

# 引起半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒病\*

栗子丹<sup>1,2,3</sup> 李 晋<sup>1,2,3</sup> 史成银<sup>1,2①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;

3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 2012 和 2013 年, 山东某育苗场 15–20 日龄的半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 鱼苗出现暴发性大规模死亡, 7 d 内死亡率高达 90%–100%。本研究调查了疾病的发生情况和临床特征, 采集病鱼样品进行了组织病理学检查, 并运用 RT-PCR 方法进行了病原的检测和基因序列分析。结果发现, 半滑舌鲷鱼苗一般在 7 月和 8 月发病, 发病时养殖水温为 22–24℃。病鱼游泳行为异常, 表现为上下翻游、螺旋性游动、全身大幅度波浪状浮动症状, 但病鱼体表无出血和溃疡症状。组织病理检查发现, 病鱼脑和视网膜组织出现严重的空泡化及坏死。病鱼样品的 RT-PCR 检测结果全部呈鱼类神经坏死病毒阳性。对得到的 RT-PCR 产物测序, 进行 BLAST 比对, 发现该病毒与鱼类神经坏死病毒的赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)基因型的相似性达 98%以上, 而与鱼类神经坏死病毒的其他 3 个基因型: 黄带拟鲈神经坏死病毒(Striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)、红鳍东方鲀神经坏死病毒(Tiger puffer nervous necrosis virus, TPNNV)和条斑星鲈神经坏死病毒(Barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV)的相似性仅为 71%–78%。由此可以判定, 本研究发现的引起半滑舌鲷鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒为 RGNNV 基因型, 半滑舌鲷也是鱼类神经坏死病毒的天然宿主。该发现在半滑舌鲷疾病防治和鱼类神经坏死病毒的流行机制研究方面都具有重要意义。

**关键词** 半滑舌鲷; 赤点石斑鱼神经坏死病毒; RT-PCR; 检测

**中图分类号** S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0110-06

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)是我国北方常见的大型底栖鱼类, 主要分布于我国的渤海、黄海海域, 其活动范围小、营养等级低、生长快, 鱼肉营养丰富、口感细腻, 具有较高的经济价值, 已成为我国沿海地区海水养殖鱼类的优良品种之一。随着半滑舌鲷人工繁殖技术取得成功, 养殖规模不断扩大, 并逐步开始了集约化养殖(姜言伟等, 1993)。但是, 由于养殖密度过大、养殖环境恶化和病原传播等原因, 各种疾病也不断增多。其中, 大部分疾病为细菌性疾病,

病毒性疾病报道较少(Tang *et al*, 2008; 张晓君等, 2009; Zhang *et al*, 2011; 陈政强等, 2012)。

2012 年和 2013 年, 山东某育苗场的半滑舌鲷鱼苗先后发生大规模死亡, 患病半滑舌鲷鱼苗呈现身体畸形弯曲、狂游或螺旋型游动等临床症状, 但体表及内脏无出血、溃烂等现象, 疑为感染了鱼类神经坏死病毒。已有的研究表明, 鱼类神经坏死病毒可以分为 4 种基因型, 即: 黄带拟鲈神经坏死病毒(Striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)、红鳍东方鲀神经坏死病毒(Tiger

\* 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B01)资助。栗子丹, E-mail: suzidan08@163.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-10, 收修改稿日期: 2015-06-15

puffer nervous necrosis virus, TPNNV)、赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)和条斑星鲈神经坏死病毒(Barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV) (Nishizawa *et al.*, 1997)。据报道, 鱼类神经坏死病毒可以感染 10 目 33 科 50 余种鱼类(Munday *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2011), 对海水养殖鱼类尤其是鱼类育苗造成了极大的威胁。然而, 未见半滑舌鲷感染鱼类神经坏死病毒报道。

本研究运用组织病理学和分子生物学方法, 对上述患病鱼苗进行病原分析, 首次证实半滑舌鲷是鱼类神经坏死病毒的天然宿主, 该发现在半滑舌鲷疾病防治和鱼类神经坏死病毒的流行机制研究方面都具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

2012 年和 2013 年, 山东某育苗场培育的半滑舌鲷鱼苗出现大规模死亡, 本研究对发病情况调查, 记录病鱼的临床特征, 采集具有典型临床症状的 15–20 日龄半滑舌鲷鱼苗。一部分鱼苗用 RNAlater (Qiagen, 北京) 保存, 用于 RNA 提取和病毒检测。一部分鱼苗用 Davidson's AFA 固定液固定, 用于组织病理研究。

### 1.2 组织病理切片

对 Davidson's AFA 固定液固定的病鱼, 剪取鱼苗头部组织, 进行石蜡组织切片和苏木精-伊红染色, 封片后用光学显微镜(Nikon E800, 日本)观察病理变化。

### 1.3 RNA 的提取

取 RNAlater 保存的病鱼头部组织约 30 mg, 采用 GB 核酸释放试剂盒(诺晶生物公司, 上海), 参照说明书步骤提取组织总 RNA。

### 1.4 RT-PCR 检测

根据 GenBank 中已经公布的鱼类神经坏死病毒的基因序列, 选取保守区设计 RT-PCR 引物, F1: CTG GTC GGC TGA TAC TCCT, R1: CAA CGC CAT CTG TGA ACG, 目标扩增片段大小为 399 bp。

以 1.3 中提取的组织总 RNA 为模板, 采用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen, 北京) 进行反转录, 合成 cDNA 模板。20  $\mu$ l 反转录体系: 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l 随机引物 1  $\mu$ l、反转录酶 1  $\mu$ l、2  $\times$  TS 反转录缓冲液 10  $\mu$ l、组织总 RNA 3  $\mu$ l、DEPC 水 5  $\mu$ l。反转录程序: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。

取上述合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。25  $\mu$ l PCR 反应体系: 10  $\mu$ mol/L F1 和 R1 引物各 0.5  $\mu$ l、2  $\times$  GB-Direct PCR Mix 12.5  $\mu$ l、cDNA 模板 2  $\mu$ l、DEPC 水 9.5  $\mu$ l。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s; 58 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。取扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果并拍照。

### 1.5 序列比对与相似性分析

PCR 产物由生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序, 拼接后的序列输入计算机, 用 BioEdit 软件和 BLAST 软件进行序列相似性分析。

## 2 结果

### 2.1 发病情况和临床特征

调查发现, 半滑舌鲷鱼苗发病时的养殖水温一般在 22–24 $^{\circ}$ C, 养殖水体盐度为 30, pH 为 7–8。1–12 日龄以及 30 日龄以上的鱼苗发病较轻。13–30 日龄的鱼苗发病严重, 死亡率高达 90%–100%。50 日龄以上的鱼苗不发病。患病鱼苗呈现上下翻游、螺旋性游动或全身大幅度波浪状浮动等症状。鱼体无力, 随着水流漂动, 部分鱼苗有短暂的狂游现象。患病严重的鱼苗脊柱出现弯曲畸形, 但病鱼体表无出血、溃烂等现象(图 1)。



图 1 水中患病的半滑舌鲷鱼苗  
Fig.1 The diseased fry of half-smooth tongue sole *C. semilaevis* in water

### 2.2 组织病理观察

对采集的患病半滑舌鲷鱼苗进行组织病理学观察, 可以看到典型的病毒性神经坏死病理特征, 即病

鱼的脑和视网膜组织大量空泡化。在患病半滑舌鲷鱼苗的头部组织切片中,最明显的空泡化病变主要出现在视网膜的视细胞层、双极细胞层以及节细胞层,中枢神经组织的空泡化病变主要出现在脑灰质部位,并且在空泡周围有大量的嗜碱性的病毒包涵体(图 2)。

### 2.3 病原的 RT-PCR 扩增结果

采用 RT-PCR 方法对于采集的半滑舌鲷鱼苗进行鱼类神经坏死病毒的检测。电泳结果显示,采集到的 4 批样品,病毒检测结果均为强阳性(图 3)。

### 2.4 序列比对与相似性分析

对上述 RT-PCR 产物测序并进行 BLAST 比对,结果显示,感染半滑舌鲷的神经坏死病毒(CsCN NNV)

与 RGNNV 基因型的代表种——七带石斑鱼神经坏死病毒(Seven-band grouper nervous necrosis virus)(GenBank 检索号: AY324870.1)的序列相似性为 98%,与感染白星笛鲷(*Lutjanus stellatus*)、东大西洋石斑鱼(*Epinephelus marginatus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和布氏鲷(*Trachinotus blochii*)的几种鱼类神经坏死病毒的序列相似性均在 98%以上。另一方面, CsCN NNV 与分别隶属于 SJNNV、TPNNV、BFNNV 基因型的黄带拟鲷(*Pseudocaranx dentex*)神经坏死病毒、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)神经坏死病毒和条斑星鲷(*Verasper moseri*)神经坏死病毒的序列相似性仅在 71%–78%之间(图 4)。测定的半滑舌鲷的神经坏死病毒基因序列已经提交到 GenBank, 检索号 KJ541748.2。

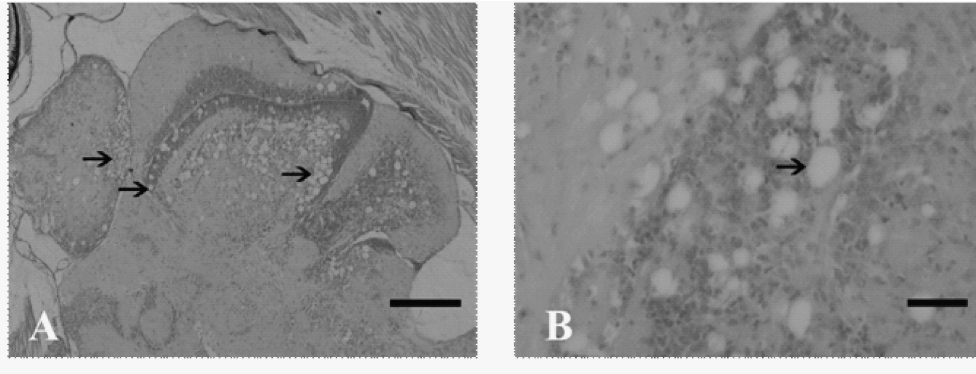


图 2 患病半滑舌鲷的组织病理变化

Fig.2 The histopathological characteristics of diseased half-smooth tongue sole

A. 脑组织空泡化(标尺, 100 μm); B. 视网膜组织空泡化(标尺, 20 μm)

A. vacuolation of brain (Scale bar = 100 μm); B. vacuolation of retina (Scale bar = 20 μm)

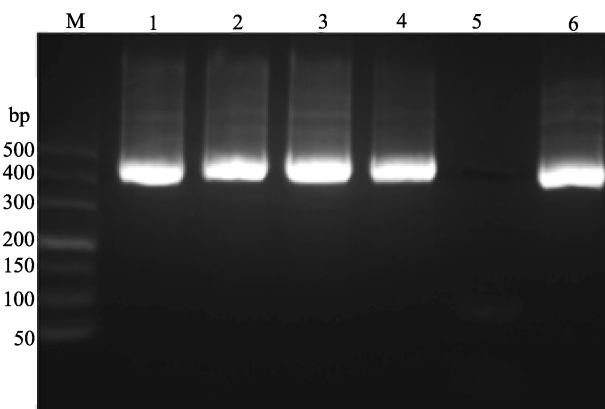


图 3 半滑舌鲷样品的 RT-PCR 检测结果

Fig.3 The RT-PCR results of diseased half-smooth tongue sole

M: DL 500™ DNA Marker; 1–4: 病鱼样品;

5: 阴性对照; 6: 阳性对照

M: DL 500™ DNA Marker; 1–4: diseased fish;

5: Negative control; 6: Positive control

## 3 讨论

半滑舌鲷为我国新兴的海水养殖鱼类品种,由于其较高的经济效益,使得半滑舌鲷的养殖规模日益扩大。育苗场多为工厂化育苗模式,集约化程度高,养殖密度大,在管理不善、隔离不严时,爆发性流行病容易发生,造成鱼苗的大规模死亡。通过对发病鱼苗的临床症状、组织病理观察及病原的 RT-PCR 检测,可以初步确定该养殖场 2012 年和 2013 年半滑舌鲷鱼苗的大规模死亡是由鱼类神经坏死病毒的感染引起的。

调查发现, 13–30 日龄的患病半滑舌鲷鱼苗死亡率极高。据报道, 13–35 日龄的半滑舌鲷鱼苗正处于变态期,此阶段鱼苗的中枢神经系统开始迅速发育,神经细胞大量增加,同时鱼苗的视网膜结构和视觉特性发生明显改变,以适应底栖生活(Ma *et al*, 2006、2007; 卢艳艳等, 2011)。如果鱼苗此时感染了鱼类神

|                                   |  |     |
|-----------------------------------|--|-----|
| CsCN NNV                          | CTGGTCGGCT GATACTCCTG TGTGTCGGCA ACAACACTGA TGTGGTCAAC GTGTCGGTGC TGTGTCGCTG | 70  |
| Sevenband grouper NNV             | .....A.....  | 70  |
| <i>Epinephelus marginatus</i> NNV | .....A.....  | 70  |
| Golden pompano NNV                | .....  | 70  |
| White star snapper NNV            | .....  | 70  |
| <i>Paralichthys olivaceus</i> NNV | .C.....  | 70  |
| Barfin flounder NNV               | .G.C...T.....C.C.....A...A.....  | 70  |
| Tiger puffer NNV                  | .G.C.....G.....  | 70  |
| Striped jack NNV                  | ...C...G.....T...G.....T.....A..CA.....                                      | 70  |
| CsCN NNV                          | GAGTGTTCGA CTGAGCGTTC CATCTCTTGA GACACCTGAA GAGACCACCG CTCCCATCAT GACACAAGGT | 140 |
| Sevenband grouper NNV             | .....  | 140 |
| <i>Epinephelus marginatus</i> NNV | .....T.....A.....T.....  | 140 |
| Golden pompano NNV                | .....T.....  | 140 |
| White star snapper NNV            | .....  | 140 |
| <i>Paralichthys olivaceus</i> NNV | .....  | 140 |
| Barfin flounder NNV               | .....G.T.C.T.....C.....T.ATT.....A.C.A.CTTG.A                                | 140 |
| Tiger puffer NNV                  | .....G.C.T.T.C.T.T.G.A.....G.A.ATT.....A...C.A.GC.G.A                        | 140 |
| Striped jack NNV                  | ...C...C.T.T.T.C.G.C.....G.C.....A.T.C.T.C.G.CG                              | 140 |
| CsCN NNV                          | TCCCTGTACA ACGATTCCCT TT-----C CACAAATGAC TTCAAGTCCA TCCTCCTAGG ATCCACACCA   | 203 |
| Sevenband grouper NNV             | .....  | 203 |
| <i>Epinephelus marginatus</i> NNV | .....  | 203 |
| Golden pompano NNV                | .....A.....  | 203 |
| White star snapper NNV            | .....  | 203 |
| <i>Paralichthys olivaceus</i> NNV | .....  | 203 |
| Barfin flounder NNV               | C.A.C...C...G-----AG.C...T...A.A.A.T.T.C.T.C.AG                              | 203 |
| Tiger puffer NNV                  | C.G.....A.CA-CAACTG...TTC.GG.TCGT...T.C.TGGT.AG                              | 209 |
| Striped jack NNV                  | C.A..CC...A.AACAACGGT T...-C.GA.TCGT...T.T.G.G.C.G..C.A                      | 209 |
| CsCN NNV                          | CTGGATATTG CCCCTGATGG AGCAGTCTTC CAGCTGGACC GTCCGCTGTC CATTGACTAC AGCCTTGAA  | 273 |
| Sevenband grouper NNV             | .....C.....  | 273 |
| <i>Epinephelus marginatus</i> NNV | .....C.....  | 273 |
| Golden pompano NNV                | .....  | 273 |
| White star snapper NNV            | .....  | 273 |
| <i>Paralichthys olivaceus</i> NNV | .....  | 273 |
| Barfin flounder NNV               | ..T..C..C.....A...C...AT TCAT.A.T.G.....T.G.C                                | 273 |
| Tiger puffer NNV                  | ..T..C..C.T...CCA.CA.T...AT TC.A.T..A.A.A...T.C.T...A..G..G                  | 279 |
| Striped jack NNV                  | ..C..CC.C.T...CAA C.T...T GTCACT...A AA...T.C.....T...AT.....G               | 279 |
| CsCN NNV                          | CTGGAGATGT TGATCGTGCT GTTTATTGGC ACCTCAAGAA GTTTGCTGGA AATGCTGGCA CACCTGCAGG | 343 |
| Sevenband grouper NNV             | .....C.....  | 343 |
| <i>Epinephelus marginatus</i> NNV | .....C.....C.....A.....  | 343 |
| Golden pompano NNV                | .....C.....  | 343 |
| White star snapper NNV            | .....C.....  | 343 |
| <i>Paralichthys olivaceus</i> NNV | .....C.....  | 343 |
| Barfin flounder NNV               | .....T.....C.C...C.....C...TG.G...AG.....C...TG..A.....G..                   | 343 |
| Tiger puffer NNV                  | T...T.C...C.....G.C...GCTC...AAGAAA.T.G.C.AAA.AC.....                        | 349 |
| Striped jack NNV                  | TG..C..C..C.C..G..C...GCG...AAA...G.CA..CAGG T.....T..                       | 349 |
| CsCN NNV                          | CTGGTTTCGC TGGGGCATCT GGGACAACCT TAATAAGACG TTCACAGATG GCGTTG                | 399 |
| Sevenband grouper NNV             | .....C.C.....G.....  | 399 |
| <i>Epinephelus marginatus</i> NNV | .....C.....  | 399 |
| Golden pompano NNV                | .....C.....  | 399 |
| White star snapper NNV            | .....C.....  | 399 |
| <i>Paralichthys olivaceus</i> NNV | .....C.....  | 399 |
| Barfin flounder NNV               | G....C.AT....GC.A....T.T.C..C..A.A....C.G.....                               | 399 |
| Tiger puffer NNV                  | ..TC..GGAT....AT.G....TG.T..C....AGTA....GAC...C                             | 405 |
| Striped jack NNV                  | G.AC..GA....AC.G....TG....C....A.....T...G.CAC                               | 405 |

图 4 CsCN NNV 与 8 株鱼类神经坏死病毒基因序列的比较

Fig.4 Comparison of the amplicon nucleotide sequence among nine strains of nervous necrosis viruses

CsCN NNV: 半滑舌鲷神经坏死病毒(KJ541748.2); Sevenband grouper NNV: 七带石斑鱼神经坏死病毒(AY324870.1); *Epinephelus marginatus* NNV: 东大西洋石斑鱼神经坏死病毒(KF748942.1); Golden pompano NNV: 布氏鲷神经坏死病毒(GQ904199.1); White star snapper NNV: 白星笛鲷神经坏死病毒(AY835642.1); *Paralichthys olivaceus* NNV: 牙鲆神经坏死病毒(KF841612.1); Barfin flounder NNV: 条斑星鲽神经坏死病毒(EU236147.1); Tiger puffer NNV: 红鳍东方鲀神经坏死病毒(EU236149.1); Striped jack NNV: 黄带拟鲷神经坏死病毒(AB056572.1)

CsCN NNV: *Cynoglossus semilaevis* NNV (KJ541748.2); Sevenband grouper NNV: AY324870.1; *Epinephelus marginatus* NNV: KF748942.1; Golden pompano NNV: GQ904199.1; White star snapper NNV: AY835642.1; *Paralichthys olivaceus* NNV: KF841612.1; Barfin flounder NNV: EU236147.1; Tiger puffer NNV: EU236149.1; Striped jack NNV: AB056572.1

经坏死病毒,病毒容易随着神经细胞的生长而大量复制,引起鱼苗脑部及视网膜的病变和空泡化,最终造成鱼苗的大量死亡(Tanaka *et al*, 2004; Manin *et al*, 2011)。

本研究通过 RT-PCR 技术和序列测定,得到了感染半滑舌鲷的神经坏死病毒 CsCN NNV 的部分基因序列。序列的比对与分析结果显示,该病毒与分离自七带石斑鱼、东大西洋石斑鱼等鱼体中的 5 株鱼类神经坏死病毒(全部为 RGNNV 基因型)的相似性超过 98%,而与其他 3 种基因型的鱼类神经坏死病毒的相似性仅为 71%–78%,因此,感染半滑舌鲷的神经坏死病毒 CsCN NNV 应属于 RGNNV 基因型(Nishizawa *et al*, 1997; Toffolo *et al*, 2007)。考虑到该育苗场同时进行多种石斑鱼鱼苗的繁育,且曾发生过病毒性神经坏死病,推测感染半滑舌鲷鱼苗的神经坏死病毒很可能来源于同场的其他石斑鱼鱼苗,随着育苗器具及人员的流动而水平传播。由于半滑舌鲷也是鱼类神经坏死病毒的敏感宿主,且鱼苗对病毒的抵抗力弱,因而出现了大规模死亡。这种在同一育苗场中养殖多种鱼苗,造成鱼类神经坏死病毒交叉感染的现象也发生在石斑鱼和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)之间(Hick *et al*, 2011; Manin *et al*, 2011)。因此,在育苗过程中必须严格进行器具消毒,并加强隔离措施,从而阻断鱼类神经坏死病毒的水平传播途径。

鱼类神经坏死病毒宿主广泛,包括 50 余种海淡水鱼类(Munday *et al*, 2002; Sano *et al*, 2011),但半滑舌鲷并不在其中。本研究首次证实半滑舌鲷是鱼类神经坏死病毒的天然敏感宿主,这一发现在半滑舌鲷疾病防治和鱼类神经坏死病毒的流行机制研究方面都具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- 马爱军,王新安,庄志猛,等.半滑舌鲷仔、稚鱼视网膜结构与视觉特性.动物学报,2007,2(53):354–363
- 卢艳艳,张雅芝,常建波,等.半滑舌鲷的育苗效果及生物学特征的观察.集美大学学报(自然科学版),2011,16(1):7–13
- 张晓君,秦国民,阎斌伦,等.半滑舌鲷病原鳃利斯顿氏菌表型及分子特征研究.海洋学报,2009,31(5):112–122
- 陈政强,姚志贤,林茂,等.半滑舌鲷皮肤溃疡病原研究.水产学报,2012,36(5):764–771
- 姜言伟,万瑞景,陈瑞胜,等.渤海半滑舌鲷人工育苗工艺技术的研究.海洋水产研究,1993(14):25–33
- Hick P, Schipp G, Bosmans J, *et al*. Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. Aquaculture, 2011, 319(1–2): 41–52
- Ma AJ, Liu XZ, Xu YJ, *et al*. Feeding rhythm and growth of the tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther, during its early life stages. Aquac Res, 2006, 37(6): 586–593
- Manin BO, Ransangan J. Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, *Lates calcarifer* and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. Aquaculture, 2011, 321(1–2): 157–165
- Munday BL, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. J Fish Dis, 2002, 25: 127–142
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, *et al*. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(4): 1633–1636
- Sano M, Nakai T, Fijan N. Viral diseases and agents of warm water fish. In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition, Woo PTK & Bruno DW, eds. CABI, London, UK, 2011, 166–244
- Tanaka S, Takagi M, Miyazaki T. Histopathological studies on viral nervous necrosis of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. J Fish Dis, 2004, 27(7): 385–399
- Tang XQ, Zhou Li, Zhan WB, *et al*. Isolation and characterization of pathogenic *Listonella anguillarum* of diseased half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther). J Ocean Uiver China, 2008, 7(3): 343–351
- Toffolo V, Negrisolo E, Maltese C, *et al*. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. Mol Phylogenet Evol, 2007, 43(1): 298–308
- Zhang XJ, Qin GM, Bing XW, *et al*. Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. New Zeal J Mar Fresh, 2011, 45(1): 1–13

(编辑 冯小花)

## Preliminary Study on Massive Mortality of Hatchery-Reared Half-Smooth Tongue Sole, *Cynoglossus semilaevis*, Associated with Viral Nervous Necrosis

SU Zidan<sup>1,2,3</sup>, LI Jin<sup>1,2,3</sup>, SHI Chengyin<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In the years of 2012 and 2013, there was an outbreak of disease and massive death of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) 15–20 days post-hatching (dph 15–20) in a hatchery of northern China, and the cumulative mortality reached 90%–100% within one week. The outbreak occurred in July and August when the water temperature was 22–24°C. The symptoms included erratic swimming behaviors such as spiraling movement and fast swimming in circles, without hemorrhaging and ulceration on body surfaces. The histopathological examination revealed typical signs of viral nervous necrosis. The nerve cells of brain and retina underwent severe vacuolation and necrosis. RT-PCR with primers of nervous necrosis virus showed positive results in all samples from moribund half-smooth tongue soles. The RT-PCR products were then sequenced and the sequence alignment was carried out with BLAST. It was found that the sequence similarity was above 98% between the nervous necrosis virus in half-smooth tongue sole (CsCN NNV) and five strains of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV). In contrast, the similarities between CsCN NNV and other three genotype strains of NNV: Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), and Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), were only 71%–78%. Therefore, we inferred that CsCN NNV was a new strain with RGNNV genotype. It was the first case of naturally occurred RGNNV infection of half-smooth tongue sole. Our findings provided insights into the epidemic mechanism of RGNNV infection as well as the prevention of viral nervous necrosis in half-smooth tongue sole.

**Key words** Half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*; Red-spotted grouper nervous necrosis virus; RT-PCR; Detection

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn