

# 不同饵料组合对中国对虾幼体 WSSV 携带量及存活率的影响

肖广侠<sup>1,2</sup> 孟宪红<sup>1\*</sup> 孔 杰<sup>1</sup> 曹宝祥<sup>1</sup>  
刘 宁<sup>1</sup> 张庆文<sup>1</sup> 罗 坤<sup>1</sup> 李战军<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 天津渤海水产研究所, 300457)

(<sup>3</sup> 山东省海洋捕捞生产管理站, 烟台 116023)

**摘 要** 采用单胞藻(SA)、配合饵料(AF)、轮虫(BP)和卤虫幼体(BS)4种饵料,设计了SA+AF、SA+AF+BP、SA+AF+BS和SA+AF+BP+BS4种饵料组合并用于中国对虾苗种培育,投喂SA+AF饵料的受精卵分设“碘伏”消毒及未消毒组,投喂其他饵料的受精卵均为“碘伏”消毒组。分析各期幼体成活率、P<sub>10</sub>体重及WSSV携带量,结果表明,N-Z期间,受精卵消毒与否及投喂不同饵料对中国对虾的成活率差异均不显著( $P>0.05$ );Z-P期间,投喂BP的成活率明显高于未投喂BP组( $P<0.01$ );投喂SA+AF+BS的幼体在M-P期间成活率与其他饵料组差异极显著( $P<0.01$ );投喂SA+AF+BP饵料组P<sub>10</sub>幼体的平均体重小于投喂SA+AF+BP+BS组的幼体( $P<0.01$ );SA+AF消毒组P<sub>10</sub>仔虾WSSV携带量为 $10.52\pm 3.3$  copies/ng DNA,低于其他饵料组仔虾的WSSV携带量( $P<0.05$ )。在P<sub>11</sub>-P<sub>60</sub>培育期间,分别投喂菲律宾蛤仔足肌(CF)+配饵(AF)、<sup>60</sup>Co γ辐照菲律宾蛤仔足肌(RCF)+配饵(AF)、高锰酸钾消毒菲律宾蛤仔足肌(DCF)+配饵(AF)和配饵(AF)4种饵料组合。结果表明,CF+AF组对虾体重和体长增长最大,但与AF组差异不显著,而CF+AF组和AF组与其余两组差异显著( $P<0.05$ );4组对虾存活率差异不显著( $P>0.05$ )。WSSV人工感染实验结果表明,4种饵料投喂的对虾累积死亡率都在90%以上,差异均不显著( $P>0.05$ )。

**关键词** 中国对虾 饵料 生长发育 存活率 WSSV

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2013)04-0043-09

## Effect of different diets on the WSSV load and survival rate of *Fenneropenaeus chinensis*

XIAO Guang-xia<sup>1,2</sup> MENG Xian-hong<sup>1\*</sup> KONG Jie<sup>1</sup> CAO Bao-xiang<sup>1</sup>  
LIU Ning<sup>1</sup> ZHANG Qing-wen<sup>1</sup> LUO Kun<sup>1</sup> LI Zhan-jun<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>Bohai Fisheries Research Institute of Tianjin, 300457)

(<sup>3</sup>Shandong Marine Fishing and Production Management Station, Yantai 116023)

国家自然科学基金(31072206;31172402)和青岛市关键技术攻关类项目(11-1-1-11-hy)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291-803

收稿日期:2012-07-18;接受日期:2013-01-10

作者简介:肖广侠(1984-),男,助理工程师,主要从事水产动物遗传育种工作。E-mail: gxxiao@163.com, Tel: (022)59886527

**ABSTRACT** Using microalgae (SA), artificial feed (AF), brachionus plicatilis (BP) and brine shrimp larvae (BS), four diets including SA + AF, SA + AF + BP, SA + AF + BS, and SA + AF + BP + BS were formulated and used for rearing *Fenneropenaeus chinensis* larvae. All fertilized eggs were disinfected except the larvae fed with SA + AF. The survival rates of different treatments were compared at each stage. It was found that there was no significant difference in the survival rate at N-Z stage by feeding with different diets ( $P > 0.05$ ), but the survival rate of BP treatment was higher than others ( $P < 0.01$ ) at Z-P stage, while that of SA + AF + BS treatment was significantly different ( $P < 0.01$ ) from others at M-P stage. The body weight of 10-day post larvae ( $P_{10}$ ) fed with SA + AF + BP diet was less than that of SA + AF + BP + BS ( $P < 0.01$ ). The WSSV load of SA + AF treatment ( $10.52 \pm 3.3$  copies/ng DNA) were significantly lower than that of other treatments ( $P < 0.05$ ) at  $P_{10}$  stage. During the stage of  $P_{11}$ - $P_{60}$ , four kinds of diets, including *Ruditapes philippinarum* foot muscle (CF) + artificial feed (AF), *R. philippinarum* foot muscle radiated by  $^{60}\text{Co } \gamma$  (RCF) + artificial feed (AF), potassium-permanganate-disinfected *R. philippinarum* foot muscle (DCF) + artificial feed (AF) and artificial feed (AF), were used to feed the prawn. The CF + AF treatment gained the greatest increase of body weight and body length, showing no significant difference ( $P > 0.05$ ) from AF treatment, but with significant difference ( $P < 0.05$ ) from the other two treatments. The survival rate of CF + AF treatment was the highest but no significant difference from other treatments ( $P > 0.05$ ). WSSV artificial infection experiment showed that the accumulated mortality in all treatments were higher than 90%, with no significant difference among treatments ( $P > 0.05$ ).

**KEY WORDS** *Fenneropenaeus chinensis* Diet Growth Survival rate WSSV

中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 是我国重要的增养殖对象。1993 年全国范围对虾养殖场大面积暴发白斑综合征 (White Spot Syndrome, WSS) 流行病, 使我国养虾业遭受了巨大损失。对虾病害发生的原因是复杂和多方面的, 其中对虾苗种培育是目前对虾病害防治体系中的薄弱环节, 如果对虾苗种本身带有病毒, 会给对虾养殖带来潜在的危险。无特定病原 (Specific Pathogen Free, SPF) 对虾是指对虾苗种经过病毒、微生物及寄生虫检疫, 无特定的病毒、微生物或寄生虫存在的对虾 (宋晓玲等 2006)。养殖结果证明, SPF 对虾培育对养殖生产有重要作用 (李 健等 2001)。不过 SPF 对虾一旦转移到 SPF 生产设施外, 由于对虾感染疾病风险变大而被称为高健康对虾 (HHS) (Pruder *et al.* 1994; Wybany *et al.* 1992)。有文献报道, 用 SPF 技术培育的高健康苗种进行养殖生产, 无论在成活率、产量、饵料转换率以及个体大小均匀程度, 均优于普通苗种 (李 健等 2001), 培育出生长快、抗 WSSV 能力强的高健康对虾苗种在生产上意义重大 (潘鲁青 1997; 林琼武等 2001)。饵料是 SPF 对虾培育过程中的关键因素 (Chambedain *et al.* 1981)。研究发现, 每年 4~10 月的对虾均检测出 WSSV; 另外, 主要饵料及养殖环境生物类群, 包括鱼类、虾类、蟹类、桡足类、端足类、沙蚕、卤虫均可检出 WSSV (宋晓玲等 2001; 邓 灯等 2004), 对虾饵料 (轮虫、卤虫、菲律宾蛤仔) 可能已成为对虾病毒传播的重要途径 (Canzonier 1971)。鉴于此, 研究如何利用现有条件降低病源的入侵、优化饵料及苗种培育过程, 进而提高对虾养殖的成功率就变得尤为重要。

利用合适的物理或者化学处理消除对虾饵料中的病毒是目前较为可行的方法, 主要有高锰酸钾消毒及  $^{60}\text{Co } \gamma$  辐照处理方法。高锰酸钾是水产养殖中常用的化学消毒剂, 具有强氧化性, 通过氧化细菌体内的活性基因而发挥杀灭细菌的作用, 并且毒性小、副作用小、用量小, 因而高锰酸钾常用于养殖设施消毒和水生动物疾病防治。但高锰酸钾在处理对虾饵料中报道较少, 见于在消毒卤虫成体 (胡贤德等 2009)。另一种消毒方法

$^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 射线辐照属于冷消毒法,具有节约能源、无残毒、穿透力强、消毒均匀彻底、效果可靠等优点,目前已应用于医药、食品、化妆品、畜禽饲料等的消毒和灭菌处理(张印法等 1994;周正宇等 2001),但较少见于水产饲料处理。针对以上研究情况,本研究对中国对虾受精卵进行消毒及对苗种投喂不同的饵料(主要是轮虫、卤虫及配合饵料),并利用高锰酸钾及 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 辐照处理菲律宾蛤仔足肌用于培育对虾苗种,尝试降低对虾苗种的 WSSV 携带量,并利用生长及存活率等指标评价各种饵料组合的育苗效果,以期生产中提供高健康的中国对虾苗种提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料为中国对虾“黄海 2 号”,饵料种类包括单胞藻(金藻)(SA)、褶皱臂尾轮虫(BP)、卤虫无节幼体(BS)、菲律宾蛤仔足肌(CF)和日清配合饵料(AF)等。实验地点:中国对虾遗传育种中心(山东青岛鳌山卫),实验时间:2010 年 12 月~2011 年 12 月。

### 1.2 饵料处理方法

卤虫卵孵化幼体前经过脱壳处理;鲜活轮虫经过 300 目筛绢过滤;菲律宾蛤仔经过粉碎机处理后,用 100 目筛绢过滤,并充分漂洗后收集粉碎的肌肉;高锰酸钾处理方法为:菲律宾蛤仔足肌经浓度为 20mg/L 高锰酸钾溶液消毒 10min,然后充分漂洗; $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 射线辐照方法为:菲律宾蛤仔足肌经过剂量率为 1kGy/h 的 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 射线辐照 5h(居 华等 2009)。

### 1.3 对虾饵料投喂设置

#### 1.3.1 无节幼体-仔虾(N-P<sub>10</sub>)

实验设置 A'、A、B、C、D 5 组,每组 4 个平行,每个平行放无节幼体 3 000 尾,于 120L 塑料桶内养殖,其中 A'组为对照组,对虾受精卵不进行消毒处理,A~D 组为消毒组,受精卵利用碘伏消毒,具体方法参照孔 杰等(2005)。各饵料组合的投喂设置如下:A'、A 组:单胞藻+配合饵料(SA+AF);B 组:单胞藻+轮虫+配合饵料(SA+AF+BP);C 组:单胞藻+卤虫+配合饵料(SA+AF+BS);D 组:单胞藻+卤虫+轮虫+配合饵料(SA+AF+BS+BP)。

对虾发育至溞状幼体后,开始投喂饵料,每天投喂饵料 4 次,时间分别为 5:00、11:00、17:00 和 23:00,投喂量根据对虾幼体发育的不同时期进行调整(表 1)。

#### 1.3.2 仔虾(P<sub>11</sub>-P<sub>60</sub>)

幼体发育至仔虾(P<sub>11</sub>)后,将摄食 SA+AF+BS+BP 饵料组的仔虾分为 4 组,每组 3 个平行,每平行 60 尾仔虾。按照 K:菲律宾蛤仔足肌+配饵(CF+AF),L: $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 辐照菲律宾蛤仔足肌+配饵(RCF+AF),M:高锰酸钾消毒菲律宾蛤仔足肌+配饵(DCF+AF),N:配饵(AF)进行投喂。每天投喂 4 次,投喂时间同上,AF 与 CF(DCF、RCF)间隔投喂,投喂量为对虾体重 10%。

### 1.4 体重、体长的测量

P<sub>10</sub>与 P<sub>60</sub>时所有饵料组分别随机取 30 尾仔虾,分别测量体长和体重。

### 1.5 饵料测试及日常管理

温度:培育无节幼体时养殖用水温度保持 14℃,然后每天升高 2℃,早晚各 1℃,至 24℃稳定。仔虾第 8 天后,每天降温 2℃,至 16℃;盐度:24~25;溶氧:5~7mg/L;pH:7.5~8.3。养殖海水需经过网滤、沉淀、砂滤,经次氯酸钠消毒后方可使用。仔虾前只加水,仔虾后开始换水,每天换水量为养殖用水总体积的 1/3~1/2。

表1 中国对虾苗种培育投饵  
Table 1 The diet treatments for *F. chinensis* larval rearing

组别 Treatment	溞状幼体 1 期 Zoea 1(Z <sub>1</sub> )	溞状幼体 2 期 Zoea 2(Z <sub>2</sub> )	溞状幼体 3 期-糠虾幼体 1 期 Zoea 3-Mysis larva 1 (Z <sub>3</sub> -M <sub>1</sub> )	糠虾幼体 2 期-仔虾 1 期 Mysis larva 2-Post larva 1 (M <sub>2</sub> -P <sub>1</sub> )	仔虾 2 期-仔虾 10 期 Post larva 2-Post larva 10 (P <sub>2</sub> -P <sub>10</sub> )
A', A	SA 1×10 <sup>4</sup> /ml	SA 3×10 <sup>4</sup> /ml	SA 9×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.05g/次,	SA 18×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.08g/次,	SA 27×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.1g/次,
B	SA 1×10 <sup>4</sup> /ml	SA 3×10 <sup>4</sup> /ml, BP 0.5~2 个/ml	SA 8×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.05g/次, BP 2~3 个/ml	SA 10×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.08g/次, BP 3~4 个/ml	SA 10×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.1g/次, BP 4~5 个/ml
C	SA 1×10 <sup>4</sup> /ml	SA 3×10 <sup>4</sup> /ml	SA 8×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.05g/次, BS 20~30 个/尾	SA 10×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.08g/次, BS 20~30 个/尾	SA 10×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.1g/次, BS 70~100 个/尾
D	SA 1×10 <sup>4</sup> /ml	SA 3×10 <sup>4</sup> /ml	SA 8×10 <sup>4</sup> /ml, FD 0.05g/次, BP 2~3 个/ml, BS 20~30 个/尾	SA 10×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.08g/次, BP 3~4 个/ml, BS 20~30 个/尾	SA 10×10 <sup>4</sup> /ml, AF 0.1g/次, BP 4~5 个/ml, BS 70~100 个/尾

注: A' 为对照组, A~D 为消毒组; A 组投喂单胞藻+配饵(SA+AF); B 组投喂单胞藻+轮虫+配饵(SA+AF+BP); C 组投喂单胞藻+卤虫+配饵(SA+AF+BS); D 组投喂单胞藻+卤虫+轮虫+配饵(SA+AF+BS+BP)

Note: Treatment A' was control, A~D were disinfected treatments; Treatment A and A' were fed with SA+AF; Treatment B was fed with SA+BP+AF; Treatment C was fed with SA+BS+AF; Treatment D was fed with SA+BS+BP+AF

## 1.6 幼虾人工感染 WSSV 实验

P<sub>60</sub> 时将 K、L、M 及 N 组幼虾利用可视嵌入性橡胶(Visible implant elastomer, VIE)染料分别进行不同颜色组合的荧光标记,标记部位为对虾尾部,共背面及左右侧面 3 个部位,标记颜色为红、橙、蓝、绿和空白。将标记后的对虾放入 20m<sup>2</sup> 的水泥池中混养 7d 后,每组取 60 尾对虾进行人工 WSSV 感染实验。感染方法:幼虾饥饿 24h 后,分别单独放置于 1L 的塑料容器中,投喂毒饵(感染 WSSV 死亡的中国对虾肌肉)(10±5mg),对照组(E 组)用投喂正常的对虾肌肉(10±5mg)代替毒饵,其他处理相同,待幼虾摄食对虾肌肉后放回养殖池。每 1h 记录对虾的死亡情况,至 15d 后实验结束,此阶段水温为 21~22℃。

## 1.7 病毒检测方法

P<sub>60</sub> 对虾攻毒后死亡对虾样品 DNA 提取及巢式 PCR 检测均参照邓 灯等(2005),PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,于 Gel Doc1000 凝胶成像仪上分析实验结果。P<sub>10</sub> 对虾利用 TaqMan 实时定量 PCR 检测 WSSV,具体方法参照 Durand 等(2002)。

## 1.8 数据的统计分析

实验数据以平均值±标准差表示,实验用 SPSS 17.0 统计软件进行结果分析,在 ANOVA 单因子方差分析的基础上,采用 Duncan's 多重比较检验组间差异,以 P<0.05 作为差异显著的标准。

## 2 结果

### 2.1 不同饵料组合对中国对虾幼体(N-P<sub>10</sub>)成活率及体重的影响

由表 2 可知,投喂饵料组合 SA+AF 的对虾,对照组与消毒组各期对虾幼体存活率差异均不显著(P>0.05);不同饵料组合对对虾 N-Z 的存活率差异均不显著(P>0.05),投喂 BP 组对虾幼体 Z-P 时期存活率均高于未投喂 BP 组,差异极显著(P<0.01),其中投喂 SA+BP+AF 组与投喂其他饵料组的对虾在 M-P 存活率差异均极显著(P<0.01),投喂 BP 饵料组合的对虾在 N-P 的存活率上明显高于未投喂 BP 的饵料组,差异极显著(P<0.01)。

表 2 饵料组合对中国对虾 N-Z-M-P<sub>10</sub> 存活率影响的多重比较

Table 2 Multiple comparison for the influence of diet combination on survival of N-Z-M-P<sub>10</sub> *F. chinensis*

组别 Treatment	饵料组合 Diet combination	N-Z 存活率 Survival rate of N-Z (Mean±SD)	Z-M 存活率 Survival rate of Z-M (Mean±SD)	M-P <sub>10</sub> 存活率 Survival rate of M-P (Mean±SD)	N-P <sub>10</sub> 存活率 Survival rate of N-P (Mean±SD)
A'	SA+AF	86.00±7.2368 <sup>a</sup>	31.84±5.0573 <sup>a</sup>	10.47±3.1447 <sup>a</sup>	1.67±0.94 <sup>a</sup>
A	SA+AF	83.97±10.284 <sup>a</sup>	33.67±5.973 <sup>a</sup>	11.98±2.974 <sup>a</sup>	1.99±1.41 <sup>a</sup>
B	SA+AF+BP	82.75±9.961 <sup>a</sup>	59.63±3.134 <sup>b</sup>	78.11±4.731 <sup>b</sup>	19.60±4.34 <sup>b</sup>
C	SA+AF+BS	87.08±8.623 <sup>a</sup>	31.49±4.070 <sup>a</sup>	32.65±2.950 <sup>c</sup>	4.85±2.33 <sup>a</sup>
D	SA+AF+BP+BS	83.70±9.964 <sup>a</sup>	61.00±1.378 <sup>b</sup>	80.86±3.771 <sup>b</sup>	21.91±8.60 <sup>b</sup>

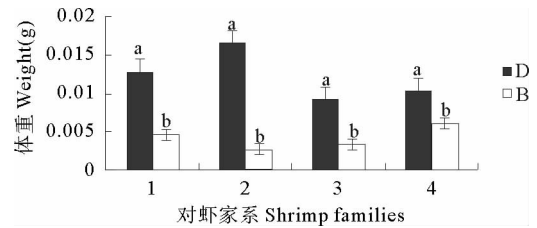
注:1)A'组为对照组,A~D组为消毒组;A'、A组投喂单胞藻+配饵(SA+AF);B组投喂单胞藻+轮虫+配饵(SA+AF+BP);C组投喂单胞藻+卤虫+配饵(SA+AF+BS);D组投喂单胞藻+卤虫+轮虫+配饵(SA+AF+BS+BP)。2)上标字母相同者表示组间差异不显著(P>0.05),不同者表示差异显著(P<0.05)

Note: 1) Treatment A' was control; A~D were disinfected treatments; Treatment A and A' were fed on SA+AF; Treatment B was fed with SA+BP+AF; Treatment C was fed with SA+BS+AF; Treatment D was fed with SA+BS+BP+AF; 2) The different superscript letters mean significant difference from each other (P<0.05). The same superscript letters mean no significant difference from each other (P>0.05)

摄食饵料组合 SA+AF+BS 与 SA+AF 的对虾由于存活数目太少,实际生产意义不大,所以未称量体重。对其余两种饵料组合培育的 P<sub>10</sub> 称重结果表明,摄食饵料组合 SA+AF+BP 的仔虾体重低于摄食 SA+AF+BP+BS 组的仔虾(图 1),两者差异极显著(P<0.01)。

### 2.2 不同消毒方式处理饵料对中国对虾幼虾(P<sub>11</sub>-P<sub>60</sub>) 生长及存活率的影响

摄食 4 种饵料组合的中国对虾,经过 50d 养殖实验,在体长、体重上都有一定程度的增加(表 3)。投喂饵料 CF+AF 组对虾体重与体长增加最大,增加量分别为 1.274±0.735g、3.259±2.212 cm,RCF+AF 组体重与体长增加最小,增加量分别为 0.947±0.575 g、2.717±



注:B组投喂单胞藻+轮虫+配饵(SA+BP+AF); D组投喂单胞藻+卤虫+轮虫+配饵(SA+BP+BS+AF)

Note: Treatment B was fed with SA+BP+AF; Treatment D was fed with SA+BP+BS+AF

图 1 两种饵料组合下中国对虾仔虾体重  
Fig. 1 The body weight of juvenile *F. chinensis* fed with two diets

表 3 饵料组合对中国对虾体长、体重及存活率的影响

Table 3 Influence of diet combination on length, body weight and survival rate of *F. chinensis*

饵料组合 Diet combination	实验前体长 Body length before experiment (cm)	实验后体长 Body length after experiment (cm)	平均增长 Length gain (cm)	实验前体重 Body weight before experiment (g)	实验后体重 Body weight after experiment (g)	平均增重 Weight gain (g)	存活率 Survival rate (%)
K	1.417±0.229	4.676±0.380	3.259 <sup>a</sup>	0.039 0±0.017 3	1.313±0.313	1.274 <sup>a</sup>	92.22 <sup>a</sup>
L	1.417±0.229	4.130±0.478	2.713 <sup>b</sup>	0.039 0±0.017 3	1.017±0.395	0.978 <sup>b</sup>	77.22 <sup>a</sup>
M	1.417±0.229	4.134±0.581	2.717 <sup>b</sup>	0.039 0±0.017 3	0.987±0.369	0.948 <sup>b</sup>	88.34 <sup>a</sup>
N	1.417±0.229	4.444±0.377	3.027 <sup>ab</sup>	0.039 0±0.017 3	1.311±0.312	1.272 <sup>a</sup>	90.00 <sup>a</sup>

注:1)K为投喂菲律宾蛤仔足肌+配饵组(CF+AF);L为投喂消毒菲律宾蛤仔足肌+配饵组(DCF+AF);M为投喂放射菲律宾蛤仔足肌+配饵组(RCF+AF);N为投喂配饵组(AF);2)上标字母不同者表示组间差异显著(P<0.05),相同者表示组间差异不显著(P>0.05)

Note: 1) Treatment K was fed with CF+AF; Treatment L was fed with DCF+AF; Treatment M was fed with RCF+AF; Treatment N was fed with AF; 2) The different superscript letters mean significant difference from each other (P<0.05). The same superscript letters mean no significant difference from each other (P>0.05)

1.571 cm, CF+AF 组在增重上与 DCF+AF、RCF+AF 组差异显著( $P < 0.05$ ), AF 组与其他 3 组差异不显著( $P > 0.05$ ); 在体长增长上 CF+AF 和 AF 组与其余两组差异显著( $P < 0.05$ ), 在对虾存活率上 CF+AF 组最高(92.22%), DCF+AF 组存活率最低(77.22%), 但是各组对虾存活率差异不显著( $P > 0.05$ )。

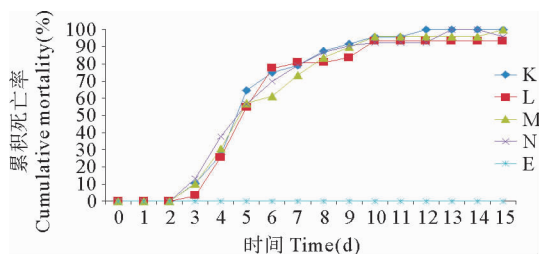
### 2.3 不同饵料组合对中国对虾幼虾人工感染累积死亡率的影响

图 2 为各饵料组对虾人工感染 WSSV 后的累积死亡率情况, 由图 2 可看出 4 条曲线在 3~7d 内都出现一个明显的死亡高峰。统计各组实验对虾累计死亡率, DCF+AF 组对虾累积死亡率最低, 为 93.55%, 其次为 RCF+AF 组, 最高为 CF+AF 与 AF 组, 累积死亡率达到 100%, 并且差异均不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.4 病毒检测结果

#### 2.4.1 巢式 PCR 检测结果

利用巢式 PCR 技术对人工感染后死亡的  $P_{60}$  样品检测, 部分检测样品见图 3, 4 个饵料组死亡对虾检测阳性率为 93.24%。



注: K: 菲律宾蛤仔足肌+配饵; L: 消毒菲律宾蛤仔足肌+配饵; M: 放射菲律宾蛤仔足肌+配饵; N: 配饵; E: 对照组

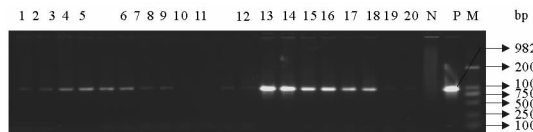
Notes: Treatments are represented by K: CF+AF; L: DCF+AF; M: RCF+AF; N: AF; E: Control

图 2 不同饵料组合下中国对虾人工感染 WSSV 后累积死亡率

Fig. 2 Accumulative mortality rate of *F. chinensis* fed with different diets

#### 2.4.2 TaqMan 定量 PCR 检测结果

利用含 69 bp 目的片段的质粒标准品构建 TaqMan 实时定量 PCR 的标准曲线, 根据图 4 可知:  $P_{10}$  时, 对照组(投喂 SA+AF 饵料组的仔虾) WSSV 携带量为  $13.93 \pm 3.64$  copies/ng DNA, 消毒饵料组(分别为投喂 SA+AF、SA+BP+AF、SA+BS+AF 及 SA+BP+BS+AF 饵料组的仔虾)病毒携带量为  $10.52 \pm 3.31$ 、 $19.13 \pm 7.25$ 、 $25.43 \pm 13.33$  及  $33.44 \pm 16.76$  copies/ng DNA, 对照组与消毒组对虾病毒携带量差异显著( $P < 0.05$ ), 消毒饵料组中, 摄食 SA+BP+AF、SA+BS+AF 及 SA+BP+BS+AF 仔虾 WSSV 携带量差异不显著( $P > 0.05$ ), SA

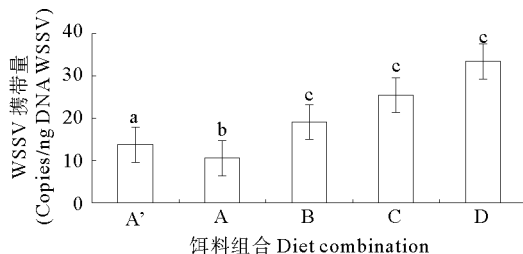


注: 1~5 为 K 组: 菲律宾蛤仔足肌+配饵组; 6~10 为 L 组: 消毒菲律宾蛤仔足肌+配饵组; 11~15 为 M 组: 辐照菲律宾蛤仔足肌+配饵组; 16~20 为 N 组: 配饵组; N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: Marker

Note: 1~5 denote treatment K fed with CF+AF; 6~10 denote treatment L fed with DCF+AF; 11~15 denote treatment M fed with RCF+AF; 16~20 denote treatment N fed with AF; N: Negative control; P: Positive control; M: DL 2000

图 3 人工感染 WSSV 实验部分样品的巢式 PCR 检测结果

Fig. 3 Nest PCR test of some of the *F. chinensis* samples infected by WSSV



注: 1) A' 组为对照组, A~D 组为消毒组; A'、A 组投喂单胞藻+配饵; B 组投喂单胞藻+轮虫+配饵; C 组投喂单胞藻+卤虫+配饵; D 组投喂单胞藻+卤虫+轮虫+配饵。2) 上标字母不同者表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: 1) Treatment A' is the control, Treatment A~D are the disinfected treatments; Treatment A' and A were fed with SA+AF; Treatment B was fed with SA+BP+AF; Treatment C was fed with SA+BS+AF; Treatment D was fed with SA+BS+BP+AF; 2) The different superscript letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

图 4 不同饵料组合下中国对虾仔虾 WSSV 携带量

Fig. 4 WSSV load of *F. chinensis* fed with different diets

+AF 与 SA+BP+AF、SA+BS+AF 及 SA+BP+BS+AF 仔虾 WSSV 携带量差异显著( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 不同饵料组合对中国对虾幼体变态发育的影响

投喂不同饵料组合的中国对虾各期苗种存活率差异很大,其中投喂 SA+AF 的饵料组的中国对虾在 Z 以后各期幼体存活率很低,与投喂其他饵料组幼体存活率差异极显著,这与朱丽岩等(2000)的研究结果一致,说明只投喂 SA 和 AF 不能保证对虾正常的变态发育。分析具体原因,一方面是水质问题,人工饵料易引起水质变坏。在实验期间,投喂 SA+AF 的对虾养殖水体混浊,造成水质污染,不利于苗种的正常发育,而用鲜活饵料不仅对水质污染程度极轻,而且能起到净化水质及优化水环境的作用,因此有利于对虾幼体的生长;另一方面,鲜活饵料的营养成分更能满足对虾幼体发育的需求,对虾 Z 以前对蛋白质需求量较小,依靠 SA 及 AF 等可满足发育需要,而 M 以后对虾对蛋白质需求量增加,因此投喂蛋白质含量高的动物性饵料可以使对虾获得更好的发育(张道波等 1996)。本研究中投喂 BP 组对虾的成活明显高于未投喂 BP 组,原因可能是 BP 体内含有较多的不饱和脂肪酸,使摄食组对虾各期幼体成活率较高(田宝军等 2007;张敏等 1996)。

在本研究中投喂饵料组合 SA+BP+AF 的  $P_{10}$  的体重明显小于投喂 SA+AF+BP+BS 的饵料组,这与 BS 蛋白质含量高、氨基酸组成成分与对虾氨基酸组成相近的特点是密切相关的(荣长宽等 2000);另外, BP 体积太小,适宜于 Z 与 M 摄食,不适合 P 的摄食,不能满足 P 对蛋白质的发育需求,而刚孵出的 BS 幼体,体长适中(0.3~0.48 mm),游泳能力弱, P 容易捕食,而且 BS 体内含有卵黄和其他营养物质,因此 BS 幼体很适合作为对虾苗种培育后期投喂的饵料。

#### 3.2 不同饵料处理组合对中国对虾生长及存活的影响( $P_{11}$ - $P_{60}$ )

本研究利用高锰酸钾及 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  辐照对中国对虾养殖中常用的饵料 CF 进行消毒处理,实验结果表明,投喂 CF+AF 饵料组合的对虾体重、体长增长与存活率最大,AF 次之,DCF+AF 与 RCF+AF 对虾的增长最小,表明 CF+AF 是对虾苗种培育前期的最佳饵料组合。摄食 4 种饵料组合的对虾生长指标低于实际养殖对虾的原因与养殖用水有关,经过次氯酸钠消毒和小体积养殖水体的都可对中国对虾的生长产生负面效果。分析投喂 CF+AF 与 AF 饵料组合对虾发育效果不同的原因,可能为饵料中氨基酸的含量与脂肪酸的含量都可影响中国对虾幼体的生长发育,与对虾体内营养组成成分相近的饵料可以使对虾获得好的生长效果(袁芳等 2000;荣长宽等 1994;任泽林等 1994),AF 不如 CF 营养丰富,而 CF 与对虾体内营养组成成分比较相近,因此造成摄食 CF+AF 饵料的对虾优于摄食 AF 组的对虾。摄食饵料组 DCF+AF 与 RCF+AF 的对虾生长效果最差,推测原因主要有以下三点:第一,两种饵料处理方式可能破坏 CF 的营养成分,高锰酸钾溶液可直接腐蚀肌肉组织,造成 CF 营养物质成分含量下降, $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照虽不可对动物组织的蛋白质、脂类等成分产生影响,但可造成组织维生素的破坏(钟爱华等 2004),而维生素可影响对虾的生长、存活率(程安玮等 2009;杜少波等 2002;罗莉等 2004);第二,经过两种饵料消毒方式处理的 CF 饵料在诱食性方面也不如未处理的 CF,高锰酸钾处理减弱了 CF 的鱼腥味, $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照 CF 可产生一种辐照味道(胡鹏等 2009),二者均可降低 CF 饵料的诱食性,减弱了幼虾摄食 CF 饵料的积极性;第三,经过两种消毒方式处理的 CF 饵料在养殖水体中更容易腐烂变质,对虾摄食剩余的 CF 饵料对水质的污染比较严重,以致幼虾生长效果最差。

#### 3.3 受精卵消毒不同饵料组合对中国对虾仔虾( $P_{10}$ ) WSSV 携带量的影响

防治对虾病毒病暴发的根本途径是切断病毒的传播途径,包括病毒的垂直与水平传播途径,目前 WSSV 的水平传播途径已经得到公认。研究人员通过对 WSSV 的调查和人工感染实验发现,WSSV 主要是通过经口摄食带毒的饵料生物而感染对虾(黄捷等 1995)。而对于 WSSV 在对虾中的垂直传播途径,一直以来还存在着争议。WSSV 具备在对虾中垂直传播的条件,WSSV 可能通过对虾生殖系统的感染而传播给子代,但受

到感染卵孵化出的无节幼体携带 WSSV 的证据不足,相关研究还有待进一步进行。

本研究中利用碘伏对中国对虾受精卵进行消毒,结果显示消毒组与对照组卵子孵化率与苗种各期变态率差异不显著,消毒组仔虾( $P_{10}$ )WSSV 携带量低于对照组,并且差异显著,表明利用碘伏消毒受精卵不影响对虾苗种的变态发育,并且消毒处理可以减弱 WSSV 可能存在的垂直传播。由于本研究方法可以降低对虾胚胎 WSSV 的携带量,不影响卵子的孵化率,苗种的培育生产工作可正常进行,而且脱毒药物来源广泛且毒性低。此种方法操作程序简单,适合应用于大规模生产(孔杰等 2005)。

轮虫与卤虫作为对虾培育中的重要饵料,在对虾苗种培育过程中至关重要。本研究对轮虫与卤虫样品进行定量 PCR 检测,结果表明二者都携带一定量的 WSSV,并且轮虫携带量低于卤虫携带量,这与宋晓玲等(2001)、邓灯等(2004)的研究结果基本一致。本研究中未投喂轮虫和卤虫的饵料培育的仔虾与投喂两种饵料的仔虾在 WSSV 携带量上差异显著,且前者携带量低于后者,在 WSSV 排除饵料以外的其他传播途径后,表明对虾摄食轮虫或者卤虫可能使自身带入 WSSV,这与邓灯等(2004)研究的卤虫可以携带有活性的 WSSV 病毒粒子,并可通过摄食导致对虾间接携带病毒研究结果一致。消毒组对虾摄食饵料组合 SA+AF 的 WSSV 携带量最低,可以为 SPF 对虾苗种或者高健康对虾苗培育中的饵料投喂提供一定的参考依据。

### 3.4 不同饵料处理对中国对虾 WSSV 人工感染存活率的影响

WSSV 人工感染结果表明,摄食 DCF+AF 饵料组的对虾存活率最高,其次为 RCF+AF 与 CF+AF 组,最后为 AF 组。其原因可能是中国对虾幼虾感染 WSSV 的存活率同其生长一样,与幼虾摄食饵料的营养成分及其组成有关,CF 的营养价值高于 AF,因此摄食 CF 组的对虾感染 WSSV 的存活率高于摄食 AF 组对虾。对虾摄食经过高锰酸钾与 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  处理的 CF 感染 WSSV 可以获得较高的存活率,原因可能为两种饵料处理方式都一定程度上破坏了 CF 内部的 WSSV,采用浓度为 20mg/L 高锰酸钾对 CF 进行消毒,不仅可以消除 CF 表面的病原微生物,还可能杀死 CF 内部的一些细菌病毒;利用剂量为 5kGy 的 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照消毒,可杀死 CF 内部 99.96% 以上的微生物(居华等 2009);或者是高锰酸钾消毒和 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照降解了 CF 内有关 WSSV 复制的核酸物质,导致 CF 携带的 WSSV 复制效率减慢,进而使 CF 保持一个较低的 WSSV 携带量水平。两种处理方式都可能降低了饵料的 WSSV 携带量,对虾摄食 WSSV 携带量低的饵料,从而可能获得较高的 WSSV 抵抗力。有关对虾 WSSV 携带量与其抗 WSSV 能力的相关性,已设计其他实验分析其相关机制。

## 4 结论

在中国对虾苗种培育过程中,虽然轮虫和卤虫是对虾培育过程中重要的饵料,但本研究结果表明,轮虫与卤虫都不可避免地造成 WSSV 的水平传播,致使摄食轮虫和卤虫的仔虾( $P_{10}$ )体内 WSSV 携带量增加,建议在生产中采用适合的消毒方式除去饵料携带的病毒或者开发其他营养成分类似但不携带病毒的饵料;经碘伏消毒的受精卵仔虾( $P_{10}$ )WSSV 携带量显著低于未经碘伏消毒的对虾,表明碘伏消毒对虾受精卵可降低仔虾 WSSV 的携带量,建议对虾养殖过程中对受精卵进行消毒处理,利用 WSSV 携带量尽量低的苗种进行培育,可降低对虾后期养殖过程中疾病暴发的几率。

## 参 考 文 献

- 孔杰,张庆文,柳学周,王伟继,刘萍,钟磊. 2005. 对虾胚胎白斑综合征病毒脱毒方法. 中国:发明专利,01107747
- 邓灯,刘萍,孔杰. 2004. 卤虫在 WSSV 病毒病传播中的媒介作用. 海洋水产研究, 25(5): 36-42
- 邓灯,张庆文,王伟继. 2005. 中国对虾几个产卵场群体携带白斑综合征病毒状况调查. 水产学报, 29(1): 74-78
- 田宝军,李英文,丁茜. 2007. 轮虫与卤虫在营养价值等方面的比较. 河北渔业, 12: 45-47
- 朱丽岩,郑家声,王梅林,祁自忠,徐怀恕. 2000. 不同饵料及添加剂对中国对虾幼体的影响. 海洋科学, 24(11): 41-44
- 任泽林,李爱杰,薛长湖. 1994. 中国对虾对必需脂肪酸的营养需求. 青岛海洋大学学报, 24(1): 24-32
- 杜少波,胡超群,沈琪. 2002. 亲虾营养需求研究进展. 热带海洋学报, 21(4): 80-91
- 李健,牟乃海,孙修涛,宋全山,王清印. 2001. 无特定病原中国对虾种群选育的研究. 海洋科学, 25(12): 30-33



- 宋晓玲,黄 捷. 2006. 无特定病原(SPF)对虾种群的选育及应用. 渔业现代化, 6: 42-47
- 宋晓玲,史成银,黄 捷,张立敬. 2001. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查. 中国水产科学, 8(4): 36-40
- 张印法,耿彦生,袁志助. 1994. 电离辐射灭菌研究进展. 中国公共卫生, 10(11): 522-523
- 张 敏,王瑞平,王渊源. 1996. 斑节对虾幼虾期对饲料不和脂肪酸的营养需求. 厦门水产学院学报, 18(2): 22-28
- 张道波,马 牲,王克行. 1996. 中国对虾蚤状及糠虾幼体的蛋白质需求量. 中国水产科学, 6(4): 117-118
- 林琼武,单宝堂,黄加琪. 2001. 不同饵料搭配对日本对虾人工育苗存活率的影响. 台湾海峡, 20: 44-49
- 罗 莉,周初霞. 2004. 中国对虾的营养需求. 水产饲料, 119/120(5/6): 22-25
- 周正宇,薛智谋. 2001. 实验动物饲料<sup>60</sup>Co $\gamma$ 辐射灭菌剂量的研究. 上海实验动物科学, 21(2): 100-103
- 居 华,王 锋,哈益明,刘书亮. 2009. 辐照控制菲律宾蛤仔中致病菌及其在贮藏期的生长情况. 核农学报, 23(1): 102-105
- 胡贤德,孙成波,丁树军,王 平,李义军,徐政生,李 婷,徐安敏. 2009. 不同饵料对斑节对虾幼体的生长及对 WSSV 敏感性的影响. 海洋与湖沼, 40(3): 296-301
- 荣长宽,梁素秀,岳炳宜. 1994. 中国对虾对 16 种饲料的蛋白质和氨基酸的消化率. 水产学报, 18(2): 131-137
- 胡 鹏,蔡荣宝,王文亮,杜方岭. 2009. 辐照肉及肉制品中“辐照味”的产生机理及预防措施. 中国食物与营养, 4: 28-31
- 钟爱华,李星云. 2004. 中国对虾亲虾与幼体的营养需要, 科学视野, 8(5): 78-80
- 袁 芳,许德春,孟丽芬,王成波,赵晓南,闫力军,赵 卓,王占菊,闫家仁,朴昌玉. 2000. 医用一次性输液器<sup>60</sup>Co $\gamma$ 灭菌的研究. 激光生物学报, 9(1): 61-64
- 黄 捷,于 佳,宋晓玲,杨丛海. 1995. 1994 年浙江省对虾暴发性流行病病原及传播途径的初步调查. 海洋水产研究, 16(1): 91-98
- 程安玮,杜方岭,徐同成,王成亮. 2009. 辐照对食品中营养成分的影响. 山东农业科学, 11: 57-60
- 潘鲁青. 1997. 几种消毒剂对中国对虾受精卵和无节幼体的影响研究. 海洋科学, 1: 7-9
- Canzonier WJ. 1971. Accumulation and elimination of coliphage S-13 by the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. Applied Microbiology 21(6): 1024-1031
- Chambédain GW, Lawrence AL. 1981. Maturation, reproduction and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. J World Mariculture Soc 12(1): 209-224
- Durand SV, Lightner DV. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. Fish Dis 25: 381-389
- Pruder GD. 1994. High health shrimp stocks: an advance, an opportunity but not a panacea. World Aquaculture 25(3): 26-28
- Wybany JA, Swing JS, Sweeney JN. 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. Proceeding of the Special Session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Bathon Rouge, Louisiana, 254-260