

文章编号:1000-0615(2008)02-0315-06

·研究简报·

“胃萎缩症”仿刺参幼体及亲参组织中病毒观察

邓 欢, 周遵春, 韩家波

(辽宁省海洋水产科学研究院 辽宁省应用海洋生物开放实验室, 辽宁 大连 116023)

关键词:仿刺参;胃萎缩症;病毒

中图分类号:S 941.41 文献标识码:A

海参含有丰富的蛋白质和粘多糖,营养和药用价值极高。全世界海参约有 1200 种,在我国海域分布的有 140 多种,其中以黄、渤海的仿刺参 (*Apostichopus japonicus*)品质最佳^[1]。近几年,仿刺参(俗称“刺参”)人工养殖已成为辽宁、山东沿海水产业重要的养殖品种之一和新的经济增长点。然而,在仿刺参育苗、越冬及养成期不断出现了多种明显病症和大规模的死亡现象,严重制约了该产业的可持续发展。

2006 年 5-6 月,辽宁地区仿刺参人工育苗期浮游幼体发生一种流行疾病—“胃萎缩症”,患病幼体死亡率高,造成多家育苗场几乎绝产。目前海参病害研究,国外多属疾病调查方面的报道^[2-3],国内一些学者陆续报道了仿刺参育苗期常见病害^[4-6]。如浮游期幼体的“烂边病”、“烂胃病”。王印庚等^[4]认为一些细菌感染幼体可以导致烂胃病。本文仅对首次在仿刺参患“胃萎缩症”的浮游幼体体内发现病毒粒子这一事实进行初步报道,旨在仿刺参流行病病原种类的探索奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

2006 年 5-6 月,分别于大连地区旅顺董坨、金州三道沟、瓦房店三台、庄河大郑及营口鲅鱼圈 5 家海参育苗场,现场采集经浓缩后(每 mL 约含 100 个幼体)的 3~7 日龄发生胃萎缩症的浮游幼

体,个体大小 400~850 μm ,然后放入灭菌的广口瓶中,同时随机取其相应的亲本各 3 只,2 h 内带回实验室用于病毒检测。

1.2 方 法

病毒粗提液的制备及负染观察 用无菌生理盐水冲洗 3 次过滤收集的发病幼体,同时取其相应幼体发病育苗场的亲参雌、雄性腺,体壁,肠管和呼吸树器官组织、每个发病场检测 3 头亲参,分别进行匀浆、冰冻过夜、冻融、离心 8 min ($13\ 000 \times g, 4\ ^\circ\text{C}$)2 次,取上清的病毒粗提液,滴加在载玻片上,将覆有 Fox-mavar 碳膜的铜网反扣在病毒悬液上,5 min 后,取下铜网,晾干。滴加 2% 的磷钨酸(PTA)负染 5 min,用滤纸吸去多余的染液,室温风干,于 JEM-1200EX 电镜下观察并拍照。

超薄切片的制作 过滤收集发病幼体,经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,系列乙醇脱水, Epon812 环氧树脂渗透包埋, Ultracut-E 型超薄切片机切片,经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,于 JEM-1200EX 电镜下观察并拍照。

2 结 果

2.1 流行与危害

仿刺参幼体胃萎缩症是辽宁地区 2006 年首次发现的育苗期流行病。该流行病最初主要在幼体选育后的第 5~7 天暴发,流行面较广,造成幼体死亡率高,尚无有效药物控制病情的发展和蔓

收稿日期:2007-02-14

资助项目:国家海洋局海洋公益专项(200705007);辽宁省科技计划项目(2004203001);大连市科技计划项目(2004BINS030)

作者简介:邓 欢(1957-),辽宁鞍山人,研究员,主要从事海洋动物病害研究。Tel:0411-84691603, E-mail:denghuan6@msn.com

延,致使辽宁地区数家海参育苗场因发生该病而颗粒无收。

2.2 症状

通常浮游幼体发育至大耳状后期,发病幼体胃逐渐收缩,胃壁增厚、粗糙、萎缩变形(图1)、最终收缩似球状,同时伴随幼体摄食能力下降或不摄食,发育迟缓,从耳状幼体到樽形幼体变态率很低,甚至幼体浮游20d以上也不变态。这种病变开始大多发生在第一批幼体孵出后的第5~7天,如果继续用原来的亲参产卵孵化,以后批次的幼体发病期会逐次提早,直至孵化选育后的第1~2天就发病。

2.3 仿刺参带毒检测

应用电镜负染技术共检测5家发生胃萎缩症流行病育苗场的已发病幼体、健康幼体及其相应的亲参。电镜下平均每个视野观察到的病毒数 < 1 表示为 + , = 1 表示为 ++ , > 1 表示为 +++ , ≥ 3 表示为 ++++ (表1)。

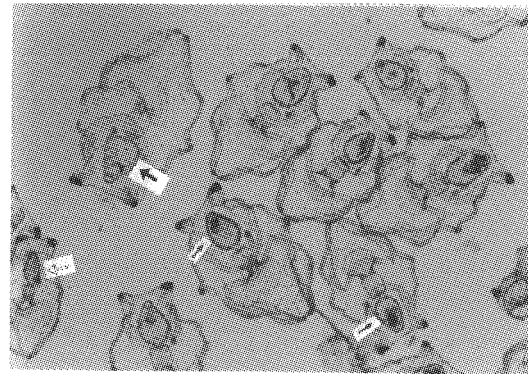


图1 光镜下正常与患病仿刺参耳状幼体的比较

Fig.1 Comparison of normal and diseased larvae under microscope

正常的耳状幼体,胃壁薄、呈梨形(实心箭头);病变耳状幼体,胃收缩、胃壁增厚(小箭头),胃收缩变形严重(空心箭头)
The stomach wall of normal larva showed pyriform thin stomach wall (black arrow), and diseased larvae tended to thick and shrank seriously (white arrow)

表1 仿刺参幼体及亲参负染法检测带毒结果

Tab.1 Detecting results of virus in the *Apostichopus japonicus* larvae and parents by negative staining

养殖场 Farm	幼体 larva	亲参 parents					病毒检出率 % percentage of detected virus
		雌性腺 gonad of female	雄性腺 gonad of male	肠管 intestines	体壁 body wall	呼吸树 respiratory tree	
旅顺基地 Lvshun	++++	+++	++	++++	+++	++	100
		++	++	++++	+++	++	
		+++	++	+++	++	++	
金州三道沟 Jinzhouandaogou	+++	++	+	+++	++	+	100
		++	+	+++	++	+	
		++	+	+++	+	+	
瓦房店三台 Wafangdiansantai	+++	++	+	+++	+	+	100
		++	++	+++	+	+	
		++	+	+++	+	+	
营口鲅鱼圈 Yingkoubayuquan	++	+	+	++	+	+	100
		+	+	++	+	+	
		+	+	++	+	+	
庄河大郑 Zhuanghedazheng	++	++	+	+++	++	+	100
		+	+	+++	++	+	
		++	+	++	++	+	
瓦房店谢屯 Wafangdianxietun	+	++	+	+++	+	+	100
		+	+	+	+	+	
		++	+	++	+	+	
庄河黑岛 Zhuangheheidao	-	-	-	-	-	-	0
		-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	

注:“+”示检出病毒,“-”示未检出病毒

Notes: “+” means detected virus, “-” means undetected virus

5 家育苗场幼体整体匀浆后经负染电镜观察,已发病幼体和健康幼体均带毒,但带毒的数量有所不同,健康幼体带毒相对很少;不同区域幼体带毒数量也具有较明显差异,其中以旅顺地区育苗场发病幼体带毒数量最多、营口和庄河地区两家育苗场发病幼体带毒数量少;较大些幼体(浮游期时间长)比较小幼体(浮游期时间短)带病毒数量多。同时检测每家相应的3只亲参雌、雄性腺,体壁,肠管和呼吸树器官组织也均带病毒,仅在带毒的数量上略有差别,肠管带毒通常高于其它被检器官组织,雌性腺带毒往往多于雄性腺。另外,对瓦房店谢屯和庄河黑岛两家育苗场未发病的浮游幼体和其相应的亲参做电镜负染观察,结果在瓦房店谢屯育苗室的浮游幼体和其相应的亲参中检测到少量的病毒粒子,而在庄河黑岛育苗场的浮游幼体和其相应的亲参中均未检测到病毒粒子。

2.4 病毒粒子形态结构

对发病幼体整体及其亲参性腺、体壁、肠管和呼吸树上清液负染电镜观察可见大量的病毒颗粒存在。从平面看近似六角形或圆形的病毒粒子,直径约75~200 nm。病毒颗粒由一个核心和外面包裹着的囊膜组成,囊膜内可见高电子高密度的核心结构。有实心或空心2种病毒粒子(图版-1,2)。

2.5 幼体整体超薄切片电镜观察

发病幼体整体超薄切片电镜观察显示,病毒粒子主要分布在幼体上皮细胞及结缔组织细胞的胞质中。处于微绒毛内(图版-3)和上皮细胞膜附近(图版-4)的病毒粒子;已成熟的带双层内膜的病毒颗粒和大量实心或空心的似六角形病毒粒子聚集或散乱在胞质中(图版-5,6,7)。随着病毒进入幼体内及上皮细胞,并同时不断地大量繁衍,进而对其侵入的细胞具有十分严重的破坏作用,细胞器不断地崩解而呈中空状,最终导致细胞解体,在呈空白状的胞质内已成熟的具双层内膜的病毒粒子和已脱落的微绒毛(图版-8)。

3 讨论

一般认为,动物在高密度等胁迫条件下养殖,易被病毒侵袭^[7]。而海产动物感染病毒病,主要是在密集养殖条件下引发的^[8-11]。可见,海产经济动物的人工养殖急需规范化。

“胃萎缩症”与以往的浮游幼体“烂胃病”比较,不同之处在于:其一,烂胃病的幼体胃收缩后其周边界限变得模糊不清,严重时整个胃发生糜烂,最终可导致幼体解体死亡;而胃萎缩症幼体显然无胃糜烂现象,有时通过调整饵料结构还可以使部分幼体已收缩的胃逐渐恢复原状。其二,王印庚等^[4]认为一些细菌感染刺参幼体可以导致烂胃病的发生;本文通过电镜负染和超薄切片法均在患胃萎缩症刺参幼体体内观察到球状病毒粒子,病毒个体大小在75~200 nm。对共7家未发病和发生幼体胃萎缩症育苗场的亲参性腺、体壁、肠管和呼吸树器官组织中均检出与其后代健康幼体和发病幼体体内同样形状及大小的病毒这一事实表明,可初步推测病毒很可能是由带毒的亲参通过垂直传播方式直接传染给后代。同时也证实,在正常状态下,带毒较少的子一代可安全地完成稚参、幼参至成参的生长过程。期间病毒始终处于潜伏感染状态,但当环境因子一旦发生改变,病毒和宿主间的平衡将被破坏,由此诱发病毒的大量繁殖而暴发流行性病毒病。生产中,通常细菌病和病毒病的主要区别在于:细菌性疾病在一定程度上具有相对较好的药物可控性,正确使用抗生素和化学消毒剂就会使病情得到有效的控制;而病毒性疾病对抗生素和化学消毒剂的使用几乎没有效果,且病程较短、传染性强,导致高死亡率的特点。可见病毒是危害非常严重的一类病原。在此提醒生产者主要应从预防上避免病毒病的发生。首先,亲参的选取是关键。研究中发现:正常情况下,带毒的海参不会表现出不健康状态,因此,通过科学的手段随机取样对待作为亲参的海参进行带毒检测十分必要,或最好到非疫病区购买亲参;其次,要做好病毒病的预防工作。除加强科学管理,尤为重要的还应定期使用既能增强动物自身免疫力,又能改善动物的生存环境的无残留、毒副作用小的中草药和改善生态环境的微生态制剂。

迄今为止,与本文研究的该病毒外观形态相类似的病毒感染文献^[12-17]较多,要确定某种病毒的分类地位不能仅凭病毒的形态学和感染的靶组织,还需对病毒的核酸特性、免疫学和分子生物学等进行更深入地研究。有关该病毒粒子的致病性,发生“胃萎缩症”与环境因子、饵料的相关性等都有待于在今后的工作中进行更深入地研究。

参考文献:

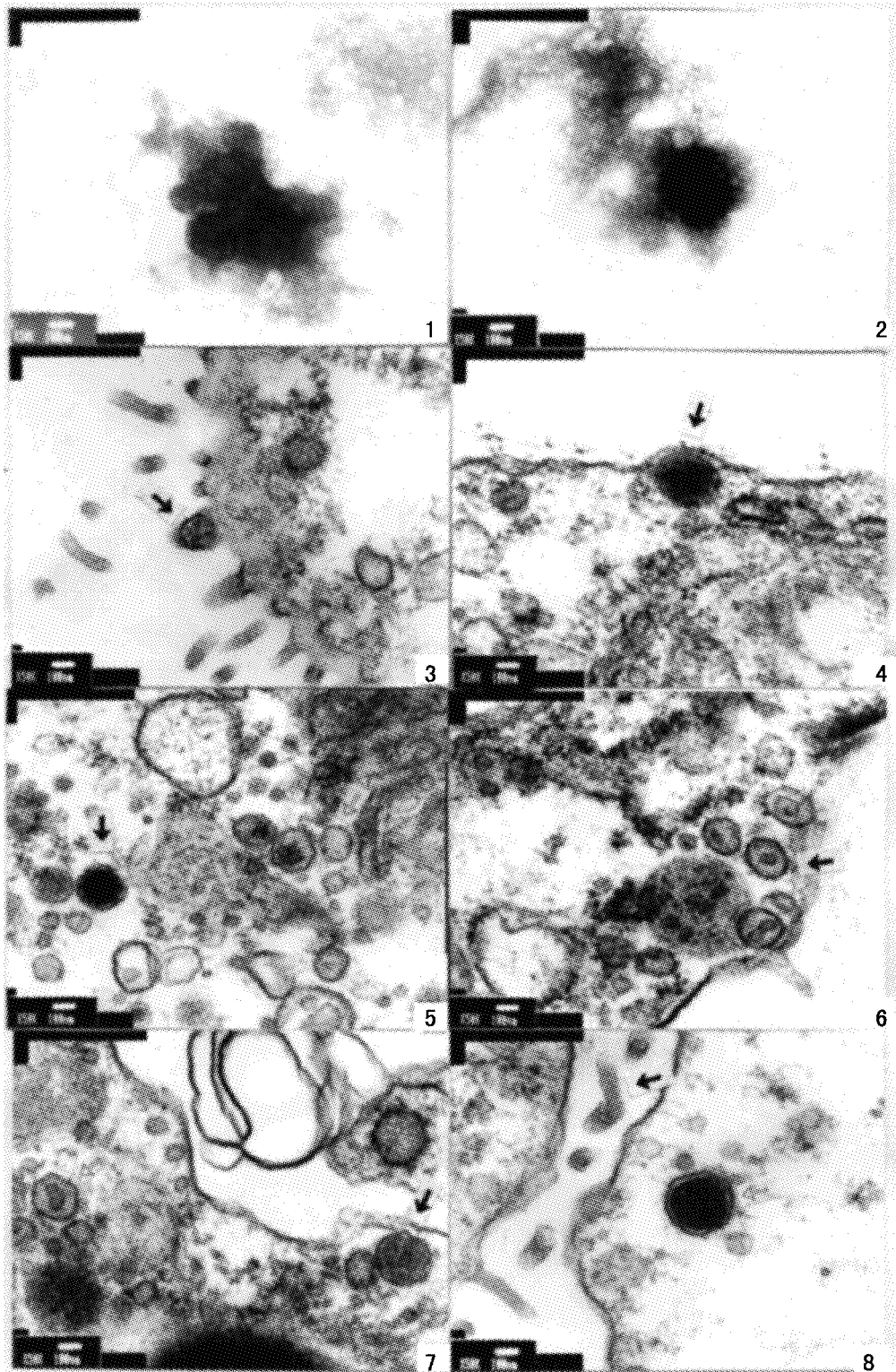
- [1] 张春云,王印庚,荣小军,等.国内外海参自然资源、养殖现状及存在问题[J].海洋水产研究,2004,25(3):89-97.
- [2] 战文斌,俞开康.海参和海胆的疾病[J].海洋湖沼通报,1993,1:95-100.
- [3] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, et al. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata) [J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4):13-30.
- [4] 王印庚,孙素凤,荣小军.仿刺参幼体烂胃病及其致病病原鉴定[J].中国水产科学,2006,13(6):908-616.
- [5] 邓欢,隋锡林.刺参育苗期常见疾病[J].水产科学,2004,23(3):40.
- [6] 王印庚,荣小军,张春云,等.养殖海参主要疾病及防治技术[J].海洋科学,2005,29(3):1-7.
- [7] 张奇亚,李正秋,江育林,等.中华鳖病毒病原的发现[J].科学通报,1996,41(21):1987-1990.
- [8] 涂小林,钟江,高双诚,等.中国对虾一种杆状病毒的ELISA检测方法[J].水产学报,1995,19(4):315-321.
- [9] 江育林,李燕,李正秋.鲤痘疮病病原的电镜观察初报[J].水生生物学报,1991,15(2):193-195.
- [10] 何建国,翁少萍,黄志坚,等.鳃暴发流行病病毒性病原研究[J].中山大学学报(自然科学版),1998,37(5):74-77.
- [11] 邓欢.刺参体内的新病原——一种球状病毒[J].水产科学,2006,25(1):30-31.
- [12] 张奇亚.我国水生动物病毒病研究概况[J].水生生物学报,2002,26(1):89-101.
- [13] 王品红,常亚青,徐高蓉,等.刺参一种囊膜病毒的分离及其超微结构观察[J].中国水产科学,2005,12(6):766-771.
- [14] 王斌,李霞.皱纹盘鲍一种球形病毒的感染及其发生[J].中国病毒学,1997,12(4):360-363.
- [15] 李霞,王斌,刘淑范,等.一种球状病毒对近海几种贝类的感染[J].大连水产学院学报,2000,15(2):86-91.
- [16] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等.栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J].水产学报,2002,26(2):180-184.
- [17] 姜静颖,高悦勉.海湾扇贝面盘幼虫“面盘解体病”病原的研究[J].中国水产科学,2004,11(1):31-36.

图版说明

1. 发病幼体整体匀浆负染电镜观察,示5个病毒粒子,×50 000; 2. 亲参组织匀浆负染电镜观察,示病毒粒子,×50 000; 3. 示一个已进入上皮细胞微绒毛内的病毒粒子(箭头),×50 000; 4. 示一个靠近上皮细胞膜的成熟的球形病毒粒子(箭头),×50 000; 5. 示散乱分布在近于崩解细胞内的带囊膜的成熟的球形病毒粒子(实心箭头),中空型病毒粒子(空心箭头),×50 000; 6. 示细胞器几乎完全溶解消失细胞内的似核型病毒粒子(箭头),×50 000; 7. 示大量病毒粒子存在于已崩解的幼体胃组织上皮细胞中,细胞内裸露的病毒粒子(实心箭头),正在装配中的似六角型的病毒粒子(空心箭头),×50 000; 8. 示近于呈空白状的细胞内带囊膜的成熟病毒粒子(空心箭头),幼体上皮细胞微绒毛脱落(实心箭头),×50 000

Explanation of Plates

1. Five naked virions on homogenate sample by negative staining, ×50 000; 2. Electronical photographs of negatively stained virus of the parents, ×50 000; 3. A mature virion which was moving toward the cell, passing through the microvilli and releasing outwards (arrow). ×50 000; 4. A spherical virion was passing through the nearly disgrated epithelial cell membrane and releasing outwards (arrow), ×50 000; 5. The mature spherical virions with envelope distributed dispersedly in the apoptosis cell (black arrow), the virions with vacant middle part (white arrow), the mitochondria engorged and ridges reduced (black arrow), ×50 000; 6. The nuclear virus in the cell with almost disjointed organelle (arrow), ×50 000; 7. The naked virions in the cracked stomach epithelium cell (black arrow), packing nearly hexagonal virions (white arrow), ×50 000; 8. Electronical photographs of ultrathin sections of diseased larva, mature virions with envelope in the almost blank cell white arrow), the microvilli of epithelial cells of larva desquamated (black arrow), ×50 000



图版 病毒负染及超薄切片的电镜观察

Plate The observation of virions by negative staining and ultrathin sections

An observation on the pathogeny of stomach atrophy in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) larva by electron microscope

DENG Huan, ZHOU Zun-chun, HAN Jia-bo

(Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute,

Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Dalian 116023, China)

Abstract: From May to June in 2006, an epidemic disease named stomach atrophy syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus* occurred widely in Liaoning area during the hatching period. The influence area was large and mortality was high and no efficient remedy to control the development and spread of this epidemic. This epidemic occurred mainly at 5 to 7th days after larvae hatching. With the increasing of spawn times, the infected time became ahead and the larvae were diseased after being hatched 1 to 2 days. The stomach of diseased larvae shrunk gradually and the stomach wall tended to thick, rough and distorted till the stomach became nearly small globosity. In order to understand the kinds of pathogeny, the *A. japonicus* larvae and their parents were detected by the observations of negative stained samples and ultrathin sections. The tissue homogenate was prepared from the *A. japonicus* larvae and the tissue of their parents. The tissue samples were centrifuged ($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 8 min) twice after homogenizing, freezing and thawing. The supernatant solution was dripped on to a copper net and stained with 2% PTA for 5min and observed with electron microscopy. The diseased animals were also fixed in 2.5% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide solution. Samples were dehydrated and transferred into Epon 812 resin and then cut. Sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and observed. The observed results showed that amount of virus particles were observed on negative staining samples in the larvae homogenate, and most of them are approximately 75 – 200 nm in diameter. The virus particles were also found in the gonad, body wall, the alimentary canal and the respiratory trees of corresponding parents hatched the larvae. Farther examination of larvae by electron microscopic observation of ultrathin sections showed that the virus affected mainly the connective tissue cells and epithelial cells. The virions were approximately spherical or hexagonal with envelope, and the core structures with high electron densities in the envelope were observed. The gonad, the body wall, the intestines and the respiratory tree of paternal and maternal parents were also observed by negative staining. The results showed that this kind of virion located in all the tested organs and tissues.

Key words: *Apostichopus japonicus*; stomach atrophy; virus