

DOI: 10.12264/JFSC2023-0129

养殖三疣梭子蟹十足目虹彩病毒 1 的检出及组织病理学分析

赵丹阳¹, 施慧², 许文军², 何杰², 王庚申²

1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;
2. 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 316021

摘要: 为探究浙江省舟山市某养殖池塘中三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)暴发疾病的病因, 应用组织病理学、分子生物学和荧光原位杂交等技术手段, 对患病三疣梭子蟹组织进行检验。研究发现, 患病三疣梭子蟹的临床症状主要表现为食欲下降, 行动迟缓, 鳃水肿; 光学显微镜下观察鳃及血淋巴液未发现寄生虫, 肝胰腺等组织中也未分离到致病菌; 采用 PCR 方法对病蟹进行血卵涡鞭虫(hematodinium)、白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、青蟹双顺反子病毒(mud crab discistrovirus-1, MCDV-1)以及青蟹呼肠孤病毒(*Scylla serrata* reovirus, SSRV)蟹类常见病原 PCR 检测, 结果均为阴性; 病蟹的肝胰腺、心脏、鳃等组织的病理切片中可观察到明显的细胞病变和嗜酸性包涵体; 超薄切片电镜观察显示: 病蟹的肝胰腺、心脏和鳃组织中均存在六边形病毒颗粒, 粒子直径 150 nm 左右, 与已报道的十足目虹彩病毒 1 (decapoda iridescent virus 1, DIV1)形态特征相似。采用特异性套式 PCR 检测方法对患病蟹组织样品进行 DIV1 病原检测, 所有样本均扩增出 457 bp 和 129 bp 大小的目的片段。进一步根据 GenBank 中 DIV1 的主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)表达基因和三磷酸腺苷酶(ATPase)表达基因序列设计特异性引物, 均能从病蟹样品中扩增出预期大小的 MCP 和 ATPase 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)区全长。将扩增获得的 MCP 和 ATPase 基因 ORF 区全长进行测序和同源序列比对分析, 进化树分析结果表明其与十足目虹彩病毒属(*Decapodiridovirus*)病毒的 MCP 和 ATPase 基因序列自然聚为一支, 判定导致此次三疣梭子蟹发病病原为 DIV1。根据原位杂交探针设计原则, 以 DIV1 的 MCP 和 ATPase 基因的保守区域为靶位点分别设计探针, 通过荧光原位杂交获得了病毒粒子在病蟹肝胰腺、心脏、肌肉和鳃组织的分布情况, 与电镜切片观察和套式 PCR 检测结果相符。研究结果可为海水养殖三疣梭子蟹十足目虹彩病毒 1 病诊断与防控提供参考。

关键词: 三疣梭子蟹; 十足目虹彩病毒 1; 组织病理; 原位杂交

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)08-1042-12

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属甲壳纲(*Crustacea*), 十足目(*Decapoda*), 梭子蟹科(*Portunidae*), 梭子蟹属, 其肉味鲜美, 营养丰富, 是我国重要的海水经济蟹类。自 20 世纪 90 年代, 人工苗繁育与养殖成功以来, 梭子蟹围塘养殖迅速发展。随着人工繁育技术的突破以及养殖技术的提升, 三疣梭子蟹已成为浙江省海水围塘养殖的主导品种^[1]。但是随着围塘老化, 养殖环境污染严重, 梭子蟹养殖中病害频繁发生, 导致养殖经

济效益降低, 严重影响该产业的健康发展。

十足目虹彩病毒 1 (decapod iridescent virus 1, DIV1)属于十足目虹彩病毒属(*Decapodiridovirus*), 是近几年危害养殖虾类较为严重的一种 DNA 病毒^[2-3]。1993 年, Lightner 等^[4]首次在厄瓜多尔对虾养殖场濒死的原糙对虾(*Protrachypene precipua*, *Burkenroa*)中发现 DIV1。国内, 2014 年 Qiu 等^[2]首先在养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中分离鉴定到一株 DIV1, 2016 年 Xu 等^[5]在养殖

收稿日期: 2023-06-13; 修订日期: 2023-07-21.

基金项目: 浙江省农业重大技术协同推广项目(2020XTTGSC03, 2022XTTGSC04); 象山县科技计划项目(2022C1001).

作者简介: 赵丹阳(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海水养殖病害防治. E-mail: 2428882005@qq.com

通信作者: 施慧, 高级工程师, 硕士生导师, 研究方向为海水养殖病害防治. E-mail: huishi2002@126.com

的红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)中也分离鉴定到 DIV1, 之后陆续有报道在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)以及克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)中检测到该病毒^[6-8]。感染 DIV1 的对虾短时间内会发生大量死亡^[9], 患病对虾主要表现为空肠、空胃、肝胰腺萎缩等症状。组织病理观察显示病虾鳃、肝胰腺以及心脏等多个组织中存在嗜酸性包涵体, 超微病理观察这些组织中都存在 DIV1 病毒粒子, 主要侵害宿主血细胞^[2]。目前针对 DIV1 已经建立了多种实验室检测方法。邹莹等^[10]以 DIV1 的 MCP 基因为靶序列, 建立了 DIV1 的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法, 可对 DIV1 进行临床快速检测; 邱亮^[9]针对 DIV1 的 ATPase 基因序列, 建立了 DIV1 套式 PCR 检测方法, 同时针对 DIV1 的 MCP 基因保守区域设计探针, 运用原位杂交技术定位 DIV1 在凡纳滨对虾体内的分布状况。

2022 年 10 月, 浙江舟山某养殖场养殖的梭子蟹发生暴发性死亡, 死亡率达 80%。发病蟹活力下降, 浮游于养殖塘边或沉入塘底; 病蟹头胸甲完好、体色无异常, 打开背甲发现鳃和心脏明显水肿, 推测可能是由病毒引起的暴发性死亡。本课题组利用分子生物学检测、组织病理和电镜超微病理观察及荧光原位杂交等方法对采集的患病三疣梭子蟹样本展开病原检测和组织病理学分析, 确定是由 DIV1 引发的三疣梭子蟹死亡。本研究报道的结果将为三疣梭子蟹十足目虹彩病毒病诊断与防控提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病三疣梭子蟹采集自浙江舟山某梭子蟹养殖场。患病蟹背甲直径 8~10 cm, 体重 150~200 g。采集的样本分别使用封口袋单独保存, 并通过冰盒低温运送到实验室。

主要试剂: 脑心浸液培养基(BHI)和 TCBS 琼脂培养基(TCBS)购于青岛高科园海博生物技术

有限公司; 总 RNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; 逆转录酶试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa 中国); 4%多聚甲醛、2.5%戊二醛、0.1 mol/L 磷酸缓冲液、1%锇酸溶液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 寄生虫检查与细菌分离

取采集回的样本蟹, 用 75%乙醇棉球对病蟹体表进行消毒, 打开背甲, 观察鳃、心脏及肝胰腺的形态变化, 取鳃、血淋巴液及肌肉等制备水浸片, 显微镜下观察; 在无菌条件下取病蟹的肝胰腺和心脏等组织, 研磨后分别划线接种于 BHI 固体培养基和 TCBS 培养基上, 置于 28 °C恒温培养 24~48 h, 观察细菌的生长情况。

1.3 蟹类病毒性病原 PCR 检测

按照 Omega 基因组 RNA/DNA 提取试剂盒说明书分别提取病蟹肝胰腺、鳃、心脏的 RNA 和 DNA, 对提取的病蟹组织总 RNA 进行反转录: 42 °C保温 60 min, 70 °C保温 5 min, 然后冰上冷却。按照《OIE 水生动物疾病诊断手册》(2022) 第 2.2.8 章第 4.3.1.2.4.1 节推荐的 PCR 方法合成检测白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引物, 并根据文献报道的 PCR 方法合成检测血卵涡鞭虫(Hematodinium)、青蟹双顺反子病毒(mud crab discistrovirus-1, MCDV-1)以及青蟹呼肠孤病毒(*Scylla serrata* reovirus, SSRV)引物^[11-14](表 1), 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以提取的患病蟹组织 DNA 以及反转录获得的 cDNA 为模板, 健康梭子蟹 DNA 及 cDNA 为阴性对照, 以本实验室保存的 4 种病原的阳性样品提取的 DNA 和 cDNA 为阳性对照的模板, 进行 PCR 扩增, 扩增的反应总体系为 25 μL: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL, *rTaq* DNA 聚合酶 0.25 μL, 模板 1 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.25 μL, 其余用去离子水补足, 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后, 观察有无目的基因条带。

表 1 蟹类病毒性病原检测所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences for detection of viral pathogens in crabs

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增片段/bp amplification fragment
WSSV-F1	ACTACTAACCTCAGCCTATCTAG	1447
WSSV-R1	TAATGCGGGTGTAAATGTTCTACGA	
WSSV-F2	GTAACTGCCCTCCATCTCCA	941
WSSV-R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	
H-F	CTGATTACGTCCCTGCCCTT	585
H-R	GCATGTCGCTCGTTCTTC	
MCDV-1F1	CTTGGTCAGTATCTTCCCTATGG	406
MCDV-1R1	CACGAAAAAGATTAAGAAGAAC	
MCDV-1F2	TGTATCCACTTCGCTTTTC	329
MCDV-1R2	ACTGGTGGTATTGTGTCTTG	
SSRV-F1	AAGCTGATATAGAATTGGCTA	119
SSRV-R1	TCGTTAGCGAGATCCGCAGGA	

1.4 组织病理学观察

光镜样品制备与观察: 取健康及患病濒死梭子蟹的肝胰腺、鳃、心脏和肌肉组织切成单边 3~4 mm 的小块, 加入 4% 多聚甲醛, 4 °C 下固定 24 h; 再经洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、烤片、HE 染色、封片等步骤最终制成组织石蜡切片, 在光学显微镜下对各个组织进行病理学观察、拍照。

电镜样品制备与观察: 取典型症状的濒死蟹的肝胰腺、鳃、心脏和肌肉组织, 单向切割成约 2 mm 的组织小块, 加入 2.5% 戊二醛固定液 (0.1 mol/L, pH7.4), 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% 银酸溶液固定, 再经过脱水、包埋、固化、切片和染色, 制备超薄电镜切片, 最后置于透射电子显微镜下观察、拍照。

1.5 DIV1 检测及 MCP 和 ATPase 基因序列测定及系统发育树的构建

按照 Omega 基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取病蟹肝胰腺、鳃、心脏的 DNA, 以提取的患病蟹组织 DNA 为模板进行 DIV1 的 PCR 检测。根据 SC/T 7237-2020 虾虹彩病毒病诊断规程合成检测用引物(表 2), 以内参 F/R 为引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 观察目的基因条带。根据诊断规程中套式 PCR 检测方法进行 DIV1 病原检测, PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 观察目的基因条带。

表 2 十足目虹彩病毒 1 PCR 检测所用引物序列

Tab. 2 Primer sequences for PCR detection of DIV1

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增片段/bp amplification fragment
内参 F	TGCCTTATCAGCTNTCGATTGTAG	848
内参 R	TTCAGNTTGCAACCATACTTCCC	
DIV1-F1	GGGCGGGAGATGGTAGAT	457
DIV1-R1	TCGTTCGGTACGAAGATGTA	
DIV1-F2	CGGGAAACGATTGTATTGGG	129
DIV1-R2	TTGCTTGATCGGCATCCTTGA	

根据 GenBank 中已发表 DIV1 的 MCP、ATPase 基因分别设计相应特异性引物(表 3), 以患病蟹组织 DNA 为模板进行 DIV1 的 MCP、ATPase 基因 ORF 区全长扩增。以 ATP-F/R 为引物, 反应总体积为 25 μL: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL, rTaq DNA 聚合酶 0.25 μL, 模板 1 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.25 μL, 其余用去离子水补足, 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 1 min 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min。以 MCP-F/R 为引物, 反应体系仍为 25 μL, 各组成体积与浓度不变, 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 1 min 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min。

表3 十足目虹彩1病毒MCP和ATPase基因序列扩增所用引物序列

Tab. 3 Primer sequences used for amplification of MCP and ATPase gene sequences of DIV1

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增片段/bp amplification fragment
ATP-F	GCAATGTAAATCGTCAACC	1232
ATP-R	AAACTAAAAGAGCGGGATTG	
MCP-F	CGTGATATGGTGTACTCTC	1570
MCP-R	CAGATGGGTCAATCTGAATG	

扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将 PCR 产物送至华大基因公司测序。运用 DNAMAN 软件对测序获取的基因序列进行排序、比对, 同时应用 NCBI 中 BLAST 软件对测得的基因序列进行同源性检索。从 GenBank 中下载同源性较高的 *MCP* 和 *ATPase* 基因序列与获得的基因序列测序结果进行比对分析; 使用 MEGA-X 软件, 应用 Kimura-2 法计算遗传距离, 采用 bootstrap (重复次数 1000) 检查聚类树各分支置信度, 运用邻接法(neighbour-joining)构建系统进化树。

1.6 原位杂交

根据原位杂交探针设计原则, 以 NCBI 数据库中 DIV1 的 *MCP* 和 *ATPase* 基因序列(登录号: KY681039.1 和 KY681040.1), 用 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对分析, 选取同源性高的片段, 各设计 5 条探针, *ATPase* 探针于 5'端标记 cy3, *MCP* 探针于 5'端标记 FAM, 探针序列如表 4 所示, 探

表4 原位杂交探针序列

Tab. 4 Probe sequence of in situ hybridization

探针序列 probe sequence
<i>ATPase</i> 探针 <i>ATPase</i> gene probe
Probe1: 5'-[cy3]+CGTATACACCGTTCTGAATGCGATC-3'
Probe2: 5'-[cy3]+GGACTTCCATCCCTGAAACATCATT-3'
Probe3: 5'-[cy3]+CCGTAGTCAATGTAATCGATTGGGAG-3'
Probe4: 5'-[cy3]+TACTGCGATAACTTCGGGATGATCA-3'
Probe5: 5'-[cy3]+TGTTGGGAATACCTTTGGAAAAA-3'
<i>MCP</i> 探针 <i>MCP</i> gene probe
Probe6: 5'-[FAM]+TTGGATTTGGATCAGAAGATCATC-3'
Probe7: 5'-[FAM]+CTGAGCTTGTCCACTTGACACCAC-3'
Probe8: 5'-[FAM]+GCTCTGTCCAGTTCTGAATTCGAA-3'
Probe9: 5'-[FAM]+TAGATTCAATCAACATGTCGCGGTG-3'
Probe10: 5'-[FAM]+GGGGTAAAGTTGAGCTTGGAAAGAAG-3'

针粉末 5000 r/min 离心 15 s, 加入杂交液配制成探针, 5 条探针等量混合使用。使用这两种探针分别对健康的三疣梭子蟹和感染十足目虹彩病毒 1 梭子蟹的心脏、鳃、肌肉、肝胰腺组织切片进行原位杂交实验。

将制备好的石蜡切片常规脱蜡水化, 切片于修复液中煮沸 5 min, 冷却后滴加蛋白酶 K (20 μL/mL) 37 °C 消化 15 min, 蒸馏水冲洗后, PBS 洗 5 min×3 次; 预杂交: 滴加适量预杂交液, 37 °C 孵育 1 h; 杂交: 倾去预杂交液, 滴加含 *MCP* 和 *ATPase* 基因探针的杂交液, 浓度 500 nmol/L, 40 °C 恒温过夜; 杂交后洗涤: 37 °C 条件下经梯度 SSC 洗涤 (2×SSC 洗涤 10 min, 1 次; 1×SSC 洗涤 5 min, 2 次; 0.5×SSC 洗涤 10 min, 1 次); 杂交 2: 轻轻甩干切片, 滴加已预热的探针混合物 2 杂交液(60 μL), 水平置于湿盒内 40 °C 杂交 45 min (湿盒底部加入 50 mL 2×SSC, 防止干片); 杂交后洗涤(同第 1 次杂交洗涤); 信号杂交: 轻轻甩干切片, 滴加已预热的信号探针杂交液(60 μL), 水平置于湿盒内 40 °C 杂交 45 min (湿盒底部加入 50 mL 2×SSC); 杂交后洗涤(同第 1 次杂交洗涤); 滴加 DAPI 染液避光孵育 8 min, 对标本进行染核, 冲洗后滴加抗荧光淬灭封片剂封片; 将切片置于荧光显微镜下观察、拍照(紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 发蓝光; FAM 绿光激发波长 465~495 nm, 发射波长 515~555 nm, 发绿光; cy3 红光激发波长 510~560 nm, 发射波长 590 nm, 发红光)。

2 结果与分析

2.1 临床症状与解剖观察

病蟹食欲下降, 行动迟缓, 患病后期于池边缓游或沉于塘底; 病蟹应激反应能力下降, 蟹爪无力, 体色无异常, 甲壳及附肢关节等外壳上未见异常变化; 打开背甲, 可见鳃水肿明显, 心脏水肿边缘呈半透明凝胶状, 弹性下降, 胃肠空, 肝胰腺未见异常, 甲壳腔内的血淋巴液凝聚性降低(图 1)。



图 1 病蟹鳃水肿
Fig. 1 Branchial edema of diseased crab

2.2 寄生虫检测和细菌培养结果

对采集回的样本蟹鳃、血淋巴液及肌肉等进行显微镜镜检，均未发现寄生虫。在无菌条件下，将 20 只病蟹肝胰腺和心脏等组织分别接种于 BHI 固体培养基和 TCBS，恒温培养 24 h 后，均未见优势致病菌生长。

2.3 蟹类病常见病原的 PCR 检测

以发病蟹样本的 DNA 及 cDNA 作为模板，采用 OIE 推荐和文献报道的 PCR 和 RT-PCR 检测方法，对发病梭子蟹进行常见病原 WSSV、血卵涡鞭虫、MCDV-1 及 SSRV 的检测，结果 4 种常见病原核酸检测均为阴性。

2.4 组织病理切片观察

对健康和患病三疣梭子蟹肝胰腺、鳃、心肌细胞组织样本分别进行组织病理切片和 HE 染色，显微镜下观察，与健康蟹样本相比，患病蟹的肝胰腺、心肌、鳃组织切片出现了明显的病理变化，在患病蟹的肝胰腺、鳃、心肌组织分布的血淋巴细胞均可见到嗜酸性包涵体(图 2)。

健康蟹的肝胰腺由众多分支状肝小管组成，形状规整，排列整齐，患病蟹肝小管形状大小不一，排列紊乱，部分肝小管肿大，管腔变窄，基底膜破损、缺失，柱状上皮细胞界限模糊不清晰，细胞核固缩，细胞空泡化变性，部分细胞坏死、崩解，从基底膜上脱落，形成一片无细胞结构的物质。

健康蟹的心肌纤维有明显横纹，分支状，相互连接，排列整齐，而病蟹心肌纤维间的结缔组织破损，肌束间隙增大，肌纤维排列混乱呈条索状，部分弯曲、断裂，出现大面积溶解坏死，心肌纤维细胞的细胞核固缩、崩解。

蟹的鳃为叶状鳃，基本结构由鳃轴和鳃叶组成，鳃叶内有众多鳃丝，鳃丝外层是坚固的角质层，其内为众多的鳃腔组成中央血腔，患病蟹的鳃丝肿大，角质层呈波状拱起，鳃腔间隙变窄，管腔内有大量渗出物，部分鳃小隔结缔组织破损、缺失。

2.5 超微病理观察

病蟹组织超薄切片电镜观察显示，病蟹的肝胰腺、鳃和心脏组织中均存在六边形病毒颗粒，直径大小约为 150 nm，病毒粒子主要存在于细胞质中，在细胞核内未观察到；感染细胞的细胞膜破裂、皱缩，细胞质严重空泡化并有大量病毒粒子分布其中，核崩解；部分感染细胞内可清晰地观察到具有衣壳和核心的成熟病毒粒子以及散落分布的六边形病毒粒子或空心衣壳；病毒粒子通过细胞膜内陷侵入邻近细胞，以出芽方式释放到细胞外(图 3)。

2.6 DIV1 检测及 MCP 和 ATPase 基因序列分析结果

以发病蟹组织提取的总 DNA 作为模板，采用引物 DIV1-F1/R1 和 DIV1-F2/R2 通过套式 PCR 方法进行 DIV1 检测，结果发现，从发病蟹 DNA 样本中可以扩增获得 457 bp 和 129 bp 左右的特异性条带，与预期大小相符，阴性对照样品无目的扩增条带(图 4)；以引物 MCP-F/R 和 ATP-F/R 分别扩增 MCP 和 ATPase 基因的 ORF 区全长，通过比对分析、剪切、拼接最终获得 1434 bp 和 1200 bp 的预期大小片段。在 GenBank 数据库中运用在线软件 BLAST 将获得的基因序列进行序列相似性检索，结果发现扩增序列与已发表的分离自凡纳滨对虾的虾血细胞虹彩病毒和红螯螯虾虹彩病毒的 MCP 和 ATPase 基因 ORF 区全长(KY681039.1 和 KY681040.1)的同源性最高，为 100%。从 GenBank 上查找虹彩病毒科其他病毒的 MCP 和 ATPase 序列，包括肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)病毒、蛙病毒属(*Ranavirus*)病毒、绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*)病毒、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)病毒、十足目虹彩病毒属病毒等，利用 MEGA 软件采用邻接法进行系统发

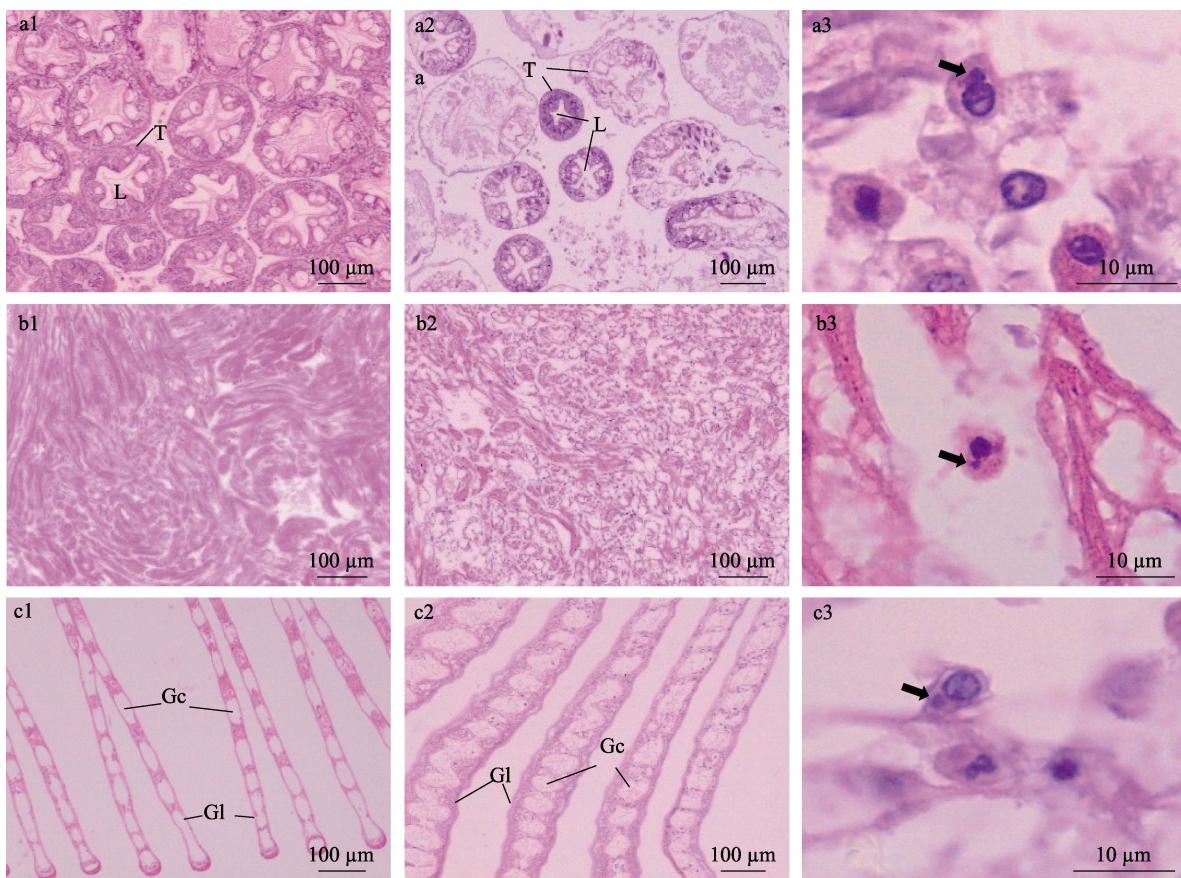


图2 三疣梭子蟹组织病理切片图

a1. 健康蟹肝小管; a2. 肝小管(T)排列紊乱, 管腔(L)变窄, 柱状上皮细胞坏死脱落; a3. 肝小管上皮细胞空泡变性、坏死, 肝胰腺内的血淋巴细胞可见嗜酸性包涵体(黑色箭头); b1. 健康蟹心肌纤维; b2. 心肌纤维排列混乱呈条索状; b3. 心肌纤维断裂、溶解, 心脏组织内的血淋巴细胞中可见嗜酸性包涵体(黑色箭头); c1. 健康蟹鳃丝(Gl); c2. 鳃丝(Gl)肿大, 鳃腔(Gc)间隙变窄, 管腔内有大量渗出物; c3. 鳃腔(Gc)内结缔组织细胞肿大、坏死脱落, 鳃腔(Gc)内的血淋巴细胞中可见嗜酸性包涵体(黑色箭头)。

Fig. 2 Pathological section of *Portunus trituberculatus* tissue

a1. Healthy crab hepatic tubules; a2. Disordered arrangement of hepatic tubules (T), narrowing of lumen (L), necrosis and shedding of columnar epithelial cells; a3. Vacuolar degeneration and necrosis of hepatic tubular epithelial cells (white arrow), eosinophilic inclusion bodies (black arrow) were observed in hemocytes in hepatopancreas; b1. Healthy crab heart muscle fibers; b2. Cardiac muscle fibers arranged in a chaotic cord-like; b3. Myocardial fiber rupture, dissolution, eosinophilic inclusion bodies (black arrow) can be seen in the blood lymphocytes in the heart tissue; c1. Healthy crab gill lamellae (Gl); c2. Swollen gill lamellae (Gl), narrowed gill cavity (Gc) space, and a large amount of exudates (white arrows) in the lumen; c3. The connective tissue cells in the gill cavity (Gc) were swollen, necrotic and detached, and eosinophilic inclusion bodies (black arrows) were seen in the hemocytes in the gill cavity (Gc).

育树构建, 结果显示从三疣梭子蟹中扩增获得的病毒 *MCP* 和 *ATPase* 序列与十足目虹彩病毒属病毒的 *MCP* 和 *ATPase* 序列自然聚为一支(图 5, 图 6)。

2.7 DIV1 在三疣梭子蟹各组织中的分布情况

荧光素 FAM 和 cy3 标记的探针与样本组织石蜡切片(图 7)上的病毒核酸经原位杂交后, 在荧光显微镜下观察, 其中与 FAM 标记 *MCP* 探针发生反应为绿色; 与荧光染料 cy3 标记 *ATPase* 探针发

生反应为红色; DAPI 染色的细胞核为蓝色, 粉紫色荧光为 3 种颜色荧光(绿色、红色、蓝色)混合显示结果, 根据绿色和红色两种阳性信号强弱以及分布的密度, 可判断组织中病毒含量的多少。结果表明, 在三疣梭子蟹的肝胰腺、心脏、肌肉和鳃组织细胞中均有绿色和红色阳性杂交信号, 且信号分布较一致, 其中在肝胰腺组织细胞中有疑似包涵体的强阳性信号聚集(图 8)。

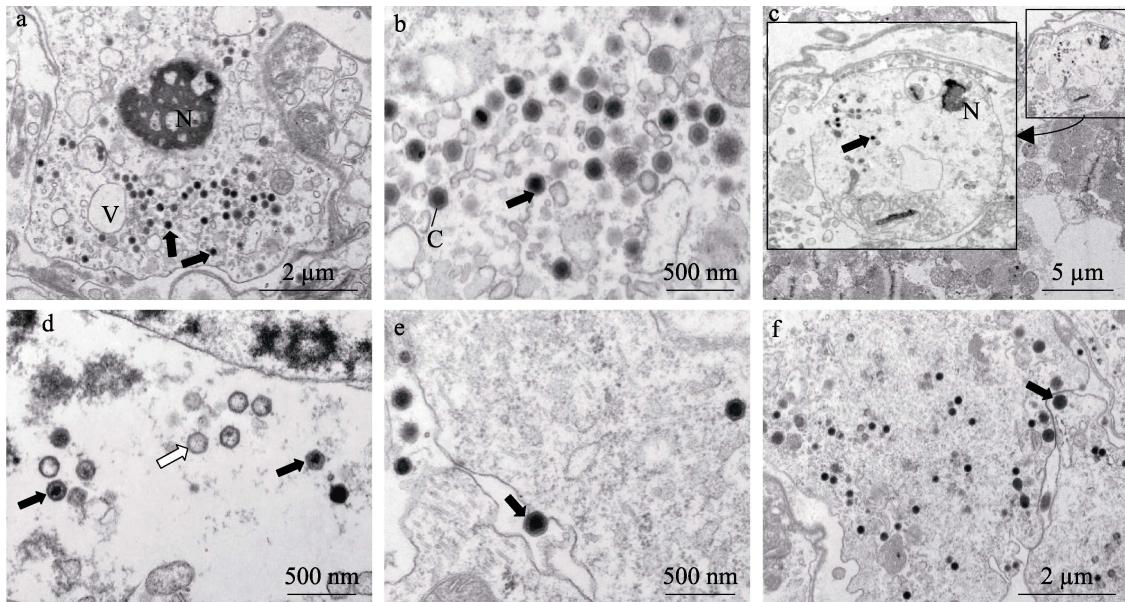


图3 患病三疣梭子蟹组织电镜图

a-b. 细胞核(N)崩解, 细胞质严重空泡化(V), 大量的病毒粒子(黑色箭头), 成熟病毒粒子的衣壳(C);
 c-d. 细胞核(N)固缩边缘化, 病毒粒子(黑色箭头)存在于细胞质中, 完整病毒粒子(黑色箭头)和空心衣壳(白色箭头);
 e-f. 肝胰腺, 从细胞膜上出芽释放的病毒粒子(黑色箭头), 病毒粒子通过细胞膜内陷侵入邻近细胞(黑色箭头).

Fig. 3 Electron microscope picture of diseased *Portunus trituberculatus* tissue

a-b. The nucleus (N) disintegrated, the cytoplasm was severely vacuolated (V), a large number of virus particles (black arrow), the capsid of mature virus particles (C); c-d. Nuclear (N) pyknosis marginalization, virus particles (black arrow) in the cytoplasm, complete virus particles and hollow capsid (white arrow); e-f. Hepatopancreas, virus particles released from cell membrane budding (black arrow), virus particles invade adjacent cells through cell membrane invagination (black arrow).

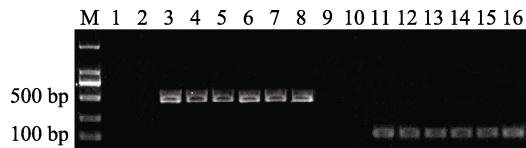


图4 患病蟹 DIV1 病原检测结果

M: DL2000 DNA maker; 1-8: DIV1 痘原第一轮 PCR 检测结果; 9-16: DIV1 痘原第二轮 PCR 检测结果; 1 和 9. 空白对照; 2 和 10. 阴性对照; 3 和 11. 阳性对照; 4-8 和 12-16. 痘蟹样品.

Fig. 4 The results of PCR detection of DIV1 pathogen in diseased crabs

M: DL2000 DNA maker; 1-8: the results of the first round of PCR detection of DIV1 pathogen in diseased crabs; 9-16: the second round of PCR detection results of DIV1 pathogen in diseased crabs. 1, 9: blank control; 2, 10: negative comparison; 3, 11: positive comparison; 4-8, 12-16: diseased crab sample.

3 讨论

DIV1 传染性和致死率都极高, 研究显示养殖的凡纳滨对虾和罗氏沼虾感染 DIV1 后的死亡率能达 80%以上^[15-17]。目前关于养殖蟹类自然感染

DIV1 死亡的案例报道较少, 但在实验室条件下, 通过不同感染方式可以使蟹类感染 DIV1 后发病死亡。潘长坤等^[18]对养殖中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和野生粗腿厚纹蟹(*Pachygrapsus crassipes*)两种螃蟹肌肉注射 DIV1, 并利用实时荧光定量 PCR 方法证实该病毒能够在两种试验蟹体内复制, 其中粗腿后纹蟹感染后死亡率达 46.7%。陈形^[19]以含 DIV1 的饵料投喂三疣梭子蟹, 试验蟹出现食欲减退, 反应迟钝等症状, 发病死亡率累计达 50%; 而以肌肉注射方式感染三疣梭子蟹, 试验蟹发病死亡率可达 100%。本研究中自然发病的三疣梭子蟹与先前报道的 DIV1 人工感染发病的三疣梭子蟹临床症状相似, 但本研究采集的自然发病蟹样本还出现鳃和心脏水肿的症状, 通过对发病蟹细菌分离培养与解剖镜检排除了细菌和寄生虫感染的可能。在病蟹样本的肝胰腺、鳃和心脏组织病理切片中观察到嗜酸性包涵体, 同时, 在这些组织的透射电镜超薄切片中观察到

的病毒粒子大小、形态等特征与邱亮^[9]在凡纳滨对虾体内观察到的 DIV1 类似, 病毒粒子直径 150 nm 左右, 形状为正六边形, 但未观察到呈现晶格排列的病毒粒子。根据 SC/T 7237-2020 DIV1 病诊断规程设计合成特异性引物, 利用套式 PCR 法对病蟹样本进行 DIV1 检测, 结果在病蟹组织中扩增出 457 bp 和 129 bp 左右的特异性条带, 从

而证实病蟹体内 DIV1 的存在, 初步判断 DIV1 是导致此次养殖三疣梭子蟹发病的病原。

虹彩病毒基因组学的研究表明, 虹彩病毒科 (Iridoviridae) 的 ATPase 和 MCP 基因在同属间都具有高度的保守性, 两种基因在虹彩病毒科不同属间又具有一定的差异性, 是研究虹彩病毒分类及系统演变的核心基因^[20-21]。严家彬等^[22]从患病美

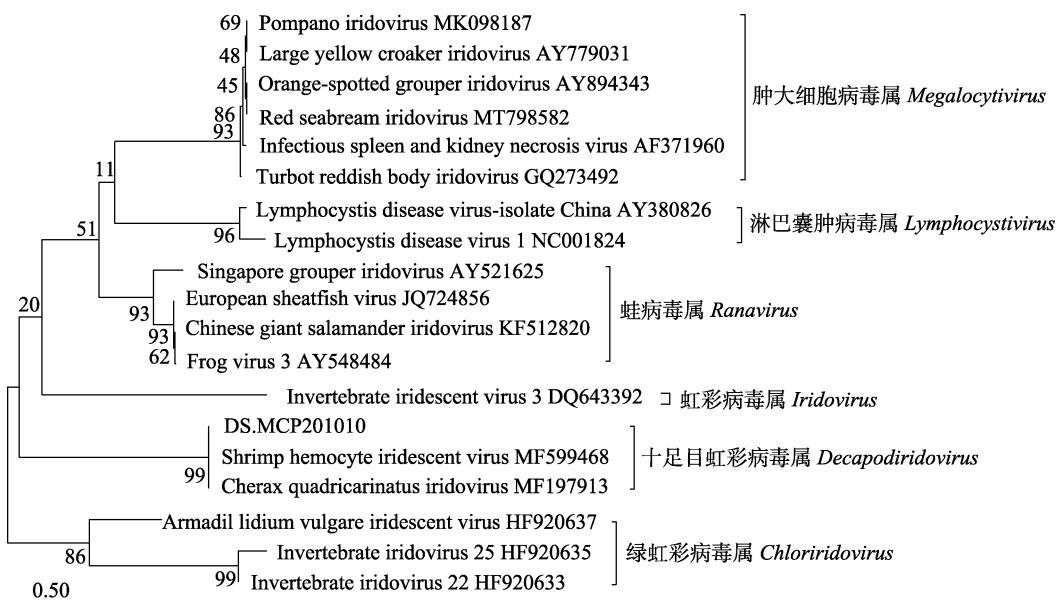


图 5 根据 DIV1 MCP 基因序列构建的系统进化树图
Fig. 5 Phylogenetic tree based on DIV1 MCP gene sequence

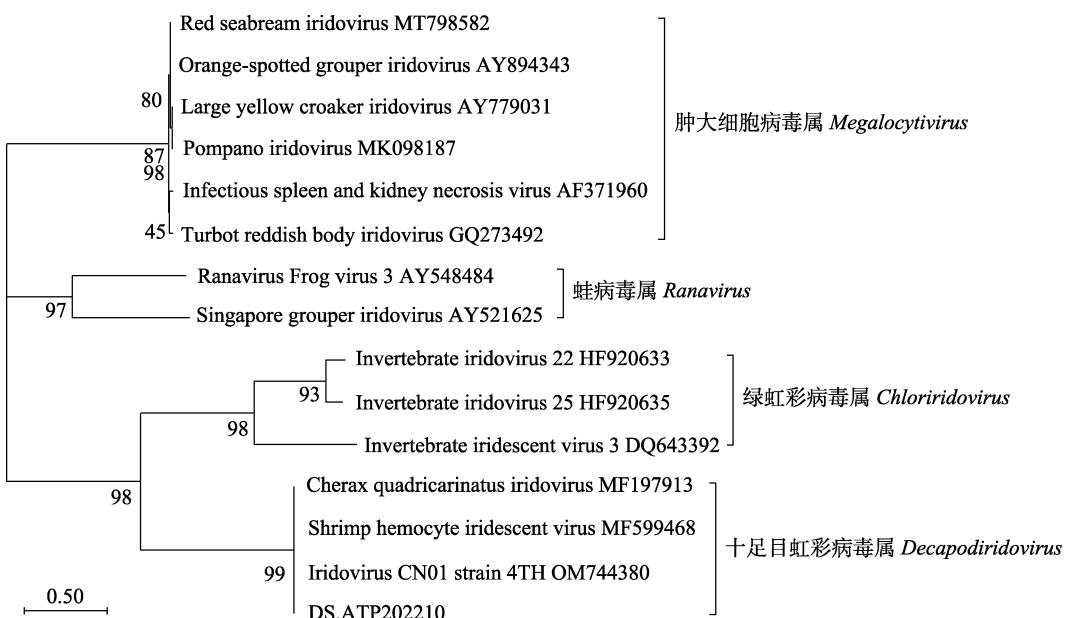


图 6 根据 DIV1 ATPase 基因序列构建的系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree based on DIV1 ATPase gene sequence

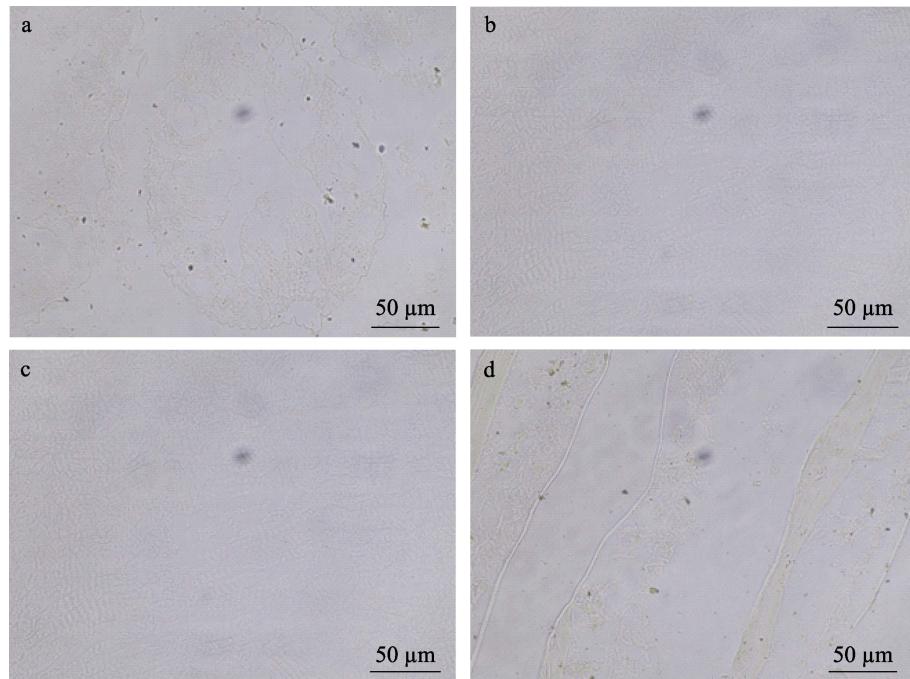


图7 患病三疣梭子蟹不同组织明视野显微图

a. 肝胰腺组织; b. 心脏组织; c. 肌肉组织; d. 鳃组织.

Fig. 7 Micrograph of different tissues of diseased *Portunus trituberculatus*
a. Hepatopancreas tissue; b. Heart tissue; c. Muscle tissue; d. Gill tissue.

国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)的脾脏组织DNA样本中扩增到一特异性条带,经进化树分析,该片段与多株鱼类的虹彩病毒 $ATPase$ 基因核心部分具有95.6%以上的同源性。杨展展等^[23]对一株分离自患病大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的病毒 MCP 、 $ATPase$ 基因进行序列比对分析,确定该毒株为一个高度保守的虹彩病毒科蛙病毒。本研究根据DIV1的 MCP 基因和 $ATPase$ 基因序列分别设计引物,从病蟹组织DNA中分别扩增出DIV1的 MCP 和 $ATPase$ 基因ORF区全长,通过序列同源性比对分析发现扩增序列与虾血细胞虹彩病毒和红螯螯虾虹彩病毒的 MCP 基因和 $ATPase$ 基因同源性达到100%,并且进化树分析结果显示扩增获得的 MCP 和 $ATPase$ 基因序列与Genbank中已登录的十足目虹彩病毒属聚为同一分支,证明造成此次养殖三疣梭子蟹暴发性死亡的毒株为十足目虹彩病毒属成员。

原位杂交技术可检测目标基因在组织细胞内显微或亚显微水平的时空表达情况,在水产养殖育种和疾病防控中应用日趋广泛^[24-26]。彭超等^[27]运用原位杂交技术对蛙病毒在鞍带石斑鱼(*Epine-*

phelus lanceolatus)不同组织中进行了定位分析,比较了病毒对组织的嗜性。吕晓楠等^[28]通过对患病镜鲤(*Cyprinus carpio var.specularis*)的不同组织进行荧光原位杂交,获得了鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV)在组织中的分布情况,证明了鳃是鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV)攻击的重要靶器官。本研究根据DIV1的 MCP 及 $ATPase$ 基因序列合成了探针,并分别以荧光素FAM和cy3进行标记,结果在病蟹肝胰腺、心脏、肌肉以及鳃组织的病理组织切片中均观察到明显的荧光杂交信号,且两种颜色的荧光信号分布基本一致,获得了DIV1在蟹组织中的分布情况,检测结果与电镜观察和套式PCR检测结果相符。

本研究首次从患病养殖三疣梭子蟹体内观察并检测到一株病毒,病毒形态大小与已报道的DIV1相似,且该病毒的 MCP 和 $ATPase$ 基因序列与DIV1的两种基因序列高度同源,初步判定DIV1为此次养殖三疣梭子蟹暴发性死亡症的病原,研究结果将为三疣梭子蟹感染DIV1的诊断与防控提供重要依据。当前因海水养殖转型升级的需求,三疣梭子蟹与凡纳滨对虾、日本对虾等

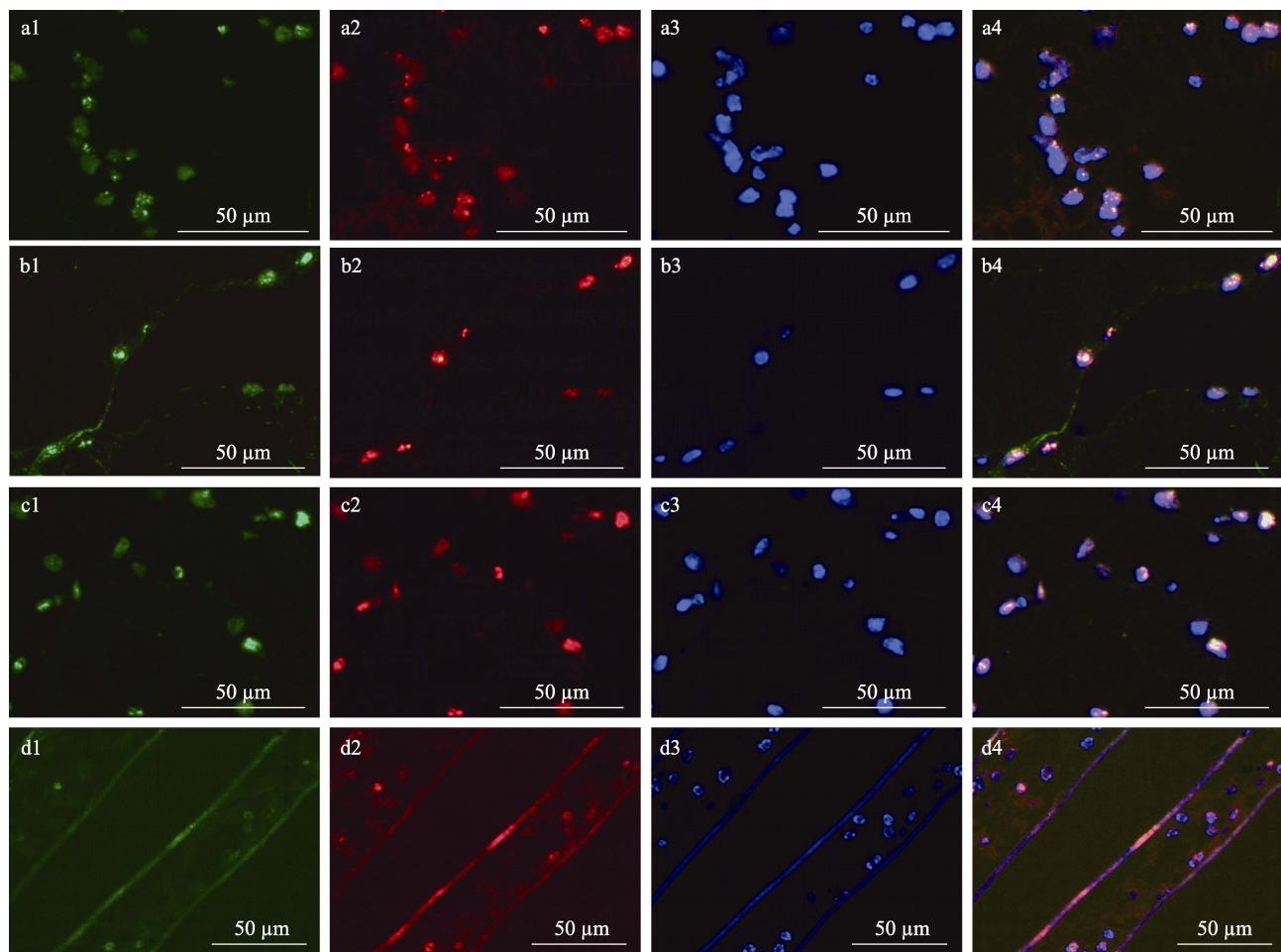


图8 患病三疣梭子蟹不同组织荧光原位杂交图

a1-a4. 肝胰腺组织原位杂交结果; b1-b4. 心脏组织原位杂交结果; c1-c4. 肌肉组织原位杂交结果;
d1-d4. 鳃组织原位杂交结果. 绿色荧光为 MCP 基因探针杂交信号; 红色荧光为 ATPase 基因探针杂交信号;
DAPI 染色细胞核呈蓝色; 粉紫色荧光为 3 种颜色荧光(绿色、红色、蓝色)共同定位混合结果.

Fig. 8 Fluorescence in situ hybridization of different tissues of diseased *Portunus trituberculatus*

a1-a4. The results of in situ hybridization of hepatopancreas; b1-b4. Heart tissue in situ hybridization results; c1-c4. Muscle tissue in situ hybridization results; d1-d4. In situ hybridization results of gill filament tissue. Green fluorescence was the hybridization signal of MCP gene probe; red fluorescence was the hybridization signal of ATPase gene probe; DAPI staining showed that the nucleus was blue; pink purple fluorescence is the result of co-localization of three kinds of color fluorescence (green, red, blue).

虾类进行混养的养殖模式得到大力推广, 但本研究结果为 DIV1 自然感染三疣梭子蟹提供了有力证据, 由于 DIV1 高致病性, 提示在虾蟹混养模式中需要格外关注该病毒的监测。

参考文献:

- [1] Cheng G B, Shi H L, Lou B, et al. Biological characteristics and artificial propagation, culture technique for *Portunus trituberculatus*[J]. Hebei Fisheries, 2012(4): 59-61. [程国宝, 史会来, 楼宝, 等. 三疣梭子蟹生物学特性及繁养殖现状[J]. 河北渔业, 2012(4): 59-61.]
- [2] Qiu L, Chen M M, Wan X Y, et al. Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus

(SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11834.

- [3] Qiu L, Chen M M, Wang R Y, et al. Complete genome sequence of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) isolated from white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Archives of Virology, 2018, 163(3): 781-785.
- [4] Lightner D V, Redman R M. A putative iridovirus from the penaeid shrimp *Protrachypene precipua burkenroad* (crustacea: Decapoda)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1993, 62(1): 107-109.
- [5] Xu L M, Wang T T, Li F, et al. Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 120(1): 17-26.

- [6] Wang W Y, Wang J G, Wang Y. Diagnosis of “white spot disease” on the head of *Macrobrachium rosenbergii* cultured in Shanghai suburban area[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2022, 49(5): 290-295. [王文雁, 王建刚, 王元. 上海地区养殖罗氏沼虾头部“白点病”的诊断[J]. 水产科技情报, 2022, 49(5): 290-295.]
- [7] Zeng J G, Guo Q, Shen Z H, et al. Investigation and analysis of the infection of shrimp hemocyte iridescent virus in *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2022, 63(8): 1871-1874. [曾建刚, 郭琦, 沈中华, 等. 虾血细胞虹彩病毒在青虾中的感染情况调查分析[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(8): 1871-1874.]
- [8] Chen X, Qiu L A, Wang H L, et al. Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the infection with shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV 20141215), a strain of decapod iridescent virus 1 (DIV1)[J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 387.
- [9] Qiu L. Viral metagenomics analysis of farmed shrimp and molecular epidemiological study of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018. [邱亮. 养殖对虾的病毒宏基因组分析及虾血细胞虹彩病毒(Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)的分子流行病学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.]
- [10] Zou Y, Guo X M, Wan X Y, et al. Establishment and application of the LAMP detection method for decapod iridescent virus 1(DIV1)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 156-164. [邹莹, 郭晓萌, 万晓媛, 等. 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 156-164.]
- [11] Lo C F, Ho C H, Peng S, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 27: 215-225.
- [12] Shi H, Xu W J, Xu H X, et al. Development of an ITS1 gene-targeted PCR-based diagnosis for *Portunus trituberculatus* parasite *Hematodinium* sp[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(1): 28-33. [施慧, 许文军, 徐汉祥, 等. 三疣梭子蟹感染血卵涡鞭虫 PCR 检测方法的建立[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(1): 28-33.]
- [13] Ou Y J. Detection method and molecular epidemiology of reovirus and bicistronic virus in *Scylla serrata*[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010. [区宇洁. 锯缘青蟹呼肠孤病毒与双顺反子病毒检测方法及分子流行病学研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.]
- [14] Xiao F. One-step reverse transcription PCR assay, host range and *Procambarus clarkii* experimental infection of *Scylla serrata* reovirus[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2012. [肖樊. 锯缘青蟹呼肠孤病毒 RT-PCR 检测方法、宿主范围及克氏原螯虾感染模型研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2012.]
- [15] Zheng Q, Yao G S, Wu X F, et al. Research progress in the crustaceoiridovirus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 36(5): 962-968. [郑秦, 姚光山, 吴小峰, 等. 甲壳动物虹彩病毒的研究进展[J]. 病毒学报, 2020, 36(5): 962-968.]
- [16] Xu H C, Xu S W, Wang W Q, et al. Investigation on major pathogens carried by shrimp seeds of *Penaeus vannamei* in Ningbo city of Zhejiang Province in 2020[J]. *China Animal Health Inspection*, 2021, 38(9): 29-32, 39. [许昊川, 徐胜威, 王雯琼, 等. 2020 年浙江省宁波市南美白对虾苗主要病原携带情况调查[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(9): 29-32, 39.]
- [17] Sun W F, Huang X S, Hu X J, et al. Detection and analysis of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), *Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND) and shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) from *Litopenaeus vannamei* in coastal areas of Guangdong Province[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(10): 2343-2349. [孙卫芳, 黄小帅, 胡晓娟, 等. 广东沿海地区凡纳滨对虾 EHP、VPAHPND 和 SHIV 感染情况调查与分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2343-2349.]
- [18] Pan C K, Yuan H F, Wang T T, et al. Study of Cherax quadricarinatus iridescent virus in two crabs[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2017, 36(1): 82-86. [潘长坤, 袁会芳, 王甜甜, 等. 红螯螯虾虹彩病毒在两种螃蟹内的研究[J]. 应用海洋学报, 2017, 36(1): 82-86.]
- [19] Chen X. Susceptible host survey of decapod iridescent virus 1(DIV1)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [陈形. 十足目虹彩病毒 1 (DIV1) 的易感宿主调查[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [20] Huang M, Feng Y. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of the major capsid protein of Chinese giant salamander iridovirus[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2017, 56(21): 4146-4150. [黄谧, 冯勇. 大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(21): 4146-4150.]
- [21] Zhang R, Zhang Q Y. Adenosine triphosphatase activity and cell growth promotion of *Andrias davidianus* ranavirus 96L-encoded protein(ADRV-96L)[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(5): 1090-1099. [张锐, 张奇亚. 大鲵蛙病毒编码 96L 蛋白(ADRV-96L)的腺苷三磷酸酶活性和促进细胞生长作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1090-1099.]
- [22] Yan J B, Li X H, Li K B, et al. ORF core sequence clone and analysis of ATPase gene in *Sciaenop ocellatus* iridovirus[J]. *Aquaculture of Science and technology of Guangxi*, 2003(1): 1-9. [严家彬, 李新辉, 李凯彬, 等. 美国红鱼虹彩病毒 ATP 酶基因 ORF 核心序列克隆与分析[J]. 广西水产科技, 2003(1): 1-9.]
- [23] Yang Z Z, Lin Q, Fu X Z, et al. Molecular epidemiology and histopathological analysis of largemouth bass ranavirus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(6): 1063-1073. [杨展展, 林强, 付小哲, 等. 大口黑鲈蛙病毒分子流行病学及组织病理分析[J]. 水产学报, 2022, 46(6): 1063-1073.]
- [24] Zhou N, Wang Y K, Hong K H, et al. Molecular cloning, expression profile and subcellular localization of nanos1 gene from *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(6): 52-59. [周南, 王亚坤, 洪坤浩,

- 等. 罗氏沼虾 nanos1 基因克隆、表达及亚细胞定位[J]. 南方水产科学, 2022, 18(6): 52-59.]
- [25] Liu B, Li H L, Han Y. Application of in situ hybridization technique in breeding and disease diagnose in aquatic animals[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2011, 24(2): 53-56, 62. [刘斌, 李海龙, 韩英. 原位杂交技术在水产动物育种与疾病诊断中的应用[J]. 水产学杂志, 2011, 24(2): 53-56, 62.]
- [26] Cai Y Y, Ren W C, Wang C M, et al. in situ hybridization and its application in the diagnosis of viral diseases in aquaculture animals[J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2010, 27(3): 71-73. [蔡玉勇, 任伟成, 王崇明, 等. 原位杂交技术及其在水产养殖动物病毒性疾病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(3): 71-73.]
- [27] Peng C, Ma H L, Guo Z X, et al. Tissue distribution of grouper iridovirus genus Ranavirus in infected farmed juvenile giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) [J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(3): 88-94. [彭超, 马红玲, 郭志勋, 等. 石斑鱼蛙病毒在鞍带石斑鱼中的组织分布[J]. 南方水产科学, 2015, 11(3): 88-94.]
- [28] Lyu X N, Xu L P, Zhang W, et al. Research on histopathological changes and virus distribution situation of mirror carps infected with carp edema virus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(3): 1077-1084. [吕晓楠, 徐立蒲, 张文, 等. 感染鲤浮肿病毒镜鲤的组织病理变化及病毒分布规律研究[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(3): 1077-1084.]

Detection and histopathological analysis of Decapoda iridescent virus 1 in cultured *Portunus trituberculatus*

ZHAO Danyang¹, SHI Hui², XU Wenjun², HE Jie², WANG Gengshen²

1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province; Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China

Abstract: In October 2022, an infectious disease outbreak was observed in farmed *Portunus trituberculatus* in Zhoushan, China. Samples of diseased crabs showing unspecific signs, such as anorexia, slow activity, and gill edema, were analyzed using parasitology, microbiology, histopathology, electron microscopy, and molecular identification. Parasitological and microbiological assays indicated that the diseased crabs were not infected with parasites or bacteria. The crab samples were tested by PCR methods recommended by World Organization for Animal Health and demonstrated to be free of Hematodinium, white spot syndrome virus (WSSV), mud crab discistrovirus-1 (MCDV-1), and *Scylla serrata* reovirus (SSRV). Histopathological examination revealed eosinophilic inclusions in hematopoietic tissue and hemocytes in gills, hepatopancreas, and the myocardial tissue of diseased crabs. Meanwhile, transmission electron microscopy showed that the virus in diseased crab tissues exhibited a typical icosahedral structure with a mean diameter of 150 nm, which was similar to the morphological characteristics of Decapoda iridescent virus 1 (DIV1). Nested PCR detection of DIV1 result showed that the first step of the PCR produced a 457 bp amplicon and the second step of the PCR produced a 129 bp amplicon. Phylogenetic analyses using gene sequences of major capsid protein (*MCP*) and *ATPase* revealed amplified sequences, DS.MCP201010 and DS.ATP202210 sequences, had the highest homology with the *MCP* gene and *ATPase* gene of DIV1, 100%. Therefore, it was determined that the pathogen of the disease was DIV1. In addition, specific probes directed to the *MCP* and *ATPase* gene of DIV1 were designed to obtain the distribution of virus particles in the hepatopancreas, heart, muscles, and gills of diseased crabs by fluorescence in situ hybridization, which was consistent with the results of electron microscopy and nested PCR. This study presents the first report of DIV1 infection in cultured *Portunus trituberculatus*, which will provide a strong reference for the prevention and control of the disease.

Key words: *Portunus trituberculatus*; Decapoda iridescent virus 1, DIV1; histopathology; *in situ* hybridization

Corresponding author: SHI Hui. E-mail: huishi2002@126.com