

文章编号:1000-0615(2002)04-0307-05

冰冻斑节对虾体内病毒侵染中国对虾的电镜观察

于春霞, 王安利, 王维娜, 李凤超, 郭明申

(河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 用市售冰冻斑节对虾中头胸甲有白斑的病虾做感染源, 对中国对虾仔虾进行人工感染, 通过电子显微技术, 对中国对虾仔虾的肝胰腺细胞进行观察研究。结果表明: 冰冻斑节对虾体内的杆状病毒能够使中国对虾致病, 其发病程度与对虾养殖密度有关。从病毒基质发生到形成完整的病毒粒子及侵染大致分 4 个阶段: 病毒基质发生期、病毒囊膜形成期、病毒粒子装配期、病毒粒子再度侵染期。同时观察中还发现了一些可能与病毒形成有关的特殊物质, 如绒团物和冰晶状物等。

关键词: 斑节对虾; 中国对虾; 杆状病毒; 病毒侵染

中图分类号: S945.1 文献标识码: A

Electron microscopy of viruses in frozen *Penaeus monodon* which infects *Penaeus chinensis* postlarvae

YU Chun-xia, WANG An-li, WANG Wei-na, LI Feng-chao, GUO Ming-shen

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: *Penaeus chinensis* postlarvae are artificially infected by baculoviruses from *Penaeus monodon*. Frozen *Penaeus monodon* harboured baculovirus used in the experiment came from the Fuhe Baoding market. The hepatopancreatic cells were observed. The results show that the baculovirus can infect *Penaeus chinensis* and the degree of illness is related with the density of cultivation. We find that *Penaeus chinensis* postlarvae infected by baculovirus can be divided into four stages: 1. formation period of virogenic stroma; 2. virus envelope formation period; 3. maturation period of viral particles; 4. infection period. At the same time, some special material which is connected with viral formation was observed.

Key words: *Penaeus monodon*; *Penaeus chinensis*; baculovirus; virus infection

对虾养殖是我国海水养殖的支柱产业^[1], 它已成为普及面广, 发展速度快, 产值高, 出口创汇率多的产业之一^[2]。然而, 近年来由于主要养殖地区的虾池老化, 环境污染, 赤潮频繁, 生态失衡, 疫区扩大, 疾病频发, 投入增加, 使得对虾养殖业面临新的挑战, 尤其是暴发性流行病带给养虾业灾难性的后果^[3]。流行病暴发的特点是发病快, 死亡率高, 蔓延广, 时间长, 危害严重^[4]。

疾病的流行严重影响着对虾养殖业的发展, 现有资料表明: 引起养殖对虾暴发性流行病的一个重

收稿日期: 2001-05-09

资助项目: 河北省首批重大科技攻关计划项目(85-93-29)

作者简介: 于春霞(1976-), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 主要从事水产养殖及病害防治研究。Tel: 0312-5079617, E-mail: chunxiayu2000@163.com

要原因是病毒感染^[1]。对虾类病毒病的研究已成为当前水产养殖动物病害研究领域中的热点^[5]。已见报道的对虾病毒有15种之多,如斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon* type baculovirus, MBV)^[6,7],中肠腺坏死杆状病毒(midgut gland necrosis type baculovirus, BMNV)^[8],传染性皮下组织和造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and haemopoietic necrosis virus, IHHNV)^[9]等。分属于6个病毒科^[1],其中杆状病毒科^[10]比例最多,家族最大,危害最重^[11],半数以上的对虾病毒都归属此科^[1]。因此,清楚了解杆状病毒对虾体的侵染是非常必要的。

实验以市售冰冻斑节对虾中头胸甲有白斑的病虾作为感染源,人工感染中国对虾,通过电子显微技术,研究斑节对虾中杆状病毒侵染中国对虾引起的细胞核内外病理变化及病毒侵染过程。

1 材料和方法

1.1 材料

头胸甲有白斑的冰冻斑节对虾购自保定府河市场,中国对虾仔虾从浙江空运而来。购回的斑节对虾于 -84°C 的低温下保存。中国对虾仔虾在实验室养殖15d,然后进行感染实验。

1.2 方法

1.2.1 养殖条件

规格为 $60\text{cm}\times 30\text{cm}\times 45\text{cm}$ 的水族缸Ⅰ和水族缸Ⅱ,缸内海水的体积为 $60\text{cm}\times 30\text{cm}\times 5\text{cm}$,以充气球供氧。用广东省徐闻县生产的高级海水晶配制成为盐度为25的海水,每升水补1g氯化钙。

1.2.2 感染实验

随机取正常脱壳生长、健康无病的中国对虾仔虾120尾,放入Ⅰ和Ⅱ号水族缸中,Ⅰ号缸80尾,Ⅱ号缸40尾。饿食1d后,直接投喂发病的斑节对虾的肝胰腺及头部肌肉,在 $20\sim 24^{\circ}\text{C}$ 的温度条件下养殖,大约7d后Ⅰ号缸仔虾死亡率达50%以上,而Ⅱ号缸仔虾死亡率仅为5%。其生活条件均为温度: $20\sim 24^{\circ}\text{C}$,pH 8.3~8.5,盐度25。正常仔虾生活条件与上相同,不同的是喂食卤虫和线虫。

1.2.3 电镜制片及观察

分别从Ⅰ号缸和Ⅱ号缸中取感染第八天活的中国对虾仔虾肝胰腺,切成 $1\sim 2\text{mm}$ 的小块,用 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 下保存的磷酸缓冲液配成的2.5%戊二醛液固定 $1\sim 2\text{h}$ 后,经 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液漂洗,锇酸固定1h,然后顺浓度梯度酒精脱水,Epon 812包埋剂浸透、包埋、聚合,在ULTRACUTE超薄切片机上切片,切片经醋酸铀和柠檬酸铅双染色,切片在JEM-100SX透射电子显微镜下观察、拍照。

2 结果与讨论

经人工感染的中国对虾仔虾的发病症状主要表现为:摄食减少,不喜进食,排便减少,行动迟缓,反应慢,肠道空,胃部发白,死虾头部及躯干部发白等。发病症状与天然发病的病症相同,而实验所养的正常仔虾无以上症状。

从温州空运来的仔虾中随机取样,测得其每尾平均湿重为 0.026g ,平均体长为 6.5mm ,饲养27d每尾平均湿重为 0.040g ,体长平均 9.1mm ,养到第47d后仔虾每尾平均湿重为 0.052g ,平均体长 15.7mm 。

以上数据表明仔虾在这样的环境下能正常生长,不发病,从而为感染实验提供了正常对照。而Ⅰ号缸和Ⅱ号缸的养殖条件相同,不同的是所喂食物不一样,给Ⅰ号和Ⅱ号两缸仔虾喂食有病的斑节对虾的肝胰腺及头部肌肉,发病斑节对虾的头胸甲其有白色斑点(图版-1),从而引起中国对虾发病死亡。

将有病的斑节对虾的去壳头胸部离心提纯后进行负染,可以发现不带囊膜的具横纹的杆状病毒核衣壳(图版-2),从而证明从府河市场所买的发病斑节对虾具有病毒,将Ⅰ号和Ⅱ号缸感染后的中国

对虾活仔虾的肝胰腺切片染色后进行电镜观察,发现不论在细胞核中,还是在细胞质中,都有正在组装和组装完整的杆状病毒存在(图版-3)。这样进一步说明中国对虾仔虾能够被斑节对虾杆状病毒侵染。

电镜观察 I 号缸中国对虾的肝胰腺切片,发现 I 号缸仔虾发病明显,不仅细胞核变形显著,而且细胞核中也有大量的病毒粒子,包括具囊膜的组装完整的杆状病毒粒子和未组装完整的不具囊膜或只有囊膜的病毒粒子,细胞质中也有游离的病毒粒子(图版-3)。相比之下,II 号缸仔虾的发病特征不甚明显。虽然切片中在细胞核内外也能检测出病毒粒子,但其数量远远不及 I 号缸的切片。产生这种现象的原因是 I 号缸较 II 号缸的养殖密度大,因此 I 号缸对虾仔虾之间增加了攻击性行为,同时由于养殖密度大加剧水环境的恶化,这样就增大了杆状病毒侵染的机会。相反,由于 II 号缸养殖密度较 I 号缸小一半,这样就使得 II 号缸对虾排泄废物少,产生的氨氮及硫化氢等有害物质少,从而使其水质较好。仔虾虽被喂食带杆状病毒的斑节对虾的去壳头胸部组织,但发病并不明显,原因可能是仔虾在被侵染过程中自身的免疫力得到了增强,从而导致杆状病毒在仔虾体内潜伏时间长,不易发病且症状较轻。

通过电镜观察发现被侵染的中国对虾仔虾肝胰腺细胞的发病程度不一,推测其病毒从发生到成熟并侵染大致经过 4 个阶段:

