

# 北黄海菲律宾蛤仔帕金森流行病害的研究\*

梁玉波 张喜昌 王立俊 杨波 张映 蔡春雷

(国家海洋局海洋环境保护研究所 大连 116023)

**提要** 2000 年 7—11 月,对我国北黄海沿岸滩涂增殖的菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* 大规模死亡进行了研究,并对病害暴发与温度、盐度的相关性进行了探讨。利用 FTM 培养和组织切片方法对病害流行海域的菲律宾蛤仔进行了检测。结果表明,蛤仔体内寄生了大量病原帕金森 *Perkinsus* sp., 感染率为 20%—100%, 感染强度为 3—3 565 936 cell/ind 或 2—1 670 615 cell/g 组织。感染强度与蛤仔大小有关,个体越小,感染程度越轻。经感染试验,进一步确定了帕金森大量繁殖是引起蛤仔大规模死亡的原因。病害始于 7 月下旬,止于 10 月下旬;最初暴发于庄河栗子房海域,尔后逐渐向东西两侧海域蔓延。病害暴发时机主要受温度影响,高于 20℃ 易于暴发帕金森病害;流行范围主要受盐度影响,盐度为 20—32 海域适宜帕金森病害的流行。

**关键词** 菲律宾蛤仔, 帕金森, 病害

**中图分类号** S944.4

目前我国北黄海沿岸滩涂菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* 增殖是当地海洋经济支柱产业之一。但从 2000 年 7 月中旬起,该沿岸庄河栗子房海域滩涂菲律宾蛤仔发生了大规模死亡,并且逐渐向两侧沿岸海域扩大;到 10 月下旬向东北蔓延至丹东市东港海域,向西南蔓延至大连市石城岛海域,病害总面积约 10 000ha(图 1),直接经济损失估计为 3 亿元人民币。就菲律宾蛤仔死亡状况比较而言,个体大的比个体小的死亡严重;潮下带的比潮上带的死亡严重;养殖密度大的海域比养殖密度小的死亡严重。在死亡之前,大部分菲律宾蛤仔爬到滩面,贝壳张开而死。

迄今国外已报道过共有 4 种帕金森对海产贝类可造成危害,其中 *Perkinsus marinus* 是美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* 最典型的病原生物(Mackin *et al.*, 1950; Ray, 1954; Andrews, 1955; Perkins, 1969; Levine, 1978)。此外, *P. atlanticus* 寄生于葡萄牙蛤 *Ruditapes decussates* 和菲律宾蛤仔 *R. philippinarum* 体内(Azevedo *et al.*, 1990); *P. olseni* 寄生于澳洲黑唇鲍 *Haliotis ruber* 体内(Lester *et al.*, 1981); *P. qugwadi* 则寄生于虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 体内(Blackbourn *et al.*, 1998)。帕金森是种寄生于贝类体内的单细胞原动物,可通过海水和其他动物(如螺和蟹等)传播(Mackin, 1962; White *et al.*, 1988; Dungan *et al.*, 1993)。当帕金森寄生于贝类体内以不游动的营养孢子存在时,直径为 2—10 $\mu$ m

\* 国家自然科学基金资助项目,30070124 号;国家重点基础发展规划研究项目,G1999012000 号;国家海洋局青年基金资助项目,99601 号;中国科学院实验海洋生物学开放实验室资助项目,001217G 号;大连市科委资助项目,97-11 号。梁玉波,男,出生于 1962 年 9 月,副研究员,E-mail:ybliang@nmemc.gov.cn

