



养殖银鲳虹彩病毒感染的组织病理学分析及分子检测

许跃, 钱冬, 周素明*, 王亚军,
尹飞, 金珊, 詹萍萍

(宁波大学海洋学院, 生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 2018年7月, 宁波象山某养殖场内银鲳出现集中死亡现象, 累积死亡率高达80%以上, 为探究此次疾病暴发的原因, 本研究通过对患病银鲳进行组织病理学分析、透射电镜观察、病原的分子生物学检测及分析来对其病原进行鉴定, 以便制定合理的防控措施。患病银鲳临床表现为厌食、身体失衡、脾脏肿大、肝脏颜色异常等病征。组织病理学观察发现, 患病银鲳肝脏、脾脏和肾脏均出现直径10~15 μm、细胞质嗜碱性的肿大细胞。进一步的透射电镜观察则在脾脏、肾脏等组织细胞内发现了病毒包涵体结构以及大量的病毒粒子, 直径为140~160 nm。通过虹彩病毒特异性PCR检测发现, 患病组织样品为虹彩病毒阳性。此外, 通过病毒主要衣壳蛋白基因(MCP)序列分析, 发现银鲳源病毒与大黄鱼虹彩病毒(GenBank 登录号: AY779031.1)MCP同源性最高为99.76%, 认为此分离病毒属于虹彩病毒科、肿大细胞病毒属、真鲷虹彩病毒(Red sea bream iridovirus, RSIV)类群。本实验首次报道了全人工养殖环境下银鲳感染虹彩病毒的病例, 该研究将为养殖银鲳虹彩病毒病的诊断和防治提供重要的参考依据。

关键词: 银鲳; 养殖; 肿大细胞病毒; 虹彩病毒; 分子诊断

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

银鲳(*Pampus argenteus*)属鲈形目(Perciformes)、鲷科(Stromateidae)、鲷属(*Pampus*), 在我国主要分布于东海、南海和黄、渤海等地区^[1]。由于银鲳肉质细腻、营养丰富、味道鲜美而深受消费者喜爱, 其市场需求量逐年增大, 但由于市场供给全部依赖捕捞, 导致银鲳的市场价格逐年攀升。最近几年, 国内银鲳的全人工养殖在宁波地区取得成功^[2]。目前, 有关养殖银鲳的研究主要集中在生殖生理、饲料研发及对环境的适应性等方面^[3-7], 在疾病方面的研究极少。由于人工驯化时间短、养殖环境与野生环境差异大等原因导致的病害问题尤为突出。

早在2000年和2007年, 科威特就报道某养殖基地出现养殖银鲳大规模死亡现象, 患病银

鲳出现眼部出血、昏睡、食欲不振等现象, 解剖后发现肝脏肿大, 肾脏和脾脏充血, 通过病原的分离鉴定发现, 这两次病情暴发是由无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)感染引起^[8-9]。2015年, 在宁波象山地区银鲳养殖基地发现大量银鲳患出血性败血症, 且常伴有局部溃疡, 通过研究, 发现是美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)感染导致^[10]。此前研究所发现的银鲳疾病案例均为细菌性感染所致, 尚未有银鲳相关的病毒性病原的报道。

2018年7月宁波象山某室内养殖场的银鲳发病, 累积死亡率高达80%以上。本实验对发病银鲳的爆发性死亡原因进行了研究。通过对患病银鲳病症观察、细菌分离、分子生物学诊

收稿日期: 2019-05-11 修回日期: 2019-07-28

资助项目: 宁波市农业重大专项(2015C110003); 浙江省重大科技专项(2018C02G2070580)

通信作者: 周素明, E-mail: zhousuming@nbu.edu.cn

断、组织病理及透射电镜观察,确定此次银鲟发病与虹彩病毒科(Iridoviridae)肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)的病毒感染相关。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

