

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14473

一株似鲇高原鳅源蛙病毒的分离与鉴定

范玉蕾, 耿毅, 周燕, 邓梦玲, 余泽辉, 汪开毓, 黄小丽, 陈德芳, 张雨薇

四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014

摘要: 从四川乐山某养殖场自然发病的似鲇高原鳅(*Triplophysa siluroides*)体内分离到一株病毒 FYL140220。病毒感染鲤上皮瘤细胞系(epithelima popuasum cuprini, EPC)后, 细胞呈现圆缩、坏死、脱落、明显空斑的病变特征。将自然发病鱼组织过滤除菌液和细胞培养病毒液分别接种健康似鲇高原鳅, 试验鱼出现与自然发病鱼相同的症状, 死亡率分别为 30%和 40%, 而对照组无异常。对经 FYL140220 感染出现典型细胞病变(CPE)的 EPC 细胞制备超薄切片进行电镜观察, 发现病毒呈正六边形, 对称 20 面体, 对角线直径约(103±7) nm; 提取细胞培养病毒液、自然发病鱼和人工感染发病鱼的脏器器官总 DNA 进行蛙病毒主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因保守区域的 PCR 扩增, 均能扩增出预期大小约 500 bp 的特异性条带。MCP 基因同源性与遗传进化分析表明, 分离株 FYL140220 与蛙病毒属成员聚为一支, 尤其与大鲵蛙病毒与沼泽绿蛙病毒同源性最高, 分别达 99.8%和 99.6%。结合 PCR 检测、电镜观察和系统发育分析, 确认分离病毒 FYL140220 为蛙病毒, 这是首次报道蛙病毒可自然感染似鲇高原鳅并致死。

关键词: 虹彩病毒; 蛙病毒; 似鲇高原鳅; 分离; 鉴定; 系统发育分析

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)03-0556-07

蛙病毒(*Ranavirus*)属于虹彩病毒科(Iridoviridae), 是一类感染鱼类、两栖类和爬行类的 DNA 病毒。自 20 世纪 60 年代, Allan Granoff 等首次从患病蛙肾中发现并分离蛙病毒以来, 蛙病毒已被证实是严重危害冷血动物, 尤其是两栖动物和鱼类的重要病原, 其感染具有发病率与死亡率高的特点, 故又被称为“冷血动物杀手”。目前在亚洲、澳洲、欧洲和北美等地区先后在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[1]、河鲈(*Perca fluviatilis*)^[1]、林蛙(*Rana temporaria*)^[2]、沼泽绿蛙(*Rana grylio*)^[3-4]、虎皮蝾螈(*Ambystoma tigrinum stebbinsi*)^[5]、中华鳖(*Trionyx sinensis*)^[6]、虎纹蛙(*Rana rugulosa Wiegmann*)^[7]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[8]、大鲵(*Andrias davidianus*)^[9-10]、蜥蜴(*Andrias davidianus*)^[10]、锦鲤(*Cyprinus carpio*)^[11]和大鳄龟(*Macrochelys tem-*

temminckii)^[12]中发现蛙病毒感染并引起大量死亡的报道。蛙病毒感染对鱼类、两栖类以及爬行类的危害已受到人们的高度关注, 相继在蛙病毒的病原特性、感染机制、致病机理和免疫防治等方面开展了研究。鉴于蛙病毒感染的严重危害性, 其已被世界动物卫生组织(OIE)列入法定报告的疾病名单。

似鲇高原鳅(*Triplophysa siluroides*)属鲤形目(Cypriniformes)、鳅科(Cobitidae)、条鳅亚科(Cobitidae)、高原鳅属(*Triplophysa*)鱼类, 俗称老虎鱼, 主要分布于黄河上游的干支流及其附属湖泊中。似鲇高原鳅已作为易危(vulnerable, VU)物种被世界自然保护联盟(IUCNNR)编入《中国濒危动物·鱼类卷》^[13]。出于保护、开发和利用的目的, 近年我国突破了似鲇高原鳅人工繁育技术, 其作

收稿日期: 2014-11-16; 修订日期: 2014-12-16.

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0027).

作者简介: 范玉蕾(1990-), 女, 研究生, 研究方向水生动物疾病学. E-mail: 449587713@qq.com

通信作者: 耿毅(1974-), 共同第一作者, 教授, 主要从事水生动物疾病学的教学与研究工作. E-mail: gengyisicau@126.com

为一种地方特色品种逐步开始进行集约化养殖,养殖规模的扩大化在恢复种质资源、产生经济效益的同时,也加速了疾病的暴发。目前,对于似鲇高原鳅的疾病已有温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)^[14]和寄生虫的报道,但病毒感染致病却未见报道。2014年2—3月,四川乐山某养殖场似鲇高原鳅出现以体表褪色、皮肤溃烂为特征的疾病,死亡率约为35%,曾使用多种抗菌药物治疗均无效,给养殖户造成较为严重的损失。为明确病因,本研究用鲤上皮瘤细胞系(epithelima popuasum cuprini, EPC)从自然发病的似鲇高原鳅体内分离到一株病毒 FYL140220,人工感染证实其为该病的病原,PCR检测、电子显微镜观察和主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因同源性与遗传进化分析表明分离株 FYL140220 为蛙病毒属(*Ranavirus*)成员。

1 材料与方法

1.1 材料

患病似鲇高原鳅体重100~150 g,由四川乐山某养殖场送检;健康似鲇高原鳅购自四川汉源某养殖场,体重(120.5±6.7) g。鲤上皮瘤细胞系(EPC)由珠江水产研究所惠赠。M199 营养液和胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司, DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司, Mix-reaction buffer、PCR 产物纯化试剂盒、DNA Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 病毒分离与培养

1.2.1 组织过滤除菌液的制备 无菌条件下取病鱼肝、脾、肾组织,剪碎后加灭菌 PBS 按 1:5 的体积比例匀浆成悬液,反复冻融 3 次,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,−20℃ 保存备用。

1.2.2 细胞接毒培养 EPC 细胞传代后,待细胞单层铺满瓶底,用灭菌 PBS 轻洗细胞表面。将组织过滤除菌液用含 2% FBS 的 M199 营养液进行梯度稀释 10 倍、100 倍,吸取 2 mL 加入到单层 EPC 细胞培养瓶中,孵育 1 h 后,吸弃组织过滤除菌液,加入含 2% FBS 的 M199 营养液 5 mL,

接种的 EPC 细胞置于 27℃ CO₂ 生化培养箱中继续培养,同时,设正常细胞为对照组,每天观察细胞生长情况。每代连续观察 15 d,如无病变继续传代。

取出现 CPE 的 EPC 细胞,反复冻融 3 次,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液即细胞培养病毒液,按 Reed 等的方法^[15]计算病毒的 TCID₅₀。

1.3 人工感染试验

根据柯赫氏法则(Koch's Rule),将健康的似鲇高原鳅在水温(19.0±1.5)℃ 的实验室中暂养 7 d 后,进行人工感染实验。实验鱼分为 3 组,每组 10 尾。试验 A 组腹腔注射 0.2 mL/尾细胞培养病毒液;试验 B 组腹腔注射 0.2 mL/尾组织过滤除菌液;对照组腹腔注射等量的灭菌生理盐水,逐日观察。

1.4 电子显微镜观察

细胞出现 CPE 后,将细胞瓶内的营养液弃去,用灭菌 PBS 清洗细胞。25 mL/L 戊二醛 4℃ 固定 2 h,用橡皮刮将贴壁细胞刮下,3 000 r/min 离心 3 min。将细胞沉淀悬浮于 2% 低熔点琼脂糖后于 37℃ 以 5 000 r/min 保温离心 10 min。待琼脂糖凝固后,将包埋于琼脂糖中的细胞沉淀部分切成 1 mm × 1 mm × 1.5 mm 的小块。按常规方法进行 1% 锇酸固定、乙醇脱水、环氧树脂包埋,超薄切片透射电镜观察。

1.5 MCP 基因扩增和序列分析

虹彩病毒 MCP 基因既具有高度的保守性,又具有足够的差异性,是进行虹彩病毒鉴定和进化分析的良好分子标记^[7]。参考 Geng 等^[9]的方法,设计并合成用于鉴定蛙病毒的特异性 PCR 引物。上游引物: 5'-GAC TTG GCC ACT TAT GAC-3'; 下游引物: 5'-GTC TCT GGA GAA GAA GAA-3',该引物由上海生工生物工程有限公司合成。

取有明显临床症状的自然发病鱼、人工感染发病鱼内脏组织和细胞培养病毒液提取组织总 DNA,将其作为模板进行 PCR 检测。PCR 扩增总反应体系为 25 μL: Mix-reaction buffer 12.5 μL,上下游引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 9.5 μL dd H₂O。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃

变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。取 5 μ L 扩增产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察 PCR 扩增结果。

将 PCR 扩增产物纯化后送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行序列测定。测序后, 采用 NCBI-BLAST 软件在 GenBank 中的核酸数据库中查找该序列的相似序列。将获得的所有序列采用 DNASTar 分析软件进行多序列比对分析, 并用 MEGA 软件建立系统发育树。

2 结果与分析

2.1 自然发病症状

2014 年 2—3 月, 四川乐山某养殖场似鲃高原鳅(体重 100~180 g)出现以体表褪色、皮肤溃烂为特征的疾病。患病似鲃高原鳅症状最初表现为病鱼摄食减少, 畏光性增强, 体色变浅, 游动缓慢, 身体浮于水中失去平衡, 随病程发展病鱼食欲废绝, 在背部和腹部局部明显褪色、出血灶, 最终形成溃疡(图 1), 并陆续发生死亡, 累计死亡率达 35% 左右。

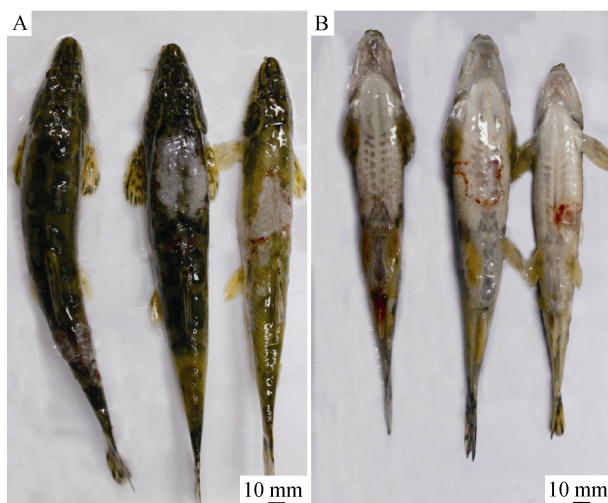


图 1 患病似鲃高原鳅病症

A. 背部褪色、溃烂; B. 腹部溃疡、出血。

Fig.1 Clinical signs of moribund fish

A. Discoloration and ulceration on the backside; B. Bleeding and ulceration in the abdomen.

2.2 病毒分离

首次接种, 取自然发病鱼组织过滤除菌液接

种 EPC 细胞, 15 d 内未出现 CPE。将接种后的细胞反复冻融 3 次, 离心取上清再次接种 EPC 细胞。第 3 次接种约 24 h 后, 在个别位置出现细胞变圆、细胞单层逐渐收缩、折光度增加、少量细胞脱落的现象(图 2A); 约 72 h 后, 单层细胞出现空斑、大面积的收缩呈渔网状, 培养液中细胞漂浮增多(图 2B); 5 d 后小空斑逐渐变大, 90% 以上细胞单层网状破裂(图 2C); 对照组细胞生长正常(图 2D)。分离的病毒能在 EPC 细胞中稳定增殖, 经测定其病毒滴度为 $10^{3.58}$ TCID₅₀/mL。

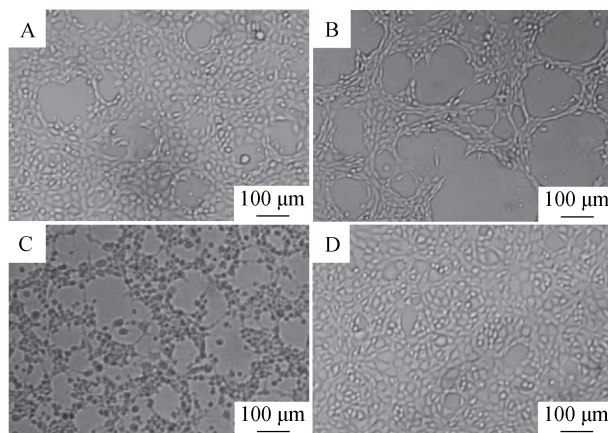


图 2 从自然发病的似鲃高原鳅体内分离的病毒株 FYL140220 感染 EPC 细胞的细胞病变

A. 24 h 后, 出现少量小空斑; B. 72 h 后, 细胞小空斑增多, 变大; C. 5 d 后, 细胞单层网状破裂, 细胞脱落、漂浮; D. 对照组细胞形态正常。

Fig. 2 The cytopathic effect(CPE) of the EPC cell monolayers infected by virus strain FYL140220 from diseased *Triplophysa siluorides*

A. Few small plaques were observed in EPC after inoculation for 24 h; B. After inoculation for 72 h, more round cells aggregated and heaped at the edge of the plaques and the size of plaques were enlarged; C. After inoculation for 5 days, the monolayer cells desquamated, forming a network-like monolayer; D. Uninfected control EPC cells remained normal.

2.3 人工感染发病症状

人工感染似鲃高原鳅 5 d 后出现症状, 主要表现为游动缓慢, 食欲减弱, 背腹部出现白色溃疡, 身体明显褪色, 与自然发病鱼临床表现相似, 感染后第 8 天开始出现死亡。感染 14 d 后, 试验 A 组死亡 4 尾, 试验 B 组死亡 3 尾, 其死亡率分别为 40% 与 30%。对照组无异常表现, 全部存活。

2.4 电子显微镜观察结果

将出现典型 CPE 的 EPC 细胞进行超薄电镜切片观察，其中可见处于不同时期的病毒粒子。胞浆内聚集大量病毒粒子呈晶格排列形成包

涵体(图 3A)；在胞浆中组装完备的病毒粒子，以出芽的方式释放到细胞间质中(图 3B)；病毒的复制和释放导致细胞质严重空泡化，核仁固缩断裂成数个大小不等的凋亡小体(图 3C)。

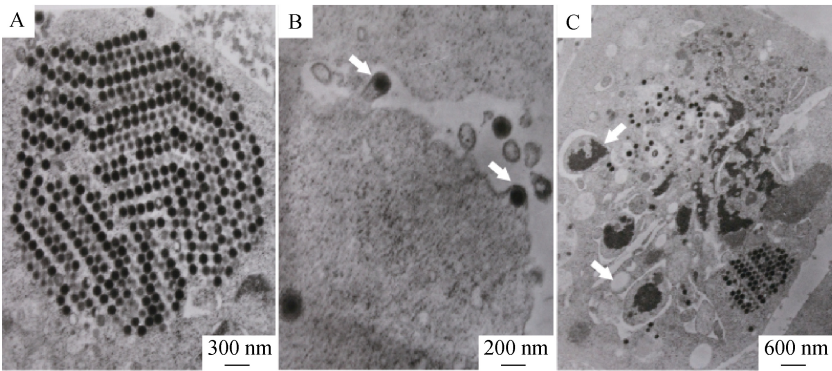


图 3 FYL140220 感染 EPC 细胞后电子显微镜下病毒形态与细胞病变

A. 病毒粒子晶格排列形成包涵体; B. 病毒颗粒出芽释放; C. 细胞质严重空泡化，细胞凋亡形成凋亡小体.
Fig. 3 The viral morphology and EPC pathologic lesion under electron micrographs after FYL140220 infected EPC
A. The regularly crystalline-arranged viral particles formed a inclusion body; B. Viral particles(arrows) released by budding from cellular membrane protrusions; C. The virion and the apoptosis body spread in the cytoplasm which was full of vacuolation.

2.5 MCP 基因扩增和序列分析结果

针对蛙病毒 MCP 基因的 PCR 扩增产物，经 1%琼脂糖凝胶电泳，发现自然发病鱼、人工感染发病鱼和细胞培养病毒液总 DNA 中均特异性扩增出预期大小约为 500 bp 的条带(图 4)。

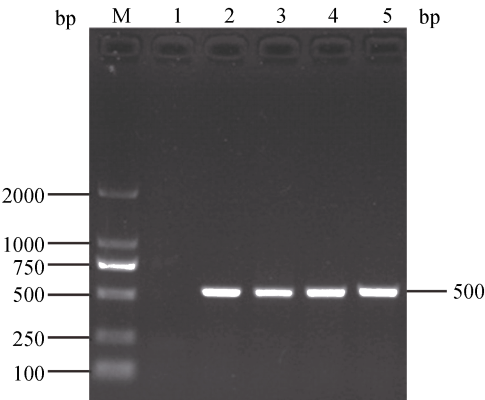


图 4 蛙病毒 MCP 基因的 PCR 扩增产物电泳图

M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 分离病毒 FYL140220; 3: 自然发病鱼; 4: 人工感染试验 A 组发病鱼; 5: 人工感染试验 B 组发病鱼.

Fig. 4 The electrophoresis of PCR-product of ranavirus MCP gene
M: DL 2000 DNA marker; 1: Negative control; 2: Isolated virus FYL140220; 3: The natural infected fish; 4: The artificial infection group A; 5: The artificial infection group B.

将分离病毒 MCP 基因 PCR 扩增产物纯化回收后，经上海生工生物工程有限公司测序，将测序结果提交到 NCBI 获得 GenBank 登录号 KM577620。将分离病毒 MCP 基因序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 对比，结果显示分离病毒与 GenBank 上虹彩病毒科蛙病毒属的 MCP 基因序列的同源性最高。在基于本研究分离病毒 MCP 基因序列及 GenBank 中其他虹彩病毒科病毒 MCP 基因序列构建的系统发育树上(图 5)，蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属和肿大细胞病毒属各占一支，分离病毒与蛙病毒属 CGSV-G、CGSV-ADIV2010001 和 RGV 聚为一支，同源性达 99.6% 以上。由此表明，分离病毒 FYL120220 属于蛙病毒。

3 讨论

在中国，自 1995 年，张奇亚等^[4]从患有传染性溃疡综合症的沼泽绿牛蛙(*Rana grylio*)中首次分离到蛙病毒 RGV9506 以来，蛙病毒已逐渐成为危害我国水生动物的重要病原之一，已有蛙病毒感染中华鳖^[6]、虎纹蛙^[7]、石斑鱼(*Epinephelus*

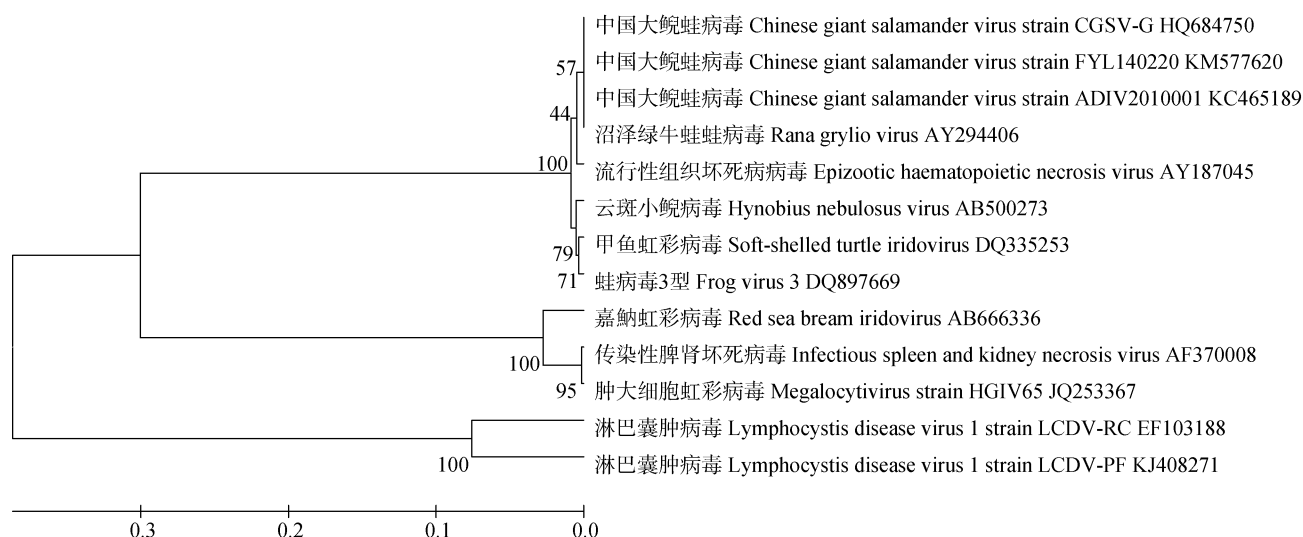


图 5 基于 *MCP* 基因序列构建的 FYL140220 系统发育树

分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度百分比, 标尺长度表明每个位点发生 0.1 次置换。

Fig.5 The FYL140220 phylogenetic tree based on the *MCP* gene sequences

The values at the node indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data(1000 replicates). The scale bar shows the number of substitutions per site.

coioides)^[16]、大鲵^[9]和大鳄龟^[12]等引起大规模死亡的报道。随着蛙病毒宿主范围的不断扩大, 蛙病毒对水生动物的威胁越加受到人们的关注。本研究经病毒分离、人工感染试验、电镜观察、PCR 检测和 *MCP* 基因同源性与遗传发育分析, 从自然感染发病的似鲃高原鳅体内分离并鉴定出病原为虹彩病毒科蛙病毒属成员, 表明蛙病毒在自然情况下也能感染似鲃高原鳅。似鲃高原鳅作为鳅科鱼类中体型最大的一种, 曾遭遇过度捕捞濒临灭绝。近年来, 随着人工繁育的成功, 似鲃高原鳅作为一种新兴的名特优水产养殖种类在青海、四川、甘肃等地快速发展, 并逐渐形成具有地方优势特色的产业。然而对似鲃高原鳅疾病的研究却远远落后于对其生物学特性的研究, 本研究报道蛙病毒可感染养殖似鲃高原鳅并引起死亡, 因此, 在似鲃高原鳅的养殖中应重视蛙病毒对其造成的危害, 并加强蛙病毒发病机制与防治技术的研究, 以更好地保护与利用似鲃高原鳅这个地方特色品种。

蛙病毒在自然界中广泛存在, 感染后均可引起动物体表损伤、皮肤褪色、出血和溃疡^[10]。除此之外, 蛙病毒感染引起的临床症状不尽相同,

如体表黏液分泌增多、全身性出血、四肢肿胀、内脏损伤、皮肤穿孔等。本实验分离到的蛙病毒来自于体表溃疡的似鲃高原鳅, 具黏液分泌增多、背腹部溃疡出血等症状。其外部临床病变特点与蛙病毒感染大鲵^[9]和大鳄龟^[12]基本一致, 均有皮肤出血和溃疡症状; 大鲵和大鳄龟蛙病毒感染解剖可见, 肝、脾、肾出现肿大、出血现象, 但似鲃高原鳅内脏眼观病变不明显, 究其出现这种差异是因宿主的种属特异性, 还是病毒毒力差异还需要进一步的研究。在本研究中基于蛙病毒 *MCP* 基因的遗传进化分析表明, 似鲃高原鳅源蛙病毒(FYL140220)与我国两栖动物大鲵^[17]和沼泽绿牛蛙^[3]蛙病毒的同源性最高, 而与其他鱼类源的蛙病毒同源性相对较低, 因此, 对于似鲃高原鳅源蛙病毒的来源还有待进一步的研究, 分析它与其他蛙病毒的遗传进化关系, 为阐明蛙病毒在不同物种间的传播及其遗传变异提供资料。

研究表明, 虹彩病毒对宿主细胞造成损伤主要是通过以下两种方式: 一是引起宿主细胞免疫应答异常导致细胞损伤; 二是从宿主细胞中出芽释放导致细胞破裂或直接裂解细胞^[18-19]。这两种途径均能导致病毒靶器官受到破坏, 失去正常的

免疫功能, 病毒得以大量复制并扩散至全身, 最终导致宿主死亡。结合本研究在电镜下观察出现典型 CPE 的 EPC 细胞超薄切片, 在胞浆中观察到核仁裂解形成凋亡小体导致细胞凋亡, 同时观察到成熟的病毒粒子出芽释放导致细胞破裂。这进一步佐证了前人有关蛙病毒致病机制的观点, 但对于该病毒诱导细胞凋亡的机制, 以及其是否会诱导免疫细胞凋亡, 从而导致感染动物免疫功能抑制, 都需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Reddacliff L, Whittington R. Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus(EHNV) infection in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.)[J]. J Comp Pathol, 1996, 115(2): 103–115.
- [2] Cunningham A, Langton T, Bennett P, et al. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog(*Rana temporaria*)[J]. Philos Trans: Biol Sci, 1996, 351(1347): 1539–1557.
- [3] Zhang Q Y, Zhao Z, Xiao F, et al. Molecular characterization of three *Rana grylio* virus(RGV) isolates and *Paralichthys olivaceus* lymphocystis disease virus(LCDV-C) in iridoviruses[J]. Aquaculture, 2006, 251(1): 1–10.
- [4] Zhang Q Y, Li Z Q, Jiang Y L, et al. Preliminary studies on virus isolation and cell infection from diseased frog *Rana grylio*[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1996, 20(4): 390–392.[张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 390–392.]
- [5] Jancovich J D E, Elizabeth W. Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*[J]. Dis Aquat Organ, 1997, 31: 161–167.
- [6] Chen Z X, Zheng J C, Jiang Y L. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle[J]. Virus Res, 1999, 63(1): 147–151.
- [7] Miao S Y, He J G. Cloning, sequence analysis of the major capsid protein gene of newly isolated iridovirus from *Rana tigrina*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(6): 559–563. [苗素英, 何建国. 虎纹蛙病毒主要衣壳蛋白基因的克隆及其序列[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 559–563.]
- [8] Deng G C, Xie J, Li S J, et al. Isolation and preliminary identification of the pathogen from largemouth bass ulcerative syndrome[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 871–877. [邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871–877.]
- [9] Geng Y, Wang K, Zhou Z, et al. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed chinese giant salamanders(*Andrias davidianus*)[J]. J Comp Pathol, 2011, 145(1): 95–102.
- [10] Stöhr A C, Blahak S, Heckers K O, et al. Ranavirus infections associated with skin lesions in lizards[J]. Vet Res, 2013, 44(1): 1–10.
- [11] George M R, John K R, Mansoor M M, et al. Isolation and characterization of ranavirus from koi, *Cypriotes scorpio* L., experiencing mass mortalities in India[J]. Fish Dis, 2014, doi: 10.1111/jfd.12246.
- [12] 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. [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.]
- [13] Le P Q, Chen Y Y. China Red Data Book of Endangered Animals: Fish[M]. Beijing: Science Press, 1998. [乐佩琦, 陈宜瑜, 中国濒危动物红皮书: 鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 1998.]
- [14] Xu J J, Geng Y, Wang K Y, et al. isolation, identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* from *Triplophysa siluroides*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2014, 33(5): 708–714. [徐敬钧, 耿毅, 汪开毓, 等. 似鲈高原鳅温和气单胞菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. 四川动物, 2014, 33(5): 708–714.]
- [15] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. Am J Epidemiol, 1938, 27(3): 493–497.
- [16] Teng Y, Hou Z, 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]. Virology, 2008, 377(1): 39–48.
- [17] Chen Z, Gui J, Gao X, et al. Genome architecture changes and major gene variations of *Andrias davidianus* ranavirus(ADRV)[J]. Vet Res, 2013, 44(1): 101.
- [18] Do J W, Cha S J, Kim J S, et al. Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 64(3): 193–200.
- [19] Wu C L, Kong X Y, Shi C Y. Progress on *Megalocytivirus* Iridoviral disease of fish[J]. Prog Vet Med, 2007, 28(3): 70–74. [吴成龙, 孔晓瑜, 史成银, 鱼类细胞肿大虹彩病毒病研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(3): 70–74.]

Isolation and identification of a ranavirus from *Triplophysa siluroides*

FAN Yulei, GENG Yi, ZHOU Yan, DENG Mengling, YU Zehui, WANG Kaiyu, HUANG Xiaoli, CHEN Defang, ZHANG Yuwei

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: A virus named FYL140220 was isolated from naturally infected *Triplophysa siluroides* in Leshan, Sichuan Province using epithelima popuatum cuprini (EPC) cells. The infected EPC cells showed circular shrinkage, necrosis, and desquamation, which formed significant plaque-lesion characteristics. Diseased tissue suspension filtered from bacteria and EPC-grown virus were used to inoculate healthy *Triplophysa siluroides*. As a result, the infected *T. siluroides* developed similar clinical symptom to those described above and suffered 30% and 40% mortality, whereas the uninfected control EPC cells remained normal. Electron microscopy revealed icosahedral viral particles in the cells. The FYL140220 virus had an average diameter of (103 ± 7) nm, and the hexagonal shape was highly similar to that of other Iridoviridae viruses. DNA was extracted from the EPC-grown virus and naturally and artificially infected internal *T. siluroides* tissues for polymerase chain reaction (PCR) amplification of the conserved region of the ranavirus major capsid protein (*MCP*) gene, revealing a 500-bp fragment. The *MCP* homology and genetic evolution analysis showed that FYL140220 and other ranavirus strains formed a tight cluster and shared 99.8% identity with CGSV-G and 99.6% with RGV. Taken together, these results confirm that FYL140220 is a ranavirus. This is the first report on a natural ranavirus infection and mortality caused by this pathogen in cultured *Triplophysa*.

Key words: iridoviridae; ranavirus; *Triplophysa siluroides*; isolation; identification; phylogenetic analysis

Corresponding author: GENG Yi. E-mail: gengyisicau@126.com