

丝足鱼(*Trichogaster trichopterus*)耐盐性及盐度驯化

窦海鸽^{1,2}, 黄 健¹, 王秀华¹, 范文辉¹, 刘 莉¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:以斑马鱼(*Danio rerio*)和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)作比较, 对丝足鱼(*Trichogaster trichopterus*)耐盐性进行研究, 测定丝足鱼的96 h半致死盐度($LS_{50-96\text{ h}}$)、平均存活时间(MST)、50%存活时间(MT_{50})、开始死亡时间和死亡率等耐盐指标, 并逐级提高养殖水体盐度对丝足鱼进行耐盐驯化实验, 测定丝足鱼在盐度为14水体中不同驯化时间的血清渗透压。结果表明, ①丝足鱼的耐盐性高于斑马鱼, 而低于剑尾鱼的耐盐性; ②丝足鱼稚、幼鱼耐盐性存在着显著差异, 其耐盐性与日龄有关, 日龄越大, 耐盐性越强; ③丝足鱼在盐度14半咸水中驯化48 h左右渗透压基本调节平衡。实验证明经过从低盐度到高盐度的梯度驯化, 丝足鱼可适应盐度为14的半咸水, 为丝足鱼作为海水致病菌毒力分析模型奠定理论基础。[中国水产科学, 2006, 13(5): 775-780]

关键词:丝足鱼; 耐盐性; 咸水驯化

中图分类号: S965.199 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0775-06

近些年来, 中国海洋产业迅猛发展成为国民经济的新增长点, 然而较大规模的水产养殖病害也接连发生, 每年给国家都造成几十亿元的经济损失, 严重威胁海水养殖产业的持续发展^[1]。研究疾病发病机理、建立病害预警系统及实施健康养殖迫在眉睫, 而进行以上相关研究的关键环节之一就是病原感染动物模型的建立。丝足鱼(*Trichogaster trichopterus*), 又称丝足鲈, 属鲈形目(Perciformes)、攀鲈科(Anabantidae), 是原产于东南亚的一种热带观赏淡水鱼^[2], 繁殖快、抗病力强、容易饲养, 新加坡学者已应用在淡水鱼类细菌性病原的检测和感染模型构建等方面的研究^[3-5]。本研究以斑马鱼(*Danio rerio*)和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)作比较对丝足鱼的耐盐性进行初步研究, 探讨耐盐驯化后的丝足鱼为模式动物在海水鱼类致病菌毒力分析等方面的应用, 旨在为丝足鱼作为海水致病菌毒力分析模型奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验地点及材料

实验在黄海水产研究所病研室水族室进行。丝

足鱼、斑马鱼和剑尾鱼(鱼的体长、体质量见表1)于2005年夏季购于青岛南山花鸟鱼市, 体质健康, 摄食正常, 暂养于40 cm×30 cm×30 cm塑料整理箱, 充气泵空气增氧。实验用水采用青岛沿岸海水(盐度30~33)和曝气的自来水(盐度0)配制而成, 水体盐度用WY100Y型折光式盐度计测定。

1.2 耐盐指标

根据耐盐驯化资料^[6-7], 选用以下耐盐指标:

(1)平均存活时间(Mean survival time, MST): 将实验鱼直接从淡水移到海水中的平均存活时间。

(2)50%存活时间(Median survival time, ST_{50}): 将实验鱼直接从淡水移到海水中, 50%个体存活的时间。

(3)96 h半致死盐度(Median lethal salinity-96 h, $LS_{50-96\text{ h}}$): 将实验鱼直接从淡水移入到不同盐度的水中饲养96 h, 个体死亡一半的盐度。设盐度梯度为5、10、15、20、25、30, 用寇氏法分别计算 $LS_{50-96\text{ h}}$ ^[8]。

(4)开始死亡时间(Begin time of occurring death, BTOD): 将实验鱼直接从淡水移到海水中, 个体开始死亡的时间。

收稿日期: 2005-11-16; 修订日期: 2006-01-05。

基金项目: 中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室自选课题项目。

作者简介: 窦海鸽(1979-), 男, 硕士研究生, 从事水产动物医学研究。E-mail: haigedou@163.com

通讯作者: 黄 健。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

(5)死亡率(Mortality):将实验鱼直接从淡水移入到上述几种盐度梯度水中,在试验期间死亡个体所占的百分率。

1.3 耐盐驯化

设1个驯化组、1个非驯化组(盐度14)和1个对照组(盐度0),选择丝足鱼稚鱼(20~25日龄)和幼鱼(40~45日龄)作为耐盐实验材料,每组投放稚鱼和幼鱼各20尾,同时设1个平行组,用塑料整理箱(40 cm×30 cm×30 cm)连续充空气饲养,试验持续30 d。驯化组最初饲养于淡水中(盐度0),每隔2天提高盐度5左右,直到盐度为14时保持不变。非驯化组采用盐度14的半咸水饲养,对照组采用曝气的自来水。试验期间每2天投喂1次热带鱼专用饲料,每天吸底排污1次,水温21.5~23℃,pH 7.50~8.10,发现死鱼即刻捞出,并记录死亡时间和尾数。实验鱼死亡标准为鳃盖停止活动,用解剖针轻扎无反应^[9]。

1.4 血清渗透压的测定

丝足鱼在淡水中正常饲养5 d后,每2天提高盐度5左右,直到盐度为14。分别取在盐度14的半咸水中驯化0 h、24 h、48 h、72 h和96 h的丝足鱼各5尾,断尾取血4℃下保存过夜,用离心机离心(3 000 r·min⁻¹,20 min,4℃),取上清液于-20℃下保存。血清渗透压采用Fiske Micro-Osmometer (Model 210)渗透压分析仪进行测定。

1.5 统计分析

用SPSS10.0软件对斑马鱼、剑尾鱼和丝足鱼耐盐指标的差异及不同驯化时间的丝足鱼血清渗透压进行显著性检验及多重比较^[10]。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼、剑尾鱼和丝足鱼耐盐性比较

实验结果表明,丝足鱼耐盐 ST₅₀为53 min、MST为62.4 min、LS₉₆-96 h为17.0。与剑尾鱼和斑马鱼相比较,剑尾鱼耐盐性最高,丝足鱼次之,斑马鱼耐盐性最低(表1)。

2.2 不同日龄丝足鱼耐盐性的比较

在盐度小于15的几个试验组中,受试鱼活动正常,食欲良好,未见死亡现象,而在盐度高于15的试验组中,受试鱼沿整理箱边不断游动,呼吸加快,表现急躁、窜跳,排泄物增多,最终死亡。盐度由20升高到25时,稚幼鱼 MST 和 ST₅₀都逐渐下降,但下降幅度较小,而盐度由25升高到30时,各耐盐指标的下降幅度相对较大(表2)。稚幼鱼的耐盐指标比较,表明丝足鱼的耐盐性与其日龄有一定的关系:鱼日龄越大,耐盐性越强。

2.3 不同盐度下的死亡率

从低盐度到高盐度,丝足鱼开始死亡时间和死亡高峰逐渐提前,丝足鱼在盐度20、25和30水中死亡率均为100%,在盐度15的半咸水中耐受96 h,稚鱼死亡率为20%,而幼鱼死亡率只有14.3%。在盐度5、10、14试验组中耐受96 h,丝足鱼活动正常。在高于15盐度下的丝足鱼死亡变化趋势如图1。

2.4 耐盐驯化过程中死亡率差异

驯化组2天提高盐度5左右,由耐盐性研究中得知盐度14是丝足鱼耐盐的临界值,故驯化最终盐度确定为14,驯化持续30天结束时稚幼鱼死亡率均为0。而非驯化组(盐度14)中,稚鱼的死亡率为65%,幼鱼的死亡率为40%(表3),稚幼鱼存活率差异显著($P<0.05$)(表3)。实验说明,丝足鱼经驯化可安全适应盐度14的半咸水,同时再次表明丝足鱼耐盐性与其日龄密切关系。

表1 斑马鱼、剑尾鱼和丝足鱼耐盐驯化指标比较

Tab.1 Comparison of salinity tolerance of *Danio rerio*, *Xiphophorus helleri* and *Trichogaster trichopterus*

分组 Group	实验鱼尾数 Number of fish	体质量/g Weight	体长/cm Body length	50%存活时间 ST ₅₀ /min	平均存活时间 MST/min	96 h半致死盐度 LS ₉₆ -96 h
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	140	0.33±0.05	3.68±0.19	41 ^a	43 ^a	12.30 ^a
剑尾鱼 <i>Xiphophorus helleri</i>	140	0.98±0.09	4.24±0.21	62 ^b	65 ^b	20.23 ^b
丝足鱼 <i>Trichogaster trichopterus</i>	140	1.65±0.10	5.08±0.26	53 ^c	62.4 ^b	17.0 ^c

注:同一列中数值,上标相同者为差异不显著($P>0.05$)。

Note: Means in the same column followed by the same letters are not significantly different($P>0.05$).

表2 不同盐度下丝足鱼的耐盐指标

Tab.2 Salinity tolerance indexes of gourami *Trichogaster trichopterus* challenged at difference salinities

盐度 Salinity	规格 Specification	平均存活 时间/min MST	50%存活 时间/min ST ₅₀	96 h 半致死盐度 LS ₅₀ -96 h	开始死亡 时间/min BTOD	死亡率/% Mortality
5	稚鱼 Juvenile	∞	∞	—	—	0
	幼鱼 Young	∞	∞	—	—	0
10	稚鱼 Juvenile	∞	∞	—	—	0
	幼鱼 Young	∞	∞	—	—	0
14	稚鱼 Juvenile	∞	∞	—	—	0
	幼鱼 Young	∞	∞	—	—	0
15	稚鱼 Juvenile	∞	∞	—	2 880	20 ^a
	幼鱼 Young	∞	∞	—	4 200	14.3 ^b
20	稚鱼 Juvenile	152.3 ^a	148.8	—	65.0	100
	幼鱼 Young	212.4 ^b	210.4	—	140	100
25	稚鱼 Juvenile	142.5 ^a	140.3	—	60.0	100
	幼鱼 Young	175.1 ^b	168.5	—	81.0	100
30	稚鱼 Juvenile	41.4 ^a	43.0	16.8	31.0	100
	幼鱼 Young	62.4 ^b	53.0	17.0	50.0	100

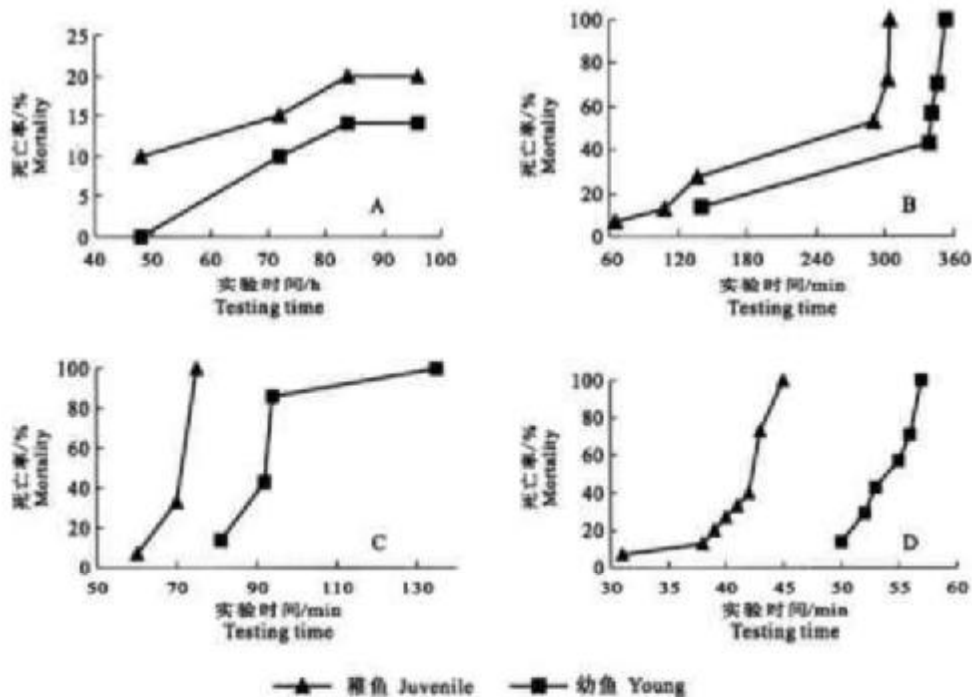
注:同一列中数值,上标不同者为差异显著($P < 0.05$).Note: Means in the same column followed by the different letters are significantly different ($P < 0.05$).

图1 不同盐度下丝足鱼稚鱼和幼鱼死亡率变化

A: 盐度 15; B: 盐度 20; C: 盐度 25; D: 盐度 30

Fig.1 Mortality of the gourami *T. trichopterus* challenged at different salinity

A: Salinity 15; B: Salinity 20; C: Salinity 25; D: Salinity 30

表3 持续盐度为14时驯化和非驯化条件下丝足鱼的死亡率
Tab.3 Mortality of gourami *T. trichopterus* acclimated and challenged to salinity 14

丝足鱼规格 <i>T. trichopterus</i> specification	驯化过程/d Domestication course	驯化组 Domesticated group		非驯化组 Un-domesticated group		对照组 Control group	
		盐度 Salinity	死亡率/% Mortality	盐度 Salinity	死亡率/% Mortality	盐度 Salinity	死亡率/% Mortality
稚鱼 Juvenile	2	5	0	14	35	0	0
	4	10	0	14	55	0	0
	6	14	0	14	65	0	0
	30	14	0	14	65	0	0
幼鱼 Young	2	5	0	14	25	0	0
	4	10	0	14	40	0	0
	6	14	0	14	40	0	0
	30	14	0	14	40	0	0

2.5 不同驯化时间血清渗透压的变化差异

在盐度驯化过程中,丝足鱼体内渗透压也发生改变,以适应变动的环境渗透压。在盐度14半咸水驯化0 h、24 h和48 h血清渗透压测定,分别为280 m Osm·kg⁻¹、380 m Osm·kg⁻¹、420 m Osm·kg⁻¹,三者之间差异极显著($P < 0.01$);驯化48 h、72 h和96 h的渗透压分别为420 m Osm·kg⁻¹、428 m Osm·kg⁻¹、426 m Osm·kg⁻¹,三者之间差异不显著($P > 0.05$)(图2)。由此推断,丝足鱼在盐度14的半咸水中驯化48 h左右,体内渗透压基本调节平衡。

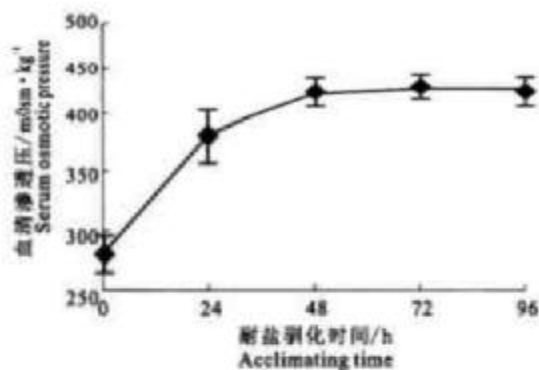


图2 在盐度14条件下不同驯化时间的丝足鱼血清渗透压变化

Fig.2 Serum osmotic pressure of gourami *T. trichopterus* after different acclimating time at salinity 14

3 讨论

3.1 丝足鱼的耐盐性和适盐范围

国内外学者发现大部分养殖鱼类经过驯化对盐度适应会有所提高^[11-12],比如食蚊鱼(*Gambusia affinis*)和虹鳉(*Poecilia reticulatus*)经过逐渐适应可以忍受39.0~58.8的盐度^[13-14],鲮(*Parasilurus asotus*)的盐度耐受极限大约为9.5^[15],草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)可适应的最高盐度范围为7~9^[16]。李学军等^[17]研究发现以色列罗非鱼(*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*)日龄越大,耐盐性越强,本实验发现存在同样的规律:在同一盐度梯度条件下,日龄较大的丝足鱼存活时间相对较长,说明日龄大丝足鱼的适盐能力强。盐度的突变是导致狭盐性鱼类死亡的重要因素。本研究逐级增加养殖水体盐度对丝足鱼进行耐盐驯化,丝足鱼对盐度的缓慢变化具有较强的适应性,这为人工耐盐驯化成功奠定了基础,丝足鱼经6~8 d从低盐度到高盐度过程可以安全适应盐度14的半咸水。不同日龄的丝足鱼在盐度15的水中96 h内均出现死亡,说明丝足鱼耐盐临界值低于15,因此建议丝足鱼驯化最终盐度应在13~14之间。

3.2 渗透压调节和耐盐性的关系

鱼类对水环境中盐度的适应主要靠渗透压的调节来完成^[18-20]。Jackson^[21]对鲑鳟鱼类的渗透压变化规律研究分析后认为,在渗透压的调节过程中

达到新的平衡至少需要40 h;Amoudi^[22]等认为鱼类经驯化到适应一个较高盐度,一般需要48 h的时间。丝足鱼驯化48 h左右渗透压基本达到平衡,结果与以上学者观点相一致。近年来,人们发现利用光照的改变^[23]、加强营养^[24]及注射生长激素^[25]等技术手段可提高鱼类渗透压调节能力,从而促进鱼类对高盐度的适应能力。以上因素的变化是否可同样提高丝足鱼对海水的耐受性?如果可能,对于应用耐盐驯化的丝足鱼分析海水致病菌毒力和评价疫苗免疫保护作用的研究将是一个极大的推动。

3.3 丝足鱼耐盐驯化成功为其作为海水致病菌毒力分析模型奠定基础

丝足鱼作为试验模式动物,近几年来逐渐被应用到鱼类疾病学^[3]、生理学^[26]和免疫学^[27]等方面的研究。本课题组发现丝足鱼在盐度13~14时对海水鱼类致病病原感染非常敏感(另文发表),丝足鱼作为海水致病菌毒力分析模型,不仅经济便宜、饲养管理方便,还可以避免实验材料本身因海水细菌隐性感染影响实验结果的判断,在海水鱼类致病病原分析和感染模型的复制等方面应用前景十分广阔。

致谢:实验过程中,青岛科技大学马曜辉和唐劭同学参加部分工作,中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室潘晋青教授、刘泓宇博士给予大力支持和热情帮助,谨此深表谢意!

参考文献:

- [1] 赵法箴. 中国水产健康养殖的关键技术研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 1-5.
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 廖学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [3] Srinivasa Rao P S, Lim T M, Leung K Y. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis[J]. Infect Immun, 2003, 71(3): 1343-1351.
- [4] Yu H B, Rao P S, Lee H C, et al. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis[J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1248-1256.
- [5] Srinivasa Rao P S, Lim T M, Leung K Y. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates[J]. Infect Immun, 2001, 69(9): 5689-5697.
- [6] Villegas C T. Evaluation of the salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* and their F1 hybrids[J]. Aquaculture, 1990, 85: 281-292.
- [7] Watanabe W O, Ellington L J, Olla B L, et al. Salinity tolerance and seawater survival vary ontogenetically in Florida red tilapia[J]. Aquaculture, 1990, 87: 311-321.
- [8] 荆永志, 李在连. 实验细菌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [9] Watanabe W O, Kuo C M, Huang M C. The ontogeny of salinity tolerance in the tilapias *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* and *O. mossambicus* × *O. niloticus* hybrid, spawned and hatched in freshwater[J]. Aquaculture, 1985, 47: 353-367.
- [10] 陈平雁, 黄新明. SPSS10.0 统计软件应用教程[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001.
- [11] 臧维玲, 王武, 叶林, 等. 盐度对淡水鱼类的毒性效应[J]. 海洋与湖泊, 1989, 20(5): 445-452.
- [12] Husan M R, Macintosh D J. Acute toxicity of ammonia to common carp fry[J]. Aquaculture, 1986, 54: 97-107.
- [13] Gupta K K, Achar D P, Theerapongkarn W P, et al. Salinity tolerance of *Gambusia affinis* larvivorous fish[J]. Indian J Public Health, 1991, 35(1): 19-20.
- [14] Chervinski J. Salinity tolerance of the guppy, *Poecilia reticulata* Peters[J]. J Fish Biol, 1984, 24: 449-452.
- [15] Chervinski J. Salinity tolerance of young catfish, *Clarias farias* (Burchell)[J]. J Fish Biol, 1984, 25: 147-149.
- [16] Kilambi R V, Zdzink A. The effects of acclimation on the salinity tolerance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Cuv. and Val.)[J]. J Fish Biol, 1980, 16: 171-175.
- [17] 李学军, 李思发, 冯金海, 等. 以色列红罗非鱼耐盐性的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(3): 205-208.
- [18] Peters J E, Maclean N. The haemoglobin of the fish *Sarotherodon mossambicus* (Peters): functional significance and ontogenetic changes[J]. J Fish Biol, 1976, 9: 447-455.
- [19] Clarke W C, Bern H A, Li C H, et al. Evaluation of the seawater challenge test as an index of marine survival[J]. Aquaculture, 1982, 18: 177-183.
- [20] Helms L M, Grau E G, Shimoda S K, et al. Bern H A. Studies on the regulation of growth hormone release from the proximal pars distalis of male tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in vitro[J]. Gen Comp Endocrinol, 1987, 65(1): 48-55.
- [21] Jackson A J. Osmotic regulation in rainbow trout *Salmo gairdneri* following transfer to sea water[J]. Aquaculture, 1981, 24: 143-151.
- [22] AL-Amoudi M M. Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to sea water-an experimental study[J]. Aquaculture, 1987, 65: 333-342.
- [23] Likongwe J S, Stecko T D, Stautter Jr J R, et al. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus)[J]. Aquaculture, 1996, 146: 37-46.
- [24] Jurek K, Bittrorf T, Vokler T. Biochemical investigations into the influence of environmental salinity on starvation of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. Aquaculture, 1984, 40: 171-182.
- [25] Seddiki H, Baud G, Meunier V, et al. Effects of growth hormone treat-

- ment on oxygen consumption and seawater adaptability in Atlantic salmon parr and pre-smolts[J]. *Aquaculture*, 1996, 148: 49-62.
- [26] Degani G, Jackson K, Goldberg D, et al. BetaFSH, betaLH and growth hormone gene expression in blue gourami (*Trichogaster trichopterus*, Pallas 1770) during spermatogenesis and male sexual behavior[J]. *Zool Sci*, 2003, 20(6): 737-43.
- [27] Fock W L, Chen C L, Lam T J, et al. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas) against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11(2): 101-13.

Salinity tolerance and salt water acclimation of gourami *Trichogaster trichopterus*

DOU Hai-ge^{1,2}, HUANG Jie¹, WANG Xiu-hua¹, FAN Wen-hui¹, LIU Li¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The salinity tolerance of gourami *Trichogaster trichopterus* was examined in comparison with *Danio rerio* and *Xiphophorus helleri*. Five parameters, including mean survival time (MST), 50% survival time (ST₅₀), 96h median lethal salinity (LS₅₀-96h), beginning time of death occurring (BTOD), and mortality, were measured. The salt water acclimation of gourami *T. trichopterus* and serum osmotic pressure of the gourami after different acclimating time at salinity 14 were studied. The major results were as follows. 1) The salinity tolerance of *T. trichopterus* is stronger than *D. rerio*, but it is weaker than *X. helleri*. 2) The difference of salinity tolerance is highly significant between juvenile and young of gourami *T. trichopterus*, and the salinity tolerance is related to the age. The older animals have the stronger salinity tolerance. 3) Serum osmotic pressure of the gourami *T. trichopterus* is in equilibrium after 48 hours at salinity 14. Generally, after acclimation from low salinity to high salinity step by step, gouramis *T. trichopterus* can tolerate 14 salinity safely. The results lay a theoretical foundation for *T. trichopterus* as an infection model to analyze the pathogenicity of sea water bacteria. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 775-780]

Key words: *Trichogaster trichopterus*; salt-tolerance; salt water acclimation

Corresponding author: HUANG Jie. E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn