

海湾扇贝面盘幼虫“面盘解体病”病原的研究

姜静颖, 高悦勉

(大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:对大连地区患“面盘解体病”的海湾扇贝(*Argopecten irradians*)面盘幼虫进行电镜观察,并对健康海湾扇贝幼虫进行人工感染实验。患该病面盘幼虫病症为:下沉,组织解离,游泳器官面盘解体,经过一段时间后全部死亡。对发病面盘幼虫进行超薄切片电镜观察发现,该病原病毒主要侵染面盘幼虫的结缔组织细胞和上皮细胞,病毒呈六角形或近圆形,未成熟病毒颗粒直径为84~90 nm,病毒颗粒形态不一,大致有4种与所报道的鸡马立克氏病毒(Marek's disease herpes virus)和火鸡疱疹病毒(Turkey herpes virus)相似,即致密拟核型、中空型、十字型和双环型。从形态学上进行鉴定,认为该病毒属于疱疹样病毒(*Similar herpesvirus*)。人工感染实验显示,在感染病毒后100 h,有30%幼虫出现“面盘解体”病状;感染148 h,幼虫全部死亡(水温22~24℃)。根据实验结果推断,病毒的传播途径包括垂直传递和水平传播。

关键词:海湾扇贝;面盘幼虫;“面盘解体病”;疱疹样病毒

中图分类号:S944.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)01-0031-06

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)原产于美国大西洋沿岸,具有适应强,生长快,养殖周期短的优点。我国自20世纪80年代初引进,已经形成规模养殖生产,成为扇贝中的主要养殖种类之一,而且养殖用的苗种完全工厂化人工育苗生产。自1997年以来,人工养殖的海湾扇贝在人工育苗和养成期间,均有病害发生,尤其是人工育苗过程中,面盘幼虫面盘解体,大量下沉,可在十几小时后全部死亡^[1],已给人工育苗及养殖带来严重损失。

目前,国内外关于扇贝病毒性疾病研究较少,Mortensen^[2]曾报道挪威大扇贝(*Pecten maximus*)有传染性坏死病毒(IPNV)存留;王运涛^[3]在栉孔扇贝体内观察到两种寄生原核生物和少量病毒粒子;王崇明^[4]在栉孔扇贝(*Chlamys ferreiri*)体内分离并观察到一种球形病毒;王秀华^[5]对胶州湾栉孔扇贝大规模死亡进行了流行病学调查;王文兴^[6]报道了海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究;刘英杰等^[7]对栉孔扇贝类立克次体的自然感染进行了流行病学调查并报道了其人工感染实验结果。但关于海湾扇贝“面盘解体病”的研究至今鲜有报道。本文作者^[8]曾于1998年在国内外首次报道在扇贝体内发现疱疹病毒,本文对海湾扇贝面盘幼虫“面盘解体病”的病原以及致病性做进一步报道,以期为该病的

防治工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 自然发病面盘幼虫 5~8日龄,个体大小140~150 μm,于1997年4月和1998年4月分别取自金州区正明寺村、杏树屯实验场、大连水产学院苗种基地、辽宁省海洋水产研究所的育苗室。

1.1.2 稚贝、幼贝、成贝 个体大小分别为2~3 mm、1.5~2 cm、5~6 cm,均取样于金州区杏树屯海区。

1.1.3 种贝 分别取自辽宁省海洋水产研究所、金州区大魏家增殖站、大连水产学院海养楼的育苗室。

1.2 方法

1.2.1 负染色方法 过滤收集正发病幼虫或者取稚贝、幼贝的软体部分或者取成贝、种贝的不同器官组织,匀浆、冻融、离心(13 000 g/min,5 min),取上清液滴于铜网,2%PTA染色2 min。

1.2.2 超薄切片法 过滤收集发病幼虫,经戊二醛和锇酸双固定,琼脂包埋,乙醇系列脱水,Epon812树脂浸透、包埋,奥地利E型切片机进行超薄切片,铀、铅双染色。

以上2种方法均用于JEM-1200EX型透射电

收稿日期:2002-12-30; 修订日期:2003-08-03.

基金项目:辽宁省海洋水产厅扇贝病害项目(020406)。

作者简介:姜静颖(1950-),女,高级工程师,从事生物电镜技术与超微结构研究。

镜观察、拍照。

1.2.3 病毒感染实验 于1998年4月进行人工感染实验。取大连水产学院海养楼培养的选育后5 d的健康幼虫为实验材料(电镜负染色方法检测未见病毒,并用超薄切片法进行正常超微结构观察),进行感染实验,另设1个对照组。感染组和对照组幼虫分别培养在2 000 mL大烧杯中(每组各设2个大烧杯),培养用海水为生产育苗所用砂滤海水,使用时再用脱脂棉二次过滤并经高压灭菌。水温为22~24℃(水浴控温),幼虫密度各为5个/mL。日彻底换水一次,用300目筛绢过滤幼虫换水。投喂的饵料生物为湛江等鞭金藻,经离心去除上清液后投喂,日投喂量为2万个/mL,为早晚2次投喂。感染用病毒悬液为发病幼虫经灭菌海水滤洗多次后,采用文献[9]方法制备成除菌发病幼虫组织浆悬液,(该液经电镜负染检测,病毒数量较多),将此悬液取100 mL分别加入人工感染实验组设的2个大烧杯的海水中,每杯中发病幼虫组织浆悬液质量分数为2.5%。对感染组和对照组进行定时观察变化情况,浮游阶段终止时检查幼虫存活率,并收集下沉死亡幼虫,用负染法电镜检测各组病毒的含量情况。

2 结果

2.1 症状

发病面盘幼虫是在人工育苗时,3月末4月初选育后5~7 d开始发病,培育水温22~24℃。其主要症状是丧失浮游能力,大批下沉,沉于池底的幼虫纤毛仍在摆动,数小时后逐渐出现组织解离呈球、块状,靠近壳缘的面盘、口沟、肛门、足等部位的细胞或组织渐渐散落,游泳器官面盘解体,脱落下的纤毛或带纤毛的组织靠纤毛的摆动在壳中或壳外转动,患“面盘解体”病的幼虫经过一段时间全部死亡。如果继续培养幼虫,其发病时间逐渐缩短。

2.2 人工感染实验

人工感染60 h,即有少量幼虫下沉,运动不活跃,但无“面盘解体”现象出现;感染100 h水中已无幼虫浮游,幼虫全部沉于底部,约30%的幼虫出现“面盘解体”病状;148 h幼虫全部出现“面盘解体”而死亡,存活率为0%,与自然发病情形基本一致,电镜下可检测到数量较多的病毒粒子,形态与感染所用病毒一致。对照组幼虫一直可以正常培养,至148 h已结束浮游,转入足匍匐爬行,存活率达78%,电镜检测未见病毒。

2.3 病毒形态

对发病面盘幼虫上清液负染色方法观察,电镜下可见呈六角形或近圆形未成熟的裸体病毒核壳体,直径约100 nm,有实心和空心2种裸体病毒颗粒(图版I-1),衣壳上的壳粒呈中空,以点阵排列构成衣壳(图版I-2),但在实心裸体病毒颗粒衣壳表面,看不到整齐排列的壳粒。电镜下还见到极少数带宽松、形态不定形囊膜的成熟病毒颗粒,直径约200 nm,可清晰见到呈六角形的核壳体(图版I-3),电镜下可在囊膜上隐约看到衣壳上的壳粒。

对发病面盘幼虫超薄切片方法电镜观察,在细胞核和细胞质中,均有分散的病毒颗粒,并以细胞质分布为主。未成熟病毒颗粒直径84~90 nm,呈六角形或圆形。病毒颗粒形态不一,大致有4种与报道^[10]的鸡马立克氏病毒和火鸡疱疹病毒相似,即致密拟核型、中空型(图版I-4)、十字型(图版I-5)和双环型。成熟病毒颗粒,由拟核、衣壳和囊膜所构成,颗粒直径约120 nm,有时在一个成熟病毒颗粒内,可看到有2个核衣壳颗粒(图版I-5),偶见具宽松囊膜颗粒直径150~250 nm。

2.4 病毒分布

2.4.1 负染法电镜观察及检测结果 在下沉死亡面盘幼虫的样品中,观察到大量病毒颗粒;在未发病浮游幼虫的样品中病毒数量较少;在稚贝、幼贝、成贝各个发育时期均未见病毒;在种贝性腺器官中发现数量极少的病毒颗粒。

2.4.2 超薄切片法电镜观察 在发病浮游幼虫体内,病毒分布主要局限于具有纤毛上皮细胞组织下的结缔组织和细胞中(图版I-6,7),该上皮细胞内也有少量病毒粒子分布。其中以口沟内部及构成口沟的上皮细胞下的结缔组织、间隙中,病毒数量较多(图版I-8);而在浮游幼虫面盘组织的上皮细胞及结缔组织、间隙中,只见到少量和中等数量散在的病毒颗粒,仅在1个幼虫样品的上皮细胞及间隙中观察到有大量细菌存在。

2.5 健康面盘幼虫超微结构观察

幼虫体内上皮细胞排列整齐,细胞核的染色质呈大小不等的小块状分布于核内,核仁居中,核膜间隙均匀。细胞质中有丰富的内质网,线粒体呈椭圆形,嵴发达、呈短管状(图II-1),细胞质中有一高尔基体(图II-2)。面盘及口沟部分的上皮细胞表面,附生的微绒毛排列密集、呈栅栏状,其外层还附生大量纤毛,其切面可见微管。肌纤维排列较致密,明暗

带及间线可辨(图Ⅱ-2,3)。在各组织细胞中均未见病毒粒子。

2.6 发病面盘幼虫超微结构病理观察

病毒侵染的细胞,细胞核的染色质聚集,趋边,核较大,核膜间隙不均匀,局部膨大;线粒体嵴减少或崩解呈半空泡状(图版Ⅱ-4);内质网膜肿胀或崩解,病毒进入肿胀的内质网膜内(图版Ⅰ-5);严重时细胞器崩解、消失、界线不清,细胞器由于解体而数量减少,细胞质中出现空白区(图版Ⅱ-6);幼虫体内的肌原纤维排列疏松(图版Ⅱ-7),面盘组织和口沟部位的上皮细胞附生的纤毛和微绒毛由于脱落而数量减少、排列疏松散乱,尤其是微绒毛变化更为明显(图版Ⅱ-8,图版Ⅰ-8)。

3 讨论

3.1 “面盘解体病”的病原

从形态学上进行鉴定,扇贝面盘幼虫体内呈六角形或近圆形病毒的特征与疱疹病毒^[10]十分相似。因此认为该病毒属于疱疹样病毒。

疱疹病毒科据1986年报道共分5个属,除危害人、马、猪、鼠等动物外^[10],对某些水产动物也有严重危害的报道,例如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、牡蛎^[11-14]、虹鳟(*Salmo gairdneri*)、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[15]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[16]、鲆鱼^[17]、海湾扇贝^[8]等,得病后可引起较高的死亡率。本实验从自然发病面盘幼虫中提取病毒上清液,后经人工感染实验和病理观察,出现实验面盘幼虫症状和病理变化同自然发病面盘幼虫,感染148 h死亡率达100%,电镜下可检出相同的病毒粒子,因此表明该病的病原为病毒。对照组死亡率为22%,所收集下沉死亡的幼虫,电镜下未检出病毒粒子,实属于幼虫培养中正常死亡。在自然发病面盘幼虫的超薄切片中,发现有大量的细菌可能是继发感染。关于海湾扇贝面盘幼虫患面盘病已有研究^[18-19],但其发病的症状和发病的原因、病原均与本文报道不同,海湾扇贝面盘幼虫“面盘解体病”的病原为疱疹样病毒尚未见到报道。

3.2 组织病理变化及致病性

电镜下发现病毒主要分布在浮游幼虫体内具有附生纤毛上皮细胞组织下的结缔组织中,其次在该上皮细胞内。幼虫的面盘、口沟、足、肛门器官组织的上皮细胞皆具纤毛,当病毒侵染上述组织细胞后,随着病毒大量增殖会引起细胞崩解,组织溃散,此病

理变化与“面盘解体”病症状吻合。人工感染实验证明,在感染100 h左右,幼虫全部沉于底部,约30%的幼虫出现“面盘解体”病症状,面盘是浮游幼虫的游泳器官,面盘解体,直接影响幼虫浮游,使其不能正常生长、发育,口沟、肛门、足等部位细胞或组织解离、散落,最终导致幼虫死亡。

3.3 病毒感染途径

有关疱疹病毒生物学特征认为,许多病毒经湿润的粘膜之间的接触而传染,某些疱疹病毒经胎盘、分娩、乳汁或输血进行传播,还有些病毒成员可能以气源性和水源性途径传播^[10]。从本实验中幼虫与种贝的体内均带毒以及其他环境因子来看,病毒经水平和垂直传递的两种可能都有。

水平传播是由个体之间的传播。从人工感染实验的结果分析,该病毒是以水源性途径传播,病毒经幼虫口或体表侵入机体,后经具纤毛上皮细胞进入结缔组织,在结缔组织细胞中大量增殖。另外,前述已经提及多种水产动物患有疱疹型病毒性疾病。1998年4月在扇贝幼虫发病期间,本文作者曾对大连水产学院苗种基地育苗室培育6 d的牡蛎面盘幼虫,发生了与扇贝面盘幼虫一样症状的发病牡蛎面盘幼虫进行负染色电镜观察,发现也有较多该疱疹样病毒,由此可以说明该病毒对贝类幼虫具有广泛的感染性。

垂直传播途径是由种贝传播的,本实验对稚贝、幼贝和成贝做负染检测,均未见病毒,而在种贝性腺器官中负染检测到数量极少的疱疹样病毒粒子。据此认为,病毒极有可能是侵染体质虚弱的越冬种贝繁殖器官,然后传播给子一代,在面盘幼虫时期流行和暴发,并在幼虫体内引起侵染和大量增殖。

病毒侵染种贝的途径分析有2种可能,一种是海洋其他生物,如鱼、贝、甲壳类等水平传播。另一种是种贝传给子一代,带毒的子一代由于体内病毒含量较少,因此未发病,正常进入稚贝至成贝期。此间,病毒处于潜伏感染,呈隐性存在,电镜亦无法检出病毒颗粒。而当病毒和宿主间的平衡被破坏、病毒大量增殖条件具备时,即可再次引起病毒的增殖,并呈现临床症状。有报道^[17]例举单纯疱疹病毒,在最初感染发病后,往往沿三叉神经在神经节内潜伏感染,由于体液免疫和细胞免疫的低下,外界对宿主个体施以物理性的或机械性的刺激以及给予免疫抑制剂等,都可使病毒活化而再发,并通过排出病毒而引起传播。一般认为温度是病毒病发生的主要外部

因素,而目前海湾扇贝人工育苗期间,种贝和幼虫培育的水温均由人为升温控制在 22~24℃,因此温度对该病的发生和发展可能起了一种诱导作用。据报道^[10]感染牡蛎疱疹型病毒病的牡蛎在转移到温度较低(12~18℃)天然海水中后,感染和死亡就可能停止。

参考文献:

- [1] 王世胜. 几种化学试剂对海湾扇贝幼体病害的防治效果[J]. 水产科学, 1994, 13(2): 32-33.
- [2] Mortensen S H, Bachere E, Gall G, et al. Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops *Pecten maximus* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1992, 12 (3): 221-227.
- [3] 王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770-773.
- [4] 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.
- [5] 王秀华, 王崇明, 李 筠, 等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 149-156.
- [6] 王文兴, 罗挽涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究[J]. 海洋科学, 1998, 3: 23-25.
- [7] 刘英杰, 王崇明, 宋洛社, 等. 栉孔扇贝类类立克次体自然感染调查及人工感染试验[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 346-352.
- [8] 姜静颖, 高悦勉, 史晓明. 海湾扇贝体内发现一种新病原-疱疹病毒[J]. 山东农业大学学报, 1997(增刊): 26-28.
- [9] 李 华, 邢殿楼, 马悦欣, 等. 1993 年中国对虾爆发性流行病病原初步研究[J]. 大连水产学院学报, 1994, 9(4): 74-79.
- [10] 李 成, 刘树森, 谷守林, 等. 畜禽病毒图谱[M]. 北京: 农业出版社, 1987, 13-16, 52-53.
- [11] 孟庆显, 余开康. 鱼虾蟹贝疾病诊断和防治[M]. 北京: 农业出版社, 1996, 24-26, 282-283.
- [12] Hine P M, Wesney B, Hay B E. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval pacific oysters *Crassostrea gigas* [J]. Dis Aquat Org, 1992, 12: 135-142.
- [13] Comps M, Cochenneec N A. Herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L [J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 201-203.
- [14] Hine P M, Wesney B, Besant P. Replication of a herpes-like virus in the larvae of the flat oyster, *Tiostrea chilensis*, at ambient temperatures [J]. Dis Aquat Org, 1998, 32: 161-171.
- [15] 黄琪斌. 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993, 83-84, 93.
- [16] 孙丽敏, 国际翔. 中华绒螯蟹放养期仔蟹 I 型疱疹病毒的电镜观察[J]. 水产科学, 1999, 18(6): 20-22.
- [17] 王殿瀛, 王述浩, 刘文多, 等. 兽医传染病学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1985. 452-453.
- [18] 魏利平. 贝类幼虫面盘纤毛脱落病的起因及防治[J]. 海洋湖沼通报, 1997, 2: 64-69.
- [19] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 130-131.

Pathogen of 'facial disc disintegration disease' in *Argopecten irradians* veliger

JIANG Jing-ying, GAO Yue-mian

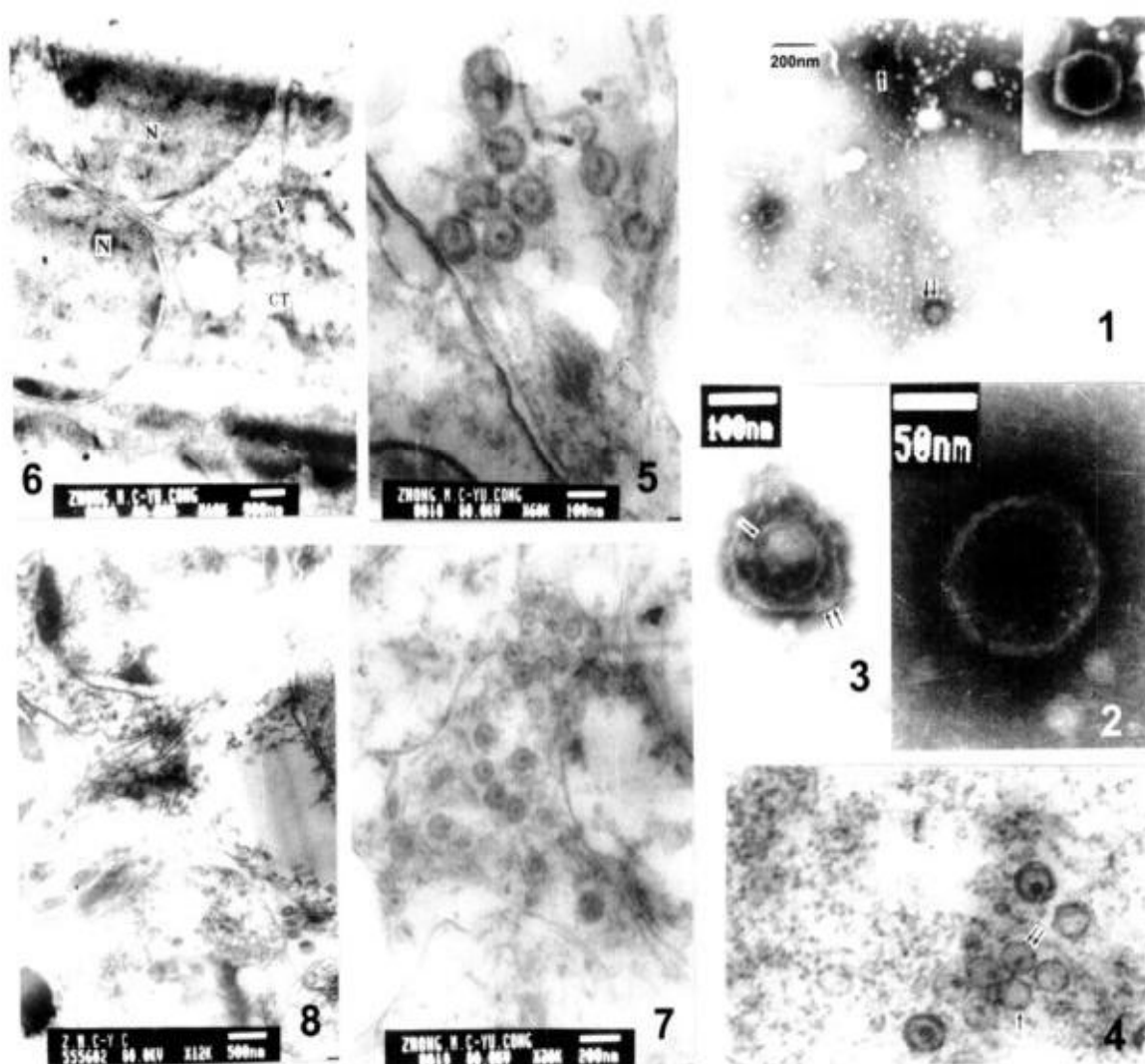
(Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Agriculture Ministry, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: An investigation was conducted along the sea area of Dalian, Liaoning Province. The *Argopecten irradians* veligers with 'facial disc disintegration disease' were observed under electron microscope and the artificial infection experiment was made. The symptoms showed that the diseased veligers subsided and their tissues dissolved with the facial disc of swimming organ disintegrating, and all died at last. The pathogenic virus mainly invaded the connect tissue cell and epithelial cell of the veliger. The virus had the shape of hexogan or approximate spherical, and the diameter of immature virions were 84-90 nm. The virions were various in shape, and four morphological types were similar to marek's disease herpes virus and turkey herpes virus, which were compact nucleoid type, hollowing type, crisscross type and two-ring type. The artificial infecting results show that 30% veligers appeared the symptom of 'facial disc disintegration' after 100 h infection, and all died after 148 h at water temperature 22-24℃. The transmission ways of the virus includes vertical and horizontal transmission.

Key words: *Argopecten irradians*; veligers; facial disc disintegration disease; herpes-like virus

姜静颖等:海湾扇贝面盘幼虫“面盘解体病”病毒病原的研究

JIANG Jing-ying et al: Pathogen of 'facial disc disintegration disease' in *Argopecten irradians veliger*



图版 I

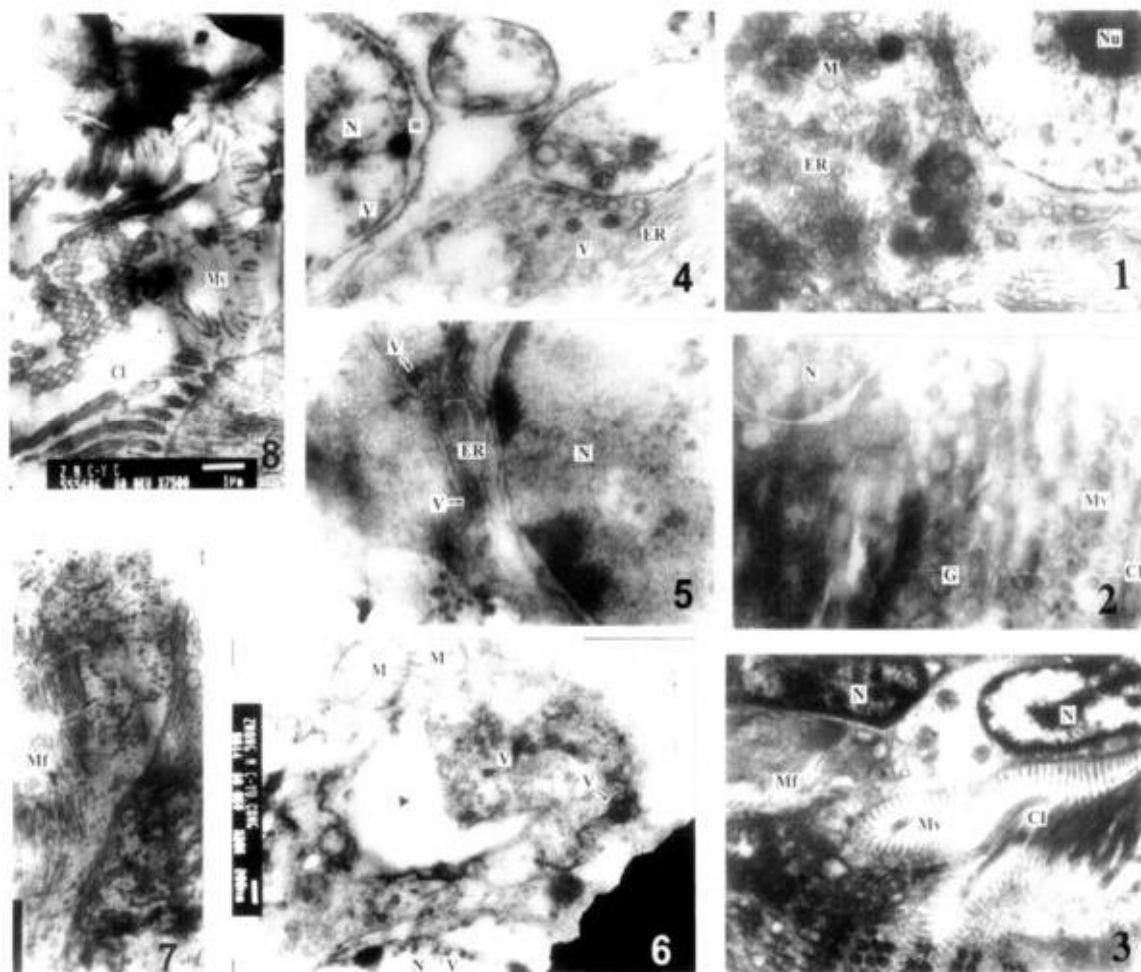
1. 示电镜下一个视野内有2个空心(↑)和3个实心(↑↑)裸体病毒粒子负染色照片, ×30 000。左上角为空心病毒粒子放大图片, ×100 000。2. 一个裸体病毒粒子负染色放大照片, ×300 000。壳粒(↑)。3. 带囊膜成熟病毒粒子负染色照片, ×120 000。衣壳(↑), 囊膜(↑↑)。4. 示细胞质中分布的病毒粒子, ×60 000。中空型病毒粒子(↑)。致密拟核型病毒粒子(↑↑)。5. 示细胞质中分布的病毒粒子, ×60 000。十字型病毒粒子(↑↑)。在一个病毒粒内, 可见到双核衣壳颗粒(↑)。6. 病毒粒子分布在结缔组织(CT)中, ×10 000。7. 图6中结缔组织处分布的病毒粒子放大, ×30 000。8. 病毒粒子在口沟部位的分布, ×12 000。

Plate I

1, Two hollow (↑) and three solid (↑↑) unenveloped virions in a visual field inside by negative staining, ×30 000. The magnified hollow virions is on the top left corner, ×100 000. 2, The magnified unenveloped virion by negative staining, ×300 000. Capsomere (↑). 3, Enveloped virions by negative staining, ×120 000. Capsid (↑), Envelope (↑↑). 4, virions in cytoplasm, ×60 000. hollowness type (↑), compact uncloidal type (↑↑). 5, virions in cytoplasm, ×60 000. virions of crisscross (↑↑). A virion with double nucleocapsids (↑). 6, virions in connective tissue (CT), ×10 000. 7, picture 6, the magnified virions in connective tissue. 8, Distribution of virions in oral groove, ×12 000.

姜静颖等:海湾扇贝面盘幼虫“面盘解体病”病毒病原的研究

JIANG Jing-ying et al; Pathogen of 'facial disc disintegration disease' in *Argopecten irradians* veliger



图版 II

1. 健康幼虫面盘上皮细胞, $\times 10\ 000$ 。2. 健康幼虫面盘上皮细胞, $\times 12\ 000$ 。3. 示健康幼虫口沟部位微绒毛(MV), 纤毛(CI)和肌原纤维(MF), $\times 7\ 500$ 。4. 示核膜间隙(☆), 线粒体嵴减少, $\times 30\ 000$ 。5. 病毒粒子进入肿胀的内质网中, $\times 30\ 000$ 。6. 示病毒粒子在细胞内分布, $\times 20\ 000$ 。在细胞质空胞内可见有病毒粒子(↑), 细胞内出现空白区(▲)。7. 示肌原纤维排列疏松, $\times 12\ 000$ 。8. 幼虫面盘上皮细胞微绒毛排列散乱, $\times 25\ 000$ 。在一个病毒颗粒内, 可见到双核衣壳颗粒(v)。

N - 核; Nu - 核仁; M - 线粒体; ER - 内质网; G - 高尔基体; V - 病毒; CI - 纤毛; Mv - 微绒毛; MF - 肌原纤维; CT - 结缔组织

Plate II

1, Epithelial cell of Healthy veliger, $\times 10\ 000$. 2, Epithelial cell of Healthy veliger, $\times 12\ 000$. 3, Microvilli (MV) cilli (CI) and myofibril (MF) in oral groove of healthy veliger, $\times 7\ 500$. 4, Space of nuclear membrane (☆), mitochondrial cristae less $\times 30\ 000$. 5, Virions enter swollen endoplasmic reticulum, $\times 30\ 000$. 6, Distribution of virions, $\times 20\ 000$. Virions in the vacuole of cytoplasm (↑), vacant area of cell (▲). 7, Loose arrangement of myofibril, $\times 12\ 000$. 8, Microvilli of epithelial cell of veliger arrange in disorder, $\times 25\ 000$. A virion with double nucleocapsids (v).

N - Nucleus; Nu - nucleolus; M - Mitochondria; ER - Endoplasmic reticulum; G - Golgi complex; V - Virions; CI - Cilium; Mv - Microvilli; MF - myofibril; CT - connective tissue