

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240319001

http://www.yyxxjz.cn/

苏兴琦, 傅强, 李旭鹏, 孔杰, 田吉腾, 曹宝祥, 刘宁, 栾生, 罗坤, 孟宪红. 凡纳对虾感染副溶血弧菌后 pVA1-like 质粒的组织分布及增殖特点. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 77–89

SU X Q, FU Q, LI X P, KONG J, TIAN J T, CAO B X, LIU N, LUAN S, LUO K, MENG X H. Tissue distribution and proliferation characteristics of pVA1-like plasmid after infection with *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 77–89

凡纳对虾感染副溶血弧菌后 pVA1-like 质粒 的组织分布及增殖特点*

苏兴琦^{1,2} 傅 强^{2,3} 李旭鹏^{2,3} 孔 杰^{2,3} 田吉腾^{2,3}
曹宝祥^{2,3} 刘 宁^{2,3} 栾 生^{2,3} 罗 坤^{2,3} 孟宪红^{2,3①}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物
产出过程功能实验室 山东 青岛 266237; 3. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要 对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)主要由副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)携带的 pVA1-like 质粒表达毒力蛋白 PirAB^{Vp} 所致。本研究通过 2 次定量口饲的感染方式对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)成虾进行弧菌胁迫, 研究相对低摄菌量实验组(L 组, 10⁵ CFU/尾)与相对高摄菌量实验组(H 组, 10⁷ CFU/尾)的个体 5 个不同时间点(感染后 3、6、9、24 和 48 h)的 9 种不同组织(鳃、胃、肠道、眼柄、肌肉、肝胰腺、第 5 游泳足、腹部神经和第 2 触角鞭)中弧菌分布及变化情况。通过毒力蛋白 PirA^{Vp} 的基因表达量反映副溶血弧菌携带的 pVA1-like 质粒量, 进而代表弧菌的分布及变化特点。结果显示, H 组和 L 组的总体死亡率无差异, 且均在 3~6 h 达到死亡高峰。2 个实验组中病原质粒在各组织中的拷贝数不同, 腹部神经与肠道组织平均质粒拷贝数均高于其他组织; 同一组织内 H 组比 L 组的质粒拷贝数高 1.9~4.9 倍。质粒变化相关性分析显示, 质粒拷贝数变化情况与对虾摄菌时间、死亡率无显著关系。同时 2 个实验组的质粒拷贝数变化特点也不同。L 组中, 有 6 个组织的质粒拷贝数随时间呈先上升后下降的趋势, 而在胃、肠和肝胰腺中随时间呈波动变化; H 组中, 有 7 个组织的质粒拷贝数随时间呈现波动变化, 但在胃和第 5 游泳足中随时间呈先上升后下降的趋势。第 2 触角鞭和第 5 游泳足在各取样时间段均可检测出 PirA^{Vp}, 可作为保种成虾活体常态病原检测的候选组织。本研究探究了商品规格种虾感染不同浓度 Vp_{AHPND} 后在体内不同组织的分布及扩增动态变化的特点, 可为 AHPND 精准抗性测试方案的制定和致病机理研究提供数据与理论依据, 也为保种期成虾准确的病原监测的候选组织提供参考。

关键词 凡纳对虾; 副溶血弧菌; PirA^{Vp}; 实时荧光定量 PCR; 组织分布

中图分类号 S945.1+2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)03-0077-13

* 国家自然科学基金(32172960)、国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)和中国水产科学研究院科技创新团队项目(2020TD26)共同资助。苏兴琦, Email: suxingqi1998@163.com

① 通信作者: 孟宪红, 研究员, Email: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-03-19, 收修改稿日期: 2024-04-17

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)俗名南美白对虾, 1988 年从美国夏威夷引入我国(张伟权, 1990), 1992 年, 其人工繁殖技术实现了突破, 随后, 其养殖在全国范围内得到推广。2022 年, 我国海水对虾养殖总产量达 153.18 万 t, 包括凡纳对虾、斑节对虾(*P. monodon*)、中国对虾(*P. chinensis*)和日本对虾(*P. japonicus*), 其中, 凡纳对虾产量为 134.03 万 t, 占海水养殖总产量的 87.50% (农业农村部渔业渔政管理局等, 2023)。近年来, 由于养殖规模的不断扩大, 养殖环境遭到破坏, 病害问题层出不穷, 已严重制约我国凡纳对虾养殖业的发展。其中, 急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是近年来造成灾难性经济损失的主要对虾疾病之一, 对世界对虾养殖业造成的经济损失估计高达 430 亿美元(Kumar *et al*, 2021)。

AHPND 最初被命名为对虾早期死亡综合征(early mortality syndrome, EMS)。已报道的可引起对虾 AHPND 的弧菌种类包括副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、欧文斯氏弧菌(*V. owensii*)和坎贝氏弧菌(*V. campbellii*)等(贾丹等, 2018)。目前, 普遍认为对虾 AHPND 是由致病性弧菌携带的 pVA1-like 质粒编码毒力蛋白 PirAB^{Vp} (PirA^{Vp} 和 PirB^{Vp})导致(Kumar *et al*, 2021; Lightner *et al*, 2012; Tran *et al*, 2013)。对虾患病后, 常表现出厌食、空肠空胃、肝胰腺肿大、质地松软等症状(Lee *et al*, 2015)。在对其基本病理研究中发现, Vp_{AHPND} 附着在对虾的胃中, 然后将致病的 PirAB^{Vp} 毒素分泌到肝胰腺(靶器官), 导致上皮细胞的分离和分解, 使其成为细菌复制的底物, 最终破坏肝胰腺的功能(Lai *et al*, 2015)。Soonthornchai 等(2015)对斑节对虾感染 Vp_{AHPND} 后的胃、中肠和后肠进行扫描电镜(SEM)检查, 发现 Vp_{AHPND} 可以通过口饲感染, 经过胃到达中肠部位附着、增殖并造成组织损伤。

探究病原感染宿主的不同途径以及感染后在宿主体内各组织的分布及增殖特点是病理研究的基础(汪开毓等, 2007), 也是育种工作中科学制定抗性测试方法、准确获取抗性性状测试数据的重要参考依据。目前, 关于 AHPND 的研究多为关于防范与治疗, 如在水体中添加噬菌体杀灭弧菌(González-Gómez *et al*, 2023)、在饲料中添加生物制剂及植物提取物提高免疫力(Wanvimonsuk *et al*, 2023; Mantaring *et al*, 2024)、通过转录组学技术手段找到相关免疫通路(Miao *et al*, 2023)等。该病原在对虾体内分布及增殖特点方面, 陈蒙蒙等(2018)通过浸浴方式, 探究感染后濒死的凡纳对虾仔虾 Vp_{AHPND} 在对虾各组织内的分布及变化情况, 发现鳃、肝胰腺、肌肉、肠均能检测到 PirA^{Vp}

基因, 且总体呈先上升后下降的趋势。张倩(2022)对凡纳对虾[(5.15±1.6) g]进行注射感染 AHPND, 在 0、1、2、3、8 和 12 d 检测不同组织中的病原菌载量, 发现肝胰腺的病原载量动态变化呈先上升后下降的趋势, 而鳃与肌肉组织的病原载量动态变化无明显趋势。关于 Vp_{AHPND} 在对虾体内分布情况及扩增特点方面的研究仅集中在仔虾和幼虾阶段, 且多使用浸泡、注射等感染方式。而在遗传育种中心的无特定病原(specific pathogen free, SPF)环境下, 保种成虾更容易通过摄入外源饲料和添加剂等方式感染 AHPND, 针对这种口饲感染, 尤其是摄食不同浓度病原的条件下, 在不同时间下, 各主要组织、器官病原的分布和增殖特点还未见系统研究的报道。

