

文章编号:1000-0615(2008)05-665-09

牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定

陈松林¹, 田永胜¹, 徐田军^{1,2}, 邓寒¹, 刘寿堂³,
刘本伟¹, 季相山¹, 于过才¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090;

3. 山东海阳黄海水产有限公司, 山东 海阳 265100)

摘要: 通过自然选择和人工感染途径筛选出抗鳗弧菌病牙鲆鱼种, 将其培育成亲鱼 94 尾, 建立了牙鲆抗病群体; 从日本引进了牙鲆日本群体; 以上述 2 个群体以及黄海中捕捞的黄海群体为基础群体, 通过不同组合的交配, 建立了 63 个牙鲆家系, 其中半同胞家系 54 个, 全同胞家系 9 个。生长比较实验表明这 63 个家系的生长速度存在着明显差异, 从中筛选出生长快速的家系 4 个(家系 36, 42, 43 和 57), 生长较快的家系 9 个(家系 27, 28, 35, 39, 41, 51, 60, 65 和 76), 生长慢的家系 1 个(75 号家系)。通过对 59 个家系的抗病能力测定表明, 不同家系在抗鳗弧菌感染的能力上存在着明显差别, 从中鉴定出抗病力强的家系 3 个(家系 50, 61 和 68 号), 其在鳗弧菌感染后的成活率高达 60% 以上; 抗病力比较强的家系 17 个, 其成活率为 39%~60%; 抗病力一般的家系 33 个, 其成活率为 17%~39% 之间; 抗病力差的家系 6 个, 其成活率在 17% 以下。这些牙鲆家系的建立为牙鲆抗病、高产新品种的培育奠定了重要基础。

关键词: 牙鲆; 抗病群体; 日本群体; 黄海群体; 家系; 选育; 生长率; 抗病力

中图分类号: S 917

文献标识码: A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 是一种冷、温水性、底栖的海产名贵经济鱼类。在我国渤海、黄海以及东海有广泛的分布。牙鲆具有味道鲜美、生长快、个体大、繁殖力强、洄游性小等特点, 特别适宜于沿海发展增养殖业。我国从上世纪 80 年代开始牙鲆人工育苗和商业化养殖, 目前已在海水养殖中占有重要地位, 成为我国海水养殖鱼类的主导品种之一。然而, 随着牙鲆养殖业的快速发展, 养殖牙鲆病害频发, 导致牙鲆苗种阶段的成活率大大降低, 给牙鲆养殖业造成重大经济损失。

危害牙鲆的主要病害是细菌性和病毒性疾病, 前者造成的危害更大。其中危害最大的一种细菌性疾病是由鳗弧菌引起的弧菌病^[1]。尽管采取了抗菌素类药物等传统的防病措施, 仍无法从

根本上解决牙鲆养殖中的病害问题。并且抗菌素类药物具有容易在鱼体内积累, 对消费者的健康具有潜在危害, 容易使病原菌产生抗药性以及严重污染养殖环境等问题, 因而在水产养殖业中的应用越来越受到限制。同时抗菌素的使用也不能满足人们日益增长的对无药物残留的、绿色水产品的需求。因此, 采用现代生物技术手段培育抗病力强、生长速度快的牙鲆新品种, 已成为我国水产科技界必须解决的重大课题, 也是解决牙鲆病害问题的根本途径。在牙鲆遗传育种方面, 迄今只在牙鲆分子标记筛选和遗传多样性评价、种质鉴定等方面有一些报道。如邹曙明等^[2]采用 RAPD 技术对牙鲆养殖群体的遗传结构进行了检测分析; 尤峰等^[3]采用同工酶技术对山东近海

收稿日期: 2007-10-28

资助项目: 国家科技支撑计划(2006BAD01A12011); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A404); 国家自然科学基金(30413240); 山东省泰山学者建设工程专项经费资助

作者简介: 陈松林(1960-), 男, 博士, 主要从事鱼类生物技术和分子育种研究。Tel: 0532-85844606, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

牙鲆和养殖牙鲆的遗传多样性进行了分析; Sekino 和 Hara^[4]利用开发出的牙鲆微卫星标记进行了牙鲆种群遗传结构分析; Liu 等^[5-6]利用微卫星标记和 AFLP 技术评价了牙鲆养殖群体和野生群体的遗传结构,表明养殖群体的遗传多样性具有一定程度的下降;陈微等^[7]开展了牙鲆微卫星标记筛选和遗传多样性的分子研究;张玉喜和陈松林^[8]分析了牙鲆抗病鱼和不抗病鱼的 MHC 基因多态性,初步筛选到抗病相关的 MHC 基因型;刘云国等^[9]采用 AFLP 技术初步筛选到牙鲆抗病相关的分子标记。但有关牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能测定的研究,目前尚未见报道。

本文采用自然选择和人工感染途径,筛选出一批抗病牙鲆,同时从日本引进了日本牙鲆群体。在此基础上,建立了牙鲆家系 63 个,这里首先介绍牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能测定的初步结果。

1 材料与方法

1.1 牙鲆抗病群体的建立

从 2002 年开始,我们就通过自然选择和人工感染途径筛选对鳃弧菌病具有抗性的牙鲆鱼苗和鱼种。自然选择途径就是收集鳃弧菌病发作后存活的牙鲆鱼苗或鱼种。人工感染就是对正常牙鲆鱼苗或鱼种进行鳃弧菌感染。实验用鳃弧菌为本实验室保存的鳃弧菌菌株。鳃弧菌的培养按照常规方法进行。培养基为 2216 E 培养基,细菌在此培养基中培养 20 小时后离心收集菌体。用生理盐水稀释菌液配制成浓度为 10 OD 的菌液,经过预备实验确定有效注射剂量。然后进行正式感染实验。试验用牙鲆共 600 多尾,购自黄海水产研究所海阳 863 高技术实验基地和麦岛实验基地,体长 6.5~8.5 cm,体重约 10 g。所有牙鲆个体腹腔注射鳃弧菌,剂量控制在半数致死。抗病群体为人工感染鳃弧菌后长期健康成活的牙鲆个体,感病群体由感染鳃弧菌后严重患病或死亡的牙鲆个体组成。经过 3 年多的培育,这些鱼于 2006 年春达到性成熟,并繁殖了部分抗病牙鲆鱼苗。2007 年,大多数抗病牙鲆达性成熟,并被用于建立家系。

1.2 牙鲆日本群体和黄海群体的培育

2003 年 10 月,从日本引进牙鲆日本群体鱼

苗 50 尾,引进时体长为 5 cm 左右。经过 3 年多的培育,于 2006 年 4 月部分鱼达性成熟,其中少数鱼进行了繁殖产卵。2007 年,大多数鱼达性成熟,并被用于建立牙鲆家系。通过微卫星标记分析从日本引进的这批牙鲆鱼苗具有较高的遗传多样性,为多个亲本的后代^[10]。黄海野生群体亲鱼为从黄海中捕捞的野生个体培育而成的亲鱼,数量为 60 尾左右。采用电子标记法对抗病群体、日本群体以及黄海野生群体等 3 个群体亲鱼进行个体标记,每尾亲鱼给一个标记号。以便配对繁殖时识别亲鱼来源。

1.3 精、卵的采集与人工授精

利用人工挤压腹部法分别采集成熟卵于干燥的量杯中,挤压并用吸管吸取成熟精子于干燥的玻璃瓶中。采用干法受精,将精子与卵摇动混合,加入 15~16 °C 海水激活,完成授精过程。将沉淀后获得的上浮卵移入孵化缸中孵化。胚胎发育至原肠早期统计受精率,发育至孵化前期统计孵化率。

1.4 牙鲆家系的建立

牙鲆家系的建立主要在山东省海阳市黄海水产有限公司进行。采用抗病群体(RS)、日本群体(JS)和黄海野生群体(YS)3 个繁殖群体作为亲本(图 1)。采用 1 尾雄鱼对 1 尾雌鱼的交配方式构建家系,有时是 1 尾雄鱼分别对 2~4 尾雌鱼,或 1 尾雌鱼分别对 2~5 尾雄鱼的交配方式构建半同胞家系。这次参与家系建立的雄性抗病牙鲆为 13 尾、雄性日本牙鲆为 4 尾、黄海野生雄性牙鲆为 4 尾;雌性抗病牙鲆为 21 尾,雌性日本牙鲆为 7 尾,雌性黄海野生牙鲆为 2 尾。人工采卵授精,建立半同胞和全同胞家系共计 63 个。

人工交配方式主要是在 3 个繁殖群体之间或种群之内以如下方式进行。

1.5 牙鲆家系苗种培育

将以上牙鲆受精卵 30 mL 放入 3 m³ 水缸中孵化,水温保持在 15.2~17 °C,每日利用虹吸法清除缸底死卵。大约孵化 60 h 左右出膜。鱼苗的饲养和疾病的防治参照《海水鱼类养殖理论与技术》中“牙鲆养殖技术”进行^[11]。

鱼苗养殖至 15 d 左右对鱼苗密度进行初步调整,使每缸鱼苗数量保持在 10 000 尾左右,养殖到 50 d 左右对所有家系的饲养密度进行第二次调整,每个家系随机选留 2 000 尾鱼苗在 3 m³ 水缸中饲养。

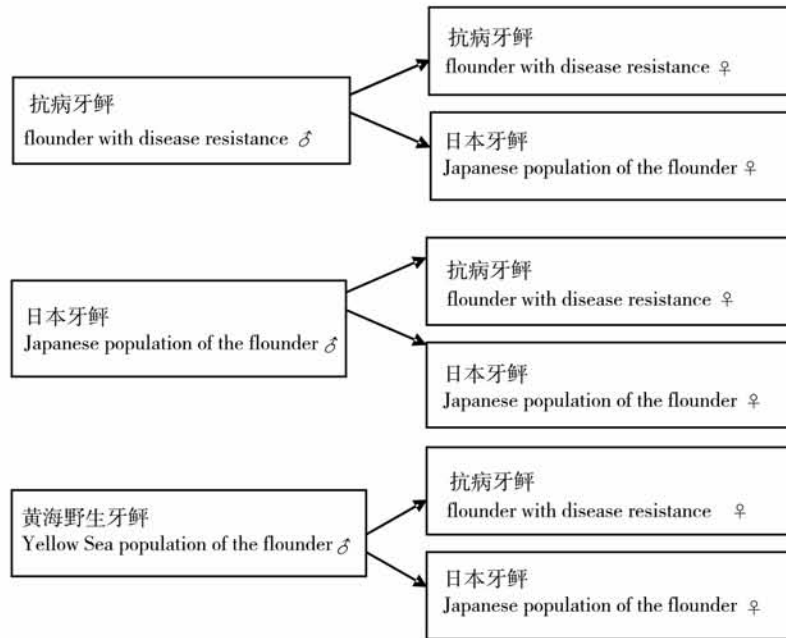


图1 牙鲆家系建立的交配方式

Fig. 1 Mating model of flounder different populations for family development

1.6 牙鲆不同家系鱼苗生长性能的测定

2007年3月26至4月18日基本完成了大部分家系的建立,经过平均64.8 d的培养,对所有家系进行生长测量。测量指标主要包括全长(从吻端到尾鳍末端)、体宽(身体最宽处,不含背、腹鳍长度)、体重3个指标,每个家系测量30尾鱼。

1.7 牙鲆不同家系鱼苗抗鳃弧菌病能力的测定

抗病性能测定实验在海阳市本课题组实验基地进行。选取59个家系,每个家系取样约100尾,共约5900尾,体长为9~11 cm,体重为10 g左右。感染用菌株为本实验室保存并经过鉴定的鳃弧菌菌株。将鳃弧菌在灭菌的2216 E培养基(蛋白胨5 g,酵母提取物1 g, $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g,陈海水1 000 mL)中28℃, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养约18 h。测定OD 600值,将原菌液用灭菌的0.9%的生理盐水稀释至 4.9×10^7 cfu。对所有实验牙鲆采用腹腔注射稀释的鳃弧菌,经过预备实验摸索确定牙鲆鱼苗半致死浓度为0.2 mL上述浓度的细菌溶液。经过菌落记数,鳃弧菌的注射浓度约为 9.8×10^5 cfu·g⁻¹鱼体重。

1.8 数据处理及统计分析

数据的统计分析采用SPSS 13.0软件进行,计算各指标的平均值和标准差,并进行单因素方

差分析(one way ANOVA),不同家系间利用最小显著极差法进行多重比较。

2 结果

2.1 牙鲆抗病群体、日本群体及黄海野生群体的建立

利用自然选择和人工感染的方式构建了抗病牙鲆繁殖群体200尾,引进牙鲆日本群体鱼苗50尾,经培养选育获得30多尾性成熟个体,从黄海捕捞野生牙鲆作为黄海野生群体,经过3年多的培育,这些鱼达到性成熟,经过人工生殖调控达到人工繁殖的要求。

抗病牙鲆体长为45~75 cm,平均为(53.6 ± 5.02) cm;体重为1.02~2.49 kg,平均(1.93 ± 1.42) kg。日本牙鲆体长为51~70 cm,平均为(62.15 ± 6.16) cm,体重为1.5~4.3 kg,平均为(2.65 ± 0.72) kg。

2.2 牙鲆家系的建立

本文利用13尾抗病群体雄鱼、4尾日本群体雄鱼、4尾黄海野生群体雄鱼分别与21尾抗病群体雌鱼、7尾日本群体雌鱼和2尾黄海野生群体雌鱼进行交配授精,建立家系63个,其中半同胞家系54个,全同胞家系9个。

2.3 牙鲆不同家系鱼苗的生长性能

牙鲆不同家系鱼苗的生长比较结果列于表

1. 对不同家系的体重数据进行统计分析表明,有 8 个家系鱼苗(分别为 2、4、5、19、36、42、43 和 57 号家系)的体重明显大于对照组体重,其间差异极其显著,因为家系的建立时间不尽相同,故我们将

表 1 牙鲆不同家系鱼苗生长性能比较

Tab. 1 Comparison of growth characteristic of different families of Japanese flounder

 $\bar{X} \pm S, D$

| 家系编号 family No. | 全长(cm) body length | 体宽(cm) body width | 体重(g) body weight | 家系编号 family No. | 全长(cm) body length | 体宽(cm) body width | 体重(g) body weight |
|--------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 2 | 10.57±0.73 | 3.55±2.52 | 10.59±2.42** | 49 | 9.10±0.69 | 2.91±0.297 | 6.98±1.42 |
| 3 | 9.66±1.17 | 3.52±0.28 | 9.50±2.70* | 50 | 9.98±0.62 | 2.9±0.28 | 6.74±1.6 |
| 4 | 10.14±1.24 | 3.58±0.39 | 10.16±4.39** | 51 | 9.92±0.72 | 3.43±0.31 | 9.70±2.03* |
| 5 | 10.99±3.41 | 3.53±0.57 | 12.77±8.85** | 52 | 8.28±1.20 | 2.71±0.27 | 6.08±2.12 |
| 10 | 9.18±1.45 | 3.02±0.24 | 6.54±1.23 | 53 | 9.21±0.67 | 2.96±0.50 | 7.23±1.68 |
| 12 | 10±0.79 | 3.38±0.26 | 9.37±2.31* | 54 | 8.58±1.995 | 2.72±0.78 | 5.18±2.01 |
| 13 | 9.14±1.15 | 3.14±0.33 | 8.16±2.67 | 55 | 8.11±0.54 | 2.68±0.22 | 4.90±1.14 |
| 14 | 9.53±2.62 | 3.06±0.30 | 7.54±2.52 | 56 | 8.33±0.73 | 2.58±0.25 | 5.77±1.53 |
| 15 | 9.6±0.99 | 3.2±0.40 | 7.75±2.26 | 57 | 10.53±0.697 | 3.51±0.27 | 11.78±2.01** |
| 16 | 9.82±0.74 | 3.34±0.28 | 8.73±2.05 | 58 | 9.20±0.56 | 2.98±0.20 | 7.28±1.09 |
| 19 | 10.66±0.63 | 3.84±0.28 | 11.25±1.91** | 59 | 8.08±0.45 | 2.62±0.18 | 5.44±0.84 |
| 21 | 9.34±1.67 | 3.34±0.45 | 8.43±1.59* | 60 | 9.66±0.68 | 3.27±0.28 | 9.14±2.35* |
| 22 | 9.2±0.77 | 3.2±0.92 | 6.73±1.4 | 61 | 9.33±0.84 | 3.18±0.31 | 7.93±1.82 |
| 23 | 9.96±0.59 | 3.26±0.24 | 9.73±1.95 | 62 | 8.65±1.35 | 2.83±0.27 | 6.35±1.35 |
| 24 | 8.55±0.94 | 2.88±0.75 | 5.63±1.88 | 63 | 8.44±0.76 | 2.75±0.20 | 6.45±1.20 |
| 25 | 9.45±1.56 | 3.28±0.77 | 7.63±2.84 | 64 | 9.16±0.50 | 3.10±0.22 | 7.33±1.07 |
| 26 | 8.38±1.35 | 2.87±0.27 | 5.95±1.50 | 65 | 9.75±1.09 | 3.16±0.46 | 9.49±2.85* |
| 27 | 9.77±0.58 | 3.18±0.27 | 9.02±1.67* | 66 | 9.02±0.61 | 3.03±0.31 | 7.06±1.64 |
| 28 | 9.89±0.60 | 3.40±0.45 | 9.06±1.77* | 68 | 9.25±0.78 | 3.08±0.26 | 7.30±1.55 |
| 29 | 9.06±0.81 | 3.00±0.3 | 6.53±2.53 | 69 | 8.27±1.25 | 2.74±0.41 | 5.22±2.79 |
| 32 | 9.44±1.25 | 3.17±0.41 | 8.22±5.58 | 70 | 8.10±0.34 | 2.64±0.16 | 5.26±0.796 |
| 35 | 9.6±0.92 | 3.2±0.29 | 8.34±2.34* | 73 | 8.06±1.06 | 2.76±0.37 | 5.41±2.17 |
| 36 | 10.72±0.73 | 3.86±0.37 | 12.13±1.78** | 75 | 5.65±0.83 | 1.81±0.32 | 1.89±0.83** |
| 39 | 9.26±0.59 | 3.21±0.31 | 8.23±1.65* | 76 | 9.05±1.29 | 2.91±0.43 | 7.31±3.70* |
| 40 | 8.10±0.80 | 2.59±0.29 | 5.17±8.00 | 78 | 9.00±0.65 | 3.03±0.29 | 7.04±1.76 |
| 41 | 9.62±1.34 | 3.26±0.52 | 7.66±1.56* | 79 | 8.20±0.56 | 2.67±0.23 | 5.31±1.14 |
| 42 | 10.24±0.56 | 3.62±0.25 | 10.54±1.53** | 80 | 8.30±0.65 | 2.82±0.36 | 6.47±1.74 |
| 43 | 10.54±1.50 | 3.61±0.33 | 12.29±2.91** | 81 | 8.17±1.20 | 2.70±0.43 | 6.21±2.80 |
| 45 | 9.82±1.37 | 3.42±0.53 | 8.68±2.15 | 82 | 7.38±0.48 | 2.32±0.23 | 3.94±0.63 |
| 46 | 8.96±0.92 | 3.12±0.38 | 6.87±2.75 | 85 | 8.60±0.86 | 2.82±0.39 | 6.63±2.24 |
| 47 | 7.61±0.69 | 2.35±0.21 | 4.26±1.12 | 89 | 8.07±0.66 | 2.70±0.24 | 5.43±1.38 |
| 48 | 8.07±0.92 | 2.57±0.35 | 5.42±2.75 | 对照组 control | 8.34±0.19 | 2.66±0.06 | 5.28±0.36 |

注: * 表示体重与对照组相比差异显著($P < 0.05$); ** 表示体重与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)

Notes: * indicates difference is significant at the 0.05 level; ** indicates difference is significant at the 0.01 level

与对照组同时或在其后面建立的家系确定为快速生长家系,共计有 4 个家系,即 36、42、43 和 57 号家系;有 12 个家系鱼苗(分别为 3、12、21、27、28、35、39、41、51、60、65 和 76 号家系)的体重也明显大于对照组鱼苗体重,其间差异显著,同样,考虑到建家系的时间因素,我们将家系 27、28、35、39、41、51、60、65 和 76 号等家系称为生长较快家系;另外家系 75 号明显比对照组生长慢,将其称为慢速生长家系;剩下的家系的

生长与对照组差异不够显著,将其称为生长速度一般的家系。

利用获得的测量数据对不同杂交组合后代的生长指标进行了初步比较,从图 2 可以看出作为分布于两个不同地理区域的日本群体与抗病群体的杂交后代的生长性能体现出了明显的杂交优势,而同一地理种群内部的自交(黄海群体和抗病群体也属同一地理区域)产生的后代与杂交后代相比则没有体现生长优势。

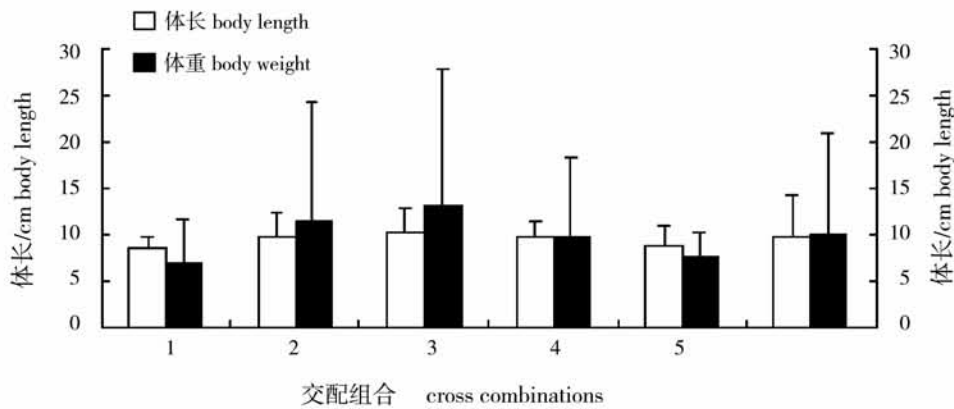


图 2 不同亲本交配组合生长性能的比较

交配组合分别表示为: 1, 日本群体♂×日本群体♀; 2, 抗病群体♂×抗病群体♀; 3, 日本群体♂×抗病群体♀; 4, 抗病群体♂×日本群体♀; 5, 黄海群体♂×抗病群体♀; 6, 抗病群体♂×黄海群体♀

Fig. 2 Comparison of growth characteristic of different cross combinations of flounder

Cross combinations were indicated with 1, JS♂×JS♀; 2, RS♂×RS♀; 3, JS♂×RS♀; 4, RS♂×JS♀; 5, YS♂×RS♀; 6, RS♂×YS♀

2.4 牙鲆不同家系鱼苗的抗病性能

本文对 59 个牙鲆家系进行了抗鳃弧菌感染能力测试。结果表明,在注射鳃弧菌后约 12 h,鱼苗开始出现游动缓慢、活动力差等症状;20 h 开始出现少量死亡,濒临死亡的鱼呈现体色发黑的症状,腹部肿大,体表粘液增多,内脏外露,部分个体出现白便拖粪现象。死亡后短时间内鱼体僵硬。30 h 开始出现死亡高峰,48 h 内死亡数占整个感染中死亡总数的绝大多数,96 h 后基本稳定。对照组为在家系建立中期采用抗病群体和黄海群体交配的鱼苗。根据感染后的鱼种成活率,结合与对照组成活率差异性检验的显著性水平,我们将成活率在 60% 以上的家系定义为抗病力强的家系,将成活率在 39%~60% 的家系定义为抗病力比较强的家系,将成活率在 17%~39% 的家系定义为抗病力一般的家系,将成活率在 17% 以下的家系定义为抗病力差的家系。按此标准,我们初步鉴定出抗病

力强的家系 3 个(家系 50、61 和 68 号),抗病力比较强的家系 17 个(家系 21、22、28、45、49、51、52、53、57、58、59、60、63、64、66、70 和 79),抗病力一般的家系 33 个,抗病力差的家系 6 个(表 2)。

3 讨论

有关鱼类高产、抗病品种培育是目前国际上鱼类良种培育的重要方向和前沿热点研究课题。鉴于高产、抗病品种在水产养殖业可持续发展中的重要意义,国际上一些国家纷纷开展了鱼类抗病、高产品种培育的研究工作。国际上的代表性工作主要集中在鲑鳟鱼类。挪威科学家采用家系建立和基因标记手段进行了大西洋鲑抗病育种的研究工作,分别建立了抗病家系和疾病敏感家系^[12];日本科学家对虹鳟抗病品种培育进行了大量研究,筛选到虹鳟抗病相关 QTL^[13]。这些研究开辟了鱼类抗病育种的新方向,为鱼类抗病良

表2 牙鲆不同家系鱼苗抗鳃弧菌病能力比较

| Tab. 2 Comparison of disease resistance of various families to <i>Vibrio anguillarum</i> | | $\bar{X} \pm S, D$ | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|--|
| 家系 family No. | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | |
| 成活率(%) survival rate | 19.28± 2.31 | 30.62± 2.09 | 23.98± 0.72 | 21.80± 9.77 | 20.78± 6.76 | 19.96± 7.68 | 17.80± 7.45 | 28.73± 0.82 | 21.28± 1.54 | 14.70± 1.30* | |
| 家系 family No. | 19 | 21 | 22 | 23 | 24 | 26 | 27 | 28 | 29 | 32 | |
| 成活率(%) survival rate | 30.86± 7.22 | 43.85± 1.48* | 39.21± 1.71* | 31.74± 1.71 | 25.08± 2.19 | 21.77± 3.05 | 29.15± 9.27 | 44.17± 8.24* | 15.56± 5.32* | 20.79± 1.34 | |
| 家系 family No. | 35 | 36 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 45 | 46 | 47 | |
| 成活率(%) survival rate | 32.11± 1.73 | 37.38± 8.13 | 32.60± 21.25 | 26.62± 3.71 | 30.95± 1.42 | 28.81± 5.38 | 7.27± 3.57* | 42.47± 0.33* | 35.91± 16.85 | 14.29± 3.89 | |
| 家系 family No. | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | |
| 成活率(%) survival rate | 20.39± 2.27 | 48.46± 5.21* | 64.05± 0.74* | 54.13± 1.23* | 47.23± 7.05* | 44.78± 4.61* | 30.54± 1.54 | 23.03± 12.29 | 19.53± 9.15 | 46.26± 4.14* | |
| 家系(%) family No. | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 66 | 68 | 69 | |
| 成活率(%) survival rate | 41.66± 1.39* | 39.40± 3.57* | 44.41± 5.13* | 65.76± 0.63* | 28.09± 7.01 | 41.82± 0.39* | 45.80± 0.73* | 49.39± 2.25* | 62.08± 22.52* | 28.75± 8.64 | |
| 家系 family No. | 70 | 75 | 76 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 89 | 对照 control | |
| 成活率(%) survival rate | 49.90± 3.09* | 26.23± 7.22 | 36.42± 2.77 | 33.97± 0.39 | 44.50± 0.40* | 31.74± 7.37 | 11.34± 10.56* | 12.58± 11.61 | 17.51± 10.00 | 25.24± 8.15 | |

注: * 表示成活率与对照组相比差异显著($P < 0.05$)

Notes: * indicates difference is significant at the 0.05 level

种培育提供了可行性。而在国内,有关牙鲆高产抗病品种选育的研究,目前尚未见报道。

家系选育是培育鱼类新品种的重要途径之一。家系由于具有遗传构成比较均一、亲代和子代的基因型容易测定等特点,因而在水产动物优良品种选育上得到较为广泛的应用。家系选育的另一个重要优点就是通过对全同胞或半同胞家系表型性状的观测,可以对亲本的一些难以测定的性状的育种值进行估计。这样,我们就可以通过家系选育进行肉质和疾病抗性数量性状选育。在家系选育中,还有一个值得注意的问题就是为了维持尽可能低的近交率和尽可能高的选择强度,家系选育中要求家系的数量不能低于50个家系。本文以我们培育的牙鲆抗病群体、日本群体以及黄海野生群体等为基础群体,建立了63个家系,这些家系的数量达到了进行家系选育的要求。生长对比实验初步表明在63个家系中,生长

快速的家系4个(36,42,43和57),生长较快的家系9个,生长最慢的家系1个(75号)。本项研究中获得的几个快速生长家系的体长增长率一般比对照组高23%~29%,这比其他学者在其它鱼类不同家系上观察到的增长率高一些。例如,Gjerde和Korsvoll^[14]在大西洋鲑家系选育上获得14%的增长率,而Rezk等^[15]在斑点叉尾鲷选育中获得20%的增长率。这可能有2方面的原因:一方面充分表明家系选育的有效性,通过家系选育确实能选择出生长快速的家系;另一方面,由于本项研究采用的亲鱼是来自二个不同地理群体的亲鱼,快速生长家系的产生也有不同地理群体之间杂交的效果存在。这些在生长性能上差异明显的不同家系的获得为下一步筛选生长性状相关分子标记以及选育快速生长牙鲆新品种提供了选育材料,奠定了重要基础。

在抗病性能方面,本项研究从59个家系中获

得抗病力强的家系 3 个,抗病力较强的家系 17 个,抗病力一般的家系 33 个,抗病能力差的家系 6 个。抗病力最强的家系和抗病力最差的家系在病原菌感染后的成活率上相差 50% 以上。这些结果表明家系选育方法在抗病品种选育上是有效的。类似的研究工作在大西洋鲑上也开展过。挪威从 1998 年开始,对来自大西洋鲑 50 个家系的 2 000 尾个体进行 *Aeromonas salmonicida* 细菌感染和对 50 个家系的 2500 尾大西洋鲑进行 ISAV(传染性贫血病)病毒的感染实验,从中筛选出抗病力强和疾病敏感家系^[12];同时他们结合 MHC 抗病基因型的筛选,筛选出了抗病性强的 MHC 基因型和易感病的 MHC 基因型。接着,在建立的 F2 代家系中成功筛选出了 2 个抗病基因型家系,并发现了一个易感家系^[16]。此外,日本科学家采用家系建立和微卫星标记技术开展了牙鲆抗淋巴囊肿病毒病品种培育的研究,筛选到抗病家系以及抗淋巴囊肿病毒病相关位点^[17]。

从生长和抗病性能上来看,本文中报道的日本群体和抗病群体之间交配产生的家系表现出较好的生长优势和抗病能力。而中国本地牙鲆之间交配形成的家系,则较少表现出生长快和抗病力强的优势。这种优势可能既有抗病牙鲆亲鱼所贡献的抗病潜力,同时可能也有日本牙鲆群体和中国抗病群体之间所产生的物种内杂交优势。当然,本项研究获得的这些家系还需要采用基因标记以及分子标记等分子生物学手段进行进一步的分析论证。

总之,本文在国内首次开展了牙鲆抗病和高产品种选育的研究,采用群体选育、家系选育和种内杂交等多项技术,建立了 63 个牙鲆家系,获得了一些生长快速、抗病能力强的牙鲆家系。为牙鲆抗病、高产新品种的选育奠定了重要基础,为我国海水鱼类抗病品种培育开辟了一条新途径。本文所建立的方法在其它养殖鱼类上具有重要应用价值。

感谢中国水产科学研究院黑龙江水产研究所刘海金研究员在我们引进牙鲆日本群体中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 周丽,宫庆礼,俞开康. 牙鲆的疾病[J]. 青岛海洋大学学报,1997,27(2):173-180.
- [2] 邹曙明,李思发,蔡完其. 牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异[J]. 中国水产科学,2000,7(4):311-316.
- [3] 尤锋,王可玲,相建海,等. 山东近海褐牙鲆自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析[J]. 海洋与湖沼,2001,32(5):512-518.
- [4] Sekino M, Hara M. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Marine Biotechnology,2001,3: 572-589.
- [5] Liu Y, Chen S, Li B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2005a, 243:103-111.
- [6] Liu Y, Chen S, Li B, et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33: 993-1005.
- [7] 陈微,张全启,于海洋,等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 中国水产科学,2005,12: 682-687.
- [8] 张玉喜,陈松林. 牙鲆 MHCII B 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的研究[J]. 水产学报,2006, 30(5):633-639.
- [9] 刘云国,陈松林,刘占江. 牙鲆抗鳃弧菌病 AFLP 分子标记的筛选[J]. 中国水产科学,2007,14: 155-159.
- [10] 邵长伟,廖小林,田永胜,等. 牙鲆三个不同地理群体遗传结构的微卫星分析[J]. 海洋水产研究,2008,29(4).
- [11] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [12] Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, et al. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci [J]. Immunogenetics,2003,55, 210-219.
- [13] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S K, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Mol Genet Genomics, 2001,265, 23-31.
- [14] Gjerde B, Korsvoll A. Realized selection differential for growth rate and early sexual maturity in Atlantic salmon [C]. Abstracts, Aquaculture Europe 99,

- Trondheim, Norway, August 1999,7-10,73-74.
- [15] Rezk M A, Smitherman R O, Williams J C, *et al.* Response to three generations of selection for increased bodyweight in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, growth in earthen ponds [J]. *Aquaculture*, 2003,228:69-79.
- [16] Kjøglum S, Larsen S, Bakke H G, *et al.* How specific MHC class I and II combinations affect disease resistance against salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Fish Shell Immunol*, 2006,21:431-441.
- [17] Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, *et al.* Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2006,254:203-210.
-

欢迎订阅 2009 年度《南方水产》

《南方水产》是由中国水产科学研究院南海水产研究所主办,国内外公开发行的综合类水产科技期刊。主要报道渔业资源、捕捞技术、渔业设施、渔业环境保护、水产养殖与增殖、渔业生物病害、水产品加工与综合利用以及水产基础研究等方面的研究论文、研究简报、综述等。

《南方水产》立足南方,面向全国,突出学术性、地域性、实用性、可读性,重点报道我国南方地区渔业科研、生产的新技术、新成果及新动向。

《南方水产》为双月刊,80页,大16K,逢双月5日出版。国内统一连续出版物号:CN 44-1619/S,国际标准连续出版物号:ISSN 1673-2227。邮发代号 46-65,每期定价 8 元,全年 6 期 48 元(含邮费)。

从 2008 年开始,本刊内文采用进口铜版纸印刷,价格不变,欢迎订阅!读者可到当地邮局订阅,也可将款汇至《南方水产》编辑部订阅或补订。

通讯地址:广州市新港西路 231 号《南方水产》编辑部

邮 编: 510300

电 话: 020-84458694 传真: 020-84451442

网 址: <http://SchinafiSh.cn>

E-mail: msc@vip.163.com

Development and characterization for growth rate and disease resistance of disease-resistance population and family in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

CHEN Song-lin¹, TIAN Yong-sheng¹, XU Tian-jun^{1,2}, DENG Han¹, LIU Shou-tang³,
LIU Ben-wei¹, JI Xiang-shan¹, YU Guo-cai¹

- (1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;
3. Huanghai Aquaculture Ltd., Haiyang 265100, China)

Abstract: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is a widely cultured marine fish species in China and is high valued because of its fast growth and good taste. However, diseases of the cultured fish have occurred frequently and losses due to infectious diseases limit profitability and development of aquaculture. To breed new flounder strain with enhanced disease-resistance and growth rate is an important task in marine fish aquaculture. In the present study, 94 disease-resistant individuals selected from natural selection and artificial challenge by pathogenic bacteria, *Vibrio anguillarum*, were used as one of basic populations for developing family. Japanese population of the flounder were imported from Japan in 2003 and used as one of basic populations. In addition, the flounder captured from Yellow sea were used as one of the basic population for developing family. Different mating of the above three populations resulted in 63 families in which 54 families are half-sibling family, 9 families are full-sibling families. Growth comparison demonstrated that there are big differences in growth rate among the 63 families. Some families exhibited fast growth while some families grow very slowly. Among the 63 families, 4 fast-growth families (Family 36, 42, 43 and 57), 9 secondly fast-growth families (Family 27, 28, 35, 39, 41, 51, 60, 65 and 76), and one slow-growth family (75) were identified. Bacterial challenge experiments demonstrated that there are big differences in disease resistance among the 59 tested families. Some families exhibited strong disease resistance to bacterial infection, while some families are not resistant to bacterial challenge. Among the 59 families, 3 families (Family 50, 61 and 68) with strong disease resistance with a survival rate of over 60% were identified, 17 families with secondly strong disease resistance with a survival rate of 39% – 60%, 33 families with normal disease resistance with a survival rate of 17% – 39%, and 6 families with low disease resistance with a survival rate of less than 17% were identified. Development of the 63 families lay foundation for selective breeding of flounder strains with fast growth and disease resistance.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; Japanese population; disease-resistant population; Huanghai population; family; selection breeding; growth rate; disease resistance