病毒基质发生期:首先细胞核变形,而且变形程度不同。图版-4 所示,一绒团状物质准备侵入变形的细胞核,推测这一绒团状物质与病毒发生基质有密切关系。该核旁边存在大量脂肪滴和大小不等的液泡,粗面内质网较少,脂滴边缘存在膜状结构。我们认为此细胞为 R-cell,由此说明 R-cell 易受侵染,这与陈细法等^[12]和王维娜等^[13]的研究结果一致。此核中央区电子密度明显降低(中央亮区),核上方有凝聚的团状物质,核内边缘分布着许多压缩在一起的核仁和染色质,说明这可能是病毒发生基质前期。通过观察其他的细胞核(图版-5),我们还发现绒团物侵入细胞核后,核变得更不规则,核周围有大量的液泡,而少脂肪滴。液泡并非如有些文献所报道的那样,空斑的出现是细胞被严重侵染的表现。今证实所谓空斑实际就是上述的液泡。这种细胞是仔虾肝胰腺中存在的又一类型细胞——B-细胞 cell^[13]。

此杆状病毒引起中国对虾感染的前期主要病变为细胞核肥大、畸形,核膜增厚,染色质着边、缩小,核仁解体分离,胞质中的细胞器分布散乱、不均,胞质局部水肿,线粒体形态不一,有的体积很大,有的嵴很少,有的分枝成树状。但线粒体的这种变化是否因病毒侵染引起还有待于进一步证实。研究发现不同类型细胞的线粒体数量、形态都有所不同。

病毒囊膜形成期:核中央亮区出现散在的电子致密区,核中出现了大量的病毒囊膜、少数正在装配的病毒粒子和已装配完整的杆状病毒粒子。值得一提的是在许多囊膜旁边也有许多电子致密物质,这些物质可能就是病毒发生基质。图版-6 所示为整个细胞核都有病毒在装配,病毒发生基质充满整个细胞核。

病毒粒子装配期:核内完整的病毒粒子明显增多,而囊膜的比例减少,这时核膜逐渐瓦解消失,有少量组装完整的杆状病毒粒子已穿过核膜游离于胞质中。纵观核内众多的杆状病毒,大部分具备装配完全的核衣壳和囊膜,成为完整的杆状病毒,但也有小部分未组装完整的病毒,有的没有被注入核酸,有的只具囊膜,有的只有蛋白质衣壳。病毒粒子的形状也千奇百怪,有的病毒粒子膜顶端有小突起,有的病毒囊膜边缘凹陷,图版-7 所示众多杆状病毒的横切和纵切以及整个核中病毒的密集和侵染状况。成熟的杆状病毒大小为 $200 \sim 340\text{nm} \times 87 \sim 100\text{nm}$,而核衣壳(未带囊膜)为 $127 \sim 300\text{nm} \times 55 \sim 90\text{nm}$ 。在受染细胞核边缘及胞质中有大量的冰晶状物(图版-8),其功能尚不明确。陈细法等^[12]曾将其称之为纤丝状物质,认为这很可能是组成囊膜和衣壳的蛋白质或前体。除此以外,我们还认为其功能也可能与病毒的复制及侵染过程有密切关系。

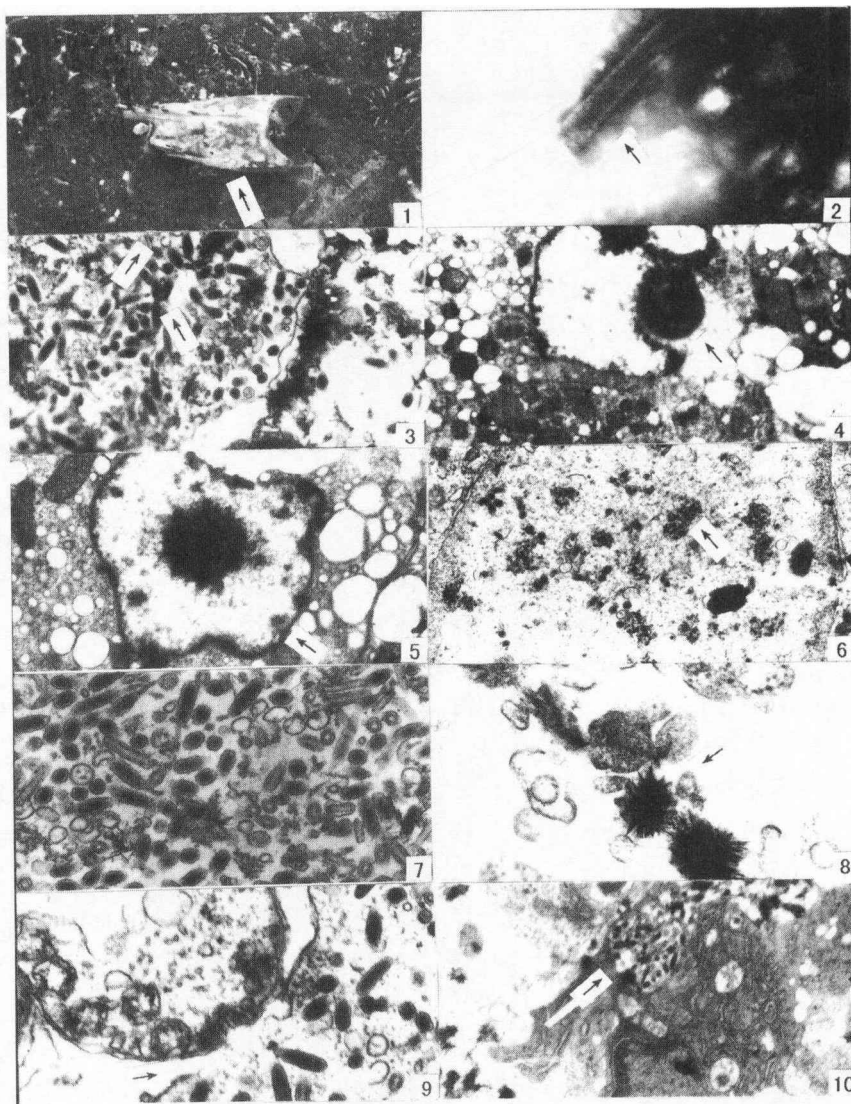
病毒粒子再度侵染期:组装完整的杆状病毒粒子通过核孔或破碎的核膜外释放进细胞质中,对胞质中的细胞器进行侵染(图版-9)。图中显示出细胞器的器膜已有部分被溶解。成熟的杆状病毒粒子

准备进入。同时,我们在细胞质中发现了自成一体的单元,张建红等^[14]曾称之为封人体。“封人体”一般是指在胞质内伴随病毒粒子并具有双层膜的蛋白质结构。我们发现封入体内也有组装完整和未组装完整的杆状病毒存在(图版-10)。封人体对病毒发生、复制和侵染所起作用尚待进一步研究。

由以上结果可以说明杆状病毒侵染中国对虾仔虾以细胞核为基地,使细胞核变形,染色质凝聚着边,然后杆状病毒的核酸注入细胞核并在核内进行复制与装配,最终使核膜破裂,病毒粒子散布于胞质中形成新的感染源,继之侵染胞质中的细胞器和其它细胞。

参考文献:

- [1] Zhang Q Y. Generalization of research on virus diseases of *Penaeus* between internal and external countries[J]. *Modern Fisheries Information*, 1995, 10(10): 1-6. [张奇亚. 国内外对虾病毒病研究综述[J]. 现代渔业信息, 1995, 10(10): 1-6.]
- [2] Yu Z G. Analysis on the pathogeny of the outbreaking epidemic disease of *Penaeus* shrimp and its precautionary countermeasures[J]. *Marine Environmental Science*, 1995, 14(2): 53-60. [于占国. 对虾暴发性流行病的病因及预防对策分析[J]. 海洋环境科学, 1995, 14(2): 53-60.]
- [3] Chen X F, Wu D H, Huang H, et al. Electron microscopic observation on cytopathologic changes in hepatopancrea epithelial cells infected by MBV[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(4): 265-269. [陈细法, 吴定虎, 黄槐, 等. 草虾感染草虾杆状病毒(MBV)后肝胰腺上皮细胞病理变化的电镜观察[J]. 水产学报, 1994, 18(4): 265-269.]
- [4] Song S Y, Zhang C, Shen M S, et al. Experimental infection of kuruma shrimp *Penaeus japonicus*, with baculovirus[J]. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 1994, 33(5): 696-699. [宋思扬, 张驰, 沈明山, 等. 日本对虾杆状病毒人工感染初探[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, 33(5): 696-699.]
- [5] Lei Z W, Huang J, Yang B, et al. Status quo of research on virus diseases of shrimp[J]. *Marine Fisheries Research*, 2000, 21(2): 77-83. [雷质文, 黄捷, 杨冰, 等. 对虾病毒病的研究现状[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(2): 77-83.]
- [6] Lightner D V, Redman R M. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Invertebr Pathol* 1981, 16(38): 299-302.
- [7] Chen X F, Wu D H, Huang H, et al. Pathological characteristics and diagnostic value of virus co-infection with bacteria in cultured shrimp[J]. *Chinese Journal of Virology*, 1997, 13(4): 146-150. [陈细法, 吴定虎, 黄槐, 等. 对虾病毒病和细菌合并感染的病理特点和诊断价值[J]. 病毒学报, 1997, 13(4): 146-150.]
- [8] Sano T, Nishimura T, Oguma K, et al. Baculo virus in Japan[J]. *Fish Pathol*, 1981, 15(2): 185-191.
- [9] An B C, Du R B. Technology of marine cultivation on desirable fish shrimp and crab[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997. 220-221. [安邦超, 杜荣斌. 海水名优鱼虾蟹养殖技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 220-221.]
- [10] Meng Q X. Therapeutic handbook on diseases of *Penaeus* shrimp[M]. Qingdao: Publisher of Ocean University of Qingdao, 1991. 80-87. [孟庆显. 对虾疾病防治手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. 80-87.]
- [11] Ru S G, Jiang M, Li Y Q, et al. Electron microscopy of baculovirus propagation in hepatopancreatic epithelial cytoplasmic of *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1996, 26(1), 21-23. [汝少国, 姜明, 李永祺, 等. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)肝胰腺上皮细胞质中杆状病毒增殖的电镜观察[J]. 青岛海洋大学学报, 1996, 26(1), 21-23.]
- [12] Chen X F, Chen P. Ultrastructure research on virogenic stroma of baculovirus in *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Electron Microscopy*, 1994, 12(5): 359-361. [陈细法, 陈平. 斑节对虾杆状病毒发生基质的超微结构研究[J]. 电子显微学报, 1994, 12(5): 359-361.]
- [13] Wang W N, Wang A L, Wei X H, et al. Studies on the ultrastructure of hepatopancreas cells of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997, 43(Suppl.): 39-44. [王维娜, 王安利, 魏谊辉, 等. 日本沼虾肝胰腺细胞超微结构的研究[J]. 动物学报, 1997, 43(增刊): 39-44.]
- [14] Zhang J H, Chen D H, Xiao L C, et al. Infection and morphogenesis of non-inclusion body baculovirus from *Penaeus orientalis kishinouye in vivo*[J]. *Virologica Sinica*, 1994, 9(4): 362-365. [张建红, 陈棣华, 肖莲春, 等. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生[J]. 中国病毒学, 1994, 9(4): 362-365.]



图版说明 Explanation of Plate

1. 有白色斑点的斑节对虾头胸甲(光镜); 2. 从斑节对虾中提纯的具横纹杆状病毒, $\times 80\ 000$; 3. 变形细胞核中的大量病毒, $\times 15\ 000$; 4. 融团状物正准备侵入变形细胞核, $\times 5\ 000$; 5. 融团状物侵入到变形细胞核, $\times 6\ 000$; 6. 大量囊膜及病毒发生基质, $\times 10\ 000$; 7. 杆状病毒粒子形态、数量, $\times 25\ 000$; 8. 胞质中的冰晶状物, $\times 40\ 000$; 9. 准备侵入细胞器的杆状病毒, $\times 25\ 000$; 10. 胞质中形成的杆状病毒“封人体”, $\times 10\ 000$.

1. Head and breast shell of *Penaeus monodon* having white spot (optical microscope); 2. Baculovirus purified from *Penaeus monodon*, $\times 80\ 000$; 3. A lot of baculovirus in altered hepatopancreatic cell nucleus, $\times 15\ 000$; 4. Cotton material having been into shapeless cell nucleus, $\times 5\ 000$; 5. Cotton material coming into shapeless cell nucleus, $\times 6\ 000$; 6. A lot of envelope and virogenic stroma in a complete nucleus, $\times 10\ 000$; 7. Shape and quantity of baculovirus, $\times 25\ 000$; 8. Ice crystal in cytoplasmic, $\times 40\ 000$; 9. Baculovirus infecting organelle, $\times 25\ 000$; 10. The formed baculovirus "body" in cytoplasmic, $\times 10\ 000$.