

陈一铭, 顾泽茂, 李莉娟, 等. 白斑综合征病毒感染对克氏原螯虾肠道菌群的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 40-46.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.006

白斑综合征病毒感染对克氏原螯虾肠道菌群的影响

陈一铭¹, 顾泽茂^{1,2}, 李莉娟¹, 陈天圣¹, 袁军法^{1,3}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学双水双绿研究院, 武汉 430070;

3. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 为揭示白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)后对其肠道菌群的影响, 运用 16S rDNA 基因的高通量测序技术分析健康与人工感染 WSSV 的克氏原螯虾的肠道菌群的组成及多样性。结果显示, 感染组与对照组在肠道丰度及多样性无显著差异, 但其优势菌群组成发生变化。对照组优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)和软壁菌门(Tenericute), 分别占 75.42% 和 19.17%; 感染组肠道优势菌门为变形菌门和拟杆菌门(Bacteroidetes), 分别占 78.14% 和 17.38%。利用 LEfSe 分析差异菌属发现, 感染组与对照组相比, *Candidatus bacilloplasma* 丰度显著减少($P < 0.05$), 拟杆菌科(Bacteroidaceae)和黄杆菌科(Flavobacteriaceae)的丰度显著上升($P < 0.05$)。此外, 部分潜在病原菌如黄杆菌属(*Flavobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)的丰度在感染后显著升高($P < 0.05$)。以上结果说明 WSSV 感染导致克氏原螯虾肠道菌群发生变化, 提示 WSSV 或可通过干扰肠道稳态致病。

关键词 甲壳动物; 克氏原螯虾; 肠道菌群; 白斑综合征病毒; 高通量测序; LEfSe 分析; 稻田养虾

中图分类号 Q 959.223⁺.63 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)02-0040-07

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾, 在分类上属动物界(Animalia)、节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、螯虾科(Cambaridae)、原螯虾属(*Procambarus*), 原产于美洲。1918 年, 由美国引进日本, 1929 年又由日本传入我国^[1]。近年来, 随着稻田综合种养模式的推广, 湖北省克氏原螯虾养殖规模日益壮大, 克氏原螯虾成为重要的淡水经济虾类。与此同时, 克氏原螯虾养殖过程中的病害也逐渐暴露, 流行病学调查显示白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是克氏原螯虾最为主要的病原之一, 给养殖造成了很大的损失^[2-3]。尤为严重的是养殖小龙虾携带 WSSV 较为普遍, 使得 WSSV 的防控形势更为严峻^[2]。

肠道菌群与宿主营养、免疫息息相关^[4-5]。肠道微生物群落可以帮助宿主促进营养吸收, 刺激免疫反应和提高疾病抵抗力, 从而对宿主的健康起至关重要的作用^[6]。近年来研究表明, 病毒入侵会使肠道菌群发生紊乱, 菌群丰度、多样性以及功能发生变

化, 甚至影响肠道黏膜的完整性, 导致肠道细菌转位, 引发细菌继发感染^[7-8]。WSSV 感染诱导甲壳动物肠道正常菌群的改变已在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[9]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[10]中被报道, 但在克氏原螯虾这一新兴的养殖虾中却没有研究。本试验通过人工感染, 比较健康与 WSSV 感染克氏原螯虾的肠道菌群, 分析 WSSV 感染对克氏原螯虾肠道菌群的影响, 旨在为 WSSV 的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用克氏原螯虾(体质量(25±5) g/只)由潜江龙居湾稻虾共生专业合作社提供, 试验前经过 1 周的池塘水室内暂养, 暂养水温 24℃ 左右。

1.2 人工感染

试验虾经饥饿处理 1 周后, 随机分为 2 组, 每组各 20 只。感染组自第 4 步足基部注射经 PBS 溶液稀释的 WSSV 病毒悬液 100 μL, 含 1×10⁷ 拷贝的

收稿日期: 2019-09-22

基金项目: 湖北省现代农业产业技术体系稻田综合种养创新团队和湖北省技术创新专项(2018ABA103)

陈一铭, 硕士研究生. 研究方向: 水生动物医学. E-mail: 2086654718@qq.com

通信作者: 袁军法, 博士, 副教授. 研究方向: 水生动物医学. E-mail: jifyuan@mail.hzau.edu.cn

WSSV 病毒。对照组注射等量的 PBS 溶液。感染后的第 5 天取感染组和对照组各 5 只虾,经体表消毒后解剖取后肠用于后续分析。

1.3 WSSV 的定量检测

以靶向于 WSSV 聚合酶的特异性引物 WDP06/07^[11]为定量引物,检测各组样品中 WSSV copies 情况。引物序列为 5'-TCAGCTTCAAGAATCCCAATAG -3'/5'-ACAAC TAGCAAGCACTGGTAT -3'。每个 PCR 反应体系包含 10 μ L SYBR Premix, WDP06/07 各 0.5 μ L,组织 DNA 1 μ L,加无菌三蒸水使反应体系的总体积至 20 μ L。扩增目的片段大小为 330 bp,PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。定量扩增在 LightCycler480 实时荧光 PCR 仪上进行。

1.4 肠道 DNA 提取与 16S rDNA PCR 扩增

使用 CTAB 方法提取克氏原螯虾后肠的总基因组 DNA,通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和纯度。用无菌水将 DNA 稀释至 1 ng/ μ L 用于后续肠道微生物的 16S rDNA 的扩增。使用 16S v3-v4 引物 341F-806R^[12] 扩增,引物序列为 5'-CCTAYGGGRBGCAS-CAG-3'/5'-GGACTACNNGGTATCTAAT -3' PCR。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,27 个循环。

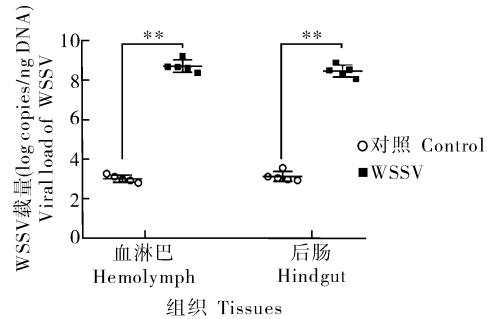
1.5 16S rDNA 高通量测序与数据分析

肠道细菌 16S rDNA 扩增产物建库按照诺禾致源公司流程和方法,PCR 产物经过纯化后制备文库,测序使用 IonS5™ XL 测序平台,利用单端测序(Single-End)的方法,构建小片段文库进行单端测序。通过对 reads 剪切过滤,平均每样品测得 69 256 条 reads,经过质控平均得到 65 653 条有效数据。舍弃低质量序列,对原始下机数据(raw data)进行碱基过滤,随后的数据进行质量控制,得到质控后可用于后续分析的有效数据序列(clean data)。将一致性(identity)大于 97% 的测序序列归为 1 个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 进行聚类 and 物种分析。统计各个样品所含 OTU 的数量,通过维恩图(Venn diagram)统计对照组和 WSSV 感染组样品共有的和特有的 OTU。利用包括覆盖率(coverage)、丰富度指数(Chao1/ACE)以及多样性指数(Simpson/Shannon)在内的 α -多样性指数分析 2 组内微生物群落的丰度和多样性。同时在门和属 2 个分类水平上统计每个样品的物种丰度和物种分布,并做群落结构分析。

2 结果与分析

2.1 WSSV 感染后病毒载量检测

试验用克氏原螯虾感染前无明显临床病症。WSSV 感染组于第 3 天开始表现活力降低、副肢无力、对外界刺激反应弱等典型病症,并于第 5 天开始出现死亡,对照组试验期间无明显变化。定量 PCR 结果(图 1)显示感染组血淋巴的病毒载量均升高至 10^8 copies/ng DNA 以上,对照组病毒含量仅为 $10^2 \sim 10^4$ copies/ng DNA,呈携带状态。进一步检测感染组和对照组后肠带毒量,结果显示 WSSV 感染组后肠的带毒量也显著升高($P < 0.05$)。5 个感染组后肠样品 WSSV 病毒载量在 $10^{8.0} \sim 10^{8.9}$ copies/ng DNA,而对照组后肠 WSSV 载量均未超过 10^4 copies/ng DNA,同血淋巴带毒水平近似。



** 表示显著性水平 $P < 0.01$ 。 ** indicates a significant difference with $P < 0.01$.

图 1 对照组和 WSSV 感染组血淋巴及后肠组织病毒载量

Fig.1 Viral load in hemolymph and hindgut in control group and WSSV infected group

2.2 肠道细菌群落多样性指数分析

如图 2 所示,感染组与对照组共同拥有的 OTU 291 个,感染组特有 OTU 161 个,对照组特有 OTU 75 个。Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 4 个 α -

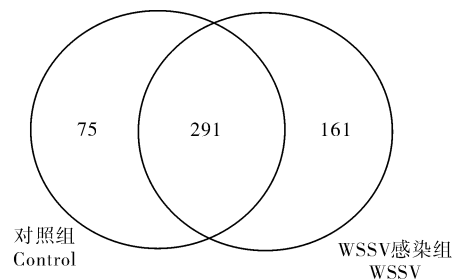


图 2 感染组和对照组 OTU 数量对比

Fig.2 Venn diagram of OTU number between control group and WSSV infected group

表 1 对照组和感染组 α -多样性指数
Table 1 α -Diversity of control group and WSSV infected group

样品 Sample ID	序列数 Reads	分类操作单元 OTU	丰富度指数 Richness index		覆盖率 Coverage	多样性指数 Diversity index	
			ACE	Chao1		Shannon	Simpson
CK							
c1	63 159	195	162.761	183.522	0.998	3.124	0.801
c2	60 422	220	197.28	239.517	0.998	1.804	0.438
c3	80 162	190	161.251	179.837	0.998	2.553	0.677
c4	77 316	154	120.554	137.44	0.998	1.475	0.423
c5	80 208	170	125.892	163.285	0.999	2.055	0.577
均值 Mean			153.50±27.90	180.72±33.59	0.998 2±0.000 4	2.20±0.57	0.58±0.14
WSSV							
w1	52 464	209	179.125	190.385	0.999	1.902	0.57
w2	67 802	217	196.076	235.487	0.998	3.013	0.806
w3	50 323	217	179.267	188.733	0.998	4.0173	0.899
w4	80 043	337	280.097	347.0123	0.999	1.919	0.587
w5	52 620	145	121.69	141.307	0.998	1.808	0.458
均值 Mean			191.25±51.08	220.58±69.88	0.998 4±0.000 4	2.53±0.86	0.66±0.16

注:c1~c5 代表对照组样品编号,w1~w5 代表 WSSV 感染组样品编号。Note:c1-c5 represent the sample number of control group,w1-w5 represent the sample number of WSSV infection group.

多样性指数感染组均略高于对照组,但没有显著性差异(表 1)。Beta 多样性分析显示感染组和对照组无显著性差异(数据略)。这些结果说明 WSSV 感染对克氏原螯虾肠道菌群丰度和多样性几乎没有影响。

2.3 肠道菌群结构

在对照组与 WSSV 感染组的克氏原螯虾肠道菌群共发现 17 个门类,包括变形菌门(Proteobacteria)、软壁菌门(Tenericute)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Acti-

nobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝藻门(Cyanobacteria)和奇古菌门(Thaumarchaeota)等。选取每个样本或分组在门类水平上最大丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图,如图 3 所示。结果显示对照组优势菌门为变形菌门(占 75.42%)和软壁菌门(占 19.17%),感染组肠道优势菌门为变形菌门(占 78.14%)和拟杆菌门(占 17.38%。)

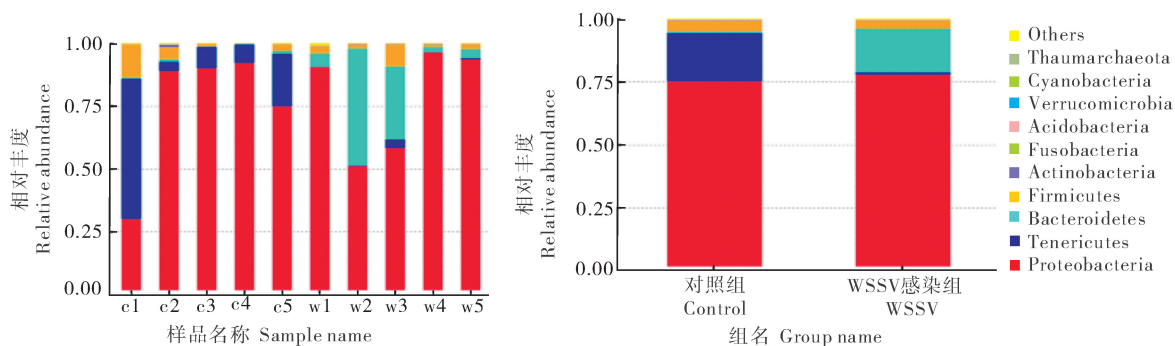


图 3 对照组和感染组肠道微生物在门水平的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of the phyla level in control group and WSSV infected group

在属的水平上,共检测到 207 个细菌种属,其中对照组的克氏原螯虾肠道优势菌为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)占 53.01%、希瓦氏菌属(*Shewanella*)占 19.57%、*Candidatus bacilloplasma* 占 18.52%。WSSV 感染组虾肠道优势菌属为寡养单胞菌属占 63.23%、希瓦氏菌属占 7.68%、拟杆菌属

(*Bacteroides*)占 2.78%(图 4)。虽然正常和患病的虾肠道优势菌属均为寡养单胞菌,但患病虾肠道中拟杆菌属丰度显著上升,希瓦氏菌属及 *Candidatus bacilloplasma* 显著降低。如图 5 所示,2 组中其他差异显著的细菌分别有气单胞菌属(*Aeromonas*)、*Haliangium*、*Chryseolinea*、鞘氨醇杆菌属(*Sphin-*

gobacterium), 这些结果说明 WSSV 感染使克氏原螯虾肠道菌群结构发生改变。

表 2 对照组和感染组门水平上细菌丰度

分类 Taxonomy	丰度/% Abundance	
	对照 Control	WSSV
变形菌门 Proteobacteria	75.42	78.14
软壁菌门 Tenericute	19.17	0.84
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.63	17.38
厚壁菌门 Firmicutes	4.24	3.11
放线菌门 Actinobacteria	0.36	0.22
梭杆菌门 Fusobacteria	0.04	0.01
酸杆菌门 Acidobacteria	0.02	0.04
其他 Others	0.12	0.26

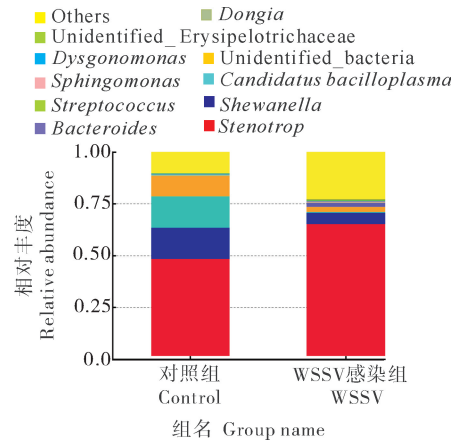


图 4 对照组和 WSSV 感染组肠道微生物在属水平的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of the genus level in control group and WSSV infected group

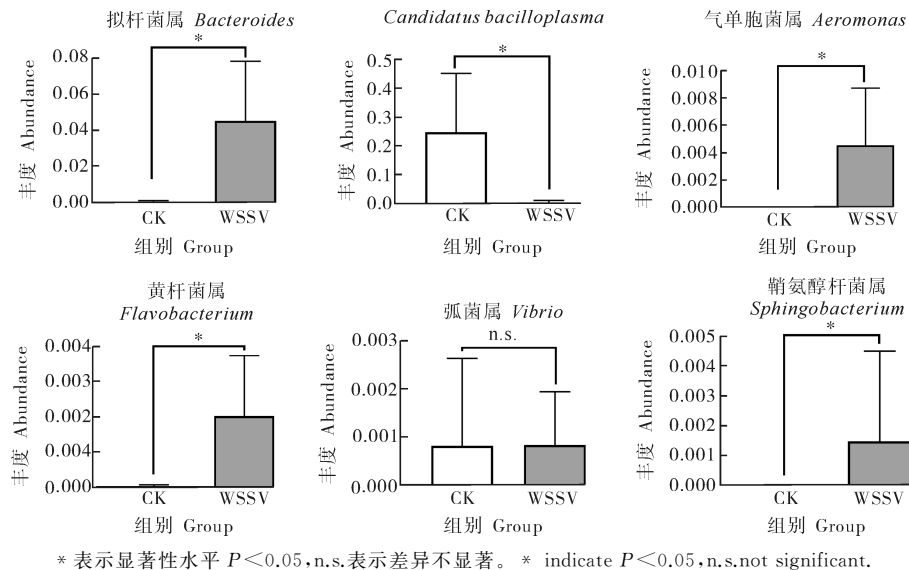


图 5 2 组中部分菌属相对丰度对比

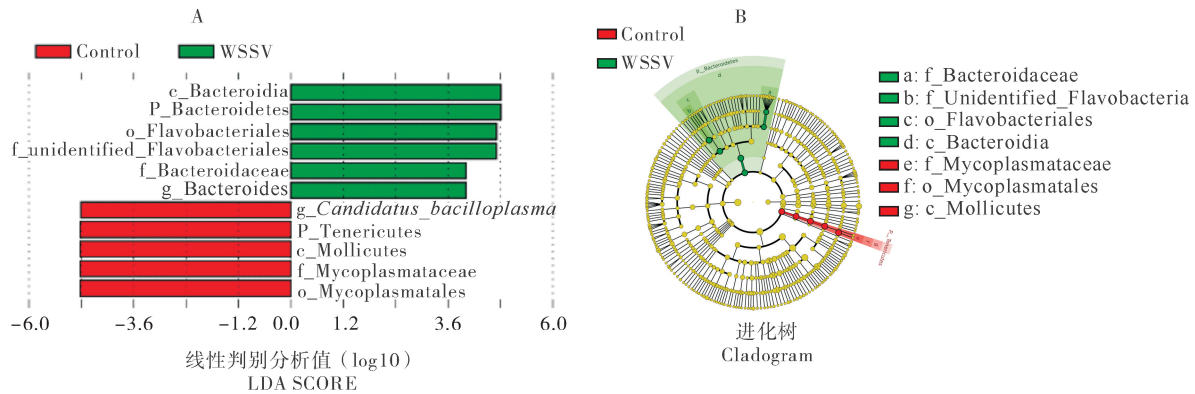
Fig.5 Comparison of relative abundance of some species in control group and WSSV infected group

2.4 LEfSe 分析

为进一步分析与 WSSV 感染相关的克氏原螯虾肠道菌群,用 LEfSe 分析法对对照组和 WSSV 人工感染组肠道菌群相对丰度进行比较分析,以找出显著性变化的相关菌群。如图 6A 所示,经过线性判别分析(LDA),发现对照组与 WSSV 感染组的菌群共有 3 个具有显著差异的菌群,隶属于 2 个菌门。其中对照组只有 1 个菌属(*Candidatus bacilloplasma*),隶属于软壁菌门,且具有较大丰度。感染组的 2 个菌群隶属于拟杆菌门的拟杆菌科(Bacteroidaceae)和黄杆菌科(Flavobacteria),它们的亲缘关系如图 6B 所示。

3 讨论

本研究通过人工感染人为增加克氏原螯虾体内 WSSV 的病毒载量,模拟养殖过程克氏原螯虾白斑病发病历程,评价 WSSV 感染对肠道菌群的影响,发现 WSSV 感染导致克氏原螯虾肠道菌群结构发生改变。尽管试验用虾人工感染前检测出少量的 WSSV 基因组 DNA,但并未呈现明显临床症状,仅为携带状态。流行病学调查显示,养殖小龙虾携带 WSSV 较为普遍^[13]。笔者所在实验室研究人员先前针对克氏原螯虾白斑综合征的流行病学调查也表明 WSSV 拷贝数在 10^6 以下时养殖克氏原螯虾不会



A: 线性判别分析(LDA)。柱状图的长短代表的是不同组间显著差异物种的影响程度 Linear discriminant analysis(LDA). The length of the histogram represents the degree of influence of significantly different species between different groups; B: 进化树 Cladogram.

图 6 LEfSe 分析对照组和感染组差异菌群

Fig.6 Taxonomic differences in the intestinal microbiota between control group and WSSV infected group analyzed by LEfSe

表现出明显的临床病症,仅呈携带状态,但当水质条件恶化或环境条件剧烈变化时引起 WSSV 大量复制,进而造成克氏原螯虾死亡。

克氏原螯虾等甲壳动物肠道栖息着大量的微生物,这些微生物是与宿主长期共同进化的结果^[14],肠道微生物参与机体代谢、营养和免疫等重要生理过程,与宿主的健康密不可分。本试验过程中感染组与对照组均使用未经消毒处理的池塘水养殖,富含细菌,在相同养殖条件下饲养,感染 WSSV 的克氏原螯虾肠道内的细菌丰度与多样性无显著变化。已有研究表明,病毒入侵会干扰肠道正常菌群,破坏其正常的生理功能^[7,15],许多鱼类病毒能使宿主肠道菌群与多样性及丰度显著降低。如草鱼呼肠孤病毒感染草鱼^[8]、鲤疱疹病毒 II 感染鲫^[16]后其宿主肠道菌群组成结构及多样性和丰度均发生显著改变。针对 WSSV 的研究显示, WSSV 感染凡纳滨对虾^[10]、中华绒螯蟹^[9]后其丰度与多样性未显著改变,但其肠道菌群组成结构发生明显改变。

优势菌群分析显示,变形菌门是对克氏原螯虾肠道中占比最大的菌门,其同时也是多种水产动物如大黄鱼、中华绒螯蟹、凡纳滨对虾等肠道中的优势菌群^[17-19],同时也是哺乳动物肠道菌群的主要门类。与 WSSV 感染其他甲壳动物变形菌门相对丰度显著升高不同,本试验中并未观察到病毒感染前后变形菌门相对丰度的显著变化,其可能原因是物种及养殖环境的不同。不同于人类及其他哺乳动物,健康的克氏原螯虾后肠中拟杆菌门的丰度较低,但 WSSV 感染后显著上升。与此一致的是,凡纳滨对虾在 WSSV 感染后拟杆菌门丰度显著上升^[10]。健康状态下,拟杆菌是多种甲壳动物肠道菌群的重要

组成部分。在健康的凡纳滨对虾中拟杆菌为优势菌群,然而 WSSV 感染后其丰度显著降低,这与我们对克氏原螯虾研究的结果相反。其可能的原因是养殖环境的不同。通过 LEfSe 分析发现,在对照组克氏原螯虾中大量存在而感染之后显著减少的 *Candidatus bacilloplasma* 菌属已被报道在中华绒螯蟹^[9]、龙虾^[20]和斑节对虾^[21]等多种甲壳动物肠道中发现,Kostanjsek 等^[22]的研究表明,该菌通过特殊的体表结构附着于肠道之上,鉴于其在甲壳动物肠道中的丰度及在本试验感染后的急剧下降,推测其对宿主健康有着重要的作用,只是该类菌的功能尚未阐明。

WSSV 感染后,我们检测到克氏原螯虾后肠中黄杆菌 (*Flavobacterium*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)等潜在病原菌的出现和显著上调。尽管这些病原菌危害鱼类的报道较多,如柱状黄杆菌,危害各种淡水鱼类如草鱼、鳊、斑点叉尾鲷等^[23],但其在甲壳动物上的致病能力尚不明确。已有的研究证明对虾等甲壳动物体内也存在该种细菌^[24]。但 WSSV 感染凡纳滨对虾后其肠道中柱状黄杆菌丰度显著减少^[10],这也与我们的结果相反。李继秋等^[25]发现, WSSV 感染凡纳滨对虾后,肠道中气单胞菌及其他条件致病菌的丰度较对照组显著上升。弧菌是对虾体内存在的正常菌群,也是条件致病菌,当宿主免疫力下降或其数量超过正常值时可引起对虾发生疾病^[26]。WSSV 感染会使凡纳滨对虾体内弧菌等有害菌大量增殖^[27-28]。我们的研究结果显示,在健康的克氏原螯虾肠道中弧菌属只占很小的比例,且在感染前后并无明显变化(图 5)。

肠道稳态及其菌群组成与宿主健康密切相关,

本研究显示 WSSV 感染导致克氏原螯虾肠道菌群发生变化,提示 WSSV 或可通过干扰肠道稳态致病,可为进一步研究 WSSV 的致病机制提供新的线索,也为甲壳类益生菌筛选提供了科学依据。

参考文献 References

- [1] 唐鑫生.克氏原螯虾[J].生物学通报,2001,36(9):19-20. TANG X S.*Procambarus clarkii*[J].Bulletin of biology,2001,36(9):19-20(in Chinese).
- [2] 李青彬.克氏原螯虾白斑综合征病毒的活体检测及流行病学调查[D].武汉:华中农业大学,2018.LI Q B.Bio-assay detection and epidemiological investigation of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkia* [D].Wuhan:Huazhong Agricultural University,2018(in Chinese with English abstract).
- [3] 李青彬,李艳和,王卫民,等.湖北省不同克氏原螯虾群体携带白斑综合征病毒情况调查[J].中国农学通报,2019,35(12):157-164.LI Q B,LI Y H,WANG W M,et al.Investigation of white spot syndrome virus in different *Procambarus clarkii* populations in Hubei[J].Chinese agricultural science bulletin,2019,35(12):157-164(in Chinese with English abstract).
- [4] VALDES A M,JENS W,ERAN S,et al.Role of the gut microbiota in nutrition and health[J/OL].British medical journal,2018;k2179 (2018-06-13) [2019-09-22]. https://doi.org/10.1136/bmj.k2179.
- [5] BARKO P C,MCMICHAEL M A,SWANSON K S,et al.The gastrointestinal microbiome:a review.[J].Journal of veterinary internal medicine,2018,32(1):9-25.
- [6] CLEMENTE J C,URSELL L K,PARFREY L W,et al.The impact of the gut microbiota on human health;an integrative view[J].Cell,2012,148(6):1258-1270.
- [7] DUBOURG G,SURENAUD M,LÉVY Y,et al.Microbiome of HIV-infected people[J].Microbial pathogenesis,2016,106:85-93.
- [8] 朱文根,李星浩,饶刘瑜,等.感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响[J].水生生物学报,2019,43(1):109-116. ZHU W G,LI X H,RAO L Y,et al.Effects of reovirus infection on the intestinal microbiota diversity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J].Acta hydrobiologica sinica,2019,43(1):109-116(in Chinese with English abstract).
- [9] DING Z F,CAO M J,ZHU X S,et al.Changes in the gut microbiome of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection[J].Journal of fish diseases,2017,40(11):1561-1571.
- [10] WANG J,HUANG Y,XU K,et al.White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*[J].Fish & shellfish immunology,2019,84:130-137.
- [11] 袁军法,李莉娟,谷万港,等.对虾白斑综合征病毒 VP28 免疫后克氏原螯虾血清酶活性及中和活性[J].武汉大学学报(理学版),2005(s2):253-258. YUAN J F,LI L J,GU W G,et al.Lysozyme,phenoloxidase activity and neutralization ability in the serum of crayfish vaccinated by VP28 of white spot syndrome virus[J].Journal of Wuhan University (natural science edition),2005(s2):253-258(in Chinese with English abstract).
- [12] ZHANG X X,SUN Z Q,ZHANG X S,et al.Hemolymph microbiomes of three aquatic invertebrates as revealed by a new cell extraction method [J/OL].Applied and environmental microbiology,2018,84(8):e02824-17 (2018-04-02) [2019-09-22].https://doi.org/10.1128/AEM.02824-17.
- [13] 兰江风,代云佳,林鑫.养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析[J].水产学报,2016,40(3):318-325.LAN J F,DAI Y J,LIN L.Quantitative analysis of white spot syndrome virus in the tissues of cultured red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J].Journal of fisheries of china,2016,40(3):318-325(in Chinese with English abstract).
- [14] XIONG J B.Progress in the gut microbiota in exploring shrimp disease pathogenesis and incidence[J].Applied microbiology and biotechnology,2018,102(17):7343-7350.
- [15] PREVEDEN T,SCARPELLINI E,MILIC N,et al.Gut microbiota changes and chronic hepatitis C virus infection[J].Expert review of gastroenterology & hepatology,2017,11(9):813-819.
- [16] SHE R,LI T T,LUO D,et al.Changes in the intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius gibelio*) associated with cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) infection[J].Current microbiology,2017,74(10):1130-1136.
- [17] 魏娜.大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 肠道菌群结构及其与宿主经济性状间的关系[D].厦门:集美大学,2016.WEI N.Intestinal microbiota in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and the relationship to host economic traits[D].Xiamen:Jimei University,2016(in Chinese with English abstract).
- [18] WANG C H,ZHOU Y F,LYU D W,et al.Change in the intestinal bacterial community structure associated with environmental microorganisms during the growth of *Eriocheir sinensis* [J/OL].Microbiology open,2018,8(5):e00727 (2018-10-11) [2019-09-22].https://doi.org/10.1002/mbo3.72.
- [19] PTACNIK R,SOLIMINI A G,ANDERSEN T,et al.Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities[J].Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(13):5134-5138.
- [20] MEZITI A,RAMETTE A,MENTE E,et al.Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities[J].FEMS microbiology ecology,2010,74(2):472-484.
- [21] RUNGRASSAMEE W,KLANCHUI A,CHAIYAPECHARA S,et al.Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages [J/OL].PLoS One,2013,8(4):e60802 (2013-04-05) [2019-09-22].https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060802.
- [22] KOSTANJSEK R,TRUS J,VGUSTIN G. "Candidatus *bacilloplasma*", a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crusta-

- cea; Isopoda)[J]. Applied and environmental microbiology, 2007, 3(17): 5566-5573.
- [23] DARWISH A M, ISMAIEL A A. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer[J]. Molecular & cellular probes, 2005, 19(4): 267-274.
- [24] 王祥红, 李会荣, 张晓华, 等. 中国对虾成虾肠道微生物区系(英文)[J]. 青岛海洋大学学报, 2000(3): 493-498. WANG X H, LI H R, ZHANG X H, et al. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2000(3): 493-498(in English).
- [25] 李继秋, 谭北平, 麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 109-113. LI J Q, TAN B P, MAI K S. Study on the relationships between white spot syndrome virus outbreak in cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) and the composition of aerobic heterotrophic bacterium communities in shrimp intestine[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1): 109-113 (in Chinese with English abstract).
- [26] 张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(2): 211-218. ZHANG S J, ZHAO X J, SONG X L, et al. Analysis of the culturable bacteria's quantity and composition in the intestinal tract of cultivation shrimp[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(2): 211-218 (in Chinese with English abstract).
- [27] PHUOC L H, CORTEEL M, THANH N C, et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2009, 290(1/2): 61-68.
- [28] SELVIN J, LIPTON A. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon* [J]. Diseases of aquatic organisms, 2003, 57(1/2): 147-150.

Effects of white spot syndrome virus (WSSV) infection on intestinal flora composition of *Procambarus clarkii*

CHEN Yiming¹, GU Zemao^{1,2}, LI Lijuan¹, CHEN Tiansheng¹, YUAN Junfa^{1,3}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Shuangshui Shuanglü Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Hubei Engineering Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China

Abstract To reveal the effect of white spot syndrome virus (WSSV) infection on the intestinal flora of crayfish (*Procambarus clarkii*), 16S high-throughput sequencing technology was used to analyze the composition and diversity of the intestinal flora of crayfish in the healthy and artificial-infected group. The results showed that there was no significant difference in intestinal abundance and diversity between the WSSV infected group and the control group, but the composition of their dominant flora was different. The dominant bacteria in the control group were Proteobacteria (75.42%) and Tenericute (19.17%). The dominant intestinal bacteria in the infection group were Proteobacteria (78.14%) and Bacteroidetes (17.38%). LEfSe analysis showed that compared with the control group, the abundance of *Candidatus bacilloplasma* was significantly reduced ($P < 0.05$) in the infected group, and the abundance of Bacteroidaceae and Flavobacteria was significantly increased ($P < 0.05$). In addition, the abundance of some potential pathogens such as *Flavobacterium* and *Aeromonas* increased significantly after infection ($P < 0.05$). These results indicated that WSSV infection caused changes in the intestinal flora of crayfish, suggesting that WSSV may cause disease by altered the homeostatic balance of the crayfish intestine.

Keywords crustacean; *Procambarus clarkii*; intestinal flora; WSSV; high-throughput sequencing; LEfSe analysis; shrimp in rice fields

(责任编辑:边书京)