

高敏敏, 税典章, 吴 萍, 等. 池塘环境中异育银鲫鲤疱疹Ⅱ型病毒(CyHV-2)的检测与传播途径分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(24): 187-190. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.051

池塘环境中异育银鲫鲤疱疹Ⅱ型病毒(CyHV-2)的检测与传播途径分析

高敏敏¹, 税典章¹, 吴 萍¹, 叶元土¹, 吴 韬², 何冬成², 陈 卓³, 崔振华⁴

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123; 2. 无锡三智生物科技有限公司, 江苏无锡 214000;

3. 华辰水产有限公司, 江苏盐城 224000; 4. 林华水产有限公司, 江苏盐城 224000)

摘要:以发生鲫鱼鳃出血病的 4 个池塘为对象, 以鱼体肝、胰、脾、肾脏的混合物、鲫鱼体表黏液、鲫鱼鱼卵和水体浮游生物为试验材料, 采用 PCR 扩增后电泳检测 239 bp 的鲤疱疹Ⅱ型病毒(CyHV-2)特异条带的方法, 证实这 4 个池塘发生了 CyHV-2 病, 鲫鱼肝、胰、脾、肾脏中含有 CyHV-2; 鲫鱼体表黏液中检测到 CyHV-2, 在部分雌性鲫鱼个体的卵巢中也检测到了 CyHV-2, 提示通过鱼体体表黏液在鱼体之间、通过鱼卵向鱼苗传播 CyHV-2 的可能性。在鲢鱼内脏中检测到 CyHV-2, 而其他种类如草鱼、鳊鱼、野杂鱼, 以及浮游生物中没有检测到 CyHV-2, 提示通过池塘中其他种类传播 CyHV-2 的可能性, 但主要传播途径还是依赖鲫鱼的体表黏液进行横向传播, 通过鱼卵进行纵向传播的可能性。

关键词: CyHV-2; 体表黏液; 鱼卵; 传播途径; 异育银鲫

中图分类号: S943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0187-03

异育银鲫鳃出血病是由鲤疱疹Ⅱ型病毒(CyHV-2)引发的一种危害非常大的流行性病毒性疾病。关于 CyHV-2 的传播途径尚不完全清楚, 一种可能性是通过鱼卵、受精卵到鱼苗的纵向传播途径, 另一种可能途径是通过鱼体体表黏液在鱼体之间的横向传播途径。纵向传播途径的研究需要在鱼卵、受精卵中找到 CyHV-2 存在和传播的路径, 而横向传播则需要从鱼体体表黏液中找到 CyHV-2 存在的证据和传播路径。

本研究以发生异育银鲫鳃出血病的单一池塘为研究单位, 以同一池塘中的不同鱼类、异育银鲫鱼体的体表黏液、鱼卵巢、水体、水体中藻类等为试验材料, 采用定量 PCR 方法检测 CyHV-2 的特异性存在, 评价在池塘环境条件下不同鱼体、雌性鱼体卵巢、鱼体体表黏液、浮游生物中是否携带 CyHV-2, 探讨 CyHV-2 在池塘环境中的传播途径、存在状态, 以期为系统防控异育银鲫鳃出血病的发生和发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 采样池塘

选择江苏大丰的上海农场(光明渔业公司)的 8 号、17 号池塘和大丰渔场的 9 号、18 号池塘(盐城华辰水产科技有限公司)共 4 个池塘为试验对象, 这 4 个池塘在 2017 年 6 月初均有疑似异育银鲫鳃出血病发生。于 2017 年 6 月 23、24 日分别对这 4 个池塘的异育银鲫、草鱼、鲢鳊鱼、野杂鱼和浮

游生物进行采样, 进行 CyHV-2 检测。

1.2 鱼体材料

鱼种类: 选择池塘中异育银鲫、草鱼、鲢鱼、鳊鱼、野杂鱼等种类, 将鱼体在冰盘上解剖, 取肝、胰、脾、肾等内脏, 每尾鱼的肝脏、胰脏、脾脏、肾脏混合为 1 个样本, 液氮速冻后带回苏州大学实验室用于检测 CyHV-2。如果鲫鱼性成熟, 则采集鱼卵、或精巢进行 CyHV-2 检测。鲫鱼体表黏液通过刮取鲫鱼体表两侧提取, 液氮冷冻保存于 CyHV-2 检测。

1.3 浮游生物样本

取池塘饲料投喂区域、水面下 30 cm 水样, 用 80 目滤网过滤, 滤渣再经过 3 000 r/min 离心 10 min, 得沉淀物液氮速冻作为池塘浮游生物样本用于 CyHV-2 检测。

1.4 CyHV-2 检测方法

以 CyHV-2 病毒核心序列 C-2-F1 和 C-2-R1 为引物(C-2-F1: TGGAATCAGTTCAACGCGTCAT; C-2-R1: CGTCAGTGCCTGGCAGTAATA), 提取样品组织的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 产物于 2% 琼脂糖进行凝胶电泳。电泳图谱中 239 bp 片段特异性条带即为 CyHV-2 病毒阳性。

2 结果与分析

2.1 上海农场水产养殖四区 17 号池塘(NC-4-17) CyHV-2 检测结果

上海农场水产养殖四区 17 号(编号: NC-4-17)池塘面积 4 hm², 鱼种放养模式为: 体质量 131.5 g/尾的异育银鲫 38 671 尾/hm²; 255 g/尾的鲢鱼 836 尾/hm²; 体质量 862 g/尾的鳊鱼 896 尾/hm²。鱼种放养时间为 2016 年 2 月 27 日。2017 年 6 月初, 异育银鲫开始发病, 诊断为鳃出血病, 于 2017 年 6 月 25 日采样, 异育银鲫累计死亡约 3 000 尾, 采样时还

收稿日期: 2018-03-01

基金项目: 江苏省水产三新工程项目(编号: D2015-12); 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(17)2027]。

作者简介: 高敏敏(1994—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: 942950979@qq.com。

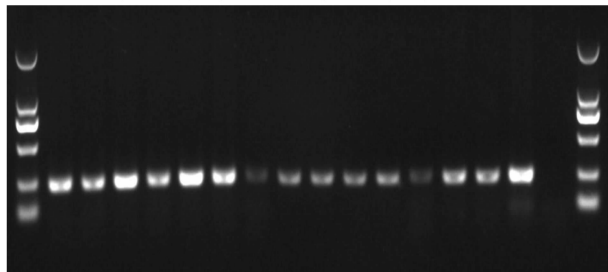
通信作者: 叶元土, 教授, 主要从事水产动物营养与饲料研究。

E-mail: yeyt@suda.edu.cn。

有鲫鱼死亡情况。以收撒网采集池塘中 6 尾异育鲫鱼的肝胰脾肾混合物样品、6 尾异育银鲫的体表黏液;1 号、4 号鲫鱼为雌性(其余为雄性),采集了卵巢样品。

由图 1 可知,该池塘异育银鲫发生了典型的鳃出血病,取样的 1~6 号异育银鲫的肝、胰、脾脏和肾混合物中在 239 bp 出现明显的条带,显示 CyHV-2 的存在,也证实了该池塘发生的疾病为异育银鲫鳃出血病。重要的是,在其黏液中检测到了 CyHV-2,在 1 号、4 号(其他为雄性个体)异育银鲫鱼卵中也检测到了 CyHV-2。结果表明,对于已经发病的异育银鲫个体,其体表黏液含有 CyHV-2,可以成为横向(鱼体个体之间)传播的基础,即鱼体之间通过身体黏液的接触传播 CyHV-2 是可能的。同时,鱼卵中 CyHV-2 的存在,也预示着通过鱼卵传递到受精卵中的可能性。

M Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ N₁ N₂ N₃ N₄ N₅ N₆ L₁ L₄ + - M



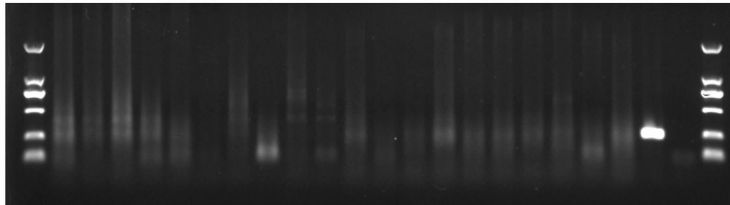
M为DL 2 000 marker; Z₁~Z₆为1~6号异育银鲫肝、胰、脾、肾混合物样品; N₁~N₆为1~6号异育银鲫黏液样品; L₁、L₄为1号、4号异育银鲫的鱼卵样品; +为CyHV-2阳性对照样; -为阴性对照(蒸馏水)

图1 NC-4-17 池塘异育银鲫 CyHV-2 的检测结果

2.2 上海农场水产养殖一区 8 号池塘(NC-1-8) CyHV-2 检测结果

该池塘面积 5.3 hm²,鱼种放养模式为:体质量 50 g/尾的异育银鲫 8 620 尾/hm²;体质量 800 g/尾的斑点叉尾鲷 10 179 尾/hm²;体质量 300 g/尾的鲢鱼 478 尾/hm²;体质量 250 g/尾的鳙鱼 970 尾/hm²。鱼种放养时间为 2017 年 1 月 12 日,2017 年 6 月初异育银鲫开始发病,诊断为鳃出血病,于 2017 年 6 月 25 日采样,异育银鲫累计死亡 15 200 尾,采样时还有鲫鱼死亡情况。采集了 6 尾异育鲫鱼的肝胰脾肾混合物样品、6 尾鲫鱼的体表黏液;2 号、6 号鲫鱼为雌性,采集了卵

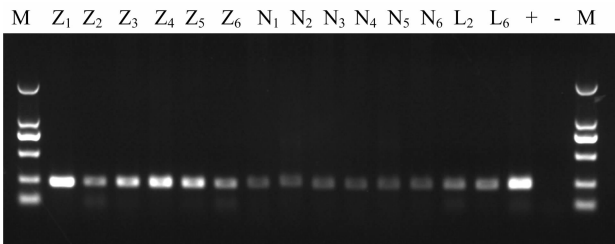
M Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ N₁ N₂ N₃ N₄ N₅ N₆ N₇ N₈ N₉ N₁₀ + - M



M为DL 2 000 marker; Z₁~Z₁₀为 1~10 号异育银鲫肝、脾、肾混合样; N₁~N₁₀为 1~10 号异育银鲫体表黏液样品; +为 CyHV-2 阳性对照样; -为阴性对照(蒸馏水)

图3 DFW-18 池塘 CyHV-2 检测结果

由图 3 可知,DFW-18 池塘中,异育银鲫 1、2、3、4、5 号个体带有 239 bp 的 CyHV-2 条带,其他个体的不明显;1、4、5、6、7、8、10 号鲫鱼的体表黏液有 239 bp 的 CyHV-2 条带但不明显。DFW-18 池塘的异育银鲫内脏中有 CyHV-2 的存在,但 239 bp 条带的明亮程度不强;异育银鲫的体表黏液中



M为DL 2 000 marker; Z₁~Z₆为1~6号异育银鲫肝、胰、脾、肾混合物样品; N₁~N₆为1~6号异育银鲫黏液样品; L₂、L₆为 2、6 号异育银鲫的鱼卵样品; +为 CyHV-2 阳性对照样; -为阴性对照(蒸馏水)

图2 NC-1-8 池塘异育银鲫各组织 CyHV-2 病毒检测结果

巢样品。

NC-1-8 池塘是 1 个异育银鲫鳃出血病发病池塘,在取样 1~6 号异育银鲫肝、胰、脾、肾的混合样品中,在 239 bp 出现明显的条带,显示 CyHV-2 的存在;同时,1~6 号鲫鱼体表黏液中也检测到了 CyHV-2 的存在。在 2、6 号鲫鱼鱼卵中也检测到 CyHV-2 的存在。结果表明,NC-1-8 池塘的异育银鲫发生了 CyHV-2 病,鲫鱼肝、胰、脾、肾混合样品中检测到了 CyHV-2;同时,鲫鱼体表黏液中 CyHV-2 的存在,预示着鱼体之间横向传播 CyHV-2 的可能性;鱼卵中 CyHV-2 的存在预示着通过受精卵纵向传播 CyHV-2 的可能性。

2.3 大丰茅渔场 18 号池塘(DFW-18) CyHV-2 检测结果

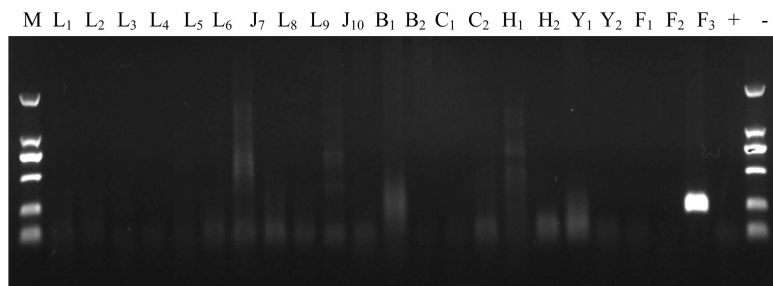
该池塘面积 5.2 hm²,鱼种放养模式为:异育银鲫:体质量 8 g/尾 的 鱼 种 20 507 尾/hm²、体质量 161 g/尾 的 鱼 种 7 463 尾/hm²;体质量 7 g/尾 的 草 鱼 149 254 尾/hm²;体质量 13 g/尾 的 鲢 鱼 597 尾/hm²;体质量 18 g/尾 的 鳙 鱼 1 239 尾/hm²。鱼种放养时间为 2017 年 3 月 10 日,2017 年 6 月初异育银鲫开始有少量死亡,于 2017 年 6 月 24 日采样,异育银鲫累计死亡 1 000 尾。采样时该池塘发病得到有效控制,没有再出现鲫鱼死亡情况。采集了 10 尾鲫鱼的肝胰脾肾混合物样和体表黏液;同时采集有草鱼、鲢鱼、鳙鱼、野杂鱼的肝胰脾肾混合样;采集浮游生物样品 1 个。

DFW-18 池塘不同鱼种、浮游生物中 CyHV-2 的检测

结果见图 3 和图 4。

也有 CyHV-2 的存在。

由图 4 可知,异育银鲫的卵巢、精巢中没有检测到明显的 239 bp 的 CyHV-2 特异条带。鲢鱼 2 号肝胰脾肾混合样中检测到 239 bp 的 CyHV-2 条带,而草鱼、鳙鱼和野杂鱼中没有检测到 239 bp 的 CyHV-2 条带;浮游生物样中也没有检测



M 为 DL 2 000 marker; L₁~L₆: 鲫鱼卵巢; J₇~J₁₀: 鲫鱼精巢; B₁~B₂: 白鲢肝、脾、肾混合样; C₁~C₂: 草鱼肝、脾、肾混合样; H₁~H₂: 花鲢肝、脾、肾混合样; Y₁~Y₂: 野杂鱼肝、脾、肾混合样; F₁~F₃: 浮游生物。+为 CyHV-2 阳性对照样; -为阴性对照(蒸馏水)

图4 DFW-18 池塘 CyHV-2 检测结果

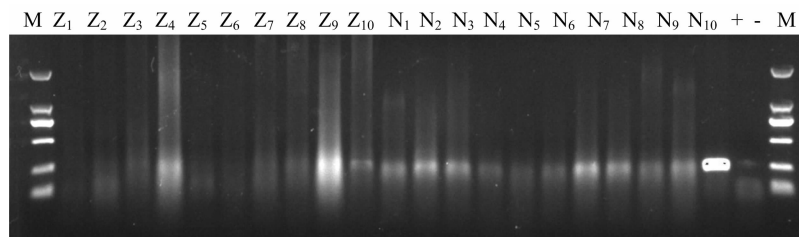
到 239 bp 的 CyHV-2 条带。这个结果表明,在 DFW-18 池塘中,除了异育银鲫内脏和黏液中携带 239 bp 的 CyHV-2 条带外,鲢鱼的个体可能有 239 bp 的 CyHV-2 条带,而其他鱼种没有 239 bp 的 CyHV-2 条带。

2.4 大丰苇渔场 9 号池塘 (DFW-9) CyHV-2 检测结果

该池塘面积 9.2 hm², 鱼种放养模式为:体质量 76 g/尾的异育银鲫 12 716 尾/hm²; 体质量 63 g/尾的草鱼 37 313 尾/hm²; 体质量 455 g/尾的鲢鱼 776 尾/hm²; 体质量 556 g/尾的鳙鱼 761 尾/hm²。鱼种放养时间为 2017 年 3 月 6

日,2017 年 6 月初异育银鲫开始有少量死亡,于 2017 年 6 月 24 日采样,鲫鱼累计死亡 1 500 尾,采样时不再有鲫鱼死亡情况。采集了 10 尾异育鲫鱼的肝脾肾混合物样、体表黏液和卵巢样品;同时采集浮游生物样品 1 个。

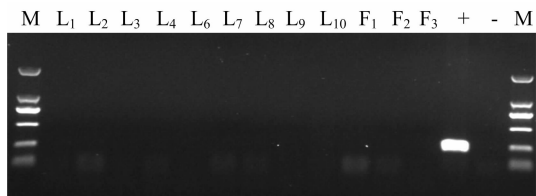
由图 5 可知,DFW-9 池塘的异育银鲫检测样本中,4、9、10 号鲫鱼的肝脾肾混合样中有明显的 239 bp 的 CyHV-2 条带,其他个体不明显;而 1~10 号鲫鱼的体表黏液中均有较为明显的 239 bp CyHV-2 条带。这一结果再一次证实了异育银鲫体表黏液有 CyHV-2 的存在。



M 为 DL 2 000 marker; Z₁~Z₁₀ 为鲫鱼的肝、脾、肾混合样, N₁~N₁₀ 为鲫鱼的黏液。
+为 CyHV-2 阳性对照样; -为阴性对照(蒸馏水)

图5 DFW-9 池塘 CyHV-2 检测结果

由图 6 可知,在内脏和体表黏液中有 CyHV-2 存在的情况下,异育银鲫卵巢中没有检测到 CyHV-2。池塘浮游生物中也没有检测到 CyHV-2 的存在。



M 为 DL 2000 marker; L₁~L₁₀ 为鲫鱼卵巢; F₁~F₃ 为浮游生物

图6 DFW-9 池塘 CyHV-2 检测结果

3 讨论

笔者所在课题组前期的研究表明,在发生鳃出血病的异育银鲫体内存在大量的 CyHV-2 粒子,在血液、肝、胰、肾、脾脏等组织中均有 CyHV-2 粒子的存在,也观察到了 CyHV-2 粒子的成熟过程^[1-3]。这些研究结果表明,CyHV-2 是鲫鱼鳃出血病的病原体,CyHV-2 的增殖导致细胞破裂、死亡,鱼体内、尤其是鳃小片大量出血,鱼体发生过度的炎症反应。

本研究以 4 个发生异育银鲫鳃出血病的池塘为研究对

象,对池塘中鱼体内脏、卵巢、黏液中 CyHV-2 的检测结果显示,在异育银鲫发生 CyHV-2 病后,其肝脏、胰脏、脾脏、肾脏等内脏器官组织中有 CyHV-2 的存在,也证实了这些池塘发生鲫鱼死亡的疾病为 CyHV-2 病。

在 4 个目标池塘中异育银鲫体表黏液中 CyHV-2 的检测结果显示,鲫鱼体表黏液中有 CyHV-2 的存在。这个结果表明,如果在体表黏液中含有 CyHV-2,鱼体之间通过身体的接触,例如在摄食饲料的过程中,存在通过体表黏液传播 CyHV-2 的可能性。当然,本试验仅证实发病鲫鱼体表黏液中 CyHV-2 的存在,还不能完全证实通过体表黏液传播 CyHV-2 的路径、发生过程。

异育银鲫鱼卵中 CyHV-2 的存在,也证实了通过鱼卵、受精卵传播 CyHV-2 到鱼苗的可能性。当然,本研究结果仅是证实鱼卵中 CyHV-2 存在的客观性,这需要有更为精确的试验来证实这种纵向传播 CyHV-2 的路径。

在鲫鱼以外的其他种类中,仅有 DFW-9 池塘中鲢鱼内脏中检测到了 CyHV-2 存在,而在其他种类如草鱼、鳙鱼和野杂鱼中没有检测到 CyHV-2。这提示通过其他种类传播 CyHV-2 的可能性。

对 2 个池塘的浮游生物进行了 CyHV-2 检测,均未检测

寞 勇,姚妙爱. 复合酶制剂对黄颡鱼生长性能、表观消化率及氮排放的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):190-193.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.052

复合酶制剂对黄颡鱼生长性能、表观消化率及氮排放的影响

寞 勇,姚妙爱

(江苏财经职业技术学院,江苏淮安 223003)

摘要:为研究黄颡鱼膨化饲料最低蛋白质添加量,基于黄颡鱼最适能蛋白比 33.5 ~ 37.7 MJ/kg,饲料粗蛋白质含量依次设置为 36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%,研究黄颡鱼膨化饲料添加复合酶制剂对其生长性能及氮排放的影响。结果表明,添加 0.02% 的复合酶制剂,蛋白质含量可降低至 38%,不影响黄颡鱼生长性能,且粪氮排放量最低,与对照组相比降低了 50%,有效降低黄颡鱼生产对水环境污染。

关键词:酶制剂;黄颡鱼;膨化饲料;生长性能;氮排放

中图分类号: S963.73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0190-04

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 俗名黄角丁、黄腊丁、戈牙等,隶属鲿科 (Bagridae)、鲇形目 (Siluriformes)、黄颡鱼属 (*Pelteobagrus*),广布于我国东部各大水系,是目前经济价值较高的淡水养殖新品种之一^[1-4]。研究表明,黄颡鱼对蛋白质的需求量基本在 33.5% ~ 45.0%,人工养殖条件下可全程摄食颗粒料或膨化配合饲料^[5-6]。我国早期养殖黄颡鱼以颗粒料为主,饲料的蛋白质含量高达 44% ~ 45%,造成高蛋白饲料浪费,并对养殖水体和环境造成巨大污染。随着饲料膨化技术的发展,黄颡鱼膨化饲料逐渐研发使用,但其蛋白质含量仍高达 42%,存在蛋白质资源浪费现象。

目前,在配合饲料中添加酶制剂,成为提高水产动物对饲料营养成分消化吸收的有效途径之一。复合酶制剂由多种可以分解饲料营养分子链的生物活性物质组成,可最大限度地提高饲料营养成分的消化分解,解除饲料中多种抗营养因子,补充内源性消化酶分泌的不足,提高动物对营养成分的消化

吸收,促进动物生长和提高饲料效率^[7]。由于鱼类饲料加工多数采用制粒或膨化,特别是饲料膨化过程中温度高达 150 ℃,加工过程对酶的活性影响较大,限制了酶制剂在生产上的应用。此外,黄颡鱼适宜生长温度在 25 ℃ 左右,但大多数酶制剂活性最适温度为 30 ~ 50 ℃,黄颡鱼养殖过程中酶活性达不到最适温度。因此,在黄颡鱼膨化饲料中很少使用酶制剂,为此本研究采用先制粒后喷涂的方式添加复合酶制剂,待膨化后饲料温度降低至 80 ℃ 左右,由油脂稀释酶制剂后进行喷涂,可有效提高复合酶制剂活性。为研制高效环保型黄颡鱼膨化饲料,降低黄颡鱼膨化饲料中蛋白质添加量,有效提高蛋白质利用率,降低黄颡鱼养殖过程中 N 排放量,在黄颡鱼膨化饲料中添加水产专用复合酶制剂,基于黄颡鱼最适能蛋白比 33.5 ~ 37.5 MJ/kg 情况下,研究不同粗蛋白质添加量对黄颡鱼生产性能、氮元素吸收的影响,以期获得在不影响黄颡鱼生长性能情况下,膨化饲料中最低蛋白质用量,为成功研制环保型黄颡鱼膨化饲料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

黄颡鱼由扬州市董氏特种水产苗种繁育中心提供,体质量 8 ~ 9 g/尾,试验前驯养 15 d,淘汰体质差及环境不适应个体。

异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 组织器官的损伤作用[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(3):587-594.

[2] 林秀秀,叶元土,吴 萍,等. 异育银鲫造血器官坏死症病鱼体内鲤疱疹病毒 II 型的电镜观察与超微病理学特征[J]. 水产学杂志,2016,29(1):17-23.

[3] 林秀秀,叶元土,吴 萍,等. 感染鲤疱疹病毒 II 型 (CyHV-2) 的异育银鲫血液生理生化指标及相应组织学变化[J]. 水产学杂志,2016,29(2):16-23.

[4] 吴淑勤,李新辉,石存斌,等. 鳊鱼病毒传播途径的初步研究[J]. 水产学报,2001,25(5):460-463.

收稿日期:2017-08-05

基金项目:江苏省苏北科技发展规划(编号:BN2014035);2016 年江苏省“青蓝工程”资助项目(编号:苏教师(2016)15 号);2017 年淮安市第二期“533 英才工程”项目。

作者简介:寞 勇(1979—),男,安徽巢湖人,硕士,副教授,主要从事水产养殖与食品安全方面研究。Email:414052169@qq.com。

到 CyHV-2 的存在,显示通过浮游生物传播 CyHV-2 的途径可能是不存在的。

综合本试验结果表明,CyHV-2 的传播途径主要还是通过鲫鱼的体表黏液进行鱼体之间进行横向传播、通过鱼卵进行纵向传播的可能性,这应该是 CyHV-2 在池塘中传播的主要途径。需要注意的是,本试验结果仅表明这 2 种传播途径的可能性,还需更为精确的试验来证实其具体的传播路径。

参考文献:

[1] 林秀秀,叶元土,吴 萍,等. 鲤疱疹 II 型病毒 (CyHV-2) 感染对