

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)耐高温品系选育 及耐温性能评估*

马爱军¹ 黄智慧¹ 王新安¹ 郭黎¹ 雷霖霖¹
杨志² 曲江波²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071; 2. 烟台市开发区天源水产有限公司 烟台 264003)

提要 采用家系选育方法,进行了大菱鲂耐高温性状选育研究,对两代家系耐温性能进行测定,并利用 bCOX 回归分析了各家系的耐温性优势比。结果表明:各家系耐温性差异达到了显著水平($P < 0.05$),并且耐高温能力的优势比也存在显著差异,这反映出在大菱鲂耐高温选育中家系选择的高效性;经过一代选育,获得 4 个耐高温家系,并据此构建选育二代家系。耐温性能评估,选育二代比一代有显著提高,在 27℃ 高温条件下,选育一代的平均死亡率为 49%,选育二代的平均死亡率为 10.26%;28℃ 条件下,选育二代耐高温子代的平均死亡率为 32.83%,对照组的平均死亡率为 88.9%;经过筛选后,选育二代的耐温性比选育一代提高了 1—2℃ 左右。

关键词 大菱鲂,耐温性,家系,优势比,选育
中图分类号 Q953

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)是原产欧洲沿海的一种特有的名贵低温经济鱼类。具有生长迅速、肉味鲜美和经济价值高等优点,自然分布于大西洋东北部,冰岛和摩洛哥附近的欧洲沿海,相对盛产于北海、波罗的海以及冰岛和斯堪的纳维亚半岛附近海域(雷霖霖, 2003)。黄海水产研究所于 1992 年“跨洋引种”将其引入我国,突破“种子工程”,创建了“温室大棚+深井海水”的开放式工厂化养殖模式,使其成为我国北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一(雷霖霖等, 2002; 马爱军等, 2002)。大菱鲂为冷温性鱼类,对温度等环境指标要求较严,适宜生长水温 12—19℃;通常在良好的充气和流水条件下,耐受高温可达 25—26℃,但时间不宜长;最高生长水温 21—22℃,最低生长水温 7—8℃(雷霖霖, 2005); Purdom 等(1972)试验证明,大菱鲂最大的生长水温是 18.9℃;温度对大菱鲂幼鱼生长、成活率的影响试验表明,温度 4—20℃

时,大菱鲂幼鱼成活率为 100%, 22—24℃ 为 80%, 26℃ 为 40%;当水温达到 28℃,幼鱼成活率为 0 (高淳仁等, 2006)。温度作为主导环境因子之一,直接影响着鱼体生化、生理和行为(Beitinger *et al*, 2000),对鱼类不适宜的高温会使鱼体产生高温应急反应,导致死亡率升高,生长速度和抗病力下降(方永强等, 2001; Dominguez *et al*, 2004)。对大菱鲂的适宜养殖水温而言,中国北方夏季自然海水温度偏高,目前解决这一问题主要通过抽提深井海水降温,虽然这种方法效果显著,但缺点也很明显:首先,抽提海水需要较大的耗能;其次,也给环境带来极大的压力,在一些深水井分布密度较大的地区,由于过度抽取,造成地下水位严重下降(雷霖霖等, 2002)。此外,大菱鲂在南方沿海的接力北方推广养殖过程中,受春末至秋末的高温的限制,通常养殖周期为 11 月中旬到来年的 3—4 月份,延长养殖周期将大大提高养殖效益。

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-50-G01)、国家 863 计划(2012AA10A408-8)共同资助。马爱军, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-06-30, 收修改稿日期: 2011-09-21

对大菱鲂的耐温性状进行遗传改良,选育出生长性能优良的耐高温新品种已成为节能环保、提高养殖效益和健康化养殖水平的当务之急。

国内对鱼类耐温性状遗传改良的研究已有报道。黑龙江水产研究所成功地培育出鲤鱼抗寒新品种(朱世龙等,1999);宁波大学利用耐低温性能研究以及分子标记筛查等手段对大黄鱼进行了耐低温选育的初步探究(徐镇等,2006;李凌云等,2010;胡玉珍,2011¹⁾)。国内对罗非鱼的耐温选育也有报道,主要利用家系选育的手段进行(李晨虹等,1996;林勇等,2010;卢其西等,2011);卢钟磊等(2007)利用微卫星分子标记技术对褐牙鲂耐热性状进行研究,得到了2个与耐热性状显著相关的微卫星标记。国内对大菱鲂耐温育种工作开始于国家“十一五”期间,目前也取得了一些进展:马爱军等(2011)获得了1个与大菱鲂耐温性显著相关的微卫星,刘宝锁等(2011)对大菱鲂耐高温性状的遗传参数进行了估计。这些研究为大菱鲂耐温性状的选育工作提供了理论基础。但目前关于大菱鲂耐高温选育进展情况,选育子代性能评价等具有重要实践指导意义的工作,国内外还没有详细报道。本课题组开展了大规模耐高温家系筛选工作,通过分析大菱鲂的半致死温度、高温累计存活小时数、耐高温性能优势比等相关指标,初步获得了4个选育一代耐高温家系;2010年将家系作为传代选育亲本,构建并培育了选育二代耐高温家系,并对耐高温实验组与非选育实验组之间的耐温性能进行分析,确定选育二代的耐高温性,为大菱鲂进一步的耐高温品种选育工作提供基础数据及理论依据。

1 材料与方法

1.1 选育一代耐高温家系筛选

1.1.1 实验用家系及实验鱼 耐高温选育采用的家系来源于本课题组于2007年4月12日—7月19日在烟台天源水产国家级良种场所构建的56个选育家系(马爱军等,2010)。本实验于2008年3月从这些家系中选择标准为生长状态良好、成活率高的32个家系开展对高温的耐受性研究。从每个家系中随机挑取100尾12月龄幼鱼,同时从非选育群体的相同月龄的幼鱼中挑取100尾作为参照组,采用颜色-位点组合的方法对不同家系进行荧光色素标记,之后,将32个家系以及普通幼鱼共计约3300尾鱼混养在6个

20m³的长方形水池中,确保每个池子中每个家系有15尾。暂养时间为10d,水温为(13±1)°C,氧气泵连续通氧,DO 7.3mg/L,盐度为28,每天早晚各一次投喂配合饵料。实验开始前,测量幼鱼的生长指标。

1.1.2 高温胁迫实验 根据预实验结果,12月龄幼鱼高温养殖适宜上限温度(即摄食、活力正常时的温度)为(25±0.5)°C,生命耐受温度上限(每个实验组都开始出现死亡时的温度)为(27±0.5)°C。因此,初步确定耐高温品系筛选温度为27°C,其中升温方法参考Diegane等(2007),稍作改动,即:从正常水温(13±1)°C按每12h增加1°C的速度升至25°C后,再按每24h增加1°C升至27°C,水温调节利用热气管将配水池中的海水加热到适合温度,采用抽水泵,将海水抽到每个实验池中,进行流水养殖,以确保水温的维持,水流量为0.05m³/h。死亡半数时,停止实验,共历时145h。胁迫期间,正常投喂,每日换水一次,清底一次。每次投喂时记录各家系幼鱼摄食状况,每隔3h观察一次,记录鱼体状况并及时捞出死亡个体。实验结束记录最后成活鱼的数目,测量存活个体的生长指标。

1.2 选育二代耐高温家系筛选

1.2.1 实验用家系及实验鱼 通过2008年的大规模耐温筛选,共筛选出了4个耐温家系,将这4个家系经过高温筛选后的存活个体单独暂养4周后,挑选体格健康、体形正常的幼鱼共计287尾,通过电子标记混养的方法进行培育。2010年春季,在大菱鲂繁殖周期中的盛期,从中选取体格健壮、体型完整,色泽正常、性腺发育成熟、状态良好的大菱鲂作为亲鱼,采用人工采卵受精的方法进行交配。具体步骤及家系管理参照文献(马爱军等,2010),共构建12个选育二代耐高温候选家系,并于2011年春季对这12个家系进行耐高温性能评定及大规模耐高温筛选工作。验证试验与高温家系筛选实验均是从每个家系中随机挑取100尾12月龄幼鱼,同时从2个普通家系中各挑取100尾作为参照组,标记方法与混养方法同1.1.1中所述。

1.2.2 选育二代耐温性能评估 为了便于同选育一代耐温家系做对照分析,验证试验同样采用了27°C,实验持续145h;具体升温方法同1.1.2中所述。

1.2.3 高温胁迫实验 根据预实验结果,选育二代耐温家系12月龄幼鱼生命耐受温度上限增高至为

1) 胡玉珍,2011. 低温选择大黄鱼子代SSR分析及越冬季节生理生化指标变化. 宁波: 宁波大学硕士学位论文,19—28

(28±0.5)℃, 初步确定耐高温品系筛选温度为 28℃, 实验依然持续 145h, 具体升温方法同 1.1.2 中所述。

1.3 数据处理与统计分析

利用 SPSS 16.0 软件对各家系首尾死亡历时(第一尾死亡个体的高温持续时间); 实验结束时各家系末尾死亡历时(最后一尾死亡个体的高温持续时间); 死亡历时时域(首尾死亡至实验结束时最后死亡历时的范围); 各家系死亡率及各群体组合后代的死亡率, 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 并采用多重比较法进行分析处理, 差异显著水平为 $P<0.05$; 并对高温下各家系生长指标与耐温性能及存活率进行相关性分析; 利用该软件, 通过 bCOX 回归分析, 计算得到各家系耐温性回归系数的数学期望, 即获得各家系的优势比(Odds ratio, OR), 从而预测筛选出耐高温家系。

Cox 回归模型(亦称比例风险模型)表达式为:

$$h_i(t) = h_0(t) \exp\left(\sum_{j=1}^p \beta_j X_j\right)$$

式中, $h_i(t)$ 是指当所有伴随变量 X_j ($j = 1, 2, \dots, p$)都处于 0 或标准状态下的风险系数时, 为一不确定的值。 $\beta_j X_j$ ($j = 1, 2, \dots, p$)称为 Cox 回归系数, 是模型中的待定参数。

2 结果与分析

2.1 选育一代家系高温胁迫后死亡历时及存活率分析

通过对 2007 年建立的 32 个家系共约 3200 尾大菱鲂幼鱼开展高温筛选试验, 当总体死亡数量到达 50%左右时, 终止实验, 统计表明, 各家系的死亡率(Mortality Ratio, MR)在(15.35±3.57)%—(78.5±2.31)%之间。从表 2 可知, 在筛选温度 27℃条件下, 不同家系的死亡历时及死亡率均表现出显著的差异性($P<0.05$), 死亡率与死亡历时时域具有一定的相关性, 死亡历时时域越大, 其死亡率越高; 本实验将死亡率低于 21%的家系作为耐高温家系, 即 E1e2、E2f1、F2e4、F1f4 (MR<21%), 将死亡率超过 70%的家系作为不耐高温家系; 而未经家系选育的普通鱼的死亡率相当高, 达 70%以上。

2.2 不同亲本组合的耐高温能力的差异比较

4 个不同地理群体的父母本交配有 16 种组合, 各子代的高温胁迫后代死亡率如表 2 所示, 死亡率较低的组合为 Ee、Ff、Ef、Fe, 其 MR<30%; 死亡率较高的组合为 Fd>70%; 母本为丹麦群体的 Ed、Fd、Dd、Nd, 其 MR>60%, 均为不耐高温家系, 因此判断丹麦

表 1 高温培育下各家系大菱鲂幼鱼死亡历时、死亡历时时域及死亡率

Tab.1 Duration, lasting time domain of death and mortality for every family-turbot under high temperature stress

家系号	死亡历时(h)		死亡历时时域(h)	死亡率(%)
	首尾历时	末尾历时		
1. E1×e1	48 ^a	139	48—149	30.4 ⁱ
2. E1×e2	59 ^b	135	59—135	20.9 ^a
3. E2×f1	54 ^c	128	54—128	13.0 ^c
4. E2×f2	33 ^d	132	33—132	35.0 ⁱ
5. E3×d1	38 ^e	142	38—142	67.9 ^d
6. E3×d2	42 ^f	144	42—144	63.3 ^e
7. E4×n1	58 ^{bz}	133	58—133	59.8 ^f
8. E4×n2	62 ^h	146	62—146	34.1 ⁱ
9. F1×f3	42 ^f	140	42—140	25.6 ^f
10. F1×f4	53 ^c	144	53—144	18.9 ^a
11. F2×e3	48 ^{ag}	141	48—141	47.9 ^{hj}
12. F2×e4	52 ^{cyw}	124	52—124	18.1 ^a
13. F3×d3	25 ^l	143	25—143	79.2 ^k
14. F3×d4	28 ^m	144	28—144	65.1 ^c
15. F4×n3	68 ⁱ	130	68—130	51.5 ^g
16. F4×n4	54 ^c	144	54—144	49.4 ^h
17. D1×d5	32 ^p	144	32—144	76.2 ^m
18. D1×d6	34 ^d	136	34—136	59.0 ^{bf}
19. D2×e5	38 ^{ac}	121	38—121	58.2 ^{bf}
20. D2×e6	41 ^f	139	41—139	70.1 ⁿ
21. D3×f5	42 ^{fb}	143	42—143	33.9 ⁱ
22. D3×f6	48 ^{acg}	145	48—145	48.9 ^h
23. D4×n5	37 ^e	141	37—141	57.2 ^b
24. D4×n6	51 ^w	144	51—144	63.4 ^e
25. N1×n7	58 ^b	143	58—143	49.6 ^h
26. N1×n8	41 ^f	144	41—144	57.5
27. N2×e7	37 ^e	139	37—139	46.4 ^j
28. N2×e8	57 ^u	129	57—129	63.5 ^e
29. N3×f7	49 ^e	131	49—131	30.4 ^{io}
30. N3×f8	52 ^w	142	52—142	43.0 ^p
31. N4×d7	21 ^k	144	21—144	67.8 ^d
32. N4×d8	32 ^p	143	32—143	59.0 ^f
非选育	20 ^k	145	20—145	72.7 ⁿ

注: 上标字母表示多重比较结果, 标注不同字母表示差异显著($P<0.05$)

群体的母本对耐温性能有较大的影响; 而英国、法国群体的子代耐温性能比较强。对各组合子代的耐温性通过多重比较发现, 杂交后代与自交后代在耐温性上并没有表现出明显的差异, 反而自交后代 Ee、Ff 有着较低的死亡率, 分别为 27.4%和 22.3%; 如表 2 所示, 交配组合两两之间存在着显著的差异性($P<$

0.05)。通过对各组合子代的耐温性能进行方差分析,结果如表 3 所示,各组合间存在着显著的差异性;对各组合内家系间的存活率进行方差分析表明,16 个组合内家系间的耐温性均存在显著的差异($P < 0.05$)。

2.3 家系耐高温能力与生长性状的相关性分析

在进行高温胁迫实验之前以及实验结束之后,对各家系生长指标进行测量,并将数据与各家系的存活率进行相关性分析。如表 4 所示,存活率与各家系生长率(体重、体长增长率)具有显著的相关性($P < 0.05$),其相关系数分别为 0.243 和 0.57。但通过对

各家系内存活个体与生长率分析,却没有明显的相关性。

2.4 选育一代各家系耐高温性的优势比较

经过高温胁迫实验后,发现各家系间的耐温性能存在着显著的差异,通过 bCOX 回归分析,计算出各家系耐高温性的优势比(OR),从表 5 中可以看出,E2f1 家系的 OR 值最高,为 5.536,其次是 F₁f₄、F₂e₄ 号家系,分别为 3.564 和 3.248;根据优势比分析,结合各家系的死亡率及生存历时域,最终确定了 E2f1、E1e2、F₂e₄ 以及 F₁f₄ 为耐高温家系。

表 2 大菱鲂 4 个群体组合子代高温胁迫后死亡率的平均值及多重比较
Tab.2 Comparison of mortality rate of four cross combinations under thermal stress

交配组合	家系数/死亡率			
	英国 e(♀)	法国 f(♀)	丹麦 d(♀)	挪威 n(♀)
英国 E(♂)	Ee(2) 27.4% ^a	Ef(2) 25% ^a	Ed(2) 65.6% ^{bn}	En(2) 44.9% ^c
法国 F(♂)	Fe(2) 33% ^d	Ff(2) 22.3% ^k	Fd(2) 71.1% ^j	Fn(2) 50.4% ^f
丹麦 D(♂)	De(2) 64.2% ^b	Df(2) 41.4% ^c	Dd(2) 67.6% ⁿ	Dn(2) 60.3% ^l
挪威 N(♂)	Ne(2) 54.5% ^m	Nf(2) 36.7% ^d	Nd(2) 63.4% ^b	Nn(2) 51.6% ^{fm}

注:上标字母表示多重比较结果,标注不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

表 3 6 个不同群体组合间死亡率方差分析
Tab.3 ANOVA for mortality among 6 cross combinations

变异来源	平方和	自由度 df	均方	F-检验	P
组间	1.008	16	0.063	5.086	0.001
组内	0.211	17	0.012		
总和	1.219	33			

表 4 大菱鲂各家系高温胁迫下存活率与生长增长率的相关性分析
Tab.4 Correlation analysis between survival and growth rates under thermal stress of turbot family

项目	体长	体质量
相关系数	0.243	0.57
P 值	0.0186*	0.01*

注:*表示显著相关($P < 0.05$),单尾检验

2.5 选育二代家系的耐温性能验证

根据 2008 年筛选出的 4 个耐高温家系为父母本,构建了选育二代耐高温候选家系,如表 6 所示,27℃条件下,死亡率平均值仅为 10.26%,对照组的死亡率平均值为 50.95%,相同条件下,选育一代平均死亡率为 49%;12 个家系在耐温性方面表现出显著的提高。

2.6 耐高温品系筛选分析

如表 7 所示,在高温 28℃条件下,耐高温子代组的平均死亡率为 32.83%,而对照组的平均死亡率为

88.9%,在极限温度下,选育二代耐高温家系表现出了显著高于对照组($P < 0.05$),说明 2008 年筛选出的一代耐高温家系是有效的。由此可以判断,选育二代的生命耐受温度上限应在 28—29℃,比选育一代提高了 1—2℃。通过 bCOX 回归分析,计算出各家系耐高温性的优势比,从表 8 中可以看出,各家系的耐高温能力的优势比存在显著差异。其中,8 号家系的 OR 值最高,为 5.708;其次是 10 和 11 号家系,分别为 4.919 和 4.848;根据优势比分析,结合各家系的死亡率及生存历时域,最终确定了 8、10、11 及 12 号为选育二代耐高温品系。

3 讨论

3.1 耐高温性状选育方法

研究表明,生物体在适应不同环境的同时,也会对温度的耐受性产生差异(Kocovsky *et al*, 2001; Wagner *et al*, 2001),因此,可以通过一定的育种策略,制订合理的育种规划,选择具有潜在耐高温性能的群体或个体,选育出耐高温新品系。Brett 等(2004)在高温条件下成功地选育出耐高温群体,其体长和体重较对照组长分别增长 11%和 24%;Agresti 等(2000)选育出的罗非鱼新品系,具有生长快、在海水中耐盐、在淡水中耐寒的优良特性。目前,研究鱼类温度

表 5 32 个大菱鲆家系耐温性的优势比
Tab.5 Odds ratio analysis of disease of thermal-patience among 32 turbot families

家系(♂×♀)	优势比	置信区间 95% CI for Exp(B)		家系(♂×♀)	优势比	置信区间 95% CI for Exp(B)	
		下限	上限			下限	上限
E1×e1	2.463	1.469	4.131	D1×d5	1.196	0.996	1.755
E1×e2	3.037	1.908	5.321	D1×d6	1.400	1.087	1.801
E2×f1	5.536	1.987	15.428	D2×e5	1.493	1.116	1.999
E2×f2	2.325	1.404	3.987	D2×e6	0.899	0.765	1.439
E3×d1	1.501	1.112	2.026	D3×f5	2.122	1.305	3.451
E3×d2	1.509	1.099	2.071	D3×f6	1.605	1.136	2.268
E4×n1	1.414	1.085	1.843	D4×n5	1.568	1.138	2.159
E4×n2	2.026	1.212	2.945	D4×n6	1.474	1.098	1.979
F1×f3	3.054	1.589	5.872	N1×n7	1.548	1.090	2.200
F1×f4	3.564	1.879	6.093	N1×n8	1.569	1.147	2.076
F2×e3	1.477	1.042	2.095	N2×e7	1.463	1.010	2.105
F2×e4	3.248	1.617	6.524	N2×e8	1.320	1.009	1.837
F3×d3	0.623	0.576	1.973	N3×f7	2.466	1.531	3.806
F3×d4	1.564	1.113	2.197	N3×f8	1.581	1.068	2.340
F4×n3	1.438	1.085	1.905	N4×d7	1.509	1.009	2.187
F4×n4	1.501	1.088	2.001	N4×d8	1.409	1.092	1.903

表 6 2010 年建立的大菱鲆子二代家系耐高温性能分析
Tab.6 Comparison of thermal-patience of F₂ families established in 2010

家系号	死亡率(%)	家系号	死亡率(%)
1	9.41	9	7.85
2	19.88	10	4.38
3	15.54	11	5.31
4	13.27	12	6.78
5	9.33	平均值	10.26
6	18.63	对照组 1	49.80
7	11.97	对照组 2	52.10
8	3.60	平均值	50.95

耐受性的方法主要有两种: (1) 将实验鱼从适应的温度突然转入实验温度, 并记录直到死亡所经历的时间; (2) 以一个升温率标准加温, 直至实验鱼出现死亡(刘宝锁等, 2011)。这两种基本研究方法, 在不同具体情况中均有其实际意义。通常情况下, 国内学者大多采用升温方式来研究鱼类的温度耐受性。

同样, 本研究对大菱鲆的温度耐受性也采用了升温的方法。在高温胁迫条件下, 通过评估大菱鲆各家系的耐高温性能发现, 不同家系耐温性能的差异达到显著水平($P < 0.05$), 在 27℃ 条件下, 选育一代各家系的死亡率在 13.0%—79.2% 之间, 死亡率低于 30% 的有 5 个, 低于 20% 的有 3 个, 选育二代各家系

表 7 高温培育下选育二代各家系大菱鲆幼鱼死亡历时、死亡历时域及死亡率

Tab.7 Duration, lasting time domain of death and mortality for F₂ of every family-turbot under high temperature stress

家系号	死亡历时(h)		死亡历时域(h)	死亡率(%)
	首尾历时	末尾历时		
1	57	145	57—145	27.5
2	53	143	53—145	43.97
3	49	145	49—145	51.22
4	51	144	51—144	48.52
5	59	145	59—149	38.39
6	48	144	48—144	49.21
7	50	145	50—145	49.33
8	61	142	61—142	9.87
9	53	139	53—139	25.43
10	58	135	58—135	13.7
11	51	142	51—142	16.91
12	59	144	59—144	20.02
对照组 1	21	145	21—145	86.5
对照组 2	29	145	29—145	91.3

的死亡率在 9.87%—51.22%, 死亡率低于 30% 的有 6 个, 低于 20% 的有 3 个, 这些家系可作为耐高温选育的核心育种家系, 为传代选育提供材料, 达到进一步纯合、富集优良遗传基因的目的。在 27℃ 高温条件下, 选育一代的平均死亡率为 50.21%, 选育二代的

表 8 12 个大菱鲆 F₂ 耐高温家系耐温性优势比
Tab.8 Odds ratio analysis of disease of thermal-patience among 12 turbot of F₂ families

家系号	优势比	置信区间 95% CI for Exp(B)		家系号	优势比	置信区间 95% CI for Exp(B)	
		下限	上限			下限	上限
1	2.029	0.984	4.183	7	1.543	0.899	2.401
2	1.506	0.969	2.340	8	5.708	1.566	20.808
3	1.544	0.995	2.395	9	2.865	1.179	4.211
4	1.518	0.994	2.320	10	4.919	1.512	16.003
5	1.610	1.048	2.472	11	4.848	1.565	15.018
6	1.498	0.873	2.219	12	3.974	1.321	10.316

平均死亡率为 10.26%，而二代参照组的平均死亡率为 50.95%，显然，选育二代的耐高温性能明显比选育一代有了显著提高，此外，参照组的高死亡率也验证了选育一代筛选出的耐高温家系的耐高温特性是可遗传的。通过两代的耐温选育，选育二代的耐温性比选育一代提高了 1—2℃ 左右。

3.2 耐高温家系分析

对 4 个地理群体的 16 个选育一代家系的平均耐高温性能进行方差分析发现，不同群体组合方式产生的后代其耐高温性能表现出显著的差异性 ($P < 0.05$)。E♂×d♀、F♂×d♀、D♂×e♀、D♂×d♀、D♂×n♀、N♂×d♀ 6 个组合的死亡率均在 60% 以上，属于非耐高温组合，这些组合中均有丹麦(D)群体作为亲本，这可能是由于不同地理群体耐温性差异的结果。英国和法国大菱鲆作为亲本，其后代的死亡率相对较低，有较好的耐高温性能；此外，各家系间的耐温性存在着显著的差异，通过家系间耐温性优势比分析，可以筛选出具有耐温性较强的家系，获得耐高温选育的核心育种群体。

各家系间的生长指标与存活率的相关性分析表明，存活率与体长、体质量的增长率具有显著的相关性 ($P < 0.05$)，其相关系数分别为 0.243 和 0.57，这可能是由于生产快速家系在机体各方面生理指标都较强而具有一定的耐温性，这种相关性可以为后续培育具有生长快且耐高温的优良品种打下基础。

通过 bCOX 回归分析，各家系的耐高温能力的优势比存在显著差异，这在一定程度上反映出家系选择在大菱鲆耐高温选育中的高效性。这些结果有助于科学地确定耐高温家系。2010 年利用 2008 年筛选的耐高温家系有针对性的建立了 12 个家系，表现出较高的耐温性，可为继续开展大菱鲆耐高温传代选育工作奠定基础。

3.3 高温胁迫生理学机制分析

鱼类在对高温适应的过程中，逐渐改变机体代谢水平和生理活动状态，以适应其生活环境，是一种积极的调节活动(Ma *et al.*, 2005)；但当超出其忍受能力时，将会出现鱼体发育畸形、中毒甚至死亡等不良后果。因此，研究鱼类的高温热效应及其生理学机制，在耐高温选育工作中也是至关重要的。有关鱼类耐高温机制分析，国内外学者均有报道(Lermen *et al.*, 2004; Bowden, 2008; Lushchak *et al.*, 2006; 田宏杰等, 2007; 高淳仁等, 2006)，本课题组在大菱鲆耐高温选育工作中，开展了大量的生理生化及分子生物学研究，并取得了一些成果：将型粘液细胞确定为一种与高温胁迫相关的生理指示细胞(黄智慧等, 2010)；分析了溶菌酶、抗菌肽、IgM、IL-1、酸性磷酸酶、SOD 六种免疫因子与温度的相关性，确立了抗氧化系统在鱼体高温胁迫下起到了关键调控作用(Huang *et al.*, 2011)；利用微卫星分子标记辅助育种技术筛查到了一个与温度显著相关的微卫星位点 Sma-USC27(马爱军等, 2011)；等等。通过以上研究验证了耐温性个体的生理特质在热适应性上的调控优势，为耐高温选育工作在分子和蛋白水平上提供了理论依据。

3.4 耐温性状的遗传机制分析

在动物育种中，对一个目标性状进行遗传改良时，首先要明确改良目标的性状属性，即：界定选育性状是属于数量性状、阈性状(即离散性状)，还是质量性状。不同属性性状的选择理论和选择方法是不同的。尽管数量性状和阈性状的遗传机制都是微效多基因效应，但由于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不同于数量性状(刘月府等, 1993)。目前，有关耐温性状遗传机制的研究较少，其性状属性尚不清晰。在植物育种上，尽管在水稻耐热性 QTLs 定位研究发现耐热性遗传是由多基因控制，但据此判定耐温性

状是数量性状的依据尚不充分。因为在通常情况下, 某一特定的生物个体或种群对温度的耐受性存在着特定的阈值。因此, 对于动物耐温等抗逆性状的选育, 明确耐温性状属性是开展育种工作的基础, 它决定着耐温性状遗传参数估计、遗传效应预测及 QTL 定位等相关育种工作的正确性。

参 考 文 献

- 马爱军, 王新安, 薛宝贵等, 2010. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)选育家系的构建和培育技术研究. 海洋与湖沼, 41(3): 301—306
- 马爱军, 许可, 黄智慧等, 2011. 大菱鲂与耐高温性状相关的微卫星标记筛选. 海洋科学进展, 29(3): 370—378
- 马爱军, 雷霖霖, 陈四清等, 2002. 大菱鲂不同产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响. 海洋与湖沼, 33(1): 75—82
- 方永强, 翁幼竹, 杨尧等, 2001. “大菱鲂引进驯化和养殖”的试验. 台湾海峡, 20(3): 356—362
- 卢其西, 林勇, 宾石玉等, 2011. 罗非鱼 6 个家系的低温耐寒测定分析. 广西师范大学学报: 自然科学版, 29(2): 104—109
- 卢钟磊, 池信才, 王义权, 2007. 褐牙鲈耐热性状相关的微卫星分子标记筛选. 厦门大学学报, 46(3): 396—402
- 田宏杰, 庄平, 章龙珍等, 2007. 水温对施氏鲟幼鱼消化酶活力的影响. 中国水产科学, 14(1): 126—131
- 朱世龙, 白庆利, 于保群等, 1999. 鲤鱼抗寒良种的培育研究. 高师理科学刊, 19(4): 43—46
- 刘月府, 张沅, 吴长信, 1993. 阈性状的选择理论和育种值估计方法(综述). 北京农业大学学报, 19(增刊): 44—51
- 刘宝锁, 张天时, 孔杰等, 2011. 大菱鲂生长和耐高温性状的遗传参数估计. 水产学报, 35(11): 1601—1606
- 李多云, 吴玉珍, 冀德伟等, 2010. 低温选择大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的肝脏蛋白质组双向电泳分析. 海洋与湖沼, 41(3): 348—351
- 李晨虹, 李思发, 1996. 不同品系尼罗罗非鱼致死低温的研究. 水产科技情报, 23(5): 195—198
- 林勇, 唐瞻杨, 唐章生等, 2010. 罗非鱼 5 个不同品系低温致死的研究. 水产科技情报, 37(5): 222—225
- 徐镇, 江锦坡, 陈寅儿, 2006. 不同品系大黄鱼致死低温的研究. 宁波大学学报(理工版), 19(4): 462—464
- 高淳仁, 王印庚, 马爱军, 2006. 温度对大菱鲂幼鱼生长、成活率和体内蛋白酶活性的影响. 渔业科学进展, 33—36
- 黄智慧, 马爱军, 2010. 大菱鲂体表粘液细胞组化研究及高温胁迫对其类型和分布的影响. 水产学报, 34(5): 719—725
- 雷霖霖, 2003. 大菱鲂养殖技术. 上海: 上海科学技术出版社, 8
- 雷霖霖, 2005. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 321—322
- 雷霖霖, 门强, 王印庚等, 2002. 大菱鲂“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. 海洋水产研究, 23(4): 1—7
- Agresti J J, Seki S, Cnaani A *et al*, 2000. Breeding new strains tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. Aquaculture, 185(1—2): 43—56
- Beitinger T L, Bennett W A, McCauley R W, 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. Environ Biol Fishes, 58: 237—275
- Bowden T J, 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. Fish & Shellfish Immunology, 25(4): 373—383
- Brett W Molony, Anthony R Churchl, Greg B Maguire, 2004. A comparison of the heat tolerance and growth of a selected and non-selected line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Western Australia. Aquaculture, 241: 655—665
- Diegane N D, Yu-Yuan Chen, 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. Fish & Shellfish Immunology, 22: 686—694
- Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M *et al*, 2004. Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 241: 491—500
- Huang Zhihui, Ma Aijun, Wang Xin'an, 2011. The immune response of the skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under stress at high temperature. The Journal of Fish Diseases, 34(8): 619—627
- Kocovsky P M, Carline R F, 2001. Influence of Extreme Temperatures on Consumption and Condition of Walleyes in Pymatuning Sanctuary, Pennsylvania. North American Journal of Fisheries Management, 21(1): 198—207
- Lermen C L, Lappe R, Crestan M *et al*, 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 239(1—4): 497—507
- Lushchak V I, Bagnyukova T V, 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. I. Indices of oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology, 143(1): 30—35
- Ma S W, Shen A L, Shen X Q, 2005. Acute lethal effect of water temperatures on inhomogeneous fishes. Marine Fisheries, 27(4): 298—303
- Purdom C E, Jones A, 1972. Cultivation trail with turbot (*Scophthalmus maximus* L). Aquaculture, (1): 213—230
- Wagner E J, Arndt R E, Brough M, 2001. Comparative tolerance of four stocks of cutthroat trout to extremes in temperature, salinity, and hypoxia. West N Am Nat, 61(1): 434—444

THE SELECTIVE BREEDING OF THERMAL TOLERANCE FAMILY AND APPRAISAL OF PERFORMANCE IN TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

MA Ai-Jun¹, HUANG Zhi-Hui¹, WANG Xin-An¹, GUO Li¹, LEI Ji-Lin¹,
YANG Zhi², QU Jiang-Bo²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, P. R. China, Qingdao, 266071; 2. Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, Yantai, 264003)

Abstract In order to carry out the breeding program which about thermal tolerance traits of turbot *Scophthalmus maximus* L., a large-scale family construction was carry out, and detected the tolerance performance of two generation, and calculate the odd ratio of tolerance by bCOX regression analysis. The results demonstrated that the tolerance and it odd ratio of every family have been at a significance different level ($P < 0.05$), it reflected that the high performance of family breeding method. After the first filial generation breeding, we get four tolerance family, and constructed the second filial generation, to evaluate the thermal tolerance, the result suggested that mortality rate of F_2 family just 10.25%, and F_1 family was 49%, the F_2 family tolerance was higher than F_1 , when they in the 27°C condition. Then in the 28°C condition, F_2 family the mortality rate just 32.83%, and the mortality of control group was 88.9%. According to these analysis, we judged that the tolerance of F_2 family have increased 1—2°C.

Key words Turbot *Scophthalmus maximus*, Thermal tolerance, Family, Odds ratio, Selective breeding