

文章编号:1674-7054(2010)04-0371-05

## 5种饵料对日本囊对虾早期生长及感染 WSSV 存活率的影响

王平<sup>1,2</sup>, 孙成波<sup>1</sup>, 庄健进<sup>1</sup>, 李咏<sup>2</sup>, 李义军<sup>1,2</sup>, 李婷<sup>1</sup>, 徐安敏<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088; 2. 海南省昌江南疆生物技术有限公司, 海南三亚 572000)

**摘要:** 采用人工配合饲料、鱼粉、丰年虫无节幼体、虾片和牡蛎肉 5 种不同饵料投喂日本囊对虾幼虾, 实验周期 20 d, 测量日本囊对虾的体长、体重及计算其成活率。结果表明, 5 种饵料对日本囊对虾生长的影响差异显著 ( $P < 0.05$ ), 其中丰年虫组体长、体重的增长明显优于其他各组, 差异达极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 牡蛎肉组次之, 配合饲料组的体长、体重增长最小, 鱼粉组体长、体重增长大于虾片组。人工投喂 WSSV 感染 5 种不同饵料投喂的日本囊对虾幼虾, 实验周期 10 d。丰年虫组和鱼粉组的存活率最高, 明显高于配合饲料和牡蛎肉两实验组, 差异达极显著水平 ( $P < 0.01$ ); 丰年虫组和鱼粉组之间存活率无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 人工配合饵料组和牡蛎肉组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。半定量 PCR 检测表明, 感染前日本囊对虾幼虾均不携带 WSSV, 感染后全部个体均检测到相应的病毒特征片段。

**关键词:** 日本囊对虾; 饵料; WSSV; 半定量 PCR

**中图分类号:** S 963.14

**文献标志码:** A

日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 俗称花虾、竹节虾、花尾虾、斑节虾、车虾, 是一种海产大型经济虾类。日本囊对虾分布广泛, 日本北海道以南、中国沿海、东南亚、澳大利亚北部、非洲东部及红海等均有分布。对虾白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 是迄今为止危害对虾养殖业最为严重的病毒性疾病, 在具有传播快、致死率高的特点。WSSV 每年使我国对虾养殖业遭受亿元以上的损失。WSSV 可使感病对虾在 3 ~ 10 d 内死亡, 且死亡率达 100%<sup>[1]</sup>, 国际兽疫局 (OIE) 将其列为需要报告的水生动物病毒性疫病<sup>[2]</sup>。

本研究采用人工投喂毒饵的方法使日本囊对虾幼虾感染 WSSV, 用半定量 PCR 检测感染效果, 探究不同饵料对日本囊对虾幼虾生长及抗病力的影响, 旨在为科学选择饵料投喂, 提高日本囊对虾幼虾对病害的免疫力, 增加病毒感染后日本囊对虾的存活率, 减少 WSSV 对生产造成的影响提供科学依据。

### 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 实验在海南省昌江南疆生物技术有限公司三联基地进行, 所用日本囊对虾幼虾为公司苗场培育。人工感染用 WSSV 为惠州爱试灵生物科技有限公司提供病虾, 经 PCR 检测全为阳性。实验饵料为恒兴牌对虾人工配合饲料 0 号料 (粗蛋白含量为 42%)、天然鱼粉、鲜活丰年虫无节幼体、滋丰虾片和新鲜牡蛎肉。实验用水为从海区抽取经沙滤、沉淀, 再用有效氯质量浓度为  $20 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$  的强氯精消毒后充暴晒处理的海水, 确保水体无病原生物。实验用水的温度为  $(29 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 盐度为 28。

**收稿日期:** 2010-11-15

**基金项目:** 科技部农业科技成果转化资金项目 (2010GB2E200382), 海南省重点科技计划项目 (090706), 科技部星火计划重点项目 (2010GA800008)

**作者简介:** 王平 (1977-), 男, 云南宣威人, 海南省昌江南疆生物技术公司高级工程师。

**通信作者:** 孙成波 (1970-), 男, 江苏赣榆人, 广东海洋大学水产学院, 副教授, 博士。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 实验设计

(1) 生长实验。实验设置 A, B, C, D, E 5 个组, 每组设 3 个平行组, 每个平行组放日本囊对虾幼虾 100 尾, 饲养于 25 L 的塑料桶中, 养殖水体为 20 L, 分别投喂人工配合饲料(A 组), 鱼粉(B 组), 丰年虫无节幼体(C 组), 虾片(D 组), 牡蛎肉(E 组), 每天投喂 3 次。丰年虫经聚维酮碘浸泡消毒, 虾片经 80 目筛绢搓, 牡蛎肉经打碎后投喂, 饵料投喂量以摄食 1.5 h 后略有剩余, 每餐投喂 1.5 h 后吸污换水, 日换水量 30%, 实验周期 20 d。

(2) 攻毒实验。完成生长实验后, 再从对应的平行组中取大小均匀的日本囊对虾 12 尾放于 25 L 的塑料桶, 分别作为对照组、WSSV 攻毒组, 每个攻毒组设置 3 个平行组, 每组设 1 个对照组。攻毒前让日本囊对虾饥饿 24 h 再投喂带病毒虾肉糜 1 次, 然后继续投喂各相应饵料, 对照组按攻毒前方式投喂, 实验周期 10 d。

### 1.2.2 体质量、体长测量及成活率、存活率统计

(1) 体长和体质量测量。实验前后, 每组随机抽取 30 尾个体测量 1 次体长和体质量。体长测量从眼柄基部至尾脊末端, 体质量用电子天平称量。

(2) 成活率 = 实验后各平行成活尾数 ÷ 实验前虾尾数 × 100%; 平均增长 = (终末体长 - 初始体长) ÷ 实验周期; 平均增重 = (终末体质量 - 初始体质量) ÷ 实验周期。

(3) 存活率 = 攻毒后存活数 ÷ 攻毒前虾尾数 × 100%。

1.2.3 数据分析 采用单因素方差分析(ANOVA)和样本均值多重分析方法进行统计分析, 并在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平上对结果进行差异显著性检验。

1.2.4 病毒检测 参照 CHANG P S 等<sup>[3]</sup>的方法, 采用半定量 IQ2000TMPCR 检测 WSSV, 按照试剂盒说明书进行。试剂配法: 第 1 次扩增反应: 8  $\mu\text{L}/\text{reaction}$ , First PCR PreMix 7.5  $\mu\text{L}$ , IQzyme DNA Polymerase 2 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  0.5  $\mu\text{L}$ ; 第 2 次扩增反应: 15  $\mu\text{L}$ , Nested PCR Polymerase 2 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

反应条件: 第 1 次扩增反应: 94  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 重复 15 圈; 末圈之后加跑 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 20  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s 的条件。第 2 次扩增反应: 94  $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 62  $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 重复 30 圈; 末圈之后加跑 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 20  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s 的条件。再将 PCR 产物于琼脂凝胶中进行电泳检测, 经荧光紫外成像断定结果后拍照保存结果。

1.2.5 数理统计分析 应用 SPSS11.5 软件对所得结果及数据进行单因素方差分析(ANOVA), 并在  $P < 0.01$  及  $P < 0.05$  水平上对结果进行差异显著性检验。存活率数据平方根反正弦转换后进行方差分析。

## 2 结果与分析

2.1 投喂不同饵料对日本囊对虾幼虾体长、体质量的影响 不同饵料对日本囊对虾幼体体长、体质量增长有明显影响。投喂不同饵料对日本囊对虾幼虾的体长、体质量的影响见表 1。投喂丰年虫无节幼体组体长、体质量的增长明显优于其他各组, 差异达极显著水平( $P < 0.01$ ), 投喂牡蛎肉组次之, 投喂人工配合饲料组的体长、体质量增长最小, 投喂鱼粉组体长、体质量增长大于虾片组。投喂丰年虫无节幼体和投喂鱼粉的两组成活率最高, 差异达极显著水平( $P < 0.01$ ); 丰年虫无节幼体组和投喂鱼粉组之间成活率无显著差异( $P > 0.05$ ), 投喂人工配合饵料组和牡蛎肉组差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 1 不同饵料体长、体质量及成活率的影响

饵料	实验前体长/	实验后体长/	平均增长/	实验前体质量/	实验后体质量/	平均增质量/	成活率/
	( $\text{cm} \cdot \text{尾}^{-1}$ )	( $\text{cm} \cdot \text{尾}^{-1}$ )	( $\text{cm} \cdot \text{尾}^{-1}$ )	( $\text{g} \cdot \text{尾}^{-1}$ )	( $\text{g} \cdot \text{尾}^{-1}$ )	( $\text{g} \cdot \text{尾}^{-1}$ )	%
A	0.82 ± 0.13	1.73 ± 0.17	0.94 <sup>e</sup>	0.016 ± 0.004	0.151 ± 0.012	0.140	43 <sup>c</sup>
B	0.82 ± 0.13	2.67 ± 0.19	1.92 <sup>e</sup>	0.014 ± 0.004	0.415 ± 0.015	0.401	78 <sup>a</sup>
C	0.82 ± 0.12	3.47 ± 0.22	2.77 <sup>a</sup>	0.014 ± 0.003	0.912 ± 0.017	0.898	85 <sup>a</sup>
D	0.80 ± 0.20	1.99 ± 0.23	1.20 <sup>d</sup>	0.013 ± 0.005	0.227 ± 0.014	0.213	64 <sup>b</sup>
E	0.81 ± 0.16	3.20 ± 0.19	2.39 <sup>b</sup>	0.012 ± 0.003	0.645 ± 0.010	0.630	50 <sup>c</sup>

注: 1) A: 投喂人工配合饲料组; B: 投喂鱼粉组; C: 投喂丰年虫; D: 投喂虾片组; E: 投喂牡蛎肉组。

2) 上标字母不同者表示差异显著( $P < 0.05$ ), 相同者表示组间差异不显著( $P > 0.05$ )。

**2.2 投喂不同饵料对日本囊对虾幼虾攻毒后存活率和累积死亡率的影响** 投喂牡蛎肉组和人工配合饵料组的存活率较低,分别为22.25%和5.55%;投喂丰年虫无节幼体组和鱼粉组的存活率为94.5%和91.7%,显著高于投喂牡蛎肉组和人工配合饵料组( $P < 0.01$ );投喂鱼粉组和投喂丰年虫无节幼体组之间的存活率无显著差异,投喂人工饵料组与牡蛎肉组之间的存活率差异也不显著( $P > 0.05$ )。

除对照组外,各实验组在人工投喂感染带毒饵料后经历一段潜伏期,投喂人工配合饵料组在第2天出现个体死亡,其他实验组在第3天出现个体死亡,死亡数在短期内迅速上升,最后趋于平稳,投喂人工配合饵料组累积死亡率最高,为94.4%,投喂丰年虫组累积死亡率最低,为5.56%(见图1)。

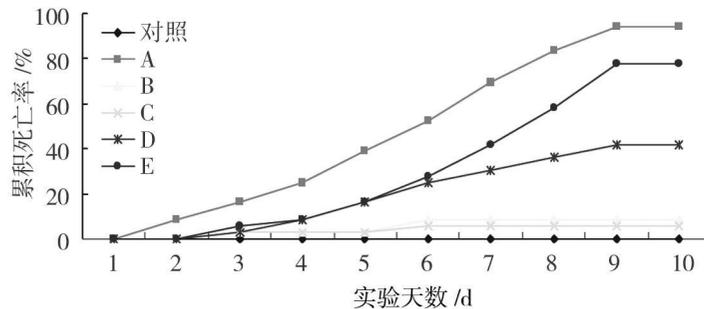


图1 投喂不同饵料的日本囊对虾幼虾的累积死亡率

**2.3 PCR检测结果** 攻毒前随机抽取20尾幼虾,半定量PCR检测WSSV全部为阴性,阴性率100%(见图2)。攻毒实验后,死虾和存活虾经检测全部为阳性,阳性率为100%(见图3)。投喂的毒饵经半定量PCR检测全部为阳性。

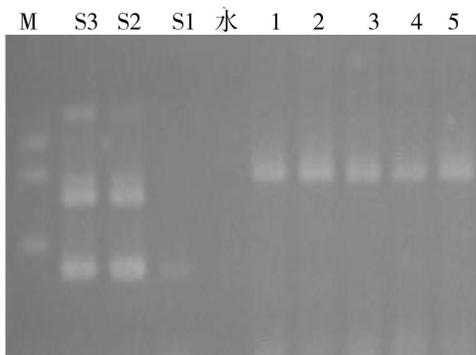


图2 实验前WSSV PCR扩增条带

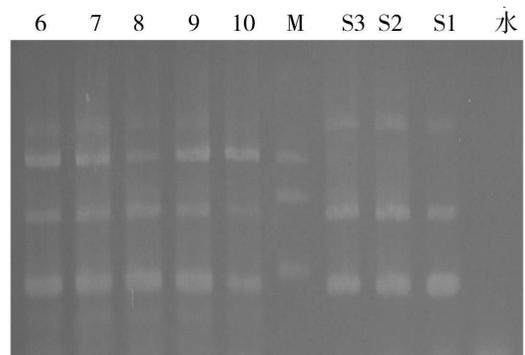


图3 实验后WSSV PCR扩增条带

M: 分子标记,848 bp,630 bp,333 bp;S3: 标准品 3,2 000 copies/reaction;S2: 标准品 2,200 copies/reaction;S1: 标准品 1,20 copies/reaction;1~5 为实验前虾体,6~10 为实验后虾体

### 3 讨论

**3.1 不同饵料对日本囊对虾生长的影响** 日本囊对虾幼虾的生长受各种因素的影响,如水质因素、病害的发生情况、管理水平、饵料的品质以及投饵方式等,各种影响因素均会对幼虾的生长与发育乃至存亡都产生极大影响<sup>[4]</sup>。本实验亦证实了,不同的饵料对对虾幼体的生长存在着显著的影响,投喂不同的饵料的日本囊对虾的生长效果依次为:投喂丰年虫无节幼体 > 投喂牡蛎肉 > 投喂鱼粉、虾片 > 投喂人工配合饵料。

日本囊对虾属于肉食性虾类,对蛋白质的需求较其他虾类高,最能满足对虾的生长需要的饵料为含有对虾本身氨基酸组成的饵料,特别是含有与日本囊对虾必需氨基酸组成相似的蛋白质的饵料<sup>[5]</sup>。有研究表明,丰年虫的氨基酸组成与对虾的氨基酸需求最为相近<sup>[6]</sup>,而且,鲜活丰年虫还可起到净化水质,优化水环境,减轻水质污染程度的作用<sup>[7]</sup>,以及能满足日本囊对虾幼虾抱食习性的需要,减少对虾自相残杀,从而提高存活率。这与本研究中投喂鲜活丰年虫无节幼体组的日本囊对虾的生长量最大、成活率最高的结论相符。牡蛎肉为易腐饵料,较易沉入水底未被幼虾摄食而腐烂,破坏水质,但其营养成分较鱼

粉、虾片、人工配合饵料等全面,易被虾体吸收利用,故用其投喂的日本囊对虾的生长量较大而成活率偏低。鱼粉、虾片因其颗粒细小无法被幼虾完全摄食,较易使水体浑浊,恶化水质,但其蛋白质含量极高,有利于对蛋白质需求量较高的日本囊对虾的生长。人工配合饲料虽然营养成分不比鲜活饵料、鱼粉、虾片等全面、丰富,但其对养殖水质污染小,投喂成本低,操作方便,是实际生产中最常用的对虾饵料。

鲜活丰年虫虽然具有种种优点,但仅以其幼体及成体单独作为饵料,成本相对较高<sup>[8]</sup>。滕世栋等<sup>[4]</sup>和林琼武等<sup>[9]</sup>采用不同饵料搭配的方法,对降低饵料成本的问题进行了讨论。孔杰等<sup>[7]</sup>亦指出,在生产实践中以卤虫无节幼体及其成体与其他饵料搭配使用,可使营养互补,更为全价,并能促进幼虾生长发育。综合以上研究结果,结合本实验结果,笔者建议在日本囊对虾养殖生产中,宜以鲜活丰年虫搭配其他饵料进行投喂。

**3.2 日本囊对虾抗病力与饲料营养成分的关系** 本研究采用投喂毒饵的方法攻毒,实验过程中对虾幼虾所表现的发病过程符合 WSSV 发病的特征。这与黄健<sup>[10]</sup>报道对虾爆发流行病的病原可通过投喂进行感染的结果一致。已有的研究结果<sup>[11-14]</sup>证实日本囊对虾感染 WSSV 的主要途径是经口传播。CHOU 等<sup>[15]</sup>报道,用投喂和浸泡的方法感染对虾均可使之发病死亡,但黄健等<sup>[10]</sup>通过浸泡和共居感染的方法,未引起感染组对虾的急性死亡,在感染对虾中亦未找到 WSSV 特有的组织病理病变。何建国等<sup>[14]</sup>用 WSSV 粗提液浸泡对虾,同时投喂饵料,以及用 WSSV 粗提液浸泡对虾 4 8h 后再投喂饵料,结果,前者实验对虾全部死亡,后者实验对虾在 15 d 观察时间内没有出现死亡和白斑综合症症状。因此,他们认为单纯浸泡或共居不能完全使对虾发病感染。此外,注射方法虽然能引起对虾的感染,但此方法对对虾的物理伤害较大,也与实际对虾发病病程不符。因此,进行日本囊对虾人工感染实验时,适于采用投喂毒饵的感染方法。本实验结果也证实,通过投喂的方法对日本囊对虾幼虾进行人工感染,对对虾的物理伤害小,而且与自然条件下对虾发病病程基本一致。

不同饵料组中日本囊对虾感染 WSSV 后的存活率表现出显著的差异,这可能是由于饵料营养成分的不同而影响了对虾的体质,进而造成虾体对病害的免疫力不同。汪小锋等<sup>[16]</sup>研究表明 $\beta$ -葡聚糖和脂多糖主要是通过刺激日本囊对虾大颗粒细胞内糙面内质网的大量增生,大幅度提高酚氧化酶的产量,来提高对虾自身免疫力。董世瑞等<sup>[17]</sup>采用 4 种饵料投喂中国对虾幼虾,用投喂感染的方法人工感染 WSSV。投喂鲜活丰年虫组体长、体重的增长明显优于其他各组,投喂丰年虫幼体和投喂鱼肉两组的攻毒存活率最高,明显高于投喂配合饵料和牡蛎肉实验组。胡贤德等<sup>[18]</sup>研究不同饵料对斑节对虾幼虾的生长及对 WSSV 敏感性的影响,认为投喂丰年虫无节幼体组的幼虾的体长、体重增长明显优于其他各组;不同饵料对幼虾 WSSV 敏感性的影响也有差异,投喂感染 WSSV 后,丰年虫组和鱼肉组成活率最高。这与本研究中投喂鲜活丰年虫无节幼体组的日本囊对虾感染 WSSV 后存活率最大的结论是一致的。

## 参考文献:

- [1] 黄健,宋晓玲,于佳,等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死—对虾暴发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1-10.
- [2] 雷质文,黄健,寇运同,等. 对虾白斑综合症(WSSV)的分子流行病学研究进展[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 260-264.
- [3] CHANG P S, LO C F, WANG Y C, et al. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in shrimp, *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Dis Aquat Org Inpress, 1996, 24: 131-139.
- [4] 滕世栋,丁增明. 贻贝幼体在对虾育苗中的应用[J]. 海洋科学, 1999(3): 18-20.
- [5] 王军霞,王维娜,王亚斌,等. 日本对虾的营养需求[J]. 海洋通报, 2003, 22(5): 78-85.
- [6] 荣长宽,梁素秀,岳炳宜. 中国对虾对 16 种饲料的蛋白质和氨基酸的消化率[J]. 水产学报, 1994, 18(2): 131-137.
- [7] 张天时,孔杰,刘萍,等. 饵料和养殖密度对中国对虾幼虾生长及存活率的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 41-47.
- [8] 王克行. 虾蟹类增养殖学[M]. 北京: 农业出版社, 1997: 62-69.
- [9] 林琼武,单保党,黄加祺. 不同饵料搭配对日本对虾人工育苗存活率的影响[J]. 台湾海峡, 2001, 20: 44-48.
- [10] 黄健,蔡生力,宋晓玲,等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 51-58.
- [11] 宋晓玲,黄健,王崇明,等. 皮下及造血组织坏死杆状病毒对中国对虾人工感染[J]. 水产学报, 1996, 20(4): 374-378.

- [12] 刘萍,孔杰,孟宪红,等. 白斑综合症病毒(WSSV)在对虾养殖过程中传播途径的调查[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3):9-12.
- [13] 蔡生力,黄捷,王崇明,等. 1993—1994年对虾爆发病的流行病学研究[J]. 水产学报, 1994, 19(2):112-119.
- [14] 何建国,周化民,姚泊,等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. 中山大学学报:自然科学版, 1999, 38(2):65-69.
- [15] CHOU H Y, HANG C Y, WANG C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimps in Taiwan[J]. Dis Aquat Org Inpress. 1995, 23:165-173.
- [16] 汪小锋,樊廷俊,从日山,等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(1):66-73.
- [17] 董世瑞,高焕,孔杰,等. 不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1):52-58.
- [18] 胡贤德,孙成波,丁树军,等. 不同饵料对斑节对虾(*Penaeus monodon*)幼虾的生长及对 WSSV 敏感性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(3):296-301.

## Effects of Five Different Diets on Growth and WSSV Resistance of *Marsupenaeus japonicus*

WANG Ping<sup>1,2</sup>, SUN Cheng-bo<sup>1</sup>, ZHUANG Jian-jin<sup>1</sup>, LI Yong<sup>2</sup>, LI Yi-jun<sup>1,2</sup>, LI Ting<sup>1</sup>, XU An-min<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries college of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Hainan Changjiang Nanjiang Marine Biotechnology Co., Sanya 572000, China)

**Abstract:** Five diets, which were artificial feed, fish meal, artemia salina nauplii, shrimp flakes and oyster meat respectively, were used to feed *M. japonicus*, and the body length as well as body weight were measured, experimental period was 20 days. The results indicated that the effects of 5 species of diets on the growth of the *M. japonicus* were significantly different ( $P < 0.05$ ); the increasing of the weight and length of the group which fed with Artemia Salina nauplii were significantly higher than that of other groups ( $P < 0.01$ ), and the group which was fed with artificial feed got the slowest increasing in length and weight; the length and weight of the group which was fed with fish meal was higher than that of shrimp flakes; After infected with WSSV, and the experiment time was designed as 10 d, the survival rate of artemia salina nauplii group and the fish meal group were significantly higher than that of other groups ( $P < 0.01$ ); there was no significant difference between Artemia Salina nauplii group and the fish meal group ( $P > 0.05$ ), there was no significant difference between artificial feed group and the oyster meat group ( $P > 0.05$ ). The analysis results of semi-quantitative PCR showed that there were no WSSV gene fragments before infection but there were positive signs of infection after the experiment.

**Key words:** *M. japonicus*; diets; WSSV; semi-quantitative PCR