

## 应用 DGGE 技术研究扇贝养殖海域微型真核浮游生物多样性

吴寅嵩<sup>1</sup>, 李赞<sup>1\*</sup>, 王娜<sup>1</sup>, 王崇明<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 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:** 为了研究扇贝养殖海区微型真核浮游生物群落多样性, 明确养殖扇贝发病时期高丰度微型真核浮游生物种类, 探讨微型真核浮游生物与栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 水平传播的可能关系。于 2009 年和 2010 年从青岛流清河湾扇贝养殖海区采集了 9 个月份的海水样品, 经 25 和 3  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤收集海水中 3 ~ 25  $\mu\text{m}$  的浮游生物, 扩增 18S rDNA 可变区序列, 并利用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gelelectrophoresis, DGGE) 技术对扩增序列进行分离以分析微型真核浮游生物多样性。结果表明, 该养殖海区微型真核生物包括甲藻、纤毛虫、眼虫、定鞭藻、硅藻、盘蜷虫、隐藻、领鞭毛虫、变形虫和 Cercozoan, 其中甲藻类和纤毛类生物的最高相对丰度分别达 41.0% 和 38.2%, 是海区的优势种类。各月份 DGGE 谱带聚类分析结果表明, 2009 年 6、7、8、9 月份浮游生物群落组成较为相似。中肋骨条藻在扇贝发病前后均有分布。结合相关扇贝 AVNV 已有的研究结果, 研究认为中肋骨条藻是 AVNV 水平传播的参与者之一, 但海区中广泛分布的甲藻和纤毛虫与 AVNV 传播的关系还有必要进一步研究。

**关键词:** 浮游生物; 栉孔扇贝; 急性病毒性坏死病毒; 变性梯度凝胶电泳

**中图分类号:** Q 938.8; S 917

**文献标志码:** A

微型真核浮游生物是海洋浮游生物的重要组成部分, 是其它海洋生物的基础饵料, 在维持海洋生物多样性及生态环境的稳定方面发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。微型真核浮游生物多样性一直是海洋生态学研究的重要内容。镜检观察和计数常常是开展相关研究的常用方法, 但是, 许多微型真核浮游生物无明显的外部特征, 大多呈球形或近球形, 准确鉴定其种类目前仍存在很大的困难<sup>[1]</sup>。近年来发展起来的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术已有报道应用于真核浮游生物的研究<sup>[2-5]</sup>。该技术不受生物大小的限制, 并且可以同时分析多个样品, 具有可重复和效率高等优点, 适合于调查生物种群的时空分布, 显示该技术在开展微型真核浮游生物多样性研究方面的诸多优势。

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是我国北方沿海广泛养殖的重要经济贝类。自 1997 年以来, 在养

殖中后期发生的大规模死亡造成了这一养殖产业处于严重的停滞状态。已有的研究表明, 急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 是造成养殖扇贝发病死亡的致病病原<sup>[6-10]</sup>。张靖宇等<sup>[6]</sup>的研究表明, 饵料微藻可以选择性的携带 AVNV, 王娜等<sup>[5]</sup>对养殖海区浮游生物携带 AVNV 的研究表明, 海区浮游生物携带 AVNV 具有明显的季节性变化。可见, 海区浮游生物可能与 AVNV 的流行传播具有一定关系。为了明确养殖海区携带 AVNV 的主要浮游生物, 有必要首先对养殖海区浮游生物的季节性变化进行分析, 了解在 AVNV 流行传播的关键时期海区浮游生物的主要种类, 从而为确定与 AVNV 流行有关的浮游生物提供参考。

本研究对青岛流清河湾栉孔扇贝养殖海区不同月份微型真核浮游生物多样性进行了 DGGE

收稿日期: 2011-07-07 修回日期: 2011-10-12

资助项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目 (CARS-48)

通讯作者: 李赞, E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn

分析,其目的在于了解该海区微型真核浮游生物多样性,确定不同月份的主要浮游生物种类,为研究扇贝 AVNV 的水平传播以及栉孔扇贝养殖中病害防治等提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 采样与前期处理

在山东省青岛流清河湾扇贝养殖海区养殖筏周围确定采样点(N36° 07' 00. 68" E120° 36' 36. 69")。分别于 2009 年 6 月 12 日、7 月 15 日、8 月 13 日、9 月 17 日、10 月 14 日、12 月 13 日和 2010 年 1 月 15 日、3 月 24 日、6 月 30 日进行采样,共 9 次。每次取表层海水 5 L,立即带回实验室。

采集水样立即用 25  $\mu\text{m}$  筛网过滤,除去样品中的杂质和大型浮游生物,随后经 3  $\mu\text{m}$  玻璃纤维滤膜抽滤,收集 3 ~ 25  $\mu\text{m}$  浮游生物。每个样品过滤 1 L 海水,收集的浮游生物连同滤膜一起冰冻保存用于样品基因组 DNA 提取。

### 1.2 样品总 DNA 提取

样品基因组 DNA 的提取方法采用改良的 CTAB 法<sup>[5]</sup>。提取 DNA 用紫外分光光度计进行定量分析,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 18S rDNA 部分序列的扩增和 DGGE 分析

用于 DGGE 分析的目标序列为 18S rDNA V1-V3 可变区。用于 PCR 扩增的引物参考 Díez 等<sup>[4]</sup>,上游引物 Euk1A:5'-CTGGTTGATCCTGCCAC-3',带 GC 夹的下游引物 Euk516r-GC:5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG-GCACGGGGGACCAGACTTGCCCTCC-3',扩增片断长度预期约 560 bp。PCR 扩增体系为 50  $\mu\text{L}$ ,包括 36  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,10  $\times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,2.5 mmol/L dNTP Mix 4  $\mu\text{L}$ ,5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 2.5  $\mu\text{L}$ (约 50 ng)。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 130 s,然后 35 个循环 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。取 2.5  $\mu\text{L}$  PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。

扩增序列采用 DGGE 电泳技术进行分离。本研究 DGGE 电泳采用 DCODE<sup>TM</sup> 综合突变检测系统(美国,BIO-RAD 产品)。其中聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10% (丙烯酰胺:甲叉双丙烯胺 37.5:1),其变性剂梯度范围是 25% ~ 45% (100% 变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲

酰胺混合物),每个加样孔中加入 50  $\mu\text{L}$  PCR 产物。在 60  $^{\circ}\text{C}$  1  $\times$  TAE 缓冲液(40 mmol/L Tris,20 mmol/L 冰醋酸,1 mmol/L EDTA,pH 7.4)中,100 V 恒定电压电泳 16 h。电泳完成后,使用 4  $\mu\text{g/mL}$  溴化乙锭染料对凝胶进行染色 20 ~ 30 min,蒸馏水漂洗 5 min 后,用 JS-380A 自动凝胶图像分析仪对电泳结果进行观察和拍照。

### 1.4 切胶和测序

在波长为 354 nm 紫外线下,切取 DGGE 凝胶上的主要条带,破碎悬浮在 30  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 中,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,回收 DGGE 主要条带 DNA。对回收的 DNA 进行二次扩增,使用不带 GC 夹的引物进行重 PCR,反应体系和程序与前述相同。重 PCR 产物经 ZYMO 凝胶回收试剂盒纯化回收后,连接到 pEASY-T1 克隆载体,并转入 Trans1-T1 感受态细胞进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆使用 M13 通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物送测序公司进行测序。

### 1.5 统计及分析

DGGE 电泳图谱采用 BIO-RAD QUANTITY ONE 4.6.2 分析软件对泳道和条带进行识别和定位。在对所有条带进行高斯建模的基础上,以条带光密度曲线下面积值作为物种的相对丰度。

多样性分析使用大型多元统计软件 PRIMER v6.1。对 DGGE 丰度数据进行对数转换后,采用 Bray-Curtis Measure 距离系数对各月份的数据进行聚类分析(CLUSTER)和多维定标分析(MDS)。同时计算各月份真核浮游生物多样性的 Shannon 多样性指数( $H$ ),其公式为

$$H = -\sum_{i=1}^{i=n} p_i \ln p_i$$

式中, $n$  为每个样品中条带总数, $p_i$  为每个条带的相对强度。

测序序列经拼接后提交到 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),用 BLAST 在 Genbank 数据库中进行相似性搜索。序列亲缘关系分析使用 PHYLIP 软件构建 ML(maximum likelihood,最大似然法)系统发生树。

## 2 结果

### 2.1 DNA 的提取及 PCR 扩增

使用紫外分光光度计对提取的 9 个样品基因组 DNA 进行检测,测得 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值在 1.60 ~ 1.80,浓度范围为 35 ~ 50 ng/ $\mu\text{L}$ 。经过 PCR 扩增

后,获得长度为 560 bp 左右的目标片断。

## 2.2 养殖海区微型真核浮游生物多样性分析

将 DGGE 图谱中位于同一位置的条带规定为一个可操作的分类学单位 (operational taxonomic unit, OTUs)。分析显示,9 个月份的样品获得可识别的 OTUs 62 个。2010 年 1 月 15 日采集的样品 OTUs 数量最多,为 36 (图 2 和图 3)。

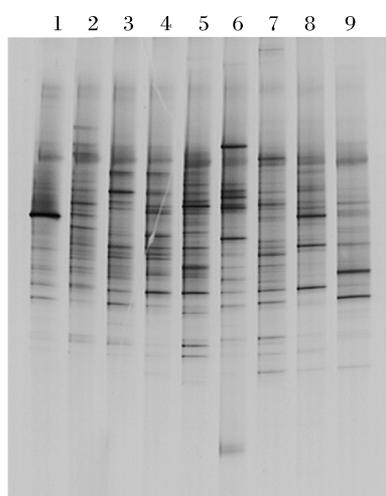


图 1 不同月份海水样品 DGGE 凝胶电泳图谱

Fig. 1 DGGE fingerprints of different months marine water samples

1. 2009-06-12; 2. 2009-07-15; 3. 2009-08-13; 4. 2009-09-17;  
5. 2009-10-14; 6. 2009-12-13; 7. 2010-01-15; 8. 2010-03-24;  
9. 2010-06-30.

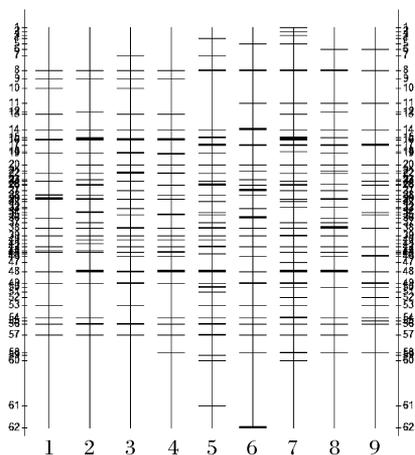


图 2 DGGE 条带分布及类型模式图

Fig. 2 Banes' Types of different lanes

1. 2009-06-12; 2. 2009-07-15; 3. 2009-08-13; 4. 2009-09-17;  
5. 2009-10-14; 6. 2009-12-13; 7. 2010-01-15; 8. 2010-03-24;  
9. 2010-06-30.

2009 年 6 月 12 日的样品 OTUs 数量最少,为 23。有 5 个 OTUs 在 9 个月份中均有出现,占到总 OTUs 数的 8.06%,而 14 个 OTUs 只在一个月份的样品中出现,占到总数的 22.58%。

基于 DGGE 条带的相对丰度,每个月份浮游生物 Shannon 多样性指数如表 1 所示,在所有样品中多样性指数最高的是 2010 年 1 月 15 日,为 3.18,2009 年 6 月 12 日和 2010 年 6 月 30 日的样品均较低,分别为 2.42 和 2.58。

表 1 微型真核浮游生物群落多样性指数

Tab. 1 Eukarytic nanoplankton community diversity index

采样日期 date of sampling	条带数量 number of bands	Shannon 多样性指数 Shannon index
2009-06-12	23	2.42
2009-07-15	26	2.92
2009-08-13	26	2.79
2009-09-17	24	2.69
2009-10-14	32	3.01
2009-12-13	25	2.77
2010-01-15	36	3.18
2010-03-24	28	2.83
2010-06-30	25	2.58

## 2.3 养殖海区微型真核浮游生物的聚类分析和多维定标分析

基于 9 个月份的 DGGE 电泳条带及条带的光密度相对值进行聚类分析,结果显示 2009 年 6 月、7 月、8 月和 9 月的 4 个样品聚为一个支,2009 年 10 月、12 月以及 2010 年 1 月、3 月、6 月采集的 5 个样品聚为另一支。

但在 50% 相似性水平上,9 个月份浮游生物群落变化的多维定标分析结果显示 (图 3),9 个月份可被分为 3 个组 (I ~ III)。ANOSIM 分析显示,不同组之间存在显著差异 ( $R = 0.831, P = 0.001$ )。其中组 I 包括 2009 年 6 月 12 日、7 月 15 日、8 月 13 日和 9 月 17 日采集的样品;组 II 包括 2009 年 10 月 14 日、12 月 13 日和 2010 年 6 月 30 日采集的样品;组 III 包括 2010 年 1 月 15 日和 3 月 24 日采集的样品。2010 年 6 月份的样品竟然与 2009 年 10 月和 12 月的样品聚为一组,这可能是取样不均匀造成的偏差。其它的分析结果与基于群落分析的结果相似。

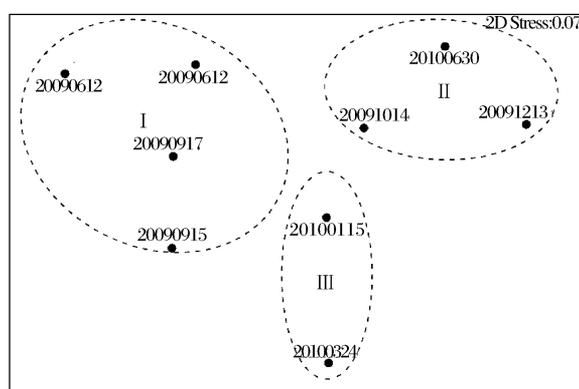


图3 养殖海区微型真核浮游生物群落的多维定标分析  
Fig.3 MDS ordination of planktonic communities

#### 2.4 浮游生物的种类鉴定及其在海区的分布

对 DGGE 图谱中 33 条主要条带进行测序, 测序条带覆盖总 OTUs 数量的 53.2%。Blast 分

析结果表明, 青岛流清河湾海域分布的微型真核浮游生物的主要种类分别为甲藻、纤毛虫、眼虫、定鞭藻、硅藻、盘卷虫、隐藻、领鞭毛虫、变形虫和 Cercozoan。结合 DGGE 分析, 可以看到流清河湾养殖海区微型真核浮游生物多样性存在如下 4 个特点:

(1) 在分析的 9 个月份样品中, 甲藻是种类和丰度最高的种类。在 33 个测定的 OTUs 序列中 12 个 OTUs 序列与甲藻相应序列有较高相似性, 占到测定序列总数的 36.36%。将这 12 个 OTUs 序列与公共数据库中亲缘关系较近的甲藻序列同时进行分析, 构建 ML 系统发生树, 结果显示 12 个 OTUs 中 7 个(包括条带 21、25、36、39、42、45、48)与裸甲藻目亲缘关系较近, 3 个 OTUs (包括条带 35、38、54)与多甲藻目较近(图 4)。

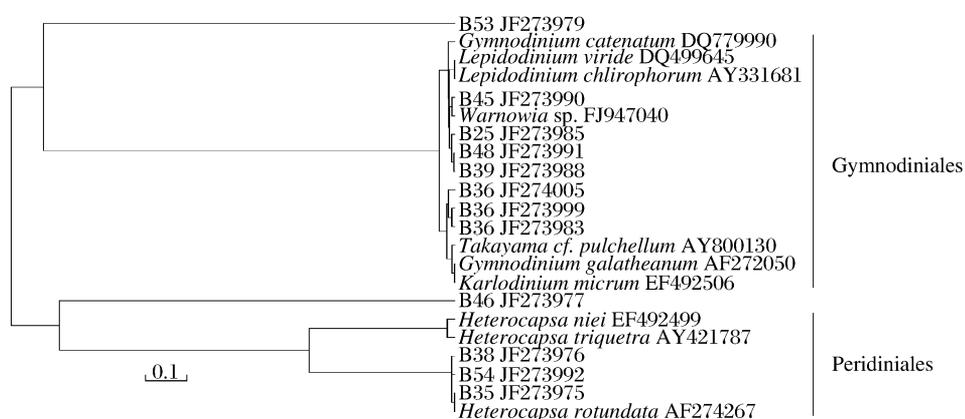


图4 养殖海区甲藻类浮游生物的亲缘关系比较

Fig.4 Maximum likelihood tree obtained from the 18S rDNA of Dinophyceae

甲藻类浮游生物丰度较高的月份是 2010 年 3 月和 2009 年 9 月, 分别为 41.35% 和 35.72%, 丰度最低的月份是 2009 年的 6 月, 仅为 12.37% (图 5)。但各月份甲藻的种类数则差别不大, 如丰度最低的 2009 年 6 月, 甲藻的种类数为 7, 丰度最高的 2010 年 3 月, 甲藻的种类数为 9。可见, 相对于丰度, 养殖海区分布的甲藻的种类在分析的 9 个月份则比较稳定。

进一步分析不同种类甲藻分布的季节性变化, 结果显示, 季节性变化与甲藻种类明显有关。如与多甲藻目甲藻相近的条带 38 和与裸甲藻目甲藻相近的条带 48 在所有 9 个月份中均出现。与裸甲藻目甲藻相近的条带 39 和 42 以及与多甲藻目甲藻相近的条带 54 也是常年分布的甲藻, 在 8 个月份有分布。与裸甲藻目甲藻相近的条带

25、36 和 45 只在 1 个月份的样品中出现。

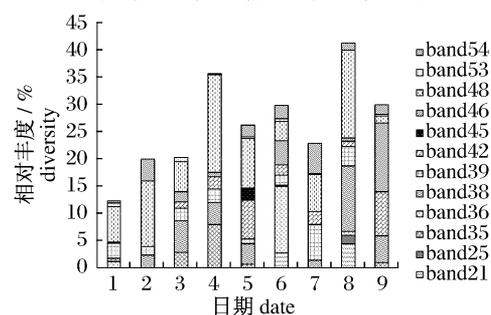


图5 养殖海区 12 种甲藻类浮游生物  
在各个月份的相对丰度

Fig.5 The diversity of 12 Dinophyceae in the sea area for scallop culture of different months

1. 2009-06-12, 2. 2009-07-15, 3. 2009-08-13, 4. 2009-09-17, 5. 2009-10-17, 6. 2009-12-13, 7. 2010-01-15, 8. 2010-03-24, 9. 2010-06-30.

(2) 在33个被测序 OTUs 中有7个 OTUs 序列与纤毛类生物的序列有较高相似性。亲缘关系分析显示,条带5与侧口纲的序列有较高的相似性,条带14和23与寡膜纲的序列有较高相似性,条带17和22同多膜纲的序列有较高相似性(图6)。纤毛虫类生物在全年的丰度变化除了2009年3月丰度仅为8.73%、2009年8月丰度达38.20%以上外,其它月份纤毛虫的丰度基本上维持在20%~30%。各月份纤毛虫的种类在3~6种(图7)。条带14全年分布,其序列与 *Homalogastra setosa* 序列的相似性达97%,其相对丰度范围为3.30%~14.75%。条带16与

*Bursaria truncatella* 序列相似性为85%,在2009年6月、7月、8月、9月和2010年1月的样品中出现,相对丰度范围为7.69%~12.46%。条带17与 *Strombidium cf. basimorphu* 序列相似性为98%,在2010年6月的相对丰度最高达19.71%。序列22与 *Parastrombidinopsis minim* 序列相似性达98%,只在2009年12月的样品中未出现,在2009年8月的样品中相对丰度最高为12.55%,明显高于其他样品。条带24与 *Stylonychia mytilu* 序列相似性为90%,在2009年6月的样品中相对丰度最高为8.39%,明显高于其他样品。

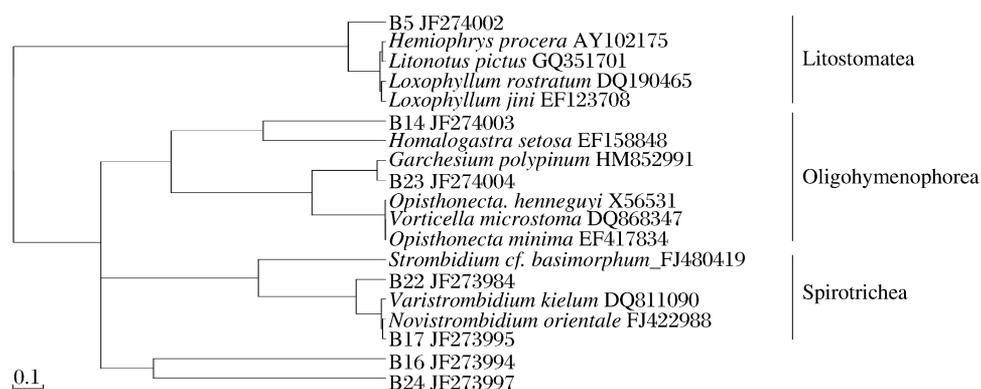


图6 养殖海区纤毛类浮游生物的亲缘关系分析

Fig. 6 Maximum likelihood tree obtained from the 18S rDNA of Ciliophoras

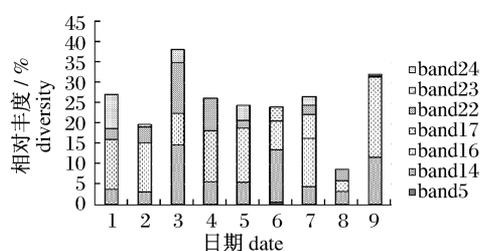


图7 养殖海区7种纤毛虫类浮游生物的相对丰度

Fig. 7 The diversity of 7 Ciliophoras in the sea area for scallop culture of different months

1. 2009-06-12, 2. 2009-07-15, 3. 2009-08-13, 4. 2009-09-17, 5. 2009-10-17, 6. 2009-12-13, 7. 2010-01-15, 8. 2010-03-24, 9. 2010-06-30.

(3) 除甲藻和纤毛虫以外,有6个 OTUs 的测序结果与其它原生生物界的 Amoebozoa、眼虫门、领鞭虫门和 Cercozoa 生物的序列有较高相似性。3个 OTUs(包括条带47、49和50)与眼虫门生物相似性较高,条带49与 *Proccryptobia sorokin* 序列相似度达100%,除2010年3月未检测到外,

其他月份均有分布,相对丰度范围为2.43%~12.97%。条带50与 *Eutreptiella gymnastica* 序列相似性达99%,在2009年10月和2010年1月、3月和6月均有分布,相对丰度范围为1.31%~3.20%。条带47与 *Eutreptiella gymnastica* 序列相似性达99%,只在2010年1月的样品中出现,相对丰度仅为1.47%。条带15与领鞭虫门的 *Choanoflagellida* sp. 序列相似性达98%,在2009年7月、10月和2010年1月、3月有分布,在2009年7月的样品中相对丰度明显高于其他样品,为8.12%。条带37与一株 cercozoan 的序列相似性达99%,在2009年6月、9月、12月和2010年1月的样品中有出现,相对丰度范围为0.41%~3.85%。条带19与 Amoebozoa(门)的 *Spongomonas minim* 序列相似性为91%,在2009年8月和9月的样品中相对丰度较高,分别为9.94%和7.04%。结果显示,这6个 OTUs 在海区的分布均比较低。

(4) 本研究还有 8 个 OTUs 的测序结果分别与色素界的定鞭藻门、硅藻门、隐藻门和盘蜷门的生物序列相似性较高。3 个 OTUs 与定鞭藻门生物序列相似性较高,条带 26 与 *Platyochrysis pienaarii* 序列相似度为 94%,在 2009 年 7 月、10 月和 2010 年 1 月的样品中相对丰度超过 7%。条带 28 与 *Chrysochromulina strobilus* 序列相似度达 99%,除 2009 年 8 月和 2010 年 1 月、3 月外,其它 6 个月份均有分布,在 2009 年 6 月的样品中相对丰度最高达 20.1%。条带 44 与 *Phaeocystis globosa* 的序列相似性达 99%,除 2009 年 10 月、12 月和 2010 年 6 月外,其他 6 个月份均有分布,2009 年 9 月的样品中相对丰度最高为 9.21%,但其他月份的相对丰度均较低。2 个 OTUs 与硅藻门生物序列相似性较高,条带 30 与 *Skeletonema pseudocostatum* 序列相似度达 99%,在 2009 年 6 月、10 月、12 月的样品中有出现,在 2010 年 3 月的样品中相对丰度达 11.73%。条带 32 与 *Bolidomonas pacifica* var. *eleuthera* 序列相似性为 88%,只在 2010 年 1 月和 3 月的样品中出现,相对丰度不高。条带 20 与盘蜷门的 *Thraustochytrium multirudimentale* 序列相似性为 93%,除 2009 年 6 月外,有 8 个月份分布,但丰度不高,最高仅为 3.85%。条带 27 与盘蜷门的 *Thraustochytrium striatum* 序列相似性为 84%,在 2009 年 8 月、12 月和 2010 年 1 月、3 月 4 个月份分布,2009 年 12 月相对丰度最高,但也仅 7.03%。条带 55 与隐藻门 *Geminigera cryophil* 序列相似性为 96%,只在 2010 年 6 月的样品中出现,相对丰度不足 1%。除了与 *Chrysochromulina strobilus* 和与 *Skeletonema pseudocostatum* 相近的浮游生物丰度较高外,色素界其它生物的丰度均未超过 10%。

### 3 讨论

基于真核生物核糖体 18S rDNA 可变区序列的 DGGE 分析技术,Díez 等<sup>[4]</sup>分析了天然海水中超微型真核浮游生物群落的多样性,该研究认为该技术的优点是可快速便捷地对采自不同环境的大量样品进行多样性分析,借助于分离条带的序列测定,可以监测和研究环境样品中出现的特定物种<sup>[11-15]</sup>。鲍磊等<sup>[13]</sup>对厦门西海域超微型真核浮游生物群落的周年变化进行了 DGGE 分析,结

果显示,该海区超微型真核浮游生物主要由绿藻、Stramenopiles、定鞭金藻、甲藻、灰胞藻和部分未确定的类群组成,这些浮游生物的遗传结构和主要类群存在季节性的显著变化。陈美军等<sup>[2]</sup>利用 DGGE 技术比较了太湖不同湖区真核微型浮游生物群落的多样性,结果显示湖区营养状况与浮游生物多样性有关。Yan 等<sup>[12]</sup>对长江三峡库区不同地点的真核浮游生物多样性进行了 DGGE 分析,聚类分析表明长江主河道与其支流香溪河虽然水质理化性状差别明显,但真核浮游生物群落多样性却存在相当高的相似性。此外,利用 DGGE 技术,马晓军等<sup>[3]</sup>对不同类型冰川中真核微生物,王娜等<sup>[15]</sup>对扇贝养殖海区真核浮游生物分别也进行了物种多样性研究。本研究结果显示该方法可以有效分离微型真核浮游生物,不同时间采集的样品中微型真核浮游生物群落结构存在明显不同,聚类和多元定标分析显示 9 个月份的样品大致可分为 3 组。结合 33 个 OTUs 的序列分析进行种类鉴定,结果显示流清河湾扇贝养殖海区微型真核浮游生物包括甲藻、纤毛虫、眼虫、定鞭藻、硅藻、盘蜷虫、隐藻、领鞭毛虫、变形虫和 Cercozoan 等。本研究鉴定出来的种类数要多于之前利用传统镜检方法获得的该海区微型真核浮游生物的种类数,这说明利用 DGGE 技术可以更为全面客观的研究和监测环境中微型真核浮游生物的多样性。

关于养殖扇贝死亡的病原,一致的研究表明,AVNV 是扇贝养殖中后期发病死亡的直接病原。王娜等<sup>[5]</sup>分析了扇贝养殖海区浮游生物携带 AVNV 情况,结果表明,流清河湾养殖海区 3~25 μm 粒径的浮游生物在 2009 年 6、7、8 和 9 月份均携带病毒,携带病毒的拷贝数在 8 月份达到峰值,这一时期正是海区养殖栉孔扇贝大规模死亡集中爆发的时期。根据本研究的结果,在流清河湾扇贝养殖海区中甲藻类和纤毛虫类生物丰度较高。11 种甲藻类生物的相对丰度最低不足 15%,最高则能达到 41%。7 种纤毛类生物的丰度除了一个月份(2010 年 3 月样品)不足 10%,其它月份均在 20.0%~38.2%,纤毛虫类生物的丰度在各个月份比较稳定。其它种类如与定鞭藻门 *Chrysochromulina strobilus* 序列相似度达 99% 的条带 28,在 2009 年 6 月的样品中相对丰度最高达 20.1%,在其它月份则一直比较低。在扇贝发病

死亡时期,海区浮游生物多样性相似,相对丰度在10%以上的浮游生物种类只有甲藻(条带48)和纤毛虫(条带14、16和22)。显然,如果这两类浮游生物可携带AVNV,将很有可能是AVNV流行传播的主要参与者。

张靖宇等<sup>[6]</sup>研究了17种常见浮游微藻对AVNV病毒的携带和黏附情况,结果表明,只有亚心形扁藻、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。并且人工感染试验表明,粘附在微藻表面的AVNV同样具有显著的致病性。但是该研究涉及的3种分属裸甲藻目和膝沟藻目的甲藻[包括小亚德里亚共生藻(*Gymnodinium microadriaticum*)、亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)和前沟藻(*Amphidinium* spp.)]均不能携带AVNV病毒。甲藻是否参与AVNV的水平传播仍然不能确定,也许该研究涉及甲藻的种类仍然有限。作为海区广泛分布、丰度最高的浮游微藻,甲藻是否参与AVNV的水平传播还有必要进行广泛的研究。

张靖宇等<sup>[6]</sup>的研究还显示,中肋骨条藻可以携带AVNV,并可以将携带AVNV感染扇贝导致扇贝发病死亡。本研究DGGE分离的条带30与中肋骨条藻的序列相似性达99%,该浮游生物在2009年的7、8和9月相对丰度在1.01%~5.80%,最高相对丰度出现在7月。中肋骨条藻由于大小及浮游特性,是扇贝摄食饵料食物之一,尽管其在养殖海区相对丰度不高,但考虑到其在扇贝发生前后均有分布,可以认为,这一时期养殖海区分布的中肋骨条藻可能与AVNV病毒的水平传播有关,是AVNV传播的重要参与者之一。

海区养殖扇贝主要摄食硅藻、金藻、绿藻、甲藻、动物卵和大小合适的有机颗粒及纤毛虫等。本研究结果表明,纤毛类生物也是流清河湾扇贝养殖海区中相对丰度较高的类群,纤毛虫可以摄食微藻<sup>[16-19]</sup>。有研究表明卤虫摄食携带WSSV的微藻后可以携带病毒,对虾由于摄食带毒卤虫从而发病<sup>[16]</sup>。因而扇贝摄食大小合适、携带病毒的纤毛虫类生物而感染AVNV也是有可能的。

#### 参考文献:

[1] Caron D A, Gast R J, Lim E L, *et al.* Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions [J]. *Hydrobiologia*,

1999,401:215-227.

- [2] 陈美军,孔繁翔,陈非洲,等. 太湖不同湖区真核微型浮游生物基因多样性的研究[J]. *环境科学*, 2008,29(3):769-775.
- [3] 马晓军,刘炜,侯书贵,等. 不同类型冰川雪坑中真核微生物多样性变化与环境因子关系研究[J]. *自然科学进展*,2009,18(3):254-261.
- [4] Díez B, Pedrós Alió C, Marsh T L, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001,67(7):2942-2951.
- [5] 王娜,李赞,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.
- [6] 张靖宇,李赞,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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Lefranc M, Thénot A, Lepère C, *et al.* Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status [J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2005,71(10):5935-5942.
- [12] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, *et al.* Plankton community composition in the Three Gorges Reservoir Region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20 (2008): 732-738
- [13] 鲍磊,陈纪新,黄邦钦. 应用变性梯度凝胶电泳研究厦门西海域超微型真核浮游生物多样性[J]. *海洋环境科学*,2007,26(6):504-509.
- [14] Formin N, Hamelin J, Tamawaski S, *et al.* Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns [J]. *Environmental Microbiology*,2002,4(11):634-643.

- [15] 王娜,蔡玉勇,李贇,等. 应用 DGGE 技术分析扇贝养殖海区真核浮游生物种群多样性[J]. 中国海洋大学学报,2010,40(12):51-56.
- [16] Zhang J S, Dong S L, Dong Y W, *et al.* Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus(WSSV) transmission[J]. Veterinary Research Communications,2009.
- [17] Gifford D J. Laboratory culture of marine planktonic oligotrichs (Ciliophora, ligotrichida) [J]. Marine Ecology,1985,23:257-267.
- [18] Bernard C, Rassoulzadegan F. Bacteria or microflagellates as major food source for marine ciliates: possible implications for the microzooplankton [J]. Marine Ecology Progress Series,1990,64:147-155.
- [19] Heinbokel J F. Studies on the functional role of tintinnids in the Southern California Bight. II. Grazing rates of field populations [J]. Marine Biology,1978,47:191-197.

## Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) to study the diversity of eukaryotic nanoplankton in the sea area for scallop culture

WU Yin-song<sup>1</sup>, LI Yun<sup>1\*</sup>, WANG Na<sup>1</sup>, WANG Chong-ming<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

**Abstract:** In order to study the diversity of eukaryotic nanoplankton in the sea area for scallop culture, and clarify the relationship between eukaryotic nanoplankton and transmission of zhikong scallop (*Chlamys farreri*) acute viral necrosis virus(AVNV), seawater samples were collected monthly in 2009 and 2010 from Qingdao Liuqing River Bay's sea area. 3-25  $\mu\text{m}$  plankton components were filtered and amplified 18S rDNA variable region sequences from filtered samples were analyzed by DGGE technique. The results show that the main eukaryotic nanoplankton in the sea area included Dinzoa, Ciliophora, Euglenozoa, Haptophyta, Ochrophyta, Labyrinthulomycota, Cryptista, Choanozoa, Amoebozoa and Cercozoan. The amount of Dinzoa and Ciliophora was the highest at 41% and 38.2%, respectively. The cluster analysis based on mensal DGGE bands shows that the plankton community from May to November 2009 is similar in the diversity of eukaryotic nanoplankton. According to the studied results on scallop AVNV, *Skeletonema costatum* was taken to be a vector of transmission of AVNV, and it distributed during the period of scallop massive death. However, the role of Dinzoa and Ciliophora during the transmission of AVNV has yet to be determined.

**Key words:** plankton; *Chlamys farreri*; acute viral necrosis virus(AVNV); DGGE

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