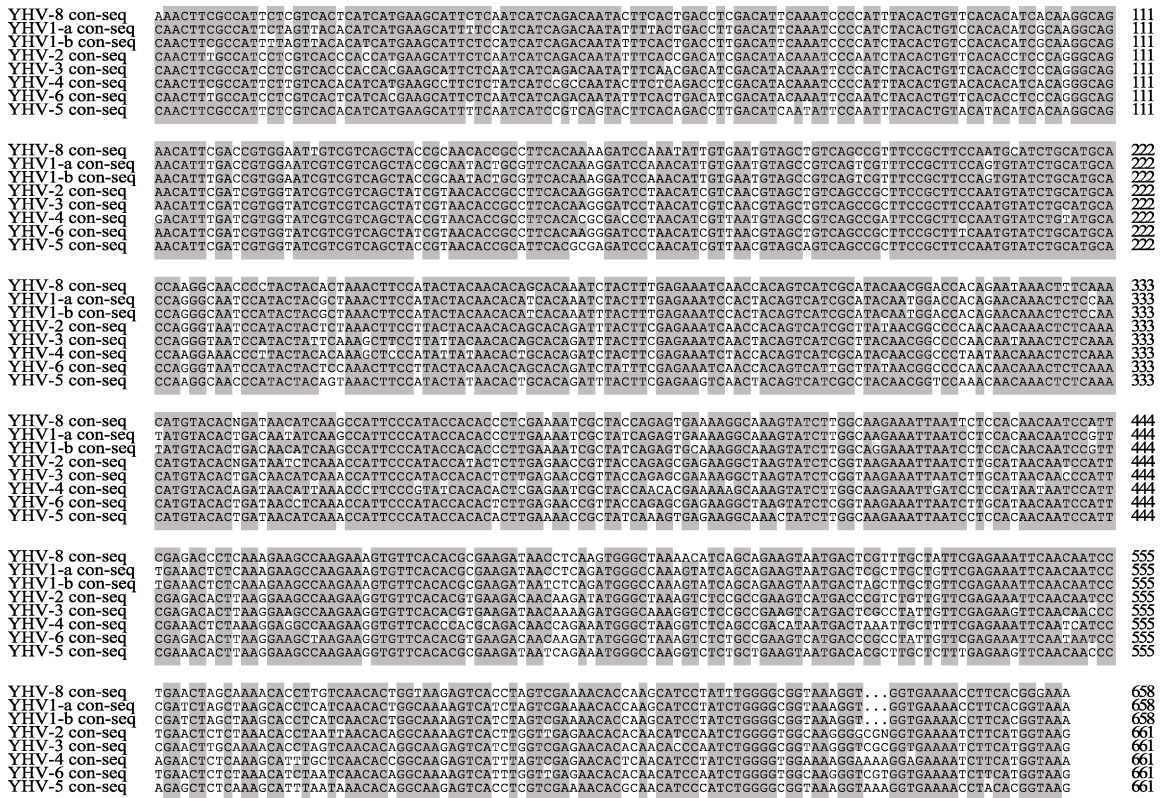


图 3 ORF1b 片段共有序列比对

Fig.3 Alignment of ORF1b fragment consensus sequence

YHV-8 con-seq	CCTATTGCTAAATCTTTCATCAGTCTTGTTCCTCAAACTGAAACATCATGGAACAACGAACTGAAACCGGACAGACCAGCTTGGCTCACGA	95
YHV-1a con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCAAACTGAATATATCATGGAACAGTCAAACTGAAAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-1b con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCAAACTGAATATATCATGGAACAGTCAAACTGAAAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-2 con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCCCTAACTGAACACATCTTGGAAACAACGAACTGAAAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-3 con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCCAACTGAACACATCTGGAACAACAACGAAACCGATTAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-4 con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCCCTAACTGAACACATCTGGAACAACAACGAAACCGATTAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-5 con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCCCTAACTGAACACATCTGGAACAACAACGAAACCGATTAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-6 con-seq	CCTATCGCTAAATCTTTCATCTCTTCATGCTTCCCTAACTGAACACATCTGGAACAACAACGAAACCGATTAAGGCCAAGTCACTGTTGCCATGA	95
YHV-8 con-seq	CCGTCATCGGCTCAGACCAACAAGCTGCTACTCTATTTAACTCCAGCTTCAACCTCTTAGTCATTGGACTCTTTCATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-1a con-seq	TAGACATAAGCTCAGACCAACAAGTGGCCATCTATTTCAACTCCACTTTCATCTCTTAGTCATTGGACTCTTTCATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-1b con-seq	TAGACATAAGCTCAGACCAACAAGTGGCCATCTATTTCAACTCCACTTTCATCTCTTAGTCATTGGACTCTTTCATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-2 con-seq	TGGGATAGACTCGGGCCAACAAGTGGTATCTATCTTCAACAGATCACTTAAATTTGCTTCAATATCTCTCTCAATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-3 con-seq	CGGGATAGACTCGGGCCAACAAGTGGTATCTATCTTCAACAGATCACTTAAATTTGCTTCAATATCTCTCTCAATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-4 con-seq	CGGGATAGACTCGGGCCAACAAGTGGTATCTATCTTCAACAGATCACTTAAATTTGCTTCAATATCTCTCTCAATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-5 con-seq	CGGGATAGACTCGGGCCAACAAGTGGTATCTATCTTCAACAGATCACTTAAATTTGCTTCAATATCTCTCTCAATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-6 con-seq	TGGCATAGACTCGGGCCAACAAGTGGTATCTATCTTCAACAGATCACTTAAATTTGCTTCAATATCTCTCTCAATCTCTCTGTTTCTTCA	190
YHV-8 con-seq	TCACTCCAGCAATTCGCTAAACT.....AAACCAGCCATCAAATCTCC....CCATGTTCTCTCGAAGCGGCC	256
YHV-1a con-seq	TCACTCCGCTCTTCGGCAGCATTTCAAGTGAATTTCTGAAAAGACAAGTCAGTCCCTCATGGCTCC....CCACGTACTTTTTGAGGCCGGCC	280
YHV-1b con-seq	TCACTCCGCTCTTCGGCAGCATTTCAAGTGAATTTCTGAAAAGACAAGTCAGTCCCTCATGGCTCC....CCACGTACTTTTTGAGGCCGGCC	236
YHV-2 con-seq	TCAACCCAGCTTTGCTTA.....AGGAGCT.....GAAACATTAATTTCAAGCAATC	238
YHV-3 con-seq	TCACTCCGAGCTTTGCTTAGCACAAC.....AATGAACCC.....AACATTCCTCAGCTAATC	247
YHV-4 con-seq	TCAACCCAGCTTTGCTTA.....AGGAGCT.....GAAACATTAATTTCAAGCAATC	238
YHV-5 con-seq	TCACTCCGAGCTTTGCTTAGCACAAC.....AATGAACCC.....AACATTCCTCAGCTAATC	231
YHV-6 con-seq	TCAACCCAGCTTTGCTTA.....AGGAGCT.....GAAACATTAATTTCAAGCAATC	238
YHV-8 con-seq	AACC...CGAG...CCTTCCGACTCGGTTACATGGGCTGC.CAATGGTACTGTTCTGTAAATAACCCAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	344
YHV-1a con-seq	AACCAACTGAG...CCTCCAGACTGCATCCATTTGGGCTGC.TAATGGTACTGTTCTGTAAATAACCCAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	371
YHV-1b con-seq	AACCAACTGAG...CCTCCAGACTGCATCCATTTGGGCTGC.TAATGGTACTGTTCTGTAAATAACCCAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	236
YHV-2 con-seq	ACAC...TGAA...CCTTACGACTGCATGTTTGGGCTGC.AAATGGCAGCTGATCATGTAACGCCACAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	326
YHV-3 con-seq	TTCA...AGAG...CCAGCAGACTGTCACATTTGGGCTGC.TAGCGTTCGCTGATGCAATTTCCAGCAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	335
YHV-4 con-seq	ATAC...TGAA...CCAGCAGACTGTCACATTTGGGCTGC.AAATGGGATTTGTTATTTGTAAGGACACCAACTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	326
YHV-5 con-seqCCATCAGACTGTCATGTTTGGGCTGC.TAATGGCAGCTGTTCTGTAAATAACCCAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	311
YHV-6 con-seq	ACAC...TGAA...CCTTACGACTGCATGTTTGGGCTGC.AAATGGCAGCTGATCATGTAACGCCACAATTTGGATTTGGAGTGAACCAAGTTCA	326
YHV-8 con-seq	AAATCAATGTCCAATCTTTGCAACACCTCTCTTC.....TTCTCTCCACCACTAGTCTCTCAACATCCAAGGATCTGTCAACGCTT	430
YHV-1a con-seq	AACCTTTTGTCTCAAACTGTAAACACATCATCTCCCACTACAACCTCTTCGCCACACAATCTCTTCCGCTCTTCCACTCTCTTCTAGTGAACGCGG	466
YHV-1b con-seq	AACCTTTTGTCTCAAACTGTAAACACATCATCTCCCACTACAACCTCTTCGCCACACAATCTCTTCCGCTCTTCCACTCTCTTCTAGTGAACGCGG	304
YHV-2 con-seq	ACATCTCTGCCCACACACATGCAAT.....ATCATCTCCCACTACAACCTCTTCCTACTACACAATCCCTTCCGCTCTTCCACTCTCTTCTAGTGAACGCGG	397
YHV-3 con-seq	AGAGGCTCTGCAATCAGATGTAAT.....CAGGGCAGATCAGCAGCACCACCCCACTAGAGGCCCAAAATTTCAA	406
YHV-4 con-seq	ACATCTTTGCCCACACACATGCAAT.....GTGGCAGCAGCAGC.....CAGCAGCTTCCAAACATTA	388
YHV-5 con-seq	AAGTCTCTGCCCACACACATGCAAT.....CATCACAAGCACAAGAGGCCCACTTACACTACAACCTTCCAGTA	394
YHV-6 con-seq	ACATCTCTGCCCACACACATGCAAT.....CAGGGCAGATCAGCAGCACCACCC...CATAGAGCCCAAAATTTCAA	394
YHV-8 con-seq	CCAACCCCTTGCAATTGAACAGGATTCGGATGGCTGTTATGACTATCTTCTGCTATAAATCTTCTAAACTCACTCAGG	508
YHV-1a con-seq	ATAATCCTTGTGTTGCACAGGACGATGCCGTTGTTACAGCTATCTTAATGACTATGACGAATCAAAAACGTACACAAAG	544
YHV-1b con-seq	ATAATCCTTGTGTTGCACAGGACGATGCCGTTGTTACAGCTATCTTAATGACTATGACGAATCAAAAACGTACACAAAG	382
YHV-2 con-seq	CATCTCCGATGCTCCGAGACGATTTCAACCGGATGCTTTAAATATCTTTATGATTACAGCGAATCTAAATTAACACAGC	472
YHV-3 con-seq	CTACCCAGATGTCAGCTGAAGATTTCAACAGGTTGTTTGAATATCTTTATGATTATGATGAAATCAAAGTAAACACAGC	484
YHV-4 con-seq	CATCTCCGATGCTCCGAGACGATTTCAACCGGATGCTTTAAATATCTTTATGATTATGATGAAATCAAAGTAAACACAGC	466
YHV-5 con-seq	GTAACCCCTTGTGTTATCTCAGGATGAAGTCCGTTGTTTCAACTATCTCAATTAAGTATGACGATTCGAAAACGGACACAG	472
YHV-6 con-seq	CATCTCCGATGCTCCGAGACGATTTCAACCGGATGCTTTAAATATCTTTATGATTACAGCGAATCTAAATTAACACAGG	472