本研究从发病养殖车间中共采集并解剖了10尾患病个体,从其他未发病养殖车间采集并解剖了5尾健康个体,并分别取5尾患病和3尾健康银鲟的肝脏、脾脏和肾脏等组织,切成合适尺寸组织块,保存于DNA组织样品常温保存液[B644771,生工生物工程(上海)股份有限公司],10%中性甲醛固定液及2.5%戊二醛溶液用于后续的核酸检测和组织病理学分析;取另外5尾患病及3尾健康银鲟进行细菌性病原的分离和检测。

1.2 常规细菌分离

采用无菌操作技术,将患病银鲟的肝脏、脾脏和肾脏等病灶样本通过划线接种到胰大豆蛋白胨(TSB)固体培养板上,并将其放置于28℃恒温培养箱中培养48h。根据细菌生长情况开展后续实验。

1.3 组织病理观察

将保存在10%中性甲醛固定液中的样本按照经典的组织学分析方法进行组织脱水、透明、透蜡和包埋处理,经切片和苏木精—伊红(H.E)染色后,置于Nikon Eclipse E80i光学显微镜(Nikon,日本)下观察和拍照。

1.4 透射电子显微镜观察

将保存在2.5%戊二醛固定液中的组织样品,经1%锇酸固定剂固定、4%醋酸铀染色后,分别使用梯度酒精脱水和100%丙酮脱水,并用无水丙酮与包埋剂渗透组织、振荡和包埋,置烘箱内37、45和60℃逐级聚合、修块,用超薄切片机制备100~120nm切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色。将染色处理完的切片置于透射电子显微镜中观察拍照。

1.5 组织核酸提取及PCR检测

取常温保存液中的组织样品,使用组织DNA提取试剂盒(D3396, Omega)进行总DNA的提取。随后将获得的DNA样品在NanoDrop 2000

(ThermoScientific, Waltham, MA, USA)进行定量。

根据2017年在线版《OIE水生动物疾病诊断手册》中虹彩病毒特异性PCR检测方法,对发病银鲟组织样品DNA进行特异性PCR扩增,反应分别使用引物1-F(5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3')/1-R(5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3')和4-F(5'-CGGGGGCAATGACGACTACA3')/4-R(4-R: 5'-CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA-3')^[11]进行目的基因的扩增,扩增产物大小分别为570和568bp。PCR采用25μL反应体系:2×PCR Master Mix 12.5μL(CW0682,北京康为世纪生物科技有限公司)、上下游引物各1μL、ddH₂O 9.5μL、DNA模板1μL。反应程序:94℃预变性5min;94℃变性2min,55℃退火30s,72℃延伸30s,35个循环;72℃终延伸5min。PCR反应产物经1%的琼脂糖凝胶电泳观察目的基因的完整性和质量。

1.6 虹彩病毒主要衣壳蛋白基因(MCP)序列的扩增、克隆和测序

根据已报道方法^[12]对检测阳性的DNA样品进行虹彩病毒MCP的PCR扩增、克隆及测序分析。PCR采用引物MCP-F(5'-ATGTCTGCAATCTCAGGTGCAAACGTAA-3')/MCP-R(5'-CAGGATAGGGAAGCCTGCGGCG-3')。扩增反应程序:94℃预变性5min;94℃变性2min,57℃退火30s,72℃延伸60s,35个循环;72℃终延伸5min。取5μL产物经琼脂糖凝胶电泳检测分析,将获得的与预期片段大小一致的PCR产物进行克隆和转化。采用pMD18T载体(K7201AB, TaKaRa)作为克隆质粒,通过T-A克隆的方法将目标片段克隆至载体中,与T₄连接酶体系混合于16℃孵育过夜,并将酶连产物转化至感受态DH5α中,挑取阳性克隆,PCR检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。随后对获得的序列进行数据库比对和系统发生学分析。

2 结果

2.1 患病银鲟的临床症状

患病银鲟养殖于宁波某养殖场室内水泥池中,发病时为4月龄,平均体质量为50g。患病银鲟临床症状表现为厌食、昏睡、身体失衡、脾脏肿大及肝脏颜色异常等(图1)。疾病发生时水温条件为26~28℃。



图 1 患病银鲳的临床症状

患病鱼脾脏异常肿大，肝脏颜色异常

Fig. 1 Clinical symptoms of diseased *P. argenteus*

Abnormal enlargement of spleen and abnormal liver color in sick fish

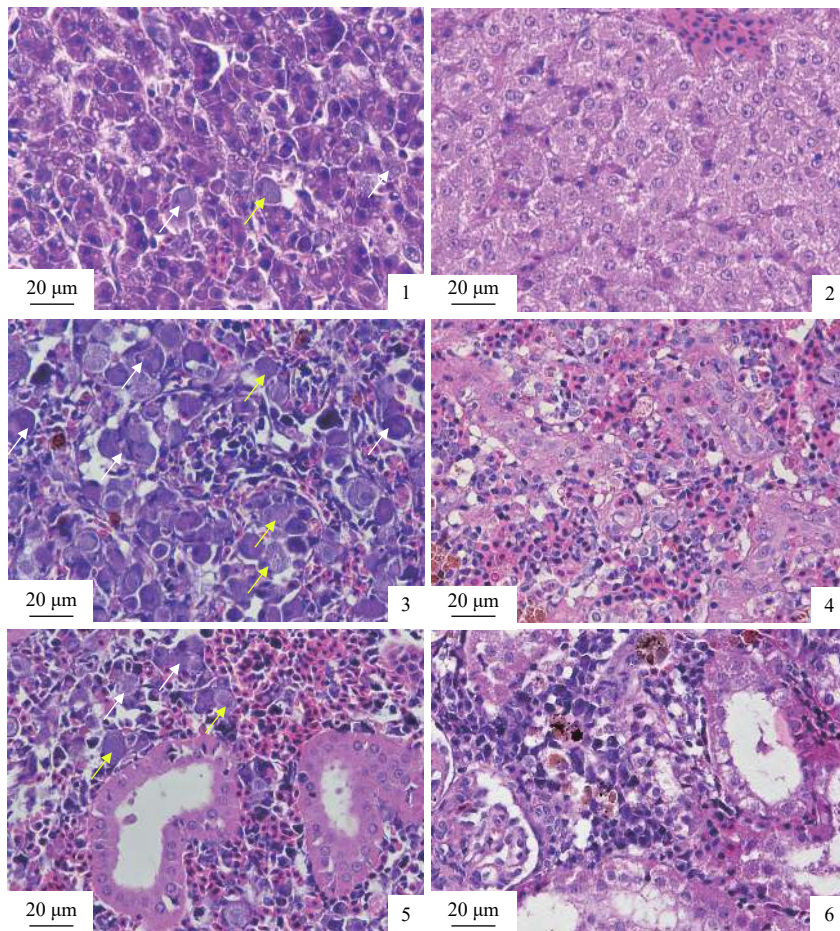
2.2 细菌的分离

无菌条件下，将样本内脏组织样品接种至 TSA 培养基上，26 °C 培养箱中恒温连续培养 48 h 后，仅有少数样本肝脏出现零星菌落，经 16S

rDNA 测序为弧菌 (*Vibrio* spp.)。

2.3 组织病理学分析和电镜观察结果

患病银鲳的组织病理学检测结果显示，在患病鱼的肝脏、脾脏和肾脏组织出现较高比例的凋亡细胞及嗜碱性肿大细胞(图版 I-1, I-3, I-5, 白色箭头所示)。凋亡细胞表现为细胞核裂解、固缩或消失。嗜碱性肿大细胞中含有深色颗粒分布(图版 I-1, I-3, I-5, 黄色箭头所示)。此外，上述组织中出现炎性细胞浸润。对脾脏和肾脏组织切片的透射电镜结果进行观察，肿大细胞存在细胞核病变、核裂解等(图版 II-1, 白色箭头所示)，在其细胞质中可发现游离或包裹在包涵体内的六边形病毒粒子，粒径为 140~160 nm(图版 II-4)。上述病理学观察结果表明患病银鲳存在病毒感染。

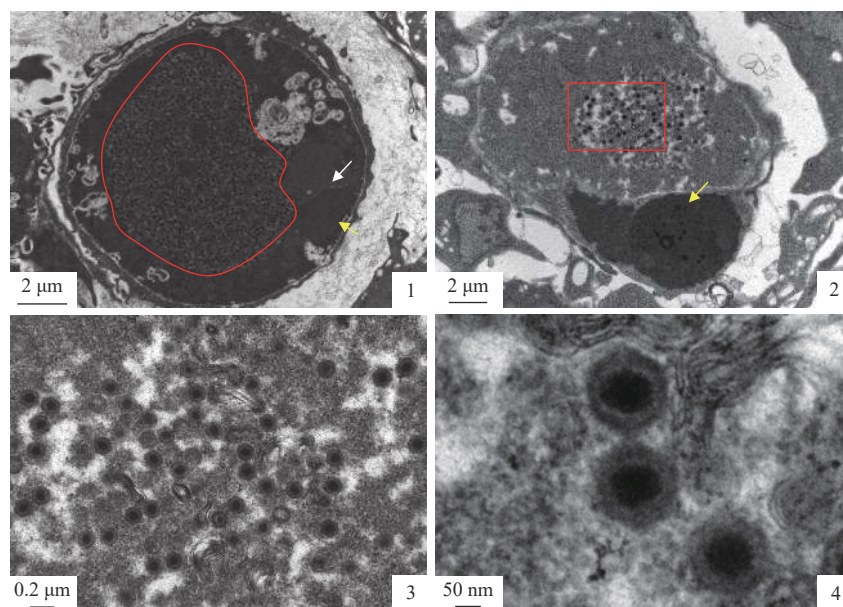


图版 I 组织病理图片

1、3、5. 患病银鲳组织，2、4、6 健康的银鲳组织；1、2. 肝脏，3、4. 脾脏，5、6. 肾脏；白色箭头所示为肿大细胞，黄色箭头所示为深色颗粒

Plate I Histopathologic image

1, 3, 5. the diseased tissue of *P. argenteus*; 2, 4, 6. the health tissues of *P. argenteus* ; 1, 2. liver, 3, 4. spleen, 5, 6. kidney; the white arrows indicate mast cells; the yellow arrows indicate dark particles



图版 II 病鱼脾脏与肾脏透射电镜图片

1. 脾脏, 2-4. 肾脏; 红色框内为包涵体, 黄色箭头所指的是核固缩

Plate II Transmission electron microscope graph of diseased fish's spleen and kidney

1. spleen, 2-4. kidney; in the red frame is inclusion body, the yellow arrows point to nucleolus shrinkage

2.4 虹彩病毒特异性 PCR 检测

本实验分别对 3 尾患病银鲳及 1 尾健康银鲳的肝脏、脾脏和肾脏组织进行了总 DNA 提取, 并将 DNA 样品通过虹彩病毒特异性 PCR 进行病毒检测。2 对特异性引物的 PCR 扩增结果显示, 所有患病银鲳的组织 DNA 样品结果均为阳性, 而健康银鲳均为阴性 (图 2)。特异性 PCR 检测的结果证实患病银鲳存在病毒的感染, 且感染病毒为虹彩病毒。

2.5 病毒 MCP 基因扩增及测序分析

本实验随机选取了患病银鲳肝脏、脾脏和

肾脏组织 DNA 样品, 对其进行 MCP 基因的 PCR 扩增。PCR 反应结果显示, 所有样品均扩增得到大小约为 1 300 bp 的扩增产物。通过基因克隆及序列测定得到了 3 个样品的 MCP 基因片段序列。将这 3 条序列与 NCBI 数据库 GenBank 中 DNA 序列通过 BLAST 软件进行序列对比。结果显示, 本实验获得的 MCP 基因与大黄鱼虹彩病毒 (Large yellow croaker iridovirus, LYCIV) (登录号: AY779031.1) 和真鲷虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus, RSIV) (登录号: AB666328.1) 的 MCP 基因均具有 99.76% 的序列相似性。此外, 系统发育树分析结果显示, 本实验中银鲳源的

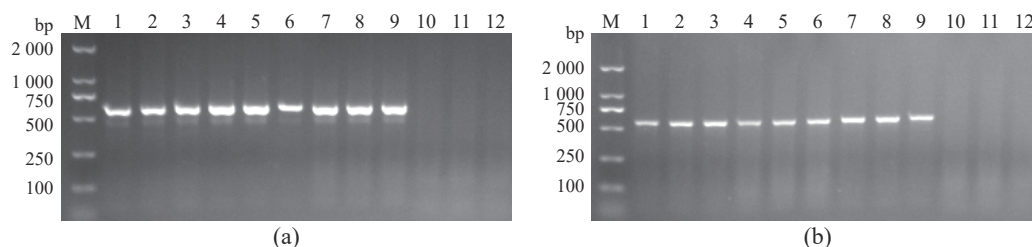


图 2 病鱼肝脏、脾脏、肾脏组织中虹彩病毒的检测

(a) 1F/1R 引物检测, (b) 4F/4R 引物检测; M. DL 2000 DNA Marker, 1-9. 病鱼组织, 10-12. 健康鱼组织; 1、4、7、10. 肝脏, 2、5、8、11. 脾脏, 3、6、9、12. 肾脏

Fig. 2 Electrophoresis map of amplified products of iridescent virus detection in diseased liver, spleen and kidney tissues

(a) detection with 1F/1R primer; (b) detection with 4F/4R primer; M. DL 2000 DNA Marker; 1-9. diseased fish tissue, 10-12. healthy fish tissue, 1, 4, 7, 10. liver, 2, 5, 8, 11. spleen, 3, 6, 9, 12. kidney

病毒 MCP 基因与肿大细胞病毒属的 LYCIV 及 2 株 RSIV 聚类成紧密的分支, 并与其他 5 株 RSIV 共同聚类成一个大 RISV 分支 (图 3)。MCP 基因序列分析结果说明了感染银鲟的病毒为肿大细胞病毒属虹彩病毒。

3 讨论

肿大细胞病毒属虹彩病毒为虹彩病毒科的一类 DNA 病毒, 粒径为 100~200 nm。根据其遗传差异及宿主感染症状可将其分为 3 大类, 即 RSIV、传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 及大菱鲆红体病虹彩病毒 (TRBIV) 病毒群。研究报道该属的病毒感染宿主包括淡水鱼类和海水鱼类等^[13]。肿大细胞病毒属病毒已对多种鱼类养殖造成过较为严重的损失, 目前已报道的可被肿大细胞病毒属感染的养殖经济鱼类包括真赤鲷、云斑尖塘鳢 (*Oxyeleotris marmoratus*)、眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)、大黄鱼、大菱鲆、鳊 (*Siniperca chuatsi*)、条石鲷等^[12, 14-19]。本实验通过临床症状观察、组织病理学分析以及分子诊断技术首次证明银鲟可被肿大细胞病毒属病毒感染, 而且在银鲟中发现的病毒与 RSIV 具有极高的同源性。

真鲷感染 RSIV 后常会表现出游泳行为异常、昏睡以及脾脏肿大等病征^[20], 与本实验中患病银鲟出现的临床症状一致。真鲷感染 RSIV 后组织

病理学病变主要为脾脏和肾脏等组织中出现大量嗜碱性肿大细胞^[20-21], 也与本研究在患病银鲟的组织病理学观察结果相似。此外, 病变组织细胞内存在典型的病毒包涵体结构是肿大细胞病毒感染的典型病变特征^[22], 并已被用于肿大细胞病毒感染的鉴定^[23], 本研究中银鲟的病变组织细胞中同样发现了典型的病毒包涵体结构, 其中包裹了大量不规整排列的六边形病毒颗粒, 说明病鱼可能感染了肿大细胞病毒属病毒。

为进一步验证此结论, 本实验以《OIE 水生动物疾病诊断手册》提供的特异性引物进行了 PCR 检测, 结果证实了患病组织中存在虹彩病毒。通过对银鲟源病毒 MCP 序列分析, 发现该病毒与大黄鱼虹彩病毒 (AY779031.1) 的 MCP 序列相似性达 99.76%; 同时, 系统发育树分析显示, 本实验中发现的病毒与肿大细胞病毒属真鲷虹彩病毒亲缘关系较近, 属肿大细胞属病毒。通过上述结果初步判断, 引起宁波象山地区人工养殖银鲟在 2018 年 7 月份暴发的大规模死亡可能与肿大细胞病毒属虹彩病毒感染有关, 但还需要进一步的感染实验验证。

我国银鲟全人工养殖技术尚处于起步阶段, 近几年银鲟的繁育孵化及幼体饲养取得较大成功。然而由于驯化时间短, 养殖环境差异大, 银鲟在人工养殖条件下对于病原的抵抗能力或有减弱, 同时银鲟全人工养殖体系及养殖管理

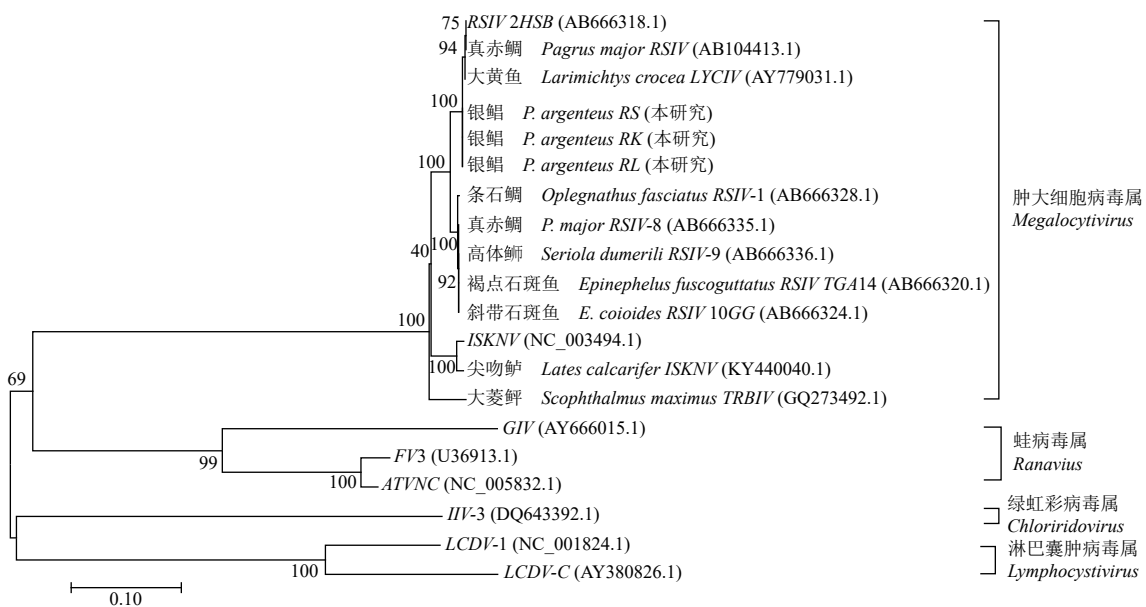


图 3 根据 MCP 基因构建 20 株虹彩病毒系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 20 iridovirus isolates (strains) based on the complete coding sequence of MCP gene

也有待进一步完善,导致养殖过程疾病时有发生。本实验首次报道了全人工养殖环境下银鲳感染虹彩病毒的病例,该研究将为养殖银鲳虹彩病毒病的诊断和防治提供重要的参考依据。

参考文献 (References):

- [1] 李建生,胡芬,严利平. 东海区银鲳资源合理利用的研究[J]. *自然资源学报*, 2014, 29(8): 1420-1429.
Li J S, Hu F, Yan L P. Study on the rational utilization of *Pampus argenteus* resources in the East China Sea Region[J]. *Journal of Natural Resources*, 2014, 29(8): 1420-1429(in Chinese).
- [2] 施兆鸿,赵峰,汪建钢,等. 舟山渔场银鲳人工授精及孵化[J]. *渔业现代化*, 2009(01): 21-24+37.
Shi Z H, Zhao F, Wang J G, et al. Artificial insemination and incubation of silver pomfret (*Pampus argenteus*) from Zhoushan fishing ground[J]. *Fishery Modernization*, 2009(01): 21-24+37(in Chinese).
- [3] 彭士明,尹飞,孙鹏,等. 不同饲料对银鲳幼鱼增重率、肝脏脂酶及抗氧化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 769-774.
Peng S M, Yin F, Sun P, et al. Effects of different diets on weight gain, hepatic lipase and antioxidant enzyme of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(6): 769-774(in Chinese).
- [4] 施兆鸿,王建钢,高露姣,等. 银鲳繁殖生物学及人工繁育技术的研究进展[J]. *海洋渔业*, 2005, 27(3): 246-250.
Shi Z H, Wang J G, Gao L J, et al. Advances on the studies of reproductive biology and artificial breeding technology in silver pomfret *Pampus argenteus*[J]. *Marine Fisheries*, 2005, 27(3): 246-250(in Chinese).
- [5] 施兆鸿,谢明媚,彭士明,等. 温度胁迫对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响[J]. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 30-35.
Shi Z H, Xie M M, Peng S M, et al. Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30-35(in Chinese).
- [6] 赵峰,施兆鸿,庄平. 银鲳繁育生物学研究进展[J]. *海洋科学*, 2010, 34(1): 90-96.
Zhao F, Shi Z H, Zhuang P. Advance on reproductive biology and artificial breeding technology of silver pomfret, *Pampus argenteus*[J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(1): 90-96(in Chinese).
- [7] 周健恺,徐善良,邱成功,等. 银鲳不同消化器官中消化酶活性的分布及其比较[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2014, 27(4): 1-6.
Zhou J K, Xu S L, Qiu C G, et al. Distribution and comparison of digestive enzyme activity of *Pampus argenteus* in different digestive organs[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2014, 27(4): 1-6(in Chinese).
- [8] Duremdez R, Al-Marzouk A, Qasem J A, et al. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(5): 307-310.
- [9] Azad I S, Al-Marzouk A, James C M, et al. Outbreak of natural *Streptococcosis* in hatchery produced silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) larvae in Kuwait[J]. *Aquaculture*, 2012, 330-333: 15-20.
- [10] Tao Z, Shen C, Zhou S M, et al. An outbreak of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in cultured silver pomfret *Pampus argenteus* in Eastern China[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 201-205.
- [11] Kurita J, Nakajima K, Hirono I, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV)[J]. *Fish Pathology*, 1998, 33(1): 17-23.
- [12] 王庆,曾伟伟,刘春,等. 云斑尖塘鳢肿大细胞病毒属虹彩病毒的分离与鉴定[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(6): 1150-1156.
Wang Q, Zeng W W, Liu C, et al. Identification and characterization analysis on a megalocytivirus isolated from diseased marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(6): 1150-1156(in Chinese).
- [13] Hyatt A D, Gould A R, Zupanovic Z, et al. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses[J]. *Archives of Virology*, 2000, 145(2): 301-331.
- [14] Dong Y Y, Weng S P, He J G, et al. Field trial tests of FKC vaccines against RSIV genotype Megalocytivirus in cage-cultured mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in an inland reservoir[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1598-1603.
- [15] 何爱华,林奕坚,郭永建,等. 大黄鱼幼鱼虹彩病毒感染的电镜研究[J]. *福建水产*, 1999(3): 56-59.
He A H, Lin Y J, Guo Y J, et al. Electron microscopy on

- iridovirus infection in *Pseudosciaen crocea* larva[J]. Journal of Fujian Fisheries, 1999(3): 56-59(in Chinese).
- [16] 何爱华, 郑永和, 郭永建, 等. 真鲷幼鱼狂游症病毒病原学初步研究[J]. 福建水产, 1997(2): 11-14.
- He A H, Zheng Y H, Guo Y J, *et al.* Viral etiological study on mad swimming of larva of *Pagrosomus major*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 1997(2): 11-14(in Chinese).
- [17] 李华, 孙志鹏, 李强, 等. 条石鲷检出的虹彩病毒特性研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(2): 158-164.
- Li H, Sun Z P, Li Q, *et al.* Characterization of an iridovirus detected in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel)[J]. Chinese Journal of Virology, 2011, 27(2): 158-164(in Chinese).
- [18] 秦蕾, 王印庚, 史成银, 等. 一种虹彩病毒感染大菱鲆的病理学研究[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 6-12.
- Qin L, Wang Y G, Shi C Y, *et al.* Pathological study on the infection of *Scophthalmus maximus* by an iridovirus[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 6-12(in Chinese).
- [19] 席云清, 戚瑞荣, 田佳鑫, 等. 眼斑拟石首鱼虹彩病毒病的诊断[J]. 水生生物学报, 2018, 42(5): 929-934.
- Xi Y Q, Qi R R, Tian J X, *et al.* Diagnosis of iridovirus disease in *Sciaenops ocellatus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 929-934(in Chinese).
- [20] Wang C S, Shih H H, Ku C C, *et al.* Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(3): 127-133.
- [21] Sano M, Minagawa M, Nakajima K. Multiplication of red sea bream iridovirus (RSIV) in the experimentally infected grouper *Epinephelus malabaricus*[J]. Fish Pathology, 2002, 37(4): 163-168.
- [22] Subramaniam K, Shariff M, Omar A R, *et al.* Megalocytivirus infection in fish[J]. Reviews in Aquaculture, 2012, 4(4): 221-233.
- [23] Chaiwud S, Masato M, Teruo M. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 48(3): 163-173.

Histopathological analysis and molecular detection of iridovirus in cultured *Pampus argenteus*

XU Yue, QIAN Dong, ZHOU Suming*, WANG Yajun, YIN Fei, JIN Shan, ZHAN Pingping

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Applied Marine Biotechnology, School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In July 2018, an outbreak of unknown disease occurred in the silver pomfret (*Pampus argenteus*) cultured in a farm in Xiangshan, Ningbo, with a cumulative mortality rate of over 80%. To investigate the cause of disease outbreak, histopathological analysis, transmission electron microscope observation and molecular biological detection and analysis were carried out to identify the pathogen, so as to help us to understand and control the disease. The clinical manifestations of sick *P. argenteus* are anorexia, body imbalance, swelling of the spleen, and abnormal color of the liver. Histopathological analysis showed the presence of basophilic enlarged cells with a diameter of 10~15 μm in diseased fish spleen, liver and kidney. Further transmission electron microscopic observation revealed the presence of inclusion bodies and a large number of virus particles (a diameter of 140-160 nm) in cells from spleen and kidney tissues. Moreover, results of the iridovirus-specific PCR test showed that all these tissue samples collected from diseased fish were positive for iridovirus. To further detect the presence of iridovirus, the major capsid protein (*MCP*) gene of virus in *P. argenteus* was amplified, cloned and sequenced. Sequence similarity analysis showed that silver pomfret-derived virus (SPDV) shared the highest homology with the large yellow croaker iridovirus (LYCIV) (GenBank accession number: AY779031.1) *MCP*, with a sequence similarity of 99.76%. In a phylogenetic tree, SPDV and LYCIV are closely grouped with red sea bream iridovirus (RSIV) strains. Thus, we concluded that the virus that infected silver pomfret belongs to the Iridovirus family, *Megalocytivirus* genus, RSIV group. In summary, this paper reported *Megalocytivirus* infection in cultured *P. argenteus* for the first time. This study will provide an important reference for the diagnosis and prevention of *P. argenteus* iridescent virus disease.

Key words: *Pampus argenteus*; cultured; *Megalocytivirus*; iridovirus; molecular diagnosis

Corresponding author: ZHOU Suming. E-mail: zhousuming@nbu.edu.cn

Funding projects: Ningbo Agricultural Major Project (2015C110003); Zhejiang Major Science Project (2018C02G2070580)