

牙鲆抗迟缓爱德华菌病家系建立与抗病性能评价

张英平^{1,2}, 陈松林^{1*}, 孙何军^{1,2}, 王磊^{1,3}, 范彩霞^{1,2},
于洋¹, 张文婷¹, 杨英明¹, 张永珍¹, 田永胜¹,
邓寒¹, 陈红林¹, 刘肖峰¹, 吴娅红¹

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

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 河南师范大学水产学院,河南 453007)

摘要:为筛选出抗迟缓爱德华菌的牙鲆家系,实验以已经选育出的牙鲆抗病和快速生长家系以及从韩国引进的选育群体为亲本建立了牙鲆家系 56 个,并对其中 32 个家系进行了迟缓爱德华菌人工感染实验。确定了迟缓爱德华菌对牙鲆家系的半致死浓度 LD_{50} 为 3.69×10^5 CFU/mL 后,从每个家系中随机抽取 75 尾,按照 0.2 mL/10 g 体质量腹腔注射半致死浓度的菌液,并设置 1 次重复。人工感染时水温控制在 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。从 32 个家系中共选取 4 800 尾 5 月龄牙鲆幼鱼进行感染,16 d 实验结束后统计各家系存活率为 8.2%~66.1%,平均存活率为 31.2%。不同家系对迟缓爱德华菌的抗感染能力表现出显著差异 ($P < 0.05$)。筛选出 6 个存活率高于 45% 的抗病家系,发现 2007 年筛选出的抗鳃弧菌病家系 F0768 的后代家系在迟缓爱德华菌感染后的存活率普遍很高,表现出抗迟缓爱德华菌病的能力。研究为选育抗鳃弧菌病和抗迟缓爱德华菌病的牙鲆优良品系奠定了基础,对牙鲆抗细菌病的分子机理研究及抗病新品种选育具有重要意义和应用价值。

关键词:牙鲆;迟缓爱德华菌;家系;抗病力;选育

中图分类号:S 941

文献标志码:A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为冷温性、底栖型海水鱼类,是中国、日本和韩国等国家的重要海水养殖经济鱼类。1992 年以来,牙鲆人工养殖业发展迅速,山东、河北、辽宁等地大规模开展了牙鲆工厂化、网箱和池塘养殖,取得了良好的经济和社会效益。但是,长期的近亲交配和高密度养殖导致牙鲆种质退化,生长变慢,抗病力下降,导致病害频发,产量下降,给牙鲆养殖产业带来巨大经济损失。传统的鱼病治疗方法主要靠使用抗生素,而抗生素的大量使用不仅会产生药物残留、耐药性和环境污染等问题,而且对消费者的健康也存在潜在的影响。因此,采用现代生物技术,培育抗病力高的牙鲆新品种迫在眉睫,成为国家和产业发展的重大需求。

迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)为革兰氏阴性短杆菌,具有运动性^[1]。1962 年,Hoshina^[2]发现热灭活的迟缓爱德华菌细胞对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)有致死作用。该菌在自然条件下广泛存在,是一种条件致病菌^[3],并且宿主种类很多,包括海、淡水养殖的鲫(*Carassius auratus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、真鲷(*Pagrosomus major*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、牙鲆^[4-5]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[6]、澳洲宝石鱼(*Scortum barcoo*)^[7]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[8-9]等,另外,牛蛙(*Rana catesbiana* Shaw)^[10]和中华鳖(*Trionyx sinensis*)^[11]也有感染的报道。细菌病是危害牙鲆

收稿日期:2014-02-15 修回日期:2014-04-25

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A408);国家“九七三”计划(2010CB126303);山东省自主创新重大专项(2013CXC80202);山东省泰山学者工程专项

通信作者:陈松林,E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

的主要疾病,迟缓爱德华菌感染后导致牙鲆腹水病,该病具有感染率高,感染后死亡迅速,患病前期不易被发现等特点,是目前牙鲆的主要病害之一,对牙鲆养殖业危害巨大。目前迟缓爱德华菌病的防治主要有化学药物治疗法、免疫学治疗法和生物防治三种方法^[12]。药物治疗主要是抗生素治疗,迟缓爱德华菌的耐药性已有报道,1977年,Aoki等^[13]从该菌中分离到了抗药性质粒,后来发现其耐药性越来越强,而且呈多重抗药性^[14-15];传统的免疫疗法效果不理想,生物防治也处于初级阶段,可见,虽然国内外对迟缓爱德华菌进行了大量研究,但其致病机理仍没有彻底查清楚,也没有有效防治迟缓爱德华菌病的方法。通过家系选育结合现代生物技术培育抗病品种,是解决牙鲆病害问题的重要途径。

在牙鲆抗病育种研究方面,日本科学家开展了牙鲆抗淋巴囊肿瘤病毒病品种培育的研究,筛选到抗病家系以及抗淋巴囊肿瘤病毒病相关位点^[16-17];张玉喜等^[18]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^[19]采用AFLP技术初步筛选到牙鲆抗病相关的分子标记;陈松林等^[20-21]利用自然选择和人工感染建立了抗鳃弧菌病群体,对牙鲆家系的抗鳃弧菌能力进行了筛选和分析;王磊等^[22]在国内首次建立了牙鲆抗病家系的F₂、F₃家系和雌核发育一代和二代家系,

并对它们的抗病力进行了研究,筛选到抗病力强的家系并且分析了历年来获得的10个抗病力强的F₁家系的亲本来源。虽然在牙鲆抗病育种方面已经有以上研究报告,但是以前抗病育种的研究主要是针对淋巴囊肿病和鳃弧菌病,而有关牙鲆迟缓爱德华菌病的研究,大多是研究细菌本身及其致病机理^[2,23],以及牙鲆对细菌感染后的反应机理,人工感染实验也仅仅局限于测定半致死浓度^[24]和感染方法^[25],尚无牙鲆抗迟缓爱德华菌家系选育的报道。有关牙鲆抗鳃弧菌和抗迟缓爱德华菌病的双抗家系筛选的研究迄今也尚未见报道。本实验主要以2007年和2009年本研究室筛选出的牙鲆抗鳃弧菌病家系为亲本建立家系,并对这些家系抗迟缓爱德华菌的性能进行了评价,旨在获得对抗鳃弧菌病和迟缓爱德华菌病有稳定抵抗力的双抗家系,从而为牙鲆抗多种细菌病的良种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼 亲鱼来源包括2007年建立的生长快、成活率高的优良家系亲本群体;韩国群体(KS)及其自交后代;2009年在抗鳃弧菌感染、抗淋巴囊肿瘤病毒(LCDV)、养殖成活率和日增重率这几项指标中表现优良的家系群体。实验家系配组采用不完全双列杂交(表1)。

表1 实验家系组合方式
Tab.1 The combination modes of experimental families

母本(♀)	父本(♂)										
	F1005	F0905	F0908	F0915	F0917	F0927	F0990	F09121	F0768	F0751	KS
F1005	1					1					
F0905			1		1			1			1
F0908		1	1	1	1			1		1	
F0915			1	1			1		1		
F0927			1								
F09121				1				1			
F0768			1								
F0719				1							1
KS											1

注:1表示这两个家系的组合建立了实验家系

Notes:1 means that the combination of these two family was mated

迟缓爱德华菌培养 迟缓爱德华菌株由中国海洋大学张晓华老师惠赠。用划线法接种在TSA琼脂平板上,挑取单菌落接种于TSB培养基

中,将接种后的培养基放在震荡培养箱中,28℃,200 r/min培养约24 h,测定OD₆₀₀值,培养至菌液浓度达到1.0 OD时,即对数生长中期,取出,4℃

保存备用。人工感染前,将培养好的菌液以 8 000 r/min 的转速离心 15 min,每次离心完毕倒掉上清液,并用 1 × PBS 进行吹洗,连续离心 3 次,将菌液用 1 × PBS 稀释到测定出的半致死浓度,立即注射,存放时间不宜过长。

1.2 家系建立和实验用鱼培育

本实验在海阳市黄海水产有限公司完成。2013 年 2 月开始对亲鱼进行室内营养强化培育,2 月中旬开始升温,2 月底升到 11 °C,3 月中旬升到 14 ~ 15 °C,到 4 月底即可发育成熟。2013 年 4 月底开始建立家系,共建成家系 56 个,家系建立方法参照陈松林等^[21]。人工授精后,将上浮卵倒入 25 cm × 25 cm × 80 cm 孵化网箱中,充气孵化,死亡的卵发白沉底,早、中、晚各吸底 1 次,清除网箱底部的死卵,防止水质变坏,受精卵发育到胚体转化期时,收集孵化网箱中的上浮受精卵 20 mL 布入 2.5 m³ 水槽中孵化和育苗,水温保持在 15 ~ 18 °C,约 24 h 左右出膜。在实验用鱼生长至 15 d 时对家系养殖数量进行第 1 次标准化,每个家系鱼苗数量保持在 10 000 尾左右。在实验鱼 2 月龄和 3 月龄时,再对每个家系养殖数量进行标准化,分别从每个家系随机抽取 2 000 和 600 尾继续养殖。经过 3 次数量调整后不再调整,幼鱼培育到 5 月龄时,开始实验。保持养殖水温为 20 ~ 23 °C。

1.3 牙鲆迟缓爱德华菌人工感染实验

确定半致死浓度 人工感染方法同王磊等^[22]。鱼苗达到 5 月龄后,从建立的 56 个家系中,挑选出 32 个家系进行人工注射感染实验,实验前 1 天停止投喂饲料,从 32 个家系中各随机选取 7 尾,平均放到 7 个鱼缸中,每个鱼缸共 32 尾。用灭菌的 PBS 溶液把原菌液稀释到 4.33×10^9

CFU/mL,并把菌液分别按照不稀释、稀释 50 倍、100 倍、200 倍、500 倍和 1 000 倍稀释到 6 个浓度梯度,另加一个灭菌 PBS 溶液对照组,总共 7 组进行注射,分别编号为 A1、A2、A3、A4、A5、A6 和 A7。采用腹腔注射法^[26]注射不同浓度的迟缓爱德华菌液,每 3 h 观察 1 次,记录结果。注射 12 h 后视每个家系摄食情况适当投喂饲料。

感染实验 迟缓爱德华菌对牙鲆半致死浓度确定后,从每个家系中随机抽取 75 尾,按照 0.2 mL/10 g 体质量腹腔注射半致死浓度的菌液,并设置 1 次重复实验。实验时水温控制在 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$,每个家系实验用鱼独立养殖,保持流水和通气。注射菌液后每 2 h 观察 1 次,记录每个家系实验鱼的体色变化、活力大小、摄食强弱、有无发病症状和死亡时间等信息,及时捞出死鱼,测量其全长(从吻端到尾鳍末端)、体质量,并剪取鳍条保存,在实验结束时,记录每个家系的存活数目,测量存活鱼的全长和体质量。

1.4 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对前后两次实验结果进行配对样本 *t* 检验,检测有无差异;计算各家系感染后存活率的平均值和标准差,进行单因素方差分析,最小显著差法进行多重比较,找出抗病家系;计算各家系体长、体质量的平均值和标准差,分析其与抗病力之间是否有相关性。

2 结果

2.1 半致死浓度测定结果

A7(对照组)没有出现死亡,A1(原菌液)组全部死亡。通过实验得到迟缓爱德华菌对牙鲆的 168 h 半致死浓度 LD_{50} 为 3.69×10^5 CFU/mL(表 2)。

表 2 注射不同浓度菌液牙鲆的感染情况

Tab. 2 The mortality of Japanese flounder injected with different concentration of bacteria

分组 group	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	感染鱼数/尾 infected fish	死亡总数/尾 totality of dead fish	死亡/% mortality
A1	8	13	9	2	0	0	32	32	100
A2	0	0	1	12	15	2	32	30	93.8
A3	0	0	0	5	23	1	32	29	90.6
A4	0	0	0	3	20	3	32	26	81.3
A5	0	0	1	1	10	8	32	20	62.5
A6	0	0	0	1	4	8	32	13	40.1
A7	0	0	0	0	0	0	32	0	0

2.2 不同家系感染迟缓爱德华菌结果

在对 32 个家系共约 4 800 尾牙鲈 5 月龄鱼苗进行迟缓爱德华菌人工感染后,第 1~3 天,所有家系鱼摄食量和活力明显下降,偶有上浮,缸底出现数量不同的白便,第 3 天开始出现死鱼,无明显症状。第 4 天大部分家系鱼已出现死亡,部分实验鱼腹部不同程度隆起。第 5~6 天为死亡高峰期,实验第 12 天,所有家系日死亡数低于 10 尾,第 16 天未再出现死亡,实验结束,整个实验过程中有 95% 以上死亡个体出现腹水。

对前后两次实验结果进行配对样本 *t* 检验,

无明显差异 ($\text{sig.} = 0.468 > 0.05$)。各家系存活率在 8.2%~66.1% 之间,平均存活率为 31.2%。将 32 个家系按照抗病力从高到低排序,如图 1 所示,可以看出 F1331、F1305、F1334、F1333、F1323 和 F1337 这 6 个家系的抗病力在 45% 以上,优于其他家系,单因素方差分析表明,这 6 个家系与其他家系有显著差异 ($P < 0.05$)。根据存活率和标准差,将上述 6 个抗病力较强家系定义为抗病家系,占有家系的 18.8%,将抗病力低于 19% 的 6 个家系定义为易感家系,占有家系的 18.8%。

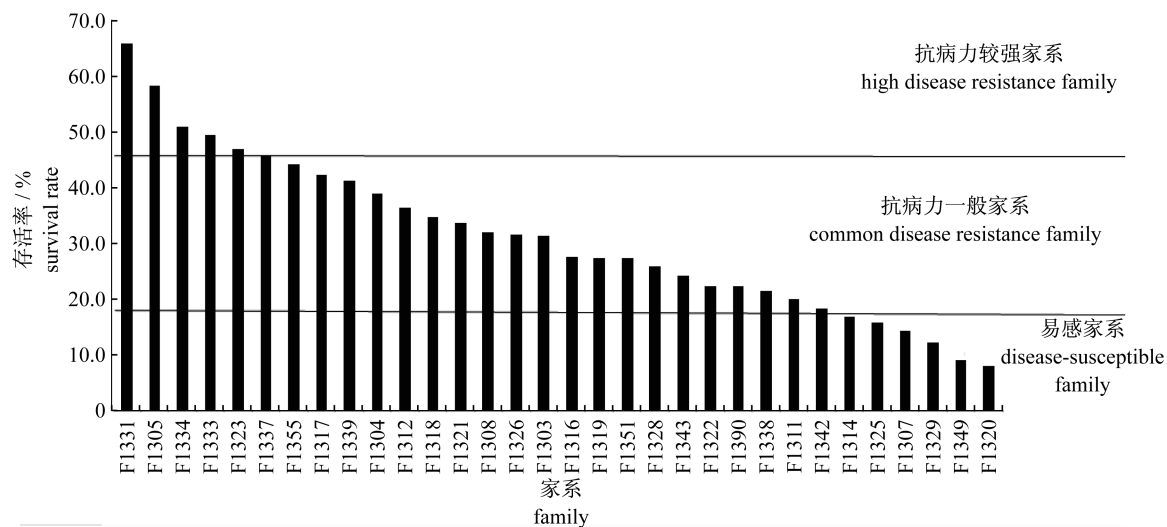


图 1 不同家系迟缓爱德华菌感染后的存活率比较

Fig. 1 Comparison of different families for their survival rate after artificial infection

2.3 对迟缓爱德华菌不同抵抗力家系发病情况分析

易感家系在注射迟缓爱德华菌后第 3 天开始出现死亡,第 5~6 天进入死亡高峰期,第 8 天即达到稳定状态;抗病家系在注射后第 5 天开始出现死亡,第 6~8 天进入死亡高峰期,第 10 天达到稳定状态(图 2)。易感家系人工感染后,发病早,死亡迅速,发病周期短,死亡率高。抗病家系表现为发病晚,死亡慢,发病周期较长。两者患病个体症状无差异,抗病家系的最终存活率明显比易感家系高。

2.4 后代强抗病力亲本的选择

不同父母本家系抗病力分析 把 32 个家系按照父母本的交配组合分组,其中父系半同胞家系为 F0905、F0908、F0915 和 F1005;母系半同胞家系包括 KS、F0905、F0915、F0908、F0768、

F09121 和 F1005;自交系包括 KS、F0908、F0915 和 F09121。以 F0915 和 F1005 为父本的所有家

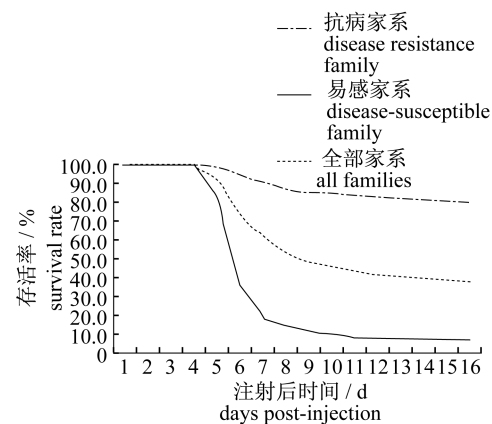


图 2 不同抗病能力家系存活率变化

Fig. 2 The change of survival rate of different disease resistance families

系平均存活率为 40.6% 和 39.1%,明显高于其他家系,变异系数分别为 22.1% 和 42.9%;以

F0768 为母本的家系平均存活率最高,达到 47.7%,变异系数也最低,只有 5.8% (表 3)。

表 3 不同父母本家系抗病力分析

Tab. 3 Disease resistance analysis about different family's parents

家系 family	平均存活率 (mean ± SD)/% average survival rate	变异系数/% coefficient of variation	家系 family	平均存活率 (mean ± SD)/% average survival rate	变异系数/% coefficient of variation
F0768 ♀	47.7 ± 2.8	5.8	F0905 ♂	32.8 ± 20.6	62.7
F1005 ♀	46.1 ± 17.3	37.4	F0908 ♀	32.4 ± 23.9	73.9
F0915 ♂	40.6 ± 9.0	22.1	KS ♀	28.3 ± 10.0	35.4
F1005 ♂	39.1 ± 16.7	42.9	F0908 ♂	28.2 ± 13.7	48.7
F0917 ♀	35.6 ± 13.9	39.1	F0915 ♀	27.8 ± 7.8	28.2
F09121 ♀	33.5 ± 2.1	6.1	自交系	25.5 ± 15.4	60.4

注:F ♀ 表示以家系 F 为母本. F ♂ 表示以家系 F 为父本

Notes:F ♀ means that it is the female parent of the family. F ♂ means that it is the male parent of the family

抗病家系系谱分析 由家系系谱分析可以看出,在抗病家系中,F0908 和 F0768 做亲本的所占比例最大,达到 25%,6 个抗病家系的亲本有 41.7% 与 KS 群体有亲缘关系;易感家系中,

F0908 做亲本的所占比例最大,达到 33.3%,F0768 后代没有易感家系。综上所述,F0768 做亲本其后代抗病力普遍较强,抗病力遗传稳定性优于 F0908 家系(图 3)。

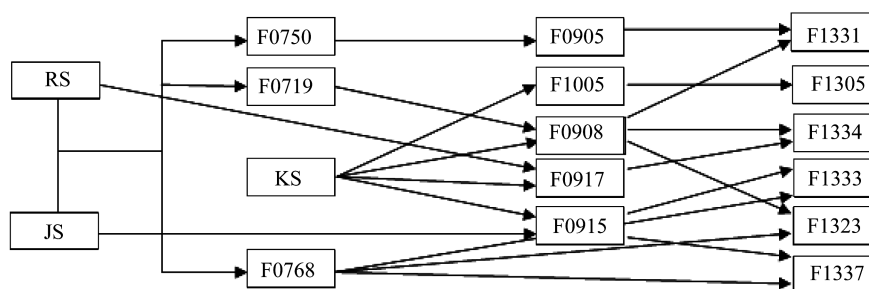


图 3 抗病家系系谱

箭头所指方向为该家系的后代,只有一条箭头的是自交家系

Fig. 3 The family trees of disease resistance family

Direction of the arrow is for the family's posterity, which has only one arrow is the family self-cross inbred

2.5 各家系生长性状测量结果及其与抗病力相关性分析

通过对 32 个家系生长性状的测量,对其均值,标准差和差异性(表 4)进行相关性分析,发现全长与体质量相关性都在 0.86 以上,都达到了极显著水平($P < 0.01$);对 32 个家系内抗病个体与易感个体和所有家系抗病个体与易感个体的全长和体质量进行单因素方差分析,发现 18 个家系在全长上有显著差异($P < 0.05$),其中 16 个有极显著差异($P < 0.01$),差异显著家系所占总体的比例达到 56.3%。18 个家系在体质量上有显著差异($P < 0.05$),其中 13 个家系有极显著差异($P <$

0.01),差异显著的家系占总体的比例达到 56.3%。全部家系所有抗病个体与易感个体的全长和体质量差异性极显著($P < 0.01$);结合抗病力与之进行分析,发现 6 个抗病家系中,有 4 个家系全长和体质量差异均不显著,2 个差异显著。6 个易感家系中,有 4 个家系全长和体质量差异性均极显著,1 个家系差异不显著,1 个体长差异性不显著,体质量差异性极显著。全长和体质量大小的差异性表现在抗病个体均值高于易感个体均值。以上表明,总体情况下,抗病个体全长和体质量均值高于易感个体,生长性状与抗病家系的相关性低于易感家系,且因家系而异。

表 4 各家系生长性状
Tab. 4 Comparison of growth characteristics of different families

家系 family	全长/cm length	体质量/g weight	家系 family	全长/cm length	体质量/g weight
	平均值 average mean ± SD			平均值 average mean ± SD	
F1321	17.0 ± 1.63	39.1 ± 10.6	F1309	17.9 ± 1.88 *	44.9 ± 12.0 *
F1307	15.5 ± 1.79	31.5 ± 10.7	F1351	16.4 ± 3.09 **	40.5 ± 20.7 *
F1339	14.9 ± 1.92	27.3 ± 10.2	F1320	14.4 ± 1.9 **	25.9 ± 10.8 **
F1323	16.9 ± 1.87	40.0 ± 13.1	F1316	16.0 ± 1.92 **	33.2 ± 11.4 *
F1305	17.6 ± 1.88	42.9 ± 13.3	F1318	18.8 ± 1.98 **	58.4 ± 16.1 **
F1311	14.7 ± 1.76	27.6 ± 10.3	F1319	16.9 ± 2.05 **	40.3 ± 13.4 **
F1331	16.3 ± 1.72	33.6 ± 10.3	F1314	16.2 ± 1.94 **	35.2 ± 12.9 **
F1342	16.6 ± 1.85	42.0 ± 14.2	F1349	12.4 ± 1.97 **	17.1 ± 8.6 **
F1312	18.6 ± 1.67	52.7 ± 13.9	F1329	16.4 ± 1.8	38.3 ± 10.6 **
F1337	15.4 ± 2.23	31.5 ± 13.6	F1333	17.3 ± 1.96 **	42.3 ± 13.2 **
F1343	15.7 ± 1.75	33.7 ± 10.8	F1334	18.0 ± 2.14 **	48.2 ± 13.4 **
F1303	17.1 ± 1.62 **	40.6 ± 10.6	F1304	17.8 ± 1.87 **	46.6 ± 15 **
F1328	17.8 ± 1.69	45.6 ± 12.9	F1308	19.1 ± 1.74 **	60.2 ± 15.5 **
F1317	15.9 ± 1.7 **	32.7 ± 10.5	F1322	17.1 ± 2.41 **	41.7 ± 15.1 **
F1355	15.5 ± 2.11	30.7 ± 12.8 *	F1338	15.7 ± 2.21 **	32.7 ± 13.3 **
F1326	15.8 ± 1.55	32.5 ± 9.6 *	F1325	16.7 ± 1.98 **	38.0 ± 11.7 **
总数 all families	16.5 ± 2.37 **	38.0 ± 15.5 **			

注: * 表示抗病个体全长和体质量与易感个体相比差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示抗病个体全长和体质量与易感个体相比差异极显著 ($P < 0.01$)

Notes: * body length and body weight indicate difference is significant at the 0.05 level between survival and death in the family. ** body length and body weight indicate difference is significant at the 0.01 level between survival and death in the family

3 讨论

测得迟缓爱德华菌对本次研究家系的 168 h 半致死浓度 LD_{50} 为 3.69×10^5 CFU/mL, 略高于高晓田等^[24]测定的半致死浓度 2.1×10^5 CFU/mL, 比 Matsuyama 等^[26]测得的 5.8×10^5 CFU/100 g 体质量高。比刘云等^[25]测定的半致死浓度 5.01×10^6 CFU/mL 低 1 个数量级。迟缓爱德华菌对牙鲆的半致死浓度测定结果的不同, 可能是由所用的实验材料不同、实验条件不同和实验标准不同 3 个方面的原因引起的。

鳎^[27]、牙鲆^[4,28]、大菱鲆^[8-9]等多种水产养殖动物感染迟缓爱德华菌后会出现摄食量和活力明显下降, 腹腔膨大, 腹膜软化出血, 内脏肿大甚至外漏, 肝、肾等组织局灶性坏死^[28]等临床症状, 这些临床症状与本研究所观察到的基本一致。另外, 本研究发现牙鲆家系人工感染迟缓爱德华菌具有易感率高, 症状表现突出, 发病经过类似自然感染, 整个实验周期至少需要 16 d, 不同家系抗

病力差异明显等特点。

本研究显示, 抗病力最强的和最差的家系在病原菌感染后的平均成活率上相差 57.9%, 这与陈松林等^[21]在对牙鲆鳎弧菌感染后得出抗病力最强的和最差的家系成活率上相差 50% 以上的结论相同。本研究获得了 6 个存活率高于 45% 的抗病家系, 发现以 F0915 和 F1005 做父本的所有家系平均存活率明显高于其他家系, 以 F0768 为母本的家系平均存活率最高; 除以 F09121 和 F0768 为母本的家系存活率变异系数很小 ($C.V \leq 6.1\%$) 外, 其他家系存活率的变异系数均大于 20%; 牙鲆家系抗迟缓爱德华菌性能优良的家系其抗病性能与生长性状相关性较小, 对迟缓爱德华菌易感的家系其抗病性能与生长性状相关性较大, 存在差异性; F0768 家系的后代抗迟缓爱德华菌感染的能力普遍较强。

F0768 家系是 2007 年筛选出的抗鳎弧菌病家系^[21], 在本项研究中其后代又表现出抗迟缓爱德华菌病的能力, 可以以此为基础培育针对这两

种细菌病的双抗家系,这对于牙鲆抗细菌病良种选育研究具有重要意义。而有关鱼类多抗家系的筛选及多抗新品种的培育,目前国内外未见报道。本研究首次表明 2007 年筛选出的抗鳗弧菌病家系 F0768 后代对迟缓爱德华菌也有较强的抗病能力,为牙鲆抗多种细菌性疾病优良品种的选育奠定了重要基础。

参考文献:

- [1] Zhou L, Gong Q L, Yu K K. Diseases of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Ocean University of Qingdao: Natural Science, 1997, 27 (2): 173 - 180. [周丽, 宫庆礼, 俞开康. 牙鲆的疾病. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 1997, 27 (2): 173 - 180.]
- [2] Hoshina T. Studies on red disease of eels [J]. Journal of Tokyo University of Fisheries, Special Report, 1962, 8: 100 - 104.
- [3] Jin X H, Huang W Q, Xia Y J, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against *Edwardsiella tarda* [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2000, 16 (2): 168. [金晓航, 黄威权, 夏永娟, 等. 抗迟缓爱德华菌单克隆抗体的制备及鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16 (2): 168.]
- [4] Zhang X J, Zhan W B, Chen C Z, et al. Studies on the infection and pathogen of *Edwardsiella tarda* in flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29 (1): 31 - 37. [张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究. 水生生物学报, 2005, 29 (1): 31 - 37.]
- [5] Zhu Z C, Shi X G, Zhang S J, et al. The pathogenic bacteria of the ascites in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fisheries Science, 2006, 25 (7): 325 - 329. [朱壮春, 史相国, 张淑杰, 等. 牙鲆腹水病病原研究. 水产科学, 2006, 25 (7): 325 - 329.]
- [6] Deng X Y, Luo W, Tan S H, et al. Isolation and identification of bacteriosi pathogen-*Edwardsiella tarda* from yellow cartfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with red head disease [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2008, 39 (5): 511 - 516. [邓先余, 罗文, 谭树华, 等. 黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) “红头病”病原菌迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 的分离及鉴定. 海洋与湖沼, 2008, 39 (5): 511 - 516.]
- [7] Ye X H, Lin X G, Wang Y M. Identification and detection of virulence gene of the pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* in cultured *Scortum barcoo* [J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40 (1): 50 - 54. [叶旭红, 林先贵, 王一明. 养殖澳洲宝石鱼迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及致病基因的检测. 淡水渔业, 2010, 40 (1): 50 - 54.]
- [8] Wang Y G, Qin L, Zhang Z, et al. Edwardsiellosis in cultured *Scophthalmus maximus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31 (4): 487 - 495. [王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲆的爱德华氏菌病. 水产学报, 2007, 31 (4): 487 - 495.]
- [9] Qin L, Wang Y G, Zhang X J. Pathological study on turbot *Scophthalmus maximus* (L.) affected by *Edwardsiella tarda* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (3): 411 - 419. [秦蕾, 王印庚, 张晓君. 迟钝爱德华氏菌感染大菱鲆的病理学研究. 中国水产科学, 2009, 16 (3): 411 - 419.]
- [10] Xiao K Y, Huang Z J. Studies on the pathogenicities and biologic characteristics of the pathogens causing the Edwardsiellosis of the Bullfrog [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21 (3): 316 - 321. [肖克宇, 黄志坚. 牛蛙爱德华氏菌病原菌的鉴定和致病因素的研究. 水产学报, 1997, 21 (3): 316 - 321.]
- [11] Cai W Q, Sun P F, Liu Z Z. Studies on the pathogeny and tissue pathology of Edwardsiellosis in *Trionyx sinensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21 (4): 428 - 433. [蔡完其, 孙佩芳, 刘至治. 中华鳖爱德华氏菌病原和组织病理研究. 水产学报, 1997, 21 (4): 428 - 433.]
- [12] Zheng D H, Mai K S. Review of studies on *Edwardsiella tarda* [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2004 (1): 52 - 59. [郑大海, 麦康森. 迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 研究概况. 海洋湖沼通报, 2004 (1): 52 - 59.]
- [13] Aoki T, Arai T, Egusa S. Detection of R plasmids in naturally occurring fish-pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda* [J]. Microbiol Immunol, 1977, 21 (2): 77 - 83.
- [14] Aoki T, Kitao T. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds [J]. Fish Pathology, 1981, 15 (3 - 4): 277 - 281.
- [15] Choi M S, Park K H, Choi H S. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from cultured-eel [J]. Fisheries Science research, 1995, 11: 141 - 150.

- [16] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, *et al.* Maker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 291-295.
- [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(1-4): 203-210.
- [18] Zhang Y X, Chen S L. Full length cDNA cloning and tissue expression analysis of major histocompatibility complex (MHC) II B from turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2006, 16(8): 859-863. [张玉喜, 陈松林. 大菱鲆 MHC II B 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析. 高技术通讯, 2006, 16(8): 859-863.]
- [19] Liu Y G, Chen S L, Liu Z J. Screening of AFLP markers for *Vibrio anguillarum* resistance in Japanese flounder [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(1): 155-159. [刘云国, 陈松林, 刘占江. 牙鲆抗鳃弧菌病 AFLP 分子标记筛选. 中国水产科学, 2007, 14(1): 155-159.]
- [20] Xu T J, Chen S L. Comparative analysis of disease resistance among Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010(1): 59-68. [徐田军, 陈松林. 牙鲆抗鳃弧菌病家系筛选及其分析. 中国水产科学, 2010(1): 59-68.]
- [21] Chen S L, Tian Y S, Xu T J, *et al.* Development and characterization for growth rate and disease resistance of disease-resistance population and family in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 665-673. [陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 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. 水产学报, 2008, 32(5): 665-673.]
- [22] Wang L, Chen S L, Zhang Y P, *et al.* Comparative analysis of disease resistance among three successive generations of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 990-996. [王磊, 陈松林, 张英平, 等. 牙鲆连续三代抗鳃弧菌病家系的筛选与分析. 中国水产科学, 2013, 20(5): 990-996.]
- [23] Suprato H, Nakai T, Muroga K. Toxicity of extracellular products and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in the Japanese eel and flounder [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1995, 7(4): 292-297.
- [24] Gao X T, Wang Y M, Xiao G H. Determination of half lethal concentration of *Edwardsiella tarda* to Japanese flounder [J]. *Hebei Fisheries*, 2007(7): 13-14. [高晓田, 王玉梅, 肖国华. 迟钝爱德华氏菌对牙鲆半致死浓度的测定. 河北渔业, 2007(7): 13-14.]
- [25] Liu Y, Liu Y K. Infection experiments with *Edwardsiella tarda* in the bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*): an evaluation of four different challenge methods [J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(2): 8-11. [刘云, 刘允坤. 牙鲆迟缓爱德华氏菌急性感染实验: 4 种不同方法的比较. 海洋科学, 2001, 25(2): 8-11.]
- [26] Matsuyama T, Fujiwara A, Nakayasu C, *et al.* Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 598-607.
- [27] Bo Q R, Jeremy C, Huang X M, *et al.* Pathological and pathogenic study on Edwardsiellosis in eels [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(3): 258-260. [薄清如, Jeremy Carson, 黄新民, 等. 鳃弧菌爱德华氏菌病的诊断和病原学研究. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 258-260.]
- [28] Liu Y, Jiang M, Jiang G L, *et al.* Effect of injection of *Edwardsiella tarda* on the immune organ of bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(12): 42-46. [刘云, 姜明, 姜国良, 等. 迟缓爱德华氏菌对牙鲆免疫器官的影响. 海洋科学, 2000, 24(12): 42-46.]

Establishment and analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families with enhanced disease resistance to *Edwardsiella tarda*

ZHANG Yingping^{1,2}, CHEN Songlin^{1*}, SUN Hejun^{1,2}, WANG Lei^{1,3},
FAN Caixia^{1,2}, YU Yang¹, ZHANG Wenting¹, YANG Yingming¹, ZHANG Yongzhen¹,
TIAN Yongsheng¹, DENG Han¹, CHEN Honglin¹, LIU Xiaofeng¹, WU Yahong¹

(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 201306, China;

3. College of Fisheries, Henan Normal University, Henan 453007, China)

Abstract: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is a widely cultured economic marine fish species in China because of its fast growth, high value and good taste. As a consequence, more and more fish farmers participate in Japanese flounder aquaculture in recent years. However, high density of breeding makes it easy to cause water quality deterioration and a variety of diseases, and diseases of the cultured fish have occurred frequently and infectious disease brought huge economic losses. What is more serious is that this limits the profitability and development of Japanese flounder aquaculture. Therefore, to breed new flounder strain with enhanced disease resistance and growth rate is an important task in marine fish aquaculture. In this paper, we focused on the detection of different disease resistance ability, during the course of *Edwardsiella tarda* infection, 56 families were established. Among them, 32 families were used in the experiment of infecting *E. tarda*. The purpose of this experiment was to screen families with high disease resistance to *E. tarda* so that we could solve the problems caused by the traditional methods of treating disease, such as drug residues, environmental pollution and drug resistance. Disease resistance was evaluated in 32 families through intraperitoneal injection of bacterial *E. tarda*. Before formal challenge experiment, we did a preliminary infection experiment to measure the half lethal concentration of *E. tarda* to Japanese flounder. According to the results of preliminary experiments, we determined the half lethal concentration (LD_{50}) to be $(3.69 \times 10)^5$ CFU/mL. Then 75 fishes were randomly taken from each family and injected with the bacteria according to the half lethal concentration of solution, 0.2 mL/10 g body weight. Water temperature should be controlled at $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$. 4 800 fishes from 32 families were challenged with *E. tarda* through intraperitoneal injection. Through the analysis we know that their survival rate was between 8.2% – 66.1% with an average rate of 31.2%. Results demonstrated that there was significant difference in disease resistance among different families ($P < 0.05$). Six families showed high disease resistance to *E. tarda*. Moreover, we found that the families from family F0768 which had been considered to be highly resistant to *Vibrio anguillarum* in 2007 showed high disease resistance to *E. tarda*. So we speculate that the family F0768 has a good disease resistance to both of the bacteria. This study laid the foundation for the selection of *E. tarda* and *V. anguillarum* resistant Japanese flounder strains, which is of importance and has application value for the study of molecular mechanism of bacteria resistance and the selective breeding of disease-resistant new species.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Edwardsiella tarda*; family; disease resistance; selective breeding

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn