

虾肝肠胞虫感染病理特征、18S rRNA 基因序列及系统进化树分析

周颖¹, 祝波¹, 钱冬¹, 卢先东², 李小冰¹, 李政¹, 刘艳红², 蔡惠凤³,
吴仲宁³, 袁思平³, 张崇虎⁴, 叶乐平⁴, 马荣荣^{1*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波爱基因科技有限公司, 浙江 宁波 315105;
3. 宁波市鄞州区渔业技术管理服务站, 浙江 宁波 315117; 4. 浙江正大畜禽水产有限公司 浙江 宁波 315806)

摘要: 为调查浙江省部分地区虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)暴发来源及与其他宿主来源的微孢子虫进化关系, 本研究利用形态学特征和分子鉴定, 尝试对引起浙江多地凡纳对虾生长缓慢综合征的病原进行探究。同时基于 18S rRNA 基因序列分析该病原与其他地区及其他宿主来源微孢子虫的进化关系。结果显示, 所采病虾均为 EHP 阳性, 采样地区 EHP 18S rRNA 基因具有高度同源性, 为 98.5%~100%。对国内外 EHP 基因序列进行同源性分析, 其同源性为 86.2%~100%, 所采 EHP 与印度 EHP 聚为一个分支。EHP 18S rRNA 基因序列与其他水生生物微孢子虫 18S rRNA 均处于不同分支, 表明 18S rRNA 可作为 EHP 的主要鉴别序列。将本研究所采 EHP 与 NCBI 中同源性较高的比氏肠胞虫和金头鲷微孢子虫比较分析, 结果表明微孢子虫基因序列同源性与其宿主进化发育程度有关, 宿主之间进化距离越近, 则微孢子虫基因序列同源性相聚越近。

关键词: 虾肝肠胞虫; 凡纳对虾; 病理特征; 18S rRNA; 系统进化树

中图分类号: S945.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2022) 02-0008-07

微孢子虫是一类分布广泛的单细胞专性细胞内寄生虫, 由于其孢子具有较强的环境抗性, 微孢子虫的宿主范围极广, 其可寄生于从原生动物到哺乳动物(包括人类)的几乎所有动物类群^[1], 在迄今已知的 187 个属中, 几乎有一半会感染水生生物, 约有 50 属感染水生节肢动物, 占已知种类的四分之一^[1]。虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 隶属真菌界(Fungi)、微孢子虫门(Microsporidia)、单倍期纲(Haplophasea)、壶孢目(Chytridiopsida)、肠胞虫科(Enterocytozoonidae)、肠胞虫属(*Enterocytozoon*), 是一类主要寄生于对虾肝胰腺上皮细胞的微孢子虫, 最早在 1989 年发现于马来西亚养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*)中^[2], 后于 2009 年由 Tourtip 等^[3]首次分离并正式命名。

对虾感染 EHP 早期可正常摄食, 无明显症状^[4], 2~3 个月后开始出现摄食减少、生长缓慢甚至停止生长等现象^[5-6], 部分对虾出现白便症状^[7]。EHP 通常不会直接引起对虾死亡, 但会对虾体自身免疫力产生一定影响。已有学者报道, 虾肝肠胞虫感染可增加对虾感染副溶血弧菌风险^[8], 给对虾养殖业带来巨大的经济损失。近年来, EHP 在我国养殖对虾中流行率居高不下, 已成为危害我国养殖对虾的重要病原之一^[9]。

鉴于浙江省对虾养殖中虾肝肠胞虫病频发问题更为突出, 不同养殖场及不同虾苗来源的养殖对虾均有发病, 本文以浙江宁波、台州养殖场的患病对虾为研究对象, 对不同养殖场以及不同国家来源的虾肝肠胞虫 18S rRNA 基因序列进行同源性

收稿日期: 2021-09-13.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市公益性计划(202002N3062); 三门县农业农村局项目(三招采-2019-GK013号)。

第一作者: 周颖(1999-), 女, 陕西铜川人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水生动物医学。E-mail: zy18700697409@163.com

*通信作者: 马荣荣(1990-), 女, 山东菏泽人, 助理研究员, 主要研究方向: 水生动物医学。E-mail: marongrong@nbu.edu.cn

差异分析,探究虾肝肠胞虫疫情爆发病原来源,并与其他常见水产养殖动物体内寄生的微孢子虫序列进行比较,为虾肝肠胞虫的溯源及分类研究提供线索,以便为后续养殖过程中区域爆发虾肝肠胞虫病的防控提供参考与指导,对其他地区虾肝肠胞虫病的防控亦可发挥指导作用。

1 材料与方法

1.1 发病背景及临床症状

2020年6—9月在浙江宁波北仑、象山以及台州三地对虾养殖场发现大量凡纳对虾出现生长缓慢综合征(Slow Growth Syndrome, SGS),患病对虾主要表现为生长迟缓,同池对虾体长差异较大,养殖水体漂浮白便。三地养殖场初步检测均为虾肝肠胞虫阳性。分别于发病地区采集患病症状的凡纳对虾各50尾,其中9尾用于组织切片研究,其余样品于95%乙醇中固定后送至实验室,以便进行后续实验。

1.2 主要试剂及仪器

Taq DNA聚合酶和2×Mix购自康为世纪生物公司;通用型DNA提取试剂盒购自Magen公司;琼脂糖粉购自Sigma公司;Trans2K DNA marker购自全式金生物公司。

凝胶成像仪GelDoc XR+购自Bio-Rad公司;高压灭菌锅MLS-3781L-PC购自Panasonic公司。

1.3 Masson 染色

取患病对虾的肝胰腺组织,用Davidson's AFA固定液固定24 h后换液。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后进行切片,控制切片厚度为5 μm左右。参考Goldner^[10]的方法进行改进Masson染色:切片常规脱蜡至水;Weigert氏铁苏木素液染色5 min,流水冲洗;1%盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗数分钟;丽春红酸性品红染色5 min,后快速漂洗;磷钼酸水溶液处理4 min,倾去玻片上磷钼酸溶液;用苯胺蓝液复染3 min,倾去玻片上染液;1%冰醋酸分化1 min,至切片无蓝色脱出,无水乙醇洗去浮色,二甲苯透明,中性树胶封固,普通光学显微镜观察^[11]。

1.4 虾肝肠胞虫18S rRNA PCR 扩增

对虾肝胰腺样品利用Magen DNA通用提取试剂盒进行DNA提取,利用以下序列进行18S rRNA

基因的PCR扩增:18S-F (5'-CACCAGGTTGATTC TGCCTGA-3'); 18S-R (5'-TCTGAAATAGTGACG GGCGG-3')^[12]。PCR反应体系(25 μL): 10 μmol·L⁻¹上下游引物各1 μL, DNA模板1.0 μL, 2×Mix 12.5 μL, 双蒸水补足至25 μL。PCR反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环35次,最后72 °C延伸10 min^[13]。

1.5 目的基因序列分析

利用1%琼脂糖凝胶分离PCR产物,取条带清晰、明亮的PCR产物进行测序。使用DNAMAN软件对测序结果基因序列进行校对,在NCBI中下载水生生物微孢子虫、比氏肠胞虫(*Enterocytozoon bieneusi*)和国内外各地虾肝肠胞虫18S rRNA核苷酸序列。利用DNASTar进行核苷酸同源性分析,利用MEGA 7.0软件构建Neighbor-Joining (NJ)树,采用1000次重复抽样进行系统进化分析。

2 结果分析

2.1 虾肝肠胞虫临床症状及病理形态学观察

患病对虾暂养于养殖池中,3个月后,可见患病虾体体长仅为9~10 cm,患病对虾生长明显迟缓(图1),大量白便吸附于管壁上(图2)。

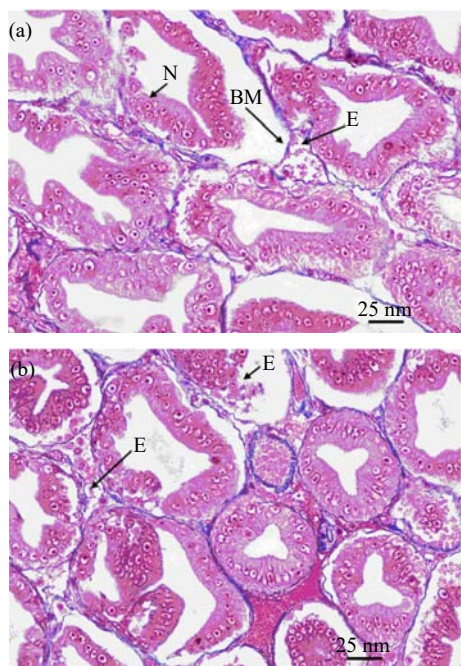


图1 患病凡纳对虾



图2 养殖水体中的白色粪便

Masson 染色后,可见凡纳对虾肝小管基膜为蓝色,细胞核为颜色较深的黑蓝色(图 3(a)),病虾组织切片中肝胰腺腔体缩小及变形(图 3(b)),虾肝肠胞虫在肝小管细胞质中有明显的颗粒感,颜色为较组织更深的粉红色,形状呈光滑椭圆形,多聚集分布。

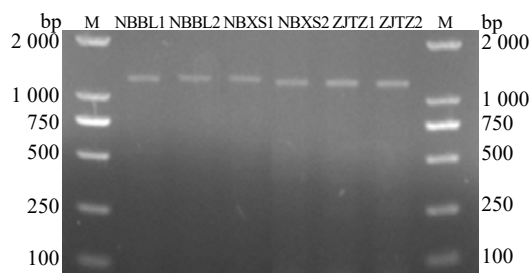


注: N 为细胞核; BM 为肝小管基膜; E 为虾肝肠胞虫成熟孢子。

图 3 虾肝肠胞虫感染肝胰腺组织病理变化($\times 400$ 倍)

2.2 18S rRNA 测序结果

对采样地区虾肝肠胞虫 18S rRNA 基因进行 PCR 检测,18S rRNA 基因扩增产物大小约为 1 150 bp (图 4),与 NCBI 已有序列进行对比,其与虾肝肠胞虫的序列相似度可达 99.48%,结合采样病虾表现出摄食减少、生长缓慢、白便等生长缓慢综合征典型症状及病理特征,基本可以确定引起凡纳对虾患病病原为虾肝肠胞虫。



注: NBBL 为宁波北仑虾场样本; NBXS 为宁波象山虾场样本; ZJTZ 为浙江台州虾场样本。下图同。

图 4 18S rRNA 基因 PCR 扩增结果

2.3 18S rRNA 基因核苷酸同源性及其系统进化树

对浙江三地采集的病虾肝肠胞虫 18S rRNA 核苷酸序列进行同源性分析,利用 Blastn 在 NCBI 数据库中选择同源性较高的微孢子虫(主要感染人类免疫缺陷患者,引起患者腹泻的比氏肠胞虫(*E. bienersi*)^[14]和寄生于金头鲷(*Sparus aurata*),引起消瘦综合征的微孢子虫(*Enterosporea nucleophila*)^[15]),利用 MEGA 7.0 构建系统进化树。同源性分析结果(图 5)显示,采样地区虾肝肠胞虫的 18S rRNA 基因核苷酸序列同源性为 98.5%~100%,提示采样地区虾肝肠胞虫 18S rRNA 具有高度同源性。虾肝肠胞虫聚为一个分支,与寄生于金头鲷的微孢子虫相距较近,而与比氏肠胞虫相距较远。虾肝肠胞虫系统进化树(图 6)显示,除宁波北仑 2 号样品外,其余地区样品均处于一个大分支上,但仍有微小差异。18S rRNA 虽然高度保守,但不同地区来源的微孢子虫 18S rRNA 仍具有一定种内差异,这些微小差异可作为虾肝肠胞虫来源追踪及鉴定的重要依据。

		同源百分比							差异	
		1	2	3	4	5	6			
1			98.5	99.5	99.2	98.9	99.0	1		NBBL1
2	1.5			98.6	98.5	98.5	98.5	2		NBBL2
3	0.5	1.5			99.7	99.5	99.6	3		NBXS1
4	0.8	1.5	0.3			99.6	100	4		NBXS2
5	1.1	1.5	0.5	0.4			99.6	5		ZJTZ1
6	1.0	1.5	0.4	0	0.4			6		ZJTZ2
		1	2	3	4	5	6			

图 5 采样地区 18S rRNA 基因核苷酸序列的同源性分析

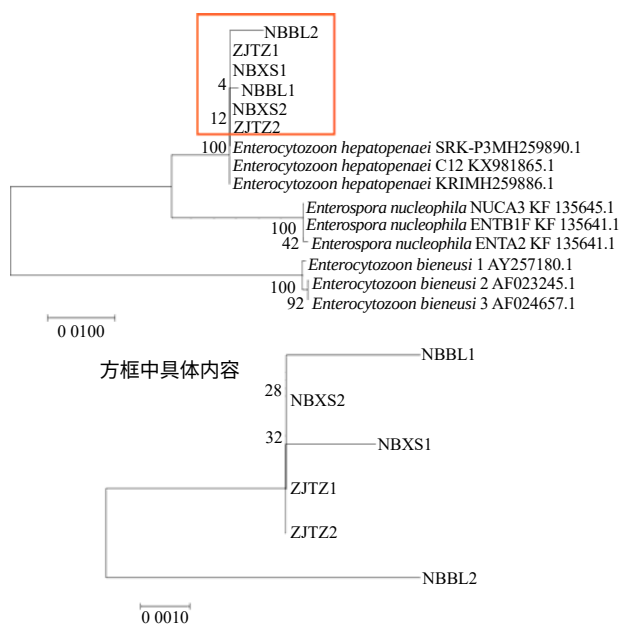


图 6 基于 18S rRNA 的系统进化树(NJ 法)

国内外虾肝肠胞虫源性分析结果如图 7 所示, 大部分印度虾肝肠胞虫与中国虾肝肠胞虫(包括本实验采样地区)聚集, 处于一个大分支, 与少部分印度虾肝肠胞虫(KX013492.1、KX013491.1)、越南虾肝肠胞虫以及两株泰国虾肝肠胞虫(KF362130.1、KF362129.1)相聚于一个分支, 而一株泰国虾肝肠胞虫(FJ496356.1)则处于另一分支。

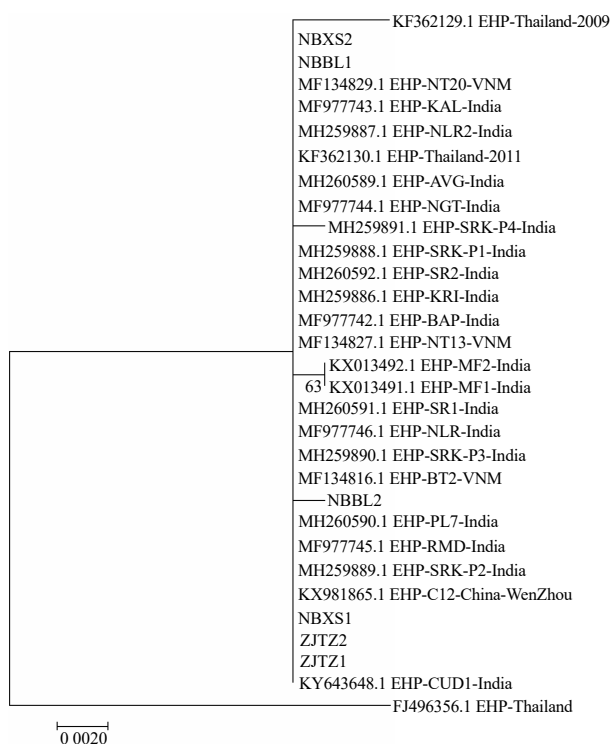


图 7 基于 18S rRNA 序列的国内外虾肝肠胞虫系统进化树 (NJ 法)

采样地区虾肝肠胞虫的 18S rRNA 基因核苷酸序列同源性为 86.2%~100%。NCBI 信息显示, 单独位于一个分支上的虾肝肠胞虫位于泰国东部, 另外两株虾肝肠胞虫采样地区则靠近泰国曼谷, 临近泰国湾。两株单独不聚群印度病株检测地区临近西孟加拉邦, 其他印度聚群病株均靠近印度南部。由此可推测, 虾肝肠胞虫种间差异可能与所处地理环境差异相关, 不同区域的虾肝肠胞虫有一定的种间差异。

2.4 虾肝肠胞虫与水生生物微孢子虫 18S rRNA 基因序列比对

虾肝肠胞虫与其他水生生物微孢子虫中序列分析显示, 虾肝肠胞虫仅与中华绒螯蟹肠胞虫 (*Hepatospora ericheir*) 位于同一分支, 二者虽遗传

距离较近, 但仍有一定的差异。寄生于三疣梭子蟹的梭子蟹肌胞虫 (*Ameson portunus*) 以及引起眼斑龙虾微孢子虫病的微孢子虫 (*Ameson* sp.) 处于另一大分支, 与其他微孢子虫遗传距离较远, 寄生于黄线狭鳕的微孢子虫 (*Microsporidium* sp.)、宿主未明确的微孢子虫 (*Microsporidium* sp.) 以及引起真鲷格留虫病的微孢子虫 (*Glugea* sp.) 则位于另一个大分支 (图 8)。由此可知, 微孢子虫基因序列同源性与宿主进化发育程度具有一定关系, 凡纳对虾与中华绒螯蟹同属节肢动物门软甲纲, 而与黄线狭鳕、真鲷等亲缘关系较远, 该结果为微孢子虫宿主进化关系的研究提供了线索。

3 讨论

凡纳对虾是我国主要的水产养殖经济物种, 占我国海水养殖虾类的 79%^[9]。虾肝肠胞虫虽不直接导致对虾死亡, 但其引起的凡纳对虾“生长缓慢综合征”使同一养殖塘中相同时期放养的对虾个体大小存在明显差异, 抵抗力下降, 易感其他病害, 大大降低对虾养殖经济效益, 对我国凡纳对虾养殖业造成巨大经济损失。因此, 虾肝肠胞虫的早期诊断防控以及与其他水生生物微孢子虫的区分鉴别在我国凡纳对虾养殖产业中具有重要意义。

本研究对浙江三地所采病虾样本, 进行临床病例特征观察, 感染虾肝肠胞虫的凡纳对虾生长明显迟缓。正常对虾养殖 3 个月体长可达 20 cm, 本实验对虾在相同条件下养殖 3 个月后, 体长不足正常养殖对虾的一半。Masson 法被广泛应用于节肢动物组织中纤维及炎症因子的染色, 故本研究以 Masson 染色法对患病凡纳对虾肝胰病变组织情况进行观察, 通过孢囊整体形态及染色深度初步判定为虾肝肠胞虫感染, 但由于虾肝肠胞虫大小仅为 1~2 μm ^[16], 难以对虾肝肠胞虫感染进行确诊。病理切片诊断设备要求高, 观察较为困难, 检出率低, 无法确诊, 不适于用作虾肝肠胞虫的常规检测手段。

基于虾肝肠胞虫 18S rRNA 序列源性分析以及系统进化树分析结果显示, 从三种不同养殖地采样并分离的虾肝肠胞虫 18S rRNA 源性较高, 聚为一个分支, 同种间的序列差异较小。与 NCBI 中源性较高的比氏肠胞虫和金头鲷微孢子虫比

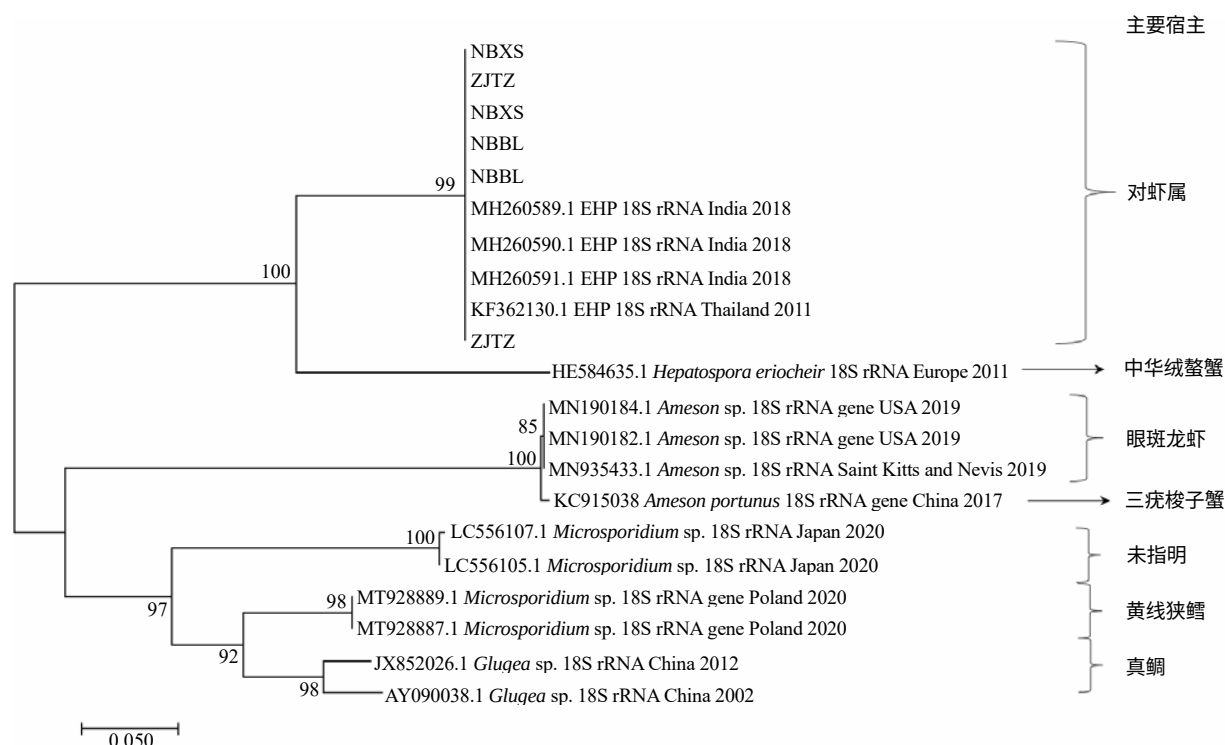


图8 不同宿主微孢子虫 18S rRNA 序列进化树分析

较分析发现, EHP 与这两种微孢子虫均位于不同的分支, 与寄生于金头鲷的微孢子虫基因序列相距较近, 而与感染人类的比氏肠胞虫相距较远, 表明微孢子虫基因序列同源性与宿主进化发育程度有关, 且虾肝肠胞虫可通过 18S rRNA 序列与相似种群微孢子虫进行区分鉴定。为进一步探究 EHP 与 NCBI 中其余寄生水生生物微孢子虫的序列同源性, 构建系统进化树分析显示, 仅有中华绒螯蟹肠胞虫与虾肝肠胞虫处于同一分支, 其余水生生物中的微孢子虫遗传距离都相对较远, 提示二者亲缘关系较近。中华绒螯蟹肠胞虫与虾肝肠胞虫均为肝肠胞属微孢子虫, 中华绒螯蟹肠胞虫可引起中华绒螯蟹的白化、水化、肝胰腺消失等明显症状^[17], 与 EHP 感染对虾症状具有明显差异。而虾肝肠胞虫与寄生于三疣梭子蟹的梭子蟹肌胞虫^[18]、引起眼斑龙虾微孢子虫病^[19-20]的微孢子虫、寄生于黄线狭鳕的微孢子虫、宿主未明确的微孢子虫^[21-22]以及引起真鲷格留虫病^[23-24]的微孢子虫 18S rRNA 遗传距离较远, 同源性较低, 进一步证明 18S rRNA 可作为虾肝肠胞虫的主要鉴别序列。国内外虾肝肠胞虫 18S rRNA 序列分析结果显示, 同一地区或国家虾肝肠胞虫有明显的聚群现象, 大部分印度虾肝

肠胞虫与中国虾肝肠胞虫(包括本实验采样地区)聚集, 处于一个大分支。但同一国家中由于地理位置差异, 也会导致虾肝肠胞虫的 18S rRNA 序列存在一定的种内差异。

虾肝肠胞虫病尚无针对性治疗药物, 虾场爆发后往往难以根治, 针对该病应仍以早期预防为主。宁波北仑、象山及浙江台州地区虾场集体爆发虾肝肠胞虫病, 根据序列分析显示该感染病原有较高的同源性, 部分虾肝肠胞虫 18S rRNA 基因核苷酸序列同源性高达 100%, 提示虾肝肠胞虫来源可能相同。通过国内外虾肝肠胞虫 18S rRNA 序列分析结果可知, 我国 EHP 与大部分印度 EHP 处于同一分支, 同源性较高, 因此本研究结果亦可为我国各地对虾养殖场虾肝肠胞虫病的防控提供参考, 在引进虾苗时, 应尽可能进行虾肝肠胞虫抽样检测, 确定虾苗未携带或感染虾肝肠胞虫病原后再进行大规模养殖生产。

参考文献:

- [1] Stentiford G D, Feist S W, Stone D M, et al. Microsporidia: Diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems[J]. Trends in Parasitology, 2013, 29(11):567-578.

- [2] Anderson I G, Shariff M, Nash G. A hepatopancreatic microsporidian in pond-reared tiger shrimp, *Penaeus monodon*, from Malaysia[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 53(2):278-280.
- [3] Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford G D, 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]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1):21-29.
- [4] Kasthuri Raju K. Haematological parameters as predictive indicators of stress induced mortality in Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during transboundary shipment[J]. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2017, 46(7):1440-1446.
- [5] 胡吉卉, 李正民, 段健诚, 等. 虾类肝肠胞虫流行病学研究进展[J]. 水产养殖, 2020, 41(11):1-4; 10.
- [6] Aranguren L F, Han J E, Tang K F J. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2017, 471:37-42.
- [7] Aranguren Caro L F, Mai H N, Pichardo O, et al. Evidences supporting *Enterocytozoon hepatopenaei* association with white feces syndrome in farmed *Penaeus vannamei* in Venezuela and Indonesia[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2020, 141:71-78.
- [8] Zhu B, Lu X D, Liu Y H, et al. Effects of *Enterocytozoon hepatopenaei* single-infection or co-infection with *Vibrio parahaemolyticus* on the hepatopancreas of *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2022, 549:737726.
- [9] 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. 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2020.
- [10] Goldner J. A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes[J]. The American Journal of Pathology, 1938, 14(2):237-243.
- [11] 常晓晴. 虾肝肠胞虫病理学检测技术的建立[D]. 上海:上海海洋大学, 2018.
- [12] Wang L J, Lv Q, He Y T, et al. Integrated qPCR and staining methods for detection and quantification of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Microorganisms, 2020, 8(9):1366.
- [13] Ding Z F, Chen J Q, Lin J, et al. Development of *in situ* hybridization and real-time PCR assays for the detection of *Hepatospora eriocheir*, a microsporidian pathogen in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(7):919-927.
- [14] Ou Y L, Jiang W, Roellig D M, et al. Characterizations of *Enterocytozoon bienersi* at new genetic loci reveal a lack of strict host specificity among common genotypes and the existence of a canine-adapted *Enterocytozoon species* [J]. International Journal for Parasitology, 2021, 51(2/3): 215-223.
- [15] Palenzuela O, Redondo M J, Cali A, et al. A new intranuclear microsporidium, *Enterosporea nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae[J]. International Journal for Parasitology, 2014, 44(3/4):189-203.
- [16] 常晓晴, 王元, 英娜, 等. 8 种染色方法对组织切片中虾肝肠胞虫染色效果的比较[J]. 海洋渔业, 2019, 41(1): 91-99.
- [17] 王元. 脊尾白虾与三疣梭子蟹微孢子虫病的病原和病理[D]. 上海:上海海洋大学, 2013.
- [18] Wang Y, Li X C, Fu G H, et al. Morphology and phylogeny of *Ameson portunus* n. sp. (Microsporidia) infecting the swimming crab *Portunus trituberculatus* from China[J]. European Journal of Protistology, 2017, 61(Pt A):122-136.
- [19] Small H J, Stentiford G D, Behringer D C, et al. Characterization of microsporidian *Ameson herrnkindi* sp. nov. infecting Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2019, 136(3):209-218.
- [20] Small H J, Meyer G R, Stentiford G D, et al. *Ameson metacarcini* sp. nov. (Microsporidia) infecting the muscles of dungeness crabs *Metacarcinus magister* from British Columbia, Canada[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2014, 110(3):213-225.
- [21] Liu X H, Wen M Q, Zhao Y L, et al. Morphological and molecular characterization of a new freshwater microsporidium, *Jirovecia sinensis* sp. n. (Microsporidia) infecting the coelomocytes of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae) in China[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 173:107368.
- [22] Sokolova Y Y, Overstreet R M. A new microsporidium, *Apotaspora heleios* n. g., n. sp., from the Riverine grass shrimp *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 157:125-135.
- [23] Abdel-Baki A A S, Tamihi A F, Al-Qahtani H A, et al. *Glugea jazanensis* sp. nov. infecting *Lutjanus bohar* in

- the Red Sea: Ultrastructure and phylogeny[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2015, 116(3):185-190.
- [24] Azevedo C, Abdel-Baki A A S, Rocha S, et al. Ultrastructure and phylogeny of *Glugea arabica* n. sp. (Microsporidia), infecting the marine fish *Epinephelus polyphemadion* from the Red Sea[J]. European Journal of Protistology, 2016, 52:11-21.

Pathological characteristics of *Enterocytozoon hepatopenaei*, 18S rRNA gene sequence and phylogenetic analysis

ZHOU Ying¹, ZHU Bo¹, QIAN Dong¹, LU Xiandong², LI Xiaobing¹, LI Zheng¹, LIU Yanhong², CAI Huifeng³, WU Zhongning³, YUAN Siping³, ZHANG Chonghu⁴, YE Leping⁴, MA Rongrong^{1*}

(1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.Ningbo Ai Gene Technology Co., Ltd., Ningbo 315105, China;

3.Ningbo Yinzhou District Fishery Technology Management Service Station, Ningbo 315117, China;

4.Zhejiang Zhengda Livestock, Poultry and Aquatic Products Co., Ltd., Ningbo 315806, China)

Abstract: Outbreaks of slow growth syndrome of *Penaeus vannamei* have occurred in some areas of Zhejiang Province. In the present study, pathological characteristics and molecular identification were determined to examine the pathogen causing slow growth syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp farms. The relationship was also investigated between this pathogen and the microsporidia from other regions and other host sources based on 18S rRNA gene sequence. The results show that all the shrimps with the disease were EHP positive, and the EHP 18S rRNA gene in the sampling area was high homology (98.5%-100%). The homology analysis of EHP gene sequences at home and abroad was 86.2%-100%. The collected EHP and Indian EHP were clustered into one branch. The sequence of EHP 18S rRNA gene was in different branches from that of other aquatic organisms, indicating that 18S rRNA could be used as the main identification sequence of EHP. The comparative analysis of EHP with *Enterocytozoon bieneusi* and *Enterospora nucleophile* showed that the gene sequence homology of microsporidium was related to the degree of host evolution and development. The closer the evolutionary distance between hosts, the closer the gene sequence homology of microsporidium.

Key words: *Enterocytozoon hepatopenaei*; *Penaeus vannamei*; pathological characteristics; 18S rRNA; phylogenetic tree

(责任编辑 韩 超)