

櫻花鈎吻鮭之細菌、 黴菌和病毒之研究(一)

The Study of Fungi, Bacteria and Viruses of
Oncorhynchus masou (Brevoort) (I)

徐 亞 莉 陳 博 勳
簡 秋 源 吳 金 洌 周 延 鑫
張 崑 雄

中華民國七十六年八月

計劃編號 (76 農建-12.2-林-42(5))

誌 謝

本計劃承蒙農委會之大力支持提供研究經費（76 農建 - 12. 2- 林 - 42(5)），始克完成初步調查研究，本計劃所有研究人員謹此表示謝意。對於武陵農場張場長民善先生，水產試驗所鹿港分所余所長廷基先生提供資料和援助，使得報告得以順利完成，謹致最大之謝意。

摘 要

武陵農場之櫻花鉤吻鮭復育中心于七十五年繁殖季節，開始魚病調查。七尾死亡之成魚，分別作病毒、細菌和黴菌之檢驗。魚卵和魚苗亦作病毒檢驗。發現有一尾內臟潰爛小魚感染呼腸孤病毒。另外二尾魚感染了一些細菌，多是腸內菌，無病原細菌，但另三尾魚，體外有水黴菌感染，是細囊水生菌，屬雙鞭毛菌綱。其他魚卵和魚苗都未發現病毒。

目 錄

誌 謝.....	I
摘 要.....	II
緒 言.....	1
材料和方法.....	2
結 果.....	5
討 論.....	13
參考文獻.....	15

櫻花鈎吻鮭之黴菌、 細菌和病毒之研究(一)

徐亞莉、陳博勳、簡秋源、吳金洌、周延鑫、張崑雄

緒 言

臺灣大甲溪上游，武陵農場轄區內擁有陸封性鮭魚 (land-mocked salmon)——亦即櫻花鈎吻鮭 (*Oncorhynchus masou* Brevoort)，早在民國六年，臺灣總督府技手青木赳雄先生即發現此魚 (興儀喜宣，中村廣司，1938)。但目前已臨絕種邊緣。故政府于民國七十三年，將其列爲國寶魚，並建復育保護中心，加強復育工作。前年開始由臺灣水試所鹿港分所支援人工孵化工作，由 3682 粒卵孵化出 1371 尾魚，去年採卵 10774 粒，孵化出 7316 尾。故前年孵化率爲 37.24%，去年爲 67.90%，表示孵化技術進步，抑或種魚選擇較好。但前年的只剩 78 尾，死亡率達 94.31%，而去年孵化的魚剩 768 尾，死亡率達 89.6%，多半在卵以及幼魚時期死亡。

茲爲研究爲何有這樣高的死亡率和如此低的孵化率。遂希望由魚病—黴菌、細菌及病毒等寄生情形着手研究，本實驗室遂於去年加入武陵農場櫻花鈎吻鮭之疾病調查研究，期早期發現疾病，及時治療及防治以減少因疾病而致死的機率，進而達到復育成功的目的。

材 料 與 方 法

水黴菌之培養：水黴菌在魚體表面，可看到白色菌絲，將菌絲取出放在查氏培養基 (Sabouraud dextrose agar) 或愛默生培養基 (Emerson's YpSs agar) (Chien, 1981; Tuite, 1969) 上生長，然後再將培養皿上之菌絲挑出，接種在亞麻種子液培養於 16°C，經一週後，即可開始觀察其形態和生活史，以作為分類鑑定之用。

細菌培養：魚體有潰爛者，經解剖，將其內臟包括肝、心、脾等作細菌培養，劃線在 TSA plate 上，培養在 25°C 下，當菌落出現後，作細菌的生化鑑定。

細胞培養：Chinook salmon embryo (CHSE-214) cells (Nims *et al.*, 1970), Bluegill fry (BF-2) (Wolf & Quimby, 1966), Brown bullhead (BB) (Wolf & Quimby, 1969), Channel catfish ovary (CCO) (Bowser & Plumb, 1980), Atlantic salmon (AS) (Nicholson & Byrne, 1973), Epithelioma papillosum cyprini (EPC) (Tomasec & Fijan, 1971), Fathead minnow (FHM) (Gravell & Malsberger, 1965), Grouper kidney (GK) (Nicholson *et al.* 1987), Milkfish heart (MHR) (Wu J. L. & Y. L. Hsu unpubl. data), Perch heart (PH) (Nicholson *et al.* 1987), Perch liver (PL) (Nicholson *et al.* 1987), Rainbow trout gonad (RTG-2) (Wolf & Quimby, 1962), 和 Tilapia ovary (TO-2) (Chen *et al.*, 1983) 這些魚類細胞株都用 Eagle's Minimum Essential Medium 培養，而 TO-2 用 L-15 培養。此外培養基

都含 10%胎牛血清 (fetal bovine serum, Gibco), 100 IU/ml penicillin (Gibco), 100 μ g/ml streptomycin (Gibco), 25 μ g/ml gentamycin (Gibco), 2.5 μ g/ml fungizone (Squibb; E. R. Squibb & Sons. Inc. USA), 及 5 ml/l 7.5% NaHCO_3 。培養在 20°C 下的有 CHSE-214, RTG-2 和 AS, 其餘培養在 25°C 下。

病毒分離：分離方法和 Hill (1976), Meyer (1979) 及 Adaire & Ferguson (1981) 等所用方法相似。將櫻花鉤吻鮭之未孵化卵、死亡之魚苗或魚體取出之內臟，加 10 倍體積含加倍濃度抗生素之培養基，剪碎暨磨碎使成均質後在 2,000 $\times$ g 下離心 10 分鐘，上澄液用 0.45 μ m millipore 過濾膜過濾，置 4°C 下過夜，將此濾液接種在已長滿單層細胞之 24 孔平板 (24 well TC plate, Greiner)，接種時分別採用 CHSE-214, AS, BF-2 和 CCO 四種細胞株。然後置於 18°C 下培養，每天觀察，至第 14 天可看到 cytopathic effect (CPE)，至完全 CPE，以 0.2 μ m 過濾膜過濾後，感染另一新長滿單層之細胞株，俟確定因病毒增殖而引起 CPE 時，作 Plaque assay，篩選病毒斑，作病毒株之純化，再測病毒感染力價 (TCID_{50}) (Reed & Muench, 1938)。

寄主範圍：選用 13 種永久魚類細胞株作病毒寄主範圍測定，將 0.5 ml 之 $10^4 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 病毒液接種在已長滿單層之各種細胞株之 25 cm^2 培養瓶中，吸附一小時後各加 4.5 ml 培養基，於 18°C 培養至完全 CPE 後，用 0.2 μ m millipore 過濾膜過濾，取濾液用 CHSE-214 細胞測定病毒感染力價 (Reed & Muench, 1938)。

增殖溫度範圍：將 0.5 ml 病毒力價 $10^4 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 之病毒液加入 25 cm^2 之單層 BF₂ 細胞，分別放在 10°C、15°C、18°C、

20°C、22°C、25°C、30°C 下培養。至完全 CPE 後，在 $2,000\times g$ 下離心 10 分鐘，測上澄液中之病毒感染力價。

簡易 RNA 電泳法：病毒感染 25 cm^2 之單層細胞後至完全 CPE，收集病毒和細胞懸浮液，在 $2,000\times g$ 下離心 10 分鐘，上澄液加 Sarkosyl 至最終濃度 0.1%，以 $130,000\times g$ 離心一小時，將沉澱物溶於含 0.5% SDS, $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ proteinase K 之 TNE buffer (0.1 M Tris-0.1 M NaCl-1 mM EDTA, pH 7.3) 中於 37°C 下過夜，再加等體積 $2\times$ electrophoresis sample buffer，經煮沸 2 分鐘後，將樣本置於 10% SDS-polyacrylamide gel 上，以 10 mA 電流進行泳動 16 小時後，以核酸銀染色法染色。

核酸銀染色：核醣核酸電泳後，將膠體固定在含 50% (v/v) methanol, 12% (v/v) acetic acid 之固定液中 3 分鐘，其次用含 10% (v/v) ethanol, 5% (v/v) acetic acid 之溶液洗 3 次，每次 10 分鐘，共 30 分鐘。再將膠體浸在 0.1% CTAB (cetyltrimethylammonium) 中 30 分鐘，接著用蒸餾水洗 30 分，然後加入 0.3% Ammonium，輕搖 15 分鐘，再換成 Ammoniacal silver solution，輕搖 15 分鐘。再用蒸餾水洗一下，加顯影液 (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde) 輕搖至影像顯現恰好，則放至 0.25% nitric acid 15 分鐘，再用蒸餾水洗之，乾燥保存 (Goldman & Merrill, 1982; Guillemette & Lewis, 1983)。

結 果

武陵農場櫻花鉤吻鮭復育中心的繁殖場已於前年（七十五年）開始作人工繁殖，去年（七十六年）本實驗室開始針對這些發芽卵、魚苗及成魚作魚病研究。由於國寶魚已臨絕種邊緣，因此研究對象為已死亡的卵、魚苗及成魚。茲將魚的病徵以及所作的研究方向，作一列表、如表 1。成魚共有 7 尾，分別作病毒、細菌和水黴菌的培養和鑑定，其次是魚卵，首批 210 粒卵，取 57 粒一起作均質，再作病毒分離，其次由 10 個孵化盒，共 2256 粒卵，每盒取 30 粒卵作成病毒分離用之均質液。而魚苗死亡的共 1836 尾，分四池，故每池取一部分，共 193 尾魚苗作病毒分離之均質液。

復育中心的櫻花鉤吻鮭首先被發現有水黴菌的寄生。體表有白色菌絲，如表 1，成魚 E. F. G. 體上的菌絲挑出，劃在 SAA 或 YpSs plate 上，於 16°C 下培養，結果在 YpSs plate 上長得較好。再將菌落挑放在亞麻種子餌上之水培養法，16°C 下，經一周後，即可觀察到培養皿中有半透明狀物，如圖 1。顯微鏡下可見纖細的菌絲，約 11 μm 膜狀菌落，大而薄，是細囊水生菌 (*Aphanomyces leavis* deBary) 在 16°C 下培養，可觀察到無性生殖和有性生殖之生活史，如圖 2，在顯微鏡下可見細的菌絲，內有分化的游孢子囊 (Sporangium)，成熟的游孢子囊會由頂端放生，單個游孢子 (Zoospore) 遇環境不良時，成休眠孢子 (encyst)，遇適當環境，開始發芽 (germination)，感染魚體表面破裂處，細囊水生菌亦會產生厚壁孢子 (chlamydospore)，約在菌絲體培養一個月後產生。遇環境

Table 1. The records of dead *Oncorhynchus masou* from WuLin farm.

Stage of fish	Dead time	Location	Symptoms	Preliminary study
Adult A (14.2 cm)	75. 10. 19	The 9th culture pond.	Necrosis of pelvic fin and internal organs.	Reovirus-LSV from internal organs.
Adult B (24.5 cm)	75. 10. 26	Taiwan pond	Swelling of cloaca.	Bacteria isolation from kidney and spleen.
Adult C (30 cm)	75. 10. 26	Taiwan pond	Swelling of cloaca.	Bacteria isolation from kidney.
Adult D (25.9 cm)	75. 11. 7	Taiwan pond		The 4th passage for virus isolation.
Adult E (31.5 cm)	75. 11. 14	Taiwan pond	Fungus	Fungus and virus isolation.
Adult F (18.5 cm)	75. 11. 14	Taiwan pond	Fungus	Fungus and virus isolation.
Adult G (22.0 cm)	76. 1. 10	Near the cultural ponds.	Fungus	Fungus and virus isolation.
Eggs (210)	75. 10. 16~ 75. 10. 26	The 2nd, 5th & 6th hatchery boxes.	Dead eggs	57 eggs was examined for viruses.
Eggs (2256)	75. 10. 24~ 75. 12. 10	The 1st to 10th hatchery boxes.	Dead eggs	Each box take 30 eggs for virus isolation.
Fry (1836)	75. 11. 30~ 76. 1. 12	The 1st to 4th ponds.	Dead fries.	Total 193 fries for virus isolation.



Fig. 1. Water culture of *Aphanomyces laevis* on hempseed baiting culture plate.

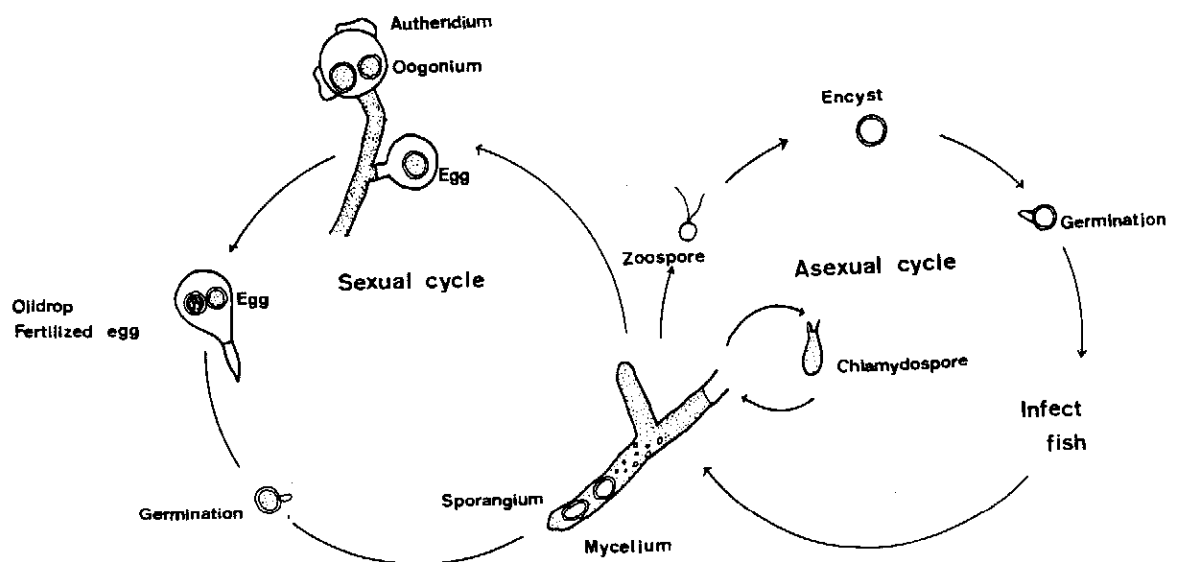


Fig. 2. A proposed life cycle of *Aphanomyces laevis*.

適當，再發芽成爲菌絲體，此二者爲無性生殖 (Asexual cycle)，細囊水生菌之有性生殖出現在水培養後一個月，菌絲頂端出現藏卵器 (Oogonium) 外有二層膜，內有一或數個卵 (egg)，藏精器 (Antheridium)，兩個附在藏卵器外面，當精子與卵結合成爲受精卵 (fertilized egg)，可見有油滴狀物出現，藏卵器外膜溶解，受精卵放出，開始萌芽，形成新菌絲體，此爲有性生殖 (Sexual cycle)。

曾作細菌培養的櫻花鉤吻鮭爲成魚 B 和 C，其泄殖腔腫大，其內臟經細菌培養，鑑定得知 B 有 *Enterobacter gergoviae*, *Acinetobacter*, *Citrobacter freundii* 及 *Micrococcus* (Table 2) 而成魚 C 有 *Enterococcus*, *Phialophora* sp., *Acinetobacter lowffii* 及 *Pseudomonas asngihosa* 這些多是腸內菌都不是致病性細菌，由於是已死亡之魚體作細菌培養，非理想作法，需改進。應在垂死前帶培養皿上山，當場取材作細菌培養，才是良策。

大部份死亡之櫻花鉤吻鮭之卵、魚苗、成魚等，都分組作了病毒分離，但至目前爲止，只有一尾 14.2 cm 長之小魚分離到病毒，其內臟潰瘍，由 Liver, Gill 分離到病毒，用 CHSE-214 (圖 3A)、AS、BF-2、CCO 四種細胞株培養，以在 CHSE-214 細胞中 CPE 最明顯，約經 14 天，才有 CPE 出現。細胞有癒合現象，如圖 3B，感染時間愈久，則有似絲狀物成橋出現，如圖 3C, 3D 和正常細胞圖 (3A) 有很大區別，此種病毒是因由陸封性鮭魚分離的，命名爲 LSV (Landmocked salmon virus)。

LSV 之寄主範圍：分離到的病毒，先作 Plaque assay，篩選病毒斑作病毒株之純化，大量培養後，首先作寄主範圍測定，如表 4，十三種永久細胞株中，LSV 以在 BF-2、CCO、BB 和 CHSE-

The 2. The organisms isolated from *Oncorhynchus masou*, Adult B.

Number	Organisms
1	<i>Enterobacter gergoviae</i>
2	<i>Acinetobacter</i>
3	<i>Citrobacter freundii</i>
4	<i>Micrococcus</i>

Table 3. The organisms isolated from *Oncorhynchus masou*, Adult C.

Number	Organisms
1	<i>Enterococcus</i>
2	<i>Phialophora</i> sp.
3	<i>Acinetobacter lowffii</i>
4	<i>Pseudomonas asngihosa</i>

Table 4. Replication of LSV in selected fish cell lines at 18°C.

Cell lines	Titer (TCID ₅₀ /ml)
AS	2.2×10^5
BF-2	7.0×10^8
BB	5.0×10^7
CCO	1.0×10^8
CHSE-214	1.0×10^7
EPC	3.2×10^4
FHM	5.0×10^3
GK	1.6×10^4
MHR	6.8×10^5
PH	6.8×10^4
PL	4.7×10^5
RTG-2	6.8×10^3
TO-2	3.2×10^2

Table 5. Effect of temperature on LSV multiplication in BF-2 cells.

Temperature	10°C	15°C	18°C	20°C	22°C	25°C	30°C
TCID ₅₀ /ml	4.3×10^4	7.9×10^6	7.9×10^6	2.0×10^7	1.3×10^7	1.4×10^6	4.0×10^4

214 中生長最好，其次爲 PL、AS、MHR、EPC、GK 和 PH，最差寄主爲 FHM、RTG-2、TO-2。在 TO-2 只有 3.2×10^2 TCID₅₀/

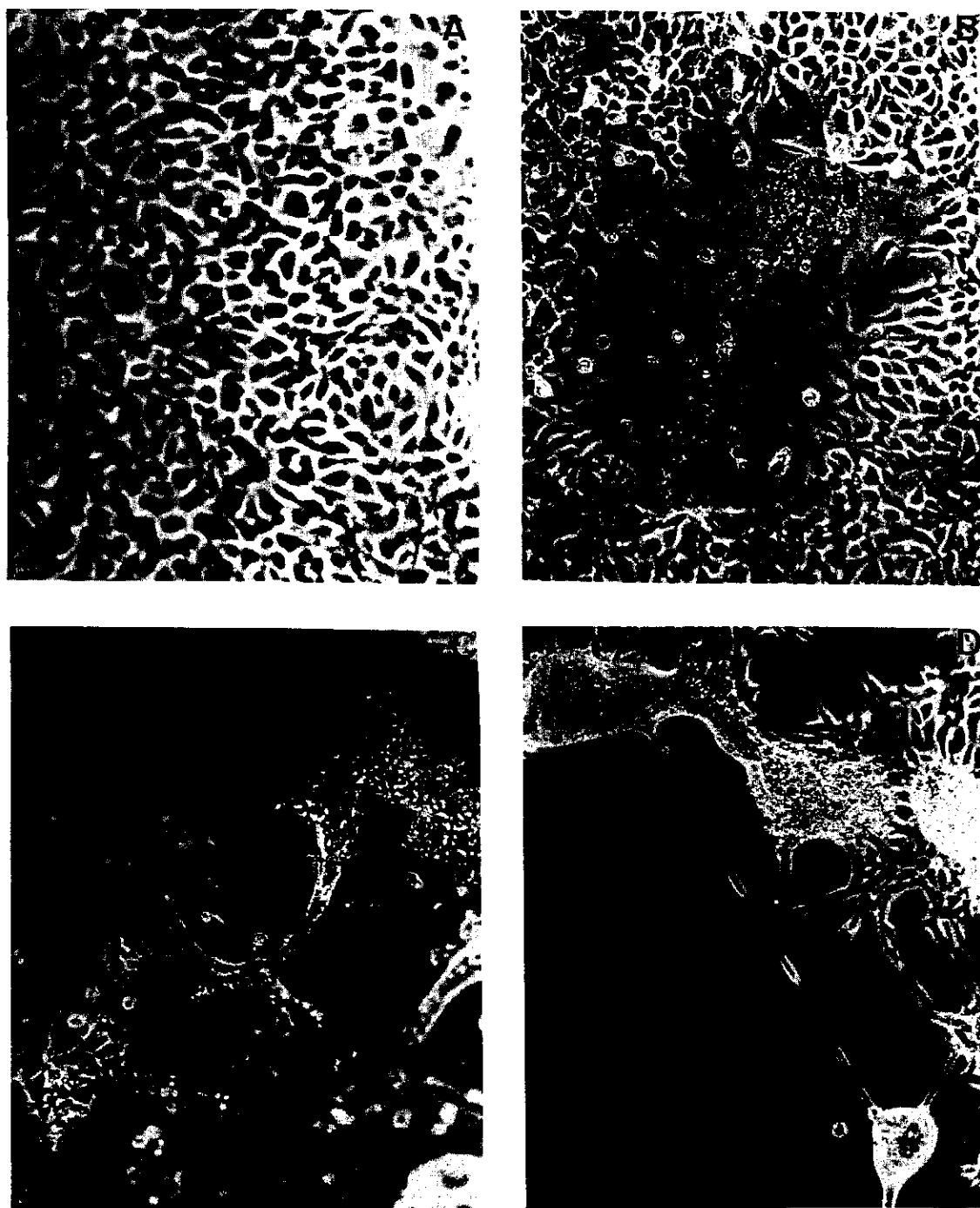


Fig. 3. Normal CHSE-214 cells (3A) and the cytopathic effect of LSV in CHSE-214 cells (3B-D).

ml。此外，LSV 無法在 Reovirus 3 寄主 BHK-21 (Baby hamster kidney-21) 細胞株中增殖，而 Reovirus 3 亦無法在 CHSE-214 中增殖。

LSV 之最適增殖溫度：表 5 及圖 4，為 LSV 在 BF-2 細胞株中，不同溫度下之增殖情形，其中以在 20°C 左右最佳。

病毒之核糖核酸電泳圖型是用簡易核糖核酸膠體電泳法，然後作銀染色，得圖 5，是故細胞內之核酸亦被染出在膠體上端。LSV 和由另一種鮭魚分離之 CSV (chum salmon virus, Winton *et al.*

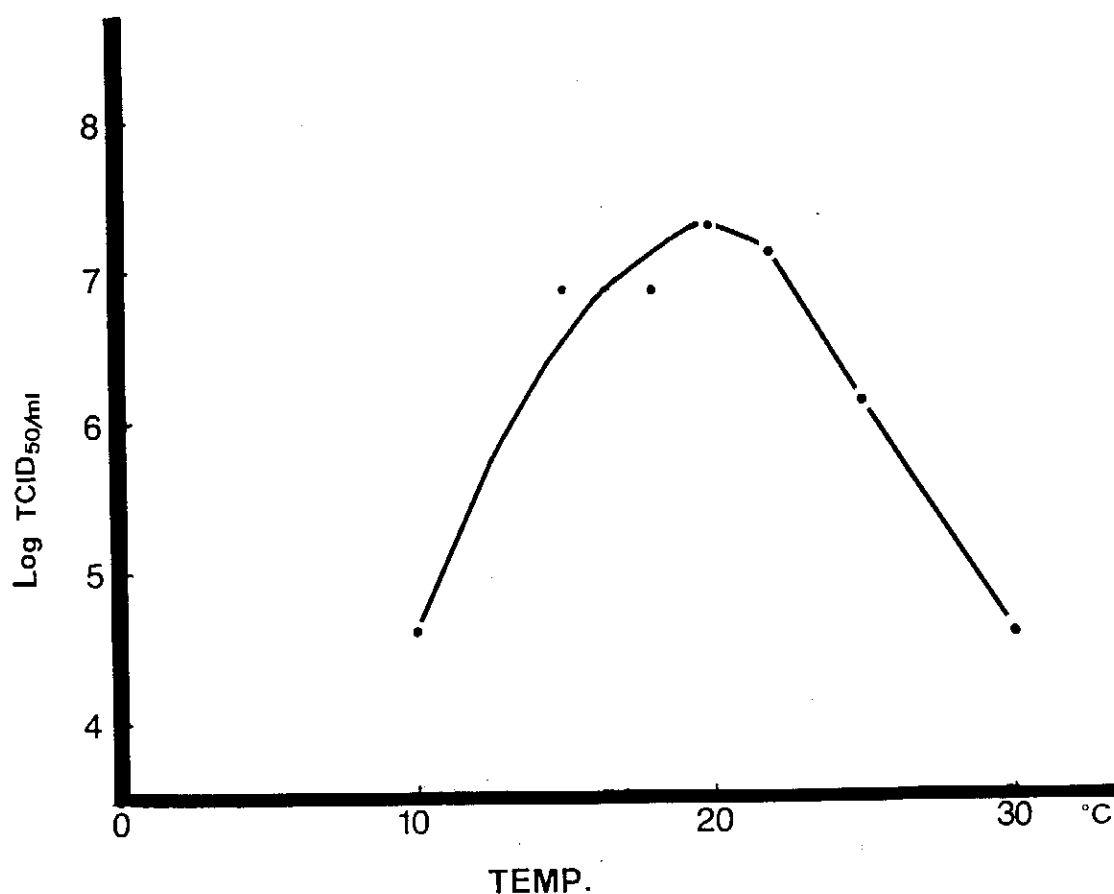


Fig. 4. The temperature curve of LSV multiplication in BF-2 cells.

1981) 較相似，它們的 RNA 均可分爲 11 段，分大、中、小三組，大的三段爲 L₁, L₂ 和 L₃，中的三段分爲 M₁, M₂, M₃，小段的分爲 S₁, S₂, S₃, S₄ 和 S₅。但 LSV 之 L₃ 較 CSV 者大，M₁ 則較小，同時 S₁, S₂, S₄ 及 S₅ 均比 CSV 者大，表示 LSV 與 CSV 之 RNA 圖型亦不同，爲一新的病毒株。LSV 和人類呼腸孤病毒 serotype 3 (即 Reo-3) 相差甚遠，Reo-3 有 10 段 RNA，電泳距離相隔甚遠，屬不同種類可想而知。

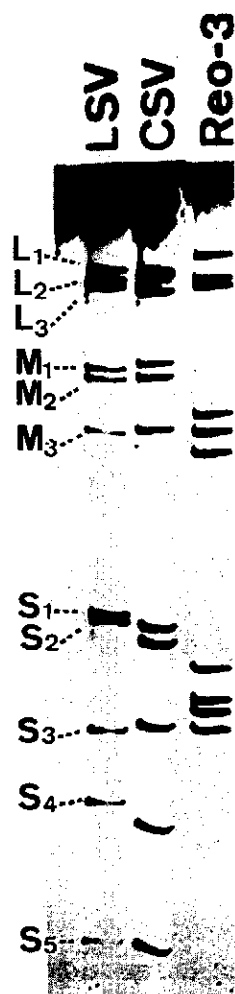


Fig. 5. The comparison of RNA patterns between LSV, CSV and Reovirus type 3.

討 論

養殖於武陵農場之櫻花鉤吻鮭最明顯的病徵爲水黴菌，經 YpSs plate 培養，以及亞麻種子水培養後，觀察而知生活史，如圖 2。依其型態和生活史可鑑定爲細囊水生菌 (Chien, 1981)，此種水黴菌多生長在低溫，菌絲體爲薄膜狀，會寄生在破裂受傷的魚體表面或鰓處，可用藥浴減輕病發，由於細囊水生菌出現不多，據報告 (Chien, 1981) 也認爲它並不是造成大量死亡原因。

其次，自魚體內臟培養出來之細菌大多爲腸內菌，亦不是致病性細菌。一般細菌分離應用活體，魚體死亡後，某些細菌會被腸內菌大量繁殖而遮蓋，致無法檢驗出。此次是魚體死亡後所作的分離，應做修正，應作活體細菌培養，才能找出是否有致病性細菌所引起的死亡。

原懷疑大批魚卵、幼苗及成魚的死亡，是否和病毒有關，然只有一尾魚有呼腸孤病毒感染。此種水產呼腸孤病毒增殖很慢。據 Winton *et al.* (1987) 報導，鮭魚呼腸孤病毒，致死率很低，由於櫻花鉤吻鮭只分離到一尾有 LSV，相信致死率亦很低。雖然水產呼腸孤病毒已知分離的有從 golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*; GSV), (Plumb *et al.* 1979), chum salmon (*Oncorhynchus keta*; CSV), (Winton *et al.*, 1981), channel catfish (*Ictalurus punctatus*; CRV) (Hedrick *et al.*, 1984) 及從 American oyster (*Crassostrea virginica*; 13P₂) (Meyers, 1979) 等，它們都有共同特性，約 75 nm 大小之二十面體顆粒，含有

11 段，分大、中、小三類大小之雙股核糖核酸，分子量為 2.5 到 0.31×10^6 daltons。這些呼腸孤病毒有五種病毒顆粒蛋白質。其中致死率較高的是從牡蠣分離出的 13P₂。LSV 依其寄主範圍，生長溫度以及核糖核酸電泳圖型都類似水產呼腸孤病毒中之 CSV。此是臺灣第一次分離到的水產呼腸孤病毒。其生化特性以及在水產呼腸孤病毒之血清分類位置，值得作進一步研究。

綜上所觀，武陵農場繁殖的櫻花鉤吻鮭，其孵化率低、死亡率高和疾病關係較少，即使有亦是少量。據報導，每次死亡都在山洪爆發後，山溪挾帶大量黃泥，阻塞住櫻花鉤吻鮭的鰓和呼吸道，是可能致死原因之一。此外，山洪沖刷泥沙，也可能污染水源。因此建議在復育中心作一山溪過濾池，防止泥沙及污染物的通過，進而達到優良繁殖率。當然，細菌培養需採自活體或剛死亡之魚體。此是技術上採樣之改進，當可找出致死原因，加以改進，達到復育櫻花鉤吻鮭之目的。

參 考 文 獻

1. 興儀喜宣，中村廣司 (1938). 臺灣高地產鱒（櫻花鉤吻鮭），天然紀念物調查報告第五輯，臺灣總督府內務局，32pp. 林曜松譯，農委會林業特刊第九號，行政院農業委員會印行，13pp.
2. Adair, B. M. and H. W. Ferguson (1981). Isolation of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) virus from non salmonid fish. J. Fish Dis. 4: 69-76.
3. Austin, B. and D. Allen-Austin. (1985). A review bacterial pathogens of fish. J. Appl. Bact. 58: 483-506.
4. Bowser, P. R. and Plumb, J. A. (1980). Fish cell lines: Establishment of a line from ovaries of channel catfish. In Vitro 16: 365-368.
5. Chen, S. N., S. C. Chi, Y. Ueno and G. H. Kou. (1983). A cell line derived from tilapia ovary. Fish Path. 18: 13-18.
6. Chien, Chiu-Yuan (1981). Fungal diseases of fresh water fishes in Taiwan. NSC Symposium Series No. 3: 33-45.
7. Goldman, D. and C. R. Merrill. (1982). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size electrophoresis 3: 24-26.
8. Gravell, M. and R. G. Malsberger. (1965). A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann. N. Y. Acad. Sci. 126: 555-565.

9. Guillemette, J.G. and P.N. Lewis. (1983). Detection of subnanogram quantities of DNA and RNA on native and denaturing polyacrylamide and agarose gels by silver staining. *Electrophoresis* 4: 92-94.
10. Hedrick, R.P., R. Rosemark, D. Aroustein, J.R. Winton, T. McDowell and D.F. Amend. (1984). Characteristics of a new reovirus from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Gen. Virol.* 65: 1527-1534.
11. Hill, B.J. (1976). Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc tellina tenuis (da Costa). In *Wild life diseases*, pp. 445-452. Edited by L.A. Page. N.Y. and London. Plenum Press.
12. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
13. Meyers, T.R. (1979). A Roe-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Gen. Virol.* 43: 203-212.
14. Nicholson, B.L. and C. Byrne (1973). An established cell line from the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 913-916.
15. Nicholson, B.L., D.J. Danner and J.L. Wu. (1987). Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 23: 199-204.
16. Nims, L., J.L. Fryer and K.S. Pilcher. (1970). Studies of replication of four selected viruses in two cell lines

- derived from salmonid fish. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135: 6-12.
17. Plumb, J. A., P. R. Bowser, J. M. Grizzle and A. J. Mitchell. (1979). Fish viruses: a double-stranded RNA icosahedral virus from a North American cyprinid. J. Fish. Res. Board Can. 36: 1390-1394.
 18. Reed, L. J. and H. Muench. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg. 27: 493-497.
 19. Tomasec, J. and N. Fijan. (1971). Virus Bolesti Riba (Viral Diseases of Fish). Final Report on Research under a part of project. 6n/1966, Zagreb.
 20. Tuite, J. (1969). Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Comp. pp. 30.
 21. Winton, J. R., C. N. Lannan, J. L. Fryer and T. Kimura. (1981). Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. Fish Pathology 15: 155-162.
 22. Winton, J. R., C. N. Lannan, J. L. Fryer, R. P. Hedrick, T. R. Meyers, J. A. Plumb and T. Yamamoto. (1987). Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. J. Gen. Virol. 68: 353-364.
 23. Wolf, K. and M. C. Quimby (1962). Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science 135: 1065-1066.
 24. Wolf, K. and M. C. Quimby. (1966). Lymphocystis virus: Isolation and propagation in centrarchid fish cell lines.

Science 151: 1004-1005.

25. Wolf, K. and M. C. Quimby. (1969). Fish cell and tissue culture. pp. 253-305. In W. S. Hoar and D. J. Randall (eds.) Fish Physiology, Academic Press.