

# 养殖对虾病毒致病性的初步研究

张 驰 陈晋安 孙昌博 沈明山 杨淑专 苏文金

(厦门大学生物学系, 厦门 361005)

**摘要** 用从日本对虾分离的杆状病毒和长毛对虾分离的球状病毒分别感染健康无病毒的健康日本对虾, 对虾死亡率分别为 65% (杆状病毒组) 和 50% (球状病毒组), 而对照组的死亡率仅为 25%, 在诸环境因素中, 温度的上升和低压可能是对虾病毒病发作的最重要诱因之一。

**关键词** 养殖对虾, 对虾病毒, 感染实验

随着对虾养殖业的发展, 疾病问题日趋严重, 尤其是对虾病毒性疾病, 已引起人们的特别重视<sup>[1]</sup>。本文在我们过去工作<sup>[2]</sup>基础上, 用两种不同的对虾病毒纯化物人工感染健康无病毒的健康日本对虾, 以了解新分离纯化对虾病毒的致病性及病毒病发作的诱因, 为养殖对虾病毒病的防治提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒来源

取患病毒病濒死及已死的日本对虾 (*Penaeus japonicus*)。肝胰脏和中肠组织, 研磨制成匀浆液, 经 4℃, 2000g 及 3000g 离心除去细胞碎片后, 用 PEG6000 沉淀病毒, 再经 390000g 超速离心即获得用于感染的日本对虾杆状病毒 (图 1-A)。

取患病毒病濒死或已死的长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 肝胰脏和中肠组织, 经研磨和超声波处理制成匀浆液, 4℃, 2000g 离心及氯仿处理除去组织细胞碎片及杂蛋白, 再经 13000g 高速离心和 400000g 超速离心即获得长毛对虾球状病毒 (图 1-B)。

### 1.2 供试虾及养殖条件

供试虾为日本对虾, 室温饲养在 70 × 50 × 35cm 水族缸中, 缸底铺 3—5cm 细沙, 充气泵供氧, 养殖海水为经过沙滤的陈海水, 对虾喂以新鲜海蛎, 人工感染实验前, 对虾先饲养二周, 经观察为无病毒的健康虾。

### 1.3 人工感染方法

日本对虾经两周的适应性饲养与观察后,

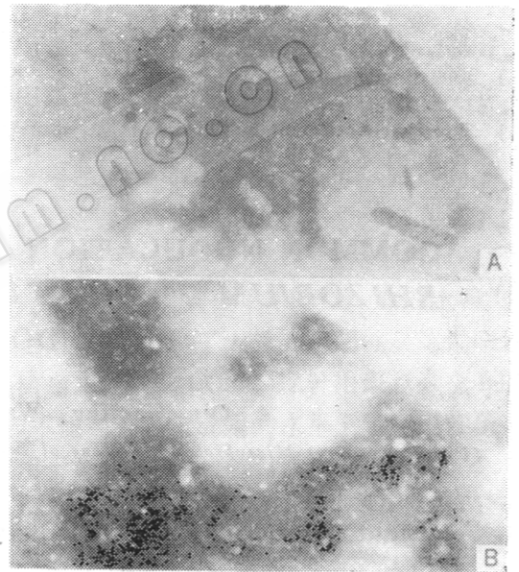


图 1 纯化的日本对虾杆状病毒 (A, × 36000) 和长毛对虾球状病毒 (B, × 58000)

分为三组: A 为空白对照组, 共 16 只对虾; B 和 C 为感染实验组, 均有 20 只对虾, 分别喂食 25 只注射有日本对虾杆状病毒和长毛对虾球状病毒溶液的海蛎 (25μl 病毒液/只海蛎)。为确保对虾食用作为病毒源的海蛎, 人工感染实验前, 对虾停食 1d。人工感染后, 为证实对虾死因, 取各组死虾肝胰脏, 按常规法进行组织包埋切片和电镜观察。

厦门市重大科技项目  
1994-12-07 收稿

## 1.4 养殖水体中有关参数的测定

每天测量养殖水体的温度与 pH 值,并定时取样计数水体中的弧菌数和测量氨氮含量。弧菌计数时以无菌陈海水为稀释液,10 倍稀释水样,取 0.1ml 涂布接种于 TCBS 琼脂(上海生物制品研究所产品),35℃ 培养 24h 后计数,并按常规方法鉴定<sup>[3]</sup>。氨氮含量测定按文献[4]进行。

## 2 结果

### 2.1 日本对虾杆状病毒的致病性

日本对虾人工感染杆状病毒后,四周内 20 只实验虾共死亡 13 只,死亡率达 65%,而对照组的死亡率仅为 25%,两者差异显著(图 2)。电镜观察结果表明,对照组中正常对虾肝胰脏细胞超微结构完整,未发现有病毒包涵体及病毒样颗粒(图 3-A),而感染杆状病毒的对虾肝胰脏细胞结构破坏严重,发现有杆状病毒颗粒(图 3-B),其形态和大小与作为感染源的杆状病毒(图 1-A)相似。

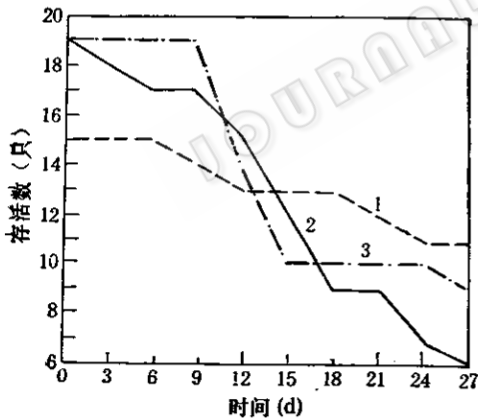


图 2 感染病毒后对虾的存活数

1. 空白对照组; 2. 感染杆状病毒组; 3. 感染球状病毒组

### 2.2 长毛对虾球状病毒的致病性

日本对虾人工感染球状病毒后,四周内 20 只实验虾共死亡 10 只,死亡率 50%,低于感染日本对虾杆状病毒的 B 组,而明显高于对照组(图 2)。电镜观察结果表明,在受球状病毒感染的对虾肝胰脏细胞中存在有较大量数的与用

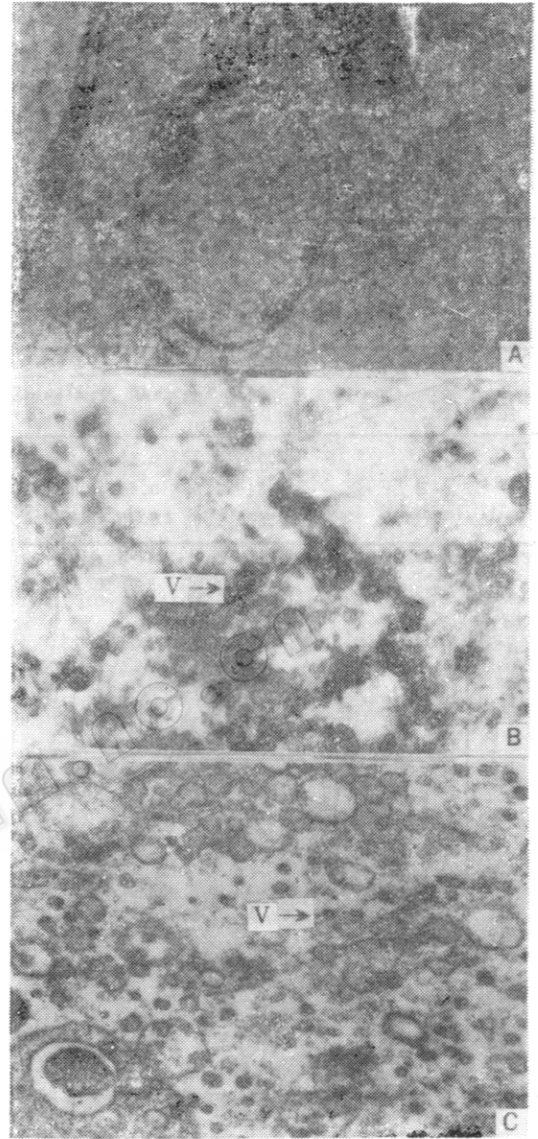


图 3 人工感染日本对虾细胞的电镜观察

A. 对照组( $\times 7200$ ); B. 杆状病毒组( $\times 29000$ ; V 示杆状病毒); C. 球状病毒组( $\times 19000$ ; V 示球状病毒)

作感染源的长毛对虾球状病毒(图 1-B)相似的病毒颗粒(图 3-C)。

### 2.3 养殖水体中环境参数的测定

人工感染后,不同时间和不同实验组之间, pH (图 4)、弧菌数(表 1)和氨氮含量(表 2)略有变化,但差异不显著,而在第 10—15 天之间,温度有所上升,同时伴随较长时间的阴天闷热天气,试验虾也出现较多的死亡(图 2、4)。

表 1 养殖水体中弧菌数 (CFU/ml 水)

时间 (d)	8	11	12	17	20	26
组别						
A( $\times 10^3$ )*	2.75	3.00	2.75	4.25	4.50	4.00
B( $\times 10^3$ )	3.00	3.25	3.00	3.15	3.50	3.75
C( $\times 10^3$ )	2.25	2.50	2.75	4.00	3.75	4.00

\* A、B、C 见图 2 注

表 2 养殖水体中氨氮含量 (mg/L 水)

时间 (d)	6	12	14	17	22
组别					
A*	2.56	2.28	0.40	0.56	0.96
B	1.81	1.80	0.44	0.64	0.80
C	1.82	1.88	0.40	0.64	0.76

\* A、B、C 见图 2 注

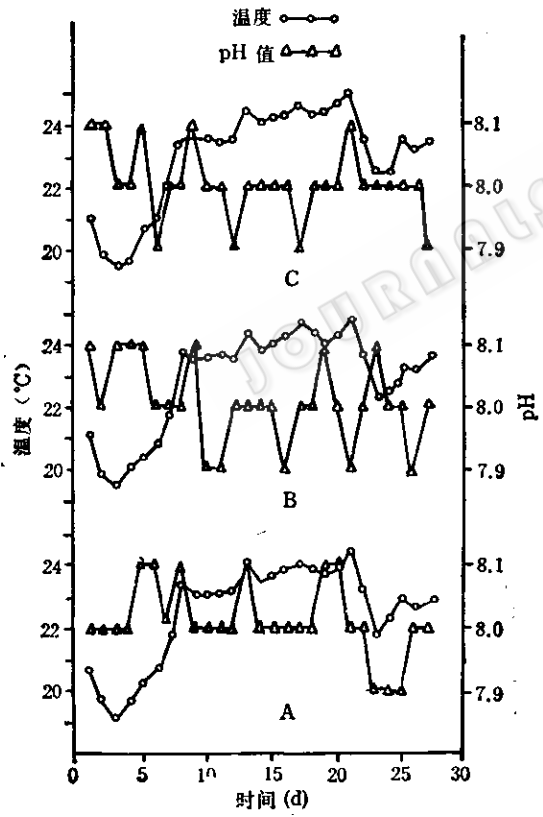


图 4 养殖水体中的温度和 pH 值 (A、B、C 同图 2 注)

### 3 讨论

日本对虾是我国南方主要的养殖虾种之

一。根据国内外学者报道,日本对虾不仅可被杆状病毒感染(如传染性中肠坏死症病毒:BMNV),也可被球状病毒感染(如肠道与呼吸道感染症病毒:REOV)<sup>[5-7]</sup>。然而,关于感染病毒的来源及其宿主特异性尚未见报道。在我们的实验中,磷钨酸负染色电镜观察表明,从日本对虾提纯的病毒为杆状病毒,从长毛对虾提纯的为球状病毒(图 1)。由于时间关系,我们尚未鉴定出这两种病毒的确切属种,但本文工作证实了在我们的实验条件下,日本对虾皆可被这两种不同宿主来源的病毒感染,只是死亡程度有所差异,这不仅进一步了解了病毒的宿主范围,同时还提示了不同虾种之间所存在的病毒相互感染的可能性,为切断对虾病毒的传播途径提供了依据。至于日本对虾感染了不同宿主来源的病毒之后所出现的死亡率差异,究竟是不是不同病毒毒株毒力不同,或是由于宿主范围改变所致,有待于进一步研究。

对虾感染了病毒之后,就有了患病毒病的可能性,但何时发作病毒病并出现死亡,还取决于其他因素的影响。为此,在对虾人工感染病毒之后,我们跟踪检测了养殖水体中 pH、温度、氨氮含量和弧菌数,并观察了对虾的摄食及脱壳情况。结果表明,由于温度的上升及阴天引起的低压,对虾的食欲会受到明显的影响,摄食大量减少,随之出现感染对虾的死亡(2d 内 A 组死亡 28%,B 组死亡 40%),而在对照组,虽然也出现类似的食欲不振现象,但未出现对虾的死亡。另外,不管是实验组或对照组,仅温度升高而无低压出现(如第 3 天到第 8 天),则不会引起对虾死亡。这些现象表明,温度的升高和低压可能对虾体的生理状态(包括对病毒的免疫力)产生影响,从而有利于病毒的繁殖,并在体质较弱的虾体首先导致死亡。因此,在养殖期间,如出现气候异常变化,则应采取相应的应急措施,以防止对虾病毒病的发作。

### 参 考 文 献

[1] 蔡心一,苏永全. 现代渔业信息,1993,8(9): 11-18.  
[2] 宋思扬,张驰,沈明山,等. 厦门大学学报(自然版),1994, 33: 696-700.

- [3] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (vol 1). Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, 516—538.
- [4] 蔡岳文, 陈淑海. 海洋环境科学, 1992, 11(2): 49—56.
- [5] 李定安. 中国水产(台湾). 1989, 441: 19—62.
- [6] 黄旭田. 养虾全集(台湾). 1989, 139—152.
- [7] 孟庆显. 对虾疾病防治手册, 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.

## PRIMARY STUDY ON PATHOGENESIS OF VIRUSES ISOLATED FROM CULTIVATED PENAEID SHRIMPS

Zhang Chi Chen Jinan Sun Changbo Shen Mingshan  
Yang Shuzhuan Su Wenjin

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** The healthy, virus-free shrimps of *Penaeus japonicus* were infected with the baculovirus isolated from *P. japonicus* and the spheroid-virus isolated from *P. penicillatus* respectively. The mortality of the infected shrimps was 65% for the baculovirus group and 50% for the spheroid-virus group and only 25% for the control group. Among the factors investigated in the cultivated environment, the lift of temperature and the low atmospheric pressure were suggested to be the most important factors that could cause the viral disease of cultivated penaeid shrimps.

**Key words** Cultivated penaeid shrimps, Penaeid shrimp virus, Infection assay