图 4 ORF3 片段共有序列比对
 Fig.4 Alignment of ORF3 fragment consensus sequence

序显示, 产物大小为 509 bp, 与 YHV-1a 545 bp、YHV-1b 383 bp、YHV-2 476 bp 均不同。序列与 YHV 已知 6 个基因型 20 份样品进行多重序列比对显示(图 4), 6 份样品间相似度为 97.2%–99.4%。6 份样品共有序列与 YHV-1a、YHV-1b、YHV-2、YHV-3、YHV-4、YHV-5 和 YHV-6 型共有序列的相似度分别为 67.9%、63.2%、62.5%、60.8%、62.8%、62.5%和 62.1%, 相似度均较小。

两份样品 ORF2 的套式 PCR 扩增目的条带经测序得到 445 bp 产物序列, 共编码 144 aa, 与 YHV-2–YHV-5 型长度相同, 比 YHV-1 型(146 aa)短。多重序列比对结果显示(图 5), 两份样品序列相似性为 99.8%, 蛋白序列完全相同, 与 YHV-1–YHV-4 共有序列相似度分别为 85.9%、80.7%、80.6%、82.4%, 与 YHV-1 相似度较高。

2.4 ORF1b、ORF3 部分片段和 ORF2 片段的系统发育树结果与分析

采用 Geneious(v4.8.5)软件对 ORF1b、ORF3 部分

片段和 ORF2 片段序列与 NCBI 中部分已知序列构建系统发育树(图 6–图 8)。

ORF1b 部分片段的系统发育树显示(图 6), 6 份样品处于同一分支, 都属于 YHV-9 的基因型, 该分支的各样品在年代和地域上没有明显聚合规律。YHV-9 与 YHV-1 聚为一个较大的分支, 与 YHV 其他 5 个基因型分支较远; YHV-2 和 YHV-6 亲缘关系较近, 先聚为同一支, 再与 YHV-3 聚合; 前述这 5 个基因型再聚为一个簇, 最后与 YHV-4 及 YHV-5 汇聚。该基因片段无法有效对 YHV-1a 和 YHV-1b 进行区分。

ORF3 部分片段的系统发育树分析显示(图 7), 6 份样品相似性高, 与 20120706TH 一起均属于 YHV-9, 处于同一分支; YHV-2 与 YHV-4 先聚为一支, 再依次与 YHV-5、YHV-3、YHV-9、YHV-1 等各大分支聚合。YHV-9 与 YHV 已知 6 个基因型分支距离较为均等。YHV-1a 和 YHV-1b 则在分支上被清晰地区分出来。

ORF2 片段只有 20120706-TH 和 20131018-JM 这两份样品得到有效扩增和测序, 序列位于 YHV-9 的同一分支, 该分支再与 YHV-1 聚于同一大的分支;

YHV-4 EU785043	ATGAACCCGCGCTACGTCCTCCCAACTCCCATGCCCTGCTCGTGC...CTTCCTCCTATCTCAGCCTTCACGGAAACGCCGCTATGATCGAG	87
YHV-1 DQ978360	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
YHV-3 EU785042	ATGAACCCGCGCACAGCTCCCTCAGGCCCTATGCCCTATTCGCGCG...CCTCCTACATCTCAGCCACTAGGACCGCCAGGCTAAITGAA	87
YHV-1b FJ194949ATGCCCTGCTCGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	60
YHV-1992	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
YHV-1995	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
YHV-1999	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
20120706-TH	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
20131018-JM	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
GAV	ATGAACCCGCGCACAGCCCTCAGGCCCTATGCCCTATTCGCGCG...CCACCCAGATCTCAGCCGCCAGGAAACGCCAGGCTAAITGAA	87
YHV EU487200	ATGAACCCGCTAGACGACCCGCAACTCCTATGCCCTGCTCGCTACCTCCTTCACACCGAACCCTGCAATGCAAGGCTCATCGAG	90
YHV-4 EU785043	ATCCCTCAGTCCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	177
YHV-1 DQ978360	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
YHV-3 EU785042	ATCCACAGTCCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	177
YHV-1b FJ194949	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	150
YHV-1992	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
YHV-1995	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
YHV-1999	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
20120706-TH	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
20131018-JM	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
GAV	ATCCACAGTCCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	177
YHV EU487200	ATTCCTCAATCCTTCGCAGTGAACCGCGGAAATGGATGGACTCTGGCATATGCCCCAGGTAAAAATCCACTACCGGGAAAAGTTCATCGCT	180
YHV-4 EU785043	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	267
YHV-1 DQ978360	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
YHV-3 EU785042	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	267
YHV-1b FJ194949	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	240
YHV-1992	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
YHV-1995	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
YHV-1999	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
20120706-TH	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
20131018-JM	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
GAV	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	267
YHV EU487200	CGTATGCAAGCATCTCCATTCATTCAAGGACTTCAAGTCAATCCCTCCAAGTTGTCAGTCACTCTGATGGTAAATATACAATTTCAAAG	270
YHV-4 EU785043	AGATATGGTAAAAATGGCTATCACCCTATCTTAAACCCCAACGACCCCTATCCTTCCCAAACGTTCTACCCAGAAGCAATCGTTCCAGACCC	357
YHV-1 DQ978360	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
YHV-3 EU785042	AGATATGGCAAAAATGGCAATCACCCTAACCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTCCCTAAACGTTCCACCAGAACAAATGTTCCCTGATCC	357
YHV-1b FJ194949	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	330
YHV-1992	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
YHV-1995	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
YHV-1999	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
20120706-TH	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
20131018-JM	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
GAV	AGATATGGCAAAAATGGCAATCACCCTAACCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTCCCTAAACGTTCCACCAGAACAAATGTTCCCTGATCC	357
YHV EU487200	AGATACCGTAAAAATGGCCATCACCCTATCTTAAATCCCAACGATCCCATTCCTGCCAAAAGGTTCAACACAGAAGTCAATCGTTCCCGATCCT	360
YHV-4 EU785043	TCCTTTAACAATCGACAACCTTGCTGAGGCATCCATGCTATGACAATGGATGATGATGAAGGC...GAAGCTCAAACATAA	435
YHV-1 DQ978360	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	441
YHV-3 EU785042	TCACTTAAACATCGATAACCTTGCTGAGGATTCACGCAATGACAAITGGATGACGAAAGAGGC...GATACACAACCTTAA	435
YHV-1b FJ194949	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	411
YHV-1992	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	441
YHV-1995	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	441
YHV-1999	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	441
20120706-TH	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	441
20131018-JM	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	435
GAV	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	435
YHV EU487200	TCCTTTGACATAGAGAACCCTAGCTGAAGGTATCCACGCAATGAGCCTTGAAGACGACGAAATCCATGGAAACACAATCATATA	441

图 5 ORF2 序列比对
 Fig.5 Alignment of ORF2 consensus sequence

而在该片段上, YHV-2 和 YHV-3 的亲缘关系很近, 这两个基因型再与 YHV-4 汇聚为一大分支; 表现出 YHV-1、YHV-9 和 YHV-2、YHV-3、YHV-4 两大分支的结构(图 8)。由于报道序列较少, YHV-5 和 YHV-6 均未能在该片段的系统发育树上绘出。

3 个片段进化树的分析显示, YHV-9 与 YHV-1 的进化关系较近, ORF1b 和 ORF2 片段的进化关系比 ORF3 片段的进化关系近, 说明 YHV 中国株虽然与 YHV-1 进化关系较近, 但不同片段的进化关系仍存在显著差别。

3 讨论

黄头病是养殖对虾的主要病害之一, 是 OIE 收录

的甲壳动物疫病, 我国将其列为二类动物疫病。黄头病毒(YHV)最早在泰国被发现(Limsuwan, 1991), 澳大利亚于 1995 年在养殖对虾内发现另一致病型 YHV(Spann *et al*, 1995)。我国台湾地区很早就 在养殖的斑节对虾、日本囊对虾中检测到 YHV 的存在, 但 为非致病型(Wang *et al*, 1996)。我国于 2005 年从泰国 进口的斑节对虾内检测到 YHV, 但我们国内养殖对 虾中未曾检测到 YHV 阳性(熊炜等, 2006)。2012 年, 在疑似发生 EMS 养殖场的中国明对虾内检测到 YHV 阳性(刘群等, 2014)。由于我国长期从国外引进亲虾, 东南亚及澳洲地区作为 YHV 的主要疫病区和水产品 出口地, 我国通过水产品进口或引进携带 YHV 亲虾 并垂直传播的可能性较高。本研究对 2012-2014 年间

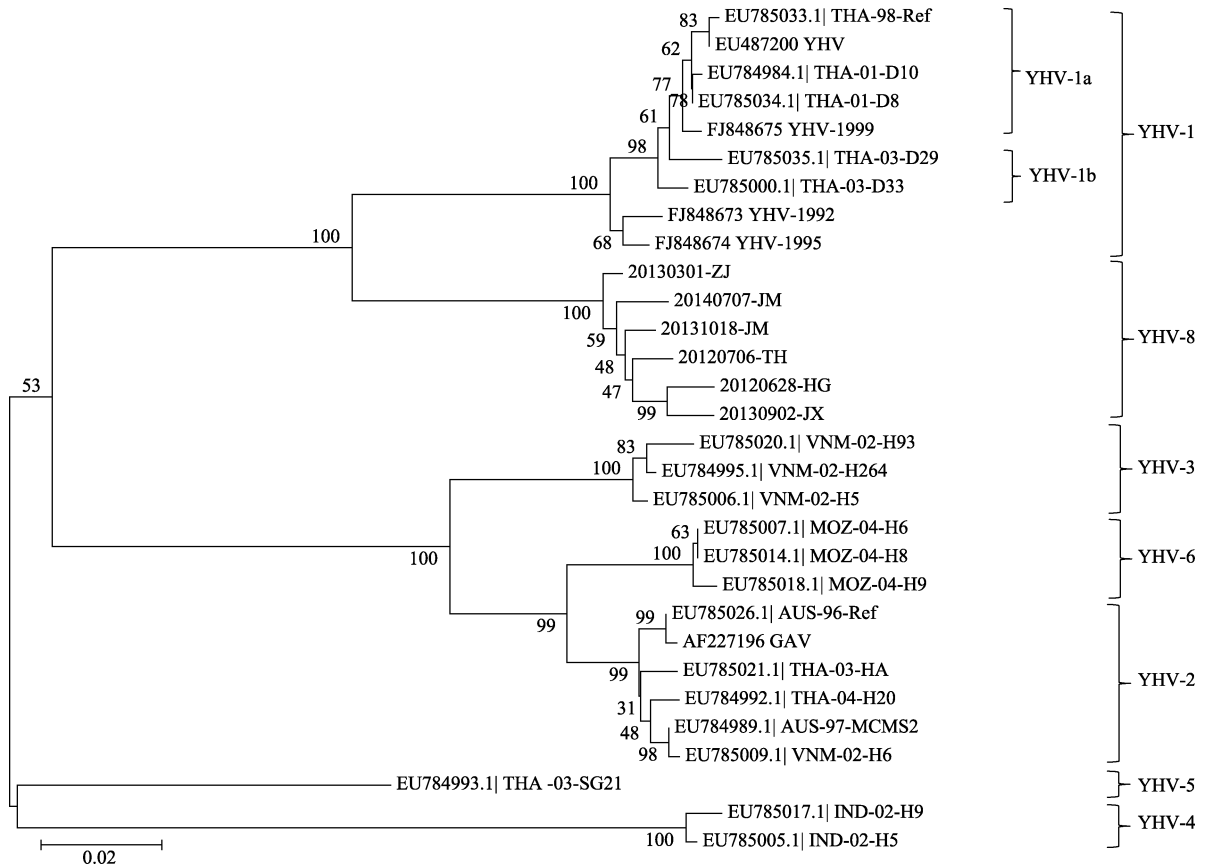


图 6 基于 YHV ORF1b 片段序列多重比对后构建的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree based on the sequences of ORF1b fragment multiple sequence alignment

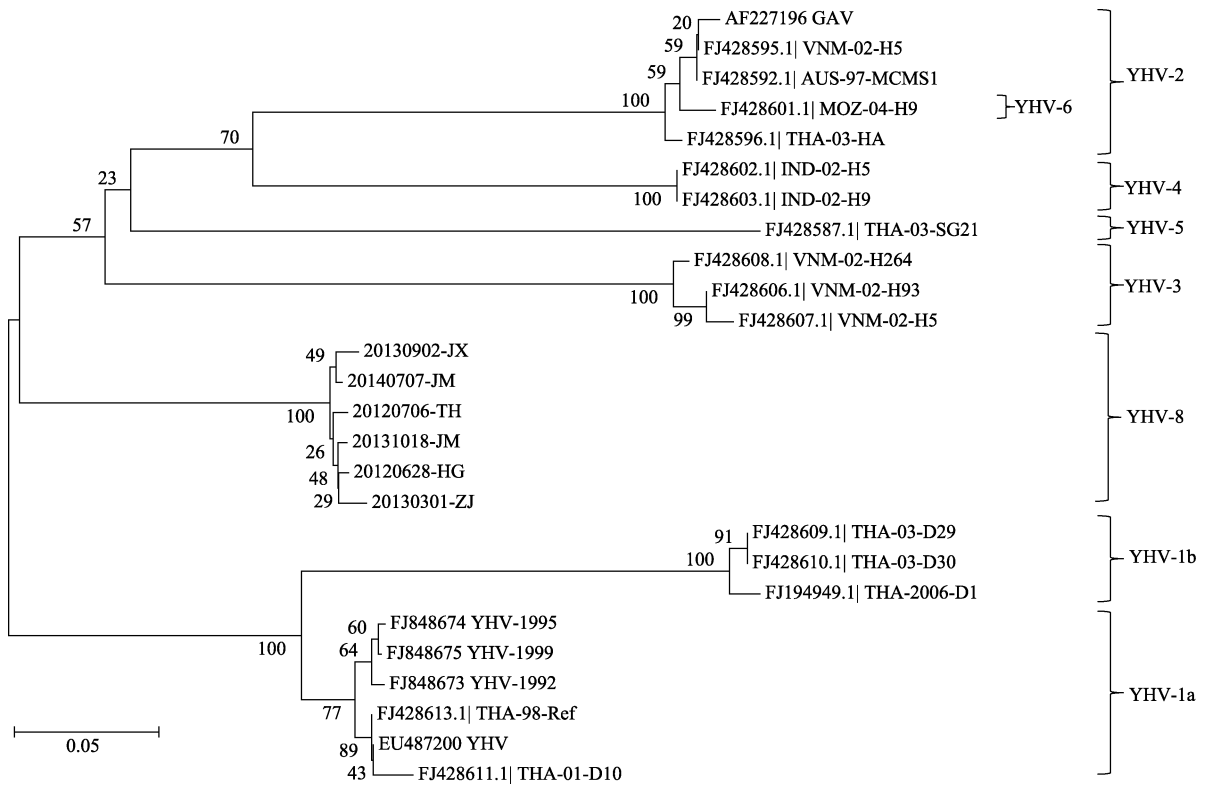


图 7 基于 ORF3 片段序列多重比对后构建的系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree based on the sequences of ORF3 fragment multiple sequence alignment

