

# 稀有𬶋鲫对草鱼出血病病毒 敏感性的初步研究\*

王铁辉 刘沛霖 陈宏溪 刘汉勤 易咏兰 郭文

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提 要

本文报道稀有𬶋鲫对草鱼出血病病毒(GCHV)的敏感性。GCHV是草鱼出血病的病原, 用GCHV人工感染1—6月龄的稀有𬶋鲫, 在水温22—32℃时能导致稀有𬶋鲫出现出血病症状。在水温28℃时, 病鱼在1d内死亡, 潜伏期为5d, 发病高峰期在感染后第6—8d。GCHV能在稀有𬶋鲫体内传代, 并诱导80%以上的稀有𬶋鲫患病死亡。将人工感染GCHV的稀有𬶋鲫病鱼组织超薄切片, 电镜观察, 发现在肠道、脾脏、肾脏等组织中存在大小与形态和GCHV相似的病毒颗粒。从稀有𬶋鲫出血病病鱼组织中纯化病毒, 免疫电镜观察, 发现病毒颗粒能被GCHV的特异性抗体聚集成团。由上可知, 稀有𬶋鲫出血病是由GCHV感染所致, 稀有𬶋鲫对GCHV是敏感的, 可以作为草鱼抗出血病育种的模型。

**关键词** 草鱼出血病, 草鱼出血病病毒, 稀有𬶋鲫, 稀有𬶋鲫出血病

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.)是我国淡水鱼类中优良的养殖对象, 也是人们喜爱的食用鱼之一, 但草鱼出血病造成草鱼鱼种阶段的大批死亡, 现已证明, 该病由草鱼出血病病毒(Hemorrhagic Virus of Grass Carp, 简称GCHV)引起<sup>[1-4]</sup>。因此, 进行草鱼抗出血病病毒育种研究对于我国淡水渔业的发展具有重要的意义。从1982年起就开始进行草鱼抗出血病生物技术育种研究, 建立了对GCHV敏感的细胞株<sup>[5]</sup>, 分离了GCHV抗性细胞株<sup>[6]</sup>, 并获得了一批经GCHV攻击存活的个体。但因草鱼个体大, 世代周期长, 繁殖期短, 使这一研究的进展缓慢。选择一种世代周期短, 繁殖期长, 而对GCHV敏感的小个体实验鱼作为草鱼抗病毒育种研究的模型, 必将大为加速草鱼抗出血病育种研究的进程; 同时, 也为其它鱼类及动物的抗病毒育种提供技术和方法。

稀有𬶋鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类, 属于𬶋亚科(Danionionae), 鲈属(*Gobiocypris*), 仅分布于四川省汉源县境内, 属大渡河支流的流

\* 本所电镜室协助病鱼组织的超薄切片和病毒样品的电镜制片, 武汉大学分析测试中心电镜室钟桂荣、边书民老师协助电镜观察和照相。本所曹文宣教授赠送稀有𬶋鲫亲鱼, 崔书勤、戴捌华、腾婧青为材料鱼的饲养和管理付出了辛勤的劳动, 在此一并致谢!

1991年11月25日收到。

沙河中、下游 40Km 的范围<sup>[7]</sup>。由于其个体小,生命力强,温度适应范围广,饲养方便,世代周期短,分批产卵,产卵批次多,繁殖期长等一系列优点,是一种理想的实验鱼材料<sup>[8]</sup>。GCHV 人工感染稀有鮈可很快导致出血病症状,GCHV 能在稀有鮈体内传代,并能从稀有鮈出血病病鱼体内分离出 GCHV,稀有鮈对 GCHV 是敏感的,可以作为草鱼抗出血病育种的模型。本文报道稀有鮈对草鱼出血病病毒敏感性的研究结果。

## 1 材料与方法

**1.1 稀有鮈** 由本所鱼类学研究室提供亲鱼,本研究组人工繁殖,以红虫和颗粒饵料饲养于室内水泥池中的 1—6 月龄鱼。

**1.2 GCHV 来源** GCHV-861 株,系 1986 年从武汉东西湖渔场收集的草鱼出血病病鱼组织,经 1990 年人工感染草鱼种后收集的显症病鱼组织,保存于-20℃冰箱。使用时将病鱼组织制成匀浆,0.22μm 滤膜过滤除菌,或在含 1000μm/ml 青霉素,1000μg/ml 链霉素,500μg/ml 卡那霉素中 4℃冰箱过夜除菌。

**1.3 感染方法** 用曝气自来水稀释病毒,采用浸泡或高渗浸泡感染<sup>[9]</sup>。感染后的稀有鮈饲养于 26—28℃,逐日观察。

**1.4 超薄切片和电镜观察** 取病鱼或健康鱼组织戊二醛,锇酸固定,Epon 812 包埋,LKB 切片机超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色,JEM-100CX II 电镜观察。

**1.5 免疫血清的制备** 用 GCHV-861 株感染 GCK-84 细胞株后<sup>[6]</sup>,采集细胞培养液,用 CsCl 梯度纯化病毒,常规方法免疫大耳白兔<sup>[10]</sup>,颈动脉采血制备兔抗 GCHV 抗血清。

**1.6 免疫电镜观察** GCHV 感染稀有鮈后,收集病鱼组织,制成匀浆,40%蔗糖垫底、差异离心浓缩、纯化病毒。免疫电镜制片按 Morgan-Capner 等的方法进行<sup>[11]</sup>,2%磷钨酸负染,JEM-100CX II 电镜观察。

## 2. 结果

### 2.1 稀有鮈出血病症状

GCHV 人工感染稀有鮈后,在 5—12d 内能复制出典型的出血病症状(图版 I:1),称之为稀有鮈出血病。人工感染后,饲养于 28℃,发病死亡高峰在第 6—8d(图 1)。由于稀有鮈鳞片小、皮薄,开始发病之鱼即可观察到肌肉斑块状充血,充血块增多、扩大,游动缓慢,病鱼在 1d 内死亡。刚死之病鱼一般表现为两种症状,大部分表现为全身肌肉及鳃盖、口腔、鳍基斑块状充血,此时,鳃丝充血或充血不明显,肝、肠等内脏苍白或泛黄,脾肿大,无腹水或少腹水;小部分表现为肠道及肠系包膜斑块状充血,严重时整个肠道红色或紫红色,肝脏充血或泛黄,脾肿大,有少量腹水,此时,肌肉充血不明显,口腔、鳍基及肛门充血。性成熟后的病鱼,常可见性腺包膜斑块状充血,甚至整个包膜呈紫红色。

表 1 表示 GCHV-861 株两次人工感染稀有鮈的结果。每次实验分两组,第一组为高渗浸泡感染,第二组为常规浸泡感染,另设对照。高渗浸泡感染时稀有鮈患出血病的死亡率大为升高。

### 2.2 GCHV 在稀有鮈体内传代

GCHV 感染稀有鮈后,从发病鱼体中分离病毒,重复感染稀有鮈,表 2 表示 GCHV 在稀有鮈体内传代四次的结果。GCHV 在稀有鮈体内连续传代后,毒力增强,死亡率从 86.7% 升到 100%。潜伏期从 7d 缩到 5d,死亡高峰从第 9d 提前到第 7d。

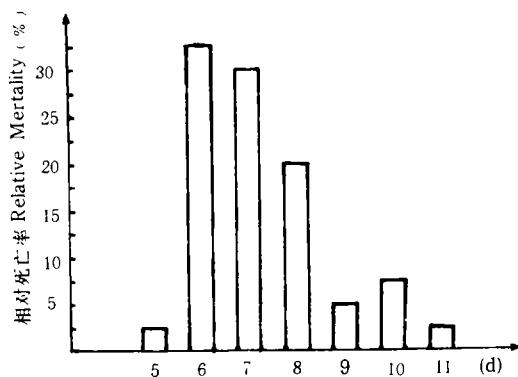


图 1 稀有𬶋鱼出血病的相对死亡率

Fig.1 The relative mortality of *Gobiocypris rarus* with hemorrhage

表 1 稀有𬶋鱼对 GCHV 的敏感性

Tab.1 Susceptibility of *Gobiocypris rarus* to GCHV

组 合 Group	温度(℃) Tem.	鱼数(尾) Number of fish	死亡日期(开始 / 结束) Date of death Initial / End		死亡率(%) Mortality
			—	—	
第一次	对照 Control	28	7	—	0
	第一组 Group 1	28	9	5 / 8	100
	第二组 Group 2	28	10	4 / 9	50.0
第二次	对照 Control	26	15	—	0
	第一组 Group 1	26	60	7 / 13	86.7
	第二组 Group 2	26	15	9 / 13	60.0

表 2 GCHV 在稀有𬶋鱼体内传代

Tab.2 The transmission of GCHV in *Gobiocypris rarus*

代数 Generation	第一代		第二代		第三代		第四代	
	实验 Test	对照 Control	实验 Test	对照 Control	实验 Test	对照 Control	实验 Test	对照 Control
温度(℃) Temperature	26	26	26	26	28	28	28	28
鱼数(尾) Number of fish	60	15	15	15	15	15	15	15
死亡日期(开始 / 结束) Date of death Initial / End	7 / 13	—	7 / 10	—	6 / 11	—	5 / 10	—
死亡高峰期 Period of high mortality	9th	—	8th	—	7th	—	7th	—
死亡率(%) Mortality	86.7	0	86.7	0	100	0	100	0

### 2.3 温度对稀有𬶋鲫出血病的影响

GCHV 人工感染稀有𬶋鲫后,于 18—32℃水温饲养 20d, 18℃恒温饲养时,稀有𬶋鲫未见发生出血病死亡,22℃时死亡率较低,只有 60%,没有明显的发病高峰期;25—32℃时出血病死亡率没有差异,但随着温度升高,潜伏期缩短,发病高峰期提前(表 3)。

表 3 温度对稀有𬶋鲫出血病的影响

Tab.3 The effect of temperature on the hemorrhage of *Gobio cypris rarus*

温度(℃) Temperature	18	22	25	28	32	Control(28)
鱼数(尾) Number of Fish	15	15	15	15	15	15
死亡日期(开始/结束) Date of death Initial / end	—	11/16	7/14	6/14	6/12	—
死亡高峰期 Period of high mortality	—	11th-14th	8th	7th	6th	—
死亡率(%) Mortality	0	60.0	93.3	93.3	93.3	0

### 2.4 超薄切片观察

GCHV 感染稀有𬶋鲫后,收集稀有𬶋鲫出血病病鱼的肝、脾、肾等,超薄切片,电镜观察。在病鱼的肠道、脾脏、肾脏等组织细胞内见到许多病毒颗粒[图版 I: 3, 4],大小为 70nm 左右,具双层衣壳,与邓初夏等报道的草鱼呼肠孤病毒在 GCK-84 细胞株观察的一致;并观察到组织和细胞明显损害<sup>[12]</sup>。

### 2.5 免疫电镜观察

GCHV 感染稀有𬶋鲫后,收集发病的稀有𬶋鲫肌肉和内脏制成匀浆,运用蔗糖垫底差异离心分离纯化病毒,负染电镜观察,可以看到许多散在的六边形病毒颗粒,具双层衣壳,大小为 60—70nm,与以前报道的草鱼呼肠孤病毒一致;用 GCHV 特异的免疫血清进行免疫电镜观察,可以发现许多成团的病毒颗粒[图版 I: 2],大小和形状同上,但可以看到病毒颗粒上许多抗体桥;由上可知,我们从稀有𬶋鲫出血病病鱼体内分离的是 GCHV, GCHV 能在稀有𬶋鲫体内繁殖。

## 3 讨 论

GCHV 是草鱼出血病的病原,同时 GCHV 也能感染青鱼(*Mylopharyngodon piceus* Richardson)和罗汉鱼(*Pseudorasbora parva* Temminck et Schlegel)<sup>[1]</sup>,丁清泉等认为 GCHV 人工感染鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix* Curieret Valenciennes)和布氏鱲条(*Hemiculter bleekeri* Warpachowsky),虽无出血病症状,但能在这两种鱼体内复制。鱲鱼(*Aristichthys nobilis* Richardson)、鲫鱼(*Carassius auratus* Linnaeus)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yie),泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus* Canbar)对 GCHV 是不敏感的<sup>[13]</sup>。目前还没有报道 GCHV 人工感染稀有𬶋鲫的研究。我们的研究结果表明, GCHV 人工感染稀有𬶋鲫能导致稀有𬶋鲫出现出血病症状, GCHV 能在稀有𬶋鲫体内复制和传代。超薄切片,电镜观察发现,稀有𬶋鲫出血病病鱼肠道、脾脏、肾脏等组织中存在大量病毒颗粒;免疫电镜观察表明,在稀有𬶋鲫出血病病鱼

组织中能分离特异的 GCHV 病毒颗粒。所以,稀有𬶋鲫出血病是由 GCHV 引起,稀有𬶋鲫对草鱼出血病病毒是敏感的。

草鱼出血病根据症状不同可分为三种类型:红鳍红鳃盖型,红肌肉型和肠炎型。GCHV-861 株人工感染草鱼种主要表现为红肌肉型和肠炎型(未发表资料);人工感染稀有𬶋鲫出血病的症状主要表现为肌肉、鳃盖、口腔等外部器官点状或斑块状充血;少部分表现为肠道等内部器官的充血,此时,鳍基、口腔、鳃盖、肛门等部位也见充血;与草鱼出血病的症状基本相同。GCHV 只能感染一龄或二龄草鱼种,二龄草鱼种发病率较低,大草鱼或性成熟草鱼不发生出血病;GCHV-861 株能够感染性成熟的稀有𬶋鲫,并发生出血病,有时表现为性腺包膜斑块状充血,其组织病理和细胞病理学有待进一步研究。

鱼类作为一种变温动物受环境因素特别是水温变化的影响,病毒在鱼体的感染过程可受水温变化而产生决定性的影响。水温过低不利于病毒的增殖,而水温升高到一定程度鱼体的抵抗力包括各种免疫因素也随之增强,从而抑制了病毒的增殖。流行病学调查表明,草鱼出血病的主要流行季节是 6—9 月,水温在 27℃ 以上最容易流行<sup>[14]</sup>。丁清泉等<sup>[15]</sup>的研究表明,在室内控温饲养,草鱼出血病病毒人工感染草鱼发病死亡率与自然发病流行一样受温度的影响,24—30℃ 恒温时发病率无差异,20℃ 为该病流行的临界温度,33℃ 恒温时 48h 左右引起病毒性暴发死亡。我们用 GCHV 人工感染稀有𬶋鲫的结果表明,在水温 18℃ 饲养时未见死亡,在 22℃ 恒温饲养时死亡率 60.0%,无明显的死亡高峰期,25—32℃ 恒温饲养时死亡率为 93.7%;但潜伏期随温度上升而缩短,死亡高峰提前,在 32℃ 时也未见暴发性死亡的现象。温度对稀有𬶋鲫出血病的影响还需进一步研究。

由于草鱼抗出血病育种对我国淡水渔业的发展具有重要意义,我们从“六五”以来就开始进行这一研究,取得了一定的进展。但是,草鱼个体大,世代周期长,繁殖期短,造成了养殖、操作、取材等方面的困难,我们一直在探索用一种小型鲤科鱼作为草鱼抗出血病生物技术育种研究的模型。稀有𬶋鲫是我国特有的、在鲤科鱼类中新发现的难得的实验鱼材料<sup>[8]</sup>。稀有𬶋鲫对 GCHV 敏感这一新的发现,展示了稀有𬶋鲫作为草鱼抗出血病育种模型的可能性,其分布范围小,种质纯,便于进行遗传分析和实验结果的比较;个体小,容易养殖和管理;分批产卵,产卵批次多,在人工控温条件下养殖可以一年多次繁殖,便于实验取材和重复实验;世代周期短,便于灵活运用多种生物技术进行抗出血病育种研究,观察对后代的影响。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组. 草鱼出血病病原的研究. 水生生物学集刊, 1978, 6(3): 321—329.
- [2] 中国科学院病毒研究所等. 草鱼出血病病毒电子显微镜观察初报. 淡水渔业, 1983, (3): 39.
- [3] 毛树坚等. 草鱼出血病病原的研究. 水产学报, 1989, 13(1): 1—4.
- [4] 柯丽华等. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153—159.
- [5] 邓初夏等. 几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒敏感性的研究. 水生生物学报, 1985, 9(4): 351—358.
- [6] Wang Tiehui et al. Characterization of a cell clone resistant to Hemorrhagic Virus of Grass Carp. *Aquaculture*, 1993, (111): 307.
- [7] 叶妙荣, 傅天佑. 鲈亚科鱼类—新属新种记述(鲤形目:鲤科). 动物分类学报, 1983, 8(4): 434—437.
- [8] 王剑伟. 稀有𬶋鲫的繁殖生物学. 水生生物学报, 1992, 16(2): 165—174.
- [9] 王铁辉等. 草鱼出血病病毒高渗浸泡感染稀有𬶋鲫的研究. 当代微生物学研究进展, 武汉大学出版社, 1993.

待印

- [10] 戴华生等。新实验病毒学。北京:中国学术出版社,1983, P265。
- [11] P Morgan-Capner. Pattison J R. Techniques in Clinical Virology. in: Virology (ed. by B W J Mahy). Oxford: IRL Press. 1985, p237-258.
- [12] 王铁辉等。草鱼出血病病毒人工感染稀有𬶋鲫出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察。水生生物学报,1993, 17(4): 343—346。
- [13] 丁清泉等。草鱼出血病病毒对其他鱼的感染性研究。水产学报,1991, 6(4): 434—437。
- [14] 黄琪瑛主编。鱼病学。上海:上海科学技术出版社,1983, P60。
- [15] 丁清泉等。温度对草鱼出血病影响的初步探讨。病毒学杂志,1990, 5(2): 215—220。

## PRELIMINARY STUDY ON THE SUSCEPTIBILITY OF

### *GOBIOCYPRIS RARUS* TO HEMORRHAGIC VIRUS OF GRASS CARP (GCHV)

Wang Tiehui Liu Peilin Chen Hongxi Liu Hanqin Yi Yonglan and Guo Wen

(Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

#### Abstract

This is the report on the susceptibility of *Gobiocypris rarus* to Hemorrhagic Virus of Grass Carp (GCHV). The hemorrhage of *Gobiocypris rarus* is induced by the GCHV in the age from 1—6 months when the water temperature is 22°C—32°C. At the water temperature of 28°C, the diseased fish die in one day, whose latent period is 5 days after infection. The period of high mortality of the diseased fish comes in 6—8 days after the infection. GCHV can transmit in *Gobiocypris rarus*, and more than 80% of the fish die from the infection of GCHV. The electron microscopic examination on the ultrathin sections reveals that there are virus particles, which resemble GCHV in size and shape, in such organs as the intestinal tract, the spleen, and the kidney etc. of the artificially infected hemorrhagic fish. The immuno-electron microscopic observation showed that the purified virus particles isolated from the hemorrhagic *Gobiocypris rarus* can be aggregated by the specific GCHV antibody. The results prove that the hemorrhage of *Gobiocypris rarus* is caused by GCHV, and that *Gobiocypris rarus* is susceptible to GCHV. Furthermore, *Gobiocypris rarus* may serve as a model of the Virus-resistance breeding of Grass Carp with biotechnique methods.

**Key words** Hemorrhage of Grass Carp, Hemorrhagic virus of Grass Carp (GCHV), *Gobiocypris rarus*, Hemorrhage of *Gobiocypris rarus*