

大口黑鲈虹彩病毒双重 PCR 检测方法的建立

王 庆 曾伟伟 刘 春 马冬梅 石存斌 吴淑勤

农业部渔药创制重点实验室/广东省水产动物免疫技术重点实验室/中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380

摘要 为同时检测患病大口黑鲈中不同属虹彩病毒感染和带毒情况, 针对蛙病毒属和肿大细胞病毒属大口黑鲈虹彩病毒主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因的序列, 分别设计 1 对特异性引物 Rana-mcp F/R 和 Mega-mcp F/R, 扩增产物片段大小分别为 475 bp 和 262 bp。通过 PCR 反应体系的优化、反应的特异性和灵敏度试验, 建立一种可以同时检测大口黑鲈蛙病毒属和肿大细胞病毒属虹彩病毒感染的双重 PCR 检测方法, 最低 DNA 检测量分别为 6.5 pg 和 14.5 pg。用此方法, 对临床获得的 15 个大口黑鲈样品进行双重 PCR 检测和序列测定, 获得 5 个蛙病毒属和 1 个肿大细胞病毒属虹彩病毒检测阳性结果。本研究建立的基于 MCP 基因的大口黑鲈虹彩病毒双重 PCR 检测方法, 可用于养殖大口黑鲈虹彩病毒病快速鉴别诊断和分子流行病学调查。

关键词 大口黑鲈; 虹彩病毒; 蛙病毒属; 肿大细胞病毒属; 虹彩病毒主衣壳蛋白基因; 双重 PCR

中图分类号 S 943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0106-05

大口黑鲈(largemouth bass, *Micropterus salmoides*), 俗称加州鲈, 原产于北美密西西比河流域, 属广温性鱼类, 具有生长快、病害少、耐低温、肉质鲜美和容易捕捞等特点, 已成为我国重要的淡水养殖品种^[1-2]。从 20 世纪 90 年代开始, 我国池塘养殖大口黑鲈发生病害的问题越来越复杂, 如烂鳃病、肠炎病、腐皮病、水霉病、车轮虫病、杯体虫病等, 导致大口黑鲈发病的病原主要是嗜水气单胞菌、柱状黄杆菌、霉菌和寄生虫, 确诊由病毒感染导致发病的报道较少^[3-6]。据报道, 大口黑鲈的病毒性疾病, 如病毒性溃疡病、肝脾肿大分别由虹彩病毒科蛙病毒属(*Ranavirus*)、肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)虹彩病毒引起, 发病时, 死亡率较高, 给大口黑鲈养殖业造成一定损失^[7-9]。2008 年至 2011 年期间, 广东佛山顺德地区、南海地区养殖大口黑鲈鱼塘频发疾病, 笔者检测和分离到大口黑鲈蛙病毒属和肿大细胞病毒属虹彩病毒。目前, 针对大口黑鲈蛙病毒属虹彩病毒已有常规 PCR、荧光定量 PCR 检测方法的报道^[10-11]。本研究中笔者建立了可同时检测蛙病毒属和肿大细胞病毒 2 种虹彩病毒的双重 PCR 检测方法, 旨在为大口黑鲈虹彩病毒感染鉴别

诊断、分子流行病学调查提供有效技术手段。

1 材料与方 法

1.1 毒株和细胞

大口黑鲈蛙病毒属虹彩病毒 SD-R 株和肿大细胞病毒属 NH-M 株由笔者所在实验室分离、鉴定和保存。蛙病毒(frog virus 3, FV3)自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)购买, 草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus HZ08, GCRV HZ08)、传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)和黄尾鲷腹水症病毒(yellowtail ascites virus, YTAV)由笔者所在实验室保存。鳃肌细胞(FHM)、鲤上皮瘤细胞(EPC)、草鱼肾脏细胞(CIK)购自武汉大学典型培养物保藏中心, 鳃脑原代细胞(SCC)由笔者所在实验室建立和保存。

1.2 试 剂

M199、L15 培养基、胎牛血清、0.25%胰酶购自 Gibco 公司; PCR 试剂、DL1000/DL2000 DNA marker、pMD18-T 载体购自 TAKARA 公司; 感受态细胞 DH5 α 购自天根公司; 组织 DNA 和 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; 引物

收稿日期: 2012-09-06

基金项目: 广东省省级财政鱼病防治专项和现代产业技术体系建设专项(CARS-46)

王 庆, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 水生动物病毒病防控。E-mail: sunny_929@163.com

通讯作者: 吴淑勤, 研究员, 研究方向: 水生动物病害防控。E-mail: wushuqin001@21cn.com

合成和产物测序委托 Invitrogen(上海)公司完成。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中大口黑鲈虹彩病毒 (large-mouth bass ranavirus, LMBV) MCP 的基因序列

(登录号 GU256635)和 马冬梅等^[9]发表的大口黑鲈肝脾肿大症病毒 MCP 序列,设计和筛选出 2 对特异性片段引物。各引物序列、预期扩增片段长度见表 1。

表 1 双重 PCR 引物

Table 1 Primer sequences for the duplex PCR

| 引物检测虹彩病毒类型 The detective species | 引物 Primer | 引物序列 Primer sequences | 扩增片段大小/bp Predicted size |
|-------------------------------------|--------------|--|-----------------------------|
| 蛙病毒属 <i>Ranavirus</i> | Rana-mcp | F:5'-TATGTGCTCAACTCTTGGCTGGTC-3' R:5'-CCACGATGGGCTTGACTTCTCC-3' | 475 |
| 肿大细胞病毒属 <i>Megalocytivirus</i> | Mega-mcp | F:5'-ATGCTCATTGAACAGTGCCAGGTG-3' R:5'-GGTGGAGCCGAGGGGTGTTTC-3' | 262 |

1.4 双重 PCR 检测方法的建立

1)病毒的增殖和病毒 DNA、RNA 的提取。大口黑鲈病毒 SD-R 株和 FV3 均采用 FHM 增殖,草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株采用 CIK 增殖,传染性造血器官坏死病毒 IHNV 采用 EPC 增殖,以上细胞加入含 5%胎牛血清 M199 培养基,28℃培养(IHNV 为 15℃培养)。大口黑鲈病毒 NH-M 株和黄尾鲈腹水症病毒 YTAV 采用 SCC 增殖,加入含 5%胎牛血清 L15 培养基,28℃培养。待细胞病变(CPE)达 85%以上收毒,并反复冻融 3 次。取病毒悬液 200 μL,按照 OMEGA 组织 DNA 提取试剂盒、RNA 提取试剂盒说明书进行相关操作。同时提取不接种病

毒的细胞 DNA,作为阴性对照模板。

2)PCR 扩增条件的优化。分别使用 Rana-mcp 和 Mega-mcp 引物进行单一扩增,确定引物扩增有效后,再混合病毒 DNA 采用 2 种引物进行双重 PCR 扩增。对 PCR 循环数、退火温度、引物浓度、MgCl₂ 浓度等进行优化。筛选出单一及双重 PCR 反应中最佳反应模式。PCR 扩增后的产物,用 10 g/L 的琼脂糖凝胶在 120 V 电压下电泳 25 min,用凝胶成像系统观察并拍照。

单独使用引物 Rana-mcp 或 Mega-mcp 引物进行单一 PCR,或者联合使用引物 Rana-mcp 和 Mega-mcp 进行双重 PCR 的体系和反应程序见表 2。

表 2 单一及双重 PCR 扩增的反应条件

Table 2 Reaction system for single or duplex PCR

| 项目 Items | 单一 PCR Single PCR | | 双重 PCR Duplex PCR |
|-----------------------------------|-------------------|------------|-------------------|
| | Rana-mcp | Mega-mcp | Rana-mcp+Mega-mcp |
| 模板 DNA templete | 1 μL | 1 μL | 2 μL |
| 缓冲液 10×Buffer | 5 μL | 5 μL | 5 μL |
| 氯化镁 MgCl ₂ (25 mmol/L) | 3 μL | 3 μL | 3 μL |
| PCR 体系 PCR system (50 μL) | | | |
| 上游引物 Primer F(25 μmol/L) | 1 μL | 1 μL | 1 μL+1 μL |
| 下游引物 Primer R(25 μmol/L) | 1 μL | 1 μL | 1 μL+1 μL |
| dNTP(2.5 mmol/L) | 8 μL | 8 μL | 8 μL |
| 酶 DNA polymerase | 0.25 μL | 0.25 μL | 0.25 μL |
| 无菌水 ddH ₂ O | 30.75 μL | 30.75 μL | 27.75 μL |
| 预变性 Preheated | 95℃ 3 min | 95℃ 3 min | 95℃ 3 min |
| 变性 Denaturation | 95℃ 30 s | 95℃ 30 s | 95℃ 30 s |
| 反应程序 Reaction program | | | |
| 30 循环 30 cycles | | | |
| 退火 Anneal | 58℃ 30 s | 55℃ 30 s | 55℃ 30 s |
| 延伸 Extension | 72℃ 30 s | 72℃ 20 s | 72℃ 30 s |
| 延伸 Extension | 72℃ 10 min | 72℃ 10 min | 72℃ 10 min |

3)PCR 产物的克隆和序列测定。将扩增的 PCR 产物切胶后,按照 OMEGA 胶回收试剂盒的说明进行纯化回收。分别克隆进 pMD18-T 载体中,转化感受态细胞 DH5α,选取阳性克隆重组质粒送 Invitrogen 公司进行序列测定。

4)单一及双重 PCR 的特异性试验。用建立的单一及双重 PCR 方法对大口黑鲈病毒 SD-R 株、NH-M 株、虹彩病毒 FV3 的 DNA,草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株、传染性造血器官坏死病毒 IHNV、黄尾鲈腹水症病毒 YTAV 的 cDNA 进行扩增,评价单一

及双重 PCR 鉴别检测的特异性。

5) 双重 PCR 的敏感性试验。用紫外分光光度计测定 SD-R 株和 NH-M 株模板 DNA 的浓度, 将已知浓度的大口黑鲈病毒 SD-R 株和 NH-M 株的 DNA 模板等量混合, 用灭菌双蒸水将混合的模板进行 10 倍梯度稀释, 取混合后不同稀释倍数的模板进行双重 PCR 扩增, 电泳后观察条带亮度。

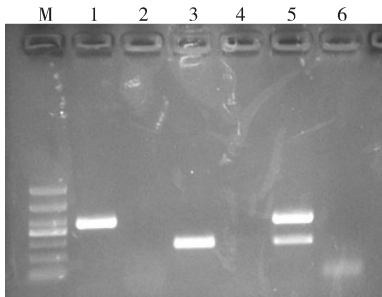
1.5 临床样品检测

从佛山市南海区、顺德区收集到 15 个大口黑鲈样品。病料采集后, 保持低温送至实验室, 取适量脾组织, 组织 DNA 提取按照 OMEGA 组织 DNA 提取试剂盒说明书操作。样品 DNA 采用双重 PCR 方法进行检测。阳性结果进行克隆和序列测定。

2 结果与分析

2.1 单一和双重 PCR 扩增结果

采用 Rana-mcp 作为引物, 以大口黑鲈病毒 SD-R 株病毒 DNA 作为模板, 可以扩增出预期大小 475 bp 的片段。以 Mega-mcp 作为引物, 以 NH-M 株病毒 DNA 作为模板, 可以扩增出预期大小 262 bp 的片段。以 SD-R 和 NH-M 毒株混合 DNA 作为模板, 同时采用 Rana-mcp 和 Mega-mcp 引物进行双重 PCR 扩增, 可以同时扩增出 475 bp 和 262 bp 大小的片段(图 1)。阴性对照均无条带。序列测定结果显示, 所测得的基因序列与已知模板的基因序列相似性均为 100%。



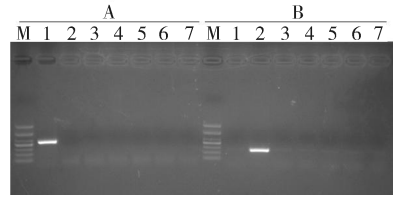
M: DL 1 000 DNA marker; 1: 用引物 Rana-mcp 检测 SD-R 株 SD-R with primers Rana-mcp; 2: 用引物 Rana-mcp 检测空白细胞 Control cell with primers Rana-mcp; 3: 用引物 Mega-mcp 检测 NH-M 株 NH-M with primers Mega-mcp; 4: 用引物 Mega-mcp 检测空白细胞 Control cell with primers Mega-mcp; 5: 用混合引物同时检测 SD-R 株和 NH-M 株 SD-R and NH-M with mixed primers; 6: 用混合引物检测空白细胞 Control cell with mix primers.

图 1 单一及双重 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of single and duplex PCR

2.2 单一及双重 PCR 特异性检测结果

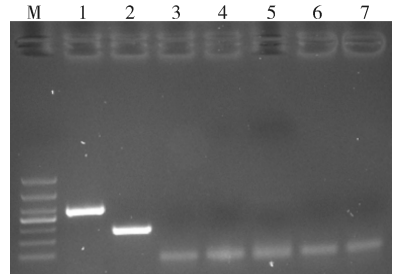
以大口黑鲈病毒 SD-R 株、NH-M 株、虹彩病毒 FV3 的 DNA, 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株、传染性造血器官坏死病毒 IHNV、黄尾鲈腹水症病毒 YTAV 的 cDNA 作为模板, 单独使用 Rana-mcp、Mega-mcp 引物进行单一 PCR 以及同时采用 Rana-mcp 和 Mega-mcp 引物进行双重 PCR 扩增, 结果显示引物 Rana-mcp 可以从 SD-R 株病毒 DNA 中扩增出 475 bp 的条带, 其他模板均无条带, 引物 Mega-mcp 可以从 NH-M 株病毒 DNA 中扩增出 262 bp 的片段, 其他模板均无条带(图 2)。联合使用 Rana-mcp 和 Mega-mcp 引物, SD-R 株扩增出 475 bp 条带, NH-M 株扩增出 262 bp 条带, 其他模板均无条带(图 3)。阴性对照也没有任何条带出现。



A: Rana-mcp; B: Mega-mcp; M: DL 1000 DNA marker; 1: SD-R; 2: NH-M; 3: FV; 4: GCRV; 5: IHNV; 6: YTAV; 7: 阴性对照 Negative control.

图 2 单一 PCR 引物的特异性试验

Fig. 2 Specificity test of single PCR



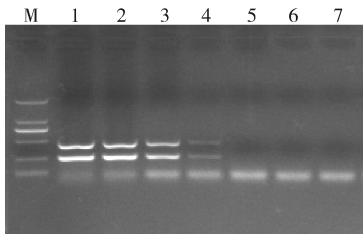
M: DL 1 000 DNA marker; 1: SD-R; 2: NH-M; 3: FV3; 4: GCRV; 5: IHNV; 6: YTAV; 7: 阴性对照 Negative control.

图 3 双重 PCR 引物的特异性试验

Fig. 3 Specificity test of duplex PCR

2.3 双重 PCR 方法的敏感性检测结果

经紫外分光光度计测得 SD-R 株和 NH-M 株 DNA 模板质量浓度分别为 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 145 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 将 2 种模板等量混合, 再进行 10 倍梯度稀释。对不同浓度混合模板进行双重 PCR 扩增后, 电泳显示在稀释度为 10^{-4} 时, 依然可以观察到清晰的特异性条带(图 4), 表明双重 PCR 反应能检测病毒的最低含量分别为 6.5 μg 和 14.5 μg 。



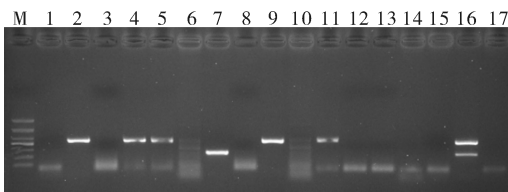
M: DL 2 000 DNA marker; 1~6: 稀释倍数从 10^{-1} 至 10^{-6} 的混合 DNA 模板 Dilution of mix DNA template from 10^{-1} to 10^{-6} ; 7: 阴性对照 Negative control.

图4 双重PCR敏感性试验

Fig. 4 Sensitivity test of duplex PCR

2.4 临床样品检测结果

运用双重PCR检测方法对采集的15个临床样品进行检测,其中6份样品扩增出特异性条带,5份为引物 Rana-mcp 检测阳性,1份引物 Mega-mcp 扩增阳性。全部临床阳性检测结果均进行了片段克隆和序列测定,测序后证实与 GenBank 中发表的序列(序列号:GU256635)一致。



M: DL 1 000 DNA marker; 1~15: 临床样品 Clinical samples; 16: 阳性对照 Positive control; 17: 阴性对照 Negative control.

图5 临床样品检测结果

Fig. 5 Results of duplex PCR detection for clinical samples

3 讨论

大口黑鲈虹彩病毒(largemouth bass ranavirus, LMBV; 又称 Santee-Cooper ranavirus, SCRV)通常指的是蛙病毒属虹彩病毒^[12]。1995年美国南卡罗莱纳州的 Santee-Cooper 水库养殖的大口黑鲈暴发鱼灾(fish kill)引起人们高度关注。该病毒的特点是不但可以导致大面积暴发疾病死亡引起鱼灾,也可以是不表现任何症状的隐性带毒^[13],因此对大口黑鲈健康养殖带来巨大威胁。2009年,邓国成等^[7]报道了大口黑鲈溃疡病是由虹彩病毒感染引起的,这是国内对大口黑鲈溃疡病毒性病原的首次报道。而虹彩病毒中另外一个重要的病毒属肿大细胞病毒属,对鱼的致病性更强,该类病毒引起的鱼类疾病呈逐年上升趋势,患病鱼死亡率达 30%~100%^[14-17]。马冬梅等^[9]研究证实大口黑鲈的肝脾肿大症由肿大细胞病毒属虹彩病毒引起,实验室大

口黑鲈攻毒试验显示 100% 死亡率。2 种不同种属虹彩病毒对大口黑鲈养殖的影响,引起我们对该类病原的高度关注。

在虹彩病毒中,研究比较清楚的结构蛋白是主要壳蛋白(major capsid protein, MCP)。MCP 占整个病毒粒子多肽的 40%~45%,是虹彩病毒粒子中丰度最高的蛋白,并且在虹彩病毒科中高度保守,因此可以利用 MCP 的同源性差异进行虹彩病毒分子进化方面的研究^[18]。1999年, Mao 等^[19]综合大口黑鲈病毒蛋白合成分析,限制性片段长度多态分析(restriction fragment length polymorphisms, RFLP), MCP 和 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DMet)基因序列分析的结果,明确了大口黑鲈虹彩病毒的分类地位为虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(Ranavirus)成员。Mao 等^[19]比较了 LMBV 与 FV3 等的 MCP 和 DMet 基因的氨基酸序列,以及它们的限制性内切酶图谱,结果显示 LMBV 与蛙病毒代表株 FV3 有一定差距。在国际病毒分类委员会第八次报告中将 LMBV 归类为蛙病毒属的 Santee-Cooper ranavirus 种^[20]。因此,本研究针对不同种属大口黑鲈虹彩病毒 MCP 设计引物进行检测,可以最大限度检测到病毒。由于 FV3 和 LMBV 属于蛙病毒属不同种,序列存在一定差异,本研究中引物 Rana-mcp 仅针对 LMBV MCP 特异性序列设计,因此该检测方法可以检测到 LMBV,不能检测到 FV3。本试验建立的双重 PCR 检测方法,可以在一个反应中同时检测大口黑鲈不同种属虹彩病毒的带毒或发病情况,PCR 产物经测序后证实与 GenBank 中发表的序列(序列号:GU256635)一致。

目前,在虹彩病毒的防治方面没有特效药物,我国也无商品化的虹彩病毒疫苗,因此,虹彩病毒的早期监测和诊断显得尤为重要。本研究建立的大口黑鲈虹彩病毒双重 PCR 检测方法,特异性和敏感性较好,可以同时检测蛙病毒属和肿大细胞病毒属虹彩病毒的带毒或发病情况,检测结果准确可靠,对实施大口黑鲈虹彩病毒监测工作具有借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] 李胜杰. 加州鲈养殖技术概述[J]. 内陆水产, 2008(9): 26-28.
- [2] 梁素娟, 白俊杰, 叶星, 等. 养殖大口黑鲈的遗传多样性分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 260-263.
- [3] 邓国成, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈池塘养殖常见病及其防治[J]. 广东农业科学, 2011, 38(18): 102.
- [4] 黄文芳, 陈红, 胡朝晖, 等. 鱼类镰刀菌的研究 I. 从大口黑鲈病

- 灶上分离的镰状镰刀菌的研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 345-351.
- [5] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 大口黑鲈烂身病病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 广东农业科学, 2011, 38(6): 126-128.
- [6] 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.
- [7] 邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871-877.
- [8] DENG G C, LI S J, XIE J, et al. Characterization of a ranavirus isolated from cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China [J]. Aquaculture, 2011, 312(14): 198-204.
- [9] 马冬梅, 邓国成, 白俊杰, 等. 大口黑鲈肝脾肿大病病原研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 654-659.
- [10] 马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 MCP 基因序列分析及 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1149-1155.
- [11] 马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 Taq-Man-MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(2): 99-102.
- [12] GRIZZLE J M, ALTINOK I, FRASER W A, et al. First isolation of largemouth bass virus [J]. Dis Aquat Organ, 2002, 50(3): 233-235.
- [13] GROOCCOCK G H, GRIMMETT S G, GETCHELL R G, et al. A survey to determine the presence and distribution of largemouth bass virus in wild freshwater bass in New York State [J]. J Aquat Anim Health, 2008, 20(4): 158-164.
- [14] HE J G, ZENG K, WENG S P, et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Aquaculture, 2002, 204: 11-24.
- [15] 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]. J Fish Dis, 2003, 26(10): 615-619.
- [16] JEONG J B, KIM H Y, JUN L J, et al. Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes [J]. Dis Aquat Organ, 2008, 78(3): 209-215.
- [17] WANG Q, ZENG W W, LI K B, et al. Outbreaks of an iridovirus in marbled sleepy goby, *Oxyleotris marmoratus*, cultured in southern China [J]. J Fish Dis, 2011, 34(5): 399-402.
- [18] TIDONA C A, SCHNITZLER P, KEHM R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution [J]. Virus Genes, 1998, 16(1): 59-66.
- [19] MAO J, WANG J, CHINCHAR G D, et al. Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. Dis Aquat Organ, 1999, 37(2): 107-114.
- [20] CHINCHAR V G, ESSBAUER S, HE J G, et al. The double stranded DNA viruses [C]//FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Virus taxonomy-8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press, 2005: 145-162.

A duplex PCR for detection of iridescent virus from largemouth bass, *Micropterus salmoides*

WANG Qing ZENG Wei-wei LIU Chun MA Dong-mei SHI Cun-bin WU Shu-qin

Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture/
Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Techniques,
Pearl River Fishery Research Institute/
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

Abstract In order to detect different species of iridescent virus from largemouth bass, two pairs of specific primers, named Rana-mcp and Mega-mcp with predicted products of 475 bp and 262 bp, were designed from sequences of major capsid protein (MCP) gene from *Ranavirus* and *Megalocytivirus*, respectively. The reaction conditions of the duplex PCR were optimized, and the specificity and sensitivity were further studied. The limit DNA of the duplex PCR for *Ranavirus* and *Megalocytivirus* were 6.5 pg and 14.5 pg, respectively. Using duplex PCR and sequencing methods, 15 clinical samples were tested and 5 positive samples from *Ranavirus* infection and 1 positive sample from *Megalocytivirus* infection were detected. The developed duplex PCR method based on MCP gene could be used for rapid diagnosis and epidemiology investigation on iridescent virus disease of cultured largemouth bass.

Key words largemouth bass; iridescent virus; *Ranavirus*; *Megalocytivirus*; MCP gene; duplex PCR

(责任编辑:边书京)