

养殖大黄鱼“白鳃病”一种新病毒病原的初步研究

施 慧¹, 谢建军¹, 汪 玮¹, 王庚申¹, 何 杰¹, 许文军^{2*}

(1. 浙江省海洋水产研究所 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江 舟山 316100;

2. 浙江海洋大学渔业学院, 浙江 舟山 316100)

摘要: 运用组织病理学、电镜观察及PCR扩增等方法对近年来网箱养殖大黄鱼暴发的“白鳃病”进行了研究, 以探讨引起养殖大黄鱼“白鳃”关联病毒的致病机理。临床解剖观察显示: 患“白鳃病”的鱼表现出极度的贫血症状、鳃丝苍白色、血液稀薄且血细胞数显著减少; 内脏组织病理观察结果显示: 鱼的肝、脾、肾脏内脏组织发生严重的病理变化, 组织内红细胞发生明显的退行性变化, 同时鱼体的红细胞数量显著减少; 采用针对真鲷虹彩病毒(red sea bream iridoviral virus, RSIV)的引物对病鱼内脏组织核酸样本进行PCR检测, 结果显示, 患“白鳃病”病鱼样本RSIV核酸呈阴性; 组织超薄切片电镜观察结果显示: 在患“白鳃病”病鱼脾脏和肾脏组织细胞的胞质中可见直径约40~45 nm的病毒粒子。由此初步判断, 浙江地区网箱养殖大黄鱼的“白鳃病”不是由RSIV导致, 而与一种直径为45~50 nm的病毒有直接关联, 本研究为大黄鱼疾病的诊断与防治提供了参考依据。

关键词: 大黄鱼; 白鳃病; 真鲷虹彩病毒; 组织病理学; 聚合酶链式反应

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)俗称黄花鱼, 是我国主要的经济鱼类之一。大黄鱼肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 为我国传统经济鱼类。大黄鱼为浙江省六大优势养殖品种之一, 近年来, 随着大黄鱼养殖规模迅速扩大, 病害问题已成为制约我省大黄鱼海水网箱养殖业健康、可持续发展的重要因素。目前在大黄鱼养殖中流行的病害主要有细菌性疾病(弧菌病、假单胞菌病)、寄生虫病(本尼登虫病、刺激隐核虫病、淀粉卵甲藻病)、病毒病(真鲷虹彩病毒病)。其中病毒性疾病是危害较为严重的一类疾病, 每年给养殖者造成了极大的经济损失。近年, 在网箱养殖大黄鱼中出现了一种以鳃丝苍白为主要症状的新疾病, 养殖户称其为“白鳃病”。该病通常发生于每年的6—9月, 累计死亡率可达20%以上, 严重时可达50%。病鱼体表完好无其他明显

病征, 体色偏白, 鳃丝呈极度贫血状态、发白; 解剖病鱼可观察到呈白色或黄色的肝脏、呈贫血状态的肾脏以及肿大的脾脏, 经流行病学检测未发现致病性寄生虫或细菌。杨小强等^[1]通过研究认为真鲷虹彩病毒(red sea bream iridoviral virus, RSIV)是导致“白鳃病”的主要病原; 而龚晖等^[2]则运用细胞培养和组织超薄切片电镜观察认为一种RNA病毒颗粒可能是引起“白鳃病”的病原。2014年在浙江的象山网箱养殖的大黄鱼中大规模的暴发了以“白鳃”为主要临床症状的疾病, 本实验采集了发病大黄鱼样本, 从病原学、组织病理学和分子生物学等方面对大黄鱼“白鳃病”病原进行了系列研究, 探讨导致大黄鱼“白鳃病”的关联病原, 以期为大黄鱼养殖过程中出现的“白鳃病”的诊断与防治提供科学依据。

收稿日期: 2016-06-06 修回日期: 2017-01-13

资助项目: 浙江省自然科学基金(Y15C190018); 浙江省科技厅院所专项(2015F30003; 2015F10001); 浙江海洋大学博士启动基金(22135010815); 浙江海洋大学“水产”省一流学科开放课题(20160008)

通信作者: 许文军, E-mail: xwenjun@sina.com

1 材料与方 法

1.1 实验材料

发病大黄鱼于2014年9月采集自浙江象山的大黄鱼网箱养殖点, 体长25~28 cm, 体质量230~270 g, 选取临床表现出特征性的鳃丝苍白症状的病鱼。

1.2 实验方法

解剖观察和血细胞计数 调查发病养殖区域的水温、发病鱼的鱼龄及观察病鱼在养殖池中的活动情况、死亡率等。然后在现场进行解剖和观察并记录病鱼体外和体内的临床症状。将病活鱼样本断尾取血液, 血细胞计数采用普通血球计数板进行。采用显微照相系统将计数框内图像拍下, 然后在电脑上计数, 每个样本计数3次, 取平均值。

寄生虫观察和细菌分离 取临床表现出典型病征的濒死病鱼, 取鳃丝、体表黏液及肠道内容物等制成水浸片, 显微镜下观察。用75%酒精棉球对病鱼体表消毒后, 无菌条件下取出病鱼的肝、肾、脾等内脏的小块组织于离心管中, 剪碎后在常规细菌培养基胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和弧菌选择性培养基(TCBS)上划线接种, 然后低温运回实验室, 27 °C培养24~48 h, 观察细菌生长情况。

虹彩病毒PCR检测分析 将患病鱼的肝、脾和肾脏组织碾碎, 取20~50 mg组织匀浆液, 使用DNA抽提试剂盒(Qiagen公司), 按说明书提取总基因组DNA。根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准(SN/T 1675-2014), 合成虹彩病毒检测用引物两对: 针对真鲷虹彩病毒的引物1-F: 5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'; 1-R: 5'GCACCAACACATCTCCTATC-3'以及针对传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)的引物对: 4-F: 5'-CGGGGGCAATGACGACTACA-3'; 4-R: 5'-CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA-3', 两对引物的PCR扩增产物分别是570和568 bp。PCR反应体系(25 μL)为: 17.25 μL超纯水, 2.5 μL的10×Reaction buffer, 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2.5 μL模板DNA, 每条引物(10 pmol/L)各0.25 μL, 0.25 μL Taq酶。PCR反应参数为94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 45 s, 共进行30个循环; 最后72 °C延伸10 min, 10 °C保存。

组织病理切片制备与观察 选择临床表现典型“白鳃病”症状的活鱼, 分别取其肝、脾及肾等组织经10%甲醛中固定, 在24 h后换数次75%乙醇冲洗, 最后保存于75%的乙醇中。固定样品经后续乙醇系列及丙酮脱水过程, 移入二甲苯溶液中透明, 浸蜡包埋后切片, 烤干后展片以苏木精-伊红染色法(H. E)染色, 显微镜下观察拍照。

电镜组织切片制备与观察 选择患病活鱼, 将病鱼肝、脾及肾等内脏组织切成2 mm×2 mm×2 mm的小块分别固定于2.5%戊二醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)中, 4 °C固定4 h以上。在0.1 mol/L磷酸缓冲液中4 °C漂洗过夜后再用1%锇酸溶液固定, 经过一系列浓度的乙醇脱水, 样品块经环氧树脂包埋后制备超薄切片, 透射电镜观察拍照。

2 结果

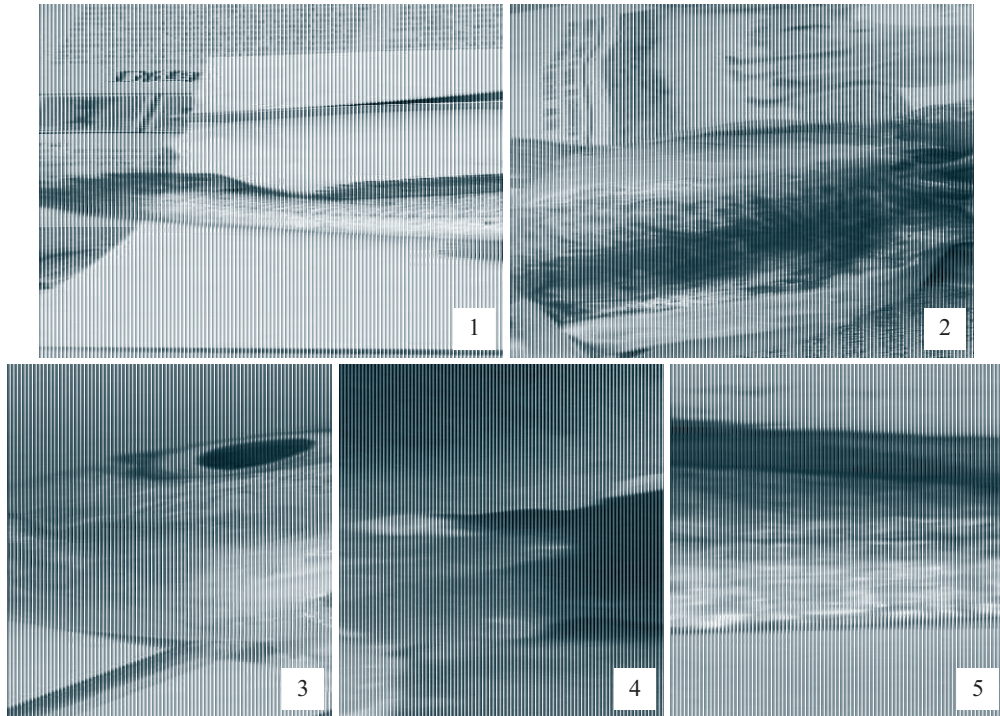
2.1 临床症状与解剖观察

“白鳃病”发病时间通常为7—9月份, 水温25~27 °C, 发病鱼体长多为20 cm以上的成鱼, 该病累计死亡率在12%以上。病鱼体表完好、无溃疡等异常病症, 但体色偏白(图版 I -1)。解剖濒死活鱼(图版 I -2), 主要病症表现为鳃丝苍白(图版 I -3); 肝脏呈土黄色或黄色, 质脆; 脾脏肿大, 呈暗红色; 肾脏稍肿大, 但严重贫血; 心包积液严重(图版 I -4); 肌肉无血色甚至变成浅黄色; 濒死鱼断尾取血液, 血液稀薄呈现淡红色水样, 不凝结(图版 I -5)。

将病鱼的血液在显微镜下进行计数, 发现血液中血细胞数量显著降低。正常大黄鱼的红细胞数和白细胞数分别为 $(1.79 \pm 0.22) \times 10^6$ 和 $(7.49 \pm 0.41) \times 10^6$ 个/mm³, 而患“白鳃病”大黄鱼的则为 $(0.27 \pm 0.01) \times 10^6$ 和 $(9.61 \pm 0.34) \times 10^6$ 个/mm³。数据分析显示正常大黄鱼和患“白鳃病”鱼两者血液中红细胞数量的差异极显著($P < 0.01$)(表1)。而正常鱼与患病鱼的白细胞数之间差异不显著($P > 0.05$), 但白细胞数占红细胞数的比例差异大($P < 0.01$), 正常的大黄鱼的白细胞数占红细胞数的比例为4.18%, 而患白鳃病鱼的白细胞占比高达35.59%。

2.2 细菌分离和寄生虫检测

对采集病鱼样本的体表黏液、鳃丝、肠道内容物等进行显微镜检, 均未发现致病性寄生



图版 I 病鱼临床症状

1. 发病大黄鱼体表; 2. 发病鱼解剖图; 3. 病鱼鳃丝苍白; 4. 心包积液; 5. 将濒死鱼断尾后流出的血液

Plate I Clinical symptoms of white-gill diseased fish

1. surface of diseased fish; 2. anatomical drawing of diseased fish; 3. white gill of diseased fish; 4. pericardial effusion; 5. blood of the diseased fish

表 1 病鱼样本血细胞数量的变化(平均值±标准差)

Tab. 1 Identification of the blood counts of white-gill diseased fish (mean±SD)

组别 group	红细胞数/ ($\times 10^6$ 个/ mm^3) RBC	白细胞数/ ($\times 10^4$ 个/ mm^3) WBC
正常鱼 health	1.79±0.22*	7.49±0.41**
白鳃病 diseased	0.27±0.01*	9.61±0.34**

注: *表示同一列正常鱼和白鳃病鱼之间数值差异极显著($P < 0.01$), **表示表示同一列正常鱼和白鳃病鱼之间数值差异不显著($P > 0.05$)
Notes: * mean the same column normal numerical difference between fish and white gill disease significantly ($P < 0.01$), ** means the same column normal numerical difference between fish and white gill disease was not significant ($P > 0.05$)

虫。无菌条件下, 使用细菌培养基TSA和TCBS对病鱼的肝、肾和脾等内脏组织进行细菌分离培养, 27 °C培养48 h后观察, 均未发现有优势致病菌出现。

2.3 RSIV PCR检测结果

以针对RSIV的两对特异性引物, 对采集的临床表现“白鳃”症状的病鱼组织核酸样本进行PCR扩增(图1), 结果病鱼样本中两对引物均未扩出目的核酸条带; 而真鲷虹彩病毒阳性样本中

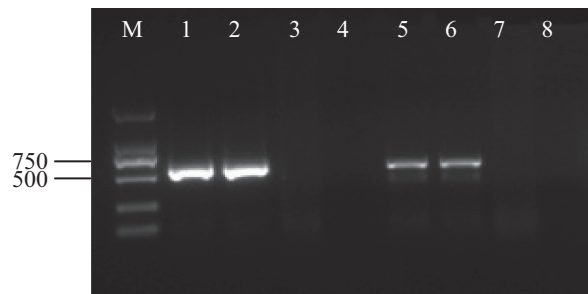


图 1 大黄鱼RSIV PCR检测图

M. DL2000 DNA Marker; 1, 2, 5, 6.真鲷虹彩病毒鱼样本; 3, 7.“白鳃病”病鱼样本; 4, 8.阴性对照。1~4.引物1-F/1-R扩增产物; 5~8.引物4-F/4-R扩增产物

Fig. 1 Deteced the RSIV infection of *L. crocea* samples by PCR

M.DL2000 DNA marker; Lane1, 2, 5, 6.RSIV positive control ; Lane3, 7.genomic DNA purified from white-gill disease fish; Lane4, 8.RSIV negative control 1-4.The primer pair used for genomic DNA amplification is 1-F and 1-R; Lane5-8.The primer pair used for genomic DNA amplification is 4-F and 4-R

两对引物均可以扩增出目的核酸条带。

2.4 组织病理学观察

在普通光学显微镜下观察病鱼的组织病理

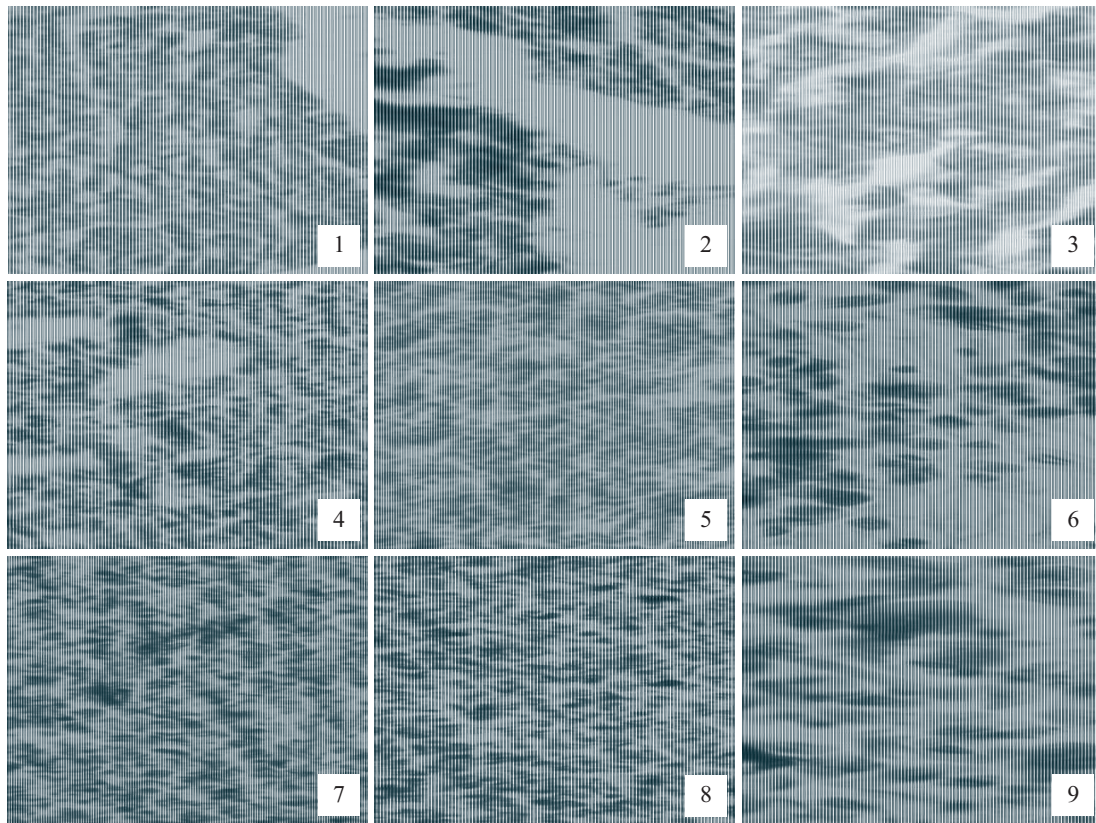
切片,发现病鱼的肝、脾和肾等内脏组织均发生了严重的病理变化,有明显的细胞坏死、含铁血黄素沉积、脂肪样变以及炎性细胞浸润等现象。

肝脏 患病鱼肝脏组织病理观察显示:肝内血管管腔狭窄或闭塞,血管壁的内皮细胞发生变性,坏死,解体;血管内多空虚,或所含的血液多为血浆,红细胞少见。肝细胞坏死、核肿大、细胞间界限模糊,失去原有结构、有的肝细胞核空泡化或崩解(图版 II-1~3)。

肾脏 患病鱼肾脏组织病理观察显示:病变严重,肾小球肥大、肾小球囊腔消失,白

细胞浸润严重。肾小管规则形状消失,管腔变窄与闭塞,肾小管上皮细胞间界限模糊,失去原有结构,严重的肾小管甚至崩解、消失,仅有肾小管基底膜轮廓(图版 II-4~6)。

脾脏 病鱼的脾脏组织病理观察显示:脾组织发生大面积严重坏死,结构紊乱。大量红细胞淤积在靠近脾小梁的红髓中,而血管里的红细胞却很少;髓窦内有大量含铁血黄素沉积,淋巴细胞相对减少,黑素巨嗜细胞中心增多;脾脏内的红细胞大多发生退行性变化,表现为细胞形态不规则,多呈不规则形,细胞体积明显变小,胞核小而致密,胞质深染;有些



图版 II 病鱼组织切片图

1~3, 4~6, 7~9分别表示患病鱼肝组织、肾组织以及脾组织病理变化。1.肝内血管管腔狭窄(H.E×400); 2.血管内无红细胞(H.E×400); 3.肝细胞核肿大,细胞之间界限模糊(H.E×1000); 4.病鱼肾小球肥大(H.E×400); 5.肾小管规则形状消失(H.E×400); 6.肾小管崩解、消失,仅有肾小管基底膜轮廓(H.E×1000); 7.红细胞弥漫于整个脾组织中,(H.E×400); 8.髓窦内有大量含铁血黄素沉积(H.E×400); 9.红细胞形态不规则,大多发生退行性变化,退变的红细胞凝聚成一小团(H.E×1000)

Plate II Histopathological examination of white-gill diseased fish

Histopathological examination of 1-3, 4-6 and 7-9 indicates the damage degree in white-gill diseased fish. 1. Intrahepatic vasculars were stenosing. (H.E×400); 2. There were no red blood cells in blood vessels of the liver (H.E×400); 3. The nucleus of hepatocytes became swollen and cell boundaries of hepatocytes were unclear. (H.E×1000); 4. Glomerular hypertrophy (H.E×400); 5. The renal tubular normal structure disappeared (H.E×400); 6. Renal tubules were disintegrated and disappeared and only the shape of the base membrane was there (H.E×1000); 7. Red blood cells diffuse throughout the spleen of white-gill diseased fish (H.E×400); 8. There were a large number of hemosiderin depositions in pulp of spleen (H.E×400); 9. The erythrocytes in the spleen showed serious degenerative changes (H.E×1000)

退变的红细胞凝聚成一小团, 或形成均质球状(图版 II-7~9)。

2.5 电镜观察结果

内脏组织超薄切片电镜观察结果显示, 肝脏、脾脏和肾组织细胞核普遍因病毒侵染而发生明显的病理变化。病变肝细胞出现核固缩, 细胞质中出现大面积空白区, 但细胞内未观察到病毒(图版 III-1)。病变的肾、脾细胞损坏严重, 细胞结构模糊不清, 在病变细胞中可以观察到病毒样颗粒, 病毒粒子呈圆形, 直径大小约为45~50 nm, 无囊膜, 病毒呈散在或集中分布于细胞质内, 未见明显的包涵体存在(图版 III-2~6)。

3 讨论

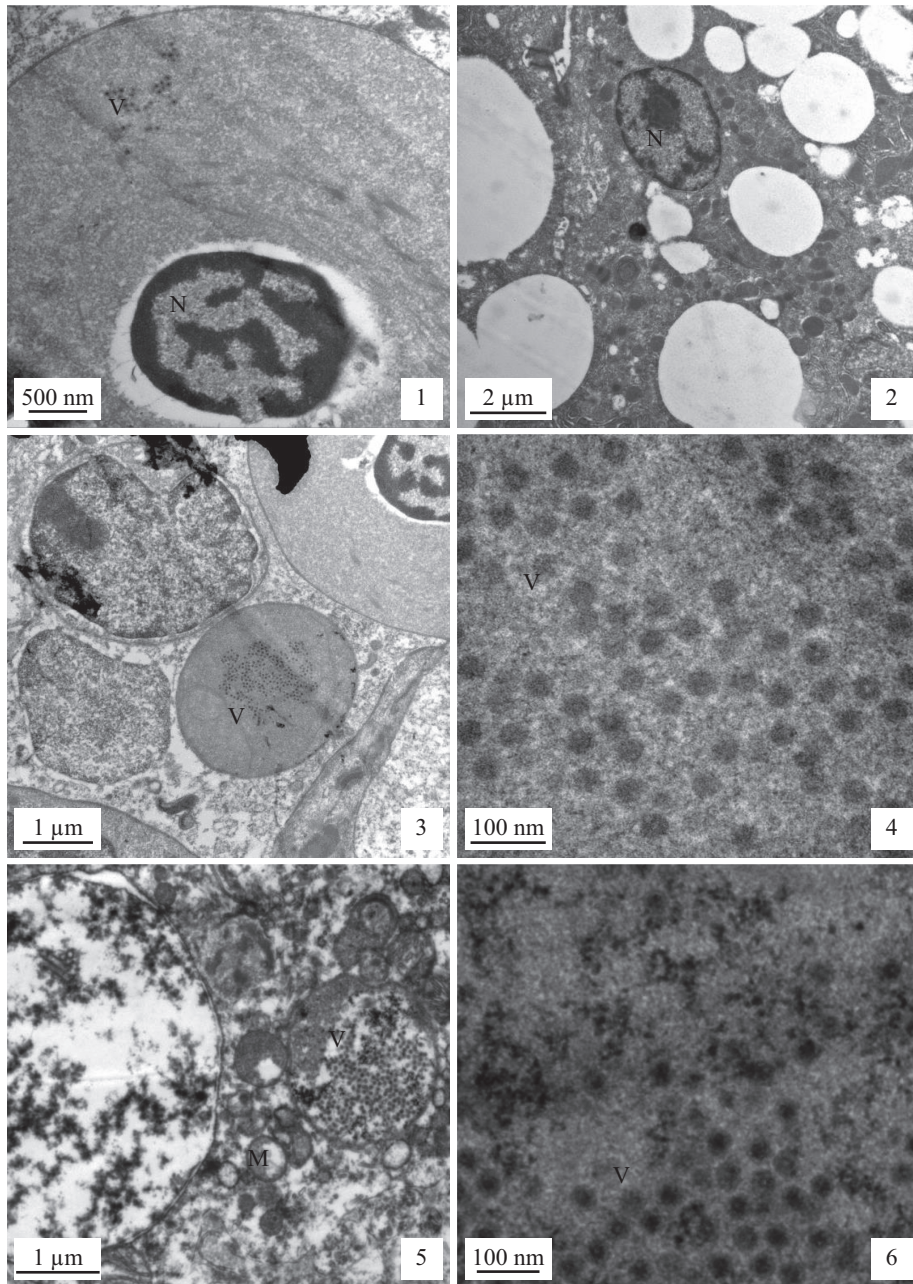
本实验中采集的患“白鳃病”的病鱼样本主要表现的临床症状是鳃丝苍白, 通过解剖观察, 病鱼表现出的病理症状与之前报道的大黄鱼“白鳃病”是一致的。采集病鱼血液对血细胞计数显示, 血液中红细胞等数量急剧减少。将病鱼的核酸样本进行RSIV的PCR检测, 结果核酸样本RSIV均为阴性, 排除了病鱼RSIV感染的可能。病鱼内脏组织中也未分离或观察到可疑细菌性或寄生虫性病原, 但病鱼的内脏组织超薄切片在电镜下观察到一种直径约为45~50 nm的无囊膜病毒颗粒。实验结果初步显示, 此次大黄鱼“白鳃病”是由一种新病毒导致。

鳃是鱼类的重要呼吸器官, 鱼体与外环境的气体交换主要由鳃器官来完成。鱼类鳃部的变化, 如出血、充血或贫血是鱼类疾病诊断的重要依据^[3]。正常活鱼的鳃为鲜红色, 而“白鳃”一般是鱼体贫血的一个重要表症。“白鳃病”是一种以鳃丝苍白为主要临床病症的疾病, 患病鱼均呈极度的贫血状态。该病2007年在福建三都澳海域首次被发现, 之后连续多年在福建三都岛、黄湾、港口等海域和宁德地区网箱养殖大黄鱼中暴发, 造成了较大的经济损失^[4-5]。目前报道的能引起鱼类贫血的病原种类很多, 病毒或细菌感染都可以导致鱼体贫血、鳃丝发白, 纪荣兴等^[6]曾报道海洋双RNA病毒可以引起牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)贫血症, 患病牙鲆的鳃会出现无血色症状。范文辉等^[7]曾报道哈维氏弧菌可以使养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)溃疡, 继而引起鱼鳃丝贫血发白。而报道最多的可以导致鱼类贫血症的病毒是RSIV, 其宿主几乎涵

盖了我国主要的海水养殖鱼类以及重要的淡水养殖鱼类, 研究认为感染RSIV鱼的鳃也会呈现苍白色, 同时该病毒也是危害大黄鱼养殖的一个重要病毒性病原^[8-13]。

大黄鱼“白鳃病”发病季节与RSIVD相同, 两种疾病的临床症状也有一定相似性, 均表现贫血, 鳃苍白。但两种疾病存在一定的差异, 首先两者在发病鱼的个体上存在差异, 目前发现的患“白鳃病”的大黄鱼大部分都是成鱼, 而RSIV目前研究认为大黄鱼幼鱼更易感染发病死亡, 而成鱼通常只携带RSIV不会发病死亡^[14]。其次, 患“白鳃病”大黄鱼最主要的病征为贫血、鳃丝变白, 血液稀薄、外周血液中血细胞数量减少。崔龙波等^[15]曾对福建宁德患“白鳃病”大黄鱼的外周血液中血细胞数量、形态和分布的进行了系统比较分析, 结果发现与正常大黄鱼相比, 不仅患病鱼的红细胞数量显著降低, 同时患病鱼血液中小淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和血栓细胞所占比例也明显减少, 而大淋巴细胞和单核细胞所占比例明显增加。感染RSIV的大黄鱼, 外周血液量未见明显异常, 外周血液中的红细胞数量、形态也未有明显变化^[16-18], 说明两种病原所导致的大黄鱼机体上的变化是有差异的。再者, 从组织病理学变化上分析, 大黄鱼“白鳃病”和大黄鱼RSIVD导致的组织病理变化存在一定的差异, 目前研究报道虹彩病毒感染通常会导致鱼的脾、肾等病毒靶器官内出现大量嗜碱性的、细胞质匀质化的、直径约15~20 μm的肿大细胞^[19-23]。而在患“白鳃病”的病鱼内脏组织中没有出现这种特征性的肿大细胞, 但患病鱼内脏组织中的红细胞发生退行性变化。患“白鳃病”病样组织电镜显微观察到的是直径约45~50 nm, 无囊膜的病毒颗粒, 而RSIV电镜下观察是一种直径约为150~180 nm有囊膜的病毒颗粒。

