



## II型草鱼呼肠孤病毒在稀有鮡鲫中的传播途径

倪秦伟<sup>1</sup>, 孙 阳<sup>1</sup>, 刘林怡<sup>1</sup>, 吕利群<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学, 国家水生动物病原库, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为了研究II型草鱼呼肠孤病毒(GCRV-II)的流行规律, 本实验基于稀有鮡鲫感染GCRV-JX02的研究模型, 利用分子生物学检测、逆转录实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)等方法开展GCRV-II水平和垂直传播的研究。结果显示, 水平传播中浸泡感染和共培养感染都能使稀有鮡鲫成为GCRV-II的无症状携带者, 阳性检出率分别为50%和80%; 其中共培养感染直接导致8%的稀有鮡鲫死亡。感染后无症状的稀有鮡鲫经热休克处理, 浸泡感染与共培养感染组的死亡率分别为57.14%和100%, 总体阳性检出率分别为80.95%和100%。腹腔注射感染GCRV-JX02后存活的无症状稀有鮡鲫每0.01 g精巢与卵巢中病毒拷贝数分别为 $3.64 \times 10^6$ 和 $6.84 \times 10^6$ 个。垂直传播实验中稀有鮡鲫单个的卵子、未受精卵、受精卵和幼鱼的平均病毒拷贝数为 $1.98 \times 10^3$ 、 $1.15 \times 10^4$ 、 $4.75 \times 10^3$ 和 $6.74 \times 10^4$ 个, 幼鱼中病毒的拷贝数显著高于卵子与受精卵时期, 表明GCRV-JX02不仅能够垂直传播, 还能伴随幼鱼的发育不断扩增。本研究阐明了不同传播途径下GCRV-II的传播潜力, 有助于评估草鱼出血病的流行风险, 且为筛选阻断草鱼呼肠孤病毒传播的药物提供了有效的动物模型。

**关键词:** 稀有鮡鲫; 草鱼呼肠孤病毒; 水平传播; 垂直传播; 热休克处理

**中图分类号:** S 943

**文献标志码:** A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国养殖产量最高的鱼类养殖品种, 在我国各地均有养殖, 2022年全国养殖总产量为590.4805万t<sup>[1]</sup>。根据《2023中国水生动物卫生状况报告》, 2022年因病害造成草鱼养殖经济损失19亿元, 其中草鱼出血病(grass carp hemorrhagic disease, GCHD)是草鱼养殖过程中监测到的主要疾病, 是制约我国草鱼养殖业可持续发展的主要瓶颈之一<sup>[2]</sup>。1978年陈燕燊<sup>[3]</sup>在国内首先报道了草鱼出血病是一种病毒性鱼病; 1983年陈燕燊等<sup>[4]</sup>测得该病毒基因组核酸为分节段双链RNA, 确定草鱼出血病病毒为草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)。稀有鮡

鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科(Cyprinidae)鱼类, 具有生命力强、饲养简便、性成熟快等优点, 1992年王剑伟<sup>[5]</sup>指出其是实验鱼的理想对象。1993年王铁辉等<sup>[6]</sup>用草鱼呼肠孤病毒人工感染稀有鮡鲫, 对有出血病症状的病鱼主要器官组织进行了超薄切片电镜观察, 发现实验鱼被感染。1994年王铁辉等<sup>[7]</sup>用草鱼呼肠孤病毒人工感染1~6月龄的稀有鮡鲫, 发现在水温22℃~32℃时可导致稀有鮡鲫出现出血病症状, 并证明是由GCRV感染所致, 预测稀有鮡鲫可以作为草鱼抗出血病育种的模式鱼。

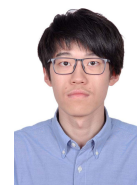
自1978年到1998年, 我国各地已经发现多

收稿日期: 2024-01-23 修回日期: 2024-04-02

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-16)

第一作者: 倪秦伟(照片), 从事水产动物病原学研究, E-mail: 2489452063@qq.com

通信作者: 吕利群, 主要从事水产动物病原学研究, E-mail: lqlv@shou.edu.cn



株草鱼呼肠孤病毒分离株<sup>[8-12]</sup>; 鉴于当时针对我国不同分离株尚缺少系统的比较研究, 1998年李军等<sup>[13]</sup>研究比较了GCRV-861和GCRV-873这2株草鱼呼肠孤病毒分离株的基因组核酸图谱、致病性及体外组织培养特征, 发现861株感染草鱼和稀有鮠鲫发病死亡率可高达85%~100%, 而感染草鱼肾细胞系(GCK)和草鱼肾组织细胞系(*C. idella* kidney cell line, CIK)未能观察到细胞病变效应(CPE); 相反873株感染培养细胞出现典型的CPE, 但对草鱼和稀有鮠鲫几乎无致病力。861株是武汉水生所的湖北省武汉东西湖分离株, 而873株是武汉病毒所的湖南邵阳分离株<sup>[10]</sup>; 1990年王炜等<sup>[9]</sup>发现, 武汉病毒所分离的GCRV湖北武汉南湖分离株和湖南邵阳分离株的核酸片段数一致, 但分子量不同。由于草鱼呼肠孤病毒3'无PolyA尾结构, 各个毒株间同源性较低, 无法采用设计引物进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)的方法扩增病毒全基因组, 模式毒株GCRV-873的全序列测定工作从20世纪90年代一直延续到21世纪初, 由几个实验室分别合作完成<sup>[14-15]</sup>; 在细胞系上不形成CPE的GCRV湖北株在2012年才首次测定全序列<sup>[16]</sup>, 这可能也是湖北株在研究界长期不被重视的原因之一。cDNA末端快速扩增技术(full-length amplification of cDNA, FLAC)可以对未知基因序列的dsRNA病毒基因组序列进行扩增, 该技术在草鱼呼肠孤病毒基因组上的应用从2012年起促进了湖北株的临床鉴定和基因组解析<sup>[17-19]</sup>。中国水产科学院长江水产研究所的研究人员在2013年发现了1株在基因组水平与湖北株、湖南株同源性都很低的新GCRV毒株GCRV-104<sup>[20]</sup>。因此, 最近10年来国内同行专家根据基因组序列的同源性分析将已报道的所有GCRV毒株分为I、II、III共3种基因型, 根据已发表的研究论文中使用毒株情况, 确定3种基因型的典型代表株分别为湖北株中的GCRV-873<sup>[9]</sup>、湖南株中的GCRV-HZ08<sup>[18]</sup>和新毒株GCRV-104<sup>[19]</sup>。

