

## 中国对虾球状病毒垂直传播的初步研究\*

包振民 胡景杰 李秋芬 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

姜明<sup>√</sup> 刘晓云

(青岛海洋大学测试中心, 青岛 266003)

S945.29

S917.1

A

**摘要** 应用透射电镜技术在越冬中国对虾雌性亲虾体内检测出一种球状病毒, 直径为 80 nm 左右。人工感染实验证实该病毒颗粒具有感染性。对带毒亲虾在室内隔离条件下进行了暂养催产, 并对其所产的卵子、幼虫和幼虾进行了隔离培育。带毒亲虾的卵子孵化率、幼虫成活率和幼虾生长速度均明显低于不带毒亲虾的子代。电镜观察发现, 在带毒亲虾卵巢、各期幼虫和幼虾的细胞内存在球状病毒颗粒, 在刚产的卵子的卵黄颗粒中可看到一种似球状病毒颗粒。研究表明, 带球状病毒的对虾呈隐性感染, 在胁迫条件下带毒幼虾可暴发病害, 带毒亲虾可正常发育产卵, 病毒可能通过卵巢、卵子进行垂直传播。

**关键词** 中国对虾, 球状病毒, 垂直传播

随着养殖对虾病毒病研究的不断深入, 新发现的病毒种类也越来越多<sup>[1-3]</sup>。1994 年陈棣华等报道了一种中国对虾的球状病毒<sup>[4]</sup>, 严隽冀在中国对虾未发病前的幼体阶段检测出似痘状病毒<sup>[5]</sup>。从病毒大小、形态结构上看, 上述报道与 1994 年及 1995 年在青岛地区部分发病虾检出的球状病毒极为相似(未发表)。陈棣华等报道了该病毒可进行水平传播。张立人等在雄性亲虾输精管细胞内观察到球状病毒粒子, 并对其垂直传播途径进行了推测<sup>[6]</sup>。

本文报道了作者利用电子显微技术对带球状病毒的越冬亲虾及其在室内隔离条件下所产的卵子、各期幼体进行的电镜观察与分析, 讨论了球状病毒经卵传播的可能性。结果如下:

## 材料和方法

## 1 亲虾来源

带毒和不带病毒亲虾 1995 年 2 月取自胶州市营房镇, 体长 13.8~15.2 cm。带毒虾取自养成过程中经检测发现带有球状病毒的越冬群体。不带毒亲虾取自该镇另一家养殖场的越冬虾, 为养成过程中一直未检出带有球状病毒的群体。

## 2 亲虾暂养、催产及幼体培育

将带毒和不带毒亲虾分别在实验室内暂养催产(2 m<sup>3</sup> 水体放 12 尾, 水温度 16 ℃, 饵料为煮熟的鲜蛤仔肉。亲虾产卵时, 将产卵亲虾挑出, 用 3×10<sup>-4</sup> g/mL 的福尔马林处理 1 min, 煮沸消毒海水冲洗三遍后, 放

收稿日期: 1996-05-30, 修回日期: 1996-11-15

\* 国家八五应急攻关课题, 参加本项工作的还有李筠、牟海津同志

入盛有消毒海水的玻璃缸内,一尾一缸单产。产卵后捞出亲虾,解剖取中肠和卵巢,固定切片进行电镜观察检测是否带有病毒。对来源于带毒群体的经检查体内带有病毒粒子的亲虾,将其所产卵子和幼体进行隔离孵化培育。用人工配合饵料、适当添加纯种培养的叉鞭金藻和小硅藻,其他日常管理按常规进行。对卵子、幼虫及幼虾分别取样,用于电镜观察。来源于不带病毒群体的亲虾,产卵后未发现病毒粒子的作为无毒正常虾,按上述方法对其子代培育观察,作为对照 I。

### 3 感染试验

将带毒亲虾(-30℃下保存)切碎,按对虾体重的 10% 投喂不带毒幼虾(体长 3.5~4.8 cm),这些幼虾为室内隔离培养的无毒亲虾的子代,并经抽样检测不带有球状病毒。投喂 2 d 后将感染病毒的幼虾分为二组,每组 20 尾,一组投喂过量的人工饵料使养殖条件恶化(COD>15 mg/mL)促使对虾发病。另一组按正常管理,作为对照 II。

### 4 电子显微技术

卵和幼虫整体、成虾取组织切成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块后投入 2.5% 戊二醛溶液作预固定。1% 锇酸溶液后固定 1 h,梯度乙醇脱水,Epon812 包埋,用 LKB-V 型超薄切片机切片,切片厚度约 500 Å 左右,经柠檬酸铅、醋酸铀双染色,日立 H-7000 型透射电子显微镜观察、拍照。

## 结果和讨论

1 对带毒亲虾的中肠、卵巢和其所产子代进行切片,电镜观察可在细胞中找到球状病毒粒子,大小为 80 nm 左右,该病毒粒子中央电子密度较低,陈棣华等认为是染色过程中时间掌握不同的缘故<sup>[4]</sup>。在亲虾中肠组织中可观察到成片散在肌浆网的病毒粒子(图 1)。在亲虾卵巢中除可找到散在的病毒粒子外(图 2),还可在卵母细胞中观察到正在形成的病毒粒子(见图 3)。图 4 为在囊胚期病毒感染的细胞,可见在核内形成的病毒发生基质和正在装配的病毒粒子,并可在细胞质中看到片层状的微纤维结构,以及线粒体肿胀、嵴崩解等病理变化。在带毒亲虾的子代幼虾中肠组织也可找到聚集的球状病毒(图 5)。球状病毒一般情况下并不引起严重的病理变化,从图 1、图 2 可见中肠组织中该病毒大多散在肌浆网中,病理变化表现为肌浆网水肿和肌原纤维的轻微变形。病情严重可使线粒体发生肿胀、嵴倒塌,内质网增多、呈泡状。该病毒散在于细胞质中已有许多报道<sup>[4-6]</sup>,但病毒是否感染细胞核则未见报道。从图 3、图 4 中可见细胞核也受该病毒的侵染,病毒感染的细胞核核膜肿胀,严重时核膜消失,核内形成电子密度较高的病毒发生基质,并可看到正在形成的病毒粒子。

亲虾体内这种球状病毒粒子与 1994 年和 1995 年青岛地区发病虾池检出的球状病毒在形态大小、感染部位和引起的病理变化十分相似(未发表)。人工感染实验(见表 1)表明这种病毒可通过口进行水平传播。人工感染后,在环境条件恶化的胁迫状态下对虾 3~4 d 后开始发病,出现空胃、活动能力减弱、背部常常弓起、肌肉混浊等症状。10 d 实验结束时,试验组死亡率为 67%,无病毒对照组 I 为 15%,感染病毒后按常规管理的对照组 II 为 25%。对发病虾进行电镜切片观察,可见到许多直径为 80 nm 左右的球状病毒颗粒。证明病毒粒子具有感染性。本研究观察的病毒与陈棣华 1994 年报道了在河北省乐亭养殖中国对虾中检出一种球状病毒<sup>[4]</sup>,从病毒的形态结构、病症病理等特征看都很相似。

2 室内饲养的带毒虾的生长情况表明(见表 2),感染球状病毒的亲虾在适宜的条件下可正常生长、发育并产卵,卵子孵化率和幼虾成活率低于正常健康虾。带毒亲虾产的幼虾生长稍微缓

慢,体质弱,虾体内已携带病毒,呈隐性感染状态。陈棣华对养殖过程中感染球状病毒的对虾的研究表明:当环境变化时,可诱发携带病毒的对虾发生病毒病<sup>[4]</sup>。本实验的结果也证实了这一点。

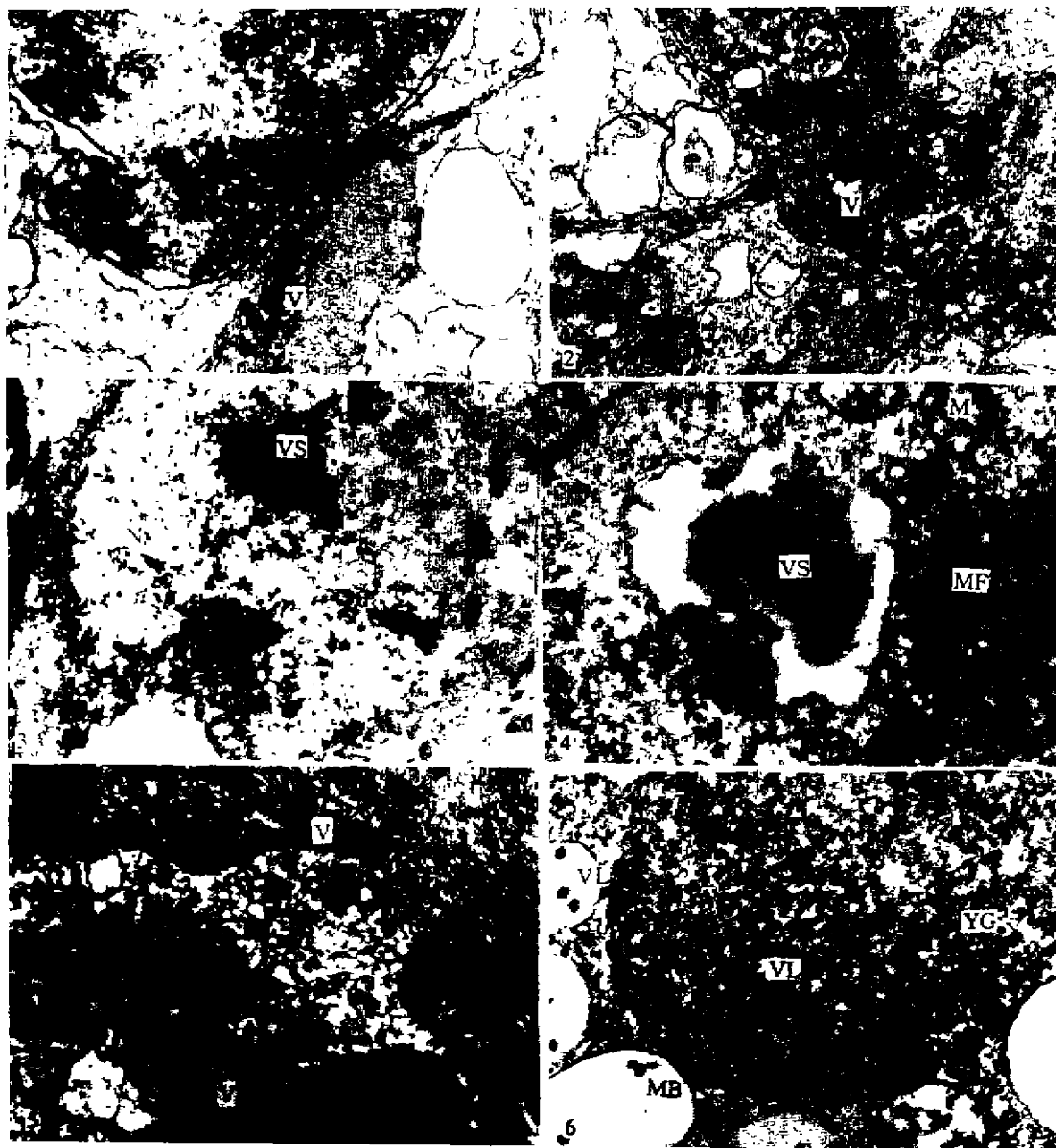


图1 未发病亲虾中肠细胞内的病毒粒子(V) × 20000

Figure 1 Virion(V) in cell of midgut of parental shrimps. nucleus(N). × 20000

图2 排卵后亲虾卵巢细胞内的病毒粒子(V) × 20000

Figure 2 Virion(V) in cell of ovary of spawned parental shrimp. × 20000

图3 卵巢内卵母细胞中的病毒粒子

A: 示卵母细胞核中病毒的发生基质(VS)和正在形成的病毒粒子(V)以及病毒造成的核膜肿胀消失的病理变化。×6000 B: 为图 A 方框部分的放大。×20000

Figure 3 Virion(V) in oocyte of ovary.

A: Showed virogenic stroma(VS) and virion(V) in nucleus(N) of oocyte, The pathological change of inflated and destructive nuclear membrane. ×6000 B: The amplification of the square part in the figure A. ×22000

图 4 囊胚期细胞内的病毒发生基质(VS)和正在装配的病毒粒子(V) ×22000

可观察到核膜肿胀, 线粒体(M)内嵴崩解, 细胞质中形成的微纤维片层结构(ML)等病理变化。

Figure 4 Virogenic stroma(VS) and virion(V) that are assembling in the embryonic cell

Showed the pathological change of inflated nuclear membrane, decomposed mitochondria(M) cristae, Patches of Microfilaments(MF) ×22000

图 5 幼虾中肠细胞内的病毒粒子(V) ×20000

Figure 5 Virion in cell of midgut of juvenile shrimp ×20000

图 6 刚产卵子的卵黄球和多泡体中的似病毒粒子(VL) ×20000

Figure 6 Virus-like(VL) particle in yolk granule(YG) and multivesicular body(MB) of just spawned eggs. ×2000

表 1 球状病毒人工感染实验及病毒检测

Table 1 Artificial infection experiment and detection of spherical viruses

	实验组	对照组 I	对照组 II
	Trial group	Control group I	Control group II
试验虾数(尾)	20	20	20
Number of shrimp(ind)			
死亡率	67%	15%	25%
Dead rate			
病毒检出率	85%	0	80%
Rate of viral detection			

注: 对照 I 为不携带病毒幼虾, 对照 II 为感染后按常规饲养组

Note: Control group I is the juvenile shrimp with no virus.

Control group II is the normal feeding group after infection

表 2 带毒亲虾和无毒亲虾的后代室内小水体培育的情况比较

Table 2 Comparison of the culture of offsprings from carrying and no-carrying virus parental shrimp in tank

组别	卵子孵化率(%)	至 P5 期仔虾成活率(%)	36 日龄幼虾平均体长(cm)
Groups	Hatching rate	Rate of postlarvae up to P5	Mean length of juvenile shrimp of 36 days old
实验组	43.5	37.3	2.6
Trial group			
对照组 I	87.8	56.1	3.1
Control group I			

3 从刚产卵的卵黄颗粒和多泡体中可找到聚集的似球状病毒颗粒(图 6), 似球状病毒粒子形态不十分典型, 但与卵母细胞中的病毒粒子很相似, 从其形态大小、分布的部位看与细胞内的糖元颗粒具有明显不同。张立人<sup>[6]</sup>报道了在雄性亲虾精巢与输精管内发现球状病毒粒子的存在, 并在卵细胞的串泡内也观察到似病毒粒子, 认为病毒有可能通过受精卵而带进子代虾体内。

4 在整个实验过程中孵化和培育一直处于隔离状态,外界引入病毒的可能性较小,对带毒亲虾及其所产的卵子和幼虾进行电镜观察,可在细胞中找到球状病毒粒子或似球状病毒粒子,而对不带毒亲虾和其所产后代均未观察到病毒粒子。从表1可见带毒亲虾的子代幼虾普遍感染球状病毒(80%)。上述结果表明该病毒可能通过卵巢和卵细胞垂直传给后代。Lighter曾发现兰对虾在养殖过程中的一种传染性皮下和造血器官坏死病(IHHNV)病毒可以通过卵巢和卵细胞传给仔虾,同时感染上IHHNV的对虾终身带病毒<sup>[7,8]</sup>。本研究表明,带有球状病毒的中国对虾可以正常生长发育,病毒在虾体内呈隐性感染,该病毒可能通过卵细胞传给子代。中国对虾病毒垂直传播途径研究对其防治具有实际意义。

### 参 考 文 献

- 1 蔡生力,黄捷,王崇明等.1993-1994年对虾暴发病的流行病学研究.水产学报,1995,(2):112-119
- 2 张立人,张建红,陈樟华等.东方对虾体内病毒粒子的电镜观察.第二届全国病毒学学术会议论文集.武汉:中国微生物学会病毒学会,1991,227
- 3 苏永全,蔡心一,王军.1992-1993年福建南部地区虾病的调研.海洋科学,1995,(1):1-4
- 4 陈樟华,张建红,石正丽等.中国对虾中一种球状病毒的分离提纯与检测.中国病毒学,1994,9(2):170-173
- 5 严隽箕.养殖对虾一种似痘状病毒的电镜观察及其传播途径的推测.水产科学,1995,14(1):3-4
- 6 张立人,张建红,石正丽等.中国对虾亲虾体内球状病毒粒子的电镜观察.广西大学学报,1994,19(增刊):36-37
- 7 Lighter D V, Redman R M, Bell T A. Infections hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J Invertebr Pathol, 1983a, 42:62
- 8 Lighter D V, Redman R M, Bell T A. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. J World Mariculture Soc, 1983b, 14:212-225

## A Primary Study of the Vertical Transmission of a Kind of Spherovirus in *Penaeus chinensis*

Bao Zhenmin Hu Jingjie Li Qiufen Xu Huaishu

(College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Jiang Ming Liu Xiaoyun

(Centre of electron microscope, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

With electron microscope, a kind of spherovirus was observed in plasma of penaeid shrimp *Penaeus chinensis* at different stages, such as eggs, larvae and juvenile shrimps. The artificial infection experiment verified that the spheroviral particle has infectivity. The offsprings coming from carrying virus parental shrimp were infected generally in the separated breeding condition. A kind of spherovirus-like particle was found out in just spawned eggs. The result showed that the spherovirus probably can be transmitted vertically.

**Key words** *Penaeus chinensis*, Spherovirus, Vertical transmission