

中国对虾糠虾幼体病原哈氏弧菌的鉴定及毒力基因检测

张晓君 毕可然 阎斌伦 陈丽 白雪松 秦蕾

(淮海工学院海洋学院,江苏省海洋资源开发研究院,连云港 222005)

摘要 2011 年春季对江苏连云港某对虾育苗场中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 病死糠虾幼体分离到优势生长菌,对分离菌进行致病性、形态与生理生化特征及 16S rRNA 和 *gyrB* 基因同源性与系统发育分析。结果显示,引起糠虾幼体大量死亡的病原为哈氏弧菌 *Vibrio harveyi*,菌株 kx1 对中国对虾仔虾和日本对虾仔虾的半数致死量 LD_{50} 分别为 2.0×10^6 CFU/ml 和 7.0×10^5 CFU/ml。为进一步明确分离菌株毒力基因的携带情况,进行了分离鉴定的 4 株病原菌对群体效应调节基因(*luxR*)、毒力调控基因(*toxR*)、溶血素基因(*vhhA* 和 *vhhB*)、金属蛋白酶基因(*vhpA* 和 *vhpB*)、毒力相关基因(*toxS*)、鞭毛结构基因(*flaA*)及锌金属蛋白酶基因(*pap6*)共 9 种毒力基因的检测,结果表明,4 株病原菌均可检测到 *luxR*、*toxR*、*vhhA*、*vhhB* 和 *pap6* 毒力基因,扩增片段大小分别为 679、390、1324、216 和 355 bp,其他 4 种毒力基因未检测到。分离鉴定的 4 株病原哈氏弧菌携带相同的毒力基因,这些毒力基因可作为检测致病性哈氏弧菌的生物学标记。

关键词 中国对虾;糠虾幼体;哈氏弧菌;毒力基因

中图分类号 S917.1 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)03-0105-07

Identification and virulence genes detection of pathogenic *Vibrio harveyi* isolated from mysis of *Fenneropenaeus chinensis* L.

ZHANG Xiao-jun BI Ke-ran YAN Bin-lun

CHEN Li BAI Xue-song QIN Lei

(College of Ocean, Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

ABSTRACT *Vibrio harveyi* is widely distributed in the marine estuarine environments and has been widely recognized as a primary pathogen of many commercially cultured invertebrate species over the world. Breeding season of spring, 2011, the outbreak of mass mortality of mysis of *Fenneropenaeus chinensis* L. occurred in a hatchery in Lianyungang, Jiangsu Province. In this study, we isolated and identified the pathogenic bacteria, analyzed the pathogenicity of isolated strains, and detected the presence of virulence genes of isolated strains. Dominant bacteria isolated from the diseased mysis were identified based on morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, sequences similarity and phylogenicity analysis of the 16S rRNA and *gyrB* genes. The phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method, and pathogenicity of the tested strain was analyzed by bath challenge experiment on postlarvae *F. chinensis* and *P. japonicus*, and virulence

江苏省水产三项工程项目(D2013-5-4)、江苏高校优势学科建设工程资助项目和连云港市科技攻关项目(CG1134)共同资助

收稿日期:2013-05-24;接受日期:2013-08-19

作者简介:张晓君(1969-),女,教授,博士,主要从事水产动物病害及病原微生物学研究。E-mail:zxj9307@163.com, Tel:15861247889

genes of isolated strains were detected by a specific PCR assay. The characteristics of identified strains (kx1-kx4) consist with *V. harveyi*, and the 16S rRNA and *gyrB* genes of the tested strains exhibited high similarity with *V. harveyi*. Two strains (kx1 and kx2) were clustered with *V. harveyi*, which was supported by a high bootstrap value. The tested strain (kx1) was lethal to the healthy postlarvae *F. chinensis* and *P. japonicus* with the LD_{50} of 2.0×10^6 CFU/ml and 7.0×10^5 CFU/ml, respectively. The genes (*luxR*, *toxR*, *vhhA*, *vhhB* and *pap6*) existed in these four strains with gene fragments were 679 bp, 390 bp, 1324 bp, 216 bp and 355 bp, respectively. These results suggested that the diseased mysis of *F. chinensis* were infected by *V. harveyi*, and the isolated four strains have the same virulence genes, which can be used as the biomarkers to detect pathogenic *V. harveyi*.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis* L.; Mysis; *Vibrio harveyi*; Virulence gene

哈氏弧菌 *Vibrio harveyi* 广泛分布在海洋环境中,能够引起多种水生动物感染发病,对水产养殖业危害严重。该菌可引起育苗场斑节对虾 *Penaeus monodon* 幼体的大量死亡,从蚤状幼体到仔虾阶段死亡率可达 100% (Karunasagar *et al.* 1994; Lavilla-Pitogo *et al.* 1990; Liu *et al.* 1996; Pizzutto *et al.* 1995; Song *et al.* 1993; Vandenberghe *et al.* 1998); 该菌对中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 同样危害严重,尤其是可导致蚤状幼体死亡率高达 80% 以上(李军等 1998); 此外,该菌也感染双壳类(Pass *et al.* 1987)、头足类(Ramesh *et al.* 1989)、硬骨鱼类(Tendencia 2002)、软骨鱼类(房海等 2009; Grimes *et al.* 1985)。2012 年春季对虾育苗期,江苏连云港赣榆县某育苗场培育的中国对虾糠虾幼体(mysis)出现大量死亡,被感染幼体表现为活力减弱、缺乏食欲、身体混浊。经病原学检验,表明引起中国对虾糠虾幼体大量死亡的病原为哈氏弧菌。

随着水产养殖业的发展,弧菌病的暴发越来越频繁,传播速度越来越快,给全世界水产养殖业带来了巨大的经济损失。弧菌的致病性与其产生的多种毒力因子息息相关,毒力基因是产生各种毒力因子的物质基础。因此,本研究在分离检验哈氏弧菌的致病性、表型及分子特征的基础上,研究了分离检验的 4 株病原哈氏弧菌毒力基因的携带情况,为深入研究哈氏弧菌的分布、宿主范围及对水生动物的危害等相关研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 糠虾幼体发病情况及病原菌分离

2012 年 4 月,江苏连云港某育苗场中国对虾糠虾幼体发病死亡,取发病幼体,用无菌生理盐水洗涤多次,无菌操作研磨,制备成虾体组织悬浮液。取虾体组织悬浮液,划线接种于 Zobell 2216E 海水营养琼脂平板培养基,28℃ 培养 24 h 后,选取优势生长菌落进一步划线纯化后,转接 2216E 海水营养琼脂斜面,保存备用,同时转接甘油管于 -40℃ 保存。保存菌株编号为 kx1 - kx4。取虾体组织悬浮液涂片后革兰氏染色镜检细菌。

1.2 致病作用检验

选用暂养 3 d 后的健康中国对虾和日本对虾仔虾,采用浸浴的感染方式。将供试菌株(kx1)接种于普通营养肉汤,28℃ 过夜培养后作为供试菌液,菌液稀释为 2.8×10^8 、 2.8×10^7 、 2.8×10^6 、 2.8×10^5 和 2.8×10^4 CFU/ml,共 5 个浓度,以无菌营养肉汤作对照。每个试验组分别放置活力基本一致的仔虾苗 30 尾。每 2 h 观察并记录仔虾死亡情况, LD_{50} 计算参考张庆萍等(2000)的方法进行。

1.3 分离菌鉴定

分离纯化的 4 株纯培养菌分别进行革兰氏染色、氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、硝酸盐还原、OF 试验、动力、对 O/129 敏感性等理化特性测定(Brenner *et al.* 2008)。分离纯化的 4 株纯培养菌的 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因序列的 PCR 扩增及系统发育学分析参照张晓君等(2009)的方法进行。

1.4 分离菌毒力基因的检测

根据 GenBank 已登录的哈氏弧菌的毒力基因,选择群体效应调节基因(*luxR*)、毒力调控基因(*toxR*)、溶血素基因(*vhhA* 和 *vhhB*)、金属蛋白酶基因(*vhpA* 和 *vhpB*)、毒力相关基因(*toxS*)、鞭毛结构基因(*flaA*)、锌金属蛋白酶基因(*pap6*)共9种毒力基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,由上海生物工程技术公司合成(表1),以检测分离菌几种毒力基因的携带情况。

表1 毒力基因 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in search of virulence genes

靶基因 Target gene	产物大小 Product size (bp)	PCR 引物序列 PCR primers sequence (5'-3')	参考 Reference
<i>luxR</i>	679	luxR-F: ATCTTGCGGCCTGTACTG luxR-R: AGTTGGTTACTGCGGTTTGT	GenBank M55260
<i>toxR</i>	390	toxR-F: TTCTGAAGCAGCACTCAC toxR-R: TCGACTGGTGAAGACTCA	Conejero <i>et al</i> (2003)
<i>vhhA</i>	1300	vhhA-F: ATCATGAATAAAACTATTACGTTACT vhhA-R: GAAAGGATGGTTTGACAAT	Conejero <i>et al</i> (2004)
<i>vhhB</i>	216	vhhB-F: TCAGTGCCTCTCAAGTAAGA vhhB-R: GCTTGATAACACTTTGCGGT	Conejero <i>et al</i> (2004)
<i>vhpA</i>	1324	vhpA-F: TGAACGACGCCATTATT vhpA-R: CCATTGCGGAACCTTGTACC	GenBank AY630354
<i>vhpB</i>	1005	vhpB-F: GCGATGCCGACGACAAT vhpB-R: CTGCCCTGCTTCCTGTGT	GenBank AY630354
<i>toxS</i>	355	toxS-F: TCCGTTCTTTTCAGCAGTTG toxS-R: GCTGTGCTTCGGAAAAGTCT	GenBank EU240944
<i>flaA</i>	576	flaA-F: GCACCAACTCAGCGTCAG flaA-R: CGACCGCATTTTGTGAAC	GenBank AY956422
<i>pap6</i>	355	pap6-F: ACTGTGAAAGCGGTC AAC pap6-R: GCAAGGTAGCGTCAGAG	GenBank AF508306

2 结果

2.1 供试菌致病性及 LD_{50}

供试菌株(kx1)浸浴感染健康中国对虾和日本对虾仔虾苗,感染数小时后虾苗表现出行动迟缓、体色发暗、虾体较混浊,并陆续死亡,死亡情况见表2;kx1对中国对虾的 LD_{50} 为 2.0×10^6 CFU/ml, kx1对日本对虾的 LD_{50} 为 7.0×10^5 CFU/ml;感染死亡虾苗进行细菌学检验,结果分离检验到大量原感染菌,表明分离菌为引起中国对虾糠虾幼体大量死亡的病原菌。

2.2 供试菌表型特征

菌株 kx1 - kx4 理化特性一致,菌株间无差异,均为革兰氏阴性、散在、两端钝圆、直或稍弯曲、不发光的短杆菌。在 Zobell 2216E 海水营养琼脂平板培养基上形成圆形光滑、透明、稍隆起、无色、边缘整齐的菌落,在 TCBS 培养基上菌落为黄色。主要生化特性为细胞色素氧化酶、接触酶、赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶阳性,精氨酸双水解酶阴性,还原硝酸盐,所测其他理化特性结果见表3。综合 kx1 - kx4 理化特性,分离菌与弧菌属的哈氏弧菌亲缘关系最近。

表 2 分离菌 kx1 的致病性
Table 2 Pathogenicity of kx1 isolate

组别 Group	试验仔虾 Post larvae	感染尾数 Infected amount	细菌浓度 Density (CFU/ml)	感染死亡时间及死亡数 Time and amount of mortality								死亡率 Mortality rate (%)
				2 h	4 h	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h	总数 Total	
试验组 Experimental group	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	30	2.8×10^8	8	7	15	0	0	0	0	30	100
		30	2.8×10^7	3	8	12	7	0	0	0	30	100
		30	2.8×10^6	0	0	1	2	4	3	2	12	40.0
		30	2.8×10^5	0	0	0	1	1	3	2	0	23.3
		30	2.8×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	30	2.8×10^8	11	19	0	0	0	0	0	30	100
		30	2.8×10^7	8	10	12	0	0	0	0	30	100
		30	2.8×10^6	0	0	1	2	3	2	12	20	66.7
		30	2.8×10^5	0	0	0	1	2	3	6	11	36.7
		30	2.8×10^4	0	0	0	0	0	0	2	2	6.7
对照组 Control	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	30	Seawater	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		日本对虾 <i>P. japonicus</i>	30	Seawater	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3 分离菌的生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of isolates

特性 Characteristics		kx1 - kx4	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i> *	特性 Characteristics		kx1 - kx4	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i> *
形态	Cell form	杆状	杆状	松三糖	Melezitose	-	NA
革兰氏染色	Gram	-	-	鼠李糖	Rhamnose	-	-
氧化酶	Oxidase	+	+	苦杏仁苷	Amygdalin	-	NA
接触酶	Catalase	+	+	卫茅醇	Dulcitol	-	-
O-F 试验	O-F test	F	F	棉子糖	Raffinose	+	-
动力	Motility	-	v	蜜二糖	Melibiose	-	40
赖氨酸脱羧酶	Lysine decarboxylase	+	83	麦芽糖	Maltose	+	+
精氨酸双水解酶	Arginine dihydrolase	-	-	蔗糖	Sucrose	+	83
鸟氨酸脱羧酶	Ornithine decarboxylase	+	83	α-甲基-D-葡萄糖苷	α-Methyl-D-glucoside	+	-
葡萄糖产酸	D-glucose, acid	+	83	淀粉酶	Diastase	-	NA
葡萄糖产气	D-glucose, gas	-	-	DNA 酶	DNase	-	+
甘露糖	Mannose	+	+	明胶酶	Gelatinase	-	-
半乳糖	Galactose	+	67	ONPG		+	-
甘露醇	Mannitol	+	+	枸橼酸盐	Citrate	-	-
肌醇	Inositol	-	-	丙二酸盐	Malonate	-	-
山梨糖	Sorbose	-	NA	酒石酸盐	Tartrate	-	50
水杨素	Salicin	+	-	葡萄糖酸盐	Gluconate	-	NA
胆汁七叶苷	Esculin	-	-	硝酸盐还原	Nitrate reduction	+	+
侧金盏花醇	Adonitol	-	-	硫化氢	H ₂ S	-	-
纤维二糖	Cellobiose	+	+	O/129: 10 μg		S	S
粘液酸	Mucate	+	NA	150 μg		S	S
阿拉伯糖	Arabinose	-	-	NaCl 中生长: 0 g/L		-	-
山梨醇	Sorbitol	-	-	10 g/L		+	+
木糖	Xylose	-	-	30 g/L		+	+
糊精	Oextrin	+	NA	60 g/L		+	+
乳糖	Lactose	-	-				

“+”示阳性,“-”示阴性,“F”示发酵型,“S”示敏感,“v”示可变,“NA”示在原文中无记载,数字为阳性百分比。上角标*指表中数据取自 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner et al. 2008, second edition)

+, positive; -, negative; F, fermentative; S, sensitivity; v, varying; NA, not described in the original article; each number is the % positive; *, the data from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner et al. 2008, second edition)

2.3 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列的系统发育树构建

kx1 和 kx2 两株供试菌所扩增的 16S rRNA 基因序列长度分别为 1408 bp (GenBank 存取号: KC935858) 和 1410 bp (GenBank 存取号: KC935859); 所扩增的 *gyrB* 基因序列长度分别为 1192 bp (GenBank 存取号: KC935860) 和 1193 bp (GenBank 存取号: KC935861)。16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列在 NCBI 通过 Blast 进行同源性检索, 两种基因序列均与弧菌属细菌相似性较高。两种基因序列系统发育学分析构建的系统发育树如图 1 和图 2 所示, 在 16S rRNA 基因序列系统发育树中, 菌株 kx1 和 kx2 聚为一个分支, 并与哈氏弧菌及 *V. azureus* 聚为一个大的分支; 在 *gyrB* 基因序列系统发育树中, 菌株 kx1 和 kx2 聚为一个分支, 并与哈氏弧菌聚为一个大的分支。综合菌株 kx1 和 kx2 基因序列同源性及系统发育树分析结果, 分离菌与弧菌属的哈氏弧菌亲缘关系最近。

2.4 分离菌毒力基因检测结果

用设计的 9 种毒力基因的特异性引物对分离菌 (kx1 - kx4) 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳, 结果 4 株分离菌均可检测到群体效应调节基因 (*luxR*)、毒力调控基因 (*toxR*)、溶血素基因 (*vhhA* 和 *vhhB*) 和锌金属蛋白酶基因 (*pap6*), 扩增片段大小分别为 679、390、1324、216 和 355 bp; 4 株分离菌均未检测到金属蛋白酶基因 (*vhpA* 和 *vhpB*)、毒力相关基因 (*toxS*) 和鞭毛结构基因 (*flaA*), 检测结果见图 3。

3 讨论

对虾养殖是我国沿海渔业经济中的支柱产业, 在工厂化苗种生产中, 细菌性疾病发病率最高、危害最大, 一般从发病到幼体死亡只需十几个小时, 严重时 1-2 d 内发病池幼体累积死亡率达 90% 以上, 幼体病状表现为活力明显下降、游泳不活泼、趋光性弱、腹部弓起、在水中打旋、不摄食、体色变白等, 其病原主要为弧菌及气单胞菌。本次对引起中国对虾糠虾幼体大量死亡病原的检验, 经对优势生长菌 (代表菌株 kx1 - kx4) 形态特征、理化特性及分子特征的鉴定, 表明哈氏弧菌是本次糠虾幼体大量死亡的病原。选择代表菌株 kx1 进行的致病性试验, 细菌浓度为 2.8×10^8 CFU/ml 和 2.8×10^7 CFU/ml 时, 中国对虾仔虾和日本对虾仔虾均在 12 h

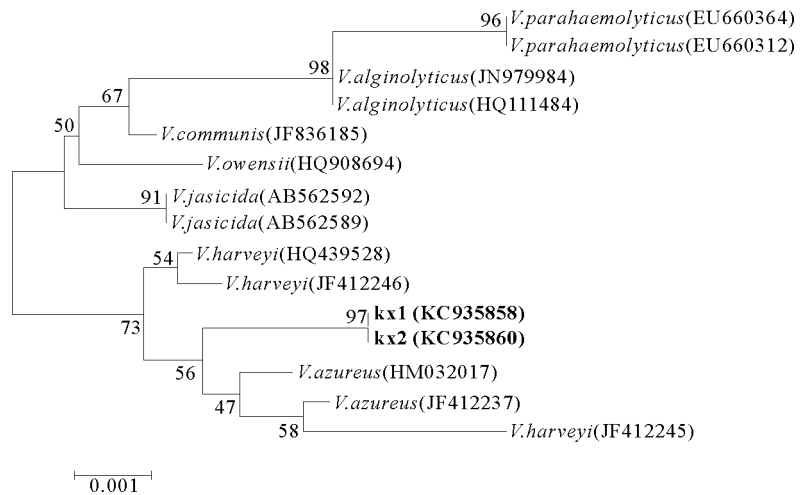


图1 kx1 和 kx2 16S rRNA 基因序列 NJ 系统发育树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree based on kx1 and kx2 16S rRNA gene sequences

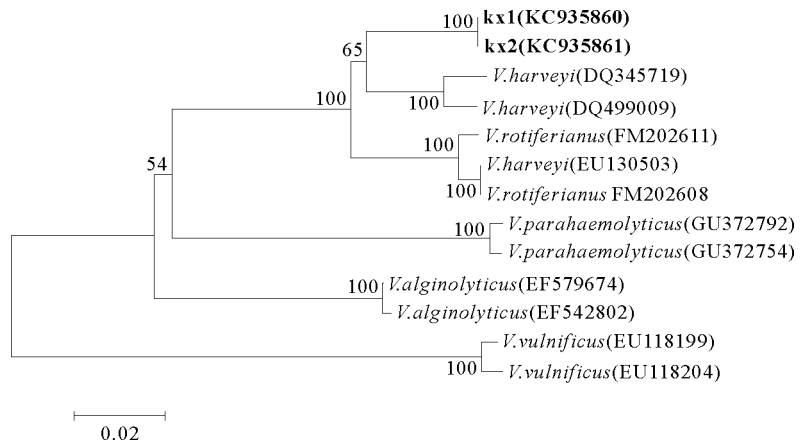


图2 kx1 和 kx2 *gyrB* 基因序列 NJ 系统发育树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on kx1 and kx2 *gyrB* gene sequences

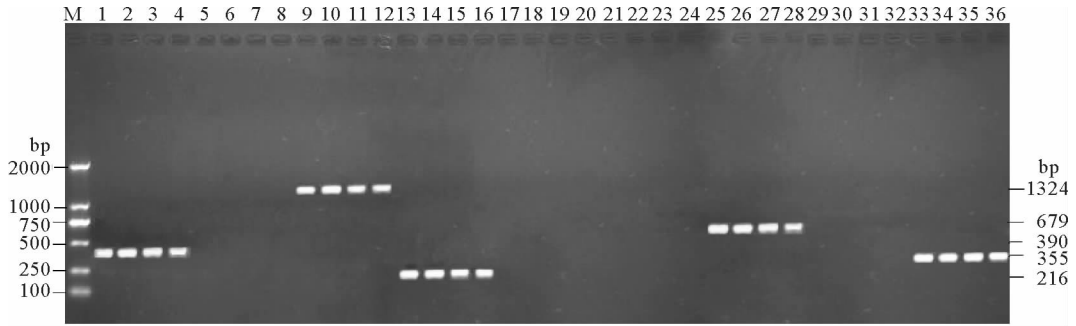


图3 哈氏弧菌毒力基因凝胶电泳结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of virulence genes of *V. harveyi*

M, DL 2000 bp marker; lane 1-4, *toxR*; lane 5-8, *toxS*; lane 9-12, *vhhA*; lane 13-16, *vhhB*; lane 17-20, *vhpA*; lane 21-24, *vhpB*; lane 25-28, *luxR*; lane 29-32, *flaA*; lane 33-36, *pap6* (strains: kx1, kx2, kx3 and kx4)

内发生 100% 的死亡;细菌浓度为 2.8×10^5 CFU/ml 时,对中国对虾仔虾和日本对虾仔虾均会造成一定程度死亡,表明分离菌的致病性及对于对虾幼体的危害。

多数弧菌生活在水体环境中,在进化过程中,部分菌株不断从外界获得有利于在宿主体内定居与繁殖的遗传因子,从而发展成毒力株或致病株。现已证实,不同种间存在相同的毒力基因,相同的种内也存在不同的毒力基因,毒力基因或相关基因的转移是导致某些无毒株转变为重要的有毒株及水环境中不断出现弧菌新病原的重要原因(谢珍玉等 2005)。因此本研究对分离鉴定的 4 株病原哈氏弧菌进行了部分毒力基因的检测,以进一步证实分离菌株的致病性,并为发展毒力基因检测与毒力菌株的鉴定提供相关资料,以便及时有效地预防弧菌传染病的大面积暴发。

目前哈氏弧菌的毒力因子及毒力基因尚未完全揭示,已有报道弧菌间的毒力基因可水平传递(Waldor *et al.* 1996)。哈氏弧菌的 *luxR* 基因是群体效应的主要调控基因(Henke *et al.* 2004);*toxR* 基因参与调控弧菌的一些主要毒力基因和外膜蛋白的表达,并存在于哈氏弧菌中(Franco *et al.* 2006);溶血素对宿主组织具有细胞毒性及溶血活性,存在于多数弧菌中并对宿主造成严重损伤(Chattopadhyay *et al.* 2003);金属蛋白酶是哈氏弧菌主要蛋白酶之一,亦是重要的毒力因子(Won *et al.* 2008;Zhang *et al.* 2008);*toxS* 基因参与调节 *ctx* 启动子的表达,是一种毒力相关基因(Miller *et al.* 1989);鞭毛对一些细菌毒力起重要作用,每一个亚单位对于鞭毛的形成都是必要的(McCarter 1995)。因此,本研究对分离鉴定的 4 株哈氏弧菌进行了群体效应调控基因(*luxR*)、毒力调控基因(*toxR*)、溶血素基因(*vhhA* 和 *vhhB*)、金属蛋白酶基因(*vhpA* 和 *vhpB*)、毒力相关基因(*toxS*)、鞭毛结构基因(*flaA*)、锌金属蛋白酶基因(*pap6*) 9 种毒力相关基因检测,结果表明,4 株病原哈氏弧菌均可检测到群体效应调控基因、毒力调控基因、溶血素基因 *vhhA* 和 *vhhB* 和锌金属蛋白酶基因,未检测到其他 4 种毒力基因,初步表明 4 株病原哈氏弧菌携带相同的毒力基因,这些毒力基因可作为检测致病性哈氏弧菌的生物学标记,并为分子流行病学研究奠定基础。

参 考 文 献

- 李军,徐怀恕. 1998. 中国对虾幼体致病菌哈维氏弧菌的分离及其生物学特性研究. 海洋与湖沼, 29(4):353-361
- 张庆萍,黄晓辉,谢海棠. 2000. 计算 LD50 的查表法和经验估算法. 中国临床药理学和治疗学, 5(2): 162-163
- 张晓君,陈翠珍,阎斌伦,房海,秦国民,徐静. 2009. 凡纳滨对虾病原副溶血弧菌的表型及分子特征. 海洋与湖沼, 40(5): 654-661
- 房海,秦国民,陈翠珍,张晓君,葛慕湘. 2009. 长鳍真鲨源哈氏弧菌的主要生物学性状研究. 渔业科学进展, 30(1):19-25
- 谢珍玉,胡超群. 2005. 弧菌毒力基因水平转移与进化的研究进展. 热带海洋学报, 24(3):86-95
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2008. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition). Volume 2. Springer, pp: 546-551

- Chattopadhyay K, Banerjee KK. 2003. Unfolding of *Vibrio cholerae* hemolysin induces oligomerization of the toxin monomer. *J Biol Chem* 278(40):38470-38475
- Conejero MJ, Hedreyda CT. 2003. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection. *J Appl Microbiol* 95(3):602-611
- Conejero MJ, Hedreyda CT. 2004. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*. *J Gen Appl Microbiol* 50(3):137-142
- Franco PF, Hedreyda CT. 2006. Amplification and sequence analysis of the full length *toxR* gene in *Vibrio harveyi*. *J Gen Appl Microbiol* 52(5):281-287
- Grimes DJ, Brayton P, Colwell RR and 1 other. 1985. *Vibriosis* as autochthonous flora of neritic sharks. *Syst Appl Microbiol* 6:221-226
- Henke JM, Bassler BL. 2004. Three parallel quorum sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 186(20):6902-6914
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR and 1 other. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128(3-4):203-209
- Lavilla-Pitogo CR, Baticados MCL, Cruz-Lacierda ER and 1 other. 1990. Occurrence of the luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91(1-2):1-13
- Liu PC, Lee KK, Yii KC and 2 others. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr Microbiol* 33(2):129-132
- McCarter LL. 1995. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 177(6):1595-1609
- Miller VL, DiRita VJ, Mekalanos JJ. 1989. Identification of *toxS*, a regulatory gene whose product enhances *toxR*-mediated activation of the cholera toxin promoter. *J Bacteriol* 171(3):1288-1293
- Pass D, Dybdahl R, Mannion M. 1987. Investigation into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65(2):149-169
- Pizzutto M, Hirst RG. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis Aquat Organ* 21:61-68
- Ramesh A, Venugopalan VK. 1989. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish. *J Appl Bacteriol* 66(6):529-533
- Song YL, Lee SP. 1993. Characterization of ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *B I Zool Acad Sinica* 32:217-220
- Tendencia EA. 2002. *Vibrio harveyi* isolated from caged cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquac Res* 33(6):455-458
- Vandenbergh J, Li Y, Verdonk L and 4 others. 1998. *Vibriosis* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea; Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169(1-2):121-132
- Waldor MK, Mekalanos JJ. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272(5270):1910-1914
- Won KM, Park SI. 2008. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture* 285(1-4):8-13
- Zhang W, Sun K, Cheng S and 1 other. 2008. Characterization of DegQVh, a Serine protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Appl Environ Microbiol* 74(20):6254-6262