

山东中国对虾暴发病病原体的研究*

THE AGENT OF INFECTIONS DISEASE OF PRAWNS IN SHANDONG, CHINA

张红卫¹ 王金星¹ 于士广¹ 赵双宜¹ 刘昌彬¹

高守华¹ 张文学²

(¹ 山东大学生物系 济南 250100)

(² 河南师范大学生物系 郑州 450000)

关于养殖对虾的疾病及其防治的研究已有大量报道^[1,2,4~12],对虾的病毒病多达10余种。近年来,我省的对虾暴发病,发病急、发病面积大。病症与文献^[12]的斑节对虾杆状病毒,以及文献^[11]报道的极为相似。本文主要对从发病中国对虾分离纯化的病原体进行感染实验,同时对病毒悬液和病虾组织进行显微及亚显微结构的观察,结合对病毒核酸的分析结果,证明山东中国对虾暴发病的主要病原体可能是杆状病毒。

1 材料与方法

1.1 实验材料

暴发病中国对虾取材于寿光、威海等地区,用于进行感染实验的健康中国对虾取于无棣和石岛对虾养殖公司。实验用的中国对虾正常饲养。

1.2 病原体的分离纯化

1.2.1 细菌悬液和病毒粗提液的制备 根据暴发病症状,取典型暴发病中国对虾的虾头匀浆,匀浆液经反复冻融、离心(10 000 r/min)20min,去细胞碎片,经细菌滤膜分离,分别用无菌海水稀释,制成细菌悬液和病毒粗提液,用于第一次感染实验。

1.2.2 纯化病毒的分离 冻融、离心去掉细胞碎片的粗提液经超离心或蔗糖梯度超离心(30 000r/min)180min,获得较纯的病毒,供第2次感染实验,用于病毒的形态观察和核酸研究。感染实验病中国对虾的病毒分离纯化方法同上。

1.3 病毒和病虾组织形态学研究材料的制备

1.3.1 取较纯化的病毒悬液制电镜观察用铜网滴片,磷钨酸负染,用于病毒粒子的电镜观察。

1.3.2 取病虾的鳃、肝胰脏、肠、血管等组织,于波恩氏液固定,常规石蜡包埋,6 μ m切片,H·E染色,用于显微结构的观察。

1.3.3 取病虾的鳃、肝胰脏、肠组织,用戊二醛、俄

酸双固定、EPON 812包埋、超薄切片,铀、铅双染色,用于透射电镜观察。

1.4 感染实验

1.4.1 第一次感染实验 利用本校实验室人工循环海水实验体系饲养健康中国对虾,4d后对已适应该环境的对虾进行第一次感染实验。实验分4组进行,每组10只对虾。第一组为对照组,注射高压灭菌海水;第2组为病毒单独感染组;第3组为细菌单独感染组;第4组为病毒和细菌交叉感染组。各组均采用尾部皮下注射的方法进行病毒感染,病毒和细菌交叉感染或细菌感染。每只注射量均为0.05ml。

1.4.2 第2次感染实验是在荣成市石岛海带育苗场进行。利用天然海水饲养健康中国对虾并进行感染实验。实验共分6组:即对照组、鳃下注入组、假鳃下注入组、口部灌服组、尾部皮下注射组、水中浸泡组。其中对照组不进行任何处理,假鳃下注入组用灭菌海水代替病毒悬液。其他各组均用0.1ml/只纯化的病毒悬液于不同方法进行感染。各组在实验前后均正常饲养和管理,观察并记录发病死亡情况。

1.5 病毒核酸的分离提取及分析

将前述分离的不同病毒样品,即暴发性中国对虾病毒和感染实验病虾病毒,分别加入DNase和RNase,37℃消化30min,以除去寄主细胞中的DNA和RNA,然后用常规酚-氯仿法抽提病毒核酸,经DNase和RNase再分别消化,用0.5%琼脂糖电泳,进行核酸分析。

2 结果

2.1 感染实验

* 荣成市水产局和石岛海带育苗场曾为感染实验提供条件和健康对虾,寿光和无棣对虾养殖公司提供实验材料。张举仁和张法忠二同志参加考察工作。张惠同志协助进行超薄切片,在此一并致谢。

第一次感染实验进行后第4天,病毒单独感染组和病毒细菌交叉感染组开始大量死亡。1周内死亡率已达70%。对照组和细菌单独感染组均仅有10%。

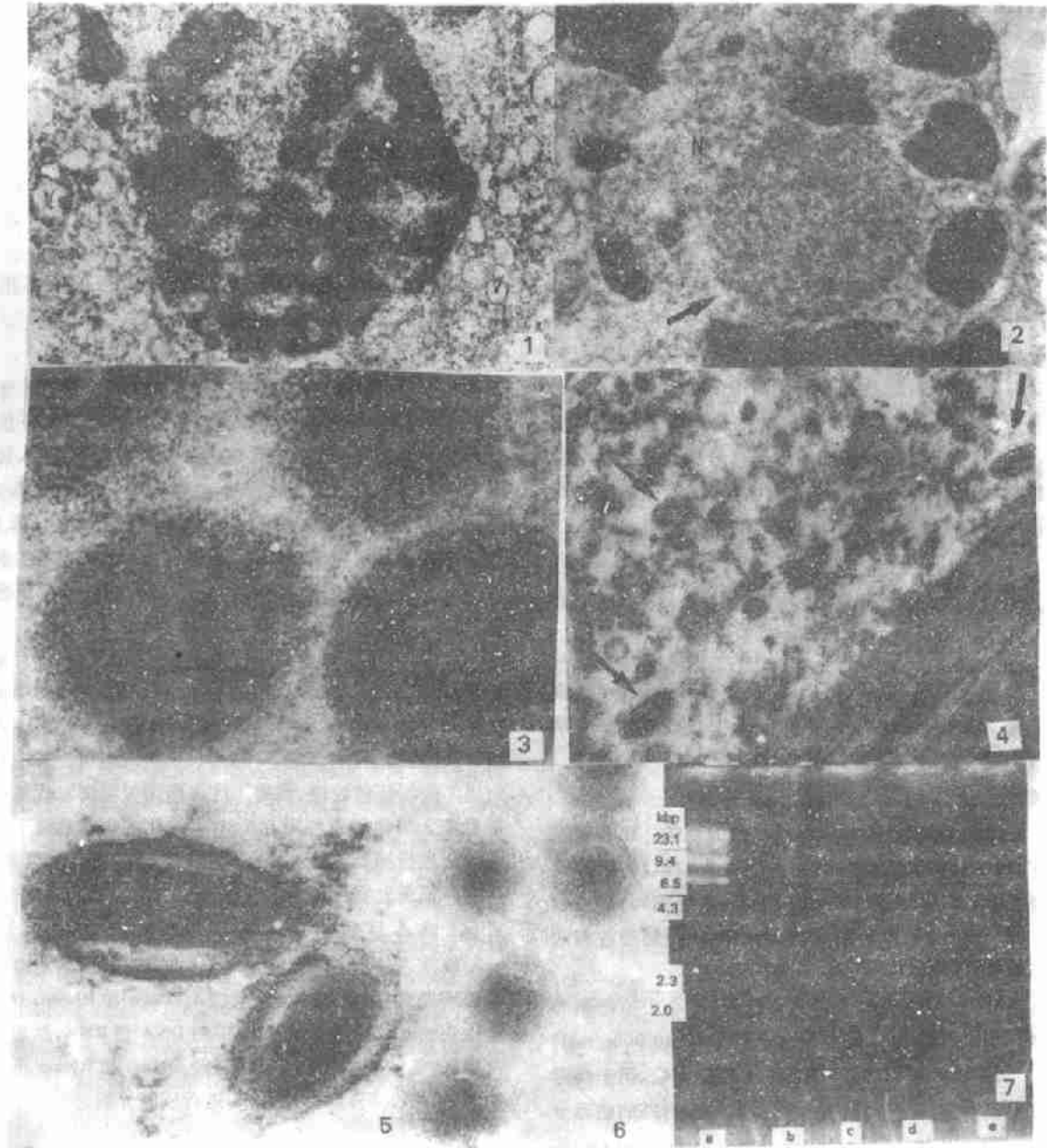


图 1

1-1 病对虾肝胰腺细胞透射电镜照片,示核内异染色质增多,细胞内出现大量空泡,线粒体退化 $\times 7\ 200$; 1-2 病对虾肝胰腺细胞透射电镜照片,示核内包涵体(箭头所示) $\times 10\ 000$; 1-3 病对虾肝胰腺细胞质内包涵体 $\times 7\ 200$; 1-4 病对虾鳃细胞内的杆状病毒粒子(箭头所示) $\times 19\ 000$; 1-5 杆状病毒高倍电镜照片 $\times 100\ 000$; 1-6 球形病毒悬液电镜照片 $\times 100\ 000$; 1-7 核酸分析电泳图谱。a 为标准, b 和 c 为经 RNase 消化的病虾和感染病虾病毒核酸电泳带, d 和 e 为 DNase 消化后前两者寄主病毒核酸电泳带

第二次感染实验在实验进行第2天鳃下注入组就开始出现大量死虾。4d后,该组死亡率已达78%。其次是尾部皮下注射组实验进行4d后死亡率达53.8%,口部灌服组达到35%,对照组和水中浸泡组均很低,假鳃下注入组无死亡,见表1。观察死虾病症,对照组4只死虾,肝胰腺颜色正常即背面呈黄褐色,腹面白色,有典型的红腿病病症。其余各感染实验死虾均有暴发性典型病症,开始发病时,不摄食,死虾胃肠无食物,头胸甲很易揭开,甲壳有较明显的白斑,且肝胰腺呈棕黄色且易碎。

表1 第二次感染实验死亡统计

实验组名称	对虾数 (只)	实验开始进行天数				死亡率 (%)
		1	2	3	4	
对照组	35	0	2	2	0	11
鳃下注入组	14	0	9	2	0	78
假鳃下注入组	8	0	0	0	0	0
口部灌服组	17	0	3	2	1	35
尾部皮下注射组	13	0	4	1	2	53.8
水中浸泡组	17	0	3	0	0	18

2.2 病虾组织和病毒的形态学观察

光镜下,暴发病中国对虾的肝胰腺、鳃和肠组织学切片中均可见到数量不等的嗜碱性或嗜酸性包涵体。

电镜下可观察到肝胰腺组织中有大量出现病理变化的细胞(图1-1)。这些细胞的核内出现大量高电子致密度物质,细胞质内有大量空泡,细胞器退化,细胞膜和核膜破裂。有些细胞中可观察到包涵体(图1-3)和病毒粒子。在鳃组织的切片中可观察到大量解体中的肌样上皮细胞,在有的细胞中可观察到核内包涵体(图1-2)和大量杆状病毒(图1-4)。这些杆状病毒呈长圆柱形,长240~280nm,横切直径为90~110nm,具有包膜(图1-5)。

对暴发病中国对虾病毒悬液滴片的电镜检查,观察到两种病毒粒子,即一种是前述的杆状病毒粒子,另一种是球形病毒,这种病毒无包膜,直径为30~70nm(图1-6)。球形病毒仅见于部分对虾材料的病毒悬液,杆状病毒较为普遍存在。

2.3 病毒的核酸分析

从暴发病对虾和感染实验的病对虾中分离出的病毒样品经常规法核酸提取,再用DNase和RNase分别消化,琼脂糖电泳。结果一致显示:不加酶的样品出现一条带,DNase消化的不出现带,经RNase消化的出现一条与不加酶的样品相同的带。表明该病毒对DNase敏感,对RNase不敏感,是DNA病毒。同时从暴发病对虾分离出的杆状病毒样品与感染实验病虾分离出的病毒样品的核酸分析结果一致,均为25kb左右的DNA分子(图

1-7)。

3 结论与讨论

第一次感染实验结果显示细菌单独感染组和对照组死亡率均很低,而病毒单独感染组和病毒细菌交叉感染组死亡率都较高,初步表明病毒是主要病原体。第二次感染实验由于采用了较纯化的病毒做为感染源,得到了更迅速和明显的结果,进一步表明病毒确是该次暴发病的病原体。同时,鳃下注入实验感染组显示的死亡率最高,甚至明显地高于皮下注射感染组,表明致病病毒可能以鳃部为主要感染途径,但也必须注意到消化道感染也是一个重要途径。

本实验在病虾的电镜切片和病毒悬液滴片中均观察到病毒粒子的存在,进一步证明了暴发病对虾的病原体是病毒,而不是细菌。更进一步对暴发病对虾和感染病虾二者所分离纯化病毒样品的核酸分析结果的一致性,和杆状病毒普遍存在于各种病虾材料中的分析结果,表明暴发病虾的主要病原体是杆状病毒,这种杆状病毒比国外报道的黄头病毒体积略大^[1]。

至于山东中国对虾暴发病病原体是否仅为杆状病毒?是何类杆状病毒?该病有哪些继发性因素?环境和生态的诱发因素又有何影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 孟庆显,1991.对虾疾病防治手册.青岛海洋大学出版社,80~137.
- [2] 肖乐、杨坚、张田,1991.实用虾病防治法.海洋出版社,25~105.
- [3] 陈楠生等译,1992.对虾生物学.青岛海洋大学出版社,407~410.
- [4] Lightner, D. V. and Brock, J. A., 1985. Society for Invertebrate Pathology, 18th Annual Meeting, Ontario (Abstract).
- [5] Lightner, D. V. and Brock, J. A., 1987. *J. Invertebr. Path.* 49: 188-193.
- [6] Lightner, D. V., 1975. In Proceeding of the Third U. S. - Japan meeting on Aquaculture Special Publication of Fisheries Agency, Niigata, Japan. 75-97.
- [7] Lightner, D. V., 1978. *J. Invertebr. Pathol.* 32: 139-150.
- [8] Lightner, D. V., 1988. 2nd ed Elsevier, New York. 8-127.
- [9] Kinne, O., 1990. *Diseases of Crustacea. Biologische Anstalt*

Helgoland, Hamburg. 245-399.

- [10] Itami, Y. *et al.* , 1989. *J. Aquatic Animal Health* 1; 238-242.

- [11] Takahashi, Y. *et al.* , 1994. *Fish Pathology* 29; 121-125.

- [12] Chen, S. N. , 1989. *J. Fish Disease* 12; 73-76.