综上所述, 导致此次网箱养殖大黄鱼中“白鳃病”的病原是不同于RSIV的另外一种病毒, 这种病毒可以破坏大黄鱼内脏组织的结构与功能, 特别是使脾脏组织等造血器官, 造成内脏组织中的血细胞发生严重退行性变化, 从而导致全身血管内的血细胞特别是红细胞稀少, 使患病鱼在临床上表现出极度贫血状态。由于暂未确定病毒的种类, 所以该病毒的致病机理、快速检测方法和预防措施还有待进一步研究。



图版 III 病鱼组织细胞的电镜图

1, 2~4及5~6分别表示患病鱼肝组织、脾组织以及肾组织超薄切片。1.肝细胞质中出现大量空泡,显示固缩的细胞核(N); 2.脾细胞质中散在的病毒颗粒(V); 3.脾细胞中集中存在的病毒颗粒(V); 4.脾细胞中放大的病毒颗粒(V); 5.肾细胞中集中存在的病毒颗粒和空泡化的线粒体(M); 6.肾细胞中放大的病毒颗粒(V)。M: 线粒体; N: 细胞核; V: 病毒颗粒

Plate III Electron micrograph of cells from white-gill diseased fish

Electron micrograph of 1-3, 4-6 and 7-9 indicates the cell from liver, spleen and kidney. 1. showing the condensed chromatin and vacuolized cytoplasmic; 2. showing virus particles within the cytoplasmic; 3. showing the aggregated virus particles within the cytoplasmic; 4. virus particles in spleen cell; 5. showing the aggregated virus particles and vacuolized mitochondrion; 6. virus particles in kidney cell

M:Mitochondrion; N:Nucleus; V:virus particles

参考文献:

[1] 杨小强. 罗源湾养殖大黄鱼虹彩病毒的PCR检测[J]. 福建畜牧兽医, 2013, 35(2): 5-8.

Yang X Q. PCR detection of cage cultured large yellow

croaker *Iridovirus* in the Luoyuan bay, Fujian province[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 35(2): 5-8(in Chinese).

[2] 龚晖, 郑在子, 刘振勇, 等. 患“白鳃病”大黄鱼的病毒的

- 分离及部分理化特性分析[C]//2013年中国水产学会鱼病专业委员会学术研讨会论文集. 海口: 中国水产学会, 2013: 86.
- [3] 胡利静, 胡鲲, 杨先乐, 等. 临床中鱼病诊断的环节[J]. 渔业致富指南, 2015(5): 52-54.
Hu L J, Hu K, Yang X L, *et al.* The links of Fish disease diagnosis in clinic[J]. Fishery Guide to be Rich, 2015(5): 52-54(in Chinese).
- [4] 林能锋, 许斌福, 龚晖, 等. 网箱养殖大黄鱼“白肝病”防治初探[J]. 福建畜牧兽医, 2001, 23(2): 14-15.
Lin N F, Xu B F, Gong H, *et al.* Elementary research on “white-liver disease” prevention and cure of *Pseudosciaena crocea* in cage aquaculture[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2001, 23(2): 14-15(in Chinese).
- [5] 王昌各. 大黄鱼苗种白鳃白肝的防治[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 18(2): 76-77.
Wang C G. Prevention and control white gill and white liver disease of seedling of *Pseudosciaena crocea*[J]. Animal Science & Veterinary Medicine, 2001, 18(2): 76-77(in Chinese).
- [6] 纪荣兴, 吉水守, 绘面良男, 等. 牙鲆贫血症病毒分离株的特性[J]. 集美大学学报(自然科学版), 1998, 3(3): 120-125.
Ji R X, Yoshimizu M, Ezura Y, *et al.* Characteristics of a isolated virus strain from anemic Japanese flounder[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 1998, 3(3): 120-125(in Chinese).
- [7] 范文辉, 黄捷, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 665-670.
Fan W H, Huang J, Wang X H, *et al.* Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 665-670(in Chinese).
- [8] Weng S P, Wang Y Q, He J G, *et al.* Outbreaks of an iridovirus in red drum, *Sciaenops ocellata* (L.), cultured in southern China[J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(11): 681-685.
- [9] Shi C Y, Wang Y G, Yang S L, *et al.* The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China[J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 11-25.
- [10] Teng Y, Hou Z W, Gong J, *et al.* Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Virology, 2008, 377(1): 39-48.
- [11] 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).
- [12] 王庆, 李凯彬, 曾伟伟, 等. 大口黑鲈虹彩病毒病研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 73-76.
Wang Q, Li K B, Zeng W W, *et al.* Progress on viral disease caused by largemouth bass ranavirus[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(2): 73-76(in Chinese).
- [13] 高正勇, 曾令兵, 肖汉兵, 等. 大鲵虹彩病毒理化及生物学特性研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(5): 17-21, 26.
Gao Z Y, Zeng L B, Xiao H B, *et al.* Studies on the physical, chemical and biological characteristics of giant salamander iridovirus[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(5): 17-21, 26(in Chinese).
- [14] Chen X H, Lin K B, Wang X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson) in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(10): 615-619.
- [15] 崔龙波, 迟爽, 李新华, 等. 正常与患白鳃病大黄鱼的血细胞比较研究[J]. 水产科学, 2013, 32(4): 192-196.
Cui L B, Chi S, Li X H, *et al.* Comparison of hematocytes between normal and white-gill diseased large yellow croaker *Pseudosciaena crocea richardson*[J]. Fisheries Science, 2013, 32(4): 192-196(in Chinese).
- [16] 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).
- [17] 戚瑞荣, 雷燕, 崔龙波, 等. 传染性脾肾坏死病毒感染鳊 *Siniperca chuatsi* 的组织病理学观察[J]. 水产学杂志, 2015, 28(3): 35-38.

- Qi R R, Lei Y, Cui L B, *et al.* Histopathological observation of mandarinfish (*Siniperca chuatsi*) infected with infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(3): 35-38(in Chinese).
- [18] 文琳, 雷燕, 戚瑞荣, 等. 尖吻鲈 *Lates calcarifer* 虹彩病毒病的诊断[J]. 水产学杂志, 2015, 28(4): 28-32.
- Wen L, Lei Y, Qi R R, *et al.* Diagnosis of iridovirus disease in sea bass *Lates calcarifer*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(4): 28-32(in Chinese).
- [19] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, *et al.* First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*)[J]. Journal of Comparative Pathology, 2011, 145(1): 95-102.
- [20] 秦蕾, 王印庚, 史成银, 等. 一种虹彩病毒感染大菱鲂的病理学研究[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).
- [21] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997, 21(S): 56-60.
- Wu S Q, Li X H, Pan H J, *et al.* Research on the pathogen of the outbreak infective disease of *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(S): 56-60(in Chinese).
- [22] 余泽辉, 耿毅, 汪开毓, 等. 大鳄龟感染蛙病毒的PCR检测及组织病理分析[J]. 动物学杂志, 2015, 50(1): 68-74.
- Yu Z H, Geng Y, Wang K Y, *et al.* PCR Detection and Pathohistological Analysis of *Ranavirus* Infection in Alligator Snapping Turtle[J]. Chinese Journal of Zoology, 2015, 50(1): 68-74(in Chinese).
- [23] 罗霞, 付小哲, 李宁求, 等. 同步接毒条件下鳊传染性脾肾坏死病毒在CPB细胞中的最适增殖条件[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1713-1720.
- Luo X, Fu X Z, Li N Q, *et al.* Study on optimal proliferation conditions of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi* in CPB cells with synchronous inoculation[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1713-1720(in Chinese).

Preliminary study of a new virus pathogen that caused the white-gill disease in cultured *Larimichthys crocea*

SHI Hui¹, XIE Jianjun¹, WANG Wei¹, WANG Gengshen¹, HE Jie¹, XU Wenjun^{2*}

(1. Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316000, China;

2. Fisheries College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316100, China)

Abstract: By using histopathology and polymerase chain reaction (PCR) methods, studies were carried out to find the cause of the white-gill disease in *Larimichthys crocea* cultured in cage in Zhejiang Province. White-gill diseased fish had the typical symptom of pale gills and there is no ulcer in the body surface of infected fish. However, the blood and blood cell counts in the white-gill disease fish were significantly decreased. Pathological observation showed serious pathological changes in internal organs. In white-gill diseased fish, haemocytes, in particular, erythrocytes reduced sharply in the blood vessels of liver, spleen and other organs and degenerative changes occurred in red blood cells, too. Under electron microscope, a large number of viral particles were observed in the cytoplasm of spleen, with an average diameter of 40 to 45 nm. With the primers derived from RSIV, no fragments of the RSIV DNA could be amplified from the white-gill diseased fish. The results indicated that although white-gill disease and RSIVD both can lead to the symptom of pale gills, but the pathogen that caused each disease was completely different, and the white-gill disease that broke out in Zhejiang may be associated with another virus.

Key words: *Larimichthys crocea*; white-gill; red sea bream iridovirus virus; histopathology; polymerase chain reaction

Corresponding author: XU Wenjun. E-mail: xwenjun@sina.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y15C190018); Institute of Science and Technology of Zhejiang Province (2015F30003, 2015F10001); Basic Research Foundation of Zhejiang Ocean University (22135010815); Open Project of First-Class Discipline for Aquatic Province of Zhejiang Ocean University (20160008).