

山瑞鳖细菌性败血症病原菌的分离鉴定及其毒力基因检测

韩书煜^{1,2}, 梁静真^{1,3}, 覃志彪^{1,3}, 黄艳华⁴, 韦慕兰⁵,
蒙兰丽⁶, 黄维⁶, 胡大胜^{1,2}, 黄钧^{1,3*}

- (1. 广西水生动物病害诊断实验室, 广西南宁 530005;
2. 广西水产技术推广总站, 广西南宁 530022;
3. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005;
4. 钦州市水产技术推广站, 广西钦州 535000;
5. 都安瑶族自治县水产技术推广站, 广西都安 530700;
6. 田东县水产技术推广站, 广西田东 531500)

摘要: 查明广西南宁、贵港和桂平养殖山瑞鳖细菌性败血症的病原菌及其6种毒力基因的携带情况, 为有效防控山瑞鳖细菌性败血症提供参考。本研究以常规方法从患病山瑞鳖的心脏和肝脏取样、分离细菌, 人工感染方法确定分离菌株的致病性, 细菌鉴定采用API 20NE生化鉴定和16S rRNA分子鉴定相结合的方法进行, PCR扩增法对菌株的溶血素基因(hemolysin gene, *hly*)、气溶素基因(aerolysin gene, *Aer*)、细胞兴奋性肠毒素基因(cytotoxic enterotoxin gene, *Act*)、细胞毒性肠毒素基因(cytotoxic enterotoxin gene, *Act*)、黏附素基因(major adhesin gene, *ahal*)和丝氨酸蛋白酶基因(serine protease gene, *ahp*)6种毒力基因进行检测。结果显示, 从患病山瑞鳖心脏和肝脏中共分离到4株优势菌SRB125、SRB142、SRB143和SRB345, 对健康山瑞鳖的平均致死率为97.50%~100.00%, 是引起山瑞鳖细菌性败血症的病原菌; 生化和分子鉴定结果显示, 4株分离菌均为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 与*A. hydrophila* L3-5 (KP716701)菌株的亲缘关系最近, 同源相似性均达到99.9%; 6种毒力基因共包含2种毒力基因型, 在4株菌株中的分布为 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^+ahp^+$ 和 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^-ahp^-$ 各2株, 来源于南宁的SRB143和桂平的SRB345菌株均缺失*ahp*基因。

关键词: 山瑞鳖; 细菌性败血症; 嗜水气单胞菌; 毒力基因

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

山瑞鳖(*Palea steindachneri*)隶属龟鳖目(Tesudines)、鳖科(Trionychidae), 为国家二级保护动物, 国内主要分布于广西、广东、云南、贵州、台湾和海南等地, 国外分布于越南^[1]。山瑞鳖具有较高的经济和药用价值, 目前在我国南方各省/区被广泛进行人工繁殖和养殖^[2-5], 同时也是广西龟鳖产业中重要的名贵经济动物之

一。山瑞鳖的养殖方式主要有室内水池养殖和室外池塘养殖。近年来对广西龟鳖的病害监测发现, 无论是室内还是室外养殖, 当管理不善时, 山瑞鳖容易感染各种细菌、真菌和寄生虫等疾病, 其中以细菌性疾病尤为常见^[6-10]。因细菌引起的患病山瑞鳖常见症状主要有颈部溃烂、口腔及肺等内脏器官出血、全身性水肿、底

收稿日期: 2016-09-25 修回日期: 2017-04-11

资助项目: 广西水产畜牧兽医局专项(桂渔牧财[2013]35号, 桂渔牧财[2014]52号, 桂渔牧财[2015]97号); 南宁市科技局科技计划项目(南科发〔2012〕51号-20122096; 南科发〔2013〕46号-20132124)

通信作者: 黄钧, E-mail: hj1351@163.com

板发红、体腔中有腹水等,不同养殖区域、不同养殖方式发病山瑞鳖的症状和病原也不尽相同。可见,在广西山瑞鳖细菌性疾病的症状和病原均表现为多样性。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属条件致病菌,对水生动物具有广泛的致病性,已知嗜水气单胞菌等病原菌所携带的毒力基因对病原菌的致病力有直接影响^[11-14],因此有关水生动物病原菌毒力基因的研究倍受国内外学者的关注^[11-24]。已发现嗜水气单胞菌具有包括外毒素(exotoxin)、胞外酶(exoenzyme)和膜上黏附因子(adherent factor)等众多的毒力基因,在这些毒力基因中,溶血素基因*hly*、气溶素基因*Aer*、细胞兴奋性肠毒素基因*Alt*和细胞毒性肠毒素基因*Act*具有溶血性、肠毒性和细胞毒性,黏附素基因*ahal*和丝氨酸蛋白酶基因*ahp*在病原菌的致病过程中也起了重要作用,可直接破坏宿主的组织或促进细菌的侵袭而致病,因此对感染对象也具有严重的危害性。朱大玲等^[11]、刘杰等^[15]和张晓君等^[16]分别检测了鱼源嗜水气单胞菌中的气溶素基因*Aer*等3种毒力基因,Vijai等^[17]检测了鱼源和鱼塘水中嗜水气单胞菌分离株的气溶素基因,蒋春阳等^[12]对池塘水中嗜水气单胞菌的气溶素*Aer*等6种主要胞外毒力基因进行了检测,方兵等^[18]对6株鱼源、蟹源和鳖源气单胞菌安徽分离株进行*ahal*、*hly*和*Alt*基因的PCR扩增、克隆和测序,潘晓艺等^[19]对嗜水气单胞菌2个潜在的共同保护性抗原基因丝氨酸蛋白酶基因*spe*和溶血素基因*hly*进行了克隆和融合表达,黄艳华等^[20]、黄钧等^[21]和王志铮等^[22]分别对黄沙鳖(*Pelodiscus sinensis*)和中华鳖鳖源气单胞菌的毒力基因进行了检测,罗志飞等^[23]检测了鲫(*Carassius auratus*)和水环境源嗜水气单胞菌的温敏胞外蛋白酶(*eprCAI*)等5种毒力基因并进行了相关特性分析,Sen等^[24]研究了弹性蛋白酶(*ahyB*)等6种毒力基因在饮用水源气单胞菌中的分布。但至今未见有关养殖山瑞鳖细菌性败血症病原菌及其毒力基因携带情况的研究报告。2013至2015年间,广西南宁、贵港和桂平等地池塘人工养殖的山瑞鳖分别发生暴发性死亡,至作者到达现场采样时,各地发病山瑞鳖的死亡率为20%~50%。根据发病个体的外观症状初步判定为细菌性败血症,由于广西山瑞鳖细菌性疾病病原呈多样性^[6-10],本实验现场采集发病山瑞鳖带回实验室后进行病原菌的分离鉴定,并结合广西对水生

动物源气单胞菌毒力基因的研究状况^[13-15, 20-21],对病原菌的*hly*、*Aer*、*Alt*、*Act*、*ahal*和*ahp*共6种毒力基因进行检测,以查明引起山瑞鳖暴发性死亡的病原菌及其毒力基因的携带情况,旨在对山瑞鳖暴发性死亡的有效防治和水生动物病原菌毒力基因的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病山瑞鳖为2014年和2015年的6月至8月分别采自广西南宁、贵港和桂平3个龟鳖养殖场,个体质量316~1260 g,发病池塘水温(上午9-11时,距水面约30 cm深处)29~32 °C。用于人工感染实验的健康山瑞鳖购自广西南宁某水产养殖公司,平均体质量(180.9±10.2) g,购回后经15 d暂养,暂养期间正常饲养管理,成活率100%,用于实验前随机抽取5只剖检观察,并进行细菌分离培养,5只山瑞鳖均无肉眼可见病症,也未分离到细菌。

普通营养琼脂培养基和兔血琼脂培养基购自北京陆桥有限公司,氧化酶试剂、API细菌鉴定试剂条及相关配套试剂购自法国梅里埃公司。PCR扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成。10×PCR Buffer、10 mmol/L dNTPs、*Taq* DNA聚合酶、25 mmol/L的MgCl₂、ddH₂O均购自宝生物工程(大连)有限公司。琼脂糖购自Invitrogen(美国)公司。细菌基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 细菌分离

对病样的外观症状进行检查记录后,用75%酒精棉球擦拭病样体表,无菌条件下进行解剖,观察记录其内部器官的病症。对发病症状典型的个体取其心脏、肝脏和腹水等病料,划线接种到普通营养琼脂培养基上36.8 °C培养24 h,挑取优势菌落经纯化培养转接到甘油营养培养基中,-80 °C冰箱保存备用,同时接种到兔血琼脂培养基上,36.8 °C培养24 h观察细菌的溶血性。

1.3 病原的鉴定

无菌滤液的人工感染 按黄艳华等^[20]和黄钧等^[21]的方法,取患病山瑞鳖的心脏、肝脏、脾脏等内脏组织器官匀浆,10 °C低温离心(10 000 r/min) 30 min后取上清液,以0.22 μm微孔细菌滤器

过滤得无菌滤液。涂布培养法检验无菌滤液是否无菌, 对健康山瑞鳖进行无菌滤液的人工感染, 实验组和对照组(各20只)分别从后腿基部肌肉注射无菌滤液和无菌PBS液, 每只注射量均为0.5 mL, 然后连续进行15 d的饲养观察。若发生死亡现象即取刚死或濒死个体内脏再制成无菌滤液并进行人工感染实验。

菌悬液的人工感染 取保存的分离菌株经3次传代培养, 再以普通营养琼脂培养基进行扩大培养, 36.8 °C培养18~24 h后, 用无菌PBS液洗下菌苔并制成菌悬液, 并以细菌比浊仪将细菌浓度调成 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL。菌悬液的人工感染按无菌滤液人工感染方法进行实验分组和注射, 菌悬液和无菌PBS液的注射量均为0.5 mL/只, 注射后将实验组和对照组山瑞鳖分别在不同水族箱中进行正常饲养管理。每天定时投喂、换水和测定水温, 观察记录各组山瑞鳖的发病和死亡情况, 实验共观察18 d。

无菌滤液和菌悬液的人工感染均在室内自然温度状态下进行, 实验期间日平均水温(24.3 ± 2.1) °C。

1.4 分离菌株的鉴定

API生化鉴定 根据分离菌株的氧化酶试验结果选用API 20NE或API 20E细菌鉴定系统按产品说明书进行细菌的生化鉴定。

16S rRNA分子鉴定 按文献^[19-20]的方法, 收集菌体并提取细菌基因组DNA, -20 °C保存备用。PCR扩增采用细菌通用引物, 正反向引物分别为fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', rp2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系(25 μ L): 10 \times PCR缓冲液2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L, 10 μ mol/L上下游引物各1 μ L, Taq DNA聚合酶(5U) 0.3 μ L, DNA模板3 μ L, ddH₂O补足余量。扩增条件: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 56 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 30个循环, 最后72 °C延伸10 min。PCR反应结束后以1.0%琼脂糖凝胶在100 V电压下电泳35 min, 凝胶成像分析系统(北京六一, WD-9413B)观察电泳结果。PCR产物由上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 病原菌毒力基因的检测

PCR扩增法对*Aer*^[17]、*ahal*^[18]、*hly*^[25]、*Alt*^[26]、*Act*^[27]和*ahp*^[28]6种毒力基因进行检测, 毒力基因检

测按黄艳华等^[20]和黄钧等^[21]的方法, 挑取实验菌株接种于4 mL的LB培养基中, 置于28 °C、200 r/min振荡培养16 h, 按DNA提取试剂盒说明书提取细菌基因组DNA, 各毒力基因的引物序列均与参考文献^[17-18, 25-28]的引物序列相同, 退火温度和目的基因片段大小见表1。

表1 各毒力基因的退火温度及目的基因片段大小

Tab. 1 Annealing temperature and target fragment length of each virulence gene

毒力基因 virulence gene	退火温度/°C annealing temperature	片段大小/bp fragment length
<i>hly</i>	64	597
<i>Aer</i>	53	326
<i>Alt</i>	60	482
<i>Act</i>	56	232
<i>ahp</i>	56	898
<i>ahal</i>	59	1132

PCR的反应体系、电泳及电泳结果观察与细菌的16S rRNA分子鉴定相同。PCR产物由上海生工生物工程有限公司测序。

2 结果

2.1 自然发病山瑞鳖的主要症状

本实验采自广西南宁、贵港和桂平的山瑞鳖病样主要症状均为红底板、红脖子, 四肢和肠道发红, 体腔中有大量血色腹水, 其中来自贵港的1只山瑞鳖病样有咽喉内膜发红症状(图1-a, b, c)。

2.2 细菌的分离结果

从广西贵港、南宁、桂平的发病山瑞鳖中共分离到4株优势菌株, 分别命名为SRB125、SRB142、SRB143和SRB345, 其中SRB125来源于贵港, SRB142和SRB143来源于南宁, SRB345来源于桂平。4株细菌均为革兰氏阴性短杆菌, 在兔血培养基中均呈 β 溶血(图2)。

2.3 无菌滤液的人工感染结果

涂布在普通营养琼脂培养基上的无菌滤液在36.8 °C条件下经24 h培养无可见菌落。注射无菌滤液和无菌PBS液的山瑞鳖经15 d的连续观察, 反应灵敏, 摄食正常, 均未出现病症或死亡。认

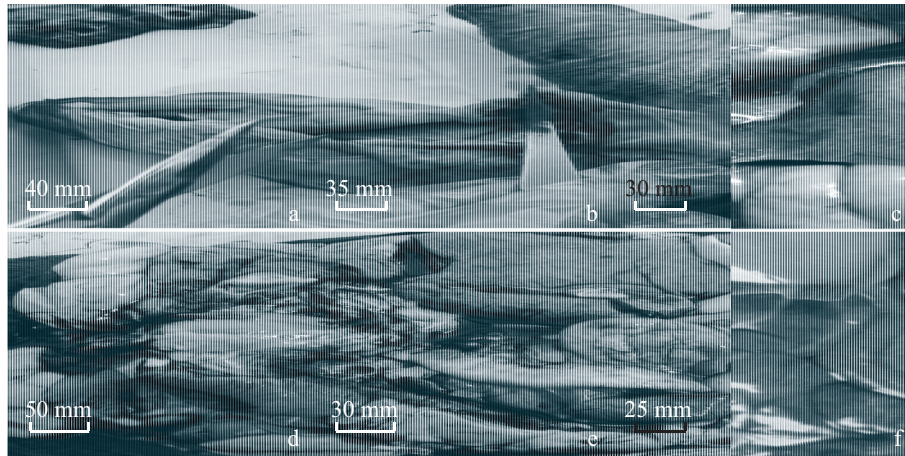


图1 发病山瑞鳖的主要症状

a. 底板、四肢及咽喉内膜发红; b. 肠道发红; c. 体腔中有大量腹水; d. 肠道发红; e. 咽喉内膜轻度发红; f. 肠道发红, 体腔中有大量腹水

Fig. 1 Major symptoms of diseased *P. steindachneri*

a. rubedo of plastron, four limbs and throat intima; b. rubedo of intestinal tract; c. plenty of ascites in the body cavity; d. rubedo of intestinal tract; e. mild rubedo of throat intima; f. rubedo of intestinal tract, and plenty of ascites in the body cavity

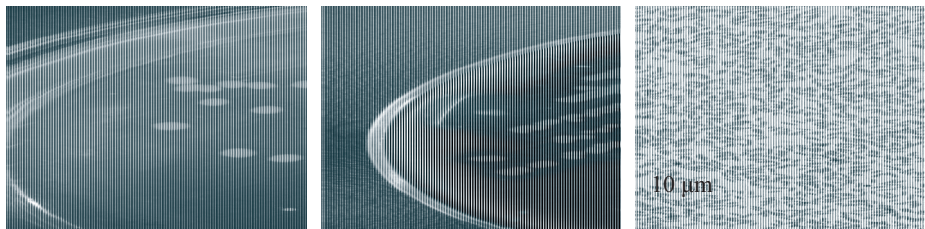


图2 分离菌株的菌落形态(左)、溶血性(中)和染色特性(右)

Fig. 2 Colony morphology (left), hemolytic property (middle), and staining property (right) of the isolated strains

为引起广西南宁、贵港和桂平池塘人工养殖山瑞鳖暴发性死亡的病原与病毒有关的可能性小。

菌悬液人工感染结果, 4株分离菌株对健康山瑞鳖的平均致死率: SRB125和SRB142均为100.00%, SRB143和SRB345均为97.50%(表2), 对照组的活动和摄食正常, 无一出现病症或死亡现象。

据观察, 人工感染后发病的山瑞鳖均出现底板和脖子发红、肠道发红、体腔中有大量腹水的症状, 与自然发病山瑞鳖的病症基本相同(图1-d, e, f), 认为4株分离菌株都是引起广西南宁、贵港和桂平池塘人工养殖山瑞鳖暴发性死亡的病原菌。

2.4 病原菌鉴定结果

API生化鉴定结果 4株菌株的氧化酶实验均为阳性, 以API 20NE进行生化鉴定。结果表

明, 菌株SRB125、SRB142、SRB143和SRB345的API阳性代码值分别为7777757、7777757、7577754和7577755。API生化鉴定结果显示4株菌株均为嗜水气单胞菌(表3)。

16S rRNA分子鉴定结果 4株菌株的16S rRNA基因片段PCR扩增结果见图3。SRB125、SRB142、SRB143和SRB345的16S rRNA基因片段大小分别为1372、1349、1375和1346 bp(登录号: KU143918~KU143921)。经BLAST并与GenBank中已报道的16S rRNA基因序列进行同源性比对, 以及系统发育树的构建结果, 4株菌株均与嗜水气单胞菌L3-5(KP716701)的亲缘关系最近, 同源相似性均为99.9%(图4)。

2.5 6种毒力基因的检测结果

4株病原菌通过PCR扩增得到的毒力基因片段均与预期片段大小一致。6种毒力基因在4株病

表2 菌悬液的人工感染结果

Tab. 2 Results of artificial infection of bacterial suspension

感染次数 injection batch	注射物 injection test	实验鳖数/只 turtle number	细菌浓度/(cfu/mL) bacterial concentration	注射量/(mL/只) injection volume	死亡情况/只 death situation											死亡率/% fatality rate	
					8 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d		11~15 d
第1次 first batch	SRB125	20	7.05×10 ⁸	0.5	0	4	3	4	4	2	1	1	0	1	0	0	100.00
	SRB142	20	9.93×10 ⁸	0.5	0	3	5	3	3	1	1	1	2	1	0	0	100.00
	SRB143	20	1.02×10 ⁸	0.5	0	3	1	3	4	3	1	2	1	0	1	0	95.00
	SRB345	20	6.36×10 ⁸	0.5	0	1	5	2	2	4	2	0	1	1	2	0	100.00
	PBS	20	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
第2次 second batch	SRB125	20	8.42×10 ⁷	0.5	0	2	3	5	3	2	1	2	1	1	0	0	100.00
	SRB142	20	1.03×10 ⁷	0.5	0	4	3	3	3	1	3	2	1	0	0	0	100.00
	SRB143	20	1.20×10 ⁷	0.5	0	3	1	5	4	2	0	2	0	1	2	0	100.00
	SRB345	20	1.05×10 ⁷	0.5	0	3	2	4	2	3	3	0	1	1	0	0	95.00
	PBS	20	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

原菌中的检出率除 ahp 基因为50.00%外, 其余基因均为100.00%; 毒力基因型SRB125和SRB142为 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+aha^+ahp^+$, SRB143和SRB345为 $hly^+Aer^+Alt^+Act^+aha^+ahp^-$ (图5, 图6, 表4)。

3 讨论

3.1 关于养殖鳖类的细菌性疾病及病原菌

在我国, 养殖鳖类主要有中华鳖及其地方种群黄沙鳖、山瑞鳖和佛罗里达鳖(*Apalone ferox*)等, 广西的主要养殖品种是黄沙鳖和山瑞鳖。有关鳖类的细菌性疾病在中华鳖和黄沙鳖中已获得大量研究成果, 其中红底板病和红脖子病主要由嗜水气单胞菌^[20, 29-31]和美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*)^[31]感染引起; 引起白底板病的病原菌种类较多, 主要有嗜水气单胞菌^[21, 31-33]、温和气单胞菌(*A. sobria*)^[21, 31, 34]、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)^[32]、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)^[30-31]、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[31]等; 引起疔疮病、穿孔病、腐皮病和烂颈病的病原菌有嗜水气单胞菌^[30, 35-37]、温和气单胞菌^[38]和普通变形杆菌^[35]。此外, 还有迟缓爱德华菌引起的“浮肿病”^[39]和类志贺邻单胞菌(*P. shigelloides*)引起的类志贺邻单胞菌病^[40]等。有关山瑞鳖在养殖过程中的细菌性疾病及其病原菌, 目前已报道的主要有嗜水气单胞菌引起的口腔出血^[7]和红底

板病^[9-10], 产气单胞菌(*Aeromonas sp.*)引起的颈部溃烂症^[6], 塞氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter sedlakii*)引起的全身水肿病^[8]。本实验分别从广西南宁、贵港和桂平患细菌性败血症山瑞鳖中分离到的4株病原菌均为嗜水气单胞菌, 病原菌种类与在多例中华鳖和黄沙鳖的红脖子病、红底板病、白底板病、疔疮病、穿孔病、腐皮病及烂颈病中分离到的相同^[20-21, 29-33, 35-37], 也与从具有口腔出血等症^[7]和患红底板病^[9-10]的山瑞鳖中分离到的病原菌一致, 但与叶巧真等^[31]从患红底板病中华鳖中分离到的致病性美人鱼弧菌的结果不同。综合众多学者和本实验的研究结果, 嗜水气单胞菌是中华鳖、黄沙鳖和山瑞鳖养殖过程中一种可引起红底板、白底板、疔疮、穿孔等多种病症并导致大批死亡的常见病原菌, 同时也发现, 多种病原菌引起同一种病症现象在细菌性鳖病中也很常见。这种同一病原不同病症和同一病症不同病原的现象给生产实践中细菌性鳖病控制带来极大困难, 正确诊断必须要通过实验分析。在广西的鳖类养殖中, 细菌性败血症也是山瑞鳖的常见急性传染病, 在室外的池塘养殖和室内的保温越冬时都有发生, 从幼鳖至成鳖、亲鳖均可受害, 水温20℃以上、放养密度大或性别比例不合适引起的相互撕咬、池塘环境卫生差等是本病暴发流行的诱因, 一旦发病死亡率会很高, 很难控制, 因此在生产上应以防为主。

表3 病原菌的API 20NE鉴定结果
Tab. 3 Results of identification of strains by API 20NE system

测试项目	test items	实验菌种 test isolates			
		SRB125	SRB142	SRB143	SRB345
硝酸钾	NO ₃	+	+	+	+
色氨酸	Trp	+	+	+	+
葡萄糖	Glu	+	+	+	+
精氨酸	Adh	+	+	+	+
脲素	Ure	+	+	-	-
七叶灵	Esc	+	+	+	+
明胶	Gel	+	+	+	+
对硝基-β-D甲基半乳糖	Pnpg	+	+	+	+
葡萄糖	Gle	+	+	+	+
阿拉伯糖	Ara	+	+	+	+
甘露糖	Mne	+	+	+	+
甘露醇	Man	+	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺	Nag	+	+	+	+
麦芽糖	Mal	+	+	+	+
葡萄糖酸盐	Gnt	+	+	+	+
癸酸	Cap	+	+	+	+
己二酸	Adi	-	-	-	-
苹果酸	Mlt	+	+	+	+
柠檬酸	Cit	+	+	-	+
苯乙酸	Pac	+	+	-	-
四甲基-对-苯二胺	Ox	+	+	+	+

注: +. 阳性; -. 阴性, 下同
Notes: +. positive; -. negative, the same below

3.2 关于水生动物源嗜水气单胞菌的毒力基因型及其致病力

不少学者对水生动物源和水环境中的嗜水气单胞菌所携带毒力基因及其致病力相关性已进行了大量研究。分离自池塘水嗜水气单胞菌的6种毒力基因携带率分别为 *Aer* 85.71%、*Act* 28.57%、*epr CAI* 42.86%、*Alt* 85.71%、*ahp* 57.14%、*ahyB* 100.00%^[12]。*aerA⁺hlyA⁺ahpA⁺*是鱼源致病性嗜水气单胞菌主要的基因型, 其中无毒菌株不携带 *ahpA* 基因, 强毒株都携带 *aerA*、*hlyA*和*ahpA* 3种毒力基因^[11]。85.00%来源于鱼体

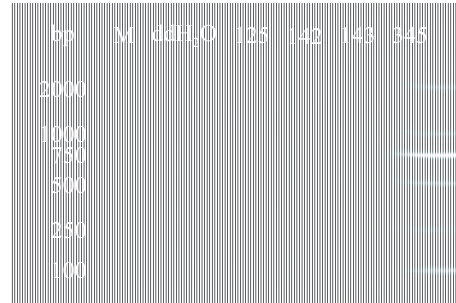


图3 4株菌株的16S rRNA基因PCR扩增结果
M为Marker; 125、142、143、345分别为菌株SRB125、SRB142、SRB143、SRB345

Fig. 3 PCR amplification results of 16S rRNA gene of four strains
M: Marker; 125, 142, 143, 345: strain SRB125, SRB142, SRB143, SRB345

表4 6种毒力基因在4株病原菌中的分布

Tab. 4 Distribution of six virulence genes in four pathogenic strains						
病原菌株 pathogenic strains	<i>hly</i>	<i>Aer</i>	<i>Alt</i>	<i>Act</i>	<i>ahal</i>	<i>ahp</i>
SRB125	+	+	+	+	+	+
SRB142	+	+	+	+	+	+
SRB143	+	+	+	+	+	-
SRB345	+	+	+	+	+	-

和鱼塘水中的嗜水气单胞菌携带气溶素基因 *aerA*^[17]。据Michael等^[25]的研究结果, 所有具有毒力的嗜水气单胞菌均携带 *hlyA*和*aerA*基因。对胡子鲶(*Clarias fuscus*)源致病性嗜水气单胞菌6种毒力基因的检测结果, 除 *ahp* 基因的检出率为 33.33%外, 其余5种基因均为100.00%, 毒力基因型共2种, 其中 *hly⁺Aer⁺Alt⁺Act⁺ahal⁺ahp⁺* 占 33.33%、*hly⁺Aer⁺Alt⁺Act⁺ahal⁺ahp⁻* 占 66.67%, 2种毒力基因型的菌株均为强毒株^[14]。从患暴发性流行病黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)中分离到的3株致病性嗜水气单胞菌均携带 *aer*、*hly*和*ahp* 3种毒力基因, 均为强毒株^[15]。不同研究者对黄沙鳖源嗜水气单胞菌6种毒力基因的阳性检出率虽不尽相同, 黄艳华等^[20]检测了5株菌株, 各毒力基因的检出率, *hly*、*Aer*和*Act*基因为 100.00%, *Alt*、*ahal*和*ahp*基因均为 80.00%; 黄钧等^[21]检测了9株菌株, 结果显示除了 *ahal* 的检出率为 88.89%外, 其余5种基因的检出率均为 100.00%; 刘杰等^[13]的检测结果中, 47株菌株6种

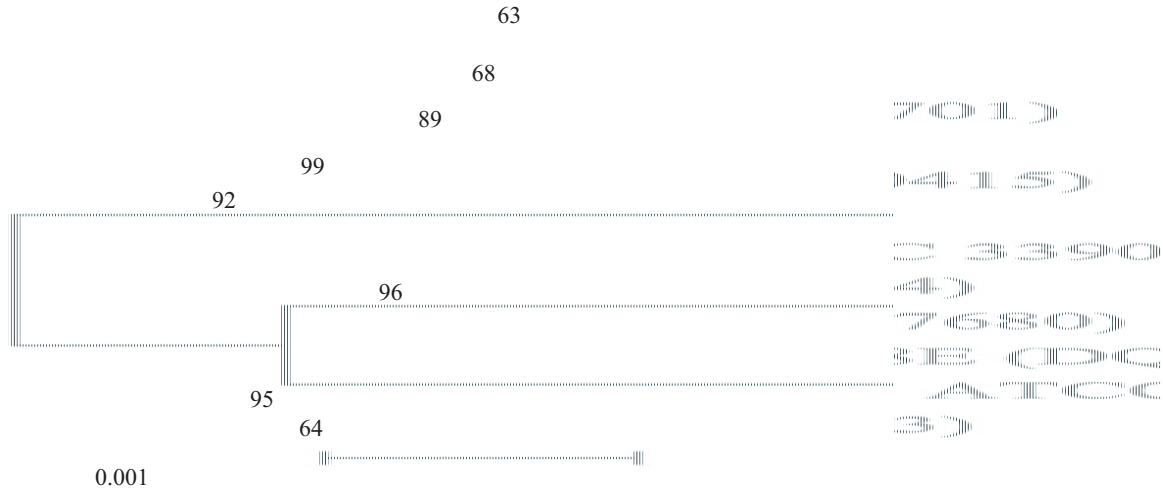


图 4 4株嗜水气单胞菌的16S rRNA基因序列系统发育树

GenBank基因登录号: KU143920 (嗜水气单胞菌SRB143)、KU143921 (嗜水气单胞菌SRB345)、KU143919 (嗜水气单胞菌SRB142)、KP716701 (嗜水气单胞菌L3-5)、KU143918 (嗜水气单胞菌SRB125)、X60415 (易损气单胞菌ATCC49657)、EU770300 (点状气单胞菌MS12)、X60410 (中间气单胞菌ATCC33907)、X60414 (维氏气单胞菌维罗纳生物型)、AY3437680 (库蚊气单胞菌CECT5761)、DQ504429 (双壳气单胞菌868E)、X74681 (杀鲑气单胞菌ATCC33658T)、X74683 (温和气单胞菌ATCC43979T)

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of the four isolates of *A. hydrophila*

GenBank accession number: KU143920 (*A. hydrophila* SRB143), KU143921 (*A. hydrophila* SRB345), KU143919 (*A. hydrophila* SRB142), KP716701 (*A. hydrophila* L3-5), KU143918 (*A. hydrophila* SRB125), X60415 (*A. trota* ATCC49657), EU770300 (*A. punctata* MS12), X60410 (*A. media* ATCC33907), X60414 (*A. veronii* bv. *veronii*), AY3437680 (*A. culicicola* CECT5761), DQ504429 (*A. bivalvium* 868E), X74681 (*A. salmonicida* ATCC33658T), X74683 (*A. sobria* ATCC43979T)

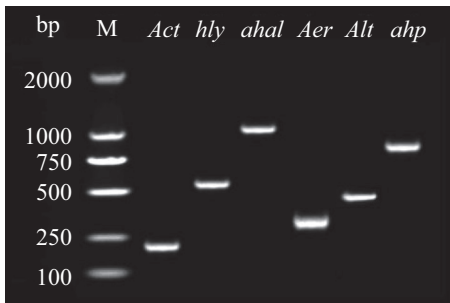


图 5 病原菌6种毒力基因的PCR扩增结果

Fig. 5 PCR amplification results of the six virulence genes of pathogenic strain

毒力基因的检出率分别为 *hly* 95.79%、*Aer* 87.23%、*Alt* 76.60%、*Act* 89.36%、*ahal* 72.34%和 *ahp* 70.12%；综合各学者的研究结果，毒力基因型分别包含3种^[20]、2种^[21]和9种^[13]，但主要毒力基因型都是 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺。研究的样本量可能是导致不同研究者对嗜水气单胞菌毒力基因检测结果产生差异的原因之一，当所取研究样本量较少时就难免出现毒力基因型不一致的情况。刘杰等^[13]发现，在研究的47株黄沙鳖源嗜水气单胞菌中，凡携带 *hly* 基因的菌株均为有毒

株，菌株的致病力不受 *ahp* 基因缺失的影响，仅携带 *Alt* 和 *ahal* 2种毒力基因的菌株为无毒株，携带包含 *hly* 和 *Act* 在内的至少4种毒力基因的菌株为强毒株，仅携带包含 *hly* 在内的2种或3种毒力基因的菌株为弱毒株。另有研究表明，单独缺失 *ahal* 基因或同时缺失 *Alt*、*ahp* 基因对嗜水气单胞菌的致病力无影响^[20]。本实验中，4株山瑞鳖源嗜水气单胞菌只包含2种毒力基因型(各占50.00%)，2次人工感染结果显示，4株菌株对山瑞鳖的致死率为95.00%~100.00%，均为强毒株，*ahp* 基因的缺失对菌株的致病力无明显影响，这一结果与刘杰等^[13]和黄艳华等^[20]的研究结果一致，但与朱大玲等^[11]的研究结果不同。另外，本实验检测到的 *hly*⁺*Aer*⁺*Alt*⁺*Act*⁺*ahal*⁺*ahp*⁺ 毒力基因型在胡子鲇源嗜水气单胞菌中也被检测到^[14]，但在黄沙鳖源嗜水气单胞菌中未被发现^[13, 20-21]。据刘杰等的研究结果，嗜水气单胞菌的毒力基因型也存在多样性，每个毒力基因都有缺失的可能，只是不同的基因缺失的机率不尽相同^[13]。有关基因缺失的机制和影响因素目前尚未清楚，仍需深入研究。

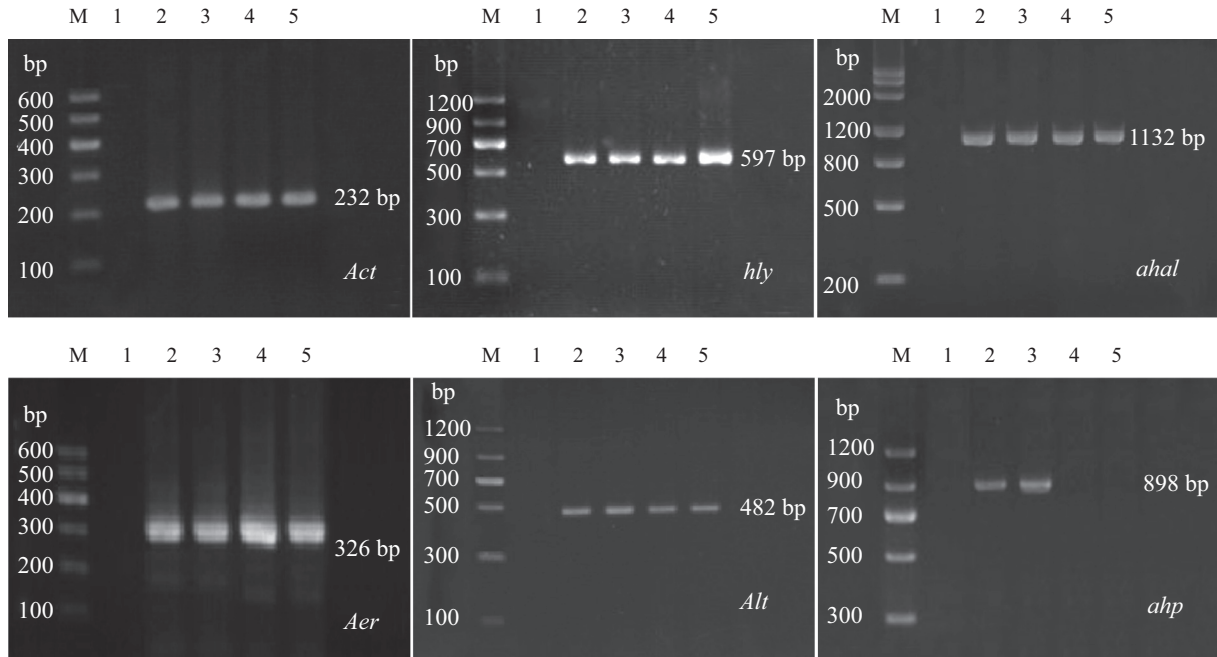


图6 6种毒力基因的检出结果

M. Marker; 1. 双蒸水; 2~5. 菌株SRB125、SRB142、SRB143、SRB345

Fig. 6 Detection results of six virulence genes

M. Marker; 1. ddH₂O; 2-5. strain SRB125, SRB142, SRB143, SRB345

参考文献:

[1] 周婷. 龟鳖分类图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004, 225.
Zhou T. Classification of Chinese turtles [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004, 225 (in Chinese).

[2] 郑文彪, 梁淡茹, 肖智, 等. 山瑞鳖与中华鳖的养殖生长和形态比较[J]. 淡水渔业, 1998, 28(1): 40-41.
Zheng W B, Liang D R, Xiao Z, et al. Comparison of culture growth and morphology between *Palea steindachneri* and *Trionyx sinensis*[J]. Freshwater Fisheries, 1998, 28(1): 40-41(in Chinese).

[3] 唐大由, 李贵生, 李海. 山瑞鳖的生物学特性及人工养殖技术[J]. 中药材, 1997, 20(4): 168-171.
Tang D Y, Li G S, Li H. Biological characteristics and artificial breeding technology of *Palea steindachneri*[J]. Chinese Herbal Medicines, 1997, 20(4): 168-171(in Chinese).

[4] 赵春光, 黄利权, 刘文进, 等. 山瑞鳖不同密度养殖试验[J]. 科学养鱼, 2009(6): 31-32.
Zhao C G, Huang L Q, Liu W J, et al. Different density cultivation test of *Palea steindachneri*[J]. Scientific Fish Farming, 2009(6): 31-32(in Chinese).

[5] 阳建春, 周永富, 梁启燊, 等. 山瑞鳖产卵与孵化研究

[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2000, 21(3): 110-114.
Yang J C, Zhou Y F, Liang Q S, et al. The study of spawning and hatching in *Palea steindachneri*[J]. Journal of Jinan University (Natural Science Edition), 2000, 21(3): 110-114(in Chinese).

[6] 尤岩岩, 韦平, 王秀英, 等. 山瑞鳖感染产气单胞菌的诊断报告[J]. 广西畜牧兽医, 2008, 24(2): 120-121.
You Y Y, Wei P, Wang X Y, et al. The diagnostic report of *Palea steindachneri* infected with *Aeromonas*[J]. Guangxi Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008, 24(2): 120-121(in Chinese).

[7] 童桂香, 韦信贤, 黎小正, 等. 山瑞鳖嗜水气单胞菌感染的诊断及防治[J]. 广西农业科学, 2009, 40(12): 1607-1611.
Tong G X, Wei X X, Ni X Z, et al. Diagnosis and treatment of *Palea steindachneri* infected *Aeromonas hydrophilia*[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2009, 40(12): 1607-1611(in Chinese).

