

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16307

牙鲆抗淋巴囊肿病家系选育及生长和抗病性能分析

侯吉伦, 王桂兴, 张晓彦, 宋立民, 孙朝徽, 赵雅贤, 任建功, 姜秀凤, 司飞,
刘海金, 王玉芬

中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100

摘要: 为了选育抗淋巴囊肿的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)新品种, 2015 年建立了 5 个普通家系(C1~C5)、3 个雌核发育家系(G1、G2、G3)和 1 个对照组, 在淋巴囊肿病高发养殖场进行自然染毒实验, 统计各家系的抗病保护率。同时对各家系 120 d、180 d、240 d 和 300 d 时的生长性状进行跟踪测量和比较。结果表明, 各家系牙鲆在不同时期有各自不同的生长规律, 呈现出家系间生长规律的不一致性。但在所有家系中, 家系 G2 各个时期的生长表现始终排名靠前。390 d 统计抗病保护率的结果显示, 对照组的抗病保护率只有 59.57%, 而经选育所有实验组的抗病保护率都在 60%以上, 最高达 97.20% (家系 G2)。但总体上, 390 d 时牙鲆淋巴囊肿抗病和患病个体间体重和体长差异均不显著; 体重、体长与抗病保护率为正相关, 但相关性均不显著。家系 G2 抗病个体的平均体重显著高于患病个体($P < 0.05$)。以 G2 家系为基础, 继续进行选育, 有望获得牙鲆抗淋巴囊肿速生新品种。

关键词: 牙鲆; 淋巴囊肿病; 抗病保护率; 生长

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0727-11

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国大陆重要的海水养殖种类之一。近年来包括牙鲆在内的鱼类在养殖生产过程中出现了众多不利因素, 表现出生长速度减慢、发病率高、抗逆性差等现象, 严重阻碍了产业的健康和可持续发展。在众多不利因素中, 病毒性疾病的暴发给水产养殖业带来了重大的经济损失^[1]。淋巴囊肿病(lymphocystis disease, LD)是由虹彩病毒科(Iridoviridae)的淋巴囊肿病毒(lymphocystis disease virus, LDV)引起的一种鱼类病毒性传染病。该病毒为双链 DNA 病毒, 呈二十面体对称, 因宿主和环境等不同, 病毒粒子大小有所差异, 直径介于 130~330 nm。淋巴囊肿病呈世界性传播, 流行地区相当广泛, 据报道至少 42 科、125 种以上的鱼可被淋巴囊肿病病毒感染, 其中海水鱼占 30 科^[2]。病鱼口唇部、躯干皮肤、鳍及尾部可见有单个或成群的鱼卵状或水

疱状肿胀物, 大小不一, 小如念珠大如菜花。在中国, 1992 年于养殖的云纹石斑鱼(*Epinethelus moara*)中首次发现了淋巴囊肿病^[3], 1997 年牙鲆淋巴囊肿病大面积暴发^[4]。水温在 15~20℃时, 发病鱼较多, 囊肿物生长也较快。该病死亡率并不高, 但患病鱼几乎全部丧失其商业价值。淋巴囊肿病已经成为制约牙鲆养殖产业健康持续发展的一种重要疾病。在河北省和山东省牙鲆淋巴囊肿病高发, 使养殖户遭受了严重的经济损失, 导致牙鲆养殖大面积萎缩、产量下降。

国内外学者利用多种研究方法, 对淋巴囊肿病毒的基因组序列^[5]、病理学^[6-7]、检测方法^[8]、致病机理^[9]、自愈机理、疫苗^[10-11]以及抗病标记的筛选^[12-13]等进行了一系列研究。在牙鲆抗淋巴囊肿的相关研究中, 日本学者 Fuji^[12, 14]等在 2006 年筛选获得了一个与抗淋巴囊肿紧密相关联的微

收稿日期: 2016-10-23; 修订日期: 2016-11-24.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-50-G2, CARS-50-Z03); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2016HY-ZD0202).

作者简介: 侯吉伦(1984-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: jilunhou@126.com

通信作者: 王玉芬, 高级工程师, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: wangyf-8000@163.com

卫星标记 *Poli9-8TUF*, 并通过此标记, 在日本培育出抗淋巴囊肿牙鲈。Hwang 等^[15]在牙鲈 *tlrs* 基因的染色体定位研究中发现, 牙鲈 *tlr2* 基因与抗淋巴囊肿病标记 *Poli9-8TUF* 紧密连锁, 他们认为可以把 *tlr2* 作为牙鲈抗淋巴囊肿病的候选基因。我们利用 *Poli9-8TUF* 标记对中国种群的牙鲈进行筛选, 发现通过此标记筛选出的抗淋巴囊肿个体在染毒实验中也能感染上淋巴囊肿病。因此, 日本的标记并不完全适合于中国种群^[16]。2014 年范彩霞等^[13]通过群体分离法筛选到一个与牙鲈淋巴囊肿病相关的 SSR 标记 *scaffold185_597*, 为中国牙鲈淋巴囊肿牙鲈筛选提供了候选标记。另外, 国内外学者在选育虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[17]、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus* L.)^[18]、大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)^[19]、牙鲈^[20-22]抗病家系时, 也对家系的生长性能进行了评估, 同时探讨了抗病性与生长之间的相关关系。

为了减少淋巴囊肿病对牙鲈养殖业的危害, 我们从良种选育角度连续多年开展抗病新品种的选育工作。本研究利用经染毒实验获得的抗病亲鱼进行杂交或人工诱导减数分裂雌核发育制备家系, 并在淋巴囊肿病高发的养殖场进行染毒实验, 对不同家系的抗病性能进行评估, 同时对实验鱼的生长进行动态测量, 从而筛选出抗病保护率高、生长速度快的优良家系, 旨在为牙鲈抗淋巴囊肿速生新品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 家系的建立

牙鲈实验家系的建立和前期培育在中国水产科学研究院北戴河中心实验站进行。本站 2012 年制备的家系经淋巴囊肿病毒染毒后获得未患病牙鲈, 选取其中 8 尾雌性(体长 40~70 cm, 体重 1500~3000 g)和 5 尾雄性(体长 30~60 cm, 体重 1000~2000 g), 制备 5 个普通家系(1 尾雌鱼配 1 尾雄鱼) C1~C5 和 3 个雌核发育家系 G1~G3, 人工诱导减数分裂雌核发育方法参见刘海金等^[23]。其中 G2、C5 的母本和 C2 的父本来自同一家系, 其余家系亲本均来自不同家系。另外, 以未经病毒感染实验的 1 尾野生雌鱼(体长 75 cm, 体重 3500 g)配 1

尾野生雄鱼(体长 60 cm, 体重 2500 g)所获得的家系作为对照组(control)。所有家系均在同一日制备。

1.2 苗种的培育

各家系孵化后仔鱼分别置于 300 L 圆形玻璃钢水槽中培育。为减少养殖密度以及环境对生长所带来的影响, 在养殖过程中进行 4 次密度标准化调整: 第 1 次密度标准化在孵化后 15 d 进行, 每个家系随机选取 5000 尾在 3000 L 圆形玻璃钢水槽中培育; 第 2 次密度标准化在孵化后 40 d 进行, 每个家系随机选取 3000 尾在 3000 L 圆形玻璃钢水槽中培育; 第 3 次密度标准化在孵化后 70 d 进行, 每个家系随机选取 2000 尾在底面积为 25 m² 的水泥池中培育; 第 4 次密度标准化在孵化后 150 d 进行, 每个家系随机选取 800 尾进行荧光标记, 并将标记后各家系的鱼混合, 平均分成 4 个在底面积为 25 m² 的水泥池中密集培育 7 d, 随后转移至昌黎养殖基地进行染毒实验。各养殖时期水流、水温、充气条件以及投饵量均保持相同。

1.3 生长性状测定

分别在 120 d、180 d、240 d 和 300 d 时, 从每个家系随机挑选 60 尾进行生长性状的测量。用电子称对体重进行称量。同时用数码相机拍摄每一尾鱼的标准照, 并使用 Motic Images Plus 2.0 软件对以下性状进行测量: 全长、体长、头长、体高、尾柄长和尾柄高。测量数据经比例尺校正后转换为各性状的数值。体型指数是根据鱼体测量指标的内在关系, 利用数学式将它们联系在一起即成为体型指数, 本文中体型指数有头长/体长、体高/全长以及尾柄长/尾柄高。

生长速度的计算公式^[24]为:

$$\text{绝对增重率(g/d)} = (W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)$$

$$\text{绝对增长率(cm/d)} = (L_2 - L_1) / (t_2 - t_1)$$

式中, W_2 和 W_1 分别为测量时日龄 t_2 和 t_1 对应的体重; L_2 和 L_1 分别为测量时日龄 t_2 和 t_1 对应的体长。公式中各符号为斜体。

1.4 淋巴囊肿病染毒实验

牙鲈淋巴囊肿病染毒实验在中国水产科学研究院北戴河中心实验站昌黎养殖基地进行。此养殖场牙鲈淋巴囊肿病高发, 人工养殖的牙鲈每年都会不同程度地感染淋巴囊肿病毒。2012 年

—2014 年每年都在此养殖场进行牙鲆淋巴囊肿病的自然染毒实验, 均获得成功。

染毒实验自 2015 年 10 月 12 日开始, 至 2016 年 6 月 3 日结束。将荧光标记完的各家系鱼平均分成 4 个池子(每个池子 42 m²)进行混合饲养。实验期间, 养殖水温维持在 13~23℃, 盐度 10~27。在染毒实验过程中, 定期观察染病情况, 并进行记录; 实验结束后, 统计各家系健康个体和患病个体的比例, 并测量各家系抗病和患病个体体重和体长。判定是否抗病的标准为: 如果用肉眼观察到鱼体表或鳃长有颗粒状囊肿, 则认定该鱼为患病个体; 如果体表或鳃未观察到颗粒状囊肿, 则判定该鱼为抗病个体。

1.5 统计分析

采用 R 软件对数据进行统计分析。体重、体长以及体型指数均采用平均数±标准差表示。变异系数(coefficient of variation, CV)为(标准差/平均数)×100%。对各家系 120 d、180 d、240 d 和 300 d 的体重、体长和体型指数进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Tukey 多重比较, 并分析 9 个家系的体型指数与体重的相关性; 分别对牙鲆各家系 390 d 的体重、体长与淋巴囊肿病抗性进行相关性分析, 以及各家系内抗病个体和患病个体的体重、体长均值进行 *T* 检验。

2 结果与分析

2.1 各家系生长的比较

在体重性状上, 120 d 和 240 d 时, 家系 G2 的体重显著高于其他家系, 差异显著($P < 0.05$)。180 d 时, 家系 G1、G2 和 C5 之间的体重差异不显著, 但高于其他家系($P < 0.05$)。而 300 d 时, 家系 G1 的体重值最高, 其次为家系 G2 和 G3。在各个日龄的体重变异系数(CV)上, 家系 G2 均在 20%以内, 且日龄间变动较小; 而家系 C2 在 180 d 时的变异系数达到了 81.63%, 可以看出此阶段家系内个体间在体重上存在较大的差异(表 1)。不同日龄各家系的绝对增重率分析结果显示, 除家系 G3 之外, 其余家系在 121~180 d 期间的生长速度最快; 家系 C1、C2、C5 和 G2 在 181~240 d 期间的生长速度快于 241~300 d 期间, 而 C3、C4、G1 和对照组则相反; 各家系在 181~240 d 和 241~300 d 期间的生长速度相近, 且快于 121~180 d 期间; 所有家系的生长速度在 1~120 d 期间最慢。家系的生长速度比较表明, 1~120 d 和 121~180 d 期间, 家系 G2 的生长速度最快, 其次为家系 G1; 181~240 d 期间, 家系 G3 的生长速度最快, 其次为 G2; 而 241~300 d 期间, 家系 G1 的生长速度最快, 其次为 G3 (表 2)。

表 1 9 个牙鲆选育家系不同日龄体重的比较
Tab. 1 Comparison of body weight of different days of age among 9 Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) groups
n=60; $\bar{x} \pm SD$

家系 group	体重/g body weight				变异系数/% coefficient of variation (CV)			
	日龄/d days of age				日龄/d days of age			
	120	180	240	300	120	180	240	300
对照组 control	23.787±8.227 ^a	110.500±24.321 ^a	156.926±45.47 ^{ac}	216.339±59.759 ^a	34.59	22.01	28.97	27.62
C1	32.178±8.045 ^b	101.963±32.863 ^a	161.632±47.407 ^{ab}	209.638±50.929 ^a	25.02	32.19	29.33	24.29
C2	32.330±5.562 ^b	102.942±84.034 ^a	155.408±40.424 ^a	206.357±48.757 ^a	17.20	81.63	26.01	23.63
C3	33.067±10.713 ^b	112.330±35.359 ^a	156.204±51.747 ^{ab}	216.708±65.400 ^a	32.39	31.48	33.13	30.18
C4	39.715±8.968 ^{cd}	111.115±30.699 ^a	166.243±48.416 ^{abd}	224.757±58.509 ^a	22.58	27.63	29.13	26.03
C5	36.122±9.328 ^{bc}	139.223±28.315 ^b	191.065±35.599 ^c	234.363±45.219 ^{ab}	25.83	20.34	18.63	19.30
G1	41.070±9.881 ^{de}	144.496±36.098 ^b	195.509±52.468 ^{cde}	287.753±82.231 ^c	24.06	24.98	26.84	28.58
G2	44.928±7.750 ^e	160.750±28.550 ^b	225.488±37.020 ^e	262.490±47.827 ^{bc}	17.25	17.76	16.42	18.22
G3	25.558±3.630 ^a	103.923±20.141 ^a	182.920±32.078 ^{bc}	261.965±53.673 ^{bc}	14.20	19.38	17.54	20.49

注: 同列中不同上标字母表示不同家系间体重差异显著($P < 0.05$).
Note: Values with different superscript letters within the same column mean significant differences of the body weight among different groups at 0.05 level.

表 2 9 个牙鲆选育家系不同日龄的绝对增重率的比较
Tab. 2 Comparison of absolute growth rate in body weight among 9 Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

家系 group	日龄/d days of age			
	1~120	121~180	181~240	241~300
对照组 control	0.198 ⁹	1.445 ⁴	0.774 ⁸	0.990 ⁴
C1	0.268 ⁷	1.163 ⁹	0.995 ³	0.800 ⁷
C2	0.269 ⁶	1.177 ⁸	0.875 ⁵	0.849 ⁶
C3	0.276 ⁵	1.321 ⁵	0.731 ⁹	1.009 ³
C4	0.331 ³	1.190 ⁷	0.919 ⁴	0.975 ⁵
C5	0.301 ⁴	1.718 ³	0.864 ⁶	0.722 ⁸
G1	0.342 ²	1.724 ²	0.850 ⁷	1.537 ¹
G2	0.374 ¹	1.930 ¹	1.079 ²	0.617 ⁹
G3	0.213 ⁸	1.306 ⁶	1.317 ¹	1.318 ²

注：上角标数字表示增重率排序。
Note: Superscript numbers indicate the order of absolute growth rate in body weight.

由表 3 可知在所有家系中 C4 和 G2 在 120 d 和 300 d 时的体长最长, 和其他家系差异显著($P<0.05$); 而 180 d 和 240 d 时, 家系 G2 的体长要大于其他家系($P<0.05$) (表 3)。在绝对增长率指标上, 除家系 C4 之外, 其他家系在 121~180 d 期间的体长生长速度最快, 其次是在 1~120 d 期间; 家系 C4 在 1~120 d 期间的体长生长速度要快于 121~180 d 期间的生长速度。181~240 d 期间, 除了家

系 C2 和 G2 的体长生长速度要快于 241~300 d 期间的生长速度, 其余家系此期间的体长生长速度均要慢于 241~300 d 期间的生长速度(表 4)。

通过不同家系在不同日龄体重和体长生长的比较表明, 虽然各家系牙鲆在不同时期有各自不同的生长规律, 呈现出家系间生长规律的不一致性, 但在所有家系中, 家系 G2 各个时期的生长表现始终是排名靠前的。

2.2 体重与体形指数的相关性分析

应用体形指数可反映各指标间的比例关系、体形特点及相对水平。9 个家系不同生长阶段, 头长/体长、体高/全长以及尾柄长/尾柄高与体重有着不同的相关性关系(表 5)。其中, 头长/体长在 120 d 和 240 d 时与体重呈表型正相关, 且相关水平显著($P<0.05$); 而在 180 d 和 300 d 时, 两者呈负相关, 且 300 d 时的相关水平极显著($P<0.01$)。体高/全长与体重在各个时期都呈表型正相关, 相关系数随日龄的增加而增大(0.013~0.320), 且在 180 d、240 d 和 300 d 时, 相关水平极显著($P<0.01$)。尾柄长/尾柄高与体重在各个生长时期呈负相关, 除 120 d 外, 其余 3 个时期的相关水平极显著($P<0.01$)。另外, 尾柄长/尾柄高与头长/体长、体高/全长在各个时期也呈极显著负相关($P<0.01$)。

表 3 9 个牙鲆选育家系不同日龄体长的比较
Tab. 3 Comparison of body length of different days of age among 9 Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

家系 group	体长/cm body length				变异系数/% coefficient of variation (CV)			
	日龄/d days of age				日龄/d days of age			
	120	180	240	300	120	180	240	300
对照组 control	12.641±2.116 ^{bc}	20.505±1.823 ^{cd}	20.967±2.420 ^{ab}	24.552±2.408 ^a	16.77	8.87	11.54	9.82
C1	11.921±1.233 ^b	19.981±2.439 ^{cd}	22.529±2.334 ^b	25.453±2.315 ^{ab}	10.32	12.21	10.34	9.12
C2	12.552±1.018 ^{bc}	18.782±1.920 ^{ab}	22.457±2.144 ^b	25.399±2.173 ^{ab}	8.13	10.22	9.53	8.54
C3	11.980±1.437 ^b	19.583±2.285 ^{bc}	20.392±2.361 ^a	25.302±3.147 ^{ab}	12.02	11.64	11.57	12.45
C4	13.578±1.330 ^d	19.849±1.865 ^{bd}	21.141±2.043 ^{ac}	26.078±2.546 ^b	9.79	9.55	9.65	9.78
C5	12.787±2.404 ^{bd}	19.718±1.449 ^{bd}	22.414±1.944 ^b	25.375±2.146 ^{ab}	18.76	7.35	8.66	8.47
G1	13.413±1.99 ^{cd}	21.042±1.718 ^{de}	22.481±2.364 ^{bcd}	25.714±2.838 ^{ab}	8.95	8.17	10.50	11.05
G2	13.575±1.583 ^d	21.821±1.749 ^e	23.947±1.709 ^d	26.067±1.489 ^b	11.63	8.02	7.14	5.72
G3	10.902±0.705 ^a	18.035±1.408 ^a	20.997±1.535 ^{ac}	25.033±2.099 ^{ab}	6.51	7.82	12.77	8.39

注：同列中不同上标字母表示不同家系间体长差异显著($P<0.05$)。
Note: Values with different superscript letters within the same column mean significant differences of the body length among different groups at 0.05 level.

表 4 9 个牙鲆选育家系不同日龄的绝对增长率
Tab. 4 Comparison of absolute growth rate in body length among 9 Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

家系 group	日龄/d days of age			
	1~120	121~180	181~240	241~300
对照组 control	0.105 ⁴	0.131 ³	0.007 ⁹	0.060 ³
C1	0.099 ⁶	0.134 ²	0.040 ⁴	0.043 ⁶
C2	0.105 ⁴	0.104 ⁸	0.061 ¹	0.049 ⁵
C3	0.100 ⁵	0.127 ⁴	0.014 ⁸	0.082 ¹
C4	0.113 ¹	0.105 ⁷	0.022 ⁷	0.082 ¹
C5	0.107 ³	0.116 ⁶	0.045 ³	0.049 ⁵
G1	0.112 ²	0.127 ⁴	0.024 ⁶	0.054 ⁴
G2	0.113 ¹	0.138 ¹	0.036 ⁵	0.035 ⁷
G3	0.091 ⁷	0.119 ⁵	0.050 ²	0.067 ²

注: 上角标数字表示增长率排序。
Note: Superscript numbers indicate the order of absolute growth rate in body length.

2.3 家系间体形指数的比较

结果 2.2 表明体高/全长与体重呈正相关, 而

尾柄长/尾柄高与体重呈负相关, 结合生长性能对 9 个家系间体形指数进行比较。由表 6 可知, 各个生长时期体高/全长指数值最高的均是 G3 家系, 在各个时期排名第二的家系分别为: 120 d 时为 C4 和 G1; 180 d 时为 G2; 240 d 时为 C2、C4 和 G2; 300 d 时为 C3、C4 和 G2。由表 7 可知, 在尾柄长/尾柄高指数上, 120 d 时, 家系 G3 最优, 其次是家系 C1、C2、C4、C5、G1 和 G2; 180 d 时, 家系 G1 和 G3 最优, 其次是家系 C5 和 G2; 240 d 时, 家系 G3 最优, 其次是家系 G2 和 C5; 300 d 时, 家系 C5 最优, 其次是家系 C2。以上结果表明, 除了 300 d 时的尾柄长/尾柄高性状, 家系 G3 的两个体形指数在各个生长时期的表现都为最优; 而家系 G2 在各个生长时期两个体形指数上排名也均靠前。综合以上结果可推断, 体形指数体高/全长越大, 而尾柄长/尾柄高越小的家系生长速度越快, 可将这两个体形指数作为牙鲆选育参数之一。

表 5 9 个家系不同日龄的体形指数与体重的相关系数
Tab. 5 Phenotypic correlation of body index and body weight at different days of age in Japanese flounder (*P. olivaceus*)

日龄/d days of age	性状 trait	体重 body weight	头长/体长 head length/ body length	体高/全长 body height/ total length	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle length/ caudal peduncle height
120	体重 body weight	1.000	0.091*	0.013	-0.002
	头长/体长 head length/body length		1.000	0.409**	-0.403**
	体高/全长 body height/total length			1.000	-0.433**
	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle length/caudal peduncle height				1.000
180	体重 body weight	1.000	-0.032	0.200**	-0.134**
	头长/体长 head length/body length		1.000	0.342**	-0.438**
	体高/全长 body height/total length			1.000	-0.305**
	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle length/caudal peduncle height				1.000
240	体重 body weight	1.000	0.119*	0.265**	-0.305**
	头长/体长 head length/body length		1.000	0.357**	-0.406**
	体高/全长 body height/total length			1.000	-0.295**
	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle length/caudal peduncle height				1.000
300	体重 body weight	1.000	-0.203**	0.320**	-0.213**
	头长/体长 head length/body length		1.000	-0.014	-0.142**
	体高/全长 body height/total length			1.000	-0.098*
	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle length/caudal peduncle height				1.000

注: “**”为在 0.01 水平(双侧)上显著相关; “*”为在 0.05 水平(双侧)上显著相关。
Note: “**” means significant differences at level 0.01; “*” means significant differences at level 0.05.

表 6 9 个牙鲆家系不同日龄体高/全长的比较
Tab. 6 Comparison of body height/body length of different days of age among 9 Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

$n=60; \bar{x} \pm SD$

家系 group	日龄/d days of age			
	120	180	240	300
对照组 control	0.328±0.014 ^{ab}	0.331±0.012 ^a	0.343±0.023 ^{ab}	0.335±0.015 ^a
C1	0.327±0.021 ^{ab}	0.343±0.015 ^{bc}	0.349±0.015 ^b	0.345±0.014 ^b
C2	0.321±0.018 ^a	0.332±0.012 ^a	0.347±0.013 ^b	0.342±0.011 ^{ab}
C3	0.323±0.019 ^a	0.342±0.016 ^{bc}	0.346±0.016 ^{ab}	0.345±0.014 ^b
C4	0.334±0.016 ^b	0.339±0.013 ^{ab}	0.348±0.013 ^b	0.348±0.010 ^b
C5	0.327±0.025 ^{ab}	0.337±0.015 ^{ab}	0.339±0.014 ^a	0.337±0.010 ^a
G1	0.335±0.016 ^b	0.346±0.009 ^{bc}	0.345±0.013 ^{ab}	0.341±0.012 ^{ab}
G2	0.328±0.030 ^{ab}	0.349±0.012 ^c	0.348±0.010 ^b	0.346±0.012 ^b
G3	0.362±0.017 ^c	0.362±0.017 ^d	0.378±0.012 ^c	0.361±0.012 ^c

注：同列中不同上标字母表示不同家系间数据差异显著($P<0.05$).
Note: Values with different superscript letters within the same column mean significant differences of the body height/body length among different groups at 0.05 level.

表 7 9 个牙鲆选育家系不同日龄尾柄长/尾柄高的比较
Tab. 7 Comparison of caudal peduncle length/caudal peduncle height of different days of age among 9 Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

$n=60; \bar{x} \pm SD$

家系 group	日龄/d days of age			
	120	180	240	300
对照组 control	1.293±0.156 ^c	1.222±0.124 ^d	1.141±0.146 ^c	1.267±0.160 ^d
C1	1.128±0.157 ^b	1.187±0.139 ^{cd}	1.292±0.179 ^d	1.282±0.178 ^d
C2	1.151±0.151 ^b	1.125±0.155 ^c	1.229±0.124 ^{cd}	1.161±0.127 ^b
C3	1.288±0.160 ^c	1.178±0.168 ^{cd}	1.265±0.116 ^{cd}	1.392±0.147 ^e
C4	1.141±0.128 ^b	1.212±0.154 ^d	0.940±0.123 ^b	1.324±0.140 ^{de}
C5	1.119±0.138 ^b	1.007±0.161 ^b	0.927±0.136 ^b	1.009±0.148 ^a
G1	1.081±0.107 ^b	0.819±0.049 ^a	1.178±0.171 ^c	1.046±0.131 ^{ab}
G2	1.081±0.140 ^b	1.006±0.122 ^b	0.954±0.126 ^b	1.072±0.127 ^{ac}
G3	0.896±0.133 ^a	0.896±0.133 ^a	0.844±0.094 ^a	1.135±0.174 ^{bc}

注：同列中不同上标字母表示不同家系间数据差异显著($P<0.05$).
Note: Values with different superscript letters within the same column mean significant differences of among different groups at 0.05 level.

2.4 各家系淋巴囊肿病抗病和患病个体比例的统计

自 2015 年 10 月染毒实验开始至 2016 年 2 月底,各家系均未发现有患淋巴囊肿的个体。自 2016 年 3 月开始,逐渐有个别鱼开始患淋巴囊肿,其典型症状为患病鱼体表、鳃或嘴部等增生白色或血红色淋巴颗粒,增生的淋巴颗粒成团或成簇,形如菜花(图 1b);而抗病个体在整个染毒实验养殖过程中,身体的各个部位均未有淋巴囊肿物出现(图 1a)。随着养殖时间的增加,患病鱼所增生

的囊肿物越来越多,而且患病鱼比例开始增加。5 月中旬至 6 月 3 日,患病个体的比例保持稳定,未有新的患病个体出现。因此,在 6 月 3 日统计各家系抗病和患病个体的比例,结果显示对照组的抗病保护率最低,只有 59.57%;而实验组中,G2 的抗病保护率最高(97.20%),其次为 C5 (84.49%),C1、C2、G1 和 G3 家系抗病保护率在 70%~80%,C4 最低为 66.09% (图 2)。在所有家系中,C5 和 G2 的抗病保护率超过了我们设定的 80%的基准线,为抗病家系。家系 C3 的抗病保护率为 79.10%,表

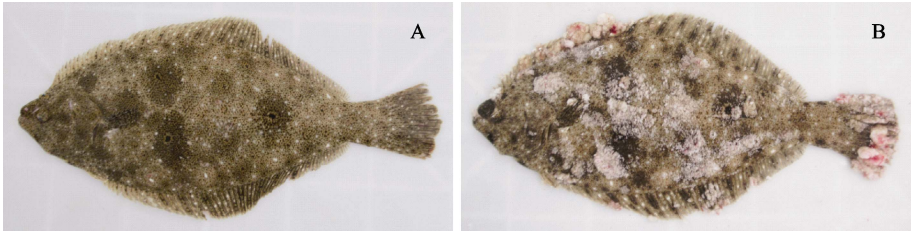


图 1 牙鲆淋巴囊肿抗病个体(A)和患病个体(B)
Fig. 1 Lymphocystis disease resistant individual (A) and sensitive individual (B) of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

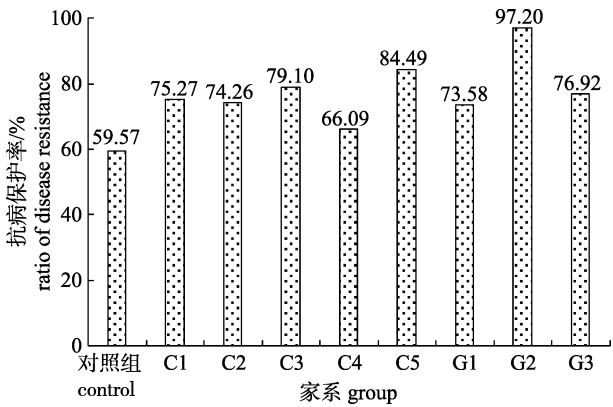


图 2 牙鲆各家系淋巴囊肿抗病保护率
Fig. 2 Ratio of lymphocystis disease resistance of different Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

现也较为优秀。

2.5 抗病和患病个体间体重、体长的比较及相关性

对各家系抗病个体和患病个体的体重和体长分别进行配对 *T* 检验。由表 8 可知在体重性状上，

家系 C1 和 G2 抗病个体的平均体重显著高于患病个体($P<0.05$)；其余家系抗病和患病个体间的体重差异不显著($P>0.05$)。家系 G2 抗病个体的平均体重要比对照组抗病个体的平均体重高 24.47%。在体长性状上，对照组抗病个体的体长要长于患病个体，差异显著($P<0.05$)；而家系 C3 患病个体的体长要显著长于抗病个体($P<0.05$)；其余家系抗病和患病个体间的差异不显著($P>0.05$)。从所有个体总体上分析，无论体重还是体长，抗病和患病个体间的差异均不显著。

390 d 各家系体重、体长和淋巴囊肿抗病性的相关性分析结果显示，体重、体长与抗病性为正相关，但相关性均不显著($P>0.05$) (表 9)。上述结果表明，从总体上而言，牙鲆个体是否患淋巴囊肿病对生长不会造成明显的影响，而且个体的患病与否和生长快慢无直接关联。

表 8 390 d 牙鲆各家系淋巴囊肿抗病个体和患病个体间体重、体长的配对 *T* 检验
Tab. 8 Paired *T*-test of body weight and body length of lymphocystis disease resistant and sensitive individuals at 390 d among 9 Japanese flounder (*P. olivaceus*) groups

n=60; $\bar{x} \pm SD$

家系 group	体重/g body weight		P	体长/cm body length		P
	抗病 disease resistance	患病 disease sensitivity		抗病 disease resistance	患病 disease sensitivity	
对照组 control	290.211±91.338	266.274±81.349	0.302	28.598±2.169	26.314±2.357	0.001
C1	304.700±68.881	245.100±79.109	0.027	28.005±2.392	26.581±3.326	0.162
C2	254.600±83.603	216.700±73.184	0.083	26.485±2.512	25.740±2.672	0.296
C3	231.571±76.191	293.429±105.718	0.072	25.348±3.013	28.060±3.053	0.028
C4	278.421±99.694	280.474±84.053	0.948	27.359±2.754	27.719±2.434	0.689
C5	277.330±72.092	399.445±453.801	0.274	27.589±2.213	28.255±3.245	0.257
G1	390.464±99.800	408.721±81.290	0.621	30.087±2.484	30.345±2.428	0.715
G2	361.164±60.706	277.282±90.150	0.012	29.581±2.073	27.268±2.797	0.073
G3	377.505±119.298	376.235±105.442	0.962	28.216±2.720	27.959±3.282	0.735
平均值 mean	304.255±100.133	305.847±189.665	0.923	27.844±2.742	27.484±3.072	0.217

表 9 390 d 牙鲆体重、体长与淋巴囊肿病抗性的相关性
Tab. 9 Correlation between body weight and body length with lymphocystis disease resistance at 390 d in Japanese flounder (*P. olivaceus*)

系数 coefficient	体重 body weight	体长 body length
Pearson 相关系数 Pearson correlation coefficient	0.009	0.087
P	0.863	0.110

3 讨论

水产养殖技术的不断发展,使得工厂化养殖、高密度养殖等养殖模式在生产实践中越来越多的被采用。这在一定程度上节约了资源,提高了养殖户的收益。但在养殖过程中病害频繁,给养殖户带来经济损失。国内外育种学者采用多种技术方法,开展了抗病水产动物新品种的选育。在鱼类上,马爱军等^[19]基于家系选育技术开展了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)病选育研究,并从 30 个选育二代家系中获得了 5 个抗病力在 65%以上的优良家系。Kjøglum 等^[25]通过 MHC 抗病基因型的筛选,在大西洋鲑(*Salmo salar*)中筛选出了对传染性鲑鱼贫血病(infectious salmon anaemia)抗病性强的 MHC 基因型和易感病的 MHC 基因型,并筛选出了 2 个抗病家系和 1 个易感家系。他们也采用家系选育技术研究了大西洋鲑对疖病(furunculosis)、传染性鲑鱼贫血病和传染性胰腺坏死病(infectious pancreatic necrosis)的抗病遗传力,发现大西洋鲑对上述 3 种疾病的抗性具有中等到高等的遗传力,通过选育可获得抗病新品种^[26]。Liu 等^[27]利用线性模型及阈模型研究了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)对迟钝爱德华氏菌病(*Edwardsiella tarda*)和鳃弧菌病抗性的遗传力,结果显示,两个性状的遗传力为 0.19~0.26,为半滑舌鳎抗病新品种的选育奠定了基础。在牙鲆上,针对养殖中出现的各种疾病,国内外学者在新品种选育上也做了诸多研究^[14, 20, 22]。在已经开展的关于鱼类抗病性能的研究中,基本上都是采用人工染毒的方法对抗病力进行测定,染毒周期一般较短,且能获得较好的实验结果。但在牙鲆中,利用淋巴囊肿病毒

对鱼体进行人工染毒,效果较差(鱼体不得病或得病个体数少),不能反映真实的染病情况。因此,在本研究中,我们将实验鱼放置在养殖池中进行长时间的养殖,让自然水体中含有的淋巴囊肿病毒对其进行感染,从而检测各家系的抗病性能。这种染毒方法和获得的结果更接近生产实际。在本研究中,我们以淋巴囊肿抗病保护率为指标,对各家系进行选育。结果表明,对照组抗病保护率只有 59.57%;而实验组中, G2 的抗病保护率最高(97.20%),其次为 C5(84.49%), C1、C2、G1、G3 家系抗病保护率为 70%~80%。结果表明选育家系对淋巴囊肿病的抗性要优于非选育家系。以 G2 和 C5 两个抗病保护率高于 80%的家系为基础继续选育,有望获得牙鲆抗淋巴囊肿新品种。

在新品种选育过程中,除了抗病性状,研究者同时也关注生长性状,希望能选育出既抗病又高产的新品种^[23]。徐田军、陈松林等^[29]利用大规模家系选育技术对日本牙鲆群体和中国群体杂交后代进行选育,获得了生长速度快、鳃弧菌抗病力强的家系,并在此基础上,选育出牙鲆新品种‘鲆优 1 号’,该新品种的主要特点是养殖成活率提高 20%以上,且生长速度提高 30%左右。对两个性状同时进行选育,遗传改良进展很大程度上决定于这两个性状是否存在相关性。在虹鳟上,研究发现传染性造血器官坏死病(infectious haematopoietic necrosis)的抗病力和实验结束时的体重呈显著正相关($P<0.05$),而细菌性冷水病(bacterial coldwater disease)的抗病力与初始体重呈极显著正相关($P<0.01$)^[17]。大西洋庸鲈鳃弧菌病的抗病力和个体大小、生长之间存在着较低但显著的相关性,但这种相关性在不同家系间存在着差异^[24]。孙何军等^[21]研究了牙鲆不同时期的生长情况与鳃弧菌病抗病力的相关性,结果显示鳃弧菌病抗病力与 65 d 和 85 d 的体长和体重相关性不显著,而与 230 d 的体长和体重存在显著的相关性;但同一家系内的个体大小与死亡率或存活率并无明显的相关性。但同样是在牙鲆上,王磊等^[22]发现鳃弧菌感染存活率与 580 d 的体重之间无显著相关性,高存活率的牙鲆在后期并未显示出较快的生长速度;但淋巴囊肿的抗病力与 580 d 的体重之间呈

显著的正相关。在本研究中,从总体上分析 390 d 牙鲆淋巴囊肿抗病和患病个体间的体重和体长差异均不显著;且体重、体长与抗病性为正相关,相关性均不显著($P>0.05$)。但抗病保护率最高的家系 G2 抗病个体的平均体重显著高于患病个体($P<0.05$)。马爱军等^[19]在大菱鲆上的研究结果显示,实验前的体重、体高与鳃弧菌感染后的存活率存在极低的正相关,而全长与存活率为负相关,相关性均不显著。本研究的结果和马爱军等在大菱鲆上的结果类似。体重、体长等是数量性状,而抗病性通常定义为阈性状^[19]。因为阈性状的表型不连续以及表型与遗传效应呈非线性关系,阈性状在选择理论和评价方法上通常不同于数量性状^[30]。而且因研究对象、实验环境、实验方法、测定时间和统计方法等诸多因素的不同,造成了对于抗病力和生长之间的相关性,不同研究有着不同结果。因此,关于抗病力和生长之间的相关性,仍需要系统性的研究。

综上,本研究通过对牙鲆淋巴囊肿抗病个体间的杂交以及人工诱导减数分裂雌核发育的方式,建立了实验家系并在淋巴囊肿病高发区进行染毒养殖实验。同时,对各家系的生长情况进行了动态跟踪测量和分析,获得了一个既抗病生长又快的优良家系(抗病保护率为 97.20%; 390 d 抗病个体平均体重比对照组抗病个体平均体重高 24.47%)。以此家系为基础继续选育,有望获得牙鲆抗淋巴囊肿速生新品种。

参考文献:

- [1] Walker P J, Winton J R. Emerging viral diseases of fish and shrimp[J]. Vet Res, 2010, 41(6): 51.
- [2] Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases[M]. New York: Comstock Publishing Associates, 1988.
- [3] Zhang Y J. Light and electron microscopic studies of lymphocystis disease in *Epinethelus moara*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 1992, 14(6): 97–102. [张永嘉. 云纹石斑鱼淋巴囊肿病的光镜和电镜研究[J]. 海洋学报, 1992, 14(6): 97–102.]
- [4] Qu J, Jiang Y L, Sheng H P, et al. A preliminary report on lymphocystis disease in *Paralichthys olivaceus*[J]. China Animal Health Inspection, 1998, 15(2): 4–6. [曲径, 江育林, 沈海平, 等. 牙鲆鱼淋巴囊肿病初报[J]. 中国动物检疫, 1998, 15(2): 4–6.]
- [5] Zhang Q Y, Xiao F, Xie J, et al. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China[J]. J Virol, 2004, 78(13): 6982–6994.
- [6] Colomi A, Diamant A. Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.)[J]. J Fish Dis, 1995, 18(5): 467–471.
- [7] Shen X Z, Zhan W B. Histopathological studies on target organs of lymphocystis disease virus of fish[J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(5): 749–753. [绳秀珍, 战文斌. 鱼类淋巴囊肿病毒靶器官的组织病理研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36(5): 749–753.]
- [8] Liu Y K, Sun X Q, Huang J, et al. The diagnostic method of PCR for lymphocystis disease (LCD) of cultured *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese High Technology Letters, 2002, 12(11): 87–89. [刘允坤, 孙修勤, 黄健, 等. 牙鲆淋巴囊肿病的 PCR 诊断方法研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(11): 87–89.]
- [9] Iwakiri S, Song J, Nakayama K, et al. Host responses of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with lymphocystis cell formation[J]. Fish Shellfish Immun, 2014, 38(2): 406–411.
- [10] Zheng F, Sun X, Liu H, et al. Study on the distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1128–1134.
- [11] Feng R Z, Xiu Q S, Ming Q X, et al. Immune response of DNA vaccine against lymphocystis disease virus and expression analysis of immune-related genes after vaccination[J]. Aquac Res, 2010, 41(10): 1444–1451.
- [12] 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.
- [13] Fan C X, Chen S L, Wang L, et al. Screening and identification of SSR markers associated with lymphocystis disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 576–582. [范彩霞, 陈松林, 王磊, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记的筛选与鉴定[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 576–582.]
- [14] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, et al. Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Aquaculture, 2007, 272(1–4): 291–295.
- [15] Hwang S D, Fuji K, Takano T, et al. Linkage mapping of toll-like receptors (TLRs) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Mar Biotechnol, 2011, 13(6): 1086–1091.
- [16] National Flatfish Industry Technology Development Center.

- Annual Report 2010 of National Technology System for Flatfish Culture Industry[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2011. [国家鲆鲽类产业技术研发中心. 国家鲆鲽类产业技术体系年度报告[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2011.]
- [17] Overturf K, LaPatra S, Towner R, et al. Relationships between growth and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. J Fish Dis, 2010, 33(4): 321–329.
- [18] Imsland A K, Jonassen T M, Langston A, et al. The interrelation of growth and disease resistance of different populations of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)(J). Aquaculture, 2002, 204(1–2): 167–177.
- [19] 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.]
- [20] Chen S L, Tian Y S, Xu T J, et al. Development and characterization of 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.]
- [21] 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.]
- [22] Wang L, Hu C C, Chen S L, et al. Determination and analysis of 4 breeding traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 620–629. [王磊, 胡灿灿, 陈松林, 等. 牙鲆家系 4 个选育性状的测定与分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 620–629.]
- [23] Liu H J, Hou J L, Chang Y M, et al. Induced meiotogynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by sperm of red sea bream (*Pagrus major*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 508–514. [刘海金, 侯吉伦, 常玉梅, 等. 真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 508–514.]
- [24] Li S F, Li C H, Li J L, et al. On-station evaluation of growing performance of five strains of Nile tilapia[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22(4): 28–35. [李思发, 李晨虹, 李家乐, 等. 尼罗罗非鱼五品系生长性能评估[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 28–35.]
- [25] Kjøglum S, Larsen S, Bakke H G, et al. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Fish Shellfish Immun, 2006, 21(4): 431–441.
- [26] Kjøglum S, Henryon M, Aasmundstad T, et al. Selective breeding can increase resistance of Atlantic salmon to furunculosis, infectious salmon anaemia and infectious pancreatic necrosis[J]. Aquac Res, 2008, 39(5): 498–505.
- [27] Liu F, Li Y Z, Wang X X, et al. Estimation of genetic parameters for disease-resistance traits in *Cynoglossus semilaevis* (Günther, 1873)[J]. J Appl Ichthyol, 2016, 32(4): 643–651.
- [28] Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. Fish Shellfish Immun, 2008, 25(3): 213–221.
- [29] Sun H J, Chen S L, Zheng W W, et al. Screening for resistance to *Edwardsiella tarda* in different families of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1115–1122. [孙何军, 陈松林, 郑卫卫, 等. 抗迟缓爱德华氏菌病牙鲆家系的筛选与分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1115–1122.]
- [30] Liu Y F, Zhang Y, Wu C X. Selection theories and breeding value prediction of threshold traits[J]. Acta Agriculture University Pekinensis, 1993, 19(S1): 44–51. [刘月府, 张沅, 吴常信. 阈性状的选择理论和育种值估计方法[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(S1): 44–51.]

Analysis of growth and lymphocystis disease resistance of selected breeding families of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

HOU Jilun, WANG Guixing, ZHANG Xiaoyan, SONG Limin, SUN Zhaohui, ZHAO Yaxian, REN Jiangong, JIANG Xiufeng, SI Fei, LIU Haijin, WANG Yufen

Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China

Abstract: Lymphocystis disease is a viral infection caused by lymphocystis disease virus, which has serious impacts on the aquaculture industry, resulting in heavy losses. In order to select new varieties of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) resistant to lymphocystis disease, eight experimental groups and one control group were established in 2015. The exposure experiment was conducted on one farm with high incidence of lymphocystis disease, and the protection rate of each group was determined. At the same time, the growth traits of each group at 120 d, 180 d, 240 d, and 300 d were measured and compared. The results showed that there were different growth patterns for each group in different periods, showing inconsistent growth patterns among groups. However, in all the groups, the growth performance of group G2 was always ranked the highest for each period. The results also showed that the disease resistance protection rate of the control group was only 59.57%, while the disease resistance protection rate of all the tested groups was above 60%, reaching up to 97.20% for group G2. From the overall analysis, there were no significant differences in the body weight and body length between the disease resistant or sensitive individuals at 390 d of age. The body weight and body length were positively correlated with disease resistance protection rate, while their effects were not significant ($P>0.05$). However, the mean body weight of disease-resistant individuals in group G2 was significantly higher than that of disease-sensitive individuals ($P<0.05$). Based on the group G2, it is expected that a new variety of fast-growing lymphocystis disease-resistant Japanese flounder could be developed.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; lymphocystis disease; disease resistance protection rate; growth

Corresponding author: WANG Yufen. E-mail: wangyf-8000@163.com