Tan M J, Zou Q Q, Liang Y L, *et al*. Grass carp reovirus infection on phenotypic morphology and immune gene expression in juvenile *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(8): 082616. [谭美杰, 邹青青, 梁玉林, 等. 草鱼呼肠孤病毒感染对草鱼幼鱼免疫基因和外部形态的影响 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(8): 082616.]

草鱼呼肠孤病毒感染对草鱼幼鱼免疫基因和外部形态的影响

谭美杰[1, 2, 3, 4] 邹青青[2, 3, 4, 5] 梁玉林[2, 3, 4, 5] 徐 镇[2, 3, 4, 5] 段 明[1, 2, 3, 4, 5]

(1. 西藏大学生态环境学院, 拉萨 850000; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 3. 水产品种创制与高效养殖全国重点实验室, 武汉 430072; 4. 智慧渔业湖北省重点实验室, 武汉 430072; 5. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本研究旨在探究人工注射草鱼呼肠孤病毒感染草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)幼鱼进程中病毒组织分布、外部形态变化与免疫应答的变化特征。实验采用人工腹腔注射GCRV-Ⅱ型YX-246毒株构建草鱼幼鱼感染模型, 采用qRT-PCR系统分析了感染后病鱼体内病毒及*IFN1*、*Mx2*、*IgM*、*MyD88*四个免疫基因的相对表达量, 利用图像处理技术量化病鱼的外部形态变化特征, 采用Spearman法分析形态指标与各组织病毒载量及免疫基因表达的相关性, 并通过一阶差分交叉相关分析法评估其时序同步性与滞后关系及交叉时序。结果显示, 感染组草鱼幼鱼于4d出现死亡, 累计死亡率100%。qRT-PCR分析发现病毒载量呈现显著组织嗜性, 肝脏和大脑为主要复制场所; 免疫基因表达呈现强烈组织特异性。外部形态量化结果显示, 体表出血面积百分比(P_{bs})和体色黑化面积百分比(P_{ds})均呈现“先升后降”趋势; 背鳍展开角度(A_{df})自3d起持续减小，在4d显著降低(P<0.05)。相关性分析结果表明, 大脑和肝脏中的病毒载量与*IgM*(r=0.79)等多个免疫基因呈强正相关, 同时免疫基因之间也存在强正相关关系(r=0.82—0.96); P_{bs}和P_{ds}强相关(r=0.79, P<0.05), P_{bs}、P_{ds}与多个组织中的病毒载量及免疫基因存在显著相关关系(r=0.86—0.96, P<0.05), A_{df}与肾脏和大脑中的*IgM*呈显著负相关关系(r=–0.79, P<0.05)。交叉相关分析发现, 在大脑中, P_{ds}与*MyD88*的表达波动呈高度同期相关性(r=0.80, P<0.05), P_{bs}(r=0.64)和A_{df}(r=0.69)的变化领先GCRV变化2d。本研究可为草鱼出血病的临床识别、快检模型建立及综合防控策略制定提供重要的数据支撑。

关键词: 草鱼出血病; 形态表型量化; 免疫基因; 图像处理技术; 相关性分析; 草鱼

中图分类号: S941.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)08-082616-13

doi: 10.3724/1000-3207.2026.2026.0085 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2026.0085

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是一种典型的草食性鲤科鱼类, 作为中国重要的水产养殖物种, 占中国淡水养殖总产量的17.45%, 其全球产量每年超过600万吨, 是中国消费量最大的淡水鱼之一[1]。然而, 草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)引起的草鱼出血病(Grass Carp Hemorrhagic Disease)对草鱼养殖构成了严重威胁, 这是一种常见且严重的病毒性疾病, 给水产养殖业带来重大经济损失[2, 3]。该病主要危害2.5—15 cm的草鱼幼鱼, 病死率极高, 尤其对1龄以内幼鱼的致死率高达90%以上[4]。

GCRV可分为3种基因型, 其中GCRV-Ⅱ型潜伏期短、毒力强, 是目前草鱼出血病主要流行的基因型[5—7]。该病毒传播迅速, 感染后4—15d内发病死亡, 常与细菌性疾病如烂鳃病等并发[8, 9]。GCRV

收稿日期: 2026-03-17; **修订日期:** 2026-04-15

基金项目: 中国科学院基础与交叉前沿科研先导专项(B类先导专项)(XDB0730100); 中国科学院“中央级科学事业单位改善科研条件专项资金”科研装备项目(GSZXKYZB2025082); 湖北省科技厅湖北省技术创新计划重点研发项目“长江流域生态保护技术创新专项”(2024BCB069); 国家重点研发计划“海洋农业与淡水渔业科技创新”重点专项“优质安全鱼类营养调控机制和精准饲料技术”课题(2023YFD2400605)资助 [Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB0730100); Scientific Research Equipment Program of the Chinese Academy of Sciences (GSZXKYZB2025082); Key Research and Development Program of Hubei Province (2024BCB069); the National Key R & D Program of China (2023YFD2400605)]

作者简介: 谭美杰(2000—), 女, 硕士研究生; 主要从事渔业智能技术与装备研究。E-mail: tanmeijie@ihb.ac.cn

通信作者: 段明(1981—), 男, 研究员; 主要从事渔业智能技术与装备研究。E-mail: duanming@ihb.ac.cn

©The Author(s) 2026. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

的流行具有明显的季节性特征, 主要在6—9月水温25—28℃时暴发[10]。鱼类被病毒感染后, 病毒会在其体内大量复制, 引起相关免疫基因的剧烈应答, 造成严重的组织病理学损伤。此外, 患病草鱼外部形态也发生了病变, 鳃盖内外、口腔内部、上下颌及眼眶边缘出血明显[8, 11], 同时伴随着体色变黑、烂鳍等症状。这些明显的外部形态病变特征可以作为识别鱼类健康状况的重要指标[12—15]。其中, 体表出血原因是病毒引起的鱼血管通透性和渗透性出血增多, 出现系统性损伤, 造成体表穿刺性出血[3, 16—18], 出血可能会因病程阶段的不同而存在差异[19]; 体色变暗则是由于病原感染引起免疫病理反应, 使鱼分泌一种抗炎激素诱导表皮黑素细胞功能性改变而引发鱼体变黑, 并降低其对感染的抵抗力[20]。目前已有对人工感染GCRV-Ⅱ型病毒的草鱼进行的研究, 但多聚焦于组织病理形态和免疫特征的研究, 缺乏对 GCRV感染进程中草鱼外部形态变化特征的定量描述。基于此, 本研究通过图像处理技术对患病草鱼的外部形态进行量化, 系统探讨感染进程中草鱼幼鱼外部形态变化的特征, 及其与病毒载量和免疫应答的可能关联, 为草鱼出血病临床识别和快速检测提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验鱼暂养

本实验采用来自中国科学院水生生物研究所官桥实验站培育的全同胞家系3月龄草鱼[n=120, 体长: (6.02±0.79) cm, 体重: (4.09±1.46) g], 分别放入3个配备壁挂式HBL-303过滤器(Sunsun, China)的60 L水箱中进行驯化2周, 每个水箱40尾。每日进行两次饲喂(10:00和18:00), 每日投喂量设定为鱼体重的2%, 小型浮性饵料(水分≤10%, 粗蛋白≥40%, 粗脂肪≥4%, 粗灰分≤15%, 粗纤维≤3%, 磷≥1%), 喂食1h后去除残留食物。光周期为12h:12h明/暗, 水的溶解氧和pH分别维持在(6±0.5) mg/L和7±0.5, 水温保持在28℃。

1.2 病毒和感染

草鱼在水箱中驯化2周, 过程中食用饲料和游泳正常, 无死亡或明显体表损伤, 随机选取6尾进行qRT-PCR测定, 被确认无健康问题后, 使用GCRV-Ⅱ毒株 GCRV-YX246, 进行人工感染。随机选择90尾鱼分为3个实验组(n=30), 腹腔内注射100 μL GCRV-YX246 (1×10^5 Copies/μg), 放入60 L水箱中。另外随机选择15尾健康草鱼作为对照组, 腹腔内注射等量的PBS, 放入另一水箱中。水温保持在28℃, 空气温度保持在30℃。连续观察10d, 记录草鱼死亡数量, 病毒注射前1d为感染0d。

1.3 草鱼幼鱼外部形态图像采集及量化

在感染病毒后, 对草鱼幼鱼外部形态进行采集。图像采集自病毒感染前一天起, 连续采集8d。在此期间, 每日随机选取30尾草鱼, 置于定制窄型透明亚克力鱼缸(尺寸: 200 mm×180 mm×30 mm)中, 缸内水深保持100 mm, 保持鱼体头部统一朝左。鱼缸底部贴附透明刻度标尺, 便于后续图像校准。采集平台主要设备包括尼康D810数码相机(Nikon, Japan)配105 mm f/2.8 G镜头、专用拍摄台、环绕式PVC白色卡纸背景及300 W顶灯(图 1)。相机固定于拍摄台正前方60 cm处, 顶灯固定于鱼缸前上方。拍摄过程中保持环境安静, 所有图像在同一环境下获取。图像以高分辨率(7360像素×4912像素)保存, 便于后续细节提取。

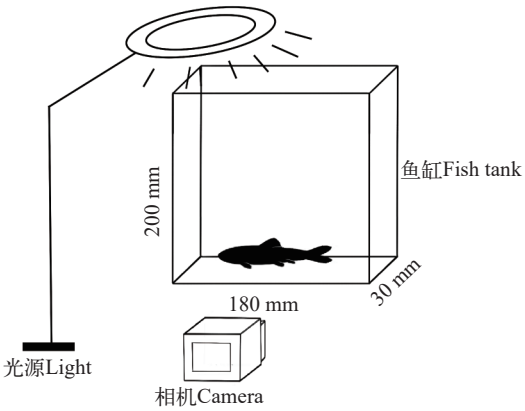


图 1 形态采集平台示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the juvenile *C. idella* morphology collection platform

为了量化形态变化, 本研究选取草鱼幼鱼的体表出血面积百分比P_{bs}、体表黑化面积百分比P_{ds}、背鳍展开角度A_{df}三个指标进行定量, 其中不将鳍条纳入P_{bs}、P_{ds}的测量过程中。

为量化感染草鱼幼鱼的体表出血情况, 首先对采集到的图像进行颜色增强, 再使用图像处理软件Image J, 分割鱼体及出血区域, 计算出血面积与鱼体侧面积比; 为量化感染草鱼幼鱼体表黑化进程, 使用图像处理软件Image J调节阈值范围, 操作界面会出现对应直方图, 因此将人工目视直方图的范围作为阈值调节判断依据, 覆盖选中鱼体黑化区域, 计算阈值化区域面积占鱼体侧面积比例。计算公式:

$$P_{bs}(\%) = A_b/A_f \times 100$$

$$P_{ds}(\%) = A_d/A_f \times 100$$

式中, P_{bs}为鱼出血面积百分比; A_b为出血面积;

A_f为鱼体侧面积; P_{ds}为黑化面积百分比; A_d为黑化区域面积。

背鳍展开角度为背鳍基部两端连线与背鳍最前端鳍条至基部连线之间的夹角(图 2), 重复三次测量取平均值。

1.4　组织采集

在感染的0、1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d随机选择3尾草鱼幼鱼(濒死鱼)使用丁香酚进行麻醉, 取完整的大脑、心脏、肝脏、肾脏组织, 储存在–80℃。

1.5　qRT-PCR

通过TRIzol试剂(Invitrogen, USA)提取大脑、心脏、肝脏、肾脏组织中总RNA。使用含随机引物/Oligo (dT)18引物混合液的HiScript Ⅲ 1st Strand cDNA合成试剂盒(Vazyme, China)对提取的RNA进行逆转录以获得cDNA。通过使用定量实时聚合酶链反应(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)测定病毒载量和4个免疫基因(*IFN1*、*Mx2*、*IgM*和*MyD88*)的相对表达量。*β-actin*在本研究中被用作内参基因[21], 所使用的引物如表 1所示。反应条件: 预变性95℃, 5min; 变性95℃, 10s; 退火60℃20s; 在72℃最终延伸30s, 共39个循环, 生物技术重复3次。GCRV和免疫基因的相对表达量通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算[22]。

1.6　数据统计

本研究使用SPSS 25.0版本软件进行统计分析, 并用GraphPad Prism 9.5.0 (La Jolla, San Diego, CA, USA)绘图。所有数据均以平均值±标准误(mean±SE)表示。实验数据先进行正态性检验。正态分布数据采用单因素方差分析(ANOVA), 采用LSD检验进行多重比较; 非正态数据采用Kruskal-Wallis检验。由于数据不符合正态分布, 形态指标与各组织病毒载量及免疫基因表达的相关性分析采用Spearman法, 并采用一阶差分交叉相关分析法评估各指标间的时序同步性与滞后关系。以$P<0.05$为显著差异。

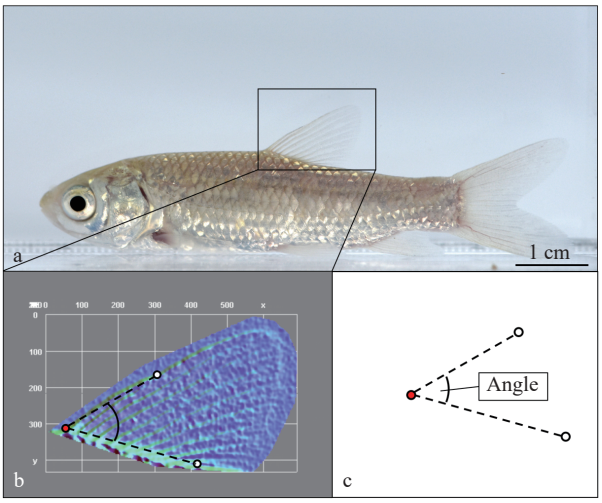


图 2　草鱼幼鱼背鳍展开角度测量示意图

Fig. 2　Schematic diagram of dorsal fin extension measurement in juvenile *C. idella*

a. 鱼体侧面图像; b. 经Imge J处理后的背鳍图像; c. 背鳍展开角度示意图

a. lateral image of the fish; b. dorsal fin image processed by Imge J; c. schematic of dorsal fin angle

2　结果

2.1　草鱼幼鱼的累计死亡率以及病毒载量变化特征

每天监测感染组和对照组。所有受感染的草鱼幼鱼10d内死亡率100%, 临床症状明显(图 3)。潜伏期约为3d, 感染后4d出现死亡, 7—10d为死亡高

表 1　本研究中使用的引物

Tab. 1　Primers used in this study

基因Gene	引物名称 Primer name	引物序列Primer sequence (5′—3′)
GCRV-YX246-S7	*GCRV-YX246-S7*-F	CGGACGACAAGATTGGGATACT
	GCRV-YX246-S7-R	CTATGCCAGCCAAGAAATTTATACTG
β-actin	*β-actin*-F	TCGGTATGGGACAGAAGGAC
	β-actin-R	GACCAGAGGCATACAGGGAC
IFN1	*IFN1*-F	AAGCAACGAGTCTTTGAGCCT
	IFN1-R	GCGTCCTGGAAATGACACCT
MyD88	*MyD88*-F	TGGAGGACTGTCGCCGAAATG
	MyD88-R	TGTGGCCTCTGGACGAGTTTC
IgM	*IgM*-F	CGGACTCGCTTACTTTC
	IgM-R	ATTGTATTTGCCACCTGA
Mx2	*Mx2*-F	ACATTGACATCGCCACCACT
	Mx2-R	TTCTGACCACCGTCTCCTCC

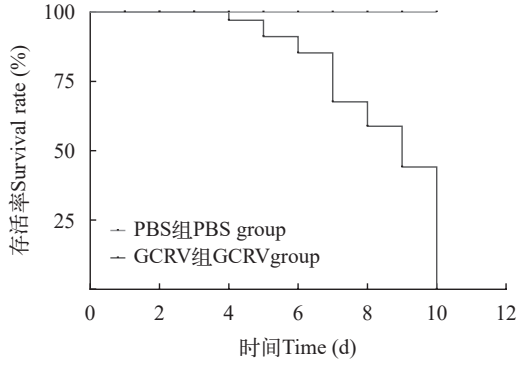


图 3　PBS组和GCRV组草鱼幼鱼的生存曲线

Fig. 3　Survival curves of juvenile *C. idella* in the PBS group and GCRV group

峰期。PBS组无死亡。

使用qRT-PCR法检测评估病毒在草鱼幼鱼体内的组织嗜性与复制的时序动态变化。首先, 以同一组织感染后1d的病毒相对表达量为归一化对照(图 4a)。结果显示, 感染1—7d内, 组织中的病毒相对表达量整体存在统计学显著差异(P<0.05)。进一步成对比较发现, 肾脏组织内病毒表达量变化不显著(P>0.05)。心脏组织中的病毒表达量总体维持在对照水平附近。大脑组织中的相对病毒载量总体呈现“先上升后下降”的显著趋势, 在感染后5—6d显著上升(P<0.05), 7d出现回落但依旧高于对照水平。肝脏组织中的病毒在感染后3d显著降低(P<0.05), 于4d上升后再次降低, 整个感染阶段始终维持在对照水平之下。

此外, 以同一时间点肾组织的相对病毒载量为归一化对照(图 4b), 发现同一时间点内4个组织之间的病毒相对表达量存在统计学显著差异(P<0.05)。在1d和5d, 组织中的病毒载量复制水平为肝脏>大脑>心脏>肾脏; 在2d、3d、4d、7d, 组织中的病毒载量复制水平为肝脏>大脑>肾脏>心脏。这说明, GCRV在草鱼幼鱼体内的高度组织特异性复制模式, 肝脏和大脑是其主要的复制场所。

2.2 草鱼幼鱼关键免疫基因表达

为探究GCRV感染草鱼幼鱼免疫基因的变化, 测定感染组的草鱼幼鱼肾脏、心脏、大脑、肝脏组织中*IFN1*、*Mx2*、*IgM*和*MyD88*基因的相对表达, 以同一组织感染后0d为对照。结果表明, 这4个免疫相关基因在感染后均被不同程度地诱导, 呈现出显著的组织特异性(图 5)。

*IFN1*基因在肾脏、心脏、大脑和肝脏组织中的相对表达量存在显著差异(P<0.05; 图 5a)。其中, 在肾脏、心脏和大脑组织中则呈典型的“先上升后下降”的趋势, 且均在感染后4d到达峰值, 7d下调至对照水平之下; 肝脏组织中的*IFN1*在整个感染阶段总体表达为波动式上调, 于7d显著上调至峰值(P<0.05), 且上调幅度最高。

*Mx2*基因在所有组织中被显著诱导(图 5b)。在肾脏、心脏和大脑组织中均表现为先上升再下降(P<0.05), 峰值出现时间集中在感染4—6d; 在肝脏组织中, *Mx2*表达呈波动上升的趋势, 在感染中后期维持在较高水平, 但时序差异变化不显著(P>0.05)。

大脑和肝脏组织中的*IgM*基因整体上具有统计学差异(P<0.05), 均在感染后期维持较高水平(图 5c)。肝脏组织中*IgM*与*Mx2*基因的调控表现出相似的变化, 于5d上调至峰值。脑组织中总体呈波动上升的趋势, 在感染后7d达到峰值。肾脏和心脏组织无统计意义(P>0.05)。

*MyD88*基因在大脑和肾脏组织中存在统计学显著差异(P<0.05), 呈先升后降趋势, 均在5d上调至峰值, 但成对比较发现在时序上差异不显著(图 5d)。在肝脏中, 该基因在感染后2d受到明显抑制(P<0.05), 总体水平低于对照。在心脏中, *MyD88*表达量无显著变化(P>0.05)。

2.3 草鱼幼鱼外部形态变化特征

本研究连续观察了感染组和对照组的草鱼幼鱼, 结果显示, 感染组的草鱼幼鱼体表症状明显(图 6): 体表出血明显, 多见于吻端、鳃盖、眼眶周

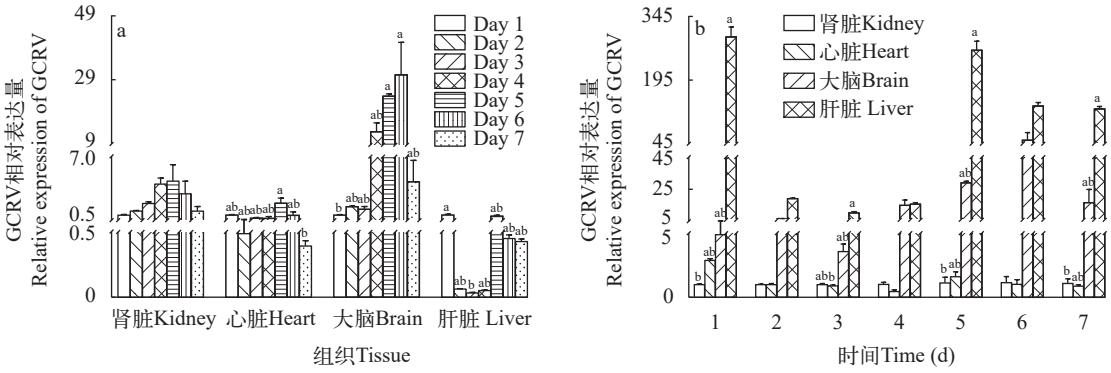


图 4 比较4个组织GCRV组在感染后1—7d的相对病毒载量

Fig. 4 Comparison relative expression of virus from 1—7 days post infection in four tissues of the GCRV group

a. 以同一组织第1天的相对病毒载量为归一化对照; b. 以同一时间点肾脏组织的病毒表达量为归一化对照; 柱形图上标注不同字母表示组间差异显著(P<0.05), 如‘a’与‘ab’、‘ac’差异不显著, 不同字母的组别如‘a’与‘b’‘c’差异显著; 下同

a. The viral load on day 1 of the same tissue is used as a control for normalization; b. The viral expression in the kidney tissue at the same time point are used as a control for normalization. Different letters on columns indicate significant differences (P<0.05), e.g., groups labeled with ‘a’and ‘ab’ or ‘a’ and ‘ac’ are not significantly different, whereas groups with no shared letters, such as ‘a’and ‘b’or ‘a’ and ‘c’, are significantly different; The same applies below

围、躯干部及鳍基部, 出血点呈散布或融合成小片状, 区域颜色以红色为主。部分个体出现鳞片脱落, 尤以尾部常见, 脱落处皮肤暴露, 呈灰紫色。头部及躯干局部可见黑色素沉积。随着感染进程推进, 体表出血点减少, 眼球表面、眼眶及躯干皮肤出现大量黑色素颗粒沉积, 体色发黑。鱼鳍尤其是背鳍和尾鳍发黑, 鳍边缘破损, 糜烂严重, 伸展功能明显受限(图 6)。对照组草鱼幼鱼体表完整, 无出血、溃烂或色素异常沉着现象, 各鳍形态较完整(图 2a), 活动状态正常。

由于实验过程中有鱼死亡, 最终用于0—7d形态数据分析的草鱼样本为22尾/d。本研究分析了感染组草鱼幼鱼体表病变特征, 结果显示, 各时间点之间的出血面积百分比(P_{bs})分布存在统计学显著差异(H=21.135, df=7, P<0.05)。鱼体P_{bs}总体上呈现先升后降的趋势(图 7a)。在感染后4d达到峰值(1.48±0.16)%, 并显著高于感染0d (0.76±0.09)%和7d (0.82±0.16)% (P<0.05)。此外, 不同感染天数下草鱼幼鱼黑化面积百分比(P_{ds})总体呈先上升后下降趋势(H=18.837, df=7, P<0.05; 图 7b), 于感染后5d升至峰值(40.00±1.61)%, 在整个感染阶段始终高于对照水平(32.51±1.80)%, 但成对比较发现其在时序上差异不显著(P>0.05)。

此外, 本研究还量化了PBS组和感染组草鱼幼鱼的背鳍展开角度(A_{df})。注射PBS的草鱼幼鱼在整个观察期内A_{df}未发生显著变化[F(7, 56)=1.384, P>0.05] (图 8a), 而感染组草鱼幼鱼A_{df}在感染后存在极显著差异(H=95.521, df=7, P<0.05; 图 8b)。经检验, 草鱼幼鱼A_{df}在感染后3d (38.07±1.42)°开始持续性降低, 5d (30.77±2.13)°显著低于对照水平(43.10±1.62)°(P<0.05), 7d (25.21±1.83)°显著低于感染早期阶段。由此表明, 病毒感染可导致草鱼幼鱼A_{df}显著且持续性降低。

2.4　草鱼幼鱼外部形态与病毒、免疫基因的相关性和时序分析

本文探究了3个形态学指标与4个组织中的病毒载量和免疫基因的关联(图 9)。病毒载量与免疫基因在多个组织中存在显著相关性(P<0.05), 且相关性呈显著的组织特异性。在肾脏、大脑和肝脏组织中, 病毒载量与多个免疫基因均呈显著正相关(P<0.05)。在肾脏组织中, 病毒载量与*IFN1* (r=0.79)和*MyD88* (r=1.00)强相关(图 9a); 在大脑中, 病毒载量与*MyD88* (r=0.79)强相关(图 9c); 在肝脏组织中, 病毒载量与*IgM* (r=0.79)强相关(图 9d)。此外, 免疫基因之间存在高度协同表达, 这种趋势在大脑和肝脏组织中最显著(P<0.05)。在肝脏组织中, *IFN1*与*IgM* (r=0.93)、*Mx2* (r=0.96)、*MyD88* (r=0.93)强相关, *IgM*与*Mx2* (r=0.86)强相关, *Mx2*与*MyD88* (r=0.86)呈强正相关(图 9d)。在大脑组织中, *Mx2*与*IFN1* (r=0.82)、*MyD88* (r=0.86)呈强正相关(图 9c)。

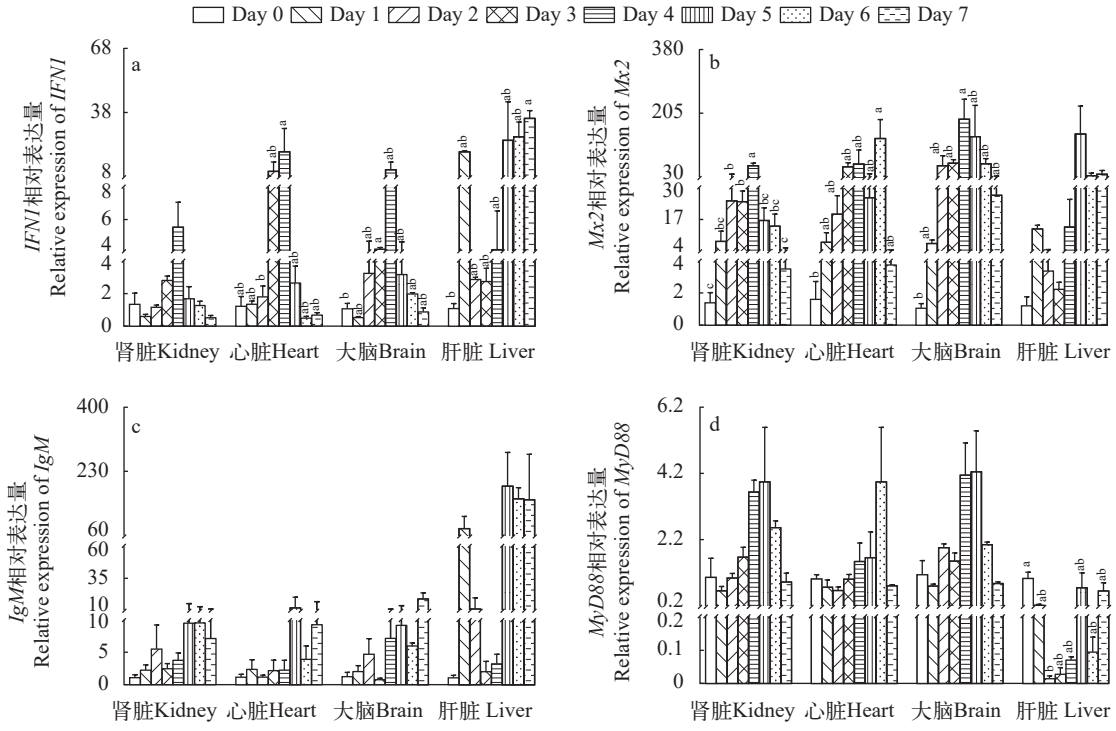


图 5　GRCV组草鱼幼鱼的4种免疫基因在感染后0—7d的相对表达量

Fig. 5　Relative expression of four immune genes from 0—7 days post infection in the GCRV group

出血面积百分比(P_{bs})、黑化面积百分比(P_{ds})、背鳍展开角度(A_{df})三个形态学指标之间, 仅P_{bs}和P_{ds}强相关(r=0.79, P<0.05)。形态学指标与病毒载量及免疫基因的相关性呈现明显的组织特异性(P<0.05)。P_{bs}与多个组织中的*IFN1*和*Mx2*强相关(r=0.89—0.96); P_{ds}与肾脏中的病毒(r=0.86)和*MyD88* (r=0.86)以及大脑组织中的*Mx2* (r=0.86)和*MyD88* (r=0.89)强相关; A_{df}与肾脏(r=–0.79)和大脑(r=–0.79)组织中的*IgM*强相关(P<0.05; 图 9c)。

为进一步明确病毒复制、免疫应答与形态损伤之间的时序先后关系, 采用一阶差分交叉相关分析法对关键指标进行分析。大脑组织同时参与激素调控与抗病毒免疫, 本研究以大脑为代表组织, 选择图 9c中关联度高的指标进一步分析时序同步性。交叉相关分析显示, 大脑组织中各形态指标与病毒和免疫指标的变化呈现出不同的时序关联性(图 10)。P_{ds}与*MyD88*的表达波动呈现高度的同期相关性(r=0.80, P<0.05; 图 10d), P_{bs} (r=0.64)和A_{df} (r=0.69)的变化领先GCRV变化2d左右(P>0.05; 图 10f和10h)。

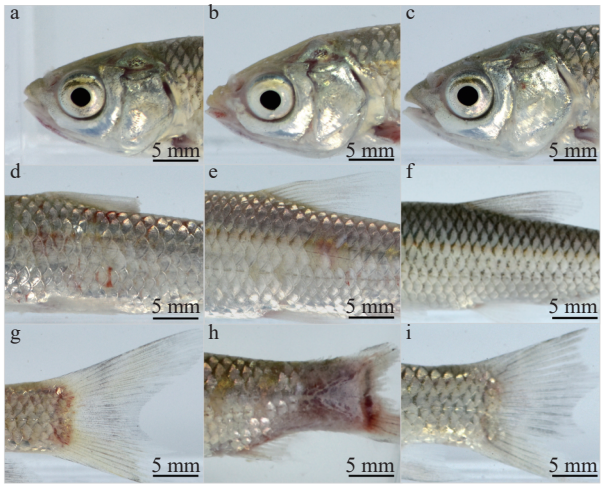


图 6 GCRV感染组草鱼幼鱼典型表型症状

Fig. 6 Typical phenotypic symptoms of juvenile *C. idella* in the GCRV group

3 讨论

3.1 草鱼幼鱼的累计死亡率及病毒载量变化特征

由GCRV引起的草鱼出血病传播快、致死率极高。有研究人员建立了带有GCRV-Ⅱ的草鱼感染模型和草鱼呼肠孤病毒四种人工感染方法, 研究结果发现草鱼累积死亡率约80%[21, 23]。本研究采用人工注射方法感染3月龄草鱼幼鱼, 发现在感染后4d出现死亡, 10d内死亡率100%, 而对照组无死亡。这一结果与刘林等[24]对草鱼的感染实验中第一次出现的死亡时间和高死亡率结果相似。

为了进一步阐明GCRV在草鱼幼鱼体内的复制动态模式, 本研究分析了病毒在肾脏、肝脏、心脏及大脑4个组织中的相对表达量。结果显示, 病毒在不同组织中复制动态呈现复杂的时序特征(图 4), 且具有明显的组织嗜性(图 5), 这与先前的研究结果一致[21, 23, 25]。Chen等[4]对大脑进行组织切片发现, 在感染后脑细胞逐渐脱落, 在感染5—7d出现大量脑细胞坏死、脑组织松弛及充血的现象, 而本研究中大脑组织中的病毒表达量总是高于同期的肾脏和心脏组织, 并在感染中后期, 病毒载量显著升高, 进一步证实了病毒主要在感染中后期于中枢神经系统富集的结论。肝脏组织中的病毒在感染后3d的增殖受到明显抑制, 推测是因为草鱼感染GCRV后, 肝脏中的干扰素诱导蛋白被显著诱导表达后快速进入抗病毒状态[26]。以往相关组织病理学研究表明[21], 草鱼在感染GCRV后3d肝脏已经出现肝细胞空泡化、核固缩和核增大等病理改变, 这与本研究中病毒复制受抑制和免疫应答激活的时期相符。此外, 肝脏组织中的病毒表达量总是显著高于同期的肾脏组织, 这与Zhang等[27]关于GCRV病毒在肝脏中的复制水平远高于肾脏的研究发现

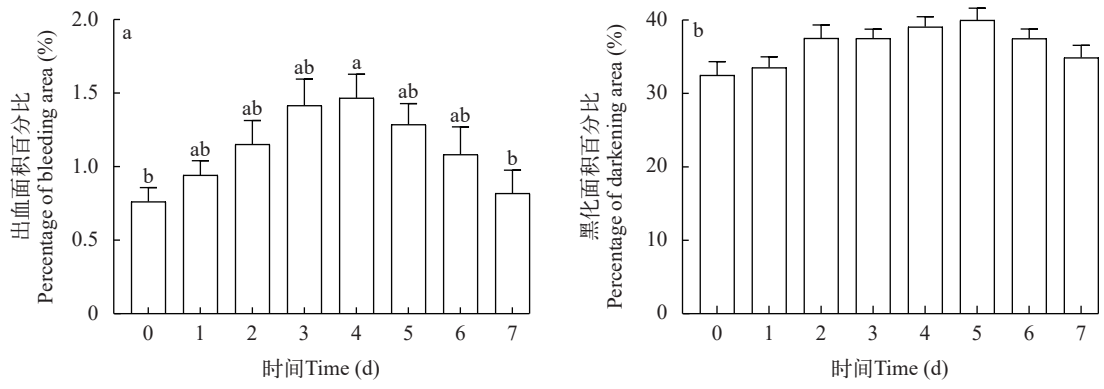


图 7 GCRV感染组在感染后0—7d体表出血面积百分比和黑化面积百分比

Fig. 7 Percentage of bleeding area and darkening area in the GCRV group from 0—7 days post infection

相符。肝脏作为主要的脂代谢器官, 其代谢解毒功能被削弱, 可能导致病毒在肝脏中能维持在相对较高水平[11]。

3.2　草鱼幼鱼关键免疫基因表达

本研究检测了感染组草鱼幼鱼大脑、心脏、肝脏和肾脏组织中*IFN1*、*MyD88*、*IgM*和*Mx2*基因的相对表达。结果显示, GCRV感染引发了多组织、多层次的抗病毒免疫应答, 先天性与适应性免疫均被有效激活, 但呈现出强烈的组织特异性与时序性差异。

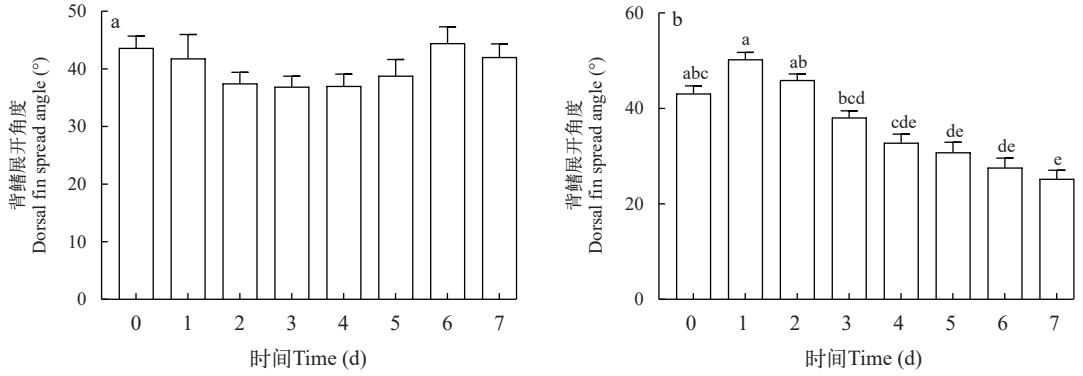


图 8　PBS组和GCRV感染组在感染后0—7d的背鳍展开角度

Fig. 8　Dorsal fin spread angle of the PBS group and GCRV group from 0—7 days post infection

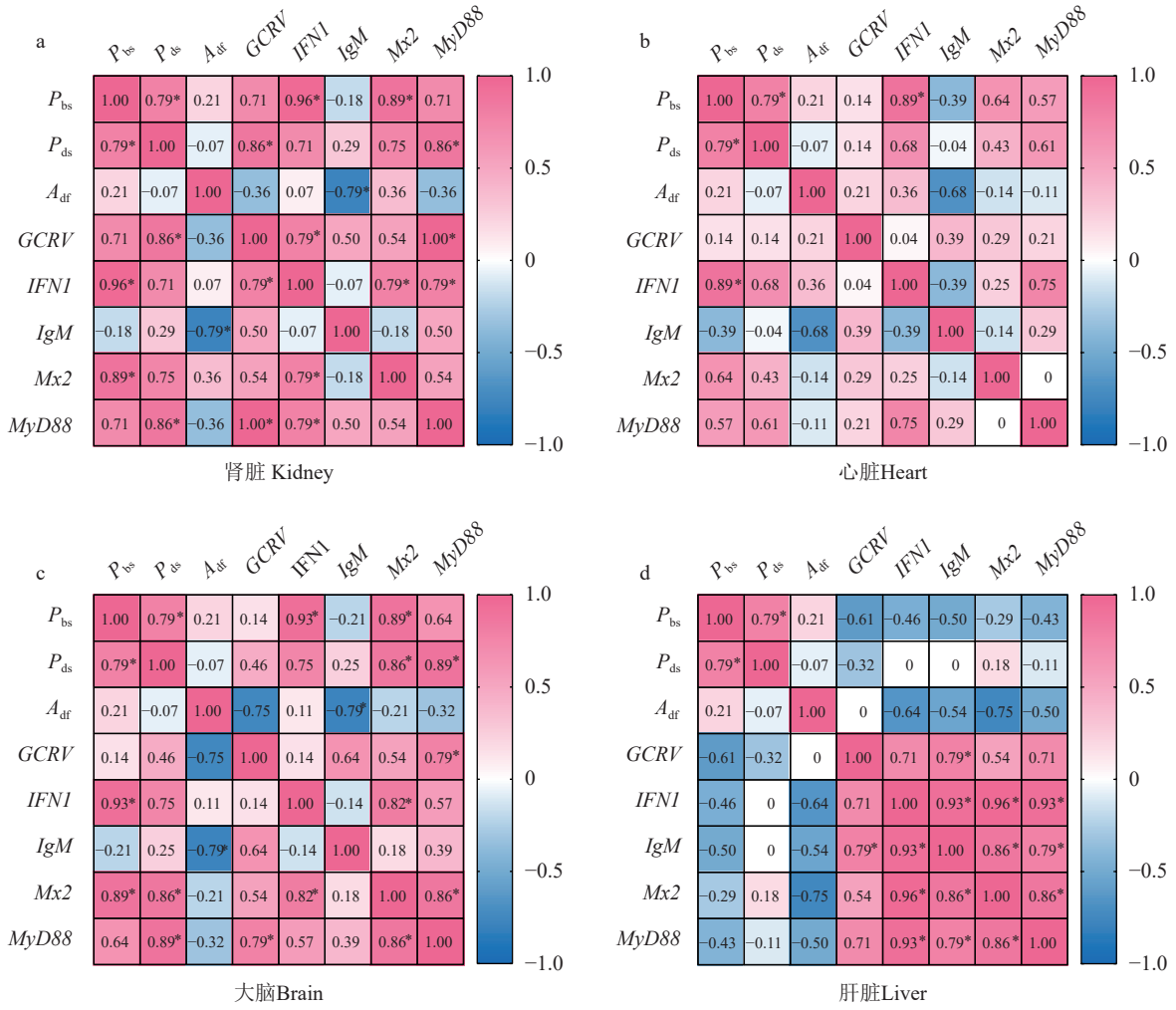


图 9　形态指标与病毒及免疫基因相关性热图

Fig. 9　Correlation heatmap of morphological indicators with viral load and immune gene expression

*P<0.05; 下同the same applies below

干扰素(Interferon, *IFN*)是一种广谱抗病毒细胞因子, 病毒感染后几小时内可快速响应[28, 29]。其中, *IFN1*被认为是鱼类先天性免疫中参与抗病毒免疫反应中最为重要的细胞因子之一[30, 31]。在本研究中, *IFN1*在多个组织中于感染后4d到达峰值, 表明其被快速诱导, 并启动先天性抗病毒免疫应答。后期*IFN1*普遍下调, 推测感染后期病毒的增殖被有效抑制, 为防止免疫过度造成机体损伤, 体内的*IFN*被负调控因子减弱[32]。而肝脏组织中的*IFN1*上调幅度最高、最持久, 可能与肝脏病毒高表达有关, 这有效激活其上游模式识别受体信号通路, 促使TANK结合激酶1 (TBK1)在肝脏中过度表达, 从而显著诱导了*IFN1*的上调[33]。

作为IFN1的下游效应分子之一的黏病毒抗性(Myxovirus resistance, *Mx*)基因, 可被*IFN1*快速诱导, 从而帮助宿主细胞快速建立抗病毒状态[31]。其中*Mx2*可以有效抑制GCRV在细胞中的增殖和复制, 是鱼类先天抗病毒免疫的效应分子[34, 35]。在本研究中, *Mx2*表达呈先升后降模式, 但整体表达呈上升趋势, 说明系统抗病毒分子被有效激活, 这与He等[36]的研究结果一致。肝脏中*Mx2*的表达随*IFN1*影响而波动上调, 并在后期维持较高水平, 这与*IFN1*在肝脏中被显著诱导的时序特征一致, 进一步证实了肝脏中先天性免疫应答被有效激活[33]。

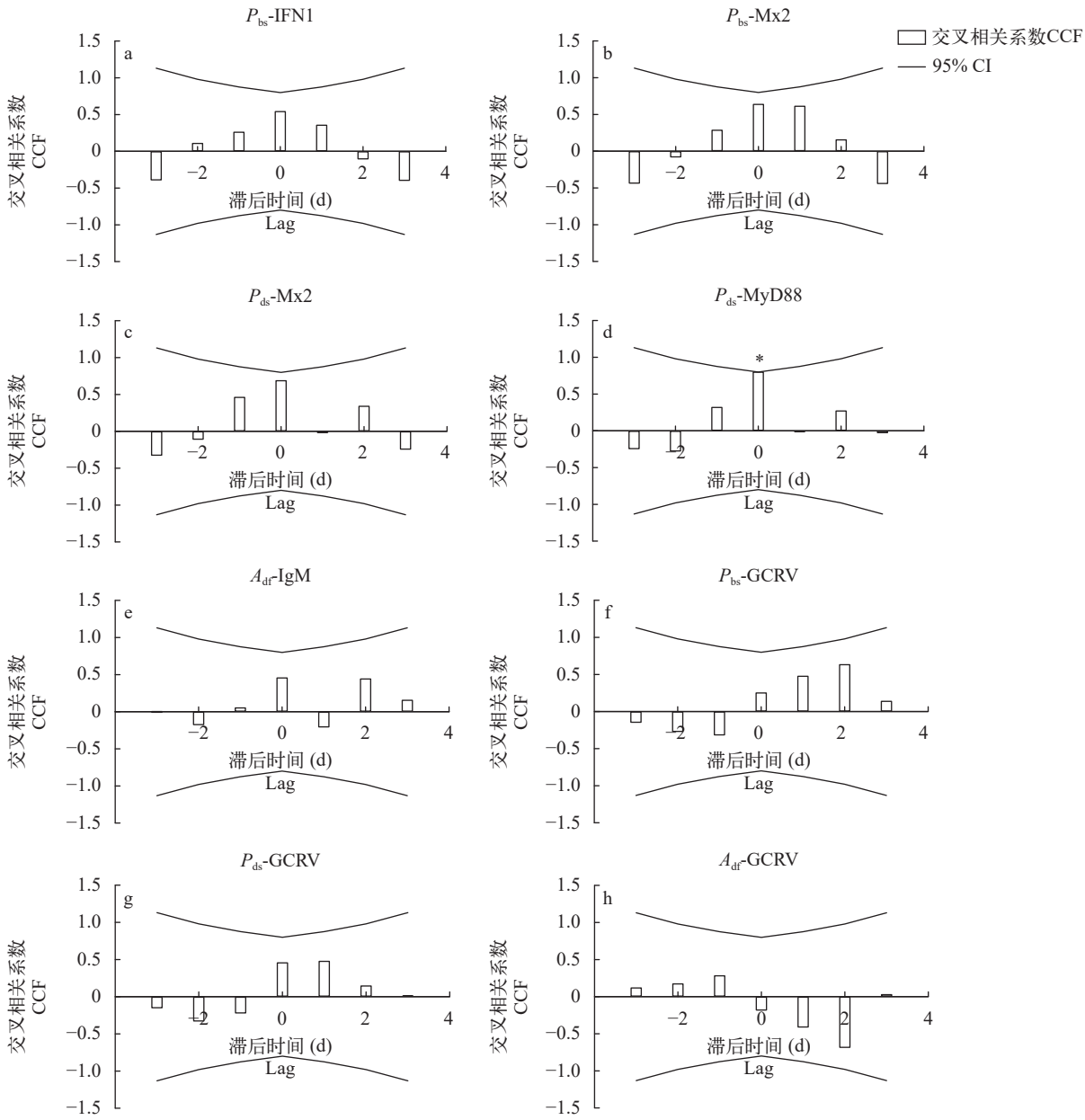


图 10 形态指标与病毒及免疫基因交叉相关分析图

Fig. 10 Cross-correlation analysis of morphological indicators with viral load and immune gene expression

免疫球蛋白M (Immunoglobulin M, *IgM*)是适应性免疫的代表基因[37], 在全身和黏膜组织中高度积累, 对特定体液免疫至关重要[38—40]。在本研究中, 肝脏中*IgM*基因在感染后5d上调至峰值, 此时, 病毒在肝脏中的表达量显著高于其他组织(图 5), 提示病毒引发了剧烈的局部体液免疫应答[40]。在大脑组织中, *IgM*表达在感染后7d上调达到峰值, 此时该组织中病毒相对表达量出现急剧下降, 提示感染鱼类适应性免疫可能成功建立, 促成了体内病毒载量降低[41]。肾脏和心脏组织中的*IgM*时序上无显著差异, 这与该组织中病毒稳定表达的情况相符。

髓样分化因子88 (Myeloid differentiation factor 88, *MyD88*)作为先天免疫的关键衔接蛋白, 参与启动促炎细胞因子的表达[42, 43], 在多种组织和病毒感染模型中均呈现动态表达, 并与病毒复制水平密切相关[44]。在感染过程中, 肝脏中的病毒相对表达量下降阶段观察到*MyD88*显著下调; 而病毒在上升至峰值后再次回落时期, *MyD88*也出现了相应的变化。这种时序变化一致性在肾脏和大脑组织中同样被观察到, 推测*MyD88*可能在鱼体抗病毒应答中发挥重要功能[45]。

3.3　草鱼幼鱼外部形态变化特征

目前的病害识别主要是基于图像处理技术对鱼体健康状况进行自动诊断, 大多通过机器学习方法来实现[46—54]。然而, 这一领域普遍面临鱼类形态的标准化数据库缺失, 缺乏统一定量分析的标准等瓶颈, 寻找直观且易于量化的生物学指标迫在眉睫。GCRV感染可能会改变鱼体内细胞形态并导致内皮屏障功能减退, 从而造成明显的体表出血损伤[18]。此外, 体色可作为反映动物健康状况的重要指标[55]。Ness和Foster[56]研究发现, 与健康的三刺棘鱼不同, 感染寄生虫固体吸虫的个体会出现皮肤褪色和眼睛变暗的现象, 且寄生虫体积越大, 这种体色变化越明显。对于草鱼而言, 体色变黑等同样是其感染GCRV后的典型临床症状之一[16, 57, 58]。研究发现, 感染组的草鱼幼鱼大部分体表出血明显, 且有明显的色素沉着, 并伴随着鳍条糜烂。进一步的定量分析发现, 感染组的草鱼幼鱼P_{bs}、P_{ds}和A_{df}具有显著且规律的变化。

感染组的草鱼幼鱼体表出血面积和黑化面积出现显著变化(P<0.05)。体表出血作为全身性血管损伤的直接体现, P_{bs}峰值出现在病毒大量复制期间, 进一步证实了病毒通过对内皮细胞的直接破坏, 增大了血管通透性而引发鱼体表渗血[59]。P_{bs}在感染后期降低, 推测是干扰素系统的快速响应抑制了病毒复制并减轻了炎症反应, 内皮细胞损伤减少, 从而表现为体表出血在4d后逐步缓解。另外, 在本研究中, 草鱼幼鱼体P_{ds}在整个感染阶段始终高于对照水平, 推测是急性病毒感染刺激使中枢神经系统调控分泌了α-MSH参与抗炎, 使得色素体数量增加, 导致皮肤色素沉着或变暗[60, 61]。

背鳍是鱼类重要的功能性特征, Bruno等[62]研究验证了背鳍角度变化可作为一种无创、直观的健康状态指标。为定量描述鳍尖锐性, Welsh等[63]提出了测量最长鳍条与相邻鳍两侧之间夹角的方法, 本研究参考该方法对背鳍展开角度进行测量。结果显示, 感染组草鱼幼鱼从感染后4d起, A_{df}持续显著降低, 而对照组保持稳定, 这表明实验操作及环境因素对测量的干扰有限, 感染组背鳍角度变化可能主要归因于病毒感染。基于此, A_{df}可作为可视化评估草鱼幼鱼健康状态的候选指标。本研究量化了草鱼幼鱼背鳍展开角度变化特征, 但鱼的背鳍展开角度由鳍条、肌肉协同调控[64], 其变化的深层机制可能涉及组织病理损伤、生理应激及行为适应性改变等多个层面, 需进一步系统研究。

3.4　草鱼幼鱼外部形态与病毒、免疫基因的相关性和时序分析

本研究对病毒载量、免疫基因表达与形态学指标在4个组织中的关联进行了系统分析, 结果发现各指标间存在显著相关, 且相关性呈现显著的组织特异性。

病毒复制水平直接驱动局部免疫应答强度, 而肝脏和大脑作为病毒主要富集场所, 病毒载量与多个免疫基因呈显著强正相关, 其免疫激活最为强烈, 肝脏和大脑中免疫基因间的高度协同表达, 进一步印证大脑和肝脏是GCRV的主要靶器官[4, 27]。A_{df}与肾脏和大脑组织中*IgM*呈显著负相关关系, 提示A_{df}在一定程度上反映了适应性免疫中*IgM*介导的体液免疫应答增强。在3个形态指标中, 仅P_{ds}与肾脏组织中的病毒强相关, 提示单一指标难以独立完成精准判定, 需结合多指标综合评估。时序关联表明, P_{ds}可同步反映*MyD88*介导的免疫激活, 而P_{bs}与A_{df}对病毒载量变化具有约2d的预警指示作用(图 10), 但统计效能不足, 可能与采样时间点少有关。尽管如此, 上述趋势仍提示A_{df}等形态指标对鱼体健康状态具有一定预警作用[62], 未来研究可适当增加采样频次, 基于形态指标与生理指标融合建模, 为草鱼出血病临床快速识别提供量化工具。

综上, 本研究通过人工注射GCRV感染草鱼幼鱼, 系统量化了感染进程中草鱼幼鱼病毒的组织分布、免疫基因表达及外部形态特征的动态变化, 并分析形态学指标与病毒和免疫基因相对表达量的

相关性。结果表明, GCRV感染激活了草鱼幼鱼多组织抗病毒免疫应答, 肝脏和大脑是GCRV入侵的主要靶器官, 其病毒表达量显著高于肾脏和心脏。相关性分析进一步证实, 病毒载量与多个免疫基因表达呈显著正相关, 且免疫基因间存在高度协同表达, 以肝脏和大脑组织中最为显著。此外, 体表出血面积百分比(P_{bs})、黑化面积百分比(P_{ds})和背鳍展开角度(A_{df})在感染中后期出现明显变化, 与部分组织中的病毒和免疫基因变化显著相关, 表明外部形态特征能够在一定程度上反映组织水平的病毒感染状态和免疫应答强度。但需要指出的是, 本研究采用的相对定量法无法获得病毒绝对拷贝数, 可能影响跨实验比较。此外, 各指标之间的相关性存在差异。因此, 在未来研究中, 需要考虑引入绝对定量的方法, 进一步分析各指标权重, 构建综合评估模型。本研究为草鱼出血病的临床识别、快检模型建立及综合防控策略制定提供了重要的数据支撑。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

[1] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2025 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2025: 30. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2025 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2025: 30.]

[2] Chen G, Xiong L, Wang Y M, *et al*. Different responses in one-year-old and three-year-old grass carp reveal the mechanism of age restriction of GCRV infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(86): 702-712.

[3] Su H, Su J G. Cyprinid viral diseases and vaccine development [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(83): 84-95.

[4] Chen J M, Chang O Q, Li Y, *et al*. Establishment of a rare minnow (*Gobiocypris rarus*) disease model for grass carp reovirus genotype Ⅱ [J]. *Aquaculture*, 2021(533): 736133.

[5] He L B, Zhang A D, Pei Y, *et al*. Differences in responses of grass carp to different types of grass carp reovirus (GCRV) and the mechanism of hemorrhage revealed by transcriptome sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 452.

[6] Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al*. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. *Journal of Virology*, 2012, **86**(22): 12466.

[7] Wang Q, Zeng W W, Yin L, *et al*. Comparative study on physical–chemical and biological characteristics of grass carp reovirus from different genotypes [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2016, **47**(6): 862-872.

[8] Wang F H, Li A X. Advances in research of hemorrhage of grass carp [J]. *South China Fisheries Science*, 2006, **2**(3): 66-71. [王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展 [J]. 南方水产, 2006, **2**(3): 66-71.]

[9] Wang Q, Wang K J. Research progress on hemorrhagic disease of grass carp and its vaccine [J]. *South China Agriculture*, 2014, **8**(36): 172-175. [王强, 汪开毓. 草鱼出血病及其疫苗研究进展 [J]. 南方农业, 2014, **8**(36): 172-175.]

[10] Sun T G. Diagnosis and comprehensive control of hemorrhagic disease of grass carp [J]. *New Agriculture*, 2022(9): 44-46. [孙田革. 草鱼出血病的诊断及综合防治 [J]. 新农业, 2022(9): 44-46.]

[11] Yang L, Su J G. Studies on pathological symptoms and virus distribution in natural and artificial injection infection *Ctenopharyngodon idella* with grass carp reovirus type Ⅱ [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(2): 250-260. [杨玲, 苏建国. 草鱼呼肠孤病毒Ⅱ型自然发病与人工注射感染草鱼的病理症状和病毒分布研究 [J]. 水产学报, 2022, **46**(2): 250-260.]

[12] Li H Y, Huang W F. A histopathological study on gill, liver and kidney of the bacterial gill rot disease in mandarinfish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Journal of South China Normal University* (Natural Science), 1999(3): 67-73. [李海燕, 黄文芳. 鳜细菌性烂鳃病的鳃、肝、肾组织病理研究 [J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 1999(3): 67-73.]

[13] Stien L H, Noble C, Madaro A, *et al*. Reviewing the severity of handling-induced injuries in the LAKSVEL protocol for salmon welfare [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2025, **17**(4): e70076.

[14] Zhang L, Jin D Q, Zhong T. Mechanisms of aggregation and dispersion of melanosomes in zebrafish skin [J]. *Biology Teaching*, 2022, **47**(10): 2-5. [张琳, 靳大庆, 钟涛. 斑马鱼皮肤黑色素小体聚集和分散的机制研究 [J]. 生物学教学, 2022, **47**(10): 2-5.]

[15] Wang Y F, Yuan H C. Fish disease detection method based on attention mechanism and GSConv-YOLOv8 [J]. *Fishery Modernization*, 2025, **52**(2): 118-125. [王怡飞, 袁红春. 基于注意力机制及GSConv-YOLOv8的淡水鱼鱼病检测方法 [J]. 渔业现代化, 2025, **52**(2): 118-125.]

[16] Tang Y F, Zeng W W, Wang Y Y, *et al*. Comparison of the blood parameters and histopathology between grass carp infected with a virulent and avirulent isolates of genotype II grass carp reovirus [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020(139): 103859.

[17] Wu M L, Li H Y, Chen X W, *et al*. Studies on the clinical symptoms, virus distribution, and mRNA expression of several antiviral immunity-related genes in grass carp after infection with genotype Ⅱ grass carp reovirus [J]. *Archives of Virology*, 2020, **165**(7): 1599-1609.

[18] Sun M X, Li Y L, Tang H, *et al*. GMPR2-MDA5 interac-

tion bridged the cell junction and anti-GCRV immune [J]. *Aquaculture*, 2024(591): 741152.

[19] Zhu X L, Jia L Z, Zhang M Y. Haemopathological study on latent and developing period of hemorrhagic disease of grass carp fingerlings [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1987, **11**(1): 59-66. [朱心玲, 贾丽珠, 张明瑛. 草鱼出血病潜伏期和发展期的血液病理研究 [J]. 水生生物学报, 1987, **11**(1): 59-66.]

[20] Gorgoglione B, Kotob M H, Unfer G, *et al*. First proliferative kidney disease outbreak in Austria, linking to the aetiology of black trout syndrome threatening autochthonous trout populations [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, **119**(2): 117-128.

[21] Wang H Y, Li Y M, Wang Q, *et al*. Establishment of different artificial infection method models for grass carp reovirus [J]. *Aquaculture*, 2025(599): 742162.

[22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

[23] Yang X, Jin S Z, Xiao T Y. A comparative study on the resistance of grass carp, barbel chub and hybrid F1 challenged with *Aeromonas hydrophila* and GCRV [J]. *Open Journal of Fisheries Research*, 2018, **5**(2): 64-75. [杨雄, 金生振, 肖调义. 草鱼、赤眼鳟及杂交F1对嗜水气单胞菌、GCRV的抗性比较研究 [J]. 水产研究, 2018, **5**(2): 64-75.]

[24] Liu L, Xu S Y, Li J H, *et al*. Evaluation of immune efficacy of GCRV vp6 DNA vaccine [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, **19**(5): 841-847. [刘林, 徐诗英, 李婧慧, 等. 草鱼出血病病毒vp6核酸疫苗的免疫效果评估 [J]. 中国水产科学, 2012, **19**(5): 841-847.]

[25] Zhang Y, Shi J Y, Lu Y T, *et al*. Molecular cloning and characterization of scavenger receptor class B type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and its expression profile following grass carp reovirus challenge [J]. *Fishes*, 2024, **9**(7): 276.

[26] Yuan X M, Xu L W, Huang L, *et al*. Prokaryotic Expression of recombinant interferon IFNγ of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its anti-GCRV effects [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, **30**(7): 1348-1356. [袁雪梅, 徐铃威, 黄雷, 等. 重组草鱼干扰素IFNγ原核表达及其抗GCRV效果 [J]. 农业生物技术学报, 2022, **30**(7): 1348-1356.]

[27] Zhang K, Liu W, Li Y, *et al*. Isolation, identification, and genomic analysis of a novel reovirus from healthy grass carp and its dynamic proliferation in vitro and in vivo [J]. *Viruses*, 2021, **13**(4): 690.

[28] Zhang Y L, Xu L L, Zhang Z, *et al*. Enterovirus D68 infection upregulates SOCS3 expression to inhibit JAK-STAT3 signaling and antagonize the innate interferon response of the host [J]. *Virologica Sinica*, 2023, **38**(5): 755-766.

[29] Zhang Y B, Yu X M. Progress of studies on fish interferon [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(3): 97-101. [张义兵, 俞小牧. 鱼类干扰素的研究进展 [J]. 中国水产科学, 2000, **7**(3): 97-101.]

[30] Zhou Z L, Hamming O J, Ank N, *et al*. Type III interferon (*IFN*) induces a type I *IFN*-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases [J]. *Journal of Virology*, 2007, **81**(14): 7749-7758.

[31] Li Y S, Ding G Y, Zhang S H, Guo H Z, *et al*. Antiviral innate immune function of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) *IFNe2* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2024, **48**(5): 059405. [李由申, 丁广义, 张书环, 等. 中华鲟IFNe2的抗病毒天然免疫作用 [J]. 水产学报, 2024, **48**(5): 059405.]

[32] Chen D D, Jiang J Y, Lu L F, *et al*. Zebrafish *Uba1* degrades *IRF3* through K48-linked ubiquitination to inhibit *IFN* production [J]. *Journal of Immunology*, 2021, **207**(2): 512-522.

[33] Wang B, Zhou M, Lin Y S, *et al*. *TBK1* regulates the induction of innate immune response against GCRV by phosphorylating *IRF3* in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021(115): 103883.

[34] Fernández-Trujillo M A, García-Rosado E, Alonso M C, *et al*. *Mx1*, *Mx2* and *Mx3* proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show in vitro antiviral activity against RNA and DNA viruses[J]. *Molecular Immunology*, 2013, 56(4): 630-636.

[35] Sun C, Liu Y, Hu Y, *et al*. Gig1 and Gig2homologs (CiGig1 and CiGig2) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) display good antiviral activities in an IFN-independent pathway [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, **41**(4): 477-483.

[36] He Y, Zhu W, Xu T, *et al*. Identification and immune responses of thrombocytes in bacterial and viral infections in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(123): 314-323.

[37] Jiang C L, Huo X C, Tang L J, *et al*. Oral PLGA-based DNA vaccines using interferons as adjuvants remarkably promote the immune protection of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against GCRV infection [J]. *Water Biology and Security*, 2023, **2**(2): 100143.

[38] Sheng X Z, Qian X Y, Tang X Q, *et al*. Polymeric immunoglobulin receptor mediates immune excretion of mucosal IgM-antigen complexes across intestinal epithelium in flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018(9): 1562.

[39] Ye J M, Wang Y H, Ding M M, *et al*. Structure and function of *IgM* and humoral immune response in teleost fish [J]. *Journal of South China Normal University* (Natural Science), 2015, **47**(5): 1-8. [叶剑敏, 王玉红, 丁明媚, 等. 硬骨鱼*IgM*结构和功能及其体液免疫应答 [J]. 华南师

范大学学报(自然科学版), 2015, **47**(5): 1-8.]

[40] Madyod S, Pholmai S, Prombanchong T, *et al*. Dietary β-glucan from the marine diatom *Chaetoceros muelleri* enhances immune responses and resistance of Nile tilapia to tilapia lake virus infection [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2026: e70184.

[41] Huang Z Y, Liu N C, Xue M Y, *et al*. Immunoglobulin M response in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) following ranavirus infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2025(16): 1515684.

[42] Hosseini R, Lamers G E M, Bos E, *et al*. The adapter protein *Myd88* plays an important role in limiting mycobacterial growth in a zebrafish model for tuberculosis [J]. *Virchows Archiv*, 2021(479): 265-275.

[43] Brinson C W, Lu Z, Li Y, *et al*. Lipopolysaccharide and IL-1β coordinate a synergy on cytokine production by upregulating MyD88 expression in human gingival fibroblasts [J]. *Molecular Immunology*, 2016(79): 47-54.

[44] Wang R H, Li W, Xiao T Y, *et al*. Molecular cloning, characterization and expression of *MyD88* in *Squaliobarbus curriculus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(3): 459-466. [王荣华, 李伟, 肖调义, 等. 赤眼鳟*MyD88*基因cDNA克隆与表达特性研究 [J]. 水生生物学报, 2016, **40**(3): 459-466.]

[45] Jeyakanesh J T, Tharanga E M T, Sirisena D M K P, *et al*. Molecular characterization and functional analysis of MyD88 in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*): Insights into immune regulation and antiviral defense [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2025(165): 110499.

[46] Chakravorty H, Paul R, Das P. Image processing technique to detect fish disease [J]. *Statistics in Medicine*, 2015, **9**(2): 121-131.

[47] Jiang R, Zhang J, Liao Z W, *et al*. Temperature-regulated type II grass carp reovirus establishes latent infection in *Ctenopharyngodon idella* brain [J]. *Virologica Sinica*, 2023, **38**(3): 440-447.

[48] Lyubchenko V A, Matarneh R, Kobylin O, *et al*. Digital image processing techniques for detection and diagnosis of fish diseases [J]. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, 2016, **6**(7): 79-83.

[49] Wang W Z. Application of vision technology in aquaculture [J]. *Fishery Guide to Be Rich*, 2019(21): 28-29. [汪文忠. 视觉技术在水产养殖中的运用 [J]. 渔业致富指南, 2019(21): 28-29.]

[50] Zhang Q, Zhang R M, Chen B. Research review of image recognition technology based on deep learning [J]. *Journal of the Hebei Academy of Sciences*, 2019, **36**(3): 28-36. [张琦, 张荣梅, 陈彬. 基于深度学习的图像识别技术研究综述 [J]. 河北省科学院学报, 2019, **36**(3): 28-36.]

[51] Yang X, Wang Z, Zhao W, *et al*. Development and testing of real-time detection system for fish diseases [J]. *Journal of Chinese Agricultural Mechanization*, 2023, **44**(11): 130-137. [杨霄, 王朕, 赵伟, 等. 鱼病实时检测系统的研制与试验 [J]. 中国农机化学报, 2023, **44**(11): 130-137.]

[52] Chen K. Research on a lightweight non-destructive testing model for crucian carp diseases based on machine vision and improved YOLOv5s [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Science and Technology, 2024: 25-42. [陈科. 基于机器视觉和改进YOLOv5s的鲫鱼病害轻量级无损检测模型研究 [D]. 杭州: 浙江科技大学, 2024: 25-42.]

[53] Yu G Y. Study on automatic of surface diseases in cage cultured fish based on deep learning [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023: 21-28. [于港怿. 基于深度学习的网箱养殖鱼类体表疾病自动监测研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2023: 21-28.]

[54] Li X F, Zhao S L, Chen C L, *et al*. YOLO-FD: an accurate fish disease detection method based on multi-task learning [J]. *Expert Systems with Applications*, 2024(258): 125085.

[55] Hill G E. Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes [J]. *Ecology Letters*, 2011, **14**(7): 625-634.

[56] Ness J H, Foster S A. Parasite-associated phenotype modifications in threespine stickleback [J]. *Oikos*, 1999, **85**(1): 127-134.

[57] Xu B H, Zhong L, Liu Q L, *et al*. Characterization of grass carp spleen transcriptome during GCRV infection [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, **15**(2): 15026650.

[58] Zhang L, Liu Q. Research progress and immune prevention of hemorrhagic disease in grass carp [J]. *Contemporary Aquatic Products*, 2022, **47**(3): 64-66. [张莉, 柳芹. 草鱼出血病的研究进展及免疫防治 [J]. 当代水产, 2022, **47**(3): 64-66.]

[59] Duan W, Tang H, Sun M X, *et al*. Study on functional mechanisms of AC3-mediated GCRV infection in *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Journal of Fisheries Research*, 2024, **46**(6): 563-571. [段伟, 唐浩, 孙明雪, 等. AC3介导草鱼GCRV感染的功能机制研究 [J]. 渔业研究, 2024, **46**(6): 563-571.]

[60] Vissio P G, Darias M J, Di Yorio M P, *et al*. Fish skin pigmentation in aquaculture: The influence of rearing conditions and its neuroendocrine regulation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021(301): 113662.

[61] Lipton J M, Catania A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator α-MSH [J]. *Immunology Today*, 1997, **18**(3): 140-145.

[62] Camargo-dos-Santos B, Carlos C L, Favero-Neto J, *et al*. Welfare in Nile tilapia production: dorsal fin erection as a visual indicator for insensibility [J]. *Animals*, 2021, **11**(10): 3007.

[63] Welsh D P, Fuller R C. Influence of sex and habitat on the size and shape of anal and dorsal fins of the black-

stripe topminnow *Fundulus notatus* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, **86**(1): 217-227.
[64] Jayne B C, Lozada A F, Lauder G V. Function of the dorsal fin in bluegill sunfish: Motor patterns during four distinct locomotor behaviors [J]. *Journal of Morphology*, 1996, **228**(3): 307-326.

GRASS CARP REOVIRUS INFECTION ON PHENOTYPIC MORPHOLOGY AND IMMUNE GENE EXPRESSION IN JUVENILE *CTENOPHARYNGODON IDELLA*

TAN Mei-Jie[1, 2, 3, 4], ZOU Qing-Qing[2, 3, 4, 5], LIANG Yu-Lin[2, 3, 4, 5], XU Zhen[2, 3, 4, 5] and DUAN Ming[1, 2, 3, 4, 5]

(1. *School of Ecological and Environmental Sciences*, *Xizang University*, *Lhasa* 850000, *China*; 2. *Institute of Hydrobiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*; 3. *State Key Laboratory of Breeding Biotechnology and Sustainable Aquaculture*, *Wuhan* 430072, *China*; 4. *Hubei Key Laboratory of Smart Fisheries*, *Wuhan* 430072, *China*; 5. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: This study aimed to investigate the tissue distribution of grass carp reovirus (GCRV), external morphological alterations, and immune responses in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) following experimental injection. Fishes were challenged with GCRV type Ⅱ strain YX-246 by intraperitoneal injection. The relative expression of viral and relevant immune genes in diseased fish during infection were systematically analyzed using qRT-PCR, and image processing techniques were employed to quantify the external morphological changes. Spearman correlation analysis was performed to assess the relationships between morphological indicators and viral/immune gene expression. Temporal synchrony and lead–lag relationships were further evaluated by cross-correlation analysis following first-order differencing of the time series. Mortality in the GCRV group occurred on day 4 post infection (dpi), with a cumulative mortality rate of 100%, while there were no deaths in the PBS group. Viral load demonstrated significant tissue tropism, with the liver and brain being the main sites of replication. Immune gene expression patterns demonstrated pronounced tissue specificity. *IFN1* exhibited persistent upregulation in the liver, reaching its maximum amplitude at 7 dpi, whereas in the kidney, heart, and brain, it followed an "upregulation then downregulation" trajectory, peaking at 4 dpi. *Mx2* was significantly induced across all tissues, with the strongest response observed in the brain during the viral load peak period. *IgM* expression was notably upregulated in the liver and brain during late infection, achieving peak expression at 5 dpi and 7 dpi, respectively. *MyD88* dynamics in the kidney and brain aligned with viral replication patterns, yet it was suppressed in the liver and showed no significant variation in the heart. Correlation analysis revealed that viral load was significantly positively correlated with the expression of multiple immune genes. Quantification of external morphology revealed that the percentage of bleeding area (P_{bs}) peaked at 4 dpi; the percentage of darkening area (P_{ds}) reached its peak at 5 dpi; and the dorsal fin spread angle (A_{df}) began to decrease persistently at 3 dpi and became significantly lower than the control level at 5 dpi (P<0.05). Furthermore, both P_{ds} and A_{df} showed significant correlations with viral load and immune gene expression, indicating that external morphological characteristics can effectively reflect viral infection status and immune response intensity at the tissue level. Cross-correlation analysis revealed that in the brain, fluctuations in P_{ds} and *MyD88* expression exhibited a strong synchronous correlation (r=0.80, P<0.05), whereas changes in P_{bs} (r=0.64) and A_{df} (r=0.69) preceded changes in GCRV by approximately 2 days. Studies have shown that GCRV infection causes significant and regular changes in the morphological phenotype of juvenile *C. idella*, which are highly synchronized with key periods of immune response. However, correlations among the indicators varied, necessitating further analysis of their respective weights to construct a comprehensive evaluation model. By integrating standardized image acquisition with quantitative image analysis, this study correlates morphological features with viral load and immune gene expression, providing important data support for the clinical identification of GCHD, the development of rapid detection models, and the formulation of comprehensive prevention and control strategies.

Key words: Grass carp reovirus (GCRV); Morphological phenotype quantification; Immune gene; Image processing technique; Correlation analysis; *Ctenopharyngodon idella*