

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00735

扇贝养殖海区中小型浮游生物携带 AVNV 的荧光定量检测

蔡玉勇^{1,2}, 任伟成¹, 曲朋^{1,2}, 贾志磊^{1,2}, 王崇明¹, 李赞²

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003

摘要: 为了解中小型浮游生物与扇贝急性病毒性坏死症(AVND)的流行传播关系, 于 2009 年对青岛流清河与荣成桑沟湾 2 个不同扇贝养殖海区的浮游生物进行了采样调查, 利用荧光定量 PCR(Fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR)技术对所采集样品携带急性病毒性坏死病毒(AVNV)的情况进行了定量检测。结果表明, 2 个扇贝养殖海区的浮游生物样品均检测到 AVNV, 而且不同粒径的浮游生物携带 AVNV 载量有差异($P < 0.05$): 小于 200 目粒径的浮游生物携带 AVNV 载量最大, 达到 9.45×10^6 copy/mg (DNA); 60~200 目粒径的浮游生物次之, 大于 60 目粒径的浮游生物携带量最少, 仅为 5.81×10^4 copy/mg(DNA)。在上述 2 个扇贝养殖海区, 均在 8 月份检测到浮游生物携带 AVNV。该结果与栉孔扇贝夏季大规模死亡在时间上是吻合的。结论认为, 中小型浮游生物可以携带 AVNV, 并有可能在扇贝急性病毒性坏死症的流行和传播中起到传播媒介的作用。

关键词: 急性病毒性坏死病毒; 栉孔扇贝; 浮游生物; 病毒携带; 荧光定量技术

中图分类号: S944

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0735-07

急性病毒性坏死病毒(Acute Viral Necrosis Virus, AVNV)是引起中国北方沿海养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)夏季大规模死亡(急性病毒性坏死症, Acute Viral Necrosis Disease, AVND)的直接病原^[1-3]。目前, 在明确病原的前提下, 已完成了 AVNV 的流行病学^[4]和组织病理学^[5-6]的研究, 并建立了间接 ELISA^[7]、间接免疫荧光(IIF)^[8]、聚合酶链反应(PCR)^[9]、环介导等温扩增(LAMP)^[10]和荧光实时定量 PCR(FQ-PCR)^[11]等检测方法。这些研究在检测技术层面为研究该病原的流行传播过程奠定了基础。病毒的传播途径大致可以分为 2 条: 一条是垂直传播; 另一条是水平传播。于佐安等^[12]已初步探明 AVNV 不存在卵内垂直传播的可能。有关浮游生物是否携带 AVNV 以及 AVNV 水平传播途径的研究至今尚未见相关报道。浮游生物包括浮游动物和浮游植物, 是扇贝的主要饵料生物, 因此检测扇贝养殖海区浮游生物是否携带 AVNV 对调查 AVNV 的传播途径具有重要意义。

本研究通过对青岛流清河和荣成桑沟湾 2 个扇贝养殖海区连续定期采集浮游生物样品, 进行了浮游生物主要类群和优势种的调查, 并利用 FQ-PCR 技术对浮游生物携带 AVNV 的情况进行了定量检测, 以期探讨浮游生物携带 AVNV 状况及其与扇贝急性病毒性坏死症流行与暴发的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集与处理 2009 年 4–11 月, 定期在流清河和桑沟湾扇贝养殖海区采集浮游生物样品。浮游生物的采集方法是利用浅水 III 型浮游生物网(网口直径 37 cm, 网衣孔径 0.077 mm, 网长 140 cm)垂直拖取水深 10 m 处到水面的样品, 采

收稿日期: 2010-08-01; 修订日期: 2010-10-18.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100307); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-47).

作者简介: 蔡玉勇(1985–), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害研究. E-mail: pcyy1985@yahoo.com.cn

通信作者: 王崇明, 研究员. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

集的样品用 5%(V/V)的福尔马林溶液固定保存,进行种类鉴定和细胞计数(海洋调查规范)^[13];重新拖取 1 网样品收集到 500 mL 广口瓶中 4℃保存,实验室内用孔径为 60 目、200 目筛卷依次分级过滤,过滤后水样以 120 000 r/min 离心 30 min,取沉淀。将过滤和离心所得样品收集到 1.5 mL 离心管中用于总 DNA 提取。

1.1.2 引物与探针 用于 FQ-PCR 检测采用任伟成等^[11]设计的引物,扩增引物上游序列 c-f: 5'-AGC CTT TTA CAG AAT TTT GCA CCT T-3',下游序列 c-r: 5'-TGT CGC ATG TTA ACC TCG TCT G-3',扩增片段大小为 90 bp。Taq Man 探针序列为, 5'-FAM-AGC CAT CAC ATC AGC CAG CAA CGA CT-TAMRA-3'。引物和 Taq Man 探针均委托大连 TaKaRa 生物工程有限公司合成。

1.2 浮游生物总 DNA 提取

利用 OMEGA 微量基因组提取试剂盒提取浮游生物总 DNA, DNA 提取所用试剂全部来自试剂盒。向含有的浮游生物的 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L Buffer TL, 加入 25 μ L OB 蛋白酶, 混匀, 55℃水浴至组织完全消化, 每隔 20~30 min 混匀 1 次。室温 10 000 g 离心 5 min 去除杂质, 小心转移上清液至一个新 1.5 mL 离心管中。加入 220 μ L Buffer BL 涡旋混匀, 70℃水浴 10 min。加入 220 μ L 无水乙醇, 高速涡旋 15 s 混匀。转移混合液至套有收集管 HiBind DNA 柱子中, 室温下 8 000 g 离心 1 min, 弃去滤液。把柱子重新装进收集管, 加入 500 μ L HB Buffer, 室温下 8 000 g 离心 1 min, 弃去滤液。把柱子重新装进收集管, 加入 700 μ L DNA Wash Buffer, 室温下 8 000 g 离心 1 min, 弃去滤液, 重复操作一次。弃去滤液, 把柱子重新装回收集管, 12 000 g 离心空柱 2 min 以电干柱子基质。把柱子装在干净的 1.5 mL 离心管上, 加入 50 μ L 70℃预热的 Elution Buffer 到柱子基质上, 室温下静置 3 min 后, 室温 10 000 g 离心 1 min 以洗脱 DNA, 保留含 DNA 的洗脱液。利用超微量分光光度计 (ThermoScientific NanoDrop2000c) 对 DNA 的浓度和纯度进行分析。

1.3 质粒提取

FQ-PCR 所用阳性对照质粒由任伟成等^[11]构

建, 以 AVNV 基因组全序列为模板, 选取保守序列, PCR 扩增后, 纯化阳性 PCR 产物并将其插入到 PGEM-T(Premaga)质粒载体中构建重组质粒。将该重组质粒转化到 DH-5 α 工程菌内增殖。利用威格拉斯高纯度质粒小量提取试剂盒提取质粒 DNA, 质粒提取所用试剂全部来自试剂盒。取过夜培养菌 1~3 mL 菌液, 装入 1.5 mL 离心管中, 12 000 g 于室温离心 2 min 沉淀菌体, 完全弃除上清。加入 200 μ L Buffer P1, 充分混悬震荡菌体沉淀 10~15 s, 使其完全分散开, 至无絮块存在。加入 200 μ L Buffer P2, 轻轻颠倒离心管 3~5 次, 室温放置 2~3 min, 使细菌完全裂解, 溶液透明。裂解时间不要超过 5 min。加入 300 μ L Buffer P3, 轻轻颠倒离心管 4~6 次, 充分混匀, 室温放置 1 min, 可见白色絮状物产生。于室温 12 000 g 离心 8 min, 小心吸出上清, 转移至插入套管的离心柱内, 于台式离心机上高速离心 30 s。弃去套管内废液, 再将离心柱插回套管。向离心柱内加入 Buffer PWT(洗涤液 T)500 μ L, 高速离心 20 s, 弃去套管内废液, 将离心柱插回套管。向离心柱内加入 Buffer PW(洗涤液)700 μ L, 高速离心 20 s, 弃去套管内废液, 将离心柱插回套管。再次高速离心 1~2 min 电干。高速离心 1~2 min 电干后, 小心取出离心柱, 不要沾上套管内的废液。弃去套管。将离心柱插入一个新的 1.5 mL 离心管, 在离心柱内硅胶膜中心位置加入 100 μ L 洗脱液(Elution Buffer), 注意不要触及硅胶膜; 高速离心 1 min, 离心管中即得纯化的质粒 DNA 溶液。获得的质粒 DNA 溶液, 可直接应用于后续实验中, 或保存于-20℃备用。质粒标准品 DNA 用紫外分光光度计测定浓度, 10 倍系列稀释成 $10^8 \sim 10^1$ 质粒核酸拷贝数进行 FQ-PCR。

1.4 FQ-PCR 检测

FQ-PCR 检测 AVNV 的方法参照任伟成等^[11]所建立的方法, FQ-PCR 反应在 Rotor-Gene3000 扩增仪(澳洲 Corbett Research 公司)上进行。反应体系包括: 12.5 μ L 反应混合液, 10 μ mol/L 的引物 c-f 和 c-r 各 0.5 μ L, 3 μ mol/L 的探针 1 μ L, 样品核酸 1 μ L, 加灭菌双蒸水至 25 μ L。扩增条件为: 95℃,

4 min; 95°C, 10 s 变性, 60°C, 30 s 退火延伸, 共 45 个循环。以质粒核酸拷贝数 10^8 、 10^6 、 10^4 和 10^2 为阳性对照并构建定量标准曲线, 同一样品重复检测 3 次, 根据每 μL 模板 DNA 含有的 AVNV 的拷贝数换算为提取总 DNA 单位质量中携带病毒的载量。

2 结果与分析

2.1 浮游生物主要类群和优势种的统计

浅水 III 型浮游生物网采集到的主要是中、小型浮游生物, 包括浮游动物和浮游植物。流清河扇贝养殖海区在相同时间的浮游生物总生物量都高于桑沟湾扇贝养殖海区, 流清河扇贝养殖海区浮游生物种群多样性也较高。流清河扇贝养殖海区浮游动物主要为桡足类; 其次为毛颚类; 水母类、端足类、多毛类、长尾类、磷虾和糠虾幼虫种类数量较少。中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)、强壮箭虫(*Sagitta crassa*)、双刺唇角水蚤(*Labidocera bipinnata*)、小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*)、平大眼剑水蚤(*Corycaeus dahli*)、双尾纺锤水蚤(*Acartia bifilosa*)和拟长腹剑水蚤(*Oithona similis*)等为常见种。桑沟湾扇贝养殖海区浮游动物主要为桡足类; 其次为毛颚类; 水母类多毛类、长尾类和纤毛虫数量较少。中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)、强壮箭虫(*Sagitta crassa*)、小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*)、平大眼剑水蚤(*Corycaeus dahli*)、双尾纺锤水蚤(*Acartia bifilosa*)、拟长腹剑水蚤(*Oithona similis*)等为常见种。桑沟湾扇贝养殖海区浮游植物主要为硅藻和甲藻: 硅藻门, 以角毛藻属的种类数最多, 达 9 种; 其次是圆筛藻属、菱形藻属、根管藻属和扭鞘藻属。假弯角毛藻(*Chaetoceros pseudocurvisetus*)、角毛藻(*Chaetoceros* sp.)、圆筛藻(*Coscinodiscus* sp.)、偏心圆筛藻(*Chaetoceros eccentricus*)、奇异菱形藻(*Nitzschia paradoxa*)、斯托根管藻(*Rhizosolenia stoltzforthii*)和扭鞘藻(*Streptotheca thamesis*)等为常见种。甲藻门中以角藻属的种类最多, 主要有三角角藻(*Ceratium tripos*)、长角角藻(*Ceratium macroceros*)和纺垂角藻(*Ceratium fusum*)等 9 个种类; 其次为夜光藻属, 主要是夜光

藻(*Noctiluca scientillan*)。流清河扇贝养殖海区浮游植物主要为硅藻和甲藻: 硅藻门, 以角毛藻属的种类数最多; 其次是圆筛藻属、菱形藻属、根管藻属、扭鞘藻属、弯角藻属和骨条藻属。假弯角毛藻(*Chaetoceros pseudocurvisetus*)、璇链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)、角毛藻(*Chaetoceros* sp.)、虹彩圆筛藻(*Coscinodiscus oculus-iridis*)、圆筛藻(*Coscinodiscus* sp.)、尖刺菱形藻(*Nitzschia pungens*)、奇异菱形藻(*Nitzschia paradoxa*)、斯托根管藻(*Rhizosolenia stoltzforthii*)、翼根管藻印度变型(*Rhizosolenia alata* f. *Indica*)、扭鞘藻(*Streptotheca thamesis*)、浮动弯角藻(*Eucampia zoodiacus*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)等为常见种。甲藻门中以角藻属的种类最多, 主要有三角角藻、长角角藻和纺垂角藻等 9 个种类, 其次为夜光藻属, 主要是夜光藻。特别指出的是流清河扇贝养殖海区在 6 月份中肋骨条藻的数量达到 $1.43 \times 10^6 \text{ cell/m}^3$, 占当月浮游植物总量的 95.20%; 9 月份浮动弯角藻的数量达到 $4.86 \times 10^5 \text{ cell/m}^3$, 占当月浮游植物总量的 63.33%, 并且这 2 种藻均为赤潮藻。

2.2 浮游生物携带 AVNV 的检测

FQ-PCR 检测结果表明, 在流清河、桑沟湾扇贝养殖海区采集的浮游生物均可以检测到 AVNV, 1 mg 浮游生物总 DNA 中病毒载量为 $5.81 \times 10^4 \sim 9.45 \times 10^6 \text{ copy}$ 。流清河海区 8 月份 9 月份采集的样品均可以检测到 AVNV, 而桑沟湾海区只有 8 月份采集的样品可以检测到 AVNV(表 1, 表 2)。大于 60 目粒径的浮游生物仅在流清河海区 8 月份采集的样品中检测到 AVNV, 而且病毒载量较低, 小于 60 目粒径的浮游生物在流清河和桑沟湾海区均可检测到。在相同粒径级别的浮游生物中, 流清河海区的样品携带 AVNV 的载量均高于桑沟湾海区。

2.3 不同粒径浮游生物 AVNV 携带量分析

流清河扇贝养殖海区 8 月份中小于 200 目粒径的浮游生物携带 AVNV 量最高, 病毒载量达到 $9.45 \times 10^6 \text{ copy/mg}$ (DNA); 其次为 60~200 目粒径的浮游生物, 病毒载量为 $1.43 \times 10^5 \text{ copy/mg}$ (DNA);

表 1 4–11 月流清河扇贝养殖海区浮游生物携带 AVNV 的检测结果

Tab.1 Identification on plankton carrying AVNV from April to November at Liuqinghe sea area for culturing scallops

浮游生物粒径/目 plankton particle size/mesh	采样时间 sampling date							
	09-4-10	09-5-06	09-6-12	09-7-15	09-8-20	09-9-18	09-10-14	09-11-05
>60	—	—	—	—	++	—	—	—
60–200	—	—	—	—	++	—	—	—
<200	—	—	—	—	+++	+	—	—

注：“—”代表未检测到病毒；“+”代表浮游生物中 AVNV 载量为 $10^4\sim10^5$ copy/mg(DNA)；“++”代表浮游生物中 AVNV 载量为 $10^5\sim10^6$ copy/mg(DNA)；“+++”代表浮游生物中 AVNV 载量为 10^6 copy/mg(DNA)。
Note: “—”show identifying no virus; “+”show viral load of plankton is $10^4\sim10^5$ copy/mg(DNA); “++”show viral load of plankton is $10^5\sim10^6$ copy/mg(DNA); “+++”show viral load of plankton is over 10^6 copy/mg(DNA).

表 2 4–11 月桑沟湾扇贝养殖海区浮游生物携带 AVNV 的检测结果

Tab. 2 Identification on plankton carrying AVNV from April to November at Sanggouwan sea area for culturing scallops

浮游生物粒径/目 plankton particle size/mesh	采样时间 sampling date							
	09-4-12	09-5-21	09-6-18	09-7-22	09-8-22	09-9-22	09-10-22	09-11-25
>60	—	—	—	—	—	—	—	—
60–200	—	—	—	—	+	—	—	—
<200	—	—	—	—	++	+	—	—

注：“—”代表未检测到病毒；“+”代表浮游生物中 AVNV 载量为 $10^4\sim10^5$ copy/mg(DNA)；“++”代表浮游生物中 AVNV 载量为 $10^5\sim10^6$ copy/mg(DNA)；“+++”代表浮游生物中 AVNV 载量为 10^6 copy/mg(DNA)。
Note: “—”show identifying no virus; “+”show viral load of plankton is $10^4\sim10^5$ copy/mg(DNA); “++”show viral load of plankton is $10^5\sim10^6$ copy/mg(DNA); “+++”show viral load of plankton is over 10^6 copy/mg(DNA).

最后为大于 200 目粒径的浮游生物，病毒载量为 7.47×10^4 copy/mg (DNA)；9 月份仅在小于 200 目粒径的浮游生物检测到携带 AVNV，但病毒载量较低，仅为 5.81×10^4 copy/mg (DNA)详见图 1。

桑沟湾扇贝养殖海区仅在 8 月份的浮游生物样品检测到 AVNV，小于 200 目粒径的浮游生物携带 AVNV 载量较高，达到 6.33×10^5 copy/mg (DNA)；60~200 目粒径的浮游生物携带 AVNV 载量较低，为 7.81×10^4 copy/mg (DNA)；而大于 60 目粒径的浮游生物未检测到 AVNV(图 1)。

利用 SPSS 软件对流清河扇贝养殖海区 8 月份 3 种不同粒径的浮游生物和 9 月份粒径小于 200 目浮游生物差异进行了分析，结果表明，8 月份小于 200 目粒径的浮游生物与大于 60 目粒径、60~200 目和 9 月份小于 200 目粒径的浮游生物存在显著差异。桑沟湾扇贝养殖海区 8 月份 3 种不同粒径浮游生物差异分析表明，小于 200 目粒径的浮游生物与大于 60 目粒径、60~200 目粒径的浮游生物存在显著差异($P<0.05$)；60~200 目粒径

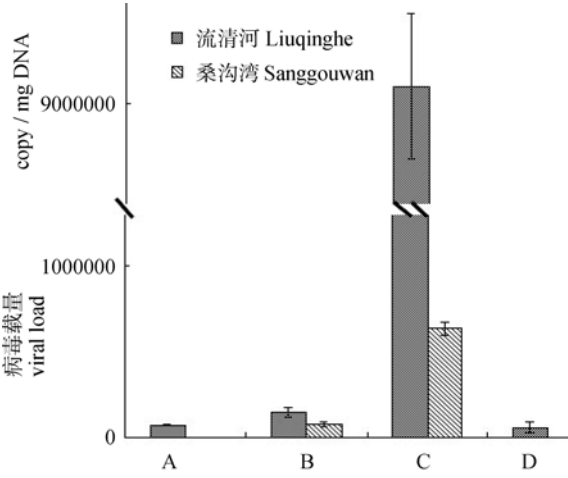


图 1 3 种不同粒径浮游生物携带 AVNV 载量

A 代表 8 月份粒径大于 60 目的浮游生物；B 代表 8 月份粒径 60~200 目的浮游生物；C 代表 8 月份粒径小于 200 目的浮游生物；D 代表 9 月份粒径小于 200 目的浮游生物。

Fig.1 the AVNV viral load in 3 planktons with different diameter A shows the plankton particle size larger than 60 mesh in August; B shows the plankton particle size between 60–200 mesh in August; C shows the plankton particle size smaller than 200 mesh in August; D shows the plankton particle size smaller than 200 mesh in September.

的浮游生物与大于 60 目粒径、小于 200 目粒径的浮游生物存在显著差异; 大于 60 目粒径的浮游生物与小于 200 目粒径、60~200 目粒径的浮游生物存在显著差异($P<0.05$)。

3 讨论

浮游生物是扇贝养殖海区生态群落中的重要组成部分, 包括浮游动物和浮游植物, 其中桡足类是主要的浮游动物优势种群, 硅藻是浮游植物的主要类群。中华哲水蚤、小拟哲水蚤、平大眼剑水蚤、双尾纺锤水蚤、拟长腹剑水蚤等为常见桡足类种。桡足类主要以浮游植物、微型浮游动物和小型浮游动物为食, 属于食物链中的中间。毛颚类、水母类、多毛类、长尾类和纤毛虫数量相对较少, 也属于扇贝养殖海区的常见类群。王如才等^[14]发现, 栉孔扇贝的食料以硅藻为主, 易摄食的主要微藻有舟型藻、圆筛藻、骨条藻、曲舟藻和金藻, 兼食一些绿藻、桡足类、无脊椎动物卵和幼虫及有机碎屑。许强等^[15]通过对桑沟湾扇贝养殖海区养殖扇贝利用脂肪酸标记法检测扇贝体内的 DHA 含量发现, 栉孔扇贝可以利用一些原生动、浮游幼虫以及卵等。

本研究在流清河与桑沟湾 2 个不同的扇贝养殖海区浮游生物样品中均检测到 AVNV, 表明浮游生物可以携带 AVNV, 可能是 AVNV 的重要传播媒介。3 种不同粒径级别的浮游生物均检测 AVNV, 小于 200 目粒径的浮游生物携带 AVNV 的载量最高; 其次为粒径 60~200 目粒径的浮游生物; 大于 60 目粒径的浮游生物 AVNV 载量最低。表明微型、小型浮游生物较中型浮游生物携带 AVNV 载量更多。刘波^[16]发现小球藻(*Chlorella*)可以携带对虾斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV), 并且可以感染对虾幼虾。张家松等^[17]发现湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、盐藻(*Dunaliella salina*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)可以携带 WSSV 并感染美丽猛水蚤, 从而感染以美丽猛水蚤为食的对虾。张家松等^[18]发现桡足类及其休眠卵均可以携带 WSSV, 携带

WSSV 的桡足类休眠卵孵化出的幼虫可已检测到 WSSV 阳性, 其休眠卵很可能在 WSSV 的传播中起到媒介作用。Yan 等^[19]也发现轮虫及其休眠卵均可以携带 WSSV, 携带 WSSV 的轮虫休眠卵孵化出的轮虫可已检测到 WSSV 阳性, 虫卵在对虾养殖池塘隔冬传播 WSSV 中可能起着重要作用。Renault 等^[20]对 Coux 和 Merignac 2 个牡蛎养殖海区浮游生物与海水样品应用 FQ-PCR 技术检测牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpes virus 1, OsHV-1), 2 个海区粒径大于 132 μm 浮游生物样品中均检测到能携带 OsHV-1, 位于河口区的 Coux 海区海水中也可检测到 OsHV-1, 而且 Coux 海区浮游生物样品的阳性检出率明显高于 Merignac 海区。本研究调查发现, 位于河口位置的流清河扇贝养殖海区的相同粒径的浮游生物 AVNV 携带量都高于桑沟湾扇贝养殖海区, 与 Renault 等^[20]的结果相似。王娜等^[21]发现大于 0.22 μm 的微型浮游生物均可携带 AVNV, 流清河扇贝养殖海区在 2009 年 5 月至 10 月均可检测到 AVNV, 桑沟湾扇贝养殖海区在 2009 年 6 月至 10 月均可检测到 AVNV, 微型浮游生物携带 AVNV 载量在 8 月份达到最高, 与本实验结果一致。

本研究中检测桑沟湾浮游生物仅在 8 月份检测到 AVNV, 流清河 8 月和 9 月份都有样品可以检测到 AVNV, 表明 AVNV 载量在 8 月份量达到峰值, 王娜等^[22]检测到海水浮游生物和多种大型海藻可以携带 AVNV, 海水浮游生物 AVNV 载量在 8 月份同样达到最高。检测结果与栉孔扇贝大规模死亡的时间相同, 与其流行病学特征一致。王秀华等^[7]利用 ELISA 检测结果均表明 8 月份养殖扇贝各组织中病毒感染强度均达到最大, 说明小型和微型浮游生物可以携带或黏附 AVNV, 以浮游植物和小型浮游生物为食的浮游生物同样可以携带 AVNV, 是 AVNV 的重要传播媒介。但是粒径大的浮游生物比粒径小的浮游生物携带 AVNV 的能力相对较弱, 表明 AVNV 对不同粒径的浮游生物有一定的选择性。扇贝可能通过滤食的途径摄入携带 AVNV 的浮游生物, 但是携带 AVNV 的浮游生物是否能感染并导致栉孔扇贝大

规模死亡,还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 付崇罗,宋微波,李赟,等.栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒的组织病理学与免疫荧光检测[J].微生物学报,2004,44(6):741-744.
- [6] 王崇明,刘英杰,王秀华,等.栉孔扇贝急性病毒性坏死症(AVND)病理学观察与分析[J].海洋水产研究,2007,28(4):1-8.
- [7] 王秀华,贺桂珍,李赟,等.栉孔扇贝的急性病毒性坏死症(AVND)病毒多克隆抗体的制备及 ELISA 分析[J].高技术通讯,2003,13(9):84-88.
- [8] 王秀华,王崇明,黄健.间接免疫荧光法检测栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒[J].中国水产科学,2005,12(1):38-42.
- [9] 任伟成.栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术研究[D].青岛:中国海洋大学,2009.
- [10] Ren WC, Wang C M, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of acute viral necrosis virus in scallop *Chlamys farreri* [J]. Acta Virologica, 2009, 53(3): 161-167.
- [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] 于佐安,王崇明,李赟,等.栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒(AVNV)卵内的垂直传播途径[J].水产学报,2009,33(6):1031-1036.
- [13] 国家技术质量监督局编.海洋监测规范(第四部分:海水分析)[S].北京:中国标准出版社,1992:17-22.
- [14] 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.
- [15] 许强,杨红生,王红,等.桑沟湾养殖栉孔扇贝食物来源研究-脂肪酸标志法[J].海洋科学,2007,31(9):78-84.
- [16] 刘波.盐度和微藻在对虾感染白斑综合症病毒中的作用研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2003:36-41.
- [17] 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.
- [18] 张家松,董双林,董云伟,等.虾池中桡足类及其休眠卵携带对虾白斑综合症病毒的初步调查研究[J].中国海洋大学学报,2007,37(3):405-408.
- [19] Yan D C, Dong S L, Huang J, et al. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments[J]. Dis Aquat Org, 2004, 59: 69-73.
- [20] Renault T, Faury N, Saulnier D, et al. Summer mortality and Ostreid herpes virus investigations in 2008, in France[R]. Ifremer Annual Meeting, 2009.
- [21] 王娜,李赟,任伟成,等.扇贝养殖海区微型浮游生物携带 AVNV 的荧光定量检测[J].(水产学报已接收).
- [22] 王娜,李赟,任伟成,等.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[J].中国水产科学,2010,17(5):1012-1019.

Identification by FQ-PCR of AVNV carried by mesoplankton and microplankton at two ocean sites for culturing *Chlamys farreri*

CAI Yuyong^{1,2}, REN Weicheng¹, QU Peng^{1,2}, JIA Zhilei^{1,2}, WANG Chongming¹, LI Yun²

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: This paper describes the relationship between transmission routes of AVNV and mesoplankton and microplankton in the ocean for culturing scallops. Plankton samples were collected in Liuqinghe Qingdao and Sanggou Bay, Rongcheng, from April to November 2009. In August, the AVNV copy number carried by plankton was identified by FQ-PCR. Results showed that plankton samples from both ocean areas carried the virus, and that the virus numbers differed with different particle sizes. Plankton samples with the same particle sizes at the Liuqinghe site carried more AVNV copy numbers than those at the Sanggou Bay site at a given time. Plankton particle sizes smaller than 200 mesh carried the greatest amount of viruses (viral DNA number reached 9.45×10^6 copy/mg DNA), followed by plankton particle sizes between 60–200 mesh size. Plankton particle sizes larger than 60 mesh carried the least amount viruses. Finally, results suggest that plankton can carry AVNV, and that they may be an important host of AVNV.

Key words: AVNV; *Chlamys farreri*; Plankton; FQ-PCR

Corresponding author: WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn