

研究报告  
Research Report

## 中国沿海主要养殖贝类四种原虫病流行病学的调查研究

谢丽基 谢芝勋\* 庞耀珊 刘加波 邓显文 谢志勤 范晴 罗思思

广西壮族自治区兽医研究所, 广西畜禽疫苗新技术重点实验室, 南宁, 530001

\* 通讯作者, xiezhiyun@126.com

**摘要** 为全面系统了解中国沿海主要养殖贝类 4 种原虫病的分布和流行状况, 本研究从 2006 年 10 月到 2012 年 10 月的 6 年间, 在中国主要贝类养殖海区采集牡蛎、文蛤和扇贝等 11 种养殖贝类 331 批共 11 291 份, 并对其四种原虫的感染情况进行检测和调查。结果显示 4 种原虫的感染率累计为 15.28% (1 725/11 291), 其中感染率最高的为派琴虫(9.98%) (1 127/11 291), 其次为尼氏单孢子虫(3.99%) (451/11 291), 最低为折光马尔太虫(1.30%) (147/11 291), 未检出包拉米虫的感染。在单个的牡蛎、花甲螺、菲律宾蛤仔、扇贝、溢蛭和血蛤中, 存在多种原虫混合感染的现象, 混合感染率为 6.78% (117/1 725), 其它贝类均为单一感染, 感染率为 93.22% (1 608/1 725)。调查结果还表明, 中国不同海域和不同品种的牡蛎, 尼氏单孢子虫和派琴虫的感染率存在明显差异。该调查结果将为中国贝类养殖原虫病的防治提供重要的科学依据。

**关键词** 贝类, 尼氏单孢子虫, 派琴虫, 折光马尔太虫, 包拉米虫, 流行病学

## Epidemiological Survey of Four Protozoans in Shellfish of the Coastlines in China

Xie Liji Xie Zhixun\* Pang Yaoshan Liu Jiabo Deng Xianwen Xie Zhiqin Fan Qing Luo Sisi

Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Animal Vaccines and New Technology, Nanning, 530001

\* Corresponding author, xiezhiyun@126.com

DOI: 10.3969/gab.031.000559

**Abstract** In order to comprehensive understand the distribution and prevalence of four protozoans of China's major coastal farming shellfishes, the epidemiological surveys were carried out started on October 2006 and ended on October 2012, The major farming shellfishes in China's coastlines such as *Haplosporidium nelsoni*, *Perkinsus*, *Marteilia refringens* and *Bonamia* et al. were sampled; 11 species including 11 291 individuals in 331 batches of farming shellfishes were collected to be detected and investigated for, the four protozoan infection. The results showed that the positive detecting rate of four protozoans were 15.28% (1 725/11 291), in which the highest positive rate of *Perkinsus* was 9.98% (1 127/11 291), *Haplosporidium nelsoni* was 3.99% (451/11 291), and *Marteilia refringens* was 1.30% (147/11 291), whereas there was no positive detection of *Bonamia* in shellfish in China's coastlines. Furthermore, there were co-infected phenomenon of the protozoans existing in single oyster, *Paphia undulate*, Manila clam, Scallop, Razor clam and Ark shell, co-infection rate was 6.78% (117/1 725), other shellfishes were infected single protozoan, and the infection rate was up to 93.22% (1 608/1 725). The survey results also showed that there are obvious differences in the infections rates of *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus* in Oysters in the different sea waters and different varieties of oyster, China shellfish aquaculture protozoois in prevention, the findings in this research would provide an important scientific basis for the control of the four protozoans in farming shellfishes in China.

**Keywords** Shellfish, *Haplosporidium nelsoni*, *Perkinsus*, *Marteilia refringens*, *Bonamia*, Epidemiology

基金项目 本项目由国家百千万人才工程人选专项(945200603)、广西特聘专家专项(2011B020)和广西科技攻关(桂科攻 0630001-3M)共同资助

贝类原虫病是危害贝类养殖的主要传染性疾病。目前在世界范围内危害最严重并导致重大经济损失的贝类原虫病主要是由派琴虫(*Perkinsus* sp.)、包拉米虫(*Bonamia*)、折光马尔太虫(*Marteilia refringens*)和尼氏单孢子虫(*Haplosporidium nelsoni*)这4种原虫所引起。

根据世界动物卫生组织(OIE)规定,贝类派琴虫病、折光马尔太虫病和包拉米虫病是需要向OIE通报的贝类疾病。派琴虫的感染在韩国、日本和中国均有很多报道,其可引起贝壳不能闭合、生长缓慢,死亡率高达90%以上(Powell et al., 1996; Choik and Park, 1997; Hamaguchi et al., 1998; 梁玉波等, 2001)。包拉米虫是一种侵袭牡蛎血细胞的病原体,其引起的传染病可以导致贝类死亡,该病原体引起的疾病在法国、爱尔兰、英国和美国等国家均有爆发流行的报道(Elston et al., 1986; Doonan et al., 1994; Culloty and Mulcahy, 1996; Cochennec et al., 1998),导致了严重的经济损失。折光马尔太虫可引起贝类消瘦甚至停止生长并可导致死亡,折光马尔太虫感染在大洋洲和欧洲等国家普遍存在(Kleeman et al., 2002; Audemard et al., 2004; Carrasco et al., 2007; Lopez-Flores et al.,

2008)。尼氏单孢子虫主要感染贝类消化道上皮细胞、血细胞和结缔组织,有较高的死亡率,该病原体感染在美洲、大洋洲和亚洲等许多国家普遍存在(Haskin et al., 1966; Barber et al., 1997; Hine and Thorne, 2002; Russell et al., 2004; 王中卫等, 2009)。

目前,这4种原虫病在中国主要养殖贝类中的感染情况还没有一个系统的调查结果。本研究针对这4种原虫病,从2006年到2012年间,全面系统地调查了中国不同海域的11种养殖贝类及其种苗的感染情况,旨在掌握4种原虫病在中国主要养殖贝类中分布和流行的第一手资料,及其在不同海域和不同贝类品种上的感染状况,为这4种原虫病的有效防治提供重要的科学依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 贝类4种原虫的检出率

2006~2012年间,从辽宁、山东、浙江、福建、广东、海南和广西的海域,采集331批共11291份贝类样品。4种原虫的检出率见表1,部分样品的检测结果见图1。

表1 四种原虫的检出率

Table 1 The positive detecting rates of four protozoans

贝类种类 Shellfish species	检测份数 Tested sample	尼氏单孢子虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Haplosporidium nelsoni</i> (%)	派琴虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Perkinsus</i> (%)	折光马尔太虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Marteilia refringens</i> (%)	包拉米虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Bonamia</i> (%)
牡蛎 Oyster	5 419	215 (3.97%)	610 (11.26%)	33 (0.61%)	0
文蛤 Calm	1 026	2 (0.19%)	39 (3.80%)	2 (0.19%)	0
扇贝 Scallop	1 012	51 (5.04%)	37 (3.66%)	9 (0.89%)	0
菲律宾蛤仔 Manila clam	1 005	46 (4.58%)	265 (26.37%)	67 (6.67%)	0
贻贝 Mussel	513	5 (0.97%)	19 (3.70%)	3 (0.58%)	0
血蛤 Ark shell	506	16 (3.16%)	12 (2.37%)	11 (2.17%)	0
溢蛏 Razor clam	503	4 (0.80%)	23 (4.57%)	22 (4.37%)	0
鲍鱼 Abalone	521	45 (8.64%)	2 (0.38%)	0	0
花甲螺 <i>Paphia undulata</i>	569	67 (11.78%)	115 (20.21%)	0	0
沙包螺 Shabao calm	107	0 (0%)	3 (2.80%)	0	0
贵妃螺 <i>Mactra antiquata</i>	110	0 (0%)	2 (1.81%)	0	0
总计 Total	11 291	451 (3.99%)	1 127 (9.98%)	147 (1.30%)	0

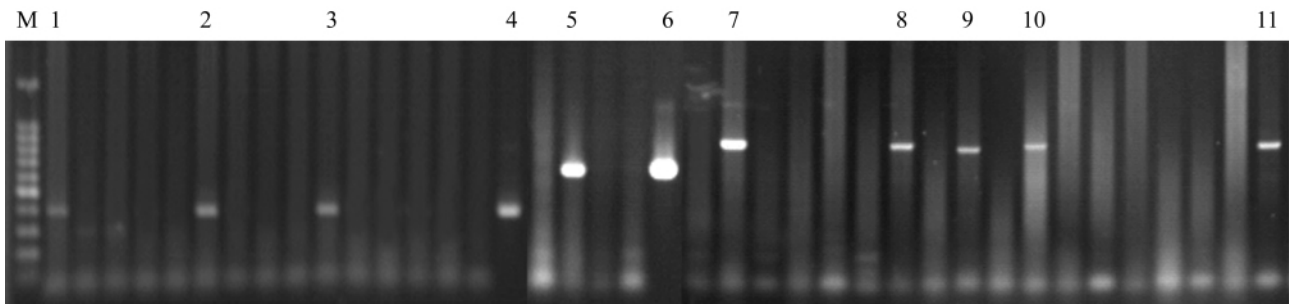


图 1 部分贝类样品检测的结果

注: M: 100 bp DNA ladder; 1~3: 折光马尔太虫阳性样品; 4: 折光马尔太虫阳性对照; 5: 尼氏单孢子虫阳性样品; 6: 尼氏单孢子虫阳性对照; 7~10: 派琴虫阳性样品; 11: 派琴虫阳性对照

Figure 1 The detection results of some shellfish samples

Note: M: 100 bp DNA ladder; 1~3: Positive sample of *Marteilia refringens*; 4: Positive control of *Marteilia refringens*; 5: Positive sample of *Haplosporidium nelsoni*; 6: Positive control of *Haplosporidium nelsoni*; 7~10: Positive sample of *Perkinsus*; 11: Positive control of *Perkinsus*

4 种原虫的感染率累计为 15.28% (1 725/11 291) ,其中感染率最高的为派琴虫(9.98%) (1 127/11 291) ,其次为尼氏单孢子虫(3.99%) (451/1 1291) ,最低为折光马尔太虫(1.30%) (147/11 291) ,未检出包拉米虫的感染。从表 1 中可见,尼氏单孢子虫的感染存在于牡蛎、文蛤、扇贝、菲律宾蛤仔、贻贝、血蛤、溢蛭和鲍鱼等贝类中,其中以花甲螺的感染率最高(11.78%)。派琴虫的感染存在所检测的 11 中贝类中,其中以菲律宾蛤仔和花甲螺感染率最高,分别达到 26.37%和20.21%。折光马尔太虫的感染存在于牡蛎、文蛤、扇贝、菲律宾蛤仔、贻贝、血蛤和溢蛭中,其中菲律宾蛤仔和溢蛭的感染率较高,分别达 6.67%和 3.49%。包拉米虫在中国沿海 11 291 份贝类中均未检出。

### 1.2 贝类 4 种原虫的混合感染

在单个贝类中,存在多种原虫混合感染的现象,其中 37 份牡蛎、18 份花甲螺、17 份菲律宾蛤仔、7 份扇贝和 1 份血蛤为尼氏单孢子虫和派琴虫这两种原

虫混合感染,9 份牡蛎、14 份菲律宾蛤仔、2 份溢蛭和 2 份血蛤为折光马尔太虫和派琴虫这两种原虫混合感染,1 份菲律宾蛤仔和 1 份牡蛎为折光马尔太虫和尼氏单孢子虫这两种原虫混合感染,8 份菲律宾蛤仔为单孢子、派琴虫和折光马尔太虫这 3 种原虫混合感染。尼氏单孢子虫和派琴虫及折光马尔太虫和派琴虫的混合感染最常见,分别占 4 种原虫感染贝类总数的 4.64%和 1.57% (80/1 725, 27/1 725)。两种或两种以上原虫混合感染的贝类占 4 种原虫感染贝类总数的 6.78% (117/1 725)。

### 1.3 不同品种牡蛎 4 种原虫的检出率

2006~2012 年间采集的 3 329 份近江牡蛎、1 229 份太平洋牡蛎和 861 份葡萄牙牡蛎的检测结果见表 2。从表中可见尼氏单孢子虫在 3 种牡蛎中均有感染,其中以太平洋牡蛎的感染率最高,达 9.44%,与其它两个品种感染率有显著差异。派琴虫在 3 种牡蛎中均有感染,其中以近江牡蛎的感染率最高,达

表 2 牡蛎不同品种的检出率

Table 2 The positive detecting rate of different kinds of oyster

牡蛎种类	检测份数	尼氏单孢子虫阳性份数(%)	派琴虫阳性份数(%)	折光马尔太虫阳性份数(%)	包拉米虫阳性份数(%)
Variety of oyster	Tested sample	Positive sample of <i>Haplosporidium nelsoni</i> (%)	Positive sample of <i>Perkinsus</i> (%)	Positive sample of <i>Marteilia refringens</i> (%)	Positive sample of <i>Bonamia</i> (%)
近江牡蛎	3 329	61 (1.83%)	508 (15.26%)	14 (0.42%)	0
<i>Crassostrea rivularis</i>					
太平洋牡蛎	1 229	116 (9.44%)	68 (5.53%)	2 (0.16%)	0
<i>Crassostrea gigas</i>					
葡萄牙牡蛎	861	38 (4.41%)	34 (3.95%)	17 (1.97%)	0
<i>Crassostrea angulata</i>					
总计	5 419	215 (3.97%)	610 (11.26%)	33 (0.61%)	0
Total					

15.26% ,与其它两个品种的感染率有显著差异。折光马尔太虫在葡萄牙牡蛎中的感染率最高,包拉米虫未检出。

#### 1.4 牡蛎不同海域的检出率

2006年到2012年间从中国沿海不同海域采集的牡蛎样品检测结果见表3。从表中可见,尼氏单孢子虫感染率较高的海域为辽宁和山东省,派琴虫感染率较高的海域为浙江、广东、海南和广西,折光马尔太虫的感染仅在福建和广西的海域出现。包拉米虫未检出感染。

#### 1.5 贝类苗4种原虫的检出率

采集的贝类苗4种原虫的检出率见表4。从表中可见,派琴虫在牡蛎苗、文蛤苗、菲律宾蛤仔苗、溢蛭苗和花甲螺苗中均存在感染,尼氏单孢子虫在牡蛎苗、文蛤苗、扇贝苗、溢蛭苗和花甲螺苗中均存在感染,折光马尔太虫在牡蛎苗、文蛤苗、扇贝苗和菲律宾蛤仔苗中均存在感染,包拉米虫在中国贝类苗中未检出。

#### 1.6 测序结果与序列分析

不同海域不同贝类,首次检测为阳性的部分样品派琴虫、折光马尔太虫和尼氏单孢子虫扩增的目的片段分别为703 bp、411 bp和573 bp,与预期大小相符。在线Blast比对分析表明,本研究的PCR产物的核酸序列,与派琴虫、折光马尔太虫和尼氏单孢子虫的基

因对应片段的同源性一致,其中部分贝类样品的派琴虫与奥尔森派琴虫(GenBank 登录号: DQ516715)同源性最高,部分贝类样品的派琴虫与派琴虫北海株(*Perkinsus beihaiensis*, GenBank 登录号: JN054741)同源性最高。结果说明本研究所扩增的片段为派琴虫、折光马尔太虫和尼氏单孢子虫的特异性片段。

## 2 讨论

中国是世界贝类养殖和出口第一大国,沿海贝类养殖产量分列前三位的是牡蛎、蛤仔和扇贝,其中牡蛎养殖量最大,约占全国海水养殖总量的1/3。2010年中国贝类产量达 $1.108 \times 10^7$  t,占世界总产量约65%,出口量 $2.65 \times 10^5$  t,占世界出口总量的40%,出口创汇9.7亿美元。牡蛎、文蛤和菲律宾蛤仔是水产品出口创汇的主要品种,沿海的山东、辽宁、浙江、福建、广东和广西等省区是中国贝类养殖的主要基地。

贝类尼氏单孢子虫、派琴虫、折光马尔太虫和包拉米虫这4种原虫,感染贝类后不仅可引起较高的发病率和死亡率,而且还可使感染的贝类生长缓慢和消瘦,从而使养殖贝类大幅度减产而导致巨大的经济损失。摸清原虫感染和流行的情况,是其有效防控的前提基础。因此,对这4种原虫病在中国养殖贝类中的感染状况进行系统而深入的调查研究,全面了解这四种原虫病在中国贝类中的分布及流行情况,以期能找出其防治的突破点。本研究经过六年多在山东、辽宁、浙江、福建、广东、海南和广西等主要贝类

表3 牡蛎不同海域的检出率

Table 3 The positive detecting rate of oyster in different sea waters

海域 Seawaters	检测份数 Tested sample	尼氏单孢子虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Haplosporidium nelsoni</i> (%)	派琴虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Perkinsus</i> (%)	折光马尔太虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Marteilia refringens</i> (%)	包拉米虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Bonamia</i> (%)
辽宁 Liaoning	630	43 (6.83%)	9 (1.43%)	0	0
山东 Shandong	599	73 (12.19%)	59 (9.85%)	2	0
浙江 Zhejiang	597	38 (6.37%)	103 (17.25%)	0	0
福建 Fujian	739	28 (3.79%)	31 (4.19%)	17 (2.30%)	0
广东 Guangdong	472	9 (1.91%)	56 (11.86%)	0	0
海南 Hainan	454	0	44 (9.69%)	0	0
广西 Guangxi	1 928	24 (1.24%)	308 (15.98%)	14 (0.73%)	0
总计 Total	5 419	215 (3.97%)	610 (11.26%)	33 (0.61%)	0



表 4 贝类苗四种原虫的检出率

Table 4 The positive detecting rate of four protozoans in the seedling of shellfishes

贝类苗种类 Shellfish seedling	检测份数 Tested sample	尼氏单孢子虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Haplosporidium nelson</i> (%)	派琴虫阳性份数(%) Positive sample of <i>Perkinsus</i> (%)	折光马尔太虫阳性 份数(%) Positive sample of <i>Marteilia refringens</i> (%)	包拉米虫阳性 份数(%) Positive sample of <i>Bonamia</i> (%)
钦州牡蛎苗 Oyster seedling of QZ	581	10 (1.72%)	176 (30.29%)	11 (1.89%)	0
青岛牡蛎苗 Oyster seedling of QD	58	1 (1.72%)	17 (29.31%)	1 (1.72%)	0
厦门牡蛎苗 Oyster seedling of XM	92	0	1 (1.09%)	0	0
温州文蛤苗 Calm seedling of WZ	154	2 (1.30%)	3 (1.95%)	1 (0.65%)	0
青岛扇贝苗 Scallop seedling of QD	72	0	0	0	0
温州扇贝苗 Scallop seedling of WZ	174	1 (0.57%)	0	1 (0.57%)	0
大连菲律宾蛤仔苗 Manila clam seedling of DL	146	0	46 (31.51%)	1 (0.68%)	0
温州溢蛭苗 Razor clam seedling of WZ	102	3 (2.94%)	11 (10.78%)	0	0
厦门花甲螺苗 Paphia undulata seedling of XM	150	1 (0.67%)	2 (1.33%)	0	0
总计 Total	1 529	18 (1.18%)	256 (16.74%)	15 (0.98%)	0

养殖的海域，采集了 11 种贝类 331 批次共 11 291 份，并对其尼氏单孢子虫、派琴虫、折光马尔太虫和包拉米虫这 4 种原虫的分布和流行情况进行系统调查，这是对中国贝类原虫感染流行情况调查持续时间最长、调查范围最广、检测原虫种类最多、贝类品种和数量最多的一次，全面系统摸清了 4 种原虫在中国养殖贝类中感染和流行的详细情况。

调查结果显示，中国不同海域养殖贝类中普遍存在原虫的感染 4 种原虫的感染率累计为 15.28% (1 725/11 291)，其中感染率最高的为派琴虫 9.98% (1 127/11 291) 其次为尼氏单孢子虫 3.99% (451/11 291)，最低为折光马尔太虫 1.30% (147/11 291)，未检出包拉米虫的感染。不同贝类品种，其 4 种原虫的感染情况是不同的，尼氏单孢子虫以花甲螺的感染率最高 (11.78%)，派琴虫以菲律宾蛤仔和花甲螺感染率最高 (26.37% 和 20.21%)，折光马尔太虫以菲律宾蛤仔和溢蛭的感染率较高 (6.67% 和 3.49%)。对牡蛎感染情况的分析结果显示，不同品种的牡蛎，其 4 种原虫的感染情况也不相同，尼氏单孢子虫以太平洋牡蛎的感染率最高 (9.44%)，派琴虫以近江牡蛎的感染率最高 (15.26%)，而折光马尔太虫以葡萄牙牡蛎中的感染率最高 (1.97%)。结果表明，不同品种贝类对不同原虫的易感性可能有

差异，因此同一片养殖海区不应进行多种贝类混合养殖，特别是对派琴虫和尼氏单孢子虫感染率很高的花甲螺和菲律宾蛤仔，不应同其它品种贝类混合养殖，以防其原虫病的传播。同时，不同海域的牡蛎，其原虫的感染情况也是不同的，尼氏单孢子虫感染率较高的海域为辽宁和山东，派琴虫感染率较高的海域为浙江、广东、海南和广西，折光马尔太虫的感染仅在福建和广西的海域出现，这也是在中国贝类中首次检测出折光马尔太虫的感染。

此次调查结果还显示，在单个贝类中，存在多种原虫混合感染的现象，占 4 种原虫感染贝类总数的 6.78% (117/1 725)，其中以尼氏单孢子虫和派琴虫、折光马尔太虫和派琴虫的混合感染最常见，分别占 4 种原虫感染贝类总数的 4.64% 和 1.57% (80/1 725, 27/1 725)。包拉米虫在中国沿海 11 种主要养殖贝类中均未检出，提示我们今后在从国外进行贝类引种时，应特别注意包拉米虫的检疫，以防止其从国外传入中国造成后患。

调查结果还表明，在首次对中国主要养殖贝类繁育种苗的检测中，从牡蛎、扇贝、文蛤、菲律宾蛤仔、溢蛭和花甲螺等贝类幼苗中也检测出了尼氏单孢子虫和派琴虫的感染，且感染率较高，表明种苗在

贝类原虫病的流行和传播上发挥了重要作用,因此应重视对4种原虫感染的检测,防止通过种苗传染扩散原虫病。该调查报告是首次全面系统地对中国主要养殖贝类的4种原虫病进行流行病学调查的报告,调查取得了丰富的第一手资料,弄清了4种原虫的感染在不同海域和不同贝类品种上的差异,为中国4种原虫病的有效防治提供重要的科学依据。

近年来,中国贝类养殖和种苗繁育过程中,各种病害频繁爆发,造成了严重的经济损失,病原微生物感染是造成贝类死亡的主要原因(柳忠传等,1996,海洋信息,(03):19;戴光宇等,2007,温州农业科技,(3):25-26;张锡佳等,2007,齐鲁渔业,(11):34-35)。种(亲)贝携带病原体是影响种苗质量和最终导致养殖过程中疫病传播及发病死亡的重要原因,应尽快开展无特定病原体(SPF)贝类原种场建设,繁育提供无携带特定病原体(SPF)的健康贝类种苗给广大养殖户养殖。因此,我们认为加强对养殖海域环境保护、减少污染,加强养殖贝类疾病特别是原虫病的监测、防止疾病传播与蔓延,调整贝类养殖结构、合理控制养殖规模和容量、提高贝类自身抗病能力,严格种苗检疫、提高种苗质量,有效控制贝类疾病通过种苗传播,已成为当前中国贝类养殖及其种苗繁育中最为紧迫的任务,这对保障中国贝类养殖业的健康可持续发展都具有重要意义。

### 3 材料与方法

#### 3.1 病原体和样品采集

由于牡蛎是中国最主要的贝类产品,因此本研究针对牡蛎的4种原虫病,按不同海域和不同贝类品种来分析其检测结果,同时对采集的贝类苗的感染率进行分析。

2006-2012年间,从辽宁、山东、浙江、福建、广东、海南和广西等海域,采集牡蛎(5 419)、文蛤(1 026)、扇

贝(1 012)、菲律宾蛤仔(1 005)、贻贝(513)、血蛤(506)、溢蛭(503)、鲍鱼(521)、花甲螺(569)、沙包螺(107)和贵妃螺(110)等贝类样品。采集方法为每月定时从各个海域采集样品,加冰打包后空运到本研究室,到达后即时用剪刀采集鳃和消化腺组织共约1g,使用碾磨磨碎。为避免交叉污染,严格按照每份贝类样品使用一把剪刀和一个碾磨,使用过的剪刀和碾磨经彻底清洗,高压消毒后才能重复使用。尼氏单孢子虫、派琴虫、折光折光马尔太虫和包拉米虫的阳性DNA等由本室保存。

#### 3.2 DNA 的提取

取经碾磨磨碎的贝类样品共约90mg,根据海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒的说明书,使用蛋白酶K和消化液消化贝类样品4h以后提取组织DNA。海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒和DNA片断胶回收试剂盒购自广州东盛生物科技有限公司。

#### 3.3 引物

派琴虫、折光马尔太虫和包拉米虫的检测使用OIE推荐的引物(<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online>),尼氏单孢子虫的检测引物参照参考文献(Stokes et al., 1995)。引物由TaKaRa公司合成,序列见表5。

#### 3.4 PCR 的扩增体系和条件

PCR的反应体系为50  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR Mix 25  $\mu$ L, 25 pmol/L的上游引物和下游引物各0.5  $\mu$ L, DNA模板2  $\mu$ L,以ddH<sub>2</sub>O补足50  $\mu$ L。根据OIE和Stoke等(1995)人的推荐条件,分别使用派琴虫、折光马尔太虫、包拉米虫和尼氏单孢子虫的引物进行PCR扩增,凝胶电泳后记录和分析结果。PCR Mix及pEASY-T1试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

表5 用于检测4种原虫的引物序列

Table 5 The primers used to detect four protozoans

原虫 Protozoans	引物 Primers	引物序列(5'-3') Primers sequences (5'-3')	扩增长度(bp) Length of PCR products (bp)
尼氏单孢子虫 <i>Haplosporidium nelsoni</i>	MSX-A	CGACTTTGGCATTAGTTTCAGACC	573
	MSX-B	ATGTGTTGGTGACGCTAACCG	
派琴虫 <i>Perkinsus</i>	PerkITS-85	CCGCTTTGTTTGGATCCC	703
	PerkITS-750	ACATCAGGCCTTCTAATGATG	
折光马尔太虫 <i>Marteilia refringens</i>	Marteiliosis 1	CCGCACACGTTCTTCACTCC	411
	Marteiliosis 2	CTCGCGAGTTTCGACAGACG	
包拉米虫 <i>Bonamia</i>	CF	CGGGGGCATAATTCAGGAAC	760
	CR	CCATCTGCTGGAGACACAG	

### 3.5 PCR 产物的克隆测序

对 3.1 中不同地区不同贝类,首次检测为阳性的部分样品取 40  $\mu$ L PCR 产物进行电泳,切下目的片段纯化回收后与 pEASY-T1 于 25 $^{\circ}$ C 连接 10 min,转化 Trans-T1 感受态细胞。挑取阳性重组菌送大连宝生生物技术有限公司进行测序,分析并用 Blast 在线软件比对测序结果。

### 作者贡献

谢丽基在整个实验过程贯穿始终,是实验设计、实验操作内容以及论文整理方面的主要完成者;通讯作者谢芝勋提供整个实验的一切费用支出和理论指导;刘加波负责样品的收集和处理;庞耀珊和邓显文负责样品的抽提;谢志勤和范晴负责样品的 PCR;罗思思负责凝胶电泳。

### 致谢

衷心感谢大连海洋大学赵力强、中国水产科学研究院黄海水产研究所李彬、浙江省海洋水产养殖研究所闫茂仓、厦门大学王蕾、广东海洋大学蓝尉冰和海南省动物疫病预防控制中心方莉的帮助与支持。本项目由国家百千万人才工程人选专项(945200603)、广西特聘专家专项(2011B020)和广西科技攻关(桂科攻0630001-3M)共同资助。

### 参考文献

Audemard C., Sajus M.C., Barnaud A., Sautour B., Sauriau P.G., and Berthe F.J., 2004, Infection dynamics of *Marteilia refringens* in flat oyster *Ostrea edulis* and copepod *Paracartia grani* in a claire pond of Marennes-Olon Bay, Dis. Aquat. Organ., 61(1-2): 103-11

Barber B.J., Langan R., and Howell T.L., 1997, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) epizootic in the Piscataqua River Estuary (Maine/New Hampshire, USA), The Journal of Parasitology, 83(1): 148-150

Carrasco N., Lopez-Flores I., Alcaraz M., Furones M.D., Berthe F.C., and ArzuL I., 2007, Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain), Parasitology, 134(11): 1541-1550

Choik K.S., and Park K.I., 1997, Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea, J.Aquac., 10(3): 227-237

Cochennec N., Renault T., Boudry P., Chollet B., and Gerard A.,

1998, Bonamia-like parasite found in the *Suminoe oyster Crassostea rivularis* reared in France, Dis. Aquat. Org., 34(3): 193-197

Culloty S.C., and Mulcahy M.F., 1996, Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of *Bonamiasis* in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland, Aquaculture, 144(1-3): 53-63

Doonan I.J., Cranfield H., and Michael K.P., 1994, Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaus strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp., New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 28(4): 335-344

Elston R.A., Farley C.A., and Kent M.L., 1986, Occurrence and significance of *Bonamiasis* in European flat oysters *Ostrea edulis* in North American, Dis. Aquat.org., 2: 49-54

Hamaguchi M., Suzuki N., and Usuki H., 1998, *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam tapes (=Ruditapes) philippinarum in Japan, Fish Pathology, 33(5): 473-480

Haskin H.H., Stauber L.A., and Mackin J.A., 1966, *Minchinia nelsoni*. sp. (*Haplosporidia*, *Haplosporidiidae*): Causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic, Science, 153(3742): 1414-1416

Hine P.M., and Thorne T., 2002, *Haplosporidium* sp. (Alveolata: Haplosporidia) associated with mortalities among rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia, Dis. Aquat. Organ., 51(2): 123-33

Kleeman S.N., Le Roux F., Berthe F., and Adlard R.D., 2002, Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*, Parasitology, 125(2): 131-141

Liang Y.B., Zhang X.C., Wang L.J., Yang B., Zhang Y., and Chang C.L., 2001, Prevalence of *Perkinsus* sp. in the manila clam ruditapes philippinarum along northern coast of yellow sea in China, Haiyang Yu Huzhao (Oceanologia Et Limnologia Sinica), 32(5): 567-575 (梁玉波, 张喜昌, 王立俊, 杨波, 张映, 蔡春雷, 2001, 北黄海菲律宾蛤仔帕金虫流行病害的研究, 海洋与湖沼, 32(5): 567-575)

Lopez-Flores I., Robles F., Valencia J.M., Grau A., Villalba A., de la Herran R., Garrido-Ramos M.A., Ruiz-Rejon C., Ruiz-Rejon M., and Navas J.I., 2008, Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain), Dis. Aquat. Organ., 82(1): 79-87

Powell E.N., Klinck J.M., and Hofmann E.E., 1996, Modeling diseased oyster populations. . Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics, J. Shellfish Res., 15(1): 141-165

Russell S., Frasca J.S., Sunila I., and French R.A., 2004, Applica-

- tion of a multiplex PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples, *Dis. Aquat. Org.*, 59: 85-91
- Stokes N.A., Siddall M.E., and Burreson E.M., 1995, Detection of *Haplosporidium nelsoni* (*Haplosporidia: Haplosporidiidae*) in oysters by PCR amplification, *Dis. Aquat. Org.*, 23: 145-152
- Wang Z.W., Lv X., Liang B., and Liang Y.B., 2009, Primary study on *Haplosporidium nelsoni* in *Crassostrea gigas*, *Haiyang Huanjing Kexue* (*Marine Environmental Science*), 28(2): 164-166 (王中卫, 吕昕, 梁斌, 梁玉波, 2009, 长牡蛎尼氏单孢子虫的初步研究, *海洋环境科学*, 28(2): 164-166)