收稿日期:2000-10-26 收修改稿日期:2001-05-13

(Perkins, 1969, 1996); 当从寄主体内转移到厌氧条件的巯基醋酸盐中培养几天之后, 圆形的休眠孢子直径为 20—200 $\mu\text{m}$ , 而大多数个体直径为 30—80 $\mu\text{m}$ (Perkins, 1996); 当休眠孢子接种到海水中后, 形成多细胞的游动孢子囊, 双鞭毛的游动孢子就从孢子囊中释放出来, 去感染寄主; 游动孢子在寄主体内失去鞭毛后, 又形成了营养孢子。据此, Ray (1954, 1966) 建立了液体巯基醋酸盐培养基(Fluid Thioglycollate Medium, FTM) 检测帕金虫方法。在该培养基中, 帕金虫营养孢子变成了休眠孢子, 休眠孢子只能生长, 不能繁殖, 因而可定量地检测贝类体内帕金虫。许多研究业已表明, 帕金虫能在贝类群体中广泛传播, 被感染的贝类不能正常生长发育, 并常导致大规模死亡(Chagot *et al*, 1987; Comps *et al*, 1987; Bower *et al*, 1998; Navas *et al*, 1992; Choi *et al*, 1989; Wilson *et al*, 1990; Powell *et al*, 1996)。Choi 等(1997) 和 Park 等(1999) 曾较系统地研究了与我国毗邻的韩国沿岸水域菲律宾蛤仔帕金虫病害。鉴于上述贝类帕金虫病害的研究成果, 对 2000 年我国北黄海沿岸滩涂大规模死亡的菲律宾蛤仔, 进行了帕金虫病害的研究, 以便确定其死亡与帕金虫危害的相关性。在我国, 到目前为止尚未见到有关贝类帕金虫病害的研究报道(吴信忠等, 1999)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品的采集

2000 年 10 月 14—22 日, 分别在我国北黄海沿海的东港、北井子、栗子房、石城岛、城子坦、凌水桥海域采集菲律宾蛤仔样品 50 多个, 另外还有来自朝鲜大和岛的样品, 一并带回实验室进行帕金虫检测(图 1 和表 1)。此后于 11 月 11—17 日, 又分别对东港、石城岛、凌水桥海域菲律宾蛤仔进行了帕金虫检测。

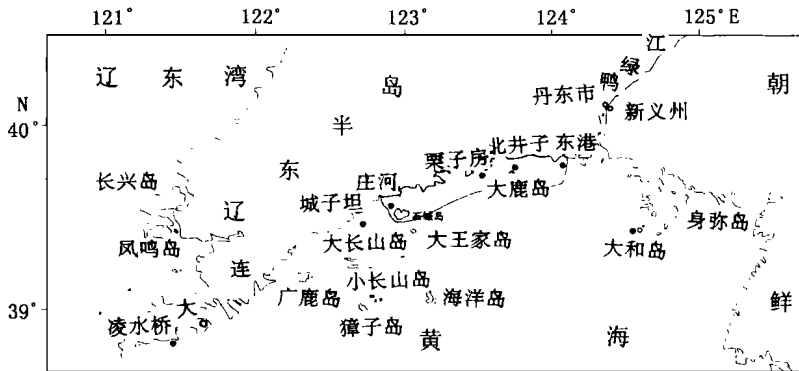


图 1 菲律宾蛤仔样品采集站位和病害流行区域

Fig. 1 Location of field sampling sites and the disease occurrence area of *R. philippinarum*

### 1.2 液体巯基醋酸盐培养基的配制

FTM 是美洲牡蛎和葡萄牙蛤及鲍帕金虫检测的标准程序。为培养休眠孢子, 先配制液体巯基醋酸盐培养基(FTM)。其方法为将 20g NaCl 和 30g 巯基醋酸盐放入 1L 蒸馏水中, 边加热边搅拌, 直到变成金黄色透明液为止, 冷却后分装于 15ml 的培养试管中, 每管装 10ml, 尔后高压灭菌, 黑暗保存备用。为抑制 FTM 中细菌, 加入一定量混合抗菌素。其

表 1 菲律宾蛤仔帕金虫病害现场调查站位和检测方法

Tab. 1 Field sampling sites and analytical methods for the *Perkinsus* disease of *R. philippinarum*

时间(年.月.日)	地点	位置	检测方法
2000. 10. 22	大和岛	39°27'09"N, 124°36'46"E	FTM
2000. 10. 22	东 港	39°48'26"N, 124°02'27"E	FTM
2000. 11. 11	东 港	39°48'26"N, 124°02'27"E	FTM
2000. 10. 22	北井子	39°47'49"N, 123°43'09"E	FTM
2000. 10. 22	栗子房	39°45'05"N, 123°29'45"E	FTM
2000. 10. 14	石城岛	39°35'17"N, 122°53'13"E	FTM 和组织切片
2000. 11. 15	石城岛	39°35'17"N, 122°53'13"E	FTM 和组织切片
2000. 10. 14	城子坦	39°29'16"N, 122°41'45"E	FTM
2000. 10. 14	凌水桥	38°56'26"N, 121°25'26"E	FTM
2000. 11. 17	凌水桥	38°56'26"N, 121°25'26"E	FTM

配制方法为 5ml 蒸馏水溶解 1g 氯霉素, 10ml 无菌蒸馏水溶解  $5 \times 10^5$  单位制霉菌素, 尔后将每 2.5ml 氯霉素加到溶解的制霉菌素瓶中, 使用时每 10ml FTM 加入 50 $\mu$ L 混合抗菌素 (Ray, 1966; Wilson-Ormond *et al.*, 1993)。

对菲律宾蛤仔测量大小和称重后, 研磨软体部, 每个试管中放入研磨液 5g, 室温黑暗培养。同时, 取菲律宾蛤仔鳃部放入 50ml FTM 中培养, 用于观察鳃组织中帕金虫。

### 1.3 帕金虫的定量检测

FTM 培养 1 周左右, 卢哥氏 (Lugol's iodine) 染色, 2000rpm 离心 10min, 帕金虫孢子沉淀于离心管底部; 倒掉上清液, 加入 30ml 2mol/L NaOH, 恒温 50 $^{\circ}$ C, 消化 30min, 再加入 0.15mol/L 盐水, 2000rpm 离心 10min, 重复这一过程 2—4 次。然后, 镜下观察帕金虫休眠孢子体呈蓝黑色。为了观察到帕金虫营养孢子在组织中的存在, 用波恩氏液固定, 石蜡切片 5 $\mu$ m, 苏木精曙红染色, 显微镜观察。

### 1.4 感染试验

分别取病害严重的石城岛和病害较轻的城子坦海域菲律宾蛤仔 5kg, 取其软体部全部研磨, 沉淀 2h 后, 用 FTM 方法对上清液帕金虫定量检测。检测结果是石城岛菲律宾蛤仔群体软体部上清液帕金虫含量为 469 796 个/ml, 城子坦为 24 个/ml。实验温度为 24 $^{\circ}$ C, 设 2 个试验组共 20 个试验缸, 每组设有平行和空白对照实验缸。每个试验缸水体为 10L, 内盛 40 个菲律宾蛤仔。受试菲律宾蛤仔来自渤海营口海域, 个体平均大小为 3.13cm (2.18—4.05cm), 经随机抽样, FTM 方法检测, 体内没有帕金虫存在。试验缸分别投喂以上两种上清液 100ml、200ml, 分别注射 0.02ml、0.1ml; 每日换水 1/2, 并投喂 100ml 三角褐指藻, 及时检出死亡个体, 试验结束时检测存活个体体内帕金虫密度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 帕金虫的形态与结构

用 FTM 方法, 在所采集的 7 个站位 9 批菲律宾蛤仔样品中, 均检测到了帕金虫存在。室温条件下, 经过 7d FTM 培养, 帕金虫休眠孢子呈卵圆形, 个体大小为 10—60 $\mu$ m (图 2a),

与 *P. marinus* 个体大小基本一致(Perkins, 1996)。通过各组织器官 FTM 培养和组织切片发现, 帕金虫在菲律宾蛤仔体内分布不均。在鳃、外套膜、性腺和消化腺中数量较高, 而在足和吸水管中很少。通过鳃组织培养和染色, 可观察到鳃表皮寄生大量蓝黑色的帕金虫(图 2b), 与 Choi 等(1997) 研究韩国海域菲律宾蛤仔帕金虫病害时观察到的结果完全一致。

