

一种定量检测大黄鱼感染变形假单胞菌方法的建立与应用

崔晓莹^{1,2}, 李泽宇^{1,2}, 李完波^{1,2}, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicid*)是引起大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏白点病的主要病原。基于变形假单胞菌的*gyrB*基因与大黄鱼的单拷贝基因*gdf-8*分别设计1对特异性引物,对所设计的变形假单胞菌*gyrB*基因的引物特异性进行了检验,并采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测了400尾人工浸泡感染变形假单胞菌5d后的大黄鱼幼鱼脾脏中的病原菌的相对含量。结果显示,基于*gyrB*基因所设计的引物对变形假单胞菌检测具有良好的特异性,可以用于对变形假单胞菌的定性和定量检测;400尾人工攻毒大黄鱼幼鱼脾脏中变形假单胞菌的相对含量(相对带菌量,用*gyrB*基因拷贝数与大黄鱼*gdf-8*基因拷贝数之比表示)变化在 $5.04 \times 10^{-7} \sim 0.482$ 之间,不同个体之间的相对带菌量差异很大,说明不同个体的大黄鱼对变形假单胞菌感染的抵抗力有很显著的差异。

[关键词] 大黄鱼;变形假单胞菌;*gyrB*基因;荧光定量PCR;相对带菌量

[中图分类号] S 941.42; S 917.4

Establishment and Application of a Quantitative Method for Detecting of *Pseudomonas plecoglossicid* Infection in Large Yellow Croaker(*Larimichthys crocea*)

CUI Xiaoying^{1,2}, LI Zeyu^{1,2}, LI Wanbo^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea of Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China)

Abstract: The main pathogen causing white-spotted syndrome in internal organs in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is *Pseudomonas plecoglossicid*. Two pairs of specific primers based on the sequences of *gyrB* of *P. plecoglossicid* and the single copy gene *gdf-8* of large yellow croaker were designed in this study, respectively. The specificity of the designed primers was first checked. The relative pathogen load(RPL) in the spleen of 400 juvenile large yellow croakers after 5 days of artificial challenge was then examined by real-time quantitative PCR(qRT-PCR). The results showed that the primers designed based on the *gyrB* gene have good specificity for detecting *P. plecoglossicid* and could be used for qualitative and quantitative detection of *P. plecoglossicid*. The RPL of the spleen in the 400 juvenile large yellow croakers ranged from 5.04×10^{-7} to 0.482(the relative pathogen load, represented by the ratio of *gyrB* gene copy number and *gdf-8* gene copy number). The dramatic difference of RPL among different individuals indicated that the resistance of different

[收稿日期] 2019-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金重点支持项目(U1705231);福建省自然科学基金资助项目(2018J01450);国家海水鱼产业技术体系(CARS-47-G04)

[作者简介] 崔晓莹(1992—),女,硕士生,主要从事水产动物遗传育种研究。通信作者:王志勇(1963—),男,教授,博导,从事水生生物遗传育种与生物技术研究。E-mail:zywang@jmu.edu.cn

individuals to *P. plecoglossicid* infection was significantly different.

Keywords: *Larimichthys crocea*; *Pseudomonas plecoglossicid*; *gyrB* gene; real-time quantitative PCR; relative pathogen load

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 为我国传统“四大海产”之一,也是我国近海的主要经济鱼类之一^[1]。因其肉质鲜嫩、营养丰富、味道鲜美,备受国民喜爱,素有“国鱼”的美称,现已成为我国养殖规模最大的海水鱼类^[2]。养殖密度过大和海区环境污染导致大黄鱼病害频发,不仅造成经济损失每年数亿元,还给食品和环境安全带来巨大隐患^[3]。其中,内脏白点病是近年来对大黄鱼养殖危害最大的病害之一,因而引起了渔业管理部门和众多鱼病研究者的重视。

现已有多位研究者通过细致的研究查明,大黄鱼内脏白点病是由变形假单胞菌(也称香鱼假单胞菌或杀香鱼假单胞菌, *Pseudomonas plecoglossicida*)引起的一种细菌性疾病^[4-8]。Huang等^[9]对变形假单胞菌进行了基因组测序。该病鱼体表无明显症状,有病死或濒死的个体上浮到海面才会被发觉,此时网箱中多数个体已严重感染,病鱼开始陆续死亡,累积死亡率可达50%~90%以上,严重时整排网箱的鱼几乎死亡殆尽。该病原来仅在局部海区发现,在越冬期及其前后,当水温低于20℃时发病,1—4月是此病的高发季节^[6],目前已蔓延到各个主要养殖海区,而且发病期呈延长趋势。由于该病是在体内发作,体外用药无效,发病期主要集中在低温季节,此时大黄鱼摄食已非常微弱或已完全停止摄食,当下也无有效渔药可以治疗此病,因此其危害格外严重。采用先进的育种技术快速培育出抗病力强的新品种,对于减少因内脏白点病引起的大黄鱼养殖业的损失具有重要的意义。

关于变形假单胞菌的检测方法已有一些研究报道,如Izumi等^[10]报道了基于*gyrB*序列设计特异性引物建立的普通PCR检测方法,袁雪梅等^[11]报道了基于*rpoD*基因序列设计特异性引物建立的LAMP检测方法,这两种方法可用于对变形假单胞菌的定性检测;周涛等^[12]报道了基于*rpoD*基因序列设计特异性引物建立检测该种细菌的SYBR Green I实时荧光定量PCR方法,可用于对变形假单胞菌的定性和定量检测。但周涛等建立的方法只检测变形假单胞菌的数量,没有同时检测宿主(大黄鱼)细胞的数量或DNA含量。对病鱼组织提取的DNA进行病原菌含量检测时,由于提取的DNA中包含有宿主细胞的DNA和病原菌的DNA,通过DNA浓度测定并无法区分宿主DNA与病原体DNA的含量,因而只能通过对用于提取DNA的组织进行定量来比较不同个体感染病原菌的数量和受感染程度。然而相同大小或相同质量的组织中所包含的宿主细胞数量可能并不一致,所以据此比较不同个体之间受感染程度并不十分精确。本研究利用变形假单胞菌的*gyrB*基因与大黄鱼的单拷贝基因*gdf-8*分别设计特异性引物,建立了基于SYBR Green I荧光定量PCR技术的变形假单胞菌及反应体系中大黄鱼DNA含量的定量检测方法,并采用所建立的方法检测了400尾大黄鱼幼鱼在人工感染变形假单胞菌后脾脏的相对带菌量,旨在为利用基因组选择的方法对大黄鱼内脏白点病的抗病育种研究提供一种新的抗病力表型测定方法和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的400尾大黄鱼于2018年1月采自福建省宁德市金铃水产科技有限公司,平均体重为(28.44 ± 8.44) g。变形假单胞菌的菌株NZBD9,以及用于检验引物特异性的菌株(包括恶臭假单胞菌(*P. putida*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)、大肠杆菌

(*Escherichia coli*) 和迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 均由集美大学水产学院微生物实验室鄢庆枇教授惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 大黄鱼人工感染变形假单胞菌

实验大黄鱼从海区养殖网箱运至宁德市金铃水产科技有限公司育苗场后，在水温 18 ℃，盐度 25 左右的条件下驯养 7 d，并饥饿 1 d 后再进行攻毒实验。临实验前将变形假单胞菌用 LB 培养基于 18 ℃、220 r/min 条件下振荡培养 12 h，并用培养液将其稀释到浓度为 1.0×10^9 cfu/mL (OD = 1.0)。实验时，将 400 尾实验鱼移入到一个放有过滤海水（水深 20 cm）的 4 m × 2 m × 0.8 m 小水泥池中，加入 1.6 L 稀释好的菌液，使其终浓度达 1.0×10^6 cfu/mL（预实验获得的半致死浓度），并在充气条件下浸泡 3 h，然后将实验鱼捞出，用干净的过滤海水淋洗后，移入到底面积 20 m²、深 1.3 m 水泥池中（放入过滤海水至水深 80 cm），维持驯养时的水温和盐度，并用市售大黄鱼配合饲料正常投喂，每天投喂 2 次（6:00 和 18:00 各一次）。攻毒后第 6 天有少量大黄鱼开始发病侧翻，将全部实验鱼集中捞出放入到装有 4 ℃海水的 1 m³ 塑料桶中，称量体重后快速剖取脾脏，并置于 95 % 的乙醇中，于 -20 ℃ 保存。

1.2.2 DNA 的提取

对攻毒实验的大黄鱼，首先将其整个脾脏进行匀浆处理，再取部分匀浆，利用天根生化科技有限公司的基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA，再加入 80 μL TE 缓冲液洗脱制备 DNA 原液，用 MULTI-SKAN GO 酶标仪（购自 Thermo 公司）测定所提取 DNA 的浓度，用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量，然后将 DNA 稀释至 30 ng/μL，-20 ℃ 保存备用。取变形假单胞菌、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌等细菌的菌液以及 1 尾未被变形假单胞菌感染的健康大黄鱼的肌肉组织，采用同样方法提取基因组 DNA，用于引物特异性与扩增效率的检测和荧光定量 PCR 反应标准曲线的制作。

1.2.3 引物设计与检测

将 GenBank 中变形假单胞菌 *gyrB* 基因序列 (JN688866) 与恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌等细菌的 *gyrB* 基因序列用 DNAMAN 软件进行比对，在其特异的序列区域设计变形假单胞菌的引物。从本实验室组装的大黄鱼参考基因组中获得单拷贝基因 *gdf-8* 的序列，根据其 CDS 区序列设计引物，并与实验室积累的大黄鱼重测序数据进行比对，确定在所设计的引物上不存在 SNP 位点。上述 2 对引物均利用 Primer Premier 5.0 软件设计，由北京六合华大基因科技有限公司合成，引物序列见表 1。

合成的引物首先分别用变形假单胞菌和健康大黄鱼肌肉的基因组 DNA 为模板，通过普通 PCR 反应检验引物扩增效果和特异性，然后分别用变形假单胞菌 (NZBD9)、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、明亮发光杆

表 1 荧光定量引物序列

Tab. 1 Primer sequences for q-PCR experiment		
引物名称	Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>gdf-8</i> - F		TGGGAGATGACAACAGG
<i>gdf-8</i> - R		GCACCGACCAATACACT
<i>gyrB</i> - F		CTTGGTGAAGCACAGCAGGTT
<i>gyrB</i> - R		GTTCGGGCAAGGAAGACT

菌、大肠杆菌、迟钝爱德华氏菌的 DNA 为模板，通过常规 PCR 对变形假单胞菌引物进行特异性检验。反应体系组成如下：10 × PCR Buffer 1.0 μL，dNTP Mix (2.5 mmol/L) 0.8 μL，rTaq 0.1 μL，10 μmol/L 的 *gdf-8* F/R 和 *gyrB* F/R 上下游引物各 0.2 μL，DNA 模板 1.0 μL，ddH₂O 6.7 μL，共 10 μL 反应体系。PCR 反应程序为：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 30 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，共 35 个循环；最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

引物特异性与扩增效率检测和标准曲线制作：首先，以变形假单胞菌和健康大黄鱼肌肉的基因组 DNA 为模板，分别用所设计的特异性引物进行普通 PCR 扩增，扩增产物经 2.0 % 的琼脂糖凝胶电泳后（电压 130 V 电泳 40 min，EB 染色），切取目的条带用 DNA 纯化试剂盒（购自 Omega 公司）进行

纯化, 纯化的产物用酶标仪测定浓度 (大黄鱼 *gdf*-8 基因和变形假单胞菌 *gyrB* 基因 PCR 产物的浓度分别为 25.10 ng/μL 和 44.31 ng/μL)。然后, 将纯化的 PCR 产物原液分别按照 10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ 倍稀释后作为模板 (根据分子拷贝数 (copies/μL) = DNA 质量浓度/DNA 分子量, 计算出对应的 DNA 拷贝数, 其中 DNA 质量浓度 = DNA 浓度 × 6.02 × 10²³; DNA 分子量 = DNA 碱基数 × 660), 用 Light Cycler 480 II (Roche, USA) 荧光定量 PCR 仪, 按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂使用说明书进行操作, 通过实时荧光定量 PCR 进一步检验 *gdf*-8 F/R 和 *gyrB* F/R 这 2 对引物的特异性, 并检测其扩增效率, 根据结果制作标准曲线。实时荧光定量 PCR 的反应体系如下: 2 × TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 10 μL, 10 μmol/L 的 *gdf*-8 F/R 和 *gyrB* F/R 上下游引物各 0.5 μL, DNA 模板 4.0 μL, ddH₂O 5.0 μL, 共 20 μL 反应体系。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环。其中, DNA 模板是上述经纯化并稀释好的大黄鱼 *gdf*-8 基因或变形假单胞菌 *gyrB* 基因 PCR 产物。

400 尾人工感染变形假单胞菌的大黄鱼幼鱼脾脏的相对带菌量检测: 将上述实时荧光定量 PCR 反应体系中 DNA 模板换为从攻毒实验大黄鱼脾脏中提取的 DNA (浓度均为 30 ng/μL), 即以大黄鱼 *gdf*-8 基因为内参基因, 以变形假单胞菌的 *gyrB* 基因为目的基因进行荧光定量 PCR 实验, 每个样品做 3 个重复。计算相对带菌量时取 3 个重复的平均值作为实验结果。

1.2.5 相对带菌量的计算

根据所作标准曲线和实时定量 PCR 的检测结果, 分别计算出从每个个体的样品中检出的变形假单胞菌 *gyrB* 基因和大黄鱼 *gdf*-8 基因的拷贝数。同一个体中检出的 *gyrB* 基因的拷贝数除以 *gdf*-8 基因的拷贝数所得的比值即为相对带菌量, 它相当于同样数量脾脏细胞中检出的变形假单胞菌数量。根据标准曲线方程 $C_T = K \times \lg(\text{DNA 拷贝数}) + C$, 其中 C_T 为循环阈值, $K = -1/\lg(1 + E)$, $C = \lg K/\lg(1 + E)$, E 为引物扩增效率, 可得 *gyrB* 基因的拷贝数 $N_p = 10^{(C_{Tp}-C_p)/K_p}$, *gdf*-8 基因的拷贝数 $N_L = 10^{(C_{TL}-C_L)/K_L}$, 相对带菌量 = N_p/N_L 。

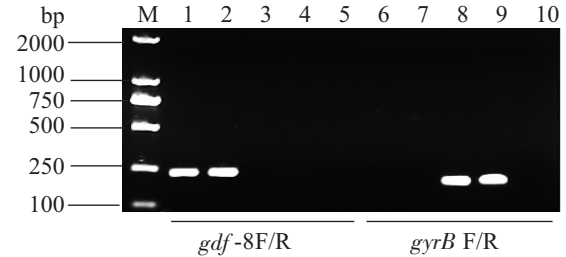
2 结果

2.1 引物的特异性验证

常规 PCR 扩增结果显示 2 对引物都只扩增出大小与预期相符的单一一条带 (见图 1), 表明所设计的 2 对引物的专一性和扩增效果良好。分别以 12 种不同细菌的 DNA 作为模板检验变形假单胞菌 *gyrB* F/R 引物的特异性。实验结果显示, 只有以变形假单胞菌为模板进行的扩增反应有目标条带出现, 而以其他细菌为模板的扩增反应却无 (见图 2), 说明 *gyrB* F/R 引物对检测变形假单胞菌有良好的特异性。

2.2 实时荧光定量 PCR 扩增效果和标准曲线制作

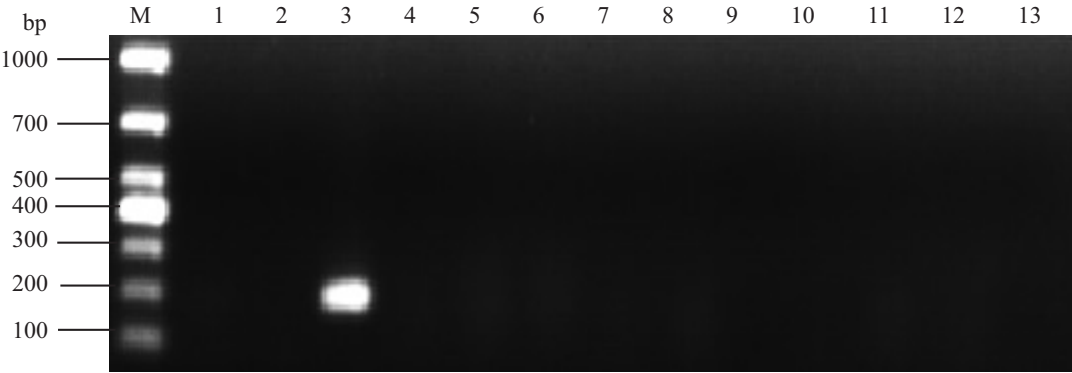
2 对引物的实时荧光定量 PCR 扩增验证结果如图 3 所示。从图 3a、b 可见, *gdf*-8 F/R 和 *gyrB* F/R 的相关系数分别为 0.990 1 和 0.999 7, 扩增效率分别为 93% 和 95%, 说明引物扩增有效性良好。由图 3c 可知, 扩增曲线拟合度比较高, 说明实时荧光定量 PCR 技术的重复性良好。图 3d 显示, 2 对引物的扩增产物均为单一峰, 说明该 2 对引物没有引物二聚体和非特异性扩增, 引物设计效果良好。



说明: M—2000 bp Marker; 1、2、6、7—健康大黄鱼肌肉 DNA 模板; 3、4、8、9—变形假单胞菌 DNA 模板; 5、10—不加 DNA 模板的阴性对照。

Notes: M-2000 bp Marker; 1, 2, 6, and 7 represented DNA templates for muscle of healthy large yellow croaker; 3, 4, 7, and 8 represented DNA templates of *P. plecoglossicid*; 5 and 10 represented negative controls without DNA templates.

图 1 *gdf*-8 F/R 和 *gyrB* F/R 引物扩增结果
Fig. 1 The result of amplification by the *gdf*-8 F/R and the *gyrB* F/R primer pairs



说明：M—1000 bp marker；1—恶臭假单胞菌；2—铜绿假单胞菌；3—NZBD9；4—副溶血弧菌；5—溶藻弧菌；6—创伤弧菌；7—哈维氏弧菌；8—嗜水气单胞菌；9—维氏气单胞菌；10—明亮发光杆菌；11—大肠杆菌；12—迟钝爱德华氏菌；13—阴性对照。

Notes: M-1000 bp marker, 1-*P. putida*, 2-*P. aeruginosa*, 3-NZBD9, 4-*V. Parahemolyticus*, 5-*V. alginolyticus*, 6-*V. vulnificus*, 7-*V. harveyi*, 8-*A. hydrophila*, 9-*A. veronii*, 10-*P. phosphoreum*, 11-*E. coli*, 12-*E. tarda*, 13-negative control.

图 2 *gyrB* – F/R 引物的特异性检测结果
Fig. 2 Specific test result of *gyrB* F/R primers

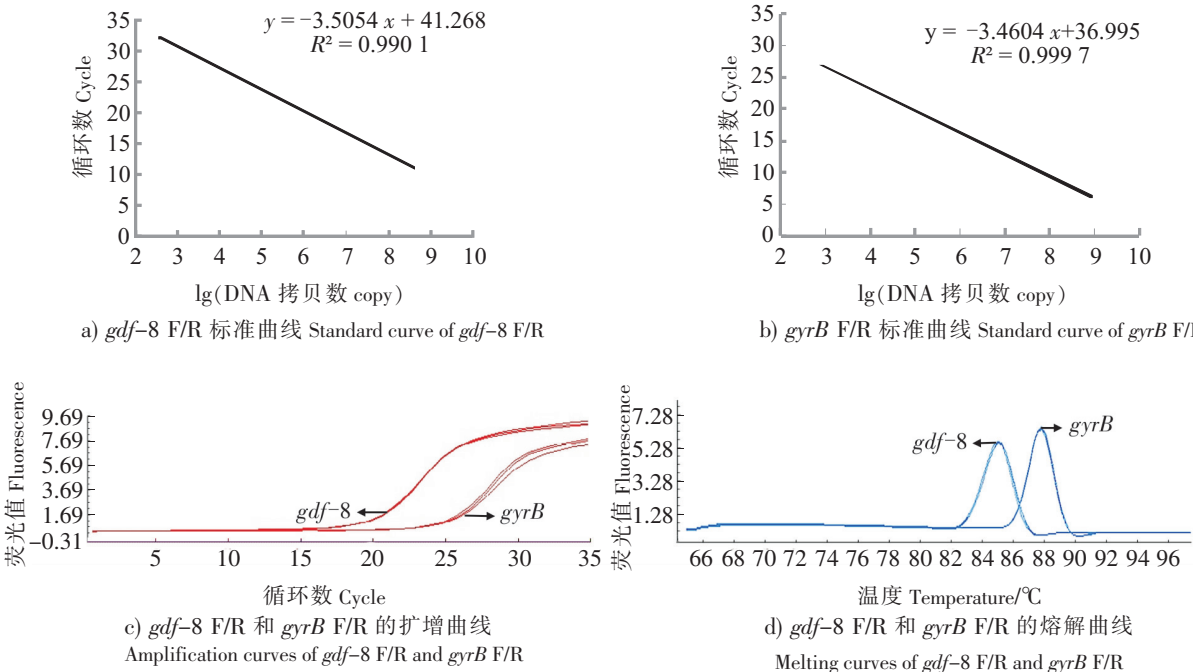


图 3 引物效果的检测
Fig.3 Detection of primer effective

2. 3 大黄鱼脾脏的相对带菌量

用所设计的两对引物和优化的扩增条件，用本研究建立的实时定量 PCR 方法，测定 400 尾人工感染变形假单胞菌的大黄鱼幼鱼脾脏的相对带菌量。结果显示，不同个体脾脏中变形假单胞菌的相对带菌量差异甚大，相对带菌量最高的个体达 0.482，最低的为 5.04×10^{-7} 。将相对带菌量的结果按照不同数量级分组，绘制相对带菌量的频数分布图，结果如图 4 所示。400 尾大黄鱼中，有 6 尾相对带菌量位于 10^{-6} 数量级，11 尾位于 10^{-1} 数量级，其余个体相对带菌量分布在 $10^{-6} \sim 10^{-2}$ 数量级之间。用 SPSS 软件对 400 尾实验鱼脾脏的相对带菌量与鱼体重作相关性分析，得到的 Pearson 相关性为 -0.035，*P* 值为 0.487，说明本研究中大黄鱼个体大小（体重）与脾脏中相对带菌量之间没有相关性。

3 讨论

近年来, 内脏白点病在浙江和福建的大黄鱼网箱养殖中流行, 给大黄鱼养殖业造成了严重的经济损失^[8]。由于患内脏白点病的大黄鱼体表没有明显症状, 难以在感染早期发现和诊断, 因而也难以及时采取有效的措施进行预防和治疗^[13]。建立病原体的定量快速检测技术, 将有利于对该病进行测报和防控, 对于开展抗病育种研究也有应用价值。

大黄鱼内脏白点病的病原体是变形假单胞菌, 分类上隶属于假单胞菌属恶臭假单胞菌组。假单胞属细菌种类繁多、分类复杂, 其基因序列和生理生化特征相似, 很难根据常规的生理生化指标鉴定近亲菌种^[14]。变形假单胞菌与恶臭假单胞菌的形态、理化特性、遗传特性都非常相似, 其 16S rRNA 序列相似度高达 99 %, 根据 16S rRNA 序列也很难辨别^[15]。*gyrB* 和 *rpoD* 序列进化速度相对较快^[16], 本研究选择变形假单胞菌的 *gyrB* 基因作为检测的目标基因, 设计的引物 *gyrB* F/R 经检验对变形假单胞菌检测具有良好的特异性, 所建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法可以应用于对大黄鱼内脏组织中感染的变形假单胞菌准确、定量地检测, 从而为变形假单胞菌引发的鱼病诊断与测报, 提供了一种准确和灵敏的检测方法。

在利用基因组选择技术进行抗病育种的研究中, 需要对不同个体的抗病力进行测定, 比较经常使用的方法是记录攻毒后宿主的发病死亡时间, 以此作为个体抗病力的表型值。尽管该方法比较简单易行, 但却无法通过对不同抗病力的个体基因表达情况进行同步检测来研究其抗病力差异的分子遗传机理。在病原体攻毒后适当时间的同一个时点采样, 并测定所有个体的被感染组织中病原体的含量, 理论上抗病力弱的个体在病灶部位得到繁殖的病原体将多于抗病力强的个体, 这也是一种评价受试个体抗病力的有效方法^[17]。然而, 在进行人工攻毒感染时, 仅仅利用病原体的特异性引物通过定量 PCR 技术进行病原体含量测定, 难以准确反映不同个体的抗病力情况; 而另一方面, DNA 模板浓度的微小差异也会对结果的准确性带来巨大影响。因此, 本研究以从感染变形假单胞菌大黄鱼脾脏匀浆中提取的总 DNA 为模板, 大黄鱼的单拷贝基因 *gdf-8* 作为内参基因, 设计出特异性引物 *gdf-8* F/R, 与病原体的特异性引物 *gyrB* F/R 同步进行荧光定量 PCR 扩增, 建立了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测大黄鱼人工感染变形假单胞菌数量的新方法。这种方法可以校正因提取 DNA 的病鱼组织的定量不准确和 DNA 模板浓度差异带来的影响, 从而实现受试鱼抗病力比较准确的测定与评价, 并且有利于通过转录组测序等技术研究宿主的抗病免疫机理, 挖掘抗病相关基因。

据本研究观察, 自然发病以及人工攻毒感染致病的患内脏白点病的大黄鱼, 通常是脾脏最先受到感染, 出现白色结节(白点)的数量最多, 所以本研究选择用从脾脏提取的 DNA 进行带菌量检测。本研究对 400 尾人工感染变形假单胞菌的大黄鱼幼鱼脾脏中相对带菌量的检测结果可看出, 不同大黄鱼个体之间脾脏中变形假单胞菌的数量差异很大, 说明不同大黄鱼个体对变形假单胞菌感染的抵抗力存在明显的差异, 因此, 通过选择抗病力强的个体作为亲本繁育后代, 培育出抗病力强的品系是完全可能的, 这将为解决养殖大黄鱼遭受内脏白点病严重危害的问题提供一条绿色有效的途径。

综上所述, 本研究设计了对变形假单胞菌检测具有良好特异性的 PCR 引物一对, 并建立了实时荧光定量 PCR 检测方法, 可以用于变形假单胞菌的定性与定量的检测, 同时建立了大黄鱼内脏组织

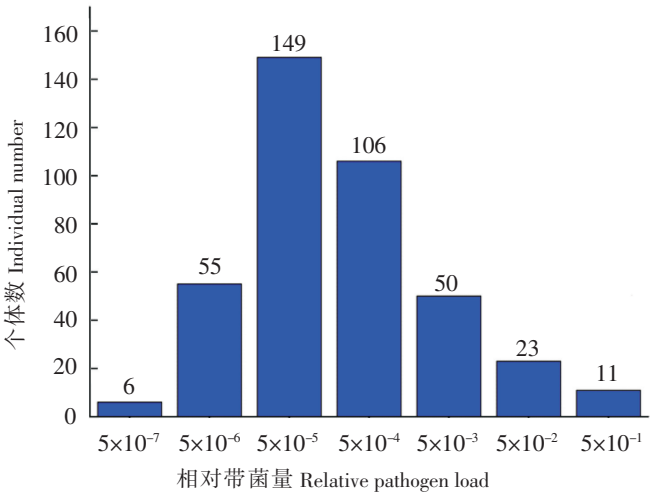


图4 400尾人工攻毒大黄鱼幼鱼脾脏的相对带菌量的频率分布
Fig.4 The frequency distribution of the relative pathogen load in the spleen of 400 juvenile large yellow croakers with artificial challenge

中变形假单胞菌的相对含量的检测方法。研究结果对于变形假单胞菌引发的鱼病的诊断和测报,以及大黄鱼抗内脏白点病的抗病育种研究,具有实际应用价值。

[参考文献]

- [1] 洪万树,刘家富,郑炜强,等. 浅论我国大黄鱼产业转型升级之对策 [J]. 渔业研究, 2018, 40(4): 315-323.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴 (2018) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- [3] 谢书秋,刘振勇. 闽东大黄鱼养殖现状分析与发展对策 [J]. 福建水产, 2006(3): 95-97.
- [4] MAO Z J, LI M F, CHEN J G. Draft genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NB2011, the causative agent of white nodules in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): e00586-13.
- [5] ZHANG J T, ZHOU S M, AN S W, et al. Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida* [J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(2): 113-121.
- [6] 胡娇,张飞,徐晓津,等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究 [J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 409-417.
- [7] 张杰,毛芝娟. 大黄鱼内脏白点病病原杀香鱼假单胞菌及其毒力因子研究进展 [J]. 浙江万里学院学报, 2015, 28(6): 69-76.
- [8] 刘年锋,郭睿,江小斌,等. 福州地区大黄鱼变形假单胞菌的分离与鉴定 [J]. 渔业研究, 2016, 38(1): 14-20.
- [9] HUANG L, ZHAO L, SU Y, et al. Genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NZBD9 [J]. Genome Announcements, 2018, 6(4): 1-2.
- [10] IZUMI S, YAMAMOTO M, SUZUKI K, et al. Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the *gyrB* region [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(7): 391-397.
- [11] 袁雪梅,葛明峰,安树伟,等. 大黄鱼致病香鱼假单胞菌对环境因子的响应及其感染检测分析 [J]. 应用海洋学学报, 2015, 34(4): 549-553.
- [12] 周涛,张继挺,王国良. 香鱼假单胞菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(1): 36-39.
- [13] 章霞,柳敏海. 大黄鱼内脏白点病的诊断与防治 [J]. 科学养鱼, 2015(7): 62.
- [14] MULET M, BENNASAR A, LALUCAT J, et al. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples [J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23(3-4): 140-147.
- [15] NISHIMORI E, KITA-TSUKAMOTO K, WAKABAYASHI H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(1): 83-89.
- [16] YAMAMOTO S, KASAI H, ARNOLD D L, et al. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes [J]. Microbiology, 2000, 146(10): 2385-2394.
- [17] DEBES P V, GROSS R, VASEMÄGI A. Quantitative genetic variation in, and environmental effects on, pathogen resistance and temperature-dependent disease severity in a wild trout [J]. The American Naturalist, 2017, 190(2): 244-265.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)