

扇贝养殖海区浮游生物及大型海藻携带AVNV病毒的检测分析

王娜¹, 李赞¹, 任伟成², 蔡玉勇^{1,2}, 王崇明²

(1. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 为了解扇贝养殖海区浮游生物及大型海藻与急性病毒性坏死症病毒(AVNV)流行传播的关系, 本研究于2008年和2009年从青岛沙子口和荣成桑沟湾2个养殖海区采集水样, 离心收集浮游生物并随机采集大型海藻, 采用荧光定量PCR(FQ-PCR)技术对这些样品携带AVNV情况进行检测。结果显示, 沙子口海区8月份的浮游生物样品中检测到AVNV, 每升海水中浮游生物携带的病毒数量为 6.92×10^5 拷贝; 桑沟湾海区4月份的浮游生物样品也检测到AVNV, 每升海水中浮游生物携带的病毒数量为 1.26×10^3 拷贝。从青岛沙子口海区随机采集的10种大型海藻中有7种[包括孔石莼(*Ulva pertusa*)、浒苔(*Enteromorpha prolifera*)、细毛石花菜(*Gelidium crinale*)、缘管浒苔(*E. Linza*)、海膜(*Halymenia floresia*)、扁江蓠(*Gracilaria textorii*)、刚毛藻(*Cladophora*)]检测到病毒, 带毒样品占到检测样品总数的55.56%, 其中在12份孔石莼样品中, 11份样品检测到病毒, 携带病毒数量最高为 $7.68 \times 10^4/0.1$ g (2009年8月25日)。从荣成桑沟湾海区采集的14种大型海藻样品中有3种(包括孔石莼、海膜和马尾藻)检测到病毒, 带毒样品占到检测样品总数的20.83%, 其中2009年7月采集的孔石莼样品携带病毒数量最高, 为 $3.06 \times 10^3/0.1$ g。这一结果说明海区浮游生物及部分大型海藻均可携带AVNV, 而摄食携带病毒的浮游生物可能是扇贝感染发病的原因, 有关大型海藻携带AVNV在该病原流行传播中的作用还有待进一步研究。[中国水产科学, 2010, 17(5): 1012-1019]

关键词: 栉孔扇贝; FQ-PCR; AVNV; 浮游生物; 大型海藻

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1012-08

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国北方沿海重要的养殖贝类, 大规模养殖曾获得了巨大的经济效益。但由于病害肆虐, 扇贝养殖效益大幅降低。据统计, 由于扇贝大规模死亡病害在夏季连年暴发(累积死亡率高达90%以上), 1997-1998年仅山东省养殖扇贝经济损失就达到了40亿元人民币以上^[1-2]。目前栉孔扇贝养殖业基本处于停滞状态。流行病学和病原学研究表明, 病毒是造成栉孔扇贝在养殖中后期大规模死亡的直接病原^[3-6], 该病毒直径130~170 nm, 为具囊膜的二十面体结构, 现已将该病害定名为急性病毒性坏死症(Acute Viral Necrobiotic Disease, 简称AVND), 其病原简称AVNV^[7-8]。目前已明确该病害暴发的季节性特征^[3]、病理组织学及细胞学特征^[9]和该病毒侵

染栉孔扇贝的靶器官^[10]。但有关该病毒的传播方式仍不清楚。近期, 任伟成等^[11]完成了AVNV保守序列的筛选分析, 建立了高灵敏的分子检测技术, 为研究该病原的流行传播机制奠定了基础。

通常病毒传播有2种可能的途径, 一种途径是患病亲贝排放带毒的精卵将病毒垂直传至子贝; 另一种途径是通过带毒的中间宿主将病毒水平传至养殖贝类。扇贝在养殖期间移动范围有限, 主动接触到中间宿主的可能性不大, 但扇贝需要摄取大小合适的浮游生物作为饵料^[12], 因此, 滤食活动可能是病毒水平感染扇贝的一个重要环节。然而目前AVNV在海区的分布情况还不清楚, 浮游饵料生物是否是AVNV水平传播的一个重要传播者还缺乏充足的证据。同时, 养殖

收稿日期: 2010-01-04; 修订日期: 2010-01-22.