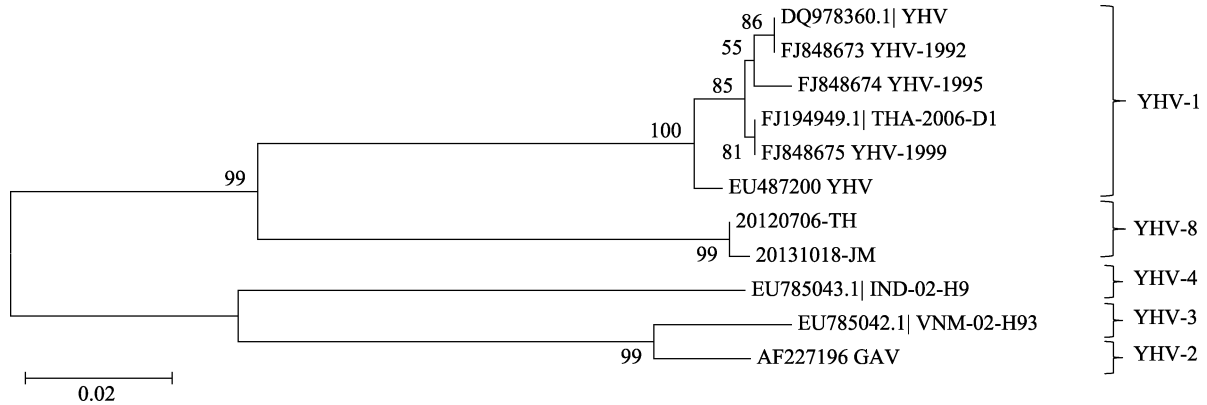


图 8 基于 ORF2 序列多重比对后构建系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree based on the sequences of ORF2 fragment multiple sequence alignment

采集自国内的 299 份对虾样品进行了 YHV 检测, 套式 RT-PCR 检出 32 份 YHV 阳性样品, 其中, 6 份样品在第一步 RT-PCR 检出阳性。

前人研究表明, YHV 病毒包括至少 6 种基因型 YHV, 其中, YHV-1 是对虾的主要病原, GAV 是 YHV-2, 与其他基因型(YHV-3–YHV-6)多存在于东南亚、澳洲及东非等地养殖的健康斑节对虾体内, 很少引起疫病(Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008、2009)。根据 2012 年在我国发现的 YHV 的 RT-PCR 检测的目的片段的序列, 推测我国新发现的 YHV 是一个新的基因型(刘群等, 2014)。本研究对我国更多地区采集的样品的 YHV 的检测和 YHV 基因组的 ORF1b、ORF3 和 ORF2 片段的序列测定和比对进一步确证了这一推测, 这一新的基因型在其基因组的 ORF1b、ORF3 和 ORF2 区域与 YHV 的已知基因型均表现出了遗传差异, 均属于 YHV 的同一个亚型。为避免在今后的研究中出现亚型命名混乱的问题, 本研究仍采用了澳大利亚对我国该亚型的命名方式, 称为 YHV-9。本研究检出的 6 份 YHV-9 阳性样品在不同片段上也存在亚型内的差异, 由于 YHV 为 RNA 病毒, 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶缺乏 3'→5'的外切活性, 无法修复复制中的错误, 导致 RNA 复制过程中变异较大, YHV 核酸序列的差异变化符合 RNA 病毒变异较快的特点。

在对多亚型间和亚型内的各片段序列比对中可以看出, YHV 基因组的 ORF3 序列表现出较高的亚型间的变异性和亚型内的稳定性, 能更好地用于 YHV 亚型的分型; 而 ORF2 序列表现出较高的亚型间的相似性, 适用于对各种 YHV 变异型的检出。由于这些序列的差异, OIE《水生动物诊断手册》中的 YHV 检测的 RT-PCR 检测法对 YHV-9 型的检测灵敏度可能有一定影响, 表明还需根据 YHV 全基因序列的比对结果, 设计新的 RT-PCR 引物, 以实现对多种

YHV 的同时检测或分型检测(OIE, 2012)。

YHV 对一些重要养殖对虾种类, 如斑节对虾、凡纳滨对虾、褐对虾(*Penaeus aztecus*)、墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)等都具有感染性(Jatuyosporn *et al.*, 2014)。本研究的流行病学调查显示, 我国养殖的中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾以及罗氏沼虾中均检出了 YHV, 而且在中国明对虾中的检出率最高, 阳性也最强, 说明中国明对虾是 YHV 的一个新发现的自然宿主, 罗氏沼虾也是本研究新发现的一个自然宿主, 这对增补 YHV 的宿主范围有重要意义(OIE, 2012)。近年来, 陆续在国内多个省市检测到 YHV 病毒的存在, 说明 YHV 已经在我国养殖区域扩散, 但由于发病样品较少, 且受养殖品种、采样区域等因素限制, 病原的源头尚未确定。新型 YHV 的出现表明我国对虾养殖产业已面临了新的疫病威胁, 建立高效、系统、全面防控疫病的引入、传播和扩散风险的生物安保体系对于对虾健康养殖具有重要意义。

参 考 文 献

- 刘群, 黄健, 杨昊霖, 等. 疑似 EMS/AHPNS 对虾中检出黄头病毒的一种新株型. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 703–709
- 熊炜, 邱璐, 李健, 等. 上海检验检疫局从泰国进境草虾中检出虾黄头病毒. 检验检疫科学, 2006, 16(6): 61–62
- Cowley JA, Walker PJ, Flegel TW, *et al.* Family Roniviridae. In King A, ed, Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, London, 2012: 797–801
- Gangnonngiw W, Anantasomboon GOW, Sang-oum W, *et al.* Non-virulence of a recombinant shrimp nidovirus is associated with its non-structural gene sequence and not a large structural gene deletion. Virology, 2009, 385(1): 161–168
- Hasson KW, Hasson J, Aubert H, *et al.* A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for

- virological detection using cDNA genomic probes. *J Virol Methods*, 1997, 66(2): 227–236
- Jatuyosporn T, Supungul P, Tassanakajon A, *et al.* The essential role of clathrin-mediated endocytosis in yellow head virus propagation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44(1): 100–110
- Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 1996
- Limsuwan C, Handbook for cultivation of black tiger prawns. Tansetakit Co. Ltd, Bangkok, 1991
- OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organization for Animal Health, 2012
- Senapin S, Thaowbut Y, Gangnonngiw W, *et al.* Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J Fish Dis*, 2010, 33(5): 421–430
- Spann KM, Vickers JE, Lester RJG. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis Aquat Organ*, 1995, 23(2): 127–134
- Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ*, 2013, 105(1): 45–55
- Walker PJ, Cowley JA, Spann KM, *et al.* Yellow head complex viruses: transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region. The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture, 2001, 227–237
- Wang CS, Tang KFJ, Kou GH, *et al.* Yellow head disease-like virus infection in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in Taiwan. *Fish Pathol*, 1996, 31(4): 177–182
- Wijegoonawardane PKM, Cowley JA, Phan T, *et al.* Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology*, 2008, 380(2): 213–225
- Wijegoonawardane PKM, Sittidilokratna N, Petchampai N, *et al.* Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. *Virology*, 2009, 390(1): 79–88

(编辑 冯小花)

Molecular Epidemiology of a New Yellow Head Virus Strain in China

ZHU Luoluo^{1,2}, ZHANG Qingli^{1,3}, WAN Xiaoyuan¹, QIU Liang^{1,2},
MA Fang^{1,2}, HUANG Jie^{1,2,3}①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Yellow head virus (YHV) is a highly lethal pathogen that causes majority of shrimp diseases. In this study we conducted the epidemiology study and revealed the existence of YHV and the current infectious situation in China. We collected 299 samples in 2012–2014 and detected YHV using the nested RT-PCR method that was recommended in the World Organization for Animal Health (OIE) manual. Genes of some YHV-positive samples were sequenced and underwent the phylogenetic tree analysis. The epidemiology survey showed that the YHV infection rate was 11% and this virus was found in cultured *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus* and *Macrobrachium rosenbergii* in China. *F. chinensis* showed the highest infection rate. *F. chinensis* and *M. rosenbergii* were newly reported as natural hosts of YHV. We then amplified a 1002 bp fragment located in the ORF1b region. The alignment results suggested that YHVs from the six infected samples shared 81.0%–90.5% sequence identity with the six YHV genotypes archived in NCBI. The phylogenetic tree analysis showed that YHVs from the six samples clustered in one branch, but they did not share the same branch with the six already known YHV strains. YHVs in the 6 samples were relatively closely related to YHV Type 1 (YHV-1) and had higher similarity with YHV-1b than with YHV-1a. We also amplified a 509 bp sequence located in the ORF3 region. It encoded gp116 and was different from the 545 bp of YHV Type 1a (YHV-1a), the 383 bp of YHV-1b and the 476 bp of YHV-2 (GAV). We next compared the ORF2 sequence of two samples and found that they were 99.8% identical in gene sequence and had the same protein sequence. Their sequence similarities with YHV-1 and YHV-2 (GAV) were 85.9% and 80.9% respectively. Results of gene sequence alignment suggested that the YHV found in China was a new pathogenic strain.

Key words Yellow Head Virus (YHV); New genotype; Phylogenetic tree; Shrimp; Epidemiology

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn