

主要浮游微藻携带急性病毒性坏死症病毒(AVNV)的研究

张婧宇¹, 李 赞^{1*}, 任伟成², 蔡玉勇²

(1. 中国海洋大学水产学院, 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: 研究常见浮游微藻对栉孔扇贝“急性病毒性坏死症病毒”(AVNV)的黏附和携带, 探讨微藻作为病毒水平传播媒介的可能性, 进而了解 AVNV 的水平传播途径。我们选取培养 17 种海区常见浮游微藻, 在微藻生长的指数增长期混入 AVNV 病毒粗提液, 用 PCR 等分子检测法定期对试验微藻携带 AVNV 的情况进行检测。实验结果表明, 亚心形扁藻、小球藻、绿色杜氏藻、四片藻、中肋骨条藻和小新月菱形藻可以在一定时间内携带 AVNV, 占到实验微藻总数的 35.3%。用携带 AVNV 的 6 种微藻投喂试验栉孔扇贝以分析其致病力, 结果表明, 试验扇贝表现出典型的急性病毒性死亡症状, 在试验的 9 d 时间内, 6 组感染组试验扇贝的累积死亡率均显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 高于对照组, 表明携带 AVNV 的微藻具有显著的致病性。本研究的结果表明, 栉孔扇贝通过摄食携带 AVNV 的微藻而感染发病是可能的, 浮游微藻可能是 AVNV 水平传播的重要传递体。

关键词: 浮游微藻; 急性病毒性坏死症病毒(AVNV); 栉孔扇贝; 水平传播途径

中图分类号: S 946

文献标识码: A

自从养殖栉孔扇贝大规模死亡现象发生以来, 围绕该病害发生的流行病学和病原学等进行了广泛研究, 目前已明确该病害的典型症状、发生的季节性特征^[1-2]以及诱发因子^[3]。组织病理学、人工感染实验以及免疫学的研究均表明, 一种球形病毒是该疾病的病原, 该病毒直径 130 ~ 170 nm, 为具囊膜的二十面体结构。现已将由该病毒引起的病症定名为急性病毒性坏死症 (acute virus necrosis disease, AVND), 并将该病原称为急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV)^[4-6]。在此基础上, 建立了免疫学和分子生物学^[7]等多种病原检测技术^[8-10]。这些工作为追踪该病原侵染机制、认识其流行传播规律奠定了基础。

目前关于该病毒流行传播途径尚不十分清楚。于佐安等^[11]研究表明, 感染 AVNV 的亲贝通过卵内垂直传播将病毒传至子一代的可能性不大。贺桂珍等^[12-13]研究表明, 海区养殖的幼贝在养殖早期即已感染 AVNV, 说明分布在养殖海区的 AVNV

可通过中间宿主传至养殖贝类。目前扇贝的大规模养殖普遍采用笼养方式, 养殖笼内的扇贝主动接触病原的可能性不大, 但扇贝须要通过滤食活动摄取海区大小合适的浮游生物作为饵料。然而, 这些浮游生物是否可以感染或者携带 AVNV, 而且携带 AVNV 浮游生物的致病力如何仍不清楚。

本研究将提取的 AVNV 加入到 17 种常见的浮游微藻中, 用分子的方法进行检测, 以了解 AVNV 对浮游微藻的选择性黏附情况, 随后以携带 AVNV 呈阳性的微藻作为栉孔扇贝饵料, 观察试验扇贝发病死亡情况, 以反映被微藻黏附 AVNV 的致病力, 以此来了解浮游微藻在 AVNV 流行传播中作用, 为认识 AVNV 的流行传播规律提供依据。

1 材料与方法

1.1 病毒粗提液的制备

用于微藻携带病毒试验的 AVNV 粗提液的制备参照 Zhang 等^[14]的方法。具体操作为, 从患

收稿日期:2010-05-05 修回日期:2010-06-08

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100307)

通讯作者:李 赞, Tel:0532-82032649, E-mail:sxswlwl@ouc.edu.cn

病濒死的栉孔扇贝剪取病料组织,每克组织约加入 2 mL PBS 缓冲液,随后 6 000 r/min 冰浴匀浆 5 min,匀浆液于 4 ℃,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,沉淀再次加入 PBS,冰浴匀浆,重新在 8 000 r/min 离心 10 min。将 2 次所得上清液混合,经 0.45 μm 孔径滤膜过滤后,滤液作为 AVNV 粗提液 -80 ℃ 保存,用于感染分离培养的微藻。

1.2 AVNV 对微藻的选择性黏附试验

用于感染试验的微藻共 17 种分属四个门。其中绿藻门 5 种,分别为小球藻(*Chlorella* sp.)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、四片藻(*Tetraselmis tetrahele*)、绿色杜氏藻(*Dunaliella viridis*)和塔胞藻(*Pyramimonas* sp.);甲藻门 3 种,分别为小亚德里亚共生藻(*Gymnodinium microadriaticum*)、亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)和前沟藻(*Amphidinium* spp.);金藻门 3 种,分别为球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、湛江叉鞭金藻(*Dicrateria inornata*)和绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*);硅藻门 6 种,分别为小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)、牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)。所有藻种均来自中国海洋大学微藻种质库。

试验微藻的培养采用 f/2 海水培养基,6 000 lx(光暗周期为 12D:12L)的光照,其中绿藻门、金藻门和甲藻门微藻的培养温度为 23 ℃,硅藻门微藻的培养温度为 19 ℃。

待培养微藻生长至指数增长后期时,取每种微藻 750 mL,平均分装 3 个三角瓶中做为平行样,每平行样加入 400 μL 病毒粗提液。保持微藻培养条件不变。分别在试验开始第 1、24、48、72、96、120、144、168 和 192 小时取 2 mL 与 AVNV 粗提液混合培养的藻液,4 ℃ 下 6 000 r/min 离心 15 min 收集微藻。收集微藻加入 1 mL 消毒海水漂洗,清除游离的病毒粒子,重复 3 次。随后采用 CTAB 法^[15]提取收集藻液 DNA,用于病毒的检测。

1.3 微藻携带 AVNV 的检测分析

首先采用 PCR 法^[16]检测微藻携带 AVNV 的情况。用于 PCR 扩增的引物由上海生工合成,其中上游引物为:5'-TTTGAGCACTGTAAACA-CCCAT-3';下游引物为:5'-CTGGTCCTACT-

GAAACATCGTAAT-3'。PCR 反应总体积为 20 μL,其中 10 × 缓冲液(200 mmol/L KCl;200 mmol/L Tris-HCl pH 8.4;100 mmol/L (NH₄)₂SO₄;15 mmol/L MgCl₂)2.0 μL,dNTP(2.5 mmol/L)1.5 μL,正反引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,Taq 酶(2.5 U/μL)0.2 μL,模板(50 ng/mL)0.5 μL,剩余体积用 ddH₂O 补足。PCR 反应程序为,95 ℃ 预变性 4 min,35 个循环包括,94 ℃ 变性 60 s,51.5 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,最后在 72 ℃ 下终延伸 5 min。PCR 产物分别在 1.0% 琼脂糖凝胶,150 V 稳压电泳 30 min 分离,EB 染色,经凝胶成像系统拍照分析。

为了确定微藻携带 AVNV 的准确数量,本研究还对 PCR 检测呈现阳性的藻液进行了荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测。FQ-PCR 上游引物为 c-f:5'-AGCCTTTTACA GAATTTTGCACCTT-3';下游引物为 c-r:5'-TGTCGCATGTTAACCTCGTCTG-3',预计扩增片段 90 bp。Taq Man 探针序列为:5'-FAM-AGCCATCACATCAGCCAGCAACGACT-TAMRA-3',引物和探针均委托大连 TaKaRa 生物工程有限公司合成。FQ-PCR 反应体系按照荧光定量 PCR 快速反应试剂盒(大连 TaKaRa 生物工程有限公司)说明书配制。采用 25 μL 体系,包括:反应试剂盒预混合液 PreMix 12.5 μL,TaqMan 探针 0.12 μmol/L,正反向引物各 0.25 μmol/L,模板 DNA 1 μL,其余体积用 ddH₂O 补足。FQ-PCR 反应在 Rotor-Gene 3000 扩增仪(澳洲 Corbett Research 公司)上进行。扩增条件为:95 ℃,4 min 预变性;95 ℃,10 s 变性;60 ℃,30 s 退火延伸,共 45 个循环。单点荧光检测在 60 ℃ 进行。以重组质粒标准品 DNA 拷贝数分别为 10⁸、10⁶、10⁴和 10²为阳性对照,依据可检测到阳性结果时 PCR 循环次数 ct 值,计算每升微藻中所含有的 AVNV 拷贝数^[16]。

1.4 黏附在微藻上 AVNV 的致病力分析

为分析黏附于微藻上的 AVNV 的致病力,本研究用携带 AVNV 的微藻作为饵料用于感染栉孔扇贝。试验用扇贝采自青岛沙子口流清河扇贝养殖基地。采集扇贝首先进行暂养,暂养期间不投饵,持续充气,每天换水,及时弃除死亡个体,一周后用于感染实验。

感染试验设 1 个对照组,6 个攻毒组。每组试验设 3 个平行样,每个平行样为在 25 L 过滤海水

中放 17 只扇贝。试验期间对照组每天投喂 6 种不带毒微藻等比例混合的混合微藻 1 次,连续充气,每天换水 1/3 体积。攻毒组分别在试验开始的第 1 和第 3 天于 20:00 投喂携带 AVNV 的微藻,其余时间每天于 20:00 投喂混合微藻。为保持攻毒组水体中 AVNV 浓度稳定,攻毒当天不换水,其余操作与对照组相同。试验期间保持水温在 25 ℃。攻毒试验持续 9 d,每天观察扇贝生长存活情况,及时检出死亡个体,统计各组死亡扇贝数,计算累积死亡率。试验数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 微藻对 AVNV 的选择性携带

在 AVNV 感染 17 种微藻的 240 h 期间,定期进行微藻携带 AVNV 的 PCR 检测,结果显示,小球藻、亚心形扁藻、四片藻、绿色杜氏藻、小新月菱形藻和中肋骨条藻这 6 种微藻在一段时间内可到携带 AVNV(表 1 和图 1)。如亚心形扁藻开始检测到 AVNV 的时间是试验后 48 h,试验 192 h 后则呈阴性,携带病毒的持续时间为 6 d。小球藻开始检测到 AVNV 的时间是试验开始后 72 h,168 h 后即呈阴性,携带病毒的时间仅 4 d。6 种微藻携带 AVNV 的持续时间在 4~6 d。而其它 11 种微藻则一直呈 AVNV 检测阴性。结果表明可携带 AVNV 的微藻种数占到试验微藻总数的 35.29%。

表 1 17 种微藻检测感染信息
Tab.1 Infection of the 17 species of microalgae

藻种名 microalgae	藻种学名 Latin name	感染情况 infection test	感染时微藻密度(10^4 cells/mL) infected densities of microalgae
小球藻	<i>Chlorella</i> sp.	+	76
亚心形扁藻	<i>Platymonas subcordiformis</i>	+	31
四片藻	<i>Tetraselmis tetraathele</i>	+	40
塔胞藻	<i>Pyramimonas</i> sp.	-	-
绿色杜氏藻	<i>Dunaliella viridis</i>	+	70
小亚得里亚共生藻	<i>Gymnodinium</i> sp.	-	-
亚历山大藻	<i>Alexandrium</i> sp.	-	-
前沟藻	<i>Amphidinium hoefleri</i>	-	-
球等鞭金藻	<i>Isochrysis galbana</i>	-	-
湛江叉鞭金藻	<i>Dicrateria inornata</i>	-	-
绿色巴夫藻	<i>Pavlova viridis</i>	-	-
小新月菱形藻	<i>Nitzschia</i> sp.	+	140
中肋骨条藻	<i>Skeletonema costatum</i>	+	56
新月菱形藻	<i>Nitzschia closterium</i>	-	-
三角褐指藻	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	-	-
伞氏角毛藻	<i>Chaetoceros muelleri</i>	-	-
纤细角毛藻	<i>Chaetoceros gracilis</i>	-	-

注:“+”表示检测呈阳性,“-”表示检测呈阴性。

Notes:“+” positive;“-”negative.

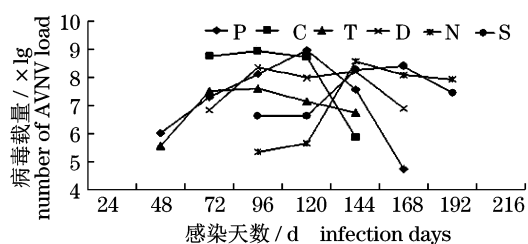


图 1 6 种微藻携带 AVNV 的情况

P. 亚心形扁藻; C. 小球藻; T. 四片藻; D. 绿色杜氏藻; N. 小新月菱形藻; S. 中肋骨条藻。

Fig.1 AVNV load on the six species of microalgae

P. (*P. subcordiformis*); C. (*Chlorella* sp.); T. (*T. tetraathele*); D. (*D. viridis*); N. (*Nitzschia* sp.); S. (*S. costatum*).

与携带 AVNV 的持续时间存在不同,6 种阳性微藻携带 AVNV 的数量也存在显著差异,FQ-PCR 检测表明(图 1),6 种微藻开始检测到 AVNV 时每升微藻培养液携带 AVNV 的拷贝数最高的是绿色杜氏藻,为 7.05×10^6 ,最低为小新月菱形藻,仅 0.22×10^6 。随着感染时间延长,各微藻携带 AVNV 的数量陆续达到峰值,亚心形扁藻携带 AVNV 的数量在感染后 120 h 达峰值,为 9.35×10^8 ,但四片藻携带病毒的数量一直处于较低的水平,在感染后 96 h 达峰值,仅为 0.40×10^8 ,与其它微藻携带 AVNV 数量相比达极显著差异。

2.2 微藻携带的 AVNV 对栉孔扇贝的致病力比较

根据 AVNV 选择性黏附微藻的实验结果,本研究选用 6 种可携带 AVNV 的微藻作为带毒饵料

料用于栉孔扇贝的攻毒试验。首先检测了用于 6 种攻毒试验微藻携带 AVNV 的数量,除四片藻实验组稍低外,其余 5 种微藻实验组 AVNV 拷贝数均在 10^8 /L 以上(表 2)。

表 2 6 种微藻用于攻毒藻密度和 AVNV 浓度
Tab. 2 Densities of the microalgae and AVNV load before challenge study

藻种 species	小球藻 <i>Chlorella</i> sp.	亚心形扁藻 <i>P. subcordiformis</i>	四片藻 <i>T. tetrathele</i>	绿色杜氏藻 <i>D. viridis</i>	小新月菱形藻 <i>Nitzschia</i> sp.	中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>
藻密度(10^4 /mL) algae density	170	70	60	200	237	100
AVNV 载量(10^8 /L) AVNV load	8.46	9.35	0.40	2.30	3.90	2.55

6 个攻毒组扇贝在第一次攻毒后第 2 至 4 天陆续出现死亡现象。发病个体开始出现对外界刺激反应迟钝,扇贝活动能力减弱,外套膜眼点颜色黯淡,也有扇贝出现外套膜萎缩现象。濒死扇贝外套膜严重萎缩,鳃组织开始降解。罹病扇贝表现典型的急性病毒性坏死症的患病症状。

死亡现象发生最早的是小球藻和四片藻实验组,在攻毒第 2 天出现死亡,亚心形扁藻、小新月菱形藻和绿色杜氏藻实验组死亡现象发生在第 3 天,中肋骨条藻实验组则在攻毒后第 4 天开始死亡,随后陆续进入快速死亡期。但各实验组进入快速死亡的时间稍有差别,亚心形扁藻实验组从感染后的第 3 天,中肋骨条藻和四片藻实验组从第 4 天,小球藻和绿色杜氏藻实验组从第 5 天,小新月菱形藻实验组则从第 6 天陆续进入快速死亡期。至试验结束时,亚心形扁藻、小球藻、四片藻、绿色杜氏藻、小新月菱形藻和中肋骨条藻实验组的累计死亡率分别为 76.47%、86.27%、78.43%、86.27%、84.31% 和 82.35%。试验期间,空白对照组在攻毒第 2 天有 1 例死亡,之后直到实验第 7 天后各组陆续出现少量死亡个体,攻毒实验结束时,对照组累计死亡率为 26.47%。扁藻、四片藻和中肋骨条藻实验组与对照组的累积死亡率相比达显著水平($P < 0.05$),其余 3 种藻与对照组的累计死亡率差异则达到极显著水平($P < 0.01$)(图 2)。

3 讨论

关于浮游微藻携带病毒的研究, Tsuneo^[17] 认为浮游微藻对 WSSV 的粘附携带与微藻表面的

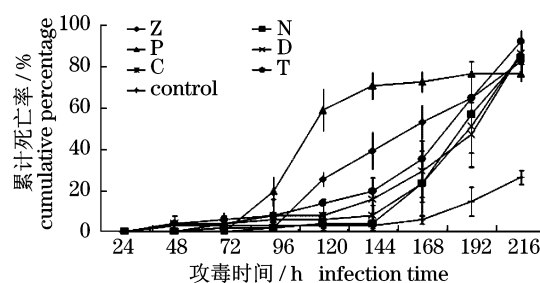


图 2 栉孔扇贝攻毒累积死亡率

P. 亚心形扁藻; C. 小球藻; T. 四片藻; D. 绿色杜氏藻; N. 小新月菱形藻; S. 中肋骨条藻。

Fig. 2 Cumulative mortality percentage of *C. farreri* exposed to AVNV

P. (*P. subcordiformis*); C. (*Chlorella* sp.); T. (*T. tetrathele*); D. (*D. viridis*); N. (*Nitzschia* sp.); S. (*S. costatum*).

化学成分有关。Liu 等^[18] 和张家松等^[19] 的研究分别表明 WSSV 可选择性的被微藻携带,而且微藻对 WSSV 的黏附仅能维持 10 d。本研究用分属于 4 个门 17 种微藻进行的感染试验显示,绿藻门和硅藻门的 6 种微藻可携带 AVNV,而金藻门和甲藻门的几种微藻则均不能被 AVNV 黏附。微藻对 AVNV 的携带也仅能维持一段时间,携带 AVNV 时间最长的微藻是亚心形扁藻,但也仅 6 d。本研究还利用感染呈阳性的微藻多次感染同种微藻,以期证实 AVNV 在微藻间的水平传播情况,结果始终没有检测到阳性结果,这说明 AVNV 对微藻的黏附可能仅是微藻对 AVNV 的简单粘附,试验微藻并不是 AVNV 的增殖有机体。

关于养殖海区扇贝摄食的饵料生物种类,王

如才等^[20]研究表明,养殖海区栉孔扇贝滤食的饵料生物主要为硅藻类,同时也包括金藻、绿藻、甲藻、动物卵子、幼虫、以及大小合适的有机颗粒。本研究试验的微藻均是扇贝摄食的主要饵料生物。本研究利用携带 AVNV 的微藻进行攻毒试验的结果表明,扇贝摄食粘附 AVNV 的微藻陆续发生典型的急性病毒性坏死症的发病症状,累积死亡率普遍在 75% 以上,尽管稍低于在扇贝大规模死亡现象发生时期养殖海区调查获得的扇贝累积死亡率,但也明确表明由微藻粘附的 AVNV 仍然具有相当高的致病力。流行病学调查结果表明,栉孔扇贝大规模死亡现象在 7 月底和 8 月初集中发生,此时养殖海区每升海水浮游生物携带 AVNV 的数量普遍在 10^8 以上(另文发表),本研究用于感染试验的微藻携带 AVNV 的数量与此相当,这样的病毒量足以导致扇贝感染发病。综合这些结果可以认为在养殖海区发病死亡的扇贝可能就是摄食携带 AVNV 的浮游生物而感染 AVNV 的,这说明浮游生物是 AVNV 流行传播的重要传播者。

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,2001,25(12):23-26.
- [2] Xiao J, Ford S, Yang H S, *et al.* Studies on mass summer mortality of cultured zhikong scallops (*Chlamys farreri* Jones et Preston) in China [J]. Aquaculture, 2005, 250: 602-615.
- [3] 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.
- [4] 王崇明,王秀花,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.
- [5] 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.
- [6] 付崇罗,宋微波,李赞,等. 栉孔扇贝感染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.
- [7] 付崇罗,宋微波,李赞,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒单克隆抗体的制备及 ELISA 检测[J]. 微生物学报,2005,45(1):116-120.
- [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,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.
- [10] 李赞,贺桂珍,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒感染的 ELISA 检测[J]. 高技术通讯,2003,13(7):90-92.
- [11] 于佐安,王崇明,李赞,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.
- [12] 贺桂珍,李赞,王崇明,等. 栉孔扇贝和海湾扇贝病原体感染与疾病发生关系探讨[J]. 高技术通讯,2003,13(3):75-79.
- [13] 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.
- [14] Zhang J S, Dong S L, Tian X L, *et al.* Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission [J]. Aquaculture, 2006, 261: 1181-1185.
- [15] Dellaporta S, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini-preparation[J]. Plant Biol Rep, 1983, 1(4):19-21.
- [16] 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的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [17] Tsuneo H. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of heterosigma akashiwa[M]// Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993:33-41.
- [18] Liu B, Yu Z, Song X, Guan Y. Studies on the transmission of WSSV(white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 95(2):87-92.
- [19] 张家松,董双林,田相利,等. 浮游微藻携带和传播 WSSV 的研究[J]. 海洋化境科学,2007,26(3):221-224.
- [20] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1998:168-169.

Studies on phytoplanktons carrying and spreading AVNV

ZHANG Jing-yu¹, LI Yun^{1*}, REN Wei-cheng², CAI Yu-yong²

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: We studied the possible role that marine microalgae may play during the outbreaks of acute viral necrobiotic disease (AVND) of cultured zhikong scallops (*Chlamys farreri*). In order to elucidate the possibility of marine microalgae carrying AVNV (acute viral necrobiotic disease virus), seventeen species of microalgae were co-cultured with pure AVNV solution and were assayed daily by PCR to study whether they could carry AVNV. Further experiments were conducted to investigate whether the virus carried by microalgae could re-infect zhikong scallops. The results showed that 6 (including *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella* sp., *Dunaliella viridis*, and *Tetraselmis tetrathele* in Chlorophyta and *Nitzschia closterium minutissima*, and *Skeletonema costatum* in bacillariophyta) of 17 microalgae, which account for 35.3% of the tested algae, could carry AVNV, the AVNV detections in microalgae were positive during 96 to 144 h. The 6 AVNV-microalgae complex were fed to zhikong scallops, the tested scallops show a typical acute viral necrobiosis symptom, and the accumulated mortalities of scallops fed with the AVNV-microalgae complex were significant ($P < 0.05$) or highly significant ($P < 0.01$) compared with that of the control fed with mixture with 6 species microalgae during the nine-day experiment, which indicated that the AVNV-microalgae complex have an impressing ability to infect the scallops. Based on these laboratory challenges studies, the microalgae can serve as a vector in the horizontal pathway of transmission of AVNV via feeding or filtering process of scallops.

Key words: microalgae; acute viral necrobiotic disease virus (AVNV); *Chlamys farreri*; horizontal transmission

Corresponding author: LI Yun. E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn