

不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响

董世瑞^{1,2}, 高 焕^{2,3}, 孔 杰², 王如才¹

(1. 中国海洋大学 生命与科学技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:采用4种饵料投喂中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)幼虾,用投喂感染的方法人工感染 WSSV。测定体长、体重以及各组的攻毒存活率,实验周期15 d。ANOVA 分析结果表明,投喂鲜活卤虫组体长、体重的增长明显优于其他各组,差异达极显著水平($P < 0.01$);投喂人工配合饵料实验组的体长、体重增长量最小;投喂鱼肉组体长增长慢于投喂蛤蜊肉组,而体重的增长快于投喂蛤蜊肉组,差异均不显著($P > 0.05$)。投喂卤虫成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蛤蜊肉两实验组,差异达极显著水平($P < 0.01$);投喂卤虫组和投喂鱼肉组之间存活率无显著差异($P > 0.05$),投喂人工配合饵料组和蛤蜊肉组差异不显著($P > 0.05$)。巢式 PCR 检测表明,人工感染前的中国对虾幼虾少数携带 WSSV,人工感染后全部个体检测到病毒特征片段。[中国水产科学, 2006, 13(1): 52-58]

关键词:中国对虾;饵料;人工感染;WSSV

中图分类号:S966 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0052-07

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国海水养殖的重要种类。1993年开始由于受到对虾暴发性流行病的影响造成虾群大规模死亡,严重影响了养殖业的持续发展。研究表明,中国对虾暴发性流行病是病毒性疾病,其病原为白斑综合症病毒(WSSV)^[1-3]。虽然对虾暴发性流行病的病原学、病理学、流行病学以及诊断学研究已深入到分子水平,但提高中国对虾产量,最终还要从生产实践着手,在养殖过程中找到切实可行的方法。本研究采用人工投喂毒饵的方法使中国对虾幼虾感染 WSSV,探讨不同饵料对中国对虾幼虾生长及抗病力的影响,并用巢式 PCR 检测感染效果,旨在科学选择饵料投喂,提高中国对虾幼虾对病害的免疫力,增加病毒感染后中国对虾的存活率,减少 WSSV 对生产造成的影响提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国对虾亲虾为山东海阳近海海捕雌虾,其幼体于海阳龙海育苗厂培育。毒饵为市购白斑明显的日本对虾(*Penaeus japonicus*),肌肉样品巢式 PCR

检测 WSSV 呈阳性。实验饵料为新鲜蛤蜊肉、鲜活卤虫成体、大乐牌人工配合饵料、新鲜黑鲱肉。

1.2 实验方法

1.2.1 幼虾攻毒实验 实验前运自山东海阳的中国对虾幼虾放入容量为 30 m³ 水泥池中暂养1个月。实验于黄海水产研究所即墨实验基地进行。实验幼虾为体长(3.09 ± 0.68) cm 的活泼健康个体。设置 A、B、C、D 共4组处理,每组3个平行。每平行12尾中国对虾个体,4组处理分别投喂 A:蛤蜊肉; B:鲜活卤虫成体; C:大乐牌人工配合饵料; D:新鲜黑鲱肉。另设4组人工感染对照组,每组12尾个体,分别投喂4种饵料。各实验组分别养殖于容量为 8 m³ 的育苗池中,养殖水体 6 m³。实验期间每天吸底1次,换水2次,每次换水 1/3-1/2 水体体积,保证水质清新。每天投喂6次,保持饵料充足。10 d后将各组幼虾分别置于 200 L 的塑料桶中饥饿8 h,然后将每尾幼虾分别单独置于 1 L 的小罐中,投喂毒饵,待其摄食后放回原池。对照组不投喂毒饵,其他处理相同。日常管理同前。15 d后结束实验。

1.2.2 体长与体重的测量及存活率计算

(1)存活率计算 各平行组存活率(R_s)计算公

收稿日期:2005-04-05; 修订日期:2005-05-24。

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2003AA603021);国家重点基础研究发展规划项目(G1999012007)。

作者简介:董世瑞(1973-),男,博士研究生,主要从事遗传育种研究。E-mail: dongsirui@163.com

通讯作者:孔 杰。Tel:0532-85823291。E-mail: hongjie@sinu.com

式为: $R_S = (N_F / N_B) \cdot 100\%$

式中, R_S 为存活率, N_F 为实验结束存活尾数, N_B 为攻毒尾数。

(2) 体长和体重测量 实验前后, 每组 12 尾个体各测量一次体长体重。体长测量从眼柄基部至尾脊末端, 体重用电子天平称量。

1.2.3 病毒检测 采用巢式 PCR 法。样品基因组 DNA 提取参照《分子克隆实验指南》^[4] 及刘萍等^[5] 的方法。PCR 反应体系 25 μL : 基因组 DNA 150 ng, 引物 15 μmol (内、外引物序列参照 Kimura 等^[6] 和孔杰等^[7]), $10 \times$ 缓冲液 2.5 μL , 50 pmol Mg^{2+} , 5 pmol dNTP, Taq DNA 聚合酶 1U。PCR 反应循环参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 反应产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。二次 PCR 使用的模板为第一次 PCR 产物 1 μL , 引物采用内引物, PCR 反应循环参

数相同, 每次反应均设阳性对照和阴性对照。两次 PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测, Gel Doc1000 紫外成像系统观察结果。毒饵取肌肉检测。实验前随机取样 30 尾检测中国对虾幼虾, 实验后检测全部实验幼虾个体。

1.2.4 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

2.1 投喂不同饵料对中国对虾幼虾体长、体重的影响

投喂实验设计的各种饵料对中国对虾幼虾的体长、体重影响见表 1。

表 1 不同饵料对体长、体重及存活率的影响 ($n = 12$)

Tab.1 Influence of different diets on length, weight and survival rate of each group ($n = 12$)

$\bar{X} \pm \text{SE}$

饵料 Diets	实验前 体长/cm Body length before experiment	实验后 体长/cm Body length after experiment	平均 增长/cm Body gain	实验前 体重/g Body weight before experiment	实验后 体重/g Body weight after experiment	平均 增重/g Weight gain	存活率/% Survival rate
A ₁	3.18 $\pm$ 0.435	3.80 $\pm$ 0.522	0.62 ^b	0.342 $\pm$ 0.326	0.659 $\pm$ 0.328	0.317 ^b	16.7 ^a
A ₂	3.14 $\pm$ 0.321	3.54 $\pm$ 0.333	0.40	0.314 $\pm$ 0.206	0.483 $\pm$ 0.152	0.169	8.3
A ₃	3.15 $\pm$ 0.236	3.59 $\pm$ 0.401	0.44	0.322 $\pm$ 0.325	0.566 $\pm$ 0.199	0.244	8.3
B ₁	3.20 $\pm$ 0.482	5.06 $\pm$ 0.777	1.86 ^a	0.349 $\pm$ 0.493	1.723 $\pm$ 0.630	1.374 ^a	75 ^a
B ₂	2.92 $\pm$ 0.529	4.89 $\pm$ 0.753	1.97	0.297 $\pm$ 0.486	1.537 $\pm$ 0.641	1.240	83.3
B ₃	2.96 $\pm$ 0.388	4.81 $\pm$ 0.601	1.88	0.310 $\pm$ 0.355	1.453 $\pm$ 0.524	1.143	83.3
C ₁	3.21 $\pm$ 0.149	3.49 $\pm$ 0.458	0.28 ^c	0.352 $\pm$ 0.268	0.521 $\pm$ 0.276	0.169 ^b	8.3 ^b
C ₂	3.06 $\pm$ 0.352	3.38 $\pm$ 0.463	0.32	0.312 $\pm$ 0.335	0.481 $\pm$ 0.261	0.169	0
C ₃	3.18 $\pm$ 0.403	3.40 $\pm$ 0.498	0.22	0.348 $\pm$ 0.353	0.453 $\pm$ 0.210	0.105	8.3
D ₁	2.98 $\pm$ 0.313	3.38 $\pm$ 0.230	0.40 ^{bc}	0.313 $\pm$ 0.412	0.676 $\pm$ 0.697	0.363 ^b	83.3 ^a
D ₂	3.23 $\pm$ 0.427	3.51 $\pm$ 0.298	0.28	0.355 $\pm$ 0.361	0.743 $\pm$ 0.520	0.388	75.0
D ₃	3.21 $\pm$ 0.397	3.63 $\pm$ 0.418	0.42	0.358 $\pm$ 0.311	0.587 $\pm$ 0.486	0.229	91.7
E _A	3.16 $\pm$ 0.335	3.66 $\pm$ 0.272	0.60	0.332 $\pm$ 0.413	0.593 $\pm$ 0.312	0.261	100
E _B	3.18 $\pm$ 0.615	4.88 $\pm$ 0.735	1.70	0.326 $\pm$ 0.577	1.613 $\pm$ 0.681	1.287	100
E _C	3.13 $\pm$ 0.433	3.44 $\pm$ 0.459	0.29	0.324 $\pm$ 0.419	0.485 $\pm$ 0.416	0.161	91.7
E _D	3.19 $\pm$ 0.235	3.51 $\pm$ 0.331	0.36	0.343 $\pm$ 0.412	0.647 $\pm$ 0.294	0.304	100

注: 1) A₁: 投喂蛤蜊肉组; B₁: 投喂鲜活青虾肉组; C₁: 投喂人工配合饲料组; D₁: 投喂鱼肉组。

2) A₁, A₂, A₃, ……下标表示各平行实验组。

3) E_A, E_B, E_C, E_D 为各对照组。

4) 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 ($P < 0.05$)。

Notes: 1) A₁: Group fed on clam; B₁: Group fed on Artemia; C₁: Group fed on artificial feed; D₁: Group fed on fish.

2) A₁, A₂, A₃, ……suffix denotes each parallel group.

3) E_A, E_B, E_C, E_D denote control for each treatment, respectively.

4) Different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$) between the groups and the same superscripts mean insignificant difference ($P > 0.05$).

表1结果显示,不同饵料对中国对虾幼虾体长、体重增长有明显影响。投喂鲜活卤虫成体组体长增长最大,与其他各组差异极显著($P<0.01$)。投喂蛤蜊肉组与投喂人工配合饵料组体长增长差异显著($P<0.05$),与投喂鱼肉组无显著差异($P>0.05$)。投喂人工配合饵料组体长增长最小,但与投喂鱼肉组无显著差异,与其他两组差异显著($P<0.05$)。投喂鲜活卤虫成体组体重的增长与其他各组差异极显著($P<0.01$),其余各组间体重增长差异均不显著($P>0.05$)。

2.2 投喂不同饵料对中国对虾幼虾攻毒存活率的影响

投喂不同饵料对攻毒存活率的影响见表1和图1。投喂蛤蜊肉组和人工配合饵料组的存活率较低,

在0~16.7%之间,投喂鲜活卤虫成体组和鱼肉组的存活率在75%~91.7%之间,显著高于投喂蛤蜊肉组和人工配合饵料组($P<0.01$),投喂鱼肉组和投喂鲜活卤虫成体组之间的存活率无显著差异,投喂人工饵料组与蛤蜊肉组之间的存活率差异也不显著($P>0.05$)。

2.3 投喂不同饵料对中国对虾幼虾人工感染累积死亡率影响

图2显示,除对照组外,各处理组在人工投喂感染后经历一段潜伏期,在第4天出现个体的死亡,死亡数在短期内迅速上升,最后趋于平稳。投喂人工配合饵料对照组在投喂毒饵后第2天有1尾死亡,其余各对照组无死亡。

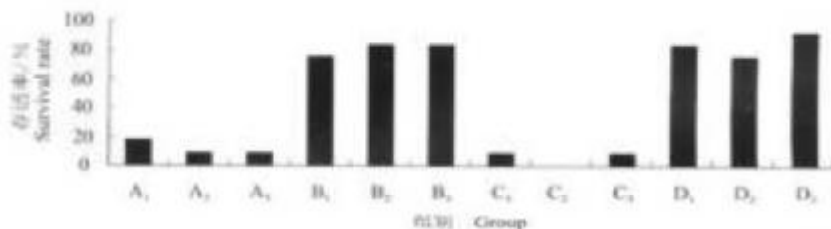


图1 不同饵料投喂中国对虾幼虾各平行组的存活率

注:1)A₁:投喂蛤蜊肉组;B₁:投喂鲜活卤虫成体组;C₁:投喂人工配合饵料组;D₁:投喂鱼肉组。

2)A₁, A₂, A₃……下标表示各平行实验组。

3)E_A, E_B, E_C, E_D为各对照组。

Fig.1 Survival rate of each parallel group feeding on different feeds

Note:1) A₁ Group fed on clam; B₁ Group fed on Artemia; C₁ Group fed on artificial feed; D₁ Group fed on fish.

2) A₁, A₂, A₃……suffix denotes each parallel group.

3) E_A, E_B, E_C, E_D denote control group for each treatment, respectively.

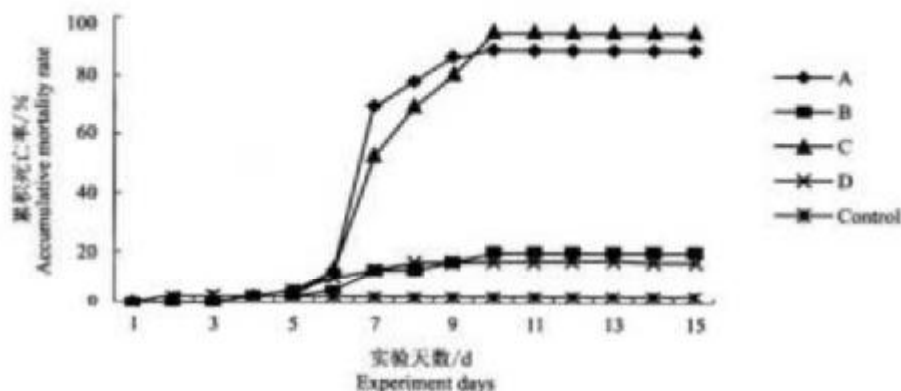


图2 投喂不同饵料中国对虾幼虾的累积死亡率

注:A—投喂蛤蜊肉组;B—投喂鲜活卤虫成体组;C—投喂人工配合饵料组;D—投喂鱼肉组。

Fig.2 Accumulative mortality rate of each group feeding on different feeds

Note: A—Group fed on clam; B—Group fed on Artemia; C—Group fed on artificial feed; D—Group fed on fish.

2.4 巢式 PCR 检测病毒结果

攻毒前随机选取 30 尾中国对虾幼虾,巢式 PCR 检测显示 3 尾呈 WSSV 阳性,阳性率为 10%。实验结束后,死亡个体及未死亡个体巢式 PCR 检测

均呈 WSSV 阳性。攻毒对照组的阳性率为 6.3%。作为毒饵的日本对虾肌肉巢式 PCR 检测阳性率为 100%。病毒检测结果见表 2 和图 3。

表 2 检测对象的个体数及 WSSV 阳性率

Tab.2 Number of tested object and the infected rate

检测项目 Tested object	毒饵 Virulent diet	攻毒前取样幼虾 Shrimp before infected	实验组 Trial				对照组 Control
			A	B	C	D	
<i>n</i>	26	30	36	36	36	36	48
阳性率/% Positive rate	100	10	100	100	100	100	6.3

注:A:投喂蛤蜊肉组;B:投喂鲜活卤虫成体组;C:投喂人工配合饵料组;D:投喂鱼肉组。

Notes: A: Group fed on clam; B: Group fed on Artemia; C: Group fed on artificial feed; D: Group fed on fish.

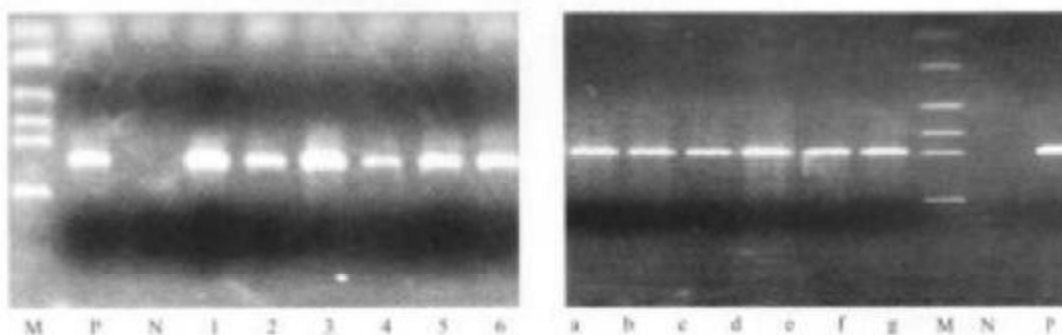


图 3 巢式 PCR 扩增条带

注:M,P,N 分别为 marker,阳性对照和阴性对照;1-6 为部分个体第一次扩增结果;a-f 为部分个体二次扩增结果。

Fig.3 Demonstration of nest-PCR

Note: M,P,N denote marker, positive control and negative control, respectively; 1-6 denote amplification of the first time; a-f denote amplification of the second time

3 讨论

3.1 饵料选择

卤虫、鱼肉、蛤蜊肉、人工配合饵料是中国对虾育苗及养成中常用的饵料。研究表明,投喂鲜活卤虫成体的生长效果最好,在相同时间内能使中国对虾幼虾获得比其他 3 种饵料更大的体长、体重生长量。相比较而言,投喂人工配合饵料的中国对虾幼虾体长、体重增长效果最差。本研究其他环境条件相同,4 种饵料的营养成分差异是影响幼虾的主要因素。荣长宽等^[8]比较了中国对虾对 16 种饲料的消化率,发现卤虫与虾体的十种必须氨基酸含量最相近。本研究中投喂鲜活卤虫成体组的生长量最大,这与卤虫的氨基酸组成与虾体相近是密不可分的。此外,4 种实验饵料的脂肪酸组成也会影响

中国对虾幼虾的生长。任泽林等^[9]研究了中国对虾的增长率、增重率、存活率变动与 4 种必须脂肪酸的关系,表明不同脂肪酸对中国对虾有不同的影响。研究还表明不同脂肪酸^[10-13]、维生素^[14-16]都会对中国对虾的生长发育造成影响。可见中国对虾幼虾的生长是受各种营养因素的影响,故本研究中设计投喂不同饵料。要探究这 4 种饵料如何影响对虾的生长,必须深入分析各饵料的成分。投喂蛤蜊肉组体长增长大于投喂鱼肉组,而体重增长小于投喂鱼肉组。这可能是由中国对虾幼虾体长和体重的增长机制不同造成的。实验中发现,虽然投喂鱼肉组的中国对虾幼虾生长效果要好于投喂人工配合饵料组,但幼虾对两者的摄食均不积极,原因可能是两者的适口性较差。因此选择饵料时除了要合理搭配各种营养成分外,提高饵料的适口性也是应该考虑的

重要因素。生产中对饵料的选择还受到经济效益的制约。虽然本研究表明投喂卤虫的生长效果最好,但其成本也是最高的,因此还要综合考虑投入与产出的比例来选择饵料。

3.2 中国对虾人工感染 WSSV 及幼虾感染存活率

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。此结果与黄健^[17]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^[18-21]证实,中国对虾感染 WSSV 的主要途径是经口传播。刘萍等^[22-23]对中国对虾卵、幼体及仔虾进行人工感染的报道证实了投喂感染方法的可行性。Chou^[24]等报道,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^[17]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,在感染对虾中未找到 WSSV 特有的组织病理病变。何建国等^[21]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 48 h 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。因此进行中国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,通过投喂的方法对中国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。

ANOVA 分析表明,投喂蛤蚧肉组和投喂人工配合饵料组存活率要显著低于投喂鲜活卤虫成体组及投喂鱼肉组;虽然投喂蛤蚧肉组在生长方面明显优于投喂人工配合饵料组,但是人工感染 WSSV 后的存活率却与投喂人工配合饵料组相似,都显著低于投喂鲜活卤虫成体组及投喂鱼肉组;投喂鱼肉组中国对虾幼虾虽然生长显著慢于投喂鲜活卤虫成体组,但人工感染 WSSV 的存活率却无明显差异,甚至要高于投喂鲜活卤虫成体组。此结果表明,中国对虾幼虾感染 WSSV 的存活率同其生长一样,与饵料的营养成分及其组成有关。

3.3 WSSV 检测及中国对虾幼虾抗病力

传统的 WSSV 诊断方法以病理学检测和生物诊断法为主。免疫学方法^[25-27]、斑点杂交法^[28-31]和原位杂交法^[32-33]都可检测到 WSSV,但以 PCR

为基础的检测方法^[34-39]以其简便快捷得到了广泛应用。本研究采用巢式 PCR 快速检测 WSSV 的存在,并且其灵敏度也极高。攻毒之前取样检测对虾幼虾个体,巢式 PCR 检测部分个体呈阳性,无明显患病体征,个体没有死亡。投喂毒饵未死亡的个体,巢式 PCR 检测呈阳性。这一结果表明中国对虾幼虾对 WSSV 有耐受性,病毒粒子的感染并不必然引起对虾的死亡,合理选择饵料,可以增强中国对虾对 WSSV 的耐受性。取样幼虾中检测到阳性个体,可能是由于幼虾发育过程中感染了病毒。对照组中死亡个体巢式 PCR 检测呈 WSSV 阴性,可能是由于实验操作的物理伤害所致。

3.4 中国对虾抗病力与饲料营养成分的关系

与脊椎动物特异性免疫反应不同,甲壳类没有产生免疫球蛋白的免疫反应。但对虾体内存在众多的抗病因子(如各种水解酶类、氧化酶类、溶菌酶、酶激活剂、酶抑制剂、细胞因子、抗菌肽、溶血素、凝集素等),它们具有相当的抗病能力^[40]。SONG 等^[41]在虾苗培育期用 β -1,3 葡聚糖浸泡而在养殖期在饲料中添加 β -1,3 葡聚糖使斑节对虾对 WSSV 的抵抗力增强。汪小锋等^[42]研究表明, β -葡聚糖和脂多糖主要是通过刺激中国对虾大颗粒细胞内糙面内质网的大量增生,以大幅度提高酚氧化酶的产量,从而提高对虾自身免疫力的。本实验不同饵料投喂的中国对虾抗病力的差异除与饵料不同营养构成造成的对虾体质的不同外,是否与不同饵料对中国对虾的抗病因子的不同作用方式有关,尚需要进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 孔杰,石拓,刘萍,等.中国对虾一种C型杆状病毒的纯化技术及形态特征研究[J].海洋与湖沼,1997,28(3):233-237.
- [2] 李华,邢殿楼,马悦欣,等.1993年中国对虾暴发性流行病原初步研究[J].大连水产学院学报,1994,9(4):74-79.
- [3] 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.
- [4] 萨姆布克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1992.463-472.
- [5] 刘萍,孔杰,石拓,等.中国对虾黄,渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J].海洋学报,2000,5(22):88-93.
- [6] Kimura T, Yamano K, Nakano H, et al. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR[J]. Fish Pathology, 1996,31:93-98.

- [7] 孔杰,刘萍,石拓,等.中国对虾杆状病毒一个 DNA 片段序列测定[J].海洋学报,2003,25(S2):186-189.
- [8] 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.
- [9] 任泽林,李爱杰,薛长刚.中国对虾对必需脂肪酸的营养需求[J].青岛海洋大学学报,1994,24(1):24-32.
- [10] 季文娟,徐学良.中国对虾(*Penaeus orientalis* Kishinouye)的几种必需脂肪酸营养价值的比较研究[J].中国水产科学,1994,1(1):1-9.
- [11] 季文娟.野生及人工养殖的中国对虾(*Penaeus chinensis*)的脂肪酸组成的分析及比较研究[J].中国水产科学,1996,3(1):16-20.
- [12] 季文娟.中国对虾(*Penaeus chinensis*)幼体发育各阶段脂肪酸组成的研究[J].中国水产科学,1996,3(4):28-34.
- [13] 季文娟.高度不饱和脂肪酸对中国对虾幼体的产卵和卵质的影响[J].水产学报,1998,22(3):240-246.
- [14] 徐志昌,刘铁斌,雷清新,等.中国对虾(*Penaeus chinensis*)维生素营养的研究——V.中国对虾维生素 C 营养[J].青岛海洋大学学报,1994,24(3):364-372.
- [15] 陈四清,李爱杰.中国对虾维生素营养的研究: I. 维生素 A 对中国对虾生长及视觉器官的影响[J].动物学报,1994,40(3):266-274.
- [16] 王安利,母学全,凌利英.中国对虾配合饲料中维生素 C 添加量的研究[J].海洋与湖泊,1996,27(4):368-372.
- [17] 黄健,蔡生力,宋晓玲,等.对虾爆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.
- [18] 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幼虾的人工感染[J].水产学报,1996,20(4):374-378.
- [19] 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.
- [20] 蔡生力,黄健,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.
- [21] 何建国,周化民,姚伯,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.
- [22] 刘萍,孔杰,李健.白斑综合症病毒(WSSV)对中国对虾卵及各期幼体人工感染的试验研究[J].海洋水产研究,2001,22(1):1-6.
- [23] 刘萍,孔杰,李健,等.爆发性流行病病原对中国对虾仔虾的人工感染实验研究[J].海洋科学,1998(1):1-4.
- [24] Chou H Y, Huang C Y, Co C F. Studies on transmission of WSSV in *P. monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion [J]. Aquaculture, 1998, 164:263-276.
- [25] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriamintara S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *P. monodon* [J]. Dis Aquat Org, 1995, 21:69-77.
- [26] 战文斌,王远红,竹本信一,等.白斑病毒在日本对虾体内的感染增殖[J].水产学报,1999,23(3):278-282.
- [27] 徐小林,钟江,高双成,等.中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法[J].水产学报,1995,19(4):315-321.
- [28] 雷质文,史成银,黄健,等. PCR 法制备地高辛标记探针直接杂交检测白斑综合症病毒(WSSV) [J]. 青岛海洋大学学报,2001,31(2):201-210.
- [29] 雷质文,黄健,杨冰,等.感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J].中国水产科学,2001,8(4):46-51.
- [30] 宋晓玲,史成银,黄健,等.用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饲料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查[J].中国水产科学,2001,8(4):36-40.
- [31] 雷质文,黄健,史成银,等.白斑综合症病毒(WSSV)的宿主调查[J].海洋与湖泊,2002,33(3):250-258.
- [32] Wang C S, Tsai Y J, Chen S N. Detection of white spot baculovirus infection in shrimp using in situ hybridization [J]. J Invertebr Pathol, 1998, 72:170-173.
- [33] Chung P S, Chen H C, Wang Y C. Detection of WSSV in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization [J]. Aquaculture, 1998, 164:233-242.
- [34] 谢敬涛,何建国,杨晓明.套式 PCR 检测斑节对虾白斑病毒[J].青岛海洋大学学报,2001,31(2):220-224.
- [35] 战文斌,邢婧,王远红.聚合酶链反应(PCR)检测养殖对虾的白斑病毒(WSSV)感染[J].中国水产科学,2000,7(1):51-54.
- [36] 闫冬春,董双林,黄健,等. PCR 核酸探针斑点杂交法检测斑节白斑综合症病毒(WSSV) [J]. 高技术通讯,2004,3:33-36.
- [37] Takahashi Y, Itami T, Maeda M, et al. PCR amplification of RV-PJ in *P. japonicus* and SEMBV DNA in *P. monodon* Fabricius [J]. J Fish Dis, 1996, 19:399-403.
- [38] Maeda M, Itami T, Furumoto A, et al. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans [J]. Fish Pathology, 1998, 33(4):371-380.
- [39] Lo C F, Ho C H, Peng S F, et al. WSBV detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. Dis Aquat Org, 1996, 27:215-225.
- [40] Söderhäll K. Invertebrate immunity [J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(4-5):263-266.
- [41] SONG Y L, LIU J J, CHAN L C, et al. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Dev Biol Stand, 1997, 90: 413-421.
- [42] 汪小伟,樊廷俊,从江山,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.

Effects of diets on growth of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and survival rate from WSSV

DONG Shi-rui^{1,2}, GAO Huan^{2,3}, KONG Jie², WANG Ru-cui¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is one of the leading cultural species in China. But shrimp farming is currently threatened by pathogen, such as virus, bacteria, et al, among which the white spot syndrome virus (WSSV) is the most serious. The efficient method to avoid or diminish the influence of the virus may lie on the diet, as evidences have revealed the main way that the WSSV spread in Chinese shrimp was caused by food. This study was initiated to assess the effects of four diets on Chinese shrimp. Those four tested diets were assigned into four treatment groups. Four repetitions were made for each diet treatment with 12 individuals in each repetition, including the control groups. The body length as well as the body weight were measured before and after the experiment. The livabilities were also calculated when the shrimp were challenged with WSSV by oral infection in indoor tanks. Total genomic DNA was extracted from the muscle tissue. The characteristic phrase of the virus was detected by nest-PCR. PCR was performed in a 25 μ L reaction. The reaction in each case consisted of 150 ng genomic DNA, 2.5 μ L buffer, 50 pmol Mg^{2+} , 5 pmol dNTPs, 1.0 U *Taq* DNA polymerase. The results showed that the gain of body weight and length of the shrimp fed on artemia were significantly higher than those of the other groups ($P < 0.01$). The shrimp fed on artificial feed had the least gain, and showed significant difference with the shrimp fed on fish and clam in body weight ($P < 0.05$), but no significant difference with the one fed on fish in body length ($P > 0.05$). The survival rate of the shrimp fed on artemia and fish was significantly higher than those of the groups fed on artificial feed and clam ($P < 0.05$). Nest-PCR showed few individuals were infected by WSSV before the experiment and all were detected to have the characteristic phrase after the experiment except the ones in the control group. These results demonstrated that the gains of body length and weight were different for the four diets, and the cause lay on the distinct components of the four diets, which affected the livabilities. The oral infection was thought to be the best and the most effective way when shrimp were challenged by WSSV and the shrimp possessed the ability of immune responses in resistance against WSSV. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 52–58]

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; diets; artificial infection; WSSV

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@sina.com