本研究以自主选育的高抗品系凡纳对虾为研究对象, 通过课题组已建立的一套定量口饲感染的方式进行 Vp_{AHPND} 感染, 利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)等技术手段, 研究相对高、低浓度摄菌量的情况下, 弧菌质粒在不同组织、不同时间的分布和增殖特点。研究结果可以更全面解析 Vp_{AHPND} 在对虾体内各组织的分布情况, 为准确获取抗性测试数据的测试方法提供重要参考, 同时可以为活体保种过程中准确检测采样组织、规范保种的防病监测提供基础数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用凡纳对虾来自农业农村部海水养殖遗传育种中心(中国水产科学研究院黄海水产研究所鳌山基地)自主选育的某高抗品系 9 月龄保种亲虾, 平均体重为(35±2) g。从核心群体中随机选取 230 尾个体, 运至中国水产科学研究院黄海水产研究所对虾性状测试车间(山东青岛)作为感染实验材料。

感染实验前, 随机采集 10 尾对虾进行病原检测。参照 OIE(2023)水生动物疾病诊断手册 (<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/>)进行病原检测, 检测病原包括白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)、致急性肝胰腺坏死副溶血弧菌(Vp_{AHPND})、肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)、虾血细胞虹彩病毒(shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)、对虾偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV)、传染性肌肉坏死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)。以确保避免其他病原对实验结果造成干扰。

1.2 实验方法

毒饵制备实验所用菌种来自自然资源部第三海洋研究所, 于-80℃冰箱保存。毒饵制备参考田吉腾等(2023)(专利号 CN202310391807.1)制备 2 种浓度含量的饲料, 单颗粒(湿重 5 mg)携菌量分别为 10⁴ CFU、10⁶ CFU 量级。每次投喂结束后, 使用同批次毒饵进行涂板检测, 以精确测定其病原浓度。

为了避免因养殖环境变化对数据造成影响, 提前将测试对虾放入抗病测试防逃逸分隔装置(孔杰等, 2023)(专利号 CN202320811114.9)进行 3 d 暂养。具体暂养条件: 每 2 尾放入一个 10 cm×15 cm×35 cm 的亚克力盒中, 每尾虾中间用隔板隔开; 暂养温度从 21℃开始, 每天升温 2℃, 至(27.0±0.5)℃; 暂养期间每天上午吸底、换水, 换水量为养殖水体的 40%; 10:00 和 22:00 进行普通商品饲料的投喂, 投喂量为体重的 3%。

感染测试分为对照组、相对低摄菌量组(L 组)、相对高摄菌量组(H 组), 将对照组、L 组、H 组分别放置在 3 个车间以避免意外或交叉感染。选取 180 尾活力正常的对虾进行感染测试, 2 个实验组均设 3 个重复, 每个重复 30 尾, 分放至 15 个亚克力盒子中; 另选取 20 尾作为对照组, 放入 10 个亚克力盒子中。同组测试个体的水环境相通。

暂养结束后, 对实验个体饥饿处理 72 h 以排空对虾肠胃, 确保其对毒饵的摄入。针对 L 组和 H 组的实验个体, 进行 2 次毒饵逐尾投喂, 每尾虾投喂 50 mg 毒饵, 第 1 次与第 2 次投喂间隔 24 h。L 组 2 批毒饵的病原含量经检测分别为 4.76×10⁵ CFU/尾和 1.76×10⁵ CFU/尾, H 组 2 批毒饵的病原含量经检测分别为 3.84×10⁷ CFU/尾和 1.68×10⁷ CFU/尾。对照组投喂的饲料为常规培养液浸泡后的商品颗粒饲料, 养殖条件与实验组保持一致。实验在不满足取样时终止。

样本采集及定量 PCR 从第 2 次投喂后的 6 h 开始计时, 分别于 3、6、9、24 和 48 h 选取 2 个实验组活力较好的 6 尾个体进行取样, 取样组织为鳃、胃、肠道、眼柄、肌肉、肝胰腺、第 5 游泳足(从基部剪取整只游泳足)、腹部神经和第 2 触角鞭(剪取基部 1 cm 段)。对照组同时取样。将组织样品经 1×PBS 冲洗后放入装有 95%乙醇的 1.5 mL 无菌冻存管中, 置于-20℃冰箱保存。使用酚-氯仿方法进行各组织 DNA 的提取, 并用核酸蛋白测定仪测定其浓度和纯度, 后统一稀释至 20 ng/μL。通过 RT-qPCR 方法检测各组织中 *PirA*^{Vp} 基因拷贝数作为 pVA1-like 质粒拷贝数, 代表弧菌变化情况。引物序列参考 Han 等(2015) (表 1)。RT-qPCR 程序设置: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 34 s; 40 个循环。

表 1 *Vp*_{AHPND} *PirA*^{Vp} 基因实时荧光定量 PCR 的引物和探针序列
Tab.1 The primers and probe sequence of the RT-qPCR for *PirA*^{Vp} gene of *Vp*_{AHPND}

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Sequence of primers (5'~3')	产物长度 Length of the product/bp
<i>PirA</i>	<i>PirA</i> -F	TTGGA CTGTCTGAACCAAACG	135
	<i>PirA</i> -R	GCACCCCATTTGGTATTGAATG	
Probe		AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGAA	

1.3 标准曲线制作

在绝对定量检测过程中, 需制备已知浓度的目标 DNA 或 RNA(标准品)的标准曲线, 用于确定病原体的绝对数量。其原理是将不同浓度的标准品与荧光信号强度相关联, 使得可以从未知样本中的荧光信号强度推算出目标分子的拷贝数(Rutledge *et al*, 2003)。本实验标准品来自蔚来生物公司合成的 *PirA*^{Vp} 基因片段, 确定其浓度后梯度稀释使用。

1.4 数据分析

使用 SPSS 26 作为数据分析的软件, 对各组织 *PirA*^{Vp} 拷贝数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 比较各组数据之间的差异, 用 Tukey's-b

检测法进行多重比较, 用皮尔逊相关性分析(Pearson correlation coefficient)检测组织间 *PirA*^{Vp} 拷贝数的相关性。*P*<0.05 为差异显著, *P*<0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 病原检测结果与 RT-qPCR 标准曲线

感染实验前的实验用虾病原检测结果显示, WSSV、*Vp*_{AHPND}、EHP、SHIV、CMNV 和 IMNV 均为阴性, IHNV 为阳性。将已知浓度的 *PirA*^{Vp} 基因片段标准品(10⁸ 定量数值)进行梯度稀释, 以稀释的梯度溶液为模板进行 RT-qPCR 扩增, 标准曲线如图 1 所示, 其 *R*²=0.998, 回归方程为:

$$Ct=3.826 \times \lg N+45.377$$

式中, N 为拷贝数, C_t 为循环数。

2.2 两实验组对虾死亡数量及特点

感染测试共计持续 78 h, 2 个实验组在各时间点死亡情况见图 2。对照组在实验过程中死亡 2 尾。L 组不同重复平均死亡(15.2 ± 2.6)尾, 累计死亡 46 尾, 死亡

率为 51.11%。H 组不同重复平均死亡(16.6 ± 2.5)尾, 累计死亡 50 尾, 死亡率为 55.56%。2 个实验组死亡数量无显著差异($P > 0.05$)。从 2 个实验组的死亡数量累计图中可看出死亡曲线特点一致。在每个时间点, 死亡率均无显著差异($P > 0.05$)。2 个实验组在计时后的 3~6 h 达到死亡高峰期, 此后死亡数量呈下降趋势。

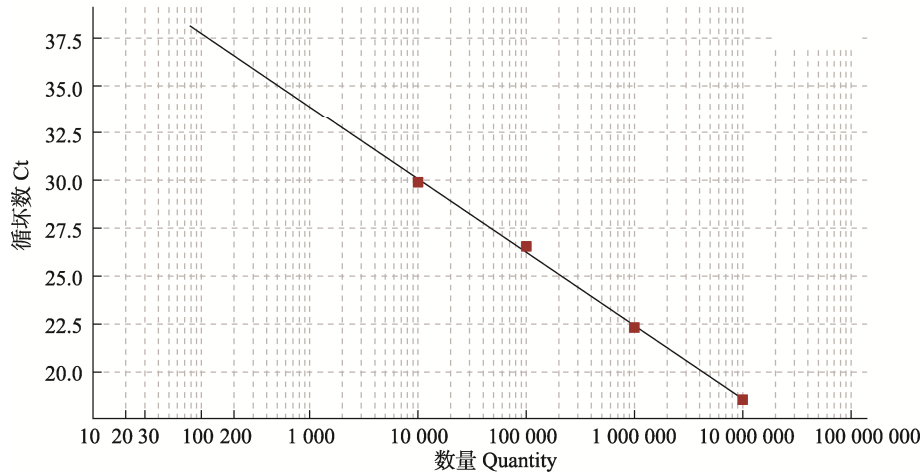


图 1 副溶血弧菌 pVA1-like 质粒 $PirA^{Vp}$ 基因标准曲线

Fig.1 Standard curve for $PirA^{Vp}$ gene of *V. parahaemolyticus* pVA1-like plasmid

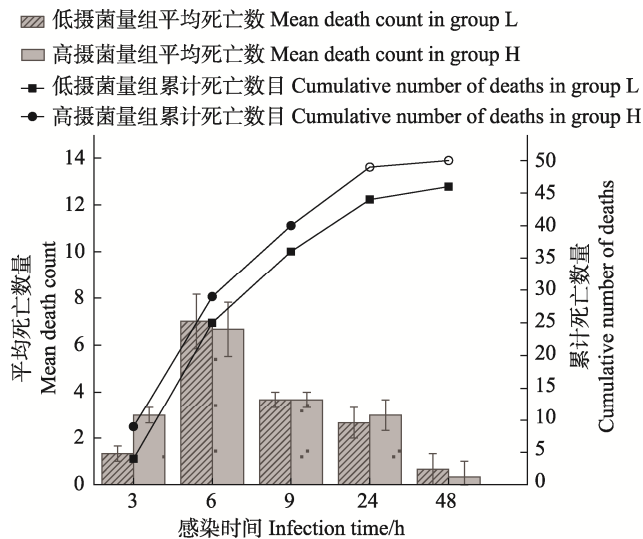


图 2 H 组和 L 组死亡数量累计

Fig.2 The cumulative number of deaths in groups H and L

2.3 两实验组各组织不同时间 $PirA^{Vp}$ 拷贝变化趋势

2 个实验组各组织在不同时间点 $PirA^{Vp}$ 拷贝数变化见图 3。在发病后 48 h 内, 根据各组织 $PirA^{Vp}$ 拷贝数变化趋势分为随时间先增加后降低状况的单峰趋势与波动趋势。L 组有 6 个组织的质粒拷贝数呈单峰趋势, 分别是鳃、眼柄、肌肉、第 5 游泳足、腹部神

经和第 2 触角鞭(图 3L-1); 3 个组织的质粒拷贝数呈波动趋势, 分别是胃、肠道和肝胰腺(图 3L-2)。L 组各组织质粒拷贝数达到最高的时间为 9 h 和 24 h 左右。其中, 9 h 质粒拷贝数达到最高的组织包括鳃[(348.5 ± 44.2) copies/ng]、胃[(228.2 ± 29.9) copies/ng]、眼柄[(478.1 ± 67.8) copies/ng]、肌肉[(247.3 ± 37.1) copies/ng] 和第 2 触角鞭[(395.8 ± 45.4) copies/ng]; 24 h 质粒拷贝数达到最高的组织有肠道[(501.1 ± 99.7) copies/ng]、肝胰腺[(314.8 ± 46.9) copies/ng]、第 5 游泳足[(316.7 ± 24.4) copies/ng]、腹部神经[(549.8 ± 90.3) copies/ng]。

H 组有 2 个组织的质粒拷贝数变化呈单峰趋势, 分别为胃和第 5 游泳足(图 3H-1); 有 7 个组织的质粒拷贝数变化呈波动趋势, 分别为鳃、肠道、眼柄、肌肉、肝胰腺、腹部神经和第 2 触角鞭(图 3H-2)。H 组不同组织的质粒拷贝数达到最高的时间分别为 3、6、9 和 48 h。其中, 在 3 h 腹部神经质粒拷贝数[(730.9 ± 78.9) copies/ng]达最高; 在 6 h 第 5 游泳足质粒拷贝数[(464.8 ± 50.9) copies/ng]达到最高; 在 9 h 质粒拷贝数达到最高的组织为鳃[(957.9 ± 206.8) copies/ng]、胃[(932.7 ± 277.3) copies/ng]、肠道[(1017.2 ± 185.4) copies/ng]、眼柄[(486.9 ± 57.3) copies/ng]、肌肉[(664.1 ± 91.0) copies/ng]、第 2 触角鞭[(444.6 ± 55.5) copies/ng];

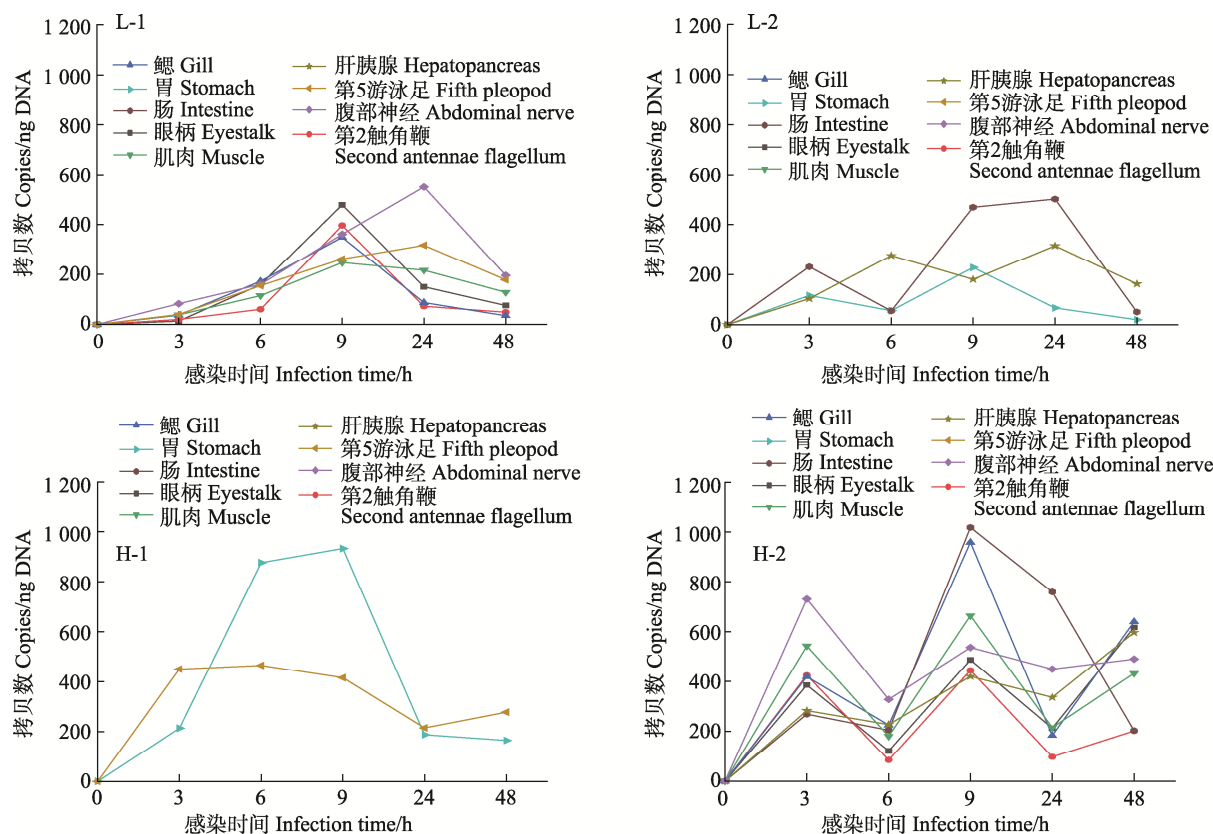


图3 L组、H组不同组织 $PirA^{Vp}$ 拷贝数随时间变化
Fig.3 The $PirA^{Vp}$ copy number of different tissues in groups L and H changed with time

L-1: 低摄菌量实验组单峰变化的组织质粒拷贝数; L-2: 低摄菌量实验组双峰变化的组织质粒拷贝数;

H-1: 高摄菌量实验组单峰变化的组织质粒拷贝数; H-2: 高摄菌量实验组双峰变化的组织质粒拷贝数

L-1: Single-peak tissue plasmid copy number in L group; L-2: Bimodal plasmid copy number of tissues in L group;

H-1: Single-peak tissue plasmid copy number in H group; H-2: Bimodal plasmid copy number of tissues in H group.

在 48 h 肝胰腺组织质粒拷贝数 $[(596.5 \pm 103.4) \text{ copies/ng}]$ 达到最高。结果表明,不同摄菌量会影响各组织弧菌载量及随时间的变化特点。

2.4 两实验组各组织间 $PirA^{Vp}$ 拷贝数差异比较

同一时间点各组织间 $PirA^{Vp}$ 拷贝数比较结果见图 4。在 3 h, 9 个组织的质粒拷贝数 H 组均高于 L 组,且除胃和肠道外,均具有极显著性差异($P < 0.01$)。在 6 h, H 组有 7 个组织的质粒拷贝数高于 L 组,且除鳃和第 2 触角鞭外,均有极显著性差异($P < 0.01$)。在 9 h,除眼柄与第 2 触角鞭外, H 组有 7 个组织的质粒拷贝数为高于 L 组,均有极显著性差异($P < 0.01$)。在 24 h, H 组有 6 个组织的质粒拷贝数高于 L 组,除肠道、肝胰腺和第 2 触角鞭外,均有极显著性差异($P < 0.01$), L 组第 5 游泳足和腹部神经的质粒拷贝数高于 H 组,且第 5 游泳足有极显著性差异($P < 0.01$)。在 48 h, H 组有 9 个组织的质粒拷贝数极显著高于 L 组($P < 0.01$)。在所有组织不同时间点的比较中, H 组

极显著高于 L 组的有 32 个; 1 个 H 组显著高于 L 组; 1 个 L 组极显著高于 H 组; 11 个 H 组、L 组无显著差异。以上结果表明,不同的摄菌量显著影响致病质粒的拷贝数,高摄菌量组在大部分时间点、大多数组织中质粒拷贝数高于低摄菌量组。

低摄菌量组(L 组)与高摄菌量组(H 组)各组织不同时间点质粒拷贝数均值见表 2。L 组所有时间点不同组织中平均质粒拷贝数范围为 97.3~269.9 copies/ng; H 组所有时间点不同组织平均质粒拷贝数范围为 250.9~507.2 copies/ng。H 组比 L 组同种组织质粒拷贝数高 1.9~4.9 倍。将各组织质粒拷贝数平均值由高到低进行排序, L 组顺序为腹部神经、肠、肝胰腺、第 5 游泳足、眼柄、肌肉、鳃、第 2 触角鞭、胃; H 组顺序为腹部神经、肠、鳃、胃、肌肉、肝胰腺、眼柄、第 5 游泳足、第 2 触角鞭。结果表明, $PirA^{Vp}$ 拷贝数在对虾体内各组织分布特点不同,其中,腹部神经和肠在 L 组和 H 组排名均位于前列。

2.5 两实验组不同组织间弧菌质粒变化相关性

2 个实验组不同组织间弧菌质粒变化相关性见表 3 和表 4。L 组肌肉与第 5 游泳足、第 5 游泳足与腹部神经、鳃与第 2 触角鞭的弧菌质粒变化有显著相关性 ($P<0.05$), 皮尔逊相关系数分别为 0.946、0.944 和 0.928; 眼柄与鳃、眼柄与第 2 触角鞭的弧菌质粒变

化有极显著相关性 ($P<0.01$), 皮尔逊相关性分别为 0.976 和 0.974。H 组肌肉与第 2 触角鞭的弧菌质粒变化有极显著相关性 ($P<0.01$), 皮尔逊相关性为 0.960。弧菌在各组织变化关联性在不同摄菌量下表现不同。2 个实验组均未发现质粒拷贝数与死亡率、摄菌时间有显著相关性。

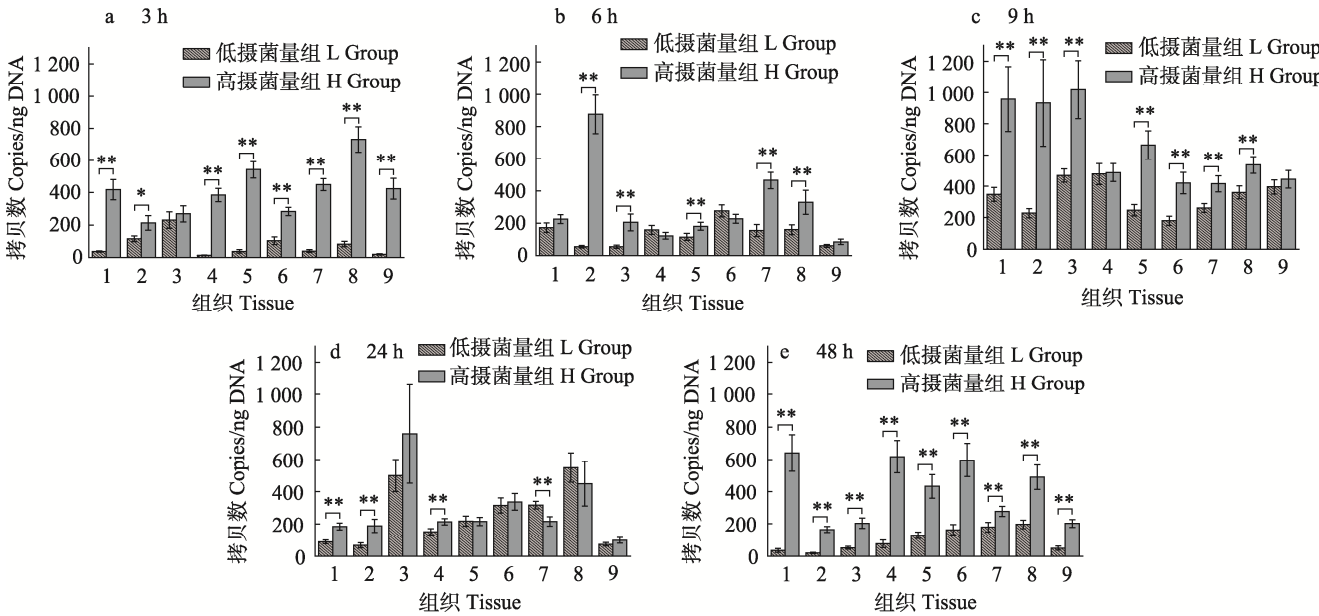


图 4 L 组、H 组的相同组织 $PirA^{Vp}$ 拷贝数对比
Fig.4 Comparison of $PirA^{Vp}$ copy numbers between L and H groups

1: 鳃; 2: 胃; 3: 肠道; 4: 眼柄; 5: 肌肉; 6: 肝胰腺; 7: 第 5 游泳足; 8: 腹部神经; 9: 第 2 触角鞭。
*为 $P<0.05$ 显著差异, **为 $P<0.01$ 极显著差异。
1: Gill; 2: Stomach; 3: Intestine; 4: Eyestalk; 5: Muscle; 6: Hepatopancreas; 7: Fifth pleopod; 8: Abdominal nerve;
9: Second antennae flagellum. *: Significant difference, $P<0.05$; **: Highly significant difference, $P<0.01$.

表 2 L 组与 H 组各组织质粒拷贝数均值排名
Tab.2 Average ranking of plasmid copy numbers in groups L and H

低摄菌量组 L group		高摄菌量组 H group	
组织 Tissue	平均值 Mean /(copies/ng)	组织 Tissue	平均值 Mean /(copies/ng)
腹部神经 Abdominal nerve	269.9±80.2	腹部神经 Abdominal nerve	507.2±65.7
肠 Intestine	261.2±69.6	肠 Intestine	490.7±167.8
肝胰腺 Hepatopancreas	207.6±58.7	鳃 Gill	485.2±143.2
第 5 游泳足 Fifth pleopod	190.3±37.5	胃 Stomach	474.8±175.7
眼柄 Eyestalk	175.2±83.4	肌肉 Muscle	407.1±93.0
肌肉 Muscle	149.1±47.5	肝胰腺 Hepatopancreas	373.0±64.3
鳃 Gill	136.0±36.2	眼柄 Eyestalk	365.0±89.7
第 2 触角鞭 Second antennae flagellum	119.4±97.1	第 5 游泳足 Fifth pleopod	364.5±50.0
胃 Stomach	97.3±38.6	第 2 触角鞭 Second antennae flagellum	250.9±77.7

表 3 L 组各组织弧菌质粒变化相关性
Tab.3 Correlation between plasmid changes of *Vibrio* in various tissues of Group L

	时间 Time	死亡率 Mortality	鳃 Gill	胃 Stomach	肠 Intestine	眼柄 Eystalk	肌肉 Muscle	肝胰腺 Hepato- pancreas	第 5 游泳足 Fifth pleopod	腹部神经 Abdominal nerve	第 2 触角鞭 Second antennae flagellum
时间	1	-0.545	-0.429	-0.576	-0.236	-0.242	0.155	0.042	0.309	0.200	-0.232
Time		0.342	0.471	0.309	0.702	0.694	0.803	0.946	0.612	0.747	0.708
死亡率	-0.545	1	0.540	0.100	-0.104	0.362	0.167	0.581	0.134	0.006	0.190
Mortality	0.342		0.347	0.873	0.868	0.549	0.788	0.304	0.830	0.992	0.760
鳃	-0.429	0.540	1	0.794	0.431	0.967**	0.669	0.143	0.427	0.282	0.928*
Gill	0.471	0.347		0.108	0.468	0.007	0.217	0.819	0.473	0.646	0.023
胃	-0.576	0.100	0.794	1	0.629	0.788	0.433	-0.291	0.146	0.167	0.867
Stomach	0.309	0.873	0.108		0.256	0.113	0.467	0.635	0.815	0.789	0.057
肠	-0.236	-0.104	0.431	0.629	1	0.553	0.707	0.249	0.645	0.802	0.563
Intestine	0.702	0.868	0.468	0.256		0.333	0.182	0.686	0.240	0.102	0.323
眼柄	-0.242	0.362	0.967**	0.788	0.553	1	0.809	0.152	0.585	0.448	0.975**
Eystalk	0.694	0.549	0.007	0.113	0.333		0.097	0.807	0.300	0.449	0.005
肌肉	0.155	0.167	0.669	0.433	0.707	0.809	1	0.509	0.946*	0.861	0.738
Muscle	0.803	0.788	0.217	0.467	0.182	0.097		0.381	0.015	0.061	0.155
肝胰腺	0.042	0.581	0.143	-0.291	0.249	0.152	0.509	1	0.692	0.666	-0.055
Hepatopancreas	0.946	0.304	0.819	0.635	0.686	0.807	0.381		0.195	0.220	0.930
第 5 游泳足	0.309	0.134	0.427	0.146	0.645	0.585	0.946*	0.692	1	0.944*	0.480
Fifth pleopod	0.612	0.830	0.473	0.815	0.240	0.300	0.015	0.195		0.016	0.414
腹部神经	0.200	0.006	0.282	0.167	0.802	0.448	0.861	0.666	0.944*	1	0.364
Abdominal nerve	0.747	0.992	0.646	0.789	0.102	0.449	0.061	0.220	0.016		0.547
第 2 触角鞭	-0.232	0.190	0.928*	0.867	0.563	0.975**	0.738	-0.055	0.480	0.364	1
Second antennae flagellum	0.708	0.760	0.023	0.057	0.323	0.005	0.155	0.930	0.414	0.547	

注：*为 $P<0.05$ 显著差异，**为 $P<0.01$ 极显著差异。下表同。
Note: *: Significant difference, $P<0.05$; **: Highly significant difference, $P<0.01$. The same below.

表 4 H 组各组织弧菌质粒变化相关性
Tab.4 Correlation between plasmid changes of *Vibrio* in various tissues of Group H

	时间 Time	死亡率 Mortality	鳃 Gill	胃 Stomach	肠 Intestine	眼柄 Eyestalk	肌肉 Muscle	肝胰腺 Hepato- pancreas	第 5 游泳足 Fifth pleopod	腹部神经 Abdominal nerve	第 2 触角鞭 Second antennae flagellum
时间	1	-0.545	0.113	-0.548	-0.179	0.546	-0.130	0.854	-0.775	-0.213	-0.367
Time		0.342	0.857	0.339	0.774	0.341	0.835	0.065	0.123	0.730	0.544
死亡率	-0.545	1	-0.274	0.809	0.042	-0.733	-0.462	-0.636	0.491	-0.690	-0.380
Mortality	0.342		0.656	0.097	0.946	0.159	0.433	0.248	0.401	0.198	0.528
鳃	0.113	-0.274	1	0.335	0.442	0.794	0.875	0.606	0.169	0.319	0.726
Gill	0.857	0.656		0.582	0.456	0.108	0.052	0.278	0.786	0.601	0.165
胃	-0.548	0.809	0.335	1	0.333	-0.259	0.118	-0.319	0.633	-0.411	0.132
Stomach	0.339	0.097	0.582		0.584	0.674	0.851	0.601	0.251	0.492	0.833
肠	-0.179	0.042	0.442	0.333	1	0.052	0.356	0.057	-0.215	0.030	0.321
Intestine	0.774	0.946	0.456	0.584		0.933	0.556	0.927	0.729	0.962	0.598
眼柄	0.546	-0.733	0.794	-0.259	0.052	1	0.747	0.877	-0.174	0.474	0.562
Eyestalk	0.341	0.159	0.108	0.674	0.933		0.147	0.051	0.780	0.420	0.325
肌肉	-0.130	-0.462	0.875	0.118	0.356	0.747	1	0.382	0.306	0.727	0.960**
Muscle	0.835	0.433	0.052	0.851	0.556	0.147		0.526	0.617	0.164	0.009
肝胰腺	0.854	-0.636	0.606	-0.319	0.057	0.877	0.382	1	-0.526	0.066	0.124
Hepatopancreas	0.065	0.248	0.278	0.601	0.927	0.051	0.526		0.363	0.916	0.843
第 5 游泳足	-0.775	0.491	0.169	0.633	-0.215	-0.174	0.306	-0.526	1	0.194	0.454
Fifth pleopod	0.123	0.401	0.786	0.251	0.729	0.780	0.617	0.363		0.754	0.443
腹部神经	-0.213	-0.690	0.319	-0.411	0.030	0.474	0.727	0.066	0.194	1	0.819
Abdominal nerve	0.730	0.198	0.601	0.492	0.962	0.420	0.164	0.916	0.754		0.090
第 2 触角鞭	-0.367	-0.380	0.726	0.132	0.321	0.562	0.960**	0.124	0.454	0.819	1
Second antennae flagellum	0.544	0.528	0.165	0.833	0.598	0.325	0.009	0.843	0.443	0.090	

3 讨论

在对某性状进行人工选育之前,需要首先评估目标性状是否具有选育潜力,进一步通过精准的性状测试和配种方案,通过大规模家系选育的方式进行新品系/种的培育。本课题组刘绵宇(2023)、刘杨(2023)等通过 AHPND 浸浴感染法、梯度浸浴感染法发现,凡纳对虾不同品系间、同品系不同家系间具有显著存活差异;抗 AHPND 性状有中低水平的遗传力,具有多世代抗性选育潜力。因此,探究合适的致病方式和病原在体内变化规律是制定精准的感染、测试方案的基础。本团队建立了一种采用菌液浸泡商品颗粒饲料口饲毒饵式感染,与反向管饲感染法(Lee *et al*, 2015)、注射感染法(Maralit *et al*, 2018)相比,可有效降低对虾的应激反应,避免表皮损伤与应激式蜕皮(Saulnier *et al*, 2000);同时,相较于使用病死对虾的肌肉进行口饲感染(Angthong *et al*, 2017)、单次浸泡感染(Boonchuen *et al*, 2018)和梯度浸泡感染(Ng *et al*, 2018)等方式更精确地控制了对虾弧菌摄入量。在开展本实验所在的农业农村部海水养殖遗传育种中心 SPF 环境中,保种的种虾通过水体感染 AHPND 的风险较低,而饲料及添加剂中含有 AHPND 的风险较高,对虾容易通过摄食的方式感染此病原,故口饲感染法是更接近保种群体感染的方式。在实验材料方面,前人均使用养殖行业商品规格成虾、幼虾或仔虾(20 g 以下)作为实验材料,而在体重较大的种虾中研究较少。在各组织部位病原量检测方面,前人的研究多数聚焦于对虾的鳃、胃、肝胰腺、肠道和肌肉(陈蒙蒙等, 2018; 张倩, 2022),本研究除了以上 5 个组织,还增加了第 2 触角鞭、腹部神经、眼柄和第 5 游泳足 4 种组织。

本研究设置相对高、低 2 个不同摄菌量实验组,虽然两组的摄菌量差别为 10^2 数量级,且组织定量结果验证了体内质粒含量的差异(H 组比 L 组同种组织平均质粒拷贝数高 1.9~4.9 倍),但研究结果显示,两组的累计死亡率和死亡速度并无统计学显著差异,这与 Yang 等(2021)发现的不同浓度弧菌胁迫死亡率结果不一致。这可能是由以下几点原因造成的:首先,本研究中 L 组的摄菌量(10^5 CFU/尾)可能已达到能够引发明显病理反应的阈值。已有研究表明, Vp_{AHPND} 感染存在一个阈值,在某个感染浓度下,即使进一步提高感染浓度,也可能不会对死亡率产生更大的影响(张倩, 2022);同时,预实验发现,摄食 1.7×10^4 CFU 数量级毒饵的对虾在 48 h 未有明显发病的迹象,因此

推测,通过口饲方式感染凡纳对虾成虾的发病浓度可能在 $10^4 \sim 10^5$ CFU/尾之间,但是否存在一个具体的发病浓度阈值还需进一步研究。其次,虽然 2 个实验组在弧菌摄入量上存在 10^2 量级显著差异,但体内的质粒拷贝数差异量级并没有达到该量级。这暗示摄菌量的增加并不一定会导致体内质粒拷贝数等比例增加。因此,后续还需要进一步探究增加毒饵的摄入量与提高体内质粒拷贝数的关系,进而了解对虾的死亡速度与弧菌胁迫浓度的关系。

预实验发现,商品颗粒饲料最大携菌量受浸泡菌液浓度与颗粒饲料大小限制,本实验所用颗粒饲料最大携菌量为 10^6 CFU/粒,为避免毒饵携菌量因对虾摄食过程中的海水浸泡造成与测量值产生显著差异,本研究选择投喂 10 粒(湿重 50 mg)毒饵。因虾体规格过大,无法满足单次投喂即可发病,经不断摸索发现,在投喂 2 次、每次摄菌量超过 10^5 CFU/尾后,第 2 次投喂后 6 h 产生 AHPND 发病症状。根据以上综合考虑,确定了本研究感染方式与病原感染量。AHPND 具有发病时间短、致死迅速等特点(Tran *et al*, 2013),预实验结果发现在 48 h 即可达到半数致死。根据前人研究(张倩, 2022; Chandran *et al*, 2023; Tang *et al*, 2020)及在实验材料数目限制条件下,本研究选择 3、6、9、24 和 48 h 作为取样时间点。在 48 h 后由于样品剩余数目的原因不适合继续取样,故本实验的测试及取样在 48 h 终止。本研究实验材料经全病原暴露(all pathogen exposed, APE)方式选育,目标品系虽携带 IHNV 病毒但并不发病,且 IHNV 病毒具有垂直传播的特点(Yu *et al*, 2021),故本实验对虾携带 IHNV 病原并不影响 AHPND 的感染与发病规律。

陈蒙蒙等(2018)使用浸浴感染方式探究对虾 AHPND 发病情况与质粒拷贝数关系,通过组织切片与 RT-qPCR 联合分析,发现在整个实验过程中(24、48 和 72 h),濒死和存活对虾质粒拷贝数无显著差异。Tinwongger 等(2016)同样使用浸浴感染方式感染对虾,利用 Western Blotting 和 RT-qPCR 手段证实了副溶血弧菌分泌 PirAB^{Vp} 毒力蛋白数量与发病情况具有显著性关系,而质粒拷贝数与死亡率、发病情况无关联。在本研究不同组织质粒拷贝数结果中,2 个实验组均未发现各组织质粒拷贝数与死亡率、摄菌时间有显著相关性,说明质粒拷贝数虽能证实其发病,但不能通过质粒含量推测死亡速率及累计死亡量。L 组各组织质粒拷贝数变化趋势中,6 个组织呈单峰形态,3 个组织呈波动形态;H 组中 2 个组织呈单峰形态,7 个组织呈波动形态,2 个实验组同组织载菌量变化不具有

相似性。L 组和 H 组各组织间 *PirA^{Vp}* 拷贝数差异结果显示, 不同的摄菌量会影响各组织载菌量及分布特点; L 组与 H 组组织间弧菌质粒变化相关性显示, L 组有 3 对组织(肌肉与第 5 游泳足、第 5 游泳足与腹部神经、鳃与第 2 触角鞭)弧菌质粒变化有显著相关性, 2 对组织(眼柄与鳃、眼柄与第 2 触角鞭)弧菌质粒变化有极显著相关性; 而在 H 组中, 仅有 1 对组织(肌肉与第 2 触角鞭)弧菌质粒变化有极显著相关性。这与梁箫等(2018)和杨千元等(2021)发现的生物各组织部位免疫能力与病原含量、酶活性等因素有关, 进而造成各组织部位弧菌变化情况不具有联系的结论一致。综上结果表明, 本研究质粒拷贝数不能预测死亡数量情况。不同摄菌量不仅会影响病原在体内的初始分布情况, 且在体内变化情况也有所不同, 说明病原在体内的变化情况不仅是极其复杂的过程, 同时病原各组织变化不具有关联性, 这与 Kim 等(2014)高、低不同的病原菌攻毒浓度会影响宿主产生不同的免疫应答进而影响各组织病原含量结论相一致。关于凡纳对虾抗 AHPND 的免疫机理仍需进一步研究。

在整体实验中, 2 个实验组各时间点所有组织均能检测出 *PirA^{Vp}*, 腹部神经与肠道平均检测量高于其他组织, 说明腹部神经与肠道均为适宜弧菌附着增殖的组织, 这与 Soonthornchai 等(2015)发现 *Vp_{AHPND}* 可以通过口饲感染, 经过胃到达中肠部位附着、增殖结论一致。后续可进一步探究腹部神经在感染后的作用。根据 FAO AHPND 治理手册(Tang *et al.*, 2020), 目前关于 AHPND 病原检测的材料为水质、粪便和对虾组织(肌肉、肝胰腺和鳃)。水质和粪便的病原检测准确性较低, 而对虾组织病原检测虽然准确性较高, 但需要将检测个体解剖, 不适用于活体对虾的检测。筛选病原检测准确性高且对虾体伤害小的组织, 并对保种成虾常态化活体病原监测有着重要意义。本研究发现, 第 5 游泳足与第 2 触角鞭平均 *PirA^{Vp}* 拷贝数虽不是最高水平, 但能稳定检测到 *PirA^{Vp}* 质粒, 因此, 游泳足与第 2 触角鞭可作为对虾活体 AHPND 检测的适宜组织。

综上, 本研究表明, 口饲毒饵式感染可作为一种稳定的感染 AHPND 方式。弧菌的摄入量不同会影响 pVA1-like 质粒在各组织的分布与变化, 但弧菌在各组织中的含量变化不具有相关性。质粒拷贝数在一定范围内仅能说明对虾病原侵染情况, 不能推测其死亡量及死亡速度。腹部神经和肠道是弧菌含量最高的组织。游泳足和第 2 触角鞭可作为对虾活体 AHPND 检测的适宜材料。

参 考 文 献

- ANGTHONG P, ROYTRAKUL S, JARAYABHAND P, *et al.* Involvement of a tachylectin-like gene and its protein in pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 76: 229–237
- BOONCHUEN P, JAREE P, TASSANAKAJON A, *et al.* Hemocyanin of *Litopenaeus vannamei* agglutinates *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (*Vp_{AHPND}*) and neutralizes its toxin. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 84: 371–381
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2023. Beijing: China Agriculture Press, 2023 [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. 2023 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2023]
- CHANDRAN A, PRIYA P S, MEENATCHI R, *et al.* Insights into molecular aspects of pathogenesis and disease management in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): An updated review. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 142: 109138
- CHEN M M, DONG X, QIU L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp_{AHPND}*) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93–100 [陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp_{AHPND}*)的定量分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 93–100]
- GONZÁLEZ-GÓMEZ J P, SOTO-RODRIGUEZ S A, GOMEZ-GIL B, *et al.* Effect of phage therapy on survival, histopathology, and water microbiota of *Penaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 2023, 576: 739851
- HAN J E, TANG K F J, PANTOJA C R, *et al.* qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 2015, 442: 12–15
- JIA D, SHI C Y, HUANG J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103–111 [贾丹, 史成银, 黄捷, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 103–111]
- KIM B M, JEONG C B, RHEE J S, *et al.* Transcriptional

- profiles of Rel/NF- κ B, inhibitor of NF- κ B (I κ B), and lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) in the lipopolysaccharide (LPS) and two *Vibrio* sp.-exposed intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 42(2): 229–239
- KONG J, TIAN J T, MENG X H, *et al.* The invention relates to a separating device for preventing escape in shrimp disease resistance test. CN20232081114.9. 2023-8-11 [孔杰, 田吉腾, 孟宪红, 等. 一种对虾抗病测试防逃逸的分隔装置. CN20232081114.9. 2023-8-11]
- KUMAR V, ROY S, BEHERA B K, *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 2021, 13(8): 524
- LAI H C, NG T H, ANDO M, *et al.* Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006–1014
- LEE C T, CHEN I T, YANG Y T, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798–10803
- LIANG X, ZHANG Y, LIU Y Z, *et al.* Influence of *Vibrio splendidus* on immune indexes and digestive enzyme activity of *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 1438–1445 [梁箫, 张亚, 刘钰珠, 等. 灿烂弧菌对厚壳贻贝免疫指标和消化酶活性的影响. *水产学报*, 2018, 42(9): 1438–1445]
- LIGHTNER D V, REDMAN R, PANTOJA C, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(1): 40
- LIU M Y, LI X P, KONG J, *et al.* Application of the liquid chip “Yellow Sea Chip No.1” in genetic evaluation of the base population with resistance to acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(1): 217–226 [刘绵宇, 李旭鹏, 孔杰, 等. 液相芯片“黄海芯1号”在凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病抗性基础群体遗传评估中的应用. *水产学报*, 2023, 47(1): 217–226]
- LIU Y, LUAN S, LIU M Y, *et al.* Genomic prediction accuracy analysis of AHPND resistance genome prediction in *Litopenaeus vannamei* using SNP panels with different densities. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(1): 165–174 [刘杨, 栾生, 刘绵宇, 等. 基于不同密度 SNP 面板的凡纳滨对虾 AHPND 抗性基因组预测准确性分析. *水产学报*, 2023, 47(1): 165–174]
- MANTARING S D A, DELOS SANTOS J R K, ESTRELLA R, *et al.* *Terminalia catappa* L. leaf extract interferes with biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and enhances immune response of *Penaeus vannamei* against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 2024, 579: 740266
- MARALIT B A, JAREE P, BOONCHUEN P, *et al.* Differentially expressed genes in hemocytes of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (Vp_{AHPND}) and Vp_{AHPND} toxin. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 81: 284–296
- MIAO M, LI S H, LIU Y, *et al.* Transcriptome analysis on hepatopancreas reveals the metabolic dysregulation caused by *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*. *Biology*, 2023, 12(3): 417
- NG T H, LU C W, LIN S S, *et al.* The Rho signalling pathway mediates the pathogenicity of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* in shrimp. *Cellular Microbiology*, 2018, 20(8): e12849
- RUTLEDGE R G, CÔTÉ C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(16): e93
- SAULNIER D, HAFFNER P, GOARANT C, *et al.* Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: A review. *Aquaculture*, 2000, 191(1/2/3): 133–144
- SOONTHORNCHAI W, CHAIYAPECHARA S, JARAYABHAND P, *et al.* Interaction of *Vibrio* spp. with the inner surface of the digestive tract of *Penaeus monodon*. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135783
- TANG K F, BONDAD-REANTASO M G, ARTHUR J R, *et al.* Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, 2020, (C1190): 1–65
- TIAN J T, KONG J, LI X P, *et al.* A method for large-scale determination of the resistance of *Litopenaeus vannamei* to acute hepatopancreatic necrosis. CN202310391807.1.2023-6-23 [田吉腾, 孔杰, 李旭鹏, 等. 凡纳滨对虾抗急性肝胰腺坏死病性状的大规模测定方法. CN202310391807.1. 2023-6-23]
- TINWONGGER S, NOCHIRI Y, THAWONSUWAN J, *et al.* Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease PirAB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(6): 1755–1765
- TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45–55
- WANG K Y, HE M. Application progress of pathologic technology in aquatic animal disease. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(5): 67–71 [汪开毓, 何敏. 病理学技术在水生动物疾病学上的应用进展. *淡水渔业*, 2007, 37(5): 67–71]
- WANVIMONSUK S, SOMBOONWIWAT K. Peroxiredoxin-4 supplementation modulates the immune response, shapes the intestinal microbiome, and enhances AHPND

- resistance in *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 139: 108915
- YANG Q Y, TENG S S, CAI Y L, *et al.* Load variation of *Vibrio harveyi* in the blood clam *Tegillarca granosa*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(6): 1506–1513 [杨千元, 滕爽爽, 蔡逸龙, 等. 哈维氏弧菌浸泡感染下泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同组织弧菌载量的变化规律分析. *海洋与湖沼*, 2021, 52(6): 1506–1513]
- YU J Y, YANG N, HOU Z H, *et al.* Research progress on hosts and carriers, prevalence, virulence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 183: 107556
- ZHANG Q. Development of molecular breeding technology for disease resistance against *Vibro* and the exploration on disease resistance mechanism in shrimp. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2020 [张倩. 对虾抗弧菌性状分子育种技术研发和抗性机制探究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2020]
- ZHANG W Q. A brief introduction to the biology of *Penaeus vannamei*, an important cultured species in the world. *Marine Sciences*, 1990, 14(3): 69–73 [张伟权. 世界重要养殖品种——南美白对虾生物学简介. *海洋科学*, 1990, 14(3): 69–73]

(编辑 冯小花)

Tissue Distribution and Proliferation Characteristics of pVA1-like Plasmid After Infection with *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*

SU Xingqi^{1,2}, FU Qiang^{2,3}, LI Xupeng^{2,3}, KONG Jie^{2,3}, TIAN Jiteng^{2,3}, CAO Baoxiang^{2,3},
LIU Ning^{2,3}, LUAN Sheng^{2,3}, LUO Kun^{2,3}, MENG Xianhong^{2,3①}

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China; 3. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract The Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) is currently a global mainstream aquaculture product. In recent years, as aquaculture scale has expanded, the aquaculture environment has suffered degradation, and diseases have become increasingly prevalent, severely constraining the development of the Chinese shrimp aquaculture industry. Among these diseases, acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) stands out as a major cause of catastrophic economic losses. AHPND is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and carried in a 69–73 kb plasmid expressing the virulence protein PirAB^{Vp}. Afflicted shrimp typically exhibit symptoms such as anorexia, empty intestines and stomachs, and enlargement and softening of the hepatopancreas. Pathological studies indicate that when the toxin encounters the hepatopancreas (the target organ), it leads to the separation and disintegration of epithelial cells, turning them into substrates for bacterial replication, ultimately compromising the function of the hepatopancreas. Currently, research on AHPND primarily focuses on prevention and treatment strategies. These include adding biological agents and plant extracts to feed to enhance immunity, introducing other organisms into the water to disrupt the growth environment of *V. parahaemolyticus*, and analyzing the mechanism of shrimp immunity to it through bioinformatics. However, research on the distribution and amplification characteristics of pathogens within shrimp bodies is limited. Investigating the different pathways of pathogen infection in the host and the distribution and amplification characteristics of various tissues in the host after infection forms the basis of pathological research. Such research is also crucial for the

① Corresponding author: MENG Xianhong, Email: mengxianhong@ysfri.ac.cn

scientific formulation of resistance testing methods and the accurate acquisition of resistance trait test data in breeding work. This study used selectively bred high-resistant strains of *P. vannamei* (average weight 35 ± 2 g) as research subjects. Through quantitative oral infection using RT-qPCR and other techniques, *P. vannamei* were infected with Vp_{AHPND} in low inoculum groups (4.76×10^5 CFU/tail, 1.76×10^5 CFU/tail) (L group) and high inoculum groups (3.84×10^7 CFU/tail, 1.68×10^7 CFU/tail) (H group) at five different time points (3, 6, 9, 24, and 48 h) across nine different tissues (gill, stomach, intestine, eyestalk, muscle, hepatopancreas, fifth pleopod, abdominal nerve, and second antennae flagellum), studying the distribution and changes of $PirA^{Vp}$ copy numbers. The amount of pVA1-like plasmid carried by *V. parahaemolyticus* was determined by the gene expression of the virulence protein $PirA^{Vp}$, which in turn represented the distribution and change characteristics of *V. parahaemolyticus*. The results revealed that both experimental groups experienced peak mortality between 3–6 h, with subsequent gradual decreases, and no significant difference in mortality between the two experimental groups. In the L group, plasmid copy numbers increased before decreasing in gills, eyestalk, muscle, fifth pleopod, abdominal nerve, and second antennae flagellum while they fluctuated in the stomach, intestine, and hepatopancreas. In the H group, plasmid copy numbers fluctuated in gills, intestine, eyestalk, muscle, hepatopancreas, abdominal nerve, and second antennae flagellum, with an increase before the decrease in the stomach and fifth pleopod. Among the 45 pairs of comparisons between different times within the same tissues, 32 had a significantly higher H group than the L group, 1 pair where the H group was significantly higher than the L group, one pair where the L group was significantly higher than the H group, and 1 pair where there was no significant difference. The mean plasmid copy numbers of tissues in the L group were ranked from high to low as abdominal nerve > intestine > hepatopancreas > fifth pleopod > eyestalk > muscle > gills > second antennae flagellum > stomach, and in the H group, they were ranked as abdominal nerve > intestine > gills > stomach > muscle > hepatopancreas > eyestalk > fifth pleopod > and second antennae flagellum. The average $PirA^{Vp}$ copy numbers in the abdominal nerve and intestine tissues of both experimental groups were higher than those in other tissues, with those in the same tissues of the H group being 1.9–4.9 times higher than those in the L group. In the correlation analysis of plasmid changes between tissues of the L and H groups, there were significant correlations ($P<0.05$) in plasmid changes between muscle and fifth pleopod, fifth pleopod and abdominal nerve, and gills and second antennae in the L group, while there were extremely significant correlations ($P<0.01$) in plasmid changes between eyestalk and gills, and eyestalk and second antennae flagellum in the L group, and an extremely significant correlation ($P<0.01$) in plasmid changes between muscle and second antennae flagellum in the H group. Conclusively, different inoculum levels not only affect the initial distribution of pathogens in the body but also lead to different changes in the body, indicating that the changes in pathogen distribution in the body are complex and unrelated among various tissues. Therefore, further research is needed on the immune mechanisms of *P. vannamei* against AHPND. In the overall experiment, $PirA^{Vp}$ was detected in all tissues at all time points in both experimental groups, with the average detection levels of abdominal nerve and intestine being higher than those of other tissues, indicating that both the intestine and abdominal nerve are suitable tissues for *Vibrio* attachment and proliferation, warranting further exploration of the role of abdominal nerve after infection. Although the average $PirA^{Vp}$ copy numbers in fifth pleopod and second antennae flagellum were not the highest, they were still detectable, making them potential new materials for pathogen detection in low-impact individual vitality.

Key words *Penaeus vannamei*; *Vibrio parahaemolyticus*; $PirA^{Vp}$; RT-qPCR; Tissue distribution