

文章编号: 1674-5566(2017)06-0853-09

DOI:10.12024/jsou.20170402024

池养罗氏沼虾生长缓慢原因初步分析

周俊名¹, 戴习林¹, 蒋飞², 丁福江²

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海申漕特种水产开发公司, 上海 201516)

摘要: 通过调查分析池养罗氏沼虾的生长状况、主要病原感染情况、遗传多样性、水质以及感染 WSSV 罗氏沼虾生长存活试验, 探讨池养罗氏沼虾生长缓慢原因。结果表明: 2016 年生长正常与生长欠佳两类池塘平均有效等位基因介于 0.632 2~0.687 2 之间, 平均多态信息含量介于 0.583 1~0.635 4 之间, 属于高度多态性, 两种生长类型池塘罗氏沼虾各遗传参数指标和水质指标间均无显著性差异 ($P > 0.05$); 生长正常池塘罗氏沼虾在养殖 50、100 和 150 d, 体长、体质量等指标均显著高于生长欠佳池塘罗氏沼虾 ($P < 0.05$), EHP、WSSV 和 IHNV 阳性检出率均显著低于生长欠佳池塘 ($P < 0.05$), 养殖 220 d, 两类池塘各生长状况指标无显著性差异 ($P > 0.05$), 两类池塘沼虾携带上述病原的阳性检出率显著高于前 3 次检疫结果 ($P < 0.05$), 同时生长正常池塘阳性检出率更高, 雄虾数量更少, 与 2014、2015 年调查塘干塘起捕前结果类似; 人工感染 WSSV 罗氏沼虾, 感染 15、30 和 45 d, 各浓度组生长状况指标存在显著性差异 ($P < 0.05$), 各生长状况指标均随着感染浓度的上升逐步降低。据此结合养殖中后期每隔 10 d 左右捕大留小的生产工艺, 认为水质、种质差异或退化引起池塘罗氏沼虾生长缓慢可能性很小, 而感染特定病原引起罗氏沼虾生长缓慢的可能性较大, 且感染特定病原对雄虾生长的影响可能大于雌虾。

关键词: 罗氏沼虾; 病原检测; 遗传多样性分析; 生长缓慢; 白斑综合征病毒

中图分类号: S 966.1 **文献标志码:** A

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 具有个体大、肉质好、生长快、易于养殖等优点, 是目前我国重要的养殖虾类^[1]。经过多年累代人工繁育与养殖, 病害增多、个体小型化、生长缓慢、性成熟时间提前、抗病能力下降等可称之为种质退化的现象日渐突出^[2-6], 尤其是近几年池养罗氏沼虾生长缓慢现象连续多年大面积发生, 严重影响了沼虾的养殖生产。引起虾类生长缓慢的原因很多, 已有较多文献报道过种质、水质、密度、病害等影响虾类生长: 黎东^[7]认为水中重金属离子抑制罗氏沼虾的生长; 戴习林等^[8]认为罗氏沼虾生长与养殖密度密切相关; 刘珍等^[9]认为 EHP 引起对虾生长缓慢; 朱凝瑜等^[10]认为 IHNV 造成对虾慢性矮小残缺综合症; 刘宝彬等^[11]认为 EHP、IHNV 能导致对虾生长缓慢。众多虾类疾病中, 由白斑综合征病毒 (WSSV)、虾肝肠胞虫

(EHP)、传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHNV)、诺达病毒 (MrNV) 和桃拉病毒 (TSV) 病原引起的疾病不仅影响存活, 也影响生长, 严重地制约着对虾养殖业的进一步发展, 也可能影响罗氏沼虾的养殖^[12-19]。另外, CHAREONTAWEE 等^[20]采用 SSR 标记分析了泰国养殖和野生群体遗传多样性, 认为养殖群体和野生群体具有相似的相对较高的遗传变异, 池养罗氏沼虾的生长表现不应归于遗传变异和近亲繁殖。本文通过调查分析池养罗氏沼虾的生长状况、主要病原感染情况、遗传多样性、水质以及感染 WSSV 对罗氏沼虾生长存活试验, 探讨池养罗氏沼虾生长缓慢的原因, 为防止池养罗氏沼虾生长缓慢与健康养殖和繁育提供对策和参考依据。

收稿日期: 2017-04-14 修回日期: 2017-05-18

基金项目: 上海市虾类产业技术体系建设项目 (沪农科产字[2014]第 5 号)

作者简介: 周俊名 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: 13122351991@163.com

通信作者: 戴习林, E-mail: xldai@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 样品采集

2016年3月,依据亲虾苗种检测情况在江苏高邮选取虾苗,虾苗分别来源于4家育苗场的12口塘(表1),在养殖50、100、150 d以及220 d后,撒网或者拉网随机采集沼虾样30~60尾,采水器采集表层底层混合水为该池塘水样,其中部分塘养至200 d左右干塘收虾,虾样品为干塘虾。所有池塘均在养殖至120~130 d期间开始捕大留小销售,后每隔10 d左右轮捕一次,直至9月末

10月初干塘收虾,最后依据生长状况和产量将采样塘分为生长正常池塘和生长欠佳池塘两种类型。2014年7月至2015年10月期间,依据养殖期间的生长表现分别对上海、江苏两地养殖中期或干塘收虾前5天的生长正常和生长欠佳池塘采集虾样和水样用于调查分析。沼虾体长采用直尺(0.1 cm)测量,电子天平(225 D,0.01 g)逐尾称量体质量,现场按常用实验动物解剖病理取材标准^[21]解剖获取鳃、肝胰腺、肌肉分别保存于RNAlater保存液和无水乙醇中,实验室-80℃保存。

表1 2016年生长状况调查塘概况
Tab.1 The general situation of survey of ponds in growth in 2016

苗种来源 Breeding source	亲虾或虾苗病原检测 Pathogen detection of broods stock and shrimp seeds	池塘面积/hm ² Area	放苗日期 Date	养殖密度/(尾/hm ²) Culture density	生长状况 Growth status
A11	阴性	1.42	3月3日	11.40 × 10 ⁴	正常
A12	阴性	1.27	3月2日	11.10 × 10 ⁴	正常
A13	阴性	1.40	3月5日	10.95 × 10 ⁴	正常
B11	阴性	1.15	3月8日	11.40 × 10 ⁴	正常
B12	阴性	1.95	3月5日	10.80 × 10 ⁴	正常
B13	阴性	1.67	3月2日	11.40 × 10 ⁴	正常
C11	阳性	1.67	3月5日	10.95 × 10 ⁴	欠佳
C12	阳性	1.67	3月2日	10.50 × 10 ⁴	欠佳
C13	阳性	1.20	3月5日	10.80 × 10 ⁴	欠佳
D11	阳性	1.29	3月7日	11.25 × 10 ⁴	欠佳
D12	阳性	1.30	3月2日	11.10 × 10 ⁴	欠佳
D13	阳性	1.40	3月3日	10.50 × 10 ⁴	欠佳

1.2 人工感染 WSSV 试验

1.2.1 实验用虾

感染用罗氏沼虾来源于经两次检疫 WSSV、IHHNV、EHP、TSV、MrNV 为阴性结果的上海申漕水产开发公司的池塘养殖虾,暂养于室内水泥池7 d,剔除极大极小个体,作为实验用虾,体长(6.76 ± 0.28) cm,体质量(9.63 ± 0.43) g。

1.2.2 实验用水槽

试验用水槽为78 cm × 58 cm × 47 cm的蓝色塑料箱。

1.2.3 WSSV 病毒精提液稀释

WSSV 病毒精提液病毒粒子来源于上海海洋大学食品学院,原浓度 1 × 10⁷ copy/μL, -80℃保存,感染前将病毒原液在冰上解冻,用预冷的无菌生理盐水将浓度分别稀释为 5 × 10⁴ copy/μL, 1 × 10⁴ copy/μL, 5 × 10³ copy/μL, 1 × 10³ copy/μL, 5 × 10² copy/μL 和 1 × 10² copy/μL。

1.2.4 感染实验

实验组为6个注射浓度组,按设定浓度分别在腹部第二腹节基部肌肉注射病毒液0.2 mL 感染 WSSV,对照组虾同法注射0.2 mL 的生理盐水,不注射为空白组,每组均设4个重复,每个水槽10尾虾。期间每天投配合饲料4次,占体质量的6%~8%,每天排污并换水10%,水温(26.0 ± 1.0)℃,pH为8.0 ± 0.2,连续充气增氧。每天检查记录实验虾存活状况,分别于养殖实验15 d、30 d和45 d,测量体长和体质量,45 d采集虾样品。

1.3 提取 DNA 和 RNA

DNA 提取:取保存于无水乙醇中的肝胰腺和肌肉组织约20 mg,依据海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)操作方法提取样品肝胰腺和肌肉组织总DNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA条带完整性,-20℃

保存。

RNA 提取:取保存于 RNAlater 保存液中的鳃组织约 20 mg,依据 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取样品鳃组织总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带完整性,核酸蛋白测定仪检测 RNA 吸光度, -80 °C 保存。

1.4 病原检测

EHP、IHHNV 采用巢氏 PCR 扩增, WSSV 采用荧光定量 PCR 扩增, TSV、MrNV 采用普通 PCR 扩增。EHP 引物来源于东海水产研究所^[22], 其余引物均为本实验室开发设计,均由上海生物工程技术有限公司合成。用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物电泳分离,逐尾检测病原。

1.5 遗传多样性分析

参照文献^[23]选取 25 对微卫星引物,分别对不同生长表现类型的池塘样品进行 PCR 扩增,每口池塘样本数 30 尾,用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶对 PCR 扩增产物电泳分离,经银染后,用扫描仪扫描成像。

1.6 水质分析

参考国家环境保护总局水和废水监测分析方法^[24]测定 DO、pH、总氮氮(TAN)、硝基氮(NO₃⁻-N)、亚硝基氮(NO₂⁻-N)、活性磷(PO₄³⁻-P)和化学需氧量(COD)等水质指标。

1.7 数据处理

采用 Excel 2010、SPSS 17.0 对实验数据进行整理, *t* 检验、方差分析处理数据, Duncan 氏法均值得多重比较, *P* < 0.05 表示存在显著性差异,数据以平均值 ± 标准差 (Mean ± SE) 表示。利用 Gelpro analyzer 4.5 对微卫星标记数据进行读取校正,采用 PopGene 3.2、Cervus 进行遗传参数分析。特定增长率、肥满度、多态信息含量、有效等位基因数、期望杂合度的计算公式如下:

$$S_{GR} = [(\ln W_t - \ln W_1) / t] \times 100\% \quad (1)$$

式中: *S_{GR}* 为特定增长率 (%); *t* 为养殖时间 (d); *W_t* 和 *W₁* 分别为第 *t* 天罗氏沼虾体质量和初始体质量 (g)。

$$C_F = W_t / L_t^3 \times 100\% \quad (2)$$

式中: *C_F* 为肥满度 (g/cm³); *W_t* 为第 *t* 天罗氏沼虾体质量 (g); *L_t* 为第 *t* 天罗氏沼虾的平均体长 (cm)。

$$P_{IC} = 1 - (\sum_{i=1}^n P_i^2) - (\sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n P_i^2 P_j^2) \quad (3)$$

式中: *P_{IC}* 为多态信息含量; *P_i*、*P_j* 分别为第 *i* 个和第 *j* 个等位基因在群体中的频率; *n* 为某一位点上等位基因数。

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (4)$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (5)$$

式中: *N_e* 为有效等位基因; *H_e* 为期望杂合度; *P_i* 为第 *i* 个等位基因在群体中的频率; *n* 为某一位点上等位基因数。

2 结果

2.1 池养罗氏沼虾生长状况调查塘养殖效果

表 2 与表 3 分别是 2016 年罗氏沼虾生长状况调查塘养殖期间的部分水质指标和养殖结果。6 口生长正常池塘和 6 口生长欠佳池塘样本数均为 180 尾。表 2 水质数据表明,两类生长状况养殖塘水质指标间均不存在显著性差异 (*P* > 0.05)。由表 3 知养殖 50 d、100 d 和 150 d 时,生长正常罗氏沼虾体长、体质量和肥满度均值均显著高于生长欠佳池塘 (*P* < 0.05),体长变异系数显著低于生长欠佳池塘的罗氏沼虾 (*P* < 0.05); 而养殖 220 d 左右,两种池塘罗氏沼虾各项生长状况指标间不存在显著性差异 (*P* > 0.05),但统计发现生长正常池塘的平均产量显著高于生长欠佳池塘 (*P* < 0.05)。

表 2 2016 年罗氏沼虾生长状况调查塘部分水质指标
Tab.2 The part of water quality of survey of ponds in growth of *M. rosenbergii* in 2016

类别 Category	生长状况 Growth status	
	生长正常 Normal growth	生长欠佳 Poor growth
pH	8.24 ± 0.33	8.16 ± 0.28
溶解氧/(mg/L) DO	5.43 ± 0.21	5.13 ± 0.34
总氮氮/(mg/L) TAN	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.02
亚硝态氮/(mg/L) NO ₂ ⁻ -N	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.03
硝基氮/(mg/L) NO ₃ ⁻ -N	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.02
活性磷/(mg/L) PO ₄ ³⁻ -P	0.18 ± 0.07	0.13 ± 0.05
化学需氧量/(mg/L) COD	15.04 ± 3.63	15.87 ± 3.45

表 3 2016 年两类池塘罗氏沼虾的养殖效果

Tab.3 The culture results of *M. rosenbergii* of two types of ponds in 2016

类别 Category	养殖天数/d Culture days	生长状况 Growth status	
		生长正常 Normal growth	生长欠佳 Poor growth
平均体长/cm Mean body length	50	2.703 ± 0.582 ^a	2.156 ± 0.672 ^b
	100	4.447 ± 0.508 ^a	4.083 ± 0.953 ^b
	150	5.562 ± 0.748 ^a	4.870 ± 1.162 ^b
	220	6.280 ± 1.352 ^a	6.065 ± 1.105 ^a
体长变异 系数/% CV	50	18.21 ± 8.76 ^a	14.43 ± 7.62 ^a
	100	10.46 ± 3.16 ^a	20.77 ± 6.44 ^b
	150	13.08 ± 3.61 ^a	22.84 ± 0.92 ^b
	220	19.48 ± 2.86 ^a	17.61 ± 6.26 ^a
平均体质量/g Average body weight	50	0.680 ± 0.405 ^a	0.393 ± 0.336 ^b
	100	1.738 ± 0.826 ^a	1.518 ± 1.028 ^b
	150	3.833 ± 1.382 ^a	2.896 ± 2.100 ^b
	220	6.055 ± 4.195 ^a	5.484 ± 3.303 ^a
肥满度/(g/cm ³) CF	50	3.216 ± 0.538 ^a	3.037 ± 0.398 ^a
	100	2.179 ± 0.111 ^a	1.965 ± 0.058 ^b
	150	2.482 ± 0.049 ^a	2.232 ± 0.139 ^b
	220	2.353 ± 0.145 ^a	2.469 ± 0.217 ^b
单位产量/(g/m ²) Specific yield	220	600.00 ± 41.08 ^a	368.75 ± 15.31 ^b

注:同一行数据中不同的字母代表两组间存在显著性差异($P < 0.05$)
Notes: different superscript lower-case letters in a line data mean significant differences ($P < 0.05$)

2.2 池养罗氏沼虾特定病原检测结果

2015 年与 2016 年所有生长状况调查塘中沼虾 TSV、MrNV 检疫结果均为阴性,而部分虾 EHP、WSSV 以及 IHNV 检疫结果为阳性。经显著性检验,2016 年沼虾分别养殖 50 d、100 d 以及 150 d 时,6 口生长正常池塘 180 尾罗氏沼虾携带 EHP、WSSV 以及 IHNV 3 种病原阳性检出率均显著低于 6 口生长欠佳池塘 180 尾罗氏沼虾($P < 0.05$),而 220 d 左右时,两类池塘沼虾携带上述病原的阳性检出率显著高于前 3 次检疫结果($P < 0.05$),同时生长正常池塘阳性检出率更高(图 1)。2015 年调查塘干塘起捕前病原检测结果(图 2)类似,20 口生长正常池塘(样本数 200 尾)EHP 阳性检出率为 14%,WSSV 阳性检出率为 13%,IHNV 阳性检出率为 1.5%,均分别高于 8 口生长欠佳池塘(样本数 80 尾)的 10%、12.5%、1.25% ($P > 0.05$)。另外,生长正常池塘携带 1 种病原、2 种病原沼虾比例均高于生长欠佳池塘($P > 0.05$,表 4)。

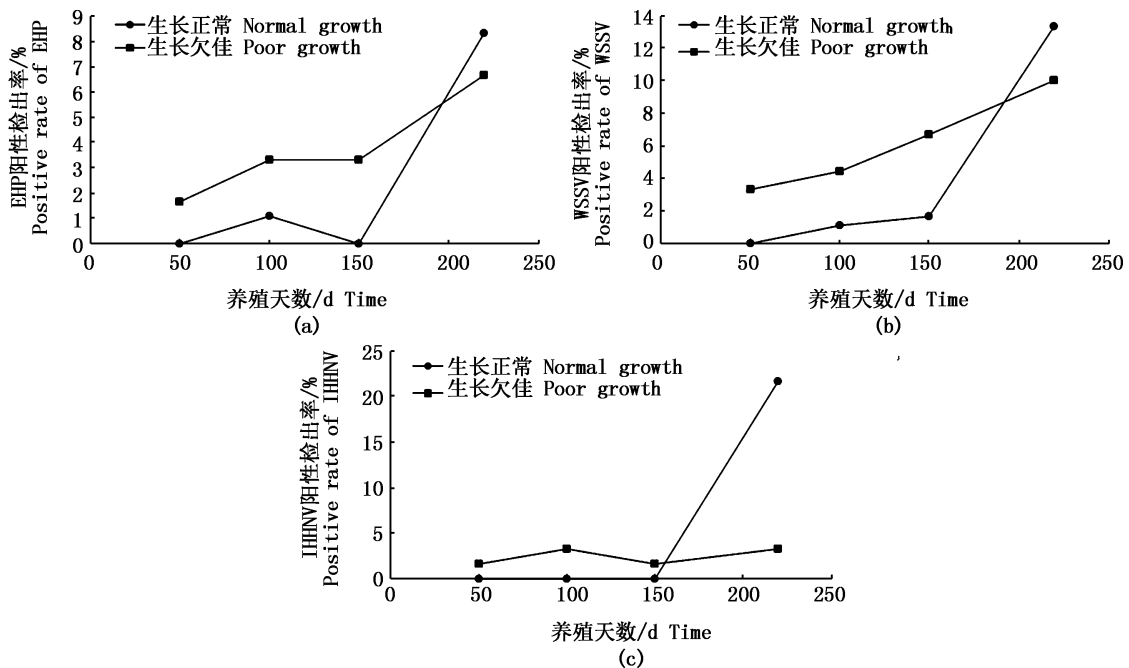


图 1 2016 年罗氏沼虾生长状况调查塘养殖期间 3 种病原阳性检出率

Fig.1 The curve of positive rate of three pathogens of *M. rosenbergii* in survey of ponds in growth in 2016

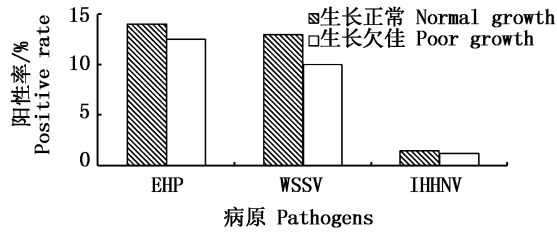


图2 2015年起捕前罗氏沼虾生长状况调查塘3种病原阳性检出率

Fig.2 The curve of positive rate of three pathogens of *M. rosenbergii* in survey of ponds in growth in 2015 before catching

表4 2015年调查塘起捕前罗氏沼虾携带病原情况
Tab.4 Results of detection of pathogens of *M. rosenbergii* in survey of ponds in 2015 before catching

类别 (Category)	携带1种病原 (One pathogen)	携带2种病原 (Two pathogens)	未携带病原 (No pathogen)
生长正常 (Normal growth)	23.0%	2.5%	74.5%
生长欠佳 (Poor growth)	18.8%	1.3%	80.0%

2.3 生长状况调查塘罗氏沼虾雄雌比

随着养殖天数增加,2016年抽检的两种生长类型池塘罗氏沼虾样品中雄性率均逐步降低,但生长正常池塘雄雌比下降速率高于生长欠佳池塘,在50 d、100 d时生长正常池塘雄雌比高于生长欠佳池塘,150 d后,生长正常池塘雄雌比低于生长欠佳池塘(图3)。同时表5数据也表明2015年干塘起捕前,生长正常池塘雄雌性比率为1:6.34,同样低于生长欠佳池塘的1:4.32,也即养殖后期生长正常池塘雄虾数量更少,且两种类型池塘中雄虾的3种病原阳性检出率均高于雌虾。

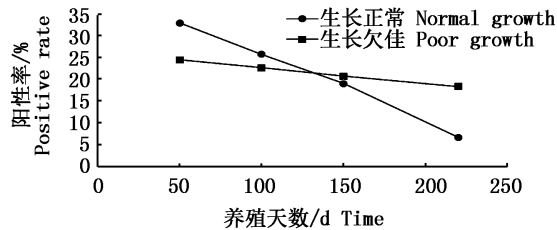


图3 2016年罗氏沼虾生长状况调查塘养殖期间罗氏沼虾雄性率

Fig.3 The male rate of *M. rosenbergii* in survey of ponds in growth in 2016

表5 2015年调查塘起捕前罗氏沼虾雄雌比率
Tab.5 The sex ratio of *M. rosenbergii* in survey of ponds in 2015 before catching

类别 (Category)	性别 (Sex)	雄雌比率 (Sex ratio)	阳性检出率 (Positive rate)		
			EHP	WSSV	IHNV
生长正常 (Normal growth)	雄	1:6.34	8.5%	8.5%	1.0%
	雌		5.5%	4.5%	0.5%
生长欠佳 (Poor growth)	雄	1:4.32	7.5%	7.5%	1.3%
	雌		2.5%	5.0%	0

2.4 两种生长类型池塘罗氏沼虾遗传多样性分析

如表6所示,两种生长类型池塘各遗传参数指标差异不显著($P > 0.05$),两种生长类型池塘25个微卫星位点平均等位基因介于6~7个之间,平均期望杂合度介于0.6322~0.6872之间,平均多态信息含量介于0.5831~0.6354之间,多态性较高。

2.5 感染WSSV对罗氏沼虾生长存活影响

荧光定量检测结果显示感染WSSV 45 d,随着感染浓度的上升,不同组别罗氏沼虾体内WSSV的拷贝数也逐步增加(图4),说明罗氏沼虾较易感染WSSV。感染15 d、30 d以及45 d,各浓度组(10尾罗氏沼虾)平均体长、平均体质量、成活率、特定生长率和肥满度均存在显著性差异($P < 0.05$),各项生长状况指标均随着感染浓度的上升逐步降低(表7)。

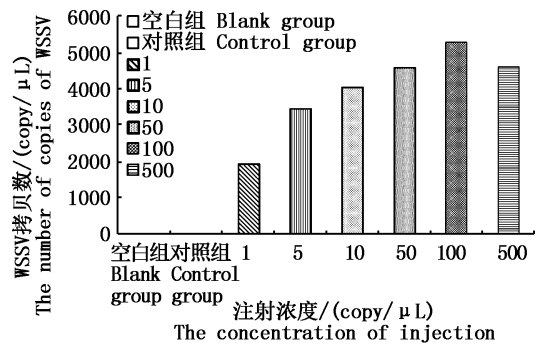


图4 人工感染45 d各组罗氏沼虾WSSV拷贝数检测结果

Fig.4 The detection results of the number of copies of WSSV in different groups of *Macrobrachium rosenbergii* with artificial infection for 45 days

图中各浓度组均 $\times 10^2$ copy/μL

Each concentration group is multiplied by 10^2 copy/μL

表 6 2016 年两种生长类型池塘沼虾遗传多样性分析结果

Tab.6 The results of analysis of genetic diversity of *M. rosenbergii* of two types of ponds in 2016

遗传参数 Genetic index	生长正常 Normal growth			生长欠佳 Poor growth		
	A11	B11	C11	C12	D11	D12
	平均等位基因 Mean Na	6	6	6	7	6
平均有效等位基因 Mean Ne	3.466	3.618	3.377	4.004	3.864	3.593
平均观测杂合度 Mean Ho	0.5467	0.5413	0.5320	0.5507	0.5347	0.5400
平均期望杂合度 Mean He	0.6447	0.6499	0.6367	0.6872	0.6322	0.6478
平均多态信息含量 Mean PIC	0.5957	0.5978	0.5862	0.6354	0.5831	0.5950
平均近交系数 Mean Fis	0.1377	0.1530	0.1503	0.1851	0.1400	0.1523

表 7 不同感染天数各组罗氏沼虾的养殖效果

Tab.7 The culture results of *M. rosenbergii* of each group for different infection days

	天数/d	空白组	对照组	1×10^2	5×10^2	1×10^3	5×10^3	1×10^4	5×10^4
	Time	Blank group	Control group	copy/ μ L	copy/ μ L	copy/ μ L	copy/ μ L	copy/ μ L	copy/ μ L
平均体长/cm Mean body length	15	7.867 ± 0.064 ^a	7.868 ± 0.078 ^a	7.854 ± 0.084 ^a	7.814 ± 0.078 ^a	7.536 ± 0.088 ^b	7.514 ± 0.074 ^b	7.332 ± 0.072 ^c	7.327 ± 0.090 ^c
	30	8.438 ± 0.255 ^a	8.300 ± 0.152 ^a	8.016 ± 0.163 ^b	7.945 ± 0.136 ^b	7.719 ± 0.290 ^c	7.646 ± 0.296 ^c	7.578 ± 0.237 ^c	7.569 ± 0.185 ^c
	45	9.021 ± 0.405 ^a	8.998 ± 0.472 ^a	8.349 ± 0.363 ^b	8.218 ± 0.337 ^{bc}	8.042 ± 0.198 ^{cd}	7.916 ± 0.542 ^d	7.835 ± 0.229 ^d	7.767 ± 0.182 ^d
体长变异系数/% CV	15	1.03 ± 0.25 ^{ab}	0.81 ± 0.08 ^b	1.13 ± 0.24 ^{ab}	1.04 ± 0.31 ^{ab}	1.17 ± 0.45 ^{ab}	1.02 ± 0.15 ^{ab}	1.03 ± 0.22 ^{ab}	1.32 ± 0.29 ^a
	30	2.92 ± 1.46 ^a	1.90 ± 0.53 ^b	2.19 ± 0.35 ^b	1.81 ± 0.53 ^b	3.89 ± 1.54 ^a	4.08 ± 2.10 ^a	3.43 ± 1.02 ^a	2.36 ± 1.01 ^b
	45	4.45 ± 2.30 ^{ab}	5.36 ± 2.02 ^{ab}	4.55 ± 1.04 ^{ab}	3.95 ± 1.85 ^b	2.79 ± 0.89 ^b	7.12 ± 4.08 ^a	2.68 ± 1.83 ^b	2.11 ± 0.82 ^b
平均体质量/g average body weight	15	11.82 ± 0.02 ^a	11.81 ± 0.08 ^a	11.78 ± 0.07 ^a	11.45 ± 0.05 ^b	11.05 ± 0.14 ^c	11.01 ± 0.12 ^c	10.64 ± 0.10 ^d	10.57 ± 0.06 ^d
	30	15.59 ± 0.34 ^a	15.36 ± 0.28 ^a	13.99 ± 0.12 ^b	13.39 ± 0.12 ^c	12.60 ± 0.05 ^d	12.05 ± 0.15 ^e	11.78 ± 0.06 ^f	11.62 ± 0.15 ^f
	45	19.59 ± 0.52 ^a	19.64 ± 0.27 ^a	16.06 ± 0.43 ^b	15.91 ± 0.33 ^b	14.56 ± 0.15 ^c	14.30 ± 0.31 ^c	13.66 ± 0.19 ^d	13.44 ± 0.25 ^d
特定生长率/ (%/d) S _{GR}	15	1.55 ± 0.01 ^a	1.57 ± 0.05 ^a	1.52 ± 0.10 ^a	1.43 ± 0.05 ^a	1.09 ± 0.14 ^b	1.04 ± 0.12 ^b	0.70 ± 0.02 ^c	0.75 ± 0.12 ^c
	30	3.40 ± 0.14 ^a	3.32 ± 0.21 ^a	2.67 ± 0.18 ^b	2.47 ± 0.04 ^c	1.96 ± 0.10 ^d	1.64 ± 0.04 ^e	1.38 ± 0.04 ^f	1.38 ± 0.17 ^f
	45	4.92 ± 0.19 ^a	4.96 ± 0.18 ^a	3.59 ± 0.27 ^b	3.62 ± 0.16 ^b	2.93 ± 0.07 ^c	2.78 ± 0.13 ^c	2.37 ± 0.08 ^d	2.35 ± 0.20 ^d
肥满度/ (g/cm ³)CF	15	2.43 ± 0.02 ^a	2.42 ± 0.04 ^a	2.43 ± 0.03 ^a	2.40 ± 0.01 ^a	2.58 ± 0.04 ^b	2.59 ± 0.03 ^b	2.70 ± 0.03 ^c	2.69 ± 0.03 ^c
	30	2.59 ± 0.03 ^a	2.69 ± 0.03 ^{bc}	2.72 ± 0.03 ^{bd}	2.67 ± 0.03 ^c	2.74 ± 0.04 ^d	2.69 ± 0.01 ^{bc}	2.71 ± 0.04 ^{bcd}	2.68 ± 0.03 ^{bc}
	45	2.67 ± 0.10 ^a	2.70 ± 0.01 ^{ab}	2.76 ± 0.08 ^{abc}	2.87 ± 0.10 ^c	2.79 ± 0.05 ^{abc}	2.88 ± 0.06 ^c	2.84 ± 0.09 ^{bc}	2.87 ± 0.12 ^c
成活率/% Survival rate	15	90.0 ± 14.1 ^a	85.0 ± 7.1 ^{ab}	75.0 ± 17.3 ^{ab}	65.0 ± 17.3 ^{bc}	52.5 ± 5.0 ^{cd}	52.5 ± 12.6 ^{cd}	50.0 ± 11.5 ^{cd}	40.0 ± 14.1 ^d
	30	90.0 ± 14.1 ^a	75.0 ± 7.1 ^{ab}	67.5 ± 22.2 ^{abc}	50.0 ± 8.2 ^{bc}	47.5 ± 9.6 ^{cd}	42.5 ± 18.9 ^d	45.0 ± 10.0 ^d	37.5 ± 9.6 ^d
	45	80.0 ± 14.1 ^a	75.0 ± 7.1 ^a	55.0 ± 5.8 ^b	45.0 ± 5.8 ^c	27.5 ± 9.6 ^d	30.0 ± 0.0 ^d	35.0 ± 5.8 ^d	30.0 ± 0.0 ^d

注:同一行数据中不同的字母代表两组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

Notes: different superscript lower-case letters in a line data mean significant differences ($P < 0.05$)

3 讨论

影响虾类生长缓慢的因素很多,如杨世平^[25]等认为盐度、饵料影响罗氏沼虾的生长,周梦颖^[26]认为温度、盐度对罗氏沼虾生长有显著影响,朱春华等^[27]认为环境激素(NP)影响罗氏沼虾的生长。

本文微卫星标记分析得出两种生长类型池塘中沼虾的 PIC 介于 0.583 1 ~ 0.635 4 之间,按 BOTSTEIN^[28]提出的标准, PIC > 0.5 属于高度多态性;许益铨等^[29]认为 Mean He 应该介于 0.3 ~ 0.8 之间才有选育的潜力,本实验两类池塘 Mean He 介于 0.632 2 ~ 0.687 2 之间,与 CHAREONTAWEE 等^[20]研究的泰国野生和养殖罗氏沼虾 Mean He 0.64 ~ 0.73 相似,说明两类池塘的罗氏沼虾杂合度相对较高,遗传变异较大;

结合 Fis 0.137 7 ~ 0.185 1 分析,近交程度较弱,两类池塘种质差异不显著,说明种质差异或退化引起池塘罗氏沼虾生长缓慢的可能性很小。

对比 2016 年两类池塘中沼虾的 3 种病原(EHP、IHHNV、WSSV)阳性检出率得出:养殖前 150 d 生长正常池塘沼虾的阳性检出率显著低于生长欠佳池塘,养殖 150 d 后两类池塘沼虾的 3 种病原阳性检出率差异不显著,且生长正常池塘雄虾数量更少。2015 年调查塘干塘起捕前结果类似,造成此类结果的原因是初次轮捕时间在 130 d 左右,后每隔 10 d 轮捕一次,轮捕时采取捕大留小的生产工艺,罗氏沼虾具有雄性生长速度大于雌性生长速度的生物学特性,因此导致生长正常池塘雄虾数量在 150 d 后迅速减少,且轮捕后剩余的罗氏沼虾个体小,病原阳性检出率高,由此得出 150 d 后生长正常池塘沼虾的病原阳性

检出率高与捕大留小的生产工艺有关。本实验还证明感染 WSSV 影响罗氏沼虾的成活率,也影响罗氏沼虾的生长,且感染 WSSV 达到较高浓度会引起罗氏沼虾的死亡,李晶晶等^[30]认为感染 WSSV 浓度 10^3 copy/ μ L 引起对虾的大量死亡;刘宝彬^[11]人工感染 IHNV 认为 IHNV 影响对虾的生长存活;刘珍等^[9]认为 EHP 引起对虾生长缓慢,IHNV 与罗氏沼虾生长缓慢的关系已有相关文献报道^[12]。两类池塘的水质指标不存在显著性差异,且两类池塘的水质指标均符合罗氏沼虾养殖的水质需求^[31]。据此结合养殖中后期每隔 10 d 左右捕大留小的生产工艺,认为感染特定病原引起池塘罗氏沼虾生长缓慢的可能性较大,且感染特定病原对雄虾生长的影响大于雌虾。

但本实验仅检测池养罗氏沼虾 5 种常见病原,其他病原是否影响罗氏沼虾生长尚无文献记载,由此认为池养罗氏沼虾生长欠佳可能与 WSSV、IHNV 及 EHP 3 种病原有关,也可能与其他病原有关,尚需进一步实验证明。本实验于 2016 年亲虾或虾苗中检测出病原,罗氏沼虾养殖期间也检测出病原,因此养殖的商品虾不宜作为生产虾苗的亲本,需在较高生物安保条件下培育亲本。

参考文献:

- [1] 杨大伟. 罗氏沼虾养殖存在的问题及关键措施[J]. 齐鲁渔业, 2015(1): 28-29.
YANG D W. Problems and key measures in culture *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Shandong Fisheries, 2015 (1): 28-29.
- [2] 张瑞祺. 工厂化循环水处理技术在罗氏沼虾苗种繁育中的应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
ZHANG R Q. Application of recirculating water treatment technology in the breeding of *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [3] 徐洋, 沈锦玉, 姚嘉赞, 等. 罗氏沼虾主要病害研究概况 [J]. 生物学杂志, 2012, 29(6): 74-76.
XU Y, SHEN J Y, YAO J Y, et al. Main diseases of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a review [J]. Journal of Biology, 2012, 29(6): 74-76.
- [4] 刘杰. 患病罗氏沼虾幼体可疑病原核酸随机克隆技术的探索[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
LIU J. The exploration of random cloning technology for suspicious pathogen nucleic acid in suffering *Macrobrachium rosenbergii* larvae [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [5] 董学洪, 陈正兴. 罗氏沼虾养殖中常见病害及防治[J]. 水产养殖, 2015, 36(11): 46-48.
DONG X H, CHEN Z X. Common diseases and prevention in culture *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Aquaculture, 2015, 36(11): 46-48.
- [6] 李新伦. 罗氏沼虾螺原体病原微生物的分离和生物学特性研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
LI X L. The separation of *Macrobrachium rosenbergii* spiroplasma pathogen and biology research [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2012.
- [7] 黎东. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对罗氏沼虾生长以及卵巢发育的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.
LI D. Effects of growth and ovarian development on *Macrobrachium rosenbergii* by Cu^{2+} and Zn^{2+} [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013.
- [8] 戴习林, 周梦颖, 鞠波, 等. 养殖密度对罗氏沼虾生长、性别分化与性腺发育的影响 [J]. 水产学报, 2016, 40(12): 1874-1882.
DAI X L, ZHOU M Y, JU B, et al. Effects of stocking density on growth, sexual differentiation and gonad development of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(12): 1874-1882.
- [9] 刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测 [J]. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 119-126.
LIU Z, ZHANG Q L, WAN X Y, et al. Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates [J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 119-126.
- [10] 朱凝瑜, 孔蕾, 郑天伦. 2013 年浙江省南美白对虾虾苗病毒携带情况分析 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(5): 756-760.
ZHU N Y, KONG L, ZHENG T L. Analysis on presence of virus in *Penaeus vannamei* shrimp larvae in Zhejiang Province in 2013 [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(5): 756-760.
- [11] 刘宝彬. 传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHNV) 对凡纳滨对虾生长影响及其致病力分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
LIU B B. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and its pathogenicity analysis effect of growth of *Litopenaeus vannamei* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [12] HAZREEN NITA M K, KUA B C, BHASSU S, et al. Detection and genetic profiling of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) infections in wild berried freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* collected for hatchery production [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 3785-3790.
- [13] ARANGUREN L F, HAN J E, TANG K F J. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic

- necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2017, 471 : 37-42.
- [14] TANG K F J, HAN J E, ARANGUREN L F, et al. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 140 : 1-7.
- [15] JAROENLAK P, SANGUANRUT P, WILLIAMS B A P, et al. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11) : e0166320.
- [16] 胡文娟, 房文红, 江敏, 等. 淡水养殖凡纳滨对虾 IHNV-WSSV 共感染率调查分析及其对免疫相关酶活性的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(5) : 685-693.
- HU W J, FANG W H, JIANG M, et al. Investigation and analyses of IHNV-WSSV co-infection in *Penaeus vannamei* cultured in freshwater and its effects on immune-related enzymes [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(5) : 685-693.
- [17] 夏小明. 对虾 WSSV 和 IHNV 病毒重组酶聚合酶扩增 (RPA) 快速检测方法的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- XIA X M. Recombinase polymerase amplification assays for rapid detection of shrimp WSSV and IHNV [D]. Shanghai : Shanghai Ocean University, 2015.
- [18] CAVALLI L S, BATISTA C R, NORBERG B F S, et al. Natural occurrence of White spot syndrome virus and Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Neohelice granulata* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 114(1) : 86-88.
- [19] PAZIR M K, AFSHARNASAB M, JAFARI B J, et al. Detection and identification of white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) of *Litopenaeus vannamei* from Bushehr and Sistan and Baluchestan provinces (Iran), during 2009-2010 [J]. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2011, 10(4) : 708-726.
- [20] CHAREONTAWEE K, POOMPUANG S, NA-NAKORN U, et al. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand [J]. *Aquaculture*, 2007, 271(1/4) : 121-129.
- [21] 孙祖越. 常用实验动物解剖病理取材图谱 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007 : 5-127.
- SUN Z Y. Atlas of anatomy and pathologically removing organ blocks of common laboratory animals [M]. Shanghai : Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2007 : 5-127.
- [22] 周俊芳, 房文红, 周红霞, 等. 一种用于我国养殖对虾肝肠胞虫感染早期预警的套式引物及其应用: 中国, CN104928288A [P]. 2015-09-23.
- ZHOU J F, FANG W H, ZHOU H X, et al. Nested primer used for early warning of *Enterocytozoon hepatopenaei* of Chinese cultured shrimps and application of nested primer: China, CN104928288A [P]. 2015-09-23.
- [23] 刘洁. 微卫星标记在罗氏沼虾世代和群体间遗传多样性分析的应用 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- LIU J. The application of diversity analysis of microsatellite markers in genetic generations and populations of *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Shanghai : Shanghai Ocean University, 2015.
- [24] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002 : 200-284.
- State Environmental Protection Administration. Water and wastewater monitoring analysis methods [M]. 4th ed. Beijing : Chinese Environment Science Press, 2002 : 200-284.
- [25] 杨世平, 丁树军, 孙成波, 等. 饵料和盐度对罗氏沼虾幼虾生长和存活率的影响 [J]. *热带生物学报*, 2014, 5(2) : 101-106.
- YANG S P, DING S J, SUN C B, et al. Effect of diet and salinity on the growth and survival rate of juvenile shrimps of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2014, 5(2) : 101-106.
- [26] 周梦颖. 养殖密度、盐度和温度对罗氏沼虾性别分化和早期性腺发育的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- ZHOU M Y. Effect of stocking density, salinity and temperature on sex differentiation and early gonadal development on *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Shanghai : Shanghai Ocean University, 2014.
- [27] 朱春华, 薛海波, 李郁娇, 等. 壬基酚 (NP) 对罗氏沼虾幼虾生长和性别分化的影响 [J]. *水产学报*, 2011, 35(3) : 365-371.
- ZHU C H, XUE H B, LI Y J, et al. Effects of 4-nonylphenol on growth and sex differentiation in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3) : 365-371.
- [28] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3) : 314-331.
- [29] 许益铨, 柳敏海, 油九菊, 等. 舟山附近海域 3 个大黄鱼养殖群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2014, 33(2) : 140-146.
- XU Y A, LIU M H, YOU J J, et al. Genetic analysis of three cultured populations large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson) using microsatellite DNA [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2014, 33(2) : 140-146.
- [30] 李晶晶, 李云, 刘红, 等. 感染溶藻弧菌及白斑综合征病毒后凡纳滨对虾不同组织的 Toll 样受体基因表达变化研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(2) : 476-483.
- LI J J, LI Y, LIU H, et al. The expression of toll-like receptors in different tissues of *Litopenaeus vannamei* after challenges with white spot syndrome virus and *Vibrio alginolyticus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016,

47(2): 476-483.

- [31] 刘海春,董学洪,刘志国. 罗氏沼虾健康养殖水质调控技术[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 338-341.
LIU H C, DONG X H, LIU Z G. The healthy aquaculture

water quality control technology in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(5): 338-341.

The preliminary analysis of the reasons for the poor growth of *Macrobrachium rosenbergii* in pond

ZHOU Junming¹, DAI Xilin¹, JIANG Fei², DING Fujiang²

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Shencao Special Fisheries Development Co., Shanghai 201516, China)

Abstract: Through the investigation on the growth, pathogen detection, genetic diversity analysis, water quality detection and injecting WSSV to explore the poor growth of *Macrobrachium rosenbergii*. The results showed that SSR analysis: Mean He 0.632 2 – 0.687 2, Mean PIC 0.583 1 – 0.635 4, genetic diversity was high, and there was no significant difference in genetic index and water quality ($P > 0.05$). The growth of normal growing pond was significantly better than that of poor growing pond in culture days (50 d, 100 d and 150 d) of *Macrobrachium rosenbergii* ($P < 0.05$), while the positive rate of EHP, WSSV and IHHNV was significantly lower than that of poor growing pond ($P < 0.05$). There was no significant difference in growth between the two groups for 220 d ($P > 0.05$). The positive rate of pathogen was significantly higher than that of the previous three quarantine results ($P < 0.05$). The positive rate of normal growing pond was higher, and the number of male shrimp of normal growing pond was less, and the results were in agreement with the results of the pathogen detection before the investigation in 2014, 2015. By injecting WSSV for 15 d, 30 d and 45 d, there were significant differences in growth index of each concentration group ($P < 0.05$), and each growth index decreased gradually with the increase of infection concentration. Therefore, combined with catching big and keeping small in the middle and late stages of culture in every 10 d, the germplasm degeneration and water quality do not affect the growth of *Macrobrachium rosenbergii*. Pathogen may affect the growth of *Macrobrachium rosenbergii*. The effects of pathogen on male are greater than on female.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; pathogen detection; genetic diversity analysis; poor growth; WSSV