DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00441

红螯光壳螯虾白斑综合症血液病理学研究

王丹丽[1, 2] 孙 婷[1] 左 迪[1] 王兰梅[1] 赵云龙[1]

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 宁波 315211)

摘要: 采用 Wright-Geimsa 染色法和电镜技术对人工感染的红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)白斑综合症(White spot syndrome, WSS) 血液病理学进行了研究。结果显示: 患病螯虾血细胞总数、透明细胞(AH)数量极显著减少(P <0.01), 大颗粒细胞(LGH)极显著增加(P <0.01); 病毒感染后 3 种血细胞大小均有增加趋势, 透明细胞和大颗粒细胞的核质比(NP)较感染病毒前极显著下降(P <0.01)。显微病理学变化主要表现为血涂片中血细胞明显减少, 病变、破损或解体的细胞增多, 至濒死期螯虾血液呈典型的溶血状态。超微病理学变化表现为血细胞受到了损伤。高尔基体变形、线粒体结构模糊破损; 核膜变形核固缩、细胞核高度异染色质化; 濒临死亡的螯虾血细胞细胞器和染色质溶解, 胞浆水肿, 细胞溶解坏死。在患病螯虾的血细胞核中清晰可见 WSSV 粒子。

关键词: 红螯光壳螯虾; 白斑综合症; 血液病理学

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0441-09

自 20 世纪 90 年代对虾白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus)在全世界范围暴发以来, 其宿主范围广, 不仅侵染各种野生及养殖对虾[1, 2], 而且还涉及几乎所有的水生甲壳类动物[3, 4], 近年来, 浙江、江苏等地也都陆续发生了 WSSV 自然感染红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的病例, 严重制约了成虾养殖。血液病理研究是病理学研究的主要内容之一, 它是疾病发生机理、病原学及防治方法研究的理论基础。已有研究表明血细胞是 WSSV 侵染的主要靶细胞, 并在病毒对各组织器官的感染中起重要作用[5, 6], 因此研究 WSSV 对宿主血细胞的感染特性, 对了解 WSSV 致病机理具有重要意义。目前有关甲壳类动物白斑综合症(WSS) 血液病理的研究报道主要有: 张吕平等[7]在光镜下描述了人工感染白斑综合症的斑节对虾(*Penaeus monodon*)和健康虾血细胞的形态区别; 陈平等[8]观察比较了中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等 4 种健康虾和白斑综合症病虾的血细胞超微病理变化; 冯守明等[9]和张志栋等[6]对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)白斑综合症血液病理进行了研究; 王轶南等[10]和陆剑锋等[11]分别研究了 WSSV 对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)血细胞的感染规律和血细胞的免疫功能; Van de Braak, *et al*.[5]对斑节对虾白斑综合症的血液病理进行了研究; Rojtinnakorn, *et al*.[12]对 WSSV 感染后日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) 血淋巴细胞数量的基因表达进行了研究; Jiravanichpaisal, *et al*.[13]对感染 WSSV 后淡水龙虾 crayfish 血细胞的研究。但迄今为止未见红螯光壳螯虾白斑综合症血液病理学研究的详细报道。本文通过比较研究感染虾与健康虾的血细胞数量、大小、核质比等指标及血细胞的显微和超微结构病理变化等, 以期为该疾病的诊断和防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验用虾

试验用红螯光壳螯虾采自上海市金山区漕泾特

收稿日期: 2011-04-21; 修订日期: 2012-02-01

基金项目: 上海市科学技术委员会重大科研资助项目(08DZ1906401); 上海市教育委员会科研创新项目(11CXY18); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903056)资助

作者简介: 王丹丽(1962－), 女, 浙江义乌人; 博士; 主要从事水生动物学及水产动物资源保护学研究。E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn

通讯作者: 赵云龙, 教授; Tel: 021-62232153; E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn

种水产养殖场, 体长(13.51±1.30) cm, 体重(59.81±6.51) g, 挑选健康活力强的 50 尾螯虾暂养于实验室玻璃水族箱内, 饲养温度(25±1)℃, 24h 连续充气。试验前暂养 7d, 每天投喂饲料 1 次。

1.2 病毒悬液制备及病毒扩增

WSSV 病毒由浙江省淡水水产研究所鱼类免疫与健康重点开放实验室惠赠(病样来源于江苏某红螯光壳螯虾养殖场, 由该实验室分离鉴定和保存)。将感染后病虾(PCR 检测为 WSSV 强阳性)的血淋巴、鳃等组织按 1∶10 (*w*∶*v*) 的比例加入无菌生理盐水在组织匀浆器中匀浆, –18℃冰箱过夜, 待解冻后经高速台式离心机以 6000 r/min 离心 5min 及 10000 r/min 离心 10min, 再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, –80℃ 保存上清液。实验时取制备的上清液,人工感染健康红螯光壳螯虾以复壮病毒, 0.14—0.2 mL/尾, 攻毒后 3—5d, 采集各发病虾的血淋巴反复冻融, 4000 r/min 离心 5min, 取上清再次感染实验用健康红螯光壳螯虾若干尾, 0.14 mL/尾, 接种后于 25℃饲养。

1.3 感染试验

将红螯光壳螯虾随机分为 3 组(对照组、72h 试验组、濒死试验组), 每组取 5 尾虾。试验组于第 1、2 腹节肌肉注射 0.14 mL/尾病毒液。分别于 0h(对照组)、72h(72h 试验组)和 96h(濒死试验组)取样用于实验分析。

1.4 血细胞计数

用 1mL 注射器吸取 0.2 mL 的固定液(5%的甲醛溶液), 再刺入红螯光壳螯虾胸足基部吸取等量的血淋巴, 混匀。以血球计数板在 Leica 显微镜下进行计数。

1.5 血涂片制作

取血后迅速制成血涂片, 每尾虾血涂片 5 张, Wright-Geimsa 染色(南京建成生物工程研究所), Leica 荧光显微镜(DM4000B)观察、拍照。

1.6 血细胞大小测量及分类计数

每张涂片随机选取 100 个细胞对其分类计数; 对不同的细胞随机选取 20 个, 用目测微尺测量细胞及核的长径和短径。计算细胞核质比: 核质比=细胞核长径/(细胞长径–细胞核长径)。

1.7 电镜样品制备及观察

取未感染病毒的对照组及感染后 72h 试验组和濒死试验组红螯光壳螯虾的血淋巴, 经 3700 r/min 离心 10min 后得血细胞, 经 2.5 %戊二醛和 1%锇酸双固定, 4℃冰箱中保存, 酒精脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, LKB 超薄机超薄切片, 醋酸双氧铀—柠檬酸铅双染法染色, 日立 H-7650 型透射电镜观察并拍照。

1.8 试验数据分析

试验所得数据以平均值(Mean, M)±标准差(Stdeva, SD)表示, 所测数据以 SPSS 14.0 软件进行数据统计分析, 采用 One-Way ANOVA 法进行显著性检验。

2 结 果

2.1 人工感染试验

人工感染 WSSV 后的红螯光壳螯虾于 3—5d 内全部死亡。发病红螯光壳螯虾体表无明显症状, 头胸甲、腹部甲壳及附肢也无明显白色斑点, 但病虾厌食, 空胃, 反应迟钝, 螯肢无力, 而且病虾血淋巴不凝固、微红, 头胸甲易剥离, 肝胰腺颜色淡黄, 腹节肌肉苍白, 断肢。对照组红螯光壳螯虾全部存活, 未见异常症状。

2.2 **WSSV** 感染前后红螯光壳螯虾血细胞的数量比较

红螯光壳螯虾白斑综合症病虾和对照虾血细胞数量比较结果(表 1)。对照组红螯光壳螯虾的血细胞平均数量为 58.34×10^6 cell/mL, 感染后 72h 试验组及濒死试验组螯虾的血细胞数量急剧下降, 分别为 21.04×10^6 cell/mL 和 6.0×10^6 cell/mL, 与对照组呈极显著差异(P <0.01)。濒死试验组螯虾的血细胞数量明显低于感染后 72h 试验组(P <0.05)。

红螯光壳螯虾的血细胞由透明细胞又称无颗粒血细胞(Hyaline hemocyte, AH)、小颗粒细胞(Small granule hemocyte, SGH)和大颗粒细胞(Large granule hemocyte, LGH)组成。对照组红螯光壳螯虾的透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞分别占血细胞总量的 47.51%、34.46%和 17.37%; WSSV 感染后透明细胞所占比例极显著低于对照组(P <0.01); 而感染后 72h 试验组及濒死试验组螯虾的大颗粒细胞所占比例明显上升, 分别为 57.81×10^6 cell/mL 和 53.18×10^6 cell/mL, 极显著高于对照组 17.37×10^6 cell/mL(P< 0.01); 小颗粒细胞的比例变化相对较小, 对照组与感染后 72h 试验组无明显差异(P>0.05), 但与濒死试验组有明显差异(P <0.05)。

2.3　WSSV 感染前后红螯光壳螯虾血细胞大小及核质比的比较

由表 2 可知, 感染 WSSV 前红螯光壳螯虾透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞的平均大小分别为 17.94 μm×14.44 μm、19.40 μm×13.86 μm 和 25.33 μm×19.09 μm, 感染后 72h 试验组及濒死试验组螯虾的 3 种血细胞均有增大趋势。对照组的 3 种细胞除透明细胞与濒死试验组无显著差异外, 与其他试验组均存在着极显著性差异(P<0.01), 其中大颗粒细胞由感染前的 25.33 μm×19.09 μm 增大到感染后的 34.45 μm×26.68 μm。

红螯光壳螯虾感染 WSSV 前后 3 种血细胞的核质比(NP)(表 2)。感染后的红螯光壳螯虾透明细胞和大颗粒细胞的核质比极显著小于对照组(P<0.01), 且其大颗粒细胞核质比都小于 1, 说明螯虾的大颗粒细胞细胞核较小, 胞质多。小颗粒细胞的核质比在 WSSV 感染前后无明显差异(P>0.05)。

2.4　血细胞病理的光镜观察

红螯光壳螯虾的血细胞由透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞 3 种组成。透明细胞多为圆形或卵圆形, 直径约 15—20 μm, 核大, 多为圆形, 位于细胞的中央占据胞体的大部分, Wright-Geimsa 染色后细胞核呈紫红色, 细胞质只在核外包绕很薄的一层, 其中无颗粒状物质, 胞膜表面光滑或有伪足状突起(图版Ⅰ:1、2)。小颗粒细胞, 多为椭圆形, 长径约 16—23 μm, 核清晰可辨, 多为圆形或椭圆形, 染色后呈蓝色或紫红色; 细胞质中含少量黑色、紫红色小颗粒或大颗粒(图版Ⅰ:2、4)。大颗粒细胞, 是 3 种细胞中最大的一种, 多为长椭圆形, 长径约 22—28 μm, 具有大量紫红色或黑色颗粒, 颗粒在细胞中分布均匀; 核多为圆形或椭圆形, 染色后细胞核呈深蓝色或紫红色, 胞核有时受颗粒的挤压, 常不居中, 核常被颗粒掩盖而不清晰(图版Ⅰ:1)。

WSSV 感染后, 血细胞的主要显微病理变化为: 血涂片中血细胞总数明显减少, 正常血细胞减少, 病变、破损或解体的细胞增多, 至濒死期呈典型的溶血状态(图版Ⅰ:9、11)。透明细胞明显减少, 大颗粒细胞明显增多(图版Ⅰ:8); 病变透明细胞细胞核

表 1　红螯光壳螯虾 **WSSV** 感染虾和对照虾血细胞数量比较

Tab. 1　The compare on hemocyte count of healthy and infected WSSV *Cherax quadricarinatus*

项目 Items	对照虾 Control shrimp	72h 试验虾 72h experimental shrimp	濒死试验虾 Danger experimental shrimp
血细胞总数 ($\times10^6$ cell/mL) Total hemocyte count	58.34±16.38^{a}	21.04±4.05^{b}	6.00±0.55^{c}
透明细胞 (%) Hyaline hemocyte	47.51±3.35^{a}	11.35±1.01^{b}	17.40±1.27^{c}
小颗粒细胞 (%) Small granule hemocyte	34.46±1.18^{a}	31.51±4.11^{ab}	27.09±2.08^{b}
大颗粒细胞 (%) Large granule hemocyte	17.37±1.68^{a}	57.81±3.86^{b}	53.18±1.74^{bc}

注: 表格中所给数据为平均数,不同的上标表示差异显著(P<0.05)或差异极显著(P<0.01); 下表同

Note: Values are means and with different superscripts have significant differences or highly significant differences; The same bellow

表 2　红螯光壳螯虾 **WSSV** 感染虾和对照虾血细胞大小及核质比的比较

Tab. 2　The compare of hemocyte size and hemocyte NP of healthy and infected WSSV *Cherax quadricarinatus* (μm)

细胞类型 Hemocytes type	对照虾 Control shrimp	72h 试验虾 72h experimental shrimp	濒死试验虾 Danger experimental shrimp
透明细胞大小 Hyaline hemocyte size	17.94±2.41^{a}×14.44±1.25^{a}	20.48±2.55^{b}×16.40±1.82^{b}	17.74±1.95^{a}×14.61±2.18^{a}
小颗粒细胞大小 Small granule hemocyte size	19.40±3.58^{a}×13.86±2.23^{a}	22.48±3.78^{bc}×17.86±2.52^{bc}	23.92±2.76^{c}×17.25±1.93^{c}
大颗粒细胞大小 Large granule hemocyte size	25.33±3.09^{a}×19.09±2.75^{a}	28.64±3.40^{b}×20.25±3.71^{a}	34.45±3.97^{c}×26.68±3.78^{b}
透明细胞核质比 NP of hyaline hemocyte	5.12±2.51^{a}	3.08±1.94^{b}	2.42±0.47^{b}
小颗粒细胞核质比 NP of small granule hemocyte	1.43±0.46^{a}	1.40±0.35^{a}	1.45±0.29^{a}
大颗粒细胞核质比 NP of large granule hemocyte	0.75±0.27^{a}	0.58±0.16^{b}	0.45±0.13^{c}

注: 表中血细胞大小数据为细胞的长径×短径

Note: The dates of hemocyte size indicate major diameter><minor diameter of hemocytes in the table

收缩, 细胞膜变形有泡状突起(图版Ⅰ:3)。病变小颗粒细胞胞质空泡化变性(图版Ⅰ: 4), 病变大颗粒细胞细胞核固缩、细胞体积膨胀(图版Ⅰ: 5、6), 感染 WSSV 后可见大颗粒细胞和小颗粒细胞释放颗粒, 部分大颗粒细胞解体, 胞浆溢出(图版Ⅰ:7、10)。

2.5 血细胞病理的电镜观察

电镜观察红螯光壳螯虾的 3 种血细胞, 其中透明细胞的胞膜表面多数光滑, 核大, 细胞质中细胞器稀少, 胞质中存在少量高电子密度的颗粒 (图版Ⅱ: 1)。小颗粒细胞细胞质中有较多的线粒体、内质网等细胞器, 高电子密度的小颗粒和少量空泡 (图版Ⅱ: 2)。大颗粒细胞是 3 种血细胞中体积最大的细胞, 胞质中含有大量高电子密度的大颗粒, 且有大量的线粒体、内质网等细胞器(图版Ⅱ: 3)。对照组中的红螯光壳螯虾血细胞核内的染色质分布均匀, 细胞质中的高尔基体和线粒体结构清晰完整(图版Ⅱ: 1—3)。

在 WSSV 感染下, 血细胞的超微结构与对照组相比发生了明显变化: 细胞核高度异染色质化, 核膜变形, 核固缩(图版Ⅱ:4、6), 部分血细胞细胞膜破裂, 颗粒外流(图版Ⅱ:6); 高尔基体变形、线粒体边界不完整或结构模糊破损(图版Ⅱ:5); 濒临死亡红螯光壳螯虾的血细胞核内分布 WSSV 病毒粒子, 细胞膜、核膜渐融, 部分细胞核边移, 细胞器变性溶解, 胞浆水肿, 染色质溶解, 直至解体(图版Ⅱ:7、8)。

在电镜下 WSSV 为杆状病毒粒子, 病毒粒子大小为(99—118) nm×(189—321) nm, 横切面为圆形, 纵切面为杆状而略带椭圆, 双层囊膜, 其形态大小与已报道的 WSSV 一致[16, 17] (图版Ⅱ:7、9)。

3 讨 论

3.1 WSSV 感染对红螯光壳螯虾血细胞数量的影响

甲壳动物不同血淋巴细胞在免疫防御方面起着不同的作用。大颗粒细胞内有大量高电子密度的颗粒, 主要作用是合成大量的酚氧化酶原(proPO), 对于病毒侵袭起着重要的作用, 当病原等异物侵入时可以通过胞吐作用释放到胞体外, 参与机体的非特异性免疫[14]。小颗粒细胞不但含有大量小电子致密颗粒, 而且富含线粒体、内质网等细胞器, 受到外源物质刺激后极易脱颗粒而表现吞噬功能[15]。另一方面小颗粒细胞还主要合成 proPO 激活系统的一些组分, 这些组分被释放后会进一步刺激大颗粒细胞活跃合成 proPO, 将大颗粒细胞所分泌出的 proPO 激活成有活性的 PO[16]。透明细胞也有很强的吞噬作用, 这与细胞表面有丰富的突起而能在异物表面强烈的附着和伸展有关。有关三类血细胞的关系至今尚未有详细报道, 陈平等[8]研究发现, 大颗粒细胞虽然无吞噬能力, 附着能力和扩散力也较弱, 但受到活化的酚氧化酶原处理后, 胞吞作用增强, 释放出更多的酚氧化酶, 说明三种细胞之间在免疫防御方面可能具有协同作用。张志栋等[6]通过研究白斑症病毒感染凡纳滨对虾后大颗粒细胞的动态变化, 发现透明细胞和小颗粒细胞有可能向大颗粒细胞转化, 这说明大颗粒细胞具有免疫功能。

本研究观察发现在病毒感染后的血细胞中大颗粒细胞明显增多, 并释放颗粒(图版Ⅰ:10, 图版Ⅱ:6)。这是由于病毒感染后, 螯虾受到病毒的刺激, 免疫防御能力增强, 透明细胞和小颗粒细胞转化成免疫功能较强的大颗粒细胞, 以致循环系统中大颗粒细胞占血细胞总数的比例显著增加, 并释放酚氧化酶到胞质中, 发挥细胞解毒的功能。但随着感染时间的延长, 机体的免疫防御机能受损, 致使血细胞总数明显下降, 至 72h 时血细胞总数下降了 63.93%, 极显著低于对照组(P <0.01), 与 Van de Braak , *et al*.[5]对斑节对虾白斑综合症的研究至 72h 时血细胞总数下降了 67.29%相吻合, 也与王轶南等[10]研究的克氏原螯虾血细胞数量从感染第 3 天开始,下降速度明显加快相符合。随着病毒感染程度的加重, 血细胞被感染率增加, WSSV 在血细胞中高强度的增殖直接导致血细胞的崩解死亡, 同时, 宿主为防御病毒而引发的细胞凋亡也是导致宿主血细胞数量急剧减少的主要原因[17]。因此 WSSV 感染至螯虾濒死时, 血细胞大量崩解, 血细胞总数进一步明显下降, 比对照组下降了 89.72%, 其中大颗粒细胞所占的比例也比感染病毒 72h 时稍有下降, 这与张志栋等[6]对凡纳滨对虾的研究结果相一致。而与 Jiravanich-paisal , *et al*.[13]对淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)的研究认为小颗粒细胞对 WSSV 感染更敏感, 感染后 3d 小颗粒细胞在血细胞中的比例上升至 65%, 大颗粒细胞为 23%的结论不同。

3.2 WSSV 感染对红螯光壳螯虾血细胞大小和核质比的影响

感染 WSSV 后红螯光壳螯虾透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞的平均大小除对照组透明细胞与

濒死试验组无显著差异外, 其余与对照组均呈极显著增大差异(P<0.01), 这与感染病毒后血细胞发生胞质空泡化变性, 胞浆水肿, 细胞膜变形突起等病变有关, 这也使感染病毒后透明细胞和大颗粒细胞的核质比较感染病毒前有极显著减小, 因为感染的透明细胞和大颗粒细胞的细胞核发生固缩、胞质膨大等所致。相同的现象在凡纳滨对虾中也存在[9]。

3.3 WSSV 感染对红螯光壳螯虾血细胞显微和超微结构的影响

在 WSSV 感染下, 红螯光壳螯虾血细胞结构发生了十分显著的变化: 细胞核高度异染色质化, 意味着在异染色质化部位的基因的转录活性显著降低; 细胞膜变形或破裂, 细胞空泡化变性, 细胞核固缩, 高尔基体、线粒体结构受损, 从而影响了红螯光壳螯虾血细胞的正常生长和繁殖。濒临死亡的红螯光壳螯虾血细胞特征与冯守明等描述的濒死凡纳滨对虾的特征十分相似[9]: 核内分布 WSSV 粒子, 胞浆水肿、细胞器变性溶解、染色质溶解, 直至细胞解体。

3.4 WSSV 在感染患病螯虾体内的分布

有关 WSSV 在甲壳动物体内的分布有不少研究[18−20], 结果各不相同, 但主要分布在外胚层和中胚层系统的组织器官中[21]。造成 WSSV 在虾体内分布结果明显不同的原因可能是由于所用 WSSV 分离毒株的不同, 检测方法不同, 以及 WSSV 感染虾的种类、大小、取样时间的不同等有关。本文在红螯光壳螯虾鳃中也发现有大量 WSSV 颗粒, 其次是在濒死试验虾的血细胞中, 在肝胰腺、触角腺、胃和肌肉中则均未发现病毒颗粒(另文发表), 表明红螯光壳螯虾的鳃细胞是 WSSV 的主要靶细胞, 血细胞次之。沈锦玉等[22] 在感染 WSSV 红螯光壳螯虾的血细胞和鳃里发现大量病毒颗粒, Jiravanichpaisal, *et al*.[13]也在淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)血细胞的核内外发现 WSSV 颗粒。但本研究在感染 72h 试验组的螯虾血细胞中未发现 WSSV 粒子, 可能与样品切片标本不够多有关, 究竟何种原因今后还需进一步的研究。

参考文献:

[1] Zhou H M. Study of morphology and tissue pathology of white spot syndrome baculovirus (wsbv) in *Penaeus monodon* [J]. *Journal of Xuzhou Normal University* (Natural Sciences), 1999, **17**(4): 59—62 [周化民. 斑节对虾白斑综合症杆状病毒(WSBV)的形态和感染的组织病理研究. 徐州师范大学学报: 自然科学版, 1999, **17**(4): 59—62]

[2] Lightner D V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp [M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 1996, 304—307

[3] Chen L, Lo C, Chiu Y, *et a1*. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthiclarvae of mud crab ScyUa serrata [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, **40**: 157—161

[4] Zhan W, Zhang L, Wang Y, *et a1*. White spot syndrome virus (WSSV) infection to crabs [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, **39**(supp1.): 153—158

[5] Van de Braak C B T, Botterblom M H A, Huisman E A, *et al*. Preliminary study on hemocytic responses to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, **51**(2): 149—155

[6] Zhang Z D, Zhan W B, Xue Y H, *et al*. Variations of granular haemocytes when shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by white spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Oceanologia Et-limnologia Sinica*, 2005, **36**(1): 67—71 [张志栋, 战文斌, 薛艳红, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染白斑症病毒(WSSV)后大颗粒血细胞的变化. 海洋与湖沼, 2005, **36**(1): 67—71]

[7] Zhang L P, Hu C Q, Wu Z H. Blood pathological study on *Penaeus monodon* experimentally infected by WSBV [J]. *Tropic Oceanology*, 2000, **19**(3): 1—9 [张吕平, 胡超群, 吴灶和. 实验感染白斑杆状病毒(WSBV)的斑节对虾血液病理研究 . 热带海洋, 2000, **19**(3): 1—9]

[8] Chen P, Huang H, Chi X C, *et al*. The composition and ultrastructure of haemocytes in four species of penaeid shrimps [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(2): 158—161 [陈平, 黄槐, 池信才, 等. 四种对虾血细胞组成及超微结构. 水生生物学报, 1998, **22**(2): 158—161]

[9] Feng S M, Yang X L, Li J, *et al*. Haemolymph pathological research on white spot syndrome (WSS) of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(1): 108—112 [冯守明, 杨先乐, 李军, 等. 凡纳滨对虾白斑综合症血液病理研究. 水产学报, 2006, **30**(1): 108—112]

[10] Wang Y N, Zhan W B, Tang X Q, *et al*. Infection process of wssv in haemocytes of *Procambarus clarkia* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, **40**(9): 56—60 [王轶南, 战文斌, 唐小千, 等. 白斑症病毒(WSSV)对克氏原螯虾血细胞的感染规律. 中国海洋大学学报, 2010, **40**(9): 56—60]

[11] Lu J F, Wan Q, Wu X G, *et al*. A preliminary study on haemocytes and immune functions of the crayfish, *Procambarus clarkia* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(6): 1018—1025 [陆剑锋, 万全, 吴旭干, 等. 克氏原螯虾血细胞及免疫功能的初步研究. 水产学报, 2009, **33**(6): 1018—1025]

[12] Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, *et al*. Gene expression in

haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2002, **13**(1): 69—83

[13] Jiravanichpaisal P, Sricharoen S, Soderhall I, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2006, **20**: 718—727

[14] Wang X F**,** Fan T J, Cong R S, *et al.* Effect of several immunostimulants on the number, ultrastructure of haemocytes and the yield, activities of phenoloxidase in *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **29**(1): 66—73 [汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响. 水产学报, 2005, **29**(1): 66—73]

[15] Cai X F, Luo L, Li Q, *et al.* A preliminary study of haemocyte of *macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica,* 2000, **24**(3): 289—292 [蔡雪峰, 罗琳, 李权, 等. 日本沼虾血淋巴细胞的初步研究. 水生生物学报, 2000, **24**(3): 289—292]

[16] Bahene E, Mialhe E. Knowledge and research prospects in marine mollusa and crustacean immunology [J]. *Aquaculture*, 1995, **132**: 17—32

[17] Sahul Hameed A S, Sarathi M, Sudhakaran R, *et al*. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV)-infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometri analysis [J]. *Aquaculture*, 2006, **256**: 111—120

[18] Lo C F, Ho C H, Chen C H. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997, **30**(1): 53—72

[19] Nunan L M, Lightner D V. Development of a non -radio active gene probe by PCR for detect ion of whit e spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Journal of Virological Methods*, 1997, **63**(1—2): 193—201

[20] Wang C S, Tsai Y J, Chen S N. Detect ion of white spot disease virus (WSDV) infection in shrimp using in situ hybridization [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, **72**(2): 170—173

[21] Zhu J Z, Lu C P. Overview of studies on shrimp white spot syndrome virus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2003, **24**(1): 47—49 [朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合症病毒研究概况. 动物医学进展, 2003, **24**(1): 47—49]

[22] Shen J Y, Yuan J F, Pan X Y, *et al.* White spot syndrome virus in *Cherax quadricarinatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(4): 556—560 [沈锦玉, 袁军法, 潘晓艺, 等. 红螯螯虾感染白斑综合症病毒. 水产学报, 2007, **31**(4): 556—560]

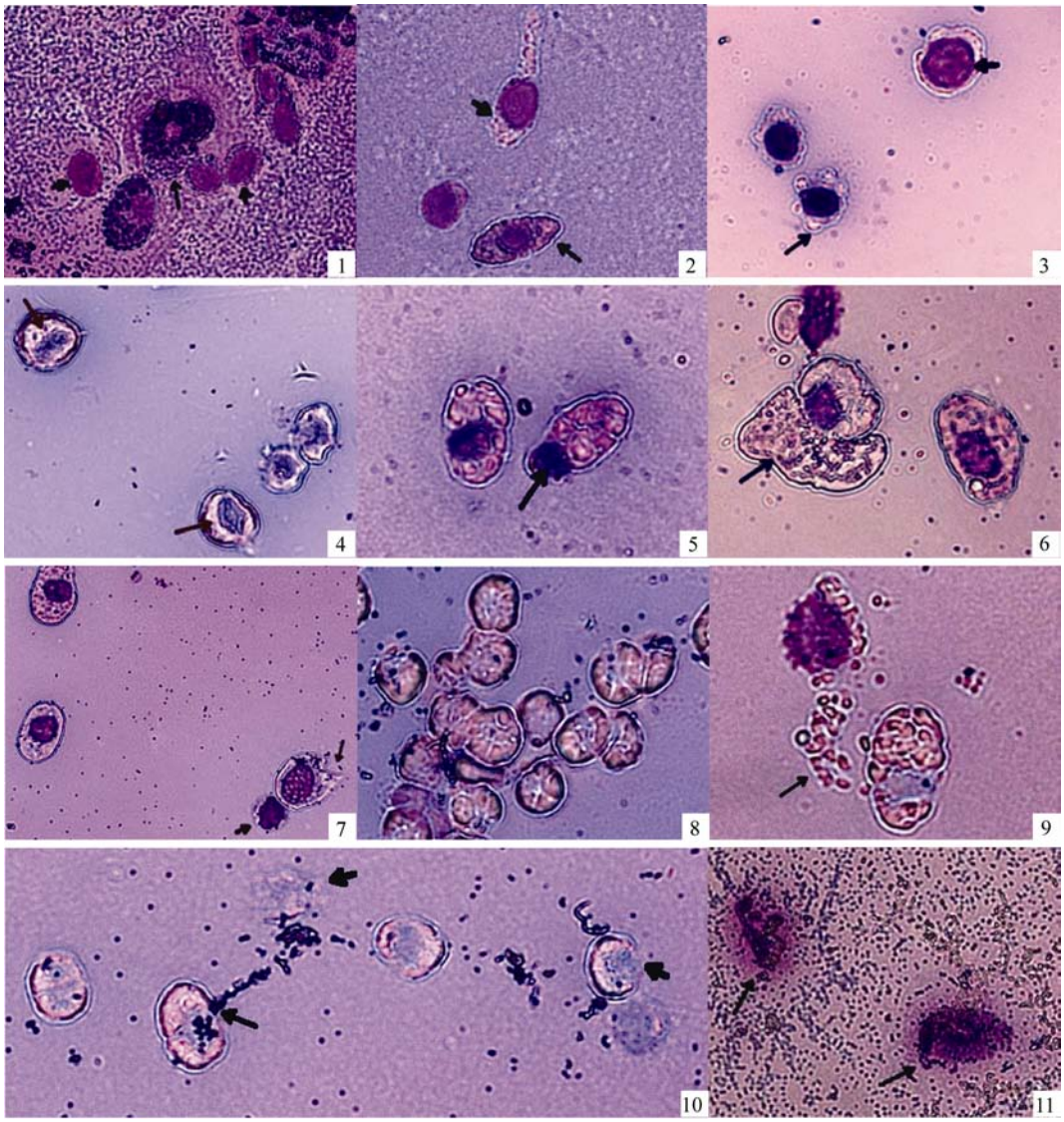
HAEMOLYMPH PATHOLOGICAL RESEARCH ON WHITE SPOT SYNDROME (WSS) OF *CHERAX QUADRICARINATUS*

WANG Dan-Li[1, 2], SUN Ting[1], ZUO Di[1], WANG Lan-Mei[1] and ZHAO Yun-Long[1]

(1. *School of Life Science*, *East China Normal University*, *Shanghai* 200062, *China*;
2. *College of Life Science and Biotechnology*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315211, *China*)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) as the pathogenic agent caused acute and lethal infect ion of shrimp, resulting in mass economic losses to shrimp aquaculture industry all around the world especially in China. In recent years, the cultivation of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) is developing, and the disease of *C. quadricarinatus* is one of the major factors in its culture and even causes redclaw crayfish to die. The viral disease was found in poly-culture of redclaw crayfish with *Penaeus vannamei.* To explore the pathogenic mechanism of *C. quadricarinatus* infected by WSSV (white spot syndrome virus), the pathological research in haemolymph on WSS of *C. quadricarinatus* infected by WSSV artificially was studied by means of Wright-Geimsa staining and electron microscope techniques. The results indicated that total haemocyte count in diseased shrimps was lower heavily than that in healthy shrimps (P<0.01). The number of their overall hemocytes decreased 63.94% and 89.7% respectively in 72h experimental shrimp and danger experimental shrimp. Three kinds of blood cells, the hyaline hemocyte (AH), the small granule hemocyte (SGH) and the large granule hemocyte (LGH) were distinguished according to the morphology, structure and the size of granule. The percentage of AH, SGH and LGH were 47.51%, 34.46% and 17.37% respectively in the control shrimp. After shrimps infected with WSSV, the percentage of AH in diseased shrimps was lower heavily than that in healthy shrimps (P <0.01), but the percentages of LGH in diseased shrimps were 57.81×10^6 cell/mL and 53.18×10^6 cell/mL respectively in 72h experimental shrimp and danger experimental shrimp, and was higher heavily than that in healthy shrimps (17.37×10^6 cell/mL, P <0.01); The percentage change of SGH was small relatively. The sizes of three blood cells were all increasing trend after treated with WSSV-infected, in which the LGH increased from 25.33 μm×19.09 μm to 34.45 μm×26.68 μm. The nuclear cytoplasmic ratio (NP) of AH and LGH had a sharp decline after treated with WSSV-infected (P <0.01), and the NP of LGH was all less than 1, in which indicated that the nucleus of LGH of crayfishes was smaller and cytoplast was more; The NP of small granule was not significantly different (P >0.05) after treated with WSSV-infected. The main micro-pathological changes of haemocyte showed that there was a decreasing hemocytes in haemolymph smear from diseased shrimps, in which the number of AH was lower heavily than that in healthy shrimps and the number of large granule hemocyte was higher than that in healthy shrimps. Synchronously broken and disintegrated cells could often be seen in the haemolymph smear, and contractive nucleus and anamorphic nuclear membrane in hyaline hemocyte, bubbles in denaturalized small granule hemocyte, pyknosis nucleus and bulgy cells in large granule hemocyte. There was a typical haemolysis in danger experimental shrimp. The ultra-micro-pathological changes showed that there were necrotic changes in every kind of haemocytes. Golgi apparatus was transmutative, mitochondria was damaged and incomplete in structure; Parts of nuclear membrane were anamorphic and parts of nucleus were contractive, while nucleus heterochromatinization in blood cells; Organelle and chromatin were dissolved, kytoplasm was dropsical in danger haemocytes, while cells were necrotic. There were clear WSSV in certain hemocyte nucleus of diseased shrimps. WSSV was a kind of baculovirus under transmission electron microscope (TEM), and the sizes of which were (99—118) nm × (189—321) nm. Its size and shape was consistent with WSSV which has been reported.

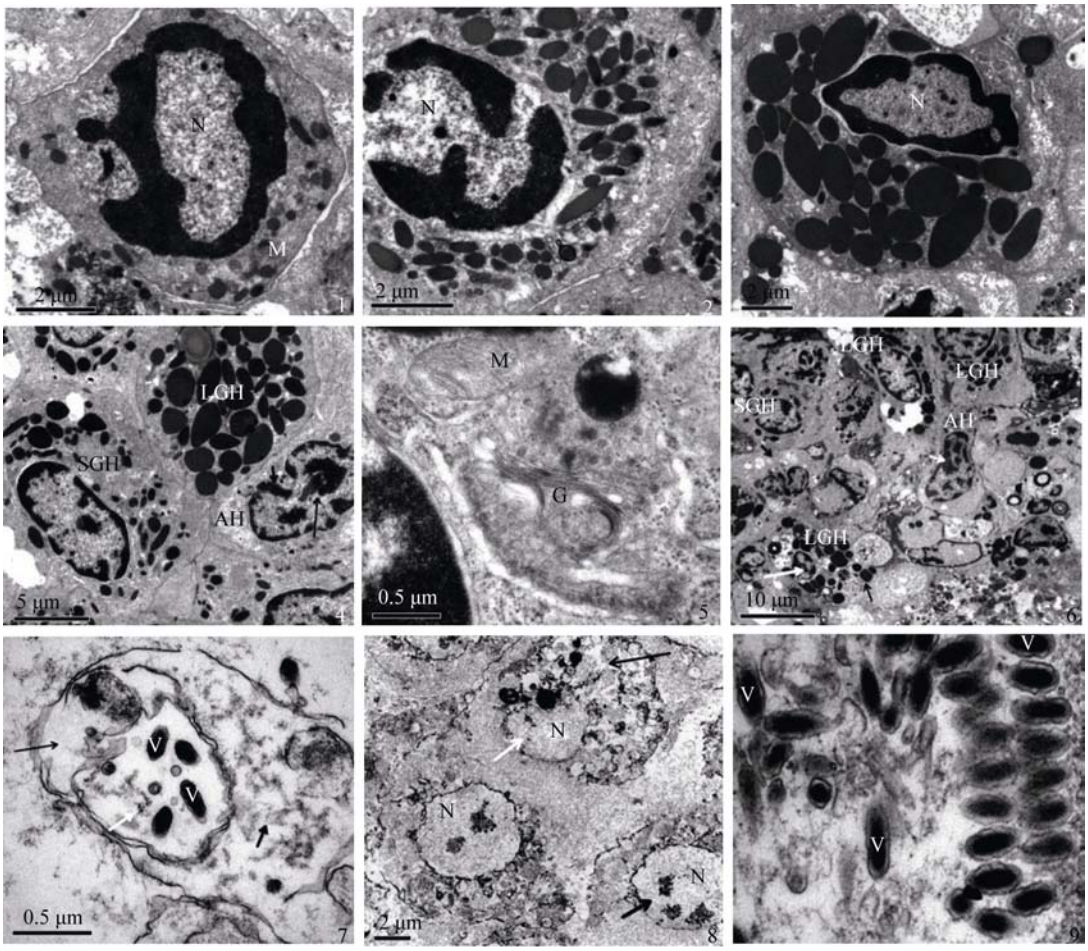
Key words: *Cherax quadricarinatus*; White spot syndrome (WSS); Haemolymph pathology



图版Ⅰ Plate Ⅰ (×400)

1. 对照组, 示透明细胞(短箭头)、大颗粒细胞(长箭头); 2. 对照组, 示小颗粒细胞(长箭头)、梭形具伪足透明细胞(短箭头); 3. 72h 试验组, 透明细胞核收缩(短箭头), 膜变形(长箭头); 4. 72h 试验组, 小颗粒细胞空泡化变性(箭头); 5. 72h 试验组, 大颗粒细胞核固缩(箭头); 6. 72h 试验组, 大颗粒细胞体积膨胀(箭头); 7. 72h 试验组, 小颗粒细胞伸出伪足、可能在释放颗粒(长箭头), 透明细胞(短箭头); 8. 72h 试验组, 大量大颗粒细胞; 9. 濒死试验组, 大颗粒细胞破裂(箭头); 10. 72h 试验组, 大颗粒细胞可能在释放颗粒 (长箭头), 部分细胞膜破裂, 胞浆溢出(短箭头); 11. 濒死试验组, 颗粒细胞溶解变性(箭头)

1. Control, hyaline hemocyte (short arrow) and large granule hemocyte (long arrow); 2. Control, small granule hemocyte (long arrow), shuttle shape and pseudopodium hyaline hemocyte (short arrow); 3. 72h infected group, contractive nucleus (short arrow) and anamorphic nuclear membrane (long arrow) in hyaline hemocyte; 4. 72h infected, bubbles (arrow) in denaturalized small granule hemocyte; 5. 72h infected, pyknosis(arrow) in large granule hemocyte; 6. 72h infected, bulgy large granule hemocyte (arrow); 7. 72h infected, pseudopodium spread and maybe granule disengagement in small granule hemocyte (long arrow), hyaline hemocyte (short arrow); 8. 72h infected, a great deal of large granule hemocyte; 9. Danger group, rupture in large granule hemocyte (arrow); 10. 72h infected, maybe granule disengagement in large granule hemocyte (long arrow), parts of cell membrane rupture and kytoplasm overflow (short arrow); 11. Danger group, dissolution and denaturation in granule hemocyte (arrow)



图版 II　　Plate II

1. 对照组, ×15000, 示透明细胞, 核内染色质均匀分布; 2. 对照组, ×15000, 示小颗粒细胞; 3. 对照组, ×10000, 示大颗粒细胞; 4. 72h 试验组, ×6000, 示透明细胞, 大颗粒细胞和小颗粒细胞; 细胞核高度异染色质化(长箭头); 核膜变形 (短箭头); 5. 72h 试验组, ×50000, 示变形的高尔基体, 边界不完整的线粒体; 6. 72h 试验组, ×3000, 示 3 种血细胞, 部分血细胞细胞膜破裂, 颗粒外流(黑长箭头); 释放颗粒后的大颗粒细胞(黑短箭头); 细胞核异染色质化(白短箭头); 核固缩(白长箭头); 7. 濒死试验组, ×60000, 示濒临死亡血细胞, 破损核内分布 WSSV 病毒粒子; 细胞膜、核膜渐融, 细胞器溶解(黑短箭头), 胞浆水肿(黑长箭头), 染色质溶解(白箭头); 8. 濒死试验组, ×7000, 示细胞坏死, 核变形边移(白箭头), 染色质溶解(黑短箭头), 细胞器变性(黑长箭头); 9. 濒死试验组, ×60000, 示 WSSV 病毒粒子

1. Control, ×15000, hyaline hemocyte, and chromatin of uniform distribution in nucleus; 2. Control, ×15000, small granule hemocyte; 3. Control, ×10000, large granule hemocyte; 4. 72h infected group, ×6000, hyaline hemocyte, small granule hemocyte, large granule hemocyte; nucleus heterochromatinization(long arrow); nuclear membrane transubstantiation (short arrow); 5. 72h infected group, ×50000, transmutative golgi apparatus and incomplete mitochondria in border; 6. 72h infected group, ×3000, three of haemocytes, parts of cell membrane rupture and granule disengagement (black long arrow); large granule hemocyte after the release of particles(black short arrow); nucleus heterochromatinization(white short arrow); nucleus pyknosis (white long arrow); 7. Danger group, ×60000, haemocytes in bordered by death; wssv in nucleus ; the melting of cell membrane, nuclear membrane and organelle(black short arrow); dropsical kytoplasm(black long arrow); dissolved chromatin(white arrow); 8. Danger group, ×7000, cells necrosis and nucleus deformations and remove (white arrow); dissolved chromatin (black short arrow); organelle denaturation (black long arrow); 9. Danger group, ×60000, WSSV

AH: 透明细胞; SGH: 小颗粒细胞; LGH: 大颗粒细胞; M:线粒体; N:细胞核; G: 高尔基体; V: 白斑综合症病毒

AH: Hyaline hemocyte; SGH: small granule hemocyte; LGH: large granule hemocyte; M: Mitochondria; N: Nucleus; G: Golgi apparatus; V: White Spot Syndrome Virus