

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16173

舟山地区大棚凡纳滨对虾生长缓慢病因的调查分析

施慧¹, 许文军², 谢建军¹, 王庚申¹

1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增殖重点实验室, 浙江 舟山 316021;

2. 浙江海洋大学, 浙江 舟山 316021

摘要: 2013 年以来, 浙江省舟山地区大棚养殖的凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)普遍出现生长缓慢、养殖成功率低的现象。为了查明该原因, 本研究采用分子生物学和组织病理学等方法对引起对虾生长缓慢的病因开展了调查分析。结果显示, 采集的 270 份病虾样本中, 对虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) PCR 阳性检出率高达 85.19%, 传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)检出率为 0; 所有采集的病虾样本中也未分离到常见的致病菌; 54 份正常的对虾样本中 EHP 和 IHNV 均未检出。将病虾 PCR 扩增产物进行序列测定和比对分析, 结果获得的序列片段与 GenBank 中已有 EHP 相关序列相似性高达 99.55%; 病虾的肝胰腺组织病理切片观察显示, 在虾肝胰腺组织中可观察到处于各个生长发育阶段的 EHP。通过上述研究, 初步认为 EHP 是引起舟山地区大棚养殖对虾生长缓慢的一个重要病原。

关键词: 凡纳滨对虾; 生长缓慢症; 对虾肝肠胞虫; 组织病理学; 聚合酶链式反应

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0387-08

凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)俗称为南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*), 原产于美洲热带地区, 是当今世界上三大经济对虾种类之一。目前在中国凡纳滨对虾的养殖模式主要有精养、半精养、粗养(混养)等方式, 其中大棚精养模式因其养殖产量高、病害少、养殖成功率高等优点, 近年在舟山地区得到了迅速推广和发展, 目前已成为舟山市凡纳滨对虾的主要养殖模式^[1-2]。随着凡纳滨对虾养殖密度的提高, 大棚养殖凡纳滨对虾病害的发生越来越频繁, 已成为制约凡纳滨对虾健康养殖发展的重要影响因素, 其中生长缓慢是近年凡纳滨对虾大棚养殖从业者普遍反映的问题之一^[3-4]。根据已有相关报道, 有多种因素都被认为可以导致对虾养殖过程中的生长迟缓。斯烈钢等^[5]认为国内凡纳滨对虾引进种群后代的种质明显退化, 导致养殖对虾的生长性状指标降低, 使得部分养殖对虾的生长速度变慢, 养成周期延

长。张国新^[6]通过对不同养殖密度下凡纳滨对虾生长速度进行比对研究发现, 养殖密度对对虾生长有显著影响; 黄凯等^[7]经过研究, 认为饲料中钙、磷含量以及水体盐度可以对凡纳滨对虾质量增长率产生影响。除了上述这些非病原性因素, 传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)和对虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)被认为是目前能导致对虾生长迟缓的重要病原性因素^[8-9]。IHNV 是最早被发现可以导致虾生长迟缓的病原性因素^[10]; 2004 年, Chayaburakul 等^[11]在表现生长迟缓的斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内发现了 EHP, 此为 EHP 首次在世界上被发现, 此后在世界各地的对虾养殖中先后被报道, 该寄生虫具有非常强的传染性, 也引起了养殖业者的高度重视。

经过系统调查, 舟山市大棚养殖对虾近年来

收稿日期: 2016-06-28; 修订日期: 2016-08-02.

基金项目: 浙江省科技厅院所专项(2015F10001; 2015F30003; 2015F50004); 舟山市科技局公益类项目(2016C31057).

作者简介: 施慧(1978-), 女, 高级工程师, 硕士, 主要从事海水养殖病害研究. E-mail: huishi2002@126.com

通信作者: 许文军, 教授级高工. E-mail: xwenjun@sina.com

出现的“对虾生长迟缓”有共同的显著特征,即临床上对虾不会表现出明显的疾病症状,也不会出现大批死亡,而且摄食正常。但与同批次养殖的正常对虾相比,发病塘的对虾生长速度缓慢或停滞,有50%~60%的对虾体重停滞在4~5 g直至养殖周期结束。为了查明导致舟山地区大棚养殖凡纳滨对虾生长缓慢的原因,2015年5~9月,从舟山地区表现生长迟缓的对虾养殖场采集了270份样本,同时采集了54份同批次养殖生长正常的对虾作为对照。对采集的样本分别开展了细菌分离以及IHHNV和EHP的PCR检测,并对获得的PCR扩增产物进行了测序和序列分析,同时对典型病例样本进行了组织病理学分析。

1 材料与方法

1.1 材料来源

出现生长迟缓的5个凡纳滨对虾大棚养殖场分别位于舟山的岱山、六横、长白、小沙和台门,养殖场的盐度在24~26,养殖塘面积在0.13 hm²左右,虾苗(PL15)放养密度在270万~300万尾/hm²。虾苗分别购自海南、厦门、深圳等地。随机从5个大棚养殖场54个表现生长缓慢的养殖塘采集病虾样本,同时采集同批次养殖生长正常的对虾。每5尾对虾组成一份样本,每个养殖塘随机取5份样本,共计270份病虾样本和54份正常对虾样本。采集的所有对虾样本平均都在45~50日龄,病虾样本体长为(6±3.4) cm,体重为(7±3.5) g,采集同一养殖场同批次健康对虾塘中对虾,体长为(9±0.5) cm,体重为(8±1.1) g,将所有样本活体充氧运回实验室进行相关检测。

实验主要试剂:常规细菌培养基TSA和TCBS均购买自杭州微生物试剂有限公司,高保真Ex Taq DNA聚合酶、dNTPs、DL 2000 Marker、UNIQ-10柱式胶回收试剂盒购买自TaKaRa公司;组织DNA提取试剂盒购自Qiagen公司;其他均为国产分析纯试剂。

实验使用的主要仪器:Leica RM2235切片机、Nikon Eclipse 50i生物显微镜、Eppendorf 5424R台式冷冻离心机、Bio-Rad DNA Engine[®]多槽PCR仪、Bio-Rad GDXI型凝胶成像系统等。

1.2 细菌分离

取活虾样本,70%酒精棉球对虾体表进行消毒,无菌状态下,取适量对虾的肝胰腺组织,分别在常规细菌培养基TSA及弧菌专用培养基TCBS平板上划线分离细菌,27℃恒温培养48 h后观察培养基平板上细菌的生长情况。

1.3 PCR模板制备和PCR扩增

1.3.1 模板DNA制备 将对虾样本的肝胰腺组织碾碎,取20~50 mg肝胰腺组织的匀浆液,使用DNA抽提试剂盒(Qiagen公司),按说明书提取对虾总基因组DNA。

1.3.2 PCR扩增及核酸序列分析 根据Somjintana等^[12]的研究方法,设计了一对针对微孢子虫的核糖体小亚基(SSU rRNA)基因序列的引物:MF 5'-CCG GAG AGG GAG CCT GAG A-3'和MR 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA A-3'。运用该对引物对采集的对虾样本进行了微孢子虫的SSU rRNA的PCR扩增检测。PCR反应体系(25 μL)为:17.25 μL超纯水,2.5 μL的10× reaction buffer,2 μL dNTPs (2.5 mmol/L),2.5 μL模板DNA,每条引物(10 pmol/L)各0.25 μL,0.25 μL Taq酶。PCR反应参数为:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 50 s,共进行30个循环;最后72℃延伸10 min,10℃保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,观察结果、拍照,并使用UNIQ-10柱式胶回收试剂盒切胶回收进行序列测定。对测序获得的核酸序列运用DNAMAN软件进行比对、排序、拼接并辅以人工校正。运用NCBI在线软件Blast进行同源性搜索,并从GenBank中下载相关序列,使用MEGA 3.1分析软件,Kimura-2法计算遗传距离,采用Bootstrap(重复次数1000)检查聚类树各分支置信度,邻位归并法(neighbor joining, NJ)构建分子系统树,确定其种类。

根据获得的基因序列设计了一对新引物EHPF: 5'-GCC GCG GTA ATT CCA ACT-3'和EHPR: 5'-GGT AAG TTT TCC CGC GTT-3'; PCR扩增目的片段大小为413 bp; IHHNV检测采用OIE推荐的引物389F: 5'-CGG AAC ACA ACC CGA CTT TA-3'和389R: 5'-GGC CAA GAC CAA AAT ACG AA-3'^[13], PCR扩增产物是389 bp。运

用这两对引物对采集的 270 份病虾样本分别进行了 EHP 和 IHNV 的 PCR 检测, PCR 反应体系为: 17.25 μL 超纯水, 2.5 μL 的 10 $\times$ reaction buffer, 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2.5 μL 模板 DNA, 每条引物 (10 pmol/L) 各 0.25 μL , 0.25 μL Taq 酶; PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果、拍照。实验所用引物的合成以及 PCR 产物的测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 病理组织切片制备与观察

选择临床表现为典型生长缓慢症状的病虾, 分别取其肝胰腺、鳃、肌肉等组织固定于波恩氏液中, 24 h 后在 75% 乙醇溶液中更换数次, 最后保存于 75% 的乙醇溶液中。固定好的组织样本经后续乙醇及丙酮溶液脱水过程, 然后在二甲苯溶液中透明, 最后将组织样本浸蜡包埋后切片, 经苏木精-伊红染色法(H&E)染色, 中性树胶封片后普通光学显微镜下观察。

1.5 采样点同批次对虾养殖跟踪监测

对实验中采样塘进行了养殖跟踪监测, 记录最终捕捞收获时 5 g 左右小规格对虾占比。

2 结果与分析

2.1 临床症状

样本采集塘中对虾整体观察无明显临床症状, 也未有暴发性死亡发生, 养殖塘中的对虾规格参差不齐, 个体差异比较大。观察采集的发病对虾体表无粗糙或畸形, 肠道非常饱满, 有部分对虾

会出现空肠现象。现场观察发现, 发病对虾体色苍白但肌肉不呈白浊样, 甲壳薄, 身体柔软; 解剖发现多数对虾的肝胰腺组织略微萎缩发软, 颜色呈棕褐色(图 1)。

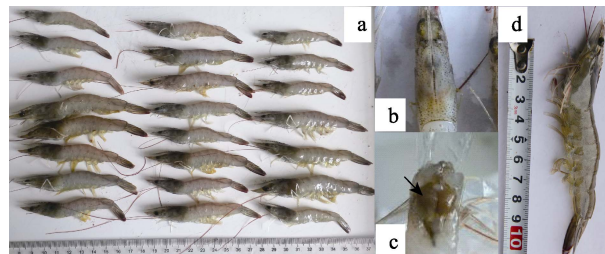


图 1 患病凡纳滨对虾临床症状

a. 患病对虾表现为生长缓慢, 个体大小不一; b. 病虾头部外观; c. 病虾肝胰腺呈棕褐色(箭头); d. 健康对虾。

Fig. 1 Clinical symptoms of diseased shrimp *Penaeus vannamei*
a. The diseased shrimp showed a reduced growth rate and partial emptiness in intestinal. b. Appearance of the diseased shrimp head; c. The hepatopancreatic tissue of diseased shrimp was yellow brown in colour (arrow); d. Normal shrimp.

2.2 病虾细菌分离结果

取病虾和健康虾肝胰腺组织接种常规的细菌培养基 TSA 以及弧菌专用培养基 TCBS, 恒温培养 48 h 后, 在病虾及健康对虾样本的肝胰腺组织中均分离到少量细菌, 但经生理生化鉴定未有常见的致病菌, 也未有明显的优势菌群出现。

2.3 EHP SSU rRNA 基因扩增及后期养殖跟踪监测结果

对虾样本的 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 在 750~1000 bp 处可见特异性单一条带。将获得的 10 份 PCR 扩增产物进行序列测定(图 2), 应用 DNAMAN 软件进行比对分析, 获得一

```
GATGTCAGCAGGCGCGAGATTGTCCACTCTTTTGAGAGGAGACAGTTATGAAACGTGAGTAGAAGGGTCGAGTGTA  
AAACCTTGACGTGAAGCAATTGGAGGGCAAGTTTTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAACCTCCAAGAGTGCTATG  
GTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCGTAGATGCAATTAAGGTGGTGTTAAAGCCATTGAGTTTGTGAGA  
GTAGCGGAACGATAGGGAGCATGGTATAGGTGGGCAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGACCAACGGAGGC  
GAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTAGAGTATCGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGT  
TCTAGCAGTAAACTATGCCGACAATGCTGGGTGTTGCGAGAGCGATGCTTGGTGTGGGAGAAATCTTAGTTTTCGGGCT  
CTGGGGATAGTACGCTCGCAAGGGTGAACCTTAAAGCGAAATTGACGGAAGGACACTACCAGGAGTGGAATTGTGCTG  
CTTAATTTAACTCAACGCGGGAACCTTACCAGGGTCAAGTCTATCGTAGATTGGAGACATGAGGTAGACAAGAGTGG  
TGCATGGCCGTTGGAATTTGATGGGGCGACTTTTAGCTTAAGTGCTGGAACCAAGTGAAGATCTTCTAGACAGGTGTTATT  
TAGGCACAGGAGGGAGAAGGCAATAACAGGTCCGTGATGCCCTTAGATATCCTGGGCAGCAAGCGCAATACAATATCT  
CTTGAGAAGACAAAGCAATTTGAGATGAGTAGGATTAGCTTTTGTAATAAGCTATGAATGAGGATTCCTAGTAACAGT  
GTCTCATCAAGGCATTGTGAATGTGTCCCTGTTCTTGACACGCGCCCGCACTC
```

图 2 患病凡纳滨对虾样本中 EHP SSU rRNA 基因序列

Fig. 2 SSU rRNA gene sequence of EHP in diseased shrimp *Penaeus vannamei*

个 912 bp 大小的基因片段——ZH2015。该序列经 BLAST 同源检索分析,与 Tangprasittipap 等^[14]之前报道的感染斑节对虾(*Penaeus monodon*)的 EHP 的基因序列(KF362130)同源性最高,达 99.55%;而与引起对虾微孢子虫病的 3 个微孢子虫属:微孢子虫(*Ameson*)、八孢虫(*Agmasoma*)、匹里虫(*Pleistophora*)相应序列的同源性分别为 56.85%、72.55%、63.26%^[15-18]。上述结果表明,所获得的序列确为拟测定的目标片段。从 GenBank 中下载来源于微孢子虫的相关序列,运用 DNAMAN 软件和 MEGA3.1 软件建立系统进化树(图 3)。从图 3 可以看到,获得的 ZH2015 序列先与 3 个已发表的 EHP 序列聚在一支,置信度达 99%,同源性达 98.3%,亲缘关系相近;然后 ZH2015 再与其他 *Enterocytozoon* 属的序列聚为一支。综合以上比对结果,可以初步判断获得的序列归属于 *Entero-*

cytozoon 属。

使用设计的特异性引物对采集的对虾样本进行 EHP PCR 检测, EHP 结果呈阳性的样本可扩增获得 453 bp 片段(图 4);在采集的 270 份对虾样本中, EHP 扩增呈阳性的有 230 份,占 85.19%;所有样本中未有检出 IHNV,采集的 54 份健康对虾样本中没有检出 IHNV 和 EHP(图 5)。后期养殖跟踪监测结果显示,检出 EHP 的采样点,同批次的对虾起捕时 5 g 左右的对虾占总量的 50%左右;未检出 EHP 的小沙采样点在降低养殖密度后,剩余对虾生长恢复正常,没有 5 g 左右的小规格对虾出现(表 1)。

2.4 组织病理学观察

将具有典型生长缓慢症状的对虾进行组织病理学分析,结果在鳃丝和肌肉组织中未见明显病理变化,但病虾的肝胰腺组织病变严重。组织病

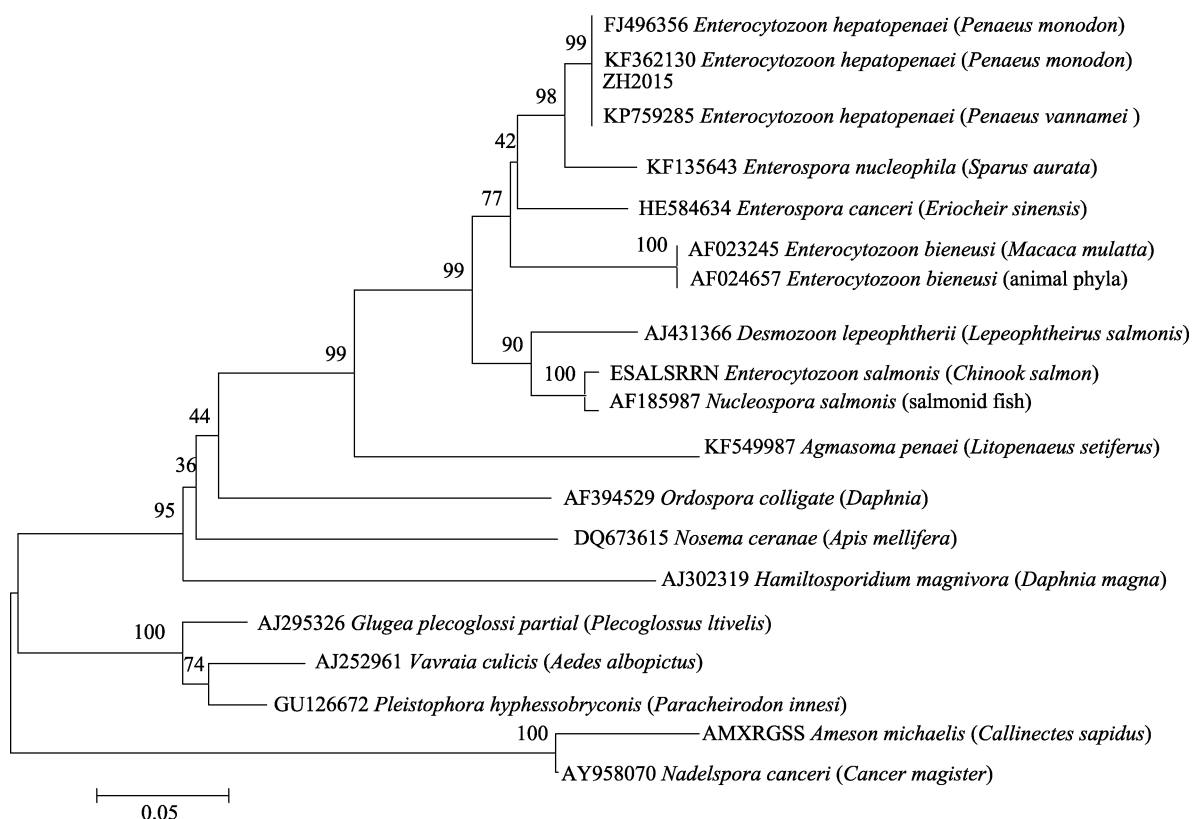


图 3 根据微孢子虫部分 SSU rRNA 基因序列构建的系统发育树

分子进化树构建采用邻位归并法,选择 Kimura-2 参数模型;分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度百分比;标尺长度表明代表每个位点发生 0.05 次置换。

Fig. 3 The phylogenetic tree of microsporidia based on partial SSU rRNA gene

The phylogenetic tree was generated by Neighbor-Joining method using 1000 bootstrap and Kimura-2 parameter model. The scale bar represents the average number of nucleotide substitutions per site.

表 1 凡纳滨对虾样品中 EHP 和 IHNV PCR 检测结果及小规格对虾占比
Tab. 1 Detection of EHP and IHNV in shrimp samples by PCR and percentage of small shrimp *Penaeus vannamei*

项目 item	养殖点 farm						合计 total
	岱山 Daishan	小沙 Xiaosha	长白 Changbai	登步 Dengbu	台门 Taimen		
养殖塘 number of ponds	15	8	16	9	6		54
病虾样本 diseased sample	75	40	80	43	27		270
健康虾样本 normal sample	15	8	16	9	6		54
EPH 检出数 number of EHP positive samples	70	0	9	43	27		230
IHNV 检出数 number of IHNV positive samples	0	0	0	0	0		0
小规格对虾占比/% small shrimp ratio	53	0	48	52	47		—

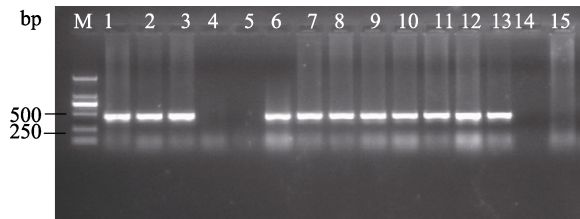


图 4 凡纳滨对虾样本 EHP PCR 检测结果
M. DL2000 分子量标准; 1~12. 采集的对虾样本 PCR 扩增产物; 13. EHP 阳性 DNA 样本的 PCR 扩增产物; 15. 健康对虾样本的 PCR 扩增产物。
Fig. 4 Detected results of the *Enterocytozoon hepatopenaei* infection of *Penaeus vannamei* samples by PCR
M. DL2000 DNA marker; Lane1–12. Genomic DNA purified from shrimp samples; Lane13. *Enterocytozoon hepatopenaei* positive control; Lane15. *Enterocytozoon hepatopenaei* negative control.

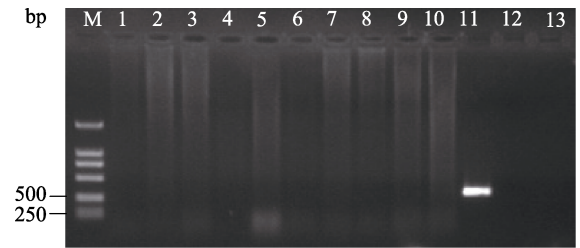


图 5 凡纳滨对虾样本 IHNV PCR 检测结果
M. DL2000 分子量标准; 1~10. 采集的对虾样本 PCR 扩增产物; 11. IHNV 阳性 DNA 样本的 PCR 扩增产物; 12. 健康对虾样本的 PCR 扩增产物; 13. 阴性对照。
Fig. 5 Detected the IHNV infection of *Penaeus vannamei* samples by PCR
M. DL2000 DNA marker; Lane1–10. Genomic DNA purified from shrimp samples; Lane11. IHNV positive control; Lane12. Genomic DNA purified from health shrimp; 13. Negative control.

理切片显示对虾肝胰腺腔体变小或消失, 细胞肿大, 膜结构模糊; 肝胰腺上皮细胞肿大、界线模糊, 细胞核坏死、消失, 部分肝胰腺上皮细胞出现局灶性坏死或脱落; 在病虾肝胰腺组织切片中可观察到 EHP 的孢子颗粒, 大小为 $(1.3\pm0.2)\mu\text{m}\times$

$(0.8\pm0.2)\mu\text{m}$, 部分肝胰腺上皮细胞的胞质内含有嗜酸性的粒状包涵体或合胞体。但在病虾的鳃和肌肉组织中未发现 EHP, 在所有组织中也均未发现其他种类的微孢子虫(图 6)。

3 讨论

IHNV 是 1981 年在发病的养殖细角滨对虾 (*Litopenaeus stylirostris*)体内发现的, 感染该病毒的对虾主要症状为生长缓慢, 同时还表现出额剑和触角弯曲、变形, 甲壳粗糙无光泽或缺损等一系列表皮畸形的临床症状^[10]。细角滨对虾感染 IHNV 会导致急性传染病和高死亡率, 但凡纳滨对虾感染 IHNV 只出现生长缓慢、表皮畸形的症状, 不会出现死亡现象^[19]。EHP 是 2004 年在泰国发生生长迟缓的斑节对虾肝胰腺组织中发现的, 该虫是一类新型的专性细胞内寄生的微孢子虫, 因其在斑节对虾中的表现得名。感染 EHP 的对虾主要表现为生长缓慢, 但与 IHNV 不同的是, EHP 感染对虾肝胰腺小管的上皮细胞, 感染对虾除了表现生长缓慢或停滞, 不会出现表皮畸形^[20]。在本次调查中, 采集的 270 份发病对虾样本均未发现表皮畸形的症状, 采用 PCR 方法检测病虾, 未有 IHNV 阳性样本检出, 所以排除了生长迟缓病虾感染 IHNV 的可能。采用通用的细菌培养基 TSA 以及弧菌专属培养基 TCBS 对病虾及健康虾的肝胰腺组织进行细菌分离, 结果对病虾和健康虾体内细菌的分离结果相似, 病虾体内未有明显的优势菌群出现, 肝胰腺的组织病理切片中也未观察到菌团, 基本可以排除细菌感染的可能。但病虾样本中 EHP 阳性检出率高达 85.19%, 且 PCR 扩增获得的基因序列与泰国学者已报道的

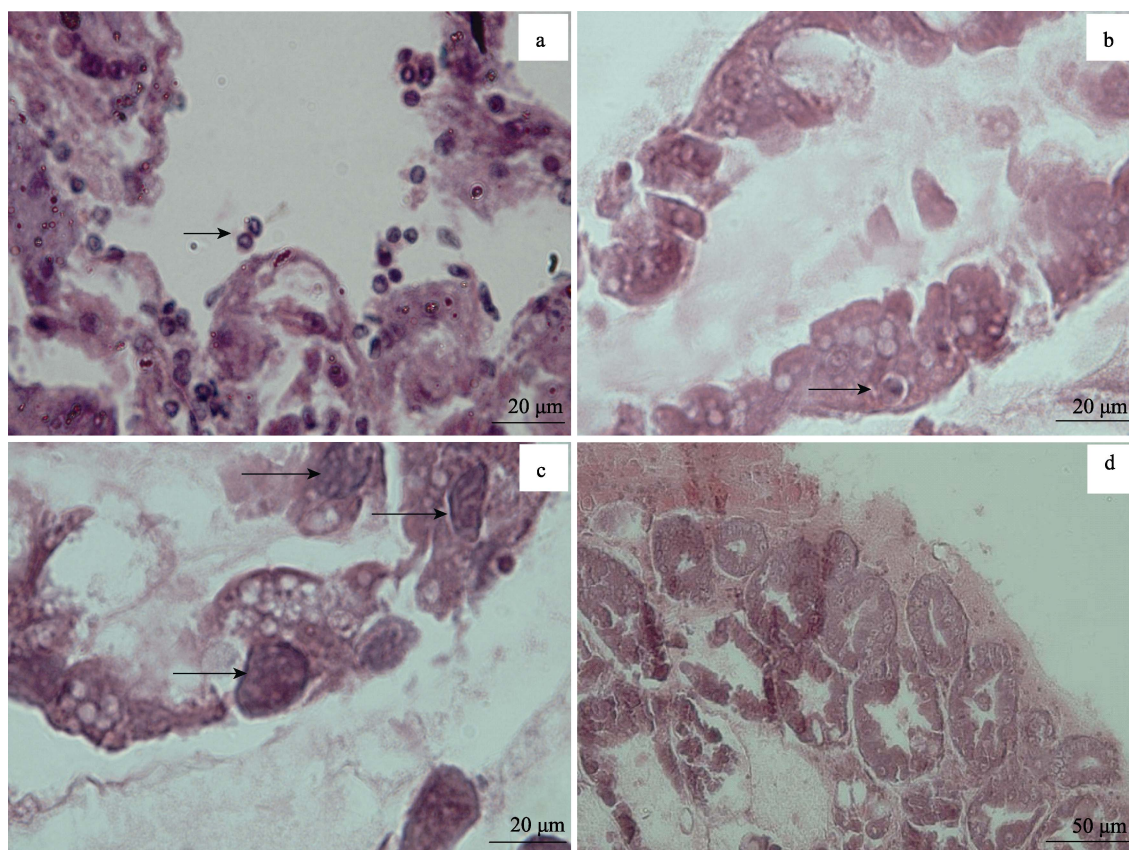


图 6 感染 EHP 凡纳滨对虾的组织病理分析

- a. 病虾肝胰腺小管的腔体间隙内可见深蓝染的成熟孢子[大小为 $(1.3\pm 0.2)\mu\text{m}\times(0.8\pm 0.2)\mu\text{m}$, 箭头所示]; b. 病虾的肝胰腺小管上皮细胞质中的嗜酸性粒状包涵体(箭头所示); c. 肝胰腺组织切片显示在小管上皮细胞质内早期和晚期的合胞体(箭头所示); d. 病虾肝胰腺病变, 腔体变小, 甚至腔体结构消失。

Fig. 6 Photomicrographs of *Enterocytozoon hepatopenaei* tubule epithelial cells of the hepatopancreas of *Penaeus vannamei*
a. A number of microsporidian spores [arrow, $(1.3\pm 0.2)\mu\text{m}\times(0.8\pm 0.2)\mu\text{m}$] free in the hepatopancreatic lumen. b. Granular inclusions in the cytoplasm of hepatopancreatic epithelial cells (arrow). c. In the hepatopancreatic tissue showing early and late plasmodia and mature spores in the cytoplasm of hepatopancreatic epithelial cells (arrows). d. The cavity of hepatopancreatic lumen is smaller; the epithelial cells are enlarged; the boundary is blurred; the nucleus is necrotic and disappeared.

EHP 相关基因序列同源性达到了 99.55%, 同时病虾组织病理切片中观察到处于不同生长阶段的 EHP, 与 Somjintana 等^[12]描述的 EHP 形态特征基本一致, 初步认为 EHP 是舟山地区大棚养殖凡纳滨对虾生长缓慢的重要病原之一。研究中后期, 对采样养殖点进行的跟踪监测调查统计结果显示, 发病塘捕获时体重在 5 g 左右的对虾占总量的 50% 左右, 而健康塘捕获虾中一般不会有 5 g 左右的对虾出现。未检出 EHP 的小沙养殖点之前在降低养殖密度后, 该采样塘的对虾生长速度马上得到恢复, 捕获时对虾规格均一, 平均体长达 14 cm; 而检出 EHP 的采样塘中的对虾捕获时, 对虾体长差异较大, 最小体长仅有 7 cm 左右。说明在凡纳滨对

虾养殖过程中可以通过采取改善养殖管理等措施来消除养殖密度等非病原性因素对对虾生长的影响。本研究未就健康对虾进行 EHP 的人工感染实验, EHP 与对虾生长迟缓之间的确切关系有待进一步研究。

微孢子虫是一种可以感染多种真核生物的专性细胞内寄生虫, 已发现的种类有 800 多种, 主要寄生于无脊椎动物和鱼类, 特别是昆虫。1994 年 Pasharawipas 等^[21-22]研究发现, 八孢虫可以感染南美白对虾和斑节对虾的肌肉和结缔组织, 受感染虾的肌肉会变白浊、不透明, 失去弹性, 故也称这类病虾为乳白虾或棉花虾; 2002 年, Canning 等^[23]报道单极虫也可以在褐对虾和南美白对虾

的肌肉组织中寄生,感染虾的整个肌肉和腹节出现了多发性病变,并最终导致对虾出现“棉花尾”症状。但在本研究中采集的病虾样本临床上未有肌肉发白的症状,组织病理切片也显示,除了在病虾的肝胰腺组织中可观察到微孢子虫外,其他组织中均未有发现。能寄生在对虾肝胰腺组织的微孢子虫除了 EHP 外, Felix 等^[24]曾报道 *Thelohanias* 属的微孢子虫也寄生于对虾的肝胰腺组织。一般寄生于水生动物体内的微孢子虫可形成肉眼可见的孢囊,制成水浸片后在普通光学显微镜下可观察到形状一致的孢子,临床上据此可以进行疾病确诊。而 EHP 比较特殊,它比一般的微孢子虫小,且不形成肉眼可见的孢囊,由于感染 EHP 的南美白对虾不会表现出特征性的临床症状,因此 EHP 的确诊需要依赖于实验室的 PCR 方法或组织病理学技术。目前不少的分子生物学方法被运用于 EHP 的检测, Tang 等^[25]建立了 EHP 的原位杂交方法,该方法可以特异性检出对虾组织、粪便以及养殖水体中的 EHP。Suebsing 等^[26]将 LAMP 方法运用于 EHP 的临床检测,研究表明该方法具有灵敏度高、操作简便等特点,非常适宜育苗场进行虾苗放养前的 EHP 的筛选检测。

目前还未在对虾养殖中观察到对虾感染 EHP 如同感染白斑综合征(white sport disease, WSV)那样导致对虾大量死亡的情况,但是 EHP 会导致虾生长迟缓,所以其给对虾养殖业带来的损失是不容忽视的,应引起高度关注。EHP 的生活史和传播途径以及对养殖对虾的危害程度还不十分清楚,而感染 EHP 的对虾缺乏可供判断的特征性临床病症,并且在感染早期很难发现对虾生长异常,只有借助于 PCR 等实验室检测手段才可以发现,同时也无针对该寄生虫的有效治疗措施,因此必须加强凡纳滨对虾幼体期和养殖过程中 EHP 的监测,以减少 EHP 可能造成的经济损失。

参考文献:

- [1] Zhang J, Yang X L. Study on multi-crop breeding technology of *Penaeus vannamei* in greenhouse in Zhoushan[J]. Rural Economy and Science Technology, 2012, 23(6): 84-86. [张杰, 杨秀来. 舟山南美白对虾大棚设施多茬养殖技术研究[J]. 农村经济与科技, 2012, 23(6): 84-86.]
- [2] Xu Z J. Three crop breeding technology of *Penaeus vannamei* in greenhouse[J]. Scientific Fish Farming, 2013(5): 29-30. [徐志进. 南美白对虾大棚三茬养殖技术[J]. 科学养鱼, 2013(5): 29-30.]
- [3] Li L. Studies of the effect of main factors on growth for *Litopenaeus vannamei* in greenhouse[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2015. [李亮. 主要理化因子对设施大棚养殖凡纳滨对虾生长影响研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2015.]
- [4] Hou C B. The cause and solution of the slow-growth in *Penaeus vannamei*[J]. Fishery Guide to be Rich, 2010(18): 32-33. [侯传宝. 南美白对虾放养后生长缓慢的原因及解决办法[J]. 渔业致富指南, 2010(18): 32-33.]
- [5] Si L G, Wang J P, Wu X F. Investigation of the germplasm and characteristic of SRF *Penaeus vannamei*[J]. Scientific Fish Farming, 2007(11): 5-6. [斯烈钢, 王建平, 吴雄飞. SPF 南美白对虾种质和苗种特性调查[J]. 科学养鱼, 2007(11): 5-6.]
- [6] Zhang G X. Effects of different stocking densities on the growth of *Penaeus vannamei*[J]. Hebei Fisheries, 2008(8): 12-16. [张国新. 不同养殖密度对南美白对虾生长的影响[J]. 河北渔业, 2008(8): 12-16.]
- [7] Huang K, Wang W, Lu J, et al. Effect of dietary calcium phosphorus and environmental salinity on growth of juvenile *Penaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 2004, 28(2): 21-26. [黄凯, 王武, 卢洁, 等. 饲料中钙、磷和水体盐度对南美白对虾幼虾生长的影响[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 21-26.]
- [8] Bai L R, Zhao Z Y. Research progress of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(14): 114-119. [白丽蓉, 赵志英. 对虾传染性皮下与造血组织坏死病毒(IHHNV)的研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(14): 114-119.]
- [9] Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford G D, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae) hepatopenaei sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships[J]. J Invert Pathol, 2009, 102(1): 21-29.
- [10] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. J Invertebr Pathol, 1983, 42(1): 62-70.
- [11] Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, et al. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand[J]. Dis Aquat Organ, 2004, 60(2): 89-96.
- [12] Somjintana T, Somjai W, Grant D S A, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships[J]. J Invertebr Pathol, 2009, 102(1): 21-29.
- [13] OIE (Office International des Epizooties). Manual of diagnostic tests for aquatic animal disease (5th edn)[M]. Paris: Office International des Epizooties, 2009: 383.
- [14] Tangprasittipap A, Srisala J, Choudee S, et al. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. BMC Vet Res, 2013, 139(9): 1-10.
- [15] Small H J, Meyer G R, Stentiford G D, et al. *Ameson metacarci* sp. nov. (Microsporidia) infecting the muscles of Dungeness crabs *Metacarcinus magister* from British Columbia, Canada[J]. Dis Aquat Organ, 2014, 110(3): 213-225.