《2023中国水生动物卫生状况报告》明确了近年来我国养殖草鱼中引起草鱼出血病的毒株主要是II型GCRV, 也即GCRV-HZ08所属的湖北株<sup>[2]</sup>。因此, 利用稀有鮠鲫的II型GCRV感染模型研究草鱼出血病重新成为最近几年的一个研究热点。我国研究人员利用前沿的蛋白质组<sup>[21]</sup>、转录组<sup>[22-23]</sup>和代谢组<sup>[24]</sup>技术系统研究了II型GCRV和稀有鮠鲫的相互作用; 围绕草鱼出血病抗病育种的技术需求, 评价了Mx-like<sup>[25]</sup>、Integrin beta-1(ITGB1)<sup>[26]</sup>、Bid<sup>[27]</sup>、TLR4<sup>[28]</sup>、Scavenger receptor

class B type 1(SRB1)<sup>[29]</sup>、TBK1 homologue<sup>[30]</sup>、P65<sup>[31]</sup>等多种靶蛋白的抗病毒功能; 利用稀有鮠鲫研制和评价II型GCRV疫苗的研究也不断取得进展<sup>[32-33]</sup>; 本课题组也利用稀有鮠鲫评价了槲皮素用于防控II型GCRV感染的可行性<sup>[34-35]</sup>。由于目前我国尚缺少遗传背景清晰的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)草鱼品系供研究人员开展相关研究, 稀有鮠鲫无疑为草鱼出血病研究提供了一个优秀的实验动物平台。

病毒的传播途径大致可以分为水平传播与垂直传播, 水产病毒通过上述两种途径进行传播的现象普遍存在。Zhai等<sup>[36]</sup>发现II型鲤疱疹病毒(cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)在 $10^3$ 个/L浓度下通过浸泡可有效引起金鱼(*Carassius auratus auratus*)的感染与死亡; Ben-Asher等<sup>[37]</sup>发现病毒性神经坏死病(viral nervous necrosis, VNN)在欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)中的水平传播, 尤其是在幼鱼中有着更高的感染率; 汝少国等<sup>[38]</sup>应用电镜技术初步探讨了对虾杆状病毒(*Baculovirus penaei*)的垂直传播途径; 江世贵等<sup>[39]</sup>初步研究了白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)对斑节对虾(*Penaeus monodon*)亲虾的感染和垂直传播。水产病毒依靠水体、食物等方式进行的水平传播以及通过鱼卵进行的垂直传播已经有了直接的证据。然而II型GCRV在稀有鮠鲫中的人工感染主要是通过高渗浸泡<sup>[7, 26]</sup>或注射<sup>[32, 34]</sup>实现, 尚无关于II型GCRV在稀有鮠鲫中的自然传播途径的系统研究。阐明II型GCRV在稀有鮠鲫中的自然传播途径, 对建立基于稀有鮠鲫的草鱼出血病流行模型、评价抗GCRV药物的药效、理解GCRV的传播规律都具有重要意义。

本实验从水平传播和垂直传播两个自然传播的途径研究了II型GCRV在稀有鮠鲫中的传播效率, 发现在水平传播中GCRV感染主要以无症状感染为主, 利用温度诱导能够实现无症状稀有鮠鲫体内病毒的激活和致病; 在垂直传播中, GCRV-II可以从亲本转移到子代, 并且随着幼鱼的发育而不断扩增。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

稀有鮠鲫资源由国家水生生物种质资源库提供, 平均体重( $2.0 \pm 0.1$ )g, 饲养于上海海洋大学国家水生动物病原库养殖鱼房内, 在( $24 \pm 1$ )°C

温度条件下暂养 7 d, 于实验前 24 h 停止喂食。本研究获得了上海海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学伦理规范, 并按照上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

II 型草鱼呼肠孤病毒 (GCRV-JX02) 为本实验室分离保藏株。TRIzol 购于 Invitrogen 公司 (美国), cDNA 合成试剂 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (6210A)、高特异性 qPCR 试剂 TB Green® Premix Ex Taq™ II (RR820A)、Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) (RR901A) 购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司。所有 PCR 及 RT-qPCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

## 1.2 水平传播实验

**浸泡感染** 取实验室所保存的感染 GCRV-JX02 死亡的稀有鮠鲫, 剪碎后加入 1×磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 研磨, 依次进行 4 000、8 000 和 1 2000 r/min 离心各 5 min, 梯度离心后取上清液并使用 0.22 μm 针头式过滤器过滤, 获得含 GCRV-JX02 病毒液 ( $2.1 \times 10^5$  个/μL)。随机挑选 31 尾稀有鮠鲫置于 4 L 水体中, 加入 30 mL 上述病毒液, 此时水体中病毒拷贝数为  $1.57 \times 10^3$  个/μL。实验期间水温控制在  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 连续观察 14 d 后取 10 尾稀有鮠鲫进行检测, 并在 2 h 内通过加热棒将水温提升至  $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$  对稀有鮠鲫进行热休克处理并保持水温不变, 每天观察 2 次, 连续观察 14 d 记录死亡数并收集死亡的稀有鮠鲫。

**共培养感染** 将 40 尾稀有鮠鲫随机分为两组, 一组 15 尾腹腔注射上述 GCRV-JX02 病毒液 100 μL/尾, 共培养组为 25 尾稀有鮠鲫不做处理。将两组置于同一水体 (4 L) 共培养并使用隔离网分开, 实验期间水温控制在  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 期间及时收集死亡的稀有鮠鲫, 连续观察 14 d 后取出注射组幸存的稀有鮠鲫并随机挑选共培养组 10 尾稀有鮠鲫进行检测, 之后将水温提高至  $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$  进行热休克, 每天观察 2 次, 连续观察 14 d 记录死亡数并收集共培养组死亡的稀有鮠鲫。

## 1.3 垂直传播实验

使用 100 μL 浓度为 2 069 个/μL 的 JX02 病毒液通过 1 mL 无菌注射器腹腔注射稀有鮠鲫, 选取感染 JX02 后幸存的稀有鮠鲫, 挑选雌雄鱼各 20 尾置于玻璃水族缸 ( $60 \times 40 \times 50$  cm) 内, 配有水族

外置过滤器 (森森 HW-702A) 装置及增氧泵装置以形成循环水系统, 利用实验室前期建立的稀有鮠鲫繁殖体系<sup>[40]</sup>饲养, 实验期间水温控制在  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 及时收集鱼卵与仔鱼并做洗脱处理。

## 1.4 样品收集、处理及检测

水平传播实验收集攻毒 14 d 及热休克后 14 d 所有稀有鮠鲫, 取脑及内脏组织, 垂直传播实验收集稀有鮠鲫亲鱼性腺组织、成熟期卵巢中的单个卵子、鱼卵及仔鱼并使用 1×PBS 洗脱处理。所有样品置于 500 μL TRIzol 中重复研磨, 按照说明书提取总 RNA, 使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (6210A) 试剂盒逆转录合成 cDNA。

PCR 检测参照 GB/T 3619—2018, 使用 Premix Taq™ 酶和 II 型 GCRV 的 M6 基因片段引物 (F: 5'-AGTTC-TCAAA-GCTGA-GACAG-3' 和 R: 5'-ACGTG-CGATT-GGAAG-AGCTT-3') 进行 PCR, 反应体系为 25 μL, 含 Premix Taq™ 酶 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL, 反应程序为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。PCR 反应结束后, 使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

采用 RT-qPCR 检测病毒拷贝数, 使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 酶和根据 II 型 GCRV 的 M6 基因片段设计定量引物 (F: 5'-GCGTCAC ACCTTCGACCATA-3' 和 R: 5'-TTACGGGCCGAA ATAGTGG-3') 进行 RT-qPCR, 反应体系为 13 μL, 含 TB Green® Premix Ex Taq™ II 酶 6.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 4.5 μL, 反应程序为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 58 °C 30 s, 39 个循环; 95 °C 10 s, 65 °C 5 s, 95 °C。

## 1.5 数据处理

实验数据用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计、分析和制图, 数据以平均值±标准差表示, 每项实验进行 3 个独立的重复。使用 Student's two-tailed *t* 检验对实验数据进行统计学分析, “\*”为  $P < 0.05$ , “\*\*”为  $P < 0.01$ , “\*\*\*”为  $P < 0.001$ , “\*\*\*\*”为  $P < 0.000 1$ 。

## 2 结果

### 2.1 水平传播中无症状感染检测

浸泡感染后 14 d 稀有鮠鲫皆未死亡, 进行

PCR 检测发现, 浸泡感染中编号 2、3、4、9、10 为阳性(图 1-a), 阳性检出率为 50%。在 14 d 共培养感染中死亡 2 尾稀有鮕鲫(编号 1、2), 第 14 天后另随机挑选共培养组 8 尾稀有鮕鲫进行检测, 其中编号 1、2、3、5、6、7、8、10 为阳性(图 1-b), 其死亡率为 8%, 阳性检出率为 80%, 浸泡感染与共培养感染都可使稀有鮕鲫携带 GCRV-JX02 成为无症状感染者, 且共培养组可直接导致出现部分稀有鮕鲫的发病死亡。

## 2.2 热休克诱导病毒激活

在 24 °C~32 °C 热休克处理无症状感染的稀有鮕鲫后, 结果显示, 浸泡感染与共培养感染组的稀有鮕鲫在热休克处理后第 2 天开始死亡, 浸泡感染组在第 10 天时共死亡 12 尾, 死亡率为 57.14%, 共培养感染组的稀有鮕鲫在第 4 天时全部死亡(图 2)。浸泡感染组中编号 1~12 的稀有鮕鲫按死亡时间顺序排列, 除 2、4、5 外皆在 320 bp 处有目的条带(图 3-a), 其阳性检出率为 75%, 而在未死亡的 9 尾稀有鮕鲫中除 14 外为阳性, 总体阳性检出率为 80.95%; 在共培养感染组中编号 1~15 的稀有鮕鲫按死亡时间顺序排列, 阳性检出率为 100%(图 3-b)。热休克处理无症状感染的稀有鮕鲫后, 浸泡感染与共培养感染组都可以得到更高的阳性检出率, 并导致一定数量的稀有鮕鲫发病死亡。

## 2.3 垂直传播病毒检测

腹腔注射 GCRV-JX02 后幸存稀有鮕鲫性腺

中病毒表达量的结果显示, 通过 RT-qPCR 检测, 组织重量进行归一, 卵巢组织中 GCRV-JX02 的平均拷贝数为  $6.84 \times 10^6$  个/0.01 g(图 4-a), 而在精巢组织中则为  $3.64 \times 10^6$  个/0.01 g(图 4-b)。通过腹腔注射可以得到性腺组织带有大量 GCRV-JX02 的无症状稀有鮕鲫。

将上述稀有鮕鲫通过本实验室的模型进行繁殖, 对收集到的稀有鮕鲫 60 个卵子、9 个未受精卵、26 个受精卵以及 13 尾孵化 14 d 后幼鱼进行 RT-qPCR 检测, 其 GCRV-JX02 的拷贝数分别为  $1.14 \times 10^5$ 、 $1.03 \times 10^5$ 、 $1.13 \times 10^5$  和  $8.75 \times 10^5$  个(表 1), 单个卵子、鱼卵和单尾幼鱼中 GCRV-JX02 的平均拷贝数为  $1.98 \times 10^3$ 、 $1.15 \times 10^4$ 、 $4.75 \times 10^3$  和  $6.74 \times 10^4$  个, 结果显示, 单尾稀有鮕鲫幼鱼体内 GCRV-JX02 的拷贝数显著高于卵子与受精卵(图 5)。

## 3 讨论

在 GCRV-II 的水平传播中, 浸泡感染与共培养感染都可使稀有鮕鲫携带 GCRV-JX02(图 1), 且共培养组可直接导致出现部分稀有鮕鲫的发病死亡, 传播效率更高。研究表明 GCRV-JX02 的水平传播途径普遍存在, 多以无症状感染为主, 而且可导致宿主的发病与死亡, 本研究结果和前人关于 GCRV 研究结果一致, Jiang 等<sup>[41]</sup>能够在有感染或暴露史的无症状草鱼脑部检测到 GCRV-II。其他水产病毒的水平传播也有类似情况, 如 Zhai 等<sup>[36]</sup>发现 II 型鲤疱疹病毒(CyHV-2)在  $10^3$  个/L 浓

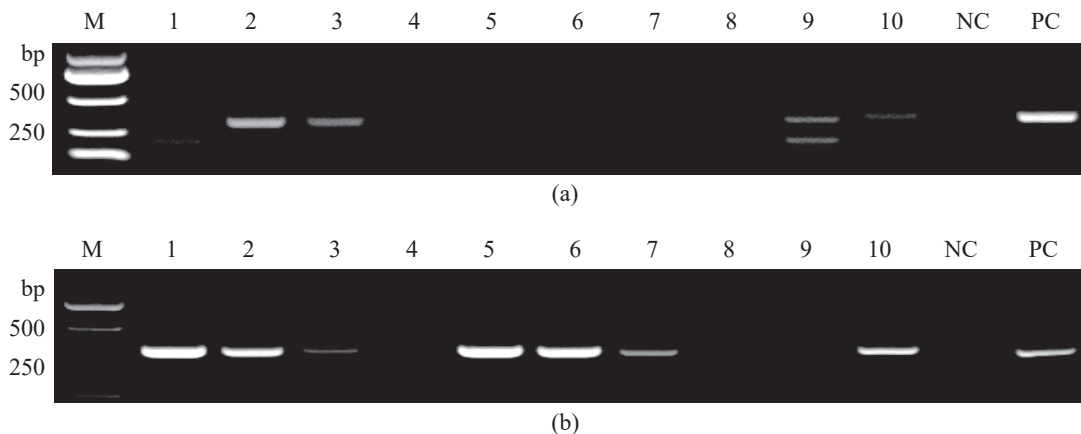


图 1 PCR 检测水平传播中稀有鮕鲫感染 GCRV-JX02 的情况

(a) 浸泡感染 14 d; (b) 共培养感染 14 d; 1~2. 死亡的稀有鮕鲫; M. DL2000 DNA marker; NC. 阴性对照组; PC. 阳性对照组, 下同。

### Fig. 1 Detection of GCRV-JX02 in rare minnow in horizontal transmission by PCR

(a) immersion infection for 14 days; (b) co-culture infection for 14 days, 1-2. dead rare minnow; M. DL2000 DNA marker; NC. negative control; PC. positive control, the same below.

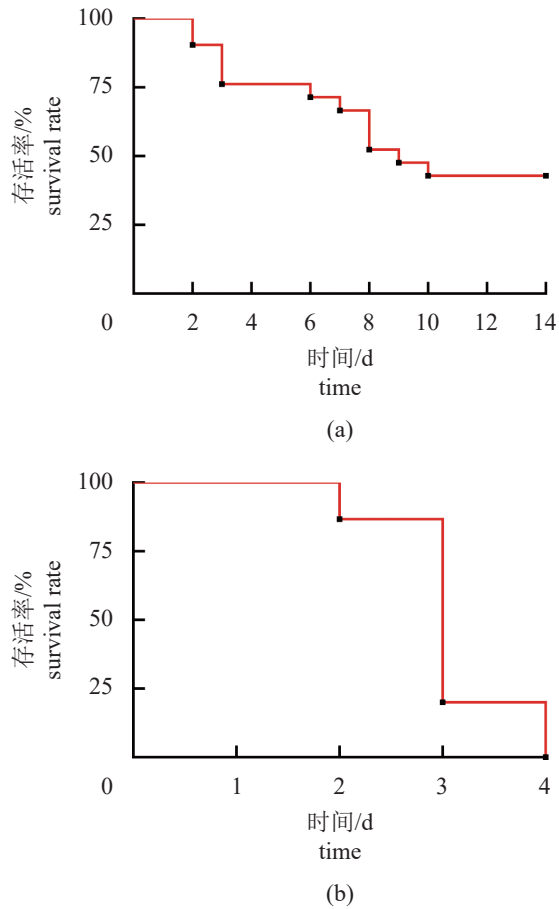


图2 热休克激活 GCRV-JX02 后稀有鮡鲫的存活率  
(a) 浸泡感染; (b) 共培养感染。

Fig. 2 Survival rate of rare minnow after heat shock activating GCRV-JX02

(a) immersion infection for 14 days; (b) co-culture infection for 14 days.

度下的通过浸泡可有效引起金鱼的感染与死亡; Ben-Asher 等<sup>[37]</sup>发现病毒性神经坏死病 (VNN) 在欧洲鲈中的水平传播, 尤其是在幼鱼中有着更高的感染率。

本研究发现自然传播途径中稀有鮡鲫无症状带毒情况比较普遍。这意味着在养殖中草鱼等目标宿主很有可能携带有 GCRV 但不出现临床症状难以发觉。Jiang 等<sup>[41]</sup>关于病毒潜伏的研究发现在升高温度后可以重新激活在草鱼脑内潜伏感染的 GCRV。为了明确热应激对于自然传播途径中草鱼等宿主无症状携带 GCRV 的影响, 本研究进一步利用温度变化可以诱导无症状稀有鮡鲫出现典型的出血症状和较高的死亡率, 这和草鱼出血病流行病特征一致, 说明面对环境温度的突然升高, 携带有病毒的无症状稀有鮡鲫会再次发病与死亡, 存在二次传播的风险。无症状宿主也可能因为受到外部环境压力或者自身免疫系统变化导致病毒的激活, 使得宿主发病死亡, 造成养殖过程中的巨大经济损失。根据本研究结果, 可以利用 GCRV-II 在稀有鮡鲫的水平传播及病毒激活模型, 评估各种消毒剂在阻断 GCRV 水平传播方面的作用, 以及采用抗应激措施防止宿主携带的 GCRV 被激活。

在 GCRV-II 垂直传播的研究中, 经过腹腔注射后无症状感染的稀有鮡鲫性腺中存在大量 GCRV-JX02, 其可以通过繁殖传播给受精卵和幼鱼, 且幼鱼中的病毒拷贝数显著高于卵子和受精卵, 该结果说明 GCRV-JX02 不仅可以在稀有鮡鲫

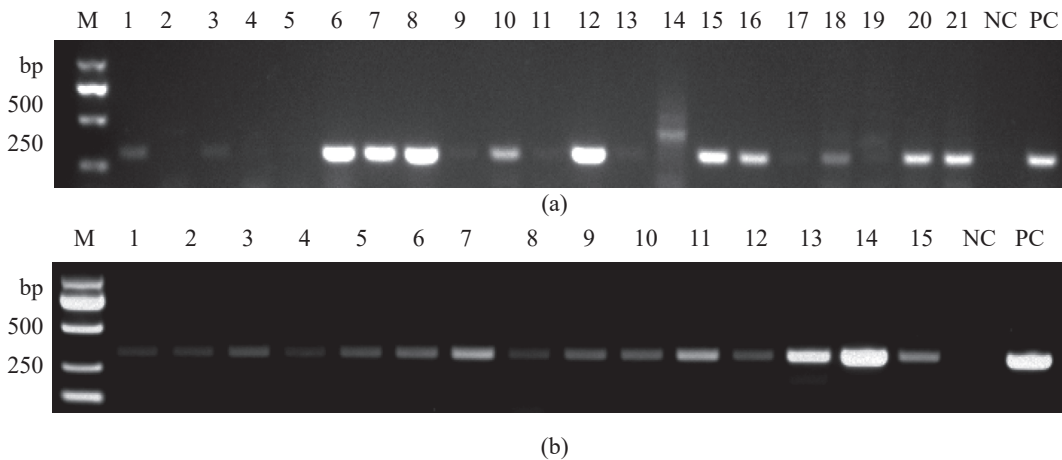


图3 PCR 检测热休克后稀有鮡鲫中 GCRV-JX02 的感染情况

(a) 浸泡感染, 1-12. 死亡的稀有鮡鲫; (b) 共培养感染, 1-15. 死亡的稀有鮡鲫; M. DL2000 DNA marker.

Fig. 3 Detection of GCRV-JX02 in rare minnow after heat shock by PCR

(a) immersion infection, 1-12. dead rare minnow; (b) co-culture infection, 1-15. dead rare minnow; M. DL2000 DNA marker.

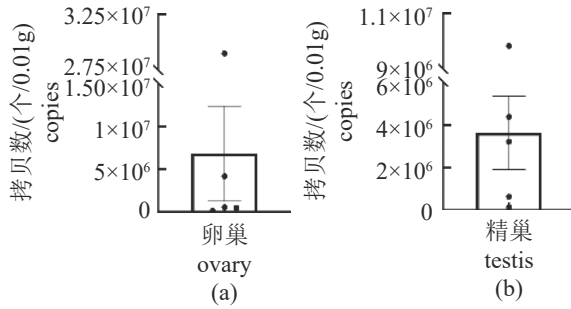


图4 稀有鮡鲫性腺组织 GCRV-JX02 的拷贝数

(a) 每 0.01 g 精巢中 GCRV-JX02 的拷贝数; (b) 每 0.01 g 卵巢中 GCRV-JX02 的拷贝数。

Fig. 4 Copy numbers of GCRV-JX02 in Gonadal tissues of rare minnow

(a) copy numbers of GCRV-JX02 in testis per 0.01 g; (b) copy numbers of GCRV-JX02 in ovary per 0.01 g.

表1 垂直传播中稀有鮡鲫卵子、鱼卵与幼鱼内 GCRV-JX02 的拷贝数

Tab. 1 Copy numbers of GCRV-JX02 in ova, eggs, juvenile fish of rare minnow in vertical transmission

组别 item	数量 no.	拷贝数/个 copies
卵子 ova	60枚	$1.14 \times 10^5$
未受精卵 unfertilized eggs	9枚	$1.03 \times 10^5$
受精卵 fertilized eggs	26枚	$1.13 \times 10^5$
幼鱼 juvenile fish	13尾	$8.75 \times 10^5$

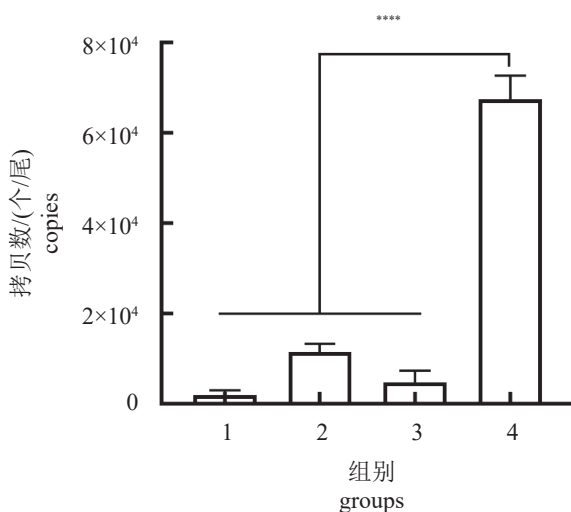


图5 稀有鮡鲫卵子、鱼卵与幼鱼中 GCRV-JX02 的平均拷贝数

1. 卵子; 2. 未受精卵; 3. 受精卵; 4. 幼鱼。

Fig. 5 Average copy numbers of GCRV-JX02 in ova, eggs, juvenile fish of rare minnow

1. ova; 2. unfertilized eggs; 3. fertilized eggs; 4. juvenile fish.

中进行垂直传播, 而且随着受精卵的孵化和幼鱼的发育进行扩增, 具有潜在的发病与再次传播能力。先前的研究表明其他水产病毒也存在垂直传播的现象, 如 Goodwin 等<sup>[42]</sup> 在金鱼亲鱼、通过 100 mg/L 活性碘消毒后的鱼卵和鱼苗中都检测到了 CyHV-2; Thompson 等<sup>[43]</sup> 也发现了斑点叉尾鲷病毒 (channel catfish virus, CCV) 在宿主中垂直传播的现象。上述实验中通过对金鱼卵洗脱后的结果说明, CyHV-2 是通过存在于鱼卵内部而不是黏附于鱼卵表面进行垂直传播, 本实验在检测病毒拷贝数与孵化前都对收集到的稀有鮡鲫鱼卵进行清洗, 减少水体环境及黏附于表面的游离病毒对检测结果的影响, 初步说明了 GCRV-II 在稀有鮡鲫内存在垂直传播的现象。根据本实验结果, 可以利用 GCRV-II 在稀有鮡鲫的垂直传播模型, 进行亲本脱毒技术、种苗检测技术、筛选抗病毒药物等相关研究。

综上, 本实验研究了 GCRV-II 在稀有鮡鲫中不同传播途径传播效率, 并使用热休克处理了无症状感染 GCRV-II 的稀有鮡鲫。在自然传播途径中 GCRV-II 的水平传播可以导致稀有鮡鲫成为病毒的携带者, 通过热休克处理可以导致无症状稀有鮡鲫的大量发病与死亡, 同时 GCRV-II 也可以通过垂直传播从亲本转移到子代, 并且随着幼鱼的发育而扩增。上述结果有助于深入了解 GCRV-II 不同的传播方法, 为后续阻断病毒传播药物的筛选提供帮助, 也为通过抗应激防治 GCRV 的研究提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.  
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 Chinese fisheries statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press Co., Ltd., 2023 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2023 年中国水生动物卫生状况报告 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.  
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 Chinese aquatic animal health status report [M]. Beijing: China Agriculture Press Co., Ltd., 2023 (in Chinese).

- ter, China Society of Fisheries. 2023 Aquatic animal health in China[M]. Beijing: China Agriculture Press Co., Ltd., 2023 (in Chinese).
- [ 3 ] 陈燕燊. 草鱼出血病病原的研究 [J]. 水生生物学集刊, 1978, 6(3): 321-330.
- Chen Y S. Studies on the causative agent of hemorrhage of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1978, 6(3): 321-330 (in Chinese).
- [ 4 ] 陈燕燊, 江育林. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究 [J]. 科学通报, 1983, 28(18): 1138-1140.
- Chen Y S, Jiang Y L. Morphological and physico-chemical characterization of the hemorrhagic virus of grass carp[J]. Chinese Science Bulletin, 1984, 29(6): 832-835.
- [ 5 ] 王剑伟. 稀有鮡鲫的繁殖生物学 [J]. 水生生物学报, 1992, 16(2): 165-174.
- Wang J W. Reproductive biology of *Gobiocypris rarus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1992, 16(2): 165-174 (in Chinese).
- [ 6 ] 王铁辉, 陈宏溪, 刘沛霖, 等. 草鱼出血病病毒人工感染稀有鮡鲫出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察 [J]. 水生生物学报, 1993, 17(4): 343-346.
- Wang T H, Chen H X, Liu P L, et al. Observations on the ultra-thin sections of the main organs and tissues of hemorrhagic *Gobiocypris rarus* artificially infected by grass carp hemorrhagic virus (GCHV)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(4): 343-346 (in Chinese).
- [ 7 ] 王铁辉, 刘沛霖, 陈宏溪, 等. 稀有鮡鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1994, 18(2): 144-149.
- Wang T H, Liu P L, Chen H X, et al. Preliminary study on the susceptibility of *Gobiocypris rarus* to hemorrhagic virus of grass carp (GCHV)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1994, 18(2): 144-149 (in Chinese).
- [ 8 ] 孟枋, 叶荫云, 温淑光. 草鱼出血病病毒的分离和保存试验 [J]. 畜牧与兽医, 1984(5): 204-206.
- Meng F, Ye Y Y, Wen S G. Isolation and preservation of grass carp hemorrhagic virus[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1984(5): 204-206 (in Chinese).
- [ 9 ] 王炜, 陈延, 柯丽华, 等. 草鱼出血病病毒武汉南湖株的精细结构与基因组及多肽的研究 [J]. 病毒学报, 1990, 6(1): 44-48,43,49.
- Wang W, Chen Y, Ke L H, et al. Fine structure, genome and poly-peptides of a grass carp hemorrhage virus (GCHV) isolate from the south lake in Wuhan hemorrhage[J]. Chinese Journal of Virology, 1990, 6(1): 44-48,43,49 (in Chinese).
- [10] 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性 [J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153-159.
- Ke L H, Fang Q, Cai Y Q. Characteristics of a novel isolate of grass carp hemorrhagic virus[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1990, 14(2): 153-159 (in Chinese).
- [11] 罗毅志, 杨广智, 叶雪平. 草鱼出血病病毒株的筛选 [J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(5): 503-506.
- Luo Y Z, Yang G Z, Ye X P. Selection of haemorrhagic virus strains from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1993, 24(5): 503-506 (in Chinese).
- [12] 曾令兵, 贺路, 左文功. 草鱼出血病病毒 854 株的理化、生物学特性及基因组结构 [J]. 水产学报, 1998, 22(3): 279-282.
- Zeng L B, He L, Zuo W G. Physical-chemical and biological characteristics and genome structure of grass carp hemorrhage virus-854[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22(3): 279-282 (in Chinese).
- [13] 李军, 王铁辉, 周立冉, 等. 两种草鱼出血病病毒株的比较 [J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 115-118.
- Li J, Wang T H, Zhou L R, et al. Comparative studies on two isolates of hemorrhagic virus from grass carp[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(3): 115-118 (in Chinese).
- [14] Qiu T, Lu R H, Zhang J, et al. Complete nucleotide sequence of the S10 genome segment of grass carp reovirus (GCRV)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 44(1): 69-74.
- [15] Fang Q, Attoui H, Biagini J F P, et al. Sequence of genome segments 1, 2, and 3 of the grass carp reovirus (Genus *Aquareovirus*, family Reoviridae)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 274(3): 762-766.
- [16] Ye X, Tian Y Y, Deng G C, et al. Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China[J]. Virus Research, 2012, 163(1): 275-283.
- [17] 王士, 许丹, 吕利群. 应用 dsRNA 测序技术检测草鱼呼肠孤病毒的混合感染 [J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 756-762.
- Wang T, Xu D, Lü L Q. Detection of the co-infection of different grass carp reovirus strains using dsRNA sequencing technology[J]. Journal of Shanghai Ocean

- University, 2012, 21(5): 756-762 (in Chinese).
- [18] Wang Y, Zeng W W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [19] Pei C, Ke F, Chen Z Y, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRv-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2435-2440.
- [20] Fan Y D, Rao S J, Zeng L B, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(10): 2266-2277.
- [21] Xu C, Yang J, Cao J J, *et al.* The quantitative proteomic analysis of rare minnow, *Gobiocypris rarus*, infected with virulent and attenuated isolates of grass carp reovirus genotype II[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 123: 142-151.
- [22] Lin Y S, Wang B, Wang N H, *et al.* Transcriptome analysis of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) infected by the grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 337-344.
- [23] Ma J, Xu C, Jiang N, *et al.* Transcriptomics in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) towards attenuated and virulent grass carp reovirus Genotype II Infection[J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(11): 1870.
- [24] Ma J, Xu C, Zhou Y, *et al.* Metabolomics in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after infection by attenuated and virulent grass carp reovirus genotype II[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 138: 108840.
- [25] Su J G, Yang C R, Zhu Z Y, *et al.* Enhanced grass carp reovirus resistance of Mx-transgenic rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(6): 828-835.
- [26] Chen G, Xiong L, Wang Y M, *et al.* ITGB1b-deficient rare minnows delay grass carp reovirus (GCRV) entry and attenuate GCRV-triggered apoptosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3175.
- [27] He L B, Wang H, Luo L F, *et al.* Bid-deficient fish delay grass carp reovirus (GCRV) replication and attenuate GCRV-triggered apoptosis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 76408-76422.
- [28] Su J G, Yang C R, Xiong F, *et al.* Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(1): 33-39.
- [29] Ou M, Huang R, Luo Q, *et al.* Characterisation of scavenger receptor class B type I in rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 614-622.
- [30] Wang B, Zhou M, Lin Y S, *et al.* TBK1 regulates the induction of innate immune response against GCRV by phosphorylating IRF3 in rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 115: 103883.
- [31] Zhou M, Wang B, Lin Y S, *et al.* Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of P65 subunit in response to GCRV infection in rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 113: 103786.
- [32] Mu C Y, Vakharia V N, Zhou Y, *et al.* A novel subunit vaccine based on outer capsid proteins of grass carp reovirus (GCRV) provides protective immunity against GCRV infection in rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Pathogens*, 2020, 9(11): 945.
- [33] Liu J, Pei C, Gao X C, *et al.* Fish reovirus GCRv-109 VP33 protein elicits protective immunity in rare minnows[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(3): 573-582.
- [34] Fu J, Xu N, Sun H, *et al.* Quercetin protects rare minnow *Gobiocypris rarus* from infection of genotype II grass carp reovirus[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(10): 4867-4873.
- [35] 付静, 吕利群. 槲皮素拮抗草鱼呼肠孤病毒感染的药理学研究 [J]. *中国水产科学*, 2022, 29(11): 1659-1668.
- Fu J, Lü L Q. Pharmaceutical research of quercetin against infection of *Ctenopharyngodon idella* reovirus[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(11): 1659-1668 (in Chinese).
- [36] Zhai Y F, Shen F, Wang H, *et al.* Combination of iron flocculation and qPCR for quantitative evaluation of virus-shedding intensity of goldfish *Carassius auratus* infected with cyprinid herpesvirus 2 in the water and the effect of sodium chlorite powder in blocking waterborne horizontal viral transmission[J/OL]. *Aquaculture and*



- Fisheries, 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468550X22001447>.
- [37] Ben-Asher R, Ravid S, Ucko M, *et al.* Chlorine-based disinfection for controlling horizontal transmission of VNN in a seawater recirculating aquaculture system growing European seabass[J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 329-336.
- [38] 汝少国, 姜明, 李永祺, 等. 中国对虾杆状病毒垂直传播途径的初步探讨 [J]. 水产学报, 1998, 22(1): 49-55.  
Ru S G, Jiang M, Li Y Q, *et al.* Preliminary study of the baculovirus vertical transmission in *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(1): 49-55 (in Chinese).
- [39] 江世贵, 何建国, 吕玲, 等. 白斑综合症病毒对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2000, 39(S1): 164-171.  
Jiang S G, He J G, Lü L, *et al.* The infectivity of white spot syndrome virus to the brooders of *Penaeus monodon* and vertical transmission of the virus[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(S1): 164-171 (in Chinese).
- [40] 孙皓. 草鱼呼肠孤病毒抑制药物筛选相关研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.  
Sun H. Research on screening of inhibitory drugs for grass carp reovirus[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [41] Jiang R, Zhang J, Liao Z W, *et al.* Temperature-regulated type II grass carp reovirus establishes latent infection in *Ctenopharyngodon idella* brain[J]. *Virologica Sinica*, 2023, 38(3): 440-447.
- [42] Goodwin A E, Sadler J, Merry G E, *et al.* Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: case studies from commercial goldfish farms[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(3): 271-278.
- [43] Thompson D J, Khoo L H, Wise D J, *et al.* Evaluation of channel catfish virus latency on fingerling production farms in Mississippi[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2005, 17(3): 211-215.

## Transmission routes of grass carp reovirus type II in rare minnow *Gobiocypris rarus*

NI Qinwei<sup>1</sup>, SUN Yang<sup>1</sup>, LIU Linyi<sup>1</sup>, LYU Liquan<sup>2\*</sup>

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Agriculture Ministry for Freshwater Aquatic Genetic Resources,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Grass carp reovirus (GCRV) causes severe grass carp hemorrhagic disease, which is one of the main diseases that threaten grass carp culture in our country. In order to explore the transmission of grass carp reovirus type II (GCRV-II), we established the horizontal and vertical transmission models of GCRV-JX02 infection in rare minnow *Gobiocypris rarus* using molecular biology detection and real-time fluorescent quantitative (RT-qPCR) methods. We compared the transmission efficiency of GCRV-JX02 in different models, and found that immersion infection and co-culture infection could turn the rare minnow into asymptomatic carriers of GCRV-JX02 in horizontal transmission. The positive detection rates were 50% and 80%, while the mortality rates of rare minnow in co-culture infection were 8%. When the asymptomatic rare minnow in the immersion and co-culture groups were treated with heat shock, the mortality rates were 57.14% and 100%, and the overall positive detection rates were 80.95% and 100%. Copy numbers of GCRV-JX02 in the testis and ovary of asymptomatic rare minnow after being injected intraperitoneally of GCRV-JX02 were  $3.64 \times 10^6$  and  $6.84 \times 10^6$  copies/0.01g. In the vertical transmission experiment, average copy numbers of GCRV-JX02 in ova, unfertilized eggs, fertilized eggs and juvenile fish were  $1.98 \times 10^3$ ,  $1.15 \times 10^4$ ,  $4.75 \times 10^3$  and  $6.74 \times 10^4$  copies. The copy number of GCRV-JX02 in single juvenile fish was significantly higher than that of ovum and fertilized egg. The results indicated that GCRV-JX02 could not only transmit vertically in rare minnow, but also persist continuously with the development of juvenile fish. This study elucidates the transmission efficiency of GCRV-II in multiple transmission routes, which is helpful in evaluating the epidemic risk of grass carp hemorrhagic disease and provide an effective animal model for screening drugs to block the transmission of GCRV.

**Key words:** *Gobiocypris rarus*; grass carp reovirus (GCRV); horizontal transmission; vertical transmission; heat shock treatment

**Corresponding author:** LYU Liquan. E-mail: [lqlv@shou.edu.cn](mailto:lqlv@shou.edu.cn)

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-45-16)