

不同品系罗非鱼抗无乳链球菌病性能的评估

朱佳杰, 周宇, 谭芸, 甘西*, 沈夏霜, 刘溪, 敖秋桅 (广西壮族自治区水产科学研究院/广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要 [目的] 为罗非鱼的养殖提供技术参考。[方法] 对吉富罗非鱼 P_0 代和抗病选育 P_2 代、奥尼罗非鱼、尼罗罗非鱼及奥利亚罗非鱼进行人工感染无乳链球菌, 评估不同品系罗非鱼的抗无乳链球菌病性能。[结果] 从感染死亡率来看, 奥尼罗非鱼的抗病性能优于其他品系, 各组的感染死亡率大小依次为吉富罗非鱼 P_0 代 > 尼罗罗非鱼 > 奥利亚罗非鱼 > 吉富罗非鱼抗病 P_2 代 > 奥尼罗非鱼。其中, 吉富罗非鱼抗病 P_2 代的死亡率比 P_0 代降低 45.3%, 与奥尼鱼的死亡率相近。从死亡历时来看, 吉富罗非鱼抗病选育 P_2 代在感染后 48 h 才出现死亡, 而其他组均在感染后 24 h 内出现死亡。[结论] 通过针对性选育能有效提高吉富罗非鱼的抗病性能, 同时也为在罗非鱼苗种投放时品种的选择提供参考依据。

关键词 罗非鱼; 抗病选育; 无乳链球菌

中图分类号 S965.125 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)10-168-03

Evaluation on the Resistance of Different Tilapia Cultivars to *Streptococcus agalactiae*

ZHU Jia-jie, ZHOU Yu, TAN Yun, GAN Xi* et al (Guangxi Academy of Fishery Sciences/Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Nanning, Guangxi 530021)

Abstract [Objective] The research aimed to provide technical references for the breeding of tilapia. [Method] GIFT P_0 and disease-resistant P_2 , *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* were challenged by *Streptococcus agalactiae* by artificial infection. The disease resistance of different tilapia cultivars to *Streptococcus agalactiae* was evaluated. [Result] From the infection mortality, the disease resistance of *O. niloticus* was better than that of other cultivars. The order of infection mortality was GIFT P_0 > *O. aureus* > *O. niloticus* × *O. aureus* > GIFT disease-resistant P_2 > *O. niloticus*. The mortality of GIFT disease-resistant P_2 was 45.3% lower than GIFT P_0 , which was similar to that of *O. niloticus*. From the duration of death, GIFT disease-resistant P_2 died within 48 h after the artificial infection, but the fishes died within 24 h after the infection. [Conclusion] The disease resistance of GIFT tilapia could be greatly improved by selective breeding, and the research could provide references for the selection of tilapia cultivars.

Key words Tilapia; Disease-resistance breeding; *Streptococcus agalactiae*

罗非鱼原产于非洲, 1956 年首次引入中国大陆^[1], 经过几十年的发展我国已成为罗非鱼养殖和出口的第一大国, 年均总产量和出口量约占世界总量的 1/3。目前我国养殖的罗非鱼品种主要有吉富罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis aureus*)、奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)、奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*)、红罗非鱼 (*Oreochromis* sp.) 等^[2]。近年来, 随着养殖规模的盲目扩大和水质环境恶化等因素的影响, 罗非鱼的病害日趋严重, 尤其是 2009 年至今罗非鱼无乳链球菌病已成为罗非鱼养殖业的首要病害^[3-5], 其中吉富罗非鱼发病最为严重, 发病死亡率达 60% 以上。因此, 有必要对现有的主养罗非鱼品种进行抗病性检测, 筛选出抗病力强的品种用于推广养殖, 减少疾病的危害, 为罗非鱼养殖业的持续发展提供良种保证。

目前, 国内外对罗非鱼链球菌病的研究主要集中在致病机理^[6-9]、疫苗研发^[10-11]、药物防控^[12] 及抗病育种^[13] 等方面。在抗病育种方面, 朱佳杰等^[13] 通过家系选育和人工感染方式筛选出 1 批吉富罗非鱼高抗病家系和易感病家系; 强俊等^[14] 分析了海豚链球菌感染对不同品系罗非鱼血液生化

指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响; 柯剑^[15] 比较了奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼、奥尼罗非鱼、吉富罗非鱼及莫荷罗非鱼 5 个品系感染嗜水气单胞菌后的抗病力差异。目前, 国内尚未见到关于不同品系罗非鱼感染无乳链球菌的报道。在前期开展吉富罗非鱼抗病选育的基础上, 笔者将选育出的 P_2 代群体分别与未选育的 P_0 代、尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及奥尼罗非鱼进行抗无乳链球菌病性能比较, 一方面对吉富罗非鱼抗病育种的效果进行评价, 另一个方面评估各个品系罗非鱼的抗病性能, 以期对罗非鱼养殖提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼。 试验所用的罗非鱼均由国家级广西南宁罗非鱼良种场提供。其中吉富罗非鱼 P_0 代为从国家级青岛罗非鱼良种场引种后群体选育的后代, 而吉富罗非鱼抗病 P_2 代则是在 P_0 代的基础上开展抗无乳链球菌病针对性选育, 目前已选育到第 2 代。奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼及奥尼罗非鱼鱼苗均取自同一个家系的苗种。2013 年将相同数量的这 5 种鱼苗在网箱中单独培育至规格 50 ~ 60 g 后进行人工感染无乳链球菌攻毒试验。试验前先对各品种鱼随机抽样进行细菌分离及 PCR 鉴定 (参考黎炯^[16] 的方法) 是否已感染无乳链球菌, 将未感染无乳链球菌的鱼用于攻毒试验。

1.1.2 试验菌株。 攻毒感染试验用的无乳链球菌菌株 (HN016) 由广西水产科学研究院鱼病防治研究室馈赠, 经过基因型和血清型鉴定^[17], 该菌株为我国罗非鱼主产区的优势菌株。菌株保存在 -80 °C 冰箱内, 取出后接种于鸡血平板, 28 °C 培养 24 h, 挑取单菌落进行革兰氏染色, 鉴定细菌是

基金项目 广西科技重大专项计划项目 (桂科重 14121004-1-1); 广西区水产畜牧兽医局科研计划项目 (桂渔牧科 1204903); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49); 广西八桂学者建设工程专项; 广西区直属公益性质科研院所基本业务费专项 (GXIF-2014-12)。

作者简介 朱佳杰 (1981-), 男, 广西贵港人, 助理研究员, 从事水产养殖方面的研究。* 通讯作者, 研究员, 硕士生导师, 从事水产养殖方面的研究。

收稿日期 2015-03-05

否被污染;随机挑取单菌落于含有 200 ml TSB 培养基的 1 000 ml 锥形瓶中,28 ℃ 下振荡培养 48 h,测定菌液的 OD 值,确定菌液浓度。然后,对菌液进行不同浓度稀释感染吉富罗非鱼 P₀ 代筛选出半数致死浓度,并以此浓度作为评估各组罗非鱼抗病力的标准。

1.2 试验方法 每组随机抽取同个家系的鱼 200 尾,设 3 个重复,每个重复 50 尾,另设置 1 个对照组。先在容量 1 m³ 的大桶中暂养 10 d,水温 30~31 ℃,pH 6.7。每天早晚各投喂饲料 1 次,每隔 2 d 换水 1 次,正常充气,试验开始 1 d 前暂停投饵料。

经半数致死浓度预试验筛选,对每组鱼进行腹腔注射无乳链球菌,菌液浓度为 1.47 × 10⁸ CFU/ml,剂量为 0.2 ml。对照组用等量无菌(0.85% NaCl)生理盐水注射。注射完成后将鱼放回原试验大桶饲养,每隔 3 h 捞出死亡鱼并记录数量,待各组均停止死亡后统计死亡鱼的数量和死亡时间。

1.3 数据处理 采用 Excel 2003 软件进行数据统计分析及

图表制作。

2 结果与分析

2.1 不同品系罗非鱼感染无乳链球菌后的抗病性能分析 试验组各品种罗非鱼感染无乳链球菌后均出现了不同程度的死亡。发病症状主要表现为:眼球突出,游动时出现侧翻和打转现象。解剖后发现鳃盖充血,肝脏及胆囊肿大、肠壁明显变薄等。对死鱼随机抽样进行脑组织细菌分离及 PCR 鉴定,证实为无乳链球菌感染致死。由表 1 可知,无乳链球菌感染后各试验组的死亡率大小依次为吉富罗非鱼 P₀ 代 > 美国尼罗罗非鱼 > 奥利亚罗非鱼 > 吉富罗非鱼抗病 P₂ 代 > 奥尼罗非鱼。其中,吉富罗非鱼抗病 P₂ 代的致死率为 22.7%,比未经选育的 P₀ 代降低了 45.3%,比尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的死亡率均低。结果表明,经过 2 个世代针对性的开展抗病选育,吉富罗非鱼抗病 P₂ 代的抗病性能与 P₀ 代相比获得了显著提高,已接近奥尼罗非鱼的抗病力水平,选育效果显著。

表 1 不同品系罗非鱼感染无乳链球菌的试验结果

组别	重复	数量 尾	菌液浓度 CFU/ml	剂量 ml	不同时间的死亡数//尾						死亡总数 尾	平均死亡 率//%	
					12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h			
奥尼罗非鱼	1	50	1.46 × 10 ⁸	0.2	0	3	6	2	1	0	0	12	21.3 ± 2.3
	2	50			0	2	5	3	0	0	0	10	
	3	50			0	1	6	2	0	1	0	10	
	4	50	0(生理盐水)		0	0	0	0	0	0	0	0	
吉富罗非鱼 P ₀ 代	1	50	1.46 × 10 ⁸	0.2	1	10	13	6	1	1	0	32	68.0 ± 3.5
	2	50			0	13	15	5	2	0	0	35	
	3	50			0	12	16	3	2	2	0	35	
	4	50	0(生理盐水)		0	0	0	0	0	0	0	0	
尼罗罗非鱼	1	50	1.46 × 10 ⁸	0.2	0	6	3	2	3	1	0	15	36.0 ± 5.3
	2	50			0	8	6	3	2	0	0	19	
	3	50			0	9	5	5	1	0	0	20	
	4	50	0(生理盐水)		0	0	0	0	0	0	0	0	
奥利亚罗非鱼	1	50	1.46 × 10 ⁸	0.2	0	3	5	4	3	0	0	15	26.7 ± 3.1
	2	50			0	4	5	3	1	0	0	13	
	3	50			0	5	3	3	1	0	0	12	
	4	50	0(生理盐水)		0	0	0	0	0	0	0	0	
吉富罗非鱼抗病 P ₂ 代	1	50	1.46 × 10 ⁸	0.2	0	0	2	5	4	0	0	11	22.7 ± 3.1
	2	50			0	0	3	4	3	0	0	10	
	3	50			0	0	0	7	6	0	0	13	
	4	50	0(生理盐水)		0	0	0	0	0	0	0	0	

2.2 5 种罗非鱼人工感染无乳链球菌后死亡时间 从图 1 可以看出,各试验组罗非鱼的死亡的变化趋势呈先逐渐上升后趋向于平稳。其中,吉富罗非鱼 P₀ 代的发病死亡高峰期主要集中在 12~72 h,而尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼、奥利亚罗非鱼、奥尼罗非鱼的发病死亡高峰期均集中 24~96 h,而吉富罗非鱼抗病 P₂ 代的死亡时间则主要集中在 48~96 h,感染后 120 h 各组的死亡数量逐渐趋向稳定。此试验的死亡规律与朱佳杰等^[13]相似,说明此次感染是比较成功的。

3 讨论

无乳链球菌属于人畜鱼共患病原菌,可以在人类、奶牛、小鼠、蜥蜴之间交叉感染。Lau^[18]及 Koh^[19]等研究表明罗非鱼链球菌也能够传染给人类。CHEN M 等^[20]研究发现

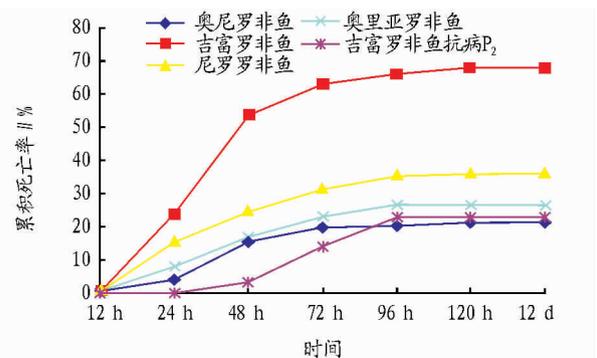


图 1 不同品系罗非鱼在人工感染无乳链球菌后的累积死亡率 2009~2012 年我国罗非鱼养殖的病害主要是无乳链球菌病,

集中在每年 6~10 月,死亡率为 30%~80%。研究表明,鱼类对疾病的抵抗力存在着物种间和个体的差异。因此,可以通过人工感染试验来培育抗病力强的品系。大西洋鲑(*Salmo salar*)^[17]及牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[21]是鱼类抗病育种较成功的例子。该研究在 2012 年筛选出的 11 个吉富罗非鱼抗病家系的基础上,通过家系间杂交获得抗病 P₂ 代,并选择抗病力强的 P₂ 代家系与奥尼罗非鱼、吉富罗非鱼 P₀ 代、尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼进行抗病性能比对,发现奥尼罗非鱼的抗病性能最强,这是种间杂交带来的杂种优势的体现。其次是吉富罗非鱼抗病 P₂ 代,主要表现在感染死亡率及死亡历时 2 个方面。它感染无乳链球菌以后的死亡率比吉富罗非鱼 P₀ 代、尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼均低,表明经过针对性的选育能显著提升吉富罗非鱼的抗病水平;死亡历时时间也比其他品系有所延长,这在养殖生产中为药物防治或疫苗免疫赢得了宝贵的时间。该研究结果与王瑞^[22]比较吉富罗非鱼、尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼、奥尼罗非鱼感染海豚链球菌的抗病力结果相似,但因菌株、感染剂量及试验鱼规格不同,各品系间的感染死亡率有所差异。

家系育种作为选择育种的重要手段之一,已在鱼类育种工作中得到广泛应用。Bolivar 等^[23]通过家系选育对尼罗罗非鱼 16 周时的体重进行连续 10 年选育,平均每个世代的体重增长 12.4%,效果非常理想。该研究中的吉富罗非鱼抗病 P₂ 代是在 P₀ 代的基础上通过家系间杂交选育出来的,其感染后死亡率比 P₀ 代降低 45.3%,表明家系选育在罗非鱼抗病育种中确实有效。究其原因,是因为将抗病性能优秀的家系进行多个世代系统定向选育,既避免了近亲繁殖,又增加了群体内抗病基因的富集,逐步稳定性状最终达到育成新品系的目的。

该研究对 5 个不同品系进行抗无乳链球菌病性能评估,一方面证实了家系选育确实能有效提高吉富罗非鱼的抗病性能,另一方面也为广大养殖户在罗非鱼苗种投放时品种的选择提供参考依据。

参考文献

- [1] 李家乐,李思发. 中国大陆尼罗罗非鱼引进及其研究进展[J]. 水产学报,2001,25(1):90-95.
- [2] 唐瞻杨. 广西罗非鱼产业化发展现状的研究[D]. 南宁:广西大学,2011:8-12.
- [3] 朱佳杰,沈夏霜,付强,等. 吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织在不同时期蛋白质组的表达差异[J]. 水产学报,2013,37(12):1821-1828.

(上接第 161 页)

只/m²,每个保温率可饲养 500 只雏鸡,育雏舍和保温伞应在雏鸡期到达前 24 h 开始加温,使地面保持在 30~32℃,以后每周降温 2℃,直至降到 18~21℃,相对湿度 65%左右,光照时间每天安排 23 h 的光照,1 h 的黑暗,1~2 周龄内光照强度为 10~15 lx/m²,3~4 周龄光照强度为 5 lx/m²。

(4) 育成期的光照管理措施是种鸡饲养的关键,而掌握光照时间长短又是调节种鸡的生长速度和性成熟迟早的关键。增加光照时间,可以促进性成熟,减少光照时间可以推

- [4] 李莉萍,王瑞,黄婷,等. 广西罗非鱼链球菌病流行菌株 PCR 鉴定和 PFGE 基因型分析[J]. 水产学报,2013,37(6):927-935.
- [5] 李莉萍,王瑞,黄婷,等. 海南、福建 3 省罗非鱼链球菌流行菌株 PCR 鉴定和 PFGE 基因型分析[J]. 西南农业学报,2013(5):2133-2140.
- [6] EVANS J J, KLESZIUS P H, GLIBERT P M, et al. Characterization of beta-haemolytic Group B Streptococcus agalactiae in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wildmullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait [J]. Journal of Fish Diseases, 2002,25:505-513.
- [7] PEREIRA U P, MIAN G F, OLIVEIRA I C, et al. Genotyping of Streptococcus agalactiae strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Niletilapia [J]. Vet Microbiol, 2010,140(1/2):186-192.
- [8] 卢迈新,黎炯,叶星,等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报,2010,37(5):766-774.
- [9] 田珂,贾爱卿,陈善真,等. 罗非鱼无乳链球菌生物学特性与致病力研究[J]. 中国畜牧兽医杂志,2013,40(6):203-208.
- [10] CHEN M, WANG R, LI L P, et al. Sequence and Evolution Differences of *Oreochromis niloticus* CXC Contribute to the Diversification of Cellular Immune Responses in Tilapias with Treatment of Streptococcus iniae [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2013,12(3):303-311.
- [11] 陈贺. 罗非鱼源无乳链球菌灭活疫苗的研制及其免疫效果的研究[D]. 湛江:广东海洋大学,2012:8-13.
- [12] 李波,陈明,李莉萍,等. 广西罗非鱼链球菌病原的生化鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(10):93-95.
- [13] 朱佳杰,李莉萍,唐瞻杨,等. 吉富罗非鱼家系构建及抗病力检测[J]. 南方水产科学,2012,8(6):22-27.
- [14] 强俊,杨弘,王辉,等. 海豚链球菌感染对不同品系罗非鱼血液生化指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响[J]. 水产学报,2012,36(6):958-968.
- [15] 柯剑. 罗非鱼病原菌分离鉴定及不同品系间抗病力初步比较[D]. 上海:上海海洋大学,2011:33-39.
- [16] 黎炯,叶星,卢迈新,等. 双重 PCR 快速鉴别无乳链球菌和海豚链球菌[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(4):449-452.
- [17] 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]. Aquacult Res, 2008,39(5):498-505.
- [18] LAU S K, WOO P C, LUK W K, et al. Clinical isolates of Streptococcus iniae from Asia are more mucoid and beta-hemolytic than those from North America [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006,54:177-181.
- [19] KOH T H, KURUP A, CHEN J. Streptococcus iniae discitis in Singapore [J]. Emerg Infect Dis, 2004,10:1694-1696.
- [20] CHEN M, LI L P, WANG R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China [J]. Veterinary Microbiology, 2012,159:526-530.
- [21] 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.
- [22] 王瑞. 罗非鱼 ICER 和 PGRN 基因 cDNA 序列及表达分析[D]. 南宁:广西大学,2010:9-12.
- [23] BOLIVAR R B, NEWKIRK G F. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model [J]. Aquaculture, 2002,204(3/4):371-381.

迟性成熟。光照强度以 5 lx/m² 为宜,酷热高温夏季应将人工补充光照时间安排在一天比较凉爽的时刻,当鸡群已经产蛋后绝不可缩减光照时间,产蛋鸡在自然光照增长时产蛋量会逐渐增加。

参考文献

- [1] 江苏省泰州畜牧兽医学校. 适用养鸡大全[M]. 北京:中国农业出版社,1992.
- [2] 陈善验. 鸡饲养与气象环境条件关系研究技术总结报告[R]. 湖南娄底生物科学研究所,2008.