

中国对虾杆状病毒垂直传播途径的初步探讨

汝少国 姜 明 李永祺 贾翠红
(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

摘 要 中国对虾杆状病毒垂直传播途径的研究对切断病毒的传播途径, 培育健康的对虾种质资源, 具有重要的理论和实践意义。本文利用电镜技术, 对中国对虾亲虾的卵巢、卵细胞和无节幼体、状幼体、糠虾、仔虾、幼成虾进行病毒检测, 结果发现卵巢和卵细胞中有似病毒粒子, 无节幼体、糠虾、仔虾、幼成虾有杆状病毒感染, 并初步探讨了中国对虾杆状病毒垂直传播的可能性。

关键词 中国对虾, 杆状病毒, 垂直传播

对虾杆状病毒的垂直传播 (Vertical transmission) 是 SPF 的主要研究内容, 它对切断病毒的传播途径、培育健康的对虾种质资源, 具有重要的理论和实践意义 [薛清刚和王文兴 1992]。目前, 我国关于对虾杆状病毒传播途径的研究已有不少报道 [陈细法等 1995, 国际翔等 1994], 这些研究大多限于病毒的水平传播, 对垂直传播途径的报道较少 [王云祥等 1994]。黄 等 [1995] 认为中国对虾传染性皮下及造血组织杆状病毒的传播途径可能主要为水平传播, 陈细法等 [1995] 对斑节对虾杆状病毒的检测发现在斑节对虾的仔虾期以前的幼体未感染病毒, 在第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会上, 专家一致认为“病毒的水平传播媒介是水、饵料和底泥, 但垂直传播途径尚无定论”。可见, 有关对虾杆状病毒的垂直传播途径的研究至今尚未有明确的结论。因此, 为进一步搞清对虾病毒的传播途径, 本文采用电镜技术, 对中国对虾亲虾的卵巢、卵细胞和无节幼体、状幼体、糠虾、仔虾、幼成虾进行了病毒检测, 并初步探讨了中国对虾杆状病毒可能的垂直传播途径。

1 材料和方法

1.1 材料

中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 取自文登市高岛盐厂。在育苗期和养成期, 分别采集亲虾的卵巢、卵、无节幼体、状幼体、糠虾、仔虾、各种规格的幼成虾及弱苗、病苗和病虾。

1.2 病毒检测方法

电镜超薄切片的制备是将采集的卵巢、卵、无节幼体、状幼体整体固定, 定向包埋, 其余个体取肝胰腺组织切成 0.5mm^3 小块, 用 2.5% 的戊二醛固定, 然后 pH 7.2 的 PBS 洗净后用 1% 的锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, Epon 812 包埋, 常规电镜切片染色, 用日立 H-7000 型透射电子显微镜观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 核型杆状病毒的超微结构

2.1.1 包涵体的超微结构

电镜观察结果表明杆状病毒包涵体位于肝胰腺上皮细胞的核质中(以下简称核型杆状病毒包涵体),数量不等,少的一个,多则 3~5 个(图版 1~3),甚至更多,呈椭圆形、圆球形或不规则形态,各个包涵体体积变化颇大,刚形成时为少量杂乱无章的颗粒状物质,以后逐渐聚集,体积增大,发育形成初期的包涵体。包涵体直径在 2~7 μm ,最大可充满整个细胞核,包涵体外无膜包裹,基质裸露,边缘整齐的较多,少数不整齐,装配完成的病毒粒子散在于细胞核内或细胞质中(图版 4)。

2.1.2 杆状病毒的超微结构

病毒粒子不组成病毒束,单个地随机分布在细胞的核质中和胞质中,由三部分组成,最外层囊膜,厚约 10.9~13.6nm,全封闭,表面光滑无凸起;中心部分是核酸核心,是一种 DNA 病毒,核心电子密度较高;在囊膜与核心之间是衣壳,衣壳是蛋白质膜,紧包在核酸核心的外缘,起支持和保护作用(图版 5)。由于从形态上难于区分核心和衣壳,因此,常把两者统称为核衣壳,核衣壳是病毒感染宿主细胞并增殖的物质基础,也是生命活动的中心。病毒的形态大小为 110~140nm \times 310~360nm(以下简称核型杆状病毒),与陈细法等[1995]对斑节对虾杆状病毒超微结构的报道相似。

2.2 质型杆状病毒的超微结构

2.2.1 包涵体的超微结构

根据对中国对虾肝胰腺上皮细胞的透射电镜观察,发现杆状病毒包涵体可在肝胰腺细胞的胞质内形成(以下简称质型杆状病毒包涵体)[汝少国等 1996],呈晶格状排列,四角体(图版 6~10)或不规则的多角体(图版 11),多角体的晶格间距 41 埃左右,病毒颗粒大致等距离地随机分布在多角体的蛋白基质中,病毒包涵体基质是多角体蛋白质组成的,这些蛋白质以特定的晶格彼此互相排列,发育形成多角体蛋白结晶的包涵体。在病毒发生基质部位,以后出现病毒粒子(图版 12)。这种在细胞质内形成的包涵体在国内外尚无报道,它的超微结构与 Lightner 和 Redman[1992]报道的在对虾肝胰腺上皮细胞核内形成的包涵体相似。

2.2.2 杆状病毒的超微结构

病毒粒子不组成病毒束,单个随机分布在细胞质中或包埋在蛋白质结构的包涵体中,属于单粒包埋型病毒。病毒粒子同核型病毒一样,由三部分组成。外形亦呈短杆状,形态大小为 33~45nm \times 51~87nm(以下简称质型杆状病毒)(图版 7~11)。

2.3 不同发育阶段的对虾幼体杆状病毒的电镜检测

电镜观察结果表明中国对虾亲虾的卵巢、卵、无节幼体、状幼体、糠虾、仔虾、各种规格的幼成虾及弱苗、病苗和病虾的均有杆状病毒感染。亲虾的卵巢中有大量的似杆状病毒粒子,形态为 45~87nm(图版 13)。卵细胞含有大量的卵黄,没有明显的细胞分化(图版 14~15),卵细胞中发现质型杆状病毒包涵体(图版 14)和似杆状病毒粒子存在(图版 15),形态为 45~

87nm。无节幼体细胞已有肝胰腺和上皮细胞的分化, 但分化程度较低(图版 16), 细胞质中有杆状病毒粒子(图版 16~ 19)和质型杆状病毒包涵体(图版 18), 病毒粒子大小为 45~ 87nm。糠虾幼体有杆状病毒感染(图版 20~ 21), 呈聚集状态, 电子密度不高。仔虾肝胰腺上皮细胞核内有包涵体形成(图版 22), 杆状病毒粒子呈聚集状态, 具有较高的电子密度(图版 23~ 24)。

3 讨论与结语

3.1 质型杆状病毒的特点及致病力

质型杆状病毒形态呈短杆状, 大小为 33~ 45nm × 51~ 87nm, 其包涵体在细胞质内形成。感染此病的对虾在发病初期, 一般外部病症并不明显, 不呈爆发流行症状, 但一旦环境恶化便使对虾大面积死亡。它与核型杆状病毒的形态与发病特点明显不同, 核型杆状病毒大小为 110~ 140nm × 310~ 360nm, 其包涵体在细胞核内形成, 这种类型病毒一旦感染对虾, 便很难控制, 一般呈爆发流行趋势[蔡生力等 1995, 姜明等 1996]。Lightner 和 Redman[1992]和 Chen 等[1989]、Chang 等[1992]及陈细法等[1995]曾在斑节对虾的肝胰腺上皮细胞的核质中发现与核型杆状病毒形态相似的病毒, 大小为 270~ 300nm, 形成晶格状蛋白质基质的包涵体, 但与质型杆状病毒形态大小明显不同。从形态上看, 质型杆状病毒与昆虫细胞中发现的质型多角体病毒(呼肠孤病毒科)的形态及包涵体的超微结构很相似, 因此本文简称为质型杆状病毒, 由于其分类非常复杂, 尚待进一步研究。

3.2 对虾杆状病毒可能的传播途径

对虾杆状病毒的传播途径从组织病理学角度可分为水平传播、垂直传播、两者兼有、自身感染等 5 种传播途径, 其 5 种传播途径中, 对虾杆状病毒水平传播的研究已较深入, 而垂直传播尚无定论。目前, 若干昆虫和鱼类病毒的垂直传播已被普遍接受[吕鸿声 1985, 江草周 1994]。但存在经卵巢传播还是卵表传播的争论, 经卵巢传播是指病毒经过卵的内部传染子代; 卵表传播是指病毒附着在卵的表面, 孵化时幼虫吞食卵壳而引起经口感染。自首次发现对虾杆状病毒以来, 杆状病毒的传播途径尚未取得统一的结论, 陈细法等[1995]通过跟踪观察斑节对虾卵细胞和各变态期 MBV 分布时发现, 卵、无节幼体、状幼体和糠虾前期无 MBV 感染, 认为 MBV 可能是通过对虾种群各个体间进行水平传播, 而不是经由生殖腺和卵细胞垂直感染子代的; 黄等[1995]也认为对虾无节幼体、状幼体和糠虾期也不感染皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV), HHNBV 的感染主要是水平传播。而通过对中国对虾亲虾的卵巢、卵和无节幼体、状幼体、糠虾幼体、仔虾的超薄切片观察, 结果发现卵巢和卵细胞中有似病毒粒子, 无节幼体、糠虾、仔虾、幼成虾有杆状病毒感染, 这表明杆状病毒经卵传递给子代是可能的。另外, 包振民等[1997]曾报道用中国对虾杆状病毒人工感染亲虾后, 其卵巢和卵细胞中发现大量杆状病毒粒子, 这表明虽然对虾的卵巢和卵细胞具有较强的自我保护能力, 但仍可被病毒感染, 桃山和夫[1988, 1989]对日本对虾育苗期间肝胰腺坏死症病毒(BMN)的传染源进行调查认为, BMN 在日本对虾体内的潜伏感染是其重要的传染源, 两者都进一步佐证中国对虾杆状病毒经卵传递给子代是可能的。但要作出肯定的结论, 还需积累更多的实验资料。

本文是国家攀登计划 B 支持项目, 编号 PDB6-7-1。

参 考 文 献

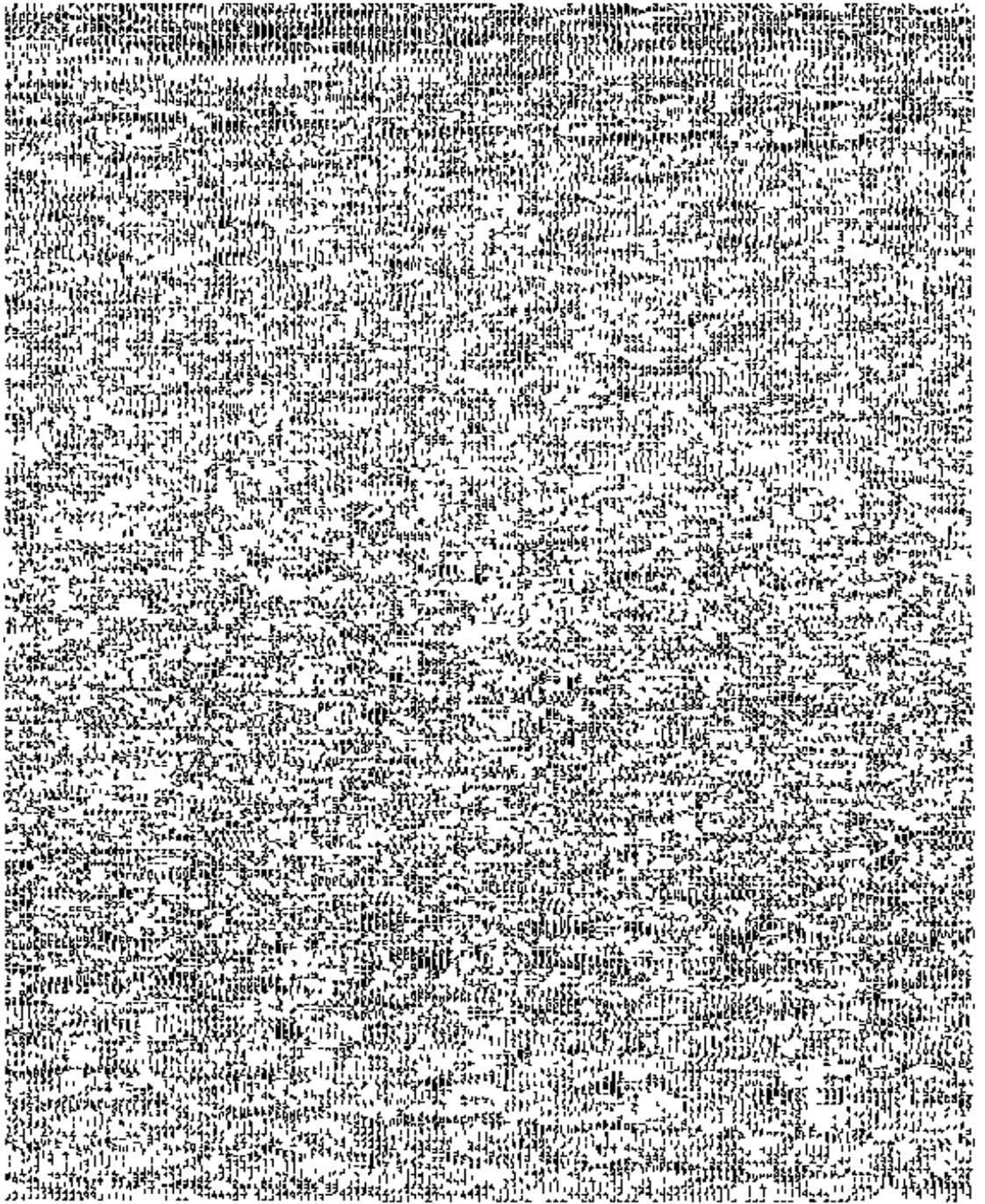
- 王云祥, 李秀梅, 孙金生. 1994. 天津地区对虾暴发病的病因、病理及传播途径的初步研究. 海洋科学, (6): 1~ 5.
- 包振民, 胡景杰, 姜明等. 1997. 杆状病毒感染越冬亲虾 (*Penaeus chinensis*) 的研究. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 27(3): 347~ 351.
- 汝少国, 姜明, 李永祺等. 1996. 对虾肝胰脏细胞质中杆状病毒增殖的电镜观察. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 26(1): 127~ 130.
- 吕鸿声. 1985. 昆虫病毒与昆虫病毒病. 北京: 科学出版社. 5~ 150.
- 陈细法, 吴定虎, 黄槐等. 1995. 斑节对虾杆状病毒的超微结构. 水产学报, 19(3): 203~ 209.
- 国际翔, 王丽霞, 李文清. 1994. 对虾杆状病毒感染寄主细胞的超微结构观察. 海洋科学, (6): 38~ 43.
- 姜明, 汝少国, 李永祺等. 1996. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 病害暴发流行期间杆状病毒亚微形态的电镜观察. 海洋科学, 1996, (1): 49~ 52.
- 黄, 宋晓玲, 于佳等. 1995. 杆状病毒的皮下及造血组织坏死——对虾暴发病的病原和病理学. 海洋水产研究, 16(1): 1~ 10.
- 蔡生力, 黄, 王崇明等. 1995. 1993~ 1994 年对虾暴发病的流行病学研究. 水产学报, 19(2): 112~ 119.
- 薛清刚, 王文兴. 1992. 对虾疾病的病理与诊治. 青岛海洋大学出版社. 8~ 74.
- 江草周三. 1994. 鱼类における垂直传播の机序. 鱼病研究, 29(1): 43~ 52.
- 桃山和夫. 1988. 日本对虾种苗生产时に发生する传染性中肠坏死症 (BMN) の传染源. 鱼病研究, 23(2): 105~ 110.
- 桃山和夫. 1989. 传染性中肠腺坏死症 (BMNV) の感染组织および海水中での活性维持. 鱼病研究, 24(3): 179~ 181.
- Chang P S, Wang Y C, Lo C F, et al. 1992. Purification and biochemical characteristics of occlusion body of *Penaeus monodon* - Type Baculovirus (MBV). Gyoby Kenkyu, 27(3): 127~ 130.
- Chen S N, Chang P S, Kou G H, et al. 1989. Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in the Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) and the Red Tail Prawn (*Penaeus penicillatus*). Fish Pathology, 24(2): 89~ 100.
- Lightner D V, Redman R M. 1992. Marine Shrimp Culture: Principles and Practices Arlo W. Fast and I. James I ester, editors. Elsevier Science Publishers B. V. All rights reserved: 569~ 588.

PRELIMINARY STUDY OF THE BACHLOVIRUS VERTICAL TRANSMISSION IN *PENAEUS CHINENSIS*

RU Shao-Guo, JIANG Ming, LI Yong-Qi, JIA Cui-Hong
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)

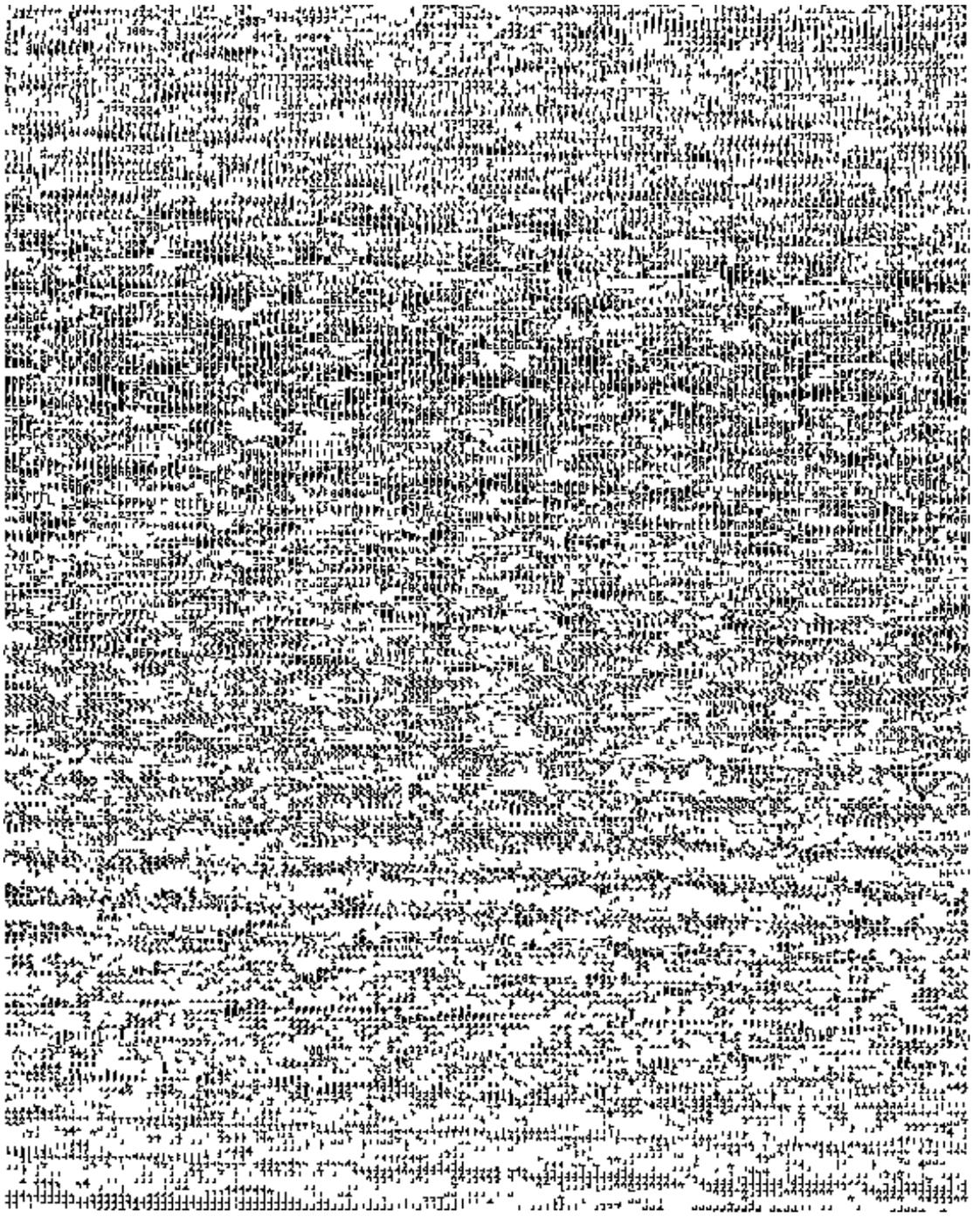
ABSTRACT The baculovirus of *Penaeus chinensis* which is transmitted to offsprings by eggs is the main content of SPF. It is important to cut off the virus transmission and cultivate the healthier strain resources of shrimps. Above all, its theoretical and practical significance are unneglected. This report made use of the electron microscope technology to examine baculovirus from ovary, egg, Nauplis, Zoea, Mysis of *Penaeus chinensis* to Postlarva, Juveniles of *Penaeus chinensis*. The results reveal there is the baculovirusoid in ovary, egg and baculovirus in Nauplis, Mysis of *Penaeus chinensis*, Postlarva, Juveniles of *Penaeus chinensis*. At the same time the report provides the possible discussion of the baculovirus vertical transmission in *Penaeus chinensis*.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Baculovirus, Vertical transmission



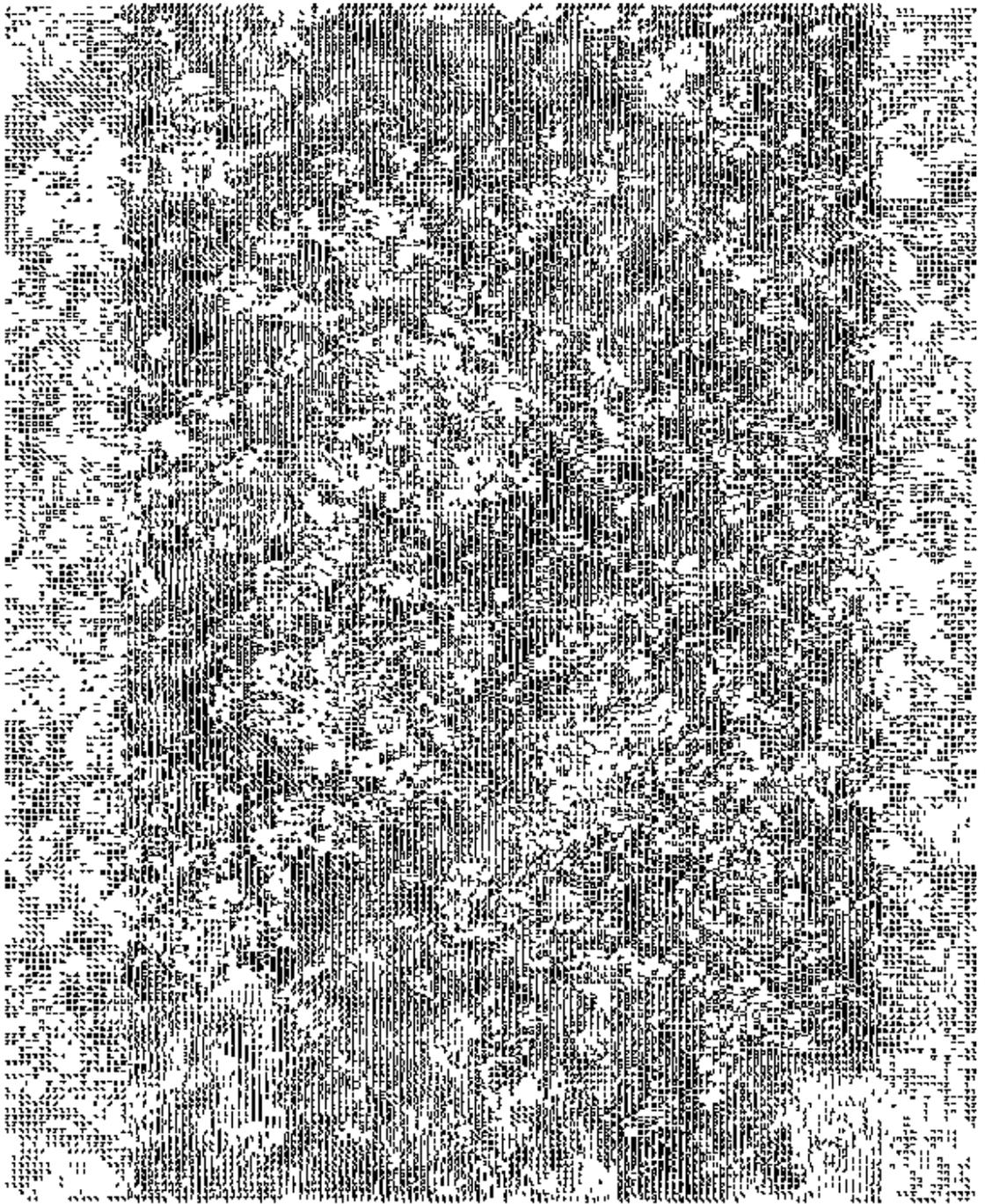
图版 Plate

1. 肝胰腺上皮细胞核中椭圆形、圆球形的杆状病毒包涵体。× 1 650;
2. 一个细胞核中两个包涵体。× 3 850;
3. 一个细胞核中有 5 个包涵体。× 4 400;
4. 细胞核内的杆状病毒和包涵体。× 8 800;
5. 病毒粒子的囊膜、核酸核心、衣壳。× 110 000;
6. 细胞质中的小形多角体开始在病毒发生基质的表面形成。× 22 000;
7. 肝胰腺上皮细胞质内形成晶格状排列的包涵体, 呈四角体。× 22 000;
8. 图版 7 的放大。× 120 000



图版 Plate

9. 包埋在蛋白质基质包涵体中的病毒粒子。× 22 000; 10. 图版 7 的放大。× 88 000; 11. 细胞质中形成不规则的蛋白质基质包涵体。× 88 000; 12. 细胞质中的病毒粒子分布状态。× 16 500; 13. 亲虾的卵巢中大量的似杆状病毒粒子, 形态大小为 45~ 87nm。× 45 000; 14. 卵细胞中发现晶格状蛋白质基质的包涵体和似杆状病毒粒子。× 40 000; 15. 卵细胞中含有大量的卵黄和似杆状病毒粒子, 没有明显的细胞分化。× 10 000; 16. 无节幼体肝胰腺和上皮细胞的分化程度较低。× 40 000



图版 Plate

17. 细胞质中有聚集在一起的杆状病毒粒子存在。× 20 000; 18. 有晶格状蛋白质基质的包涵体和病毒粒子。× 40 000;
 19. 图版 18 的放大。× 104 000; 20. 糠虾幼体感染的杆状病毒和病毒包涵体。× 6 000; 21. 糠虾幼体细胞质中的杆状病毒。× 15 000;
 22. 仔虾肝胰腺上皮细胞核内形成的包涵体。× 5000; 23. 仔虾肝胰腺中的杆状病毒粒子呈聚集状态, 形态大小为 45~ 87nm。× 7 200; 24. 杆状病毒粒子的高倍照片。× 36 000