基金项目: 国家863基金项目(2006AA100307).

作者简介: 王娜(1983-), 硕士研究生, 从事栉孔扇贝病毒传播方面的研究. E-mail: www-wangna@163.com

通讯作者: 李赞, 教授. Tel: 0532-82032649; E-mail: xsxdlwl@ouc.edu.cn

海区普遍分布丰富的大型海藻,已有的研究表明,这些大型海藻对养殖海区的生态环境具有重要的调控作用^[13-14],但与 AVNV 流行传播的关系仍有待研究。基于此,本研究利用建立的分子检测技术,对养殖海区浮游生物和大型藻类携带 AVNV 的情况进行了定量检测,以期分析浮游生物和大型藻类在 AVNV 流行传播中的作用,为认识 AVNV 的流行传播规律提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

养殖海区浮游生物样品从采集的海水样品经过离心获得。青岛沙子口海区采样时间为2008年5月

11日、2008年6月24日、2008年8月19日、2008年10月10日、2008年12月15日、2009年1月6日、2009年2月23日、2009年3月17日、2009年4月10日。荣成桑沟湾养殖海区3 m深海水采样区域包括扇贝养殖临近海区和远离海区,采样时间分别为2008年4月30日、2008年10月27日、2009年1月16日和4月13日。采集水样立即在实验室以6 000 r/min离心45 min收集,沉淀物分装5个2 mL离心管,再经10 000 r/min离心30 min,弃上清后-80 ℃保存。

养殖海区大型海藻样品采自悬挂栉孔扇贝养殖笼的悬挂缆绳及浮漂上的附着海藻以及海面漂浮的海藻,具体采集时间及海藻种类见表1、表2。

表1 青岛沙子口海区采集的大型海藻样品
Tab. 1 Seaweed samples collected from Shazikou's sea area for scallop culturing

采样时间 Sampling date	海藻种类 Seaweeds species	采样时间 Sampling date	海藻种类 Seaweeds species
2008-06-24	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i>	2009-04-10	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i>
2008-07-13	海膜 <i>Halymenia floresia</i> 浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i>	2009-05-07	孔石莼 <i>Uva pertusa</i>
2008-10-10	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i> 缘管浒苔 <i>Enteromorpha linza</i>	2009-08-13	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i> 海膜 <i>Halymenia floresia</i>
2008-11-04	舌形蜈蚣藻 <i>Grateloupia livida</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i> 缘管浒苔 <i>Enteromorpha linza</i>	2009-08-25	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 舌形蜈蚣藻 <i>Grateloupia livida</i>
2009-01-06	扁江篱 <i>Gracilaria textorii</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i> 缘管浒苔 <i>Enteromorpha linza</i> 节荚藻 <i>Lomentaria lyngb</i>	2009-09-17	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 刚毛藻 <i>Cladophora</i> 缘管浒苔 <i>Enteromorpha linza</i>
2009-02-23	孔石莼 <i>Uva pertusa</i>	2009-10-14	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 舌形蜈蚣藻 <i>Grateloupia livida</i> 马尾藻 <i>Sargassum</i> 节荚藻 <i>Lomentaria lyngb</i>
2009-03-17	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i>	2009-11-05	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 马尾藻 <i>Sargassum</i> 浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i> 刚毛藻 <i>Cladophora</i>

1.2 样品DNA的提取

浮游生物总DNA的提取参照杨君等^[15]的方法。从1 L海水中收集浮游生物,在浮游生物样品中加入65 ℃预热的提取缓冲液[3 % CTAB,1 % PVP,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0),0.1 mol/L EDTA,0.2 % β-巯基乙醇]500 μL,65 ℃水浴1 h后

加入蛋白酶K(终质量浓度为0.2 mg/mL),55 ℃温浴30 min。随后加入1/3体积的5 mol/L KAc(pH 8.0)混匀,放置20 min,加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),轻缓摇匀10 min,10 000 r/min离心10 min。上清液移至新管,并加入2/3体积异丙醇,于4 ℃冰箱中过夜,经12 000 r/min离心15 min沉淀DNA,弃上清。

表2 荣成桑沟湾海区采集的大型海藻样品
Tab.2 Seaweed samples collected from Sanggouwan's sea area for scallop culturing

采样时间 Sampling date	海藻种类 Seaweeds species	采样时间 Sampling date	海藻种类 Seaweeds species
2008-07-30	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i> 江篱 <i>Gracilaria confervoides</i> 叉枝藻 <i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	2009-07-22	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 马尾藻 <i>Sargassum</i> 金膜藻 <i>Chrysomenia wrightii</i>
2008-10-27	石花菜 <i>Gelidium amansii</i> 龙须菜 <i>Gracilaria lemaneiformis</i>	2009-08-22	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 节荚藻 <i>Lomentaria lyngb</i>
2009-01-16	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i>	2009-09-22	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 海膜 <i>Halymenia floresia</i> 舌形蜈蚣藻 <i>Grateloupia livida</i> 蜈蚣藻 <i>Grateloupia filicina</i>
2009-05-21	细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i>	2009-11-25	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 海膜 <i>Halymenia floresia</i> 海带 <i>Laminaria japonica</i> 金膜藻 <i>Chrysomenia wrightii</i>
2009-06-18	孔石莼 <i>Uva pertusa</i> 细毛石花菜 <i>Gelidium crinale</i>		

70 %的乙醇洗涤2 ~ 3次。沉淀在无菌风下吹干后溶于TE缓冲液(10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA)。用核酸蛋白仪进行定量分析, -80 ℃保存备用。

大型海藻样品总DNA提取参照苏乔等^[16]的方法。采集的大型海藻首先用无菌海水冲洗1次, 随机剪取0.1 g新鲜藻体, 在液氮中研磨, 待液氮充分挥发后, 加入提取缓冲液[3 % CTAB, 1 % PVP, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.2 % β-巯基乙醇]600 μL, 移入2 mL离心管中, 65 ℃水浴。其他处理与浮游生物总DNA的提取方法相同。

1.3 FQ-PCR检测技术

基于任伟成等^[11]的方法进行AVNV的荧光定量PCR(FQ-PCR)检测。FQ-PCR上游引物序列c-f为: 5'-AGCCTTTTACAGAATTTTGCACCTT-3', 下游引物序列c-r为: 5'-TGTCGCATGTTAACCTCGTC TG-3', 预计扩增片段大小为90 bp。TaqMan探针序列为: 5'-FAM-AGCCATCACATCAGCCAGCAACGACT-TAMRA-3', PCR引物和TaqMan探针均委托大连TaKaRa生物工程有限公司合成。

反应体系为PCR反应管中加入12.5 μL反应混合液, 10 μmol/L的引物c-f和c-r各0.5 μL, 3 μmol/L

的探针1 μL, 样品DNA 1 μL, 加灭菌双蒸水至25 μL。FQ-PCR反应在Rotor-Gene3000扩增仪(澳洲Corbett Research公司)上进行, 扩增条件为: 95 ℃, 4 min; 95 ℃, 10 s变性, 60 ℃, 30 s退火延伸, 共45个循环。

以纯化的AVNV保守序列构建重组质粒DNA拷贝数分别为10⁸、10⁶、10⁴和10²的梯度溶液为阳性对照, 根据探针序列检测到病毒时的PCR循环次数ct值, 获得1 μLDNA样品中病毒的拷贝数, 最终换算为1 L海水浮游生物或单位鲜重大型海藻携带病毒的拷贝数。采用SPSS软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 养殖海区浮游生物携带AVNV的检测结果

采用普通PCR检测方法对2个栉孔扇贝养殖海区共15份浮游生物样品携带AVNV情况进行检测, 结果显示, 所有样品均未携带AVNV病毒。但利用FQ-PCR技术检测发现, 青岛沙子口2008年8月19日采集的浮游生物样品中存在AVNV, 1 L海水中的浮游生物携带病毒数达6.92×10⁵拷贝, 荣成桑沟湾扇贝养殖海区2008年4月30日采集的浮游生物样品中也检测到1.26×10³拷贝的病毒。而其他月份采集的样品未检测到AVNV。

2.2 青岛沙子口养殖海区大型海藻携带 AVNV 的检测结果

从2008年至2009年的14个月份从青岛沙子口海区采集大型海藻36份共10种,其中7种海藻[孔石莼(*Uva pertusa*)、浒苔(*Enteromorpha prolifera*)、细毛石花菜(*Gelidium crinale*)、缘管浒苔(*E. linza*)、海膜(*Halymenia floresia*)、扁江蓼(*Gracilaria textorii*)、刚毛藻(*Cladophora*)]共20份海藻上检测到病毒的存在,检测呈阳性的样品数占到检测总样品数的55.56%。

12份孔石莼样品除了1份样品(2009年2月采集)未检测到病毒外,其余11份样品均检测到病毒,携带病毒的孔石莼样品数占到检测孔石莼样品总数的91.67%。从图1显示各月份孔石莼携带病毒的数量可以看到,孔石莼各月份携带的病毒数量存在一定差异,2份8月份采集的样品携带病毒的数量最高,其中2009年8月25日采集的孔石莼样品检测的病毒拷贝数高达 $7.68 \times 10^4/0.1 \text{ g}$,而6月份的2个样品携带的病毒数量最低,其他月份采集的样品携带的病毒数量则基本维持在 $10^2/0.1 \text{ g}$ 以上。

从该海区采集的其余海藻种也有9份阳性样品,其中4份缘管浒苔样品中有3份样品(2008年10月、11月,2009年9月采集)检测到病毒,2008年10月10日采集样品携带病毒数量最高,为 $1.24 \times 10^3/0.1 \text{ g}$ 。4份浒苔样品中有2份样品(2009年8月和11月采集)检测到病毒,8月采集的样品携带病毒数量最高,为 $8.61 \times 10^3/0.1 \text{ g}$ 。细毛石花菜在2008年10月、11月和2009年1月、3月、4月共5个月份采集到,仅1份样品(2009年4月采集)检测到少量病毒,携带的病毒数量约为 $25.72/0.1 \text{ g}$ 。2份刚毛藻样品中仅1个样品(2009年9月采集)检测到病毒,病毒数量为 $2.50 \times 10^2/0.1 \text{ g}$ 。2份海膜样品也仅在1个样品(2009年8月采集)上检测到病毒,病毒数量为 $2.54 \times 10^2/0.1 \text{ g}$ 。扁江蓼仅在2009年1月采集到,携带的病毒数量为 $77.6/0.1 \text{ g}$ 。这9份阳性样品中,2009年8月采集的浒苔携带的病毒数量最高,显著高于9份阳性样品携带 AVNV 数量的平均值,2008年10月采集的缘管浒苔携带的病毒数量次之。2009年11月采

集的浒苔和4月采集的细毛石花菜携带的病毒数量最低(图2)。其余阳性样品携带的 AVNV 数量则与平均值没有显著差异。

2008年11月4日、2009年8月25日和10月14日采集了3份舌形蜈蚣藻样品,2009年1月6日和10月14日采集2份节荚藻样品,2009年10月14日、11月5日采集2份马尾藻属样品,这些样品均未检测到病毒。

2.3 荣成桑沟湾养殖海区大型海藻携带 AVNV 的检测结果

荣成桑沟湾海区9个月份总共采集了14种共24份大型海藻样品,仅在3种海藻(孔石莼、马尾藻属、海膜)共5份样品上检测到病毒,占到检测样品的20.83%。

7份孔石莼样品有3份样品(2009年7、8、和11月采集)检测到病毒,占到检测孔石莼样品的42.86%,样品携带病毒的最高数量为 $3.06 \times 10^3/0.1 \text{ g}$ 。马尾藻属样品只在2009年7月采集到,携带病毒数量为 $1.69 \times 10^3/0.1 \text{ g}$ 。2009年9月和11月采集的2份海膜样品,只在11月样品上检测到病毒,携带的病毒数量为 $27.99/0.1 \text{ g}$ 。该海区检测到的所有5份阳性样品携带的病毒数量均无显著差异(图3)。

2008年7月30日采集的浒苔、江蓼和叉枝藻,2009年8月采集的节荚藻,2008年10月27日采集的石花菜和龙须菜,2009年1、5、6月采集的细毛石花菜,2009年9月采集的舌形蜈蚣藻和蜈蚣藻,2009年11月采集的海带,以及2009年7和11月2个月份采集的金膜藻均未检测到病毒。

3 讨论

FQ-PCR是近几年发展起来的PCR技术与荧光检测相结合的一种新的病原定量检测技术。Kathy等^[17]运用TaqMan探针技术建立了对虾的白斑病毒综合征病毒(WSSV)、造血组织坏死病毒(IHHNV)、桃拉病毒(TSV)、黄头病毒(YHV)实时定量PCR检测方法,检测极限WSSV和IHHNV为1~10拷贝,TSV、YHV为10~100拷贝。张利峰等^[18]运用建立

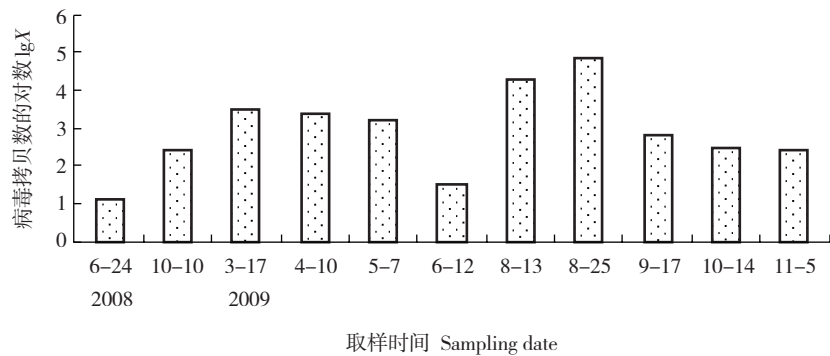


图1 青岛沙子口海区不同月份孔石莼样品携带的AVNV拷贝数
Fig. 1 AVNV copy number (X) carried by *Ulva pertusa* in different months at Shazikou's sea area for culturing scallop

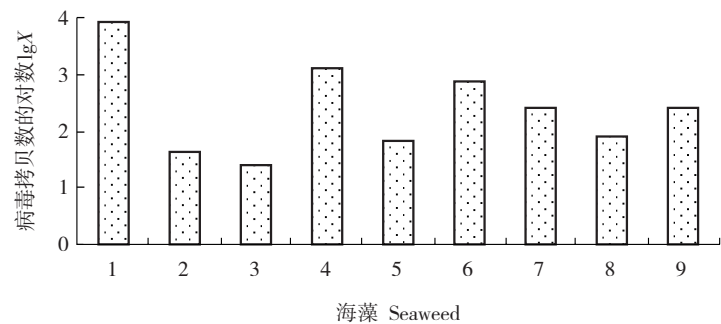


图2 青岛沙子口海区不同月份大型海藻携带AVNV的拷贝数
1: 2009-8-3 浒苔; 2: 2009-11-5 浒苔; 3: 2009-4-10 细毛石花菜; 4: 2008-10-10 缘管浒苔; 5: 2008-11-4 缘管浒苔; 6: 2009-9-17 缘管浒苔; 7: 2009-8-13 海膜; 8: 2009-1-6 扁江藻; 9: 2009-9-17 刚毛藻。
Fig. 2 AVNV copy number (X) carried by seaweeds in different months at Shazikou's sea area for culturing scallop
1: 2009-8-3 *Enteromorpha prolifera*; 2: 2009-11-5 *E. prolifera*; 3: 2009-4-10 *Gelidium crinale*; 4: 2008-10-10 *E. linza*; 5: 2008-11-4 *E. linza*; 6: 2009-9-17 *E. linza*; 7: 2009-8-13 *Halymenia floresia*; 8: 2009-1-6 *Gracilaria textorii*; 9: 2009-9-17 *Cladophora*.

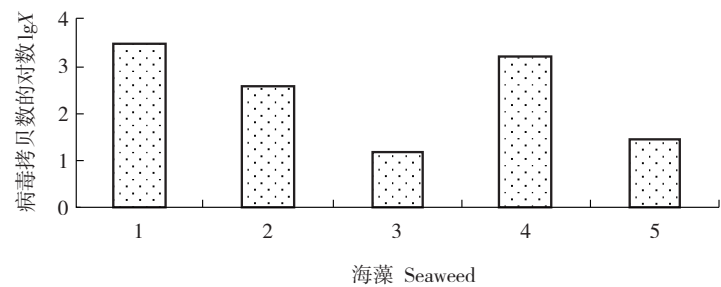


图3 荣成桑沟湾扇贝养殖海区不同月份大型海藻携带AVNV的拷贝数
1: 2009-7-22 孔石莼; 2: 2009-8-22 孔石莼; 3: 2009-11-25 孔石莼; 4: 2009-7-22 马尾藻; 5: 2009-11-25 海膜。
Fig. 3 AVNV copy number (X) carried by seaweeds in different months at Sanggouwan's sea area for culturing scallop
1: 2009-7-22 *Uva pertusa*; 2: 2009-8-22 *U. pertusa*; 3: 2009-11-25 *U. pertusa*; 4: 2009-7-22 *Sargassum*; 5: 2009-11-25 *Halymenia floresia*.

的荧光实时定量RT-PCR技术,对病鱼组织器官中鲤春病毒血症(Spring Viraemia of Carp, SVC)病毒的分布和病毒量进行了分析。罗卫等^[19]建立了鱼类神经坏死病毒实时荧光RT-PCR检测方法。任伟成等^[11]建立了荧光定量PCR检测栉孔扇贝AVNV的技术。本研究用该检测技术分别在2008年8月份从青岛沙子口和2008年4月份从荣成桑沟湾海区采集的浮游生物中检测到AVNV,而用普通PCR技术并

未检测到,可见FQ-PCR比普通PCR检测灵敏度高。

有关AVNV传播途径目前尚不清楚。于佐安等^[20]对染毒栉孔扇贝亲贝排放的精、卵、个体发育的D形幼虫、壳顶幼虫及眼点幼虫等进行检测均未发现感染病毒,显示AVNV垂直传播的可能性不大。本研究对2个养殖海区多个月份离心收集的15份浮游生物样品进行检测,仅在2份样品上检测到AVNV,尽管检测到的阳性样品数并不高,但从每升海水离心收集的浮游生物携带病毒拷贝数最高可达 10^6 以上,可见浮游生物携带AVNV并非偶然现象。可能本研究的离心收集方法并不理想,采用的离心速率仍偏小,未能全面收集水样中的浮游生物,因而导致获得结果差别较大,但该结果仍然可以说明在养殖海区确实存在一些浮游生物携带AVNV。关于病毒在浮游藻类表面附着的现象,在对虾WSSV流行传播规律的研究中已有报道^[21-23],Honjo^[23]认为,微藻细胞表面的化学成分对WSSV是否附着至关重要。张家松等^[21]研究发现,以携带WSSV的微藻作为饵料可使美丽猛水蚤(*Nitocra* sp.)也感染WSSV,说明浮游饵料携带的病毒仍然具有感染能力。本研究虽然检测到浮游生物可以携带AVNV,但附着在浮游饵料上的AVNV是否仍存在致病力还需要进一步研究。

关于大型海藻携带病毒的情况尚少见报道,本研究在2个扇贝养殖海区采集到60份大型海藻样品,其中25份样品检测呈阳性,阳性率为41.67%。虽然两海区大型海藻携带病毒的情况差别较大,青岛沙子口海区携带病毒的海藻种类以及单位鲜重样品携带的病毒数量均比荣成桑沟湾海区高,但两海区从多个月份采集的孔石莼样品上均检测到AVNV,而从舌形蜈蚣藻和节荚藻样品上则均未检测到病毒。

孔石莼是海区广泛分布的大型海藻,已有的研究表明,孔石莼通过分泌物可以影响浮游微藻如亚心形扁藻的生长^[13],孔石莼与牙鲆混养提高了白化牙鲆的转化率^[14]。这些结果说明孔石莼具有明显的生态调控作用。本研究2个海区采集的19份孔石莼样品有14份检测呈阳性,其中有11份样品携带的病毒数量在 10^2 /0.1 g以上。青岛沙子口海区8月份

采集的孔石莼样品携带AVNV的数量最高,为 7.68×10^4 /0.1 g,荣成桑沟湾海区7月份采集的孔石莼样品携带AVNV的数量最高,为 3.06×10^3 /0.1 g。虽然大型海藻上往往附着有浮游生物,检测到的病毒有可能是由附着在海藻上的浮游生物携带,但从本研究检测结果来看,尽管从孔石莼样品上检测到病毒的最高数量比从每升海水离心收集的浮游生物携带的病毒数量低1~2个数量级,但0.1 g藻体上附着的浮游生物要携带如此高丰度的病毒似乎不大可能,所以这些AVNV可能直接附着在藻体上。而且携带病毒数量峰值出现的月份与养殖扇贝大规模死亡时期基本重合,说明孔石莼可能是AVNV的重要携带者。

由于扇贝是滤食性贝类,同时养殖扇贝被限制在养殖笼内,附着在大型海藻上的AVNV不可能被扇贝滤食,所以孔石莼可能通过富集海区游离的AVNV从而降低AVNV感染扇贝的机会。此外,有研究报道,从孔石莼中克隆到一种凝集素基因序列,该基因产物具有抗烟草花叶病毒的能力,显示孔石莼的分泌物可影响病毒的致病力^[24]。但目前还缺乏证据说明黏附在孔石莼上的AVNV致病力已发生变化。仅就本研究不同月份孔石莼携带AVNV数量的变动情况,可以认为,养殖海区分布的孔石莼可能对AVNV的流行传播具有一定的阻碍作用。

但是其他海藻携带病毒的情况则差别很大,如部分浒苔和马尾藻属藻类仅1个海区样品检测呈阳性,但另1个海区样品则呈阴性。采自沙子口的缘管浒苔、刚毛藻和海膜样品,有些月份携带高拷贝的病毒,而有些月份样品则未检测到。有些检测呈阳性的大型海藻仅携带不足100个拷贝的AVNV,不排除AVNV存在偶然附着或借助附着浮游生物附着在大型海藻上的可能。由于本研究随机采集的大型海藻样品数量有限,有些海藻仅采集到1个月或几个月份,这些海藻在AVNV流行传播过程中的作用还有待广泛采集样品作进一步的研究。

致谢: 中国海洋大学曾晓起教授曾对本研究采集的大型海藻进行了种类鉴定,在此谨致衷心感谢。

参考文献:

- [1] 张福绥,杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析[J]. 海洋科学,1999(1): 44-47.
- [2] 王运涛,相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼,1999,30(6): 770-774.
- [3] 王秀华,王崇明,李筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报,2002,26(2): 149-152.
- [4] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学,2002,25(12): 23-26.
- [5] 贺桂珍,李赞,宋微波,等. 栉孔扇贝病原感染与病害发生关系探讨[J]. 水产学报,2003,27(3): 273-277.
- [6] 艾海新,王崇明,王秀华. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究[J]. 中国水产科学,2003,10(5): 386-391.
- [7] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报,2002,26(2): 180-184.
- [8] 王崇明,王秀华,艾海新,等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究[J]. 水产学报,2004,28(5): 547-553.
- [9] 付崇罗,宋微波,李赞,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒的组病理学与免疫荧光检测[J]. 微生物学报,2004,44(6): 741-744.
- [10] 贺桂珍,王秀华,李赞,等. 急性病毒性坏死症病毒在栉孔扇贝不同器官的感染状况[J]. 高技术通讯,2003,13(7): 93-96.
- [11] 任伟成,王崇明,孙世春,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒荧光定量PCR检测方法的建立和应用[J]. 中国水产科学,2009,16(4): 564-571.
- [12] 王如才,兰锡禄,刘丽辉,等. 栉孔扇贝的食料分析[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版,1989(S2): 43-55.
- [13] 南春容,董双林. 大型海藻孔石莼抑制浮游微藻生长的原因初探——种群密度及磷浓度的作用[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(1): 48-54.
- [14] 王吉桥,邓宏相,王秀新,等. 白化牙鲆幼鱼与角叉菜和孔石莼混养的能量平衡和体色恢复率[J]. 大连水产学院学报,2005,20(4): 283-289.
- [15] 杨君,王茜,刘美华,等. 一种简便的海藻DNA提取方法[J]. 生物技术,1999,9(4): 39-42.
- [16] 苏乔,祖元刚,安利佳,等. 我国几类大型海藻的分子系统学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学,2001: 1-74.
- [17] Kathy T N, Lightner D V. Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, taura syndrome virus, and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp[D]. Tucson: University of Arizona, 2001: 1-19.
- [18] 张利峰,张鹤晓,乔卫虹,等. 荧光RT-PCR检测鱼类鲤春病毒血症病毒的研究[J]. 检验检疫科学,2005,15(6): 22-25.
- [19] 罗卫,李惠芳,刘荭,等. 鱼类神经坏死病毒实时荧光RT-PCR检测方法的建立和应用[J]. 中国水产科学,2008,15(3): 506-510.
- [20] 于左安,王崇明,李赞. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒垂直传播途径的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学,2008: 1-50.
- [21] 张家松,董双林,田相利,等. 浮游微藻携带和传播WSSV的研究[J]. 海洋环境科学,2007,26(3): 221-224.
- [22] Liu B, Yu Z, Song X, et al. Studies on the transmission of WSSV(white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae[J]. Invertebr Pathol, 2007,95: 87-92.
- [23] Honjo T. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo* [M]// Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam: Elsevier Science Publishers,1993: 33-41.
- [24] 王盛,钟伏弟,吴祖建,等. 抗病虫基因新资源: 海洋绿藻孔石莼凝集素基因[J]. 分子植物育种,2004,2(1): 153-155.

Identification of AVNV carried by plankton and macroalgae along sea areas for culturing *Chlamys farreri* by FQ-PCR

WANG Na¹, LI Yun¹, REN Weicheng², CAI Yuyong^{1,2}, WANG Chongming²

(1.The key Lab of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2.Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to illuminate the function of plankton and macroalgae on transmission of Acute Viral Necrobiotic Virus (AVNV), samples of macroalgae and plankton were collected randomly from sea areas along Shazikou of Qingdao and Sanggouwan of Rongcheng in 2008 and 2009. The AVNV carried by plankton and different species of macroalgae was identified by PCR and FQ-PCR technique. The results showed that the AVNV was detected from plankton collected along the sea areas for *Chlamys farreri* culturing at Shazikou in August and at Sanggouwan in April by FQ-PCR, and the copy numbers of AVNV were 6.92×10^5 and 1.26×10^3 per liter of sea water, respectively. Twenty of 36 macroalgae samples collected along the sea areas of Shazikou in 14 months were AVNV positive, accounting for 55.56% of the total number. The positive samples included seven species which were *Uva pertusa*, *Enteromorpha prolifera*, *Gelidium crinale*, *E. linza*, *Halymenia floresia*, *Gracilaria textorii* and *Cladophora*. Five of 24 macroalgae samples collected along the sea area of Sanggouwan in nine months were AVNV positive, accounting for 20.83% of the total number. The positive samples belonged to three species including *U. pertusa*, *H. floresia* and *Sargassum*. *U. pertusa* was the main macroalgae carrying AVNV. Eleven of 12 *U. pertusa* samples collected along sea areas of Shazikou were AVNV positive, with the highest AVNV number being $7.68 \times 10^4/0.1$ g in fresh sample collected on August 25, 2009, while at that of Sanggouwan, three of five *U. pertusa* samples collected were AVNV positive, with the highest AVNV number being $3.06 \times 10^3/0.1$ g in fresh sample collected in July, 2009. The present results implied that plankton and some of macroalgae could carry AVNV, and the scallops could be infected when they take plankton carrying virus as food. The role of macroalgae carrying AVNV in transmission of AVNV remains to be further studied. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (5): 1012–1019]

Key words: *Chlamys farreri*; AVNV; FQ-PCR; plankton; macroalgae

Corresponding author: LI Yun. Tel: 0532-82032649; E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn