



脊尾白虾“僵尸病”的初探

赵然^{1,2}, 史文军², 王李宝², 黎慧², 于志君^{1,2}, 胡润豪^{1,2},
吴旭干¹, 沈辉², 乔毅², 成婕², 蒋葛², 万夕和^{2*}

(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. 江苏省海洋水产研究所, 江苏南通 226007)

摘要: 为确定 2018 年冬季以来江苏省沿海地区养殖脊尾白虾患“僵尸病”的病原及流行病学特点, 实验采用 LB 培养基和 PDA 培养基从病虾血淋巴中分离得到直径为 1~3 mm、边缘整齐、米黄色隆起菌落; 人工回感实验结果显示, 回感后的脊尾白虾表现出与自然患病脊尾白虾相同的症状, 并在回感脊尾白虾体内也分离出了相同的菌株, 符合科赫氏法则。对该菌株进行形态观察结合 18S *rRNA* 序列对比及系统发育分析, 发现分离菌株 MQ2101 具有酵母的典型形态, 且与二尖梅奇酵母相似度达 99.82%, 结果表明菌株 MQ2101 为二尖梅奇酵母。致病性结果初步分析显示, MQ2101 对脊尾白虾的半致死浓度 (LD₅₀) 为 1.39×10⁷ CFU/尾。病理学观察发现, 患病脊尾白虾鳃、肌肉和肝胰腺均发生不同程度的病变, 其中肝胰腺病变最为严重, 肝小管呈现空泡化, 管腔体积变大; 在鳃和肝胰腺组织中均存在大量定殖的菌体。流行病学调查结果显示, 每年 2—5 月发病迅速, 发病率为 5%~30%, 死亡率为 3%~10%。本研究确定了二尖梅奇酵母为江苏沿海地区脊尾白虾“僵尸病”的病原, 其对脊尾白虾具有较强致病性, 主要侵染组织为肝胰腺和鳃。以上研究结果为脊尾白虾“僵尸病”的防控提供了相关科学依据。

关键词: 脊尾白虾; 僵尸病; 二尖梅奇酵母; 分离鉴定; 病理学

中图分类号: S 945.1

文献标志码: A

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 又名小白虾、五须虾, 属于甲壳亚门 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 长臂虾科 (Palaemonidae), 由于其肉质细嫩、味道鲜美, 生长速率快、繁殖能力强、适应性广且具有较高的经济价值^[1], 在江苏沿海地区得到了快速广泛的推广, 是我国特有的经济虾类之一^[2]。随着养殖规模的逐年扩大, 脊尾白虾的病害问题也愈加严重, 近年来不断有脊尾白虾受不同病原危害造成养殖户经济损失的报道, 如

偷死野田村病毒 (Covert Mortality Nodavirus, CMNV)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.)、白斑综合征病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 等, 其中以白斑综合征为甚, 常暴发于 8 月和 9 月, 患病池塘脊尾白虾死亡率可达 60% 以上^[3-9]。

自 2018 年冬季以来, 江苏沿海地区池塘养殖的脊尾白虾开始出现一种不明原因的疾病, 病虾表现为僵尸状, 当地养殖户称之为“僵尸病”, 患

收稿日期: 2021-06-11 修回日期: 2021-11-02

资助项目: 江苏省 2019 年度“六大人才高峰”资助项目 (NY106); 江苏省农业重大新品种创制项目 (PZCZ201747); 2020 年第五期南通市“226 工程”科研资助项目 (NT226-202021); 江苏现代农业 (特色水产) 产业技术体系创新中心项目 (JATS [2021] 417); 2021 年江苏省水生动物重大疫病监控项目 (2021-SJ-067-02)

第一作者: 赵然, 从事海水虾类病害防控研究, E-mail: ranzhao1998@163.com;
史文军, 从事水产养殖及高值化利用研究, E-mail: muzhiye080326@126.com

通信作者: 万夕和 (照片), 从事健康养殖与病害研究, E-mail: wxh1708@163.com



病脊尾白虾体色泛红, 肌肉浑浊, 反应迟钝, 摄食减少, 头胸甲下蓄积大量乳白色液体, 病虾离水后较快死亡, 给养殖业造成较大的经济损失。为更好地对该病进行防控, 实验对患病脊尾白虾进行了流行病学及病理学研究, 同时开展了病原的分离、回感及鉴定, 确认了该病的病原。相关研究结果为江苏沿海脊尾白虾“僵尸病”的防治提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病原、病理学研究用样品为 2021 年 3 月于江苏省启东黄海滩涂开发有限公司养殖区采集具有典型“僵尸病”病症的濒死患病脊尾白虾, 对病虾采集后低温冷藏保存, 分别用于病原分离、组织切片和透射电镜观察。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照上海海洋大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 流行病学调查

2018—2021 每年 11 月—次年 5 月, 于江苏沿海脊尾白虾主养区启东、通州湾、如东、东台、大丰和滨海等地实地走访, 调研脊尾白虾“僵尸病”发病特征、发病时间和发病率等情况。

1.3 病理学研究

组织病理学 取经 10% 甲醛溶液固定的正常与患病脊尾白虾肝胰腺、鳃和肌肉组织样品, 经常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红 (H.E) 染色, 光学显微镜观察组织病理变化情况。

细胞病理学 取经 2.5% 戊二醛固定的患病脊尾白虾肝胰腺、鳃和肌肉组织样品, 磷酸漂洗液漂洗 3 次, 1% 锇酸 4 °C 固定 2 h; ddH₂O 漂洗 3 次后乙醇梯度脱水, 脱水浓度梯度为 30%、50%、70%、80%、95%、100% (2 次), 每次 15 min, 环氧丙烷过渡, 812 树脂梯度渗透后包埋, 60 °C 聚合, 包埋块用 Leica UC7 型超薄切片机进行半薄定位及超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色切片, 用透射电镜观察组织超微结构。

1.4 病原体分离、回感及鉴定实验

病原菌分离与纯化 用 75% 乙醇擦拭典型患病脊尾白虾体表, 无菌操作下取其血淋巴液

接种于 LB 培养基 27 °C 培养 48 h 后, 平板上生长出均一菌落, 显微镜下表现为酵母形态。经划线纯化并接种 PDA 平板再次纯培养, 用 PDA 液体培养基 27 °C 振荡培养, 收集菌液与 60% 甘油, 按体积比为 3 : 1 的比例混合, -80 °C 保存备用。

人工回感实验 健康脊尾白虾取自江苏省海洋水产研究所如东海水虾类良种基地, 经检测无病原。随机挑选 1 000 尾规格相近, 平均体长 (5.5±0.5) cm, 平均体重 (2.8±0.6) g, 健康、活力好的个体于室内水泥池暂养。暂养用水为经过滤、消毒沉降 1 周的自然海水, 盐度 25、水温 (18.0±0.5) °C。每天换水 1/3, 投喂适量商品配合饲料。取暂养 1 周的健康脊尾白虾进行回感实验, 实验采用注射法。将分离纯化后的菌株于 PDA 液体培养基 27 °C 培养 36 h, 混匀后, 取 5 mL 菌液于已灭菌的离心管中, 2 000 r/min、4 °C、离心 3 min 后去上清液, 然后加等体积灭菌生理盐水漂洗, 相同条件下离心, 去上清液, 重复漂洗 3 次后获得注射用原菌液, 4 °C 保存备用。用灭菌生理盐水将原菌液分别稀释 4、8 和 16 倍后进行注射, 浓度分别为 1.29×10⁹、6.46×10⁸ 和 3.23×10⁸ CFU/mL, 注射剂量为 20 μL/尾, 每组 200 尾虾; 对照组注射等量灭菌生理盐水。注射后各组脊尾白虾分别暂养于 500 L PVC 塑料桶中, 暂养用水为经过滤、消毒沉降 1 周的自然海水, 盐度 25、水温 (18.0±0.5) °C。每天换水 1/3, 投喂适量的商品配合饲料。回感实验期间, 各组所用设备均独立使用, 严禁混用, 每天观察并记录脊尾白虾的症状与死亡情况, 对出现症状明显的患病白虾进行病原分离鉴定。采用改良寇氏法计算分离菌株对脊尾白虾的半致死量:

$$\lg LD_{50} = X_k - d \left(\sum P - 0.5 \right)$$

式中, X_k 为死亡率最高组的对数剂量, d 为对数组距, $\sum P$ 为各组死亡率之和。

病原菌扫描电镜观察 取分离纯化后的病原菌样品置于 2.5% 戊二醛中固定 2~4 h, 磷酸漂洗液漂洗 3 次, 1% 锇酸 4 °C 固定 2 h; 双蒸水漂洗 3 次后乙醇梯度脱水, 脱水浓度梯度为 30%、50%、70%、85%、95%、100% (2 次), 每次 15 min, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥仪干燥及离子溅射仪镀膜后, 样品置于扫描电镜台上, 转移进入样品舱, HITACHI Regulus 8100 型扫描电镜拍照。

病原菌分子生物学鉴定 离心收集上述分离纯化后的菌株, 用酵母 DNA 抽提试剂盒 (Solar-

bio, 中国) 提取病菌的总基因组 DNA 作为 PCR 模板。采用 SSU 引物进行 PCR 扩增, 上游引物 SSUF: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'; 下游引物 SSUR: 5'-TGATCCTCCTGCAGGTTACCTAC-3'。30 μ L 反应体系: 上下游引物各 1.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, PCR Premix 15.0 μ L, ddH₂O 补足至 30 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 预计片段大小约 1 700 bp。模板扩增纯化产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。将病原菌株 18S *rRNA* 基因序列提交至 GenBank, 并将数据与 NCBI 数据库进行对比, 选择相似度较高的序列和不同种属的序列, 使用 MEGA 7.0 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结果

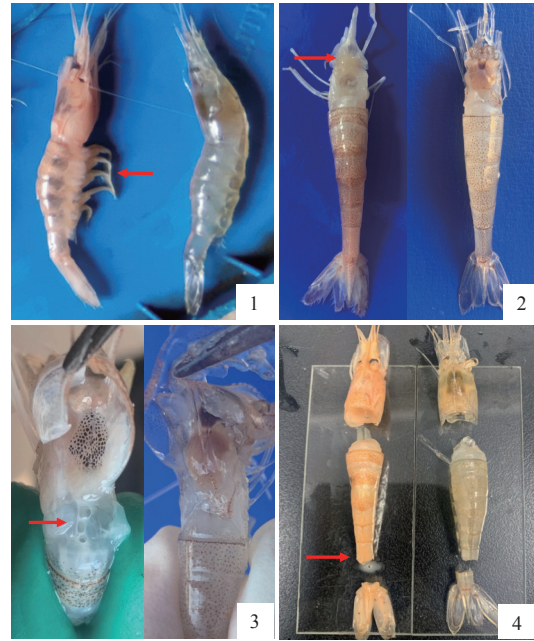
2.1 流行病学调查结果

患“僵尸病”脊尾白虾的主要症状 患病脊尾白虾表现出摄食下降或停止摄食、行动缓慢、反应迟钝, 离水不久便会死亡。患病脊尾白虾体表泛红, 附肢肿大呈白浊状, 头胸甲与附肢连接处呈肿胀突出, 打开头胸甲发现肝胰腺糜烂, 内部有大量乳白色组织渗出液聚集, 肌肉出现不同程度的液化, 呈不透明的白色, 血淋巴液也由正常时的透明色转变为乳白色(图版 I)。

主要流行病学特点 脊尾白虾“僵尸病”于 2018 年冬季开始在启东黄海滩涂开发有限公司养殖区首先出现, 呈慢性传播, 病情向邻近地区蔓延特点明显, 上年发病的池塘下年一般都会复发。周年跟踪调查显示, 脊尾白虾“僵尸病”发生的主要流行时间从 11 月开始即可被发现, 一直到次年 5 月, 其中高峰期多为 2—5 月, 此期间海水温度为 15~22 $^{\circ}$ C。从 2018 年冬季到 2021 年春季, 该病的发生越来越严重, 特别是在脊尾白虾主产区启东、东台等地; 发病率一般为 5%~30%, 死亡率为 3%~10%。该病主要感染个体比较大的脊尾白虾, 夏季或早秋无该病的发生。江苏北部沿海脊尾白虾与贝类混养模式中未见发生。相关调查结果见表 1。

2.2 病理学

组织切片观察 脊尾白虾鳃由鳃丝和鳃轴



图版 I 患病脊尾白虾症状

1. 自然患病脊尾白虾和健康脊尾白虾的对比图, 病虾附肢肿大呈白浊状(→); 2. 肝胰腺糜烂(→); 3. 头胸甲下蓄积大量乳白色组织渗出液(→); 4. 剪断尾柄可见乳白色血淋巴流出(→)。图中左边均为患病脊尾白虾, 右边为健康脊尾白虾。

Plate I Symptoms of diseased *E. carinicauda*

1. comparison of naturally diseased and healthy *E. carinicauda*, the appendages of diseased *E. carinicauda* were swollen, white and cloudy; 2. the hepatopancreas was erosive (→); 3. a large amount of milky tissue exudate accumulates under carapace (→); 4. milky haemolymph was seen when the tail handle was cut off (→). The diseased *E. carinicauda* on the left and healthy *E. carinicauda* on the right.

组成, 健康脊尾白虾的组织切片结果显示, 肌肉中肌纤维呈弯曲状紧密排列, 肌束间隙较小; 肝胰腺小管形状圆润, 排列紧密, 管腔横截面呈不规则多角形, 各小管之间存在结缔组织, 功能性细胞均清晰可见。

患病脊尾白虾的组织切片观察结果显示, 病虾的鳃丝较肿大, 鳃腔出现空泡变性, 部分鳃腔中定殖了大量的酵母, 鳃轴中大量细胞破碎, 无明显细胞结构; 肌纤维排列较为松散, 失去原有弯曲排列形态, 肌束间隙变大; 肝胰腺小管出现空泡化, 基膜破裂, 管腔体积变大, 各小管之间排列松散, 并发现大量定殖的菌体(图版 II)。

透射电镜观察 组织透射电镜结果显示, 在患病脊尾白虾鳃丝基膜内有酵母的存在, 大小形态均与致病菌扫描电镜结果一致; 在肌肉中细胞核染色质呈半月状聚集在核膜附近, 形成细胞凋亡的特征, 肌浆网呈囊泡化扩张, 肌丝结构紊

表 1 近 3 年江苏沿海地区脊尾白虾“僵尸病”发病率及死亡率调查情况

Tab. 1 Incidence of "zombie disease" and mortality of *E. carinicauda* in coastal areas of Jiangsu Province in the past three years

时间 time	启东 Qidong	通州湾 Tongzhou Bay	如东 Rudong	东台 Dongtai	大丰 Dafeng	滨海 Binhai	%		
	虾-蟹 shrimp-crab	虾-蟹 shrimp-crab	虾-蟹 shrimp-crab	虾-蟹 shrimp-crab	虾-蟹 shrimp-crab	虾-蟹 shrimp-crab	虾-贝 shrimp-shell	虾-蟹 shrimp-crab	虾-贝 shrimp-shell
2018-11—2019-05	10~15 [△]	10~15 [△]	10~15 [△]	5~10 [△]	5~10 [△]	0 [△]	5~10 [△]	0 [△]	
	3~5 [○]	0~3 [○]	0~3 [○]	0~3 [○]	3~5 [○]	0 [○]	0 [○]	0 [○]	
2019-11—2020-05	15~20 [△]	15~20 [△]	15~20 [△]	10~20 [△]	10~15 [△]	0 [△]	5~10 [△]	0 [△]	
	5~10 [○]	5~10 [○]	5~10 [○]	5~10 [○]	5~10 [○]	0 [○]	5~8 [○]	0 [○]	
2020-11—2021-05	25~30 [△]	20~25 [△]	20~25 [△]	20~30 [△]	15~20 [△]	0 [△]	20~30 [△]	0 [△]	
	8~10 [○]	7~10 [○]	7~10 [○]	7~10 [○]	5~7 [○]	0 [○]	5~10 [○]	0 [○]	

注: △. 发病率, ○. 死亡率。

Notes: △. morbidity, ○. mortality.

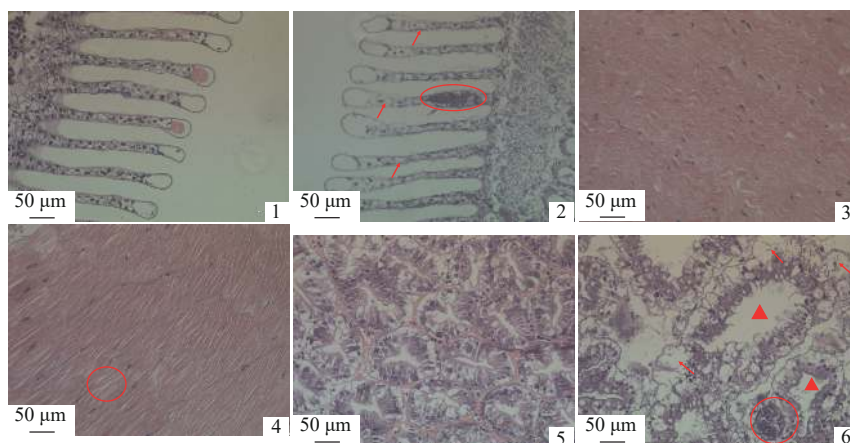
乱, 部分肌丝溶解断裂。在肝胰腺中, 肝小管基膜外存在大量酵母菌, 这与组织病理学结果一致, 还发现肝胰腺分泌细胞中线粒体肿胀空泡化, 残存线粒体腔, 其中粗面内质网也表现出囊泡化扩张(图版 III)。

2.3 病原学研究结果

病原菌分离 在 LB 培养基上, 从患病脊尾白虾血淋巴中分离得到了一株优势菌, 优势度大于 95%, 在 PDA 培养基上对该菌进行纯化培养,

生长表现良好, 命名为 MQ2101。27 °C 条件下培养 48 h 后能形成直径为 1~3 mm 的米黄色隆起菌落, 边缘整齐(图 1)。

人工回感实验 实验组中 3 组均在感染第 1 天出现死亡, 1/4 原菌液组第 5 天全部死亡, 7 d 后各组存活率分别为 0%、5% 和 11.5%。对照组在 7 d 内均未死亡, 存活率为 100%(图 2)。人工回感后的脊尾白虾表现出与自然患病白虾相同的症状(图版 IV), 且从回感染后脊尾白虾中也分离出了一株优势菌, 与菌株 MQ2101 的菌落形态、

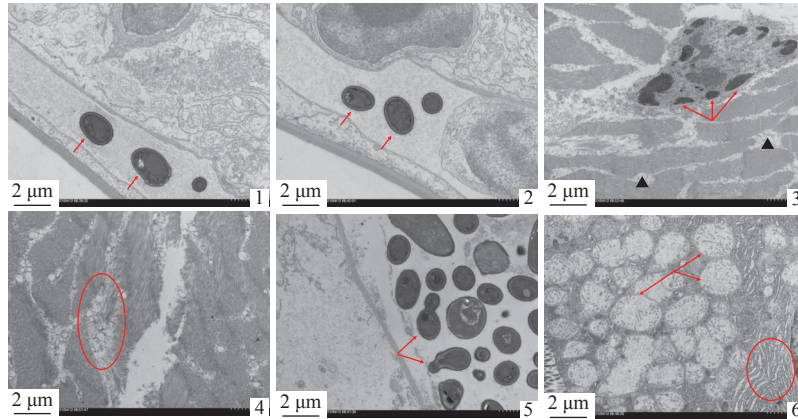


图版 II 患“僵尸病”脊尾白虾组织病理学观察

1. 健康脊尾白虾鳃组织切片; 2. 患病脊尾白虾鳃组织切片, 鳃腔出现空泡化(→), 定殖在鳃丝中的菌体(O); 3. 健康脊尾白虾肌肉切片; 4. 患病脊尾白虾肌肉组织切片, 肌纤维排列较为松散, 呈直线状排列(O); 5. 健康脊尾白虾肝胰腺切片; 6. 患病脊尾白虾肝胰腺切片, 肝胰腺中肝胰腺小管出现空泡化(→), 管腔体积变大(▲), 发现大量定殖的菌体(O)。

Plate II Histopathological observation of diseased *E. carinicauda*

1. pathohistological observation of gill from healthy *E. carinicauda*; 2. pathohistological observation of gill from diseased *E. carinicauda*. Vacuolization appeared in the gill cavity (→), and the bacteria colonized in gill filament (O); 3. pathohistological observation of muscle from healthy *E. carinicauda*; 4. pathohistological observation of muscle from diseased *E. carinicauda*. The muscle fibers arranged loosely and arranged in a straight line (O); 5. pathohistological observation of hepatopancreas from healthy *E. carinicauda*; 6. pathohistological observation of hepatopancreas from diseased *E. carinicauda*, the hepatopancreas tubules in the hepatopancreas became vacuolated (→), the lumen volume became larger (▲), a large number of colonized bacteria were found (O).



图版III 患“僵尸病”脊尾白虾组织透射电镜观察

1, 2. 鳃中鳃丝基膜内部存在菌体(→); 3. 肌细胞细胞核中染色质呈半月状聚集在核膜附近(→), 肌浆网呈囊泡化扩张(▲); 4. 肌丝结构紊乱, 部分肌丝溶解断裂(O); 5. 肝小管基膜外聚集了大量菌体, 部分正在进行出芽繁殖(→); 6. 肝胰腺分泌细胞中线粒体空泡化, 残存线粒体腔(→), 内质网呈囊泡化扩张(O)。

Plate III Transmission electron microscopic observation on the tissue of diseased *E. carinicauda*

1 and 2. there were bacteria in the basement membrane in the gill filament(→); 3. the chromatin in the nucleus of the muscle cell was gathered around the nuclear membrane in a semilunar shape (→), the sarcoplasmic reticulum was vesicled and expanded (▲); 4. myofilament structure was disordered, and some myofilaments were dissolved and broken (O); 5. a large number of bacteria accumulated outside the basement membrane of the liver tubule, and some were undergoing budding reproduction(→); 6. mitochondria in secretory cell of the hepatopancrea were vacuolated (→), and the endoplasmic reticulum were vesicularized and expanded (O).

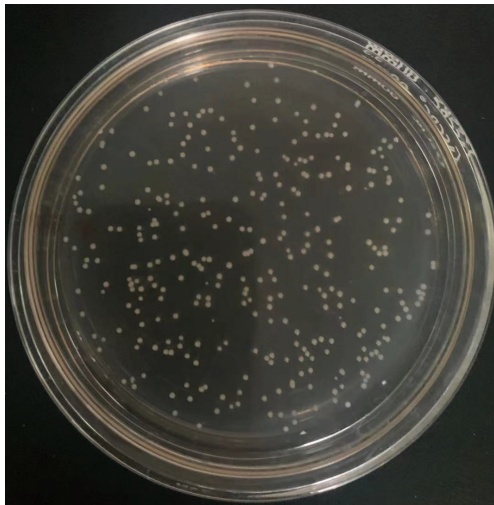


图1 PDA 培养基上菌株 MQ2101 的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of strain MQ2101 on PDA plate

生长特性完全一致, 表明分离得到的菌株 MQ2101 为脊尾白虾“僵尸病”病原菌, 且对脊尾白虾具有较强的致病性。

根据人工回感实验结果, 采用改良寇氏法初步计算脊尾白虾在注射菌株 MQ2101 后 3 d 时的 LD₅₀=1.39×10⁷ CFU/尾。

扫描电镜观察 菌株 MQ2101 的扫描电镜结果发现, 菌体呈椭圆形, 繁殖方式为出芽繁殖, 在部分菌体表面发现多重出芽留下的芽痕, 表现

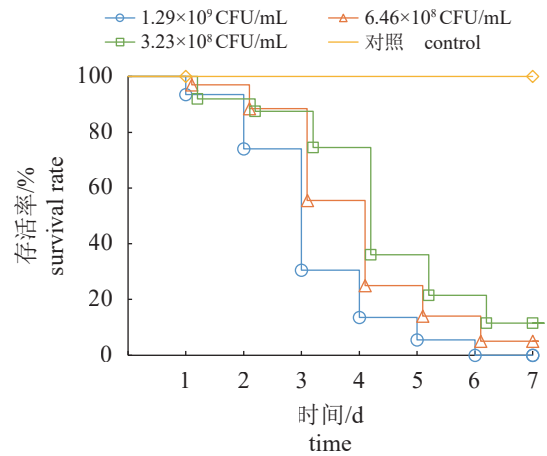


图2 菌株 MQ2101 人工回感实验结果

Fig.2 Artificial infection results of the strain MQ2101

出酵母的形态。从视野中随机选取 10 个菌体测量大小, 结果显示, 单个菌体长度为 (1.53~2.88) μm, 平均长度为 (1.96±0.43) μm, 宽度为 (0.9~1.44) μm, 平均宽度为 (1.23±0.17) μm (图版 V)。

病原菌分子生物学鉴定 通过 SSU 引物对 MQ2101 菌株进行特异性扩增, 获得的片段长度为 1 703 bp。将基因序列提交至 GenBank, 登录号为 MW876247.1。对目的序列进行 BLASTN 比对, 结果显示菌株 MQ2101 与二尖梅奇酵母 (*Metschnikowia bicuspidata*) 一致性高达 99.82%。



图版 IV 自然感染与人工回感的脊尾白虾

1. 自然发病(左)与健康(右)脊尾白虾; 2. 人工回感组(左)与对照组(右)的脊尾白虾。

Plate IV *E. carinicauda* of natural infection and artificial re-pathogenic

1. naturally infected (left) and healthy *E. carinicauda* (right); 2. *E. carinicauda* of artificial infection group (left) and control group (right).

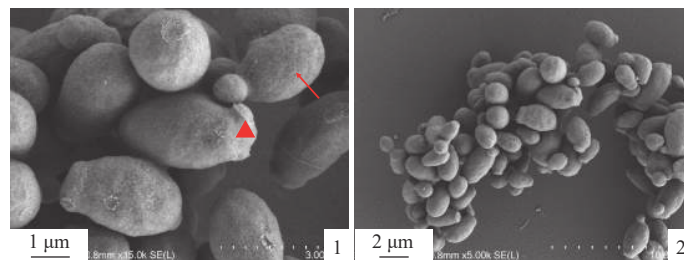
系统进化树结果显示, MQ2101 菌株与二尖梅奇酵母自然聚为一支, 亲缘关系较近(图 3), 结合该菌体的形态及其大小特点, 判定菌株 MQ2101 为二尖梅奇酵母。

3 讨论

脊尾白虾“僵尸病”是近几年来在江苏沿海盛行的一种疾病, 发病季节主要集中在冬春之交。患病脊尾白虾主要表现出体色发红、反应迟钝、摄食下降, 打开头胸甲发现有大量乳白色液体蓄积。这种症状与 2008 年许文军等^[10]在浙江地区发现的患“白浊病”脊尾白虾较为相似, 患“白浊病”

脊尾白虾游动缓慢, 体色发白, 打开头胸甲可以发现肝胰腺糜烂, 血淋巴液呈浊白色, 其病原经鉴定为血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.), 是一种寄生在海水甲壳类中的腰鞭虫, 能大量寄生于甲壳类动物的血腔、肌肉和肝胰腺中^[11]。但由血卵涡鞭虫引起的脊尾白虾“白浊病”主要暴发于夏季高温季节, 冬季几乎检测不到发病, 因此, 江苏沿海地区脊尾白虾“僵尸病”与浙江脊尾白虾的白浊病流行病学特点有明显差异。本研究从患病脊尾白虾血淋巴中分离纯化出菌株 MQ2101, 经回感实验确定了其为脊尾白虾“僵尸病”的病原菌, 结合形态学观察和 18S *rRNA* 序列扩增及系统发育分析鉴定其为二尖梅奇酵母, 这是首次发现二尖梅奇酵母在海水脊尾白虾养殖中具有致病性的报道。

酵母是一种单细胞真核微生物, 属兼性厌氧菌^[12]。一些有益酵母菌在水产养殖中也常被当作饲料添加剂使用^[13-14], 而有关水产动物酵母菌致病的案例也有研究报道。目前已知的水产动物致病酵母有葡萄牙假丝酵母 (*Candida lusitanae*)^[15]、莫格球拟酵母 (*Torulopsis mogii*)^[16]、汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*)^[17] 等。葡萄牙假丝酵母可以侵染三疣梭子蟹使其患乳化病, 病蟹蟹体消瘦, 各组织乳化严重, 发病死亡率可达 40%。莫格球拟酵母感染罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 主要暴发于亲虾越冬时, 病虾步足发红、肝胰腺糜烂, 死亡率可达 90%。汉逊德巴利酵母感染罗氏沼虾发生于 12 月—次年 2 月, 病虾体色泛黄, 全身肌肉和血淋巴呈白浊状。本研究所分离出的致病酵母为二尖梅奇酵母, 是梅奇酵母属的一种, 与其同属的美极梅奇酵母 (*M. pulcherrima*) 有较强的生物拮抗功能, 能够抑制芒果炭疽病的发生^[18], 梅奇酵母 XY201 (*M. zizyphicola*) 则



图版 V 菌株 MQ2101 扫描电镜观察

1. 正在进行出芽繁殖的酵母 (→), 出芽繁殖后留在酵母表面突出的芽痕 (▲); 2. 测量菌体的长度、宽度。

Plate V Scanning electron microscope photograph of strain MQ2101

1. yeast undergoing budding reproduction (→), the bud scar left on the surface of the yeast after budding reproduction (▲); 2. measuring the length and width of the bacteria.

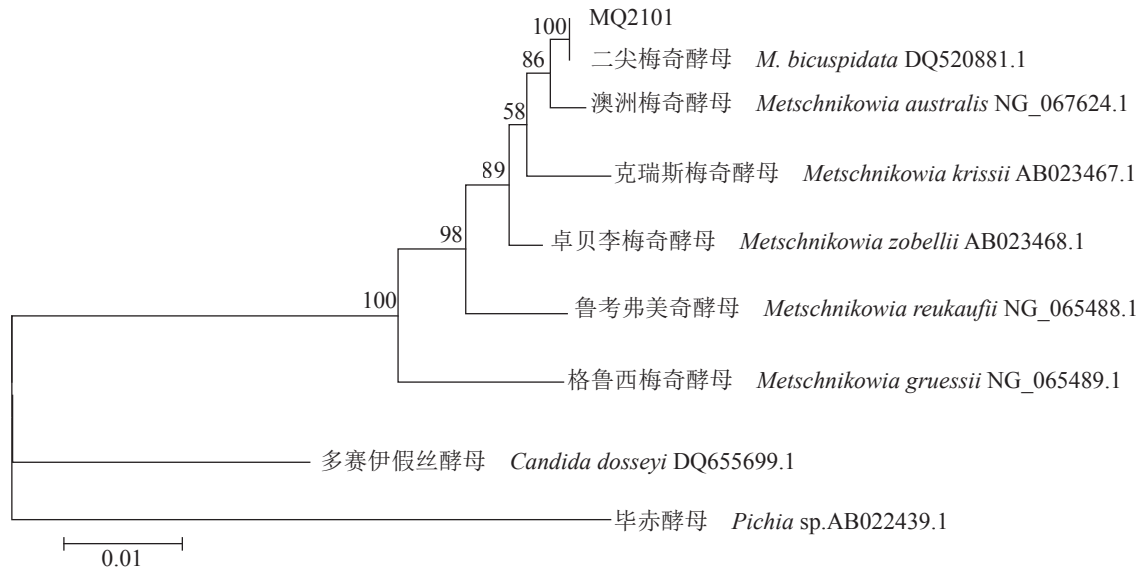


图3 基于18S rRNA序列的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequence

常被用来抑制冬枣采后的病原真菌^[19]。关于二尖梅奇酵母作为病原菌的案例也有报道, 2003年在台湾省就有报道二尖梅奇酵母与屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 混合感染罗氏沼虾^[20], 发病时间集中在10月—次年3月, 最高死亡率达到48%, 平均死亡率为25%, 病虾表现为食欲不振, 体色呈黄褐色, 肝胰腺肿大, 肌肉浑浊, 血淋巴呈乳白色, 在肌肉组织中还发现了大小不同的淡黄色斑点。同年又有报道二尖梅奇酵母作为单独致病菌致使大鳞钩吻鲑 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 患病死亡^[21], 主要是由于捕食感染二尖梅奇酵母的成年卤虫而患病, 死亡率达到34%, 在病鱼内脏中发现大量白色黏连与肿块, 内脏与腹腔有大量酵母细胞聚集。2020年4月, 辽宁省发生中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 患“牛奶病”^[22-23], 总体发病率达30%, 病蟹活力较差, 步足发白易脱落, 打开头胸甲可见明显白色牛奶状液体, 经鉴定该病原也为二尖梅奇酵母。结合此次研究可以发现, 二尖梅奇酵母感染甲壳类动物多发于低温季节(10月—次年5月), 这是目前已报道的二尖梅奇酵母感染性疾病的共同特点。

有关脊尾白虾中二尖梅奇酵母的致病机制和其在养殖环境中的感染传播途径及具体的防治措施都尚不明确, 有待进一步研究。Chen等^[24]提出酵母是在池塘水或沉积物中通过与虾口或鳃的接触而进入虾体内, 被宿主血淋巴吞噬并包裹在膜状液泡内, 在有限的复制条件下保持存活,

当水温降低时宿主对酵母的易感性提高, 酵母就在血淋巴中快速繁殖, 最终溶解并大量释放酵母细胞。在虾血淋巴中发现的非常高浓度的酵母细胞也证实了这一点, 低水温下虾体对酵母的易感性也解释了为何白虾在冬季才开始大规模暴发“僵尸病”。Moore等^[21]认为大鳞钩吻鲑是通过摄食感染二尖梅奇酵母的成年卤虫而患病, 酵母通过卤虫作为介质进入鱼体肠道内, 在肠道内成熟, 通过开裂的方式主动释放针状孢子, 针尖状的形态赋予了子囊穿透宿主肠内层的能力, 这就使得酵母从肠道开始渗透感染, 最后蔓延到全身。脊尾白虾出现“僵尸病”典型症状时, 已经进入感染后期, 增加了该病的治疗难度。建议养殖过程中加强预防意识, 贯彻防大于治的原则, 选择优质苗种, 加强投喂管理, 密切关注环境温度, 保持养殖水体稳定平衡, 实施养殖环境生态调控, 另外可以投放一些肉食性鱼类, 捕食感染的病虾, 切断传播链, 实现脊尾白虾的健康养殖。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 马鸿梅, 王兴强, 曹梅, 等. 脊尾白虾养殖研究进展[J]. 现代农业科技, 2019(16): 171-175.
- Ma H M, Wang X Q, Cao M, et al. Research progress on culture of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(16): 171-175 (in

- Chinese).
- [2] 沈晔, 王兴强, 曹梅, 等. 脊尾白虾养殖技术研究[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(15): 76-80.
- Shen Y, Wang X Q, Cao M, *et al.* Study on the culture technology of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2019, 25(15): 76-80 (in Chinese).
- [3] Liu S, Wang X, Xu T T, *et al.* Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 29-36.
- [4] 李小平, 万晓媛, 张庆利, 等. 2016—2017年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒(CMNV)分子流行病学调查[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 65-73.
- Li X P, Wan X Y, Zhang Q L, *et al.* Molecular Epidemiological Survey of Covert Mortality Nodavirus (CMNV) in Cultured Crustaceans in China in 2016-2017[J]. *Progress In Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 65-73 (in Chinese).
- [5] 张年国, 潘桂平, 周文玉. 脊尾白虾在套养池塘中的病害及其防控对策[J]. *科学养鱼*, 2015(7): 59-60.
- Zhang N G, Pan G P, Zhou W Y. Diseases of *Exopalaemon carinicauda* in polyculture pond and its measures of prevention and control[J]. *Scientific Fish Farming*, 2015(7): 59-60 (in Chinese).
- [6] 张文文, 王庚申, 施慧, 等. 一种引起脊尾白虾红体病原菌的初步研究[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2014, 34(1): 65-71.
- Zhang W W, Wang G S, Shi H, *et al.* Preliminary study on one pathogenic bacterium-*Vibrio harveyi* associated with red body disease in cultured *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2014, 34(1): 65-71 (in Chinese).
- [7] 王元, 房文红, 周俊芳, 等. 脊尾白虾肌肉微孢子虫病的病原和病理分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(5): 726-733.
- Wang Y, Fang W H, Zhou J F, *et al.* Pathogenic and pathological analysis of the muscular microsporidiosis of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 726-733 (in Chinese).
- [8] 沈辉, 万夕和, 王李宝, 等. 白斑综合征病毒对脊尾白虾的致病性研究[J]. *海洋科学*, 2013, 37(5): 55-60.
- Shen H, Wan X H, Wang L B, *et al.* Study on experimental infection of *Exopalaemon carinicauda* Holehuis with white spot syndrome virus[J]. *Marine Sciences*, 2013, 37(5): 55-60 (in Chinese).
- [9] 李新苍, 周俊芳, 房文红, 等. 实用WSSV定量检测方法的建立及其应用于脊尾白虾病毒感染规律的研究[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1554-1562.
- Li X C, Zhou J F, Fang W H, *et al.* Development and application of an economical real-time PCR for WSSV detection and quantification in ridgetail white prawns (*Exopalaemon carinicauda*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1554-1562 (in Chinese).
- [10] 许文军, 谢建军, 施慧, 等. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(3): 396-402.
- Xu W J, Xie J J, Shi H, *et al.* Infection of *Hematodinium* sp. in farmed ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(3): 396-402 (in Chinese).
- [11] 许文军, 徐汉祥, Shield J, 等. 海产甲壳类血卵涡鞭虫病研究进展[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 695-702.
- Xu W J, Xu H X, Shield J, *et al.* Progress of studies on *Hematodinium* sp. disease in marine crustacean[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(4): 695-702 (in Chinese).
- [12] 袁园, 葛莹, 钟佳祎, 等. 酵母菌在动物饲料营养学中的研究进展[J]. *饲料博览*, 2018(4): 19-22.
- Yuan Y, Ge Y, Zhong J Y, *et al.* Research progress of *Sacharomyces* in animal feed nutrition[J]. *Feed Review*, 2018(4): 19-22 (in Chinese).
- [13] Lu J, Bu X, Xiao S, *et al.* Effect of single and combined immunostimulants on growth, anti-oxidation activity, non-specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 732-742.
- [14] Zhang R, Jiang Y, Zhou L, *et al.* Effects of dietary yeast extract supplementation on growth, body composition, non-specific immunity, and antioxidant status of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 1019-1025.
- [15] 王国良, 金珊, 陈寅儿, 等. 三疣梭子蟹肌肉乳白病的

- 病原及其致病性研究[J]. *海洋科学进展*, 2006, 24(4): 526-531.
- Wang G L, Jin S, Chen Y E, *et al.* Study on pathogens and pathogenesis of emulsification disease of *Portunus trituberculatus*[J]. *Advances in Marine Science*, 2006, 24(4): 526-531 (in Chinese).
- [16] 孙玉华, 孙其焕. 罗氏沼虾亲虾暴发性疾病病原的研究及防治[J]. *水产学报*, 1998, 22(1): 56-60.
- Sun Y H, Sun Q H. Studies on pathogenic organism and prevention and cure for explosive epidemic disease of parent prawn of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(1): 56-60 (in Chinese).
- [17] 徐荣彬, 刘正义. 养殖淡水长脚大虾感染酵母菌之研究 [C]//农委会渔业特刊第四十七号. 鱼病研究专集. 1994 (15): 55-68.
- Xu R B, Liu Z Y. Study on yeast infection in cultured *Macrobrachium rosenbergii*[C]// Fisheries special issue No. 47. Monographic series of fish disease research, 1994 (15): 55-68 (in Chinese).
- [18] Tian Y Q, Li W, Jiang Z T, *et al.* The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(1): 95-105.
- [19] 王亮, 薛梦林, 施俊凤, 等. 梅奇酵母XY201菌株对采后冬枣黑斑病和青霉病的抑制效果[J]. *园艺学报*, 2010, 37(10): 1583-1590.
- Wang L, Xue M L, Shi J F, *et al.* Inhibiting effects of *Metschnikowia zizyphicola* strain XY201 on black spot and blue mold of fresh jujube ‘Dongzao’ during storage[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(10): 1583-1590 (in Chinese).
- [20] Chen S C, Chen T H, Wang P C, *et al.* *Metschnikowia bicuspidata* and *Enterococcus faecium* co-infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55(2): 161-167.
- [21] Moore M M, Strom M S. Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*)[J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 43-57.
- [22] 马红丽, 孙娜, 陆晓岑, 等. 辽宁地区中华绒螯蟹“牛奶病”的病原分离与鉴定[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(5): 714-718.
- Ma H L, Sun N, Lu X C, *et al.* Isolation and identification of pathogen in milky disease of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* in Liaoning Province[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2020, 35(5): 714-718 (in Chinese).
- [23] Bao J, Jiang H B, Shen H B, *et al.* First description of milky disease in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* caused by the yeast *Metschnikowia bicuspidata*[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 735984.
- [24] Chen S C, Chen Y C, Kwang J, *et al.* *Metschnikowia bicuspidata* dominates in Taiwanese cold-weather yeast infections of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 75(3): 191-199.

A preliminary study on the "zombie disease" of *Exopalaemon carinicauda*

ZHAO Ran^{1,2}, SHI Wenjun², WANG Libao², LI Hui², YU Zhijun^{1,2}, HU Runhao^{1,2}, WU Xugan¹,
SHEN Hui², QIAO Yi², CHENG Jie², JIANG Ge², WAN Xihe^{2*}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Oceanology & Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

Abstract: In recent years, an epidemic disease called "zombie disease" by local farmers has appeared in the ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) breeding area of Jiangsu Province. The main symptoms of the disease include reddish body color, whitish muscles and milky liquid under the carapace. The diseased prawns usually show slow movement and reduce food intake and died quickly after leaving the water. In order to determine the pathogen and epidemiological characteristics of the "zombie disease" in farmed *E. carinicauda* in the coastal area of Jiangsu Province since the winter of 2018, LB medium and PDA medium were used to isolate colonies with a diameter of 1-3 mm, neat edges, and beige-colored elevation from the hemolymph of diseased shrimp, which was named MQ2101. This strain was identified as *Metschnikowia bicuspidata* by means of morphologic structure observation, 18S *rRNA* gene analysis and constructing phylogenetic tree. Furthermore, the pathogenicity of the strain MQ2101 was confirmed by the infection experiment in healthy *E. carinicauda*. The results showed the infected *E. carinicauda* died with the similar symptoms to naturally morbid *E. carinicauda* and the same bacterium could be isolated from the infected *E. carinicauda*. The LD₅₀ of strain MQ2101 to *E. carinicauda* was 1.39×10^7 CFU/ind. Histopathology and transmission electron microscopic observation showed that there were different degrees of lesions in gills, muscle and hepatopancreas, of which hepatopancreas lesions were the most serious, with hepatic tubules vacuolated and lumen volume enlarged. Moreover, a large number of colonized bacteria were found in gill and hepatopancreas. Epidemiological findings showed the disease frequently occurred in the cool season (February to May), mainly erupted in prawn and crab mixed ponds, with a incidence rate of 5%-30% and a mortality rate of 3%-10%, the morbidity was increasing year by year. In the present study, *M. bicuspidata* was identified as the pathogen of "zombie disease" in *E. carinicauda* in coastal areas of Jiangsu Province, which is highly pathogenic to *E. carinicauda* and mainly infects the hepatopancreas and gills. It was the first time that revealed *M. bicuspidata* infection in *E. carinicauda* and the pathological changes caused by the infection. The above findings provide a scientific basis for the prevention and control of "zombie disease" in the culture of prawns.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; zombie disease; *Metschnikowia bicuspidata*; separation and identification; histopathology

Corresponding author: WAN Xihe. E-mail: wxh1708@163.com

Funding projects: Six Talent Peaks of Jiangsu Province 2019 (NY106); Jiangsu Province Agricultural Major New Variety Creation Project (PZCZ201747); The Fifth Phase of Nantong City "226 Project" Scientific Research Funding Project in 2020 (NT226-202021); The Earmarked Fund for Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JATS [2021] 417); Major Aquatic Animal Diseases Monitoring and Control Project of Jiangsu Province in 2021 (2021-SJ-067-02)