

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20170426001

http://www.yykxjz.cn/

程东远, 邱亮, 宋增磊, 万晓媛, 董宣, 谢国驹, 黄健. 凡纳滨对虾感染虾肝肠胞虫的群体及组织间差异性分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 83-92

Cheng DY, Qiu L, Song ZL, Wan XY, Dong X, Xie GS, Huang J. Differences between populations and tissues of *Litopenaeus vannamei* infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 83-92

凡纳滨对虾感染虾肝肠胞虫的群体 及组织间差异性分析*

程东远^{1,2} 邱亮^{1,2} 宋增磊^{1,2} 万晓媛¹
董宣¹ 谢国驹¹ 黄健^{1,2①}

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 对来自河北黄骅(HH)、山东平度(PD)、江苏吴江(WJ)和山东日照(RZ)的 4 个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体进行了对虾生长参数测量, 用 TaqMan qPCR 检测了凡纳滨对虾各群体的肝胰腺组织中和 RZ 群体多种组织中的虾肝肠胞虫数量(Amount of *Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)。结果显示, 在主要生长相关参数中, RZ 群体最优, 该群体 EHP 载量也最低。不同群体的样本数 EHP 对数直方图的模式存在差异, HH 和 PD 群体的 EHP 对数呈双峰分布, 而 WJ 和 RZ 群体的 EHP 对数呈单峰分布, 代表 EHP 在不同群体中可能存在不同的传播模式。EHP 对数呈单峰分布的群体或从多峰分布的群体中分离出的高 EHP 对数子群体的对虾体长或体重与 EHP 对数呈显著的负相关。RZ 群体中, 各个体不同组织中 EHP 从高到低的顺序依次是肝胰腺>中肠>血淋巴>鳃>肌肉。肝胰腺、中肠和鳃 3 个组织中 EHP 对数相互间的相关性为 99.9%的极显著水平($P<0.001$); 除了中肠与血淋巴和肝胰腺与血淋巴以外, 其余组织间 EHP 对数的相关性也达到极显著($P<0.01$)或显著($P<0.05$)水平。用 DIG 标记的 EHP 探针对于肝胰腺、肌肉、鳃、肠道组织的原位杂交显示, 肝胰腺是主要的 EHP 感染组织, 其他组织中杂交信号较弱, 但各组织中有少数细胞的 EHP 易感。

关键词 凡纳滨对虾; 虾肝肠胞虫; 生长参数; 原位杂交

中图分类号 S945 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)04-0083-10

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 菌界(Fungi)、微孢子虫门(Microsporidia)、单倍期纲是泰国 Tourtip 等(2009)描述的微孢子虫新种, 属于真 (Haplophasea)、壶孢目(Chytridiopsida)、肠胞虫科

* 中国东盟海上合作基金项目(2016-2018)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山科技创新项目(2015ASKJ02)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、948 计划(2016-X56)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016-2018), Project of the Aoshan Science and Technology Innovation Program of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), China Agriculture Research System (CARS-47), 948 Program (2016-X56), and the Construction Programme for Distinguished Taishan Scholars of Shandong Province of China]. 程东远: E-mail: cheng_dong_yuan@163.com

① 通讯作者: 黄健, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-26, 收修改稿日期: 2017-06-01

(Enterocytozoonidae)、肠胞虫属 (*Enterocytozoon*) (鲁兴萌等, 1999; Samtom, 2001; Tang *et al.*, 2015), 严格细胞内寄生(Lom *et al.*, 2002; Phelps *et al.*, 2007)。自 2003 年以来, 泰国养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*) 出现生长缓慢综合征(MSGS), 造成了严重的经济损失(Chayaburakul *et al.*, 2004)。Tourtip 等(2009)在生长缓慢的斑节对虾肝胰腺中检测到 EHP, 但感染 EHP 在组织病理学上难以诊断, 重度感染的对虾肝胰腺在常规的苏木精-伊红染色下, 很难观察到特征性的病理变化, 而通过原位杂交则能显示凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)感染 EHP 后, 其肝胰腺小管上皮细胞中存在明显杂交信号(Tang *et al.*, 2015)。感染 EHP 的凡纳滨对虾肝胰腺、粪便及养殖对虾水体能经 PCR 检测检出 EHP 阳性(Han *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016; Rajendran *et al.*, 2016), 其肝胰腺、鳃、血淋巴、肠、心脏、肌肉组织也均可检测到 EHP 阳性(Han *et al.*, 2016; Santhoshkumar *et al.*, 2016; 骆云慧等, 2016), 但不同组织中 EHP 载量的差异及相互关系还不明确。

中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室检测发现, 在我国养殖凡纳滨对虾中, 自 2013 年起有很高的 EHP 阳性率, 刘珍等(2016)建立了 EHP 的 SYBR Green I 实时荧光定量检测方法。对 3 批凡纳滨对虾样品检测表明, EHP 与对虾生长率呈一定的负相关关系, 肝胰腺中 EHP 在 10^3 copies/ng DNA 以上可能代表较高的风险。而 EHP 载量较低时, 则 EHP 感染与对虾生长的相关性尚不明确。目前, 对 EHP 的检测多以肝胰腺为目标组织, 其他组织 EHP 检测有效性不明。因此, 本研究对不同自然感染的凡纳滨对虾群体的 EHP 与生长相关性开展进一步研究, 并对不同组织 EHP 载量的差异进行定量检测和原位杂交验证。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源

于 2016 年 6 月 26 日、7 月 20 日、9 月 14 日和 9 月 20 日自河北黄骅(HH)、山东平度(PD)、江苏吴江(WJ)和山东日照(RZ) 4 个凡纳滨对虾养殖场分别

采集放苗养殖 40~80 d 的凡纳滨对虾样品共 274 尾(表 1)。其中, HH 群体养殖时间为 54 d, PD 群体养殖时间为 60 d, WJ 群体养殖时间为 40 d, 3 个群体均表现为生长缓慢, 个体差异较大; RZ 群体养殖时间为 80 d, 在 4 个群体中养殖期最长, 生长接近正常。

上述 HH、PD 和 WJ 群体样品为现场取样, 保存于 3 倍体积的 95%乙醇中, 带回实验室进行体长(L)和体重(W)测量。RZ 群体凡纳滨对虾装于塑料袋中, 充纯氧后运送至实验室, 经暂养后, 抽取对虾血淋巴至 1.5 ml 离心管中, 置于 -80°C 冰箱中保存。将对虾沿中线剖为两半, 一半用置于 Davideson's AFA 固定液(Bell *et al.*, 1998)中固定 24 h, 再保存于 70%乙醇中; 另一半分别取凡纳滨对虾的整个肝胰腺、中肠、第 1 腹节肌肉、鳃丝, 置于 1.5 ml 离心管中, 于 -80°C 冰箱保存。

1.2 群体生长相关参数计算方法

为了对不同放苗时间的各群体进行生长比较, 根据各群体放苗后的养殖天数(T), 假定放苗时平均体长(L_0)为 1 cm, 并用体重指数 $P_i=W \times L^{-3}$ 的关系估计放苗时平均体重(W_0), 推算各群体的体长日增长率(Daily growth rate of length, DGL, %/d)和体重的日增长率(Daily growth rate of weight, DGW, %/d)。公式如下:

$$\begin{aligned} \text{DGL} &= (L-L_0)/(L_0 \times T) \times 100\% \\ \text{DGW} &= (W-W_0)/(W_0 \times T) \times 100\% \end{aligned}$$

1.3 样品核酸提取

将乙醇保存的样品倒去乙醇, 用无 RNase 水冲洗后充分研磨; -80°C 冰箱保存的样品置于冰上融化后充分研磨。取 30 mg 研磨匀浆液, 用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取 DNA。用核酸分析仪(Nanodrop 2000c, Thermo Scientific)进行浓度测定, 于 -20°C 冰箱保存。

1.4 EHP 定量标准制备

取实验室制备的 EHP 标准重组质粒菌株(Liu *et al.*, 2017), 接种到 1 ml LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 $100 \mu\text{g/ml}$), 37°C 恒温培养箱中培养 4~5 h, 再按 1% 的量接种到 5 ml LB 培养基。置于 37°C 恒温培养

表 1 对虾群体样品采集信息
Tab.1 The sampling information of shrimp populations

项目 Items	对虾群体 Shrimp populations			
	河北黄骅(HH) Huanghua, Hebei	山东平度(PD) Pingdu, Shandong	江苏吴江(WJ) Wujiang, Jiangsu	山东日照(RZ) Rizhao, Shandong
养殖时间 Cultivated time (d)	54	60	40	80
样本数量 Shrimp number (ind.)	54	42	132	48

箱中, 200 r/min 摇瓶培养约 12 h。取 4 ml 培养液, 用 Mini BEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0(TaKaRa, 大连)质粒小提试剂盒按说明书方法提取质粒, 所提取质粒溶解在 50 μ l Elution Buffer 中。用核酸分析仪 (Nanodrop 2000c, Thermo)测定提取质粒样品的核酸浓度, 计算质粒拷贝数。按 10 倍梯度稀释成 $10^8 \sim 10^0$ copies/ μ l 的梯度作为 TaqMan qPCR 标准品。

1.5 EHP 的 TaqMan qPCR 检测

采用 Liu 等(2017)建立的 TaqMan 实时荧光定量检测方法进行 EHP 定量检测。定量所用引物和探针序列分别为 F168 (5'-AGT AAA CTA TGC CGA CAA-3')、R168 (5'-GCG TTG AGT TAA ATT AAG C-3')和 TaqMan 探针(5'-FAM-TCC TGG TAG TGT CCT TCC GT-TAMRA-3')。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 实时荧光定量反应体系为 20 μ l 包含 10 μ l 2 \times Premix Ex TaqTM Probe qPCR 体系 (TaKaRa, 大连), 0.8 μ l 10 μ mol/L 引物 F186, 0.8 μ l 10 μ mol/L 引物 R186, 0.4 μ l 10 μ mol/L TaqMan 探针, 7 μ l 无 RNase 水, 1 μ l 模板 DNA。扩增反应在实时荧光定量 PCR 仪(CFX96, BIO-Rad)中进行, 反应扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性后, 95 $^{\circ}$ C 5 s 和 60 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 40 个循环后终止反应。

1.6 EHP 原位杂交用 DIG 探针制备

根据 GenBank 中的 EHP SSU rDNA (KF362129) 序列, 用 Primer Premier 5.0 设计了原位杂交探针合成引物, Probe-F (5'-AGC CAT TGA GTT TGT TGA-3') 和 Probe-R (5'-TTT CGC CTC CGT TG-3'), 引物序列送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增产物为 144 bp。在 50 μ l 反应体系中, 包含 0.25 μ l Ex Taq version 2.0 (TaKaRa, 大连), 5 μ l 10 \times Buffer (TaKaRa, 大连), 3 μ l 20 mmol/L MgCl₂, 5 μ l DIG-dNTP Mix (Roche, 上海), 2 μ l 10 μ mol/L 引物 Probe-F, 2 μ l

10 μ mol/L 引物 Probe-R, 31.75 μ l 无 RNase 水, 1 μ l DNA 模板。反应在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 于 94 $^{\circ}$ C 30 s, 47 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 2 min 延伸。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.7 原位杂交

原位杂交基本按照 Bruce 等(1993)的方法进行。Davidson's AFA 固定后的组织样品经脱水、透明和石蜡包埋, 制备 4 μ m 石蜡切片, 于 65 $^{\circ}$ C 烘片 4 h, 切片复水处理, 经 10 μ g/ml 蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min, 再经 0.4%预冷的甲醛固定 5 min。于 42 $^{\circ}$ C 进行预杂交 30 min, 与 DIG 标记探针于 42 $^{\circ}$ C 杂交 12 h, 经漂洗和封闭后, 用 1:1000 碱性磷酸酶偶联的抗 DIG 抗体(Roche, 上海)于 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 再经漂洗后, 用 NBT/BCIP 避光显色 2~3 h, 终止后用 0.5% Bismarck Brown Y 复染, 经脱水、透明和封片, 在显微镜下观察。

1.8 数据分析

相关性分析采用 Microsoft Excel 的数据分析加载项计算数据间相关系数(R), 根据不同样本数和不同显著性水平的相关系数临界值, 判断相关性的显著性水平。未特别注明的, 以 $P < 0.05$ 为显著差异水平, 以 $P < 0.01$ 为差异极显著水平。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾群体生长特征

对各群体进行体长和体重测量(表 2)。4 个群体体长差异从大到小依次为 PD>HH>RZ>WJ, 体长日增长率从小到大依次为 WJ<HH<PD~RZ, 其中, WJ, HH 和 PD 群体差异显著($P < 0.05$), PD 和 RZ 群体无显著差异($P > 0.05$)。从体重测量数据来看, 4 个群体体重差异从大到小依次为 RZ>PD>HH>WJ, 体重日

表 2 对虾群体样品生物学信息

Tab.2 The biological information of samples from shrimp populations

项目 Items	对虾群体 Shrimp populations			
	黄骅群体 HH	平度群体 PD	吴江群体 WJ	日照群体 RZ
体长 Body length (cm)	4.59 \pm 0.93	5.90 \pm 1.05	2.35 \pm 0.46	7.95 \pm 0.88
体长日增长率 Length daily growth rate (%/d)	6.60 \pm 1.70 ^a	8.20 \pm 1.80 ^b	3.40 \pm 1.20 ^c	8.70 \pm 1.10 ^b
体重 Body weight (g)	1.06 \pm 0.71	2.09 \pm 1.09	0.20 \pm 0.10	5.29 \pm 1.63
体重日增长率 Weight daily growth rate (%/d)	2.00 \pm 1.40 ^a	3.60 \pm 1.90 ^b	0.32 \pm 0.18 ^c	6.40 \pm 2.00 ^d
体重指数 Ponderal index ($\times 10^{-3}$ g/cm ³)	9.67 \pm 2.04 ^a	9.67 \pm 2.30 ^{ac}	14.72 \pm 3.64 ^b	10.26 \pm 0.84 ^c

注: 标注不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)

Note: Data in the same line marked with different lowercases means significant difference ($P < 0.05$)

增长率从小到大依次为 WJ<HH<PD<RZ。从体重指数来看,体重指数差异从大到小依次是 WJ>PD>HH>RZ。

2.2 不同群体中 EHP 的 TaqMan qPCR 检测

对 4 个凡纳滨对虾群体样品进行实时荧光定量检测。结果显示,4 个凡纳滨对虾群体样品肝胰腺中 EHP 载量和阳性率各不相同(表 3)。HH 群体阳性检出率为 77.8%,考虑到 qPCR 的灵敏度,将阴性样品的 EHP

对数值归零,得 4 个群体中阳性率从高到低顺序分别为 WJ>RZ>PD>HH,总平均 EHP 对数从高到低的顺序是 PD~WJ>HH~RZ,其中,PD 与 WJ 无显著差异,HH 和 RZ 无显著差异,PD、WJ 群体与 HH、RZ 群间差异显著。

2.3 各群体 EHP 的分布特征

对 4 个群体 EHP 对数的分布进行分析(图 1)。结果显示,HH 群体的 EHP 对数分布为 0.11~3.42,呈

表 3 4 个养殖凡纳滨对虾群体中肝胰腺 EHP 检出情况
Tab.3 EHP detection in hepatopancreas from 4 populations of farmed *L. vannamei*

项目 Items	对虾群体 Shrimp populations			
	黄骅群体 HH	平度群体 PD	吴江群体 WJ	日照群体 RZ
EHP 范围 Range of EHP (copies/ng DNA)	$10^{0.11} \sim 10^{3.42}$	$10^{0.88} \sim 10^{5.88}$	$10^{0.52} \sim 10^{4.40}$	$10^{0.19} \sim 10^{2.62}$
EHP 对数 Log(EHP)	1.40 ± 1.11^a	2.95 ± 1.81^b	2.84 ± 0.63^b	1.18 ± 0.76^a
阳性率 Positive percentage (%)	77.8	88.1	98.5	95.8

EHP 指每 ng 组织总 DNA 中 EHP SSU rDNA 拷贝数,下表同

EHP means copies of EHP SSU rDNA per ng tissue total DNA, the same as below

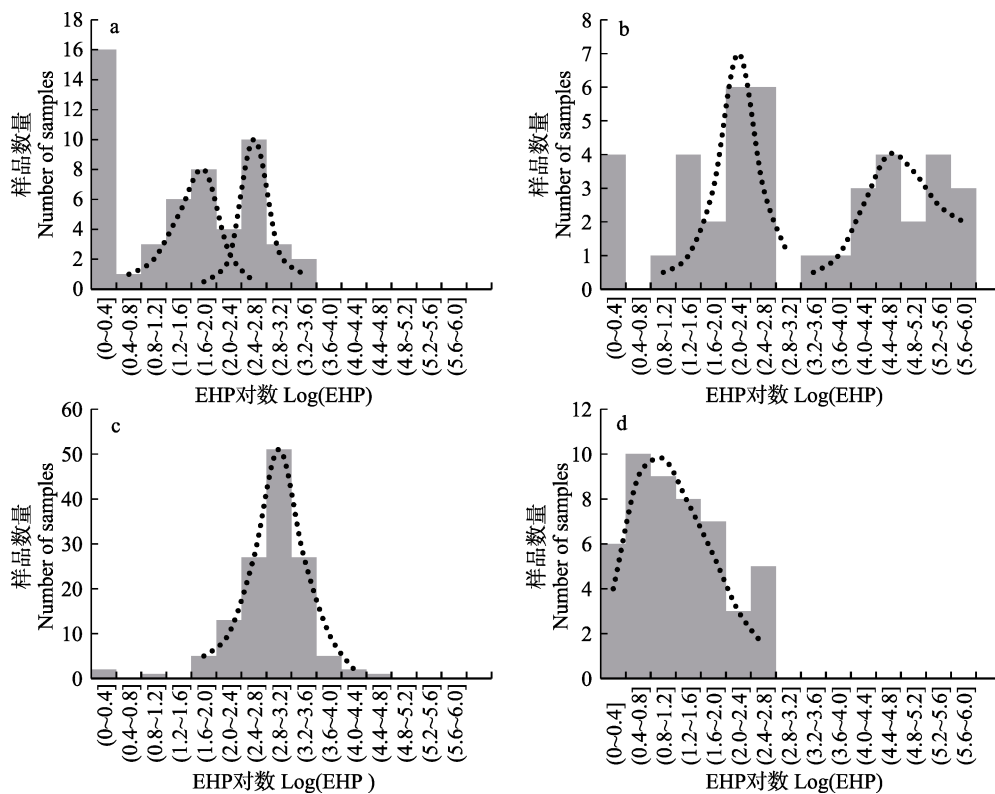


图 1 各群体感染 EHP 水平的分布

Fig.1 Distribution of quantity of EHP infection in different populations

a: 黄骅群体; b: 平度群体; c: 吴江群体; d: 日照群体。

EHP 指每 ng 组织总 DNA 中 EHP SSU rDNA 拷贝数。灰色方块为实际样本数统计,黑色虚线为分布趋势
a: HH; b: PD; c: WJ; d: RZ.

EHP means copies of EHP SSU rDNA per ng tissue total DNA, the same as below. Gray blocks are based on actual statistics, while dotted black lines show distribution trends

近正态分布,但在分布中的值为 2.0~2.4 范围内的数量降低,其分布呈 2 个有所重叠的双峰状态(图 1a); PD 群体的阳性样本的 EHP 对数分布为 0.88~5.88,但分布峰值为 0.8~2.8 和 3.2~6.0 2 个完全分离的区域(图 1b); WJ 群体的阳性样本的 EHP 对数分布在 0.52~4.40 范围,为标准的正态分布,在 2.8~3.2 位置呈单峰值(图 1c); RZ 群体阳性样本的 EHP 对数分布为 0.19~2.62,呈类泊松分布,峰值位于 0.4~0.8 位置(图 1d)。从主要样本的 EHP 分布范围的宽度来看,PD>HH>RZ>WJ, WJ 和 RZ 群体中,各个体的 EHP 感染水平较为接近,而 PD 和 HH 群体中,各个体的 EHP 感染水平差异大。

2.4 不同群体 EHP 与生长参数的相关性

分别对 4 个群体凡纳滨对虾肝胰腺 EHP 对数与对虾的体长、体重和体重指数等生长参数进行线性相关性分析(表 4)。

HH 群体样品数量 $n=54$,显著相关 $R_{0.05}=\pm 0.268$, EHP 对数与体长、体重和体重指数的相关性均无 95% 的显著性意义,其中, EHP 对数与体重指数 $R=0.2155$,介于 $R_{0.2}=0.177$ 和 $R_{0.1}=0.226$ 之间,达到 80% 显著性水平。根据该群体 EHP 双峰分布,将其分为 EHP 低的子群 HH1 ($n=32$) 和 EHP 高的子群 HH2 ($n=22$), HH2 的 EHP 对数与体长和体重的相关系数分别为 -0.452 和 -0.517 ,均达到了显著相关水平($R_{0.05}=0.423, P<0.05$) (图 2a 和图 2b)。

PD 群体样品数量 $n=42$,显著相关 $R_{0.05}=\pm 0.304$, EHP 对数与体长、体重和体重指数均无显著相关,其中, EHP 对数与体长和体重相关系数分别为 -0.2174 和 -0.2280 ,介于 $R_{0.1}=-0.257$ 和 $R_{0.2}=-0.202$ 之间,负相关性具有 80% 显著性水平($P<0.01$)。根据该群体 EHP 双峰分布,将该群体分为 EHP 低的子群 PD1 ($n=22$) 和 EHP 高的子群 PD2 ($n=20$), PD2 的 EHP 对数与体

长和体重的相关系数分别为 -0.377 和 -0.467 ,体重相关性达到 $R_{0.05}=-0.444$ 的 95% 显著性水平($P<0.05$),体长相关性接近 90% 显著性水平(图 2c 和图 2d)。

WJ 群体样品数量 $n=132$,显著相关 $R_{0.05}=\pm 0.171$, EHP 对数与 3 个生长指数的相关系数均未达到 95% 的显著性水平($P>0.05$),其中, EHP 对数与体重的相关系数 $R=-0.1635<R_{0.1}=-0.144$,具有 90% 的显著性水平($P<0.01$)(图 2e 和图 2f)。

RZ 群体样品数量 $n=48$,显著相关 $R_{0.05}=\pm 0.285$,其中, EHP 对数与对虾体长 $R=-0.2949$,表明该群体的 EHP 与体长存在显著负相关性($P<0.05$), EHP 与体重的相关系数为 $R=-0.2782<R_{0.1}=-0.240$,负相关性具有 90% 的显著性水平($P<0.01$), EHP 与体重指数的系数 $R=-0.1909<R_{0.2}=-0.188$,负相关性具有 80% 的显著性水平($P<0.2$)(图 2g 和图 2h)。

2.5 不同组织中 EHP 的 TaqMan qPCR 检测

分别对 RZ 群体样品的肝胰腺、肠道、肌肉、血淋巴和鳃 5 种组织进行实时荧光定量检测,检测结果显示,该群体 5 种组织中 EHP 载量各不相同,且 5 种组织中 EHP 阳性率也有差异(表 5)。其中,肝胰腺的 EHP 最高,阳性率也最高;其次是中肠, EHP 对数是肝胰腺的 84.1%;再次是血淋巴, EHP 对数是肝胰腺的 76.2%;鳃 EHP 对数是肝胰腺的 62.7%,其阳性率最低;肌肉的 EHP 对数是肝胰腺的 15.1%。

2.6 不同组织间 EHP 载量的关系

对 RZ 群体各个体的 5 种组织中的 EHP 对数进行组织间的相关性分析(表 6)。根据 RZ 群体的 48 个样品,确定 95.0%、99.0%、99.5% 和 99.9% 的显著性水平的相关系数 $R_{0.05}$ 分别为 0.285、0.368、0.399 和 0.460。相关性分析表明,不同组织之间的 EHP 均有正相关趋势,从 R 值大小来判断,肝胰腺、中肠和鳃

表 4 4 个养殖凡纳滨对虾群体中肝胰腺 EHP 与生长指标的相关性分析

Tab.4 Correlation analysis between EHP in hepatopancreas and growth indexes of 4 populations of farmed *L. vannamei*

相关系数 Correlation index		EHP 对数 Log(EHP)							
		HH ($n=54$)	HH1 ($n=32$)	HH2 ($n=22$)	PD ($n=42$)	PD1 ($n=22$)	PD2 ($n=20$)	WJ ($n=132$)	RZ ($n=48$)
体长	Body length (cm)	0.146	-0.073	-0.452 ^{0.05}	-0.217	-0.208	-0.377 ^{0.1}	-0.083	-0.295 ^{0.05}
体重	Weight (g)	0.074	-0.151	-0.517 ^{0.02}	-0.228	-0.223	-0.467 ^{0.05}	-0.164 ^{0.1}	-0.278 ^{0.1}
体重指数	Ponderal index (g)	0.216	0.109	-0.126	0.054	0.175	0.152	-0.047	0.191

注:标注 0.02 的数据表示有 98% 的显著相关性($P<0.02$),标注 0.05 的数据表示有 95% 的显著相关性($P<0.05$),标注 0.1 的数据表示相关的显著性水平达到 90% ($P<0.1$),未标注数据表示无显著性差异($P>0.1$)

Note: Data marked with 0.02 means 98% significant relationship ($P>0.02$); data marked with 0.05 means 95% significant relationship ($P>0.05$); data marked with 0.1 means 90% significant relationship ($P<0.1$); data without superscript means no significant relationship ($P>0.1$)

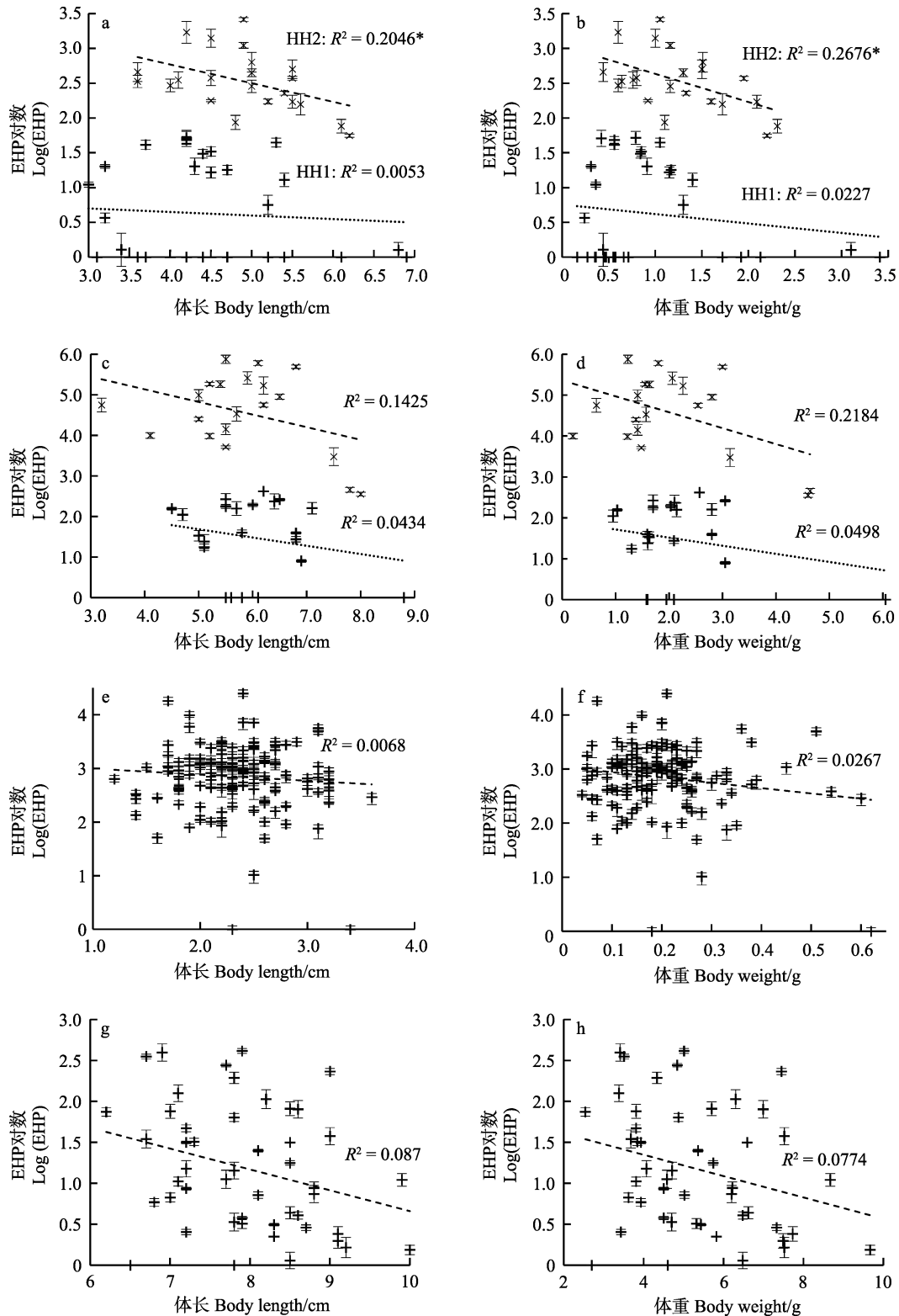


图 2 4 个养殖凡纳滨对虾群体中肝胰腺 EHP 与体长和体重的相关性
 Fig. 2 Correlation of logarithmic EHP in hepatopancreas to body length and body weight of 4 populations of farmed *L. vannamei*

a, b: HH 群体; c, d: PD 群体; e, f: WJ 群体; g, h: RZ 群体; 标注*为 95%显著相关性($P < 0.05$)
 a, b: Population HH; c, d: Population PD; e, f: Population WJ; g, h: Population RZ;
 Data marked with * means 95% significant correlation ($P < 0.05$)

表 5 RZ 群体凡纳滨对虾各组织中 EHP 载量和阳性率
Tab.5 The detection of EHP from the tissue of RZ population of *L. vannamei*

组织 Tissues	肝胰腺 Hepatopancreas	中肠 Midgut	肌肉 Muscle	血淋巴 Emolymph	鳃 Gills
EHP 对数 Log(EHP)	1.26±0.72	1.06±0.65	0.19±0.16	0.96±0.50	0.79±0.47
阳性率 Positive percentage(%)	95.00	79.00	40.00	67.00	38.00

表 6 不同组织 EHP 对数间的相关性
Tab.6 Relationship of logarithmic EHP between different tissues

组织间 Tissues	肝胰腺 Hepatopancreas	中肠 Midgut	肌肉 Muscle	血淋巴 Hemolymph	鳃 Gills
肝胰腺 Hepatopancreas	1	0.4702 ^{0.001}	0.3872 ^{0.05}	0.2401	0.6735 ^{0.001}
中肠 Midgut		1	0.4301 ^{0.005}	0.3041 ^{0.05}	0.5169 ^{0.001}
肌肉 Muscle			1	0.3041 ^{0.05}	0.3927 ^{0.01}
血淋巴 Hemolymph				1	0.1329
鳃 Gills					1

注: 标注 0.001 的数据表示有 99.9% 的极显著相关性 ($P < 0.001$), 标注 0.005 的数据表示有 99.5% 的极显著相关性 ($P < 0.005$), 标注 0.01 的数据表示有 99.0% 的极显著相关性 ($P < 0.01$), 标注 0.05 的数据表示有 95.0% 的显著相关性 ($P < 0.05$)

Note: Data marked with 0.001 means 99.9% highly significant relationship ($P < 0.001$); data marked with 0.005 means 99.5% highly significant relationship ($P < 0.005$); data marked with 0.01 means 99.0% highly significant relationship ($P < 0.01$); data marked with 0.05 means 95.0% significant relationship ($P < 0.05$)

3 种组织相互之间的 EHP 对数相关性最强, 超过 99.9% 的显著性水平, 其他依次为肠道与肌肉、鳃与肌肉、肝胰腺与肌肉、肌肉与血淋巴、肠道与血淋巴等组织之间的 EHP 对数, 这些均有极显著相关性; 肝胰腺与血淋巴和鳃与血淋巴的 EHP 对数的相关性没有达到 95.0% 的显著性水平。

2.7 不同组织中 EHP 的感染情况

取 RZ 群体不同组织进行原位杂交。结果显示, EHP 阴性样品没有杂交信号, EHP 阳性样品表现出杂交信号, 对照样品没有出现任何杂交信号, 表明所用的 EHP 探针杂交特异性良好。肝胰腺、肌肉、鳃、中肠中均可观察到杂交信号, 在这些组织中, 肝胰腺组织切片杂交信号最多且较强, 视野中大约 5%~10% 的细胞呈现阳性; 肌肉和鳃组织中杂交信号较少且较弱; 肠道中仅在中肠部位观察到杂交信号, 中肠内容物的杂交信号强, 中肠上皮细胞内的杂交信号弱 (图 3)。

3 讨论

本实验室前期对虾肝肠胞虫与凡纳滨对虾生长的相关性已经有相关研究。结果显示, EHP 在 10^3 copies/ng HP DNA 以上时, 表现出较高的风险水平, 且与对虾的生物学生长呈现一定的负相关性, 但在较低的差异范围内, EHP 与凡纳滨对虾生长的相关性不显著。本研究分别从河北黄骅、山东平度、江苏吴江和山东日照采集到 4 个凡纳滨对虾群体, 其中, 在生

长相关各参数上 RZ 群体最优。qPCR 测定表明, RZ 群体肝胰腺 EHP 也是最低的。对 EHP 对数的分布进行统计表明, WJ、RZ 群体的 EHP 对数分布为单峰, 各个体的 EHP 载量接近; 而 HH、PD 群体分布为双峰, 各个体的 EHP 载量差异大。这种分布可能提示 WJ、RZ 群体主要是单一感染, 而 HH、PD 群体可能存在群体内 2 次或多次传播。对群内 EHP 与凡纳滨对虾生长参数的相关性分析表明, RZ 群体的肝胰腺 EHP 对数与对虾体长呈现显著的负相关性 ($P < 0.05$), 与对虾体重也呈较显著的负相关性 ($P < 0.1$), WJ 群体的 EHP 对数与体重呈现较显著的负相关性 ($P < 0.1$), 而 HH 和 PD 群体整体上 EHP 对数与对虾生长参数的相关性均未达到显著水平; 但根据 EHP 对数的分布将 HH 和 PD 群体各分为 EHP 低和高的 2 个子群后, EHP 高的子群中与对虾体长或体重间出现了显著或较显著的相关性。上述结果说明, EHP 对数与对虾生长参数的相关性与 EHP 感染的时间点有重要关系, 这可以解释前期研究中某些群体的 EHP 与对虾生长参数呈现显著负相关性, 但另一些群体中没有明显相关性的现象 (刘珍等, 2016; 刘亚梅等, 2017; 刘宝彬等, 2017), EHP 感染主要发生在较相近的时间点时, 这种负相关性才能较明显; 群体中存在 2 次传播或感染在不同时间点时, 后续感染可能就扰乱了这种相关性。

本研究对凡纳滨对虾不同组织进行 EHP 检测, RZ 群体是 4 个群体中 EHP 载量最低, 但阳性率较高的群体, 个体间肝胰腺 EHP 载量比较接近, 这可能

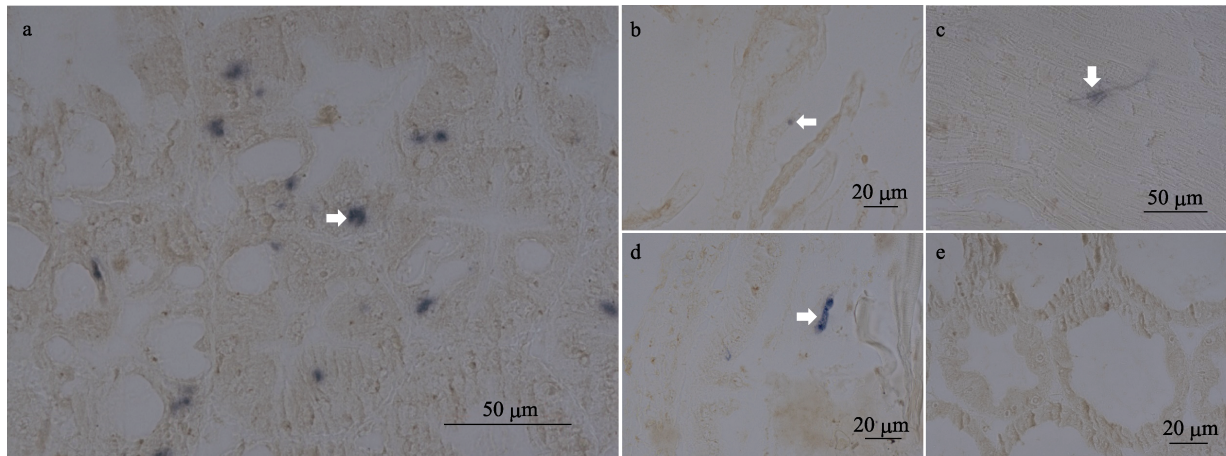


图 3 感染虾肝肠胞虫凡纳滨对虾不同组织的原位杂交

Fig.3 *In situ* hybridization of different tissues of *L. vannamei* infected with EHP

a: 肝胰腺; b: 鳃; c: 肌肉; d: 中肠; e: 肝胰腺阴性对照

a: Hepatopancreas; b: Gills; c: Muscle; d: Midgut; e: Negative control of hepatopancreas

是由于该群体受到较低水平 EHP 传染源的感染所致,如经水体传播的 EHP 孢子的感染,该群体有利于对不同组织间的 EHP 进行分析。qPCR 检测结果表明,EHP 从高到低的顺序依次是肝胰腺>中肠>血淋巴>鳃>肌肉;而检出率高低顺序在肌肉和鳃略有差异。经相关性分析表明,各组织 EHP 对数总体上有正相关性,肝胰腺、肠道和鳃三者之间的相关性达到 99.9%的极显著水平($P<0.001$),肌肉-鳃、肝胰腺-肌肉、肌肉-血淋巴、肠道-血淋巴等组织间也呈极显著相关性($P<0.01$)。这显示 EHP 主要感染的组织可能是肝胰腺和肠道,用血淋巴、鳃或肌肉进行定量或定性检测,能一定程度地反映肝胰腺中的 EHP 感染情况,但在感染水平较低时,可能存在较多的假阳性比率。Santhoshkumar 等(2016)、Salachan 等(2017)研究表明,用常规 PCR 在对虾肝胰腺、鳃、血淋巴、肠、心脏、肌肉组织均可检测到 EHP 阳性,但这些研究未揭示不同组织间 EHP 载量的关系及阳性率的高低。

前人在组织病理学观察及原位杂交的研究表明,肝胰腺和肠道中能观察到 EHP 的感染(Tang *et al.*, 2015; Rajendran *et al.*, 2016; Santhoshkumar *et al.*, 2016),但在其他组织上未观察到感染的证据。为了说明 EHP 在不同组织中的检出是属于污染还是组织内的感染,作者对 RZ 群体的不同组织进行了原位杂交检测,结果显示,RZ 群体中较低的 EHP 感染水平下,对虾肝胰腺中的杂交信号比以往报道中所看到的(Tang *et al.*, 2015, Salachan *et al.*, 2007)数量要少得多,大约 5%~10%的细胞显示为阳性,但在所检测的几种组织中是最多的;中肠的原位杂交结果则显示,肠腔内容物中出现出较强的杂交信号,中肠上皮细胞中也

出现较弱的杂交信号;此外,在鳃和肌肉细胞中也观察到少量杂交信号,但信号强度相对较弱。这说明 EHP 可能造成肝胰腺以外的组织感染,但细胞感染率和感染强度低。

本研究通过 qPCR 获得了 EHP 在凡纳滨对虾不同群体和不同组织中感染量的准确数据。群体内 EHP 载量的分布特点表示,EHP 在群体内可能存在 2 次或多次传播,群体中 EHP 感染发生在较相近的时间点时,其量与凡纳滨对虾的生长参数呈显著的负相关性。EHP 能在多组织中检出,各组织 EHP 载量有显著相关性,其中,肝胰腺和中肠中分布最多,肝胰腺是 EHP 检测的最灵敏组织;原位杂交显示,EHP 在其他组织中的存在是因为在其他组织中存在一定水平的感染,中肠内容物中存在原位杂交信号,表明 EHP 可能通过粪便进行传播,粪便也可作为检测的样品。EHP 在对虾群体和体内的感染和分布情况能为该病的诊断和预防研究提供基础数据。

参 考 文 献

- Bell TA, Lightner DV. A Handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1988
- Bruce LD, Redman RM, Lightner DV, *et al.* Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1993, 17(3): 215-221
- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89-96

- Han JE, Tang KFJ, Pantoja CR, *et al.* Detection of a new microsporidium *Perezia* sp. in shrimps *Penaeus monodon* and *P. indicus* by histopathology, *in situ* hybridization and PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(2): 165–171
- Liu BB, Yang B, Lv XW, *et al.* Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by real-time PCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 158–166 [刘宝彬, 杨冰, 吕秀旺, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧光定量PCR检测. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 158–166]
- Liu YM, Qiu L, Sheng AZ, *et al.* Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using Taqman probe real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 151: 191–196
- Liu YM, Qiu L, Chen DY, *et al.* The relationship between body length and weight in *Enterocytozoon hepatopenaei* detected *Litopenaeus vannamei* populations. *Progress of Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 96–103 [刘雅梅, 邱亮, 程东远, 等. 检出虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体的体长和体重关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(4):96–103]
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量PCR检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Lom J, Dyková I. Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n. sp. (*Microsporidia*), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*. *European Journal of Protistology*, 2002, 38(1): 19–27
- Lu XM, Jin W. Recent advances in taxonomy of phylum Microspora. *Bulletin of Science and Technology*, 1999, 15(2): 119–125 [鲁兴萌, 金伟. 微孢子虫分类学研究进展. *科技通报*, 1999, 15(2): 119–125]
- Luo YH, Shi J, Fang L, *et al.*, Qian D. Development and application of a TaqMan real-time PCR assay for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Veterinary Science in China*, 2016, 46(7): 847–852 [骆云慧, 石坚, 方磊, 等. 虾肝肠胞虫 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用. *中国兽医科学*, 2016, 46(7): 847–852]
- Phelps NB, Goodwin AE. Validation of a quantitative PCR diagnostic method for detection of the microsporidian *Ovipleistophora ovariae* in the cyprinid fish *Notemigonus crysoleucas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 76(3): 215–221
- Rajendran KV, Shivam S, Praveena PE, *et al.* Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, 2016, 454: 272–280
- Salachan PV, Jaroenlak P, Thitamadee S, *et al.* Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *BMC Veterinary Research*, 2017, 13(1): 1–7
- Santin M. *Enterocytozoon bieneusi*. Springer Berlin Heidelberg, 2001, 218–220
- Santhoshkumar S, Sivakumar S, Vimal S, *et al.* Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 40(4): 529–539
- Tang KFJ, Han JE, Aranguren LF, *et al.* Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 140: 1–7
- Tang KFJ, Pantojaa CR, Redmana RM, *et al.* Development of *in situ* hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *Journal Invertebrate Pathology*, 2015, 130: 37–41
- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (*Microsporida: Enterocytozoonidae*), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (*Decapoda: Penaeidae*): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29

(编辑 陈严)

Differences Between Populations and Tissues of *Litopenaeus vannamei* Infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*

CHENG Dongyuan^{1,2}, QIU Liang^{1,2}, SONG Zenglei^{1,2}, WAN Xiaoyuan¹,
DONG Xuan¹, XIE Guosi¹, HUANG Jie^{1,2}^①

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Growth-related parameters of individuals from four populations of *Litopenaeus vannamei* from Huanghua of Heibei Province (HH), Pingdu of Shandong Province (PD), Wujiang of Jiangsu Province (WJ), and Rizhao of Shandong Province (RZ) were assessed. Amount of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in the hepatopancreas of individuals from all populations and EHP in multiple tissues of shrimp from the RZ population were assessed with *TaqMan*-based quantitative PCR. The results showed that the RZ population possessed optimal growth-related parameters and the lowest EHP among the four populations. The histograms of case-logarithmic EHPs of the four populations presented different modes. The case distribution of logarithmic EHPs from the HH and PD populations showed double peaks, while those of the WJ and RZ populations showed a single peak. The different distribution modes may indicate a different EHP spread in the four populations. The population with a single peak mode or the higher logarithmic EHP subpopulation isolated from the population with a multiple peak mode showed a significant negative correlation with shrimp body length or body weight to logarithmic EHP. The EHP detected in different tissues of the RZ population followed the order (from highest to lowest), EHP in hepatopancreas > EHP in midgut > EHP in hemolymph > EHP in gills > EHP in muscle. The logarithmic EHP in the hepatopancreas–midgut, hepatopancreas–gills, and midgut–gills had a significant correlation level above 99.9% ($P < 0.001$), while the logarithmic EHP of the other two tissues had a significant correlation level above 99.0% ($P < 0.01$) or above 99.5% ($P < 0.05$), except for midgut–hemolymph and hepatopancreas–hemolymph. *In-situ* hybridization of a DIG-labeled EHP probe in the hepatopancreas, muscle, gills, and midgut showed that the hepatopancreas is the major target tissue of EHP infection in shrimp. Minor and weak hybridization signals were also observed in other tissues, which indicated that a few cells in those tissues were also susceptible to EHP infection in *L. vannamei*.

Key words *Litopenaeus vannamei*; *Enterocytozoon hepatopenaei*; Growth parameters; *in-situ* hybridization

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn