

养殖杂色鲍暴发病超微病理学研究

王江勇^{1,2}, 郭志勋¹, 冯娟¹, 刘广锋¹, 徐力文¹, 陈毕生¹, 潘金培²

(1.中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2.中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

摘要: 从1999年至2002年在中国南方沿海许多养殖场的杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)出现了严重的疾病, 该病可感染各种规格的鲍, 死亡很快, 死亡率高。病鲍的外观症状表现为外套膜收缩, 腹足表面变黑, 肌肉变得僵硬。通过电镜观察, 在肝胰腺、外套膜、肾、鳃及肠等组织中发现了一种球状病毒。病毒粒子大小为100~130 nm。该病毒一般存在于间质细胞的细胞质中, 为双层质膜所包裹。染病鲍细胞器如滑面内质网扩张、线粒体崩解, 糖原粒、核糖体减少, 核膜疏松、溶解、消失, 核质边缘化。病毒的病原性通过对健康鲍的感染试验得到证实。

关键词: 病毒; 病原; 病理学; 杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve)

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2007) 03-0028-05

世界上导致不同的鲍类产生严重疾病的许多病原都已经被报道过。Otsu等^[1]利用电镜观察到患病皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*)神经干附近的细胞质中存在类病毒粒子。Nakatsugawa等^[2]从患病盘鲍血细胞中分离到与反转录病毒形状和大小类似的病毒粒子, 但该分离到的粒子不再引发疾病。李霞等^[3, 4]在患“裂壳病”的皱纹盘鲍中发现一种球状病毒, 王江勇等^[5]报道了杂色鲍有类似病原但个体较大的病毒。1999年在福建东山九孔鲍暴发病时发现了3种球状病毒^[6], 宋振荣等^[7]研究了引起九孔鲍(*Haliotis diversicolor aquatilis*)大量死亡的病原, 人工感染试验结果表明病毒是致病病原。

杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)的养殖在中国南方沿海发展迅猛, 尤其在广东省, 它成为最具开发价值的海水养殖品种之一, 在集约式、高密度、工厂化养殖过程中发生流行性鲍病毒病, 许多养殖场遭受了重大损失。作者报道了该病的病原及病鲍组织细胞超微病理变化。

1 材料与方法

1.1 样品

2000~2002年, 患病鲍取自广东省沿海各鲍养殖

场。

试验健康鲍取自从未发过病的广东省潮阳兴业养殖有限公司, 经实验水槽暂养5 d后用于试验。

1.2 人工感染试验

1.2.1 病原制备

常规解剖病鲍, 取内脏软组织部分, 剪碎后, 置组织匀浆器中4 ℃研磨适度, 加入pH7.6的PBS, 在冷冻离心机中4 ℃以5 000 r/min的转速离心15 min, 弃沉淀, 上清以8 000 r/min的转速离心30 min, 弃沉淀, 上清液0.2 μm细菌过滤器过滤, 加入双抗溶液。

1.2.2 感染试验 1

感染试验共分6组, 第1、2组健康鲍各10只, 用微量注射器从足肌分别注射滤液0.05 mL和0.1 mL, 饲养温度为17~18 ℃。第3~6组每组10只, 每只健康鲍注射0.05 mL, 共注射40只, 分别饲养于水温为17, 20, 23, 26 ℃的玻璃缸中。

收稿日期: 2004-04-08; 修回日期: 2004-06-21

基金项目: 广东省重大科技攻关资助项目(2KB05301N)

作者简介: 王江勇(1971-), 男, 湖南新宁人, 助研, 硕士, 从事海洋生物病害防治研究工作, E-mail: wjy606@sohu.com;

陈毕生, 通讯作者, E-mail: chenbs309@163.com

取健康鲍内脏软组织部分，剪碎匀浆，步骤与上述完全相同，用上清液注射 10 只健康鲍，设为对照组 1。对照组 2 为 10 只健康鲍，每只注射 0.1 mL PBS，饲养水温为 17~18℃。

1.2.3 感染试验 2

用与 1.2.1 相同的方法制备病鲍上清液，分装入 4 个培养皿中，每个培养皿 1 mL，置于 20W 的紫外灯下照射，照射时间分别为 15，30，45，60 min。另设对照组：未经紫外线处理，室温下放置 30 min。每组分别注射 10 只健康鲍，饲养温度为 17~18℃。

试验用海水质量密度为 1.024，pH 8.0~8.2，整个试验期间充气、不换水、不投饵料。

1.3 电镜样品的制备

1.3.1 超薄切片

采集自然感染和试验感染的病鲍，分别取肝胰腺、腹足、外套膜、肾脏、鳃、肠等组织器官切成 1 mm³ 的小块，用 2.5%戊二醛固定，样品经磷酸缓冲液冲洗后，再用 1%锇酸固定液固定，梯度酒精脱水，Epon812 包埋，LKB 超薄切片机切片，经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后，PhilipsCM10 透射电镜观察并拍照。

1.3.2 电镜负染样品

将病鲍去腹足，取其内脏、外套膜及鳃组织置于匀浆器中捣匀（匀浆器置于放有冰块的烧杯中），加 pH 7.6PBS。在冰冻离心机中以 5 000 r/min 的速度离心 15 min，温度 4℃，弃沉淀。将上清液以 8 000 r/min 的速度离心 30 min，弃沉淀。将上清液以 40 000 r/min 的速度离心 60 min，将上述沉淀滴在 Formvar 膜覆盖的铜网上，用 pH7.2 磷酸铀负染后，再进行电镜观察，拍照。

2 结果

2.1 病鲍症状观察

鲍病刚发生时，养殖池内出现较多泡沫（图 1-1），病鲍腹足表面变黑，触角收缩，鳃瓣色淡，肝胰腺部分萎缩，头部伸出，嘴张开、微外翻；鲍死后仍然紧贴于鲍笼或池底。或部分腹足僵硬，附着不牢，腹足表面粘液层消失（正常鲍腹足表面有滑腻感），外套膜边缘脱落，部分向内萎缩（图 1-2）。

2.2 人工感染试验

人工感染试验进行了 5~7 d，鲍死亡情况记录如表 1、2。

表 1 不同水温下感染杂色鲍的累计死亡数

Tab.1 The cumulative mortality of experimental infection of *Haliotis diversicolor* Reeve at different water temperatures

组别	死亡数（只）			
	饲养时间(h)			
	24	48	72	96
第 1 组	0	2	7	10
第 2 组	0	3	9	10
第 3 组	0	4	8	10
第 4 组	0	5	8	10
第 5 组	0	0	0	0
第 6 组	0	0	0	0
对照第 1 组	0	0	0	0
对照第 2 组	0	0	0	0

从表 1 中可以看出，第 1 组至第 4 组感染饲养水温在 20℃ 以下，第 2 天始出现死亡，到第 4 天全部死亡，死亡率为 100%。第 5、第 6 组饲养水温在 23℃ 以上，在试验期间，全部存活。对照组注射健康鲍组织匀浆上清液，饲养温度在 20℃ 以下，全部存活。

表 2 紫外线处理后感染杂色鲍的累计死亡数

Tab.2 The cumulative mortality of experimental infection of *Haliotis diversicolor* Reeve after ultraviolet treatment

组别	死亡数（只）					
	饲养时间 (h)					
	24	48	72	96	120	144
15 min	0	0	0	2	5	10
30 min	0	0	0	0	0	0
45 min	0	0	0	0	0	0
60 min	0	0	0	0	0	0
对照组	0	0	5	10	10	10

从表 2 中可以看出，用紫外线处理 15 min 的病鲍悬液注射的健康鲍，在第 4 天出现死亡，在第 6 天内全部死亡，死亡率 100%；用紫外线处理 30 min 以上的组别全部存活。对照组在第 4 天内全部死亡，死亡率 100%。

2.3 相关病变器官的超微结构观察

2.3.1 细胞核

在感染较轻的肾、外套膜等靶器官的结缔组织中细胞核变化主要表现为两种类型: a. 细胞核肥大或形状异常, 核质边缘化, 提示核内染色质和 DNA 的凝

集; B. 细胞核固缩, 核膜基本溶解, 整个细胞核呈电子致密状。在感染严重的细胞中, 核膜消失, 细胞核内物质崩解, 在电镜下呈现高度电子致密体 (图 1-3, 1-4)。

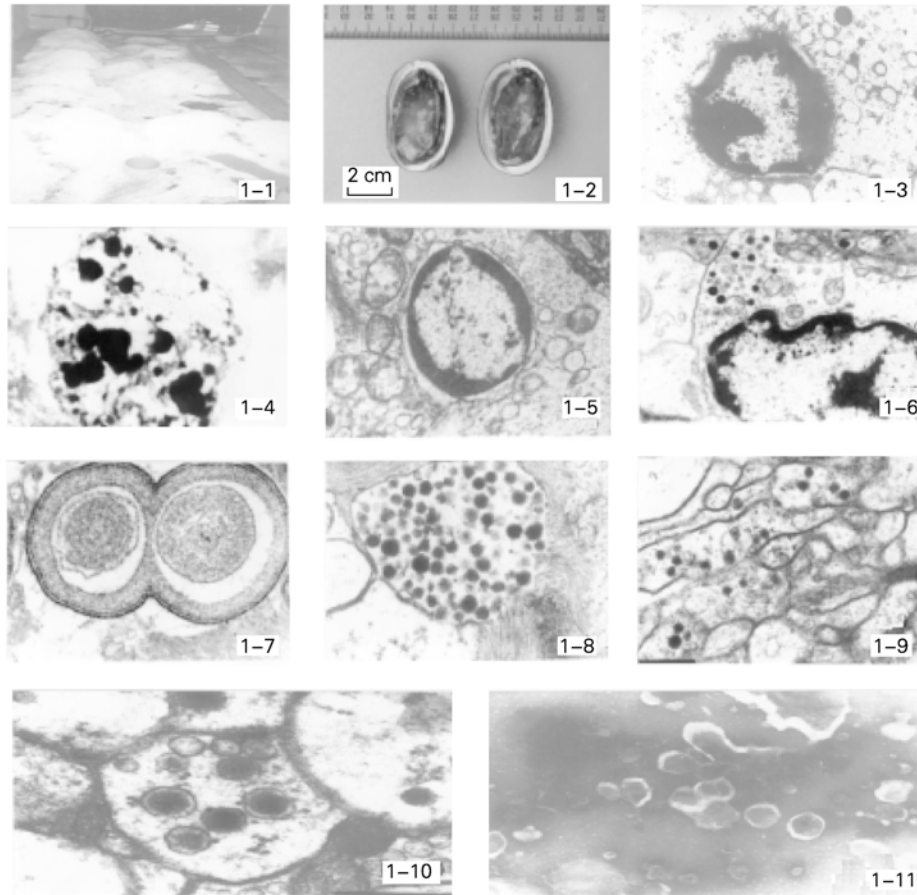


图 1 暴发病发生后病鲍外形及病原、病理变化

Fig.1 The figure and pathogen, and ultrastructural pathology of *Halotis diversicolor* Reeve after outbreaking disease occurred

1-1. 发病鲍池充满泡沫; 1-2. 病鲍腹足、外套膜萎缩; 1-3. 感染细胞, 显示细胞核肿胀, 核质边缘化, 细胞器溶解, $\times 28000$; 1-4. 严重感染的细胞, 示细胞核崩解, 部分核质呈高度电子致密状, $\times 28000$; 1-5. 细胞器病变, 线粒体萎缩、变形, 高尔基体肥大, 粗面型内质网核糖体脱落, $\times 20000$; 1-6. 细胞质中有游离的病毒粒子, 细胞器如内质网扩张, 线粒体内嵴变短、减少, 核膜溶解, $\times 20000$; 1-7. 细胞质中出现的板层状结构, $\times 16000$; 1-8. 显示存在于双层质膜中的病毒粒子, $\times 40000$; 1-9. 显示游离于细胞质中的病毒粒子, $\times 28000$; 1-10. 放大的病毒粒子, $\times 53000$; 1-11. 负染显示病毒粒子, $\times 53000$

1-1. the pond filled with foams; 1-2. diseased abalones, with shinked plepod and mantle; 1-3. infected cells with hypertrophied nuclei and margined chromatin, cell organs almost dissolved $\times 28000$; 1-4. seriously infected cells, nuclear collapsed, part of karyoplasm was highly electronic condensed $\times 28000$; 1-5. the pathological change of organelle, the Mitochondrion shranked, distorted, Golgi complex hypertrophied, Ribosome separated from RER; 1-6. dissociative viruses in the cytoplasm, the organelle such as endoplasmic reticulum expanded, mitochondria dilated with irregular shape, nuclear membranes dissolved or disappeared, the edges of nucleolus swelled. $\times 20000$; 1-7. spore-like bodies appeared in the cytoplasm $\times 16000$; 1-8. the virus particles enveloped by the double membranes. $\times 40000$; 1-9. the virus particles scattered in the cytoplasm of the infected cell, $\times 28000$; 1-10. the magnification of the virus particles, $\times 53000$; 1-11. the negative stain showed the virus partiles, $\times 53000$

2.3.2 细胞器

细胞内各种细胞器如线粒体、高尔基体、内质网的囊泡扩张,出现断裂,粗面型内质网上的核糖体脱落,线粒体内嵴变短、减少、萎缩,糖原颗粒减少,基质变稀薄,电子密度降低;感染严重者甚至呈空泡状,嵴大部分消失,外形严重扭曲(图 1-5,1-6)。细胞质中的细胞器变性、融合,在电镜下呈现数层电子致密圈和电子透明圈交替排列的板层结构(图 1-7)。

2.4 病毒粒子及其发生基质的超微结构

通过对不同器官组织的检测,发现在外套膜、腹足、鳃、肝、肾、肠等部位的组织细胞中,均有病毒粒子的存在,病毒粒子主要发现在细胞的结缔组织中,偶尔也可在血细胞中发现。主要存在于细胞质中,细胞核内未见病毒粒子。病毒粒子通常以聚集的形式存在于囊状发生器内,外面被双层质膜所包围,每层质膜厚度为 5~10 nm,两层质膜之间的空隙为 10~15 nm,该质膜内有装配成熟的病毒粒子,也有尚未装配好的病毒粒子,只有一个蛋白质外壳(图 1-8)。也有散在分布于细胞质中的病毒粒子,病毒粒子形状外观为球状或多角状,大小 100~130 nm(图 1-9,1-10)。病毒颗粒中心部分为电子密度较高的核酸核心,核酸外围为衣壳,最外层为双层囊膜,囊膜之间具有 10~15 nm 电子透明圈(图 1-10)。负染结果表明病毒粒子大小为 100~130 nm,与超薄切片观察结果相似(图 1-11)。

3 讨论

病毒是导致许多动物大规模死亡的主要病原体。在海水贝类中发现的病毒主要包括疱疹病毒科(Herperviridae)、虹彩病毒科(Iridoviridae)、乳多空病毒科(Papoviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、反转录病毒科(Retroviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)和副粘病毒科(Paramyxoviridae)。

已经报道过的病毒中有许多种与宿主的大规模死亡有关系。虹彩病毒侵染太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)面盘上皮细胞,通常出现在 3 月至 5 月,但也可能发生于整个夏季,而导致了该养殖品种损失达到 100%^[8]。类疱疹病毒是导致太平洋牡蛎幼虫高死亡率的主要病原,该病毒在幼虫中传染速度很快,显示出较短的复制周期,在 6 d 内累计死亡率高达 100%^[9]。在平牡蛎(*Tiostrea chilensis*)卵和幼体中,外套膜和消化道上皮细胞被疱疹病毒病感染,导致试验感染面盘幼体在 3~4 d 内死亡率达 95%^[10]。导致一些育苗场非

律宾蛤仔出现高死亡率的病原体为疱疹病毒^[11],该病毒粒子与在牡蛎中发现的病毒粒子在超微结构和形态发生上相同。刘英杰^[12]运用电镜检查发现在患病栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的消化腺、肾和肠中存在球状病毒,病毒粒子大小为 130~170 nm,通常发生在感染细胞的细胞质内,该病毒感染是导致自 1997 年以来中国北方地区 7~8 月份扇贝大规模死亡的主要原因。

随着鲍集约化养殖产业的发展,出现了各种各样的疾病,并且越来越严重。作者第一次报道在广东省引起杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)大规模死亡的病毒。该病毒感染力极强,传染速度快,一旦出现,使用常规水产药物无效,导致汕尾、深圳等地区几十家养殖场受到毁灭性打击,经济损失上亿元。该病一般出现于 11 月份至第二年的 3 月份之间,水温低于 20 ℃ 时容易暴发,水温高于 23 ℃ 时基本不发作。该病毒的大小、形状特征及病鲍的症状特点,与宋振荣^[7]、方莹^[13]报道的引起福建九孔鲍死亡的球状病毒相似。

通过人工感染试验表明了该病毒的致病性。该病毒引起疾病与水温关系极为密切,当水温低于 20 ℃ 时,注射感染的鲍一般在 5 d 内全部死亡;当水温超过 22~23 ℃ 时,注射感染的鲍不出现症状,这与自然条件下发病特征吻合。杂色鲍为热带、亚热带养殖品种,在自然环境中最适生长温度为 25 ℃ 左右,低温下鲍的生理特征可能使得鲍对病毒等微生物更具有易感性,其发病规律需进一步探讨。从紫外线照射试验中可以看出,病毒对紫外线较敏感,照射时间在 30 min 以上再感染健康鲍也不会发病。显示利用紫外灯来杀灭水中的病毒和其它微生物以切断疾病的传播有一定的意义。

作者通过电镜发现,病毒粒子一般存在于杂色鲍外套膜、鳃、肾、肠等各种器官组织感染细胞的细胞质中,大多数病毒粒子是以集群形式(几十个至几百个)存在,由双层质膜所包裹(图 1-8);同时观察到游离存在于细胞质中的病毒粒子(图 1-6、图 1-9),细胞核中未发现病毒粒子。这与国内外许多学者报道的贝类病毒的存在方式相一致。从电镜下观察的病毒粒子从形态、大小难以精确判定其分类地位,该病毒的核酸及序列研究分析正在进行,将另文发表。

感染细胞的病理变化一般是由细胞质开始的,细胞器发生病变,如线粒体肿胀或溶解、高尔基体、内

质网扩张。有研究表明^[14],在细胞质中,高尔基体与内质网、质膜相偶联,行使合成、运输和分泌的功能,病毒对细胞的影响首先表现为对内质网、高尔基体等膜性结构的破坏,病毒在细胞质内组装和移动时,被这些细胞器的内膜系统衍生的囊泡所覆盖,为病毒提供被膜。在本研究中即为电镜下观察到的包被病毒的双层质膜,每个质膜内含有一定数量的病毒粒子。病毒感染进一步引起细胞核的病变,如核肥大或形状异常,核质边缘化,说明核内染色质和DNA的凝集,核膜溶解或消失,最后整个核完全崩解,核内物质呈固缩状,在电镜下呈现高度电子致密状的板层结构(图1-7),组织细胞变性,细胞已失去功能。

参考文献:

- [1] Otsu R, Sasaki K. Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease[J]. *Invertebrate Pathology*, 1997, 70: 167-168.
- [2] Nakatsugawa T, Nagai T, Hiya K, *et al.* A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophy[J]. *Dis Aquat Org*, 1999, 36: 159-161.
- [3] 王斌,李霞,高船舟. 皱纹盘鲍一种球状病毒的感染及其发生[J]. 中国病毒学, 1997, 12(4): 360-363.
- [4] 李霞,王斌,刘淑范,等. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 61-66.
- [5] 王江勇,陈毕生,冯娟,等. 杂色鲍裂壳病球状病毒的初步观察[J]. 热带海洋, 2000, 12: 63-67.
- [6] 张朝霞,王军,苏永全,等. 九孔鲍暴发性流行病的病原及病理[J]. 厦门大学学报, 2001, 40(4): 949-956.
- [7] 宋振荣,纪荣兴,颜素芬,等. 引起九孔鲍大量死亡的一种球状病毒[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 463-467.
- [8] Elston R. Ultrastructural aspects of a serious disease of hatchery reared larval oysters, *Crassostrea gigas* Thberg [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1980, 3: 1-10.
- [9] Renault T, Lipart C, Arzul I. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24: 369-376.
- [10] Hine P M, Wesney B, Besant P. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, 32: 161-171.
- [11] Renault T, Lipart C, Arzul I. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 45: 1-7.
- [12] 刘英杰,吴信忠,朱洛壮,等. 栉孔扇贝球形病毒的超微结构及细胞病理学观察[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 76-79.
- [13] 方莹,黄印尧,颜江华,等. 东山九孔鲍病毒病病毒的分离观察[J]. 台湾海峡, 2002, 21(2): 199-203.
- [14] 武忠弼. 超微病理学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 20-68.

Studies on ultrastructural pathology of outbreaking disease of *Haliotis diversicolor* Reeve

WANG Jiang-yong^{1,2}, GUO Zhi-xun¹, FENG Juan¹, LIU Guang-feng¹, XU Li-wen¹, CHEN Bi-sheng¹, PAN Jin-pei²

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Received: Feb., 8, 2004

Key words: virus; pathogen; pathology; *Haliotis diversicolor* Reeve

Abstract: A serious disease had occurred in many commercial factories of *Haliotis diversicolor* Reeve during 1999 and 2002 in coastal areas of the South China Sea. It was infectious to all sizes of abalones with high mortality. The symptoms of the sick abalone were as follows: the mantle shrunk, the muscle became stiff and the surface of pleopod blacked. Under electron microscope, a kind of spherical virus was detected in the tissues of digestive gland, mantle, gill and intestine. The diameter of the virion was about 100~130nm, it was observed in the cytoplasm with double membranes. The organelle such as endoplasmic reticulum expanded, mitochondria dilated, the number of ribosome reduced, nuclear membranes dissolved or disappeared, the edges of nucleolus swelled. The pathogenicity of the virus was confirmed by an experimental infection with healthy abalones.

(本文编辑: 张培新)