- [16] Stentiford G D, Ross S H, Kerr R, et al. *Paradoxium irvingi* n.gen.sp. (Microsporidia) infecting the musculature of European pink shrimp *Pandalus montagui*[J]. J Invertebr Pathol, 2015, 130(9): 1–8.
- [17] Sokolova Y, Pelin A, Hawke J, et al. Morphology and phylogeny of *Agmasoma penaei* (Microsporidia) from the type host, *Litopenaeus setiferus*, and the type locality, Louisiana, USA[J]. Int J Parasitol, 2015, 45(1): 1–16.
- [18] Abdel-Ghaffar F, Bashtar A R, Mehlhorn H, et al. Ultra-structure, development, and host-parasite relationship of a new species of the genus *Pleistophora* a microsporidian parasite of the marine fish *Epinephelus chlorostignei*[J]. Parasitol Res, 2009, 106(1): 39–46.
- [19] Kalagayan H, Godin D, Kanna R, et al. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii[J]. J World Aquacult Soc, 1991, 22(4): 235–243.
- [20] Amornrat T, Jiraporn S, Saisunee C, et al. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in white leg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. BMC Vet Res, 2013, 9(1): 1–10.
- [21] Pasharawipas T, Flegel T W. A specific DNA probe to identify the intermediate host of a common microsporidian parasite of *Penaeus merguensis* and *P. monodon*[J]. Asian Fish Sci, 1994(7): 157–167.
- [22] Pasharawipas T, Flegel T W, Chaibaroj S, et al. Comparison of amplified RNA gene sequences from microsporidian parasites (*Agmasoma* or *Thelohania*) in *Penaeus merguensis* and *P. monodon*[J]. Asian Fish Sci, 1994, 7: 169–178.
- [23] Canning E U, Curry A, Overstreet R M. Ultra structure of *Tuzetia weidneri* sp. n. (Microsporidian parasite: Tuzetiidae) in skeletal muscle of *Litopenaeus setiferus* and *Farfantepenaeus aztecus* (Crustacea: Decapoda) and new data on *Perezia nelsoni* (Microsporidian parasite: Perezidae) in *L. setiferus* [J]. Acta Protozool, 2002, 41(3): 63–77.
- [24] Felix S S, Devaraj M. Epizootic disease outbreak in shrimp rearing ponds and its pathobiology[J]. Indian Vet J, 1996, 173(10): 1053–1056.
- [25] Tang K F, Pantoja C R, Redman R M, et al. Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp[J]. J Invertebr Pathol, 2015, 130(9): 37–41.
- [26] Suebsing R, Prombun P, Srisala J, et al. Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp[J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(5): 1254–1263.

Pathogenicity of *Penaeus vannamei* slow growth syndrome in intensively cultured penaeid shrimp in Zhoushan

SHI Hui¹, XU Wenjun², XIE Jianjun¹, WANG Gengshen¹

1. Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China;

2. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China

Abstract: Slow growth of farmed *Penaeus vannamei* has been reported throughout shrimp growing areas of Zhoushan since 2013, resulting in severe economic losses for high density *P. vannamei* farmers. Bacterial culture, histopathology, and polymerase chain reaction analyses were conducted to identify the pathogenicity of these slow growing, multiple infections. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), which are typical slow-growing pathogens, were analyzed by polymerase chain reaction in 270 *P. vannamei* samples collected from high-density, slow-growing Zhoushan shrimp in farm ponds. The results showed a high incidence of EHP (230/270, 85.19%), but no evidence of IHHNV infection. Bacteria were not consistently isolated from the diseased shrimp, and EHP and IHHNV were not detected in any normal appearing shrimp. A BLAST analysis of the sequenced product revealed 99.55% similarity with the matching region of small subunit rRNA from EHP (KF362130). Histopathological sections showed microsporidian spores only in the cytoplasm of hepatopancreatic tubule epithelial cells from diseased shrimp. Based on the ultra-structural features of the family *Enterocytozoonidae* and the cytoplasmic location of the plasmodia, the pathogen causing slow growth syndrome in Zhoushan was EHP. EHP is a microsporidian parasite that was first isolated and characterized from the giant or black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Although EHP does not appear to cause mortality, shrimp farmers have reported that it is associated with severely retarded growth in *P. vannamei* compared with their unaffected counterparts. No specific signs were observed in shrimp at the early stage of pathogenicity, which differs from the most common microsporidian reported previously from cotton shrimp. Further studies are required to understand the interaction between this host and pathogen.

Key words: *Penaeus vannamei*; slow growth syndrome; *Enterocytozoon hepatopenaei*; histopathology; polymerase chain reaction

Corresponding author: XU Wenjun. E-mail: xwenjun@sina.com