

大菱鲆胚胎和仔稚鱼的热刺激耐受能力

关 健^{1,3} 郑永允¹ 刘洪军¹ 雷霖霖² 张全启³ 官曙光^{1*}

(¹山东省海水养殖研究所, 青岛 266002)

(²中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘 要 以培育大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 耐高温品系为目的, 研究了胚胎和仔稚鱼对热刺激的耐受力差别, 为通过高温刺激选育大菱鲆耐高温品系提供指导和基础数据。实验分别对大菱鲆胚胎期(孵化前期)、卵黄囊期(初孵仔鱼, 0 dph)、前弯曲期(10 dph)和弯曲期(25 dph)的仔鱼、稚鱼(50 dph)使用 22~33 °C 范围内不同梯度的高温海水, 进行突变热刺激, 2 h 后转入原水体中培育, 记录之后 60~84 h 的死亡率、仔鱼孵化率、畸形率等数据。结果表明, 上述 5 个发育期大菱鲆经受 2h 热刺激的亚致死温度为 24、23、<22、28、28 °C, 半致死温度为 26、28、22、29、29 °C, 致死温度为 30、29、27、30、30 °C。根据热刺激后 24 和 48 h 死亡率, 耐热能力由弱到强依次为 10 dph < 胚胎 < 0 dph < 25 dph < 50 dph, 总体上呈现随生长发育逐渐增强的趋势。10 dph 左右可能为大菱鲆热刺激耐受力低谷, 此时也是开鳃期, 对外界环境反应灵敏, 受到不良环境刺激易导致死亡。

关键词 大菱鲆 胚胎 仔稚鱼 热刺激

中图分类号 Q958.1; Q955; S968.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)01-0034-06

Study on the thermal tolerance of embryos and larvae of turbot *Scophthalmus maximus*

GUAN Jian^{1,3} ZHENG Yong-yun¹ LIU Hong-jun¹
LEI Ji-lin² ZHANG Quan-qi³ GUAN Shu-guang^{1*}

(¹Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

(²Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT To study the effect of high temperature stress on the early development of turbot *Scophthalmus maximus*, the thermal tolerance of five early developmental stages of *S. maximus* was studied. The hatching stage embryo, yolk-sac larvae (0 days post hatching, 0 dph), preflexion larvae (10 dph), flexion larvae (25 dph) and juvenile (50 dph) of turbot were subjected to various temperatures from 22~33 °C for 2-hour heat shock, and then transferred to seawater at initial temperature (17.5 °C) for 60~84 h. The mortality, larvae hatching rate and

山东省农业良种工程项目“工厂化适养品种选育”和国家鲆鲽类产业技术体系建设项目(nycytx-50)共同资助

* 通讯作者。E-mail: shuguang63@126.com

收稿日期: 2011-05-09; 接受日期: 2011-05-29

作者简介: 关 健(1982-), 男, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事海水经济鱼类繁育、育种及增养殖研究。E-mail: guanjian35@gmail.com,

Tel: (0532)82655167

abnormal rate were recorded continuously. The results showed the sub-lethal temperature of early developmental stages of turbot were 24°C, 23°C, <22°C, 28°C, 28°C, respectively; the 50% mortality (LT50) temperature were 26°C, 28°C, 22°C, 29°C and 29°C, respectively; and lethal temperature were 30°C, 29°C, 27°C, 30°C and 30°C, respectively. Based on the experimental mortalities of turbot by heat shock after 24 h and 48 h, the order of thermal tolerance of turbot at five stages was 10 dph < embryo < 0 dph < 25 dph < 50 dph. These results indicated that the thermal tolerance of turbot increased with the development and growth during the first 50 dph. The stage of 10 dph, the swim bladder developing stage, is the low-ebb period of thermal tolerance, and the larvae are sensitive to temperature heat shock at this stage.

KEY WORDS *Scophthalmus maximus* Embryos Larvae
Thermal tolerance of heat shock

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 原产于 30~68°N 的欧洲大西洋东北部沿海,适应低水温,因其具有多种优良特性,20 世纪 70、80 年代被欧洲各国开发为重要的海水养殖对象,我国随后引种养殖。大菱鲆能够在 3°C 的低水温下生活,7°C 以上可正常生长,10°C 以上可快速生长,但对夏季高温的耐受能力较差。在国内,每年的 7~9 月是高温病害频发季节(雷霖霖等 2003)。受到自然海区水温的限制,我国养殖大菱鲆多采用“深井海水+温室大棚”模式(雷霖霖等 2002),虽然成效显著,但缺点也很明显:不仅抽水耗能大,而且给环境造成很大破坏,部分养殖区因深水井分布密度过大、过度抽取而造成地下水位大幅度下降,甚至枯竭(雷霖霖等 2002)。为使大菱鲆养殖节省抽水能耗,在春、秋季使用自然海水进行养殖,减少地下水的使用量,部分自然海水资源丰富而缺乏地下海水的地区甚至可以开展非深井海水的养殖模式,因而非常有必要选育大菱鲆的耐高温品系。

在许多物种都有发现,生物在适应不同环境的同时会产生对温度耐受力不同(Kocovsky *et al.* 2001; Wagner *et al.* 2001),由此可以选择具有潜在目的性状的群体或个体,以温度作为选择压力选育耐高温品系。Brett 等(2004)在高温条件下选育的虹鳟群体体长较对照组长 11%,体重增加 24%;Agresti 等(2000)选育出在海水中耐盐、在淡水中耐寒、生长快的罗非鱼优良品系。至今,对大菱鲆耐温性能的研究较少。在国内,木云雷等(2005)研究发现,大菱鲆的稚鱼高、低起始致死温度为 26.54°C 和 7.06°C。本研究以大菱鲆耐高温品系培育为目的,分析大菱鲆胚胎和仔稚鱼阶段热刺激耐受力的差别,运用高温刺激为选择压力进行选择,并从胚胎孵化率、畸形率和死亡率的角度检验选择结果,以期通过高温刺激的方法,为大菱鲆耐高温品系的选育提供指导和基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及准备

实验于 2009 年 5 月在山东烟台龙口市烟台百佳水产有限公司进行,使用该公司生产的大菱鲆胚胎和仔、稚鱼作为试验材料。使用盐度 29 的砂滤海水,胚胎孵化水温为 16.0±1.0°C,连续充气,DO≥8 mg/L,光照≤1 000lx;仔、稚鱼培育水温 17.5±1.0°C,连续充气,DO≥8 mg/L,光照≤2 000lx。选择胚胎期(孵化前期)、卵黄囊期仔鱼(初孵仔鱼,0 dph)、前弯曲期仔鱼(10 dph)、弯曲期仔鱼(25 dph)、稚鱼(50 dph)用于试验(Kendall 1984)。在热刺激前,10、25 仔鱼和 50 dph 稚鱼预先在 10 L 水槽中驯养 48 h(水温 17.5±1.0°C,水体溶氧 DO≥8 mg/L,日换水量约 30%,光周期为 12L:12D);其余胚胎、仔鱼直接转入烧杯中热刺激。

1.2 实验设计、操作及观测指标

根据预实验结果,确定了各发育阶段大菱鲆的不同热刺激温度梯度(表 1),以正常的胚胎孵化(16.0±

1.0℃)和苗种培育水温(17.5±1.0℃)为对照组。各发育阶段的实验梯度均设3个平行,胚胎组的实验指标为孵化率和初孵仔鱼畸形率(畸形仔鱼/仔鱼总数×100%),鳍膜不整、脊椎发育不完全或弯曲、全长较短等状态的仔鱼归类于畸形仔鱼;仔、稚鱼组的实验指标为死亡率。

使用盛有砂滤自然海水的玻璃烧杯作为热刺激容器,在100 L控温水浴中预热达到实验设计温度后,将计数好的胚胎/仔稚鱼用捞网转入热刺激容器中,计时2 h后热刺激停止,转入原水体中继续培育,对照组也进行完全相同的操作。间隔12 h按照一定的检查次序观察、计数一次,胚胎观察至孵化,仔、稚鱼观察至60~84 h,或至全部死亡为止。

1.3 亚致死温度、半致死温度和致死温度的界定

亚致死温度:高于或低于此温度动物因温度不适发生死亡,即动物表现正常的极限温度。半致死温度:50%的生物个体不能长期生存下去的温度,也被称为低起始致死温度(Lower incipient lethal temperature, LILT₅₀)(Fry *et al.* 1942)。致死温度:机体活动失去平衡,生物体失去逃避致死条件的能力,并将导致很快死亡(Cox 1974)。

1.4 统计与分析

结果以3个平行组的平均值±标准差表示,使用SPSS 11.5的单因子方差分析和双因子方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 则认为是差异极显著。使用Origin 8.0软件制图。

表1 大菱鲆胚胎和仔稚鱼热刺激温度梯度及实验条件

Table 1 Thermal shock temperature gradient and experimental conditions for embryos, larvae and juvenile of turbot

实验材料 Experimental material	数量 Number of samples	热刺激温度梯度(℃) Thermal shock temperature gradient	热刺激前、后培育水温(℃) Culture temperature	热刺激烧杯规格 Containers of thermal shock(ml)	热刺激后培育容器 Container post thermal shock(ml)
胚胎 Embryo	100	23, 24, 25, 26, 27, 28, 30	16.0±1.0	500	500
0 dph	50	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30	17.5±1.0	500	500
10 dph	50	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29	17.5±1.0	1 000	2 000
25 dph	30	26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33	17.5±1.0	1 000	2 000
50 dph	16	26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33	17.5±1.0	2 000	10 000

2 结果

2.1 大菱鲆胚胎、仔稚鱼的热刺激耐受能力

大菱鲆孵化前期胚胎在不同温度下热刺激2 h后的孵化率及初孵仔鱼的畸形率见图1。0、10、25 dph仔鱼和50 dph稚鱼在不同热刺激温度下热刺激2 h后,不同培育时间段的死亡情况见图2~图5。由图1可见,23~28℃的6个处理组,随着热刺激温度的升高,孵化率从83.65%下降至47.39%,仔鱼畸形率呈上升趋势。23℃处理组的仔鱼孵化率(83.65%)与对照组(83.02%)无显著差异($P > 0.05$),但前者畸形率较高(11.32%)(6.73%)($P < 0.05$);27℃组和28℃组仔鱼的畸形率(31.75%)(44.13%)高于正常率(22.22%)(3.26%)。30℃处理组的孵化率(59.55%)较27℃和28℃组为高($P < 0.05$),但畸形率高达100%。

大菱鲆0 dph仔鱼热刺激后培育60 h的总死亡率(图2),22℃、23℃、25℃组与对照组无显著差异($P > 0.05$),24℃、26℃和27℃组处于30%~40%范围内,表明0 dph仔鱼在24~25℃范围内生存情况不稳定,24~25℃是0 dph仔鱼的死亡边际温度;28℃组显著升高(62%),29℃和30℃组达100%,总死亡率整体随着热刺激温度升高而上升。热刺激后培育不同时刻的死亡率差异较大,对照组仔鱼的死亡主要发生于24 h~36 h,各组的死亡主要发生在热刺激后的36 h内,此后发生死亡相对较少。由图3可知,大菱鲆10 dph仔鱼热刺激后,培育84 h的总死亡率明显高于对照组(23%)($P < 0.05$),22~26℃组在68%~84%范围内,28℃组为

96%, 27℃、29℃组都达到 100%。热刺激后培育不同时刻的死亡主要发生于 0~12 h (约占死亡总数的 50% 及以上), 之后死亡逐渐减少。由图 4、图 5 可见, 大菱鲆 25 dph 仔鱼和 50 dph 稚鱼在热刺激后培育, 表现出的死亡情况相似: 热刺激温度低于 29℃, 死亡率较低 (<10%), 与对照组无显著差异 ($P>0.05$); 热刺激温度高于 29℃, 则实验鱼在热刺激后全部死亡。

2.2 大菱鲆胚胎、仔稚鱼的 2 h 热刺激后, 48 h 的亚致死温度、半致死温度和致死温度

胚胎期(孵化前期)、卵黄囊期仔鱼(0 dph)、前弯曲期仔鱼(10 dph)、弯曲期仔鱼(25 dph)、稚鱼(50 dph)的亚致死温度、半致死温度和致死温度见表 2。胚胎期的致死温度与弯曲期仔鱼和稚鱼无显著差异 ($P>0.05$), 总体比较不同发育时期的耐高温能力, 前弯曲期仔鱼最弱, 胚胎期和卵黄囊期仔鱼接近, 总体显著弱于弯曲期仔鱼和稚鱼。

2.3 大菱鲆胚胎、仔稚鱼热刺激耐受力随发育的变化

图 6 和图 7 横向比较了不同发育期大菱鲆热刺激后的死亡情况。发现热刺激后 48 h 的死亡情况与 24 h 相似, 不同发育时期死亡率排序, 由高到低排列为: 10 dph > 胚胎 > 0 dph > 25 dph > 50 dph。表明 0~50 dph 大菱鲆的热耐受力, 并非完全是随着生长而增强, 而是在 10 dph 存在低谷; 若不计 10 dph 的低谷, 则大菱鲆的热刺激耐受能力在 0~50 dph 范围内是逐渐增强的。

表 2 大菱鲆胚胎和仔稚鱼 2 h 热刺激后 48 h 的亚致死温度、半致死温度和致死温度

Table 2 The sub-lethal temperature, 50% mortality temperature and lethal temperature at 48 h of turbot embryo and larvae heat-shocked for 2 h

发育时期 Developmental stages		亚致死温度(℃) Sub-lethal temperature	半致死温度(℃) 50% mortality temperature	致死温度(℃) Lethal temperature
胚胎期	Hatching stage embryo	23.8±0.6 ^a	26.1±0.3 ^a	30.2±1.4 ^a
卵黄囊期仔鱼	(0 dph) Yolk-sac larvae	23.1±0.4 ^a	27.8±0.5 ^a	28.8±0.8 ^b
前弯曲期仔鱼	(10 dph) Pre-flexion larvae	<22.0 ^b	22.0±0.3 ^b	27.3±0.4 ^c
弯曲期仔鱼	(25 dph) Flexion larvae	27.7±0.7 ^c	29.2±1.1 ^c	29.9±1.2 ^a
稚鱼	(50 dph) Juvenile	28.1±0.9 ^c	29.0±1.5 ^c	30.2±1.4 ^a

3 讨论

根据谢尔福德耐受性定律, 依据生物对温度耐受范围的宽窄, 可将生物区分为广温性和狭温性。一般说来, 如果一种生物对所有生态因子的耐受范围都是广的, 那么这种生物在自然界的分布也一定很广, 反之亦然(孙儒泳 2006)。大菱鲆属冷温性狭温鱼类, 其胚胎发育的适宜温度范围为 12~18℃, 最适温度 15℃ (Karas *et al.* 1997)。本研究发现其孵化前期胚胎亚致死温度为 23.8±0.6℃, 高出最适温度 8.8℃。25~75 g 和 100 g 稚鱼的最适生长水温范围分别为 16~19℃ 和 13~16℃, 前者高于后者 (Imstrand *et al.* 1996)。

全重 4 g (推测为 50~60 dph) 的大菱鲆稚鱼温度-盐度交互生长实验表明, 盐度 33.5、25 和 15 的适宜生长水温分别为 19.6±0.3、24.7±2.1 和 22.9±1.0℃, 温度 21.8±0.9℃、盐度 18.5±0.8 的组合对生长最有利 (Imstrand *et al.* 2001)。本研究使用高温热刺激 2 h 后, 将试验鱼转入正常水温培育的方法, 发现 25 dph 仔鱼的亚致死温度为 28℃; 木云雷等(2005)发现, 25 dph 仔鱼在温度突变条件下的 24 h 存活率与温度的关系式的回归方程为 $y = -0.550 6x^2 + 18.497 0x - 53.13$, 依此得到其高、低起始致死温度为 26.54℃ 和

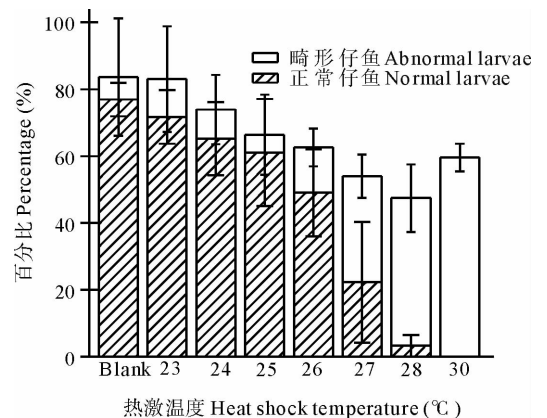


图 1 大菱鲆孵化前期胚胎不同温度热刺激后初孵仔鱼正常率、畸形率

Fig. 1 Normal and abnormal rates of turbot newly hatched larvae heat-shocked at hatching stage

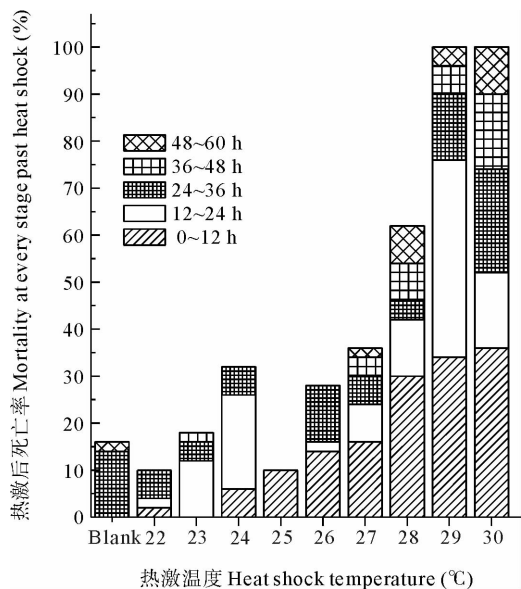


图2 不同温度热刺激后大菱鲆0 dph仔鱼死亡情况

Fig. 2 Mortality-time graph of turbot newly hatched larvae heat-shocked at different temperature

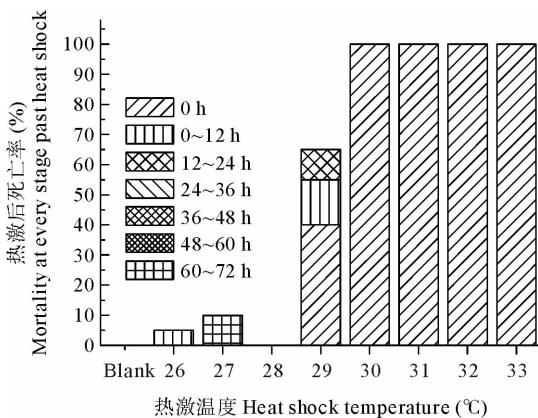


图4 不同温度热刺激后大菱鲆25 dph仔鱼死亡情况

Fig. 4 Mortality-time graph of turbot 25 dph larvae heat-shocked at different temperature

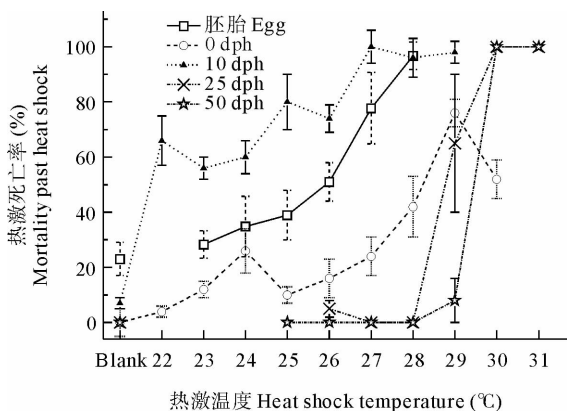


图6 不同温度热刺激24 h各发育期大菱鲆死亡情况

Fig. 6 Mortality of 5 development stages turbot at 24 h after heat-shock at different temperatures

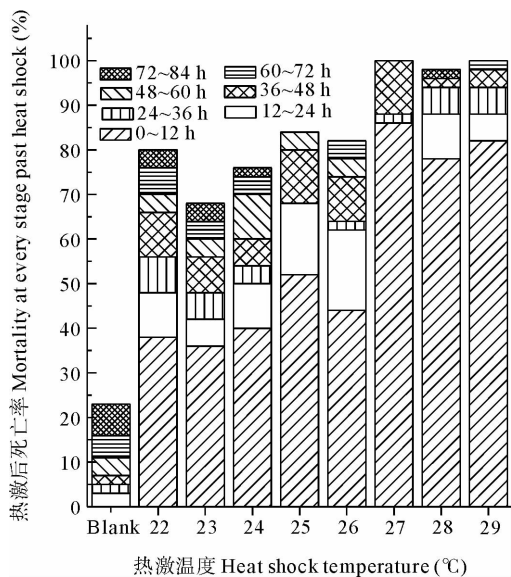


图3 不同温度热刺激后大菱鲆10 dph仔鱼死亡情况

Fig. 3 Mortality-time graph of turbot 10 dph larvae heat-shocked at different temperature

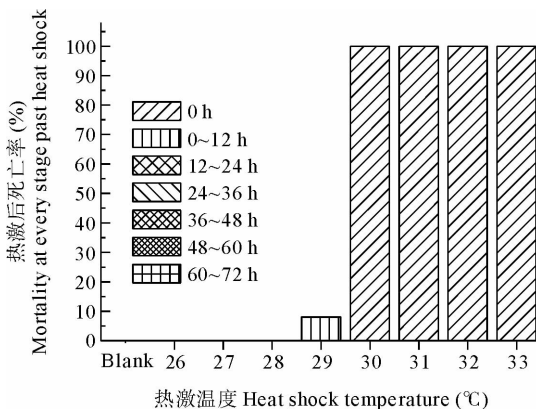


图5 不同温度热刺激后大菱鲆50 dph稚鱼死亡情况

Fig. 5 Mortality-time graph of turbot 50 dph juvenile heat-shocked at different temperature

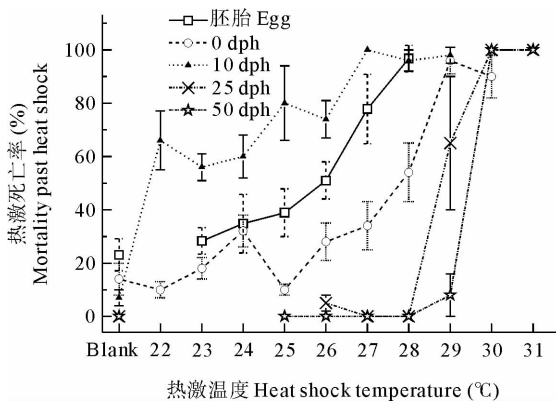


图7 不同温度热刺激48 h各发育期大菱鲆死亡情况

Fig. 7 Mortality of 5 development stages turbot at 48 h after heat-shock at different temperatures

7.06℃,略低于本研究的结果,可能由于本研究实验鱼在高温中暴露时间较短(Elliott 1995)。

大菱鲆的早期热刺激耐受能力,在0~50 dph内总体上呈上升趋势,但在10 dph出现一个明显的低谷,表明10日龄大菱鲆对不利环境的耐受能力较弱。雷霖霖等(2003)认为,8~12 dph为大菱鲆仔鱼的开鳔期,此时对环境极为敏感,水温、水质是决定开鳔是否顺利和良好开鳔的重要因素,若开鳔不良,仔鱼甚至可能全部死亡,也是大菱鲆育苗的危险期之一,因此该时期的仔鱼不宜进行高温热刺激。

提高动物耐温能力,还可以通过温度刺激诱导热休克蛋白的保护作用。热休克蛋白是指细胞或生物体在一定时间内遭受热刺激及其他环境、生理或病理胁迫时,新合成或含量增加的一类蛋白(Guttman *et al.* 1980; Hahn *et al.* 1982; Barbe *et al.* 1988; Becker *et al.* 1994)。在海洋生物中较多通过亚致死高温短期预处理生物,诱导其热休克蛋白表达,从而在之后的高温条件下延长其耐受和存活时间,如长牡蛎 *Crassostrea gigas* (Piano *et al.* 2005)和近江牡蛎 *Ostrea rivularis* (张其中等 2005)等,均取得了较好的效果。而耐高温品系的选育和热休克蛋白的诱导表达,都要以准确的亚致死温度、半致死温度和致死温度作为理论基础。

致谢:本研究的试验设计和撰写得到了厦门大学海洋学院董云伟教授的帮助,实施过程得到了烟台百佳水产有限公司的协助和该公司的曲效志经理、陈志信、陈海滨、李祥东等同仁的支持,在此一并表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 木云雷, 宋广军. 2005. 水温和盐度对大菱鲆稚鱼存活的影响. 水产科学, 24(12): 1~3
- 孙儒泳. 2006. 动物生态学原理(第三版). 北京: 北京师范大学出版社
- 张其中, 邱马银, 吴信忠, 潘金培. 2005. 热休克诱导近江牡蛎对高温的耐受性. 生态科学, 24(1): 35~37
- 雷霖霖, 门 强, 马爱军. 2003a. 大菱鲆引种工程的综合效应及其发展前景. 中国工程科学, 5(8): 30~34
- 雷霖霖, 门 强, 王印庚, 王秉新. 2002. 大菱鲆“温室大棚+深海海水”工厂化养殖模式. 海洋水产研究, 23(4): 1~7
- 雷霖霖, 马爱军, 刘新富, 门 强. 2003b. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)胚胎及仔稚幼鱼发育研究. 海洋与湖沼, 34(1): 9~18
- 雷霖霖. 2002. 关于当前我国北方沿海工厂化养鱼的一些问题和建议. 现代渔业信息, 7(4): 5~8
- Agresti J. J., Seki, S., Cnaani, A. *et al.* 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, 185(1-2): 43~56
- Barbe M. F., Tytell, M., Gower, D. J., and Welch, W. J. 1988. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science*, 241(4 874): 1 817~1 820
- Becker, J., and Craig, E. A. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry*, 219(1-2): 11~23
- Cox. 1974. Effects of the three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In: Gibbons, J. W., Sharitz, R. R. (editors), *Thermal Ecology AEC Symposium Series (Conf-73055)*: 150~163
- Elliott, A. J. 1995. A comparison of thermal polygons for British freshwater teleosts. *Freshwater Forum*, 5: 178~184
- Fry, F. E. J., Brett J. R., and Clawson, G. H. 1946. Lethal limits of temperature for young goldfish. *Rev. Can. Biol.* 1: 50~56
- Guttman, S. D., Glover, C. V., Allis, C. D., and Gorovsky, M. A. 1980. Heat shock, deciliation and release from anoxia induce the synthesis of the same set of polypeptides in starved *T. pyriformis*. *Cell*, 22(1): 299~307
- Hahn, G. M., and Li, G. C. 1982. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiation Research*, 92(3): 452~457
- Imsland A. K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M. H. G. *et al.* 2001. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 198(3-4): 353~367
- Imsland A. K., Sunde, L. M., Folkvord, S., and Stefansson, S. O. 1996. The interaction of temperature and fish size on growth of juvenile turbot. *Journal of Fish Biology*, 49(5): 926~940
- Kocovsky, P. M., and 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
- Karas, P., and Klingsheim, V. 1997. Effects of temperature and salinity on embryonic development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) from the North Sea, and comparisons with Baltic populations. *Helgoland Marine Research*, 51(2): 241~247
- Kendall, A. W., Ahlstrom, E. H., and Moser, H. G. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. *Ontogeny and Systematics of Fishes*, 11~22
- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F., and Fabbr, E. 2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene*, 361(21): 119~126
- Molony, B. W., Church, A. R., and Maguire, G. B. 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(1-4): 655~665
- Wagner, E. J., Arndt, R. E., and Brough, M. 2001. Comparative tolerance of four stocks of cutthroat trout to extremes in temperature, salinity, and hypoxia. *West. N. Am. Nat.* 61(4): 434~444