[8] 韦信贤, 童桂香, 黎小正, 等. 山瑞鳖塞氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及药物敏感性研究[J]. 淡水渔业, 2010, 40(2): 47-52.
Wei X X, Tong G X, Ni X Z, et al. Isolation, identification and drug sensitive test of *Citrobacter*

- sedlakii* from *Palea steindachneri*[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(2): 47-52(in Chinese).
- [9] 刘杰, 胡大胜, 黄钧, 等. 山瑞鳖红底板病病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2015, 46(3): 712-716.
- Liu J, Hu D S, Huang J, *et al.* Isolation, identification and drug sensitive test of pathogenetic bacteria from *Palea steindachneri* infected red abdominal shell disease[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(3): 712-716(in Chinese).
- [10] 邓小红, 龙苏, 牛志伟, 等. 一例越冬温室山瑞鳖红底板病的诊治试验[J]. 广西畜牧兽医, 2016, 32(4): 200-201.
- Deng X H, Long S, Niu Z W, *et al.* The clinical trial in a case of winter greenhouse *Palea steindachneri* with red abdominal shell disease[J]. Guangxi Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 32(4): 200-201(in Chinese).
- [11] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82-85.
- Zhu D L, Li A H, Wang J G, *et al.* The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2006, 45(1): 82-85(in Chinese).
- [12] 蒋春阳, 黄金虎, 陈默, 等. 南京地区池塘水中嗜水气单胞菌的分离鉴定与相关毒力基因检测[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(16): 4-7.
- Jiang C Y, Huang J H, Chen M, *et al.* Isolation of *Aeromonas hydrophila* in some pools of Nanjing and detection of the virulence-associated genes[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 42(16): 4-7(in Chinese).
- [13] 刘杰, 黄艳华, 黄钧, 等. 黄沙鳖源嗜水气单胞菌的致病力与毒力基因型相关性[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 698-706.
- Liu J, Huang Y H, Huang J, *et al.* Studies on the correlation with pathogenicity and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* by *Truogx sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 698-706(in Chinese).
- [14] 龙苏, 韩书煜, 牛志伟, 等. 胡子鲶致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 308-317.
- Long S, Han S Y, Niu Z W, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas* in *Clarias fuscus* and analysis of the correlation between its pathogenicity and virulence genotypes[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 308-317(in Chinese).
- [15] 刘杰, 龙宜楠, 黄钧, 等. 黄颡鱼暴发性流行病病原的分离鉴定及其3种毒力基因检测[J]. 淡水渔业, 2015, 45(2): 59-61.
- Liu J, Long Y N, Huang J, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of bacterial pathogen from *Pelteobagrus fulvidraco* Richardson with fulminant epidemic[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(2): 59-61(in Chinese).
- [16] 张晓君, 阎斌伦, 邴旭文, 等. 异育银鲫病原温和气单胞菌表型及分子鉴定与溶血素基因检测[J]. 水生生态学杂志, 2010, 3(4): 102-107.
- Zhang X J, Yan B L, Bing X W, *et al.* Detection of hemolysin gene and phenotypic and molecular identification of pathogenic *Aeromonas sobria* from gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Journal of Hydroecology, 2010, 3(4): 102-107(in Chinese).
- [17] Vijai Singh G D, Kapoor B N, Mishra W S, *et al.* Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water[J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(12): 453-458.
- [18] 方兵, 李槿年, 汪天杰, 等. 6株水产动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 966-972.
- Fang B, Li J N, Wang T J, *et al.* Cloning and sequence analysis of virulence genes of six *Aeromonas* strains isolated from aquatic animals in Anhui[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 966-972(in Chinese).
- [19] 潘晓艺, 郝贵杰, 姚嘉赟, 等. 嗜水气单胞菌TPS-30株丝氨酸蛋白酶基因与溶血素基因在大肠杆菌中的融合表达[J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 591-597.
- Pan X Y, Hao G J, Yao J B, *et al.* Fusion expression of *Spe* gene with *Hly* gene of *Aeromonas hydrophila* strain TPS-30 in *Escherichia coli*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(3): 591-597(in Chinese).
- [20] 黄艳华, 黄钧, 胡大胜, 等. 黄沙鳖红底板病病原菌的分离鉴定及其毒力基因检测[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 2116-2121.

- Huang Y H, Huang J, Hu D S, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenic bacteria from *Trionyx sinensis* with red abdominal shell disease[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2013, 26(5): 2116-2121(in Chinese).
- [21] 黄钧, 黄艳华, 胡大胜, 等. 黄沙鳖白底板病病原菌的分离鉴定及6种毒力基因检测[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 844-854.
- Huang Y H, Huang J, Hu D S, *et al.* Characterization of white plastron disease pathogens and detection of six known virulence genes in *Truogx sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 844-854(in Chinese).
- [22] 王志铮, 赵蓓蓓, 王忠发, 等. 四株鳖源致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的表型、分子鉴定及其毒力基因检测[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 776-783.
- Wang Z Z, Zhao P P, Wang Z F, *et al.* Phenotype and molecular indentification of virulence genes for four pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from a dying *Trionyx sinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5): 776-783(in Chinese).
- [23] 罗志飞, 胡萌, 陆承平, 等. 3株嗜水气单胞菌弱毒株的毒力相关特性分析[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(1): 48-57, 51.
- Luo Z F, Hu M, Lu C P, *et al.* Virulence-associated characterization analysis of three strains of *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2012, 32(1): 48-57, 51(in Chinese).
- [24] Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(5): 1077-1086.
- [25] Michael W, Heuzenroeder, Christopher Y F, *et al.* Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 174(1): 131-136.
- [26] Granum P E, O'Sullivan K, Tomás J M, *et al.* Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1998, 21: 131-137.
- [27] Cesar B K, Geert H, Mauro T, *et al.* PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp[J]. American Society for Microbiology, 1999, 65(12): 5293-5302.
- [28] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌J-1株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 84-88.
- Chu W H, Lu C P. Cloning and sequence analysis of an extracellular serine-protease gene of *Aeromonas hydrophila* J-1[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1): 84-88(in Chinese).
- [29] 虞蕴如, 储卫华, 李克敏. 中华鳖红脖子、红底板病的病原分离鉴定[J]. 动物医学进展, 2004, 25(2): 102-105.
- Yu W R, Chu W H, Li K M. Isolation and identification of pathogens from *Trionyx sinensis* with red neck disease and red abdominal shell disease[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2004, 25(2): 102-105(in Chinese).
- [30] 周剑光, 杨先乐, 艾晓辉. 中华鳖疔疮、红脖子、赤斑病并发病的病原研究[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 271-277.
- Zhou J G, Yang X L, Ai X H. The study of pathogens in *Trionyx sinensis* with complications of furunculosis, red neck and the etiology of white spot disease[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(3): 271-277(in Chinese).
- [31] 叶巧真, 何建国, 邱德全, 等. 中华鳖白底板病和红底板病细菌的分离鉴定及致病性[J]. 微生物学通报, 2000, 27(6): 407-413.
- Ye Q Z, He J G, Qiu D Q, *et al.* Isolation, identification and pathogenic ability from *Trionyx sinensis* with white abdominal shell disease and red abdominal shell disease[J]. Microbiology China, 2000, 27(6): 407-413(in Chinese).
- [32] 陈晓凤, 周常义, 青新. 鳖“白板病”致病细菌的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 309-315.
- Chen X F, Zhou C Y, Qing X. The reseach of the pathogens resuled white abdominal shell disease in turtles[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(3): 309-315(in Chinese).
- [33] 沈锦玉, 潘晓艺, 余旭平, 等. 中华鳖白底板病病原的分析[J]. 中国水产科学, 2007(5): 815-822.
- Shen J Y, Pan X Y, Yu X P, *et al.* Pathogen in white abdominal shell disease of soft-shelled turtle(*Trionyx sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007(5): 815-822(in Chinese).
- [34] 丁雷, 岳永生, 宋憬愚, 等. 鳖白底板病、腐皮病并发病病原菌及药物治疗[J]. 淡水渔业, 2001, 31(1): 46-48.
- Ding L, Yue Y S, Song J Y, *et al.* The pathogens and

- drug treatment of turtles with complication resulted from white abdominal shell disease and skin fester disease[J]. *Freshwater Fisheries*, 2001, 31(1): 46-48(in Chinese).
- [35] 孙佩芳, 蔡完其, 吴建农, 等. 鳖穿孔病的病原研究[J]. *水产学报*, 1996, 20(2): 120-124.
- Sun P F, Cai W Q, Wu J N, *et al.* A study on pathogens of Turtle hole disease[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1996, 20(2): 120-124(in Chinese).
- [36] 储卫华, 杨金先. 中华鳖“腐皮病”病原的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37(3): 43-45.
- Chu W H, Yang J X. The research in pathogens of skin fester disease[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2001, 37(3): 43-45(in Chinese).
- [37] 赵小平, 汪官余, 郑永华, 等. 中华鳖“烂颈病”病因学的初步研究[J]. *淡水渔业*, 2005, 35(6): 44-46.
- Zhao X P, Wang G Y, Zheng Y H, *et al.* A preliminary study of etiology on the *Trionyx sinensis* with “rotten neck disease”[J]. *Freshwater Fisheries*, 2005, 35(6): 44-46(in Chinese).
- [38] 彭亚, 刘杰, 胡大胜, 等. 黄沙鳖疔疮病的病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. *南方农业学报*, 2014, 45(8): 1296-1301.
- Peng Y, Liu J, Hu D S, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity of pathogenic bacteria from *Trionyx sinensis* with scabies[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(8): 1296-1301(in Chinese).
- [39] 黄钧, 朱芸, 韦友传. 中华鳖“浮肿病”致病菌的分离与鉴定[J]. *广西畜牧兽医*, 2008, 24(6): 375-376.
- Huang J, Zhu Y, Wei Y Z. Isolation and identification of pathogenic bacteria of *Trionyx sinensis* with edema disease[J]. *Guangxi Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2008, 24(6): 375-376(in Chinese).
- [40] 罗华平, 施金谷, 彭民毅, 等. 黄沙鳖幼鳖类志贺邻单胞菌病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(4): 681-686.
- Luo H P, Shi J G, Peng M Y, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Plesiomonas shigelloides* from infant *Trionyx sinensis*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44(4): 681-686(in Chinese).

Isolation, identification and virulence genes detection of pathogenic bacteria from *Palea steindachneri* with bacterial septicemia

HAN Shuyu^{1,2}, LIANG Jingzhen^{1,3}, QIN Zhibiao^{1,3}, HUANG Yanhua⁴, WEI Mulan⁵,
MENG Lanli⁶, HUANG Wei⁶, HU Dasheng^{1,2}, HUANG Jun^{1,3*}

(1. Guangxi Aquatic Animal Disease Diagnosis Lab, Nanning 530005, China;

2. Guangxi General Station of Aquaculture Technology Extension, Nanning 530022, China;

3. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

4. Qinzhou Station of Aquaculture Technology Extension, Qinzhou 535000, China;

5. Du'an Station of Aquaculture Technology Extension, Du'an 530700, China;

6. Tiandong Station of Aquaculture Technology Extension, Tiandong 531500, China)

Abstract: In order to provide reference for effective prevention and control of the bacterial septicemia of *Palea steindachneri*, the present experiment was conducted to investigate the pathogen of *P. steindachneri* with bacterial septicemia and the presence of six virulence genes. The pathogen was isolated from the heart and liver tissues of *P. steindachneri* by using conventional methods, and the pathogenicity of the strains was confirmed by artificial infection. Then the pathogen was identified based on API 20NE bacteria identification system and PCR amplification of 16S rRNA gene. Presence of virulence genes was determined using the polymerase chain reaction. Results showed that four dominant strains named SRB125, SRB142, SRB143 and SRB345 were isolated from the heart and liver tissues of diseased *P. steindachneri*. The mean fatality rate of healthy *P. steindachneri* was 97.50%–100.00% and the pathogenic bacteria of bacterial septicemia of *P. steindachneri* were the four isolated strains. According to the biochemical and molecular identification results, the four isolated strains were all *Aeromonas hydrophila*, and they had the closest genetic relationship with *A. hydrophila* L3-5 (KP716701), sharing homology of 99.9%. The four strains contained two virulence genotypes, $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^+ahp^+$ and $hly^+Aer^+Alt^+Act^+ahal^+ahp^-$, each accounting for two strains. Strain SRB143 from Nanning City and SRB345 from Guiping City all lacked gene *ahp*.

Key words: *Palea steindachneri*; bacterial septicemia; *Aeromonas hydrophila*; virulence gene

Corresponding author: HUANG Jun. E-mail: hj1351@163.com

Funding projects: Project of Bureau of Fishery Animal Husbandry and Veterinary, Guangxi Province (Gui-yu-mu-cai [2013] No. 35, Gui-yu-mu-cai [2014] No. 52, Gui-yu-mu-cai [2015] No. 97); Project of Science and Technology Plan of Bureau of Nanning Science and Technology (Nan-ke-fa [2012] No. 51-20122096, Nan-ke-fa [2013] No. 46-20132124)