

两个海区栉孔扇贝感染 AVNV 的比较分析

杨彩霞^{1,2}, 李 赞², 王崇明^{1*}, 曲 朋^{1,2}, 黄 健¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学水产学院, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 是一种能导致栉孔扇贝大规模死亡的 DNA 病毒, 研究通过检测不同养殖模式和不同苗种来源的栉孔扇贝样本携带 AVNV 的情况, 以寻找合理的养殖模式和苗种, 降低疾病的发生。以扇贝单一养殖的青岛流清河海区和贝藻间养的荣成桑沟湾海区为采样点, 每月 (2010 年 3 月—2011 年 4 月) 定期采集 2 个海区野生苗养殖和人工苗养殖的栉孔扇贝样品各 10 只, 共得到扇贝样本 480 只。取扇贝外套膜组织, 提取 DNA, 采用巢式 PCR 检测扇贝感染 AVNV 的情况, 并对 2 个海区 2 类栉孔扇贝 AVNV 感染率进行比较。结果显示, 在 2 个海区的 2 类栉孔扇贝体内均检测到 AVNV, 流清河海区野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝 AVNV 感染率分别为 21.1% 和 18.9%, 桑沟湾海区 2 类扇贝 AVNV 感染率分别为 11.1% 和 5.6%; 2 个海区 AVNV 感染扇贝均集中在 7、8 月份, 其中, 流清河海区最高可达 80%, 桑沟湾海区最高仅 40%。研究表明, 贝藻间养和选用人工苗能有效减少 AVNV 对养殖扇贝的感染, 是控制养殖扇贝发病死亡的有效措施。

关键词: 栉孔扇贝; 急性病毒性坏死病毒; 巢式 PCR; 养殖模式

中图分类号: S 943

文献标志码: A

近几十年来, 中国海水养殖产业规模不断扩大, 养殖的自身污染问题相当突出^[1]。长期单一品种的高密度养殖, 造成严重的水质恶化并导致养殖品种出现生长缓慢、病害频发等问题。大型藻类与养殖动物具有生态上的互补性, 它们能吸收养殖动物释放到水体中多余的营养盐; 借助自身的光合作用, 大型藻类也可有效固定海水中的无机碳并释放氧气, 从而对养殖环境起到生物修复和生态调控作用, 而且养殖大型藻类也具有很高的经济效益。为此, 藻类作为清洁生物在水产养殖中的应用近年来迅速发展, 并形成了藻类与鱼^[2-3]、虾^[4-5]、贝类^[6-7]及与多种生物^[8-9]的综合养殖模式。

青岛流清河海区和荣成桑沟湾海区位于山东半岛东端, 为传统的扇贝养殖海区。其中桑沟湾属半封闭性内湾, 从上世纪 80 年代桑沟湾就开始

进行大规模浮筏养殖, 主要养殖品种有栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和海带 (*Laminaria japonica*) 等, 目前几乎整个海湾都开展贝类和大型藻类养殖, 其中, 约 70% 的水域养殖大型藻类, 20% 的水域养殖贝类, 同时也开展了少量的网箱养殖。而青岛流清河海区养殖结构则相对单一, 近三十年来, 一直以栉孔扇贝养殖为主。自 1996 年扇贝大规模死亡现象发生以来, 这两个养殖海区均是病害发生的重点疫区。流行病学调查发现, 桑沟湾海区养殖扇贝死亡率总是低于流清河海区。利用建立的病原检测技术, 王娜等^[10-11]、蔡玉勇等^[12]对 2 个海区浮游生物携带 AVNV 的情况进行检测, 结果显示 2 个海区 AVNV 的分布水平存在明显不同。杨彩霞等^[13-14]对 2 个海区的细菌多样性进行了分析, 也显示 2 个海区细菌群落结构存在显著差异。但关

收稿日期: 2013-03-20 修回日期: 2013-04-03

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-48)

通信作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

于2个海区扇贝感染AVNV的季节性变化仍未见报道。本研究自2010年3月至2011年4月分别从流清河和桑沟湾养殖海区采集栉孔扇贝,对其感染AVNV情况进行周年检测,以比较2个海区栉孔扇贝感染AVNV的季节性变化特点,探讨不同养殖模式对AVNV流行传播的调控作用,为建立有效预防控制措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

检测扇贝样品共分2类,一类为野生苗养成的栉孔扇贝,另一类为人工苗养成的栉孔扇贝。采样地点为青岛流清河海区和荣成桑沟湾海区

(图1),这2个采样点均采集这2种贝类,其中青岛流清河海区扇贝采集时间为2010年3月—2011年4月(2月除外),荣成桑沟湾海区扇贝采集时间为2010年5月—2011年4月。每月定期采集海区野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝各10只,低温带回实验室。

1.2 DNA提取

根据贺桂珍等^[15]的研究结果,选取外套膜组织作为检测样本,利用海洋动物组织DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取DNA。提取DNA采用NanoDrop 2000(Thermo)检测浓度和纯度后,于-20℃冰箱保存。

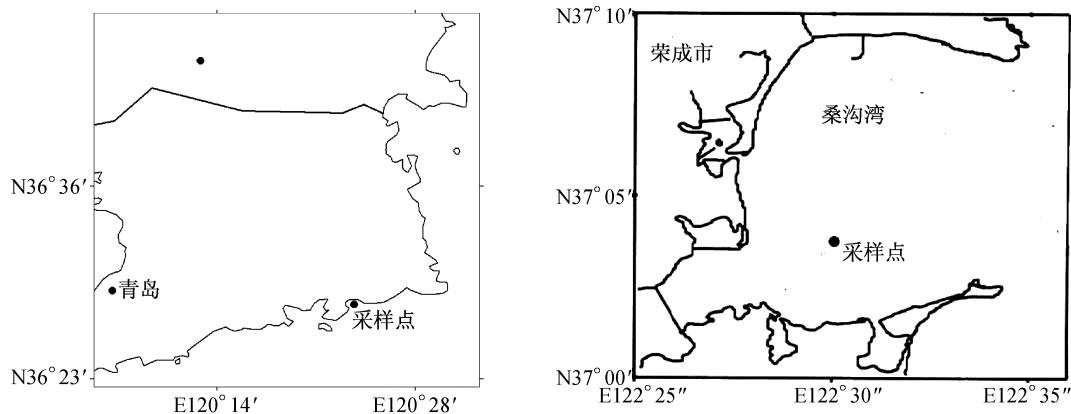


图1 青岛流清河海区和荣成桑沟湾海区采样地点

Fig.1 Map of sampling stations

1.3 扇贝感染AVNV的巢式PCR检测

巢式PCR检测AVNV的方法参考任伟成^[16]的方法,外侧引物为P1:5'-TGT TCG TGC TGA GAC GGA ATG T -3', P2:5'-AGG TGC TGT ATC CAT GGC TGA A -3';内侧引物为P3:5'-TAC CGC CAG ATG TCC TCC TA-3', P4:5'-TAC CCA ATT CCA ACC CTG TT-3'。两对引物预计扩增片段大小分别为706和314 bp。

25 μL反应体系包括10 × PCR Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)2 μL, AVNV-P1(10 μmol/L)1 μL, AVNV-P2(10 μmol/L)1 μL, 模板1 μL, rTaq(5 U/μL)0.25 μL, 无菌去离子水补足至25 μL。首先P1/P2外引物进行第1次PCR,反应程序为94℃预变性5 min,然后94℃1 min, 52.5℃1 min, 72℃1 min进行35个循环,72℃终延伸5 min。第1次PCR扩增产

物稀释10倍后作为模板,内引物P3/P4进行第2次扩增,反应体系与第1次PCR相同,反应条件为:94℃预变性5 min,94℃1 min,50℃1 min,72℃1 min进行35个循环,72℃延伸5 min。2次检测均设置阳性和阴性对照,其中阳性对照模板为从携带AVNV的扇贝病料样品提取的DNA,阴性对照模板为无菌去离子水。

2 结果

NanoDrop 2000检测后显示,提取DNA的浓度和纯度均可用于PCR扩增。巢式PCR扩增结果显示(图2),阳性对照样品扩增片段分别在预期的706和314 bp处出现单一条带,显示PCR结果可用,且引物特异性好,无非特异性扩增。其中阴性对照无条带,说明PCR产物无污染。

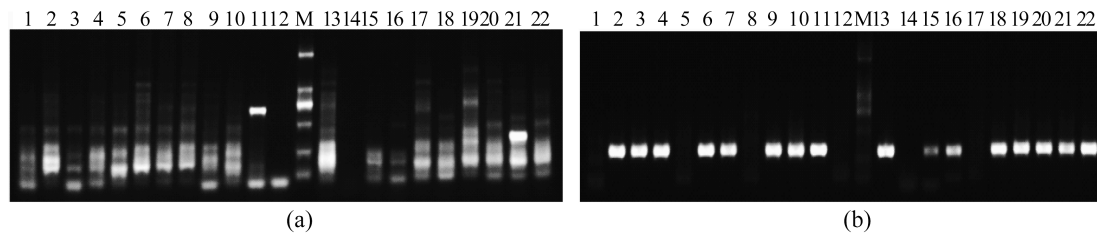


图2 巢式 PCR 扩增结果图

(a)引物 P1/P2 一扩产物琼脂糖凝胶电泳结果;(b)引物 P3/P4 二扩产物琼脂糖凝胶电泳结果

泳道 1~10. 流清河 7 月份人工苗样品,11. 阳性对照,12. 阴性对照,M. Marker,泳道 13~22. 流清河 8 月份野生苗样品

Fig.2 Nest-PCR analysis of scallops using primer pairs

(a) PCR results obtained using primers P1/P2; (b) PCR results obtained using primers P3/P4

Lane 1 - 10. PCR products of scallops from artificial seed of Liuqing River of July, 11. positive control, 12. negative control (distilled water), M. DL 2000 Marker, 13 - 22. PCR products of scallops from wild seed of Liuqing River of August

2 个海区共 480 份样品 PCR 检测结果显示 (表 1), 阳性个数 56 个, 平均阳性率为 11.67%。其中, 流清河海区 12 个月野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝各 130 份样品中, 阳性个数均为 19 个, 阳性率也同为 14.62%。桑沟湾海区 10 个月份 100

份人工苗养殖栉孔扇贝样品中, 阳性个数 5 个, 阳性率为 5%; 120 份野生苗养殖栉孔扇贝样品中, 阳性个数 13 个, 阳性率为 10.83%。结果显示, 桑沟湾海区野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝 AVNV 的感染率均低于流清河海区。

表 1 巢式 PCR 法检测流清河和桑沟湾栉孔扇贝 AVNV 阳性结果

Tab.1 Positive results of AVNV of scallops in Liuqing River and Sanggou Bay detected by nest-PCR

地区 area	样品 sample	检测数 detection no.	2010 年										2011 年			
			3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	4 月
LQR	RG	10	0	1	1	2	7	2	1	0	2	0	2		0	1
LQR	YS	10	0	0	1	0	2	8	1	0	4	2	1		0	0
SGB	RG	10	-	-	0	0	0	2	0	1	0	1	1	0	-	-
SGB	YS	10	-	-	0	0	0	4	0	1	5	0	0	2	1	0

注:LQR. 流清河,SGB. 桑沟湾,RG. 人工苗养殖的栉孔扇贝,YS. 野生苗养殖的栉孔扇贝。下同

Notes:LQR. Liuqing River,SGB. Sanggou Bay,RG. scallop originating from artificial seed,YS. scallop originating from wild seed. The same as the following

进一步分析 AVNV 感染率的季节性变化, 结果显示, 流清河海区 7 月份人工苗养殖栉孔扇贝 AVNV 感染率最高, 为 70%, 在 2010 年 3 月、10 月和 2011 年 3 月均未检测到 AVNV。8 月份野生苗栉孔扇贝 AVNV 感染率最高为 80%, 在 2010 年 3 月、4 月、6 月、10 月和 2011 年 3 月、4 月均未检测到 AVNV。桑沟湾海区 8 月和 11 月份野生苗栉孔扇贝样品 AVNV 感染率分别为 40% 和 50%, 人工苗栉孔扇贝仅在 2010 年 8 月、10 月、12 月和 2011 年 1 月检测到 AVNV, 最高感染率为 8 月, 为 20%。结果表明, 2 个海区野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝感染 AVNV 具有明显的季节性变化。2 个海区扇贝感染 AVNV 多在 7、8 月

份达到最高, 而 3、4 月份最低 (图 3), 这与扇贝发生大规模死亡的时间相一致。

对 2 个海区均有样品的 9 个月份野生苗和人工苗养殖扇贝感染 AVNV 进行对比, 结果显示 (图 4), 流清河海区野生苗养殖栉孔扇贝感染 AVNV 月平均阳性检出率为 21.1%, 人工苗养殖栉孔扇贝为 18.9%; 桑沟湾海区野生苗养殖栉孔扇贝为 11.1%, 人工苗养殖栉孔扇贝为 5.6%。结果表明, 同一海区, 野生苗养殖栉孔扇贝感染 AVNV 阳性检出率高于人工苗养殖栉孔扇贝; 不同海区, 单一养殖模式的流清河海区栉孔扇贝感染 AVNV 阳性检出率高于贝藻混养的桑沟湾海区。

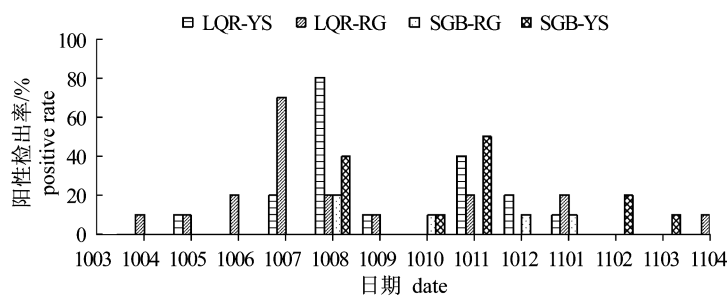


图3 2个海区栉孔扇贝 AVNV 阳性检出率比较

1003, 2010年3月份样品, 其余依次类推。LQR-YS. 流清河野生苗, LQR-RG. 流清河人工苗, SGB-RG. 桑沟湾人工苗, SGB-YS. 桑沟湾野生苗

Fig. 3 The comparison of AVNV in two culture areas of scallop

1003, samples collected in March of 2010, again and so on

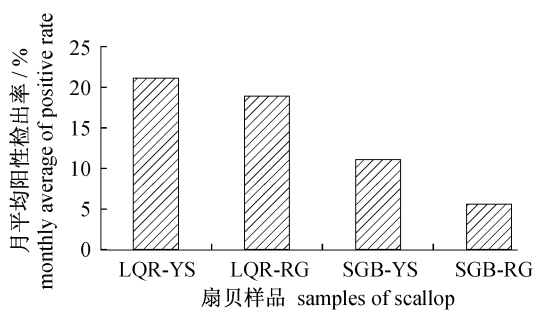


图4 2个海区野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝的 AVNV 月平均阳性检出率比较

Fig. 4 Comparison of monthly average positive rate of AVNV in two areas

作为进一步的确证性检测, 本实验还对2个海区2010年6—9月4个月份的野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝感染 AVNV 情况进行了荧光定量检测, 结果也显示流清河海区和桑沟湾海区的2类栉孔扇贝均在夏季7、8月份阳性检出率最高, 代表 AVNV 感染强度的 AVNV 拷贝数也最高。而贝藻混养的桑沟湾海区 AVNV 阳性检出率和 AVNV 拷贝数仍低于单一养殖的流清河海区。

3 讨论

有关的研究表明, 大型藻类与养殖动物具有生态上的互补性, 贝类等养殖动物的代谢活动为藻类的生长提供了必须的氮、磷等营养元素, 大型藻类则可有效地吸收释放到水体中的营养元素, 转为自身生长所需要的营养物质, 同时大型藻类通过光合作用也可固碳、释放氧气, 调节水体的 pH 值, 改善周围水域的生态环境, 从而起到对养殖环境的生物修复和生态调控作用^[17-18]。Dopazo 等^[19]发现来自潮间带绿褐藻的产色菌株对鱼的病原菌有很强的

拮抗能力。Egan 等^[20]从澳大利亚悉尼周围海域石莼表面分离到5株细菌, 其中3株可抑制多种细菌和真菌的生长。马悦欣等^[21]对石莼等10种海藻表面菌分析发现, 拮抗菌占总测试菌株的60.7%, 其中40%以上的拮抗菌株对虾的致病菌荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 有抑制作用。可见海藻上的附生菌还能对混养生物疾病的发生起到一定的抑制作用。

但是, 这些报道仅涉及到大型藻类对细菌性病原的抑制作用, 有关藻类与海区中病毒的关系仍报道不多。王娜等^[10]研究表明, 大型藻类具有集聚 AVNV 的能力, 减少了滤食扇贝通过摄食活动感染 AVNV 的可能性。王娜等^[10-11]和蔡玉勇等^[12]的研究结果表明, 在大型藻类分布广泛的桑沟湾海区, 海区浮游生物携带 AVNV 的量显著低于藻类分布少的流清河海区, 这说明大型藻类的存在, 一定程度上限制了 AVNV 的流行传播。本研究结果表明2种扇贝养殖模式下, AVNV 对扇贝的侵染率明显不同, 在贝藻混养的桑沟湾海区, 扇贝感染 AVNV 的阳性率明显低于单一养殖的流清河海区。已有的研究表明, AVNV 通过垂直传播的可能性比较低, 而水平传播是其流行传播的主要方式^[22]。至于 AVNV 水平传播的可能途径, 综合王娜等^[10-11]、蔡玉勇等^[12]及张靖宇等^[23]的研究结果, 传播途径主要包括扇贝的滤食活动以及扇贝生存的水域环境。由于大型藻类能够有效聚集海区中分布的 AVNV, 在浮游生物上粘附的 AVNV 数量显著降低, 因而通过扇贝滤食活动以及水域环境进入扇贝体内的病毒粒子数量必然降低, 与单一扇贝养殖海区相比, 贝藻间养海

区扇贝感染 AVNV 的阳性率较低。这说明,大型藻的存在,显然降低了 AVNV 对扇贝的侵染,有利于控制扇贝大规模死亡病害的发生。

本研究对 2 个海区野生苗和人工苗养殖栉孔扇贝感染 AVNV 的分析显示,2 个海区野生苗养殖栉孔扇贝感染 AVNV 均较高。分析原因,也许和野生扇贝在海区生存的时间长,感染 AVNV 的机会更多有关。但更重要的是,研究分析认为,相对于海区分布的野生扇贝,人工培育的扇贝苗种在苗种培育阶段即通过选择健康亲贝、供应人工培育的饵料以及层层过滤的海水等措施,有效减少了养殖栉孔扇贝感染 AVNV 的可能。所以,这一结果也说明,通过一系列有效的控制措施可减少 AVNV 的感染,降低养殖扇贝的死亡率。

参考文献:

- [1] 陈祖峰,郑爱榕. 海水养殖自身污染及污染负荷估算[J]. 厦门大学学报,2004,43(B08):258-263.
- [2] Petrell R J, Alie S Y. Integrated cultivation of salmonids and seaweeds in open systems [J]. *Hydrobiologia*,1996,326-327(1):67-73.
- [3] Troell M, Hailing C, Nilsson A, et al. Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output[J]. *Aquaculture*,1997,156(1):45-61.
- [4] Jones A B, Dennison W C, Preston N P. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study [J]. *Aquaculture*, 2001, 193 (1-2): 155-178.
- [5] 王吉桥,靳翠丽,张欣,等. 不同密度的石莼与中国对虾的混养实验[J]. 水产学报,2001,25(1):32-37.
- [6] Qian P Y, Wu C Y, Wu M, et al. Integrated cultivation of the red alga *Kappaphycus alvarezii* and the pearl oyster *Pinctada martensi*[J]. *Aquaculture*, 1996,147(1-2):21-35.
- [7] Demetropoulos C L, Langdon C J. Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for co-culture with abalone in a land-based system: nitrogen, phosphorus, and trace metal nutrition [J]. *Aquaculture*,2004,235(1-4):433-455.
- [8] Shpigel M, Neori A, Popper D M, et al. A proposed model for "environmentally clean" land-based culture of fish, bivalves and seaweeds [J]. *Aquaculture*,1993,117(1-2):115-128.
- [9] Neori A, Shpige M, Ben-Ezra D. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone[J]. *Aquaculture*,2000,186(3-4):279-291.
- [10] 王娜,李贲,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.
- [11] 王娜,李贲,任伟成,等. 扇贝养殖海区浮游生物携带 AVNV 的荧光定量分析[J]. 水产学报,2010,34(10):1566-1571.
- [12] 蔡玉勇,任伟成,曲朋,等. 扇贝养殖海区中小型浮游生物携带 AVNV 的荧光定量检测[J]. 中国水产科学,2011,18(4):735-741.
- [13] 杨彩霞,李贲,王娜,等. 应用 DGGE 技术分析桑沟湾贝藻混养海区细菌群落结构的季节变化[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2011,41(增刊):129-134.
- [14] 杨彩霞,王崇明,李贲,等. 应用 DGGE 技术分析流清河湾扇贝养殖海区细菌群落结构的季节变化[J]. 水产学报,2012,36(3):407-414.
- [15] 贺桂珍,王秀华,李贲,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.
- [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研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [17] 毛玉泽,杨红生,王如才. 大型藻类在综合海水养殖系统中的生物修复作用[J]. 中国水产科学,2005,12(2):225-231.
- [18] 韦玮,方建光,董双林. 贝藻混养生态系互利机制中的作用因子[J]. 中国水产科学,2005,12(2):220-224.
- [19] Dopazo C P, Lemos M L, Lodeir O C, et al. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens [J]. *Journal of Applied Bacteriology*,1988,65(2):97-101.
- [20] Egan S, Thomas T, Holmström C, et al. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from marine alga *Ulva lactuca* [J]. *Environmental Microbiology*,2000,2(3):343-347.
- [21] 马悦欣,王岩,刘璐,等. 大连海区潮间带海藻附生细菌的抗微生物活性[J]. 大连水产学院学报,2003,18(4):252-257.
- [22] 于佐安,王崇明,李贲,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.
- [23] 张婧宇,李贲,任伟成,等. 主要浮游微藻携带急性病毒性坏死症病毒(AVNV)的研究[J]. 水产学报,2010,34(8):1254-1259.

Comparative analysis of scallop *Chlamys farreri* infected by acute viral necrosis virus (AVNV) in two areas

YANG Caixia^{1,2}, LI Yun², WANG Chongming^{1*}, QU Peng^{1,2}, HUANG Jie¹

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

2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Acute viral necrosis virus (AVNV), which caused mass mortality of scallops *Chlamys farreri*, is a DNA virus. In the present study, the detection of AVNV was conducted on culture scallops from different culture modes and seeds to search appropriate culture modes and seeds which could reduce mortality of culture scallops. Ten adult scallops were sampled regularly from scallop single-cultured system (Liuqing River, Qingdao) and scallop-kelp co-cultured system (Sanggou Bay, Rongcheng) per month, both contained scallops originating from wild-seed and artificial-seed (March 2010 – April 2011, total 480 scallops were sampled). The scallops were taken to the lab at low temperature. Mantle tissue DNA was extracted and used as the template for nest-PCR to evaluate infection of AVNV. The results showed that the infection rates of AVNV for cultured scallops from wild-seed and artificial-seed were 21.1% and 18.9% in Liuqing River, while in Sanggou Bay the infection rates were 11.1% and 5.6%. In both sampling sites, high infection rates were detected in July and August. Highest infection rate in Liuqing River reached 80%, while in Sanggou Bay that was only 40%. The present study indicated that scallop-kelp co-cultured system and artificial-seed could effectively decrease the infection rate of AVNV, which could be useful methods to control occurrence of scallop disease.

Key words: *Chlamys farreri*; acute viral necrosis virus (AVNV); nest-PCR; culture mode

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