

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15048

抗迟缓爱德华氏菌病牙鲆家系的筛选与分析

孙何军^{1,2}, 陈松林^{1,3}, 郑卫卫^{1,2}, 马佳璐¹, 王文文¹, 田永胜¹, 邓寒¹, 陈红林^{1,2}, 高进¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)养殖病害日益严重, 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是牙鲆养殖中的主要致病菌, 带来了极大的经济损失, 为了培育出对该病抵抗能力强的牙鲆新品种, 2014 年 4–6 月间, 利用我们长期以来建立和筛选出来的牙鲆抗病群体和家系的亲鱼, 通过杂交, 自交, 雌核发育建立 47 个家系, 9–10 月间, 对其中 39 个家系进行感染实验, 先用少量鱼进行预实验摸索出半致死浓度, 然后再进行正式感染实验, 感染数量为每个家系 80 尾。各家系的存活率范围为 1.19%~51.19%, 最终平均存活率为 20.29%, 认为存活率高于 30% 的 7 个家系为抗病力强家系, 存活率在 20.29%~30% 的 9 个家系为抗病力一般家系, 平均存活率以下的 23 个家系为抗病力弱家系。1406[#]家系抗病力最强, 它为 1005[#]家系的自交后代, 而其他抗病力强家系也大多是 1005[#]、09104[#]、0915[#]的后代。而 09104[#]为 0768[#]的后代, 并且 0768[#]抗鳃弧菌病能力强。1005[#]为韩国群体自交后代, 0915[#]为韩国群体和日本群体杂交后代。这些抗病力强的牙鲆可以作为新品系进行推广养殖, 可望减少牙鲆腹水病发生。

关键词: 牙鲆; 迟缓爱德华氏菌; 抗病性; 家系筛选

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1115-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属鲽形目, 牙鲆科, 牙鲆属, 俗称牙片、偏口、比目鱼, 是重要的海水养殖鱼类。它在中国的主要养殖区域为辽宁、河北、天津、山东以及福建, 主要养殖种类为褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、犬齿牙鲆(*Paralichthys dentatus*)、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)。随着海水污染日益严重, 水产病害给海水养殖业带来巨大损失。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染牙鲆后, 可以引起腹水, 夏季 7–8 月水温 20℃ 以上为发病高峰期, 水温越高, 发病期越长, 一旦发病, 易于链球菌混合感染, 引起较高的死亡率^[1]。该菌的致病性在鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[2]、牛蛙(*Rana catesbiana*)^[3]、中华鳖(*Trionyx*

sinensis)^[4]、牙鲆^[5]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[6]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[7]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[8]、地图鱼(*Astronotus ocellatus*)^[9]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[10]、革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)^[11]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[12]、宝石鱼(*Bimaculatus anthias*)^[13]都有报道。

鱼类细菌性疾病主要以使用抗生素预防为主, 而引起的细菌抗逆性以及食品安全问题限制了抗生素的使用, 所以通过改良鱼类种质资源提高其天然抗病力成为重要的技术手段, 如苏联人用雄性鲫鱼和雌性鲤鱼杂交, 后代再与雄性鲫鱼回交的方法, 把鲫鱼所特有的抗赤点病特性引入鲤鱼。鲢鳙鱼养殖中, 胰脏坏死症和造血器官坏死

收稿日期: 2015-03-11; 修订日期: 2015-05-08.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A408); 国家自然科学基金项目(31461163005); 山东省自主创新重大专项(2013CXC80202).

作者简介: 孙何军(1991–), 男, 硕士, 主要从事海水鱼类育种研究. E-mail: 374015372@qq.com

通信作者: 陈松林, 研究员. Tel: 0532-85844606. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

症会造成重大损失,日本人用雄性马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)与雌性天鱼(*Oncorhynchus rhodors*)杂交,后代对两种疾病的抵抗力都大大提高,养殖存活率达到 95%^[14]。雌性兴国红鲤与雄性散鳞镜鲤杂交后代抗白头白嘴病的能力相比散鳞镜鲤有很大的提高^[15]。除了杂交育种之外,利用家系选育抗病能力强的水产经济动物有较多研究,陈松林等^[16]最早开展牙鲈家系建立和快速生长及抗病家系筛选的研究工作;随后,张英平等^[17]对建立的牙鲈家系进行了迟缓爱德华氏菌感染和抗病性能评价研究,认为 0768[#]家系后代的抗病能力很强;张涛^[18]对斑节对虾抗 WSSV 家系进行了筛选,结果表明 Y125*T115、S186、Y126*Y175、T179*S132、F20*S198 五个家系生长速度及抗病性能相对较强;徐田军等^[19]通过家系选育建立了牙鲈抗鳗弧菌病家系,研究发现,日本群体与抗病选育群体的杂交后代抗病性能表现优异;黄永春等^[20]研究了凡纳对虾抗 WSSV 家系的建立与抗病特性,经连续的定向选育,对虾抗病性状一代比一代强,表现出明显的抗病性能;陈松林等^[21]建立了半滑舌鳎家系并对其抗病性能进行了测定,结果显示,2 号家系感染后的成活率为 79.25%,被认作抗病力强家系;马爱军等^[22]研究了大菱鲈选育家系抗鳗弧菌性能,选育出 5 个抗病力较强的优良家系;王磊^[23]还研究了牙鲈抗淋巴囊肿病家系,得到 4 个发病率低于 40%的家系,其中有一个家系 F0939[#]完全没有发病。

在迟缓爱德华氏菌感染牙鲈的研究中,国外有很多相关报道,如 Rashie 等^[24]研究了从死亡的牙鲈身上分离出来的迟缓爱德华氏菌的血清型,结果表明与从鳗鱼体内分离得到的一样,同属于 A 型。Matsuyama 等^[25]比较了注射疫苗与非注射情况下感染迟缓爱德华氏菌后白细胞基因表达情况,还不能将疫苗的效力与不同基因表达联系起来。Ishibe 等^[26]研究了牙鲈腹腔巨噬细胞对高致病力与低致病力迟缓爱德华氏菌的不同反应,表明高致病力的迟缓爱德华氏菌能够在巨噬细胞的作用下存活与复制,而低致病力的却不行。Tang 等^[27]研究了牙鲈对迟缓爱德华氏菌外膜蛋白的免疫反应,发现所有免疫器官的应答在注射 4 周

后达到最高峰,然后慢慢下降。韩国养殖的成年牙鲈患腹水病后大量死亡,Oh 等^[28]从死鱼身上分离到了哈维氏弧菌与迟缓爱德华氏菌,同时也分离到了一种 RNA 病毒。Miwa 等^[29]的研究结果表明,牙鲈感染迟缓爱德华氏菌后会出现肝细胞肿大的现象,同时可以防止肝细胞数量的减少。

本研究在 2013 年牙鲈迟缓爱德华氏菌感染的基础上试图选育出更多的抗迟缓爱德华氏菌牙鲈家系,旨在为今后牙鲈育种工作提供重要的参考基础。

1 材料与方法

1.1 牙鲈家系的建立

2014 年 4–6 月海水水温 15℃左右,按照育种计划,基于我们长期以来建立和筛选出来的牙鲈抗病群体家系的亲鱼,包括:韩国群体,2007 年亲鱼、2009 年亲鱼、2010 年亲鱼,期间采用了精子冷冻保存技术^[30],减数雌核发育技术^[31],建立牙鲈全同胞家系、半同胞家系、雌核发育家系及其他交配组合家系。

1.2 迟缓爱德华氏菌培养

采用实验室-80℃下保留的菌种,直接无菌条件下接种在 2216E 液体培养基中,28℃,200 r/min 振荡培养 40 h 左右后,在波长为 600 nm 下测定其吸光值,达到 1 以上即可停止培养,4℃保存使用。

1.3 半致死浓度的确定

从预备进行感染的 39 个家系中,每个家系挑选 1 尾鱼,共 39 尾作为 1 组,重复分成 7 组。将细菌 8000 r/min 离心 15 min 后倒掉上清,并用 PBS 洗涤后重新离心倒上清,重复 3 次,最后用 PBS 缓冲液按照不稀释,稀释 50 倍,100 倍,200 倍,500 倍,1000 倍,再分别用 6 个浓度进行腹腔注射,并用 PBS 注射对照组。注射剂量按照 0~10 g 注射 0.1 mL,11~20 g 注射 0.2 mL,以此类推。摸索半致死浓度。

1.4 抗病性鉴定

2014 年 9–10 月海水水温在 20℃左右时,采用预实验确定的半致死浓度,按照预实验方法对感染用鱼逐一进行注射,每 3 h 观察鱼体状况,记录死鱼时间、体长、体重,采鳍条备用。

1.5 数据处理

计算各家系感染后存活率以及整体平均存活率、各家系体长和体重的平均值，分析其与存活率之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 半致死浓度的确定

细菌未稀释的组，第 3 天后开始死亡，到第 6 天全部死完；其他组第 5 天左右开始死亡，一直持续到第 16 天，死亡率如表 1 所示。所以确定使用稀释 200 倍作为半致死浓度进行注射，并测得活菌数为 4.12×10^5 cfu/mL。

表 1 预实验结果
Tab. 1 The result of prep experiment

浓度(v/v)concentration	死亡率/% mortality
1	100
1/50	92.5
1/100	77.5
1/200	50
1/500	20
1/1000	12
PBS	0

2.2 抗病性鉴定

根据确定的半致死浓度配制菌液进行注射，

结果表明，注射后第 3 天鱼逐渐停止吃食，并有少量白便，第 5 天开始出现死亡，死亡的个体发黑并有肠道外露现象，死亡持续到第 15 天逐渐稳定，各家系的存活率如图 1 所示，总体平均存活率为 20.29%。我们把存活率高于 30% 的 7 个家系定义为抗病力强家系，将存活率为 20.29%~30% 的 9 个家系定义为抗病力一般家系，将存活率小于 20.29% 的 23 个家系定义为抗病力弱家系。各家系的父母本信息，平均体长，平均体重及存活率如表 2 所示。

2.3 存活率与生长性状的相关性

使用 SPSS 17.0 对感染后存活率和体长体重的平均值进行皮尔森相关性分析。 $P < 0.01$ ，说明存活率与生长性状显著相关； r 值在 0.5~0.8(表 3)说明是正向相关，相关性适中，也就是说存活率高的家系生长情况也好，可能随着时间的推移，这种生长的优势会表现的更加明显。

2.4 抗病力强家系系谱图

存活率在 30% 的 7 个家系分别为 1406[#]、1421[#]、1401[#]、1422[#]、1411[#]、1446[#]、1417[#]家系。由图 2 可以看出，抗病力最强的 1406[#]是 1005[#]自交后代，1411[#]、1417[#]是 1005[#]杂交后代，1401[#]、1417[#]、1446[#]是 09104[#]后代，1401[#]、1421[#]、1422[#]是 0915[#]后代。

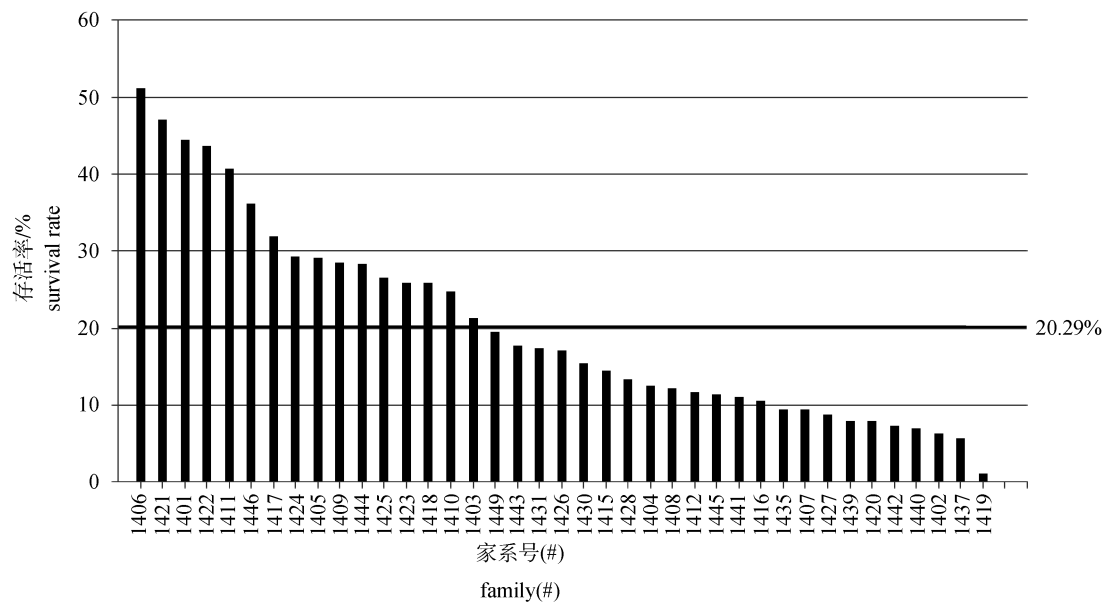


图 1 感染各牙鲈家系存活率统计
Fig. 1 Statistic of family survival rate in the infection

表 2 各牙鲈家系父母本、平均体长、平均体重及存活率
Tab. 2 Average body length and body weight, survival rate and parents of each family

家系 family	父本 father	母本 mother	体长/cm body length ($\bar{x} \pm SD$)	体重/g body weight ($\bar{x} \pm SD$)	存活率/% survival rate
1401	0915	09104	12.68±0.89	16.84±4.00	44.44
1402	1005	0990	11.30±1.06	12.54±3.78	6.33
1403	09121	1005	13.54±0.94	25.68±4.41	21.43
1404	09121	09104	12.20±2.00	16.46±4.07	12.61
1405	1010	1005	14.10±1.33	25.33±6.92	29.11
1406	1005	1005	13.21±0.75	19.65±3.26	51.19
1407	1005	09121	11.98±1.51	15.00±3.46	9.41
1408	0908	0915	11.20±1.22	12.00±4.12	12.22
1409	0908	0917	12.96±1.07	19.25±4.78	28.57
1410	0915	0768	12.68±1.66	18.73±7.03	24.71
1411	1005	0719	19.49±1.00	24.64±5.28	40.79
1412	09125	0751	12.05±1.31	15.68±5.34	11.69
1415	0908	1005	13.23±1.56	20.64±7.39	14.49
1416	09119	0990	13.17±1.05	20.57±4.84	10.59
1417	09104	1005	15.15±0.89	30.98±5.65	32.00
1418	0915	1005	13.97±0.99	22.38±4.69	25.84
1419	09119	1005	12.48±0.89	15.38±3.43	1.19
1420	1264	09121	12.49±1.14	18.28±5.16	8.05
1421	0915	0927	14.34±1.26	28.81±7.97	47.06
1422	0915	0915	13.64±1.28	23.02±7.07	43.68
1423	09125	0917	13.64±1.29	24.48±6.24	25.93
1424	0917	0917	14.41±1.13	27.70±6.77	29.33
1425	09104	0917	12.67±0.95	17.17±4.20	26.51
1426	0751	0780	11.77±1.29	14.17±4.59	17.07
1427	09125	09119	13.42±1.33	22.00±6.23	8.75
1428	1264	09119	11.74±1.02	13.50±3.51	13.33
1430	0915	0917	14.81±1.39	30.87±8.59	15.49
1431	09121	0917	13.33±0.96	20.07±4.51	17.39
1435	0768	0780	12.58±1.08	16.90±4.39	9.52
1437	鲈鱼	0768	11.52±0.88	12.60±3.51	5.68
1439	0751	0719	12.97±1.55	21.31±7.21	8.06
1440	RS	0719	12.57±2.02	19.19±7.75	7.07
1441	0908	0719	13.45±1.11	21.59±5.66	11.11
1442	0908	0927	12.71±1.40	17.94±6.04	7.41
1443	0917	0915	12.53±1.16	16.49±4.57	17.76
1444	0915	09121	12.90±0.87	17.56±3.67	28.38
1445	09119	0927	12.41±0.93	16.24±3.73	11.36
1446	09119	09104	14.51±1.48	28.36±7.72	36.25
1449	09121	1005	12.72±0.94	17.94±4.16	19.51

表 3 存活率对牙鲈家系平均体长、体重的皮尔森相关性分析
Tab. 3 Pearson correlation analysis of survival rate to average body length and body weight

项目 item	平均体长 average body length		平均体重 average body weight	
	r		r	
	P		P	
存活率 survival rate	0.538	0.000	0.504	0.001

3 讨论

3.1 感染用细菌的培养方法

实验过程中发现用液体培养基培养迟缓爱德华氏菌速度较慢，细菌的活力降低的也较快，马爱军等^[22]在进行鳗弧菌感染大菱鲈实验时，将

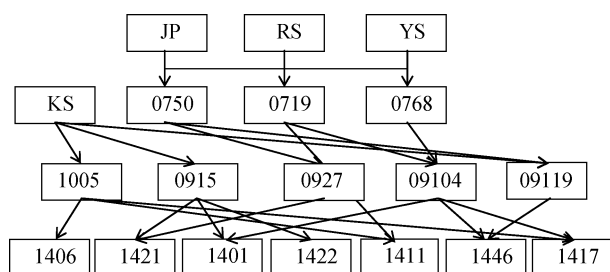


图 2 抗病力强牙鲆家系系谱图

单箭头表示自交或雌核发育产生, 双箭头表示杂交产生。

Fig. 2 Tree of high survival rate family

Single arrow indicating from autocopulation or artificial gynogenesis, and double arrow indicating from hybridization.

鳎弧菌菌株接种于灭菌的 TSB 琼脂培养基上进行培养, 冯守明等^[32]在进行大菱鲆对迟缓爱德华氏菌的免疫应答实验时也是先将迟缓爱德华氏菌在琼脂培养基上活化、增菌。王磊等^[33]认为大批量感染实验中需要的细菌量过大, 故用液体培养基进行培养, 但实验中所用到高浓度菌浊液其实并不多, 采用固体培养基增菌完全可以保证注射用量上的需要并可以较好的保存细菌。

3.2 抗病力强家系分析

本次实验中 09104[#]的后代有 5 个, 分别为: 1401[#]、1404[#]、1417[#]、1425[#]、1446[#]它们的感染存活率分别为: 44.44%、12.61%、32%、26.51%、36.25%。它们的抗病能力大多比较强。09104[#]是 0768[#]的后代, 而 0768[#]是筛选出的抗鳎弧菌病能力强的家系^[16], 09104[#]的后代可能同时具有较好的抵抗两种细菌的能力。

本次实验中 1005[#]的后代有 11 个, 分别为: 1402[#]、1403[#]、1405[#]、1406[#]、1407[#]、1411[#]、1415[#]、1417[#]、1418[#]、1419[#]、1449[#]。它们的感染存活率分别为: 6.33%、21.43%、29.11%、51.19%、9.41%、40.79%、14.49%、32%、25.84%、1.19%、19.51%。其中抗病性最强的 1406[#]是 1005[#]的自交后代, 1005[#]与其他家系杂交后代的抗病力有强也有弱, 1005[#]与 09104[#]的杂交后代为 1417[#], 1005[#]与 0915[#]的杂交后代为 1418[#], 它们的存活率分别为 32% 和 25.84%, 都高于平均存活率, 张英平等^[17]实验结果表明, F1005[#]后代感染存活率较高, 且 1005[#]自交家系 1305[#]存活率仅次于存活率最高的家系

1331[#], 但是当时主要认为 0768[#]后代抗病能力较强, 而本次实验中 0768[#]子一代 1410[#]、1435[#]、1437[#] (0768[#]雌核发育后代), 它们的存活率分别为: 24.71%、9.52%、5.68% 都相对较低。而 0768[#]子二代也就是 09104[#]子一代的抗病性却又都比较高, 未来可再建立 0768[#]子一代, 子二代家系进行抗病性对比。

本次实验存活率大于 30% 的 7 个家系中, 有 3 个是 0915[#]的后代, 它们分别是 1401[#]、1421[#]、1422[#]。而 0915[#]是抗鳎弧菌病能力强的家系^[33], 所以 0915[#]的后代也可能同 09104[#]的后代类似, 同时具有较好的抵抗两种细菌的能力。

3.3 环境条件对实验结果的影响

实验的平均存活率为 20.29%, 比预期的 50% 低得多, 可能是实验水温比预实验水温降低 2℃ 左右引起, 覃川杰等^[34]认为水体温度的变化会扰乱内分泌系统稳定、削弱鱼类机体免疫能力等。本实验最高成活率为 51.19%, 最低成活率为 1.19%, 相差 50%, 这与陈松林等^[16]的实验结果: 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% 以上相一致, 表明该实验结果在抗病选育中是有效的。

3.4 展望

本实验筛选出 7 个抗迟缓爱德华氏菌病能力强的牙鲆家系, 特别是 1406[#]家系, 它的感染存活率为 51.19%, 远远高于平均存活率 20.29%, 其生长性状指标也较好, 可以将其应用在渔业生产中, 以期带来较好的经济效益。本研究推断 0915[#]与 09104[#]后代可能同时具有抗迟缓爱德华氏菌病与抗鳎弧菌病的能力。同时, 可以借鉴本研究结果, 在今后的牙鲆家系抗病选育中, 着重建立 09104[#]、0915[#]、1005[#]家系的杂交与自交以及雌核发育后代, 为牙鲆抗病育种奠定重要基础。

参考文献:

- [1] Chang J B, Yang J M, Sun F X. On disease control and diagnosis of *Paralichthys olivaceus* (I)[J]. Shandong Fisheries, 1995, 12(5): 21-24. [常建波, 杨建敏, 孙逢贤. 牙鲆疾病的诊断及防治(一)[J]. 齐鲁渔业, 1995, 12(5): 21-24.]

- [2] Wang G L, Xu X L, Lu Z. The pathogens and a new species of *Edwardsielliasis* in eels[J]. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(3): 224–229. [王国良, 徐兴林, 路正. 鳗鲡爱德华氏病病原菌及一新种[J]. 水产学报, 1993, 17(3): 224–229.]
- [3] Fan H P, Xu J E. Studies on *Edwardsiellosis* of *Rana catesbeiana*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1995, 2(4): 22–28. [樊海平, 徐娟儿. 牛蛙爱德华氏菌病的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(4): 22–28.]
- [4] Lin Y, Hu Y J, Cai K Z. The treatment and diagnosis of *Edwardsielliasis sepsis* of *Trionyx sinensis* larva[J]. Journal of Aquaculture, 1995, 5(5): 5–5. [林禹, 胡毅军, 蔡开珍. 幼鳖爱德华氏菌败血症的诊断和防治[J]. 水产养殖, 1995, 5(5): 5–5.]
- [5] Liu Y, Jiang M, Jiang G L, et al. Studies on the morphological characteristics and the ecology of *Lateolabrax japonicus* larval, juvenile fish[J]. Marine Sciences, 2000, 24(12): 41–45. [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[J]. 海洋科学, 2000, 24(12): 41–45.]
- [6] Deng X W, Xie Z X, Liu J B, et al. Isolation and identification of *Edwardsiella* in channel catfish from Guangxi[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2008, 39(2): 231–235. [邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 广西斑点叉尾鲷爱德华氏菌的分离鉴定[J]. 广西农业科学, 2008, 39(2): 231–235.]
- [7] Zhang C R, Wang K Z, Yang X S, et al. The treatment and diagnosis of *Edwardsielliasis sepsis* of *Cyprinus carpio*[J]. Inland Fisheries, 2002(8): 31. [张超睿, 王可之, 杨新山, 等. 鲤鱼爱德华氏菌败血症的诊断和防治[J]. 内陆水产, 2002, 8: 31.]
- [8] Qin L. Studies on edwardsiellosis and pathology of several important diseases in cultured turbot[D]. Qingdao: China Ocean University, 2006. [秦蕾. 养殖大菱鲆爱德华氏菌病及其几种重要疾病的病理学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.]
- [9] Zhao F, Zou W M, Tan A P, et al. Identification and detection of virulence gene of the pathogenic bacteria *Edwardsiellosis* in oscar *Astronotus ocellatus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 22(6): 403–408. [赵飞, 邹为民, 谭爱萍, 等. 地图鱼迟钝爱德华氏菌病原菌的鉴定及毒力基因的检测[J]. 大连水产学院学报, 2008, 22(6): 403–408.]
- [10] Deng X Y, Luo W, Tan S H, et al. Isolation and identification of bacteriosis pathogen—*Edwardsiella tarda* from yellow catfish (*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[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(5): 511–516.]
- [11] Zhao D B, Ding L. The treatment and diagnosis of *Edwardsielliasis* of *Clarias gariepinus*[J]. Fishery Guide to be Rich, 2009 (14): 61–62. [赵德炳, 丁雷. 革胡子鲶爱德华氏菌病的诊断和治疗[J]. 渔业致富指南, 2009 (14): 61–62.]
- [12] Deng X W, Xie Z X, Liu J B, et al. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* in *Tilapia nilotica*[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(1): 114–117. [邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟缓爱德华氏菌的分离与鉴定[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(1): 114–117.]
- [13] 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[J]. 淡水渔业, 2010, 40(1): 50–54.]
- [14] Wu Z Q, Hong S G. The theory and application of fish crossbreeding[J]. Fujian Aquaculture, 2005(1): 61–65. [吴仲庆, 洪水根. 鱼类杂交育种的原理和应用[J]. 福建水产, 2005(1): 61–65.]
- [15] Li S F. The application of genetic theory and technique to the propagation of cyprinids[J]. Journal of Fisheries of China, 1983, 7(2): 175–184. [李思发. 遗传育种的理论和技术在鲤科鱼类增养殖业中的应用[J]. 水产学报, 1983, 7(2): 175–184.]
- [16] 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[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 665–673.]
- [17] Zhang Y P, Chen S L, Sun H J, et al. Establishment and analysis of Japanese flounder (*Aralichthys livaceus*) families with enhanced disease resistance to *Edwardsiella tarda*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1917–1925. [张英平, 陈松林, 孙何军, 等. 牙鲆抗迟缓爱德华氏菌病家系建立与抗病性能评价[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1917–1925.]
- [18] Zhang T. Screening families of *Penaeus monodon* for resistance to the white spot syndrome virus (WSSV)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [张涛. 斑节对虾抗 WSSV 家系筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [19] Xu T J, Chen S L, Tian Y S, et al. Comparative analysis of disease resistance among Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. Journal of Fishery Sciences of China,

- 2010, 17(1): 59–68. [徐田军, 陈松林, 田永胜, 等. 牙鲆抗鳃弧菌病家系筛选及其分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 59–68.]
- [20] Huang Y C, Ai H S, Pan Z C, et al. Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 359–366. [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 359–366.]
- [21] Chen S L, Du M, Yang J F, et al. Development and characterization for growth rate and disease resistance of families in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1789–1794. [陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1789–1794.]
- [22] Ma A J, Guo J L, Wang X A, et al. Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 484–493. [马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲆选育家系抗鳃弧菌性能[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484–493.]
- [23] Wang L. Screening of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families and SSR markers resistant to *Vibrio anguillarum* and lymphocystis disease[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [王磊. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)抗鳃弧菌病和淋巴囊肿病家系及相关分子标记的筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.]
- [24] Rashie M M, Mekuchi T, Nakai T, et al. A serological study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish Pathol, 1994, 29(4): 277.
- [25] 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 Shellfish Immunol, 2007, 22(6): 598–607.
- [26] Ishibe K, Osatomi K, Hara K, et al. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(2): 243–251.
- [27] Tang X Q, Zhan W B, Sheng X Z, et al. Immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to outer membrane protein of *Edwardsiella tarda*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(2): 333–343.
- [28] Oh M J, Kim W S, Kitamura S I, et al. Change of pathogenicity in Olive flounder *Paralichthys olivaceus* by co-infection of *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* and marine birnavirus[J]. Aquaculture, 2006, 257(1–4): 156–160.
- [29] Miwa S, Mano N. Infection with *Edwardsiella tarda* causes hypertrophy of liver cells in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Dis Aquat Org, 2000, 42(3): 227–231.
- [30] Ji X S, Chen S L, Zhao Y, et al. Cryopreservation of stone flounder and Japanese flounder sperms and its application to the breeding[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(1): 13–16. [季相山, 陈松林, 赵燕, 等. 石鲈, 牙鲆精子冷冻保存研究及其在人工杂交中的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 13–16.]
- [31] Ge W L, Zhang Q Q, Qi J, et al. Gynogenesis induced by heterogenous sperms and cold shock in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 35(6): 1011–1016. [戈文龙, 张全启, 齐洁, 等. 异源精子诱导牙鲆雌核发育二倍体[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 35(6): 1011–1016.]
- [32] Feng S M, Zhan W B, Sheng X Z, et al. Immune response to *Edwardsiella tarda* in Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(2): 203–208. [冯守明, 战文斌, 绳秀珍, 等. 大菱鲆对迟缓爱德华氏菌的免疫应答[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(2): 203–208.]
- [33] 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[J]. 中国水产科学, 2013, 20(5): 990–996.]
- [34] Qin C J, Yang C, Chen C F. Effect of environmental temperature on immune status of fish[J]. Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition, 2012, 39(5): 129–133. [覃川杰, 杨川, 陈昌福. 水温对鱼类免疫活动的影响[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 39(5): 129–133.]

Screening for resistance to *Edwardsiella tarda* in different families of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

SUN Hejun^{1,2}, CHEN Songlin^{1,3}, ZHENG Weiwei^{1,2}, MA Jalu¹, WANG Wenwen¹, TIAN Yongsheng¹, DENG Han¹, CHEN Honglin^{1,2}, GAO Jin¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: *Edwardsiella tarda* is a significant pathogenic bacterium that causes considerable economic losses in flounder aquaculture. We created 47 flounder families using parental fish resistant to *E. tarda* and screened them long term through cross-fertilization, self-crossing, and gynogenesis experiments during April–June 2014. We infected 39 flounder families with *E. tarda* from June–October. The half lethal bacterial concentration was determined to be 80 in each family using a small number of flounder in a preliminary experiment. Survival rate was 1.19%–51.19% (mean, 20.29%). Seven families with survival rates >30% were most able to resist *E. tarda*; the nine families with survival rates of 20.29%–30% had normal resistance to *E. tarda*; and the 23 families with survival rates < 20.29% were least resistant to *E. tarda*. Family 1406 had the best resistance, which was self-crossed with 1005. The families with the best resistance were all descendants of families 1005, 09104, and 0915. Family 09104 was a descendant of family 0768, which was resistant to *Vibrio anguillarum*, and was self-crossed with family 1005 and a Korean group. Family 0915 was cross-fertilized with Korean and Japanese groups. These disease-resistant flounder could be popularized as new strains to reduce the occurrence of virulent ascites disease.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Edwardsiella tarda*; resistance; family screening

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