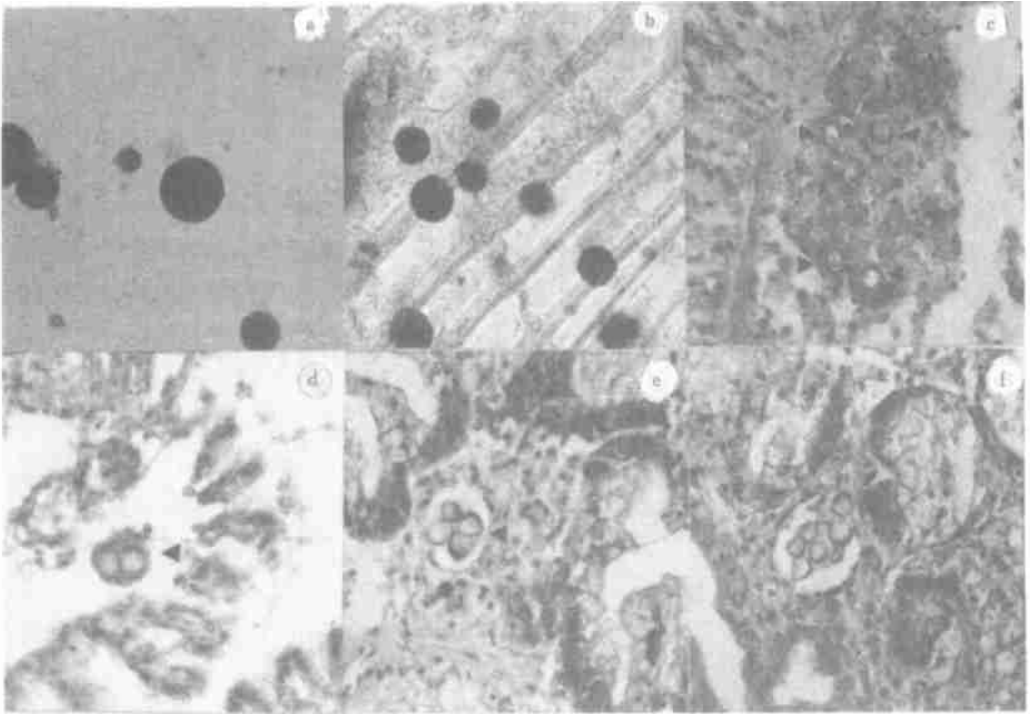


图 2 菲律宾蛤仔病原帕金虫形态与结构

Fig. 2 The shape and structure of the pathogen *Perkinsus* sp in *R. philippinarum*

a. FTM 培养的帕金虫休眠孢子; b. FTM 培养的鳃组织上的帕金虫休眠孢子; c. 鳃组织上单细胞营养孢子; d. 鳃组织上 2 细胞营养孢子; e. 消化腺组织上 4 细胞营养孢子; f. 消化腺组织上 8 细胞营养孢子  
a. *Perkinsus* hyphospores cultured in FTM; b. *Perkinsus* hyphospores in gill cultured in FTM; c. One- cell trophozoites in the gill tissue; d. Two- cell trophozoites in the gill tissue; e. Four- cell trophozoites in the digestive gland tissue; f. Eight- cell trophozoites in the digestive gland tissue

在石城岛菲律宾蛤仔组织切片中, 观察到了菲律宾蛤仔体内的帕金虫, 具有大空泡的单孢子体, 直径为 2—10 $\mu$ m(图 2c); 有 2、4、8 个营养孢子的囊体(Tomont)(图 2d、e、f), 与 *P. marinus* 所具有的空泡结构和体内生活孢子囊时期(Perkins, 1996) 完全一致。

## 2.2 帕金虫的感染强度

从图 1 和表 2 可以看出, 10 月份调查时, 病害高峰期已过的北井子和栗子房海域的菲律宾蛤仔被帕金虫感染率较低, 分别为 20% 和 80%, 且体内帕金虫数量较少, 没有发现死亡个体。但据当地养殖户反映, 该海域 7 月份菲律宾蛤仔死亡十分严重, 达 90%—100%。产生这种现象的原因, 除了在病害高发期, 该海域大规格的菲律宾蛤仔大多死亡, 剩余的小个体被感染的程度较低以外, 还可能由于大批量菲律宾蛤仔的死亡, 降低了滩涂养殖菲

表 2 帕金虫对菲律宾蛤仔的感染程度

Tab.2 The intensity of *Perkinsus* sp infecting the Manila clam *R. philippinarum*

时 间 (年.月.日)	地 点	样 品 个 数	壳 长 ± STD(cm)	组 织 湿 重 ± STD(g)	软 体 部 干 重/壳 干 重	感 染 率 (%) <sup>1)</sup>	孢 子 数 量 ± STD(ceil/ind)	孢 子 数 量 ± STD(ceil/g 组织)	采 样 时 死 亡 率 (%) <sup>2)</sup>	累 计 死 亡 率 (%) <sup>3)</sup>
2000.10.22	大和岛	5	4.51 ± 1.22	5.12 ± 4.23	0.07049	80	1,103,048 ± 1,530,357	371,528 ± 50,8049	—	—
2000.10.22	东 沟	5	3.68 ± 0.81	2.11 ± 0.93	0.04770	80	24,695 ± 541,629	76,988 ± 166,108	30—50	30—50
2000.11.11	东 沟	30	2.57 ± 1.06	1.21 ± 1.16	0.07640	70	40,750 ± 182,599	13,178 ± 59,726	0	30—50
2000.10.22	北井子	5	3.80 ± 0.66	2.56 ± 1.12	0.07914	80	3,279 ± 7,204	1,041 ± 2,251	0	90—100
2000.10.22	栗子房	5	2.48 ± 0.50	1.27 ± 0.84	0.10080	20	3 ± 6	2 ± 4	0	90—100
2000.10.14	石城岛	13	3.68 ± 0.32	4.77 ± 1.56	0.06550	100	3,565,936 ± 3,134,070	83,4075 ± 75,005	90—100	90—100
2000.11.15	石城岛	20	3.26 ± 0.53	1.88 ± 0.73	0.07420	100	3,471,655 ± 4,391,732	1,670,615 ± 2,271,883	0	90—100
2000.10.14	城子坦	5	3.06 ± 0.32	3.04 ± 0.98	0.0870	40	90 ± 184	24 ± 44	0	0
2000.10.14	凌水桥	5	3.19 ± 0.32	3.52 ± 1.61	0.09120	80	38 ± 31	14 ± 10	0	0
2000.11.17	凌水桥	30	3.09 ± 0.70	1.79 ± 1.03	0.08935	20	7 ± 18	2 ± 5	0	0

注:STD 为标准差;1) 感染率为样品中感染个体百分比;2) 采样时死亡率率为样品采集时当地群体中死亡个体百分比;3) 累计死亡率率为病害暴发群体中死亡个体百分比。

律宾蛤仔密度, 减少了相互传染的几率; 同时, 能生存下来的个体也可能产生一定的抗病力。

10月份调查时, 病害较重的石城岛和东港海域菲律宾蛤仔帕金虫感染率较高, 体内帕金虫数量较高, 其中, 石城岛海域菲律宾蛤仔体内帕金虫平均数量为 3 565 936cell/ind, 死亡最为严重, 高达 90%—100%; 东港海域菲律宾蛤仔体内帕金虫平均数量为 24 695cell/ind, 死亡率为 30%—50%。来自朝鲜大和岛海域的菲律宾蛤仔帕金虫感染率达 80%, 体内帕金虫数量为 1 103 048cell/ind, 感染率和体内帕金虫数量在石城岛和东港之间。城子坦和凌水桥海域菲律宾蛤仔受到轻微感染, 体内帕金虫的数量较少, 未发现死亡现象。据统计(表 2), 体内帕金虫含量较高的菲律宾蛤仔群体, 其软体部干重与壳重之比, 都低于 0.080 0, 明显低于体内帕金虫数量低的群体。这表明体内帕金虫数量多的菲律宾蛤仔, 其软体部比较瘦弱。

### 2.3 帕金虫的感染强度与个体大小的关系

在东港菲律宾蛤仔群体中, 个体大小与体内帕金虫数量呈明显的相关性( $R = 0.696$ ,  $N = 20$ ,  $P < 0.01$ )。在石城岛群体中, 相对而言, 规格大的个体, 体内帕金虫密度大; 规格小的个体, 帕金虫密度就小(表 3)。在病害流行海域, 个体小的栗子房群体, 体内帕金虫密度明显低于其他群体(表 2); 并且还发现, 小于 2cm 的菲律宾蛤仔个体几乎未被帕金虫感染。上述帕金虫的感染强度和个体大小的关系与韩国海域菲律宾蛤仔帕金虫病害

表 3 菲律宾蛤仔个体大小与帕金虫感染强度的关系

Tab. 3 The correlation between *R. philippinarum* size and *Perkinsus* sp. infection intensity

序号	2000年11月11日东港群体			2000年11月15日石城岛群体		
	壳长(cm)	软体部重(g)	孢子数/个体	壳长(cm)	软体部重(g)	孢子数/个体
1	5.04	4.2	131911	4.33	3.05	2065430
2	4.28	2.66	84300	3.92	3.17	13232422
3	3.8	2.35	918	3.79	2.50	4975586
4	3.77	2.59	0	3.67	2.37	6474609
5	3.56	2.14	30	3.64	2.73	2289
6	3.24	1.70	1262	3.58	2.3	84210
7	2.73	1.23	303	3.55	2.22	9750976
8	2.44	0.77	53	3.41	1.76	3388672
9	2.28	0.74	120	3.36	1.44	308
10	2.04	0.50	116	3.35	2.35	2451172
11	1.95	0.48	19	3.22	2.29	8149414
12	1.94	0.41	0	3.21	0.93	294
13	1.91	0.43	291	3.13	1.98	28
14	1.89	0.48	0	3.06	1.46	192
15	1.83	0.33	14	3.04	1.42	1362305
16	1.73	0.31	9	2.95	1.14	30
17	1.61	0.29	38	2.92	1.60	5034180
18	1.56	0.25	32	2.89	1.42	12460938
19	1.36	0.16	9	2.19	0.75	17
20	1.18	0.11	0	2.14	0.63	20

的研究结果是一致的(Choi *et al.*, 1997), 并且和美洲牡蛎帕金虫病害的研究结果也是一致的。Ray(1966)、Andrews 等(1955)报道过个体大的美洲牡蛎比小的易于感染帕金虫, 但帕金虫对葡萄牙蛤和黑唇鲍的感染, 尚未见到类似的报道。

## 2.4 感染试验

由表 4 可以看出, 就同类实验液而言, 注射了 0.1ml 各试验缸的菲律宾蛤仔死亡和感染率, 明显比注射 0.02ml 和空白试验液的高; 注射了石城岛菲律宾蛤仔软体部研磨上清液的各试验缸, 其菲律宾蛤仔的死亡和感染率明显比注射了城子坦菲律宾蛤仔软体部研磨上清液和空白试验液的高。由此可知, 帕金虫能对菲律宾蛤仔感染, 而菲律宾蛤仔被感染和死亡程度与注射液帕金虫数量有关。此结果与 *P. marinus* 对美洲牡蛎的感染试验结果是一致的(Chu, 1996)。

表 4 帕金虫感染菲律宾蛤仔试验结果

Tab.4 Experimental results of *Perkinsus* infecting the clam *R. philippinarum*

项 目	试验用 上清液 种 类	试验用 上清液 数量 ml	投喂帕 金虫数 量(个)	累计死亡率(%)					存活个体中帕金虫	
				1d	5d	10d	15d	20d	感染率 (%)	含量(个) /个体
注射感染试验	石城岛	0.1	$4.7 \times 10^4$	57.5	70	70	72.5	80	100	122.0
	城子坦	0.1	$2.4 \times 10^0$	42.5	47.5	50	50	50	40	7.4
	石城岛	0.02	$9.4 \times 10^3$	32.5	50	57.5	70	72.5	60	105.2
	城子坦	0.02	$4.8 \times 10^{-1}$	5	7.5	7.5	12.5	15.5	0	0.0
	空白	0	0	0	0	0	0	5	0	0.0
投喂感染试验	石城岛	200	$9.4 \times 10^7$	0	90	100				
	城子坦	200	$4.8 \times 10^3$	5	100					
	石城岛	100	$5.7 \times 10^7$	0	5	10	20	82.5	80	70.6
	城子坦	100	$2.4 \times 10^3$	2.5	32.5	32.5	42.5	47.5	60	22.0
	空白	0	0	0	0	0	0	5	0	0.0

投喂与注射感染试验结果基本一致(表 4), 但投喂帕金虫数量多的各试验缸, 在试验前期死亡率低, 到后期死亡和感染率高, 存活的个体中帕金虫数量多。这是因为帕金虫数量少的城子坦菲律宾蛤仔软体部研磨上清液, 呈粘稠状, 有机质含量高; 而帕金虫数量多的石城岛菲律宾蛤仔软体部研磨上清液, 呈水溶状, 有机质含量低。因而在试验前期, 投喂帕金虫数量少、有机物质高的城子坦菲律宾蛤仔软体部研磨上清液的实验缸, 水质易于变坏, 受试菲律宾蛤仔死亡率高; 随着每日换水, 各实验缸水质逐渐得到了改善, 到试验后期, 有机污染的危害逐渐降低, 帕金虫的危害逐渐表现了出来, 投喂帕金虫数量多、有机质低的石城岛菲律宾蛤仔软体部研磨上清液试验缸的菲律宾蛤仔感染和死亡率升高。

## 2.5 病害暴发与环境因子的关系

病害是在 7 月份开始的, 当时该海域水温超过 20℃; 到 8 月份水温最高, 病害最严重; 到 10 月下旬, 水温降至 20℃以下而病害停止, 这表明帕金虫病害的发生与温度可能有一定的关系, 并影响着病害暴发与停止的时机。病害发生最早最严重的栗子房海域, 盐度为 28 左右, 这可能是帕金虫最适宜繁殖的盐度范围; 病害停止于东侧东港海域盐度为 20 左

右, 西侧石城岛海域为 32, 表明低于 20 和高于 32 的盐度范围, 帕金虫可能不宜繁殖, 也说明菲律宾蛤仔帕金虫病害与盐度有关, 并影响着病害的流行范围。P. marinus 导致美洲牡蛎病害发生的适宜温度为 18—20℃, 适宜盐度为 15—30(Powell *et al.*, 1996; Soniat, 1996)。北黄海沿岸滩涂菲律宾蛤仔与美洲牡蛎帕金虫病害发生的适宜温度盐度范围基本一致。

帕金虫病害的流行与环境污染有一定的相关性(Chu *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1999), 北黄海沿岸海域重金属污染比较严重(冯志权等, 2000; 赵一阳等, 1983; 陆赛英等, 1984), 因此, 该海域菲律宾蛤仔帕金虫病害的暴发与环境污染也有关。

### 3 结论

通过 FTM 培养、组织切片和回感试验, 确定了帕金虫是导致北黄海菲律宾蛤仔大规模死亡的病原生物, 且病害流行程度与菲律宾蛤仔个体大小有关, 个体越大, 病害越严重; 根据病害暴发时间和海域, 并结合国外同类研究成果, 确定了温度和盐度是病害暴发的重要生态条件。

致谢 本研究承蒙加拿大纳奈莫太平洋生物站 Susan M Bower 博士、美国新泽西州大学 Haskin 贝类实验室 Susan E Ford 和 Eric N Powell 教授、韩国国立济州大学 Kwang-Sik Choi 博士的帮助和指导, 谨致谢忱。

### 参 考 文 献

- 冯志权, 马明辉, 关春江等, 2000. 长江以北毛蚶体内 Hg、Cd、Pb、As 残留量研究. 海洋环境科学, 19(2):50—53
- 吴信忠, 潘金培, 1999. 热带海洋珍珠贝类立克次氏体病研究—大珠母贝病原类立克次氏体包含体的组织及超微结构. 海洋与湖沼, 30(1): 73—80
- 陆赛英, 童钧安, 尹湘淳等, 1984. 黄海底质中某些环境组份的分布. 海洋与湖沼, 18(4): 371
- 赵一阳, 喻德科, 1983. 黄海沉积物地球化学分析. 海洋与湖沼, 14(5): 443—446
- Azevedo C, Corral L, Cachola R, 1990. Fine structure of zoospore in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). Parasitology, 100: 351—358
- Andrews J D, 1955. Notes on fungus parasites of bivalve mollusks. Proc Natl Shellfish Assoc, 45: 147—163
- Blackbourn J, Bower SM, Meyer G R, 1998. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Can J Zool, 76: 942—953
- Bower SM, Blackbourn J, Meyer G R, 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Can J Zool, 76: 954—959
- Chagot D, Comps M, Boulo V *et al.*, 1987. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. Aquaculture, 67: 260—261
- Choi K-S, Wilson A W, Lewis D H *et al.*, 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. J Shellfish Res, 8: 125—131
- Choi K-S, Park K-I, 1997. Report on occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. Korean J Aquacult, 10: 227—237
- Chu F-L E, Hale R C, 1994. Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Marine Environmental research, 38: 243—256
- Chu F-L E, 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. J Shellfish Res, 15: 57—66



- Comps M, Chagot D, 1987. Une parasitose nouvelle chez la palourde *Ruditapes decussatus* L. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris, 304: 41—44
- Dungan C F, Roberson B S, 1993. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. Dis Aquat Org, 15: 9—22
- Fisher W S, Oliver L M, Walker W W *et al*, 1999. Decreased resistance of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) to a protozoan pathogen (*Perkinsus marinus*) after sublethal exposure to tributyltin oxide. Marine Environmental Research, 47: 185—201
- Lester R J G, Davis G H G, 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. J Invertebr Pathol, 37: 181—187
- Levine N D, 1978. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplex. J Parasitol, 64: 549
- Mackin J G, 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinus* and other microorganisms in Louisiana. Publ Inst Mar Sci Univ Texas, 7: 132—229
- Mackin J G, Owen H M, Colloer A, 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science, 111: 328—329
- Navas J I, Castillo M C, Vera P *et al*, 1992. Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S. W. Spain). Aquaculture, 107: 193—199
- Levin N D, 1978. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. J Parasitol, 64(3): 549
- Park Kyung- Il, Kwang- Sik Choi, Jin- Woo Choi, 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. Found in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Komsoe Bay, Korea. J Korean Fish Soc, 32(3): 303—309
- Perkins F O, 1969. Ultrastructure of vegetative stages in *Labyrinthomyxa marinus* (= *Dermocystidium marinus*), a commercially significant oyster pathogen. J Invertebr Pathogen, 13: 199—222
- Perkins F O, 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on the taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. J Shellfish Res, 15: 67—87
- Powell E N, Klinck J M, Hofmann E, 1996. Modeling diseased oyster populations II. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. J Shellfish Res, 15(1): 141—165
- Ray S M, 1954. Experimental studies on the transmission and pathogenicity of *Dermocystidium marinum*, a fungus parasite of oyster. J Parasitol, 40: 235
- Ray S M, 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. Proc Natl Shellfish Assoc, 54: 55—69
- Soniati T M, 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oyster in the gulf of Mexico. J Shellfish Res, 15(1): 35—43
- White M E, Powell E N, Ray S M *et al*, 1988. Metabolic changes induced in oysters (*Crassostrea virginica*) by the parasitism of *Boonea impressa* (Gastropoda: Pyramidellidae). Comp Biochem Physiol, 90A(2): 279—290
- Wilson A W, Powell E N, Alison C M *et al*, 1990. The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf coast oysters: Its relationship with temperature, reproduction and pollutant body burden. Int Revue ges Hydrobiol, 75: 533—550
- Wilson- Ommond E A, Powell E N, Choi K- S *et al*, 1993. *Perkinsus marinus* assay. In: Lauerstein G G, Cantillo A Y ed. Comprehensive descriptions of complementary measurements. Sampling and analytical methods of the national status and trends program national benthic surveillance and mussel watch projects Vol II. NOAA technical memorandum NOS ORCA 71, II. 79—II. 84

## PREVALENCE OF *PERKINSUS* SP. IN THE MANILA CLAM *RUDITAPES PHILIPPINARUM* ALONG NORTHERN COAST OF YELLOW SEA IN CHINA

LIANG Yu- Bo, ZHANG Xi- Chang, WANG Li- Jun,

YANG Bo, ZHANG Ying, CAI Chun- Lei

(*Institute of Marine Environmental Protection, State Oceanic Administration, Dalian, 116023*)

**Abstract** Epizootic mortality of the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, has been investigated along the northern coast of the Yellow sea in China on July to October 2000, and the disease relativity to temperature and salinity also been discussed. *Perkinsus* sp. was detected in the Manila clams from seven sites along the coast. Ray's fluid thioglycollate medium (FTM) technique and Cho's 2mol/L NaOH digestion technique were used in detection and quantification of *Perkinsus* sp. Cross-sections of the clams were embedded in paraffin, sliced to 3 $\mu$ m, and stained with hematoxyline and eosine to observe the presence of trophozoites.

*Perkinsus* cells were found mostly in connective tissues of gills, mantle, gonad and digestive gland, they were rarely observed in foot and siphons. The trophozoites were often enclosed in amorphous granules. Among the infected clams, infection prevalence was within a range from 20% to 100%. Average infection intensity at each sampling site varied from 3 to 3 565 936 *Perkinsus* spores per-individual or 2 to 1 670 615 spores gram tissue. The clam's mortality was the highest in the Shichengdao because the *Perkinsus* cells in the individual was the most. A size-dependent *Perkinsus* sp. infection was found in the Manila clam collected from Donggang and Shichengdao, and the Manila clam's size was the least, the *Perkinsus* infection intensity was the most slight. The infecting experiment results indicated that the mortality of the Manila clam was quite relative to the *Perkinsus* infection intensity, and the *Perkinsus* sp. was further confirmed to be responsible to the Malina clam's mass mortality along the northern Yellow sea coast. Temperature and salinity were considered to be major environmental parameters limiting spatial distribution and the *Perkinsus* disease occurred time, temperature over 20°C and salinity between 20—32 were suitable for the disease breakout. This study firstly reports on the spatial distribution, the infection and infection intensity of *Perkinsus* sp. in mollusk in Chinese coastal water.

**Key word** *Ruditapes philippinarum*, *Perkinsus* sp., Disease