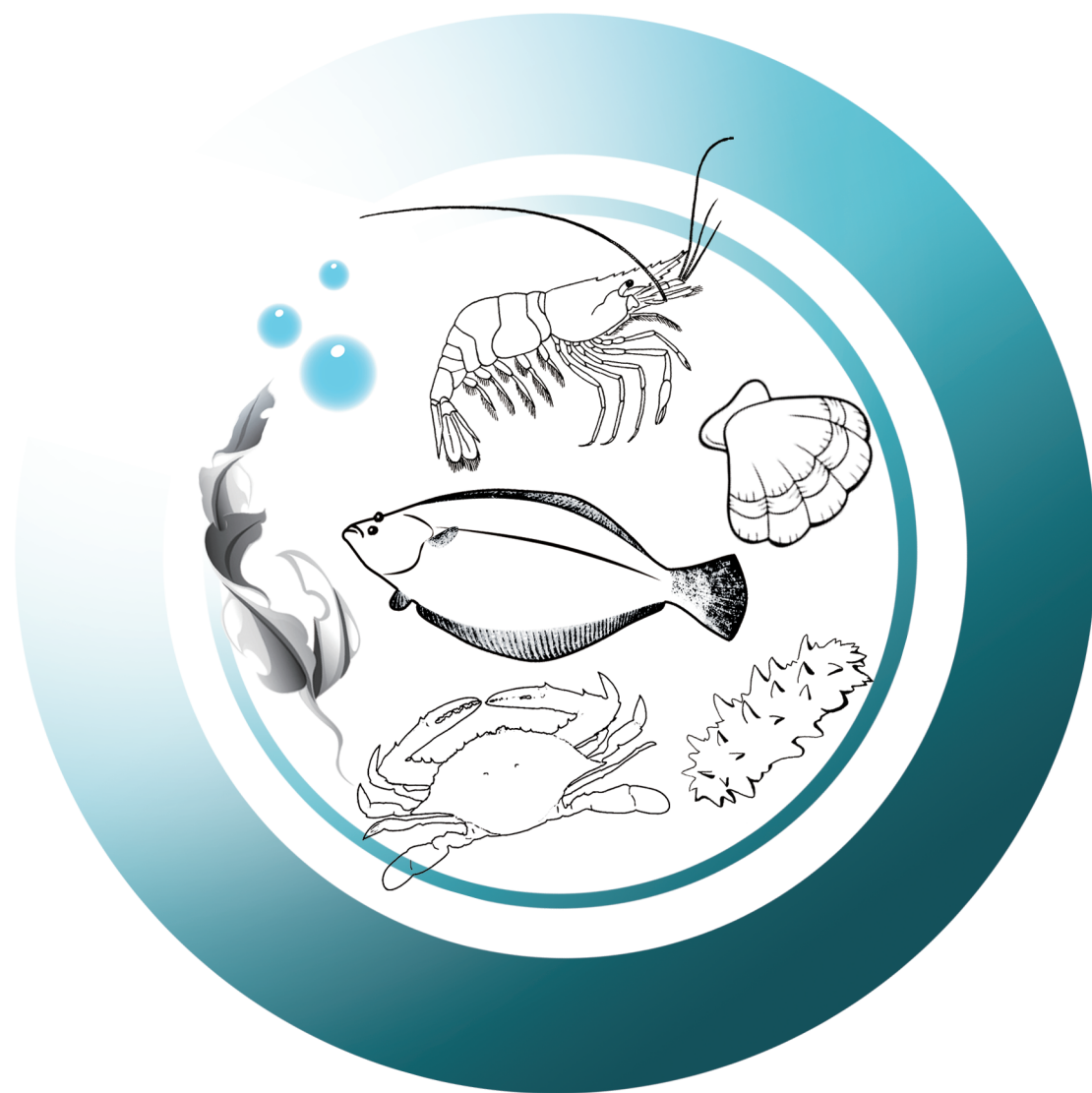


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第45卷 VOL.45 第3期 NO.3



中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

主办



科学出版社
Science Press

出版

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 45 卷 第 3 期

2024 年 6 月

中国科技核心期刊

中文核心期刊

全国优秀农业期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源核心期刊

RCCSE 中国权威学术期刊

中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、

中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊

《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊

《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊

《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

目 次

| | | |
|---|---|-------|
| 渤海湾鱼类早期资源群落结构特征及其时间变化研究 | 卞晓东 万瑞景 单秀娟 金显仕 王凯传 | (1) |
| 黄海北部辽宁近岸海域鲢产卵场分布特征及其影响因素 | 崔培东 卞晓东 张雨轩 单秀娟 金显仕 王惠宾 | (31) |
| 温度、光照强度和光照周期对铜藻有机碳释放速率的影响 | 孙威 吴文广 刘毅 仲毅 王新萌 张继红 | (46) |
| 进水流速对圆形循环水养殖池流场特性影响的数值模拟 | 李瑞鹏 田云臣 李青飞 丛雪琪 秦海晶 | (55) |
| 青海湖裸鲤自主摄食节律与生长特性研究 | 卫宇星 么宗利 来琦芳 祁洪芳 戴阳 高鹏程 杨建新 周凯 孙真 李燕 | (66) |
| 精氨酸对许氏平鲈豆粕型肠炎的修复作用研究 | 王晓艳 李宝山 孙永智 王成强 李璐 孙晓宇 王丹 左震 李培玉 黄炳山 王际英 | (76) |
| 基于转录组测序筛选乌苏里白鲑肌肉生长关键候选基因研究 | 李文文 徐革锋 黄天晴 谷伟 刘恩慧 王高超 潘玉财 周金鑫 姜再胜 王炳谦 | (87) |
| 半滑舌鲷生物钟相关基因克隆及在卵巢发育成熟过程中表达特征分析 | 晏科文 马晓东 史宝 程汉良 王重女 赵新宇 | (101) |
| 鄱阳湖泥鳅黑斑形成观察及 <i>mitfa</i> 表达分析 | 李志雄 盛军庆 盛斌 王馨晨 赵亚飞 丁佳丽 易小兵 | (117) |
| 基于转录组学探究除虫脲暴露对鲤肝脏基因表达的影响 | 陈璐 杨臻 徐锦华 乔璐 宋金龙 孙慧武 穆迎春 | (129) |
| 发酵饲料投喂方式对斑点叉尾鲴生长、肠道菌群及代谢组学的影响 | 周丽颖 钟立强 张世勇 陈校辉 刘洪岩 王明华 | (140) |
| 5 种石斑鱼全基因组微卫星筛选与特征分析 | 王旭蕾 高进 齐鑫 王永波 陈傅晓 刘金叶 符书源 | (149) |
| 投喂率对凡纳对虾中间培育生长、生理和水环境的影响 | 王立威 李薏 宋协法 李贤 董登攀 陈钊 白雪松 | (159) |
| 基于 Deep Forest 算法的对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)预警数学模型构建 | 王印庚 于永翔 蔡欣欣 张正 王春元 廖梅杰 朱洪洋 李昊 | (171) |
| 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 <i>dly</i> 基因缺失株构建及其生物学特性研究 | 刘定远 王春元 于永翔 王印庚 李京泽 张晓松 秦蕾 张正 | (182) |
| FTA 卡保存对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒 DNA 洗脱方法的优化 | 连新宇 王秀华 李晨 张庆利 苟紫玥 吕若萱 杨冰 | (193) |
| 不同缢蛏群体应对高盐养殖环境的潜沙和摄食响应能力 | 杜鑫鑫 牛东红 张树源 邓敏 王杰 李家乐 | (203) |
| 不同铵离子浓度与 pH 人工海水对栉江瑶精子激活效果的比较 | 邱达观 兰帅勤 陈煜 毛晶 臧战 VASQUEZ Hebert Ely 於锋 王爱民 郑兴 顾志峰 | (214) |
| 人工鱼礁表面分离细菌形成单一生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响 | 杨金龙 于相冰 胡晓梦 贺楚晗 梁箫 | (224) |
| 短波紫外线辐照坛紫菜壳孢子制备色彩突变体的新途径 | 陶伟丽 钟晨辉 张鹏 郭辰涛 王铁杆 林琪 | (235) |
| 白鲢鱼糜低气味本底模型的构建研究 | 耿海永 陈丽华 杨方 吴仪 王淑芬 姜启兴 许艳顺 夏文水 | (245) |
| 不同规格野生黄鳍金枪鱼肌肉营养分析与评价 | 刘龙龙 罗鸣 刘洪涛 陈傅晓 韩丽娜 | (258) |
| GC-MS 与电子舌联合分析干制方式对秋刀鱼风味的影响 | 王琳 赵玲 刘淇 齐祥明 曹荣 牟伟丽 | (268) |

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.45 No.3 June 2024

| | |
|--|-------|
| Temporal Variation of the Early Life Stages of Marine Fish Assemblage Structure and Abundance in the Bohai Bay | (1) |
|BIAN Xiaodong, WAN Ruijing, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi, WANG Kaichuan | |
| Distribution Patterns and Influencing Factors of <i>Engraulis japonicus</i> Spawning Grounds in Offshore Waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea | (31) |
|CUI Peidong, BIAN Xiaodong, ZHANG Yuxuan, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi, WANG Huibin | |
| The Effects of Temperature, Light Intensity, and Photoperiod on the Organic Carbon Release Rate of <i>Sargassum horneri</i> Seaweed | (46) |
|SUN Wei, WU Wenguang, LIU Yi, ZHONG Yi, WANG Xinmeng, ZHANG Jihong | |
| Numerical Simulation of the Effect of Inflow Velocity on the Flow Field Characteristics of Circular Circulating Aquaculture Ponds..... | (55) |
|LI Ruipeng, TIAN Yunchen, LI Qingfei, CONG Xueqi, QIN Haijing | |
| Self feeding Rhythm and Growth Characteristics of <i>Gymnocypris przewalskii</i> | (66) |
|WEI Yuxing, YAO Zongli, LAI Qifang, QI Hongfang, DAI Yang, GAO Pengcheng, YANG Jianxin, ZHOU Kai, SUN Zhen, LI Yan | |
| The Repairing Effect of Arginine on Soybean Meal-Induced Enteritis of <i>Sebastes schlegelii</i> | (76) |
|WANG Xiaoyan, LI Baoshan, SUN Yongzhi, WANG Chengqiang, LI Lu, SUN Xiaoyu, WANG Dan, ZUO Zhen, LI Peiyu, HUANG Bingshan, WANG Jiyang | |
| Screening Muscle Growth-Related Genes of <i>Coregonus ussurinsis</i> Berg Based on Transcriptome Sequencing | (87) |
|LI Wenwen, XU Gefeng, HUANG Tianqing, GU Wei, LIU Enhui, WANG Gaochao, PAN Yucai, ZHOU Jinxin, JIANG Zaisheng, WANG Bingqian | |
| Cloning and Expression Analysis of Clock Genes During Ovarian Development and Maturation of Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)..... | (101) |
|YAN Kewen, MA Xiaodong, SHI Bao, CHENG Hanliang, WANG Chongnü, ZHAO Xinyu | |
| Observation of Black Spot Formation and <i>mitfa</i> Expression Analysis of <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> from Poyang Lake | (117) |
|LI Zhixiong, SHENG Junqing, SHENG Bin, WANG Xinchun, ZHAO Yafei, DING Jiali, YI Xiaobing | |
| Effect of Diflubenzuron Exposure on Gene Expression in <i>Cyprinus carpio</i> Liver Based on Transcriptomics | (129) |
|CHEN Lu, YANG Zhen, XU Jinhua, QIAO Lu, SONG Jinlong, SUN Huiwu, MU Yingchun | |
| Effects of Fermented Feed Feeding Mode on Intestinal Flora and Metabolomics of Channel Catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>) | (140) |
|ZHOU Liying, ZHONG Liqiang, ZHANG Shiyong, CHEN Xiaohui, LIU Hongyan, WANG Minghua | |
| Screening and Characteristics Analysis of Microsatellites in the Whole Genome of Five Groupers..... | (149) |
|WANG Xulei, GAO Jin, QI Xin, WANG Yongbo, CHEN Fuxiao, LIU Jinye, FU Shuyuan | |
| Effects of Feeding Rate on the Intermediate Cultivation of <i>Penaeus vannamei</i> | (159) |
|WANG Liwei, LI Meng, SONG Xiefa, LI Xian, DONG Dengpan, CHEN Zhao, BAI Xuesong | |
| Construction of an Early Warning Mathematical Model for <i>Penaeus vannamei</i> AHPND Based on the Deep Forest Algorithm..... | (171) |
|WANG Yingeng, YU Yongxiang, CAI Xinxin, ZHANG Zheng, WANG Chunyuan, LIAO Meijie, ZHU Hongyang, LI Hao | |
| Construction and Biological Characteristics of the <i>dly</i> -Deleted Mutant Strain of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> | (182) |
|LIU Dingyuan, WANG Chunyuan, YU Yongxiang, WANG Yingeng, LI Jingze, ZHANG Xiaosong, QIN Lei, ZHANG Zheng | |
| Optimization of DNA Elution Method of Infectious Hypodermic and Hematopoietic Necrosis Virus Preserved by FTA Card | (193) |
|LIAN Xinyu, WANG Xiuhua, LI Chen, ZHANG Qingli, GOU Ziyue, LÜ Ruoxuan, YANG Bing | |
| Burrowing and Feeding Responses of Different Populations of <i>Sinonovacula constricta</i> to High-Salt Culture Environment..... | (203) |
|DU Xinxin, NIU Donghong, ZHANG Shuyuan, DENG Min, WANG Jie, LI Jiale | |
| Comparing the Effects of Ammonia Ion Concentration and pH on <i>Atrina Pectinata</i> Sperm Activation in Artificial Seawater..... | (214) |
|QIU Dagan, LAN Shuaiqin, CHEN Yu, MAO Jing, ZANG Zhan, VASQUEZ Hebert Ely, YU Feng, WANG Aimin, ZHENG Xing, GU Zhifeng | |
| The Effect of Mono-Species Bacterial Biofilms Formed on the Surface of Artificial Reef on Settlement of Plantigrades in <i>Mytilus coruscus</i> | (224) |
|YANG Jinlong, YU Xiangbing, HU Xiaomeng, HE Chuhan, LIANG Xiao | |
| A Novel Pathway to Produce Color Mutants by Short-Wavelength Ultraviolet Ray Irradiation on the Germinating Conchospore in <i>Pyropia haitanensis</i> | (235) |
|TAO Weili, ZHONG Chenhui, ZHANG Peng, GUO Chentao, WANG Tiegang, LIN Qi | |
| The Construction of a Low-Odor Background Model of Silver Carp (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>) Surimi | (245) |
|GENG Haiyong, CHEN Lihua, YANG Fang, WU Yi, WANG Shufen, JIANG Qixing, XU Yanshun, XIA Wenshui | |
| Analysis and Evaluation of the Muscle Nutrition of Different Sizes of Wild Yellowfin Tuna (<i>Thunnus albacares</i>) | (258) |
|LIU Longlong, LUO Ming, LIU Hongtao, CHEN Fuxiao, HAN Lina | |
| Effect of Drying Methods on the Flavor of <i>Cololabis saira</i> Assessed by GC-MS Coupled with Electronic Tongue..... | (268) |
|WANG Lin, ZHAO Ling, LIU Qi, QI Xiangming, CAO Rong, MU Weili | |

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230210001

http://www.yykxjz.cn/

卞晓东, 万瑞景, 单秀娟, 金显仕, 王凯传. 渤海湾鱼类早期资源群落结构特征及其时间变化研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 01–30

BIAN X D, WAN R J, SHAN X J, JIN X S, WANG K C. Temporal variation of the early life stages of marine fish assemblage structure and abundance in the Bohai Bay. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 01–30

渤海湾鱼类早期资源群落结构特征 及其时间变化研究*



卞晓东^{1,2} 万瑞景¹ 单秀娟^{1,2} 金显仕^{1,2①} 王凯传¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 山东 青岛 266071;
2. 山东长岛近海渔业资源国家野外科学观测研究站 山东 烟台 265800)

摘要 渤海湾历史上为黄渤海多种主要经济鱼类的重要产卵和育幼场。基于历史调查资料和补充调查, 构建渤海湾鱼卵、仔稚鱼调查数据集, 通过数理统计分析阐述 1982 年以来渤海湾鱼类早期资源(浮性鱼卵和仔稚鱼)群落特性和演替过程。结果显示, 渤海湾鱼类早期资源结构、产卵和育幼场重心位置处于持续更替过程中, 不同时期早期资源的种类组成、资源丰度、优势种类和物种多样性水平等呈明显季节更替, 118°30'E 以西湾中底部海域一直为产卵和育幼场集中分布区。相较 1980s, 渤海湾鱼类早期资源已发生结构性改变, 且渤海湾作为传统经济鱼类的产卵和育幼场所的功能下降明显。渤海湾鱼类早期资源种数和资源丰度均在 2010s 前期跌至历史低值, 近年来又显著回升。鱼类早期资源种数由 1980s 的 39 种, 1990s 前期的 31 种、后期的 34 种, 2000s—2010s 初期的 22 种, 逐次下降至 2010s 前期的 21 种, 2010s 中后期开始逐步回升, 至 2020s 初期已达 40 种。2020—2021 年鱼卵种数约为 1980s 的 80%左右, 资源丰度约为彼时的 88%; 仔稚鱼种数与 1980s 大致相当, 资源丰度则为彼时的 1.33 倍。鱼卵、仔稚鱼物种多样性水平呈年际和年代际剧烈波动, 鱼类早期资源种类年际更替现象明显, 且近年来呈明显加快趋势。产卵类型、栖息类型和适温类型亲体种数均呈先下降后上升的变动趋势, 全年综合浮性卵种数比例下降, 黏性卵和具卵膜丝卵种数比例升高; 陆架浅水中上层鱼类种数所占比例升高, 中底层和底层鱼类所占比例降低。斑鲷(*Konosirus punctatus*)、青鳞小沙丁鱼(*Sardinella zunasi*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus japonicus*)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等渤海湾传统经济鱼类早期资源密度显著降低; 鳀(*Engraulis japonicus*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)、赤鼻棱鳀(*Thryssa kammalensis*)和少鳞鳊(*Sillago japonica*)等鱼类早期资源密度显著增高。渤海湾鱼类早期资源发生量主要取决于产卵场的环境条件、捕捞强度和对鱼类早期资源的损害程度, 渤海湾鱼类早期资源结构及其动态变化是环境和捕捞双重扰动下鱼类群落内生态位错位交替和结构性渔业资源衰退的具体体现。

关键词 鱼类早期资源; 补充量; 产卵育幼场; 物种多样性; 长期变化; 渤海湾

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0001-30

* 农业农村部财政项目“黄渤海产卵场调查”(125C0505)、山东省自然科学基金(ZR2022MD086)、山东省泰山学者专项基金(tsqn202103135)和黄渤海渔业资源与生态创新团队(2020TD01)共同资助。卞晓东, E-mail: bianxd@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 金显仕, 研究员, E-mail: jin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-02-10, 收修改稿日期: 2023-04-10

渤海湾为三面陆缘环抱、东部与渤海毗连的半封闭性海湾,地处暖温带北缘、季风气候区,在陆上气候和黄海冷水团次级水团-渤海水团交互影响下,温、盐等季节变化显著,同时,该海域受渤海逆时针环流、往复流性质的潮流及M2潮汐余流影响,形成错综复杂的海洋生态环境;来自黄海北部的外海高盐水系和渤南沿岸低盐水系(前者夏季为低温,冬季为高温;后者夏季为高温,冬季为低温)的分布、演变和消长过程构成了渤海湾基本水文特征(农业部水产局和农业部黄海区渔业指挥部,1990)。渤海湾沿岸有滦河、蓟运河、潮白新河、海河、独流减河、子牙新河、漳卫新河和徒骇河等河流入海带来的淡水和营养盐类,促进了饵料生物大量繁殖,为渔业生物提供了适宜的生长环境,历史上为多种鱼类(夏世福,1960;吴光宗等,1983;杨东莱等,1984;姜言伟等,1988;孔立波等,1996)、虾类(邓景耀,1960、1980)、蟹类(邓景耀等,1988)和口足类(邓景耀等,1988;谷德贤等,2018)等的产卵场及其幼体的主要索饵场,同时形成了渤海三大渔场之一——渤海湾渔场。

渤海湾作为一个浅滩淤泥质海湾,海底地形自岸向海倾斜,沿岸受人类活动影响较大,半封闭的港湾特征决定其与外海交换能力差(赵维等,2019)。近40年来,渤海湾周围集中了海洋化工、海上石油开采、港口、滩涂养殖和盐业等多种经济活动(聂红涛等,2008);大规模围垦滩涂、临海城市和港口码头建设导致岸线人工化程度逐年增高(至2015年渤海湾沿岸人工岸线比例约占岸线总长度的95%以上)(孙百顺等,2017)及潮流场变化(孙晓宇等,2014),湾内环流涡旋增多(王勇智等,2015;白玉川等,2021),水交换率下降(赵维等,2019);大量陆源污染物质排入渤海湾,其一直处于富营养化状态,赤潮频发(Wang *et al.*, 2009; 赵海萍等,2016;刘晶晶等,2021),并叠加镉、汞、铅和石油烃复合污染更加剧了渤海湾生态负担(许思思等,2010)。在全球变化背景下,渤海湾海表温持续上升,海洋热浪发生频次、持续时间和累积强度显著增加(自然资源部国家海洋信息中心,2019—2022);黄河和海河等入海径流量下降、黄河尾间摆动和海河水系诸河口建闸(雷坤等,2007; Wu *et al.*, 2020)等使渤海湾淡水和营养盐输入通量显著下降(雷坤等,2007),温盐呈显著上升态势(吴德星等,2004),严重影响河口生态功能和渔业生物饵料供给,为鱼类产卵场环境生态带来严重负面影响。特别是1960s以来,渤海湾渔业资源遭遇了生长型(冯志青等,1982、1987)和补充型(农业部水产局和农业部黄海区渔业指挥部,1991)的双重捕捞过度,资源呈现严重衰退(程济生等,

2004)。

渔业种群的变动主要由补充量变化驱动,产卵场能为鱼类早期资源(鱼卵和仔稚幼鱼)提供生长、发育和存活的基本条件,鱼类早期资源的存活率则决定了种群世代强弱(Houde, 1987)。鱼卵、仔稚鱼调查提供了一种只需浮游生物网就可对产卵场中大部分鱼种丰度进行取样和评估的可能性(Sherman *et al.*, 1984; Koslow *et al.*, 2016),是鱼类繁殖生物学和补充机制研究的有效方法(Sassa *et al.*, 2019)。特别对那些不便直接开展资源调查的鱼类,相较传统底拖网调查优势更加显著(Saville *et al.*, 1981);调查获取的鱼类早期资源量及产卵场面积和位置等信息可帮助确定产卵亲体种类、产卵期、种群特别是复合种群(meta-population)的划分(Hare *et al.*, 2013),并可直接作为种群补充成功率和亲体量评估的重要指标(Sassa *et al.*, 2019);通过高质量、长周期鱼卵仔稚鱼调查数据能获得非捕捞因素导致的产卵亲体量和产卵场年际变异信息(Lasker, 1985; Hsieh *et al.*, 2005; 2006; Lo *et al.*, 2016; Takasuka *et al.*, 2019; Nielsen *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2021),其为研究人类活动(Hsieh *et al.*, 2005、2006)和气候变化(Nielsen *et al.*, 2021; Thompson *et al.*, 2021)对海洋鱼类种群影响的重要信息。渤海湾水域也为作者所在单位鱼类早期资源调查资料积累较丰富的海区之一,1982—2019年,中国水产科学研究院黄海水产研究所先后在渤海湾海域开展过60余航次鱼卵、仔稚鱼调查(姜言伟等,1988;万瑞景等,1998;程济生等,2004;卞晓东等,2018),最近又于2020年4—12月间开展了周年逐月调查,取得了长期连续观测资料。为系统掌握渤海湾鱼类早期资源群落结构特征及其长期演替过程,本研究选取其中53个季度月航次数据来进行综合分析,以期对渤海湾鱼类早期资源评价与保护研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 数据采集和样品分析

选取涵盖渤海湾1980s、1990s、2000s—2010s前期、2010s中期、2010s晚期和2020s前期(含年内各季节和鱼类主要产卵期)53航次数据,研究各调查时期鱼类早期资源种类组成、资源丰度、优势种类和物种多样性水平,产卵和育幼场范围及重心迁移,并对产卵亲体产卵、适温和栖息类型开展分析,各调查时期采样站位及时间详见图1和表1。

各调查时期鱼卵、仔稚鱼样品采集均采用网口内径80 cm、长270 cm、36 GG(孔径0.505 mm)筛绢制成的大型浮游生物网,采用水平拖网,每站表层拖网

10 min, 拖曳速度 2 nmile/h。标本用 5% 海水甲醛溶液固定。实验室内从大型浮游生物网采集样品中挑出鱼卵和仔稚鱼。样品全样本分析, 体视显微镜下经形态学鉴定并反复核实, 确认至每一物种单元, 并按种类及其发育阶段分别记录个体数。发育阶段包括卵(分裂期、原肠期、胚胎期、孵化期和死卵)和仔稚幼鱼(前期仔鱼、后期仔鱼、稚鱼和幼鱼)。鱼种学名参照 World Register of Marine Species (WoRMS, <https://www.marinespecies.org/>)。

1.2 鱼卵仔稚鱼生态密度和种类数

鱼卵、仔稚鱼生态密度为个体数生态密度(ecological density of number in early life history, EDN-ELH)。不同调查时期鱼卵 EDN-ELH 取渤海湾硬骨鱼类主要产卵季节(5、6、8 和 10 月)出现的全部鱼卵数据来计算; 仔稚鱼 EDN-ELH 取周年各月调查(5、6、8、10、11 月至次年 3 月)出现的全部仔稚鱼数据来计算; 在数据整理过程中, 由于水平拖网速度难以严格控制, 为便于同质比较和数据质量控制, 样品定量分析时以每站每网实际捕获鱼卵、仔稚鱼(ind./haul)作为指标进行比较(姜言伟等, 1988; 万瑞景等, 1998; 卞晓东等, 2018、2022a、b)。因不同调查时期各月调查站位和数量不同, 以 1982—1983 年调查结果作为本底(Y_{ref} , 年效应值为 1), 采用 R 中广义线性模型(generalized linear model, GLM), 考虑捕捞努力量的空间分布(N_R , 渔区 zone)和数据尺度特征(N_S , 调查时间 month), 分别对各调查时期(Y , 年份 year)鱼卵或仔稚鱼 EDN-ELH ($CPUE_i$)进行标准化, 构建资源丰度指数(abundance index, AI)指示不同调查时期鱼卵、仔稚鱼和各种 EDN-ELH (卞晓东等, 2018、2022a、b)。计算公式参照官文江等(2014)和官文江(2015):

$$CPUE = \frac{qaN}{A} = aqD \quad (1)$$

式(1)为 CPUE 与资源密度(EDN-ELH)一般表达式。式中, q 为捕捞系数, N 为资源量, A 为渔场面积, D 为平均 EDN-ELH, a 为有效系数, 即渔具能有效覆盖或能接近的资源比例。

$$E(CPUE_{i,j,k,e,g}) = H_h G_g Y_i Q_j R_k a_0 q_0 D_0 \quad (2)$$

式(2)为 CPUE 与 a 、 q 及 N 或 D 的函数关系。式中, a_0 为有效系数, q_0 标准捕捞系数, D_0 为标准时间-区域下的 EDN-ELH, H_h 为环境 h 的相对效应(相对于标准环境, 下同), G_g 为渔具 g 的相对效应, Y_i 为年 i 的相对效应, Q_j 为月 j 的相对效应, R_k 为区域 k 的相对效应。

$$CPUE_i = \frac{1}{N_S} \sum_{j=1}^{N_S} \sum_{k=1}^{N_R} A_k E(CPUE_{i,j,k,0,0}) \quad (3)$$

式(3)为去除 a 与 q 的变化后 CPUE 与资源量或 EDN-ELH 的正比关系, 即标准化的 CPUE。式中, N_S 为调查月份, N_R 为渔区数, $CPUE_{i,j,k,0,0}$ 为忽略环境效应与渔具效应下(即假设 H_h 与 G_g 为 1)的 CPUE。将式(2)带入式(3)可得式(4):

$$CPUE_i = a_0 q_0 D_0 Y_i \left[\frac{1}{N_S} \sum_{j=1}^{N_S} \sum_{k=1}^{N_R} A_k Q_j R_k \right] \quad (4)$$

由于 CPUE 仅代表相对资源丰度, CPUE 时间系列除以相同的数不会改变资源量的相对关系。当各年 CPUE 均除以参考年份的 CPUE, 则获得式(5)相对丰度指数 I_i (官文江等, 2014; 官文江, 2015):

$$I_i = \frac{CPUE_i}{CPUE_{ref}} \quad (5)$$

将式(4)代入式(5), 则得式(6):

$$I_i = \frac{Y_i}{Y_{ref}} \quad (6)$$

式(5)和式(6)中, I_i 为相对年效应, $CPUE_i$ 为第 i 年 CPUE, $CPUE_{ref}$ 为参考年份的 CPUE。

鱼卵或仔稚鱼种数为不同调查时期各航次出现的鱼卵或仔稚鱼物种数。

1.3 鱼卵、仔稚鱼的分布及重心迁移

根据各调查时期(表 1)实际调查获取渤海湾鱼类早期资源(鱼卵或仔稚鱼)EDN-ELH, 通过 ArcGIS10.4 软件地理统计分析模块的 Empirical Bayesian Kriging 插值处理后, 绘制不同调查时期产卵(育幼)场分布图。

采用 Garrison 分布重心法(张雨轩等, 2022a)计算各调查时期(年份)鱼卵(仔稚鱼)分布重心, 计算公式为:

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i \times \rho_i)}{\sum_{i=1}^n \rho_i} \quad (7)$$

$$Y = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i \times \rho_i)}{\sum_{i=1}^n \rho_i} \quad (8)$$

式(7)和式(8)中的 X 、 Y 分别为产卵(育幼)重心的经、纬度, X_i 、 Y_i 分别为 i 站位的经、纬度, ρ_i 为 i 站位的鱼卵(仔稚鱼)的 EDN-ELH。

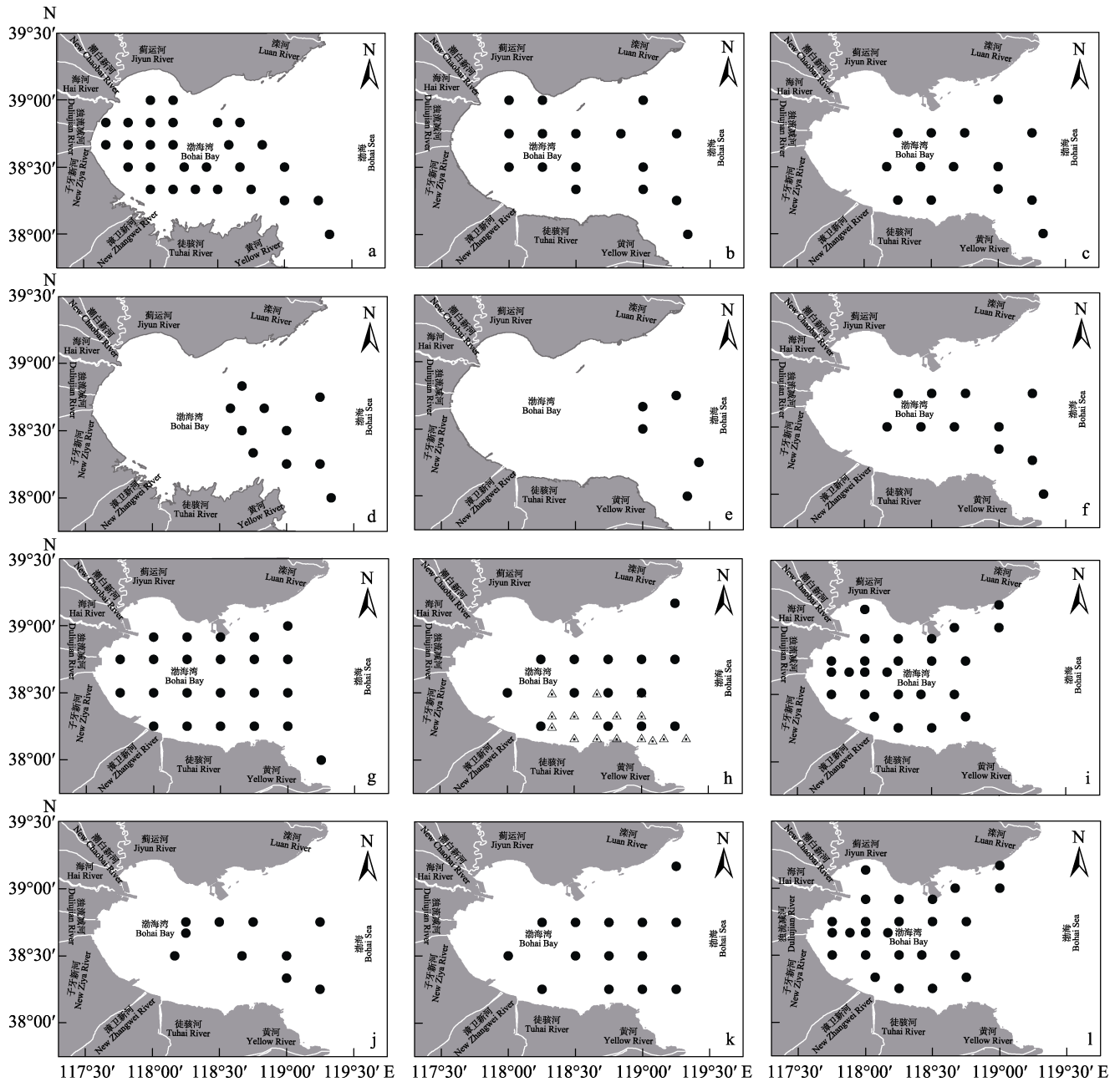


图1 不同调查时期渤海湾鱼卵、仔稚鱼采样区域和调查站位

Fig.1 Survey area and sampling stations to fish eggs and larvae in the Bohai Bay in different survey periods

a 和 d: 1980s 站位(a. 1982年5、6、8、10月; d. 1983年1—2月); b 和 e: 1990s 站位(b. 1992年8、10月, 1993年5—6月, 1998年5—6、8、10月; e. 1993、1999年2月); c 和 f: 2000—pre2010s 站位(c. 2004年5月, 2012年6、8月, 2009年10月, 2013、2014年5、6、8、10月; f. 2014年2月, 2015年1月); g 和 j: mid2010s 站位(g. 2015、2016年5、6、8月, 2016年10月; j. 2016年1、12月); h 和 k: late2010s 站位(h. 2017、2018年5、6、8、10月, ‘△’所示站位仅在2017年5、6月开展; k. 2017年3、11—12月); i 和 l: pre2020s 站位(i. 2020年5、6、8、10月; l. 2020年12月)。

a and d: Sampling stations in the 1980s (a. May, June, August and October in 1982; d. January–February in 1983);
 b and e: Sampling stations in the 1990s (b. August, October in 1992, May–June in 1993, May–June, August and October in 1998; e. February in 1993 and 1999);
 c and f: Sampling stations in the 2000s to pre2010s (c. May in 2004, June and August in 2012, October in 2009, May, June, August and October in 2013 and 2014; f. February in 2014 and January in 2015);
 g and j: Sampling stations in the middle 2010s (g. May, June, and August in 2015 and 2016, October in 2016; j. January and December in 2016);
 h and k: Sampling stations in the late 2010s (h. May, June, August and October in 2017 and 2018, stations marked as ‘△’ only surveyed in May and June of 2017; k. March, November–December in 2017);
 i and l: Sampling stations in the early 2020s (i. May, June, August and October in 2020; l. December in 2020).

表 1 各调查时期渤海湾鱼卵、仔稚鱼调查时间和站位数

Tab.1 Survey time and number of sampling stations to fish eggs and larvae during different survey periods in the Bohai Bay

| 调查时期 Survey period | 年份 Year | 调查站数/调查时间 Number of sampling stations/survey time (month.date) | | | | |
|-----------------------|------------|---|-----------------------|--------------|----------------|----------------|
| | | 春季 Spring | 春-夏季 Spring-Summer | 夏季 Summer | 秋季 Autumn | 冬季 Winter |
| | | 1980s | 1982—1983 | 26/5.6—5.19 | 28/6.7—6.17 | 26/8.5—8.27 |
| 1990s | 1992—1993 | 15/5.25—6.7 | 15/5.25—6.7 | 16/8.8—8.18 | 16/10.7—10.21 | 5/2.15—2.21 |
| | 1998—1999 | 15/5.25—6.4 | 15/5.25—6.4 | 15/8.5—8.13 | 15/10.8—10.16 | 4/2.1—2.7 |
| 2000s—pre2010s | 2004—2012* | 10/5.22—6.1 | 10/6.21—6.27 | 13/8.5—8.11 | 11/10.21—10.29 | — |
| | 2013—2014 | 14/5.17—5.26 | 13/6.18—6.26 | 12/8.10—8.20 | 13/10.13—10.31 | 13/2.23—3.5 |
| | 2014—2015 | 13/5.17—5.26 | 12/6.15—6.24 | 12/8.13—8.22 | 12/10.9—10.24 | 11/1.9—1.20 |
| mid2010s | 2015—2016 | 26/5.17—5.30 | 23/6.13—6.25 | 27/8.5—8.17 | — | 10/1.9—1.28 |
| | 2016—2017 | 26/5.16—5.26 | 27/6.18—6.28 | 26/8.2—8.12 | 23/10.13—10.26 | 10/12.15—12.24 |
| late2010s | 2017—2018 | 23/5.22—5.30 | 30/6.7—6.19 | 14/8.10—8.18 | 14/10.13—10.26 | 13/3.21—3.29 |
| | 2018—2019 | 11/5.24—5.31 | 16/6.14—6.23 | 16/8.2—8.11 | 16/10.19—10.28 | 14/11.28—11.30 |
| 2020s | 2020—2021 | 25/5.25—5.29 | 25/6.20—6.26 | 23/8.23—8.28 | 25/10.30—11.3 | 25/12.9—12.15 |

注: —: 空值; *: 春季调查时间在 2004 年, 春-夏季和夏季调查在 2012 年, 秋季调查在 2009 年。

Note: —: No data; *: The spring survey was conducted in 2004, the spring-summer and summer surveys were conducted in 2012, and the autumn survey was conducted in 2009.

1.4 鱼卵仔稚鱼优势种类和重要种类

运用 Pinkas 相对重要性指数[index of relative importance, IRI, 公式(9)](Pinkas *et al.*, 1971)对每航次调查出现鱼卵和仔稚鱼种类组成分别进行分析, 以确定鱼卵或仔稚鱼优势种类(dominant species)、重要种类(important species)和主要种类(main species)的成分:

$$IRI = (N\% + W\%) \times F\% \quad (9)$$

$$IRI = N\% \times F\% \quad (10)$$

式(9)中, $N\%$ 为每航次调查过程中某种鱼卵或仔稚鱼个体数量占鱼卵或仔稚鱼总量比例; $W\%$ 为每航次调查过程中某种鱼卵或仔稚鱼生物量比例。由于鱼卵和仔稚幼鱼个体都很小, 因此不考虑生物量, 只考虑个体数量这一因素, IRI 的计算公式可以简化为公式(10)(卞晓东等, 2018、2022a、b)。取 $IRI > 1000$ 的种类定义为鱼卵或仔稚鱼优势种; 鱼卵重要种类 IRI 值为 200~1000; 仔稚鱼重要种类 IRI 值为 100~1000。

1.5 鱼卵仔稚鱼物种多样性水平及其种类更替

采用 α 多样性测度方法, 香农-威纳指数[Shannon-Wiener Index, H' 公式(11)]和辛普森多样性指数[Simpson's Diversity Index, D_s 公式(12)]研究渤海湾不同调查时期各季节鱼卵和仔稚鱼物种多样性; 采用 β 多样性测度方法, Jaccard 群落种类组成相似性指数[coefficient of community, CC 公式(13) (Whittaker, 1972)]和基于鱼类早期资源种类相似程度的层次聚类

方法比较各年间鱼类早期资源(鱼卵仔稚鱼种数合并计数)种类相似程度(卞晓东等, 2018、2022b)。

公式(11)和(12)中, S 为不同调查时期各季节鱼类早期资源中出现的鱼卵或仔稚鱼种类数, P_i 为群落中第 i 种鱼卵或仔稚鱼所占鱼卵或仔稚鱼总量的个体比例。公式(13)中, S_s 为 2 个比较年份间鱼类早期资源共有种类数, S_j 和 S_k 为 2 个比较年份各自拥有种数。当 CC 为 0~0.25 时, 群落之间极不相似; 当 CC 为 0.25~0.50 时, 群落之间中等不相似; 当 CC 为 0.50~0.75 时; 群落之间中等相似; 当 CC 为 0.75~1.00 时, 群落之间极相似(Whittaker, 1972; 卞晓东等, 2018)。

$$H' = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad (11)$$

$$D_s = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2 \quad (12)$$

$$CC = S_s / (S_j + S_k - S_s) \quad (13)$$

1.6 渤海湾主要鱼类鱼卵资源丰度指数

渤海湾鲉(*Engraulis japonicas*)、青鳞小沙丁鱼(*Sardinella zunasi*)、斑鲹(*Konosirus punctatus*)、赤鼻棱鲉(*Thryssa kammalensis*)、黄鲫(*Setipinna tenuifilis*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)和花鲈(*Lateolabrax maculatus*)等鱼卵 EDN-ELH 取主要产卵季节(5、6、8 和 10 月)数据来计算, 各种 AI 计算方法同 1.2 中鱼卵、仔稚鱼 AI 计算方法。运用 Origin

2018 软件绘制 1980s 以来渤海湾主要鱼类鱼卵资源丰度指数变动图。

1.7 亲体产卵、适温和栖息类型分析

依据卵子类型将亲体划分为产浮性卵鱼类(pelagic egg, P)、产黏着沉性卵鱼类(demersal egg, D)、产附着性卵鱼类(egg with adhesive filaments, AF)、产凝集浮性卵鱼类(agglutinative pelagic egg, AP)和卵胎生鱼类(ovoviviparity, O)。根据鱼类区系分类有关文献索引(《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会, 1990; 田明诚等, 1993)将渤海湾亲体适温类型划分为暖温种(warm temperate species, WT)、暖水种(warm water species, WW)和冷温种(cold temperate species, CT)。根据刘静等(2011)鱼类栖息类型划分将渤海湾亲体划分为大陆架浅水底层鱼类(continental shelf demersal fish, CD)、大陆架浅水中底层鱼类(continental shelf benthopelagic fish, CBD)、大陆架浅水中上层鱼类(continental shelf pelagic-neritic fish, CPN)、大陆架岩礁性鱼类(continental shelf reef-associated fish, CRA)、大陆架大洋洄游性中上层鱼类(oceanic pelagic fish, OEP)和大洋深水底层鱼类(oceanic bathydemersal fish, OMP)。

2 结果与分析

2.1 渤海湾鱼卵总种类数和生态密度季节变化和年代际变化

近 40 年来, 渤海湾(5、6、8 和 10 月)鱼卵种数由 1980s 的 27 种, 1990s 前期的 20 种、后期的 19 种, 逐次下降至 2000s—2010s 初期的 11 种(2014—2015 年, 不足 1980s 的 50%); 自 2010s 中期(2015—2016 年)开始, 鱼卵种数逐步回升, 至 2018—2019 年达 16 种, 最近 2020—2021 年为 22 种(图 2a)。季节变化上, 各调查时期春季(5 月)和春夏季(6 月)采集浮性卵种数最多, 夏季(8 月)次之, 秋季(10 月)种类较少, 冬季(11 月至次年 3 月)均未采集到浮性卵(图 3a)。长期变化上, 春季、春夏季和夏季采集鱼卵种数年代际波动明显, 呈先下降后上升的变动趋势。春季鱼卵种数由 1980s 的 19 种, 1990s 初期的 18 种、后期的 15 种, 逐次下降至 2000s—2010s 初期的 4 种(不足 1980s 的 25%); 此后, 鱼卵种数逐步回升, 至 2020—2021 年恢复至 17 种(图 3a)。春夏季, 鱼卵种类由 1980s 的 15 种, 1990s 初期的 18 种、后期的 15 种, 降至 2000s—2010s 初期的 7 种(2004—2015 年各年均不足 1980s 的 50%); 自 2010s 中后期开始, 鱼卵种数逐步增多, 2018—

2019 年达 18 种; 至 2020—2021 年为 13 种(图 3a)。夏季, 鱼卵种类由 1980s 的 10 种, 1990s 初期的 8 种、后期的 6 种, 逐渐降至 2000s—2010s 初期的 3~4 种(2013—2014、2014—2015 年各 3 种, 均不足 1980s 的 50%); 自 2010s 中期开始, 鱼卵种数逐步回升, 至 2018—2019 年为 8 种, 当前 2020—2021 年为 6 种。秋季出现鱼卵种数相对稳定, 在 1~3 种之间(图 3a)。

如果 1982—1983 年鱼卵 AI 为 1, 那么此后其资源丰度指数变动为 0.21~2.09 倍, 历史低值在 2014—2015 年, 历史高值在 1992—1993 年。鱼卵 AI 呈先上升后下降而后又上升的变动趋势, 由 1980s 的 1.00 跃升至 1990s 初期的 2.09, 此后 AI 急剧下跌, 至 1990s 后期为 0.24; 2000s—2010s 前期, AI 一直处于低水平区间(0.21~0.26), 在 2014—2015 年跌至历史低值 0.21; 自 2010s 中期开始, AI 逐步回升, 特别是 2017 年后, AI 恢复趋势明显, 2018—2019 年升至历史次高值 1.61, 最近 2020—2021 年 AI 为 0.88。季节变化上, 鱼卵平均资源密度(AEDN, ind./haul)在各调查时期升温季节(春季和春夏季)较高; 夏季鱼卵 AEDN 急剧下降, 至秋季整个调查海区仅有零星鱼卵分布(图 3b); 冬季无浮性鱼卵分布。长期变化上, 不同年份春季 AEDN 差异极显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(10, n=204)}=81.97$, $P<0.001$; 各年均值比较 $\chi^2=59.68$, $df=10$, $P<0.001$), 由 1980s 的 4 869.5 ind./haul 升至 1990s 初期的历史高值 30 666.0 ind./haul, 1990s 后期急剧跌至 292.2 ind./haul, 在 2004—2015 年 AEDN 徘徊在历史低值区间 16.5~542.3 ind./haul (2013—2014 年跌至历史低值 16.5 ind./haul, 不足 1980s 的 0.4%); 自 2010s 中后期开始, 鱼卵 AEDN 呈波动上行趋势, 至 2018—2019 年为 3 718.9 ind./haul, 2020—2021 年则高达 25 159.5 ind./haul (图 3b)。春夏季鱼卵 AEDN 波动趋势与春季类似, 不同年份 AEDN 差异极显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by Ranks, $H_{(10, n=231)}=68.92$, $P<0.001$; 各年均值比较 $\chi^2=55.54$, $df=10$, $P<0.001$), 1980s 为 70.61 ind./haul, 1990s 初跃升至 30 666.0 ind./haul; 至 1990s 后期迅速降至 292.6 ind./haul, 2000s—2010s 初期徘徊在历史低值区间 27.9~98.55 ind./haul (2013—2014 年至历史低值 27.9 ind./haul); 自 2010s 中期开始, AEDN 呈波动上行趋势, 且 2010s 后期始, AEDN 均在 1 000 ind./haul 之上, 至 2020—2021 年为 1 130.4 ind./haul (图 3b)。长期变化上, 不同调查年份夏季鱼卵 AEDN 间差异不及春季和春夏季显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(10, n=213)}=21.49$, $P<0.05$; 各年均值比较 $\chi^2=18.01$, $df=10$, $P=0.055>0.05$), 夏季 AEDN 自

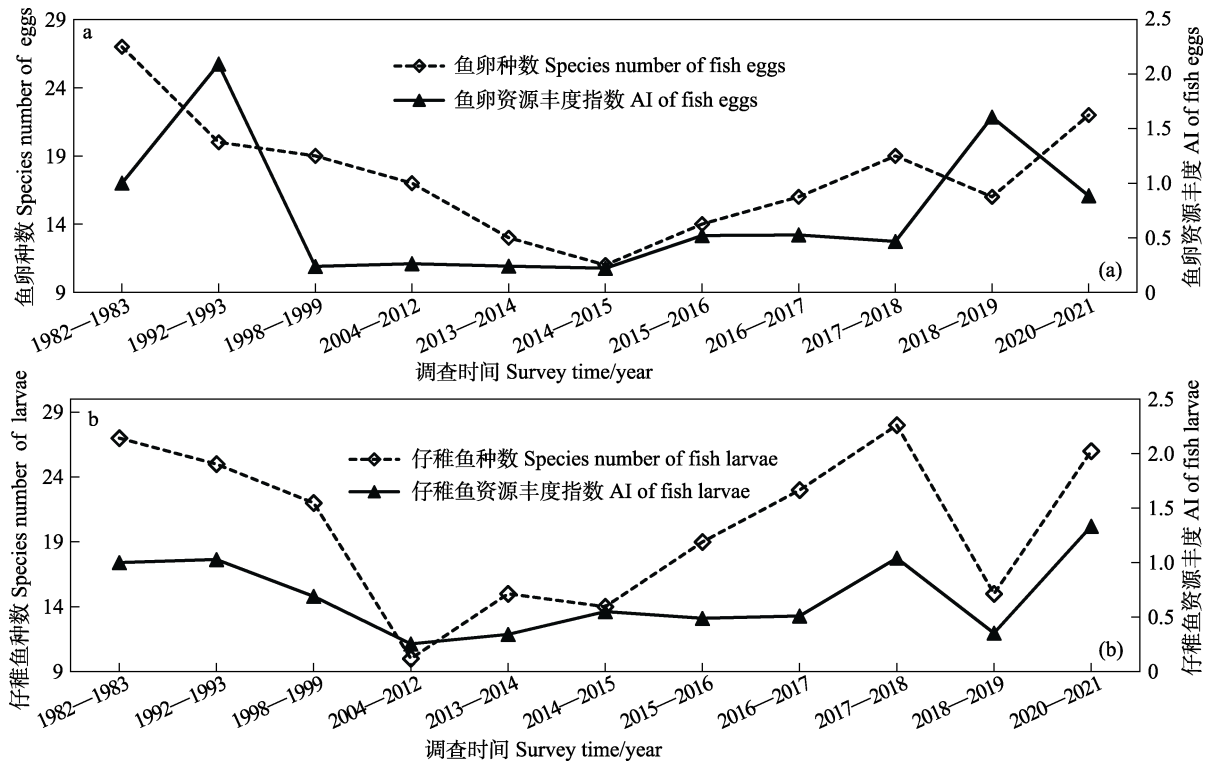


图 2 渤海湾各调查时期(年份)鱼卵(a)仔稚鱼(b)资源丰度指数和种类数

Fig.2 Abundance index and species number of (a) fish eggs and (b) fish larvae across different survey periods (year) since the 1980s in the Bohai Bay

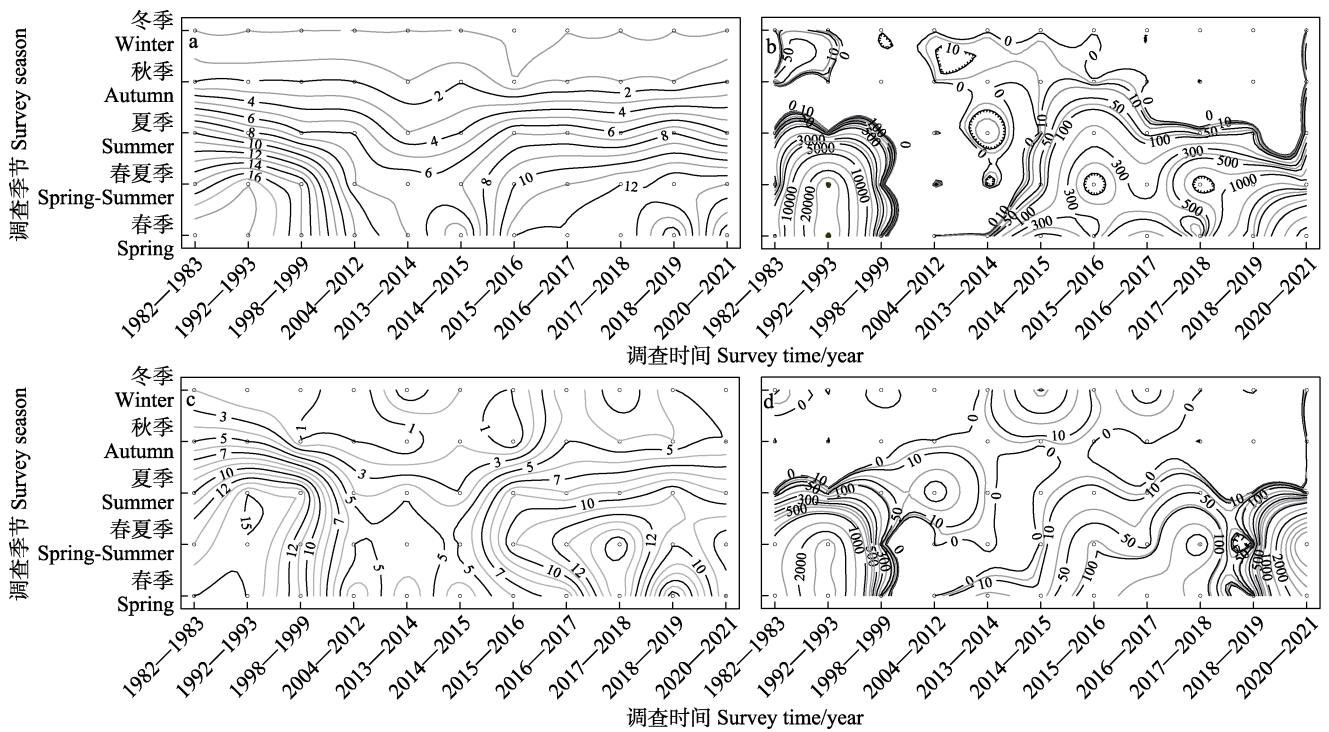


图 3 渤海湾各调查时期(年份)不同季节鱼卵、仔稚鱼种类数和生态密度概况

Fig.3 Number of species and ecological density to fish eggs and larvae profiles along the survey season across different survey periods in the Bohai Bay

a: 鱼卵种类; b: 鱼卵生态密度; c: 仔稚鱼种类; d: 仔稚鱼生态密度

a: Number of egg species; b: Ecological density of fish eggs; c: Number of larvae species; d: Ecological density of fish larvae

1982—2015年间呈下降趋势,由1980s的238.9 ind./haul降至2014—2015年历史低值1.54 ind./haul;自2010s中后期开始,AEDN波动上行,于2015—2016年达历史高值263.2 ind./haul。长期变化上,不同调查年份秋季AEDN差异显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(9, n=175)}=81.34, P<0.001$;各年均值比较 $\chi^2=71.17, df=9, P<0.001$)。秋季鱼卵AEDN自1980s历史高值100.9 ind./haul降至1990s前期的10.6 ind./haul,此后AEDN一直在0.28~4.64 ind./haul较低水平区间内波动,至2020—2021年仅为0.28 ind./haul,资源衰退严重(图3b)。

2.2 渤海湾仔稚鱼种类数和生态密度季节变化和年代际变化

近40年来,渤海湾周年调查仔稚鱼种数由1980s的27种、1990s前期的25种、后期的22种,逐次下降至2000s—2010s初期的10~15种低位区间(2004—2012年仅10种,约为1980s的37%);2010s中后期仔稚鱼种数回升,2017—2018年升至28种,2020—2021年为26种(图2b)。季节变化,各调查时期仔稚鱼种数在升温季呈上升趋势,并在春夏季至年内高值;夏季仔稚鱼种数下降,秋季出现种数进一步下降,冬季至年内最低(个别调查年份除外)但仍有一定种类仔稚鱼出现(图3c)。长期变化上,春季、春夏季、夏季和秋季出现仔稚鱼种数均主要呈先下降后上升的变动趋势。春季出现仔稚鱼种数由1980s的15种逐次降至2000—2010s前期的3~7种,2014—2015年至历史低值3种;2010s中后期升至6~15种(图3c),当前2020—2021年为12种。春夏季出现仔稚鱼种数自1980s—1990s前期小幅上升,由13种升至15种,此后种类数逐渐降低,在2000s—2010s前期剧降至5~6种,2014—2015年至历史低值5种;此后,2010s中期始仔稚鱼种数逐步升至10~16种,2017—2018年至历史高值16种,2020—2021年为13种(图3c)。夏季出现仔稚鱼种数由1980s年的10种升至1990s前期的15种、1990后期14种,此后在2000—2010s前期剧降至3~5种,2014—2015年至历史低值3种;2010s中期开始,种数上升至8~11种,在2018—2019年至历史高值11种,2020—2021年为9种(图3c)。秋季出现仔稚鱼种数也由1980s和1990s前期的5种降至1990s末期的1种,2000s—2010s前期至0~1种低水平区间,2013—2014年至历史低值0种;2010s中后期开始,仔稚鱼种数逐年递增,在2020—2021年恢复至5种(图3c)。冬季出现仔稚鱼种数较少,长期变化呈明显上升趋势。1980s和1990s仅出现1~

2种,2000s—2010s前期升至2~4种;2010s中后期至1~4种,最近2020—2021年至历史高值6种(图3c)。

如果1982—1983年仔稚鱼AI为1.00,那么此后其AI变动为0.25~1.33倍,历史低值在2004—2012年,历史高值在2020—2021年。仔稚鱼AI呈先下降后上升的变动趋势,AI值由1980s和1990s初期的1.00降至2004—2012年的0.25,此后AI波动上升,至2017—2018年恢复至1980s水平,近年来,仔稚鱼AI值在0.35~1.33区间剧烈波动,最近2020—2021年为1.33。季节变化,仔稚鱼AEDN在各调查时期升温季节较高,并在春夏季升至年内最高值;夏季仔稚鱼AEDN急剧下降,至秋季仔稚鱼AEDN降至年内最低,冬季仍有一定数量的仔稚鱼分布(图3d)。长期变化上,相同季节仔稚鱼AEDN均呈剧烈年际和年代际波动(图3d)。不同调查年份,春季AEDN差异极显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by Ranks, $H_{(10, n=204)}=81.97, P<0.001$;各年均值比较 $\chi^2=59.68, df=10, P<0.001$),呈先上升后下降而后又波动上升的趋势,由1980s的1018.6 ind./haul升至1990s初期历史高值2844.8 ind./haul,1990s后期剧降至42.07 ind./haul,2004—2015年AEDN徘徊在历史低值区间0.3~37.3 ind./haul(2004—2005年至历史低值0.3 ind./haul,不足1980s的0.03%);自2010s中后期始仔稚鱼AEDN呈明显恢复趋势,升至136.92~2670.04 ind./haul区间(2017—2018年除外),至2020—2021年为历史次高值2670.04 ind./haul(图3d)。不同调查年份春夏季仔稚鱼AEDN差异极显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(10, n=213)}=72.32, P<0.001$;各年均值比较 $\chi^2=64.39, df=10, P<0.001$),呈先上升后下降而后又波动上升的趋势,由1982—1983年1116.11 ind./haul升至1990s初期2844.8 ind./haul,至1990s后期迅速降至42.07 ind./haul,2000s—2010s初期在历史低值区间0.62~5.64 ind./haul(2014—2015年至历史低值0.62 ind./haul);自2010s中期始,AEDN呈现波动上行趋势,至2020—2021年为历史高值5424.75 ind./haul(图3d)。不同调查年份夏季仔稚鱼AEDN差异显著(Kruskal-Wallis H -Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(10, n=213)}=39.38, P<0.001$;各年均值比较 $\chi^2=25.63, df=10, P<0.01$),也呈先上升后下降而后又波动上升的趋势,由1982—1983年10.35 ind./haul升至2012—2013年75.21 ind./haul,此后在2013—2017年徘徊在2.31~16.56 ind./haul低水平区间,并在2014—2015年跌至历史低值2.31 ind./haul;自2010s后期开始,AEDN呈波动上行趋势,至2020—2021年达39.32 ind./haul(图3d)。

不同调查年份秋季 AEDN 均处 0~2.19 ind./haul 低水平区间, 年际差异显著(Kruskal-Wallis *H*-Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(9, n=175)}=49.53$, $P<0.001$; 各年均值比较 $\chi^2=47.38$, $df=9$, $P<0.001$), 历史低值在 2013—2014 年, 为 0 ind./haul, 当前 2020—2021 年为 1.76 ind./haul (图 3d)。冬季 AEDN 年际差异显著(Kruskal-Wallis *H*-Test for one-way ANOVA by ranks, $H_{(9, n=118)}=48.71$, $P<0.001$; 各年均值比较 $\chi^2=35.89$, $df=9$, $P<0.001$), 历史低值在 2017—2018 年为 0.4 ind./haul, 历史高值为 2014—2015 年的 106.9 ind./haul, 当前 2020—2021 年为 6.96 ind./haul (图 3d)。

2.3 渤海湾鱼类产卵(育幼)场分布年代际变动

1980s 渤海湾鱼卵 EDN-ELH 平面分布呈明显自湾口部至湾底部递增趋势, 等 EDN-ELH 线与岸线呈近垂直状态, 产卵场主要分布于 118°00'E 以西渤海湾中底部, 核心产卵区(EDN-ELH 高于 5 000 ind./haul) 位于潮白新河口至漳卫新河口间湾底部(图 4a)。1990s 初期鲢大暴发, 鲢卵高密度区(EDN-ELH 高于 1 000 ind./haul)几乎布满整个渤海湾, 鱼卵 EDN-ELH 呈自湾东南口部至湾底部递增趋势(图 4b)。2000s—2010s 初期, 鱼卵 EDN-ELH 急剧下降, 整个渤海湾无明显鱼类产卵场分布, 特别是渤海湾底部自蓟运河河口至徒骇河河口间产卵场消失, 鱼卵主要分布于湾东南口部近黄河入海口处(图 4c)。2010s 中期开始, 渤海湾鱼类产卵场呈恢复趋势, 除自湾东北部突入的低密度区外, 鱼卵 EDN-ELH 分布相对均匀, 2 个相对密度高值区分别位于潮白新河口至漳卫新河口间湾底部和东南部黄河入海口西北侧(图 4d)。2010s 后期, 渤海湾鱼卵 EDN-ELH 进一步升高, 产卵场主要分布于 118°00'E 以西湾中底部、东南部近黄河入海口处和渤海湾东北口部, 其中, 湾底部潮白新河口至漳卫新河口间产卵场基本恢复(图 4e)。2020s 初期, 渤海湾鱼类产卵场规模进一步扩大, 鱼卵 EDN-ELH 达历史峰值, 高密度区布满整个渤海湾, 整体呈现由湾口至底部递增的趋势(4f)。以 118°30'E 线为界, 1982—1983、2016—2017 和 2020—2021 年产卵重心在分界线以西的湾中底部; 1998—1999、2004—2012、2014—2015 和 2018—2019 年产卵重心在分界线以东的湾口部; 1992—1993、2013—2014、2015—2016 和 2017—2018 年重心分居分界线两侧(图 5a)。鱼卵分布重心由 1980s 位于渤海湾底部逐渐向湾口部迁移, 至 1990s 末已迁移至 118°30'E 以东湾口部黄河入海口西北侧(图 5a); 2000s—2010s 初期, 湾底部产

卵场进一步衰退, 产卵重心一直位于 118°30'E 以东湾口部(图 5a); 2010s 中期始产卵重心又迁回至 118°30'E 以西湾中底部(2018—2019 年除外, 位于 118°30'E 以东湾口部), 其中, 2016—2017 年产卵重心位于 118°E 以西湾底部(图 5a)。

1980s 渤海湾仔稚鱼 EDN-ELH 高密度区(高于 100 ind./haul)布满整个渤海湾, 核心育幼场(高于 500 ind./haul)位于独流减河河口至黄河故道刁口河口近岸海域及渤海湾口中部, 并形成由渤海湾东北口部突入湾西南底部高密度区, 而在渤海湾北部近岸海域密度相对较低(图 6a)。1990s 渤海湾仔稚鱼 EDN-ELH 高密度区显著收缩, 核心育幼场位于渤海湾北部海河口至滦河口近岸海域, 此外渤海湾中底部密度也较高, 存在自渤海中部和黄河入海口西北侧突入渤海湾低密度区(图 6b)。2000s—2010s 初期, 育幼场衰退明显, 仔稚鱼 EDN-ELH 剧降, 主要分布于渤海湾中底部, 呈自湾口部至底部递增趋势, 核心育幼场不明显(图 6c)。2010s 中期, 渤海湾育幼场呈现恢复, 主要分布于湾中底部, 并具一自渤海中部突入渤海湾中部低密度区, 在独流减河河口至徒骇河河口间仔稚鱼密度较高(图 6d)。2010s 后期, 渤海湾仔稚鱼 EDN-ELH 进一步上升, 育幼场主要分布于 118°00'E 以西湾中底部, 核心育幼场分布于独流减河河口至徒骇河河口间渤海湾底部; 存在自渤海湾东北口部突入中部的低密度区(图 6e)。2020s 初期调查, 鱼类育幼场规模已略高于 1980s 水平, 核心育幼场布满整个渤海湾中底部; 存在自黄河入海口西北侧突入渤海湾中部的低密度区(6f)。以 118°30'E 线为界, 仔稚鱼分布重心除 2004—2012 和 2018—2019 年位于分界线以东湾口部外; 其余年份重心主要分布于 118°00'~118°30'E 之间的湾中部, 2020—2021 年重心位于湾底部。

2.4 鱼卵、仔稚鱼优势和重要种类季节变化和年代际变化

季节变化上, 增温期春季和春夏季鱼卵优势和重要种类均以暖温性 CPN 鱼类为主, 春夏季暖水性 CPN 鱼类、暖温或暖水性 CD 或 CBD 鱼类种数逐渐增多, 部分年份春季暖水性 CRA 鱼类优势度也较高; 夏季鱼卵优势或重要种类为暖水性或暖温性 CD 和 CBD 鱼类为主, 部分年份暖温性 CPN 鱼类鲢为重要种; 降温期秋季主要为 CRA 鱼类, 冬季则未采集过浮性鱼卵(附录 I)。长期变化上, 春季鱼卵优势和重要种类, 1980s 为暖温性小型 CPN 鱼类青鳞小沙丁

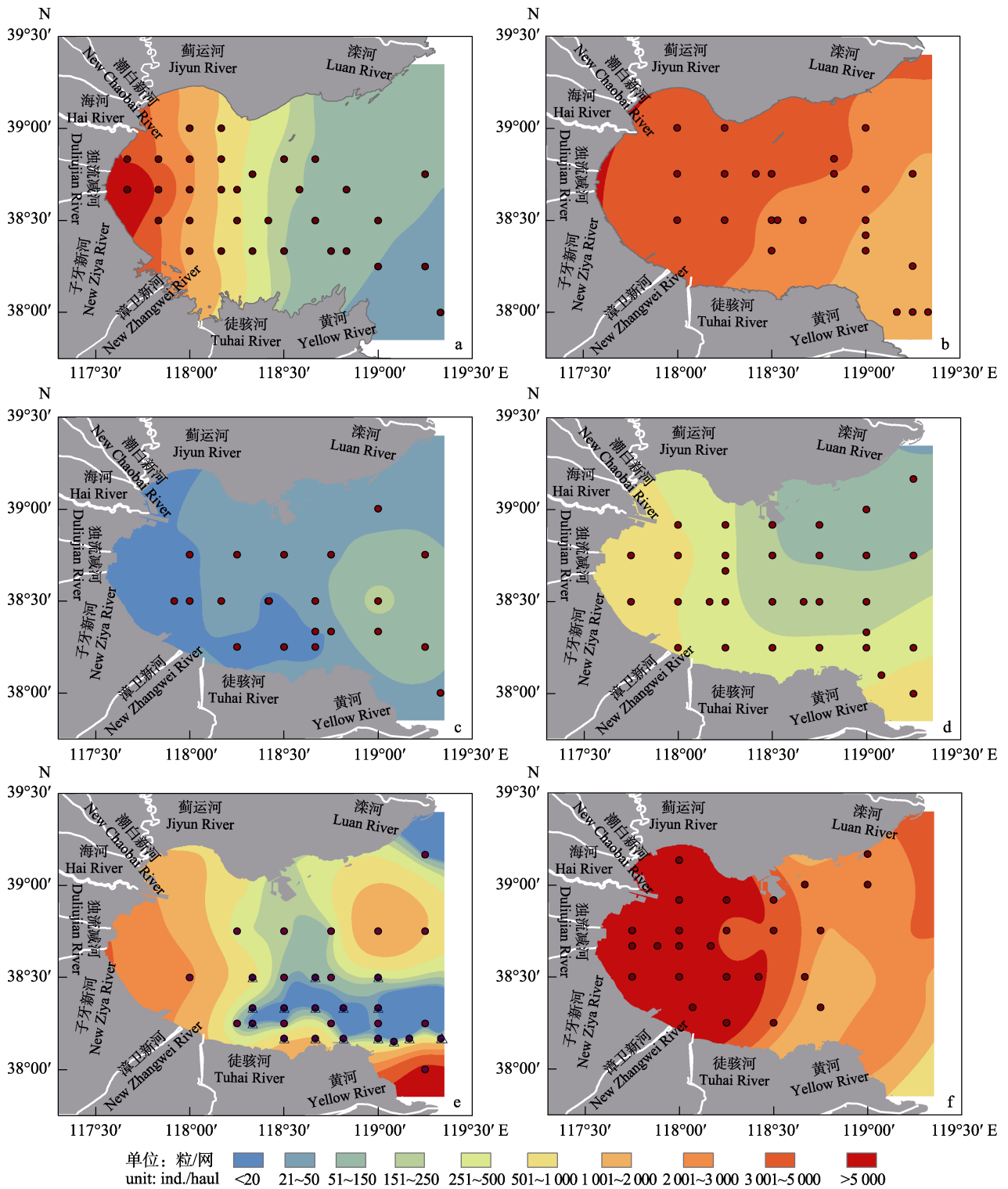


图4 1980s以来渤海湾各调查时期鱼卵生态密度分布

Fig.4 Variation of the distribution patterns to the spawning ground of fish in the Bohai Bay since the 1980s

a: 1980s; b: 1990s; c: 2000s to pre-2010s; d: mid2010s; e: late 2010s; f: early 2020s

鱼、斑鲽和CBD鱼类鲮(*Planiliza haematocheilus*)及暖水性CRA鱼类鲮(*Platycephalus indicus*); 1990s前期更替为鲮, 1990s后期为鲮、斑鲽和暖水性CPN鱼类赤鼻棱鲮; 2000s—2010s初期年间变动比较剧烈,

2004年为暖水性CBD鱼类小带鱼(*Eupleurogrammus muticus*)和暖温性CPN鱼类蓝点马鲛, 2013—2014年更替为斑鲽和鲮, 2014—2015年更替为鲮; 2010s中期更替为鲮、鲮、青鳞小沙丁鱼和斑鲽; 2010s后期

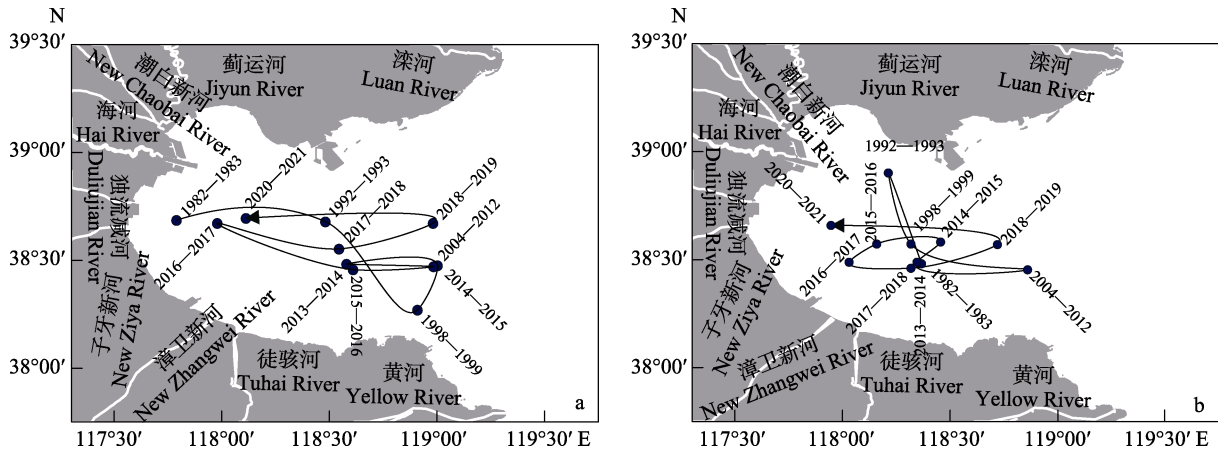


图 5 1980s 以来渤海湾各调查时期(年份)鱼卵(a)和仔稚鱼(b)分布重心迁移图

Fig.5 Migration trend of gravity center of fish eggs (a) and larvae (b) across different survey periods in the Bohai Bay since the 1980s

更替为蓝点马鲛、鲮、斑鲈和鳊；2020s 初又更替为鳊。长期变化上，春夏季优势和重要种类，1980s 为暖温性 CPN 鱼类油鲚(*Sphyraena pinguis*)、小带鱼、斑鲈和暖温性 CD 鱼类短吻红舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)；1990s 初期更替为鳊、后期为鳊、斑鲈和赤鼻棱鳊；2000—2010s 初期又更替为鳊、短吻红舌鲷、暖水性 CBD 鱼类叫姑鱼(*Johnius grypotus*)和赤鼻棱鳊；2010s 中期更替不明显；2010s 后期变为鳊、赤鼻棱鳊、短吻红舌鲷和暖水性 CPN 鱼类黄鲫；2020s 初期更替为赤鼻棱鳊、短吻红舌鲷、小带鱼和青鳞小沙丁鱼(附录 I)。夏季优势和重要种类 1980s 为短吻红舌鲷、暖水性 CBD 鱼类白姑鱼(*Pennahia argentata*)和 CD 鱼类少鳞鳕(*Sillago japonica*)；1990s 初期为短吻红舌鲷，后期为小带鱼、短吻红舌鲷和少鳞鳕；2000—2010s 初期为短吻红舌鲷、少鳞鳕、小带鱼和鳊；2010s 中期以来，主要以短吻红舌鲷和少鳞鳕为优势或重要种类。长期变化，秋季优势和重要种类变化不大，各调查时期暖温性 CRA 鱼类花鲈处于绝对优势或重要地位，仅 1998 和 2009 年暖温性 CD 鱼类半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)和鳊优势度上升成为优势或重要种类(附录 I)。

季节变化上，年内仔稚鱼在春季和春夏季优势和重要种类以暖温性 CPN、CBD 或 CD 鱼类为主，部分年份暖温性 CRA 鱼类花鲈、暖水性 CPN 鱼类赤鼻棱鳊和 CD 鱼类少鳞鳕优势度也较高；夏季暖水性 CPN 和 CD 鱼类优势度逐渐升高并在特定年份上升为优势种类，而暖温性 CPN 和 CD 鱼类仔稚鱼则是多数调查年份优势或重要种类，部分年份暖温性 OEP 鱼类尖嘴扁颌针鱼(*Strongylura anastomella*)优势度较高，为重要种类；秋季优势种年间变化较大，主要以暖温性 CRA 鱼类为主，部分时期暖温性或暖水性

CPN 鱼类及暖温性 CD 鱼类优势度较高；冬季以冷温性的 CD 鱼类为主，部分年份暖温性 CRA 鱼类花鲈或 CPN 鱼类沙氏下鱚(*Hyporhamphus sajori*)优势度较高，为优势或重要种类(附录 II)。长期变化上，春季仔稚鱼优势和重要种类自 1980s 至 2010s 初，暖温性小型 CPN 鱼类优势度呈下降趋势，暖温性小型 CD 和 CBD 鱼类优势度上升，至 2020s 初，暖温性小型 CPN 鱼类优势度略有恢复；春季仔稚鱼优势种类在 1980s—1990s 末期变化较大，由 1980s 的鳊变为 1990s 初期的花鲈和 1990s 末期的暖温性 CD 鱼类矛尾复鰕虎鱼(*Acanthogobius hasta*)；自 2000s—2010s 末期均为暖温性 CBD 鱼类鲮，2020s 初期又变为斑鲈(附录 II)。长期变化上，春夏季仔稚鱼优势和重要种类变动趋势类春季，1980s 至 2010s 中期，小型 CPN 鱼类优势度降低，暖温性小型 CD 和 CBD 鱼类优势度上升，特别是 1990s 至 2010s 中期，隶属于暖温性 CD 鱼类的各类鰕虎鱼仔稚鱼如矛尾鰕虎鱼(*Chaeturichthys stigmatias*)、矛尾复鰕虎鱼和六丝钝尾鰕虎鱼(*Amblychaeturichthys hexanema*)等优势度明显上升，成为优势或重要种类；自 2010s 中期开始，渤海湾小型 CPN 鱼类优势度显著增高(附录 II)。长期变化上，夏季 1980s—1990s 末期无明显优势种类出现，1980s 的重要种组成为尖嘴扁颌针鱼、少鳞鳕、赤鼻棱鳊、斑鲈和青鳞小沙丁鱼，1990s 初期油鲚阶段性迁入渤海湾成为重要种类，至 1990s 末期鰕虎鱼属鱼类优势度上升成为重要种类；自 2010s 初期开始，优势种显现，特别是产具卵膜丝卵的沙氏下鱚和暖水性 CPN 鱼类白氏银汉鱼(*Hypoatherina valenciennei*)等仔稚鱼优势度显著上升，成为各调查时期的优势或重要种类；自 2010s 中期以来，青鳞小沙丁鱼和鳊交替为渤海湾夏季仔稚鱼优势种类(附录 II)。长期变化上，

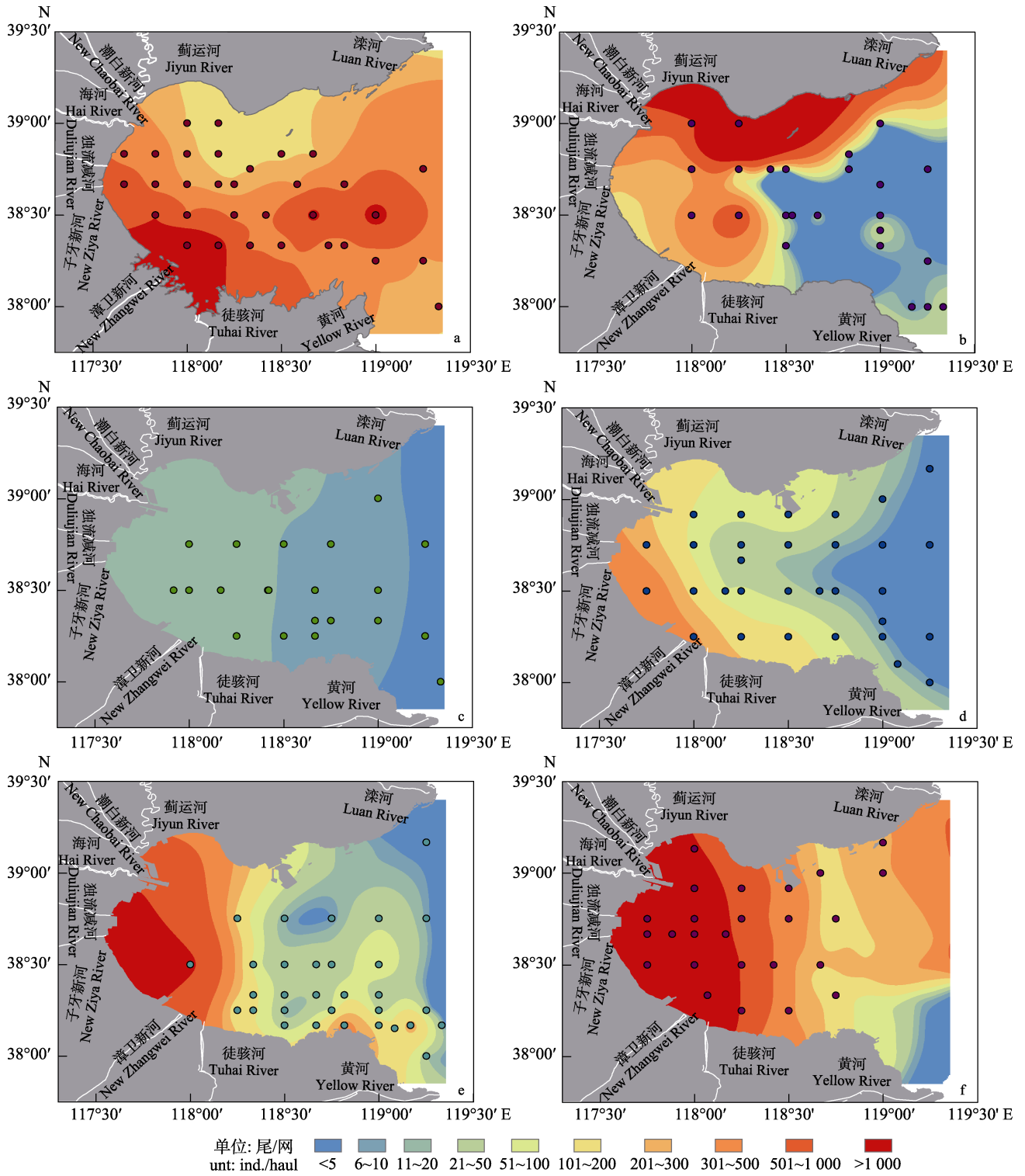


图6 1980s 以来渤海湾各调查时期仔稚鱼生态密度分布
Fig.6 Variation of the distribution patterns to the nursing areas of fish in the Bohai Bay since the 1980s
a: 1980 s; b: 1990s; c: 2000 s to pre-2010 s; d: mid2010s; e: late2010s; f: early 2020s

渤海湾秋季仔稚鱼优势和重要种类年间和年代际更替明显, 除 1990s 末期和 2010s 初外, 花鲈均为各调查时期优势或重要种类; 1982—1983 年少鳞鳕、2014—2015 和 2018—2019 年暖水性 CPN 鱼类如中颌

棱鲛(*Thryssa mystax*)、赤鼻棱鲛和白氏银汉鱼等则为相应调查年份秋季重要种类(附录 II)。长期变化上, 1980s—1990s 末期, 冬季仔稚鱼优势和重要种类年间变动显著, 由 1980s 的花鲈变为 1990s 初期冷温性

CD 鱼类大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)和 1990s 后期的冷温性 CD 鱼类玉筋鱼(*Ammodytes personatus*), 自 2013—2014 年开始, 除 2018—2019 年外, 冷温性 CD 鱼类方氏云鳎(*Pholis fangi*)均为各调查年份优势种类(附录 II)。

2.5 渤海湾鱼卵、仔稚鱼物种多样性水平的季节变化和年代际变化

多轮周年调查显示, 渤海湾鱼卵 H' (因鱼卵 D_S 变动趋势类 H' , 文中仅就 H' 展开分析) 季节变化明显 (Kruskal-Wallis 单因素方差分析 Kruskal-Wallis H -test for one-way ANOVA, $H_{(4, n=55)}=37.62, P<0.001$; 各季均值比较 $\chi^2=36.08, df=4, P<0.001$)。表现为 H' 在增温期的春季和春夏季较高并呈上升趋势, 年内最高值出现在春夏季; 夏季 H' 开始下降, 降温期秋季较低, 冬季均未采集到过浮性鱼卵(图 7a)。春季鱼卵 H' 均值为 0.86 ± 0.49 ($n=11$), 春夏季为 1.06 ± 0.48 ($n=11$) 最高, 夏季为 0.83 ± 0.24 ($n=11$) 再次, 秋季最低 0.18 ± 0.25 ($n=11$)。因鱼卵 H' (图 8a) 与 D_S (图 8b) 变动趋势基本一致, 本文将仅讨论 H' 变动, D_S 变动趋势这里不再赘述。长期变化上, 春季鱼卵 H' 年间剧烈波动, 在 $0.01\sim 1.49$ 区间, 2014—2015 年最低, 2017—2018 年最高(图 8a); H' 高值点在 1998—1999、2013—2014 和

2017—2018 年; 低值点在 1992—1993、2014—2015 和 2018—2019 年。1998—2015 年 H' 逐年下降, 由 1998—1999 年的 1.18 降至 2014—2015 年的 0.01; 2015—2018 年又逐步升至历史高值 1.49。春夏季鱼卵 H' 年间呈明显周期波动, 在 $0.32\sim 1.78$ 区间, 2012—2013 年最低, 1982—1983 年最高(图 8a)。 H' 高值点在 1982—1983、1998—1999、2013—2014、2014—2015、2016—2017、2017—2018 和 2020—2021 年; 低值点在 1992—1993、2012—2013、2015—2016 和 2018—2019 年(图 8a)。夏季鱼卵 H' 年间呈先波动上升, 此后又波动下降的变化趋势, 在 $0.38\sim 1.31$ 区间, 2020—2021 年最低, 2014—2015 年最高(图 8a)。 H' 低值点在 1982—1983、2013—2014、2017—2018 和 2020—2021 年。 H' 高值点在 2014—2015 和 2016—2017 年。1982—2015 年 H' 波动上升, 由 1982—1983 年 0.73 升至 2014—2015 年的 1.31; 此后 H' 波动下降至 2020—2021 年仅为 0.38。秋季鱼卵 H' 均较低, 呈先上升后下降而后又上升的变动趋势, 在 $0\sim 0.64$ 区间(图 8a)。2009—2010 年最高, 2013—2014 和 2015—2019 年各年份鱼卵 H' 均为 0。1982—2010 年 H' 处上升期, 由 1982—1983 年的 0.01 升至 2009—2010 年历史高值 0.64; 在 2010s, 除 2014—2015 年 H' 为 0.25 外, 其余各年 H' 均为 0, 2020—2021 年为 0.41(图 8a)。

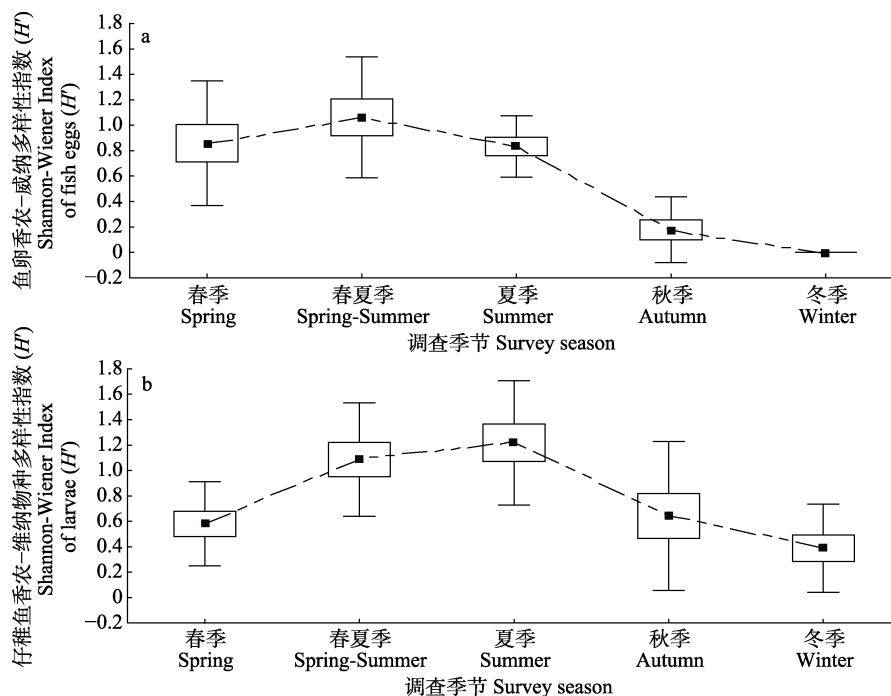


图7 渤海湾鱼卵(a)和仔稚鱼(b)香农-威纳指数(H')季节变化特征箱型图

Fig.7 Box plot of the fish eggs (a) and larvae (b) Shannon-Wiener Index (H') in different seasons

■平均值, □平均值 \pm 标准误, 工平均值 \pm 标准差; 数据源自表1中所列自1980s来11个周期鱼卵仔稚鱼调查, $n=11$ 。

■ Mean, □ Mean \pm SE, 工 Mean \pm SD; Data based on 11 round ichthyoplankton surveys carried out in the Bohai Bay since the 1980s listed in Tab.1, $n=11$.

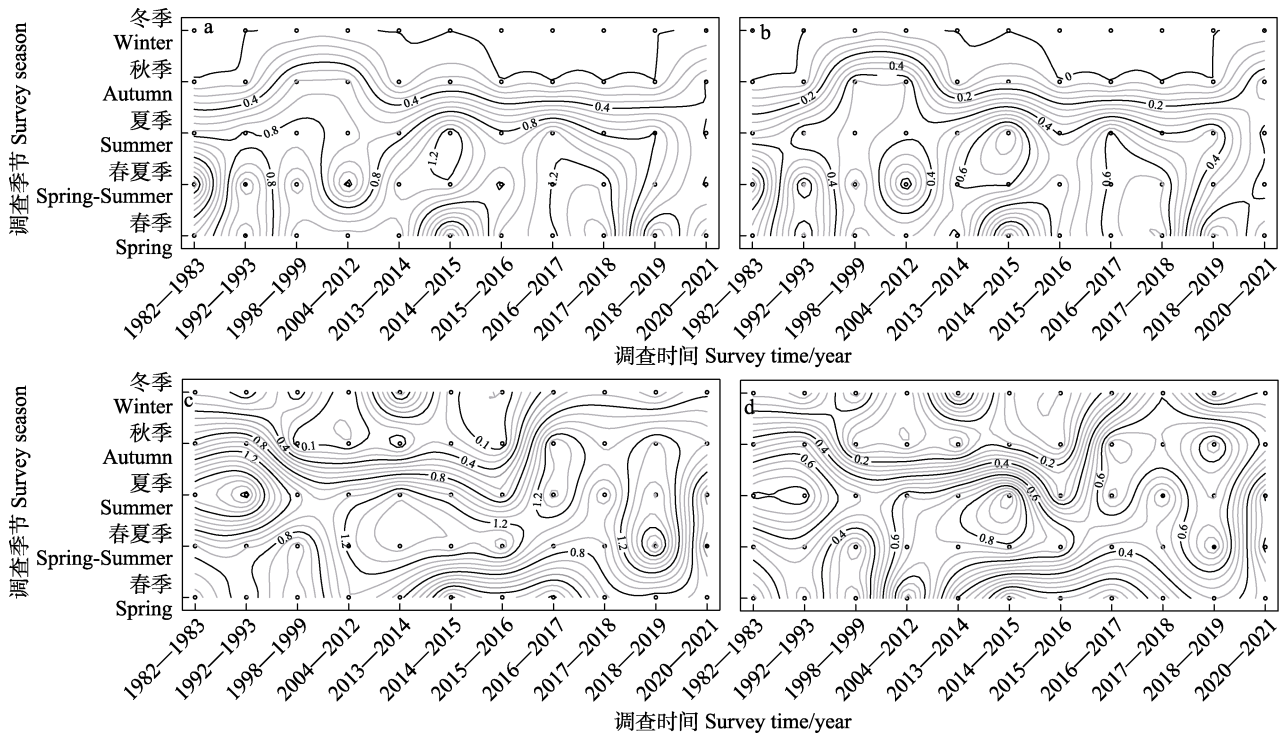


图8 渤海湾各调查时期不同季节鱼卵和仔稚鱼香农-威纳和辛普森多样性指数

Fig.8 Shannon-Wiener and Simpson's diversity index of fish eggs and larvae profiles along the survey season across different survey times in the Bohai Bay

a 和 c 分别为鱼卵和仔稚鱼香农-威纳指数; b 和 d 分别为鱼卵和仔稚鱼辛普森多样性指数
Shannon-Wiener index of eggs (a) and larvae (c); Simpson's diversity index of eggs (b) and larvae (d)

渤海湾仔稚鱼 H' (因仔稚鱼 D_s 变动趋势类 H' , 文中仅就仔稚鱼 H' 展开分析) 季节变化显著 (Kruskal-Wallis H -test for one-way ANOVA, $H_{(4, n=55)} = 18.6, P < 0.001$; 各季均值比较 $\chi^2 = 16.44, df = 4, P < 0.01$)。表现为 H' 在升温期的春季和春夏季逐次升高, 至夏季升至年内峰值; 在降温期秋季下降, 冬季进一步降至年内谷值 (图 7b)。春季仔稚鱼 H' 为 0.58 ± 0.33 ($n=11$), 春夏季升至 1.09 ± 0.45 ($n=11$), 夏季达年内高值 1.22 ± 0.49 ($n=11$), 秋季降至 0.64 ± 0.59 ($n=11$), 至冬季仔稚鱼 H' 最低 0.39 ± 0.35 ($n=11$) (图 7b)。因仔稚鱼 H' (图 8c) 与 D_s (图 8d) 变动趋势基本一致, 本文 will 仅讨论仔稚鱼 H' 变动。长期变化, 春季渤海湾仔稚鱼 H' 年间剧烈波动, 在 $0.09 \sim 1.09$ 区间, 2004—2005 年最高, 2016—2017 年最低。 H' 呈先上升后下降而后又上升的变动趋势 (图 8c), 高值点在 1992—1993 和 2004—2005 年; 低值点在 2014—2015 和 2016—2017 年。1982—2005 年 H' 波动上升, 由 1982—1983 年的 0.54 上升至 2004—2005 年的 1.09; 2005—2017 年 H' 波动下降至历史低值 0.05; 2010s 后期始 H' 逐渐上升, 至 2020—2021 年为 0.63。春夏季 H' 年间剧烈波动, 在 $0.39 \sim 1.89$ 区间, 2018—2019 年最高, 2020—2021 年

最低。 H' 呈先降后升、再降又升随后又下降变动趋势, 1982—1999 年 H' 呈下降趋势, 1999—2016 年波动上升, 近年来波动加剧, 2017—2018 年急剧下降, 随后 2018—2019 又升至历史高值, 而 2020—2021 年又跌至历史谷值 (图 8c)。夏季仔稚鱼 H' 呈先下降随后周期性波动趋势, 在 $0.45 \sim 2.07$ 区间 (图 8c)。1992—1993 年最高, 2020—2021 年最低。1982—1999 年 H' 呈下降趋势, 由 1982—1983 年 1.78 降至 1998—1999 年 1.15; 随后 H' 呈周期性波动, 高值点在 2013—2014、2016—2017 和 2018—2019 年, 低值点在 2015—2016、2017—2018 和 2020—2021 年。秋季 H' 波动剧烈, 呈先下降后上升的变动趋势, 为 $0 \sim 1.4$ (图 7c), 2016—2017 年最高, 1998—1999、2009—2010 和 2013—2014 年均为零。1982—2014 年 H' 呈下降趋势, 由 1982—1983 年 0.85 和 1992—1993 年 1.02 降至 0; 随后自 2014—2015 年开始, H' 由 0.27 升至 2016—2017 年 1.40 历史高值, 近年来一直维持在 1.0 以上。冬季 H' 年间波动剧烈, 在 $0 \sim 0.99$ 区间, 2013—2014 年最高, 1992—1993 年和 2015—2016 年均为 0。自 1982—2016 年, H' 由 1982—1983 年的 0.17 波动变为 2015—2016 年的 0; 此后, 2016—2020 年在 $0.23 \sim 0.60$ 区间小幅振动 (图 8c)。

2.6 近40年来渤海湾鱼类早期资源种类更替

渤海湾各调查时期鱼类早期资源种类更替现象明显。1982—1983年与1992—1993年、2020—2021年鱼类早期资源物种组成CC值位于0.50~0.75区间,群落间物种组成中等相似;而与1998—1999、2004—2012、2013—2019年各年CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似(表2)。1992—1993年与1982—1983年和1998—1999年CC值位于0.50~0.75区间,群落间物种组成中等相似;与其余年份CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似(表2)。1998—1999与1992—1993和2017—2018年CC值位于0.50~0.75区间,群落间物种组成中等相似;与其余调查年份CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似(表2)。2004—2012与2013—2014、2015—2019年CC值位于0.50~0.75区间,中等相似;而与其调查年份CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似。2013—2014年与2004—2012、2014—2018年各年CC值位于0.50~0.75区间,中等相似;而与其调查年份CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似(表2)。2014—2015年与1982—1983、1992—1993、

2004—2012、2017—2018和2020—2021年CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似(表2);而与其调查年份CC值位于0.50~0.75区间,中等相似(表2)。2015—2016年与1982—1983、1992—1993和1998—1999年CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似,而与其调查年份CC值位于0.50~0.75区间,中等相似(表2)。2016—2017年与1982—1999年间各调查年份CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似;而与其调查年份CC值位于0.50~0.75区间,中等相似(表2)。2017—2018年与1982—1983、1992—1993和2014—2015年CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似;而与其调查年份CC值位于0.50~0.75区间,中等相似。2018—2019年与1982—1983、1992—1993和2013—2014年各年份CC值位于0.25~0.50区间,中等不相似,而与其调查年份CC值位于0.50~0.75区间,中等相似(表2)。群落间物种组成年间相似性程度由大到小排序为1998—1999、1982—1983、1992—1993、2020—2021、2015—2016、2018—2019、2016—2017、2017—2018、2004—2012、2013—2014、2014—2015年。

表2 不同调查时期渤海湾鱼类早期资源物种组成年间 β 相似性指数矩阵

Tab.2 Matrix of the β similarity index (CC) of species composition to the ichthyoplankton community in the Bohai Bay between different survey periods

| 调查时间 Survey time | 1982— 1983 | 1992— 1993 | 1998— 1999 | 2000— 2012 | 2013— 2014 | 2014— 2015 | 2015— 2016 | 2016— 2017 | 2017— 2018 | 2018— 2019 | 2020— 2021 |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1982—1983 | | 0.63 | 0.49 | 0.42 | 0.40 | 0.36 | 0.44 | 0.45 | 0.45 | 0.44 | 0.52 |
| 1992—1993 | 0.63 | | 0.59 | 0.43 | 0.45 | 0.37 | 0.43 | 0.40 | 0.38 | 0.44 | 0.42 |
| 1998—1999 | 0.49 | 0.59 | | 0.44 | 0.41 | 0.41 | 0.43 | 0.43 | 0.50 | 0.52 | 0.45 |
| 2004—2012 | 0.42 | 0.43 | 0.44 | | 0.53 | 0.43 | 0.55 | 0.54 | 0.54 | 0.53 | 0.38 |
| 2013—2014 | 0.40 | 0.45 | 0.41 | 0.53 | | 0.55 | 0.52 | 0.60 | 0.51 | 0.43 | 0.49 |
| 2014—2015 | 0.36 | 0.37 | 0.41 | 0.43 | 0.55 | | 0.57 | 0.56 | 0.47 | 0.52 | 0.49 |
| 2015—2016 | 0.44 | 0.43 | 0.43 | 0.55 | 0.52 | 0.57 | | 0.71 | 0.65 | 0.74 | 0.57 |
| 2016—2017 | 0.45 | 0.40 | 0.43 | 0.54 | 0.60 | 0.56 | 0.71 | | 0.72 | 0.63 | 0.57 |
| 2017—2018 | 0.45 | 0.38 | 0.50 | 0.54 | 0.51 | 0.47 | 0.65 | 0.72 | | 0.70 | 0.67 |
| 2018—2019 | 0.44 | 0.44 | 0.52 | 0.53 | 0.43 | 0.52 | 0.74 | 0.63 | 0.70 | | 0.59 |
| 2020—2021 | 0.52 | 0.42 | 0.45 | 0.38 | 0.49 | 0.49 | 0.57 | 0.57 | 0.67 | 0.59 | |

2.7 40年来渤海湾主要鱼类鱼卵资源丰度指数变动

1982—2021年研究的7种渤海湾鱼类鱼卵EDN-ELH存在明显的此消彼长现象。如果1982—1983年各鱼种鱼卵资源丰度指数为1,那么此后鳀卵EDN-ELH变动为0.92~65.37倍,黄鲫卵为1~3.24倍,蓝点马鲛卵为1~2.44倍,赤鼻棱鳀卵为1~2.24倍,斑鲆卵为0.44~1倍,青鳞小沙丁鱼卵为0.48~1.75倍,

花鲈卵为0.41~1倍。变动幅度最大的为鳀,其次为黄鲫、蓝点马鲛、青鳞小沙丁鱼、赤鼻棱鳀、花鲈和斑鲆。40年来,鱼卵EDN-ELH明显降低的为斑鲆、青鳞小沙丁鱼和花鲈;明显升高的为蓝点马鲛、黄鲫、赤鼻棱鳀;鳀波动剧烈且呈升高趋势(图9)。鳀EDN-ELH在1992—1993年达历史峰值65.37倍,此外,除2016—2017和2017—2018年AI低于1982—1983年外,其余年份均高于1982—1983年;其中,2015—2016年和

2020—2021年为鳀高发年份,历史低值在2016—2017年(图9)。黄鲫历史低值在1982—1983年,在1992—1993年达历史峰值3.24倍;1992—2021年间呈先下降后波动上行趋势,至2020—2021年达次高值1.81倍。蓝点马鲛AI历史低值在1982—1983年,历史峰值在2017—2018年为2.44倍;1992—1993年AI较1982—1983年显著升高,此后1998—2015年间蓝点马鲛AI处在相对较低区间,自2016—2021年明显上升(图9)。赤鼻棱鳀AI历史低值在1982—1983年,历史峰值在2016—2017年,为1.81倍;自1982—1999年间呈上升趋势,1999—2014年呈下降趋势,2014—2017年呈明显上升趋势,而后又逐年下降,至2020—2021年为1.08倍(图9)。斑鲮历史峰值在1982—1983年,1998—1999、2013—2014和2016—2017年为相对高点;历史低值在2015—2016年仅0.48倍(图9)。青鳞小沙丁鱼历史峰值在1992—1993年,为1.75倍,历史低值在2015—2016年,仅0.47倍;1982—1993年升至历史峰值,而后至1998—1999年急剧下降,自1999—2014年处在低值区间,2017—2020年间微弱上升(图9)。花鲈历史峰值在1982—1983年,历史低值在2016—2017,仅0.41倍;自1992—2021年在低值区间内波动(图9)。

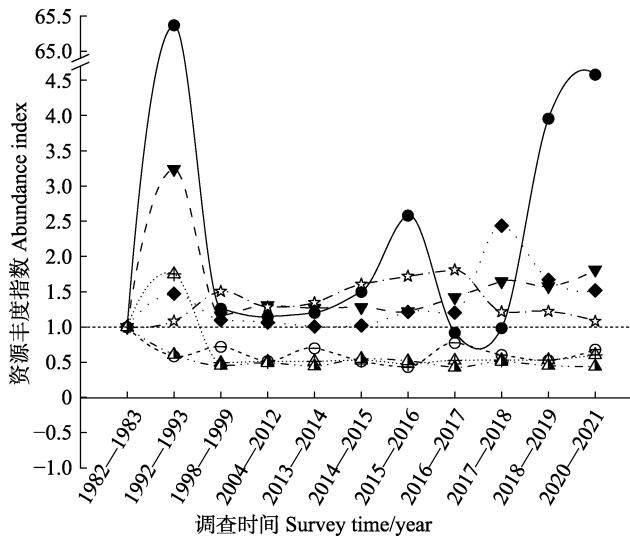


图9 1980s来渤海湾主要鱼类鱼卵资源丰度指数变动
Fig.9 Eggs abundance index of the main fish in the Bohai Bay since the 1980s

○—斑鲮、△—青鳞小沙丁鱼、●—鳀、☆—赤鼻棱鳀、▼—黄鲫、◆—蓝点马鲛、▲—花鲈。
○—*Konosirus punctatus*, △—*Sardinella zunasi*,
☆—*Thryssa kammalensis*, ●—*Engraulis japonicas*,
▼—*Setipinna tenuifilis*, ◆—*Scomberomorus niphonius*
and ▲—*Lateolabrax maculatus*.

2.8 亲体产卵、栖息和适温类型种数年代际变化

近40年来,不同调查时期渤海湾鱼类亲体各产卵类型种数均以产浮性卵种数最高,其次为产附着性卵、产黏着沉性卵和卵胎生鱼类,产凝集浮性卵鱼类仅在2020—2021年出现(图10)。长期变化上,产浮性卵鱼类种数呈先下降后上升的变动趋势,种数由1982—1983年29种降至2014—2015年13种,2010s中期始种数逐渐增加,至2020—2021年升至20种;产附着性卵鱼类种数增加趋势比较明显,自1980s至2010s初期保持稳定在4~6种,自2010s中期始种数逐渐上升保持在9~12种,至2020—2021年为10种;产黏着沉性卵鱼类呈现微弱先降后升变动趋势,由1982—1983年3种降至2004—2012年的0种,此后波动上升,至2020—2021年为4种;卵胎生鱼类种数一直维持在1~3种(图10)。长期变化,产浮性卵鱼类种数百分占比在各调查时期呈微弱先上升后波动下行的趋势,由1982—1983年的74.36%变为2004—2012年的77.27%,此后,降至55%~61.9%,2020—2021年为历史低值55%;产附着性卵鱼类百分占比呈明显上升趋势,由1982—1983年的12.82%升至2015—2016年的历史高值34.62%,2020—2021年为25%,百分占比升高1倍;产黏着沉性卵鱼类百分占比呈先下降后上升的变动趋势,由1982—1983年7.69%降至2004—2012年0,此后升至2020—2021年10%(图10)。

40余年来,各调查时期渤海湾鱼类亲体栖息类型种数均以CD种数最高,其次为CPN、CBD、CRA鱼类,OEP种数年间波动较大,OMP鱼类仅在2020—2021年出现(图11)。长期变化上,CD和CBD鱼类种数及其种数百分占比均呈先下降后上升的变动趋势。1982—2015年CD和CBD鱼类种数由1982—1983年27种降至2014—2015年11种,种数百分占比也由1982—1983年最高69.23%降至2014—2015年的52.38%;此后,CD和CBD种数逐步上升,至2020—2021年为26种,种数百分占比升至65%(图11)。长期变化上,CPN鱼类种数保持相对稳定,除1990s为11种外,其余调查年份均在7~10种之间。CPN鱼类种数百分占比则呈先上升后下降的变动趋势,1982—1993年CPN鱼类种数百分占比由1982—1983年的20.51%升至1992—1993年峰值36.67%;1993—2015年CPN鱼类种数百分占比均在30%以上(2013—2014年除外,为29.17%);从2010s中后期开始,CPN鱼类种数百分占比降至25%~27.27%区间,2020—2021年为25%(图11)。长期变化上,CRA鱼类种数

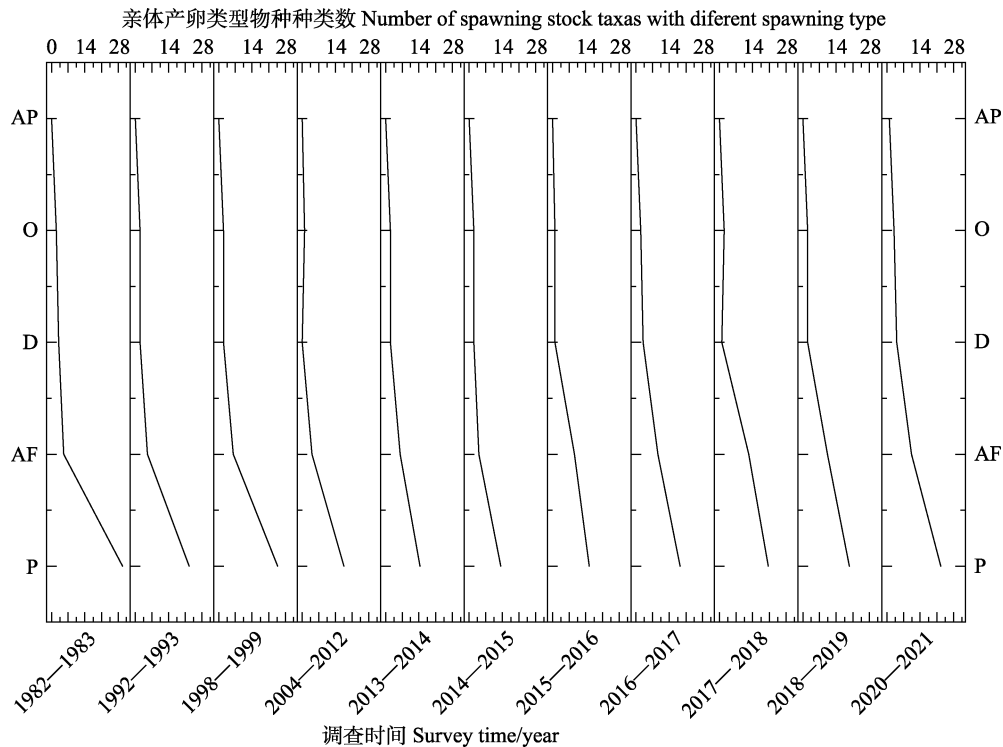


图 10 1980s 以来渤海湾不同调查时期亲体产卵类型年间种数比较

Fig.10 Comparison of the number of taxa in different spawning adaptation type of the spawning stock in the Bohai Bay between different survey periods since the 1980s

P: 产浮性卵鱼类; AF: 产附着性卵鱼类; D: 产黏着沉性卵鱼类; O: 卵胎生鱼类; AP: 产凝集浮性卵鱼类。
P: Pelagic egg; AF: Egg with adhesive filaments; D: Demersal egg; O: Ovoviviparity; AP: Agglutinative pelagic egg.

2 种左右, 基本保持稳定(1992—1993 和 2015—2016 年除外, 仅 1 种); OEP 鱼类[尖嘴扁颌针鱼和麒麟(Coryphaena hippurus)]年间波动较大; OMP 种类[黄鲛鲷(*Lophius litulon*)]仅出现在 2020—2021 年 5 月调查中(图 11)。

不同调查时期渤海湾鱼类亲体适温类型以 WT 鱼类最高, WW 鱼类种数次之, CT 鱼类种数最低, 没有出现 CW 鱼类(图 12)。长期变化, WT 和 WW 鱼类种数均呈先下降后上升的变动趋势, 种数分别由 1982—1983 年 26 种和 10 种降至 2014—2015 年的 12 种和 7 种, 此后种数逐渐上升, 至 2020—2021 年分别为 27 种和 11 种; CT 种数则一直在 1~3 种的较低区间。长期变化上, 不同适温类型百分占比在各调查时期保持相对稳定, WT 鱼类百分占比在各调查时期均超过 55%, 2018—2019 年最高为 69.70%, 2014—2015 年最低为 57.14%, 除 1992—1993、1998—1999 和 2014—2015 年外, WT 值均在 65% 以上; WW 鱼类百分占比为 25%~33%, 2013—2014 年最低为 25%, 2014—2015 年最高为 33.33%, WW 鱼类百分占比高值在 1992—1993、1998—1999、2004—2012 和 2017—2018 年, 低值在 1982—1983、2013—2014 和 2020—

2021 年(图 12); CT 鱼类百分占比为 2.9%~9.5%, 1998—1999 年最低为 2.9%, 2014—2015 最高为 9.5%, 高值在 1982—1983、2013—2014、2014—2015 和 2016—2017 年, 低值在 1998—1999 和 2017—2018 年(图 12)。

3 讨论

渔业种群早期生活史阶段是其生命周期中最脆弱、对栖息环境变化敏感性最强的阶段, 小规模环境变化也可能会对资源补充过程产生剧烈影响(Houde, 1987)。鱼类早期资源的存活和数量是渔业资源补充和可持续利用的基础(Houde, 1987), 同时也是海洋环境变化的敏感指标(Nielsen *et al.*, 2021)。挪威著名鱼类学家 Hjort (1914) 在 20 世纪初期提出了渔业资源评估最早的三个学说之一“波动论”, 认为环境条件波动是形成鱼类世代强弱的主要原因。自 Hjort (1914) 的开创性研究以来, 因对渔业种群动态的有限认知限制了人们做出有效渔业管理的能力, 鱼类补充机制研究一直为渔业资源学研究热点(Somarakis *et al.*, 2019)。近年来, 许多研究也表明, 捕捞活动可加剧渔业种群数量波动(Hsieh *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2008), 同时, 全球气候变暖背景下主导渔业种群数量波动的环

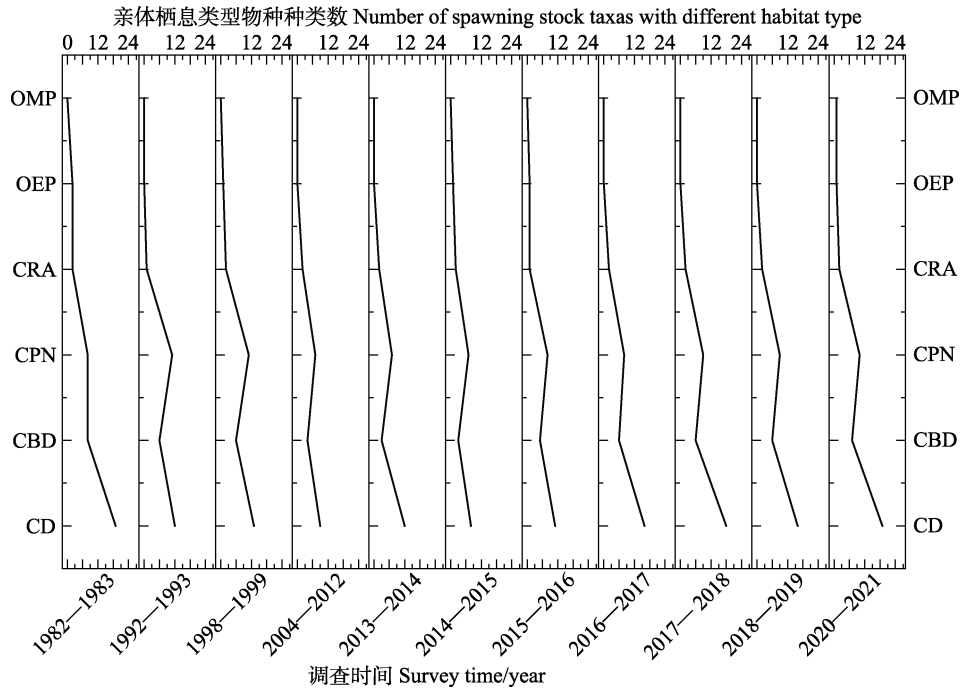


图 11 1980s 以来渤海湾不同调查时期亲体各栖息类型年间种数比较

Fig.11 Comparison of the number of taxis in different habitat type of the spawning stock in the Bohai Bay between different survey periods since the 1980s

CD: 大陆架浅水底层鱼类; CBD: 大陆架浅水中底层鱼类; CPN: 大陆架浅水中上层鱼类; CRA: 大陆架岩礁性鱼类;
 OEP: 大陆架大洋洄游性中上层鱼类; OMP: 大洋深水底层鱼类。
 CD: Continental shelf demersal fish; CBD: Continental shelf benthopelagic fish; CPN: Continental shelf pelagic-neritic fish;
 CRA: Continental shelf reef-associated fish; OEP: Oceanic pelagic fish; OMP: Oceanic bathydemersal fish.

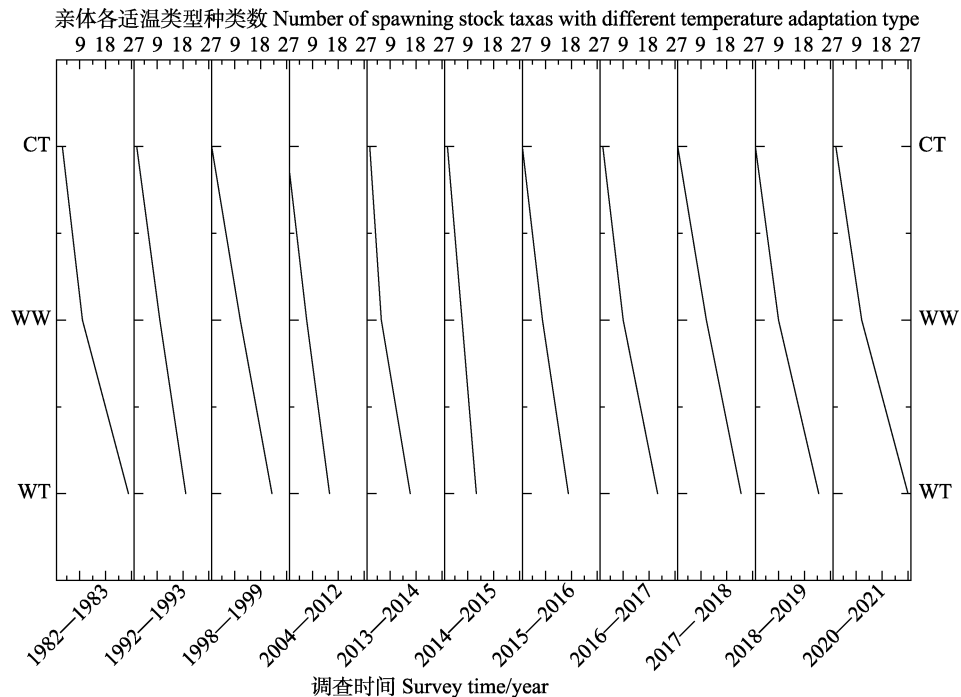


图 12 1980s 以来渤海湾不同调查时期亲体适温类型年间种数比较

Fig.12 Comparison of the number of taxis in different temperature adaptation type of the spawning stock in the Bohai Bay between different survey periods since the 1980s

CT: 冷温种; WW: 暖水种; WT: 暖温种。
 CT: Cold temperate species; WW: Warm water species; WT: Warm temperate species.

境驱动因子也常会发生转变(Rijnsdorp *et al*, 2009, Pörtner *et al*, 2010), 但要将其与气候变化两方面影响剥离非常困难。渤海湾历史上为多种鱼类如小黄鱼(*Larimichthys polyactis*) (夏世福, 1960; 刘效舜, 1960; 邱道立等, 1965; 朱崇俭等, 1965)、花鲈(吴光宗等, 1983; 万瑞景等, 1988)、半滑舌鳎(杨东莱等, 1984; 姜言伟等, 1988)、斑鲆和青鳞小沙丁鱼(孔立波等, 1996), 虾类如中国对虾(*Penaeus orientalis*) (邓景耀, 1960、1980; 邓景耀等, 1983)和中国毛虾(*Acetes chinensis*) (辽宁省海洋水产研究所和河北省海洋水产研究所, 1961; 冯志青等, 1982、1987; “渤海湾、莱州湾毛虾适宜捕捞期的研究”课题组, 1992), 蟹类如三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (邓景耀等, 1988)和口足类如口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*) (邓景耀等, 1988; 谷德贤等, 2018)等产卵场和其幼体主要索饵场。1980s, 渤海湾为整个渤海卵子密度最大、产卵持续时间最长的海域(姜言伟等, 1988)。近40年来在过度捕捞、栖息地衰退和碎片化等共同作用下, 渤海湾固有产卵场和索饵育肥场功能退化, 一些重要渔业种群产卵场、索饵育肥场等栖息地丧失或发生变迁。

3.1 渤海湾鱼类早期资源结构的时间序列变化特征

渤海湾鱼类以产浮性卵鱼类种数出现频率最高, 其次为产附着性卵、产黏着沉性卵和卵胎生鱼类, 偶见产凝集浮性卵鱼类; 亲体栖息类型均以大陆架浅水底层鱼类种数最高, 其次为大陆架浅水中上层、大陆架浅水中底层和大陆架岩礁性鱼类, 大陆架大洋洄游性中上层鱼类种数年间波动较大, 偶见大洋深水底层鱼类; 亲体适温类型以暖温性鱼类种数最高, 暖水性鱼类次之, 冷温性鱼类种数最低。各调查时期鱼类早期资源的种类组成、优势种类、物种多样性水平和资源丰度等呈明显季节更替。鱼类产卵季节集中在5—8月升温阶段, 5、6月进入渤海湾以产浮性卵为主的性成熟鱼类相继产卵, 形成全年产卵高峰; 7、8月水温全年最高, 多数种类产卵期已过, 鱼卵种类和数量明显减少, 且由于沿岸河流入海径流流量增加, 渤海湾盐度下降明显, 有些已经在近岸浅水区开始或即将产卵种类移向渤海湾口部和外部(姜言伟等, 1988); 10月湾内水温迅速下降, 大多数洄游性种类相继游出渤海湾, 整个调查海区鱼卵种类和密度均较低分布; 11月至翌年3月, 只有少数地方性(移动距离较短一般不洄游出渤海) (唐启升等, 1990; 邓景耀, 1988)产黏着沉性卵种类。小型CPN鱼类如斑鲆、青鳞小沙丁鱼、鲉、赤鼻棱鲉、黄鲫、中颌棱鲉、沙氏

下鱈和白氏银汉鱼等; 小型地方性CD和CBD鱼类, 如矛尾鰕虎鱼、六丝钝尾鰕虎鱼、大银鱼(*Protosalanx hyalocranium*)、短吻红舌鳎、方氏云鳎和少鳞鳎等; 大型地方性CD和CRA鱼类如鲰、半滑舌鳎、花鲈和鲮等为渤海湾各调查时期鱼类早期资源的主体成分。自1990s起, 春季蓝点马鲛卵优势度显著提升, 并在某些年份成为优势种类。有别于相邻莱州湾水域(卞晓东等, 2022b), 渤海湾鱼卵 H' 均值在春夏季为年内最高值期, 春季次之, 夏季再次, 秋季最低, 冬季调查海区无浮性卵子分布; 仔稚鱼 H' 均值在升温期的春季和春夏季逐次升高, 夏季升至年内峰值, 在降温期秋季下降, 冬季最低。而莱州湾水域鱼卵 H' 在春季最高, 春夏季次之, 夏季为再次, 秋季最低; 仔稚鱼 H' 春夏季达年内高值, 夏季次之, 春季再次, 冬季次低、秋季为年内最低。各调查季节渤海湾鱼卵 H' 与莱州湾鱼卵 H' 无明显差异[春季莱州湾(下同) $H'=0.95\pm 0.63(n=11)$, Mann-Whitney U Test, $U=52$, $P>0.05$; 春夏季 $H'=0.91\pm 0.61(n=11)$, $U=46$, $P>0.05$; 夏季 $H'=0.83\pm 0.35(n=11)$, $U=50$, $P>0.05$; 秋季 $H'=0.15\pm 0.24(n=11)$, $U=57.5$, $P>0.05$]。渤海湾仔稚鱼 H' 在春季明显低于莱州湾[莱州湾仔稚鱼 $H'=1.12\pm 0.38(n=11)$, Mann-Whitney U Test, $U=14$, $P<0.01$], 而其他季节差异不显著[春夏季 $H'=1.52\pm 0.45(n=11)$, $U=33$, $P>0.05$; 夏季 $H'=1.31\pm 0.49(n=11)$, $U=56$, $P>0.05$; 秋季 $H'=0.64\pm 0.33(n=11)$, $U=55$, $P>0.05$; 冬季 $H'=0.77\pm 0.37(n=11)$, $U=31.5$, $P>0.05$]。2020—2021年调查结果又显示, 渤海湾鱼卵 H' 除6月略高于烟威近岸海域外, 其余春季和夏季均低于烟威近岸海域; 而仔稚鱼 H' 在春、春夏和夏季均低于烟威近岸海域(张雨轩等, 2022b)。渤海湾各鱼种生殖时期对温盐等水文要素适应条件不同, 鱼类早期资源种类、优势种类和物种多样性水平的季节变化主要是不同生活史类型(产卵、适温和栖息类型)鱼类适应栖息地温盐等水文要素变化的结果。

自1980s以来, 渤海湾鱼类早期资源结构处持续更替过程中, 资源丰度呈激烈的年际和年代际波动。渤海湾鱼卵和仔稚鱼种类数和资源丰度整体呈先下降后上升的变动趋势, 均在2010s初期跌至历史低值, 近年来, 特别自2017—2018年以来明显恢复。鱼卵和仔稚鱼种数由1980s的39种, 1990s前期的31种、后期的34种, 2000—2010s初期的22种, 逐次降至2010s前期的21种, 2010s中后期逐步回升, 至2020—2021年已达40种。鱼卵种数和AI均在2014—2015年降至历史低值, 种数不足1980s的50%, AI仅为1980s的20%; 自2010s中期始鱼卵种数和AI值呈现恢复,

至2020—2021年种数约为1980s的80%左右, AI约为彼时的88%。鱼卵AI在不同季节呈现不同的变动趋势, 其中, 春、春夏和夏季均呈先下降后上升的变动趋势, 而秋季则呈显著下降趋势; 相较1980s, 当前鱼卵AI在春季和春夏季与其相当, 夏季呈明显上升趋势, 秋季下降明显。仔稚鱼种数和AI则均在2000—2010s初期降至历史低值, 种数仅为1980s的37%, AI仅25%左右; 自2010s中期开始, 种数和AI呈现明显恢复状态, 至2020—2021年仔稚鱼种数与1980s大致相当, AI则为彼时的1.33倍。仔稚鱼AI在春、春夏和夏季均呈先上升后下降随后波动上升的趋势, 而秋季2013—2014年调查期间仔稚鱼密度极低, 冬季2014—2015、2016—2017和1982—1983年显著高于其他年份; 相较1980s, 春季和春夏季仔稚鱼AI显著升高, 夏、秋、冬季与1980s差异不显著。相较1980s, 至2020—2021年渤海湾出现鱼类早期资源种类数和AI已与其无明显差异, 但鱼类早期资源结构已发生明显变化。40余年来鱼类早期资源年间种类更替率均在26%~64%区间, 即便是相邻年份间种类更替率也高达30%, 且近年来呈明显加快趋势。主要产卵期内同季节鱼类早期资源优势种类更替现象明显, 鱼卵和仔稚鱼 H' 呈年际和年代际剧烈波动。各产卵类型(产附着性卵鱼类除外)、栖息类型、适温类型产卵亲体种数大致呈先下降后上升的变动趋势, 全年综合亲体产卵类型中产浮性卵种数显著下降, 产附着性卵种数则显著升高; 栖息类型中CPN鱼类所占比例升高, CD和CBD鱼类所占比例降低; 适温类型中CT种数自2010s中期以来呈上升趋势。生命周期短、性成熟早、处食物链低端的小型CPN鱼类如鳀、赤鼻棱鳀和黄鲫, 小型CD鱼类如矛尾鰕虎鱼、六丝钝尾鰕虎鱼、黄鳍刺鰕虎鱼(*Acanthogobius flavimanus*)和大颌裸身鰕虎鱼(*Gymnogobius macrognathus*)以及大型的CPN鱼类如蓝点马鲛等AI超过1980s水平。但渤海湾传统经济鱼类如小型CPN鱼类青鳞小沙丁鱼、斑鲈, 大型CRA鱼类如花鲈, 大型CD鱼类如半滑舌鳎等AI较1980s下降明显; 特别是小黄鱼和带鱼等传统底层经济鱼类早期资源虽有出现, 但EDN-ELH极低, 近乎绝迹, 表明渤海湾作为传统经济鱼类的产卵、育幼场所的功能有所下降。

3.2 渤海湾鱼类早期资源密度的空间变化特征

渤海湾虽是半封闭海区, 但它与外海水有着连续而强烈的交换; 以外海高盐水系为主的黄海暖流余脉顺着黄海槽经渤海海峡进入渤海后分为两支, 其中一

支由渤海中部左转流向渤海湾, 并与以沿岸低盐水系为主沿岸流形成逆时针环流(邓景耀等, 1983)。各调查时期渤海湾鱼类产卵场和索饵场一般集中分布于湾中底部两种不同性质海流交汇区亦即两种不同水系混合区, 由于在此区域营养盐较丰富, 饵料生物繁生, 是鱼类繁育后代的良好场所(中华人民共和国黄海水产研究所, 1960)。因渤海湾多数洄游鱼类从越冬场到产卵场进行生殖洄游期间对盐度的适应是一个从高盐区逐渐过渡到低盐区的过程, 当由暖流和沿岸流年际强弱变化及其消长而引起不同水系交汇区位置和盐度发生剧变时, 往往会影响亲体产卵行动从而引起产卵场位置变化(中华人民共和国黄海水产研究所, 1960)。又因自然海域鱼类早期生活史阶段(浮性卵和初孵仔鱼)主营浮游生活, 特别是浮性卵完全没有自主游泳能力, 在风、流、波浪等作用下随波逐流地漂移。渤海湾中底部海水的流动主要由随潮汐周期流动的潮流所构成, 受地形所致, 湾内潮流向基本属东西向(邓景耀等, 1983), 所以各调查时期湾中底部鱼卵等EDN-ELH线排列为顺着东西向潮流近与岸线垂直, 仔稚鱼等EDN-ELH线排列趋势亦然。

1980s, 渤海湾产卵高峰期(5—6月)除鳀、鲷和蓝点马鲛等少数种类在渤海湾口部及外部盐度和透明度较高水域产卵外, 多数种类如优势种斑鲈和青鳞小沙丁鱼等先后进入渤海湾底部受沿岸低盐水系控制浅水河口和附近海区产卵繁殖, 产卵重心位于海河口以南至捷地减河河口以北水深5~13m海区(姜言伟等, 1988)。1990s, 随着黄河(吴德星等, 2004; 东营市水利志编纂委员会, 2003)和海河(雷坤等, 2007)等入海径流激减和黄河经常性断流, 各河口附近入海径流冲淡过程减弱, 低盐区缩小, 受盐度梯度驱动物理潮汐和湾口环流退化并开始转向, 外海高盐水入侵加强, 渤海湾及湾口盐度普遍升高(吴德星等, 2004; 雷坤等, 2007; Wang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2020)。如1961—1996年的35年中, 湾底部受沿岸低盐水系控制塘沽站年平均盐度增加1.9, 湾东南部老黄河口外海表层的低盐区已由高盐区替代(吴德星等, 2004)。相应1990s初期, 适应盐度和透明度较大的鳀(卞晓东等, 2022a)卵子扩大其分布范围至整个渤海湾, 数量在调查中占绝对优势, 而斑鲈和青鳞小沙丁鱼卵子和仔稚鱼数量激减, 仅分别为1980s的12.4%和65.5%(万瑞景等, 1998), 渤海湾产卵重心也外迁至湾中部盐度较高的118°30'E线附近; 1990s后期, 随着黄河和海河等入海径流量进一步下降, 渤海湾密集产卵区已不明显, 产卵重心迁移至湾口东南部老黄河口外海高盐区

域,仍以鳀卵为优势种。进入21世纪,整个2000s,对鱼类产卵繁殖有重要意义的春季(3—5月)黄河年均入海径流量降至历史低值14.87亿 m^3 (水利部黄河水利委员会,2002—2021),湾底部产卵场进一步衰退,鱼卵AI也跌至历史低点(未考虑捕捞因素),产卵适盐和透明度较高的蓝点马鲛优势度上升,产卵重心仍位于湾口部。2010s初期,自2012年起,春季黄河入海径流量回升,渤海湾鱼卵AI仍维持在低位,产卵重心一直在118°30'E线以东湾口部,其中,PDO指数冷位相和春季黄河入海径流量相对充沛的2013—2014年(卞晓东等,2022a)优势种为斑鲈,重心靠近118°30'E线;而PDO指数暖位相和春季黄河入海径流量相对较少的2014—2015年(水利部黄河水利委员会,2002—2021)优势种为鳀,重心偏向湾口部。2010s中期,渤海湾产卵重心也呈激烈年际变化,产卵适温较斑鲈高(产卵期晚)的近岸内湾产卵赤鼻棱鳀(卞晓东等,2022a)扩大其分布范围且优势度上升;尽管2016—2017年春季黄河入海径流量相对较少(水利部黄河水利委员会,2002—2021年),但当年鳀发生量较少,优势种为斑鲈,产卵重心位于118°E以西湾底部;2017—2018年5月,产卵适盐和透明度较高的蓝点马鲛和鲷为优势种类,6月鳀(主要分布于渤海湾119°00'E以东湾口部)和赤鼻棱鳀(主要分布于渤海湾118°35'E以西湾中部)为优势种类,产卵重心位于118°30'E线附近;2018—2019年春季黄河入海径流量为1990s初期以来的最高值(水利部黄河水利委员会,2002—2021),但因调查站位主要布设于118°00'E以东盐度和透明度较大区域(湾底部无站位),当年5、6月调查优势种仍然为鳀。进入2020s,春季黄河入海径流量达48.55亿 m^3 的历史高位(水利部黄河水利委员会,2002—2021),5月鳀为优势种广泛分布于118°00'E线以东湾中部至湾口部海域,赤鼻棱鳀为重要种类分布于118°15'E线以西湾中底部;6月赤鼻棱鳀为优势种主要分布于118°00'E以东海域,全年产卵重心位于118°E线附近。

3.3 渤海湾鱼类早期资源动态变化的“上行控制”因素初析

渤海湾为一个三面环陆的浅水海湾,气象条件对水文要素的变化影响巨大(农业部水产局和农业部黄海区渔业指挥部,1990)、生态环境脆弱,是气候变化影响的敏感区域(自然资源部国家海洋信息中心,2020—2022)。具有激烈年变化的渤海湾水温特点及其各种水文要素在空间分布和时间变化上的特征及规律,在相当大程度上决定了渤海湾产卵场范围大

小、进入产卵场的种类和数量以及鱼类早期资源密度分布。水温和盐度是影响海洋硬骨鱼类早期资源发育和存活的2个最主要的环境因子(Bunn *et al.*, 2002),水温控制鱼类生理生化进程,盐度控制鱼类渗透调节,进而使鱼类的生理机能发生变化,但在自然条件下很难把温度和盐度因素截然分开,从而找出影响生物个体各发育阶段的主导因素。全球气候变暖背景下,自1960s以来,渤海湾年均海表温(SST)呈显著波动上升趋势,其中1982—1997年处在升温期(warming period);1998—2013年尽管处于升温间歇期(warming hiatus period),但渤海湾全年暖昼日数和极端高温事件累积强度均呈现上升趋势(Li *et al.*, 2019、2021);2015—2020年渤海湾年均SST连续6年处于高位;自1980s以来,渤海湾海洋热浪发生频次、持续时间和累积强度均呈显著增加趋势,特别自2019年以来,渤海湾发生海洋热浪频次年均均在7次以上,海洋热浪时间年均80d以上,平均热浪强度在1.2℃以上(自然资源部国家海洋信息中心,2020—2022)。海洋升温会改变产卵育幼场的环境条件,将影响受精卵的孵化率、发育速率和孵化期长短,初孵仔鱼的发育状态、营养物质利用效率及其散布潜能(Pepin *et al.*, 1997; Laurel *et al.*, 2008; Pinsky *et al.*, 2013; Bian *et al.*, 2014、2016; Free *et al.*, 2019),改变饵料生物可获得性(Beaugrand *et al.*, 2018),直接决定鱼类早期资源存活状况,进而影响世代强弱(Almatar, 1984)。海洋热浪频发则会导致海洋生态系统鱼类早期资源结构的变化。在2014—2016年间频发的海洋热浪已导致东北太平洋沿岸鱼类早期资源结构发生深刻变化,如在高纬度阿拉斯加湾和加拿大不列颠哥伦比亚省沿岸海域,多数传统优势类群早期资源AI处于自采样记录来的最低水平;而在与渤海湾纬度相近美国俄勒冈州沿岸和南加州洋流区,暖水性鱼类早期资源物种丰富度和AI呈上升趋势;且与厄尔尼诺事件影响明显不同,海洋热浪频发年份在南加州沿岸海域冷温性鱼类早期资源AI也呈上升趋势(Nielsen *et al.*, 2021)。在年均SST处高位、海洋热浪频发的2015—2020年,渤海湾海域少鳞鳕和白氏银汉鱼等暖水性鱼类EDN-ELH显著升高,冬季冷温性鱼类方氏云鳕等早期资源AI也呈上升趋势(附录II)。

盐度的高低变化将直接影响卵子浮性和仔稚鱼渗透调节(Holliday *et al.*, 1960; Laurence *et al.*, 1981)。温盐组合的影响特别是水温被认为是限制产卵场地理分布的主要因子,而温度影响又被盐度效应所调控,特别是在接近产卵场地理分布边界(适温阈值)时,

盐度效应尤为显著,表现为低温低盐和高温高盐增效作用(较低产卵场水温叠加较低盐度,或较高水温叠加较高盐度,有助于提高潜在补充成功率);相反,低温高盐和高温低盐抑制作用(较低水温叠加较高盐度,或较高水温叠加较低盐度,将降低潜在补充成功率)(Alderdice *et al*, 1971; Bunn *et al*, 2002; Bian *et al*, 2016; 卞晓东等, 2022a)。渤海湾产卵场盐度变化与沿岸降水量和河流入海径流量大小有密切关系(邓景耀等, 1983)。因各河流入海径流量具明显的季节变化,渤海湾产卵场盐度由沿岸季节性低盐水和外海高盐水相互影响,交替控制。1960s 以来,海河水系降水量减少(邹磊等, 2021)、天然径流偏低等自然因素,叠加流域人类活动如水库和防潮闸建设及沿河取水取沙等,导致海河入海径流量已基本上是汛期径流(每年10月至翌年5月非汛期防潮闸关闭多数河流断流)(雷坤等, 2007),汛期外渤海湾产卵场盐度变化主要由黄河入海径流量变动引起(吴德星等, 2004; 雷坤等, 2007)。对渤海湾洄游性鱼类产卵繁殖具有重要意义的春季黄河入海径流量的年际变异会影响渤海湾产卵场范围大小、进入产卵场的种类和数量,进而影响鱼类早期资源密度。自1970s至2000s初期,黄河春季入海径流量一直呈负增长,由1970s的40.39亿 m^3 激降至1980s的23.17亿 m^3 、1990s的15.54亿 m^3 和2000s的14.87亿 m^3 ,自2010s中后期起回升至31.08亿 m^3 ,至2020年为48.55亿 m^3 (东营市水利志编纂委员会, 2002; 水利部黄河水利委员会, 2002—2021),呈明显的先下降后上升的趋势。这与渤海湾鱼类早期资源种类数和AI指数变动基本一致。随着河口海区冲淡过程减弱,盐度上升,河口海区形成渤海湾主要经济生物如小黄鱼(夏世福, 1960; 邱道立等, 1965; 朱崇俭等, 1965)、斑鲈和青鳞小沙丁鱼(孔立波等, 1996; 卞晓东等, 2022a)和中国对虾(邓景耀, 1960)等产卵场条件之一的低盐特性已发生改变,产卵场面积将随之缩小,从而影响到上述种类后代幼体的存活和补充;与此同时,生殖期适应盐度和透明度较高种类如鳀(卞晓东等, 2022a)、蓝点马鲛(卞晓东等, 2022a)和带鱼(夏世福, 1960)等将因生殖期河水流量的减少而可能扩大其分布范围,或移往河口海区的高盐区域,将有利于此类鱼类资源增殖。如自1990s以来,随着渤海湾盐度不断上升(吴德星等, 2004; 雷坤等, 2007),蓝点马鲛产卵场范围已扩展至118°30'E以西湾底部(农业农村部, 2021),在黄河入海径流量明显偏低,1992—1993年鳀卵更是布满整个渤海湾,1992年8月在渤海湾底部则采到了带鱼卵等(万瑞景等, 1998);同期斑鲈和青

鳞小沙丁鱼等产卵场范围和EDN-ELH显著降低,特别是小黄鱼卵子在2010s以来的调查中近乎绝迹,当下渤海湾内已无明显小黄鱼产卵场分布。自2002年来,黄河调水调沙工程开始实施,使得黄河淡水和营养盐在年内输送更加集中,黄河入海物质通量季节性模式发生变化(Wang *et al*, 2010; 巩瑶, 2012; 龙跃等, 2017; Wu *et al*, 2020)。这个工程的实施为河口海域带来充足淡水和营养物质,并维持产卵场低盐水体特性的同时,又限制了繁殖适盐较高、产卵期与现行调水调沙期基本一致鱼类如带鱼等在黄河冲淡水影响区域(莱州湾黄河口海域和渤海湾等)的产卵繁殖活动。如自2000s以来,渤海湾海域调查中也鲜有带鱼卵子采集,当下渤海湾内已无明显带鱼产卵场分布。

3.4 捕捞对渤海湾鱼类早期资源动态变化的影响

生殖群体和鱼类早期资源是渤海湾渔业生产和资源可持续利用的基础,捕捞强度和捕捞方式均会对其产生重要影响(邓景耀等, 1988)。如1950s,渤海湾渔业生产以群众渔业的近岸小风船为主,生产网具为扒拉网、风网、流网和转轴网等为主(天津市水产局区划办公室, 1980),主要捕捞利用资源生殖群体。渤海湾小黄鱼、带鱼等经济鱼类在集群与洄游分布上具明显季节特点,通常于生殖期集中于湾内产卵,集群密度高,易于捕捞,并形成群众渔业主要捕捞对象(刘效舜, 1960);当时小黄鱼卵和仔稚鱼广泛分布于渤海湾118°30'E以西湾底部(夏世福, 1960)以及东北部大清河口附近(朱崇俭等, 1965),卵最高密度达1000粒/网,在多种鱼类卵子数量上占绝对优势。自1960s初至1970s末,尽管渤海捕捞强度(fishing effort in the Bohai Sea, FEBH)维持在较低水平(以年总渔获量 annual total catch ATC 和年海洋渔业机动渔船主机总功率数 annual total break horsepower of the motor fishing vessels ATHPF 来表征)(卞晓东等, 2022a),但随着机动渔船增加,底拖网渔业兴起,小黄鱼、带鱼等成鱼和幼鱼的越冬群体又遭受滥捕;自1960s初期在渤海开始的秋汛捕对虾,又兼捕了大量小黄鱼和带鱼等经济鱼类幼鱼(《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会, 1988)。至1970s中后期,渤海小黄鱼和带鱼等传统底鱼资源已处于衰退或严重衰退阶段,其鱼群已形成不了渔业捕捞标志,如洄游路线、渔场和渔期等已不明显,逐渐失去其重要渔业地位(《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会, 1990);至1980s初期,渤海湾小黄鱼产卵场分布范围已显著缩小,仅在118°00'E以西湾底部海河口至歧河口附近海域出现少量鱼卵,同期的一些低质小型中上层鱼类如青鳞小

沙丁鱼、斑鲹、赤鼻棱鲷和鲷等 EDN-ELH 相对上升并成为优势种类(姜言伟等, 1988)。1980s 中期至 1990s 末, 为 FEBH 增长最为迅速阶段(1985—1998 年 ATHPF 保持高速持续增长, ATC 在 1986—1992 年增长, 1992 年急剧下降, 而后逐步上升并在 1998 年达峰值)(卞晓东等, 2022a), 并伴随着新增机动渔船小型化发展趋势; 渤海湾小型机动渔船数量激增, 其主要在渤海湾内产卵、育幼场密集的沿岸或河口海区生产, 湾内小型流动渔具和定置渔具也随之激增(《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会, 1990)。捕捞力量恶性膨胀直接导致渤海湾内传统渔业种类如小黄鱼、带鱼、花鲈、半滑舌鲷、青鳞小沙丁鱼和斑鲹等生殖群体资源量进一步下降(补充型捕捞过度); 同时渤海湾沿岸定置网渔业在渔业生产中也占据重要地位(邓景耀, 1988; 孙中之等, 2012), 定置网渔业生产过程中又兼捕了大量的经济鱼、虾类早期资源(生长型捕捞过度)(辽宁省海洋水产研究所和河北省海洋水产研究所, 1961; 冯志青等, 1982、1987; “渤海湾、莱州湾毛虾适宜捕捞期的研究”课题组, 1992), 使渤海湾渔业资源遭到了生长型和补充型的双重捕捞过度, 破坏了渔业资源可持续能力(农业部水产局和农业部黄渤海渔业指挥部, 1990); 至 1990s 后期, 渤海湾传统捕捞种类如小黄鱼、花鲈、半滑舌鲷、青鳞小沙丁鱼和斑鲹等鱼类早期资源 AI 均急剧下降, 特别是小黄鱼和带鱼等经济鱼类产卵场已经不显著(程济生, 2004; 卞晓东等, 2018)。2000—2010s 中期, 渤海 ATHPF 依旧保持在高位, 但 ATC 自 2000—2008 年间出现下降趋势, 2008—2015 年则进入平台期; 自 2015 年起, FEBH (ATC 和 ATHPF) 则均呈下降趋势(卞晓东等, 2022a)。期间, 渤海湾鱼类早期资源种类数和资源丰度持续降低, 均在 2014—2015 年跌至历史最低水平; 2010s 中期始开始恢复, 至 2020s 初, 种类数和资源丰度已与 1980s 大致相当, 但半滑舌鲷和花鲈等底层经济鱼类 EDN-ELH 仍处历史低位。

国家渔业行政主管部门自 1988 年起实施渤海全年禁止底拖网作业, 并相继开展了限制渤海沿岸海域定置网具数量、作业种类及水深, 发展流网和钓钩渔业等捕捞作业方式优化调整措施(《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会, 1988); 自 1995 年起又开始在渤海海域实施“海洋伏季休渔制度”, “休渔期”又经历了从短到长的过程(卞晓东等, 2022a)。上述举措均为影响 FEBH 的重要因素, 特别是“休渔期”起迄时间及时长又会对产卵期和传统渔期各异的渤海湾鱼类 EDN-ELH 动态产生影响。如传统渔期时长较长、开始时间较早, 但渤海湾内产卵期相对较晚(5 月下旬

至 6 月中旬)的蓝点马鲛 EDN-ELH 自 1980s 至 2010s 中期一直处于相对稳定的状态, 其关键在于黄渤海蓝点马鲛捕捞普遍采用的流网作业方式, 因流网网目(较大)受到一定限制, 这就使得相当数量的补充群体和剩余群体得到保护(韦晟, 1981); 自 1990s 中后期开始施行的“伏季休渔制度”则通过直接关闭渔业, 保护了大量蓝点马鲛产卵亲体和当年生幼体, 从而使其后代能够延续和补充; 随着“休渔期”起迄时间不断提前及时长延长, 如自 2017 年开始, 起始日期被提前到 5 月 1 日, 时长延长至 4 个月, 蓝点马鲛产卵期和其在渤海传统渔期均已涵盖在“休渔期”内, 这样对产卵亲体捕捞压力大为减轻, 2017—2018 年蓝点马鲛 EDN-ELH 又较 2016—2017 年显著提升(图 9)。产卵期一直在“休渔期”外的鱼类, 如花鲈(生殖期为 8 月上旬到 11 月上旬, 10 月上旬到 10 月下旬为生殖盛期)(万瑞景等, 1988)和半滑舌鲷(产卵初期始于 8 月下旬, 结束于 10 月上旬, 盛期为 9 月上中旬)(姜言伟等, 1988)等, 自 1980s 中期以来一直遭受巨大捕捞压力, 其 EDN-ELH 一直维持在较低水平。产卵期和传统渔期相对较晚, 一直在“休渔期”内种类如少鳞鱠和赤鼻棱鲷等 EDN-ELH 自 1990s 以来一直处于相对稳定的状态。鲈大部分时间栖息于沿海浅水、礁石及海藻丛生海区, 4 月底至 5 月初在渤海湾各河口区产卵, 除越冬期外, 鲈一般不结大群; 对鲈集中捕捞也仅在 2—3 月开凌期, 其他时间多以定置网或小型网具生产, 捕捞强度不大; 近 20 余年来沿海海藻养殖业的发展, 又为鲈创造了良好的隐蔽栖息场所(农业部水产局和农业部黄渤海渔业指挥部, 1990), 因而其一直为各调查时期春季仔稚鱼的重要种类。

4 小结

40 余年来, 渤海湾鱼类早期资源结构处于持续更替过程中, 不同时期早期资源的种类组成、资源丰度、优势种类和物种多样性水平等呈明显季节更替; 渤海湾产卵和育幼场范围和重心位置也处于持续更替过程中, 渤海湾中底部均为各调查时期产卵场和育幼场集中分布区。相较 1980s, 渤海湾鱼类早期资源已发生结构性改变, 渤海湾作为传统经济鱼类的产卵和育幼场所功能下降明显。传统经济鱼类如斑鲹、青鳞小沙丁鱼、小黄鱼、带鱼、花鲈和半滑舌鲷等 EDN-ELH 显著下降; 繁殖期相对较早且产卵适应盐度和透明度较大的鱼类如鲷和蓝点马鲛, 生殖期相对较晚的暖水性鱼类如赤鼻棱鲷和少鳞鱠等 EDN-ELH 则显著升高。全球变暖背景下渤海湾海表温持续上升

和海洋热浪频发,以及黄河和海河等入海径流量减少而引起的渤海湾盐度升高和产卵场条件恶化;高捕捞强度减少了参加产卵的亲体量,网目尺寸不合规的禁用渔具使用以及产卵期内捕捞利用等对鱼类早期资源的损害,均对渤海湾鱼类早期资源发生产生了重要影响。但要将对捕捞与气候变化两方面对渤海湾鱼类早期资源的影响剥离开来非常困难。渤海湾鱼类早期资源结构及其动态变化是环境和捕捞双重扰动下的鱼类群落内生态位错位交替和结构性渔业资源衰退的具体体现。

致谢:对各航次海上调查期间帮助采样的黄海水产研究所资源室各位前辈和科研人员谨致谢忱,感谢项目助理张晓燕同志在资料归集等方面提供的帮助,同时感谢国家农业科学渔业资源环境青岛观测实验站对本项研究给予的资助!

参 考 文 献

- ALDERDICE D F, FORRESTER C R. Effects of salinity, temperature, and dissolved oxygen on early development of the Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1971, 28: 883–902
- ALMATAR S M. Effects of acute changes in temperature and salinity on the oxygen uptake of larvae of herring (*Clupea harengus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*). *Marine Biology*, 1984, 80: 1432–1793
- ANDERSON C N K, HSIEH C, SANDIN S A, *et al.* Why fishing magnifies fluctuations in fish abundance. *Nature*, 2008, 452(7189): 835–839
- BAI Y C, SHI F S, XU H J, *et al.* Coastline and tidal current changes responses due to large-scale reclamation in Bohai Sea. *Marine Science Bulletin*, 2021, 40(6): 621–635 [白玉川, 史丰硕, 徐海珏, 等. 渤海湾大规模围填海导致的岸线变化及潮流场响应分析. *海洋通报*, 2021, 40(6): 621–635]
- BEAUGRAND G, KIRBY R R. How do marine pelagic species respond to climate change? Theories and observations. *Annual Review in Marine Science*, 2018, 10: 169–197
- BIAN X D, WAN R J, JIN X S, *et al.* Early life resources assemblage structure and succession to the marine Osteichthyes in the Laizhou Bay of Bohai Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2022b, 46(1): 51–72 [卞晓东, 万瑞景, 金显仕, 等. 渤海莱州湾硬骨鱼类早期资源群落结构及演变. *水产学报*, 2022b, 46(1): 51–72]
- BIAN X D, WAN R J, JIN X S, *et al.* Ichthyoplankton succession and assemblage structure in the Bohai Sea during the past 30 years since the 1980s. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 1–15 [卞晓东, 万瑞景, 金显仕, 等. 近30年渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 1–15]
- BIAN X D, WAN R J, SHAN X J, *et al.* Preliminary analysis on recruitment variation and the exogenous driving factors to early life stages of the small pelagic fish in the Laizhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022a, 29(3): 446–468 [卞晓东, 万瑞景, 单秀娟, 等. 莱州湾中上层小型鱼类早期资源量动态及其外在驱动因素. *中国水产科学*, 2022a, 29(3): 446–468]
- BIAN X, ZHANG X, SAKRAI Y, *et al.* Temperature-mediated survival, development and hatching variation of Pacific cod *Gadus microcephalus* eggs. *Journal of Fish Biology*, 2014, 84: 85–101
- BIAN X, ZHANG X, SAKRAI Y, *et al.* Interactive effects of incubation temperature and salinity on the early life stages of Pacific cod *Gadus microcephalus*. *Deep Sea Research Part II*, 2016, 124: 117–128
- BUNN N A, FOX C J, WEBB T. A literature review of studies on fish egg mortality: Implications for the estimation of spawning stock biomass by the annual egg production method. *Science Series Technical Report*, the Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Lowestoft, UK, 2000, 111: 1–37
- CHENG J S, QIU S Y, LI P J, *et al.* Ecological environment and biotic community in the coastal waters of the Yellow Sea and Bohai Sea. Qingdao: China Ocean University Press, 2004, 343–350 [程济生, 邱盛尧, 李培军, 等. 黄渤海近岸水域生态环境与生物群落. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2004, 343–350]
- DENG J Y, KANG Y D, JIANG Y W, *et al.* A summary of surveys of the penaeid shrimp spawning ground in the Bohai Bay. *Marine Fisheries Research*, 1983, 5: 17–32 [邓景耀, 康元德, 姜言伟, 等. 渤海湾对虾产卵场调查. *海洋水产研究*, 1983, 5: 17–32]
- DENG J Y, ZHU J S, CHEN J S, *et al.* Main invertebrates in the Bohai Sea and their fishery biology. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 91–120 [邓景耀, 朱金声, 程济生, 等. 渤海主要无脊椎动物及其渔业生物学. *海洋水产研究*, 1988, 9: 91–120]
- DENG J Y. Ecological bases of marine ranching and management in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 1–10 [邓景耀. 渤海渔业资源增殖与管理的生态学基础. *海洋水产学研究*, 1988, 9: 1–10]
- DENG J Y. Preliminary investigation results of hatching conditions to *Fenneropenaeus chinensis* in sea area (Investigation Report No.58 of the Yellow Sea Fisheries Research Institute, Ministry of Fisheries P.R.China). *Yellow Sea Fisheries Research Series*, 1960, 2: 68–72 [邓景耀. 自然海区对虾孵化条件的初步调查结果(中华人民共和国水产部黄海水产研究所调查研究报告第58号). *黄海水产研究丛刊*, 1960, 2: 68–72]
- DENG J Y. Distribution of eggs and larvae of penaeid shrimp, *Penaeus orientalis*, in Bohai Bay and its relation to natural

- environment. *Marine Fisheries Research*, 1980, 1: 17–25 [邓景耀. 渤海湾对虾(*Penaeus orientalis*)卵子、幼体数量分布及其与外界环境的关系. *海洋水产研究*, 1980, 1: 17–25]
- Dongying Water Conservancy Records Compilation Committee. *Dongying Water Conservancy Records* (2002). Beijing: Hongqi Press, 2003, 56–57 [东营市水利志编纂委员会. 东营市水利志(2002). 北京: 红旗出版社, 2003, 56–57]
- Editorial Committee of Fishery Resources Survey and Regionalization in China. *Fishery resources survey and regionalization in China (I): Regionalization of fishery*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1988, 155–158 [《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会. 中国渔业资源调查和区划之一中国渔业区划. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1988, 155–158]
- Editorial Committee of Fishery Resources Survey and Regionalization in China. *Fishery resources survey and regionalization in China (II): Regionalization of marine fishery*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1990, 112–234 [《中国渔业资源调查和区划》编辑委员会. 中国渔业资源调查和区划之二中国海洋渔业区划. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1990, 112–234]
- FENG Z Q, HUANG Y W, DONG Z H, *et al.* Opinions on rational utilization of *Acete chinensis* resources and fishing closed season of rotating shaft network in the west of Bohai Sea. *Marine Fisheries*, 1987, 1: 18–20 [冯稚青, 黄燕文, 董志华, 等. 关于合理利用渤海西部毛虾资源和转轴网禁渔期的意见. *海洋渔业*, 1987, 1: 18–20]
- FENG Z Q, SUN J H, YANG G B, *et al.* Discussion of *Acete chinensis* resources in the western areas of Bohai Sea and their rational use. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1982, 4: 62–68 [冯志青, 孙介华, 杨贵本, 等. 渤海西部海区毛虾资源现状及合理利用的探讨. *海洋湖沼通报*, 1982, 4: 62–68]
- Fisheries Bureau of Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Headquarters of Ministry of Agriculture. *Investigation and regionalization of fishery resources in the Yellow Sea and Bohai Sea*. Beijing: China Ocean Press, 1990, 141–162 [农业部水产局, 农业部黄海区渔业指挥部. 黄、渤海区渔业资源调查与区划. 北京: 海洋出版社, 1990, 141–162]
- FREE C M, THORSON J T, PINSKY M L, *et al.* Impacts of historical warming on marine fisheries production. *Science*, 2019, 363(6430): 979–983
- GONG Y. Influencing actor of nutrient transport in the lower reach of Yellow River. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [巩瑶. 黄河下游利津站营养盐输送规律及影响因素研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- GU D X, WANG T, WANG N, *et al.* Distribution and affecting factors of pseudozoea density of mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* in Bohai Bay. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 31(1): 65–71 [谷德贤, 王婷, 王娜, 等. 渤海湾口虾蛄假蚤状幼体的密度分布及影响因素研究. *大连海洋大学学报*, 2018, 31(1): 65–71]
- GUAN W J, TIAN S Q, WANG X F, *et al.* A review of methods and model selection for standardizing CPUE. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 852–862 [官文江, 田思泉, 王学昉, 等. CPUE 标准化方法与模型选择的回顾与展望. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 852–862]
- GUAN W J. *Application of R program in marine fisheries*. Beijing: China Ocean Press, 2015, 224–229 [官文江. *R语言在海洋渔业中的应用*. 北京: 海洋出版社, 2015, 224–229]
- HARE J A, RICHARDSON D E. The use of early life stages in stock identification studies. In CADRIN S X, KERR L A, MARIANI S (eds) *Stock identification methods: Applications in fishery science* (2nd Edition). New York, US: Elsevier, 2013, 329–364
- HJORT J. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe, viewed in the light of biological research. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions du Conseil Permanent International Pour L'Exploration de la Mer*, 1914, 20: 1–228
- HOLLIDAY F G T, BLAXTER J H S. The effects of salinity on the developing eggs and larvae of the herring. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 1960, 39: 591–603
- HOUDE E D. Fish life dynamics and recruitment variability. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1987, 2: 17–29
- HSIEH C H, REISS C, WATSON W, *et al.* A comparison of long-term trends and variability in populations of larvae of exploited and unexploited fishes in the Southern California region: A community approach. *Progress in Oceanography*, 2005, 67: 160–185
- HSIEH C, REISS C S, HUNTER J R, *et al.* Fishing elevates variability in the abundance of exploited species. *Nature*, 2006, 443(7113): 859–862
- JIANG Y W, WAN R J, CHEN R S. Investigation of eggs and larvae of osteichthyes in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 121–149 [姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛. 渤海硬骨鱼类鱼卵、仔稚鱼调查研究. *海洋水产研究*, 1988, 9: 121–149]
- JIANG Y W, WAN R J. Studies on morphology and developmental characters in early stage of *Cynoglossus semilavis* Guüther in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 185–192 [姜言伟, 万瑞景. 渤海半滑舌鳎的生殖习性及其产卵生态的研究. *海洋水产研究*, 1988, 9: 185–192]
- KONG L B, SUN J R, YANG D L, *et al.* Comparison research on eggs and larvae of *Harengula zunasi* Bleeker and *Clupanodon punctatus* (Temminck & Schlegel) in Bohai Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1996, 27(2): 169–178 [孔立波, 孙继仁, 杨东莱, 等. 渤海湾青鳞鱼和斑鲷两种鱼卵及仔鱼的比较研究. *海洋与湖沼*, 1996,

- 27(2): 169–178]
- KOSLOW J A, WRIGHT M. Ichthyoplankton sampling design to monitor marine fish populations and communities. *Marine Policy*, 2016, 68: 55–64
- LASKER R. An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*. NOAA Technical Report NMFS, 1985, 36
- LAUREL B J, HURST T P, COPEMAN L A, *et al.* The role of temperature on the growth and survival of early and late hatching Pacific cod larvae (*Gadus macrocephalus*). *Journal of Plankton Research*, 2008, 30: 1051–1060
- LAURENCE G C, HOWELL W H. Embryology and influence of temperature and salinity on early development and survival of yellowtail flounder *Limundi ferruginecr*. *Marine Ecology Progress Series*, 1981, 6: 11–18
- LEI K, MENG W, ZHENG B H, *et al.* Variations of water and sediment discharges to the western coast of Bohai Bay and the environmental impacts. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(12): 2052–2059 [雷坤, 孟伟, 郑炳辉, 等. 渤海湾西岸入海径流量和输沙量变化及其环境效应. *环境科学学报*, 2007, 27(12): 2052–2059]
- LI Y, REN G Y, WANG Q Y, *et al.* More extreme marine heatwaves in the China Seas during the global warming hiatus. *Environmental Research Letters*, 2019, 14(10): 104010
- LI Y, WANG Q Y, LI Q Q, *et al.* An asymmetric variation of hot and cold SST extremes in the China Seas during the recent warming hiatus period. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 2014
- Liaoning Marine Fisheries Research Institute, Hebei Marine Fisheries Research Institute. Present situation of *Acete chinensis* resources and suggestions on future production and utilization of them in the Yellow Sea and Bohai Sea. *Yellow Sea Fisheries Research Series*, 1961, 12: 16–21 [辽宁省海洋水产研究所, 河北省海洋水产研究所. 黄渤海毛虾资源现状及今后生产利用的意见. *黄海水产研究丛刊*, 1961, 12: 16–21]
- LIU J J, ZHANG Y, ZHAI H Y, *et al.* Distribution characteristics and sources of DOM in Bohai Bay seawater during wet season. *China Environmental Science*, 2021, 41(10): 4802–4810 [刘晶晶, 张彦, 翟洪艳, 等. 丰水期渤海湾水体中 DOM 的分布特征及来源. *中国环境科学*, 2021, 41(10): 4802–4810]
- LIU J, NING P. Species composition and faunal characteristics of fishes in the Yellow Sea. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 764–769 [刘静, 宁平. 黄海鱼类组成、区系特征及历史变迁. *生物多样性*, 2011, 19(6): 764–769]
- LIU X S. The research of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) geographic race (Investigation Report No.56 of the Yellow Sea Fisheries Research Institute, Ministry of Fisheries, P.R.China). *Yellow Sea Fisheries Research Series*, 1960, 2: 45–61 [刘效舜. 黄、渤海小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)种族问题的初步探讨(中华人民共和国水产部黄海水产研究所调查研究报告第56号). *黄海水产研究丛刊*, 1960, 2: 45–61]
- LO N C H, SMITH P E, TAKAHASHI M. Egg, larval and juvenile surveys. In JAKOBSEN T, FOGARTY M J, MEGREY B A, *et al* (eds) *Fish reproductive biology: Implications for assessment and management* 2nd edn. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2016, 227–251
- LONG Y, WU X, BI N S, *et al.* Evolution of active Yellow River (Huanghe) Delta under the water and sediment regulation scheme (WSRS). *Marine Geology Frontiers*, 2017, 33(3): 7–11 [龙跃, 吴晓, 毕乃双, 等. 黄河调水调沙影响下的现行三角洲叶瓣冲淤演化格局. *海洋地质前沿*, 2017, 33(3): 7–11]
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Report on the state of fishery resources in China inshore waters 2020. Beijing: China Agriculture Press, 2021, 38 [农业农村部. 中国近海渔业资源状况公报 2020. 北京: 中国农业出版社, 2021, 38]
- Municipal Office for Tianjin Bureau of Aquatic Products. The concise report on regionalization of fishery in Tianjin. 1980, 1–33 [天津市水产局区划办公室. 天津市简明渔业区划报告. 1980, 1–33]
- National Marine Data and Information Service, Ministry of Natural Resources. *Blue Book on Marine Climate Change in China (2019–2021)*. Beijing: Science Press, 2020–2022 [自然资源部国家海洋信息中心. 中国气候变化海洋蓝皮书(2019–2021). 北京: 科学出版社, 2020–2022]
- NIE H T, TAO J H. Impact of coastal exploitation on the eco-environment of Bohai Bay. *Ocean Engineering*, 2008, 26(3): 44–50 [聂红涛, 陶建华. 渤海湾海岸带开发对近海水环境影响分析. *海洋工程*, 2008, 26(3): 44–50]
- NIELSEN J M, ROGERS L A, BRODEUR, R D, *et al.* Responses of ichthyoplankton assemblages to the recent marine heatwave and previous climate fluctuations in several Northeast Pacific marine ecosystems. *Global Change Biology*, 2021, 27: 506–520
- PEPIN P, ORR D C, ANDERSON J T. Time to hatch and larval size in relation to temperature and egg size in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1997, 54(Suppl1): 2–10
- PINKAS L, OLIPHANT M S, IVERSON I L K. Food habits of albacore, bluefin tuna, and bonito in California waters. California Department of Fish and Game, *Fish Bulletin*, 1971, 152: 1–105
- PINSKY M L, WORM B, FOGARTY M J, *et al.* Marine taxa track local climate velocities. *Science*, 2013, 341(6151): 1239–1242
- PÖRTNER H O, PECK M A. Climate change effects on fishes and fisheries: Towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77: 1745–1779

- QIU D L, LIU X S, WANG Z X. Migration of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* in the Bohai Sea and Yellow Sea in relation to the hydrographic conditions. In Editorial Committee of the China Scientific Council on the Marine Fisheries Resources 1962 (ed) Anthology sequel of papers on marine fishery resources. Beijing: Agriculture Press, 1965, 43–55 [邱道立, 刘效舜, 王遵孝. 渤、黄海小黄鱼的洄游与水文环境的关系. //1962 年海洋渔业资源学术会议论文编审委员会, 海洋渔业资源论文选集续集. 北京: 农业出版社, 1965, 43–55]
- Research Group on Suitable Fishing Period of *Acetes chinensis* in the Bohai Bay and Laizhou Bay. Preliminary analysis on the composition of catches from set net used for netting *Acetes chinensis* in Bohai Bay and western Laizhou Bay. Transactions of Oceanology and Limnology, 1992, 4: 76–84 [渤海湾莱州湾毛虾适宜捕捞期的研究课题组. 渤海湾与莱州湾西部毛虾定置网渔获物组成的初步分析. 海洋湖沼通报, 1992, 4: 76–84]
- RIJNSDORP A D, PECK M A, ENGELHARD G H, *et al.* Resolving the effect of climate change on fish populations. ICES Journal of Marine Science, 2009, 66: 1570–1583
- SASSA C, TAKAHASHI M, KONISHI Y, *et al.* The rapid expansion of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) spawning ground in the East China Sea is linked to increasing recruitment and spawning stock biomass. ICES Journal of Marine Science, 2019, 77(2): 581–592
- SAVILLE A, SCHNACK D. Some thoughts on the current status of studies of fish egg and larval distribution and abundance. Rapports et procès-verbaux des réunions-Conseil international pour l'exploration de la mer, 1981, 178: 153–157
- SHERMAN K, LASKER R, RICHARDS W, *et al.* Ichthyoplankton and fish recruitment studies in large marine ecosystems. Marine Fisheries Review, 1984, 45: 1–25
- SOMARAKIS S, TSOUKALI S, GIANNOULAKI M, *et al.* Spawning stock, egg production and larval survival in relation to small pelagic fish recruitment. Marine Ecology Progress Series, 2019, 617/618: 113–136
- SUN B S, ZUO S H, XIE H L, *et al.* Analysis of impact effects and changes of the coastline in the Bohai Bay during the past 40 years. Journal of East China Normal University (Natural Science), 2017, 4: 139–148 [孙百顺, 左书华, 谢华亮, 等. 近 40 年来渤海湾岸线变化及影响分析. 华东师范大学学报(自然科学版), 2017, 4: 139–148]
- SUN X Y, LÜ T T, GAO Y, *et al.* Driving force analysis of Bohai Bay coastline change from 2000 to 2010. Resources Science, 2014, 36(2): 413–419 [孙晓宇, 吕婷婷, 高义, 等. 2000—2010 年渤海湾岸线变迁及驱动力分析. 资源科学, 2014, 36(2): 413–419]
- SUN Z Z, ZHOU J, WANG J, *et al.* Stow net fishery in the Yellow Sea and Bohai Sea area. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(3): 94–101 [孙中之, 周军, 王俊, 等. 黄渤海区张网渔业. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 94–101]
- TAKASUKA A, YONEDA M, OOZEKI Y. Density dependence in total egg production per spawner for marine fish. Fish and Fisheries, 2019, 20: 125–137
- TANG Q S, YE M Z. Exploitation and protection of offshore fishery resources in Shandong Province. Beijing: China Agriculture Press, 1990, 203–212 [唐启升, 叶懋中. 山东近海渔业资源开发与保护. 北京: 中国农业出版社, 1990, 203–212]
- THOMPSON A R, BEN-ADERET N J, BOWLIN N M, *et al.* Putting the Pacific marine heatwave into perspective: The response of larval fish off southern California to unprecedented warming in 2014–2016 relative to the previous 65 years. Global Change Biology, 2021, 28: 1766–1785
- TIAN M C, SUN B L, YANG J M. Analysis of the fish fauna of the Bohai Sea. Studia Marina Sinica, 1993, 34: 157–167 [田明诚, 孙宝龄, 杨纪明. 渤海鱼类区系分析. 海洋科学集刊, 1993, 34: 157–167]
- WAN R J, CHEN R S. Reproductive behavior and early development of *Lateolabrax japonicus* (Cuvier et Valenciennes) in the Bohai Sea. Marine Fisheries Research, 1988, 9: 203–211 [万瑞景, 陈瑞盛. 渤海鲈鱼的生殖习性及其早期发育特征研究. 海洋水产研究, 1988, 9: 203–211]
- WAN R J, JIANG Y W. The distribution and variation of eggs and larvae of osteichthyes in the Bohai Sea. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(1): 43–50 [万瑞景, 姜言伟. 渤海硬骨鱼类鱼卵和仔稚鱼分布及其动态变化. 中国水产科学, 1998, 5(1): 43–50]
- WANG H J, BI N S, SAITO Y, *et al.* Recent changes in sediment delivery by the Huanghe (Yellow River) to the sea: Causes and environmental implications in its estuary. Journal of Hydrology, 2010, 391(3/4): 302–313
- WANG X L, CUI Z G, GUO Q, *et al.* Distribution of nutrients and eutrophication assessment in the Bohai Sea of China. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27(1): 177–183
- WANG Y Z, WU D, SHI H H, *et al.* Impact of reclamation on water exchange in Bohai Bay in recent decade. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(3): 471–480 [王勇智, 吴岷, 石洪华, 等. 近十年来渤海湾围填海工程对渤海湾水交换的影响. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 471–480]
- WEI S. Current situation and prospect of Spanish mackerel resources in Bohai Sea, Yellow Sea and Northern East China Sea (Investigation Report No.184 of the Yellow Sea Fisheries Research Institute, State Aquatic Product General Bureau). Marine Fisheries Research Series, 1981, 27: 9–21 [韦晟. 渤、黄海及东海北部鲈鱼资源的现状和前景(国家水产总局黄海水产研究所调查研究报告第 184 号). 海洋水产研究丛刊, 1981, 27: 9–21]
- WHITTAKER R H. Evolution and measurement of species diversity. Taxon, 1972, 21(2/3): 213–251
- WU D X, WAN X Q, BAO X W, *et al.* Comparison of summer thermohaline field and circulation structure of the Bohai Sea

- between 1958 and 2000. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(3): 287–292 [吴德星, 万修全, 鲍献文, 等. 渤海 1958 年和 2000 年夏季温盐场及环流结构的比较. 科学通报, 2004, 49(3): 287–292]
- WU G Z, YANG D L, PANG H Y. The spawning of perch *Lateolabrax japonicus* (Cuvier & Valenciennes) in Bobai Bay. Marine Science, 1983, 6: 40–45 [吴光宗, 杨东莱, 庞鸿艳. 渤海湾鲈鱼鱼卵和仔、稚鱼分布的研究. 海洋科学, 1983, 6: 40–45]
- WU Z, ZHAO D, SYVITSKI J P M, *et al.* Anthropogenic impacts on the decreasing sediment loads of nine major rivers in China, 1954–2015. Science of the Total Environment, 2020, 739: 139653
- XIA S F. A preliminary report on the possible impact of the radical cure of Yellow River to the fishery resources in the estuary and adjacent sea areas (Investigation Report No.54 of the Yellow Sea Fisheries Research Institute, Ministry of Fisheries, P.R.China). Yellow Sea Fisheries Research Series, 1960, 2: 18–35 [夏世福. 黄河根治对河口附近海区渔业资源的可能影响初步报告(中华人民共和国水产部黄海水产研究所调查研究报告第 54 号). 黄海水产研究丛刊, 1960, 2: 18–35]
- XU S S, SONG J M, YUAN H M, *et al.* Effects of the combined pollution of Cd, Hg, Pb and petroleum hydrocarbons on common fishery species in the Bohai Bay. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(6): 793–802 [许思思, 宋金明, 袁华茂, 等. 镉、汞、铅和石油烃复合污染对渤海湾常见渔业资源生物的影响初探. 生态毒理学报, 2010, 5(6): 793–802]
- YANG D L, WU G Z, PANG H Y. Distribution of eggs and larvae of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther and *C. joyneri* Günther in Bohai Bay. Chinese Journal of Ecology, 1984(3): 30–33 [杨东莱, 吴光宗, 庞鸿艳. 渤海湾的半滑舌鳎及焦氏舌鳎的鱼卵和仔、稚鱼的季节分布. 生态学杂志, 1984(3): 30–33]
- Yellow River Conservancy Commission of Ministry of Water Resources. Yellow River Sediment Bulletin (2002–2021) [水利部黄河水利委员会. 黄河泥沙公报(2002–2021)]
- Yellow Sea Fisheries Research Institute, Ministry of Fisheries, P.R.China. Relationship between marine hydrology, meteorology, biological environment and fishery// General situation of fishery resources in the Yellow Sea and Bohai Sea and preliminary suggestions on their development and utilization(Investigation Report No.60 of the Yellow Sea Fisheries Research Institute of the Ministry of Fisheries, P.R.C.). Yellow Sea Fisheries Research Series, 1960, 3: 3–20 [中华人民共和国水产部黄海水产研究所. 海洋水文、气象及生物环境与渔业的关系//黄渤海渔业资源概况及其开发利用的初步意见(中华人民共和国水产部黄海水产研究所调查研究报告第 60 号). 黄海水产研究丛刊, 1960, 3: 3–20]
- ZHANG Y X, BIAN X D, SHAN X J, *et al.* Community structure and suitable habitat for the early life stages of marine fish in the Yantai-Weihai offshore waters. Progress in Fishery Sciences, 2022b, 43(6): 148–167 [张雨轩, 卞晓东, 单秀娟, 等. 烟威近岸海域鱼类早期资源群落结构及适宜产卵生境. 渔业科学进展, 2022b, 43(6): 148–167]
- ZHANG Y X, BIAN X D, SHAN X J, *et al.* Spatio-temporal distribution of chub mackerel (*Scomber japonicus*) spawning grounds and its relationship with environmental factors in the offshore waters of Yantai-Weihai. Journal of Fishery Sciences of China, 2022a, 29(4): 618–632 [张雨轩, 卞晓东, 单秀娟, 等. 烟威近岸海域鲈产卵场时空分布及其与环境因子的关系. 中国水产科学, 2022a, 29(4): 618–632]
- ZHAO H P, LI Q X, TAO J H. Spatio-temporal water quality variations and identification of surface water pollutant sources in Bohai Bay. Journal of Hydroelectric Engineering, 2016, 35(10): 21–30 [赵海萍, 李清雪, 陶建华. 渤海湾表层水质时空变化及污染源识别. 水力发电学报, 2016, 35(10): 21–30]
- ZHAO W, WANG J J, XU S, *et al.* Distribution characteristics and influencing factors of bacterioplankton community with offshore distance variation in the surface seawater of Bohai Bay. Haiyang Xuebao, 2019, 41(12): 156–171 [赵维, 王敬敬, 徐松, 等. 渤海湾表层海水中浮游细菌群落随离岸距离的分布特征及其影响因素. 海洋学报, 2019, 41(12): 156–171]
- ZHU C J, ZHAO Z C, JI Z Y. Preliminary studies on reproductive characteristics and field forecasting method of small yellow croaker along the coast of Hebei Province. In Editorial Committee of the China Scientific Council on the Marine Fisheries Resources 1962(ed) Anthology sequel papers on marine fishery resources. Beijing: Agriculture Press, 1965, 84–108 [朱崇俭, 赵增才, 季忠英. 河北沿海小黄鱼的生殖习性及其现场预报方法的初步探讨. //1962 年海洋渔业资源学术会议论文编审委员会, 海洋渔业资源论文选集续集. 北京: 农业出版社, 1965, 84–108]
- ZOU L, XIA J, ZHANG Y, *et al.* Spatial-temporal change characteristics and driving forces of precipitation in the Haihe River Basin. Water Resources Protection, 2021, 37(1): 53–60 [邹磊, 夏军, 张印, 等. 海河流域降水时空演变特征及其驱动力分析. 水资源保护, 2021, 37(1): 53–60]

Temporal Variation of the Early Life Stages of Marine Fish Assemblage Structure and Abundance in the Bohai Bay

BIAN Xiaodong^{1,2}, WAN Ruijing¹, SHAN Xiujuan^{1,2}, JIN Xianshi^{1,2}^①, WANG Kaichuan¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao 266071, China; 2. National Field Observation and Research Center for Fisheries Resources in Changdao Waters, Yantai 265800, China)

Abstract Bohai Bay is an important spawning and nursery habitat for a variety of economically important fish inhabiting the Yellow and Bohai seas. Based on a meta-analysis of historical data spanning 40 years, combined with a field survey of current fish habitat conditions conducted in Bohai Bay, a long-term dataset containing early life resource surveys (including 53 voyages, from 1982 to 2021) of marine Osteichthyes was built. Based on statistical analyses, long-term trends in ichthyoplankton assemblage structure, biodiversity, and synchrony were interpreted. The results indicate that ichthyoplankton assemblage structure and the center of gravity for spawning and nursery habitats in Bohai Bay are currently experiencing continuous replacement. Seasonal variations in ichthyoplankton assemblage structure, abundance index, predominant taxa, and species diversity levels are evident. Spawning and nursery habitats are concentrated in the central and inner part of Bohai Bay west of 118°30'E. Compared with survey results from the 1980s, the taxonomic composition and abundance of the ichthyoplankton assemblage structure have changed considerably. The function of Bohai Bay as a spawning and nursery habitat for traditionally economically important fish has declined significantly. The abundance index and taxon number of ichthyoplankton in Bohai Bay fell to a historic low in the early 2010s, then rebounded significantly. The taxa number of ichthyoplankton decreased from 39 in the 1980s to 31 in the early 1990s, 34 in the late 1990s, and 22 in the 2000s to pre-2010s, then further decreased to 21 in the early 2010s. From the middle 2010s, it recovered to a certain degree, increasing to 40 species just prior to 2020. The current number of pelagic egg taxa is 22, 80% of the number in the 1980s, and 88% of the abundance in the 1980s. The current (2020—2021) number of larval fish taxa is 26, almost identical to that in the 1980s, with an abundance 1.33 times greater than that in the 1980s. Interannual and interdecadal variations in fish egg and larvae species diversity fluctuated drastically. Interannual taxon substitution was noticeable. However, the substitution rate has increased significantly in recent years. Spawning, habitat, and temperature adaptation studies of breeding stock indicate that the number of taxa first decreased, then increased. The annual proportion of the number of taxa to pelagic eggs decreased, while the proportion of the number of taxa to adhesive eggs and eggs with egg membrane filaments increased. The annual proportion of continental shelf pelagic-neritic fish taxa increased, while the continental shelf demersal and benthopelagic taxa decreased. The ecological density of numbers in the early life history (EDN-ELH) of *Konosirus punctatus*, *Sardinella zunasi*, *Larimichthys polyactis*, *Trichiurus japonicus*, *Lateolabrax maculatus*, and *Cynoglossus semilaevis* decreased significantly, whereas the EDN-ELH of *Engraulis japonicus*, *Scomberomorus niphonius*, *Thryssa kammalensis*, and *Sillago*

① Corresponding author: JIN Xianshi, E-mail: jin@ysfri.ac.cn

japonica increased. Ichthyoplankton abundance in Bohai Bay mainly depends on environmental conditions in the spawning habitat, fishing intensity, and the degree of damage to the early life stages of fish resources. The temporal variation and succession of the ichthyoplankton assemblage structure in Bohai Bay were the specific manifestations of the multidimensional niche disturbance and structural performance deterioration of the fishery resources under the dual disturbance of global warming and overfishing.

Key words Early life stages of marine fish; Recruitment abundance; Spawning and nursery habitat; Species diversity; Long-term variation; Bohai Bay

附录 I 1980s来渤海湾各调查时期鱼卵优势(IRI>1 000)和重要(IRI>200)种类及其亲体适温和栖息类型

Appendix I The dominant (IRI>1 000) and important (IRI>200) taxas of fish eggs with temperature adaptation (TA) and habitat types (HT) to the spawning stock in the Bohai Bay since the 1980s

附录 II 1980s来渤海湾各调查时期仔稚鱼优势(IRI>1 000)和重要(IRI>100)种类及其亲体适温、栖息和产卵类型

Appendix II The dominant (IRI>1 000) and important (IRI>100) taxas of fish larvae with temperature adaptation (TA), habitat types (HT) and spawning types (ST) to the spawning stock in the Bohai Bay since the 1980s

<http://journal.yykxjz.cn/uploadfile/yykxjz/20230914/Bian.pdf>

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230112001

http://www.yykxjz.cn/

崔培东, 卞晓东, 张雨轩, 单秀娟, 金显仕, 王惠宾. 黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场分布特征及其影响因素. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 31–45

CUI P D, BIAN X D, ZHANG Y X, SHAN X J, JIN X S, WANG H B. Distribution patterns and influencing factors of *Engraulis japonicus* spawning grounds in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 31–45

黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场 分布特征及其影响因素*



崔培东^{1,3} 卞晓东^{1,2①} 张雨轩^{1,2} 单秀娟^{1,2} 金显仕^{1,2} 王惠宾¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 山东长岛近海渔业资源国家野外科学观测研究站 山东 烟台 265800; 3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 为掌握黄海北部辽宁近岸海域鳀(*Engraulis japonicus*)产卵场的分布特征及其关键环境因子, 基于 2021 年 4—12 月开展的产卵场综合调查获取的鳀样品及其鱼卵密度数据, 运用 Garrison 重心分布法阐释鳀产卵洄游分布特征及其主产卵期; 通过基于 Tweedie 分布的广义可加模型(generalized additive model, GAM)的构建, 分析主产卵期内鳀卵密度与同步获取的海水表层温度(SST)、海水表层盐度(SSS)、海水表层叶绿素浓度(Chla)、浮游动物丰度(F_d)、浮游植物丰度(F_z)和深度(Depth)等 6 个环境因子, 以及时间(月份, Month)和空间(经纬度、Lon 和 Lat)因子之间关系, 并识别主控因子。结果显示, 海域内鳀产卵期较长, 由 4 月持续至 11 月, 5—8 月为主产卵期, 其中, 5—6 月为产卵盛期。鳀产卵场规模和位置时空变化明显, 时空因子与鳀卵密度分布呈密切非线性相关(累积偏差解释率为 48.1%), (SST, SSS) (18.7%)和 Depth (5%)次之。鳀产卵期适温范围较广, 产卵场分布表现出高温高盐(低温低盐)增效作用和高温低盐限制作用。产卵初期(4 月), 鳀产卵场规模和鱼卵密度均较低, 产卵重心位于海洋岛东南侧深水区; 盛期(5 月底—6 月初)在 SST 主导下, 鳀产卵场规模和鱼卵密度均至年内最高值, 核心产卵场位于石城岛—庄河口一带海域; 此后, 随着辽南沿岸水系盐度的下降, 高温低盐的抑制作用使 SSS 因素主导产卵鱼群避开沿海岸域, 鳀产卵场迁移至外海深水区, 7 月后位于 30~50 m 等深线之间; 9—10 月鳀繁殖活动基本结束, 10 月鳀卵仅零星分布于调查海域, 直至 12 月未有鳀卵采获。研究可为黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场研究及鳀资源合理开发利用提供参考依据。

关键词 鳀; 产卵场; 主产卵期; Tweedie-GAM; 黄海北部

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0031-15

鳀(*Engraulis japonicus*)隶属于鲱形目(Clupeiformes)、鳀科(Engraulidae)、鳀属(*Engraulis*), 是一种近海集群

* 山东省自然科学基金(ZR2022MD086)、农业农村部财政项目“黄渤海产卵场调查”(125C0505)、山东省泰山学者专项基金(tsqn202103135)和黄渤海渔业资源与生态创新团队(2020TD01)共同资助。崔培东, E-mail: cui18621162327@163.com

① 通信作者: 卞晓东, 副研究员, E-mail: bianxd@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-01-13, 收修改稿日期: 2023-03-28

性强、生命周期短的小型中上层鱼类(张春霖等, 1955), 广泛分布于中国的渤海、黄海和东海以及朝鲜、韩国、日本、俄罗斯远东水域(Whitehead *et al.*, 1988; 李显森等, 2006)。鳀在黄海繁殖期较长, 一般在4—10月间, 并伴有洄游行为, 于每年3—4月由黄海南部越冬场北上, 4月底或5月初到达黄渤海各产卵场, 此后边产卵边索饵(李富国, 1987; 陈大刚, 1991)。鳀作为数量巨大的小型中上层鱼类及主要饵料鱼种, 在黄海生态系统中起着承上启下的枢纽作用, 是黄海生态系统动力学研究的关键种(唐启升等, 2000)。黄海北部辽宁近岸海域处于海洋与陆地交汇地带, 兼有海、陆两种不同属性的环境特征, 受各种自然营力作用和人类活动影响深刻, 且沿岸有鸭绿江、大洋河、英那河等诸多河流入海, 自然环境的复杂性和多变性较为突出(程济生等, 2004), 曾是黄海北部的重要产卵场和重要的渔业水域(刘效舜等, 1990; 陈钰, 2002; 程济生等, 2004; 王年斌等, 2004; 刘修泽等, 2014)。海域内大洋河口至海洋岛北部及海洋岛东南部邻近海域为已探明的鳀在黄海重要产卵场(阮洪超等, 1984; 万瑞景等, 1998)。

在海洋生态系统中, 鱼类早期补充群体的丰歉直接影响了种群补充成功率, 进而决定着世代的强弱(Henk *et al.*, 1990; 万瑞景, 2016)。其资源分布与变化不仅反映产卵场动态, 而且对维持海洋生态系统平衡起着重要作用。鳀卵发生量则是衡量鳀生殖群体生产力及资源补充的基础(王爱勇等, 2010)。国内相关鳀早期生活史研究已有鳀早期发育形态(阮洪超, 1984; 江素菲等, 1984)、产卵场(阮洪超, 1984; 万瑞景等, 2008a; 于金珍等, 2020; 卞晓东等, 2022)、产卵期和产卵条件(万瑞景等, 2008b; 于金珍等, 2020; 卞晓东, 2022)、巨大捕捞压力下鳀卵子大小及自然死亡率动态(Wan *et al.*, 2012)和摄食生态(孟田湘, 2001)等。与黄海北部辽宁近岸海域鳀早期资源状况相关的研究包括1959年12航次黄渤海鳀卵及仔稚鱼逐月调查(阮洪超, 1984)、1985年3月—1986年10月13航次黄海渔业生态系试捕调查(万瑞景等, 1998)、1987和1988年5—6月3航次黄海近岸产卵场调查(万瑞景等, 1998)、1998年6—9月2航次黄海北部近岸水域生物资源及栖息环境调查(程济生等, 2004)、1998年5月—2000年12月5航次黄渤海海洋生物资源及其环境调查(金显仕等, 2005)、2009年5—10月4航次黄海北部近岸鱼卵仔鱼专项调查(于旭光等, 2020)、2009—2010年4航次黄渤海重点水域增殖生态基础

调查(金显仕等, 2014)以及2014—2017年黄海北部辽宁近岸产卵场普查(董婧等, 2018)等数次调查。鱼卵阶段是鱼类生命周期中死亡率最高的时期(殷名称, 1991), 也是对海洋环境变化极为敏感的时期, 海洋环境的细微变化将对其存活、发育和生长产生强烈影响(Perry *et al.*, 2005; 万瑞景等, 2016)。黄海北部辽宁近岸海域作为重要的产卵场及索饵场, 海域地处暖温带且海陆交互频繁, 气候复杂多变, 在人类活动和气候变化双重扰动下, 鱼类早期资源分布易呈现剧烈波动, 而上述研究除阮洪超(1984)和万瑞景等(1998)对黄海北部辽宁近岸海域鳀主产卵期、适温适盐特性、产卵场分布及其生态特征等方面做过详细阐述外, 多数研究仅限于鳀早期资源数量分布状况的描述, 而有关其产卵场分布与关键环境因子的研究则相对较少。另外, 鱼类早期资源作为资源补充源头, 是产卵场调查和评价重要组成部分, 摸清其产卵场分布特征及环境驱动因子有助于评估海域鱼类资源现状和发展趋势, 为渔业资源合理开发利用及产卵场保护策略研究提供重要参考。

鱼类早期资源密度分布与环境之间的关系非常复杂, 具有非线性和不可累加的特性(Stenseth *et al.*, 2002; Dingsr *et al.*, 2007)。广义可加模型(generalized additive model, GAM) (Hastie *et al.*, 1986)是渔业中用来分析资源数量分布与环境因子之间关系的常用方法(陈新军等, 2007; 张云雷等, 2019; 朱文斌, 2021), 相较于传统方法, 其以平滑函数探究响应变量与解释变量之间的非线性关系和每个因子的重要程度, 限制条件少, 运用更灵活(Piet, 2002; 薛毅等, 2007; 马稳等, 2022)。另外, 在产卵场调查中, 因鱼卵在自然水域非均匀分布, 密度数据常不具备正态性, 且存在相当比例的零值(卞晓东等, 2022; 张雨轩等, 2022), 应用一般GAM方法不能很好地反映鱼卵分布与环境因子之间的关系(尹洁等, 2019), 诸多应用表明, 对于样本零值比例较高且呈偏态分布的资源数据而言, 基于Tweedie分布的GAM (Tweedie-GAM)较适合(王浩展等, 2017; 张云雷等, 2019; 万荣等, 2020a、b; 张雨轩等, 2022; 马稳等, 2023)。因此, 本研究基于2021年4—12月在黄海北部近岸海域开展的逐月产卵场调查获取的鳀卵和同步获取的环境因子数据以及时间和空间因子数据, 应用Tweedie-GAM模型分析方法研究影响鳀卵分布的关键因子, 以期阐明海域鳀产卵场分布特征及其影响因素, 为黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场保护和管理提供生态学参数。

1 材料与方法

1.1 调查方法及样品处理

2021年4—12月(具体时间为4月18—21日、5月28日—6月1日、7月21—24日、8月17—20日、9月11—14日、10月31日—11月4日、12月11—13日)于黄海北部辽宁近海海域开展7航次产卵场综合调查,调查船为“中渔科102”,调查区域为38.75°~39.75°N, 121.5°~124°E, 站位布设如图1所示,其中,4—11月S15站未调查,12月S3和S6站未调查。调查内容包含鱼卵和仔稚鱼、基础饵料生物(浮游动植物)、基本环境要素(表、底层水温 SST/SBT, 表、底层盐度 SSS/SBS, 深度 Depth, 表层叶绿素浓度 Chla)。

海上作业流程及样品分析参照《海洋调查规范第6部分: 海洋生物调查》(GB/T 12763.6-2007)。鱼卵、仔稚鱼样品的采集使用网目直径为0.505 mm筛绢制成的口径80 cm、长270 cm的大型浮游生物网,各站表层水平拖网10 min,拖速预设为2.0 n mile/h,网口系流量计记录滤水体积。采集的样品以5%海水甲醛溶液固定保存,实验室内对其进行分拣,样品全样本分析,使用生物解剖镜对分拣后标本进行种类鉴定和个体计数;海水温度、盐度使用美国Seabird 19 plus

或德国Sea & Sun Technology CTD60M温盐深仪现场测量,选取海水表层0.5 m内的平均值作为海表温、盐数据;水深为船载声呐同步实测数值;叶绿素浓度是通过采水器采取500 mL表层海水并过滤至玻璃纤维滤膜(孔径0.7 μm),冷冻保存带回后,实验室内以90%丙酮溶液于-20 °C环境下冷冻萃取12 h,使用Turner Designs Trilogy仪器测定。浮游动、植物分别采用浅水Ⅱ型网(网口内径0.316 m,网目孔径0.160 mm)和浅水Ⅲ型网(网口内径0.370 m,网目孔径0.070 mm)沿海水底层垂直向上采集,采用传统形态学分类方法对其进行分析。

1.2 鳀卵数据标准化处理

以滤水体积对各站采集的鳀卵数量进行标准化,滤水距离根据网口流量计计算:

$$V = d \times \pi r^2 = (R \times q) \times \pi r^2 \quad (1)$$

$$\rho = \frac{N}{V} \quad (2)$$

式中, V 为每站水平拖网滤水体积, d 为每站水平拖网滤水距离(m); R 为拖网的流量计转数差值(round); q 为网口流量计的距离转数比(m/round), r 为大型浮游生物水平拖网的网口半径(m), ρ 为鱼卵密度(ind./m³), N 为鱼卵数量。

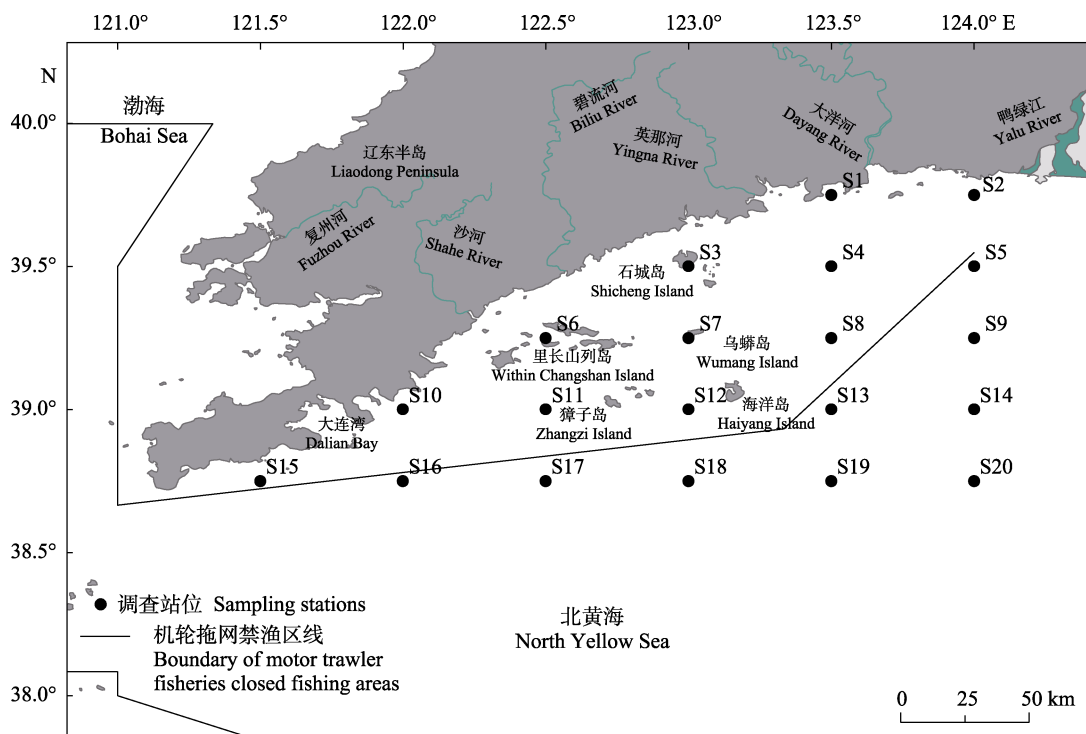


图1 2021年黄海北部辽宁近岸海域产卵场调查站位

Fig.1 Stations of spawning grounds survey in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea in 2021

1.3 产卵重心分布及环境因子梯度

采用 Garrison 的分布重心法(都煜等, 2017)计算各月鳀产卵重心, 并研究产卵重心迁移趋势:

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i \times \rho_i)}{\sum_{i=1}^n \rho_i} \quad (3)$$

$$Y = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i \times \rho_i)}{\sum_{i=1}^n \rho_i} \quad (4)$$

式中, X 、 Y 分别为产卵重心的经度、纬度, X_i 、 Y_i 分别为 i 站位的经度、纬度, ρ_i 为 i 站位的鳀卵密度。

为探究 4—12 月海域自然环境概况, 分别构建海水表层温度(sea surface temperature, SST)、海水表层盐度(sea surface salinity, SSS)、海水表层叶绿素浓度(Chl a)和深度(Depth) 4 个自然环境变量与月份(Month) 时间变量和经纬度(Lon, Lat)交互空间变量的一般 GAM, GAM 的一般形式为(万荣等, 2020a):

$$g(Y) = \alpha + \sum_{i=1}^n f_i(x_i) + \varepsilon \quad (5)$$

式中, Y 为响应变量, $g(Y)$ 为联系函数, x_i 为第 i 个解释变量, $f_i(x_i)$ 为平滑函数, α 为截距, ε 为残差。

1.4 Tweedie-GAM 构建过程

以 2021 年主产卵期(5—8 月)鳀卵密度数据(ρ , ind./m 3)作为响应变量。根据鳀卵密度频数分布判断其分布类型, 并利用 R 语言 tweedie 程序包 tweedie.Profile() 函数确定鳀卵密度 ρ 在能效参数 p 为何值时取得最大对数似然函数值(Dunn *et al.*, 2008)。当 $p=0$ 、1、2、3 时, 分别对应正态分布、泊松分布、伽马分布和逆正态分布; 当 $1 < p < 2$ 时, Tweedie 模型为复合泊松分布(Tweedie, 1984), Tweedie 分布的概率密度函数为(Shono, 2008b; 万荣等, 2020a):

$$f(y; \theta, \phi, p) = \alpha(y; \phi, p) \exp\left\{-\frac{1}{2\sigma^2} d(y; \theta, p)\right\} \quad (6)$$

式中, θ 为位置参数, ϕ 为分散参数, p 为能效参数; σ 为标准差, $d(y; \theta, p)$ 为单位偏差。 P 可以定义为除 $0 < P < 1$ 外的任意实数。

选取鳀主产卵期内同步环境调查数据为预选解释变量, 包括 SST、SSS、Chl a 和 Depth 4 个自然环境变量, (SST, SSS) 1 个交互环境变量, 浮游动物丰度(F_d)和浮游植物丰度(F_z) 2 个生物环境变量, (Lon,

Lat) 1 个交互空间变量和 Month 1 个时间变量。为减少多重共线性问题对模型准确性的干扰, 本研究通过计算方差膨胀因子(VIF, 阈值设定为 4) (Kabacoff, 2015)和条件数(κ , 阈值设定为 100) (薛毅等, 2007)衡量预选解释变量多重共线性的程度。

若响应变量符合 Tweedie 分布, 在筛选解释变量后, 采用逐步回归分析构建 Tweedie-GAM, 综合 AIC (Akaike information criterion) (Mugo *et al.*, 2010)和偏差解释率(deviance explained, DE) (薛毅等, 2007)评价所建模型优良性, AIC 最低且 DE 最高的模型为最优。模型构建使用 R 语言 mgcv 程序包(Wood, 2006), 所建 Tweedie-GAM 模型如下(张雨轩等, 2022):

$$\begin{cases} \rho \sim Tw_p(\theta, \phi) \\ \mu = E(\rho) \\ \ln(\mu) = \alpha + \sum_{i=1}^n f_i(x_i) + \varepsilon \end{cases} \quad (7)$$

式中, ρ 为鳀卵密度(ind./m 3), θ 为位置参数, ϕ 为分散参数, p 为能效参数; μ 为鳀卵密度 ρ 的期望值, 即 $E(\rho)$; $\ln(\mu)$ 表示联系函数为自然对数, α 为截距, ε 为残差, x_i 为解释变量, $f_i(x_i)$ 表示第 i 个变量的非参数平滑函数。

1.5 模型验证及潜在产卵场预测

应用 5 折交叉验证对所建 Tweedie-GAM 模型的预测能力和准确性进行评价, 将总数据集随机等分为 5 个子集, 每次随机选择其中 4 个子集作为训练集, 剩余 1 个子集作为验证集, 整个过程重复 100 次, 并通过构建模型预测值 y^* 与实际观测值 y 之间的线性关系来描述二者之间的近似程度(Li *et al.*, 2015; 马稳等, 2022; 孙浩奇等, 2022):

$$y = a + b \times y^* \quad (8)$$

式中, 截距 a 和斜率 b 的均值反映了模型预测能力, $a=0$ 代表预测值与实际观测值具有相似的空间特征, $b=1$ 代表模型预测无系统偏差。同时计算决定系数(R^2) 平均值作为回归方程的拟合优度(Li *et al.*, 2015)。

依据 2021 年 5、7、8 月海表月平均温度($1/12^\circ \times 1/12^\circ$)及海域平均深度数据($1/12^\circ \times 1/12^\circ$), 基于所建 Tweedie-GAM 模型对海域鳀卵分布进行预测, 以此分析海域鳀潜在产卵场所。海表温度数据由哥白尼海洋环境监测服务中心(Copernicus Marine Environment Monitoring Service, CMEMS) 提供 (<https://marine.copernicus.eu/>), 深度数据来自 GMED 全球海洋环境数据集(<https://gmed.auckland.ac.nz/download.html>)。

2 结果与分析

2.1 2021年黄海北部辽宁近岸海域鲢卵密度分布

2021年4—12月于黄海北部辽宁近岸海域开展的7航次产卵场调查共采集鲢卵61452粒,其中,4月23粒,平均密度为 2.3×10^{-3} ind./m³,出现频率为5.26%;5—6月54123粒,平均密度为13.81 ind./m³,出现频率为100%;7月5486粒,平均密度为0.90 ind./m³,出现频率为89.47%;8月1711粒,平均密度为0.20 ind./m³,出现频率为52.63%;9月108粒,平均密

度为0.014 ind./m³,出现频率为36.84%;10—11月1粒,平均密度为 9.96×10^{-5} ind./m³,出现频率为5.26%;12月未采集到鲢卵(图2)。5—8月各月鲢卵平均密度相对较高,出现频次均在50%以上,为鲢在海域内的主产卵期。5—6月集中分布在大洋河口至石城岛及海洋岛一带海域;7月大洋河口及里长山列岛西南海域均未采集到鲢卵,整体资源密度有明显下降,鲢卵分布逐渐远离近岸向调查海区中部迁移;8月鲢卵分布进一步南移,主要分布于獐子岛周边及鸭绿江南部外海域,鸭绿江口及大洋河口站位未采集到鲢卵(图2)。

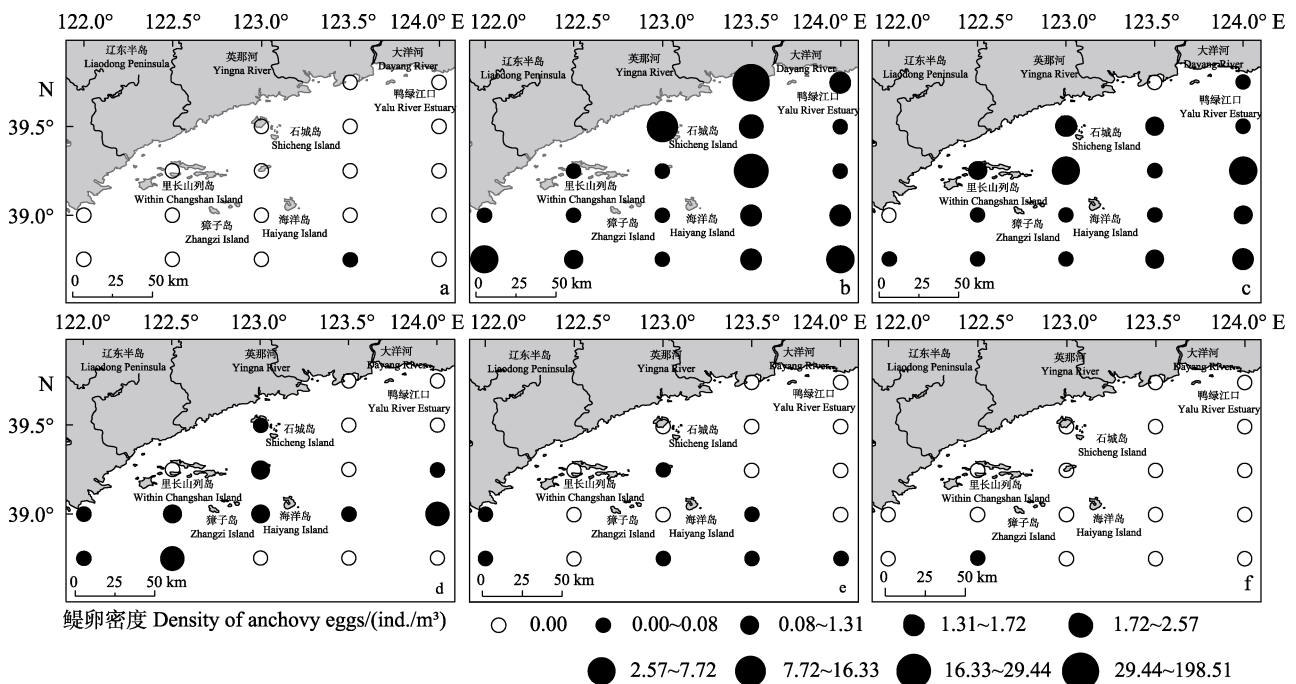


图2 2021年4—11月黄海北部辽宁近岸海域鲢卵密度分布

Fig.2 Density distribution of *Engraulis japonicus* eggs in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea from April to November 2021

a: 4月; b: 5—6月; c: 7月; d: 8月; e: 9月; f: 10—11月

a: April; b: May to June; c: July; d: August; e: September; f: October to November

2.2 主产卵期内鲢卵密度分布与 SST、SSS 和 Depth 的关系

图3a、b、c为2021年5—8月鲢卵密度与SST分布图,5—8月是黄海北部辽宁近岸海域SST升温期,平均SST由5—6月的13.6℃升至7月的24.2℃和8月的25.4℃。5—6月,海域内大洋河口及大连湾东部海域为相对SST高值区,鲢卵在此处分布最为密集;而相对SST较低的乌蟒岛、石城岛及鸭绿江口南端30~40m等深线附近海域鲢卵分布则较为稀疏(图3a)。7月,鲢卵主要分布于SST 23.5~

24.8℃、Depth 30~40m等深线范围内海域(图3b)。8月,鲢卵分布区已南移至Depth 40~50m外海,而其所处海域SST高达25.7~26.4℃。

图3d、e、f为鲢卵密度与海水表层盐度分布图,5—8月黄海北部辽宁近岸海域SSS皆呈现由近岸向离岸外海逐渐升高的趋势。5—6月,高SSS区位于海域东南及西南外侧深水区,自大洋河和英那河口存在一个突入调查水域的低盐水舌(图3d);7月,海域整体SSS有着明显下降,较高SSS区域基本位于Depth 40m等深线以南海域(图3e);8月,SSS整体有所回升,高盐区仍位于海域东南侧外海(图3f)。

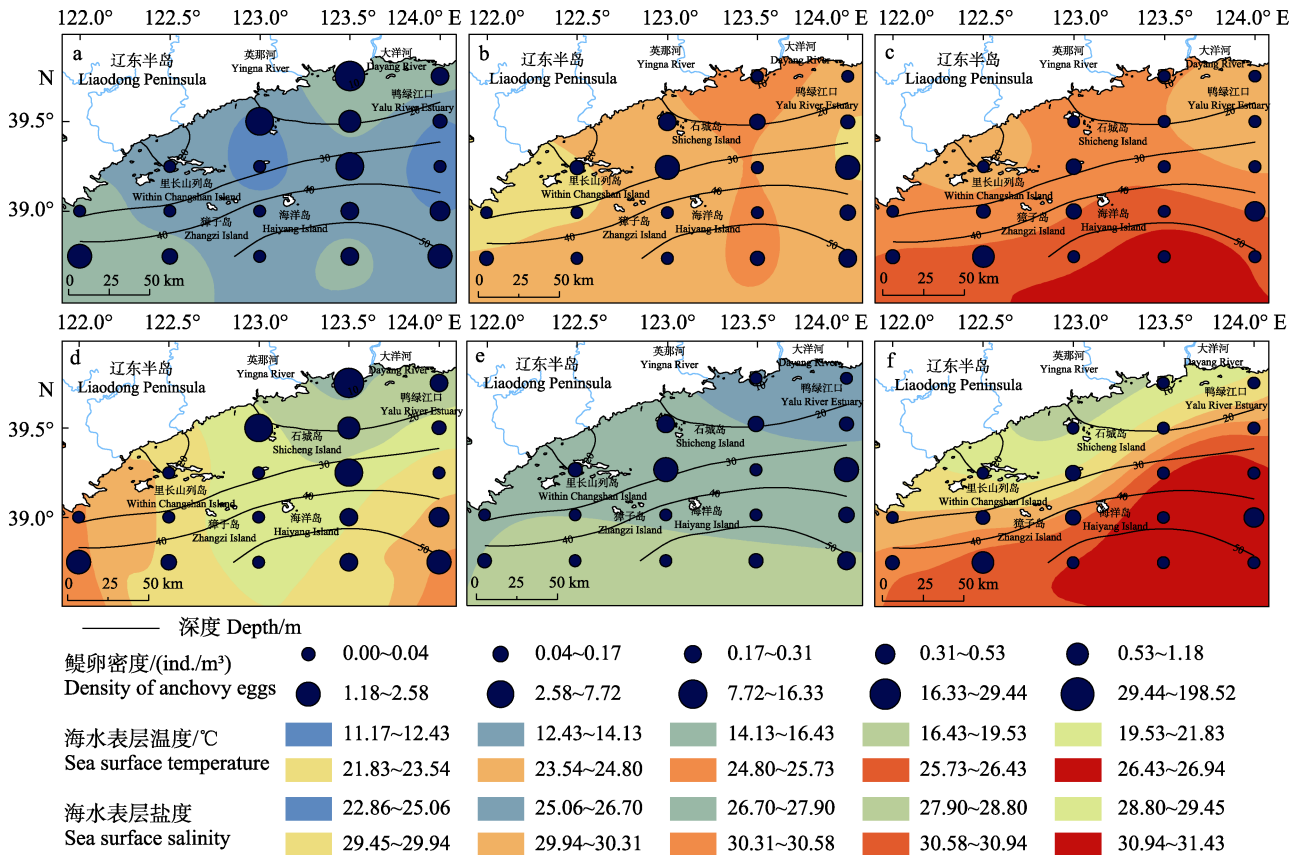


图3 2021年5—8月鳁卵密度及各环境因子实际分布

Fig.3 Density of *Engraulis japonicus* eggs and distribution of environmental factors from May to August 2021

a: 5—6月 SST; b: 7月 SST; c: 8月 SST; d: 5—6月 SSS; e: 7月 SSS; f: 8月 SSS.

a: SST from May to June; b: SST in July; c: SST in August; d: SSS from May to June; e: SSS in July; f: SSS in August.

2.3 黄海北部辽宁近岸海域鳁产卵重心月度分布与海域环境因子梯度

黄海北部辽宁近海鳁产卵重心有明显月度变动趋势(图4a), 4月下旬至6月上旬, 产卵重心由海洋岛东南部外侧深水区(123.5°E, 38.75°N)迁移至大洋河河口近岸海域(123.45°E, 39.62°N), 7月后产卵重心开始向离岸深水区迁移。7月下旬至11月上旬, 产卵重心进一步向调查海域西南侧深水区迁移, 10月下旬至11月上旬鳁产卵重心迁移至海洋岛西南部外侧深水区(122.5°E, 38.75°N), 与4月下旬大致相同纬度。最终于12月中旬产卵重心消失。

海域自然环境要素的梯度变化: SST(图4b)、SSS(图4d)和Depth(图4e)梯度变化趋势相似, 皆自近岸端向远岸侧呈递增趋势, 整体梯度变化较为均匀。Chla(图4c)有自近岸端向远岸端逐步递减趋势, 其在该海区东侧近岸端梯度变化明显, 自此向南及西南部外海海域梯度变化相对放缓。

2.4 Tweedie-GAM模型构建及分析

选取5—8月主产卵期内鳁卵密度数据作为响应变量, 依其频数分布判断该数据呈明显偏态分布并存在一定比例0值(约19%), 经tweedie.Profile()函数确定其在能效参数 $p=1.901$ 时取得最大对数似然函数值(图5), 得出该数据分布类型为复合泊松分布, 因此, 选用Tweedie-GAM。

将 $VIF < 4$ 且 $\theta < 100$ 的解释变量(除SST外其他因子)与鳁卵密度进行单因子GAM检验从而获得统计学上有意义的影响因子, 由表1可知, (Lon, Lat)、(SST, SSS)和 F_d 与鳁卵密度在 $P < 0.001$ 水平上显著相关, Depth、Chla和 F_z 在 $P < 0.01$ 水平上显著相关, SSS在 $P < 0.05$ 水平上显著相关, 各因子皆与鳁卵密度表现出较好的相关性。综合AIC和偏差解释率及调整后的 R^2 可知, F_z 的AIC值相对较高、偏差解释率相对较低且调整后的 R^2 为负, 因此, 筛除该变量。

对筛选后剩余的解釋变量与鳁卵密度进行逐步

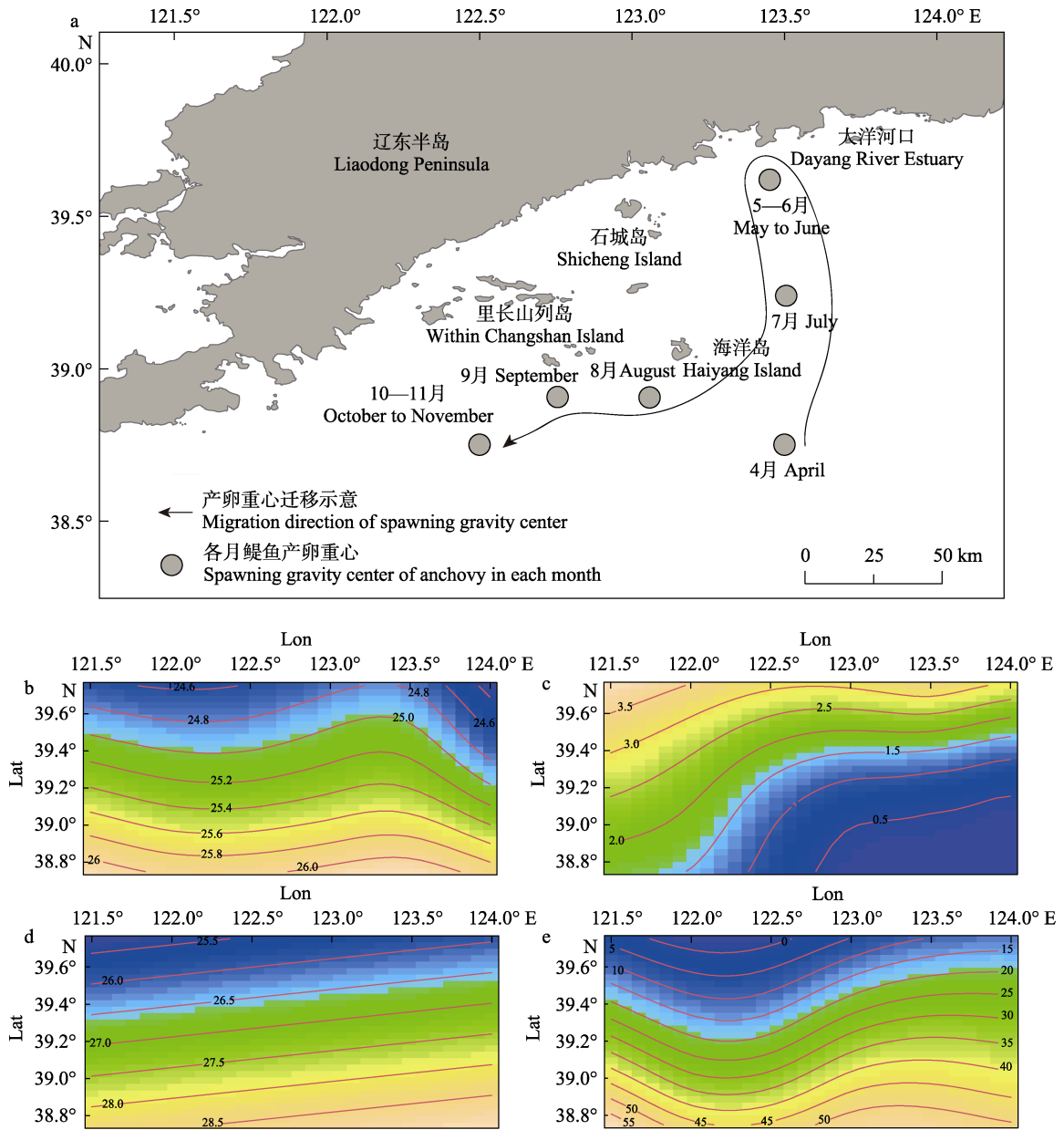


图 4 2021 年黄海北部辽宁近岸海域鲱产卵重心月度分布(a)及海域环境环境因子梯度(b: SST; c: Chla; d: SSS; e: Depth)
 Fig.4 Monthly distribution of spawning center of *Engraulis japonicus* (a) and sea environmental gradient (b: SST; c: Chla; d: SSS; e: Depth) in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea in 2021

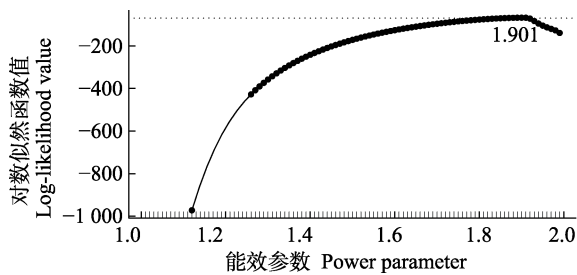


图 5 改变能效参数 p 时的对数似然函数值
 Fig.5 Log-likelihood function value while changing the power-parameter

回归构建 Tweedie-GAM 模型, 结果见表 2, 其中, 时间因子 Month 视为固定因子。综合 AIC 和累积偏差解释率分析可知, factor(Month)+(SST, SSS)+Depth+(Lon, Lat)为最优模型, 该模型 AIC 为 97.47, 累积偏差解释率达 71.8%, 其中, Month 的偏差解释率最高(28.3%), 其次为(Lon, Lat) (19.8%)、(SST, SSS) (18.7%)和 Depth (5%), 除时空因素外, SST 与 SSS 的交互作用是所选自然环境变量中影响鲱卵密度最为主要的因子。具体表达式为:

表1 单因子 GAM 检验所得 AIC、偏差解释率、R² 及 P 值
Tab.1 AIC, deviance explained, R² and P-value obtained by single factor GAM test

| 模型因子 Model factor | AIC | 偏差解释率 Deviance explained % | 调整后的 R ² Adjusted R ² | P-value |
|----------------------|--------|-------------------------------|--|-------------------------|
| factor(Month) | 120.53 | 28.30 | 0.022 | |
| (Lon, Lat) | 118.76 | 48.40 | 0.110 | 1.2×10 ^{-4***} |
| (SST, SSS) | 110.77 | 45.00 | 0.518 | 2.5×10 ^{-5***} |
| SSS | 128.51 | 26.70 | 0.146 | 1.6×10 ^{-2*} |
| Depth | 129.73 | 23.10 | 0.031 | 6.3×10 ^{-3**} |
| Chla | 132.66 | 14.50 | 0.059 | 5.5×10 ^{-3**} |
| F _z | 138.02 | 10.60 | -0.024 | 4.3×10 ^{-3**} |
| F _d | 124.86 | 27.90 | 0.046 | 6.1×10 ^{-4***} |

注：“***”表示在 0.001 水平下显著，“**”表示在 0.01 水平下显著，“*”表示在 0.05 水平下显著。
Note: “***” means 0<P<0.001, “**” means 0.001<P<0.01, “*” means 0.01<P<0.05.

表2 逐步回归所得 AIC、偏差解释率及不显著因子

Tab.2 AIC, deviance explained and non-significant factors obtained by backward stepwise regression

| 模型因子 Model factor | AIC | 偏差解释率 Deviance explained/% | 不显著因子 Non-significant factor |
|--|--------|-------------------------------|---------------------------------|
| factor(Month)+(SST, SSS) | 111.52 | 47.0 | |
| factor(Month)+(SST, SSS)+Depth | 108.49 | 52.0 | |
| factor(Month)+(SST, SSS)+Depth+(Lon, Lat) | 97.47 | 71.8 | |
| factor(Month)+(SST, SSS)+Depth+(Lon, Lat)+F _d | 100.60 | 74.3 | Depth |
| factor(Month)+(SST, SSS)+Depth+(Lon, Lat)+Chla | 97.47 | 71.8 | Chla |

$$g(\rho) = \alpha + factor(Month) + f_1(SST, SSS) + f_2(Depth) + f_3(Lon, Lat) + \varepsilon \quad (9)$$

式中, g()联系方式为自然对数, factor 为哑变量函数, f₁() 和 f₃() 采用完整的张量积平滑函数 te(), f₂() 采用自然样条平滑 s(), α 为截距, ε 为残差。模型所用 Tweedie 能效参数 p 值为 1.81。

Tweedie-GAM 结果显示(图 6), 鳀卵密度与各环境因子均呈非线性关系。在主产卵期内, 海域鳀卵密度随月份增加而逐渐减少; SST 低于 17.5 °C 时, 鳀卵密度随 SST 升高而不断上升, SST 在 17.5~25.0 °C 区间内, 在 SST 和 SSS 的交互影响下, 在较低 SST (17.5 °C)附近时, 鳀卵密集区更倾向于 SSS 为 25 左右的低盐环境, 在较高 SST (27.5 °C)附近时, 鳀卵密集区更倾向于 SSS 为 30 以上的高盐环境; 在空间因子(Lon, Lat)影响下, 鳀卵分布适宜区位 39°N 以北、122.75°E 以西至 123.75°E 区域内, 在此区域内, 纬度上鳀卵密度有自南向北、自远岸向近岸逐渐增加的

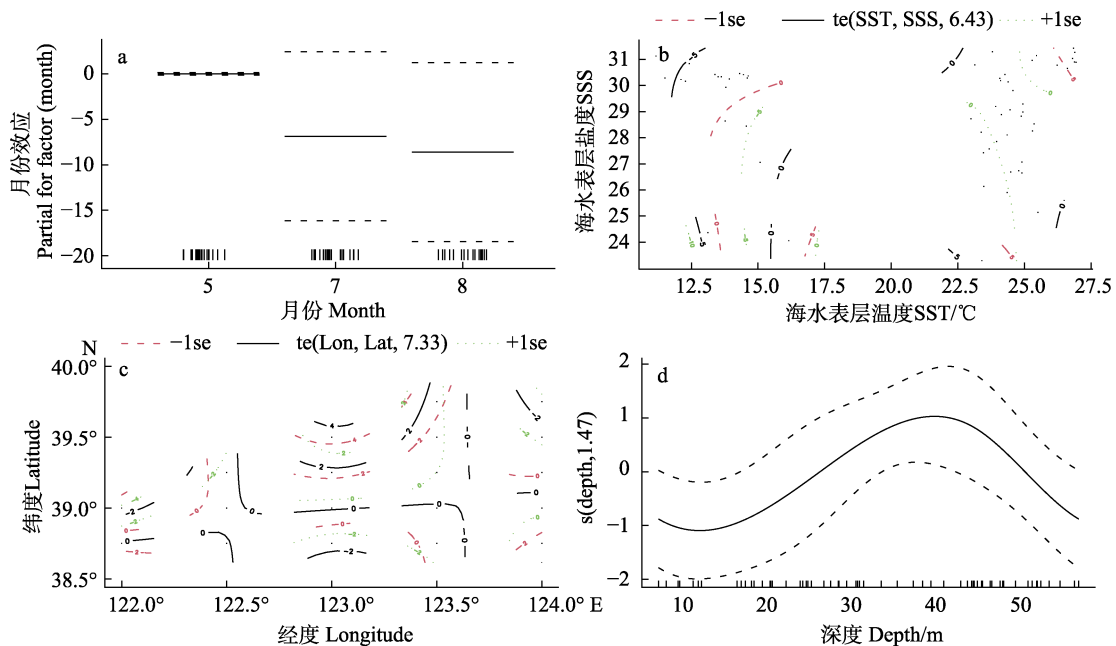


图6 各解释变量对鳀卵密度的影响
Fig.6 Effects of explanatory variables on egg density of *Engraulis japonicus*

趋势, 经度上有自西向东先增后减的趋势。此外, 随着海域 Depth 的增加, 鳀卵密度呈现先减少、再增加、后又减少的波动趋势, Depth<13.7 m 时, 密度随深度增加逐渐降低, 而后逐渐回升, 直至 40.4 m 左右出现峰值, 之后又逐渐降低。

2.5 模型预测效果检验及鳀潜在产卵场分布

交叉验证结果显示, 以模型预测值和实际观测值线性拟合出的直线平均截距为 3.86, 平均斜率为 1.68, 平均 R^2 为 0.11, 截距接近 0, 斜率接近 1, 表明所建 Tweedie-GAM 模型能较好反映鳀卵密度与各

环境因子之间的关系。

由预测结果可知(图 7), 主产卵期内鳀潜在产卵场主要分布在北部近岸纬度 39.25°N 以北, 向西最大范围可至里长山列岛中部(122.5°E), 向东可至大洋河口附近(123.7°E), 核心区域为英那河河口及石城岛周边海域。5 月, 核心产卵场最明显, 以石城岛及英那河河口为中心, 向海突出并逐渐减弱。7 月, 核心产卵场不明显, 石城岛及英那河周边海域仅有少量鳀卵分布, 海域中部及西南两侧有小规模鳀产卵场出现。8 月, 鳀潜在产卵场分布范围进一步收缩, 鳀卵密度明显下降, 无较大规模潜在产卵场出现。

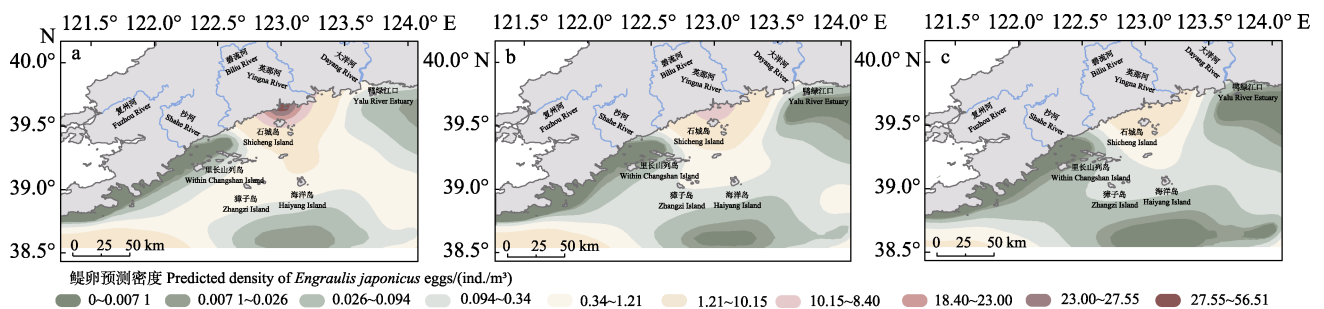


图 7 2021 年 5 月(a)、7 月(b)、8 月(c)黄海北部辽宁近海鳀潜在产卵场分布

Fig.7 Distribution of potential spawning grounds of *Engraulis japonicus* in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea in May (a), July (b) and August (c)

3 讨论

3.1 黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场分布特征

结合历史调查发现, 自 20 世纪末至今(阮洪超, 1984; 万瑞景等, 1998; 金显仕等, 2005; 董婧等, 2018), 黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵期未发生明显变化, 基本可延续 6~7 个月之久。近年来鳀产卵盛期有所提前, 1959 年调查显示(阮洪超, 1984), 产卵盛期为 6—8 月, 高峰出现于 7 月。21 世纪以来(金显仕等, 2005; 于旭光等, 2020; 董婧等, 2018), 7 月部分鳀群已有结束产卵迹象, 本年度 7 月调查期间, 鳀卵整体密度也有明显下降, 产卵盛期出现于 5—6 月。产卵场分布也随盛期变化相应发生改变, 5—6 月近岸侧, 除庄河口及海洋岛北部海域外, 历史产卵场在鸭绿江口周边海域也有分布(阮洪超, 1984; 万瑞景等, 1998; 董婧等, 2018), 而本次调查更接近于大洋河口至石城岛一线, 位置稍有西移; 在历次调查中(阮洪超, 1984; 万瑞景等, 1998; 于旭光等, 2020; 董婧等, 2018), 7 月海域鳀产卵场皆呈不同程度的南移趋势, 本次调查结果与之一致, 但对于海域中南部产卵场分布规模而言, 1959 年 7 月调查中(阮洪超, 1984), 海

域鳀产卵盛期尚未结束, 产卵场仍广布整个海区, 海洋岛以南外海存在鳀卵密集区; 2016 年(董婧等, 2018)海域鳀产卵场整体规模虽有明显下降, 但在獐子岛西南端仍存在高密度区; 本年度与 2009 年调查(于旭光等, 2020)中鳀产卵活动明显减弱, 海域内基本无鳀卵密度高值区存在。

3.2 黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场分布主导环境因素初析

相关研究表明, 温度为鱼类早期资源结构季节更替的主要驱动因素, 而盐度及深度等变化是导致其资源密度空间异质性的主要因素(张迎秋等, 2013; Monteiro *et al.*, 2021)。本研究 Tweedie-GAM 模型因子选择和模型分析结果均表明时(Month)空(Lat, Lon)因子是导致鳀卵密度时空变化的主要原因, 它们作为一种综合性的因子, 并不直接影响鳀卵分布, 而是通过 SST、SSS 和 Depth 等环境因子间接影响鳀卵和产卵群体的分布(刘效舜等, 1990; 尹洁等, 2019)。结合调查所示黄海北部近海环境特点可以发现, 在太阳辐射、气象条件、地理环境、海流、各种水系消长及中纬度季风影响下, 海域 SST 季节间变化明显, 有着明显的增温期(4—6 月)和降温期(9—11 月), 但在相

同调查季节内 SST 空间分布相对均匀,而调查海域 SSS 和 Depth 则随经纬度空间变化更为明显,具有由近岸向外海递增趋势。海洋鱼类早期生活史阶段对温盐等环境要素变动响应敏感(万瑞景等, 2016), 呈低温低盐增效作用(低 SST 叠加较低 SSS 有助于潜在补充成功率提高), 相反高温低盐抑制作用(高 SST 叠加较低 SSS 将会降低潜在补充成功率)(Alderdice *et al.*, 1968; Bian *et al.*, 2016; 卞晓东等, 2022), 在接近其产卵场地理分布边界(适温阈值)时, 盐度效应更为显著(卞晓东, 2010)。Tweedie-GAM 分析结果显示, 鳀卵密度在 SST 及 SSS 交互影响下发生非线性波动, 在 17.5 °C 前(增温期, 5—6 月), SST 表现为正效应, 鳀卵密集区分布更倾向于 SSS 为 25 左右的低盐环境, 而在高于 22.5 °C (夏季, 7—8 月)后, SST 表现为负效应, 鳀卵密集区更倾向于 SSS 为 30 以上的高盐环境, 产卵适温范围相对较广, 低温低盐区间(增温期 4—6 月)或高温高盐区间(夏季 7—8 月)更符合其产卵习性。

综合 Tweedie-GAM 模型结果分析, 得出黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场分布特征及其驱动基础如下: 调查海域 30 m 以浅水域常年为辽南沿岸水系控制, 四季皆以低盐为特征(鲍献文等, 2009); 在 30 m 以深外海深水区域, 终年存在盐度较高外海水、沿岸水与外海水之间盐度梯度较大, 其界限四季可辨别(刘效舜等, 1990)。增温期(4—6 月), SST 为影响鳀卵密度分布最重要的自然环境因子, 在 SST 主导下, 黄海鳀由黄海中南部越冬场北上, 4 月下旬即达海洋岛东南外侧深水区开始产卵但产卵场规模较小。在岸边增温作用影响下(鲍献文等, 2009), 5 月近岸 SST 有所上升, 产卵重心随温度升高逐渐向北部近岸浅水区迁移, 并于 5 月下旬迁移至大洋河河口水域附近。随着 SST 进一步升高, 产卵盛期开始, 鳀产卵场西起碧流河河口, 沿辽东半岛岸线走向分布, 东北端可至鸭绿江口周边海域, 主要位于 30 m 以浅辽南沿岸水系控制水域, 核心产卵场围绕石城岛—英那河河口一带海域, 并一直持续至 6 月中下旬鸭绿江等河川丰水期到来。7 月进入雨季, 丰水期河水入海径流的增加为河口一带海域带来了大量冲淡水(程天文等, 1985), 降低了辽南沿岸水盐度(鲍献文等, 2009), 随着温度逐渐升至鳀产卵适温阈值, 盐度效应显现, 在高温低盐抑制作用下, 鳀产卵重心逐渐迁移至海洋岛东部 30 m 等深线外侧水域, 调查水域鳀产卵活动减弱; 直至 8 月, 高密度区已南移至 40~50 m 之间外海深水区, 鳀产卵活动进一步减弱。秋季降温期(9—11 月), 鳀产卵活动进入末期, 仅有零星鳀卵分布于海洋岛西南部 40~50 m 之间外海深水区, 至 11 月上旬鳀产卵活

动基本结束。这一分布规律也与鳀繁殖群体的洄游路线相吻合(金显仕等, 2005)。

3.3 Tweedie-GAM 模型在鳀产卵场分布及其主导环境因素分析中的运用及其局限性

广义可加模型(GAM)常用于探索渔业资源的数量分布和环境因子的关系(陈新军等, 2009; 张云雷等, 2019; 朱文斌等, 2021)。诸多应用表明, 实际海洋调查中因不同生物对环境适宜性的不同, 资源丰度数据往往存在大量 0 值且主要呈现偏态分布(张云雷等, 2019)。对于鱼类早期资源而言, 因繁殖亲体集群特性及其对适宜产卵场所的主动选择行为, 0 值及偏态分布问题较为突出, 基于 Tweedie 分布族的 GAM 被证实是解决这一问题的有效方法(卞晓东等, 2022; 张雨轩等, 2022; Walsh *et al.*, 2022)。海洋鱼类早期生活史阶段是对海洋环境变化响应最敏感的阶段, 小规模的环境变化将会对补充成功率产生重要的影响。环境因子对鱼类早期资源密度及空间分布影响机制异常复杂(Ma *et al.*, 2020), 尤其对不具任何游泳能力而随波逐流的鳀浮性卵, 温盐等环境要素变动毋庸置疑影响其资源密度及空间分布; 同时, 海流扩散等水动力因素或将其带至非适宜生境, 捕食者及饵料生物等生物因子也会对其繁殖群体及早期资源密度及分布造成一定影响。本文应用 Tweedie-GAM 模型法对黄海北部辽宁近岸海域主产卵期内鳀卵密度与时(Month)空(Lon, Lat)因子、自然环境因子 SST、SSS、Chla、Depth 及饵料生物因子 F_z 、 F_d 之间的关系进行了建模分析。为避免非主产卵期内鳀卵所处环境的偶然性, 响应变量仅选用 5—8 月主产卵期内鳀卵密度数据。模型结果帮助阐释了海域鳀产卵场分布时空变化的环境驱动因子, 为气候变化背景下探讨黄海北部辽宁近岸海域鳀产卵场变迁提供了可能。但囿于模型自身缺陷或受限于研究者当前已获取数据及认识水平, 本研究仍存在如诸多不足和有待优化之处:

其一, 在处理 0 值方法选择方面, Ad Hoc 法(即对变量加上一个常量 c 并采用自然对数连接以使模型适用于 0 值)(Tian *et al.*, 2009)和 Two-step 法(即分开处理 0 值与非 0 值数据, 并通过 0 值的概率 p 构建合适的模型)(Shono, 2008a; Punt, 2004)同为解决 0 值问题的有效方法, 因受篇幅限制, 本研究未对这 2 种方法进行平行对比验证。在解决 0 膨胀问题上, Tweedie-GAM 法是否具有更好的准确性仍需深入探讨。其二, 在解释变量选择方面, 需纳入类型更为广泛的生物、非生物因子加以全面分析, 本研究虽考虑了交互项(SST 与 SSS, Lon 与 Lat), 但其他各自然环

境变量间的交互作用及自然环境变量与时空因子交互作用并未考虑。其三, 仅采用了2021年1年内的数据建模, 进行交叉验证时虽基本符合预测要求, 但直线拟合的平均截距仍未达最优状态, 与0仍有一定差距, 补充长时间序列主产卵期鳀卵密度数据以及补充多元化变量后将有效提高模型精度。

参 考 文 献

- ALDERDICE D F, FORRESTER C R. Some effects of salinity and temperature on early development and survival of the English sole (*Parophrys vetulus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1968, 25(3): 495–521
- BAO X W, LI N, YAO Z G, *et al.* Seasonal variation characteristics of temperature and salinity of the North Yellow Sea. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2009, 39(4): 553–562 [鲍献文, 李娜, 姚志刚, 等. 北黄海温盐分布季节变化特征分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(4): 553–562]
- BIAN X D, WAN R J, SHAN X J, *et al.* Preliminary analysis on recruitment variation and the exogenous driving factors to early life stages of small pelagic fishes in the Laizhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(3): 446–468 [卞晓东, 万瑞景, 单秀娟, 等. 莱州湾中上层小型鱼类早期资源量动态及其外在驱动因素. *中国水产科学*, 2022, 29(3): 446–468]
- BIAN X D, ZHANG X M, SAKURAI Y, *et al.* Interactive effects of incubation temperature and salinity on the early life stages of Pacific cod *Gadus macrocephalus*. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2016, 124: 117–128
- BIAN X D. Morphological and ecological study on fish eggs and larvae and ichthyoplankton surveys in the Yellow River estuary. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [卞晓东. 鱼卵、仔稚鱼形态生态学基础研究: 兼报黄河口海域鱼类浮游生物调查. *中国海洋大学博士学位论文*, 2010]
- CHEN D G. Fishery ecology in the Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: Ocean Press, 1991, 326–330 [陈大刚. 黄渤海渔业生态学. 北京: 海洋出版社, 1991, 326–330]
- CHEN X J, TIAN S Q. Effects of SST and temp-spatial factors on abundance of nylon flying squid *Ommastrephes bartrami* in the northwestern pacific using generalized additive models. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007(2): 104–113 [陈新军, 田思泉. 利用GAM模型分析表温和时空因子对西北太平洋海域柔鱼资源状况的影响. *海洋湖沼通报*, 2007(2): 104–113]
- CHEN Y. Fishery economy of Northern Yellow Sea. *Fisheries Science*, 2002, 21(4): 29–30 [陈钰. 黄海北部海洋渔业经济状况. *水产科学*, 2002, 21(4): 29–30]
- CHENG J S, QIU S Y, LI P J, *et al.* Ecological environment and biotic community in the coastal waters of the Yellow Sea and Bohai Sea. Qingdao: China Ocean University Press, 2004, 343–367 [程济生, 邱盛尧, 李培军, 等. 黄渤海近岸水域生态环境与生物群落. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2004, 343–367]
- CHENG T W, ZHAO C N. Runoff and sediment discharge into the sea of major rivers in China and their impacts on the coast. *Acta Oceanologica Sinica*, 1985(4): 460–471 [程天文, 赵楚年. 我国主要河流入海径流量、输沙量及对沿岸的影响. *海洋学报*, 1985(4): 460–471]
- DINGSR G E, CIANNELLI L, CHAN K S, *et al.* Density dependence and density independence during the early life stages of four marine fish stocks. *Ecology*, 2007, 88(3): 625–634
- DONG J, LIU X Z, WANG A Y, *et al.* Fishery resources in Liaoning coastal and estuarine areas. Beijing: China Agricultural Press, 2018, 103–138 [董婧, 刘修泽, 王爱勇, 等. 辽宁近海与河口区渔业资源. 北京: 中国农业出版社, 2018, 103–138]
- DU Y, XU B D, XUE Y, *et al.* Analysis of temporal and spatial heterogeneity of Japanese squid (*Loliolus japonica*) in Haizhou Bay and adjacent waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 558–565 [都煜, 徐宾铎, 薛莹, 等. 海州湾及邻近海域日本枪乌贼时空分布的异质性. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 558–565]
- DUNN P K, SMYTH G K. Evaluation of Tweedie exponential dispersion model densities by Fourier inversion. *Statistics and Computing*, 2008, 18(1): 73–86
- HASTIE T J, TIBSHIRANI R J. Generalized additive models. *Statistical Science*, 1986, 1(3): 297–310
- HENK W V D V, PIHL L, MJN B. Recruitment mechanisms in North Sea plaice *Pleuronectes platessa*. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 64(1/2): 1–12
- JIANG S F, ZHENG X Y. The morphological characters of eggs and larvae of *Engraulis japonicus* temminck et schlegel and its spawning areas in the fishing ground of the south Fujian and Taiwan bank. *Taiwan Strait*, 1984(2): 224–231 [江素菲, 郑小衍. 闽南—台湾浅滩渔场鳀鱼卵和仔鱼的形态特征及其产卵场. *台湾海峡*, 1984(2): 224–231]
- JIN X S, QIU S Y, LIU X Z, *et al.* The basis and prospect of fishery resources proliferation in the Yellow sea and Bohai Sea. Beijing: Science Press, 2014, 58–73 [金显仕, 邱盛尧, 柳学周, 等. 黄渤海渔业资源增殖基础与前景. 北京: 科学出版社, 2014, 58–73]
- JIN X S, ZHAO X Y, MENG T X, *et al.* Biological resources and habitats in the Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: Science Press, 2005, 263–264 [金显仕, 赵宪勇, 孟田湘, 等. 黄渤海生物资源与栖息环境. 北京: 科学出版社, 2005, 263–264]
- KABACOFF R. R in action: Data analysis and graphics with R. Manning Publications, 2015, 1–174

- LI B, CAO J, CHANG J H, *et al.* Evaluation of effectiveness of fixed-station sampling for monitoring American lobster settlement. *North American Journal of Fisheries Management*, 2015, 35(5): 942–957
- LI F G. Study on reproductive habits of anchovy (*Engraulis japonicus*) in the south central Yellow Sea. *Marine Fisheries Research*, 1987(8): 41–50 [李富国. 黄海中南部鳀鱼生殖习性的研究. *海洋水产研究*, 1987(8): 41–50]
- LI X S, ZHAO X Y, LI F, *et al.* Structure and its variation of the anchovy (*Engraulis japonicus*) spawning stock in the Southern waters to Shandong Peninsula. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(1): 46–53 [李显森, 赵宪勇, 李凡, 等. 山东半岛南部产卵场鳀鱼生殖群体结构及其变化. *海洋水产研究*, 2006, 27(1): 46–53]
- LIU X S, WU J N, HAN G Z, *et al.* Investigation and division of fisheries resource of Yellow and Bohai Sea. Beijing: Ocean Press, 1990, 78–266 [刘效舜, 吴敬南, 韩光祖, 等. 黄渤海区渔业资源调查与区划. 北京: 海洋出版社, 1990, 78–266]
- LIU X Z, DONG J, YU X G, *et al.* Fishery resource structure in coastal waters of Liaoning Province. *Marine Fisheries*, 2014, 36(4): 289–299 [刘修泽, 董婧, 于旭光, 等. 辽宁省近岸海域的渔业资源结构. *海洋渔业*, 2014, 36(4): 289–299]
- MA J, LI B, ZHAO J, *et al.* Environmental influences on the spatio-temporal distribution of *Coilia nasus* in the Yangtze River estuary. *Journal of Applied Ichthyology*, 2020, 36(3): 315–325
- MA W, QIN S, GAO C X, *et al.* Distribution of Japanese scad (*Decapterus maruadsi*) and its relationship with environmental factors in the coast waters of southern Zhejiang based on the Tweedie-GAM. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 12–22 [马稳, 秦松, 高春霞, 等. 基于 Tweedie-GAM 探究浙江南部近海蓝圆鲹资源分布及与环境因子的关系. *渔业科学进展*, 2023, 44(3): 12–22]
- MA W, QIN S, ZHAO J. Distribution characteristics and influencing factors of fish resources in the offshore waters south of Zhejiang. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 1–11 [马稳, 秦松, 赵静. 浙江南部近海鱼类资源季节分布特征及其影响因素. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 1–11]
- MENG T X. Studies on the feeding of anchovy (*Engraulis japonicus*) post larva in the spawning ground in the Southern waters of Shandong Peninsula. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(2): 21–25 [孟田湘. 山东半岛南部鳀鱼产卵场鳀鱼仔、稚鱼摄食的研究. *海洋水产研究*, 2001, 22(2): 21–25]
- MONTEIRO M, AZEITEIRO U M, MARTINHO F, *et al.* Long-term changes of ichthyoplankton communities in an Iberian estuary are driven by varying hydrodynamic conditions. *Journal of Plankton Research*, 2021, 43(1): 33–35
- MUGO R, SAITOH S I, NIHIRA A, *et al.* Habitat characteristics of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in the western North Pacific: A remote sensing perspective. *Fisheries Oceanography*, 2010, 19(5): 382–396
- PERRY A L, LOW P J, ELLIS J R, *et al.* Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, 2005, 308(5730): 1912–1915
- PIET G J. Using external information and GAMs to improve catch-at-age indices for North Sea plaice and sole. *ICES Journal of Marine Science*, 2002, 59(3): 624–632
- PUNT M. Standardizing catch and effort data: A review of recent approaches. *Fisheries Research*, 2004, 70(2/3): 141–159
- RUAN H C. Studies on the eggs and larvae of *Engraulis japonicus*. *Studia Marina Sinica*, 1984, 22(3): 20–56 [阮洪超. 鳀鱼卵子和仔稚鱼的形态发育及其在黄海、渤海分布. *海洋科学集刊*, 1984, 22(3): 20–56]
- SHONO H. Application of the Tweedie distribution to zero-catch data in CPUE analysis. *Fisheries Research*, 2008a, 93(1/2): 154–162
- SHONO H. Confidence interval estimation of CPUE year trend in delta-type two-step model. *Fisheries Science*, 2008b, 74(4): 712–717
- STENSETH N C, MYSTERUD A, OTTERSEN G, *et al.* Ecological effects of climate fluctuations. *Science*, 2002, 297(5585): 1292–1296
- SUN H Q, JIANG R J, CHEN F, *et al.* Spatiotemporal distribution of eggs and larvae of *Coilia mystus* and its relationship with environmental factors along Oujiang estuary. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(7): 963–973 [孙浩奇, 蒋日进, 陈峰, 等. 瓯江口凤鲚鱼卵、仔稚鱼的时空分布及其与环境因子关系. *水生生物学报*, 2022, 46(7): 963–973]
- TANG Q S, SU J L. Studies on marine ecosystem dynamics in China (I): Key scientific issues and research and development strategies. Beijing: Science Press, 2000, 1–252 [唐启升, 苏纪兰. 中国海洋生态系统动力学研究 I 关键科学问题与研究发展战略. 北京: 科学出版社, 2000, 1–252]
- TIAN S, CHEN X, CHEN Y, *et al.* Standardizing CPUE of *Ommastrephes bartramii* for Chinese squid-jigging fishery in Northwest Pacific Ocean. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(4): 729–739
- TWEEDIE M C K. An index which distinguishes between some important exponential families. *Statistics: Applications and New Directions*, 1984, 579: 579–604
- WALSH W A, KLEIBER P, MCCracken M. Comparison of logbook reports of incidental blue shark catch rates by Hawaii-based longline vessels to fishery observer data by application of a generalized additive model. *Fisheries Research*, 2002, 58(1): 79–94
- WAN R J, JIANG Y W. Studies on the ecology of eggs and larvae of Osteichthyes in the Yellow Sea. *Marine Fisheries Research*, 1998, 19(1): 60–73 [万瑞景, 姜言伟. 黄海硬骨鱼类鱼卵、仔稚鱼及其生态调查研究. *海洋水产研究*, 1998, 19(1): 60–73]
- WAN R J, WEI H, SUN S, *et al.* Spawning ecology of the

- anchovy *Engraulis japonicus* in the spawning ground of the Southern Shandong Peninsula I. Abundance and distribution characters of anchovy eggs and larvae. *Acta Zoologica Sinica*, 2008a, 54(5): 785–797 [万瑞景, 魏皓, 孙珊, 等. 山东半岛南部产卵场鳀鱼的产卵生态 I. 鳀鱼鱼卵和仔稚鱼的数量与分布特征. *动物学报*, 2008a, 54(5): 785–797]
- WAN R J, ZHANG R Z. Fish eggs and larvae in China's coastal waters and adjacent waters. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2016, 1–4 [万瑞景, 张仁斋. 中国近海及其邻近海域鱼卵与仔稚鱼. 上海: 上海科学技术出版社, 2016, 1–4]
- WAN R J, ZHAO X Y, WEI H. Spawning ecology of the anchovy *Engraulis japonicus* in the spawning ground of the Southern Shandong Peninsula II. Spawning habits and embryonic developmental characteristics of the anchovy. *Acta Zoologica Sinica*, 2008b, 54(6): 988–997 [万瑞景, 赵宪勇, 魏皓. 山东半岛南部产卵场鳀鱼的产卵生态 II. 鳀鱼的产卵习性和胚胎发育特性. *动物学报*, 2008b, 54(6): 988–997]
- WAN R J, BIAN X D. Size variability and natural mortality dynamics of anchovy *Engraulis japonicus* eggs under high fishing pressure. *Marine Ecology Progress Series*, 2012, 465: 243–251
- WAN R, SONG P B, LI Z G, *et al.* Distribution and environmental characteristics of the spawning grounds of *Scomberomorus niphonius* in the coastal waters of Yellow Sea, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020b, 31(1): 275–281 [万荣, 宋鹏波, 李增光, 等. 黄海近岸海域蓝点马鲛产卵场分布及其环境特征. *应用生态学报*, 2020a, 31(1): 275–281]
- WAN R, ZHANG T Z, LI Z G, *et al.* Spatial distribution and inter-annual variability of spawning grounds of *Cynoglossus joyneri* in the Yellow Sea coastal waters in summer. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020b, 31(3): 1023–1032 [万荣, 张同征, 李增光, 等. 黄海近岸海域短吻红舌鲷夏季产卵场的空间分布及其年际变化. *应用生态学报*, 2020b, 31(3): 1023–1032]
- WANG A Y, WAN R J, JIN X S. Decadal variations of ichthyoplankton biodiversity in spring in Laizhou Bay of the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 19–24 [王爱勇, 万瑞景, 金显仕. 渤海莱州湾春季鱼卵、仔稚鱼生物多样性的年代际变化. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 19–24]
- WANG H Z, DAI X J, GUAN W J, *et al.* Relationship between the environmental factors and the CPUE (catch per unit effort) of *Pseudocarcharias kamoharai* in tropical Atlantic Ocean based on the GAM-Tweedie model. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(6): 2024–2032 [王浩展, 戴小杰, 官文江, 等. 基于 Tweedie-GAM 模型的热带大西洋拟锥齿鲨单位捕捞努力量渔获量与环境因子的关系. *应用生态学报*, 2017, 28(6): 2024–2032]
- WANG N B, XUE K, MA Z Q, *et al.* Distribution of active phosphates and assessment of the ambient water quality in estuary of the northern Yellow Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(3): 272–275 [王年斌, 薛克, 马志强, 等. 黄海北部河口区活性磷酸盐含量分布动态与环境质量评价. *中国水产科学*, 2004, 11(3): 272–275]
- WHITEHEAD P J P, NELSON G J, WONGRATANA T. FAO species catalogue. Vol 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2-Engraulidae. FAO Fish Synop, 1988, 125: 305–579
- WOOD S N. Generalized additive models: An introduction with R. Boca Raton: CRC Press, 2006, 391–392
- XUE Y, CHEN L P, *et al.* Statistical modeling and R software. Beijing: Tsinghua University Press, 2007, 237–296 [薛毅, 陈立萍, 等. 统计建模与 R 软件. 北京: 清华大学出版社, 2007, 237–296]
- YIN J, WANG J, ZHANG C L, *et al.* Spatial and temporal distribution characteristics of *Larimichthys polyactis* eggs in Haizhou Bay and adjacent regions based on two-stage GAM. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1164–1174 [尹洁, 王晶, 张崇良, 等. 利用 two-stage GAM 研究海州湾及其邻近海域小黄鱼鱼卵的时空分布特征. *中国水产科学*, 2019, 26(6): 1164–1174]
- YIN M C. Advances and studies on early life history of fish. *Journal of Fisheries of China*, 1991, 15(4): 348–358 [殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展. *水产学报*, 1991, 15(4): 348–358]
- YU J Z, ZHANG Y W, BIAN X D, *et al.* Key impact factor identification and future distribution prediction of the anchovy spawning ground in the Bohai Sea. *China Environmental Science*, 2020, 40(5): 2214–2221 [于金珍, 张燕伟, 卞晓东, 等. 渤海鳀鱼产卵场关键影响因素识别及变迁预测. *中国环境科学*, 2020, 40(5): 2214–2221]
- YU X G, LI T P, YAN J Y, *et al.* Species composition and quantity distribution of fish eggs and larvae in coastal waters of the north Yellow Sea. *Marine Fisheries*, 2020, 42(6): 659–671 [于旭光, 李轶平, 燕金宜, 等. 黄海北部近岸海域鱼卵、仔稚鱼种类组成与数量分布. *海洋渔业*, 2020, 42(6): 659–671]
- ZHANG C L, CHENG Q T, ZHENG B S, *et al.* Investigation report on fish in the Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: Science Press, 1955, 51–52 [张春霖, 成庆泰, 郑葆珊, 等. 黄渤海鱼类调查报告. 北京: 科学出版社, 1955, 51–52]
- ZHANG Y L, XU B D, ZHANG C L, *et al.* Relationship between the habitat factors and the abundance of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in Haizhou Bay based on the Tweedie-GAM model. *Acta Oceanologica Sinica*, 2019, 41(12): 78–89 [张云雷, 徐宾铎, 张崇良, 等. 基于 Tweedie-GAM 模型研究海州湾小黄鱼资源丰度与栖

- 息环境的关系. 海洋学报, 2019, 41(12): 78–89]
- ZHANG Y Q, XIAN W W, LI W L. FzsZish assemblage structure in adjacent sea of Changjiang estuary in spring of 2004 and 2007 and its association with environmental factors. Periodical o Ocean University of China (Natural Science), 2013, 43(9): 67–74 [张迎秋, 线薇薇, 李文龙. 2004 和 2007 年春季长江口近海鱼类群落特征及其与环境因子的关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(9): 67–74]
- ZHANG Y X, BIAN X D, SHAN X J, *et al.* Spatio-temporal distribution of spawning grounds of chub mackerel (*Scomber japonicas*) and its relationship with environmental factors in Yantai-Weihai offshore waters and adjacent sea area. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(4): 618–632 [张雨轩, 卞晓东, 单秀娟, 等. 烟威近岸海域鲈产卵场时空分布及其与环境因子的关系. 中国水产科学, 2022, 29(4): 618–632]
- ZHU W B, ZHU H C, ZHANG Y Z, *et al.* Quantitative distribution of juvenile *Engraulis japonicus* and the relationship with environmental factors along the Zhejiang coast. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(9): 1175–1183 [朱文斌, 朱海晨, 张亚洲, 等. 浙江沿岸日本鳀幼鱼数量分布及其与环境因子的关系. 中国水产科学, 2021, 28(9): 1175–1183]

(编辑 冯小花)

Distribution Patterns and Influencing Factors of *Engraulis japonicus* Spawning Grounds in Offshore Waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea

CUI Peidong^{1,3}, BIAN Xiaodong^{1,2①}, ZHANG Yuxuan^{1,2},
SHAN Xiujuan^{1,2}, JIN Xianshi^{1,2}, WANG Huibin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Qingdao 266071, China;

2. National Field Observation and Research Center for Fisheries Resources in Changdao Waters, Yantai 265800, China;

3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract The ichthyoplankton stage is the stage that is most vulnerable to changes in the marine environment in the development cycle of marine fish. Subtle changes in the marine environment have a strong impact on fish survival, development, and growth. The abundance of fish eggs directly affects the early recruitment of fish resources and determines the vitality of generations. As one of the important spawning grounds of *Engraulis japonicus*, it is of great significance to understand the distribution patterns and relationship between environmental factors in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea. Based on the spawning grounds survey carried out in offshore waters of the North Yellow Sea from April to December, 2021, first, Garrison's distribution center of gravity was used to analyze the core spawning ground of *E. japonicus* and its migration route. Second, a generalized additive model based on Tweedie distribution (Tweedie-GAM) was applied to convey the main drivers of the distribution patterns of the spawning grounds. The relationship between *E. japonicus* egg density and six natural environment factors of seawater surface temperature (SST), seawater surface salinity (SSS), seawater surface chlorophyll *a* concentration, zooplankton abundance, phytoplankton abundance, and depth, as well as the factors of time (month) and space (longitude and latitude) were interpreted. Finally, the cross-validation method was used to validate the model and predict the potential spawning grounds. The results showed that the spawning period of *E. japonicus* was long, lasting from April to November, and the main

① Corresponding author: BIAN Xiaodong, E-mail: bianxd@ysfri.ac.cn

spawning period was from May to August, with peak spawning from late May to early June, in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea. During the spawning season, the size and location of the *E. japonicus* spawning grounds showed obvious spatiotemporal variation. There was a significant nonlinear correlation between spatiotemporal factors and the density distribution of *E. japonicus* eggs. Although spatiotemporal factors were the main drivers of the spatiotemporal variation of the density distribution of *E. japonicus* eggs, these factors did not directly affect their distribution pattern. Rather, spatiotemporal factors indirectly affected the concentration distribution of *E. japonicus* eggs through SST, SSS, and depth. The optimal temperature range for the spawning of *E. japonicus* was wide, and the distribution of spawning grounds indicated a synergistic effect under low temperatures and low salinity and an inhibitory effect under high temperatures and low salinity. During the early spawning season in April, the central spawning ground was located in the deep waters southeast of Haiyang Island. Alongside continuously rising water temperatures, both the size of the spawning ground and the concentration distribution of *E. japonicus* eventually reached their annual peaks between late May to early June, thus, constituting the peak spawning season. During this period, the central spawning ground was located around Shicheng Island and the Yingna River estuary. From June, however, water salinity decreased along the southern coast of the Liaoning Peninsula due to increasing coastal freshwater runoff. The inhibiting effect of higher temperatures and lower salinity drove the spawning fish away from the coastal waters and into deeper offshore sea areas. The *E. japonicus* spawning grounds, thus, migrated further offshore with SSS as the dominant factor driving this migration. As autumn and winter arrived, the spawning activity of *E. japonicus* gradually ended. *E. japonicus* eggs were sparsely scattered in the investigated sea area during October. In November, large numbers of *E. japonicus* began gathering in the center of the investigated sea area and gradually migrated further southward to their wintering habitat. Accordingly, no *E. japonicus* eggs were collected during the month of December. The main spawning grounds of *E. japonicus* were located in the coastal waters of Shicheng Island and the Yingna Estuary, and gradually showed a contraction trend after July with the gradual weakening of *E. japonicus* spawning activities. Overall, from April to December 2021, the distribution of *E. japonicus* eggs in offshore waters of the Liaoning Province in the North Yellow Sea showed a migration trend from the southern offshore deep water area to the northern offshore shallow water area, and then to the southwestern offshore deep water area. This study elucidated the spatial and temporal distribution patterns of *E. japonicus* spawning grounds and its influencing factors, which indicated that the Tweedie-GAM method could be effectively applied to analyze the relationship between the early fish resources and environmental factors. This method showed good performance in solving 0-value problems. The results provide a scientific basis for the conservation and management of *E. japonicus* spawning grounds in the North Yellow Sea, assist with evaluation of the current situation and development trend of *E. japonicus* resources in the sea area, and provide an important reference for the rational development and utilization of *E. japonicus* resources and research on spawning ground protection strategies.

Key words *Engraulis japonicus*; Spawning ground; Main spawning period; Tweedie-GAM; North Yellow Sea

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230309002

http://www.yykxjz.cn/

孙威, 吴文广, 刘毅, 仲毅, 王新萌, 张继红. 温度、光照强度和光照周期对铜藻有机碳释放速率的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 46–54
SUN W, WU W G, LIU Y, ZHONG Y, WANG X M, ZHANG J H. The effects of temperature, light intensity, and photoperiod on the organic carbon release rate of *Sargassum horneri* seaweed. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 46–54

温度、光照强度和光照周期对 铜藻有机碳释放速率的影响*



孙威^{1,2} 吴文广² 刘毅² 仲毅² 王新萌² 张继红^{2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071)

摘要 为探究铜藻(*Sargassum horneri*)的有机碳释放速率、与净初级生产力(NPP)之间的关系及主要的调控因素等问题,本研究采用三变量三水平的正交实验,测定铜藻在不同温度(5、15和25℃)、光照[86、172和258 μmol/(m²·s)]和光照周期(L:D=6 h:18 h、L:D=12 h:12 h、L:D=24 h:0 h, L表示光照时长, D表示黑暗时长)条件下溶解有机碳(DOC)、颗粒有机碳(POC)的释放速率和初级生产力。结果显示, DOC和 POC 释放速率的范围分别为 0.653~4.785 mg/(g·h)和 0.066~0.322 mg/(g·h); 温度和光照强度分别是铜藻释放 DOC和 POC的主要调控因素; 铜藻在高温、中光、L:D=6 h:18 h条件下的 DOC 释放速率最高[4.785 mg/(g·h)], 在高温、高光、L:D=24 h:0 h条件下的 POC 释放速率最高[0.322 mg/(g·h)]; 铜藻释放的 DOC和 POC占 NPP的比值分别为 4%~130%和 0.4%~5.9%; DOC 释放速率与 NPP 之间存在负相关关系, POC 释放速率与 NPP 之间无明显相关性。研究结果为深入了解铜藻的生理生态学特性及其对沿海生态系统碳循环的影响提供了科技支撑。

关键词 铜藻; 净初级生产力; 溶解有机碳; 颗粒有机碳

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0046-09

大型藻类能够以有机碳的形式释放光合作用产物,其中,能通过 0.7 μm 孔径滤膜过滤的部分被定义为溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC),滤膜截留部分则称之为颗粒有机碳(particulate organic carbon, POC) (Baines *et al*, 1991; Pagano *et al*, 2014)。大型海藻是沿海生态系统的重要组成部分,其固碳能力强、效率高,作为沿海地区的主要初级生产者,其净初级生产力(net primary productivity, NPP)大于浮游植物等其他生产者(Charpy-Roubaud *et al*, 1990;

Krause-Jensen *et al*, 2016)。海藻生长过程中释放的 DOC和 POC能在沿海生态系统的碳循环和碳封存中发挥重要作用(Jiao *et al*, 2010; 张永雨等, 2017; Weigel *et al*, 2021)。温度、光照强度和光照周期是影响藻类生长、调控有机碳释放的重要环境因素(Wada *et al*, 2007; Reed *et al*, 2015; 李科等, 2017)。关于大型海藻释放有机碳的结果差异较大。已有报道显示, 苔苔(*Ecklonia cava*) DOC 释放速率范围为 0.05~0.24 mg/(g·h) (Wada *et al*, 2007); 坛紫菜(*Pyropia haitanensis*) DOC 释

* 科学技术部重点研发计划(2020YFA0607603)、国家自然科学基金委员会-山东省人民政府联合基金(U1906216)、山东省自然科学基金(ZR2022QD035)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项(20603022022012; 20603022022024)共同资助。孙威, E-mail: sunw4101998@163.com

① 通信作者: 张继红, 研究员, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-03-09, 收修改稿日期: 2023-03-27

放速率范围为 0~1.67 mg/(g·h), POC 的释放速率低于 0.005 mg/(g·h) (Xu *et al.*, 2022); 角叉菜(*Chondrus ocellatus*) 和亨氏马尾藻(*Sargassum henslowianum*)等 11 种大型海藻的 DOC 释放速率为 0~7 mg C/(g·h), POC 释放速率为 0~17 mg C/(g·h) (Chen *et al.*, 2020)。同一种海藻, 因产地来源不同, 其有机碳的释放速率也有差异, 最高可相差约 10 倍(Chen *et al.*, 2020)。不同种类海藻释放的 DOC 与 NPP 之间的比例也不相同, 如坛紫菜释放的 DOC 仅占 NPP 的 6.3%~25.7% (Xu *et al.*, 2022), 苔苔则为 18%~62% (Wada *et al.*, 2007), 鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)经干燥胁迫, 再复水后, DOC 的释放速率要高于 NPP (Zhao *et al.*, 2022)。

近年在黄海海域暴发的以铜藻(*Sargassum horneri*) 为主要致灾种的马尾藻金潮引起了广泛关注(郑龙啸等, 2022)。金潮暴发越来越频繁, 影响范围越来越广, 已经成为继浒苔(*Enteromorpha*)绿潮之后的又一近海大型海藻灾害(Caselle *et al.*, 2018; 王丹等, 2021)。铜藻在生长时能释放大量的 DOC 和 POC, 这些 DOC 和 POC 可能对沿海生态系统的碳循环产生较大的影响(张永雨等, 2017)。目前, 大型海藻有机碳的释放速率、与初级生产力之间的关系及主要调控因素等问题尚不完全清楚, 尤其是缺少关于铜藻释放有机碳的研究。因此, 本研究以野生铜藻为对象, 通过室内正交实验, 探究温度、光照和光照周期对铜藻释放有机碳的影响, 以期了解不同因素对铜藻释放有机碳的调控效应、有机碳的释放速率、有机碳释放速率与初级生产力之间的关系等问题, 为深入了解铜藻的生理生态学特性及其对沿海生态系统碳循环的影响提供科技支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料与预处理

实验铜藻于 2021 年底取自山东省荣成市桑沟湾养殖区。铜藻在取样后冷藏运输至实验室, 在循环水养殖系统中暂养 3 d 后, 用于实验, 暂养水温设置为 20 °C。用 0.8 μm 孔径的混合纤维滤膜过滤海水, 用于后续实验。实验开始前, 采用过滤海水清洗铜藻, 去除铜藻表层的附着物。

1.2 实验设计

铜藻生长的适宜温度为 7.1~20.5 °C(孙建璋等, 2009)。光照强度小于 200 μmol/(m²·s)时, 铜藻 NPP 与光照强度之间线性关系显著, 光照强度大于 200 μmol/(m²·s)时, 线性关系不显著(刘婷, 2019)。基于此, 设置温度和光照水平, 具体实验设计见表 1。本实验共设温

度、光照强度和光照周期 3 个变量, 每个变量设 3 个水平, 分别为低温(5 °C)、中温(15 °C)、高温(25 °C); 低光[86 μmol/(m²·s)]、中光[172 μmol/(m²·s)]、高光[258 μmol/(m²·s)]; 光照周期 L : D=6 h : 18 h、L : D=12 h : 12 h、L : D=24 h : 0 h。实验容器为 2 L 锥形瓶, 加入铜藻(3~5 g/L), 实验持续 24 h, 实验中, 光照与黑暗的交替顺序为先黑暗后光照。所有实验组均设 3 个平行, 对照组设 2 个平行。

在实验开始(0 h)和结束(24 h)时, 分别取 200 mL 水样用于 DOC 和 POC 浓度分析, 取样前, 采用 Winkler 碘量法测量水体的溶解氧(DO)浓度。水样经 0.7 μm 孔径 WhatmanTM 滤膜(450 °C 预处理 4 h)过滤后, 滤液分装在 30 mL 棕色玻璃瓶内, 用于 DOC 浓度分析; 滤膜用锡纸包裹, 用于 POC 浓度分析。所有样品在分析前均于 -20 °C 避光冷冻保存。所有实验用玻璃器皿使用前均酸洗、水洗、纯水润洗、烘干。

表 1 L₉(3⁴)正交实验设计表
Tab.1 Orthogonal experimental design of L₉(3⁴)

| 实验组 Group | 温度 Temperature/°C | 光照强度 Light intensity/ [μmol/(m ² ·s)] | 光照周期(L : D) Photoperiod |
|--------------|----------------------|--|----------------------------|
| 1 | 5 | 86 | 6 h : 18 h |
| 2 | 5 | 172 | 24 h : 0 h |
| 3 | 5 | 258 | 12 h : 12 h |
| 4 | 15 | 172 | 12 h : 12 h |
| 5 | 15 | 258 | 6 h : 18 h |
| 6 | 15 | 86 | 24 h : 0 h |
| 7 | 25 | 258 | 24 h : 0 h |
| 8 | 25 | 86 | 12 h : 12 h |
| 9 | 25 | 172 | 6 h : 18 h |

1.3 样品分析

DOC 测定: 使用日本岛津 TOC-LCSH 总有机碳分析仪测定样品的 DOC 含量。POC 测定: 使用德国 ELEMENTAR 元素分析仪测定样品的 POC 含量。

1.4 计算方法与数据处理

通过实验前后水体 DO 浓度的变化来计算铜藻的 NPP, 计算公式为:

$$NPP = \frac{\Delta O_2}{W \times t} \times \frac{12}{32}$$

式中, NPP 为铜藻干质量的净初级生产力[mg C/(g·h)], ΔO₂ 为实验前后水体 DO 的质量变化, 12/32 为 C 与 O₂ 的相对分子质量比, W 为实验铜藻的干重(g); t 为实验时长(h)。

有机碳(DOC、POC)释放速率(rate, R)指单位质量铜藻(干重)在单位时间内引起的水体有机碳(DOC、POC)含量的变化。

$$R = \frac{\Delta C \times V}{W \times t} \times \frac{12}{32}$$

式中, R 为单位质量铜藻(干重)的 DOC (POC) 释放速率[mg/(g·h)], ΔC 为实验前后 DOC (POC) 浓度变化量(mg/L); V 为实验组海水体积(L); W 为实验铜藻的干重(g); t 为实验时长(h)。

直观分析法是通过通过对每个因素均值的极差来进行结果分析(滕海英等, 2008)。通过极差可判断影响实验结果的主要因素和次要因素, 可通过直观分析表找到各因素水平的最优组合。直观分析表中的 \bar{K}_1 、 \bar{K}_2 和 \bar{K}_3 分别表示在各因素、各水平下实验结果(NPP、DOC 和 POC)的平均值, 可据此确定实验结果最大时对应的因素水平。 R 表示同一因素在不同水平下实验结果平均值的极差, R 值可表征该因素水平的变动对实验结果影响的大小。

2 实验结果

2.1 铜藻的净初级生产力(NPP)

铜藻的 NPP 的实验结果见表 2。不同条件下, 铜藻 NPP 在 2.785~21.190 mg C/(g·h)之间。直观分析结果显示, 本研究中, 温度是 NPP 的主要影响因素, 光照强度对 NPP 的影响最小。各因素在不同水平下

对 NPP 影响的顺序为 15 °C>25 °C>5 °C, 24 h : 0 h>12 h : 12 h>6 h : 18 h, 高光>中光>低光。由此得出, 铜藻 NPP 最高的条件组合为 15 °C、L : D=24 h : 0 h、高光。

2.2 铜藻释放 DOC 的实验结果分析

2.2.1 温度、光照强度和光照周期对 DOC 释放速率的影响 铜藻释放 DOC 的实验结果见表 3。不同条件下, 铜藻 DOC 的释放速率在 0.653~4.785 mg/(g·h)之间。直观分析结果显示, 铜藻 DOC 释放速率最高的条件组合为 25 °C、L : D=6 h : 18 h、中光。温度、光照强度和光照周期对铜藻 DOC 释放速率的影响由强到弱依次为温度、光照强度、光照周期。在实验温度范围内, DOC 的释放速率随温度的升高而增大; DOC 的释放速率随着光照强度的增加表现为先升高再降低的趋势; 光照时间越少释放速率就越高。

2.2.2 铜藻释放的 DOC 与 NPP 之间的关系

DOC/NPP 的值见图 1a。实验结果显示, 不同条件下, 铜藻释放的 DOC 占 NPP 的比例为 4%~130%。其中, 共计 5 组占比低于 10%, 3 组占比为 20%~42%, 1 组占比超过 100% (129.5%)。图 1b 显示, DOC 释放速率与 NPP 之间存在负相关关系(实验组 1 和 3 不符合此规律)。

2.3 铜藻释放 POC 的实验结果分析

2.3.1 温度、光照强度和光照周期对 POC 释放速率的影响 铜藻释放 POC 的实验结果见表 4。不同条

表 2 净初级生产力结果直观分析及最优条件

Tab.2 Visual analysis of NPP results and optimal conditions

| 实验组 Group | 误差项 Error term | 温度 Temperature/°C | 光照强度 Light intensity/[$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] | L : D | 净初级生产力 NPP/[mg C/(g·h)] |
|------------------------|-------------------|----------------------|---|--------------|----------------------------|
| 1 | 1 | 5 | 86 | 6 h : 18 h | 2.785±0.339 |
| 2 | 2 | 5 | 172 | 24 h : 0 h | 14.678±0.992 |
| 3 | 3 | 5 | 258 | 12 h : 12 h | 3.545±0.793 |
| 4 | 1 | 15 | 172 | 12 h : 12 h | 16.612±1.217 |
| 5 | 2 | 15 | 258 | 6 h : 18 h | 18.058±1.967 |
| 6 | 3 | 15 | 86 | 24 h : 0 h | 16.430±1.083 |
| 7 | 1 | 25 | 258 | 24 h : 0 h | 21.190±1.653 |
| 8 | 2 | 25 | 86 | 12 h : 12 h | 9.223±0.694 |
| 9 | 3 | 25 | 172 | 6 h : 18 h | 3.694±0.124 |
| \bar{K}_1 | 13.529±1.070 | 7.003±0.708 | 9.479±0.705 | 8.179±0.810 | |
| \bar{K}_2 | 17.493±1.287 | 17.033±1.422 | 11.661±0.778 | 9.793±0.901 | |
| \bar{K}_3 | 17.975±1.537 | 11.369±0.824 | 14.264±1.471 | 17.433±1.243 | |
| R | | 10.030±0.714 | 4.785±0.766 | 9.254±0.433 | |
| 最优条件 Optimal condition | | 15 | 258 | 24 h : 0 h | |

表 3 DOC 结果直观分析及最优条件
Tab.3 Visual analysis of DOC results and optimal conditions

| 实验组 Group | 误差项 Error term | 温度 Temperature/°C | 光照强度 Light intensity/[$\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] | L : D | DOC 释放速率 DOC release rate/[mg/(g·h)] |
|------------------------|-------------------|----------------------|---|-------------|---|
| 1 | 1 | 5 | 86 | 6 h : 18 h | 0.653±0.066 |
| 2 | 2 | 5 | 172 | 24 h : 0 h | 1.050±0.083 |
| 3 | 3 | 5 | 258 | 12 h : 12 h | 1.488±0.331 |
| 4 | 1 | 15 | 172 | 12 h : 12 h | 1.438±0.413 |
| 5 | 2 | 15 | 258 | 6 h : 18 h | 1.198±0.296 |
| 6 | 3 | 15 | 86 | 24 h : 0 h | 1.595±0.495 |
| 7 | 1 | 25 | 258 | 24 h : 0 h | 0.917±0.093 |
| 8 | 2 | 25 | 86 | 12 h : 12 h | 2.421±0.165 |
| 9 | 3 | 25 | 172 | 6 h : 18 h | 4.785±0.798 |
| \bar{K}_1 | 1.003±0.191 | 1.064±0.160 | 1.556±0.242 | 2.212±0.387 | |
| \bar{K}_2 | 1.135±0.196 | 1.410±0.401 | 2.424±0.431 | 1.782±0.303 | |
| \bar{K}_3 | 1.055±0.157 | 2.708±0.352 | 1.201±0.240 | 1.187±0.224 | |
| R | | 1.644±0.192 | 1.223±0.191 | 1.025±0.163 | |
| 最优条件 Optimal condition | | 25 | 172 | 6 h : 18 h | |

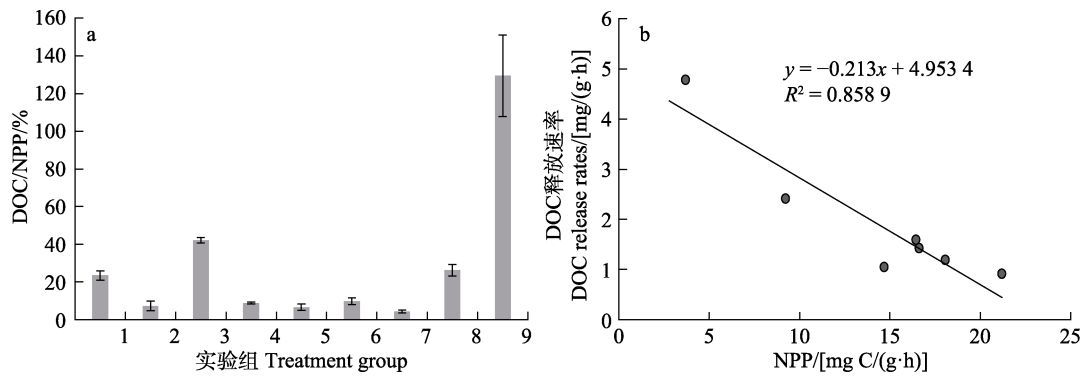


图 1 DOC/NPP 的值(a)与 DOC 释放速率随 NPP 的变化趋势(b)
Fig.1 The ratio of DOC/NPP (a) and the trend of DOC release rate with NPP (b)

表 4 POC 结果直观分析及最优条件
Tab.4 Visual analysis of POC results and optimal conditions

| 实验组 Group | 误差项 Error term | 温度 Temperature/°C | 光照强度 Light intensity/[$\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] | L : D | POC 释放速率 POC release rate/[mg/(g·h)] |
|------------------------|-------------------|----------------------|---|-------------|---|
| 1 | 1 | 5 | 86 | 6 h : 18 h | 0.165±0.008 |
| 2 | 2 | 5 | 172 | 24 h : 0 h | 0.231±0.031 |
| 3 | 3 | 5 | 258 | 12 h : 12 h | 0.149±0.009 |
| 4 | 1 | 15 | 172 | 12 h : 12 h | 0.190±0.008 |
| 5 | 2 | 15 | 258 | 6 h : 18 h | 0.074±0.004 |
| 6 | 3 | 15 | 86 | 24 h : 0 h | 0.083±0.005 |
| 7 | 1 | 25 | 258 | 24 h : 0 h | 0.322±0.025 |
| 8 | 2 | 25 | 86 | 12 h : 12 h | 0.066±0.005 |
| 9 | 3 | 25 | 172 | 6 h : 18 h | 0.182±0.019 |
| \bar{K}_1 | 0.226±0.014 | 0.182±0.016 | 0.105±0.006 | 0.140±0.010 | |
| \bar{K}_2 | 0.248±0.021 | 0.116±0.006 | 0.201±0.019 | 0.135±0.007 | |
| \bar{K}_3 | 0.209±0.020 | 0.190±0.016 | 0.182±0.013 | 0.212±0.020 | |
| R | | 0.074±0.010 | 0.096±0.013 | 0.077±0.013 | |
| 最优条件 Optimal condition | | 25 | 172 | 24 h : 0 h | |

件下,铜藻 POC 的释放速率为 0.066~0.322 mg/(g·h)。直观分析结果显示,铜藻 POC 释放速率最高的条件组合为 25℃、L:D=24 h:0 h、中光。低温(5℃)、高温(25℃)、延长光照时长都会促进 POC 的释放。增加光照强度可以加快 POC 释放速率,但当光照强度从中光增至高光时,POC 释放速率反而有大幅度下降。

2.3.2 铜藻释放的 POC 与 NPP 之间的关系

POC/NPP 的见图 2。实验结果显示,不同条件下,铜藻释放的 POC 占 NPP 的比例为 0.4%~5.9%。其中,共计 6 组占比低于 2%,3 组占比为 4%~5.9%。

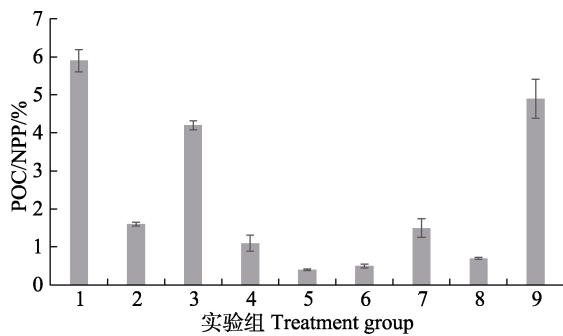


图 2 POC 占 NPP 的比例
Fig.2 The ratio of POC to NPP

3 讨论

3.1 DOC 和 POC 的释放速率

本研究发现,室内实验中的 DOC 和 POC 释放速率分别在 0.653~4.785 mg/(g·h)和 0.066~0.322 mg/(g·h)之间。铜藻的 DOC 释放速率与之前报道的其他马尾藻的 DOC 释放速率相近(Chen *et al*, 2020),并高于绿藻、红藻和其他褐藻等大型藻类的 DOC 释放速率(Paine *et al*, 2021)。铜藻 DOC/NPP 在 4%~42%之间(实验组 9 除外),其 DOC 的释放能力基本符合以往研究中人们对大型藻类的认识(Wada *et al*, 2007; Watanabe *et al*, 2020; Xu *et al*, 2022)。该结果能为精确评估铜藻在不同环境、不同生长时期的有机碳释放通量提供科技支撑。

3.2 温度、光照强度和光照周期对 DOC 和 POC 释放速率的影响

本研究表明,温度会显著影响铜藻释放 DOC 和 POC 的能力,温度与铜藻 DOC 释放速率之间正相关,与 POC 释放速率之间表现为胁迫释放。以往对苔的研究支持这一结果,即当温度适合苔生长时,其 DOC 的释放量增加、POC 释放量减少(Wada *et al*,

2007)。Barrón 等(2014)在对海草甸的研究中也有温度与 DOC 释放速率正相关相似发现。

以往的研究显示,海带(*Saccharina japonica*)和坛紫菜等大型海藻的 DOC 释放速率与光照强度正相关(尼志杰等, 2022; Xu *et al*, 2022)。然而,本研究中,铜藻释放 DOC 的速率与光照之间的关系与之前的研究有所差异。对于铜藻来说,光照与 DOC 释放速率呈正相关可能只存在于某些特定的光照强度区间内,当光照强度超出该区间时,则没有相关性或表现出负相关。因此,可以合理地推断,不同种海藻 DOC 释放速率对光照强度变化的响应程度不同。由于本研究中光照强度水平设置较少,无法准确判断该推论是否成立,故还需通过开展多光照强度梯度的单因素实验去进一步论证。另外,在针对光照周期的研究中发现,一个光照周期中,黑暗时间越长,DOC 释放速率越高。之前的研究表明,环境压力(低 pH、低营养盐、缺水、高温和强光等)是海藻释放 DOC 的驱动因素,海藻在生长过程中面临环境压力时,会出现细胞膜损伤、渗透压升高甚至组织腐烂等情况,细胞膜损伤会引起细胞内容物的大量泄漏(Thornton *et al*, 2014; Zhao *et al*, 2022; Xu *et al*, 2022)。当藻类处于低营养盐胁迫时,光合固碳速率大于其他大分子物质的合成速率,过量的光合产物会被主动释放到细胞外(Fogg, 1983)。在本研究中,光照时间作为铜藻的生长要素之一,光照时间越短,为铜藻带来的生长压力越大。因此,光照时间与 DOC 的释放速率负相关。在黑暗条件下,铜藻的呼吸作用能够同时降低海水的 pH 和 DO。已有研究证实, pH 降低能够促进大型藻类释放 DOC (Iñiguez *et al*, 2016; Diaz-Pulido *et al*, 2020)。然而,并非所有的大型藻类释放 DOC 都受 pH 的影响,如 Paine 等(2021)对边花昆布(*Ecklonia radiata*)、边缘勒诺曼藻(*Lenormandia marginata*)和拉绒石菜(*Plocamium cirrhosum*) 3 种大型藻类的研究发现, pH 的降低并不会影响其释放 DOC 的速率。因此,不能排除 DO 降低影响 DOC 释放的可能,故还需单独开展实验分别探究降低 pH 和降低 DO 对海藻释放 DOC 的影响。以上结果表明,铜藻释放有机碳的机制复杂,受温度、光照强度和光照周期等多种因素影响。本研究为后续铜藻释放有机碳的研究奠定了基础,也可为其他海藻释放有机碳的研究提供参考。

3.3 DOC 和 POC 释放速率与 NPP 之间的关系

在 DOC 释放量与 NPP 之间的关系的研究中,有人提出“光合产物扩散假说”(Fogg, 1983; Marañón *et al*,

2005; Weigel *et al.*, 2021), 认为 DOC 释放量与光合作用的固碳量成正比, 即 DOC 释放量占 NPP 的比值应相对恒定。李科等(2017)研究显示, 在 1 个光照周期内, 光照时间越长, 铜藻的 NPP 越高, 在 L : D=24 h : 0 h 时, NPP 最高。为探究铜藻在长光照周期条件下的 DOC 释放情况, 本研究设置了连续光照(L : D=24 h : 0 h) 实验。研究发现, 在连续光照条件下, 铜藻具有最高的 NPP 和最低的 DOC 释放速率, 即铜藻释放 DOC 不符合“光合产物扩散假说”。此外, 本研究结果表明, 铜藻的 DOC 释放速率与 NPP 之间呈负相关关系, 但 5 °C 实验组中的 DOC 释放速率与 NPP 之间的负相关性不显著。这可能是由于铜藻酶活性低、代谢缓慢, 细胞膜的通透性并未发生改变或改变幅度较小, 从而导致低温条件下, 铜藻的 DOC 释放速率和 NPP 均处于较低水平, 再加上受到其他因素多重胁迫, 铜藻的生理状态受到影响, 致使细胞膜的通透性发生改变, 细胞内容物更容易被释放出来。所以, 在低温抑制 NPP 的条件下, 铜藻的 DOC 释放速率并未得到显著提高。本研究发现, 实验组 9 中 DOC/NPP>100%, 这一结果可能是由于铜藻面临高温和长时间黑暗双重环境压力时, 其生理状态受到严重胁迫, DOC 大量释放的同时光合速率远低于适宜条件下的光合速率等因素共同造成的。

本研究发现, 铜藻的 POC 释放速率与 NPP 之间无显著的相关性, POC/NPP (0.4%~5.9%)与鼠尾藻和坛紫菜相近, 低于其他种马尾藻(Chen *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021)。当 NPP 相对较高[>9 mg C/(g·h)]时, POC/NPP 相对稳定, 约为(1±0.6)%; 当 NPP 相对较低[<4 mg C/(g·h)]、处于生长逆境时, POC/NPP 则会升高至 4%~6%。已有研究发现, POC 的释放速率有随生长率增加而增加的趋势, 但二者间的相关性较弱(Chen *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2022)。本研究发现, 增加光照强度或光照时长都能提高 NPP 和促进 POC 的释放, 即 POC 释放速率随光照变化的趋势与 NPP 随光照变化的趋势基本相同。本研究还发现, 铜藻在 5 °C 时, NPP 最低, 25 °C 时, NPP 最高, 但是铜藻在 5 °C 和 25 °C 时, POC 均有较高的释放速率。低温抑制 NPP、促进 POC 释放的结论已在浮游植物中得到验证(Watanabe, 1980; Verity, 1981)。据此可以合理推测, 光照变化是观察到 POC 释放速率与生长率之间有相关性的主要原因, 温度变化则是导致二者间相关性较弱的内在原因。明确 DOC/NPP 和 POC/NPP 的范围区间, 有助于初步估算金潮发生时, 铜藻对沿海生态系统碳循环的贡献。

参 考 文 献

- BAINES S B, PACE M L. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. *Limnology and Oceanography*, 1991, 36(6): 1078–1090
- BARRÓN C, APOSTOLAKI E T, DUARTE C M. Dissolved organic carbon fluxes by seagrass meadows and macroalgal beds. *Frontiers in Marine Science*, 2014, 1: 42
- CASELLE J E, DAVIS K, MARKS L M. Marine management affects the invasion success of a non-native species in a temperate reef system in California, USA. *Ecology letters*, 2018, 21(1): 43–53
- CHARPY-ROUBAUD C, SOURNIA A. The comparative estimation of phytoplanktonic, microphytobenthic and macrophytobenthic primary production in the oceans. *Marine Microbial Food Webs*, 1990, 4(1): 31–57
- CHEN S W, XU K, JI D H, *et al.* Release of dissolved and particulate organic matter by marine macroalgae and its biogeochemical implications. *Algal Research*, 2020, 52: 102096
- DIAZ-PULIDO G, BARRÓN C. CO₂ enrichment stimulates dissolved organic carbon release in coral reef macroalgae. *Journal of Phycology*, 2020, 56(4): 1039–1052
- FOGG G E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina*. 1983, 26(1), 3–14
- IÑIGUEZ C, CARMONA R, LORENZO M R, *et al.* Increased CO₂ modifies the carbon balance and the photosynthetic yield of two common Arctic brown seaweeds: *Desmarestia aculeata* and *Alaria esculenta*. *Polar Biology*, 2016, 39: 1979–1991
- JIAO N Z, HERNDL G J, HANSELL D A, *et al.* Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: Long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 593–599
- KRAUSE-JENSEN D, DUARTE C M. Substantial role of macroalgae in marine carbon sequestration. *Nature Geoscience*, 2016, 9(10): 737–742
- LI K, PAN Y R, WU J P, *et al.* Effect of LED lightings on growth of *Sargassum horneri* under different photoperiods. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(4): 631–636 [李科, 潘耀茹, 吴嘉平, 等. 不同光照周期下 LED 光源对铜藻生长的影响. *浙江农业学报*, 2017, 29(4): 631–636]
- LIU T. Study on the physiological effects and mechanism of important environmental factors on golden tide causative species *Sargassum horneri*. Master's Thesis of Wenzhou University, 2008 [刘婷. 金潮原因种铜藻(*Sargassum horneri*)对关键环境因子的生理响应与机理解析. 温州大学硕士研究生学位论文, 2019]
- MARAÑÓN E, CERMEÑO P, PÉREZ V. Continuity in the

- photosynthetic production of dissolved organic carbon from eutrophic to oligotrophic waters. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, 299: 7–17
- NI Z J, LI B, SUN Y Q, *et al.* Effects of light intensity and nutrients on dissolved organic carbon released from *Saccharina japonica* young seedling. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(5): 8–15 [尼志杰, 李斌, 孙琰晴, 等. 光照强度和营养盐对海带幼苗释放溶解有机碳的影响. *渔业科学进展*, 2022, 43(5): 8–15]
- PAGANO T, BIDA M, KENNY J E. Trends in levels of allochthonous dissolved organic carbon in natural water: A review of potential mechanisms under a changing climate. *Water*, 2014, 6(10): 2862–2897
- PAINE E R, SCHMID M, BOYD P W, *et al.* Rate and fate of dissolved organic carbon release by seaweeds: A missing link in the coastal ocean carbon cycle. *Journal of Phycology*, 2021, 57(5): 1375–1391
- REED D C, CARLSON C A, HALEWOOD E R, *et al.* Patterns and controls of reef-scale production of dissolved organic carbon by giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Limnology and Oceanography*, 2015, 60(6): 1996–2008
- SUN J Z, ZHUANG D G, SUN Q H, *et al.* Artificial cultivation trials of *Sargassum horneri* at Nanji islands of China. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(6): 41–46 [孙建璋, 庄定根, 孙庆海, 等. 铜藻人工栽培的初步研究. *南方水产*, 2009, 5(6): 41–46]
- TENG H Y, ZHU G Q, HUANG P, *et al.* Orthogonal experimental design case analysis. *Pharmaceutical Care and Research*, 2008, 8(1): 75–76 [滕海英, 祝国强, 黄平, 等. 正交试验设计实例分析. *药学服务与研究*, 2008, 8(1): 75–76]
- THORNTON D C O. Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. *European Journal of Phycology*, 2014, 49(1): 20–46
- VERITY P G. Effects of temperature, irradiance, and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus danicus* Cleve. I. Photosynthesis and cellular composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1981, 55(1): 79–91
- WADA S, AOKI M N, TSUCHIYA Y, *et al.* Quantitative and qualitative analyses of dissolved organic matter released from *Ecklonia cava* Kjellman, in Oura Bay, Shimoda, Izu Peninsula, Japan. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 349(2): 344–358
- WANG D, JIANG Y F, WANG X Q, *et al.* Research progress in ecological dynamics of golden tide dominated by *Sargassum*. *Advances in Earth Science*, 2021, 36(7): 753–762 [王丹, 姜亦飞, 王先桥, 等. 我国马尾藻金潮生态动力学研究进展. *地球科学进展*, 2021, 36(7): 753–762]
- WATANABE K, YOSHIDA G, HORI M, *et al.* Macroalgal metabolism and lateral carbon flows can create significant carbon sinks. *Biogeosciences*, 2020, 17(9): 2425–2440
- WATANABE Y. A study of the excretion and extracellular products of natural phytoplankton in Lake Nakanuma, Japan. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 1980, 65(6): 809–834
- WEIGEL B L, PFISTER C A. The dynamics and stoichiometry of dissolved organic carbon release by kelp. *Ecology*, 2021, 102(2): e03221
- XU K, LI M Y, WANG W L, *et al.* Differences in organic carbon release between conchocelis and thalli of *Pyropia haitanensis* and responses to changes in light intensity and pH. *Algal Research*, 2022, 61: 102574
- ZHANG Y Y, ZHANG J H, LIANG Y T, *et al.* Carbon sequestration processes and mechanisms in coastal mariculture environments in China. *Science China Earth Sciences*, 2017, 47(12): 1414–1424 [张永雨, 张继红, 梁彦韬, 等. 中国近海养殖环境碳汇形成过程与机制. *中国科学: 地球科学*, 2017, 47(12): 1414–1424]
- ZHAO Z F, ZHONG Z H, WANG X, *et al.* Effects of desiccation and rehydration on carbon fixation and DOC release in *Sargassum thunbergii*. *Aquatic Botany*, 2022, 179: 103516
- ZHENG L X, WU M Q, ZHAO J, *et al.* Remote sensing monitoring and temporal and spatial distribution characteristics of gold tide in the South Yellow Sea. *Haiyang Xuebao*, 2022, 44(5): 12–24 [郑龙啸, 吴孟泉, 赵杰, 等. 南黄海金潮的遥感监测及时空分布特征研究. *海洋学报*, 2022, 44(5): 12–24]

(编辑 马瑾艳)

The Effects of Temperature, Light Intensity, and Photoperiod on the Organic Carbon Release Rate of *Sargassum horneri* Seaweed

SUN Wei^{1,2}, WU Wenguang², LIU Yi², ZHONG Yi², WANG Xinmeng², ZHANG Jihong^{2①}

(1. School of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China)

Abstract The ocean is the largest carbon pool on earth and plays an important role in the global carbon cycle. Marine organisms contribute over half of the global carbon fixed by photosynthesis every year. Therefore, much attention has been paid to the role of the ocean in the carbon cycle and carbon sequestration. Macroalgae are an important component of coastal ecosystems, with strong and highly efficient carbon fixation capacity. The net primary productivity (NPP) of macroalgae was higher than that of phytoplankton and other primary producers in coastal waters. Parts of the photosynthates are released into the sea in the form of dissolved organic carbon (DOC) and particulate organic carbon (POC) during algae growth. Dissolved organic carbon and POC have attracted widespread attention because they can play important roles in carbon cycling and carbon sequestration in coastal ecosystems. However, the organic carbon release rate of macroalgae, its relationship with primary productivity, and the regulatory factors require further study. The growth of algae and the organic carbon release are influenced by temperature, light intensity, photoperiod, and other factors. However, organic carbon release rates among algae species might be quite different. Therefore, studying the regulatory effects of different factors on organic carbon release by algae and organic carbon release rate distribution has important implications for quantitatively evaluating the organic carbon release ability of algae and its contribution to the coastal ecosystem carbon cycle.

In recent years, *Sargassum horneri* is the most common wild macroalgae in the Yellow Sea. Its ecological role in the coastal ecosystem has attracted widespread attention. Few studies have focused on organic carbon release by *S. horneri*. This study conducted an orthogonal experiment to measure DOC and POC release rates of *S. horneri* at different temperatures (5, 15, and 25 °C), light intensity [86, 172, and 258 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] and photoperiod (L:D=6 h:18 h, L:D=12 h:12 h, L:D=24 h:0 h, L means light time, D means dark time) to study the organic carbon release rate of *S. horneri*, its relationship with NPP, and the main regulatory factors. The release rates of DOC were 0.653–4.785 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ and the release rates of POC were 0.066–0.322 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$. There is an order of magnitude difference between DOC and POC. This indicated that DOC was the main form of organic carbon released by *S. horneri*. The highest DOC release rate [4.785 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$] occurred at 25 °C, 172 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ light intensity, and L:D = 6 h:18 h. The highest POC release rate [0.322 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$] occurred at 25 °C, 258 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ light intensity, and L:D = 24 h:0 h. The organic carbon release ability of *S. horneri* is consistent with previous studies of other macroalgae.

This study found that changes in temperature and light conditions significantly affect the ability of *S. horneri* to release organic carbon. Temperature was the main factor affecting the release rate of DOC; the DOC release rate increases with increasing temperature. The DOC release rate initially

① Corresponding author: ZHANG Jihong, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

increases, then decreases with increasing light intensity; it increases with a decrease in the photoperiod. Light intensity was the main factor influencing the POC release rate; increasing light intensity and photoperiod accelerated the POC release rate. However, the POC release rate slightly decreased when the light intensity increased from 172 to 258 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. There was a greater POC release rate under extreme temperature stress (5 and 25 $^{\circ}\text{C}$).

This study showed that a proportion of DOC and POC in NPP were unstable in macroalgae. The range of DOC/NPP was 4%–130%. POC/NPP was relatively concentrated to approximately 0.4%–5.9%. The NPP was significantly lower in the experimental group with a high ratio of organic carbon compared with other experimental groups. The DOC release rate negatively correlated with NPP, but the negative correlation was poor in the low temperature groups. There was no significant correlation between the POC release rate and NPP. POC/NPP was relatively stable [approximately $(1\pm 0.6)\%$ when $\text{NPP} > 9 \text{ mg C}/(\text{g}\cdot\text{h})$]. The growth pressure of *S. horneri* was high when $\text{NPP} < 4 \text{ mg C}/(\text{g}\cdot\text{h})$, and the regulatory effect of organic carbon was manifested as the release under environmental stress, with POC/NPP increasing to 4%–6%. This section was modified for clarity. Please check that your meaning was retained. This study provides scientific and technological support for an in-depth understanding of the contribution by macroalgae to the coastal ecosystem carbon cycle.

Key words *Sargassum horneri*; Net primary productivity; Dissolved organic carbon; Particulate organic carbon

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230425001

http://www.yykxjz.cn/

李瑞鹏, 田云臣, 李青飞, 丛雪琪, 秦海晶. 进水流速对圆形循环水养殖池流场特性影响的数值模拟. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 55–65

LI R P, TIAN Y C, LI Q F, CONG X Q, QIN H J. Numerical simulation of the effect of inflow velocity on the flow field characteristics of circular circulating aquaculture ponds. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 55–65

进水流速对圆形循环水养殖池流场特性影响的数值模拟*



李瑞鹏¹ 田云臣^{1,2①} 李青飞¹ 丛雪琪¹ 秦海晶¹

(1. 天津农学院计算机与信息工程学院 天津 300392; 2. 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300392)

摘要 通过对工厂化循环水养殖进水流速的智能调控,可降低饵料残留,避免水质恶化。为此,本研究采用数值模拟方法探究了进水流速对工厂化循环水养殖池流场特性的影响,并基于该研究设计出一套确定进水流速调控的实验方法。首先,通过对比 Standard $k-\epsilon$ 、RNG $k-\epsilon$ 和 Realizable $k-\epsilon$ 3种湍流模型及多种壁面函数的仿真效果,确定 RNG $k-\epsilon$ 模型和标准壁面函数作为仿真配置。同时,针对多相流模型,对欧拉多相流模型和 DPM 离散相模型进行对比,为提高计算准确性选用 DPM 离散相模型,并基于上述模型进行网格无关性验证、制定网格划分方案。其次,以大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 养殖为例,模拟不同进水流速下养殖池流场、排污和水温调节的效果。最后,针对仿真结果提出进水流速调控方案。结果显示,日常采用 1.0 m/s 的进水流速,可有效提高适宜流速区面积并控制水处理成本;投饵前,采用 0.2 m/s 的进水流速可以解决循环水养殖中存在的饵料浪费问题;进食结束后,采用 1.2 m/s 的进水流速可快速排出残饵避免水质恶化;水温异常时,采用 15 °C 的水、以 1.2 m/s 的进水流速注水 230 s,可使 20 °C 的水下降到正常水平,精准化控制水温。采用本研究提出的方法,可针对不同养殖生物和养殖环境设计进水流速智能调控策略,可用于解决循环水养殖过程中饵料浪费、水质变差和水温异常等问题。

关键词 离散相模型; 颗粒分布; 流场特性; 水温调控; 圆形养殖池

中图分类号 S955.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0055-11

为满足人民群众日益增长的动物性食物消费需求,我国提出建设“蓝色粮仓”的战略。循环水养殖系统(recirculating aquaculture systems, RAS)契合“蓝色粮仓”战略,在有效降低水污染的同时保障了粮食安全(王峰等, 2013; 隋金柱等, 2022; 乔玮等, 2014)。

循环水养殖中,养殖池内的流速对养殖生物有较大影响,圆形养殖池中流速过低时,水体混合效果较

差,影响养殖安全;同时,流速过高会直接伤害养殖生物,且会致使循环水系统的后续水处理压力过大。

水产养殖中饲料成本占总生产成本的 30%~70% (de Verdal *et al*, 2018),残饵和排泄物的堆积会产生大量氨氮和亚硝酸盐(吕妍等, 2021; Yusoff *et al*, 2011),超过一定浓度后对养殖生物有致命性(Xu *et al*, 2021; 方成等, 2022)。同时,水温也是影响水产养殖生物健

* 国家重点研发计划(2020YFD0900600)、国家现代农业产业技术体系(CARS-47)和天津市海水养殖产业技术体系(ITTMRS2021000)共同资助。李瑞鹏, E-mail: 504391119@qq.com

① 通信作者: 田云臣, 教授, E-mail: tianyunchen@tjau.edu.cn

收稿日期: 2023-04-25, 收修改稿日期: 2023-06-10

康的重要因素(田相利等, 2010; 郭黎等, 2012; 杨凯等, 2020)。因此, 研究不同流速对排污和水温的影响, 并确定不同生产阶段的进水流速是必要的。

传统的循环水养殖进水流速调控方案通过研究不同流速对养殖品种生长、摄食和水质氮素等的影响, 进而确定养殖的适宜流速和经济流速(孙国祥等, 2011), 或通过对比不同流速下摄食后 12 h 内氨氮和亚硝酸盐的质量浓度变化, 提出摄食后 4~8 h 是氨氮和亚硝酸盐生成的高峰期, 提高流速可以加快氨氮和亚硝酸盐的排出, 其他时间保持较低流速构成的一套变速流方案(沈加正等, 2016)。实际应用中, 上述方法通过检测氨氮和亚硝酸盐的方式确定进水流速调控的方法成本高、反馈迟, 只能在水质已经变差的情况下调节, 无法提前预防水质变差。

计算流体力学(computational fluid dynamics, CFD)采用数值方法利用计算机求解关于流体流动的控制偏微分方程组, 并通过计算所得流场来研究流体流动状态与其相关变化。本研究基于 Fluent 流体仿真软件对不同进水流速下, 养殖池流速区大小变化、颗粒物排除效率、水温调节速度进行模拟实验, 提出了一种养殖池进水流速调控的实验方法。

1 数值模型建立与验证

水产养殖中可使用数值模拟方法解决实际生产中不同流速下的控温效果、固体颗粒物排放效率、流速区划分情况无法直接测量的问题。目前, 针对水产养殖多相流数值模拟的研究成果并不多, 已有研究集中在养殖池进出水结构和养殖池形状对流场和集排污效果的影响(薛博茹等, 2021; Liu *et al.*, 2023; 胡佳俊

等, 2021; 张倩等, 2022), 采用数值模拟方法设计进水流速调控方案的研究少有报道。

1.1 数值模型建立

本研究利用 SolidWorks 2018 软件, 参照实际养殖池尺寸, 等比例缩小 1/8 构建简化圆形养殖池, 进行数值模拟。模型各部分如图 1A 所示。养殖池半径为 40 cm, 水深为 13 cm。进水管从距壁面 52.5 mm 处养殖池顶部垂直插入, 底部沿养殖池池壁切向进水, 管径为 DN15。出水口位于养殖池底部正中央, 管径为 DN20。模型构建后, 使用 Space Claim 软件将流体域划分为主流体域、进水流体域和出水流体域, 设置边界名称, 并对几何模型进行缝隙检测。

1.2 数值模型验证

选择使用 OCA 等(2013)和 Duarte 等(2011)研究中的圆形养殖池模型, 如图 1B 所示。其中, 湍流模型和壁面函数验证中的检测位置为过养殖池中心平行于进水口的纵切面上距池底 0.03 m 处的线, 如图 1C 所示。进行数值模拟结果对比, 确定湍流模型和壁面函数。在本研究讨论的模型(图 1A)基础上, 确定了 DPM 多相流模型并进行网格无关性验证。

1.2.1 湍流模型 参考 Ansys 理论指南, 养殖池内的流场经计算属于高雷诺数, 并在充分考虑计算成本的前提下, 选择 $k-\varepsilon$ 系列的湍流模型, 其中 k 和 ε 由式(1)和(2)给出。Standard $k-\varepsilon$ 模型局限性强, 适用于高雷诺数的流场模拟; RNG $k-\varepsilon$ 相较于标准 $k-\varepsilon$ 模型在 ε 方程上增加了 1 项[由式(3)给出], 同时增加了涡流对流场的影响; Realizable $k-\varepsilon$ 模型适用于流动分离和二次流等流场

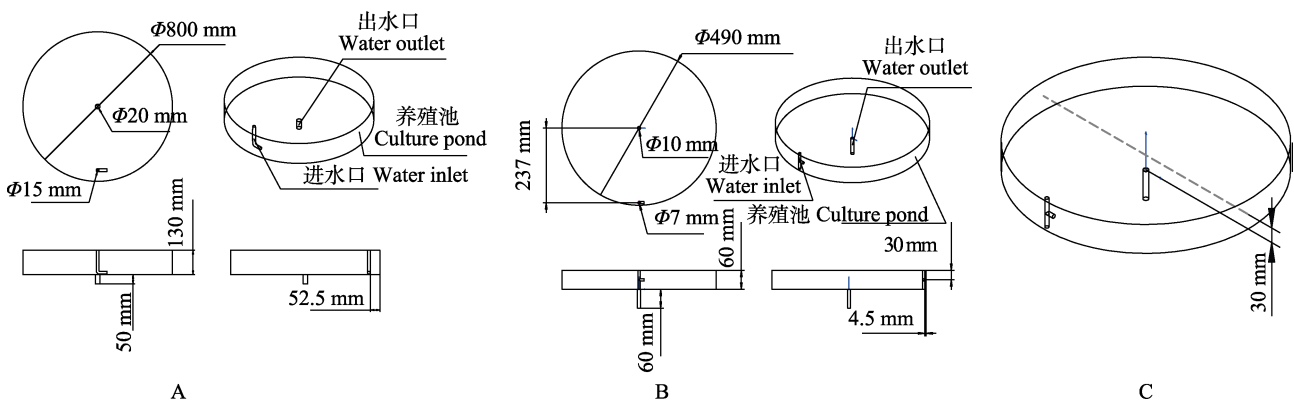


图 1 几何模型图

Fig.1 Geometric model diagram

A: 圆形养殖池模型图; B: 验证养殖池模型图; C: 检测点示意图。 Φ 表示所标示圆的内径大小。

A: Model of a circular aquaculture pond; B: Validation of aquaculture pool model; C: Schematic diagram of detection points. Φ indicates the inner diameter size of the marked circle.

模拟, 在射流曲率变化大的情况下有更好的表现。本研究通过实验对比 $k-\varepsilon$ 的 3 种湍流模型, 实验结果如图 2A 所示。由图 2A 可知, RNG $k-\varepsilon$ 模型与实验结果拟合度最高, 适用于本研究圆形养殖池流场仿真。

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho k) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho k u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\alpha_k \mu_{eff} \frac{\partial k}{\partial x_j} \right) + G_k + G_b - \rho \varepsilon - Y_M + S_k \quad (1)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \varepsilon) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho \varepsilon u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\alpha_\varepsilon \mu_{eff} \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right) + C_{1\varepsilon} \frac{\varepsilon}{k} (G_k + C_{3\varepsilon} G_b) - C_{2\varepsilon} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} - R_\varepsilon + S_\varepsilon \quad (2)$$

$$R_\varepsilon = \frac{C_\mu \rho \eta^3 \left(1 - \frac{\eta}{\eta_0} \right)}{1 + \beta \eta^3} \frac{\varepsilon^2}{k} \quad (3)$$

式中, t 为时间(s); ρ 为流体密度(kg/m^3); x 为位移分量(m); u 为速度矢量(m/s); i, j 为张量指标, 取值范围(1, 2, 3); μ 为流体动力粘度(Pa·s); α_k 和 α_ε 分别为 k 和 ε 的有效普朗特数的倒数; G_k 表示由于平均速度梯度引起的湍流动能的产生项; G_b 是由浮力产生的湍流动能; Y_M 表示可压缩湍流中波动膨胀对总

湍流耗散率的贡献; S_k 和 S_ε 是用户定义的源项; $C_{1\varepsilon}$ 和 $C_{2\varepsilon}$ 为模型经验常数, 根据经验取值为 $C_{1\varepsilon} = 1.44$, $C_{2\varepsilon} = 1.92$ 。式(3)中, $\eta = \frac{Sk}{\varepsilon}$, $S = \sqrt{2S_{ij}S_{ij}}$

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_j}{\partial x_i} + \frac{\partial u_i}{\partial x_j} \right) \eta_0 = 4.38 \beta = 0.012 \quad C_\mu = 0.0845$$

1.2.2 壁面函数 标准壁面函数(standard wall functions)是一种壁面函数的方法, 用于高雷诺数流动, 不适合大压力梯度, 一般要求 $30 < Y_+ < 300$; 增强壁面函数(enhanced wall functions)是一种近壁面模型方法, 用于无法应用对数律求解的复杂流动问题, 比如边界层分离现象, 一般要求 $Y_+ \approx 1$; Menter-Lechner 处理也是一种近壁面模型方法, 该方法在壁面网格足够细时使用一个新低雷诺数模型方法, 当壁面函数较粗时, 使用壁面函数方法, 对 Y_+ 无要求。本研究对比了 3 种壁面函数, 结果如图 2B 所示。从图 2B 可以看出, 选择标准壁面函数的模拟结果与实验数据之间的相对误差平均值小于实际生产中的测量误差。因此, 本研究的后续实验中均采用 RNG $k-\varepsilon$ 模型和标准壁面函数的配置, 稳态求解使用 Coupled 算法, 瞬态求解使用 SIMPLE 算法。

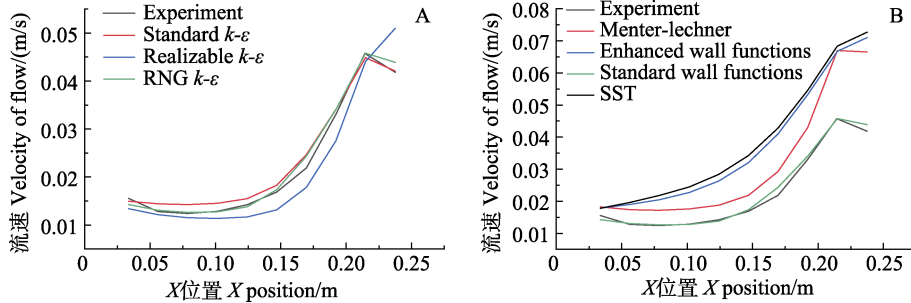


图 2 湍流模型仿真效果对比(A)和壁面函数仿真效果对比(B)

Fig.2 Comparison of turbulence model simulation effects (A) and wall function simulation effects (B)

1.2.3 多相流模型 多相流仿真中, 离散相模型选择与固体颗粒物的体积分数相关。离散相模型分为拉格朗日法(DPM 模型)和欧拉法, 其中拉格朗日法忽略了颗粒之间的相互作用, 因此, 要求固体颗粒物体积分数小于 10%~12%, 若颗粒体积分数过高则只能采用欧拉法。本研究设计的固体颗粒物体积分数远小于 10%, 因此, 本研究的多相流模型采用 DPM 模型, 式(4)为 DPM 模型的颗粒受力解析。在本研究中, 离散相注入方式选择 cone, 入射区域设置为与养殖池中心同心、半径为 0.35 m 的顶部圆形区域。从入射区域随机注入 300 个半径为 0.002 m、密度为 1 250 kg/m^3 的颗粒, 并采用离散随机轨迹模型模拟湍流对颗粒物的影响。

$$m_p \frac{d\vec{u}_p}{dt} = m_p \frac{\vec{u} - \vec{u}_p}{\tau_r} + m_p \frac{\vec{g}(\rho_p - \rho)}{\rho_p} + \vec{F} \quad (4)$$

式中, m_p 是粒子质量; \vec{u} 是流体速度; \vec{u}_p 是粒子速度; ρ 是流体密度; ρ_p 是粒子密度; \vec{F} 是附加力; m_p 是曳力。

1.2.4 网格无关性验证 在其他设置完全一致的前提下, 本研究比较了不同网格数量时过养殖池中心纵切面上距池底 0.065 m 处线上的流速大小, 结果如图 3 所示。其中, mesh-A、mesh-B 和 mesh-C 的网格数量分别为 104 662、272 453 和 1043 274。mesh-B 可以用较低的计算成本保证较高的准确性, 故选用

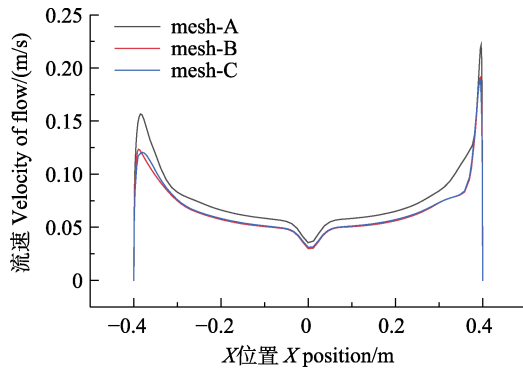


图3 网格无关性验证

Fig.3 Grid independence verification

mesh-B 的网格划分方案进行数值模拟。

Mesh-B 具体的网格划分方案如下：在 Fluent Meshing 参照表 1 的设置划分非结构化网格，其中养殖池主体部分采用六面体网格，进出水口等部分采用多面体网格并对网格进行加密，划分情况如图 4 所示。

表 1 网格划分设置

Tab.1 Grid division settings

| 选项 Option | 属性 Attribute | 参数 Parameters |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 面网格生成设置 Generate the surface mesh | 最小网格尺寸 Minimum size/m | 0.000 5 |
| | 最大网格尺寸 Maximum size/m | 0.01 |
| | 网格增长率 Growth rate | 1.2 |
| | 尺寸函数 Size functions | Curvature and proximity |
| 体网格生成设置 Generate the volume mesh | 填充方法 Fill with | Poly-hexcore |
| | 最小单元尺寸 Minimum cell length/m | 0.000 7 |
| | 最大单元尺寸 Maximum cell length/m | 0.011 2 |



图4 养殖池的网格划分

Fig.4 Grid division of aquaculture ponds

2 结果与分析

以大菱鲃(*Scophthalmus maximus*)为例讨论进水流速对养殖池流场、颗粒物排出效率和水温调节的影响。

2.1 进水流速对养殖池流场的影响

大菱鲃除摄食外，伏底栖息，集群生活(Lei *et al.*, 2005)。因此，本研究选取近池底的水平截面进行流场分析。在不同进水流速下，比较距池底 0.01 m 处水平截面的切向流速大小，观察流场均匀性，结果见图 5。由图 5 可以看出，在一定程度内随进水流速的增大，切向流速增大，整体流场趋于稳定。

在养殖池流速区的研究中，通常采用 2 种方案定义流速区：一种是凭经验将低流速标准线定义为固定值(Sin *et al.*, 2021)；另一种是将流速和养殖池内平均流速做比值，以比值的大小来定义高、中、低流速区(任效忠等, 2021)。养殖生产中，适宜的流速可以有效增加养殖生物的食用价值并促进养殖生物的生长(Huang *et al.*, 2021)，长时间过低的流速会导致养殖生物的肉质营养和水体交换速度降低，过高的流速会对养殖生物的生长和营养成分造成负面影响(钟金鑫等, 2013; Jones *et al.*, 1974; Liao *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2019)。本研究结合以上研究，提出针对不同养殖生物的适宜流速范围确定流速区划分阈值的划分方法。

研究表明，平均体长(BL)为 22 cm 的大菱鲃，流速在 0.33~0.46 BL/s 时分布更均匀，在流速超过 0.98 BL/s 时无法正常活动(Almansa *et al.*, 2012)。本研究以大菱鲃为对象，做出如下规定：最低适宜流速 0.072 6 m/s (0.33 BL/s)为低流速标准线，流速小于该值的区域定义为低流速区；最高极限流速 0.215 6 m/s (0.98 BL/s)为高流速标准线，流速大于该值的区域定义为高流速区；流速介于低流速与高流速之间的区域定义为适宜流速区。不同进水流速依照此规定划分 3 种流速区分布，结果见图 6。由图 6 可以看出，在进水流速为 0.2~0.6 m/s 时，中、低流速区占比最大；为 1 m/s 左右时，适宜流速区最大；>1.2 m/s 时，高流速区占比增大，适宜流速区减小。为确定适宜进水流速，增加进水流速为 1.1 m/s 和 0.9 m/s 下的数值模拟，适宜流速区面积变化见图 7。由图 7 可以看出，随进水流速的增大适宜流速区面积先增大后减小，在进水流速为 1.1 m/s 时，适宜流速区面积达到峰值。

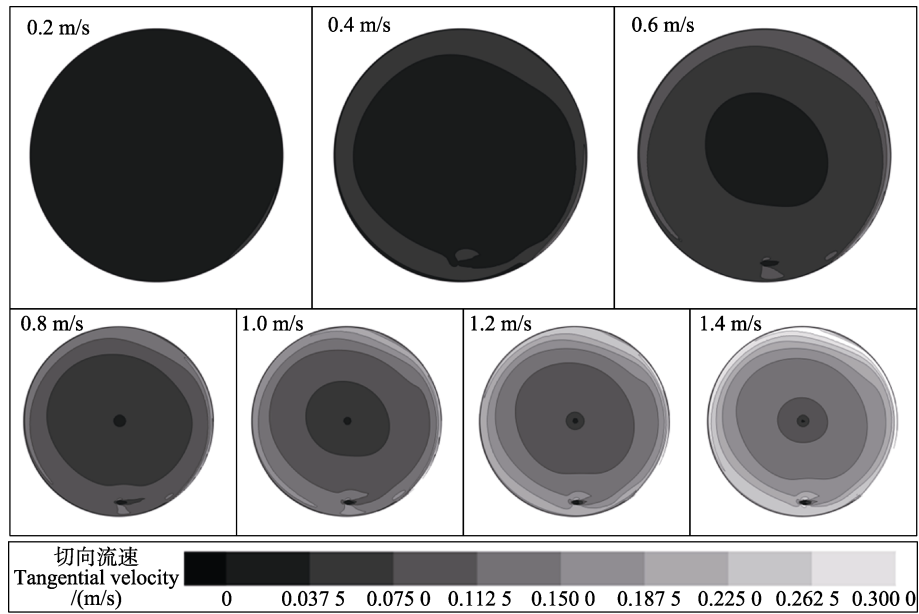


图 5 水平截面流速变化
Fig.5 Changes in horizontal cross section velocity

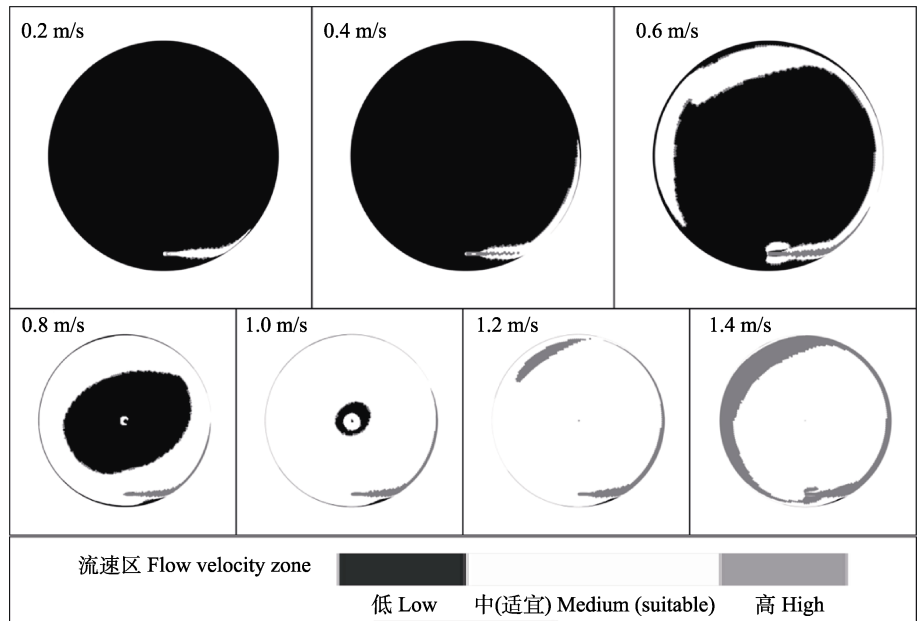


图 6 水平截面流速区划分
Fig.6 Division of horizontal cross section velocity zone

2.2 进水流速对养殖池颗粒物排出效率的影响

饵料的粒径与养殖品种和养殖周期、养殖环境等有关。以 0.002 m 的饵料粒径为例, 模拟颗粒物在不同进水流速下的颗粒排出效率, 结果见图 8、9。由图 8、9 可以看出, 随进水流速的增大养殖池内颗粒物排出速度加快, 且前期排放速度快, 后期排放速度减慢。

将养殖池划分为 4 个区域, 半径 < 0.1 m 的圆形区域为出流区, 半径在 0.1~0.2 m 之间的环形区为次出流区, 半径在 0.2~0.3 m 之间为近壁面区, 半径 > 0.3 m 为壁面区, 研究不同进水流速下颗粒物分布情况。各区域颗粒物分布情况见表 2。随流速增加, 颗粒物聚集位置更趋近于出水口附近, 排出效率也显著增加。

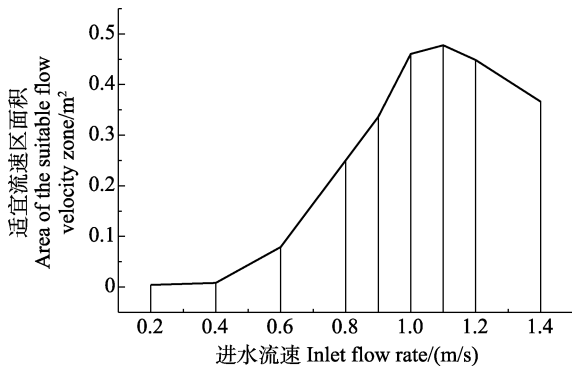


图7 适宜流速区面积变化

Fig.7 Changes in the area of the suitable flow velocity zone

2.3 进水流速对养殖池水温调控的影响

大菱鲆的最适水温为 16~18 °C(李勇等, 2011), 本研究将入水温度设置为 15 °C, 原池中水温假设为 21 °C 开始注水, 选择对 0.8~1.2 m/s 的进水流速进行仿真, 在不同进水流速下比较了大菱鲆主要活动区域(距池底 0.01 m 处水平截面)的平均温度, 结果见图 10。由图 10 可以看出, 在 100 s 内随进水流速增大调温速度并未有明显变化, 在 100~350 s 内调温效果明显且进水流速越大调温效果越好, 在 350 s 后水温逐渐趋于稳定且调温速度明显减慢。

| | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|
| Inflow velocity 0.2 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |
| Inflow velocity 0.4 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |
| Inflow velocity 0.4 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |
| Inflow velocity 1.0 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |
| Inflow velocity 10 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |
| Inflow velocity 1.2 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |
| Inflow velocity 1.4 m/s | 10 s | 20 s | 30 s | 40 s | 50 s |

图8 随着时间变化的颗粒物留存情况

Fig.8 Retention of particulate matter over time

3 讨论

3.1 进水流速对养殖池流场的影响

由流场仿真结果可以看出, 在不考虑进水成本的前提下, 进水流速为 1.1 m/s 时的适宜流速区最大、养殖效果最好。

研究显示, 大菱鲆最佳养殖密度为 8.96 kg/m², 在最佳养殖密度条件下, 每月平均增重 2.136 4 kg/m² (王峰等, 2015)。因此, 本研究对比了 0.8~1.2 m/s 时

的适宜养殖面积(见图 11)。由图 11 可知, 进水流速为 1.2 m/s 时, 适宜养殖面积减少、流量增大, 流量越大养殖成本越高, 因此, 1.2 m/s 在所讨论的进水流速中经济性最低。进水流速从 0.8~1.2 m/s 的养殖增量分别为 0.534、0.726、0.983、1.025 和 0.961 kg/月。DN15 的进水管, 在 0.8~1.2 m/s 的进水流速条件下, 流量分别为 0.508、0.572、0.636、0.699 和 0.763 m³/h。进水流速为 0.8~1.1 m/s 时, 养殖增量和进水流量变化见图 12。如图 12 所示, 进水流速为 1.1 m/s 相较

表 2 颗粒物分布情况
Tab.2 Particle distribution

| 进水流速-时间 Inlet flow rate-Time | $R < 0.1$ m | $0.1 \text{ m} < R < 0.2$ m | $0.2 \text{ m} < R < 0.3$ m | $0.3 \text{ m} < R < 0.4$ m | 剩余颗粒数 Residual particulate matter |
|---------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0.2 m/s-10 s | 17.52% | 30.66% | 38.32%* | 13.50% | 274 |
| 0.2 m/s-50 s | 20.79% | 31.10% | 45.27%* | 3.54% | 254 |
| 0.4 m/s-10 s | 23.14% | 34.90%* | 34.50% | 7.45% | 255 |
| 0.4 m/s-50 s | 21.79% | 54.49%* | 22.44% | 1.28% | 156 |
| 0.6 m/s-10 s | 22.36% | 39.66%* | 34.60% | 3.38% | 237 |
| 0.6 m/s-50 s | 70.77%* | 29.23% | 0 | 0 | 65 |
| 0.8 m/s-10 s | 26.15% | 40.51%* | 30.26% | 3.08% | 195 |
| 0.8 m/s-40 s | 100.00%* | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 1.0 m/s-10 s | 32.37% | 47.40%* | 19.65% | 0.58% | 173 |
| 1.0 m/s-30 s | 100.00%* | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 1.2 m/s-10 s | 41.60% | 53.60%* | 4.80% | 0 | 125 |
| 1.2 m/s-20 s | 100.00%* | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 1.4 m/s-10 s | 76.54%* | 22.22% | 1.23% | 0 | 82 |

注: *表示在该流速、时间下颗粒物占比最大的区域。

Note: * indicates the area with the highest proportion of particulate matter at this flow rate and time.

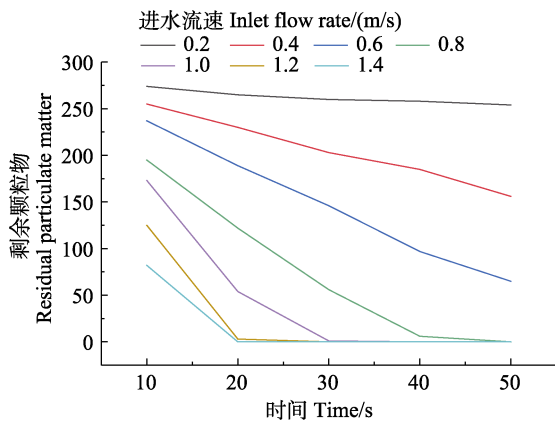


图 9 随着时间变化的颗粒物留存量

Fig.9 Particle retention over time

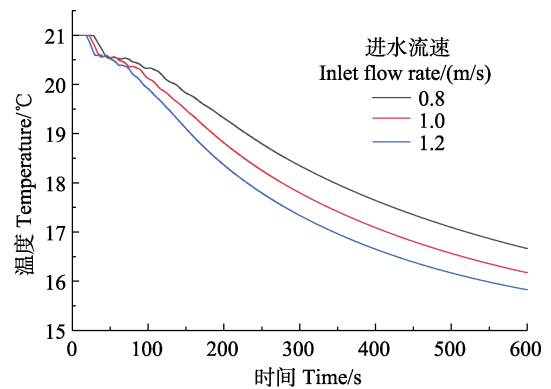


图 10 不同进水流速下养殖池平均水温随时间的变化

Fig.10 Changes of average water temperature of aquaculture ponds over time under different inflow velocities

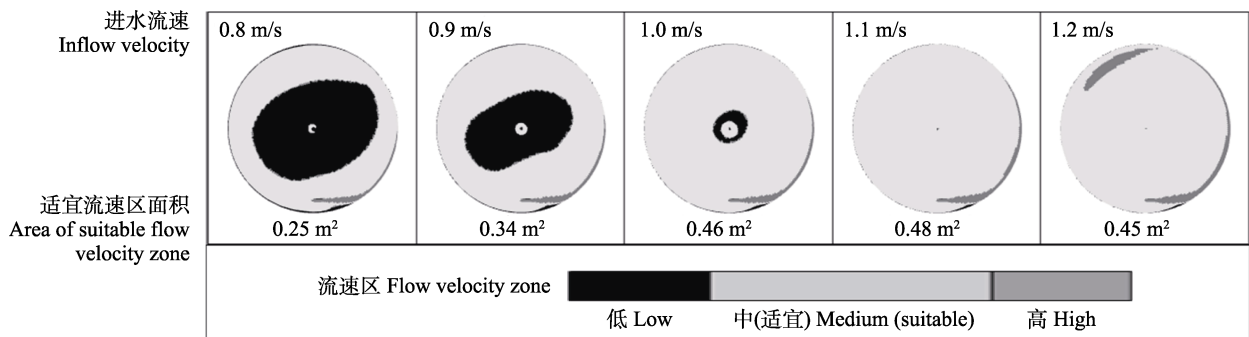


图 11 不同进水流速条件下流速区分布

Fig.11 Flow velocity zone division under different inflow velocities

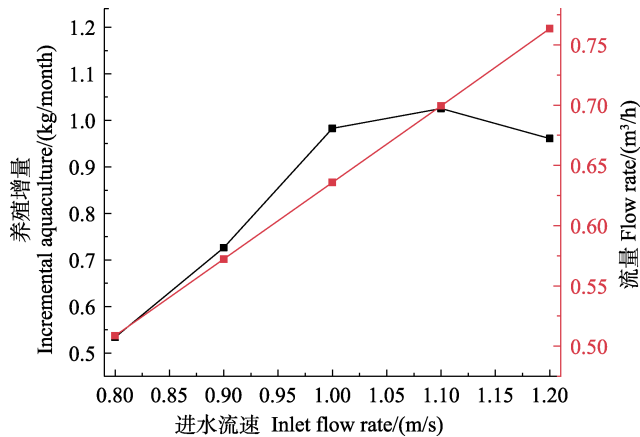


图 12 不同进水流速下养殖增量及流量变化

Fig.12 Increment and flow changes of aquaculture under different inflow velocities

于 1.0 m/s 对养殖增量提升有限, 进水流量持续较高增长, 因此, 在本研究条件下, 将 1.0 m/s 作为日常经济适宜的进水流速。

3.2 进水流速对养殖池颗粒物排出效率的影响

结合流场和颗粒物排出仿真结果, 在本研究中的适宜流速 1.1 m/s 或者经济适宜流速 1.0 m/s 时, 饵料会在 30 s 内排出, 浪费大量饵料, 增加饵料成本和后续水处理难度。若在投饵时采用 0.2 m/s 的进水流速, 饵料排出速度会有效降低, 在投饵 50 s 后饵料留存率依旧可以保持在 90% 以上, 可以保证养殖生物有充分的进食时间。虽然在该流速条件下的适宜流速区小, 但短时间的低流速不会过分影响肉质营养和水体交换, 不会对鱼体造成伤害, 因此, 可以在投饵开始时将进水流速调节到 0.2 m/s。

养殖生物进食结束后, 多余的饵料若不及时排出会产生氨氮和亚硝酸盐等有害物质, 对养殖生物造成伤害。在进食结束后, 应加快残饵和排泄物的排出。进水流速为 1.2 m/s 时, 20 s 左右可以快速排出养殖池内颗粒物, 避免养殖池中氨氮和亚硝酸盐的累积。进水流速继续增大可以更快地排出颗粒物, 但高流速会直接伤害养殖生物。因此, 在养殖生物进食结束后可采用 1.2 m/s 的进水流速。

3.3 进水流速对养殖池水温调控的影响

结合 2.3 节的仿真结果, 计算出 0.8、1.1 和 1.2 m/s 的进水流速下将平均水温调节到 18 °C 所用的时间和进水流量分别为 345 s、48.645 L, 276 s、48.576 L, 230s、48.760 L。在实际应用中可用 15 °C 的入水水温、1.2 m/s 的进水流速注水 230 s, 将 22 °C 的池内水温降低到 18 °C。

4 结论

本研究使用数值模拟方法, 模拟不同进水流速下养殖池内颗粒物排出效率、流场和水温调控的变化。与传统方法相比, 本研究提出的循环水养殖进水流速调控方法可以直接获得颗粒物排出量、养殖池内整体水温和流场分布, 从而保障养殖安全; 可以更低成本确定进水流速调控方案, 且在调控时间上精确到秒, 确保进水流速调控更精准。在此基础上, 以大菱鲆养殖为例提出一套流速调控方法: 进食阶段采用 0.2 m/s 的进水流速, 避免饵料快速排出, 降低饲料成本; 进食结束后, 采用 1.2 m/s 的进水流速持续 20 s, 可快速排出残饵、避免水质恶化; 水温异常时, 可采用不同的流速、时间方案来调节养殖池水温。在实际生产中, 针对不同生产环境和养殖品种均可参照此方法设计进水流速智能调控方案, 降低养殖成本, 增加经济效益。

参 考 文 献

- ALMANSA C, REIG L, OCA J. Use of laser scanning to evaluate turbot (*Scophthalmus maximus*) distribution in raceways with different water velocities. *Aquacultural Engineering*, 2012, 51: 7–14
- DE VERDAL H, KOMEN H, QUILLET E, *et al.* Improving feed efficiency in fish using selective breeding: A review. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(4): 833–851
- DUARTE S, REIG L, MASALÓ I, *et al.* Influence of tank geometry and flow pattern in fish distribution. *Aquacultural Engineering*, 2011, 44(2): 48–54
- FANG C, LI L S, LIANG Z Y, *et al.* Changes in immune system and growth performance of *Litopenaeus vannamei* after 40-day challenge with different concentrations of nitrite. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 180–189 [方成, 黎兰诗, 梁震宇, 等. 不同浓度亚硝酸盐亚急性胁迫对凡纳滨对虾生长与免疫功能的影响. *渔业科学进展*, 2022, 43(4): 180–189]
- WANG F, LEI J L. Effect of stocking density on growth and quality in muscles of *Cynoglossus semilaevis* Günther adult fish in industrial recirculating aquaculture. *Strategic Study of CAE*, 2015, 17(1): 19–26 [王峰, 雷霖霖. 工厂化循环水养殖模式放养密度对半滑舌鲷成鱼生长和肌肉营养成分的影响. *中国工程科学*, 2015, 17(1): 19–26]
- GUO L, MA A J, WANG X A, *et al.* Effects of temperature and salinity on the activities of antioxidant enzymes of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(5): 422–428 [郭黎, 马爱军, 王新安等. 盐度和温度对大菱鲆幼鱼抗氧化酶活性的影响. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(5): 422–428]

- HU J J, ZHU F, YAO R, *et al.* Optimization of the inlet pipe layout of circular recirculating water aquaculture tank based on STAR-CCM+. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2021, 37(21): 244–251 [胡佳俊, 朱放, 姚榕, 等. 基于 STAR-CCM+的圆形循环水养殖池进水管布设位置优化. 农业工程学报, 2021, 37(21): 244–251]
- HUANG X X, HEGAZY A M, ZHANG X Z. Swimming exercise as potential measure to improve flesh quality of cultivable fish: A review. Aquaculture Research, 2021, 52(12): 5978–5989
- JONES D R, KICENIUK J W, BAMFORD O S. Evaluation of the swimming performance of several fish species from the Mackenzie River. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1974, 31(10): 1641–1647
- LEI J L, MA A J, CHEN C, *et al.* The present status and sustainable development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) culture in China. Engineering Science, 2005, 7(5): 30–34
- LI X, JI L Q, WU L L, *et al.* Effect of flow velocity on the growth, stress and immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 86: 1169–1176
- LI Y, SUN G X, LIU Y, *et al.* Effects of temperature on feed intake, growth and digestive enzyme activity of turbot *Scophthalmus maximus* L. in high stocking density of closed recirculation aquaculture system. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(6): 17–24 [李勇, 孙国祥, 柳阳, 等. 温度对高密度循环海水养殖大菱鲆摄食、生长及消化酶的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 17–24]
- LIAO J C. A review of fish swimming mechanics and behaviour in altered flows. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, 362(1487): 1973–1993
- LIU H F, REN X, XUE B R, *et al.* Systematic optimization of the square arc angle aquaculture tank combining CFD methodology and multi-objective genetic algorithm. Aquacultural Engineering, 2023, 101: 102326
- LÜ Y. Effects of water quality indexes such as ammonia nitrogen on aquaculture a solutions. Northern Chinese Fisheries, 2021, 40(5): 53–56 [吕妍. 氨氮等水质指标对水产养殖的影响及解决办法. 黑龙江水产, 2021, 40(5): 53–56]
- OCA J, MASALO I. Flow pattern in aquaculture circular tanks: Influence of flow rate, water depth, and water inlet and outlet features. Aquacultural Engineering, 2013, 52: 65–72
- QIAO W, SONG X F, GAO C R, *et al.* Effects of stocking density on the growth and physiology of adult turbot and changes in water quality. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 76–82 [乔玮, 宋协法, 高淳仁, 等. 养殖密度对循环水系统中大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)生长的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 76–82]
- REN X Z, XUE B R, JIANG H Z, *et al.* Numerical study on the influence of double-inlet pipes system for single-drain rectangular arc angle aquaculture tank on hydrodynamic characteristics. Marine Environmental Science, 2021, 40(1): 50–56 [任效忠, 薛博茹, 姜恒志, 等. 双进水管系统对单通道矩形圆弧角养殖池水动力特性影响的数值研究. 海洋环境科学, 2021, 40(1): 50–56]
- SHEN J Z, SHI M M, RUAN Y J, *et al.* Effects of variable flow rates on water qualities in recirculating aquaculture system. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(7): 309–314 [沈加正, 史明明, 阮贇杰, 等. 变速流操作调控循环水养殖系统水质效果研究. 农业机械学报, 2016, 47(7): 309–314]
- SIN M G, AN C H, CHA S J, *et al.* A method for minimizing the zone of low water flow velocity in a bottom center drain circular aquaculture tank. Journal of the World Aquaculture Society, 2021, 52(6): 1221–1233
- SUI J Z, TIAN Y C, LI Z Z, *et al.* Research progress on intelligent feeding technology based on fish feeding behavior. Journal of Tianjin Agricultural University, 2022, 29(2): 63–68 [隋金柱, 田云臣, 李振忠, 等. 基于鱼类摄食行为的智能投饲技术研究进展. 天津农学院学报, 2022, 29(2): 63–68]
- SUN G X, LI Y, TIAN Z, *et al.* Effects of flow rate on the growth, feed intake and water nitrogen in a closed recirculation aquaculture system of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Marine Sciences, 2011, 35(5): 53–60 [孙国祥, 李勇, 田喆, 等. 流速对封闭循环水养殖大菱鲆生长、摄食及水质氮素的影响. 海洋科学, 2011, 35(5): 53–60]
- TIAN X L, WANG G D, DONG S L, *et al.* Effects of salinity and temperature on growth, osmophysiology and energy budget of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther). Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 771–782 [田相利, 王国栋, 董双林, 等. 盐度和温度对半滑舌鲷生长、渗透生理及能量收支的影响. 中国水产科学, 2010, 17(4): 771–782]
- WANG F, LEI J L, GAO C R, *et al.* Review of industrial recirculating aquaculture research at home and abroad. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(5): 1100–1111 [王峰, 雷霖霖, 高淳仁, 等. 国内外工厂化循环水养殖研究进展. 中国水产科学, 2013, 20(5): 1100–1111]
- XU Z, CAO J, QIN X, *et al.* Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: A review. Animals, 2021, 11(11): 3304
- XUE B R, LI Y F, HU Y X, *et al.* Numerical simulation on influence of inlet pipe location on the discharge rate of settling solid particles based on computation fluid dynamics. Journal of Dalian Ocean University, 2021, 36(4): 620–628 [薛博茹, 李永锋, 胡艺萱, 等. 基于 CFD 的进水管布设位置对沉降式固体颗粒排污影响的数值模拟. 大连海洋大学学报, 2021, 36(4): 620–628]
- YANG K, HUANG Z H, MA A J, *et al.* Transcriptome study of

- kidney of turbot under high-temperature stress. *Progress In Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 86–95 [杨凯, 黄智慧, 马爱军, 等. 高温胁迫条件下大菱鲂肾脏转录组研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 86–95]
- YUSOFF F, BANERJEE S, KHATOON H, *et al.* Biological approaches in management of nitrogenous compounds in aquaculture systems. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 2011, 5(1): 21–31
- ZHANG Q, GUI J S, REN X Z, *et al.* Optimization of flow field in dual-drain square aquaculture tank with relative arc to width ratio. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(4): 119–125 [张倩, 桂劲松, 任效忠, 等. 相对弧宽比对双通道方形养殖池的流场优化研究. *南方水产科学*, 2022, 18(4): 119–125]
- ZHANG S H, YU G H, WANG Y, *et al.* Numerical investigations on temperature and flow field performance of octagonal culture tank under different physical parameters for fish growth based on computational fluid dynamics. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2022, 195: 106821
- ZHONG J X, ZHANG Q, LI X R, *et al.* Effects of water velocity on the swimming behavior of *Anabarrilius graham*. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(3): 655–660 [钟金鑫, 张倩, 李小荣, 等. 不同流速对鳊(鲃)白鱼游泳行为的影响. *生态学杂志*, 2013, 32(3): 655–660]

(编辑 马瑾艳)

Numerical Simulation of the Effect of Inflow Velocity on the Flow Field Characteristics of Circular Circulating Aquaculture Ponds

LI Ruipeng¹, TIAN Yunchen^{1,2①}, LI Qingfei¹, CONG Xueqi¹, QIN Haijing¹

(1. *College of Computer and Information Engineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China;*
2. *Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture, Tianjin 300392, China*)

Abstract To meet the growing demand for animal food among the population, China has proposed the strategy of building a “Blue Granary,” relying on marine space, marine biological resources, and the application of modern marine high-tech. Industrialized recirculating aquaculture (also known as land-based factory aquaculture, factory aquaculture, or industrial fish farming) has the advantages of high production efficiency and small land occupation. It is a high-density, high-yield, high investment, and cost-effective aquaculture method. The recirculating aquaculture system is in line with the “Blue Granary” strategy, effectively reducing water pollution while ensuring food security. Therefore, in recent years, recirculating aquaculture in China has developed rapidly. In this context to achieve intelligent regulation of the inflow velocity of industrial recirculating aquaculture, this article firstly summarizes the three main factors that affect the inflow velocity from previous research: The flow field velocity of the aquaculture pool, the discharge velocity of the bait (residual bait), and the velocity of temperature regulation. With the improvement of computer software and hardware, computational fluid dynamics (CFD) is gradually being applied in various fields. CFD provides cheap tools for simulation, design, and optimization, as well as tools for analyzing three-dimensional complex flows. In complex cases, measurements are often difficult, even impossible, and CFD can easily provide detailed information on all flow fields. Compared with conventional experiments, CFD has the advantages of no restrictions on parameters, lower cost, and no interference in the flow field. This method can be used in aquaculture to solve the problems of temperature control effects, solid particle emission efficiency, and flow zone division that cannot be directly measured in actual production under different flow rates. At present, there are few studies reporting CFD numerical simulation of multiphase flow in aquaculture. Existing research focuses on the impact of the inlet and outlet structure and the shape of aquaculture ponds on the flow field, and the effect

① Corresponding author: TIAN Yunchen, E-mail: tianyunchen@tjau.edu.cn

of sewage collection. There are few reports on the use of numerical simulation methods to design the regulation scheme of inlet flow velocity. Because of the advantages of CFD, we chose it for simulation. Secondly, the specific model used in the numerical simulation was determined through experimental verification, research discussion, and other methods. Based on this, grid independence verification was conducted, indicating that the simulation results under the number of grids in the text are not affected by the number of grids, and the simulation results are reliable. Thereafter, based on the above research, and taking *Scophthalmus maximus* as an example, the effects of different inlet flow rates on the flow field, sewage discharge, and water temperature regulation in aquaculture ponds were simulated. The results showed that the inlet flow rate significantly affects these three factors. Therefore, the inlet flow rate can be adjusted according to production needs. Based on the simulation results, a set of inlet flow velocity control schemes were proposed: For the feeding stage, low flow velocity can be used to reduce feed costs (inlet flow velocity = 0.2 m/s); after eating, the feed can be quickly discharged at a high flow rate for a short period of time (inlet flow velocity = 1.2 m/s for 20 s); at abnormal water temperature, different flow rates and times can be used to adjust the water temperature in the breeding pool (water inlet temperature = 15 °C; an inlet flow velocity of 1.2 m/s can be used to inject water for 230 s, reducing the water temperature in the breeding pool from 22 °C to 18 °C). Numerical simulation experiments can be designed based on this method for different aquaculture environments and organisms to determine the inflow velocity control scheme. Unlike traditional methods, the numerical simulation method proposed in this study for regulating the inflow velocity of recirculating aquaculture systems can be used to determine the inflow velocity control scheme at a lower cost. The method can directly measure the discharge of particulate matter, the overall water temperature, and the flow field in aquaculture ponds. This method is safer than the method of indirectly measuring water quality to determine the inflow velocity control scheme. In terms of regulation time, traditional methods are only accurate to the hour in regulating the inlet flow rate, whereas this method is accurate to the second, which makes it more reliable to determine the regulation of the inlet flow rate. Therefore, from the perspectives of cost, safety, and accuracy, it is better to use numerical simulation methods to regulate the inflow velocity of recirculating aquaculture systems. In actual production, the method described in this study can be used to determine the inflow velocity control scheme, which can be combined with the control system to achieve automatic control, reduce breeding costs, and increase breeding success.

Key words Discrete phase model; Particle distribution; Flow field characteristics; Water temperature regulation; Round aquaculture pond

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221211001

http://www.yykxjz.cn/

卫宇星, 么宗利, 来琦芳, 祁洪芳, 戴阳, 高鹏程, 杨建新, 周凯, 孙真, 李燕. 青海湖裸鲤自主摄食节律与生长特性研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 66–75

WEI Y X, YAO Z L, LAI Q F, QI H F, DAI Y, GAO P C, YANG J X, ZHOU K, SUN Z, LI Y. Self feeding rhythm and growth characteristics of *Gymnocypris przewalskii*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 66–75

青海湖裸鲤自主摄食节律与生长特性研究*

卫宇星^{1,2} 么宗利^{1,2①} 来琦芳^{1,2} 祁洪芳³ 戴阳²
高鹏程² 杨建新³ 周凯² 孙真² 李燕²

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业农村部低洼盐碱地水产养殖重点实验室

中国水产科学研究院盐碱水域渔业工程技术研究中心(上海) 上海 200090;

3. 青海湖裸鲤救护中心 青海 西宁 810016)

摘要 为探究盐碱环境中鱼类的摄食和生长特性,为耐盐碱鱼类增殖保护和盐碱水养殖提供基础数据,本研究以青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)为代表,研究其在盐碱水(青海湖湖水)环境中的自主摄食节律,设置自然光照(14L:10D)湖水组和全黑暗(24D)湖水组,以自然光照(14L:10D)淡水组为对照。结果显示,青海湖裸鲤为白昼摄食类型鱼类。在自然光照条件下,淡水环境中,青海湖裸鲤的摄食高峰期为 08:00—11:00,摄食低谷期则为 05:00—08:00;湖水环境中,青海湖裸鲤在 08:00—19:00 呈现较高且持续的摄食现象,其平均每小时摄食量显著高于 05:00—08:00 和 19:00—05:00 时段。而在全暗环境中,青海湖裸鲤摄食的节律性减弱,各时段的平均每小时摄食量较为接近。经 63 d 的自主摄食养殖,在自然光照下,湖水组的青海湖裸鲤在高盐碱环境中的体长增长率为(1.19±0.17)%、体重增长率为(10.66±0.98)%、特定生长率为(0.16±0.02)%/d,均分别显著低于淡水组青海湖裸鲤的体长增长率[(18.66±0.41)%]、体重增长率[(67.32±3.05)%]和特定生长率[(0.82±0.03)%/d],表明生长受到抑制。湖水组和淡水组青海湖裸鲤的体长-体重关系参数(b)均小于 3,表明青海湖裸鲤为负异速生长鱼类,其中,湖水组 b 值小于淡水组,即湖水组体重增长速率低于淡水组,在一定程度上说明高盐碱环境导致青海湖裸鲤的生长特性发生变化。本研究通过探寻青海湖裸鲤在青海湖水环境以及淡水人工养殖中的摄食节律及生长规律,为青海湖裸鲤人工增殖投喂策略的制定提供理论依据,同时,为盐碱生境中鱼类的摄食习性研究提供基础数据。

关键词 盐碱环境;青海湖裸鲤;自主摄食节律;生长特性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0066-10

我国盐碱水资源丰富,约有 4.6×10^7 hm² 的低洼盐碱水广泛分布于我国内陆及滨海地区,内陆咸水湖泊占据全国湖泊面积的 55%,具有高盐、高碱、高

pH 和水型多样性等特点(胡红浪等, 2021; 刘永新等, 2016; 来琦芳等, 2021)。盐度和碳酸盐碱度作为盐碱水环境中的重要理化因子,与鱼类生长、渗透调节和

* 国家自然科学基金面上项目(32273158)、国家重点研究计划(2019YFD0900404)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD52)共同资助。卫宇星, E-mail: 1980816415@qq.com

① 通信作者: 么宗利, 研究员, E-mail: yaozli@ecsf.ac.cn

收稿日期: 2022-12-11, 收修改稿日期: 2023-01-16

能量代谢的关系紧密(Abou Anni *et al*, 2016; Song *et al*, 2021)。应对高盐与高碱环境, 鱼类需通过调节能量供给分别进行渗透调节和酸碱平衡, 生长速度普遍受到影响(黄岫等, 2022; 王念民等, 2022)。由于多数水生生物难以在盐碱水中生存生长, 大部分盐碱水资源长期处于闲置状态, 有效开发盐碱水资源对盐碱生境的修复、拓展渔业发展空间、践行大食物观有着重大意义。

在自然条件下, 鱼类的摄食行为存在明显的节律特征。不同鱼类的摄食节律受感官能力差异的影响有所不同, 依靠视觉摄食的鱼类通常在白天摄食, 而视觉能力较弱、嗅觉发达的鱼类则在夜间活跃并进食(李忠义等, 2018; Kulczykowska *et al*, 2010), 部分硬骨鱼的松果体器官可通过时钟基因节律性表达与褪黑素合成影响摄食节律(Saha *et al*, 2019)。鱼类摄食节律受中枢及外周组织节律性分泌激素(Landgraf *et al*, 2017)和消化酶活性(Solovyev *et al*, 2022)影响, 通过调控摄食因子的分泌引起血液中皮质醇和葡萄糖等指标和消化酶活性变化, 进而影响摄食行为的发生(高云红等, 2021)。鱼类的摄食节律会影响其代谢强度和对食物的利用率, 从而影响生长特性(张鹏飞等, 2020)。因此, 人工养殖时遵循鱼类的摄食节律进行投饵可增强鱼体的消化能力(Solovyev *et al*, 2022)和免疫能力(Chen *et al*, 2022), 对鱼类生长具有促进作用。

青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*), 又名湟鱼、无鳞鲤, 作为青海湖特有的经济鱼种, 在青海湖生态系统平衡中起到关键作用(Xiong *et al*, 2010)。青海湖地处我国西部青藏高原, 是我国最大的内陆高原盐碱湖。由于20世纪60年代过度捕捞以及湖区环境变化, 青海湖裸鲤资源量大幅下降, 目前, 主要通过封湖育鱼和人工增殖放流等措施保护青海湖裸鲤, 并维持青海湖生态平衡(周杨浩等, 2022; 王崇瑞, 2011)。作为可在盐碱水环境中生长的特殊经济鱼种, 青海湖裸鲤生长速度缓慢, 体重为250~500 g的青海湖裸鲤通常需要8~10年的生长期(王崇瑞, 2011)。已有学者通过消化酶活性的研究提出改善营养组成促进青海湖裸鲤生长(Tian *et al*, 2019), 但对于青海湖裸鲤自主摄食节律的研究少有报道, 测定青海湖裸鲤自主摄食节律可确定该鱼种的最佳投喂时间, 通过设计与自然模式相匹配的投喂策略来提高饲料转化率并促进生长。由于光照对于养殖鱼存在生理、生长等方面的影响(Karakatsouli *et al*, 2010), 本研究通过自然光照组和全黑暗组对比实验, 确定光照周期是否对青海湖裸鲤日摄食规律产生影响, 并判断其摄食节律类型。此外, 研究测定湖水和淡水环境中青海湖裸鲤的各项生长指标, 揭示水环境对青海湖裸鲤生长特性的

影响。本研究深入探寻青海湖裸鲤在青海湖水环境及淡水人工养殖中的自主摄食节律及生长规律, 为提高青海湖裸鲤人工增殖效率, 青海湖渔业资源保护以及盐碱生境中鱼类的摄食习性研究提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼与暂养管理

实验所用青海湖裸鲤由青海湖裸鲤救护中心提供。选取健康且规格相近的青海湖裸鲤暂养于循环缸系统内。暂养用水为曝气24 h以上的过滤自来水[开能净水机, 型号AC/KDF-150B(T)-1-150]。暂养期间, 水温为(17.46±0.23) °C, 溶解氧为(8.14±0.09) mg/L, 总氨氮为(0.56±0.01) mg/L, 盐度为0.40, 碳酸盐碱度为2.04 mmol/L。

实验开始前, 青海湖裸鲤需进行自主摄食训练。经驯化学习, 裸鲤可通过特定的自动投喂系统(图1)进行自主摄食(Wang *et al*, 2022)。采用浮性配合饲料(粗蛋白质≥32%、粗脂肪≥5、粗纤维≤8.5)进行投喂。

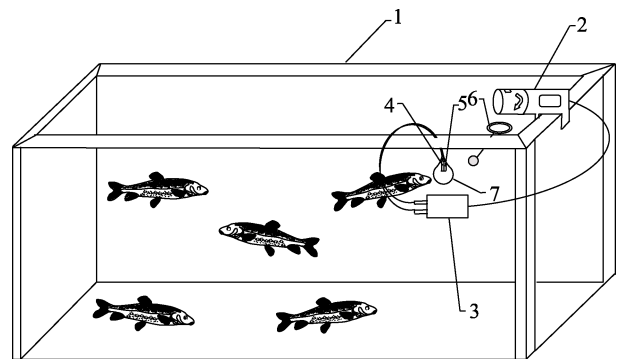


图1 青海湖裸鲤通过智能投饵装置进行自主摄食的示意图

Fig.1 A schematic diagram of *G. przewalskii* using self feeder

- 1: 鱼缸; 2: 投饵机; 3: 光电传感器;
4: 光电传感器光学发射端; 5: 光电传感器光学接收端;
6: 喂食圈; 7: 保护装置。
1: Aquarium; 2: Feeder; 3: Photoelectric sensor; 4: Optical emitter; 5: Optical receiver; 6: Feeding ring; 7: Protector.

1.2 实验设计

1.2.1 实验用水配制与盐碱驯化 实验用湖水根据青海湖裸鲤自然生长所处的青海湖水主要离子比例(Na^+ 23.05%、 K^+ 1.34%、 Ca^{2+} 0.11%、 Mg^{2+} 6.88%、 Cl^- 40.39%、 CO_3^{2-} 5.07%、 HCO_3^- 7.09%、 SO_4^{2-} 16.07%)进行配置。根据青海湖湖水历史数据(杨建新等, 2005; Yao *et al*, 2016)将湖水组盐度设为15.00, 碳酸盐碱度

设为 28.00 mmol/L。

实验前进行盐碱驯化,按湖水离子组成将青海湖裸鲤养殖水体盐度提升到 5.00,碳酸盐碱度提升到 8.00 mmol/L,随后每隔 48 h 将盐度提升 2.00、碱度提升 4.00 mmol/L,直至实验湖水盐度达到 15.08±0.02、碳酸盐碱度达到(27.53±0.16) mmol/L。

1.2.2 青海湖裸鲤自主摄食日节律 本研究采用自主摄食装置,通过记录裸鲤全天的摄食情况进行摄食节律研究。共设置自然光照淡水组(14L:10D)、自然光照湖水组(14L:10D)和全黑暗湖水组(24D),每组设 3 个重复,每个重复放置 15 尾青海湖裸鲤[体重为(57.96±2.09) g,体长为(16.31±0.17) cm]。自然光照组(14L:10D)的光照由 LED 灯提供,LED 灯架设在实验缸上方,并定时控制光强变化。根据青海地区的光照周期和光照强度,并参考相关文献(李育森等, 2019; 赵年桦等, 2021; 李艳华等, 2016)将全天分为 5 个时段:自然光照组的 05:00—08:00 和 15:00—19:00 为弱光期(水下光强 500~600 lx)、08:00—11:00 和 11:00—15:00 为强光期(水下光强 900~1 000 lx)、19:00—05:00 为黑暗期(水下光强 0 lx),各时段表层水下光照强度实测值见表 1。根据 Wang 等(2022)的研究,为保证青海湖裸鲤渗透调节功能,设置全黑暗组(24D)对比研究光照周期对日摄食节律的影响,采用黑色遮光布对缸进行遮光处理,各时段光照强度均为 0 lx。实验容器为 95 cm×60 cm×60 cm 的循环缸,实验期间,不间断充气,水温为(17.24±0.32) °C、溶解氧为(8.12±0.07) mg/L、湖水组盐度为 15.08±0.02、碳酸盐碱度为(27.53±0.16) mmol/L、pH 为 8.92±0.01,淡水组盐度为 0.40±0.01、碳酸盐碱度为(2.04±0.03) mmol/L、pH 为 7.39±0.03。实验开始后,于每日的 05:00、08:00、11:00、15:00 和 19:00 称量饲料仓所剩饲料的重量,得出各时段青海湖裸鲤的摄食量,实验共持续 5 d,各时段摄食量取 5 d 平均值进行后续分析。

1.2.3 青海湖裸鲤生长特性研究 根据摄食节律实验结果设置自然光照周期(14L:10D)进行青海湖

裸鲤生长实验,湖水组实验用水配制同 1.2.1。生长实验共持续 63 d,每个实验组共有 3 个重复,每个重复放置 15 尾青海湖裸鲤。实验容器为 95 cm×60 cm×60 cm 的循环缸,采用自动投饵装置进行饲料投喂,并定期向投饵装置添加浮性配合饲料,实验期间的成活率为 100%。养殖 63 d 后,采用 MS-222 (100 mg/L)对每尾青海湖裸鲤分别进行麻醉并测量其体长(精确至 0.1 cm)和体重(精确至 0.1 g)。

1.3 数据分析

统计数据为平均值±标准误(Mean±SE)。计算摄食量[feed intake, FI, g/(kg·h)]、体长增长率(length growth rate, GR_L, %)、体重增长率(weight growth rate, GR_W, %)、特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)、肥满度(condition factor, CF),并绘制体长体重关系曲线,计算公式如下:

$$FI = TF / (W_n \times t_h / 1\ 000)$$

$$GR_L = (L_1 - L_0) / L_0 \times 100$$

$$GR_W = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100$$

$$SGR = (\ln W_1 - \ln W_0) / t_d \times 100$$

$$CF = W / L^3 \times 100$$

式中,TF 为摄食总量(g),W_n 为体重总和(g),t_h 为摄食时段(h),L 为体长(cm),W 为体重(g),L₀ 为初始平均体长(cm),L₁ 为终末平均体长(cm),W₀ 为初始平均体重(g),W₁ 为终末平均体重(g),t_d 为养殖时间(d)。

采用 SPSS 25.0 统计软件对摄食节律实验各时段摄食量及生长实验各指标进行单因素方差分析(one-way ANOVA),差异显著则采用 LSD 法进行多重比较,显著性水平为 P<0.05。虽然湖水组和淡水组裸鲤为同龄幼鱼,由于自主摄食训练影响,生长实验中湖水组和淡水组裸鲤的初始体重有所差异,采用协方差分析(ANCOVA) (Stanley, 2022; He *et al*, 2018)估算体重的边际平均值对比分析体重增长率及特定生长率的显著性。采用幂指数方程(W=aL^b)分析裸鲤体长-体重关系,采用 t 检验分析幂指数 b 值与理论匀速生长值 3 是否具有显著差异。全文采用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对青海湖裸鲤自主摄食日节律的影响

在自然光照周期下,青海湖裸鲤呈现出白天游动、夜晚潜伏的昼行活动特征。在淡水和湖水环境中,青海湖裸鲤白天摄食量分别占全天的 65.74% 和 70.72%,显著高于夜晚(P<0.05)。淡水环境中,青海湖裸鲤的摄食高峰期位于光照较强的 08:00—11:00,该时段平均每小时摄食量显著高于其他时段(P<0.05),

表 1 自然光照组各时段光强测定

Tab.1 Measurement of light intensity at each time period in light-dark cycle group

| 起止时间 Beginning and ending time | 时段 Period | 光强 Light intensity/lx |
|-----------------------------------|--------------|--------------------------|
| 05:00—08:00 | 黎明 Dawn | 556.33±12.34 |
| 08:00—11:00 | 上午 Forenoon | 919.67±15.33 |
| 11:00—15:00 | 下午 Afternoon | 1 045.67±17.07 |
| 15:00—19:00 | 黄昏 Dusk | 641.17±11.48 |
| 19:00—05:00 | 夜间 Night | 0 |

05:00—08:00 的平均每小时摄食量显著低于 11:00—15:00 和 15:00—19:00 的平均每小时摄食量 ($P<0.05$), 显示出明显的白昼摄食节律(图 2A)。在湖水环境中, 青海湖裸鲤 08:00—11:00、11:00—15:00 和 15:00—19:00 的平均每小时摄食量无显著差异 ($P>0.05$), 但均显著高于 05:00—08:00 和 19:00—05:00 的平均每小时摄食量

($P<0.05$) (图 2B), 同样显示出白昼摄食的节律特征。全暗环境中, 在全天各时段, 湖水组青海湖裸鲤的摄食量无显著差异 ($P>0.05$), 其中 19:00—05:00 的平均每小时摄食量略低, 但是未显示出明显的摄食节律(图 2C)。该实验表明, 在自然光照周期下, 青海湖裸鲤具有明显的摄食节律, 在全暗环境中该摄食节律减弱或消失。

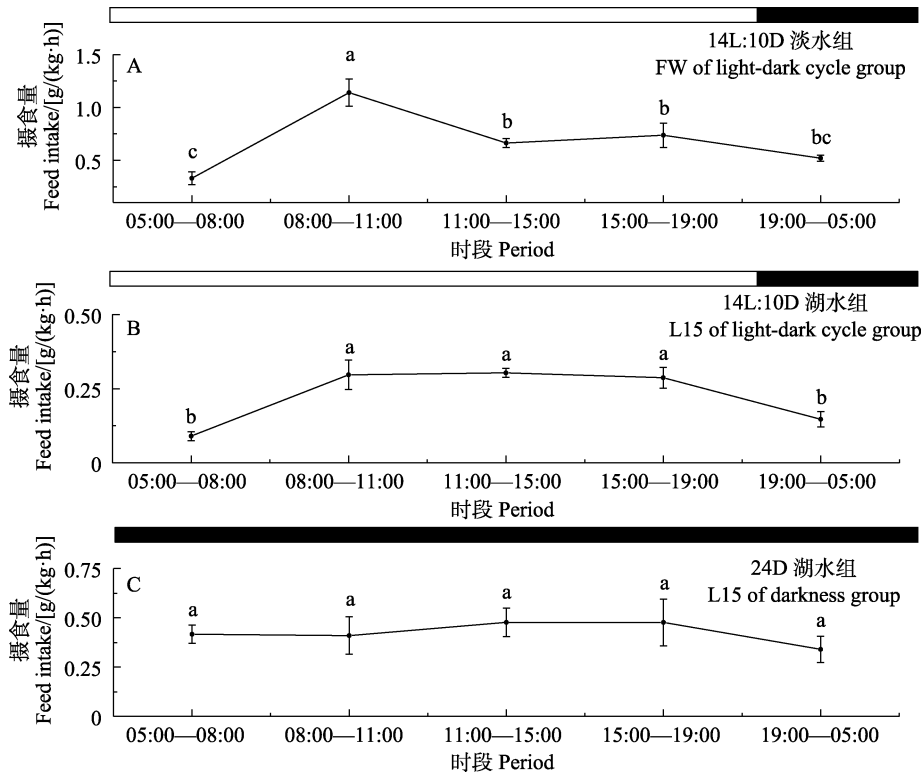


图 2 不同处理对青海湖裸鲤日摄食节律的影响(平均值±标准误, $n=3$)

Fig.2 Effects of different treatments on feeding rhythm of *G. przewalskii* (Mean±SE, $n=3$)

FW 为淡水, L15 为盐度为 15 的湖水; 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

FW is freshwater, L15 is saline-alkaline water with a salinity of 15; Different letters represent significant difference ($P<0.05$).

2.2 盐碱水环境对青海湖裸鲤生长指标的影响

在不同水环境中, 青海湖裸鲤生长指标存在显著差异(表 2)。本研究采用青海湖裸鲤自主索取饵料投饵方式, 实验前, 青海湖裸鲤通过自主学习主动获取饵料。经过 63 d 的自主摄食实验, 各组青海湖裸鲤的成活率均为 100%。在淡水环境中生长的青海湖裸鲤实测体长增长率、体重增长率、特定生长率和肥满度均显著高于湖水环境中青海湖裸鲤各项指标 ($P<0.05$)。由于不同组别的初始体重存在差异, 相关指标采用去除初始体重差异的估算边际平均值进行对比分析, 淡水环境中青海湖裸鲤的体重增长率和特定生长率估算边际平均值(67.32%和 0.82%/d)同样显著高于湖水环境(10.66%和 0.16%/d) ($P<0.05$)。

2.3 盐碱水环境对青海湖裸鲤肥满度与体长体重关系的影响

在淡水环境和湖水环境中的青海湖裸鲤体型存在明显差异(图 3)。不同水环境对青海湖裸鲤的肥满度具有显著影响, 生活在淡水环境中的青海湖裸鲤肥满度(1.48%)显著高于生活在湖水环境中的青海湖裸鲤(1.19%) ($P<0.05$)。将青海湖裸鲤的体长与体重拟合幂函数关系式, 可得如下方程: 湖水组: $W=0.039\ 98\times L^{2.558}$ ($n=90, R^2=0.859\ 3$) (图 4A); 淡水组: $W=0.030\ 07\times L^{2.754}$ ($n=90, R^2=0.936\ 2$) (图 4B)。由 t 检验表明, 在淡水环境和湖水环境中, 青海湖裸鲤的 b 值均显著小于 3, 表明青海湖裸鲤为负异速生长鱼类。由于湖水组青海湖裸鲤的 b 值更小, 因此, 相对于淡水环境, 湖水环境中的青海湖裸鲤的体长较体重相对生长速度更快。

表2 不同水环境中青海湖裸鲤的生长指标
Tab.2 Growth indicators of *G. przewalskii* in different water environments

| 指标 Indicators | 淡水组 Freshwater group | 湖水组 Lake water group |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 实测平均值 Measured mean | | |
| 成活率 Survival rate/% | 100 | 100 |
| 初始体长 Initial body length/cm | 17.03±0.22 ^a | 15.84±0.37 ^a |
| 终末体长 Final body length/cm | 20.21±0.32 ^a | 16.03±0.40 ^b |
| 体长增长率 Length growth rate/% | 18.66±0.41 ^a | 1.19±0.17 ^b |
| 初始体重 Initial body weight/g | 76.84±1.09 ^a | 46.48±2.67 ^b |
| 终末体重 Final body weight/g | 122.07±3.09 ^a | 49.33±2.73 ^b |
| 体重增长率 Weight growth rate/% | 58.82±2.09 ^a | 6.16±0.28 ^b |
| 特定生长率 Specific growth rate/(%/d) | 0.73±0.02 ^a | 0.10±0.01 ^b |
| 肥满度 Condition factor | 1.48±0.04 ^a | 1.19±0.03 ^b |
| 估算边际平均值 Estimated marginal mean | | |
| 初始体重 Initial body weight/g | 61.66±6.91 ^a | 61.66±6.91 ^a |
| 终末体重 Final body weight/g | 103.17±1.88 ^a | 68.23±0.61 ^b |
| 体重增长率 Weight growth rate/% | 67.32±3.05 ^a | 10.66±0.98 ^b |
| 特定生长率 Specific growth rate/(%/d) | 0.82±0.03 ^a | 0.16±0.02 ^b |

注：同行数据不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Data in the same row with different letters represent significant difference ($P<0.05$).

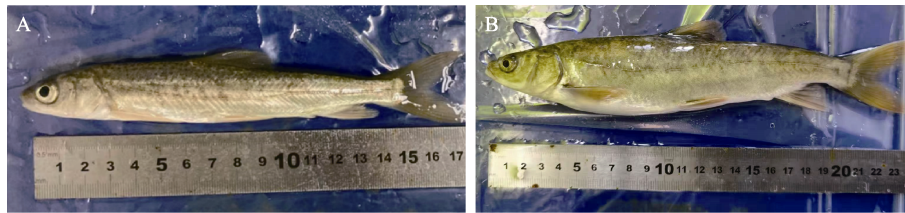


图3 在湖水(A)和淡水(B)中经63 d生长实验的青海湖裸鲤
Fig.3 *G. przewalskii* after 63 d growth in lake water (A) and freshwater (B)

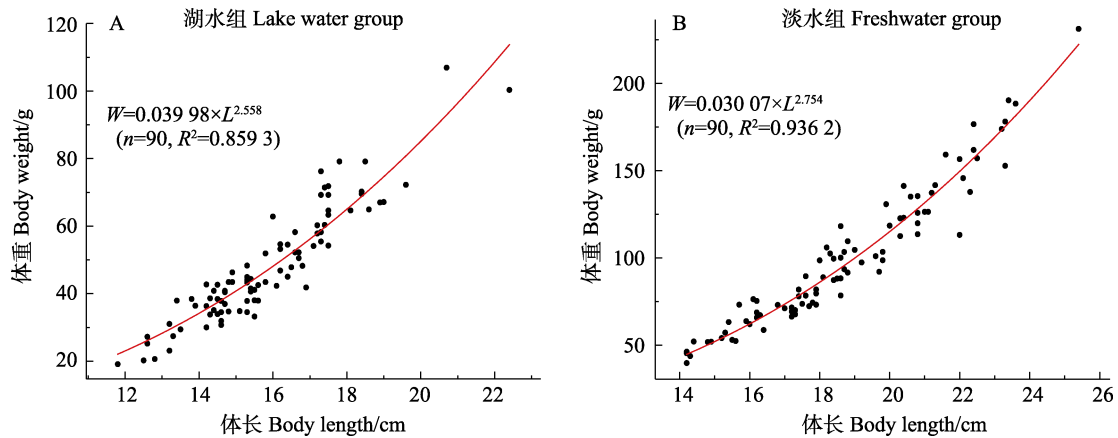


图4 青海湖裸鲤体长-体重关系曲线
Fig.4 Body length-weight relationship of *G. przewalskii*

3 讨论

3.1 盐碱水环境中青海湖裸鲤的自主摄食节律

在自然光照周期下,青海湖裸鲤表现为白昼摄食类型,摄食节律受明暗交替影响显著。本实验通过自主摄食节律的研究发现,在自然光照周期下,湖水组青海湖裸鲤的摄食主要集中在08:00—19:00时段,摄食低谷期为05:00—08:00和19:00—05:00,具有节律性。鱼类的摄食节律通常与明暗交替、摄食周期存在相互影响(Montoya *et al.*, 2010),并分为白昼摄食、夜间摄食、晨昏摄食和无规则摄食类型(Boujard *et al.*, 1992)。美洲西鲱(*Alosa sapidissima*)仔、稚鱼摄食高峰期出现在白昼,属于白昼摄食类型,且摄食高峰期长度随仔、稚鱼的生长发育逐渐延长(高小强等, 2015)。胡子鲇(*Clarias fuscus*)的摄食高峰在07:00—09:00和17:00—19:00,属于晨昏摄食类型(Fast *et al.*, 1997)。大盖巨脂鲤(*Colossoma macropomum*)的摄食行为和消化生理特征的高峰期位于夜间,属于夜间摄食类型(da Silva Reis *et al.*, 2019)。在自然光照周期下,青海湖裸鲤白昼摄食的节律特征显著,而在全黑暗的环境中,青海湖裸鲤不同时段平均每小时摄食量十分接近,05:00—08:00与19:00—05:00的摄食需求较自然光照同期明显提高,08:00—15:00的摄食需求较自然光照同期有所下降。鲫(*Carassius auratus*)的生物节律与明暗循环同步(Sáiz *et al.*, 2021),明暗周期与摄食周期的错位会对鲫的生理产生负面影响(Gómez-Boronat *et al.*, 2018)。与鲫相似,青海湖裸鲤的觅食行为频率与摄食量随光强的减弱而降低,其摄食节律与光照周期密切相关。鱼类对食物的摄取除了外部光照因素的影响,其激素分泌(Rønnestad *et al.*, 2017)和消化酶活性(da Silva Reis *et al.*, 2019)均存在内源性节律。为明确光照对青海湖裸鲤昼夜摄食节律的影响,从全黑暗和自然光照周期的各时段摄食量变化趋势来看,光照条件对青海湖裸鲤摄食行为的影响明显,在持续黑暗的条件下,青海湖裸鲤不具备明显的昼夜摄食节律,但仍然表现出白天摄食的倾向。由于光是一个复杂的环境因子,组成部分包含光谱、光强与光照周期,与鱼类的发育和生长关系密切(Wang *et al.*, 2019),光对青海湖裸鲤摄食节律的影响机制还有待进一步研究。

鱼类的消化与饮水行为一般不能同时进行(林浩然, 2011)。Wang 等(2022)研究表明,青海湖裸鲤通过在不同时段划分肠道的不同功能以缓解消化和渗透调节的冲突。由于尚未有渗透调节对摄食节律影响的研

究报道,为探寻盐碱水环境对青海湖裸鲤摄食节律的影响,设置淡水对照组进一步观察自然光照周期下青海湖裸鲤的昼夜摄食节律。与盐碱水环境相比,淡水环境中青海湖裸鲤各时段平均每小时摄食量均有所提高,其中,08:00—11:00为摄食高峰期。由于盐碱水环境中青海湖裸鲤白天摄食量占比高于淡水环境,在08:00—19:00呈现出较高且持续的摄食现象,表明青海湖裸鲤在高盐与高碳酸盐碱度的环境中进行的渗透调节会增强其白天摄食的节律特征。

3.2 盐碱水环境对青海湖裸鲤摄食和生长的影响

在盐碱水环境中,青海湖裸鲤摄食量下降、生长性能受到明显抑制。在本研究中,湖水组青海湖裸鲤的摄食率、体长增长率、体重增长率和特定生长率均显著低于淡水组,其原因可能是蛋白质、糖和脂质等物质分解所获能量更多用于渗透调节与酸碱调节。通常水生动物所处生境与摄食、生长有着密切的联系。高渗环境改变水生动物的摄食代谢与能量收支等生理状况,对其运动能力和生长产生影响(吕国华等, 2022; 李江涛等, 2021)。青海湖湖水具有高盐度、高碳酸盐碱度和高pH等特点,为典型的盐碱水环境,对鱼类存在盐度和碱度双重胁迫。鱼类在等渗环境中具备最低的渗透调节耗能、最高的摄食量和饵料转化率,当盐度远离等渗点时,鱼类的摄食和生长受到抑制(Luz *et al.*, 2008; 逯冠政等, 2022)。淡水鱼鲫在盐度为0~2的环境中具有最高的摄食率和游动能力,摄食率、食物预期活动及游动量均随着盐度的上升而下降(Luz *et al.*, 2008)。王润萍等(2019)研究发现,广盐性种类海水青鳉(*Oryzias melastigma*)在盐度为25时,摄食量最高,显著高于其他盐度组。高碳酸盐碱度容易导致鱼类出现呼吸性碱中毒和氨中毒等生理功能受损现象(Li *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2016),影响鱼类的成活率和生长速度。大鳞鲃(*Barbus capito*)在碱度为10~15.83 mmol/L时,摄食量、特定生长率和饵料转化率最高,各指标随碱度上升而下降,并在高碱环境中出现抑制生长的现象(党云飞等, 2013)。与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)通过脂代谢调节供给额外的渗透调节耗能适应高盐环境(宋凌元等, 2020)和瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)通过提高血浆中的非必须氨基酸含量作为能量来源适应高碱环境(常玉梅等, 2016)相似,青海湖裸鲤在盐碱双重胁迫下,需要消耗大量的能量进行渗透调节和酸碱调节,存储能量的脂肪和肌肉物质减少,表现为生长缓慢、肥满度下降。

青海湖裸鲤的体长与体重存在具有生物学普适性意义的幂函数关系($W=al^b$)。在盐碱水和淡水环境

中,青海湖裸鲤的异速生长因子 b 值分别为 2.558 和 2.754,符合大多数鱼类的 b 值范围(2.5~3.5)(Froese, 2006)。由于参数 $b < 3$,青海湖裸鲤群体为负异速生长。本研究发现,盐碱水环境中的青海湖裸鲤的 b 值小于淡水组,说明在相同体长增长速率的前提下,生活在盐碱水环境中的青海湖裸鲤体重增长速率低于生活在淡水环境中,一定程度上说明高盐碱环境导致青海湖裸鲤的生长性能发生变化。

参 考 文 献

- ABOU ANNI I S A, BIANCHINI A, BARCAROLLI I F, *et al.* Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832. *Aquaculture*, 2016, 455: 63–72
- BOUJARD T, LEATHERLAND J F. Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 1992, 35: 109–131
- CHANG Y M, HE Q, SUN Y C, *et al.* Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 117–124 [常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦式雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 117–124]
- CHEN Y Y, WU X Y, LAI J S, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis reveals the effect of feeding rhythm on the immunity and metabolism of *Acipenser dabryanus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2022, 122: 276–287
- DA SILVA REIS Y, LEITE J L R, DE ALMEIDA C A L, *et al.* New insights into tambaqui (*Colossoma macropomum*) feeding behavior and digestive physiology by the self-feeding approach: Effects on growth, diel patterns of food digestibility, amylase activity and gastrointestinal transit time. *Aquaculture*, 2019, 498: 116–122
- DANG Y F, XU W, GENG L W, *et al.* Effects of NaCl and NaHCO₃ on growth and gill microstructure in juvenile *Barbus capito*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 577–584 [党云飞, 徐伟, 耿龙武, 等. NaCl 盐度和 NaHCO₃ 碱度对大鳞鲃幼鱼生长及鳃组织特征的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 577–584]
- FAST A W, QIN T G, SZYPER J P. A new method for assessing fish feeding rhythms using demand feeders and automated data acquisition. *Aquacultural Engineering*, 1997, 16(4): 213–220
- FROESE R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22(4): 241–253
- GAO X Q, HONG L, LIU Z F, *et al.* The definition of point of no return of larvae and feeding characteristics of *Alosa sapidissima* larvae and juveniles. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 392–400 [高小强, 洪磊, 刘志峰, 等. 美洲西鲱仔鱼不可逆点及仔、稚鱼摄食特性研究. *水产学报*, 2015, 39(3): 392–400]
- GAO Y H, JING Q Q, HUANG B, *et al.* Characteristics of gastric evacuation and feeding digestion in “Yunlong” groupers (*Epinephelus moara*♀×*E. lanceolatus*♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 92–99 [高云红, 景琦琦, 黄滨, 等. 云龙石斑鱼胃排空特征和摄食消化特性研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 92–99]
- GÓMEZ-BORONAT M, SÁIZ N, DELGADO M J, *et al.* Time-Lag in feeding schedule acts as a stressor that alters circadian oscillators in goldfish. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1749
- HE J, ZHAO Y F, ZHAO J L, *et al.* Random regression analysis for body weights and main morphological traits in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Genetics*, 2018, 59(1): 99–107
- HU H L, LAI Q F, YAO Z L, *et al.* Green technology and model of saline-alkaline aquaculture. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 1–111 [胡红浪, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱水绿色养殖技术模式. 北京: 中国农业出版社, 2021, 1–111]
- HUANG S, LI C Z, LI Z X, *et al.* Effects of different salinities on growth and osmotic regulation gene expression of *Gymnocypris przewalskii*. *Fisheries Science*, 2022, 41(4): 527–536 [黄岫, 李长忠, 李梓瑄, 等. 盐度对青海湖裸鲤生长及渗透调节基因的影响. *水产科学*, 2022, 41(4): 527–536]
- KARAKATSOULI N, PAPOUTSOGLOU E S, SOTIROPOULOS N, *et al.* Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. *Aquacultural Engineering*, 2010, 42(3): 121–127
- KULCZYKOWSKA E, SÁNCHEZ VÁZQUEZ F J. Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: Aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research*, 2010, 41(5): 654–667
- LAI Q F, YAO Z L, GAO P C, *et al.* Saline-alkaline water environment and farming species. Beijing: China Agriculture Press, 2021, 1–40 [来琦芳, 么宗利, 高鹏程, 等. 盐碱水环境与增养殖种类. 北京: 中国农业出版社, 2021, 1–40]
- LANDGRAF D, NEUMANN A M, OSTER H. Circadian clock-gastrointestinal peptide interaction in peripheral tissues and the brain. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2017, 31(6): 561–571
- LI H, LAI Q F, YAO Z L, *et al.* Ammonia excretion and blood gas variation in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) exposed to acute hypoxia and high alkalinity. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(6): 1981–1990
- LI J T, QIU X L, QIU X T, *et al.* Effects of salinity on the energy metabolism and locomotive ability of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1291–1302 [李江涛, 邱小龙, 邱晓桐, 等. 盐度对

- 罗氏沼虾能量代谢和运动能力的影响. 中国水产科学, 2021, 28(10): 1291–1302]
- LI Y H, ZOU Y C, HU J, *et al.* Preliminary investigation of underwater illuminance in the upper reaches of Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(3): 109–112 [李艳华, 邹远超, 胡佳, 等. 长江上游水下光照度的初步调查. 淡水渔业, 2016, 46(3): 109–112]
- LI Y S, LEI J J, HAN Y Q, *et al.* Effect of temperature and light intensity on oxygen consumption rate and critical asphyxiation point of Chinese ink carp (*Procypris merus*). *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(2): 418–423 [李育森, 雷建军, 韩耀全, 等. 水温和光照强度对乌原鲤耗氧率与临界窒息点的影响. 南方农业学报, 2019, 50(2): 418–423]
- LI Z Y, YANG Y Y, YING Y P, *et al.* Feeding rhythm of *Diaphus chrysorhynchus* on the north slope of the South China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 395–402 [李忠义, 杨尧尧, 应一平, 等. 南海北部陆坡金鼻眶灯鱼秋季摄食节律. 中国水产科学, 2018, 25(2): 395–402]
- LIN H R. *Fish physiology*. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2011, 1–488 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社, 2011, 1–488]
- LIU Y X, FANG H, LAI Q F, *et al.* The current state and development strategy for China's saline-alkaline fisheries. *Strategic Study of CAE*, 2016, 18(3): 74–78 [刘永新, 方辉, 来琦芳, 等. 我国盐碱水渔业现状与发展对策. 中国工程科学, 2016, 18(3): 74–78]
- LU G Z, YAO Z L, LAI Q F, *et al.* Growth performance, blood parameters, and texture characteristics of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to highly saline-alkaline water. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 1–11 [逯冠政, 么宗利, 来琦芳, 等. 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、血液生理指标与质构特征研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 1–11]
- LUZ R K, MARTINEZ-ÁLVAREZ R M, DE PEDRO N, *et al.* Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. *Aquaculture*, 2008, 276(1/2/3/4): 171–178
- LÜ G H, ZHANG T, YAO J T, *et al.* Effects of salinity on survival, respiration, feeding metabolism and energy budget of juvenile freshwater mussel *Solenia oleivira*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(5): 802–808 [吕国华, 张婷, 姚静婷, 等. 盐度对橄榄蛭蚌幼蚌存活、呼吸与摄食代谢及能量收支的影响. 大连海洋大学学报, 2022, 37(5): 802–808]
- MONTOYA A, LOPEZ-OLMEDA J F, YUFERA M, *et al.* Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 2010, 306(1/2/3/4): 315–321
- RØNNESTAD I, GOMES A S, MURASHITA K, *et al.* Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in Endocrinology*, 2017, 8: 73
- SAHA S, SINGH K M, GUPTA B B P. Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 279: 27–34
- SÁIZ N, GÓMEZ-BORONAT M, DE PEDRO N, *et al.* The lack of light-dark and feeding-fasting cycles alters temporal events in the goldfish (*Carassius auratus*) stress axis. *Animals*, 2021, 11(3): 669
- SOLOVYEV M, GISBERT E. Feeding regimes affected the circadian rhythms of pancreatic digestive enzymes and somatic growth in flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) fry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2022, 264: 111116
- SONG L Y, CHENG Y M, ZHAO J L. Effects of salinity on the fatty acid composition and the expression of lipid-metabolism-related genes in the liver of Nile tilapia. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(8): 859–867 [宋凌元, 程亚美, 赵金良. 盐度胁迫对尼罗罗非鱼肝脂脂肪酸组成与脂代谢相关基因表达的影响. 中国水产科学, 2020, 27(8): 859–867]
- SONG L Y, ZHAO Y, SONG Y D, *et al.* Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2021, 544: 737036
- STANLEY P. Analysis of covariance: A useful tool for the pharmacologist to reduce variation and improve precision using fewer animals. *British Journal of Pharmacology*, 2022, 179(14): 3645–3650
- TIAN H N, MENG Y Q, LI C Z, *et al.* A study of the digestive enzyme activities in scaleless carp (*Gymnocypris przewalskii*) on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Aquaculture Reports*, 2019, 13: 100174
- WANG C R. Hydroacoustic stock assessment of *Gymnocypris przewalskii* in Qinghai Lake. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 [王崇瑞. 青海湖裸鲤资源声学评估. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2011]
- WANG F, ZHU L, WEI Y X, *et al.* Intestinal ion regulation exhibits a daily rhythm in *Gymnocypris przewalskii* exposed to high saline and alkaline water. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 807
- WANG H, SHI W J, WANG L, *et al.* Can larval growth be manipulated by artificial light regimes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? *Aquaculture*, 2019, 506: 161–167
- WANG N M, YANG H L, FENG C J, *et al.* Effects of different carbonate alkalinity on survival, growth and biochemical indexes in serum of three-month-old hybrid sturgeon (*Huso dauricus* ♀ × *Acipenserschrenckii* ♂). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(1): 98–107 [王念民, 杨合霖, 丰超杰, 等. 碳酸盐碱度对3月龄杂交鲟 (*Huso dauricus* ♀ × *Acipenserschrenckii* ♂) 生长与血清生化指标的影响. 上海海洋大学学报, 2023, 32(1): 98–107]
- WANG R P, DAI L L, CHEN Y F, *et al.* Effects of short-term

- temperature or salinity stress on feeding behavior and antioxidant of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(2): 378–387 [王润萍, 戴铃灵, 陈雅飞, 等. 短期温度、盐度胁迫对海洋青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*) 摄食行为及抗氧化的影响. *海洋与湖沼*, 2019, 50(2): 378–387]
- XIONG F, CHEN D Q, DUAN X B. Threatened fishes of the world: *Gymnocypris przewalskii* (Kessler, 1876) (Cyprinidae: Schizothoracinae). *Environmental Biology of Fishes*, 2010, 87(4): 351–352
- YANG J X, QI H F, SHI J Q, *et al.* Hydrochemistry property and water quality analysis of Qinghaihu lake. *Freshwater Fisheries*, 2005, 35(3): 28–32 [杨建新, 祁洪芳, 史建全, 等. 青海湖水化学特性及水质分析. *淡水渔业*, 2005, 35(3): 28–32]
- YAO Z L, GUO W F, LAI Q F, *et al.* *Gymnocypris przewalskii* decreases cytosolic carbonic anhydrase expression to compensate for respiratory alkalosis and osmoregulation in the saline-alkaline lake Qinghai. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 2016, 186(1): 83–95
- ZHANG P F, CHANG Q, CHEN S Q, *et al.* Diet feeding rhythm and analysis of gastric evacuation associated mathematical models in juvenile *Thamnaconus septentrionalis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 104–111 [张鹏飞, 常青, 陈四清, 等. 绿鳍马面鲈幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 104–111]
- ZHAO N H, ZHAO H, QIANG Z, *et al.* Effects of water temperature, photoperiod and light intensity on survival, feeding and growth of *Schizothorax biddulphi* juveniles and their tolerance of salinity and alkalinity. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(5): 54–63 [赵年桦, 赵贺, 强壮, 等. 水温、光周期和光照强度对塔里木裂腹鱼幼鱼存活、摄食和生长的影响及其盐碱耐受能力研究. *南方水产科学*, 2021, 17(5): 54–63]
- ZHOU Y H, RONG Y F, ZHOU W G, *et al.* Environmental requirements of natural reproduction of *Gymnocypris przewalskii* under artificial simulated conditions. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(6): 779–787 [周杨浩, 荣义峰, 周卫国, 等. 人工模拟条件下青海湖裸鲤自然繁殖环境条件需求研究. *水生生物学报*, 2022, 46(6): 779–787]

(编辑 马瑾艳)

Self feeding Rhythm and Growth Characteristics of *Gymnocypris przewalskii*

WEI Yuxing^{1,2}, YAO Zongli^{1,2}①, LAI Qifang^{1,2}, QI Hongfang³, DAI Yang²,
GAO Pengcheng², YANG Jianxin³, ZHOU Kai², SUN Zhen², LI Yan²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Inland Saline-Alkaline Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Engineering Research Center for Saline-Alkaline Fisheries (Shanghai), CAFS, Shanghai 200090, China; 3. Rescue Center for Naked Carp of Lake Qinghai, Xining 810016, China)

Abstract The total saline-alkaline land area in China is about 99.13 million hectares distributed across northern China, coastal areas, and areas along the bank of the Huanghe River. About 46 million hectares of saline-alkaline water areas are distributed around these saline-alkaline lands, most of which are thalassic and characterized by a high pH value in excess of 8.8 associated with high-carbonate alkalinity concentrations and various types of ion imbalances. Saline-alkaline waters are stressful environments in which only relatively few organisms are able to survive. Consequently, most of the saline-alkaline water resources have been desolate for a long time. The effective utilization of saline-alkaline water resources will benefit restoration of saline-alkaline habitats and the expansion of aquaculture space. Naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) are endemic to the austere saline-alkaline environment of Qinghai Lake. Due to overfishing in the 1960s and environmental changes in the lake area, the resources necessary for naked carp survival in Qinghai Lake declined substantially. At present, the major measures to protect the naked carp and maintain the ecological balance of Qinghai Lake are through

① Corresponding author: YAO Zongli, E-mail: yaozl@ecsf.ac.cn

a fishing ban and artificial stocking and releasing. The feeding behavior of fish under natural conditions has obvious rhythm characteristics, which is an important research topic for healthy aquaculture. To explore the characteristics of self-feeding rhythm and growth performance of fish in a saline-alkaline environment and provide basic data for the protection of native saline-alkaline fish, naked carp were taken as representative in this study. First, the freshwater and lake water group with natural photoperiod (14L:10D) and the lake water group with darkness (24D) were set. The artificial lake water was prepared according to the ionic composition of Qinghai Lake, with the contents of Na^+ 23.05%, K^+ 1.34%, Ca^{2+} 0.11%, Mg^{2+} 6.88%, HCO_3^- 7.09%, CO_3^{2-} 5.07%, Cl^- 40.39%, and SO_4^{2-} 16.07%. The measured salinity of the artificial lake water was 15.08, and the carbonate alkalinity was 27.53 mmol/L. According to the local photoperiod of Qinghai Province, the whole day was divided into five periods as 05:00–08:00, 8:00–11:00, 11:00–15:00, 15:00–19:00, and 19:00–05:00. The feeding rhythm experiment lasted for 5 d, and the average food intake of each period was calculated. The results showed that naked carp had an obvious daily feeding rhythm during their natural photoperiod. In the natural photoperiod, the feeding peak was from 08:00 to 11:00, and the low feeding period was from 05:00 to 08:00 in freshwater. In the lake water, naked carp showed high and continuous feeding from 08:00 to 19:00, and their average hourly feed intake was significantly higher than that from 05:00 to 08:00 and 19:00 to 05:00. Therefore, naked carp were determined to be the daytime feeding fish type. In addition, the high proportion and the continuous feeding in daytime in lake water indicated that the osmotic and acid-base regulation of naked carp in saline-alkaline water may enhance their diurnal feeding rhythm. Whereas in the continuous dark environment, the feeding rhythm of naked carp was weakened, and the average hourly food intake of each period was similar. To explore the growth performance of naked carp under a self-feeding rhythm, the lake water group and the freshwater control group with natural photoperiod were set up. After 63 days of self-feeding, the individual body length and weight of the naked carp were measured after being anesthetized with MS-222. The length growth rate (1.19 ± 0.17)%, weight growth rate (10.66 ± 0.98)%, and specific growth rate (0.16 ± 0.02)/d of naked carp in the lake water group were significantly lower than those in the freshwater group [length growth rate (18.66 ± 0.41)%, weight growth rate (67.32 ± 3.05)%, and specific growth rate (0.82 ± 0.03)/d], indicating that the growth of naked carp was inhibited by high salinity and carbonate alkalinity environment. The parameter b of body length-weight relationship curve of the naked carp in both the lake water group and the freshwater group was less than three, which showed that the naked carp was a negative allometric growth fish. The b value of the lake water group was lower than that of the freshwater group, and the body length of naked carp increased faster than body weight in the lake water. The growth characteristics of naked carp were affected by the high saline-alkaline environment. The self-feeding rhythm and growth performance of naked carp provided a basic knowledge for creating a feeding strategy for fish cultured in a saline-alkaline environment and recovering endangered native saline-alkaline fish.

Key words Saline-alkaline environment; *Gymnocypris przewalskii*; Self feeding rhythm; Growth performance

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230213002

http://www.yykxjz.cn/

王晓艳, 李宝山, 孙永智, 王成强, 李璐, 孙晓宇, 王丹, 左震, 李培玉, 黄炳山, 王际英. 精氨酸对许氏平鲷豆粕型肠炎的修复作用研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 76–86

WANG X Y, LI B S, SUN Y Z, WANG C Q, LI L, SUN X Y, WANG D, ZUO Z, LI P Y, HUANG B S, WANG J Y. The repairing effect of arginine on soybean meal-induced enteritis of *Sebastes schlegelii*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 76–86

精氨酸对许氏平鲷豆粕型肠炎的修复作用研究*

王晓艳 李宝山 孙永智^① 王成强 李璐 孙晓宇
王丹 左震 李培玉 黄炳山 王际英

(山东省海洋资源与环境研究院 山东省海水渔用饲料工程技术研究中心

水生动物营养与饲料研发创新示范平台 山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006)

摘要 为研究精氨酸(Arg)对患有豆粕型肠炎(SBMIE)的许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)生长性能、Arg 代谢、肠道组织结构、抗氧化性能、肠道紧密连接蛋白基因(*occludin*、*clnd15* 和 *zo-1*)及炎症因子基因(*il-1 β* 、*il-8*、*il-15* 和 *tlr8*)和抗炎因子基因(*il-12b*)表达量的影响,以(54.97 \pm 0.12) g 已诱导出 SBMIE 的许氏平鲷为研究对象,基础配方中添加 30%豆粕,以 Arg 0 添加为对照组(D0),添加 1%、2%和 3% Arg 为处理组(D1、D2 和 D3),配制 4 组等氮等能的实验饲料,每组 3 个重复,每个重复 40 尾鱼,进行为期 6 周的养殖实验。结果显示,D2 和 D3 组实验鱼增重率显著升高($P<0.05$),各处理组肝体比和脏体比均显著低于 D0 组,肥满度显著高于 D0 组($P<0.05$);处理组血清二胺氧化酶(DAO)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活性及一氧化氮(NO)含量显著降低($P<0.05$),D2 和 D3 组总一氧化氮合成酶(T-NOS)活性显著降低($P<0.05$);Arg 显著提高了实验鱼肠道皱襞高度($P<0.05$);处理组肠道总抗氧化能力显著升高,并以 D2 组最高($P<0.05$),D2 和 D3 组丙二醛含量显著降低($P<0.05$);相比较 D0 组,各处理组 *occludin* mRNA 相对表达量显著上调,D2 组 *clnd15* 和 D1 组 *zo-1* mRNA 相对表达量显著上调($P<0.05$);处理组肠道 *il-1 β* 、*il-15* 和 *tlr8* mRNA 相对表达量显著下调,*il-12b* mRNA 相对表达量显著上调($P<0.05$)。综上所述,在本实验条件下,高豆粕饲料中添加 Arg 能显著提高 SBMIE-许氏平鲷的生长性能和抗氧化性能,改善 Arg 代谢和肠道组织结构,上调肠道紧密连接蛋白和抗炎因子基因相对表达量,下调炎症因子基因相对表达量。Arg (2%最佳)对许氏平鲷 SBMIE 具有修复作用。本研究为 Arg 修复 SBMIE 的机制提供了理论依据。

关键词 许氏平鲷;精氨酸;豆粕型肠炎;紧密连接蛋白;炎症因子

中图分类号 S963.7 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0076-11

近年来,鱼粉价格不断攀升,配合饲料成本高居不下,为降低饲料成本,豆粕等产量稳定、价格低廉的植物蛋白源在水产饲料中的用量逐渐增加,但由于豆粕中含有大豆凝集素、植酸和皂甙等抗营养因子,

过量替代会引起鱼类肠道损伤,诱发豆粕型肠炎(soybean meal-induced enteritis, SBMIE)(Gu *et al.*, 2016)。对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Wang *et al.*, 2017)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Gu *et al.*,

* 山东省自然科学基金(ZR2020QC206)、山东省重点研发计划(2021SFGC0701)和烟台市科技计划(2021XDHZ055)共同资助。王晓艳, E-mail: wangxy1109s@126.com

① 通信作者: 孙永智, 副研究员, E-mail: sssunyongzhi@126.com

收稿日期: 2023-02-13, 收修改稿日期: 2023-04-12

2016)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Merrifield *et al.*, 2009)等鱼的研究均报道了豆粕过量替代鱼粉后豆粕型肠炎的发生。为缓解豆粕对鱼类肠道的损伤,提高其在饲料中的利用,Gu 等(2017)验证了谷氨酰胺、精氨酸等功能性氨基酸在肠道修复方面的积极作用。精氨酸(Arginine, Arg)是鱼类的必需氨基酸,又是一种功能性氨基酸,不仅参与蛋白质和嘧啶合成、激素释放,还是合成尿素、谷氨酸、肌酸、多胺和一氧化氮(NO)等生物活性物质的前体(万军利等, 2006),参与机体生长、免疫、肠道屏障、内分泌等多种代谢调节,在免疫调节及维持和保护肠道黏膜结构和功能等方面起着重要作用(Wang *et al.*, 2009)。在畜禽(姜海龙等, 2015)和淡水鱼(Cheng *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2015)中均报道了 Arg 有利于肠道黏膜损伤后的修复。陈娇娇(2017)离体培养草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肠道黏膜细胞发现, Arg 能促进草鱼细胞间紧密连接蛋白基因的表达; Jiang 等(2015)对建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)的研究发现, Arg 能够调节脂多糖诱导的肠道炎症反应,抑制炎症因子的表达,促进抗炎因子的表达,但作用机制尚不清楚。

许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)是我国北方网箱养殖和增殖放流的理想种类(李宝山等, 2019),作为肉食性经济鱼类,其对鱼粉需求较高,豆粕等植物蛋白过量添加易损伤肠道健康。本研究的前期实验诱导了许氏平鲈肠炎的发生,实验鱼均出现黏膜皱襞高度降低、细胞核排列紊乱、杯状细胞明显增多等 SBMIE 的典型症状。基于以上实验,本研究以诱导出豆粕型肠炎的许氏平鲈[(54.97±0.12) g]为研究对象,从生长性能、Arg 代谢、肠道组织结构、紧密连接蛋白基因(*occludin*、*clnd15* 和 *zo-1*)、炎症因子基因(*il-1β*、*il-8*、*il-15* 和 *tlr8*)和抗炎因子基因(*il-12b*)表达等多方面探讨 Arg 对豆粕型肠炎的修复作用及其机理,以期 Arg 维护鱼类肠道健康方面的应用提供科学依据,为植物蛋白在肉食性经济鱼类许氏平鲈配合饲料中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以白鱼粉、豆粕和酪蛋白为主要蛋白源,鱼油为主要脂肪源,Arg 0 添加为对照组(D0),Arg (L 型,纯度 98%,上海麦克林生化科技有限公司)添加 1%、2%和 3%为处理组(D1、D2 和 D3),用甘氨酸(L 型,纯度 98%,上海麦克林生化科技有限公司)配平饲料总氨基酸水平,配制 4 组等氮等能的实验饲料,饲料

配方、营养组成及饲料 Arg 实测值见表 1。

表 1 饲料配方及营养组成
Tab.1 Composition and nutrient levels of the experimental diets/%

| 原料 Ingredients | 组别 Groups | | | |
|---------------------------|-----------|--------|--------|--------|
| | D0 | D1 | D2 | D3 |
| 白鱼粉 White fish meal | 28.00 | 28.00 | 28.00 | 28.00 |
| 豆粕 Soybean meal | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 |
| 酪蛋白 Casein | 16.00 | 16.00 | 16.00 | 16.00 |
| 精氨酸 Arginine | 0 | 1.00 | 2.00 | 3.00 |
| 甘氨酸 Glycine | 3.00 | 2.00 | 1.00 | 0 |
| 谷朊粉 Wheat gluten | 2.40 | 2.40 | 2.40 | 2.40 |
| A-淀粉 α-Starch | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 |
| 鱼油 Fish oil | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 |
| 维生素预混料 Vitamin premix | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 矿物质预混料 Mineral premix | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 甜菜碱 Betaine | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 大豆卵磷脂 Soybean lecithin | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 氯化胆碱 Choline chloride | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| 抗氧化剂 Antioxidant | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 合计 Total | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 营养组成 Nutrient composition | | | | |
| 粗蛋白 Crude protein | 52.11 | 52.16 | 52.32 | 52.15 |
| 粗脂肪 Crude lipid | 11.41 | 11.37 | 11.22 | 11.52 |
| 粗灰分 Crude ash | 10.84 | 10.78 | 10.74 | 11.01 |
| 能量 Energy kJ/g | 19.97 | 19.99 | 19.97 | 20.60 |
| 精氨酸 Arginine | 2.80 | 3.80 | 4.83 | 5.82 |

注:维生素预混料和矿物质预混料配方组成见参考文献(沈钰博等, 2022)。

Note: Same contents of vitamin premix and mineral premix as reference (Shen *et al.*, 2022).

1.2 实验动物及饲养管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院(东营)试验基地车间的水泥池进行,实验用许氏平鲈购自威海泰丰海水育苗有限公司,选用同一批次的许氏平鲈,预实验设置 30%、40%和 50%的豆粕添加量,分别于实验的第 14、21 和 28 天取样,观察肠道的炎症程度,以所有样品均出现明显的肠道炎症为标准决定豆粕添加量及诱导周期,诱导实验最终使用 40%豆粕饲料喂养 28 d,诱导豆粕型肠炎的发生。修复实验开始前,挑选 480 尾初体重(initial body weight, IBW)为(54.97±1.12) g、已被诱导出豆粕型肠炎的许氏平鲈,随机分为 4 组,每组 3 个重复,每个重复 40 尾鱼,随机置于 12 个自制网箱(60 cm×60 cm×90 cm)中。修复实验进行 6 周,每天定时(08:00 和 17:00)定量投喂 2 次,初始投喂量为体重的 1%,根据摄食情况调整

投喂量并记录死鱼数量和重量。驯养及实验期间每天清底并加注新水,控制水温为 18~22 °C, pH 值为 7.6~8.2, 溶氧>6 mg/L, 氨氮和亚硝酸盐浓度<0.05 mg/L, 光照周期为自然光周期。

1.3 样品采集

实验结束后禁食 24 h, 每桶鱼计数并称末体重 (final body weight, FBW)。每桶随机取 10 尾鱼, 麻醉后测量体长和体重, 尾静脉采血后分离内脏, 所有操作均在冰盘内完成。血液于 4 °C 静置 4 h 后离心 (4 000 r/min, 10 min), 血清保存于-20 °C, 用于酶活性及代谢产物测定。每桶取 3 尾鱼中后肠, 生理盐水匀浆后离心 (2 500 r/min, 10 min), 上清液保存于-20 °C, 用于酶活性测定。每桶取 3 尾鱼后肠 (0.8 cm) 固定于 Bouin's 液中, 24 h 后转移到 70% 酒精中, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后, 进行常规石蜡连续切片 (厚度 7.0 μm), HE 染色后, 中性树胶封片, 徕卡高清摄像系统 (LEICA ICC50HD) 下观察并拍照。每桶取 6 尾鱼后肠 (1 cm) 于液氮中, 转移至-80 °C 冰箱保存, 用于基因表达量测定。

1.4 计算公式与实验方法

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = $[\text{FBW}(\text{g}) - \text{IBW}(\text{g})] \times 100 / \text{IBW}(\text{g})$;

肝体比 (hepatosomatic index, HSI, %) = $\text{肝脏质量}(\text{g}) \times 100 / \text{FBW}(\text{g})$;

脏体比 (viscerosomatic index, VSI, %) = $\text{内脏质量}(\text{g}) \times 100 / \text{FBW}(\text{g})$;

肥满度 (condition factor, CF) = $\text{FBW}(\text{g}) \times 100 / \text{体长}(\text{cm})^3$;

存活率 (survival rate, SR, %) = $\text{成活尾数} \times 100 / \text{总尾数}$ 。

饲料粗蛋白采用凯氏定氮法 (GB/T 6432-2006) 测

定; 粗脂肪采用索氏抽提法 (GB/T 6433-2006) 测定; 粗灰分采用 550 °C 失重法 (GB/T 6438-2007) 测定; 饲料 Arg 使用氨基酸分析仪 (HITACHI L-8900) 测定。

肠道总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 血清二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO)、总一氧化氮合酶 (T-NOS)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 活性及一氧化氮 (NO) 含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

使用山东思科捷生物技术有限公司试剂盒 (SPARKeasy Improved Tissue/Cell RNA Kit) 进行总 RNA 提取, NanoDrop[®]2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 检测 RNA 浓度及纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性及基因组污染情况, 使用 SPARKscript II RT Plus Kit (with gDNA Eraser) 反转录试剂盒去除基因组 DNA 并反转录成 cDNA。使用 2× SYBR Green qPCR Mix (with ROX) 进行实时荧光定量 PCR (LightCycler[®] 480 II) 分析。以核糖体蛋白 L17 (*rpl17*) 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达量, 引物序列见表 2。

1.6 数据统计

所有数据采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 用 Duncan's 检验进行多重比较, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P > 0.05$ 认为差异不显著。统计数据以平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示。

2 结果

2.1 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲈生长性能和形体指标的影响

由表 3 可见, Arg 对 SBMIE-许氏平鲈生长性能

表 2 许氏平鲈肠道相关基因引物序列

Tab.2 Sequence of primers for gut related genes of *S. schlegelii*

| 基因名称 Gene names | 正向引物 Forward primer (5'~3') | 反向引物 Reverse primer (5'~3') |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>rpl17</i> | AGGCGACGCACCTACCG | CCTCTGGTTTGGGGACGA |
| <i>occludin</i> | ACACCACAGGAGGAGAAACG | CTCTAAGGTCGGCATCAAATT |
| <i>clnd15</i> | TGCCGAACCGTTACTGGA | CGAATCCGTCGCACAAGA |
| <i>zo-1</i> | AACGCCGCAACAAAAGA | TGGCGGGGAAAGGATT |
| <i>il-1β</i> | TGGTTTCCCACGACTTCAC | TTTCGGTCACCAGGCTCT |
| <i>IL-8</i> | CTTATGGGACCCTGTTTGCT | TTCTTTAATCCACCCCTCGT |
| <i>il-12b</i> | CTCTGGCATCCTTATCAGTTCA | GTCTTGGTTGCTGGCGTAG |
| <i>il-15</i> | CGCCTACAATACTAAAGAGC | AGATGACGGAGCATAACAGCA |
| <i>tlr8</i> | ACGTGATCGTGCTGCTGA | CCAAAACCAAGGCTCTGC |

及形体指标具有显著影响。D2 和 D3 组许氏平鲉的末体重和增重率显著高于 D0 组($P<0.05$), D1 组与其他各组差异均不显著($P>0.05$); D1、D2 和 D3 组肝体比和脏体比均显著低于 D0 组($P<0.05$); D2 组肥满度显著高于其他各组($P<0.05$), D1 和 D3 组显著高于 D0 组($P<0.05$); 各组间存活率差异不显著($P>0.05$)。

2.2 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲉血清精氨酸代谢相关酶活性及代谢产物的影响

由表 4 可见, 添加 Arg 的各组许氏平鲉血清 DAO 活性、NO 含量及 iNOS 活性均显著低于 D0 组($P<0.05$), 各处理组间无显著性差异($P>0.05$); D2 和 D3 组血清 T-NOS 活性显著低于 D0 组($P<0.05$), D1 组与其他各组间无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲉肠道组织结构的影响

由表 5 可见, 各处理组间皱襞数目和肌层厚度无显著性差异($P>0.05$), 添加 Arg 的各组, 皱襞高度显

著高于 D0 组($P<0.05$), 以 D2 组最高, D3 组与 D1、D2 组无显著性差异($P>0.05$)。由图 1 可见, D0 组肠道黏膜受到损伤, 固有层增宽(图 1-1), 杯状细胞数量增加, 细胞核向单层柱状上皮细胞顶端移位, 排列不规则(图 1-5), 添加 Arg 的各组, 肠道黏膜结构完整, 固有层增宽(图 1-3)和杯状细胞增多现象明显改善(图 1-2~4), 单层柱状上皮细胞排列规整, 且细胞核整齐排列于细胞中下部(图 1-6~8)。

2.4 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲉肠道抗氧化能力的影响

由表 6 可见, 各处理组肠道 T-AOC 显著高于 D0 组($P<0.05$), D2 组显著高于其他各组($P<0.05$), D1 和 D3 组与对照组差异不显著($P>0.05$); 随着 Arg 添加量的升高, 肠道 MDA 含量呈先降低后升高的趋势, D2 和 D3 组显著低于 D0 组($P<0.05$), D1 组与其他各组差异不显著($P>0.05$)。

表 3 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲉生长性能和形体指标的影响

Tab.3 Effects of arginine on growth performance and body indexes of SBMIE-*S. schlegelii*

| 项目 Items | 组别 Groups | | | |
|-------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | D0 | D1 | D2 | D3 |
| 初体重 IBW/g | 54.90±0.03 | 54.92±0.01 | 54.93±0.05 | 54.99±0.03 |
| 末体重 FBW/g | 81.51±0.39 ^a | 83.18±0.67 ^{ab} | 84.94±0.41 ^b | 83.97±0.16 ^b |
| 增重率 WGR/% | 48.43±0.81 ^a | 51.47±1.25 ^{ab} | 54.65±0.81 ^b | 52.68±0.44 ^b |
| 肝体比 HSI/% | 4.08±0.06 ^b | 3.45±0.11 ^a | 3.30±0.10 ^a | 3.40±0.04 ^a |
| 脏体比 VSI/% | 10.39±0.22 ^b | 9.56±0.08 ^a | 9.29±0.07 ^a | 9.33±0.12 ^a |
| 肥满度 CF | 2.45±0.03 ^a | 3.24±0.10 ^b | 3.65±0.07 ^c | 3.30±0.05 ^b |
| 存活率 SR/% | 98.33±0.83 | 98.33±0.83 | 98.33±1.67 | 98.33±1.67 |

注: 表格中同行肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同。

Note: In the same row, data with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences ($P>0.05$). Different small letter superscripts mean significant differences ($P<0.05$). The same below.

表 4 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲉血清精氨酸代谢相关酶活性及代谢产物的影响

Tab.4 Effects of arginine on metabolism-related enzymes and arginine metabolites of SBMIE-*S. schlegelii*

| 项目 Items | 组别 Groups | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | D0 | D1 | D2 | D3 |
| 二胺氧化酶 DAO/(U/L) | 122.80±6.33 ^b | 92.66±3.13 ^a | 96.61±3.70 ^a | 97.78±6.43 ^a |
| 一氧化氮 NO/(umol/L) | 27.02±1.59 ^b | 18.39±0.91 ^a | 19.09±2.35 ^a | 18.56±2.80 ^a |
| 总一氧化氮合成酶 T-NOS/(U/mL) | 21.21±0.78 ^b | 19.34±0.57 ^{ab} | 18.86±0.70 ^a | 17.41±0.31 ^a |
| 诱导型一氧化氮合成酶 iNOS/(U/mL) | 15.77±0.77 ^b | 11.88±1.22 ^a | 11.62±0.63 ^a | 11.29±0.19 ^a |

表 5 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲉肠道组织结构的影响

Tab.5 Effects of arginine on intestinal structure of SBMIE-*S. schlegelii*

| 项目 Items | 组别 Groups | | | |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | D0 | D1 | D2 | D3 |
| 皱襞数目 Duplication number | 25.67±0.33 | 26.33±0.67 | 27.33±1.20 | 26.33±1.20 |
| 皱襞高度 Duplication height/ μ m | 295.22±13.15 ^a | 414.05±8.04 ^b | 505.72±26.57 ^c | 468.47±23.77 ^{bc} |
| 肌层厚度 Muscle thickness/ μ m | 97.32±5.14 | 97.87±3.01 | 93.42±8.31 | 87.68±5.47 |

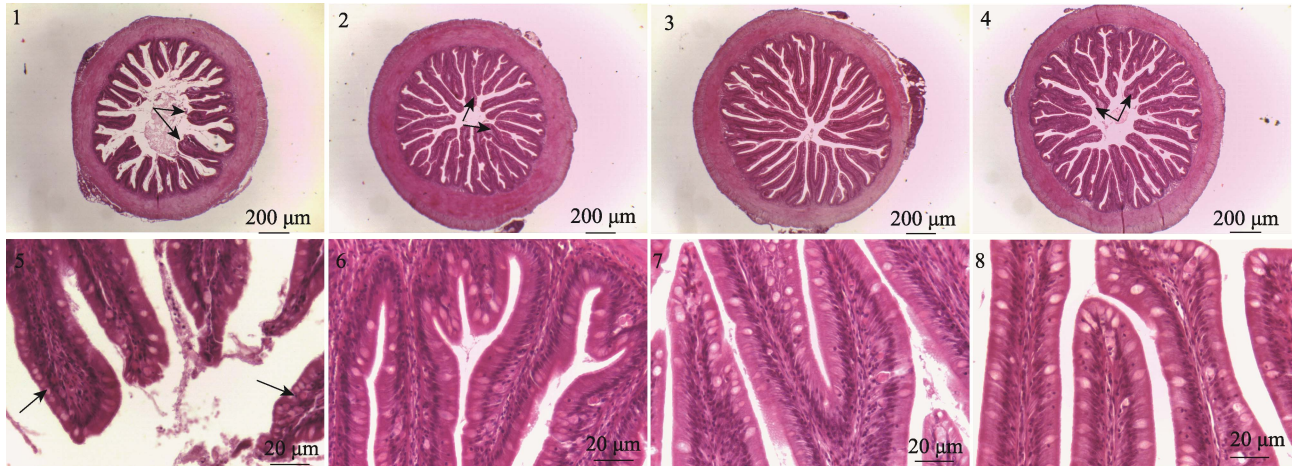


图1 SBMIE-许氏平鲉肠道组织结构

Fig.1 Intestinal structure of SBMIE-*S. schlegelii*

图中1~4分别代表40×下D0、D1、D2、D3组实验鱼肠道整体结构；5~8分别代表400×下D0、D1、D2、D3组肠道皱襞结构；1、2、4中箭头所示固有层增宽，5中箭头所示杯状细胞数量增加。

1~4 represent the overall structure of intestinal tract under 40× in group D0, D1, D2, and D3, respectively; 5~8 represent the intestinal fold structure under 400× in group D0, D1, D2 and D3, respectively. The arrows in figure 1, 2 and 4 indicated lamina propria widening, while the arrows in figure 5 show an increase in goblet cells.

表6 精氨酸对SBMIE-许氏平鲉肠道抗氧化能力的影响

Tab.6 Effects of arginine on intestinal antioxidant capacity of SBMIE-*S. schlegelii*

| 项目 Items | 组别 Groups | | | |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | D0 | D1 | D2 | D3 |
| 总抗氧化能力 T-AOC /(mmol/g prot) | 42.65±0.93 ^a | 46.44±0.51 ^b | 50.56±1.17 ^c | 45.75±0.53 ^b |
| 丙二醛 MDA /(nmol/mg prot) | 1.68±0.10 ^b | 1.45±0.05 ^{ab} | 1.15±0.10 ^a | 1.32±0.11 ^a |

2.5 精氨酸对SBMIE-许氏平鲉肠道紧密连接蛋白基因表达量的影响

由图2可见，相较于D0组，添加Arg的各组 *occludin* mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)，D1和D3组显著高于对照D0组 ($P < 0.05$)，D2组与其他各组均无显著差异 ($P > 0.05$)；D2组显著高于D0和D1组 ($P < 0.05$)，D1和D3组 *clnd15* mRNA 相对表达量与D0组差异不显著 ($P > 0.05$)，D3组与D0和D2组差异

不显著 ($P > 0.05$)；D1组 *zo-1* mRNA 相对表达量显著高于其他各组 ($P < 0.05$)，D2和D3组与D0组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.6 精氨酸对SBMIE-许氏平鲉肠道炎症因子和抗炎因子基因表达量的影响

由图3可见，添加Arg各组许氏平鲉肠道 *il-1β* mRNA 相对表达量下调，D1和D2组显著低于D0组 ($P < 0.05$)，D3组与其他各組间无显著差异 ($P > 0.05$)；

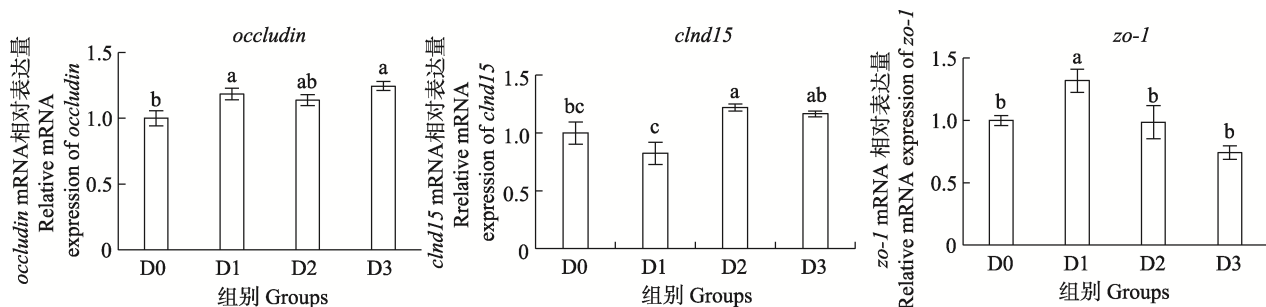


图2 精氨酸对SBMIE-许氏平鲉肠道紧密连接蛋白基因表达量的影响

Fig.2 Effects of arginine on intestinal tight junction protein gene expression of SBMIE-*S. schlegelii*

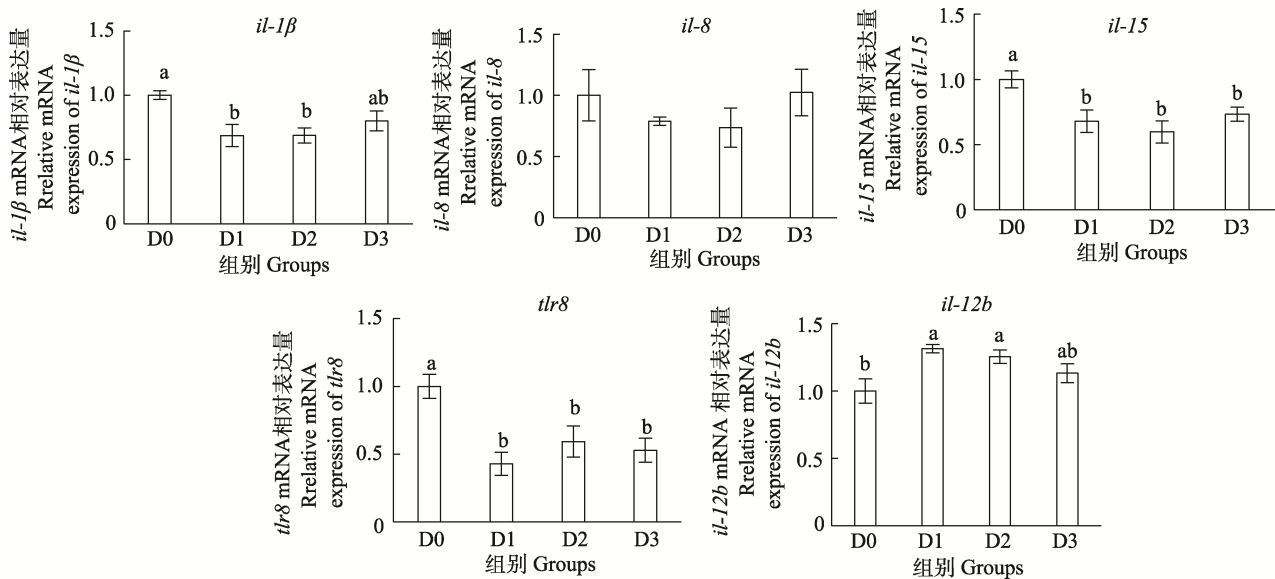


图 3 精氨酸对 SBMIE-许氏平鲈肠道炎症因子和抗炎因子基因表达量的影响
Fig.3 Effects of arginine on intestinal inflammatory and anti-inflammatory factors gene expression of SBMIE-*S. schlegelii*

Arg 对 *IL-8* mRNA 相对表达量无显著影响($P>0.05$); 各处理组 *il-15* 和 *tlr8* 的 mRNA 相对表达量显著低于 D0 组($P<0.05$), 且各处理组间差异不显著($P>0.05$); D1 和 D2 组 *il-12b* mRNA 相对表达量显著高于 D0 组($P<0.05$), D3 组与其他各组差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

对斜带石斑鱼(王彦飞, 2019)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)(王亚如, 2017)、黄金鲈(*Perca flavescens*)(吴莉莉等, 2017)等的研究均表明, 长期摄食高豆粕饲料会影响生长性能。豆粕中含有大豆抗原蛋白、皂甙、植酸、非淀粉多糖等抗营养因子(Gu *et al*, 2016), 会降低饲料蛋白质的利用, 增加内源蛋白质的分泌, 最终导致粪氮增加(孙泽威等, 2005)。正常饮食情况下, 健康许氏平鲈对 Arg 的最适需求量为 2.78% (沈钰博等, 2022), 本研究 D0 组饲料 Arg 水平为 2.799%, 满足正常许氏平鲈的基本营养需求, 但 SBMIE-许氏平鲈的肠道受到损伤, 肠道功能的完整性直接影响鱼类生长性能, 而在大菱鲆(Gu *et al*, 2017)、眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)(Cheng *et al*, 2011)等的研究均已证明, Arg 通过改善肠道功能, 进而影响实验鱼生长性能。本研究在基础配方 Arg 水平上额外添加 Arg, 对许氏平鲈的增重率产生了显著的影响, 2%的 Arg (D2)显著提高了 SBMIE-许氏平鲈的增重率, 并且 Arg 的添加改善了肝体比、脏体比, 提高了肥满度, 推测 Arg 对 SBMIE-许氏平鲈的肠道产

生了积极影响, 从而提高了生长性能。

二胺氧化酶(DAO)是反映肠道机械屏障受损伤程度的细胞内酶, 在小肠黏膜上皮细胞绒毛中含量高、活性强, 若肠黏膜细胞受损、通透性增加, 细胞内 DAO 会通过肠道屏障释放到细胞外进入血液(卓丽欣等, 2018)。本研究 Arg 显著降低了血清 DAO 活性, 提示 D0 组肠道细胞膜通透性增加, 而 Arg 显著降低了 DAO 的释放, 保护了肠黏膜屏障的完整性。诱导型 NOS (iNOS)主要分布于巨噬细胞, 一经产生就会催化生成大量 NO (Wang *et al*, 2009)。NO 参与上皮细胞迁移, 形成新的上皮细胞, 促进肠黏膜修复; 在炎症反应中, 致炎物可诱导局部 NO 合成与释放(孙红暖等, 2014), 过量 NO 会与体内氧自由基结合生成 ONOO⁻和 NO²⁻, 导致肠黏膜损伤(Upperman *et al*, 2005)。大黄鱼(*Larimichthys crocea*)日粮添加 Arg 显著提高鱼血清 T-NOS 和肝脏 T-NOS、iNOS 活性, NO 显著升高(Zhou *et al*, 2012); 沈钰博等(2022)在许氏平鲈中也获得相同趋势, 血清 NO 从对照组 4.82 μmol/L 提高到 19.26 μmol/L。本研究 Arg 添加组血清 T-NOS 和 iNOS 活性显著降低, 血清 NO 从 D0 组 27.02 μmol/L 降至 18.39~19.09 μmol/L, 与上述研究趋势相反, 但 Arg 添加组的数值相符, 原因可能是上述研究的实验鱼处于健康状态, 适当添加 Arg 可提高 NOS 活性, 从而增加 NO 的产生, 而本研究 D0 组许氏平鲈肠道受到严重损伤, 炎症反应激活了巨噬细胞 iNOS 的合成, 增强了 NO 合成与释放, 导致血清 NO 过量, 而 Arg 可有效修复肠黏膜损伤, 降低炎症反应, 从而将

NO 的合成与释放控制在正常范围。

肠道结构的完整性与肠道吸收能力密切相关。对大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)(Refstie *et al*, 2006)、大菱鲆(Sun *et al*, 2022)、黄金鲈(吴莉芳等, 2017)等鱼的研究均表明, 饲料中大量使用豆粕会导致肠道黏膜病理变化, 且随着饲料豆粕比例升高及饲喂时间延长而越发严重。豆粕中含有较多的植物凝集素, 与蛋白质和碳水化合物等有很强的结合能力, 可作用于肠黏膜刷状缘, 引起黏膜结构破坏及通透性增加(周红蕾等, 2006)。本研究 D0 组出现了皱襞高度降低、上皮细胞脱落、固有层增宽、杯状细胞数量增加等明显的 SBMIE 症状, 添加 Arg 后肠炎症状明显改善, 以 D2 组皱襞高度最高。在红鱼(*Sciaenops ocellatus*)(Cheng *et al*, 2011)和杂交条纹鲈鱼(*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*)(Cheng *et al*, 2012)研究中也观察到类似结果: 饲料添加 1% Arg (豆粕提供 40% 饲料蛋白质), 鱼的皱襞高度、肠细胞高度和微绒毛高度均有所提高。以上均表明, Arg 在维护肠道黏膜结构完整性方面的积极作用。

T-AOC 高低体现机体清除活性氧自由基、保护细胞膜和细胞内核酸抵御自由基氧化损伤能力的高低(卓丽欣等, 2018)。MDA 是生物体内脂质氧化的终产物, 具有细胞毒性, 能间接反映机体是否存在氧化损伤。对大黄鱼(吴钊, 2016)、奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)(Lin *et al*, 2011)、黄金鲫(*Carassius auratus*)(王婧瑶等, 2022)等的研究均表明, 豆粕过量替代鱼粉会降低鱼体抗氧化能力。本研究 D0 组肠道 T-AOC 最低而 MDA 含量最高, 与上述结果一致。可能是 D0 组许氏平鲈长期大量摄入豆粕造成了肠道黏膜损伤, 机体过量自由基得不到及时清除, 产生大量脂质过氧化产物 MDA (李学丽等, 2017)。而添加 Arg 各组肠道 T-AOC 显著升高, MDA 显著降低, 表明 Arg 可以改善由高剂量豆粕引起的机体氧化损伤, 在草鱼(陈娇娇, 2017)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(陈启明, 2016)上也得到了类似结论。Tan 等(2010)研究表明, Arg 能刺激细胞增殖并预防内毒素引起的肠细胞死亡, 可能是 Arg 修复了受损的肠道黏膜, 保护肠道细胞免受损伤, 从而恢复了机体抗氧化能力。

肠道紧密连接通透性决定肠道黏膜屏障的功能, 跨膜蛋白[如闭锁蛋白(occludin)和闭合蛋白(claudin, CLND)]以及胞质蛋白(如 zo-1)构成紧密连接的复杂蛋白质结构, zo-1 通过氨基端的 PDZ 结构域和 occludin、claudin 直接连接, 在紧密连接的结构组成中发挥重要作用(孔瑶瑶等, 2020)。对珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus*

lanceolatus ♂) 的研究表明, 紧密连接相关基因 occludin、clnd15a、zo-1 在前、中、后肠表达量都较高, 提示三者为维护肠道黏膜屏障功能上的关键作用(陈东鸿等, 2021)。zo-1 表达量在相当程度上受饲料营养素的影响和调节(孔瑶瑶等, 2020), 在 Arg (Chen *et al*, 2018)、谷氨酸(Jiang *et al*, 2017)、缬氨酸(Luo *et al*, 2014)上均得到证实。对大菱鲆的研究表明, 40% 豆粕显著降低了大菱鲆肠道紧密连接蛋白相关基因表达量而引发肠道炎症(Chen *et al*, 2018)。Arg 作为功能性氨基酸, 可能主要通过改善肠道黏膜屏障功能来减轻肠道疾病, 对珍珠龙胆石斑鱼(陈东鸿等, 2021)和草鱼(陈娇娇, 2017)的研究表明, Arg 可能通过增加 occludin 和 clnd15a 基因表达水平, 加强与 ZO 对紧密连接“锁扣”结构的“闭合”调控, 从而保障肠黏膜屏障的功能。建鲤幼鱼饲料中 Arg 缺乏导致肠道紧密连接蛋白表达异常(Wang *et al*, 2016)。本研究 D0 组 30% 的豆粕添加量肠道 occludin、clnd15、zo-1 三种紧密连接蛋白基因的相对表达量均受到影响, Arg 的添加显著上调了 3 个基因的相对表达量, 与上述研究结果一致, 表明 Arg 在修复肠黏膜屏障方面具有一定作用。

鱼类肠黏膜免疫状态与炎症反应密切相关, 肠黏膜受损会引起通透性增加, 细菌、毒素等会激活肠黏膜淋巴组织, 引发免疫反应并释放大量促炎因子, 影响肠上皮细胞对营养物质的吸收和对离子的转运(王亚如, 2017)。SBMIE 通常与白细胞介素(il)、TLRs 等促炎细胞因子基因的高表达有关(Zhao *et al*, 2019), il-1β、IL-8、il-12b、il-15 和 tlr8 是肠道免疫的重要调节因子, 在黏膜损伤或感染反应中起着关键作用(Wang *et al*, 2017)。il-1β 主要由活化的巨噬细胞和单核细胞产生, 对肠上皮通透性有刺激作用(Planchon *et al*, 1994)。TLRs 能够识别肠道病原体相关分子, 转化为参与肠道炎症控制的信号, 使炎症处于控制之下(Zhao *et al*, 2019)。大菱鲆(Zhao *et al*, 2019)和斜带石斑鱼(Wang *et al*, 2017)摄食高剂量豆粕, 肠道 il-1β 和 TLRs 相关分子基因表达上调, 肠黏膜受损, 而饲料中添加 1% Arg 显著抑制了大菱鲆肠道促炎因子的表达, 提高了抗炎因子在后肠的表达(Chen *et al*, 2018); 在培养基中添加 Arg, 显著降低了脂多糖诱导处理的细胞 TLR4 的表达(Tan *et al*, 2010)。本研究 Arg 添加组肠道炎症程度较 D0 组显著降低, 与 il-1β、IL-8、il-15 和 tlr8 表达水平呈正相关, 与 il-12b 表达水平呈负相关, 提示 Arg 可通过降低促炎因子水平和提高抗炎因子水平缓解肠道炎症。另有研究表明, il-1β 等促炎因子能够抑制紧密连接蛋白基因的表达(石丹等, 2015), 推测 Arg 通过抑制促炎因子的表达,

从而促进细胞间紧密连接蛋白合成, 增强鱼类上皮细胞间物理屏障功能。

4 结论

本实验条件下, 高豆粕饲料中添加 Arg 能显著提高 SBMIE-许氏平鲷的生长性能和抗氧化性能, 改善 Arg 代谢和肠道组织结构, 上调肠道紧密连接蛋白和抗炎因子相关基因的表达, 下调炎症因子相关基因的表达。因此, Arg (以 2%最佳)对许氏平鲷豆粕型肠炎具有修复作用。

参 考 文 献

- CHEN D H, CUI X, LI G, *et al.* Clone of zonula occluden-1, occludin and claudin-15a genes from hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) and its expression in intestinal tissue under intervention of arginine. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4645–4661 [陈东鸿, 崔晓, 李广, 等. 珍珠龙胆石斑鱼闭锁小带蛋白-1、闭锁蛋白和跨膜蛋白-15a 基因的克隆及其在精氨酸干预下的肠道组织表达. *动物营养学报*, 2021, 33(8): 4645–4661]
- CHEN J J. Studies on the regulation and the related mechanism of arginine on growth and intestinal structure of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 [陈娇娇. 精氨酸对草鱼幼鱼生长、肠道结构调控及机制研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2017]
- CHEN Q M. Effects of dietary arginine levels on growth, immunity and intestinal health of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016 [陈启明. 精氨酸对黄颡鱼生长、免疫及肠道健康的影响. 华南农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- CHEN Z C, LIU Y, LI Y X, *et al.* Dietary arginine supplementation mitigates the soybean meal induced enteropathy in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*, 2018, 49(4): 1535–1545
- CHENG Z Y, ALEJANDRO B, DELBERT M G. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 2011, 319(1): 247–252
- CHENG Z Y, GATLIN D M, BUENTELLO A. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 2012, 362/363: 39–43
- GU M, BAI N, XU B, *et al.* Protective effect of glutamine and arginine against soybean meal-induced enteritis in the juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 70: 95–105
- GU M, BAI N, ZHANG Y, *et al.* Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. *Aquaculture*, 2016, 464: 286–295
- JIANG H L, QIN G X, CHE D S, *et al.* Effect of arginine on piglet intestinal mechanical barrier and related mechanism. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2015, 37(1): 83–87 [姜海龙, 秦贵信, 车东升, 等. 精氨酸对仔猪肠道机械屏障的影响及相关机理. *吉林农业大学学报*, 2015, 37(1): 83–87]
- JIANG J, SHI D, ZHOU X Q, *et al.* In vitro and in vivo protective effect of arginine against lipopolysaccharide induced inflammatory response in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 457–464
- JIANG J, YIN L, LI J Y, *et al.* Glutamate attenuates lipopolysaccharide induced oxidative damage and mrna expression changes of tight junction and defensin proteins, inflammatory and apoptosis response signaling molecules in the intestine of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 70: 473–484
- KONG Y Y, MA X H, MAI K S, *et al.* Research progress of effects of diet nutrients on intestinal tight junction protein zonula occludens-1 of fish. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(11): 5081–5088 [孔瑶瑶, 马秀华, 麦康森, 等. 饲料营养素对鱼类肠道紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1 影响的研究进展. *动物营养学报*, 2020, 32(11): 5081–5088]
- LI B S, WANG J Y, WANG C Q, *et al.* Development of formula diet and current situation of culture industry of Korean rockfish *Sebastes schlegelii*. *Open Journal of Fisheries Research*, 2019, 6(2): 1–10 [李宝山, 王际英, 王成强, 等. 许氏平鲷配合饲料的研究进展及产业发展现状. *水产研究*, 2019, 6(2): 1–10]
- LI X L, WANG J Y, SONG Z D, *et al.* Research on partial replacement of fishmeal by two kinds of soybean meal in the feed of juvenile ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(5): 716–725 [李学丽, 王际英, 宋志东, 等. 两种豆粕部分替代鱼粉在珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中的研究. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(5): 716–725]
- LIN S M, LUO L. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 168: 80–87
- LUO J B, FENG L, JIANG W D, *et al.* The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreasing immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 197–207
- MERRIFIELD D L, DIMITROGLOU A, BRADLEY G, *et al.*

- Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(9): 755–766
- PLANCHON S M, MARTINS C, GUERRANT R L, *et al.* Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *Journal of Immunology*, 1994, 153(12): 5730–5739
- REFSTIE S L, LANDSVERK T, BAKKE-MCKELLEP A M, *et al.* Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 269–284
- SHEN Y B, WANG J Y, LI B S, *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 33–44 [沈钰博, 王际英, 李宝山, 等. 许氏平鲉幼鱼对饲料中精氨酸需求量的研究. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 33–44]
- SHI D, ZHOU X Q, ZHAO Y, *et al.* Effects of arginine on immune function in fish and its mechanism. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(10): 3026–3032 [石丹, 周小秋, 赵叶, 等. 精氨酸对鱼类免疫功能的影响及其机制. *动物营养学报*, 2015, 27(10): 3026–3032]
- SUN H N, YANG H M, WANG Z Y, *et al.* Nutrition physiological and immune functions of arginine in animals. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(1): 54–62 [孙红暖, 杨海明, 王志跃, 等. 精氨酸对动物的营养生理免疫作用. *动物营养学报*, 2014, 26(1): 54–62]
- SUN H Y, ZHANG J J, WANG W T, *et al.* The effects of sodium propionate supplementation in the diet with high soybean meal on growth performance, intestinal health, and immune resistance to bacterial infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture Nutrition*, 2022, 2022: 8952755
- SUN Z W, QIN G X, ZHANG Q H. Effects of soybean antigen protein on growth performance, dietary nutrient digestibility and intestinal absorption capacity of calves. *Chinese Journal of Animal Science*, 2005, 11: 33–36 [孙泽威, 秦贵信, 张庆华. 大豆抗原蛋白对犊牛生长性能、日粮养分消化率和肠道吸收能力的影响. *中国畜牧杂志*, 2005, 11: 33–36]
- TAN B, YIN Y, KONG X, *et al.* L-arginine stimulates proliferation and prevents endotoxin-induced death of intestinal cells. *Amino Acids*, 2010, 38(4): 1227–1235
- UPPERMAN J S, POTOKA D A, GRISHIN A, *et al.* Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*, 2005, 14(3): 159–166
- WAN J L, MAI K S, AI Q H. The recent advance on arginine nutritional physiology in fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 679–685 [万军利, 麦康森, 艾庆辉. 鱼类精氨酸营养生理研究进展. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 679–685]
- WANG B, FENG L, CHEN G F, *et al.* Jian carp (*Cyprinus Carpio* var. Jian) intestinal immune responses, antioxidant status and tight junction protein mRNA expression are modulated via Nrf2 and PKC in response to dietary arginine deficiency. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 51: 116–124
- WANG J Y, WU L F, WANG D, *et al.* Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth, digestive enzyme activity and non-specific immune indexes of *Carassius auratus*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2022, 44(1): 104–111 [王婧瑶, 吴莉芳, 王东, 等. 豆粕替代鱼粉对黄金鲫生长、消化酶活力及非特异性免疫指标的影响. *吉林农业大学学报*, 2022, 44(1): 104–111]
- WANG W W, QIAO S Y, LI D F. Amino acids and gut function. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 105–110
- WANG Y F. Effects of fish meal replacement with extruded or common soybean meal on the growth performance and gut-barrier function of grouper (*Epinephelus coioides*). Master's Thesis of Jimei University, 2019 [王彦飞. 膨化和普通豆粕替代鱼粉对斜带石斑鱼生长性能和肠道屏障的影响. 集美大学硕士研究生学位论文, 2019]
- WANG Y R, WANG L, ZHANG C X, *et al.* Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Reports*, 2017, 5(C): 52–57
- WANG Y R. Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal healthy in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Master's Thesis of Jimei University, 2017 [王亚如. 豆粕替代鱼粉对花鲈生长性能和肠道健康的影响. 集美大学硕士研究生学位论文, 2017]
- WU L F, QU Z H, ZHOU K, *et al.* Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth and intestinal tissue of *Perca flavescens*. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(6): 1–8 [吴莉芳, 瞿子惠, 周镡, 等. 豆粕替代鱼粉对黄金鲈生长及肠道组织的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(6): 1–8]
- WU Z. Research on the partial replacement of fish meal by different processing soybean meal in the diet of *Pseudosciaena crocea*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [吴钊. 不同工艺的豆粕部分替代鱼粉在大黄鱼饲料中的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- ZHAO S F, CHEN Z C, ZHENG J, *et al.* Citric acid mitigates soybean meal induced inflammatory response and tight junction disruption by altering TLR signal transduction in the intestine of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 92: 181–187
- ZHOU H L, LI C L, WANG G P, *et al.* Anti-nutritional factors in soybean meal and their removal methods. *Feed Industry*, 2006(3): 23–26 [周红蕾, 李春玲, 王贵平, 等. 大豆中抗营养因子及其去除方法概述. *饲料工业*, 2006(3): 23–26]

ZHOU Q C, ZENG W P, WANG H L, *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile yellow grouper *Epinephelus awoara*. *Aquaculture*, 2012, 350/351/352/353: 175–182

ZHUO L X, ZHAO H X, HUANG Y H, *et al.* Influence of oxidized fish oil on the intestinal health of juvenile yellow

catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and the use of arginine as an intervention measure. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 100–111 [卓丽欣, 赵红霞, 黄燕华, 等. 氧化鱼油对黄颡鱼幼鱼肠道健康的影响及精氨酸的干预作用. *水产学报*, 2018, 42(1): 100–111]

(编辑 陈 辉)

The Repairing Effect of Arginine on Soybean Meal-Induced Enteritis of *Sebastes schlegelii*

WANG Xiaoyan, LI Baoshan, SUN Yongzhi^①, WANG Chengqiang, LI Lu, SUN Xiaoyu, WANG Dan, ZUO Zhen, LI Peiyu, HUANG Bingshan, WANG Jiyong

(Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Marine Fishery Feed Engineering Technology Research Center, Aquatic Animal Nutrition and Feed Research and Development Innovation Demonstration Platform, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006, China)

Abstract The complete intestinal structure is important to ensure the rapid and healthy growth of fish. However, the feed composition, aquaculture water environment, intestinal microbial population, and other factors may affect the intestinal health of fish. Intestinal health problems caused by feed ingredients are mainly due to the antinutrient factors contained in raw materials. Antinutritional factors contained in high-level soybean meal can cause oxidative damage to the intestine, thus, inducing soybean meal-induced enteritis (SBMIE), which leads to a decreased appetite and the slow growth of fish. Alleviating the damage of soybean meal to the fish intestinal tract and improving intestinal health through nutrition are essential methods for ensuring the sustainable development of the feed industry, which has significant ecological and economic significance.

As a functional amino acid, arginine is a precursor to the synthesis of bioactive substances, such as urea, glutamic acid, creatine, proline, polyamine, and nitric oxide. Arginine modulates metabolic regulation, including growth, immunity, intestinal barrier, and endocrine regulation. It plays a vital role in the immune regulation, maintenance, and protection of the intestinal mucosal structure and function. It has been reported that arginine is beneficial for repairing intestinal mucosal injury in poultry and aquatic animals. In this study, the carnivorous marine economic fish *Sebastes schlegelii* (54.97±0.12) g were used to investigate the repair effect and mechanism of arginine on SBMIE. This study aimed to provide a scientific basis for the application of arginine for maintaining the intestinal health of fish and provide a reference for the application of plant protein to the compound feed of the carnivorous economic fish *S. schlegelii*.

The purpose of this study was to investigate the repairing effects of arginine on the growth performance, arginine metabolism, intestinal structure, antioxidant performance, relative expression levels of intestinal tight junction protein genes (*occludin*, *clnd15*, and *zo-1*), and inflammatory factor-related genes (*il-1 β* , *il-8*, *il-15*, and *tlr8*) and anti-inflammatory factor-related gene (*il-12b*) of *S. schlegelii* with SBMIE. *S. schlegelii* were fed high-level soybean meal (40%) for 28 days to induce SBMIE. SBMIE-*S. schlegelii* weighing (54.97±0.12) g were used as the study animals. Four

① Corresponding author: SUN Yongzhi, E-mail: sssunyongzhi@126.com

isonitrogen and isoenergetic experimental feeds were formulated. The basic formula was supplemented with 30% soybean meal, arginine 0 supplementation as the control group (D0), and 1%, 2%, and 3% arginine supplementation as the treatment groups, named D1, D2, and D3, respectively. Each diet group had three replicates, and each replicate consisted of 40 fish. The fish were randomly placed in 12 homemade cages (60 cm × 60 cm × 90 cm). The experiment lasted for 6 weeks. The experimental fish were fed twice a day (08:00 and 17:00), with the initial feeding amount being 1% of the body weight, and the feeding amount being adjusted according to the feeding situation. During the experiment, the bottom of the cages was cleaned, and the water was changed every day to maintain the water temperature at 18~22 °C, the dissolved oxygen at > 6 mg/L, the pH at 7.6~8.2, the ammonia nitrogen content at < 0.05 mg/L, and the nitrite nitrogen content at < 0.05 mg/L. The light cycle was the natural cycle. The results showed that the weight gain rate of the fish in the D2 and D3 groups was significantly higher than that in D0 group ($P < 0.05$). The hepatosomatic and viscerosomatic indexes of the fish in the arginine treatment groups were significantly lower than those in the D0 group, and the condition factor was significantly higher than that in the D0 group ($P < 0.05$). There was no significant effect on the survival rate ($P > 0.05$). Diamine oxidase (DAO) activity, NO content, and iNOS activity values in the serum of the treatment groups were significantly lower than those in the D0 group ($P < 0.05$). The serum T-NOS activity in the D2 and D3 groups was significantly lower than that in the D0 group ($P < 0.05$). The duplicature height in the treatment groups was significantly higher than that in the D0 group, while no significant difference was found in the duplicature number and muscle thickness ($P > 0.05$). In group D0, the intestinal mucosa lamina propria widened, and the number of goblet cells increased, while in groups supplemented with arginine, the intestinal mucosa was intact, and the problems mentioned above improved significantly. Intestinal total antioxidant capacity (T-AOC) in arginine supplementation groups was significantly increased, and the highest value was found in group D2 ($P < 0.05$). The malondialdehyde content in groups D2 and D3 was decreased significantly compared to that in the D0 group ($P < 0.05$). The relative expression of *occludin* mRNA in each treatment group was significantly upregulated compared to that in the D0 group ($P < 0.05$). The relative expression level of *clnd15* mRNA in the D2 group was significantly higher than that in the D0 and D1 groups ($P < 0.05$). The relative expression level of *zo-1* mRNA in group D1 was significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$). The relative expression levels of *IL-1 β* , *IL-15*, and *TLR8* mRNA were downregulated in all treatment groups, while the relative expression of *IL-12b* mRNA was upregulated ($P < 0.05$). No significant differences were found in *IL-8* mRNA relative expression ($P > 0.05$). In conclusion, under the conditions of this experiment, the growth and antioxidant performances of *S. schlegelii* with SBMIE were significantly increased, arginine metabolism and the intestinal structure were improved significantly, and the relative expression of intestinal tight junction protein and anti-inflammatory factor-related genes was upregulated, while that of inflammatory factor-related genes was downregulated, with arginine supplementation in a high-level soybean meal diet. Arginine (2% best) was effective in repairing SBMIE of *S. schlegelii*. The results of this study provide a theoretical basis for the mechanism of repairing SBMIE with arginine.

Key words *Sebastes schlegelii*; Arginine; Soybean meal-induced enteritis; Tight junction protein; Inflammatory factor

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221205001

http://www.yykxjz.cn/

李文文, 徐革锋, 黄天晴, 谷伟, 刘恩慧, 王高超, 潘玉财, 周金鑫, 姜再胜, 王炳谦. 基于转录组测序筛选乌苏里白鲑肌肉生长关键候选基因研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 87-100

LI W W, XU G F, HUANG T Q, GU W, LIU E H, WANG G C, PAN Y C, ZHOU J X, JIANG Z S, WANG B Q. Screening muscle growth-related genes of *Coregonus ussurinsis* Berg based on transcriptome sequencing. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 87-100

基于转录组测序筛选乌苏里白鲑 肌肉生长关键候选基因研究*



李文文^{1,2} 徐革锋^{2①} 黄天晴² 谷伟² 刘恩慧²
王高超² 潘玉财² 周金鑫² 姜再胜³ 王炳谦²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 冷水性鱼类产业技术创新战略联盟 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 安徽省桐城市水产服务中心 安徽 桐城 231400)

摘要 为了挖掘调控乌苏里白鲑(*Coregonus ussurinsis* Berg)肌肉生长的关键候选基因,本研究对不同生长速度乌苏里白鲑的肌肉组织进行转录组测序,以期为乌苏里白鲑群体选育提供基础数据。首先,在同等条件下(从混合池中)随机选择乌苏里白鲑 F₂ 个体进行实验分组(快长组和慢长组)。接着分别从快长组[体重为(219.20±38.66) g]和慢长组[体重为(74.30±17.86) g]中随机选取 10 尾样本,取其背部肌肉进行转录组测序。以 FDR (false discovery rate)<0.05 且|log₂(FC)|>1 (FC, fold change)为条件筛选差异表达基因并对其进行 GO (gene ontology)和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析,并通过 qPCR 验证转录组数据的准确性。转录组测序结果显示,共筛选出 2 211 个差异表达基因,与慢长组相比,快长组中 583 个差异基因表达上调及 1 628 个基因表达下调。GO 功能注释结果显示,差异基因主要参与细胞过程和结合过程,差异基因显著富集到 251 条 KEGG 通路(P<0.05),其中,MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、紧密连接(tight junction)、胰岛素信号通路(insulin signaling pathway)、糖酵解/糖异生(glycolysis/gluconeogenesis)和 PPAR 信号通路(PPAR signaling pathway)参与细胞生长。之后结合功能注释结果和 KEGG,鉴定出肌浆/内质网钙 ATP 酶基因 *atp2a1* 和 *atp2a2*、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *g6pc*、生长因子结合蛋白 1 基因 *igfbp1* 以及肌球蛋白重链基因 *myh1*、*myh4*、*myh6*、*myh7*、*myh9* 和 *myh13* 等可能与肌肉生长密切相关的基因。本研究共筛选出 10 个可能与乌苏里白鲑肌肉生长相关的关键候选基因,为今后乌苏里白鲑分子标记辅助育种提供了基础数据。

关键词 乌苏里白鲑; 转录组测序; 差异表达基因; 肌肉生长

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0087-14

乌苏里白鲑(*Coregonus ussurinsis* Berg)属鲑形目 (Coregoninae)、白鲑属(*Coregonus*), 主要分布在俄罗斯 (Solmoniformes)、鲑科 (Solmonidae)、白鲑亚科 斯西伯利亚、萨哈林及我国黑龙江等水域,具有明显

* 中国水产科学研究院科研业务费项目(2020TD32)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-46)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202103M)共同资助。李文文, E-mail: 115253562610@163.com

① 通信作者: 徐革锋, 研究员, E-mail: xugefeng@hrfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-05, 收修改稿日期: 2023-02-09

的洄游特性,是北方特有冷水性鱼类,也是黑龙江水系中唯一的白鲑属鱼类(张觉民,1995;尼科尔斯基,1960;罗京等,2021;徐革锋等,2022)。乌苏里白鲑兼具较高的营养和经济价值,是黑龙江名贵水产品之一,但由于生活水体环境恶化、洄游通道受阻及过度捕捞等原因,乌苏里白鲑栖息地逐渐缩减,资源量显著下降,被收录至《中国濒危动物(鱼类)红皮书》中(乐佩琦等,1998;徐俐力,2007;王继隆等,2019)。目前,对乌苏里白鲑仅开展了其群体遗传多样性、肌肉营养成分、性腺及胚胎发育、个体繁殖力以及病原体感染等相关研究(董崇智等,1997;马波等,2003;梁利群等,2004;李培伦等,2015;李虹娇等,2017;王继隆等,2018;史秀兰等,2020;刘恩慧等,2022),还缺乏对乌苏里白鲑生长方面的转录组研究,因此,有必要通过 RNA-seq 测序技术挖掘肌肉生长相关候选基因并阐明其分子调控机制。

鱼类的生长是重要的数量性状,受遗传、环境以及它们间相互作用等多种因素影响,也是养殖鱼类品质评价的重要指标之一(Fuentes *et al*, 2013; 孙雪等,2021)。转录组测序(RNA-seq)技术能高效地对遗传调控的相关因子进行深入分析,从分子层面对调控生长的相关基因进行筛选和鉴定。转录组测序技术已被广泛应用于鱼类生长发育(Al-Tobasei *et al*, 2017; Paneru *et al*, 2017; Lu *et al*, 2020)、免疫应激(Nguyen *et al*, 2016; Valenzuela-Miranda, 2018; Liu Z *et al*, 2020; Liang *et al*, 2021; 朱鑫海等,2022)和遗传演化(Genet *et al*, 2014; Kang *et al*, 2017; Carruthers *et al*, 2018)等相关基因的挖掘与研究。张波等(2023)从具有生长速度差异的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)群体筛选出3个可能与生长相关的基因;范嗣刚等(2022)从花鲈(*Lateolabrax maculatus*)中获得10 552个差异表达基因,筛选出 *igfbp1*、*fgf*、*mstn*、*ghr1* 等与肌肉生长发育相关的基因;Lu 等(2020)在快长和慢长的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)群体中发现 GH/IGF 轴、钙代谢、蛋白质和糖原合成、氧转运、细胞骨架和胶原纤维成分通路中的基因参与生长调控;Sun 等(2016)发现糖酵解、肌钙蛋白以及参与 Ca^{2+} 信号传导的基因是杂交石斑鱼(*Epinephelus* spp.)中的生长优势基因。鱼类生长一直是主要的育种目标性状之一。提高乌苏里白鲑的生长速度不仅可以缩短养殖周期、增加产量,还能够促进其养殖业的发展,提高经济效益的同时满足人们的食用需求,因此,对乌苏里白鲑生长相关研究也变得更加迫切,但目前该鱼的育种工作还停留在传统选育层面,从基因层面对乌苏里白鲑进行选择育种的研究还处于空白。本研究对不同生长速度乌

苏里白鲑的肌肉组织进行转录组测序,筛选与生长相关的差异表达基因和信号通路,以期为乌苏里白鲑的分子辅助育种提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用乌苏里白鲑取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站的第2代选育群体,为2018年12月同批次繁育、次年3月破膜成仔鱼、同池混养条件下饲养的3龄鱼。随机选取10尾大规格个体作为快长实验组,体长(24.27±1.48) cm,体重(219.20±38.66) g;随机选取10尾小规格个体作为慢长实验组,体长(17.61±1.80) cm,体重(74.30±17.86) g。将各组实验鱼麻醉后采集背部肌肉组织,置于液氮备用。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 文库构建及测序

将各实验组中3尾或4尾鱼的背部肌肉等量混合后按照 Trizol 法提取组织中的总 RNA,随后对总 RNA 进行质量检测:凝胶电泳检测 RNA 完整性,NanoDrop 2000 检验 RNA 的浓度和纯度,Agilent 2100 精确检验 RNA 的完整性。使用带有 Oligo dT 的磁珠通过碱基互补的方式富集 mRNA,随后将其打断成短片段经 PCR 扩增得到乌苏里白鲑转录组 cDNA 文库,共构建6个 cDNA 文库。将构建合格的 cDNA 文库使用 Illumina 高通量测序平台 NovaSeq 6000 进行测序。转录组文库构建和测序工作委托武汉菲沙基因信息有限公司完成。

1.3 转录组原始数据分析

经高通量测序平台获得的原始序列(raw reads)中含有接头信息、低质量及未测出的碱基,不利于转录组后续分析,故而采用 SOAPnuke 软件(v2.1.0)对原始序列进行质控,即去污染、去接头等处理后获得有效序列(clean reads),随后计算 Q20、Q30 (质量值≥20或30的碱基所占百分比)及 GC 含量。将质控后的有效序列使用 HISAT2 (Kim *et al*, 2015)、bowtie2 (Langmead, 2010)比对软件与本实验室乌苏里白鲑的参考基因组比对(NCBI 未发表),进行基因注释。

1.4 样本相关性分析

本研究基于基因表达量 FPKM (fragments per kilobase per million bases)对样本间的相关性进行分析,以皮尔逊相关系数 r^2 作为判断标准,相关系数越接近1,则样品间相似度越高。

1.5 差异表达基因分析及筛选

注释后的基因用 FPKM 法评估基因表达水平, 以慢长组为对照组, 快长组为实验组, 使用 DESeq 软件对差异表达基因(DEG)进行筛选, 筛选阈值为 $FDR(\text{false discovery rate}) < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ (FC, fold change)。基于差异表达基因结果, 采用分布(hypergeometric distribution)的方法对差异表达基因进行 GO (gene ontology) 功能注释(Ashburner *et al.*, 2000) 及 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析(Kanehisa *et al.*, 2004)。

1.6 qPCR 验证

对筛选出的 10 个关键差异表达基因进行 qPCR

验证。使用反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)反转录成 cDNA。根据基因 CDS 序列使用 Primer 5.0 软件设计 qPCR 引物, $\beta\text{-actin}$ 为内参基因(表 1)。qPCR 使用 SYBR qPCR Mix 试剂盒(EnzyArtisan, 上海)进行操作。PCR 扩增体系为 10 μL : 2 \times S6 Universal SYBR qPCR mix 5 μL , 正反向引物各 0.2 μL , cDNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 4.1 μL ; 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 42 个循环, 循环程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 最后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。使用 QuantStudio 6 Flex Real-time PCR 仪(Life Technologies, 美国)检测 qPCR 结果, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量。所有引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 qPCR 引物序列
Tab.1 qPCR primer sequence

| 基因 ID Gene ID | 基因名 Gene name | 正向引物 Forward primer (5'~3') | 反向引物 Reverse primer (5'~3') |
|---------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Cus11128 | <i>atp2a2</i> | TTATGAGTCTGACCTGACCTTCGT | GTCCACGTCGTCTCCTCG |
| Cus27094 | <i>atp2a1</i> | GTGCAATGACTCCTCTCTGGACTA | CCTTCACAAACATTTTAGCTCCG |
| Cus32796 | <i>myh1</i> | GTCAAGGGAGTCCGCAAGTA | CTTAGACATGTGCTGGTTTGTCT |
| Cus32832 | <i>myh4</i> | TTGGAAAAACACAGGCGTTTG | TTGTAGTCCACAGTACCGGCG |
| Cus32788 | <i>myh6</i> | CTGGTGCGGAGAAGAAGAAGGAAG | TCACTGTCTTGGCATTACCGTAAGC |
| Cus37534 | <i>myh7</i> | GAAGTTTAAGAATAAGCAGCGGGA | CTTGTGGTGACCCACTCATTTCC |
| Cus38339 | <i>myh9</i> | GGCTACAACAACACTACCGCTTCCTG | GACACCACCTTCAGCAGACCAATC |
| Cus32793 | <i>myh13</i> | GAGAAGCCCAAGCCTGCCAAAG | CCAGCCAGCCAGTGATGTTGTAG |
| Cus00245 | <i>g6pc</i> | GTCACCTCCATCCTAACCATCA | AGAGTGCCCCGCAGATACAG |
| Cus13680 | <i>igfbp1</i> | CTGACCAGGTTCTATCTGCCAA | GGACACACACCAACACCTGC |
| LOC100136352 | $\beta\text{-actin}$ | CACAGACTACCTGATGAAGATCCTG | GTAGCACAGCTTCTCCTTGATGTC |

2 结果

2.1 转录组测序和组装结果

本研究从构建的 6 个 cDNA 文库中共获得 295 605 738 条原始序列, 经质量控制过滤后共获得 283 133 612 条有效序列, 各样品的有效比对率在 94.43% 以上, Q20 的含量在 97.80% 以上, Q30 的含量在 93.90% 以上, GC 碱基含量占总碱基的 49.10% 以上, 无明显 GC 或 AT 分离现象。将质控后的有效序列与乌苏里白鲑的参考基因组进行比对, 结果显示, 比对率在 94.93% 以上, 说明测序结果可靠, 可进行后续分析(表 2)。

2.2 样本相关性分析

样品相关性系数不仅可以检验生物学实验的可重复性, 还可以评估差异表达基因的可靠性, 是评估

样本选择是否正确的重要指标。本研究通过基因表达量计算各样本之间的相关性系数, 并绘制热图(图 1)。由图 1 可知, 各样本间相关性系数均在 0.83 以上, 表明样本间相关度和实验可靠性较高。

2.3 差异表达基因分析

依据 FPKM 算法计算基因表达量, 使用 DESeq 软件(v.1.22.2)对基因表达结果进行分析, 并计算基因的 FC 值。以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ 作为条件筛选出乌苏里白鲑的生长候选差异基因, 并绘制火山图以直观反映快长组和慢长组乌苏里白鲑肌肉组织差异表达基因的分布情况(图 2)。结果显示, 在乌苏里白鲑肌肉组织中共鉴定出 2 211 个差异表达基因, 其中包含 659 个新预测基因; 与慢长组相比, 快长组有 583 个差异基因表达上调, 1 628 个差异基因表达下调。

表2 转录组测序质控结果
Tab.2 Quality control results of transcriptome sequencing

| 样本组别 Sample | 原始序列 Raw reads | 有效序列 Clean reads | 有效比对率 Effective rate/% | Q20/% | Q30/% | GC 含量 GC content/% |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------------------|-------|-------|-----------------------|
| FM1 | 48 933 582 | 46 768 662 | 95.58 | 97.90 | 94.20 | 50.80 |
| FM2 | 49 829 420 | 47 957 942 | 96.24 | 97.80 | 93.90 | 51.20 |
| FM3 | 50 470 284 | 47 908 972 | 94.93 | 97.80 | 93.90 | 51.00 |
| SM1 | 50 036 756 | 47 888 408 | 95.71 | 98.00 | 94.30 | 49.10 |
| SM2 | 49 964 426 | 48 012 690 | 96.09 | 97.90 | 94.10 | 50.80 |
| SM3 | 46 371 270 | 44 596 938 | 96.17 | 97.80 | 93.90 | 50.40 |

注: FM 为快长组肌肉组织, SM 为慢长组肌肉组织。下同。

Note: FM represents muscle of fast-growing group, and SM represents muscle of slow-growing group. The same below.

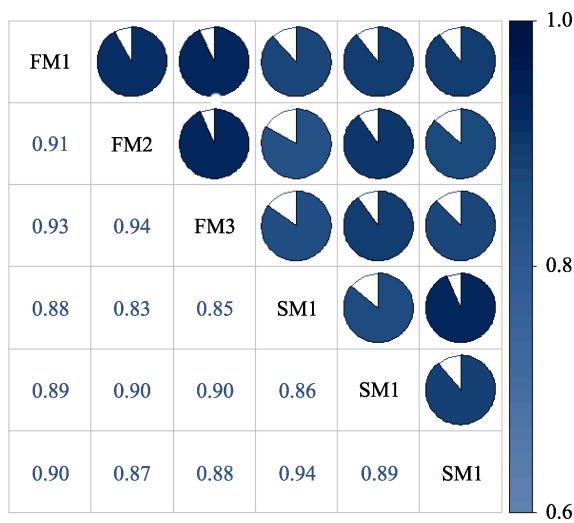


图1 样本相关性分析

Fig.1 Sample correlation analysis

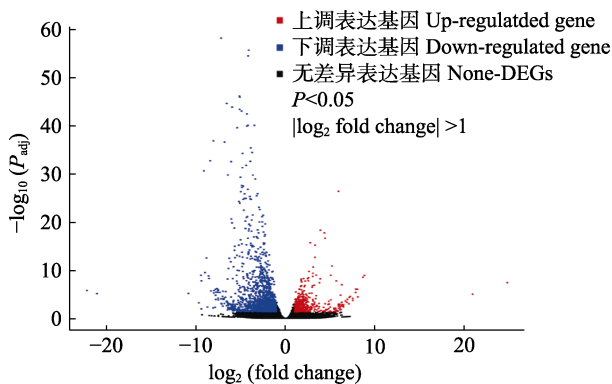


图2 差异表达基因火山图(SM vs FM)

Fig.2 Volcano map of differentially expressed genes (SM vs FM)

2.4 差异表达基因 GO 功能富集分析

GO 功能富集分析结果显示, 差异表达基因主要富集在生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component,

CC)的 3 620 个 GO term 中, 其中, BP 最多(2 457 个), 占 67.87%; MF 次之(782 个), 占 21.6%; CC 最少(381 个), 占 10.52%。由图 3 可知, 在 BP 功能中, 差异表达基因主要参与细胞过程(cellular process)与代谢过程(metabolic process), 分别含有差异基因 578 和 489 个; 在 MF 功能中, 参与结合(binding)过程的差异表达基因最多, 为 543 个, 催化活性(catalytic activity)过程次之, 为 364 个; 在 CC 功能中, 差异表达基因主要参与细胞(cell)和细胞组分(cell part)过程, 分别包含 386 和 382 个差异表达基因。

2.5 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析的结果显示, 肌肉组织中的差异表达基因被富集到 251 条已知 KEGG 通路中, 其中有 73 条信号通路被显著富集($P < 0.05$), 快长组中上调的差异表达基因显著富集在糖酵解/糖异生(glycolysis/gluconeogenesis)、甲烷代谢(methane metabolism)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、碳代谢(carbon metabolism)以及蛋白酶体(proteasome)通路等(图 4a); 下调的差异表达基因显著富集在破骨细胞分化(osteoclast differentiation)、IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)以及 TNF 信号通路(TNF signaling pathway)等(图 4b)。

2.6 核心候选基因的筛选

本研究发现, 乌苏里白鲑肌肉生长相关差异基因被显著富集在 MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、紧密连接(tight junction)、胰岛素信号通路(insulin signaling pathway)、糖酵解/糖异生、PPAR 信

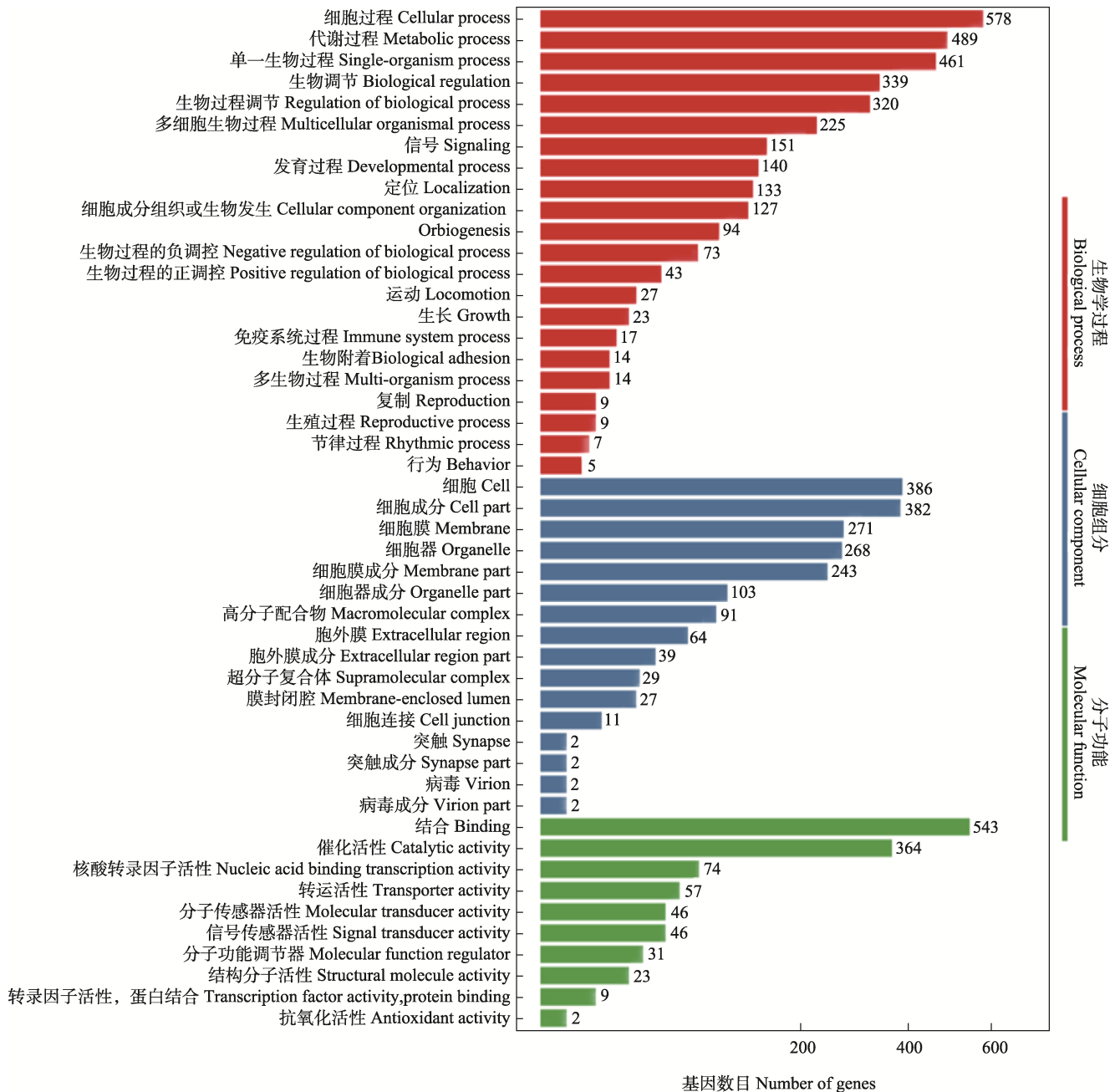


图 3 差异表达基因 GO 功能分类

Fig.3 GO functional classification of differentially expressed genes

号通路(PPAR signaling pathway)中($P < 0.05$), 结合 GO 功能注释和 KEGG 通路富集结果, 推测差异基因显著富集的信号通路中可能含有与乌苏里白鲑肌肉生长相关的基因, 结合相关文献, 最终筛选出可能与乌苏里白鲑生长相关的差异基因共 31 个, 如表 3 所示。

为进一步研究这些差异基因之间的相关作用关系并筛选出可能与乌苏里白鲑肌肉生长相关的关键基因, 使用 STRING (Version 11.5)数据库(<https://string-db.org/>)构建蛋白质互作网络图(图 5), 除 *cxcl11.1*

基因外, 在 31 个差异基因中共鉴定出 30 个基因编码已知蛋白质, 其中 27 个蛋白质之间存在相互作用。根据蛋白网络互作数筛选出了 10 个可能与乌苏里白鲑生长相关的关键候选基因: 肌浆/内质网钙 ATP 酶基因 *atp2a1* 和 *atp2a2*、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *g6pc*、生长因子结合蛋白 1 基因 *igfbp1* 以及肌球蛋白重链基因 *myh1*、*myh4*、*myh6*、*myh7*、*myh9* 和 *myh13*。其中, 快长组中 *atp2a1*、*myh1* 和 *myh13* 基因上调表达, *atp2a2*、*g6pci*、*gfbp1*、*myh4*、*myh6*、*myh7* 和 *myh9* 基因下调表达。

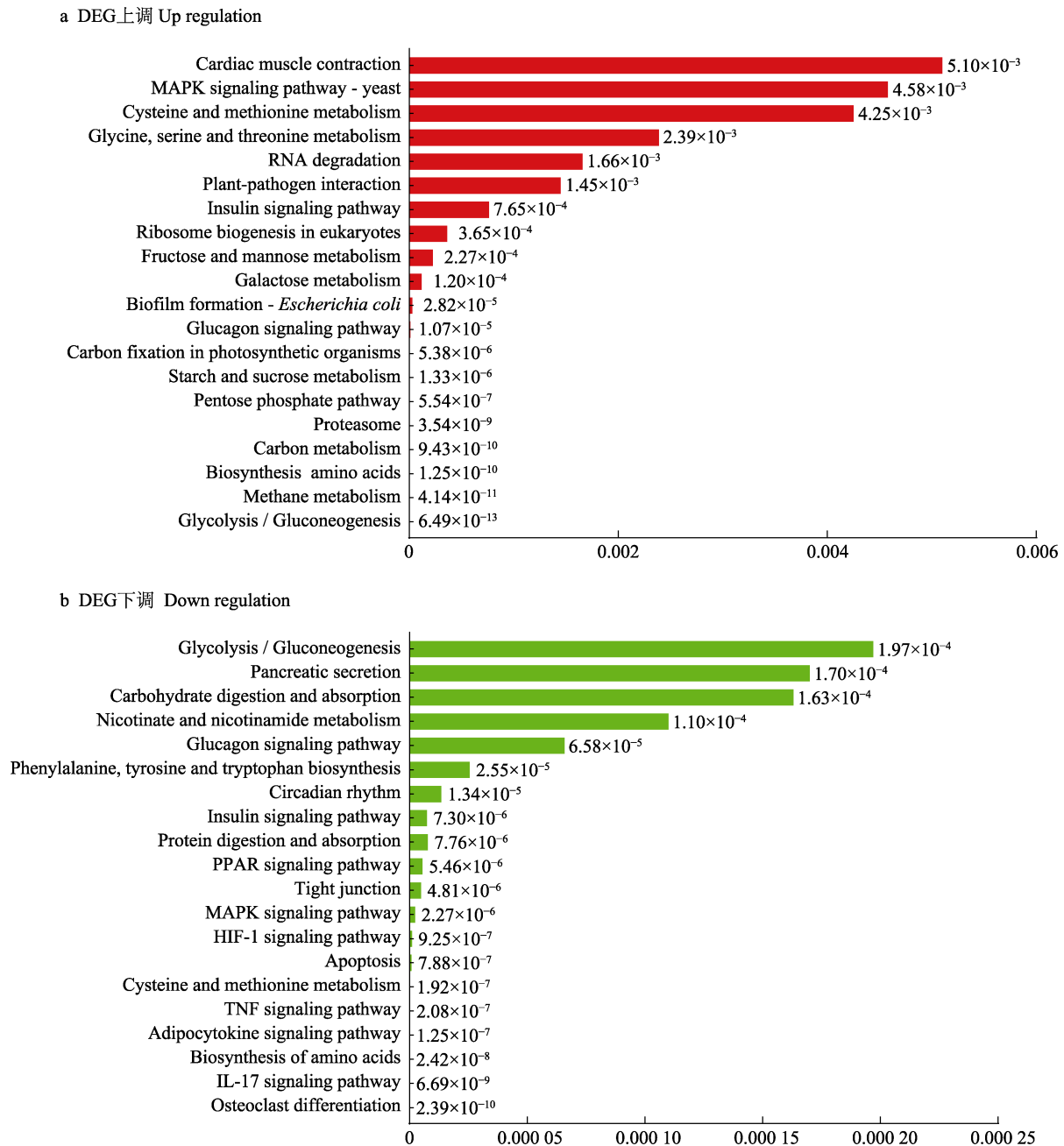


图4 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

2.7 qPCR 验证

为验证乌苏里白鲑肌肉转录组测序结果的可靠性,对筛选出的10个与生长相关的关键候选基因,以 β -actin为内参进行qPCR验证,结果显示(图6),10个差异基因表达结果与转录组测序获得的基因表达结果趋势一致,证明本研究通过转录组测序获得的结果准确,所筛选出的核心候选基因可靠,可用于后续功能验证和分子标记的开发。

3 讨论

肌肉生长是评价养殖产品质量和经济效益的重要标准之一,也是优良品种选育过程中不可忽视的指标。乌苏里白鲑是黑龙江省的名贵冷水鱼,因其肉质鲜美广受消费者喜爱。本研究前期发现,同批次繁殖、相同环境条件下养殖的乌苏里白鲑个体规格存在较大差异,为揭示其生长速度显著差异的潜在遗传机制,本研究采用高通量测序技术对快长组和慢长组的

乌苏里白鲑进行了转录组测序, 筛选出差异常表达基因并进行 GO 和 KEGG 富集分析, 挖掘出了可能与乌苏里白鲑肌肉生长相关的 10 个候选基因。

atp2a1 和 *atp2a2* 是 ATP2As 基因家族的成员, 编码负责调节钙跨胞内膜转运的肌浆/内质网 Ca^{2+} -ATP 酶(SERCA), 能够将胞浆中的 Ca^{2+} 回收至肌浆网腔和内质网腔中, 从而肌肉由收缩状态恢复为松弛状态, 在控制细胞生长和分化过程中发挥着重要作用(Chemaly *et al*, 2018)。*atp2a1* 基因在成肌细胞分化过程中表达上调, 编码的 SERCA1 蛋白参与快肌纤

维收缩过程, 其基因突变显著影响虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的生长速度(Salem *et al*, 2012)。*atp2a2* 基因主要在人体心脏、脑和 I 型骨骼肌(慢肌纤维)发育过程中表达, 其编码的 SERCA2 包含 SERCA2a、SERCA2b 和 SERCA2c 三种亚型(Hino *et al*, 2007; Hovnanian, 2007; Periasamy *et al*, 2007), *atp2a2* 基因能够减轻小鼠细胞 Ca^{2+} 失调造成的营养不良(Goonasekera *et al*, 2011), SERCA 含量下降时会延缓心肌舒张, 导致心肌收缩功能下降, 最终造成心脏衰竭(李红艳等, 2020)。本研究发现, 在快长组肌肉组织中 *atp2a1* 基

表3 候选差异表达基因注释

Tab.3 Annotation of candidate differentially expressed genes

| 基因 ID Gene ID | 基因名 Gene name | P 值 P-value |
|------------------|---|------------------------|
| Cus32796 | 肌球蛋白重链 1 Myosin heavy chain 1, <i>myh1</i> | 2.75×10^{-11} |
| Cus32832 | 肌球蛋白重链 4 Myosin heavy chain 4, <i>myh4</i> | 4.98×10^{-10} |
| Cus32788 | 肌球蛋白重链 6 Myosin heavy chain 6, <i>myh6</i> | 1.99×10^{-4} |
| Cus37534 | 肌球蛋白重链 7 Myosin heavy chain 7, <i>myh7</i> | 7.74×10^{-7} |
| Cus38339 | 肌球蛋白重链 9 Myosin heavy chain 9, <i>myh9</i> | 1.29×10^{-3} |
| Cus32793 | 肌球蛋白重链 13 Myosin heavy chain 13, <i>myh13</i> | 1.34×10^{-3} |
| Cus32818 | 肌球蛋白重链 15 Myosin heavy chain 15, <i>myh15</i> | 1.86×10^{-5} |
| Cus25495 | C-X-C 基序趋化子 11 Chemokine (C-X-C motif) ligand 11, duplicate 1, <i>cxcl11.1</i> | 9.24×10^{-4} |
| Cus33036 | 转录激活因子 4 Activating transcription factor 4, <i>atf4</i> | 1.35×10^{-10} |
| Cus09210 | 转录激活因子 7 Activating transcription factor 7, <i>atf7</i> | 1.28×10^{-9} |
| Cus40180 | 核转录因子 RELA proto-oncogene, NF-kB subunit, <i>rela</i> | 8.06×10^{-5} |
| Cus05452 | 成纤维细胞生长因子 1 Fibroblast growth factor 1, <i>fgf1</i> | 9.08×10^{-29} |
| Cus13680 | 生长因子结合蛋白 1 Insulin like growth factor binding protein 1, <i>igfbp1</i> | 2.56×10^{-11} |
| Cus34244 | 一磷酸腺苷激活蛋白激酶- γ 3 Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 3, <i>prkag3</i> | 3.95×10^{-4} |
| Cus33489 | 蛋白激酶 3 AKT serine/threonine kinase 3, <i>akt3</i> | 1.25×10^{-4} |
| Cus11870 | 丙酮酸激酶 Pyruvate kinase M1/2, <i>pkm</i> | 8.46×10^{-5} |
| Cus23574 | Na^+/K^+ -ATP 酶 α 3 亚基 ATPase Na^+/K^+ transporting subunit alpha 3, <i>atp1a3</i> | 1.83×10^{-9} |
| Cus27094 | 肌浆/内质网钙 ATP 酶 1 Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase transporting 1, <i>atp2a1</i> | 3.47×10^{-6} |
| Cus11128 | 肌浆/内质网钙 ATP 酶 2 Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase transporting 2, <i>atp2a2</i> | 1.75×10^{-3} |
| Cus29966 | 转铁蛋白受体 Transferrin receptor, <i>tfr</i> | 8.24×10^{-5} |
| Cus33302 | 磷酸肌醇-3-激酶 5 受体 Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5, <i>pik3r5</i> | 4.05×10^{-4} |
| Cus27589 | 脂肪酸合成酶 Fatty acid synthase, <i>fasn</i> | 5.30×10^{-5} |
| Cus23453 | 糖原合成酶 2 Glycogen synthase 2, <i>gys2</i> | 2.58×10^{-4} |
| Cus27723 | 磷酸甘油酸变位酶-1 Phosphoglycerate mutase 1, <i>pgam1</i> | 4.48×10^{-4} |
| Cus02461 | 磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, <i>pck1</i> | 6.85×10^{-9} |
| Cus00245 | 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 Glucose-6-phosphatase, catalytic, <i>g6pc</i> | 1.40×10^{-8} |
| Cus15210 | 谷氨酸氨连接酶 Glutamate-ammonia ligase, <i>glul</i> | 2.20×10^{-6} |
| Cus20143 | 精氨酸酶 2 Arginase 2, <i>arg2</i> | 8.19×10^{-25} |
| Cus25173 | F 框蛋白 34 F-box protein 34, <i>fbxo34</i> | 9.78×10^{-12} |
| Cus05922 | 原癌基因 Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, <i>jun</i> | 6.24×10^{-33} |
| Cus39186 | cAMP 应答元件结合蛋白 5 cAMP responsive element binding protein 5, <i>creb5</i> | 4.15×10^{-12} |

因表达量显著上调, *atp2a2* 表达显著下调, 可能是通过调节肌浆/内质网中 Ca^{2+} 通道影响心肌和骨骼肌纤维的收缩与舒张, 从而提高乌苏里白鲑神经系统的兴

奋性, 进而提高乌苏里白鲑的心肌功能与运动能力, 通过加速血液循环与骨骼肌收缩对乌苏里白鲑的生长产生了影响。

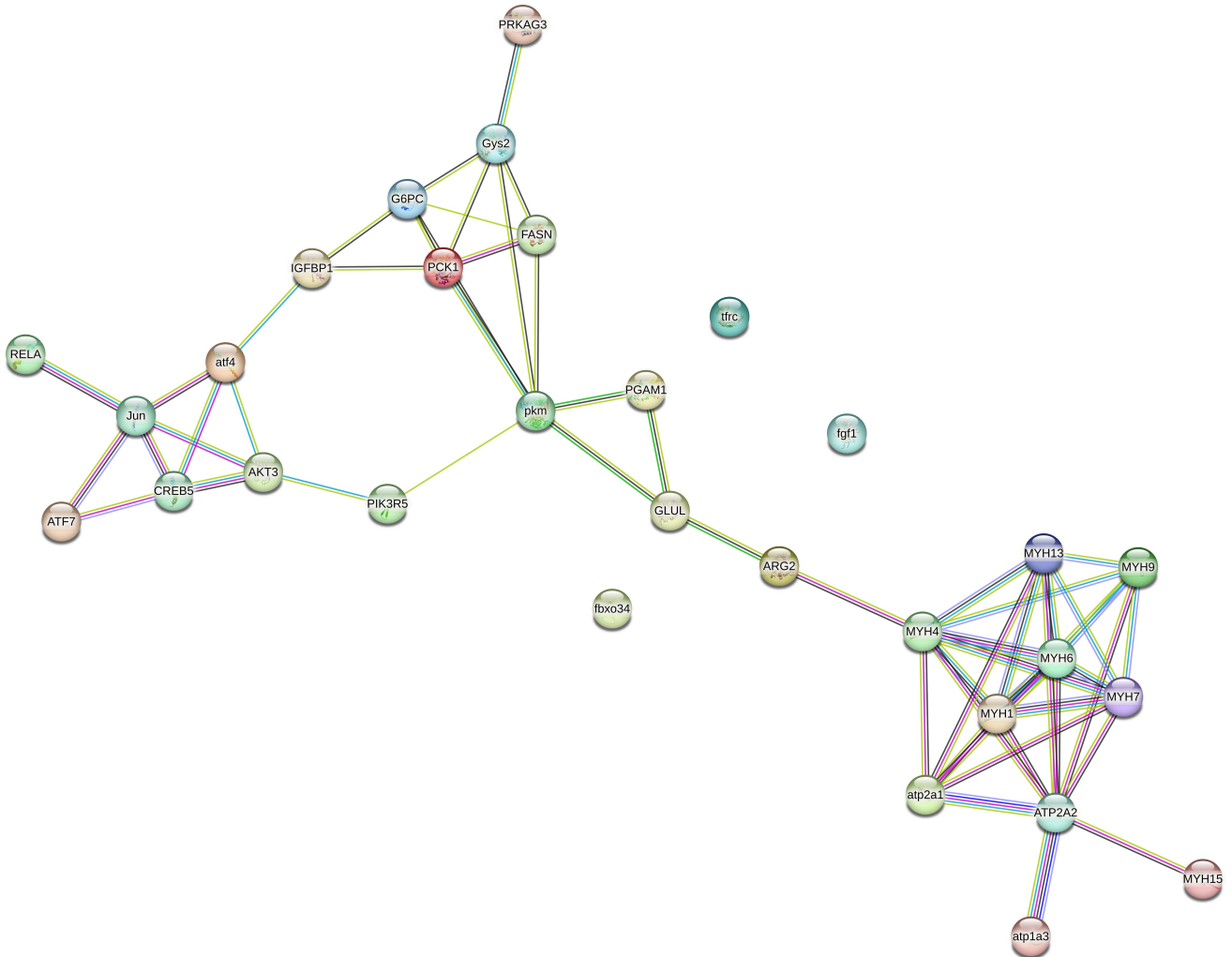


图5 差异基因蛋白互作网络分析

Fig.5 Protein-protein network interaction analysis of differential gene

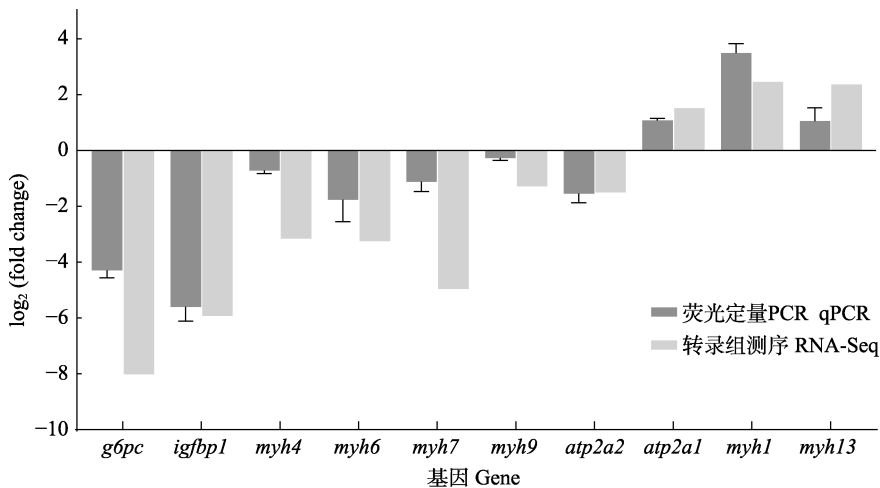


图6 差异表达基因 qPCR 验证结果

Fig.6 qPCR results of differentially expressed genes

MYHs 基因家族是调控肌肉生长发育的关键基因,其编码的肌球蛋白重链是肌球蛋白(Myosin) II 类分子中的关键亚基,也是骨骼肌中含量最丰富的蛋白质,在肌肉生长过程中发挥重要作用(陈之航等, 2017); *myh* 在不同类型的骨骼肌纤维中起作用,是肌肉纤维功能特性的主要决定因素,如 *myh7* 主要在慢肌纤维中表达,*myh1* 和 *myh2* 主要在快肌纤维中表达(Gauvry *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1999)。本研究发现,在参与乌苏里白鲑生长调节的 6 个 *myhs* 亚型中,快长组中显著上调表达基因为 *myh1* 和 *myh13*。*myh1* 及其编码的肌球蛋白-1 (Myosin-1)与脂肪生成有关,其表达上调可增加慢肌纤维的数量,增强肌肉的抗氧化能力,提高运动耐力(Talbot *et al.*, 2016; Ahn *et al.*, 2018; Czapiewski *et al.*, 2022); *myh13* 基因编码特异性眼外肌肌球蛋白重链,参与齿鲸(toothed whales)肌原纤维活性的调节(Senevirathna *et al.*, 2021)。除此之外,本研究中 *myh4*、*myh6*、*myh7* 和 *myh9* 基因在快长组中表达显著下调;*myh4* 基因是成肌分化的标志基因,编码骨骼肌生长所必须的 II B 型肌球蛋白重链纤维(Lv *et al.*, 2020), *myh6* 基因所编码的肌球蛋白较其他肌球蛋白具有更高的 ATP 酶活性,在突触传递过程中发挥重要作用(Buga *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2015), *myh7* 基因突变会引起骨骼肌或心肌方面疾病(何一旻等, 2017),同时,推测该基因在肌肉生长发育中具有调控作用(Feinstein-Linial *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016);在鱼类中, *myh4* 和 *myh6* 基因是参与黑鲟(*Acanthopagrus schlegelii*)生长调控的关键基因(Lin *et al.*, 2021), *myh6* 和 *myh7* 基因在快速生长的兰州鲶(*Silurus lanzhouensis*)肌肉组织中表达下调(Xiao *et al.*, 2022); *myh9* 基因编码非肌肉肌球蛋白 II A 重链,且能促进肌纤维分化,其表达量与草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肌肉质地有关(Pecci *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020)。不同亚型的 *myh* 基因特异性表达不同肌纤维类型,与快肌纤维相比,慢肌纤维具有更高的有氧运动耐受力 and 胰岛素敏感性,通过上调快肌表达基因增加快肌纤维的数量及横截面积,提高运动能力,而慢肌纤维能提高肌肉运动的持续时间(Yang *et al.*, 2020)。本研究发现,不同亚型 *myh* 基因通过调节其表达影响乌苏里白鲑的肌肉生长,可将 MYH 基因家族的多个亚型作为乌苏里白鲑生长关键候选基因。

g6pc 编码葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-pase)催化亚基,该酶是内质网的标志酶,能够催化 6-磷酸葡萄糖水解产生葡萄糖和磷酸,是糖酵解和糖异生途径的关键酶,在维持血糖稳态中起着重要作

用(钱云霞等, 2011; Liu S *et al.*, 2020)。注射生长抑制素的金钱鱼(*Scatophagus argus*)体内 *g6pc* 基因表达量显著上调,进而激活糖酵解/糖异生过程,消耗大量 ATP,导致其生长所需能量不足,从而抑制金钱鱼的生长(Tian *et al.*, 2022)。同样在对草鱼的研究中发现, *g6pc* 基因表达下调能够促进糖原分解从而提高饲料中碳水化合物的利用率(Yue *et al.*, 2021)。*g6pc* 基因主要参与能量与物质代谢过程,在机体代谢和生长的协调过程中发挥重要作用。本研究发现, *g6pc* 基因在快长组的乌苏里白鲑中显著下调, *g6pc* 基因表达能激活糖酵解途径、加速糖原利用、消耗更多能量、减少有机物的积累,该基因高表达时可能会阻碍乌苏里白鲑的生长,可将其作为生长相关候选基因,进一步对其进行功能验证及分子标记的挖掘。

IGF 结合蛋白(IGFBPs)和 IGF、IGF 受体(IGFR)以及 IGFBP 水解酶四部分共同构成胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs),IGFs 参与细胞分裂与分化、生物体代谢、生长与繁殖等过程,是 GH/IGF 生长轴(生长激素/胰岛素样生长因子轴)的关键因子,也是动物生长发育过程中的重要调控因子(黄建峰等, 2011; Hakuno *et al.*, 2015)。IGFBPs 是一种分泌性蛋白,在人和哺乳动物中已鉴定出 6 种亚型(IGFBP1~IGFBP6),它与 IGF 形成复合体后可延长 IGF 的半衰期,并激活胰岛素受体,抑制低血糖的发生(Duan *et al.*, 2005; 赵艳等, 2015)。*igfbp1* 是 IGFBPs 家族中第一个被发现和鉴定的成员,其结构与功能已在多个物种中进行克隆和研究,其表达水平与鲑鱼的体重、体长、生长速率等指标呈负相关(Shimizu *et al.*, 2006);在对虹鳟(Kocmarek *et al.*, 2014)和斑马鱼(*Danio rerio*) (Opazo *et al.*, 2017)的研究中发现, *igfbp1* 基因均在小规格个体中表达上调。本研究发现,与慢长组相比,快长组 *igfbp1* 基因表达下调,这与斑马鱼、虹鳟等研究结果一致,可将其作为乌苏里白鲑生长相关候选基因进行后续验证。

4 结论

本研究通过对不同生长速度的乌苏里白鲑肌肉组织进行转录组测序,共发现了 2 211 个差异表达基因,其中包含 659 个新预测基因;583 个差异基因在快长组中表达显著上调,1 628 个差异基因表达显著下调。此外,GO 和 KEGG 富集分析发现,与生长相关的基因被显著富集在 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、紧密连接、胰岛素信号通路、糖酵解/糖异生、PPAR 信号通路中。进一步对筛选出候选差异

表达基因进行 PPI 蛋白互作网络分析, 确定了 10 个与生长相关的核心候选基因: *atp2a2*、*atp2a1*、*g6pc*、*igfbp1*、*myh1*、*myh4*、*myh6*、*myh7*、*myh9* 和 *myh13*。本研究为乌苏里白鲑生长性状相关的分子调控机制及分子标记辅助育种的研究提供了基础资料。

参 考 文 献

- AHN J S, KIM D H, PARK H B, *et al.* Ectopic overexpression of porcine Myh1 increased in slow muscle fibers and enhanced endurance exercise in transgenic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 2959
- AL-TOBASEI R, ALI A, LEEDS T D, *et al.* Identification of SNPs associated with muscle yield and quality traits using allelic-imbalance analyses of pooled RNA-Seq samples in rainbow trout. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 582
- ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, *et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25–29
- BUGA A M, SASCAU M, PISOSCHI C, *et al.* The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, 12(6b): 2731–2753
- CARRUTHERS M, YURCHENKO A A, AUGLEY J J, *et al.* *De novo* transcriptome assembly, annotation and comparison of four ecological and evolutionary model salmonid fish species. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 32
- CHEMALY E R, TRONCONE L, LEBECHE D. SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium*, 2018, 69: 46–61
- CHEN Z H, DONG J J, SUN C F, *et al.* cDNA cloning and analyses of two myosin heavy chain isoforms of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on transcriptome sequencing. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 51–61 [陈之航, 董浚键, 孙成飞, 等. 基于转录组测序对翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*) 2 种肌球蛋白重链基因的克隆与分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 51–61]
- CZAPIEWSKI R, BATRAKOU D G, DE LAS HERAS J I, *et al.* Genomic loci mispositioning in *Tmem120a* knockout mice yields latent lipodystrophy. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 321
- DONG C Z, XIA Z Z, JIANG Z F, *et al.* The tentative studies on reproduction population structure of *Coregonus ussurinus*. *Chinese Journal of Fisheries*, 1997, 10(1): 14–21 [董崇智, 夏重志, 姜作发, 等. 黑龙江乌苏里白鲑生殖群体生态学特征及资源保护. *水产学杂志*, 1997, 10(1): 14–21]
- DUAN C, XU Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 44–52
- FAN S G, YANG W Y, HUANG H, *et al.* Muscle transcriptome analysis and growth-related genes screening of *Lateolabrax maculatus* with different growth rate. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2022, 42(5): 9–17 [范嗣刚, 杨文燕, 黄皓, 等. 不同生长速率花鲈肌肉转录组分析及生长相关基因筛选. *广东海洋大学学报*, 2022, 42(5): 9–17]
- FEINSTEIN-LINIAL M, BUVOLI M, BUVOLI A, *et al.* Two novel MYH7 proline substitutions cause Laing Distal Myopathy-like phenotypes with variable expressivity and neck extensor contracture. *BMC Medical Genetics*, 2016, 17(1): 57
- FUENTES E N, VALDÉS J A, MOLINA A, *et al.* Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 192: 136–148
- GAUVRY L, FAUCONNEAU B. Cloning of a trout fast skeletal myosin heavy chain expressed both in embryo and adult muscles and in myotubes neofomed *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 115(2): 183–190
- GENET C, VERRIER E R, CIOBOTARU C, *et al.* RNA-Seq analysis of transcriptome response to VHS-V infection in two target tissues of resistant vs susceptible trout clonal lines. *Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Vancouver, BC, Canada, 2014, 17–22
- GOONASEKERA S A, LAM C K, MILLAY D P, *et al.* Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(3): 1044–1052
- HAKUNO F, FUKUSHIMA T, YONEYAMA Y, *et al.* The novel functions of high-molecular-mass complexes containing insulin receptor substrates in mediation and modulation of insulin-like activities: Emerging concept of diverse functions by IRS-associated proteins. *Frontiers in Endocrinology*, 2015, 6: 73
- HE Y M, GU M M. Research progress of myosin heavy chain genes in human genetic diseases. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(10): 877–887 [何一旻, 顾鸣敏. 肌球蛋白重链基因在人类遗传性疾病中的研究进展. *遗传*, 2017, 39(10): 877–887]
- HINO S I, KONDO S, SEKIYA H, *et al.* Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(23): 2834–2843
- HOVNANIAN A. SERCA pumps and human diseases. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2007, 45: 337–363
- HUANG J F, LIAO Z Y. Structure and physiological function of IGFs. *Science and Technology Association Forum*, 2011(3): 59–60 [黄建峰, 廖志勇. 胰岛素样生长因子结构与生理功能. *科协论坛(下半月)*, 2011(3): 59–60]
- KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, *et al.* The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(1): D277–D280
- KANG J, MA X, HE S. Evidence of high-altitude adaptation in

- the glyptosternoid fish, *Creteuchiloglanis macropterus* from the Nuijiang River obtained through transcriptome analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, 17(1): 1–12
- KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–360
- KOCMAREK A L, FERGUSON M M, DANZMANN R G. Differential gene expression in small and large rainbow trout derived from two seasonal spawning groups. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 57
- LANGMEAD B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current Protocols Bioinformatics*, 2010, Chapter 11: Unit 11.7
- LI H J, HAN Y. Investigation report on biological characteristics *Coregonus ussurinsis*. *Northern Chinese Fisheries*, 2017(1): 17–20 [李虹娇, 韩英. 乌苏里白鲑生物学特征调查报告. 黑龙江水产, 2017(1): 17–20]
- LI H Y, ZHAO S H, WANG S H, *et al.* Research progress of SERCA2a in heart failure. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(2): 171–174 [李红艳, 赵思涵, 王世华, 等. SERCA2a 在心力衰竭中的研究进展. 中国药理学通报, 2020, 36(2): 171–174]
- LI P L, LIU W, WANG J L, *et al.* Fecundity of *Coregonus ussurinsis* in the Heilongjiang River, China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1234–1242 [李培伦, 刘伟, 王继隆, 等. 黑龙江乌苏里白鲑的个体繁殖力. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1234–1242]
- LIANG L Q, CHANG Y M, DONG C Z. Analysis of genetic diversity for *Coregonus ussurinsis* Berg in Heilongjiang River. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004(6): 501–505 [梁利群, 常玉梅, 董崇智. 黑龙江乌苏里白鲑遗传多样性分析. 中国水产科学, 2004, 11(6): 501–505]
- LIANG P, SAQIB H S A, LIN Z, *et al.* RNA-seq analyses of marine medaka (*Oryzias melastigma*) reveals salinity responsive transcriptomes in the gills and livers. *Aquatic Toxicology*, 2021, 240: 105970
- LIN Z, ZHANG Z, SOLBERG M F, *et al.* Comparative transcriptome analysis of mixed tissues of black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) with differing growth rates. *Aquaculture Research*, 2021, 52(11): 5800–5813
- LIU E H, HUANG T Q, GU W, *et al.* Cloning and tissue expression of liver-expressed antimicrobial peptide Leap-2 in Ussuri cisco *Coregonus ussurinsis* exposed to bacterial infection. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(3): 420–427 [刘恩慧, 黄天晴, 谷伟, 等. 乌苏里白鲑肝脏表达抗菌肽 Leap-2 基因的克隆及细菌感染后的组织表达分析. 大连海洋大学学报, 2022, 37(3): 420–427]
- LIU S, TIAN F, ZHANG C, *et al.* Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *G6PC* gene family in common carp, *Cyprinus carpio*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2020, 45(2): 205–212
- LIU Z, ZHAO L, HUANG L, *et al.* Integration of RNA-seq and RNAi provides a novel insight into the immune responses of *Epinephelus coioides* to the *impB* gene of *Pseudomonas plecoglossicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 105: 135–143
- LU X, CHEN H M, QIAN X Q, *et al.* Transcriptome analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) between fast-and slow-growing fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, 35: 100688
- LUO J, HAN Y. Research progress of Second Songhua River fishery resources. *Northern Chinese Fisheries*, 2021, 40(2): 3–7 [罗京, 韩英. 第二松花江渔业资源研究进展. 黑龙江水产, 2021, 40(2): 3–7]
- LV W, JIN J, XU Z, *et al.* IncMGPF is a novel positive regulator of muscle growth and regeneration. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2020, 11(6): 1723–1746
- MA B, SHI L Y, DONG C Z. Biochemical genetic structure in *Coregonus ussurinsis* Berg. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(3): 195–200 [马波, 石连玉, 董崇智. 乌苏里白鲑的生化遗传结构. 中国水产科学, 2003, 10(3): 195–200]
- MIAO Y, YANG J, XU Z, *et al.* RNA sequencing identifies upregulated kyphoscoliosis peptidase and phosphatidic acid signaling pathways in muscle hypertrophy generated by transgenic expression of myostatin propeptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4): 7976–7994
- NGUYEN T V, JUNG H, NGUYEN T M, *et al.* Evaluation of potential candidate genes involved in salinity tolerance in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) using an RNA-Seq approach. *Marine Genomics*, 2016, 25: 75–88
- NIKOLSKY B. Translated by GAO X. *Fishes of Amur River*. Beijing: Science Press, 1960 [尼科尔斯基. 译者: 高岫. 黑龙江流域鱼类. 北京: 科学出版社, 1960]
- OPAZO R, VALLADARES L, ROMERO J. Comparison of gene expression patterns of key growth genes between different rate growths in zebrafish (*Danio rerio*) siblings. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2017, 45(4): 766–775
- PANERU B D, AL-TOBASEI R, KENNEY B, *et al.* RNA-Seq reveals MicroRNA expression signature and genetic polymorphism associated with growth and muscle quality traits in rainbow trout. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1–15
- PECCI A, MA X, SAVOIA A, *et al.* MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene*, 2018, 664: 152–167
- PERIASAMY M, KALYANASUNDARAM A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*, 2007, 35(4): 430–442
- QIAN Y X, ZHENG W X, SONG J J. Cloning and sequence analysis of *Lateolabrax japonicus* glucose-6-phosphatase catalytic subunit (*G6PC*) cDNA and its 5'-flanking region. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(4): 606–615 [钱云霞, 郑伟贤, 宋娟娟. 鲈鱼 6-磷酸葡萄糖酶催化

- 亚基(G6PC) cDNA 和 5'侧翼序列的克隆及分析. 农业生物技术学报, 2011, 19(4): 606–615]
- SALEM M, VALLEJO R L, LEEDS T D, *et al.* RNA-Seq identifies SNP markers for growth traits in rainbow trout. PLoS One, 2012, 7(5): e36264
- SENEVIRATHNA J D, YONEZAWA R, SAKA T, *et al.* Transcriptomic insight into the melon morphology of toothed whales for aquatic molecular developments. Sustainability, 2021, 13(24): 13997
- SHI X L, WNAG B Q, HAUNG T Q, *et al.* Observation on embryo development of Ussuri whitefish *Coregonus ussuriensis* Berg in Heilongjiang River. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(2): 415–421 [史秀兰, 王炳谦, 黄天晴, 等. 黑龙江乌苏里白鲑(*Coregonus ussuriensis* Berg)胚胎发育观察研究. 海洋与湖沼, 2020, 51(2): 415–421]
- SHIMIZU M, BECKMAN B R, HARA A, *et al.* Measurement of circulating salmon IGF binding protein-1: Assay development, response to feeding ration and temperature, and relation to growth parameters. Journal of Endocrinology, 2006, 188(1): 101–110
- SUN X, LI S J, DU J X, *et al.* The effects of pyramiding growth-related genotypes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 40–46 [孙雪, 李胜杰, 杜金星, 等. 草鱼生长相关优势基因型的聚合效果分析. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 40–46]
- SUN Y, HUANG Y, HU G, *et al.* Comparative transcriptomic study of muscle provides new insights into the growth superiority of a novel grouper hybrid. PLoS One, 2016, 11(12): e0168802
- TALBOT J, MAVES L. Skeletal muscle fiber type: Using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 2016, 5(4): 518–534
- TIAN C, ZHANG J, FENG P, *et al.* Comparative analysis of transcriptome responses to injected somatostatin 3 peptide in spotted scat (*Scatophagus argus*). Aquaculture Reports, 2022, 23: 101022
- VALENZUELA-MIRANDA D, GALLARDO-ESCÁRATE C. Dual RNA-Seq uncovers metabolic amino acids dependency of the intracellular bacterium *Piscirickettsia salmonis* infecting Atlantic salmon. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2877
- WANG J L, LIU W, LI P L, *et al.* Evaluation of nutritive quality and nutrient components in the muscle of *Coregonus ussuriensis*. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(5): 35–40 [王继隆, 刘伟, 李培伦, 等. 乌苏里白鲑肌肉营养成分与品质评价. 广东海洋大学学报, 2018, 38(5): 35–40]
- WANG J L, LIU W, LU W Q, *et al.* Assessment of the population resources of *Coregonus ussuriensis* in the middle reaches of Amur River. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(6): 1824–1829 [王继隆, 刘伟, 鲁万桥, 等. 黑龙江中游乌苏里白鲑资源现状评估. 生态学杂志, 2019, 38(6): 1824–1829]
- WEISS A, MCDONOUGH D, WERTMAN B, *et al.* Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(6): 2958–2963
- XIAO W, LIAN Z Q, WU J P, *et al.* De novo RNA sequencing for identification of growth-related genes in *Silurus lanzhouensis* muscle tissues. Fisheries Science, 2022, 88(5): 565–580
- XU G F, WANG B Q, LI M S. The fish that knows how to go home for the winter - *Coregonus ussuriensis*. China Fisheries, 2022(3): 112–114 [徐革锋, 王炳谦, 李明爽. 懂得回家“猫冬”的鱼——乌苏里白鲑. 中国水产, 2022(3): 112–114]
- XU L L. Survival status of several rare cold-water fishes in Heilongjiang Province. Scientific and Technological Innovation, 2007(13): 137 [徐俐力. 黑龙江省几种珍稀冷水鱼类生存现状. 黑龙江科技信息, 2007(13): 137]
- XU W H, GUO H H, CHEN S J, *et al.* Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in muscle hardness in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed with faba bean meal. Food Chemistry, 2020, 314: 126205
- YANG H, LI X Q, XU Z, *et al.* Effects of three active components in *Eucommia ulmoides* on growth and flesh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on transcriptomics. Aquaculture Nutrition, 2020, 26(6): 1895–1907
- YUE D, HUANG S, YANG R, *et al.* Effects of tea polyphenols on the growth performance, carbohydrate metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture Nutrition, 2021, 27(6): 2344–2354
- YUE P Q, CHEN Y Y. China red book of endangered animals (fish). Beijing: Science Press, 1998 [乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物(鱼类)红皮书. 北京: 科学出版社, 1998]
- ZHANG B, JIANG D, ZHANG D L, *et al.* Comparative analysis of transcriptome of muscle tissue of individuals with different growth rate of *Larimichthys crocea*. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(3): 87–100 [张波, 姜丹, 张东玲, 等. 大黄鱼生长速率差异个体肌肉组织的转录组的比较分析. 水产学报, 2023, 47(3): 87–100]
- ZHANG J M. Fishes of Heilongjiang Province. Heilongjiang: Heilongjiang Science and Technology Press, 1995 [张觉民. 黑龙江省鱼类志. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1995]
- ZHANG Z, JIANG X, LI Q, *et al.* Differential expression of MYH7 gene in different tissues of chicken. China Poultry, 2016, 38(24): 52–54
- ZHAO Y, LU L, LIU Y Z, *et al.* Research progress on physiological function and expression regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 47(1): 139–143 [赵艳, 卢玲,

刘云章, 等. Igfbp-1 的生理功能及其表达调控的研究进展. 山东农业科学, 2015, 47(1): 139–143]
ZHU X H, ZHANG Z R, ZHOU L Y, *et al.* Transcriptomic analysis of the head kidney of *Siniperca chuatsi* infected

with *Aeromonas hydrophila*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 208–217 [朱鑫海, 张紫瑞, 周丽颖, 等. 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲈头肾转录组分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 208–217]

(编辑 冯小花)

Screening Muscle Growth-Related Genes of *Coregonus ussurinsis* Berg Based on Transcriptome Sequencing

LI Wenwen^{1,2}, XU Gefeng^{2①}, HUANG Tianqing², GU Wei², LIU Enhui²,
WANG Gaochao², PAN Yucai², ZHOU Jinxin², JIANG Zaisheng³, WANG Bingqian²

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Cold Water Fish Industry Technology Innovation Strategic Alliance, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 3. Tongcheng Fishery Service Center, Tongcheng 231400, China)

Abstract *Coregonus ussurinsis* Berg is a rare cold-water fish found in Heilongjiang Province, which has high nutritional and economical value. The growth traits of fish are critical breeding target traits, and improving the growth efficiency of cultured fishes has always been a major issue for researchers. As an endangered fish, very limited research has been conducted on *C. ussurinsis*, and studies on its growth and development are still lacking. Therefore, investigating gene expression in *C. ussurinsis* muscles would significantly contribute to our understanding of their muscle development. RNA-Seq was used to find and study the specific genes and pathways of muscle development under different conditions. Recently, transcriptome sequencing has been applied to diverse animal populations, aiding in the selection of candidate genes related to important traits by comparing the global gene expression profiles between different animal populations with specific characteristics. This study aims to understand the genetic basis of muscle development in *C. ussurinsis* at the transcriptome level and to provide new insights into growth and development. To explore the molecular regulation mechanism of growth traits of *C. ussurinsis*, F_2 individuals of *C. ussurinsis* were randomly selected from the mixed pool for test grouping (fast-growing group and slow-growing group). The dorsal muscle tissue was clipped from 10 fast-growing individuals (219.20 ± 38.66 g, weight) and 10 slow-growing individuals (74.30 ± 17.86 g, weight) for transcriptome sequencing to construct six cDNA libraries. High-throughput sequencing from Illumina NovaSeq 6000 and bioinformatics was used to determine the abundances and characteristics of transcripts. The differentially expressed genes were screened with FDR (false discovery rate) < 0.05 and $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$; the functions of these differentially expressed genes (DEGs) were annotated and analyzed by the Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database to identify the genes and genetic pathways related to the development of muscle in *C. ussurinsis*. Moreover, to verify the sequencing results, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of DEGs. The results showed that the correlation coefficients of all the samples used for transcriptome sequencing were above 0.83, indicating high correlation between the samples and experimental reliability. Transcriptome sequencing results showed that a total of 295 605 738 raw reads were assembled from the six cDNA libraries, and 283 133 612 clean reads were obtained after quality control. Q20 and Q30 sequences accounted for above 97.80% and 93.90%, respectively, and the

① Corresponding author: XU Gefeng, E-mail: xugefeng@hrfri.ac.cn

content of GC bases accounted for more than 49.1% of the total bases. Through comparison with the genome using EdgeR software, which was used to analyze the differences in gene expression, 2 211 DEGs were preliminarily obtained from muscle, including 659 novel genes. Compared with the slow-growing group, 583 differential genes were up-regulated, and 1 628 differential genes were down-regulated in the fast-growing group. Function enrichment analysis found that the DEGs participated in 3 620 GO terms. Among them, 2 457 biological processes were primarily involved in cellular and metabolic processes; there were 782 molecular functions, primarily involved in binding function and catalytic activity processes, and 381 cellular components, primarily involved in cell and cell component processes. The enrichment analysis of the KEGG pathway found that a total of 251 signal pathways were obtained, among which 73 were significantly enriched ($P < 0.05$). Among them, the up-regulated DEGs were mainly involved in glycolysis/gluconeogenesis, methane metabolism, and biosynthesis of amino acids, while the down-regulated DEGs were mainly involved in osteoclast differentiation, IL-17 signaling pathway, and biosynthesis of amino acids. The genes related to muscle growth were significantly ($P < 0.05$) enriched in the MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, tight junction, insulin signaling pathway, glycolysis/gluconeogenesis, and PPAR signaling pathway. These pathways might be closely related to muscle growth. Combined with the GO functional annotation, the KEGG pathway enrichment, and the annotation results, 31 potential growth-related candidate genes were preliminarily screened. Protein-protein interaction networks were used to further analyze the relationship between these differential genes. It was found that *atp2a2*, *atp2a1*, *g6pc*, *igfbp1*, *myh1*, *myh4*, *myh6*, *myh7*, *myh9*, and *myh13* might be closely related to muscle growth regulation, and these 10 genes can be used as crucial candidate genes for the growth regulation of *C. ussurinsis*. The qRT-PCR validation of 10 randomly selected differential genes showed consistent gene expression trends with the transcriptome sequencing results, which indicated that the results obtained by transcriptome sequencing in this study were accurate. A total of 10 growth-related essential candidate genes were screened in this study; these genes affect the growth of *C. ussurinsis* by regulating their expression levels in muscle tissue. These results provide vital information for the further understanding of the molecular basis and marker-assisted breeding of the growth regulation of *C. ussurinsis*.

Key words *Coregonus ussurinsis* Berg; RNA-seq; Differentially expressed genes; Muscle growth

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221230001

http://www.yykxjz.cn/

晏科文, 马晓东, 史宝, 程汉良, 王重女, 赵新宇. 半滑舌鳎生物钟相关基因克隆及在卵巢发育成熟过程中表达特征分析. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 101-116

YAN K W, MA X D, SHI B, CHENG H L, WANG C N, ZHAO X Y. Cloning and expression analysis of clock genes during ovarian development and maturation of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 101-116

半滑舌鳎生物钟相关基因克隆 及在卵巢发育成熟过程中表达特征分析*



晏科文^{1,2} 马晓东² 史宝^{1,2①} 程汉良¹ 王重女² 赵新宇^{1,2}

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 江苏 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 为阐明生物钟相关基因在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢成熟过程中的作用及机制, 采集性成熟半滑舌鳎不同发育期的卵巢组织提取总 RNA, 通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术对5个核心生物钟基因 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的编码区(CDS)序列进行克隆和序列分析。结果显示, *Clock1a* 的 CDS 序列编码 712 个氨基酸, 序列中有功能性结构域 PASD1 和 PAS11。*Bmal1a* 的 CDS 序列编码 626 个氨基酸, 序列中有功能性结构域 PASD3 和 PAS11。*Cry1a* 和 *Cry2* 的 CDS 序列分别编码 631 个、669 个氨基酸, 序列中均有功能性结构域 FAD7。*Per2* 的 CDS 序列编码 1 415 个氨基酸, 序列中有功能性结构域 PeriodC 和 PAS11。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析 5 个生物钟基因 mRNA 在性成熟半滑舌鳎卵巢不同发育期的表达特性, 发现 5 个生物钟基因存在性腺发育周年表达规律, 且在卵巢 II 期和 III 期相对高表达($P < 0.05$), 在卵巢 IV、V 和 VI 期相对低表达, 这说明生物钟基因对半滑舌鳎的卵巢发育成熟起到重要的调节作用。研究结果为进一步探究生物钟基因调控半滑舌鳎卵巢发育成熟的机制提供了重要参考, 为提高半滑舌鳎的繁育效率提供了理论基础。

关键词 生物钟基因; 半滑舌鳎; 卵巢; 周年表达规律

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0101-16

生物钟包括视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)中枢生物钟与各组织外周生物钟(Yu, 2017; Khan *et al.*, 2016)。生物钟基因(BioClock genes)广泛存在于真核生物的神经中枢和外周组织中, 参与调节生物机体众多生理活动。真核生物的诸多生理活动存在周期性, 这是由于内源性节律变化的存在, 这种节律

变化统称为生物学节律。生物钟核心环路由 Clock:Bmal 组成的正调节因子和 Per:Cry 组成的负调节因子构成, 呈现出核心生物钟的负反馈环路调节, 继而影响松果体(pineal gland, PG)中褪黑素(melatonin, MLT)的合成节律, MLT 又通过影响“脑/下丘脑-脑垂体-性腺”轴(brain/hypophysis-pituitary-

* 国家重点研发计划项目(2022YFD2400401)、国家自然科学基金项目(31772829)、山东省重点研发计划项目(2021LZGC028)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022023023; 2020TD47)和国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。晏科文, E-mail: yankewen1201@126.com

① 通信作者: 史宝, 副研究员, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-30, 收修改稿日期: 2023-02-01

gonad axis, BPG 轴)中的下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的分泌, GnRH 调节垂体前叶远端部(pars distalis, PD)促黄体激素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的分泌, 最终导致鱼类及其他动物的生殖机能呈现周期性变化(Keisuke *et al*, 2016; Saha *et al*, 2019; Zhang D *et al*, 2022)。

随着生物钟基因在生物机体内的作用逐渐被揭示, 关于生物钟基因在生物繁殖过程中的作用引起了国内外相关领域研究者的重视。目前, 对生物钟基因节律变化的研究以日变化规律为主。诸多研究发现, 生物钟基因在哺乳类、禽类、鱼类和甲壳类的性腺中的表达存在着日节律(Takashi *et al*, 2000; Chen *et al*, 2017; Saha *et al*, 2019)。随着季节的更替, 一年中的日照时长、温度等季节性因素有着规律性的变化, 生物钟基因的表达也存在着相应的季节性变化规律。在旗鱼(*Xiphias gladius*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)、马岗鹅、小鼠(*Mus musculus*)、苏尼特羊(*Ovis aries*)的卵巢中, 均发现生物钟基因的表达存在季节性变化规律(Davie *et al*, 2009; Wharfe *et al*, 2011; Chen *et al*, 2017; Takashi *et al*, 2017; 劳永聪等, 2019; 向光明等, 2019a、b; Basili *et al*, 2021)。Wharfe 等(2011)研究发现, 非繁殖期小鼠卵巢中 *Clock*、*Bmal*、*Cry1*、*Cry2*、*Per1* 和 *Per2* 基因表达量高于繁殖期, 并证明了生物钟基因在性成熟小鼠卵巢中的表达存在月周期性规律, 同时, 发现母体皮质酮的分泌与 *Clock*、*Bmal* 和 *Per2* 的表达密切相关, 推测生物钟基因与蛋白质、脂肪和糖类的代谢存在关联。向光明等(2019a、b)通过对比季节性发情的苏尼特羊和常年发情的小尾寒羊(*O. aries*)卵巢中 *Per1*、*Per2* 基因的表达差异发现, 生物钟基因在苏尼特羊卵巢中存在季节性表达规律, 同时, 推测 *Per1*、*Per2* 基因的高表达不利于绵羊的发情。Basili 等(2021)通过对繁殖季节(6—8月)和非繁殖季节(10—12月)捕获的雌性旗鱼进行研究, 发现非繁殖季节的旗鱼卵巢组织中 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达量高于繁殖季节, 且生物钟基因的季节性表达可调节 MLT 的表达量, 证明生物钟基因可参与调节旗鱼卵巢的成熟, 同时证明生物钟基因在鱼类卵巢组织中的表达也存在着季节性变化规律, 但受到旗鱼习性影响, 该研究未能对性成熟旗鱼卵巢组织的完整发育周期中生物钟基因的表达规律进行探究。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国北方名贵海水养殖鱼类。众多研究表明, 鱼类的繁殖主要

受具有周期性的光照和温度等因素的影响; 在繁殖过程中, 生物钟基因也存在周期性表达。关于生物钟基因与鱼类繁殖调控机制之间的研究逐渐兴起(Herrero *et al*, 2014; Pérez *et al*, 2019)。本研究以半滑舌鳎为研究对象, 克隆其生物钟核心环路的正负调节因子(*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2*)基因, 并分析其在 II、III、IV、V 和 VI 期卵巢组织中的表达变化规律, 以期丰富半滑舌鳎等海水硬骨鱼类繁育理论, 并更好地提高半滑舌鳎的繁育技术与苗种生产效率。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及样品处理

实验用半滑舌鳎取自本实验室在山东省日照市的培育基地, 卵巢发育不同时期所用半滑舌鳎选自 300 尾人工养殖达到性成熟(3 龄以上)的雌鱼, 体重为 $(1\ 795.7 \pm 82.5)$ g。实验用鱼的培育条件: 在室内水泥池中(5 m × 5 m × 1 m)流水培育(日换水率达到 600%), 水温为 8~25 °C, 盐度为 28~31, pH 为 7.8~8.4, 溶解氧(DO)为 5 mg/L 以上, 每日光照 14 h, 每日饲喂 2 次虾和干饲料。人工控制水温和光照周期来调控亲鱼性腺发育成熟, 不同繁殖期在相同亲鱼培育池中随机选取 4 尾半滑舌鳎雌鱼, 连续采集 1 年。解剖前先用 240 mg/L 的 MS-222 麻醉, 通过将塑料管插入泄殖孔取少量卵母细胞进行活检, 初判卵巢的发育阶段(Shi *et al*, 2016)。在卵巢发育的各个阶段, 选取符合采样要求的 4 尾半滑舌鳎雌鱼, 采用 MS-222 (240 mg/L)将半滑舌鳎雌鱼麻醉后迅速进行解剖, 切取适量半滑舌鳎卵巢组织放入无 RNA 酶 EP 管中并立即放入液氮中, 转至实验室置于超低温冰箱(-80 °C)中保存备用。留取每个个体适量的卵巢中段, 固定在 Bouin's 固定液中。根据本实验室半滑舌鳎卵巢发育期判定标准对所取卵巢组织样品所处发育阶段进行判断(Shi *et al*, 2015、2016)。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取保存于-80 °C 的 II、III、IV、V 和 VI 期半滑舌鳎卵巢组织, 参照艾科瑞生物的 RNAex Pro RNA 提取试剂(AG21101)操作说明提取卵巢组织的总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 确保 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.0 之间, RNA 浓度在 300~500 ng/μL 之间。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性, 28S 条带亮度达到 18S 条带的 2 倍则为纯度高且完整的 RNA 提取样品。将装有符合要求的 RNA 样品的离心管短暂离心

后置于-80℃保存。

取1 μg III期卵巢组织的总RNA, 参照TaKaRa公司的PrimerScript™ 1st Strand cDNA Synthesis反转录试剂盒(6110A)说明, 反转录成cDNA模板, 置于-20℃保存备用。

1.3 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因克隆和序列测定

在NCBI的GenBank数据库中搜索鱼类*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的同源cDNA序列, 并分析*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的编码区和保守区, 采用Primer 6.0设计特异性引物(表1)。使用Bio-Rad S1000 PCR仪(伯乐, 新加坡), 按照TaKaRa公司的Taq™ HS Perfect Mix (R300A)操作说明进行克隆。PCR扩增体系: TaKaRa Taq HS Perfect Mix (2×) 12 μL, cDNA模板1 μL, 上下游引物各1 μL, 灭菌水补至25 μL。PCR扩增条件: 95℃ 5 min, 之后35个循环(95℃ 5 s, T_m 30 s, 72℃ 1.5 min), 72℃ 5 min, 最后4℃保存。*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*的 T_m 分别为51、54、52、53和53℃。

半滑舌鲷*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 使用北京天根生化的TIANGel Midi Purification Kit (DP209)对目的片段进行回收并纯化。回收的*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*的PCR产物与TaKaRa公司的pMD™19-T Vector载体(D102A)连接, 转化至T感受态细胞中, 挑取其中的阳性克隆, 送至睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.4 基因序列分析

使用DNAMAN 6.0软件将测序所得的序列片段

表1 半滑舌鲷生物钟基因克隆所用引物

Tab.1 Cloning primer of BioClock genes in *C. semilaevis*

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'~3') |
|---------------------|---------------------------------|
| Clock1a-F | GAGCAAGAGCACAGGGAT |
| Clock1a-R | TAAATGGGCGGTGGC |
| Bmal1a-F | CGGCTGGGATTCGTT |
| Bmal1a-R | TTCTTCTGTTTGGGACTCTA |
| Cry1a-F | TTGGCAAGGAGCGAGAT |
| Cry1a-R | CAGGAAAGCTGCTGGTAGA |
| Cry2-F | CCTCTGCCTGTCATCACTC |
| Cry2-R | TGCTGCGTCGTATCTTGT |
| Per2-F | TCCGCCTTGAATGAACCTT |
| Per2-R | CACTGGTGGAGGGATTGT |

进行比对拼接, 获得半滑舌鲷*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的完整编码区(ORF)序列并推导其氨基酸序列; 利用NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行结构域的预测; 利用Jalview进行多重序列比对; 利用DNAMAN 6.0进行序列同源性分析; 利用在线软件ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)推断氨基酸序列的分子量及等电点; 利用软件MEGA7通过邻接法(NJ)构建进化树, 1000次自举(bootstrap)重复检验进化树的置信度。

1.5 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因在繁殖周期的表达分析

以克隆获得的半滑舌鲷*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因序列为模板, 设计定量引物(表2), 同时, 以半滑舌鲷18S基因作为内参基因, 合成其特异性引物(表2), 引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。使用Mastercycler ep realplex Real-time PCR仪(Eppendorf), 按照TaKaRa Ex Taq®(Mg²⁺ free Buffer) (TaKaRa)操作说明进行PCR扩增。qRT-PCR扩增体系: TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.125 μL, 10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTP Mixture (各2.5 mmol/L) 2 μL, cDNA模板1 μL, 上下游引物各1 μL, 灭菌水补至25 μL。qRT-PCR扩增条件: 95℃预变性30 s, 之后40个循环(95℃ 5 s, T_m 30 s, 72℃ 30 s), *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的 T_m 分别为50.5、53.6、52.3、53和52.5℃。以18S作为内参基因对样品中RNA的量进行校正。程序运行结束后, 对熔解曲线进行分析, 检验产物特异性。实验样品设3个平行, 并设阴性对照(cDNA模板用灭菌水代替), 以确定实验结果的可靠性。

1.6 数据处理与分析

基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001)法计算, 结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用SPSS 26进行单因素方差分析(one-way ANOVA)与Duncan多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷*Clock1a*和*Bmal1a*的序列和结构特征

从半滑舌鲷卵巢内分离得到了*Clock1a*和*Bmal1a*基因cDNA序列, 并分别获得了NCBI登录号OQ054330和OQ054331。*Clock1a*基因的编码区

表2 半滑舌鲷生物钟基因表达分析所用引物
Tab.2 Primers for expression of BioClock genes in *C. semilaievis*

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'~3') |
|---------------------|---------------------------------|
| Clock1a-F | ATGCGTAGAATGGTGAGC |
| Clock1a-R | CAGGCGGAACAAGATGA |
| Bmall1a-F | TCCCTCCTCCCGTTTG |
| Bmall1a-R | ATGACAGCCCCTCTCG |
| Cry1a-F | GATTGCGACAGGGCTAAGACA |
| Cry1a-R | CGGCAGCAGCAGGTTCTT |
| Cry2-F | GTTTGATTGCGACAGGGCTAA |
| Cry2-R | ACGGCTCATGGATGTACTTGG |
| Per2-F | GCGGGCAAGGATGGAGAA |
| Per2-R | CACTGCCGATCCAAAGCC |
| 18S-F | ACCGCCATGCGTAGA |
| 18S-R | GGTGAAGGTCCCAGTAAA |

序列长为 2 139 bp, 编码 712 个氨基酸, 分子量为 81.9 kDa, 等电点为 6.35, 序列中存在保守性较强的 PAS11 (由 271~373 位的 103 个氨基酸组成)、PASD1 (由 28~91 位的 64 个氨基酸组成)结构域(图 1)。Bmall1a 基

因的编码区序列长为 1 881 bp, 编码 626 个氨基酸, 分子量为 68.9 kDa, 等电点为 6.35, 序列中存在保守性较强的 PAS11 (由 71~134 位的 63 个氨基酸组成)、PASD3 (由 343~446 位的 103 个氨基酸组成)结构域(图 2)。

2.2 半滑舌鲷 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的序列和结构特征

从半滑舌鲷卵巢得到 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因 cDNA 序列, NCBI 登录号分别为 OQ054332、OQ054333 和 OQ054334。*Cry1a* 基因的编码区序列长为 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸, 分子量为 71.4 kDa, 等电点为 8.12, 序列中存在功能性结构域 FAD7 (由 288~486 的 199 个氨基酸组成)(图 3)。*Cry2* 基因的编码区序列长为 2 007 bp, 编码 669 个氨基酸, 分子量为 76.0 kDa, 等电点为 6.18, 序列中存在功能性结构域 FAD7 (由 288~486 位的 199 个氨基酸组成)(图 4)。*Per2* 基因的编码区序列长为 4 248 bp, 编码 1 415 个氨基酸, 分子量为 154.0 kDa, 等电点为 5.99, 序列中存在功能性结构域 PAS11 (由 373~474 位的 102 个氨基酸组成)和保守性较强的 PeriodC (由 1 190~1 384 位的 295 个氨基酸组成)(图 5)。

```

1 ATGACAAACCAATCGACCTTTATTGTCCTCCCTGCTGTCACCCACAAGGATGGGACAACATCTGCATGGAAGATATGTATGATGAAGATGAGAAAGACAGGGCAAAAAGGGAATCAGCTACAACAACTGAAAG
1 M D N Q S T F I V P C S S T H K D W D N I C M E D M Y D E D E K D R A K R E S R N K S E K
136 AAGAGAAGACAGCATTCAATGTCTCATCAAGGAGCTATGTGCAATGCTGCAGGGCAAGGACATCCACACAAGATGGATAAGACAACATTTTACAGAGAACTATTGACTTCTGCAGCAACAAAAGACATC
46 K R R D Q F N V L I K E L C A M L Q G G H P H K M D K T T I L Q R T I D F L Q Q K D I
271 ACACCAACAAAACATCCGAGATATGAGACAAGCTGGAAGCCCGCTTCTCAAGTAATGGGGACTTCACTCAGTAATGCTGGAGCCATAGATGGTTCTTGGTTGATTAACCACTGATGGAACATCATA
91 T P N K N I R D M R Q D W K P A F L S N G D F T Q L M L E A I D G F L V A L T T D G N I I
406 TAGGTGCTGATAGCGTGTCTCACTAACGGGTCACTCCCGTCAGATATGTTGACAAAATATCTGAAATTTCTCCCGGAGCAAGAGCAGGGATGTGACAAGCTGATCTTCCAATGCTGATAAAA
136 Y V S D S V S S L T G H L P S D M L D Q N I L N F L P E Q E H R D V Y K L L S S P M L I K
541 GACAACCTGAGAAATGTGGTGAATCTGCTGTCTAGCCAGAGGTAACACTGACCCACAAGAGCCCTGTGTAGATATGTGAAGTTTATGGAGATTTCAAGTTTACAACAACCGTCAATTAATGACA
181 D N S E N V V E F C C H L A R G N T D P Q Q T P V Y E Y V K F I G D F K F H N N V P K S T
676 TCGACAGCTTAAAGTACCTTACAGAGAGCCCTACAGTCAGCACTGGAGGAGATCTGCTCATTGCCAGTCCAATTAGTCACTCCCAAGTTGTCAACATTTGAAGACCTTGAAGACCCGCTGTGAT
226 C D S L K V T L H R S L Q S A L E E E I C L I A T V Q L V T P Q F V K D L C N I E D R C D
811 GAATTC ATTTCCAGGCACAGCCTGAATGGAAGTTCTCTTCTAGATCAAGAGCGTCAACAGTATATAGGGTACTTACCCTTGAGGTTCTTGGAACTGCTGCTGATGACTATACAGTACAGTACGCTGGAG
271 E F I S R H S L E W K F L F L D Q R A S P V I G Y L P F E V L G T S G Y D Y Y H V D D L E
946 CCTATAGCTCAGTGTACATAACAGTAAATGACGTTTGGAAAGGTAATCTGCTACTATGTTTGGACAAAGGTCAGCAGTGGATTTGGTTGCAGACTACTTACTATATACAGTATCACCAGTGGAACTCC
316 P I A Q C H K Q L M Q F G K G K S C Y Y R F L T K G Q Q W I W L Q T H Y Y I T Y H Q W N S
1 081 AAACCTGAGTTTATTGCTGACTACACAGTTGTCAGTACTCTAAGTACGAGTCAAAAAGAGAGAGCGGTTGGCTAAAAGAGCTGTCTCCATCGAAAATGTCTCCCTT CTGTGAAGGCTCAGGAATC
361 K P E F I V C T H T V V S Y S K V R A E K R R A V G L K E L S P S E N V L P S V K A Q E L
1 216 TACTTGGATATCTGCTCCACAATAAACCTACATTTGGATGAAACAGCGGTGACAGTTCCTCCACAGCTCTCGCAGGTCCTCAGTACACAGAAGTGTGACAGTCTGCATCTTACTTACACAGACACATGGCAA
406 Y L D I C S T I N P T L D G N S G A G S P H S S R R S S L T E L S D S A S Y S Y T D T W Q
1 351 GCTGCTTCTACTGAAACAGAAAGAACTGGCAGACTCGAGCCTGTGGTTCAAGCAGCAGCAGCCAGCCGCTTATCAGCCACAGAAAGCAAGCAGTGTGATTTGAATCAGCTGAAAGAGCAGTGGAAAGAA
451 A A S T E T E R T G R L E P C G S K Q Q Q P P P I Y Q P Q K P R P G I V N Q L K E Q L E E
1 486 AGGACAGAGTCTACAGGCTGATATAAGACACAGCAGAAGGAGCTGATAAGATTAAGAGAAAGCTTACACAGCTAACCTCCAGGTCAGCAGAGGAGTGGCAGGAGGGGAGTACAGCCCGTACTGTG
496 R T R V L Q A D I K T Q Q K E L Y K I K E K L H T A N L Q V Q Q R T G Q E G Q L Q P V T V
1 621 TCCCTTCCAGCCGGTACAAGTCTAACGATGCCGTTATTAGCAATCCATGATGTTCTCTCATCACCACCAGCAGCCGTTTACAACACAAACAGACAGCAGATGGGTTTTAAACCATGATGAACAAATA
541 S L Q T G T S L T M P L F S N P M M F S H T T T R P F H N T N Q R H A D G F L N H D E Q I
1 756 CGTACACCTTAGAGCAGCAGATCACACCTCTCTCTCCATGGAGCAGGTCAGTGAACAATGCTGTAACCTCTACCGTCTACCGCTTCTCAGCCGCCCAATTTGGTTCCTCACAACGGCTTACGACACAGCAGCT
586 R Y T L E Q Q I T P S L S M E Q I V N C N N V L P S T V F T P P I V V P H N G F M T Q Q P
1 891 CCGTCAATGCACATCAATCAGCAGTGTTCAGCCTCAGCAGCAATTTGAGATGACCAGATGTATCCCAAGTGGGCTAGTCCAACCACTTATACACTTCAATGTCCACAGC AAAGTACTGTGGAATACATC
631 P S M H I N Q H C L Q P Q Q F E M T R C I P S G S S P T T L Y T S N V P Q Q S T V E Y I
2 026 CAGCAACCAAGTCTACACCACTACGGCAGCAGCACTAAGGCAACCAACAATTTCCAAAACCCGACTGACTGTTTCAGGCTTCAGAAATGCAAACTAGGTAG
676 Q Q T M L Q Q P P V R Q Q Q L R Q H Q H F Q N P T D A V S G F R N M Q T R *

```

图1 半滑舌鲷 *Clock1a* 基因 ORF 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Open reading frame sequence of *C. semilaievis* *Clock1a* gene and the deduced amino acid sequence

方框部分: 起始密码子; 下划线: 功能结构域 PASD1; 虚下划线: 功能结构域 PAS11;

阴影部分: 保守序列; 终止密码子用*表示。

Start codon is marked with frame. Functional domain PASD1 is marked with underline. Functional domain PAS11 is indicated with virtual underline. Conserved sequence is marked in gray, and the termination codon is denoted by *.

```

1 ATGCGACAGCAAAAGAATGGATATCTCTCAAGATGAATGAGTTCATGTCGCCAGAGCTCGACAGTGTGATCAGCAGTCCATTGGCACCACGGGCATGGACTACAACCGCAAGAGGAGGCGACACCCTGAA
1 M A D Q R M D I S S T M N E F M S Q S S A D L I S S S I G T T G M D Y N R K R K G S T T E
136 TACCAGATTGATGGCTTTTCATTGACGATAGCATGGACCGGATAAAGACAAGACACTGGGAAGGGATGAACAGCAGGGCCGGATAAAAAATGCCAGGGAGGCACACAGTCAATAGAGAAAGAGCAAGGGAT
46 Y Q I D G F S F D D S M D T D K D K T L G R D E Q Q G R I K N A R E A H S Q I E K R R R D
271 AAAATGAACAGTTTATAGACAGTGTGGCGTGGTGTAGTCCCCACATGTAACGCAATGTCTCGCAAGTTGGACAAACTCACAGTGTCTCGCATGGCTGTCCAACACATGAAGACATACCGAGGGCCCAACCA
91 K M N S F I D E L A S L V P T C N A M S R K L D K L T V L R M A V Q H M K T L R G A T N P
361 TACACAGAAGCCAATAAACCAGCATTCTGTCGGATGATGAATAAAACACTTGATTTAAAGGGCTGCTGATGGTTTCTCTTCGTAGTGGTGGCATCGCGAAAAATCCCTCTTGTCTCAGAGCTGTT
136 Y T E A N Y K P A F L S D D E L K H L I L R A A D G F L F V V G C D R G K I L F V S E S V
541 TATAAAATTCATAATTACACTCAGAACGATCTGATTGGCCAGAGTTTATTCGACTACCTGCATCCAAAAGCATTGCCAAAGTAAAGAACAGCTGTATCGTCAGACAGCGCTCCACGAGAGAGACTCATCGAT
181 Y K I L N Y T Q N D L I G Q S L F D Y L H P K D I A K V K E Q L S S S D T A P R E R L I D
676 GCCAAAACCTGGTCCGGTGAAGACTGACATCACTCTGGCCCGTCCAGACTGTTCAGGTGCCCGCAGGTCTTCTCTCGCAGATGAAATGCAATCGGCATCTGTCAAGATGGAGGACAAAGACTCCCT
226 A K T G L P V K T D I T P G P S R L C S G A R R S F F C R M K C N R P S V K M E D K D F P
811 TCTACTGTCTAAAAAAGAACAGACCGTAAAGCTTTTGACACCTCCACAGCAGCGGTATCTGAAAAGCTGCCGCCCAAGATGGGCTTAGACAGGACACGAAACCCGATAATAGGGCTGCAACCTC
271 S T C S K K K A D R K S F C T I H S T G Y L K S W P P T K M G L D E D N E N E G C N L
946 AGCTGTTTAGTGCCATCGTCCGCTGCATCCACATATCGTCCCTCAGCCGATGAACGGCCGACATCCGTGTCAAACCCACTGAATACGTCTCAGCCACGCTATCGAGCGAAAGTTGTGTGTAGTACCAGAGG
316 S C L V A I G R L H P H I V P Q P M N G D I R V K P T E Y V S R H A I D G K F V F V D Q R
1081 CGCAGCCATCTTGGCGTACTTACCACAGGAGCTTTAGGAACGTCGTTTATGAGTATTTTATCAGGATGATATCGGTACCTCGCCGAGTGTACAGACAGAGTGTACAGATGCCAGAGAAAGATTAGTACA
361 A T A I L A Y L P Q E L L G T S F Y E Y F H Q D D I G H L A E C H R Q V L Q M R E K I S T
1216 AACTGTTACAATTAAGATTAAGACCGTTTCACTCATCTGAGGAGCGCTGGTTAGCTTCAAGACCCCTGGACCAAGAGGTGGAATATATAGTCTCTCAAAACACTGGTTTCGGGAGTATGCTT
406 N C Y K F K I K D G S F I T L R S R W F S F M N P W T K E V E Y I V S T N T V Y S G S M L
1351 GAAGGAGCAGTCTAGTATTCTCAGACGCTCATCTCTCAGAGCATGGACAGTGTATTAACATCAGGAGATGGCGGAGGAAACGGCCCTCTCAGATTGTTCTGGTATTCTCGGAGAACGAGAGCAGG
451 E G A D P S Y S Q T A S S P Q S M D S V L T S G D G G G K R P L Q I V P G I P G G T R A G
1486 CGCGGAAAGATTGGACGATGATCGCAGAGGAGTGGAGATCCAGAGAACTCAGAGCTCTCCCTCCCTCAGCTGTGGCTCCAGTCTTAAACATCACTGCCACGCCCCACCGACACTGCTCTCTGGG
496 A G K I G R M I A E E V M E I Q R I R G S S P S C G S S P L N I T A T P P P D T C S P G
621 GGAAGAAGATTGAGATGGTGAAGCTCAGATCTACCTTCAGCAGGAATTTGCTGGCCGCTGATCAATAGGATACCCCTATTCAAATAATTCATTAATGAGTGACAACTCTCATCGAGCATAGACATCATG
541 G K K I Q N G T P D L P S A G I V P G P D S I G Y P Y S N S L M S D N S H L S I D I M
1756 GAGGAGCTGGATCCAGCAGCCCGAGTAAATGATGAAGCAGGATGGCCGTCATCAGAGCTCTGGAGCCAGAGCTGGCTCGGGGGACCCGTGGACTTCAGTGCAGCTCCCTGGCCTTGTGTA
586 E E P G S S S P S N D E A A M A V I M S L L E A D A G L G G P V D F S D L P W P L *

```

图 2 半滑舌鲷 *Bmal1a* 基因 ORF 序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Open reading frame sequence of *C. semilaevis Bmal1a* gene and the deduced amino acid sequence

方框部分: 起始密码子; 下划线: 功能结构域 PASD3; 虚下划线: 功能结构域 PAS11;
 阴影部分: 保守序列; 终止密码子用*表示。

Start codon is marked with frame. Functional domain PASD3 is marked with underline. Functional domain PAS11 is indicated with virtual underline. Conserved sequence is marked in gray, and the termination codon is denoted by *.

2.3 半滑舌鲷 *Clock1a* 和 *Bmal1a* 氨基酸序列同源性比较和系统进化分析

对半滑舌鲷 *Clock1a* 氨基酸序列与塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*: KAG 7515747.1)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*: XP 047185380.1)和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*: XP 027129473.1)的 *Clock1a* 氨基酸序列进行比对,并绘制了多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 6)。发现半滑舌鲷的 *Clock1a* 氨基酸序列与其他鱼类的 *Clock1a* 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷的 *Clock1a* 氨基酸序列与多个物种的 *Clock1a* 氨基酸序列同源性进行分析,结果显示,半滑舌鲷 *Clock1a* 与塞内加尔鲷的同源性为 75%,与大菱鲆的同源性为 73%,与大黄鱼的同源性为 73%,与爪蟾(*Xenopus tropicalis*: NP 001122127.1)同源性为 47%,与日本鹌鹑(NP 001310116.1)同源性为 46%,与人(*Homo sapiens*: NP 004889.1)同源性为 46%。半滑舌鲷的 *Clock1a* 与其他硬骨鱼类同源性较高,但与哺乳类、禽类、两栖类等同源性较低,说明 *Clock1a* 在进化过程中出现了进化差异(图 6)。

对半滑舌鲷 *Bmal1a* 氨基酸序列与斑马鱼(*Danio rerio*: AFV 39705.1)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*:

XP 048015598.1)、尖吻欧雅鱼(*Squalius pyrenaicus*: VAX 53699.1)的 *Bmal1a* 氨基酸序列进行比对,并绘制了多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 7)。结果显示,半滑舌鲷的 *Bmal1a* 氨基酸序列与其他鱼类的 *Bmal1a* 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷的 *Bmal1a* 氨基酸序列与多个物种的 *Bmal1a* 氨基酸序列同源性进行分析,结果显示,半滑舌鲷 *Bmal1a* 与斑马鱼的同源性为 100%,与团头鲂的同源性为 99%,与尖吻欧雅鱼的同源性为 99%,与爪蟾(BAI 82610.1)同源性为 84%,与原鸡(*Gallus gallus*: NP 001384605.1)同源性为 88%,与人同源性为 88% (BAA 19968.1)。半滑舌鲷的 *Bmal1a* 与其他硬骨鱼类的同源性极高,同时与哺乳类、禽类、两栖类等同源性也较高,说明 *Bmal1a* 在进化进程中保守性较高(图 7)。

2.4 半滑舌鲷 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 氨基酸序列同源性比较和系统进化分析

对半滑舌鲷与塞内加尔鲷(XP 043877840.1)、鲟鱼 (*Echeneis naucrates*: XP 029350587.1)、龟壳攀鲈 (*Anabas testudineus*: XP 026217745.1)的 *Cry1a* 氨基酸序列进行比对并绘制了多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 8)。发现半滑舌鲷的 *Cry1a* 氨基酸


```

1 ATGGACACGCGTTACAGTAAAGTCGTGGGGTCAAGATGTGGTGGATCTGGAGCCAGAGTTGGATGGCTCCGAGGAAGTATAGCAGTACGAACGCCACCGCTCCCAAGCTCCCTCGATGACAGG
1 M D S G Y S K G R G G Q D V V D L E P E L G L A S E G S D S S H E R P P S P S S S L D D R
136 AAGCCACCACCCCAAGCTTTCGAAGAAGTGTAGAGATGGCGGTAGTGGCTCAAGTGGTAGTGAACAGAATCCCAACAGCAAGTACACGGCAACGAGTCCACGGCCATGAATCCGTGGCAGCTCCAAC
46 K R P R Q A L Q E D V E M G G S G S S G S G T E S H S N E S H G N E S H G H E S V G S S N
271 GGAATGGCAAAGATCTGCCAATCTGGAGTCTTGGCAGCAATAAAGCTCAAATCCCATAGTCCCTCACCACCAAGCAGCTCCAATGCCTTCAGTCTGGTAGCTCCGAGCAGGACAACCCATCGACCAGT
91 G N G K D S A I L E S S G S N K S L P S H S M C T P P G F E V S S Y T I E E I N R H I G T S
361 GGCTGACGACGCAAGCTGCGCAAAAGAAATCAGAAGGAGCTTTCAAGACCTGAAGGAGTAAAGAGGCACTGCCATCCGAGAAGTGGAGCAAGGAAGTCCAGCACCGTCAACACCTCAAGTAT
136 G C S S E Q S A K A K N Q K E L F K T L K E L K R H L P S E K W S K S K S T V N T L K Y
541 CGCTGCGCTGTGCAACAGGTTAAAGCAATTAAGCAATATTACCAGATGCTGATGATCAATGACAGTCCAGCTCCAGGTTTGAAGTATCATCTACACAATCGAGAAATCAACCGCATCAGCTGTGATG
181 A L R C V K Q V N K A N E E Y Y M L M I N D S H S M Q V R M P G F E V S S Y T I E E I N R H I G T S
676 ACTCTCAAGAACCGGATATATTGCGGTGCGGTCTCGCTCATACGGGAAGATCGTTTACATCTCAGAGCAGCGCGCTCATCTTGAAGTGAAGCTGAAGTGTTCAGAAACGAAAGTTTGGGAGTTT
226 T L K N T D I F A V A V S L I T G K I V Y I S E Q A A S I L N C K P E V F R N A K F V E F
811 CTCACCTCACAGGATGTCAGGCTTCTACAGTTCACACACCTACAGGCTCCCTCCGGAGCATGTGACTGGAGCAGAGTATCTCCACAGAATGCATGCAAGAGAAGTCTTCTTTTGTGCATCAGT
271 L T P Q D S A I L E S S G S N K S L P S H S M C T P P G F E V S S Y T I E E I N R H I G T S
946 GGTGGAAGCAGCATGAAGGGGATCTGCAGTACTATCTTCCGTATGACTCTTACCTGATGAAGTTACAGGATCTGAGTGTGAGAAGAACACATCTGCCTCCCTGTTGGTGAACGGGTGCATCTGGGA
316 G G K Q H E G D L Q Y Y P F R M T P Y L M K L Q D S E L S E E H I C C L L L A E R V H S G
1081 TATGAACACCTAGAATCCCAAGTACGAAACATATCTTACCACCACACACCCCAACTGTGTCCAGGATGTGGATGAGAGGGCTGTTCTTGTAGGTTACTCCCCAGGATCTGATGGGACGCCT
361 Y E A P R I P T D K R I P I T T H T P N C V F G V D E R A V P L L Q D L I G T Y
1 GTCTTACTAAATACATCAAGTACCGACCACTGATGCTGAGTGTGCATGAAAATTTACAGTTCGCTGGTCCAGCCCTTGACCCTCTCAATCGTTTCTGTGACGCAATGGTGAAGTACGTAACCATC
216 V L L N L H P S D R P L M L A V H R K I L Q F A G Q P F D H S S I R F C A R N G E Y V T I
406 GACACAGTGGTCCAGCTTGTCAACCCCTGGAGTCGAAAGTTTCTCGTATTGGCAGGCAAGGTCGCGATGGGTCTGTGAAGCAAGATGTTTTGACAGCCACCATTCATGGAGGAAAGATGATG
1351 D T S W S F V N P W S R K M F P V N E D V F A A P T M G M M
451 GATTGACATCCAGAAATAAGTGAACAGATCCACCGGATGCTACTCCAGCTGTTTATAACATGGGCTCCAGTGGTATGGGAGCCATGGGCAATGGTCCCATGAGCAGTGGTGAAGTATGATCC
1486 D S D I Q E I S E Q I H R M L L Q P V H N M G S S G Y G S H G S N G S H E Q L V S M S S S
496 AGTGAGAGCAGCCGCAAGTATGTCGGGAATCAGCAGAGGACATGGAAAGTTAAAGCTCCCGAGGACTTTTACAGGATCTGTAAGGACATCCATGCAAGAAAACCGAGGATCCAGGTTTGTCTGCA
1621 S E S N G S V M S G I T A E D M G K L K L P R T F Q E I C K D I H M Q K N Q E S Q V C L Q
541 TCGTTGTCTCTCGGCTGVCSCCAAGCTGAGCAAGAAAGAGCAGGACACATCAGCCAGAAAGTCCAAAGCAGCAGTGTGAAGCACTTGCCCGGCTGTTGGCCAGAGATGGTCAACTACA
1756 S L S S S A L P P K P E Q R K S T D T S A Q K S P T A R L K H S A P P L L A R D G T A T T
586 ACAGAGGACATCTCCTGAAGATCAGAACACATGCTTATCAACAGATTAGTGCCTGGACAGTGTATCAGATACTGGAAAGTTGAACATCCCAATCAGAGTAAAGAAAGTACCAAGTCTCTCCAC
1891 T E D I S C K D Q N T C S Y Q I S C L D S V I R Y L E S C N I P I T V K R K Y Q F S N
631 ACCACCTCTCAACTCTGACGAGCGCAAGAGGGTCCAGCGGAGCATTACAGGTTGCTCAGGCAAAAACACAGACACTGTGATGCTAGATGCCCAACCGAGCAGCTTCCCAACTGAAAGCAGCAAAAACCT
2026 T T S S N S D D G K K G P A D A L Q V A Q D K N T D T L M L D A Q P D L S N L K A P K K P
676 CCATCTGGGGCAGTTGTAGGGGAGTCTCTGCCCCCTCAGTCTACCCAGCAGGCTGAGAGTGGTGTGCATCACTCACAGTGCAGTACAGCAGCACCATTGTTATGTTGGGAGACAAAAACCTCAGCCA
2161 P S G A V V G E S L A P L S L P S K A E S V S I T S Q C S Y S S T I V H V G D K K P Q P
721 GAATCAGAGATAATCGAGGATTTGCAAGAGCGCGGTCCCAACTCTGCCCGGACAGTGGTGTCTCCACCCAGTCAAGAAAGGAGGATACAAGAAATAGGACTGACTAAACAGTGGTCCGACCTCAC
2296 E S E I I E D V A E S P V P P T L P G S M V S P P S Q E K E A Y K K L G L T K Q V L A A H
766 ACTCAGAAAGAGGAGCGGCTTCTCAGCCCTGCAGAGGACTTCGACGCGCAGGAGCTACAGAAGGACTTTTCAAAATATCTCACCAGGACAAGGAGTGTGTAAGTCCAGCTCCGCCCTAAACAGGG
2431 T Q K E E Q A F L S R C R G L R S A R S L L Q K D Y F K Y L H Q D K E S A E T P A A P K T G
811 ACCACCAGACGAGAACACTGCCAAGAAGAACAACCGCAGCAGGAAGTCAAAAAGCCAGCAATGACAGTGGCGATTGCGGAGAGCAGTGTGCCAACACAGACTCCGCGCCCTCCGAGGCTTAAAC
2566 T T R Q E N T A K K N N R S R K S K K P R M K H G D S S D S T V S N H K L R P P L Q G L N
856 CAAACATCATGGTCCGACTGGAAGCTCCAGTCAAGTCCACTACCCAGCAGCTTTCCACCCCTATGGTAACACCCCTGAGTGTGGTCCCAAAATATATTTCCCCAAATGGGACAGCTTGGGCAT
2701 Q T S W S P S E A S Q S A F N V P Y P T M V P A Y P L Y P P A A A A P A Q A P H L D P S L
901 TCCACAGGCTTTGGAGCGGGCAGAGTCAAGTCCACTACCCAGCAGCTTTCCACCCCTATGGTAACACCCCTGAGTGTGGTCCCAAAATATATTTCCCCAAATGGGACAGCTTGGGCAT
2836 S T G F G D G Q S T Q A P P T P P F T P M V T P V A L V L P N Y I F P Q M A A G Q L G H
946 ATGGGGGTACACCTCTCCCAAGTTTCTTCGAAAACAGACAAATGTCATACGCGCCCAACAGCCCTTCCAGCCCCACAGTACATACACCATGCAACACAGCCTTATTACCAACCAACACCAG
2971 M G A T P S P Q F L L E N Q T Q S A Y A A Q Q P F Q P P Q L A Y T M Q T Q P S F T N Q H Q
991 TTCCCTGTCAAACTGGATTTACTCCCAACAGCCATTTCACCCCTCAGCCAGCTTACCTAGCCAGCAGCCCTTCACTGTCCAGCCCTTTCCAGTGCACAAATATATTTCCCCAAATGGGACAGCTTGGGCAT
3106 F P V Q T G F T P P T P Q P A P P T P P F T P M V T P V A L V L P N Y I F P Q M A A G Q L G H
1036 GTGCAACCTTCCATACCTACCAAAAGCCCTGAAAAGCCCTGATATAGAGCCCGAGAGGGCGCAGCATCCCGGCTCCACTCCAGCATCGGGAACAGGAGAGCCGACTACCTCCCGCAGCTGTTGAG
3241 V Q P F H Y L T K E P S K A P D I E P R E G A A S R S S T P A S G T R E P T T S P P L F
1081 TCACGATCGACTCCACTACAATCTGCTGAGTATGGAGGATGGACGCGGTCCGTTCAAGTCAAGACAGTATGGCCCCCTGCGAGGCGCGGACGCTCACAGCGCAGCGTGGGAGAAGT
3376 S R C L Q L N L L S M E D G Q R S V E R G Q D S M A P P A G P A G G S A A E S K S
1126 GCGGTTTTATAAACACAGAGAACCAGCCACAAGTGGTGTCTAGGAGATGGTGACACAGTACAGTAACTCTCTCTGCGACTGTGATATCTTTTTCAGGAGCAGGAGGACTCGCACTTGGCACT
3511 G G F I N T E N Q P Q V V S L G D G G H S D S N S S S C D L L D I L L Q E Q E D S H S G T
1171 GGATCAGCCACTCAGGCTCAATGGTTCAGGATCAGGTTCTGGCTGAACCGTGTGGGACTTCAGTGTGAAACCTCGGGAAGCAGAACAGGAAGCAGCAACACCGCAAAATATTTGGCAGTGTGGACTCT
3646 G S A T S G S M G S G S G S G S G C N R C C A T S A S G T S S S N T S K Y F G S V D S
1216 CTAGAACAACAACACTAAGCCAAATCTATATCCAAAACAGGCAAGAGGGCTCTGAACTGGACAGTCTCAGACCAAGGCTCTCTCAGGAGAAAAAGAGCATTTCATCAAAATGTTCCCTCAGGAGCCA
3781 L E H N T K A N S I S K T R A K E G S E T G Q S Q T K A S S Q G E K E H F I K C C L Q E P
1261 CTCTGGTGTGATGGCAACCAACGACCAAAAGTCAATGTTGACATACAGTACCTATAGGACATCAAAAAGTTCACGTTGAAGACAAGGAGGCTAAGCAGATGCAGAAGGCCACTTCTTC
3916 L W L L M L N D K V M L T Y Q L P S R D I Q Q Y L R E D K E R L R E S K Q P H F S
1306 TCAGAGCAACGACAGAGCTTTGGAGAACACCCATGATTAAGACGGGGGCTTCACTGCTGCGATTAATGCAAGGAATGTGTACTGTGAAGACCCAGCAGGACACTTGGAGGATGATGTCGAGAC
4051 S E Q R R E L L E H P W I R R G G L P A A I N V K E C V Y C E D P A G T L V E D D V P D
1351 ATAGACATGGGAACTGGACATGAGCTGAGCCAGGAAGAAATCAGGCTTGGCTCATGA
4186 I D M G E L D D E L S H E E Q S G S G S *
1396

```

图 5 半滑舌鲷 *Per2* 基因 ORF 序列及推导的氨基酸序列

Fig.5 Open reading frame sequence of *C. semilaevis Per2* gene and the deduced amino acid sequence

方框部分: 起始密码子; 下划线: 功能结构域 PAS11; 虚下划线: 功能性结构域 PeriodC;

阴影部分: 保守序列; 终止密码子用*表示。

Start codon is marked is framed. Functional domain PAS11 is marked with underline. Functional domain PeriodC indicated with virtual underline. Conserved sequence is marked in gray, and the termination codon is denoted by *.

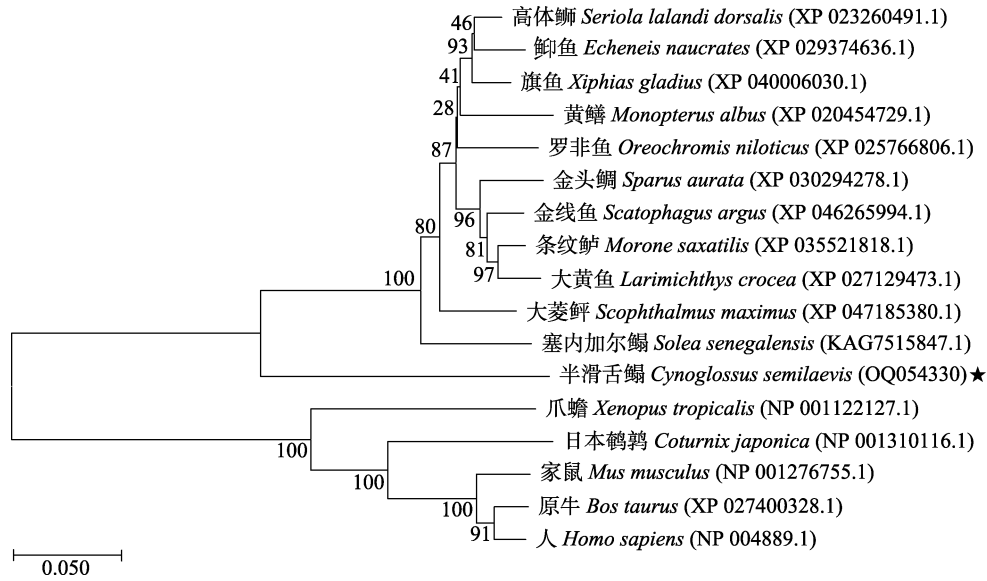


图6 Clock1a 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.6 Phylogenetic tree based on Clock1a amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

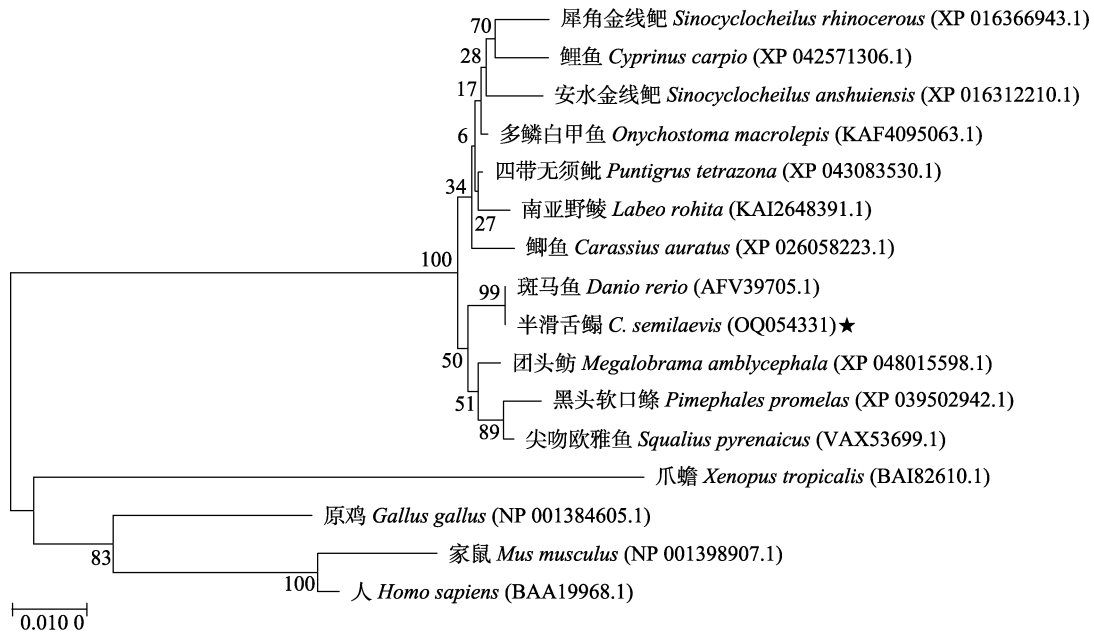


图7 Bmal1a 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.7 Phylogenetic tree based on Bmal1a amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

序列与其他鱼类的 Cry1a 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷的 Cry1a 氨基酸序列与多个物种的 Cry1a 氨基酸序列同源性进行分析,结果显示,半滑舌鲷 Cry1a 与塞内加尔鲷的同源性为 88%,与鲷鱼的同源性为 89%,与龟壳攀鲈的同源性为 88%,与爪蟾(XP 031753830.1)的同源性为 78%,与日本鹌鹑(XP 015719355.1)的同源性为 78%,与人(AAH 30519.1)的同源性为 82%。半滑舌鲷的 Cry1a 与其他硬骨鱼类及哺乳类、禽类、两栖类等同源性均

较高,说明 Cry1a 在进化进程中保守性较高(图 8)。

对半滑舌鲷 Cry2 氨基酸序列与高体鲷(*Seriola dumerili*: XP 022611640.1)、大刺鲈(*Mastacembelus armatus*: XP 026166734.1)、射水鱼(*Toxotes jaculatrix*: XP 040893925.1)的 Cry2 氨基酸序列进行比对并绘制多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 9)。发现半滑舌鲷的 Cry2 氨基酸序列与其他鱼类的 Cry2 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷和多个物种的 Cry2 氨基酸序列的同源性进行分

析。结果显示, 半滑舌鲷 Cry2 与高体鲷的同源性为 93%, 与大刺鳅的同源性为 94%, 与射水鱼的同源性为 93%, 与爪蟾(XP 031756344.1)的同源性为 68%, 与原鸡(NP 989575.1)的同源性为 70%, 与人(ABM

64210.1)的同源性为 70%。半滑舌鲷的 Cry2 与其他硬骨鱼类的同源性极高, 与哺乳类、禽类、两栖类等同源性也较高, 说明 Cry2 在进化进程中保守性较高, 与其他硬骨鱼类间具有极高的同源性(图 9)。

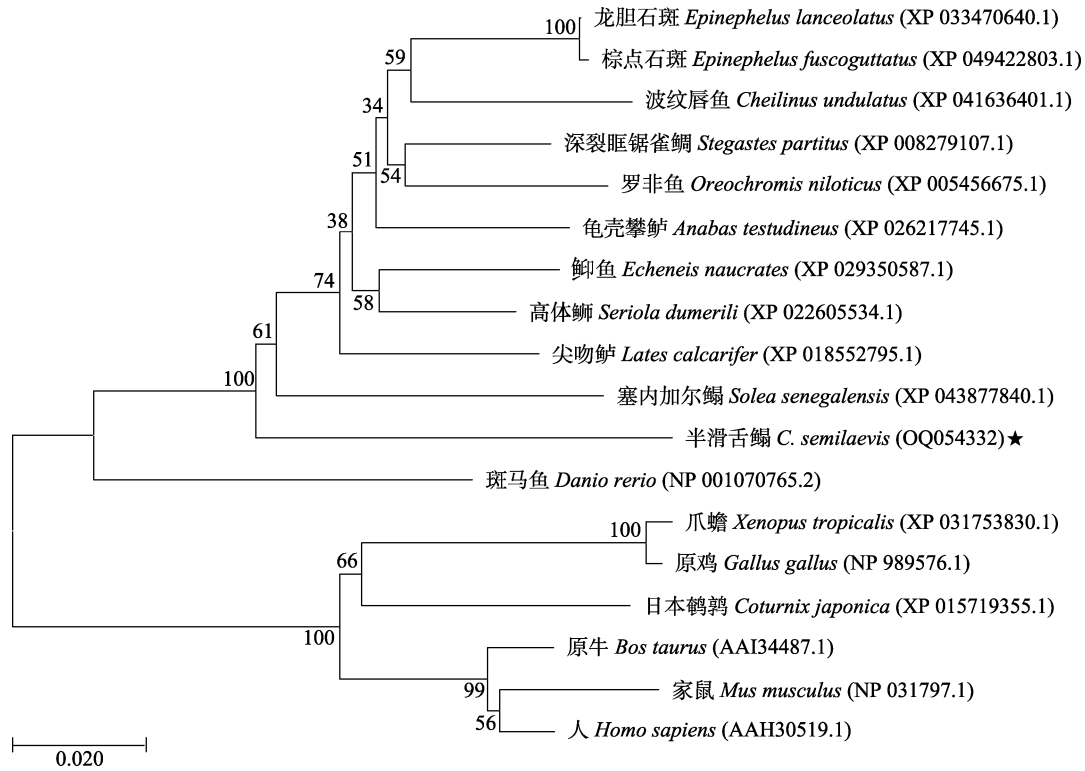


图 8 Cry1a 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.8 Phylogenetic tree based on Cry1a amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

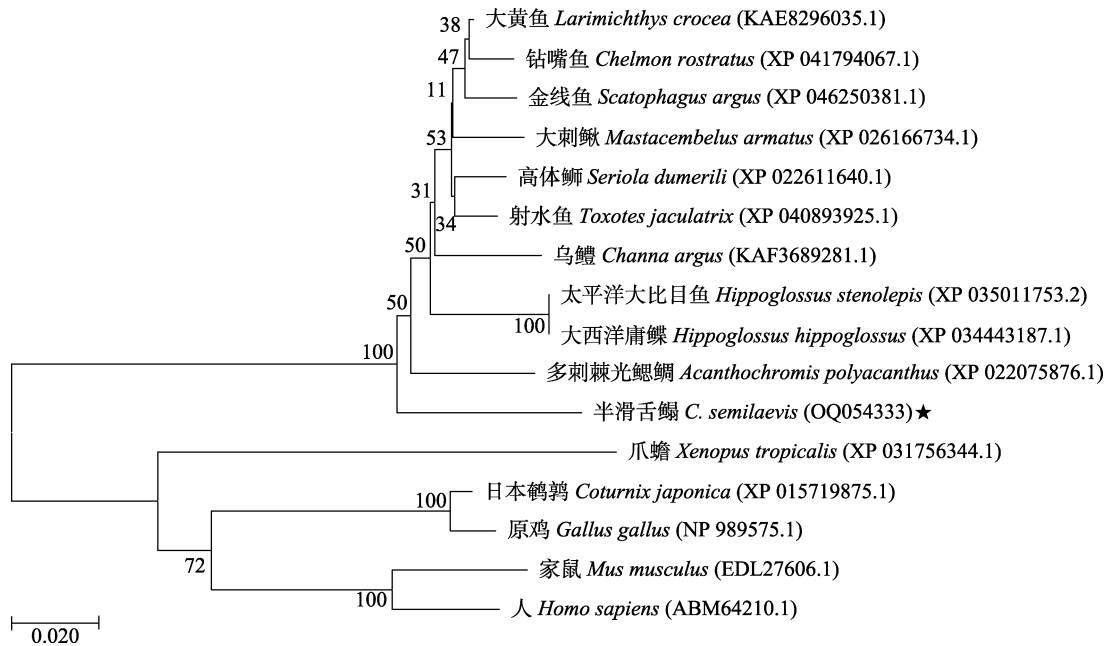


图 9 Cry2 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.9 Phylogenetic tree based on Cry2 amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

对半滑舌鲷 *Per2* 氨基酸序列与尖吻鲈鱼(*Lates calcarifer*: XP 018539634.1)、射水鱼(XP 040903216.1)、大刺鲈(XP 026175360.1)的 *Per2* 氨基酸序列进行对比并绘制了多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 10)。发现半滑舌鲷的 *Per2* 氨基酸序列与其他鱼类的 *Per2* 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷的 *Per2* 氨基酸序列与多个物种的 *Per2* 氨基酸序列同源性进行分析,结果显示,半滑舌鲷 *Per2* 与尖吻鲈鱼和射水鱼的同源性为 84%,与大刺鲈的同源性为 82%,与爪蟾(XP 031757399.1)的同源性为 61%,与日本鹌鹑(NP 001310155.1)的同源性为 67%,与人(NP 073728.1)的同源性为 71%。半滑舌鲷的 *Per2* 与其他硬骨鱼类的同源性极高,与哺乳类、禽类、两栖类等同源性也较高,说明 *Per2* 在进化进

程中保守性较强(图 10)。

2.5 *Clock1a* 和 *Bmal1a* 在半滑舌鲷卵巢不同发育时期的表达特性

在性成熟半滑舌鲷卵巢的不同发育时期, *Clock1a* mRNA 在卵巢 II 和 III 期表达量显著增加,在 III 期达到最大值($P<0.05$),随后急剧下降,在 V 期达到最小值($P<0.05$),在 VI 期又显著增加($P<0.05$)。 *Clock1a* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 1.78 倍,是 V 期的 8.31 倍(图 11A)。 *Bmal1a* mRNA 从卵巢 II 期至 III 期表达量增加至最大值,随后显著下降,在 V 期达到最小值($P<0.05$),随后逐渐增加。 *Bmal1a* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 1.36 倍,是 V 期的 4.28 倍(图 11B)。

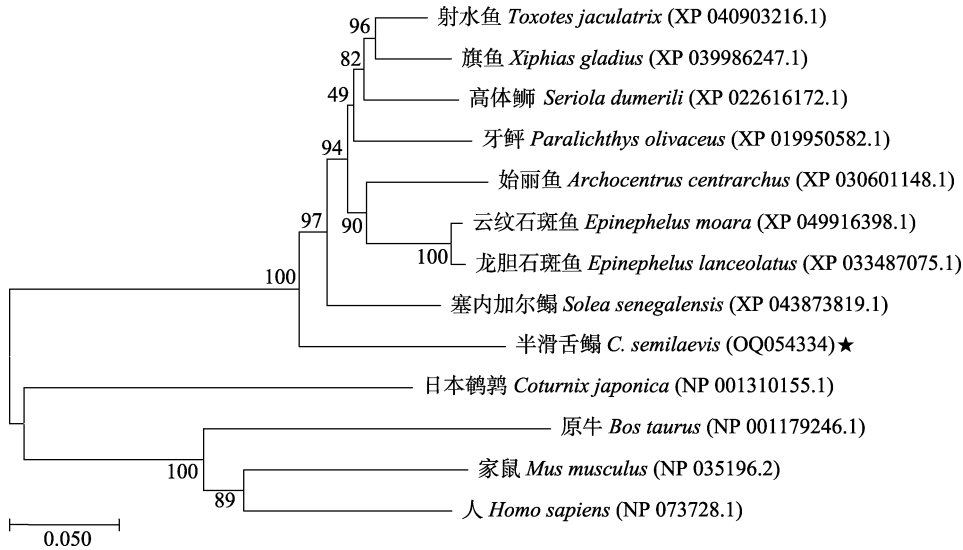


图 10 *Per2* 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.10 Phylogenetic tree based on *Per2* amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

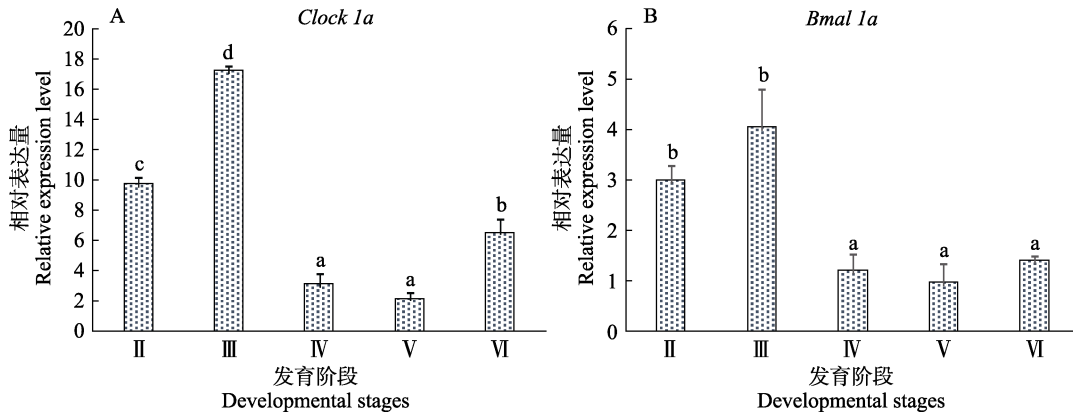


图 11 半滑舌鲷卵巢不同发育时期的 *Clock1a* 和 *Bmal1a* mRNA 表达分析

Fig.11 Expression profiles of *Clock1a* and *Bmal1a* mRNA in the different developmental stages of ovary in *C. semilaevis*

不同字母间差异显著($P<0.05$)。下同。

Different letters represent significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.6 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 在半滑舌鲷卵巢不同发育时期的表达特性

在性成熟半滑舌鲷卵巢的不同发育时期, *Cry1a* mRNA 在卵巢 II~III 期表达量显著增加, 在 III 期达到最大值($P<0.05$), 随后急剧下降, 在 V 期达到最小值($P<0.05$), 在 VI 期略有升高。*Cry1a* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 2.35 倍, 是卵巢 V 期的 16.29 倍(图 12A)。*Cry2* mRNA 在卵巢 II~III 期表达量显著增

加, 在 III 期达到最大值($P<0.05$), 随后急剧下降, 在 IV 期达到最小值($P<0.05$), 随后逐渐增加。*Cry2* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 2.16 倍, 是 V 期的 9.50 倍(图 12B)。*Per2* mRNA 在卵巢 II~III 期表达量显著增加, 在 III 期达到最大值($P<0.05$), 随后急剧下降, 在 IV 期达到最小值($P<0.05$), 随后无明显变化。*Per2* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 2.76 倍, 是 V 期的 3.09 倍(图 12C)。

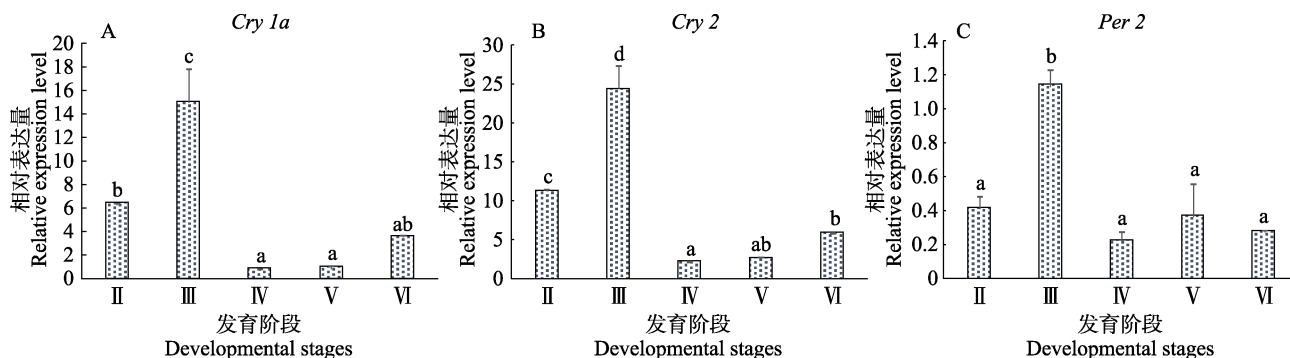


图 12 半滑舌鲷卵巢不同发育时期的 *Cry1a*、*Cry2*、*Per2* mRNA 表达分析

Fig.12 Expression profiles of *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* mRNA in the different developmental stages of ovary in *C. semilaevis*

3 讨论

本研究利用克隆技术获得了半滑舌鲷的生物钟相关基因 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的编码区序列。经预测均未发现跨膜结构域和信号肽。*Clock1a* 氨基酸序列中发现功能性结构域 PASD1 和 PAS11。*Bmal1a* 氨基酸序列中发现功能性结构域 PASD3 和 PAS11。PAS11、PASD1、PASD3 是 PAS (PER-ARNT-SIM)同源结构域, 结构域 PAS 可与结构域 bHLH 形成的功能性 DNA 结合复合物 bHLH: PAS, 与顺式元件 E-box 结合激活靶基因的转录, 形成 Clock: Bmal 异二聚体的转录因子(Marco *et al*, 2004; Bian *et al*, 2017)。在青鳉(*Oryzias latipes*)的 *Clock1* 和 *Bmal1* 序列中也存在功能性结构域 PAS-A 和 PAS-B, 且在功能性结构域 PAS-A 上发现了参与形成 Clock: Bmal 异二聚体的氨基酸残基 Ala174、Ala175 和 Leu179 (Teika *et al*, 2019)。半滑舌鲷 *Clock1a* 氨基酸序列中的功能性结构域 PASD1、PAS11 以及 *Bmal1a* 氨基酸序列中的功能性结构域 PASD3、PAS11 可能与 E-box 结合, 在半滑舌鲷生物钟基因环路调节过程中起到促进 Clock: Bmal 异二聚体形成的作用, 正向调节生物钟基因环路。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鲷 *Clock1a*、*Bmal1a* 与其他硬骨鱼类的

同源性分别达到 60%~79%、94%~100%, 与爪蟾同源性分别为 47%、84%, *Clock1a* 与日本鹌鹑同源性为 46%, *Bmal1a* 与原鸡同源性为 88%, 与人同源性分别为 46%、88%。在构建的进化树中, 半滑舌鲷 *Clock1a*、*Bmal1a* 序列分别与其他硬骨鱼类聚为一簇, 其他脊椎动物的 *Clock1a*、*Bmal1a* 序列分别聚为一簇。说明, 半滑舌鲷 *Clock1a* 基因在进化进程中出现了进化差异, 但在硬骨鱼类中保守性较强, *Bmal1a* 基因则在脊椎动物进化进程中保守性强。

Cry1a 氨基酸序列中发现功能性结构域 FAD7。*Cry2* 氨基酸序列发现功能性结构域 FAD7; 并且 *Cry1a* 和 *Cry2* 序列中 FAD7 同源性达到 75%。*Cry2* 包含一个光解酶同源区(PHR), PHR 由初级口袋(与功能性结构域 FAD 结合)、次级口袋和扩展的 C 端区域组成, *Cry2* 通过 PHR 结构域上 2 个不同的区域直接与 Clock 和 Bmal 相互作用(Gul *et al*, 2020)。当 *Cry2*: *Per2* 异二聚体与 Clock: Bmal 异二聚体结合后, *Cry2* 氨基酸序列中的 FAD7 结构域通过切除 Clock: Bmal 异二聚体氨基酸序列中的胸腺嘧啶二聚体使其序列发生改变, 从而不能与 E-box 结合, 实现负反馈调节(Saha *et al*, 2019)。在欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)的 *Cry1* 和 *Cry2* 序列中发现了功能性结构域 FAD7 (Pozo *et al*, 2012)。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *Cry1* 序列中发现了功能性结构域 FAD (Zhang *et al*, 2022)。在哺

乳动物黑线仓鼠(*Cricetulus barabensis*)的 *Cry1* 和 *Cry2* 序列中也发现了功能性结构域 FAD (朱涵毅等, 2019)。半滑舌鳎 *Cry1a* 和 *Cry2* 氨基酸序列中的功能性结构域 FAD7 可能通过抑制 Clock:Bmal 异二聚体与 E-box 结合, 在半滑舌鳎生物钟基因环路调节过程中起到抑制 Clock:Bmal 异二聚体形成的作用, 逆向调节生物钟基因环路。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 *Cry1a* 和 *Cry2* 与其他硬骨鱼类的同源性分别达到 85%~91%和 84%~94%, 与爪蟾的同源性分别为 78%和 68%, *Cry1a* 与日本鹌鹑的同源性为 78%, *Cry2* 与原鸡的同源性为 70%, 与人的同源性分别为 82%和 70%。在构建的进化树中, 半滑舌鳎 *Cry1a* 和 *Cry2* 分别与其他硬骨鱼类聚为一簇, 其他脊椎动物的 *Cry1* 和 *Cry2* 聚为一簇。说明半滑舌鳎 *Cry1a* 基因在进化进程中保守性较强, *Cry2* 基因在进化进程中出现了进化差异, 但在硬骨鱼类中保守性较强。同时, 半滑舌鳎 *Cry1a* 与 *Cry2* 的同源性达 62%, 表明 2 种半滑舌鳎 *Cry* 基因在进化进程中出现了进化差异。

Per2 氨基酸序列中发现功能性结构域 PeriodC 和 PAS11。在卡氏欧雅鱼(*Squalius carolitertii*)、尖吻欧雅鱼、勐欧雅鱼(*S. torgalensis*)、阿拉丁欧雅鱼(*S. aradensis*)等 4 种硬骨鱼生物钟基因适应与趋同的研究中发现, *Per* 序列中有功能性结构域 PAS3 或 PAS11, 以及末端区域的功能性结构域 PeriodC。功能性结构域 PeriodC 可与 Clock1a 和 Bmal1a 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 结合, 功能性结构域 PAS 具有光接收活性且在蛋白质形成二聚体的过程中发挥作用, 功能性结构域 PeriodC 可能在 FAD7 切除 Clock:Bmal 异二聚体氨基酸序列中的胸腺嘧啶二聚体的过程中发挥作用(Moreno *et al*, 2021)。在瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)的 *Per2* 氨基酸序列中存在功能性结构域 PAS(Qin *et al*, 2021)。王明勇等(2012)研究发现, 斑马鱼 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS11 能与 E-box 结合, 使限速酶 AANAT2 的表达受到抑制, 同时, PAS11 可通过 RORE 增强 *Bmal1b* 的表达, 从而使 *Per2* 基因在斑马鱼生物钟中发挥双重作用。半滑舌鳎 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PeriodC 可能通过与 Clock1a 或 Bmal1a 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 结合, 使 Clock:Bmal 异二聚体的形成受到抑制。而半滑舌鳎 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 可能与 Clock1a 或 Bmal1a 的氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 形成竞争, 抑制 Clock:Bmal 异二聚体的形成, 半滑舌鳎 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PeriodC 与功能性结构域 PAS11 共同逆向调节生物钟基因环路。同时, 功能性

结构域 PAS11 可能通过抑制限速酶 AANAT2 的表达, 达到调节 MLT 表达的作用。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 *Per2* 与其他硬骨鱼类的同源性达到 70%~84%, 与爪蟾的同源性为 61%, 与日本鹌鹑的同源性为 67%, 与人的同源性为 71%; 半滑舌鳎 *Per2* 在构建的进化树中与其他硬骨鱼类聚为一簇, 其他脊椎动物的 *Per2* 也聚为一簇, 说明 *Per2* 基因在进化进程中保守性较强。

生物钟核心环路由 Clock 和 Bmal 组成的正调节因子 Clock:Bmal 和 *Per*、*Cry* 组成的负调节因子 *Per*:*Cry* 构成。二聚化的 Clock:Bmal 蛋白能结合位于启动子上游的 E/E'-box 核苷酸序列, 从而启动 *Per* 和 *Cry* 以及钟控制基因(circadian controlled genes, CCGs)等基因的表达, 表达产物中的 *Per* 和 *Cry* 蛋白在细胞质内形成异二聚体 *Per*:*Cry*, *Per*:*Cry* 入核后, 通过与 Clock:Bmal 异二聚体结合, 抑制该二聚体与启动子上游的 E/E'-box 的结合, 从而呈现出核心生物钟的负反馈环路调节(Saha *et al*, 2019)。生物钟基因可抑制 MLT 合成过程的限速酶 AANAT2 的表达, 从而参与调节 PG 中 MLT 的合成节律, 继而影响 BPG 轴中 GnRH 的分泌(Saha *et al*, 2019)。在大菱鲆季节性繁殖过程中, MLT 受体 *Mtnr1* 和 *Mtnr2* 的表达量随着卵巢的发育成熟逐渐增加, 在产卵期达到最高值, 说明 MLT 是调节大菱鲆卵巢发育的一种有效激素(Zhao *et al*, 2022)。在非繁殖季节和繁殖季节的点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)脑和垂体中以及三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)和旗鱼的性腺中, MLT 的表达也存在着季节性规律, 繁殖季节的旗鱼卵巢组织中 MLT 表达量高于非繁殖季节的卵巢组织, 同时, 在非繁殖季节的旗鱼卵巢组织中 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达量高于繁殖季节, 说明 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2h* 和 *Per2* 基因是旗鱼卵巢发育成熟过程中的重要基因(Sokoyowska *et al*, 2004; Chai *et al*, 2013; Basili *et al*, 2021)。本研究通过 qRT-PCR 技术检测了半滑舌鳎性成熟过程中 II、III、IV、V 和 VI 期卵巢组织中的 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达变化规律, 它们在卵巢发育过程中的表达均从 II 期到 III 期显著升高, 并在 III 期达到最大值($P < 0.05$), 随后显著性降低, 在 IV 期到 VI 期呈相对低的表达量。说明半滑舌鳎的 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因是参与调节卵巢发育成熟的重要基因。

在本研究中, 半滑舌鳎 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达变化趋势与卵巢发育成熟过程呈负相关, 与季节性光照周期呈正相关并呈现出周

年表达规律。生物钟基因的周期性表达能使生物体产生食物摄入周期,从而影响脂肪累积和热量消耗(Oike *et al.*, 2014);孙学亮等(2012)通过模拟不同光照周期对半滑舌鳎生长发育的影响进行研究,发现长光照周期条件下饲料系数低。半滑舌鳎亲鱼培育过程中,卵巢Ⅱ期和Ⅲ期的光照条件为长光照,Ⅳ期和Ⅴ期的光照条件为相对短光照,生物钟基因可能通过在卵巢Ⅳ期和Ⅴ期的低表达影响半滑舌鳎的摄食和能量平衡,有助于满足卵巢发育过程中的能量需求。生物钟基因对硬骨鱼类卵巢发育周期影响的具体机制目前仍不明确,徐俊豪(2016)通过细胞转染实验发现,斑马鱼胚胎组织中 *Clock1a:Bmal1b* 异二聚体可激活骨形态发生蛋白 2a (*Bmp2a*) 的表达, *Bmp2a* 可通过影响 *Per2* 的表达参与生物钟的调控,且 *Bmp2a* 参与脂肪的生成与代谢。Shi 等(2016)研究发现,半滑舌鳎卵巢组织中的孕激素和脂联素受体 *Paqr7b* 在卵巢发育Ⅱ~Ⅴ期的卵母细胞中表达量逐渐增加,在Ⅴ期达到最大值,在Ⅵ期急剧下降。生物钟基因可能与以上蛋白共同作用,达到调节半滑舌鳎卵巢周期性发育成熟。Khan 等(2016)通过模拟不同光照条件发现,斑马鱼卵巢组织中 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry2a* 和 *Per1b* 在长光照条件下的表达量高于短光照条件。在日本鹤鹑卵巢中, *Clock*、*Per2*、*Per3* 基因在长光照条件下的表达量高于短光照条件(Takashi *et al.*, 2000)。本研究中,半滑舌鳎生物钟基因的表达变化规律与上述斑马鱼和日本鹤鹑卵巢中表达变化特征报道相似。

受光照条件等具有季节性变化规律的外在条件以及外围生物钟机制的共同影响,卵巢组织中生物钟基因的表达也呈现出年周期性表达规律。在人工控制培育水温和光照周期的条件下,对半滑舌鳎亲鱼卵巢的发育成熟过程研究发现,半滑舌鳎亲鱼卵巢发育与水温和光周期具有显著的相关关系(柳学周等, 2009)。在非发情期的苏尼特羊卵巢中, *Per1* 和 *Per2* 基因的表达量高于发情期(向光明等, 2019a、b);Basili 等(2021)通过对繁殖季节和非繁殖季节的旗鱼性成熟个体和非成熟个体的卵巢中重要基因表达特征进行研究,发现卵巢中生物钟基因(*Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2*)的表达存在季节性差异,且非繁殖季节 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达量高于繁殖季节,性成熟个体和非成熟个体间在非繁殖季节的表达差异不明显,说明了生物钟基因季节性表达在旗鱼卵巢的成熟过程中具有潜在的调控作用。本研究中,对半滑舌鳎卵巢组织中 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因在卵巢发育的Ⅱ~Ⅵ期的表达量变化分析贯

穿了一个年周期,且半滑舌鳎卵巢组织中的5个生物钟基因表达量相对高的Ⅱ期和Ⅲ期处于非繁殖季节,而5个生物钟基因表达量相对低的Ⅳ期和Ⅴ期处于繁殖季节,因此,半滑舌鳎卵巢组织中 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的表达也存在季节性规律。生物钟基因表达随着半滑舌鳎卵巢发育经历Ⅱ~Ⅵ期后再度处于Ⅱ期并开始新的发育周期时,即表现为年周期性的表达规律。在生产实践中,可以结合半滑舌鳎生物钟表达特征,通过调控半滑舌鳎亲鱼培育期的光照长短,促进其性腺发育成熟,有望获取繁殖期提前半滑舌鳎亲鱼,将有助于半滑舌鳎苗种繁育效率的提升。

综上所述,本研究克隆了半滑舌鳎生物钟相关基因 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的序列,通过构建的系统进化树,发现半滑舌鳎 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 分别与其他硬骨鱼类的 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 聚为一簇,说明其在长期进化过程中具有较近的亲缘关系。半滑舌鳎 *Clock1a* 与哺乳类、禽类和两栖类同源性较低,说明 *Clock1a* 在进化过程中出现了进化差异。半滑舌鳎 *Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 与哺乳类、禽类和两栖类同源性较高,说明其在进化进程中保守性较强。本研究初步探明了 *Clock1a*、*Bmal1*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因在性成熟半滑舌鳎卵巢组织的Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ期的表达变化规律,为进一步揭示生物钟相关基因参与调控半滑舌鳎繁殖机理奠定了基础。

参 考 文 献

- BASILI D, GIOACCHINI G, TODISCO V, *et al.* Opsins and gonadal circadian rhythm in the swordfish (*Xiphias gladius*) ovary: Their potential roles in puberty and reproductive seasonality. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 303: 113707
- BIAN S S, ZHENG X L, SUN H Q, *et al.* *Clock1a* affects mesoderm development and primitive hematopoiesis by regulating Nodal-Smad3 signaling in the zebrafish embryo. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(34): 14165–14175
- CHAI K, LIU X C, ZHANG Y, *et al.* Day-night and reproductive cycle profiles of melatonin receptor, *kiss*, and *gnrh* expression in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Molecular Reproduction and Development*, 2013, 80(7): 535–548
- CHEN S H, QIAO H, FU H T, *et al.* Molecular cloning, characterization, and temporal expression of the clock genes period and timeless in the oriental river prawn

- Macrobrachium nipponense* during female reproductive development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2017, 207: 43–51
- DAVIE A, MINGHETTI M, MIGAUD H. Seasonal variations in Clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiology International*, 2009, 26(3): 379–395
- GUL S, AYDIN C, OZCAN O, *et al.* The Arg-293 of Cryptochrome1 is responsible for the allosteric regulation of Clock-Cry1 binding in circadian rhythm. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(50): 17187–17199
- HERRERO M J, LEPESANT J M J. Daily and seasonal expression of clock genes in the pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 208: 30–38
- KEISUKE I, TAKASHI Y. Comparative analysis reveals the underlying mechanism of vertebrate seasonal reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 64–68
- KHAN Z A, YUMNAMCHA T, RAJIV C, *et al.* Melatonin biosynthesizing enzyme genes and clock genes in ovary and whole brain of zebrafish (*Danio rerio*): Differential expression and a possible interplay. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 233: 16–31
- LAO Y C, SHI Y F, CHEN Y H, *et al.* Tissue expression of clock gene in female Magang goose at different reproductive stages. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2019, 32(2): 11–16 [劳永聪, 石逸夫, 陈永浩, 等. Clock 基因在不同繁殖时期雌性马岗鹅中的组织表达. 仲恺农业工程学院学报, 2019, 32(2): 11–16]
- LIU X Z, XU Y J, LIU N Z, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态学数量特征研究. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 25–35]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MARCO H, KEES F, SACCO C, *et al.* The PAS fold a redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271: 1198–1208
- MORENO J M, JESUS T F, COELHO M M, *et al.* Adaptation and convergence in circadian-related genes in Iberian freshwater fish. *BMC Ecology and Evolution*, 2021, 21(38): 1–15
- OIKE H, OISHI K, KOBORI M. Nutrients, clock genes, and chrononutrition. *Current Nutrition Reports*, 2014, 3(3): 204–212
- PEREZ J H, TOLLA E D, DUNN I C, *et al.* A comparative perspective on extra-retinal photoreception. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2019, 30(1): 39–53
- POZO A, VERA L M, SÁNCHEZ J A, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of *cry1* and *cry2* clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2012, 3: 364–371
- QIN C J, SHAO T, LIAO X F, *et al.* Diurnal expression of circadian clock genes *period1* and *period3* in *Pelteobagrus vachellii*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(2): 652–660
- SAHA S, SINGH K M, GUPTA B B P. Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 279: 27–34
- SHI B, LIU X Z, THOMAS P, *et al.* Identification and characterization of a progestin and adipoQ receptor (PAQR) structurally related to *Paqr7* in the ovary of *Cynoglossus semilaevis* and its potential role in regulating oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 237: 109–120
- SHI B, LIU X Z, XU Y J. Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- SOKOYOWSKA E, KALAMARZ H, KULCZYKOWSKA E. Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): towards an endocrine calendar. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, 139: 365–369
- SUN X L, YANG S Y, CHEN C X, *et al.* Effects of photoperiod on growth and antioxidant indices in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(2): 23–27 [孙学亮, 杨树元, 陈成勋, 等. 光照周期对半滑舌鳎生长和抗氧化指标的影响. 水产学杂志, 2012, 25(2): 23–27]
- TAKASHI Y, YOSHIKAZU S, ERI M, *et al.* Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Molecular Brain Research*, 2000, 78: 207–215
- TEIKA O, GOSHI N, JUN-ICHI H, *et al.* Circadian oscillation of TNF- α gene expression regulated by clock gene, *Bmal1* and *Clock1*, in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *International Immunopharmacology*, 2019, 70: 362–371
- WANG M Y, HUANG G D, WANG H. Advances in the zebrafish circadian clock mechanisms. *Hereditas*, 2012, 34(9): 1133–1143 [王明勇, 黄国栋, 王晗. 斑马鱼生物钟研究进展. 遗传, 2012, 34(9): 1133–1143]
- WHARFE M D, MARK P J, WADDELL B J. Circadian variation in placental and hepatic clock genes in rat pregnancy. *Endocrinology*, 2011, 152(9): 3552–3560
- XIANG G M, LIU Q Y, WANG X Y, *et al.* Tissue expression and polymorphism of *Per1* gene and their association with seasonal reproduction in sheep (*Ovis aries*). *Journal of*

- Agricultural Biotechnology, 2019a, 27(7): 1215–1223 [向光明, 刘秋月, 王翔宇, 等. *Per1* 基因组织表达及多态性与绵羊季节性繁殖的相关性研究. 农业生物技术学报, 2019a, 27(7): 1215–1223]
- XIANG G M, LIU Q Y, WANG X Y, *et al.* Tissue expression and polymorphism of *Per2* gene and their association with seasonal reproduction in sheep (*Ovis aries*). Chinese Journal of Animal Science, 2019b, 55(11): 74–78 [向光明, 刘秋月, 王翔宇, 等. *Per2* 基因组织表达及多态性与绵羊季节性繁殖的相关性研究. 中国畜牧杂志, 2019b, 55(11): 74–78]
- XU S H. Bmp2a signaling plays a role in the circadian clock through direct facilitating *Per2* expression in zebrafish. Master's Thesis of Soochow University, 2016 [徐倏豪. 骨形态发生蛋白 Bmp2a 调控斑马鱼生物钟研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2016]
- YU Q. Biological clock: The oscillator of gene expression. Science China: Life Science, 2017, 61(1): 128–130
- ZHANG D Q, SHI B, SHAO P, *et al.* The identification of miRNAs that regulate ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. Aquaculture, 2022, 555: 738250
- ZHANG P, SUN B G. Cryptochrome 1 is involved in anti-bacterial immunity in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 2022, 561: 738675
- ZHAO C Y, XU S H, LIU Y F, *et al.* Changes of melatonin and its receptors in synchronizing turbot (*Scophthalmus maximus*) seasonal reproduction and maturation rhythm. Acta Oceanologica Sinica, 2022, 41(1): 84–98
- ZHU H Y, XUE H L, XU J H, *et al.* Clone and bioinformatics analysis of *Cry1* and *Cry2* in *Criecetulus barabensis*. Journal of Qufu Normal University, 2019, 45(4): 74–82 [朱涵毅, 薛慧良, 徐金会, 等. 黑线仓鼠 *Cry1*、*Cry2* 克隆及生物信息学分析. 曲阜师范大学学报, 2019, 45(4): 74–82]

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of Clock Genes During Ovarian Development and Maturation of Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

YAN Kewen^{1,2}, MA Xiaodong², SHI Bao^{1,2}①, CHENG Hanliang¹, WANG Chongnü², ZHAO Xinyu^{1,2}

(1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China)

Abstract Clock genes play a pivotal role in the rhythm maturation of bony fish ovaries. To explore the role of clock genes in the rhythmic ovarian development and maturation of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), we used real-time fluorescent quantitative PCR technique to analyze the expression profiles of circadian locomotor output cycles Kaput 1a (*Clock1a*), brain and muscle Arntlike 1a (*Bmall1a*), Cryptochrome 1a (*Cry1a*), Cryptochrome 2 (*Cry2*), and Period 2 (*Per2*) at the ovarian stages II, III, IV, V, and VI.

The coding DNA sequence (CDS) of five clock genes were cloned and phylogenetically analyzed. We found that the CDS sequence length of *Clock1a* was 1 620 bp and encoded 539 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Clock1a* having a predicted molecular weight of 81.9 kDa. *Clock1a* has the functional domain PASD1 (consisting of 64 amino acids) and PAS11 (consisting of 103 amino acids). The CDS sequence length of *Bmall1a* was 1 881 bp and encoded 626 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Bmall1a* having a predicted molecular weight of 68.9 kDa. In the *Bmall1a* sequence, the functional domain PASD3 is composed of 63 amino acids, and the functional domain PAS11 is composed of 103 amino acids. The CDS sequence length of *Cry1a* was 1 896 bp and encoded 631 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Cry1a* having a predicted molecular weight of 71.4 kDa. Its functional domain FAD7 was composed of 199 amino

① Corresponding author: SHI Bao, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

acids. The CDS sequence length of *Cry2* was 2 007 bp and encoded 669 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Cry2* having a predicted molecular weight of 76.0 kDa. The *Cry2* sequence contains a functional domain FAD7 consisting of 199 amino acids. The CDS sequence length of *Per2* was 4 248 bp, encoding 1 415 amino acids, and the encoded amino acid sequence of *Per2* has a predicted molecular weight of 154.0 kDa. In the *Per2* sequence, the functional domain PeriodC consists of 295 amino acids and a functional domain PAS11 consists of 102 amino acids.

The neighbor-joining method was used to analyze the *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* phylogenetic relationships between *C. semilaevis* and other bony fish, amphibians, birds, and mammals. The homology of *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* with other bony fish was 60%–79%, 94%–100%, 85%–91%, 84%–94%, and 70%–84%, respectively. Therefore, we believe that these five amino acid sequences show strong conserved property. In addition, the homology of *Cry1a* and *Cry2* was 62%, indicating that *Cry1a* and *Cry2* evolved differently during the evolution of *C. semilaevis*. In the constructed phylogenetic tree, *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* of *C. semilaevis* were clustered together with other bony fishes, indicating a close relationship between *C. semilaevis* and other bony fish in the evolutionary process. Moreover, the homology of *Clock1a* between *C. semilaevis* and mammals, birds, and amphibians is low, indicating that there are evolutionary differences in the evolutionary process of *Clock1a*. The high homology of *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* with mammals, birds, and amphibians suggests that these four clock genes were strongly conserved during the evolution of *C. semilaevis*.

In the present study, we found that the expression levels of five clock genes were high in stages II and III, which were equivalent to the non-reproductive season ($P < 0.05$). However, the expression levels of five clock genes were low in stages IV and V, which were equivalent to the reproductive season ($P < 0.05$). Therefore, the expression profiles of *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* in the ovaries of *C. semilaevis* also have seasonal characteristics. The ovarian development and maturation of *C. semilaevis* goes through stages II, III, IV, V, and VI, and then reaches stage II again and starts a new reproductive cycle. The variation patterns of seasonal factors, such as light and temperature, in fish ovaries were consistent with the annual expression patterns of the five clock genes in this study. Therefore, it can be considered that the expression of clock genes in *C. semilaevis* has an annual cycle. The findings presented in this study can enrich the theory of ovarian development and maturation of *C. semilaevis* and provide a theoretical basis for improving breeding technology and seedling efficiency.

Key words Clock gene; *Cynoglossus semilaevis*; Ovary; Expression profiles

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230418003

http://www.yykxjz.cn/

李志雄, 盛军庆, 盛斌, 王馨晨, 赵亚飞, 丁佳丽, 易小兵. 鄱阳湖泥鳅黑斑形成观察及 *mitfa* 表达分析. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 117-128

LI Z X, SHENG J Q, SHENG B, WANG X C, ZHAO Y F, DING J L, YI X B. Observation of black spot formation and *mitfa* expression analysis of *Misgurnus anguillicaudatus* from Poyang Lake. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 117-128

鄱阳湖泥鳅黑斑形成观察及 *mitfa* 表达分析*

李志雄^{1,2} 盛军庆^{1,2①} 盛斌^{1,2} 王馨晨¹
赵亚飞¹ 丁佳丽¹ 易小兵³

(1. 南昌大学生命科学学院 江西 南昌 330031; 2. 江西省水产资源与利用重点实验室 江西 南昌 330031; 3. 高安市嘉诚特种泥鳅养殖基地 江西 宜春 330800)

摘要 本研究观察了孵化后 1~60 日龄泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)中色素细胞的形成、分布和主要类型。孵化后 3 h, 在泥鳅卵黄囊内首次观察到幼体型黑色素细胞; 从仔鱼期到 21 日龄, 泥鳅体表可见幼体型黑色素细胞; 从 22 日龄的幼鱼到成鱼阶段, 泥鳅体表可见成体型黑色素细胞。虹彩细胞首先在 1 日龄泥鳅仔鱼的眼睛中出现, 直到 12 日龄才在体表被观察到。7 日龄稚鱼体表出现黄色素细胞。在孵化后 2~21 d 内, 泥鳅的黑色素细胞为幼体型黑色素细胞, 其形状由星状变化成雪花状, 进一步变化成黑点状。从 22 d 开始, 3 种花斑类型的泥鳅体表形成不同形态的成体型黑色素细胞。在大花斑泥鳅体表, 菊花状黑色素细胞有规律地聚集成大花斑; 在小花斑泥鳅体表, 圆形和树枝状黑色素细胞聚集成小花斑; 在无花斑泥鳅体表, 树突状黑色素细胞分布均匀。利用生物信息学和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法对泥鳅色素沉着相关基因 *mitfa* 进行了分析, 结果显示, 小眼畸形相关转录因子 a 基因(microphtalmia-associated transcription factor a, *mitfa*)编码的 MITFa 蛋白含 408 个氨基酸, 相对分子质量为 45.68 kDa, 预测等电点为 7.16, 包含 MITF_TFEB_C_3_N、bHLH-Zip 和 DUF 3371 结构域。与各种鱼类的 *mitf* 基因序列相比, *mitfa* 保守性较好, 序列相似度较高(58.8%~83.2%)。qRT-PCR 结果显示, *mitfa* mRNA 在胚胎发育的受精卵阶段达到峰值, 背部皮肤的表达水平高于腹部皮肤。本研究初步探究了鄱阳湖泥鳅色素和体表花斑的形成及 *mitfa* 基因的表达, 为进一步了解泥鳅体色形成的遗传机制奠定了基础。

关键词 鄱阳湖; 泥鳅; 色素形成; *mitfa*; 基因表达分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0117-12

动物的色素沉积在其生存及繁衍中扮演着重要的角色, 可以影响动物的体温调节、群体交流、求偶、躲避捕食者以及抵御紫外线等(Kelsh, 2004; Hubbard *et al*, 2010)。另外, 一些体色不同的鱼表现出不同的生长性能(Rodriguez *et al*, 2019; 傅建军等, 2021)。鱼

类体色由色素细胞的类型、分布、发育阶段和虹彩细胞对光线的反射能力决定, 并随外界环境和生理状态的变化而适应性变化(Hirata *et al*, 2003、2005)。在硬骨鱼中存在 6 种类型的色素细胞, 包括黑色素、虹彩色素、黄色素、红色素、白色素和蓝色素细胞(Fujii,

* 江西省科技重点研发项目(20232BBF60012)、国家重点研发项目(2018YFD0901700)、江西省特种水产产业技术体系项目(JXARS-10)、江西省重点研发计划(20181ACF60014)和江西省创新创业训练项目(S292110403051)共同资助。李志雄, E-mail: gdldlx@163.com

① 通信作者: 盛军庆, 副教授, E-mail: shengqingjun@163.com

收稿日期: 2023-04-18, 收修改稿日期: 2023-06-04

2000; Sugimoto, 2002; Burton, 2002; Burton *et al.*, 2017; Phang *et al.*, 2012)。在红色和金色斗鱼(*Betta splendens*)的表皮和真皮中主要是红色素细胞和黄色素细胞。在慈鲷(Cichlidae) (Maan *et al.*, 2013)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Sheng *et al.*, 2022)皮肤中色素细胞主要是黑色素、黄色素和虹彩色素细胞。色素团在色素细胞中被合成并保留其特定的色素和内部结构(Bagnara *et al.*, 2006)。皮肤色素图案反映了色素细胞本身的数量和排列情况。鱼类皮肤具有卵状、斑点、水平条纹和垂直条纹等颜色图案(Santos *et al.*, 2016; Roberts *et al.*, 2009; Kratochwil *et al.*, 2019、2018; Ahi *et al.*, 2017; Hendrick *et al.*, 2019; Sazima *et al.*, 2006)。

鱼类体色及体表图案随发育阶段而变化,不同发育阶段的鱼,其体表色素细胞亦表现出不同的发育特征(Reiss *et al.*, 2012)。体色及体表图案是在胚后发育阶段出现的特征,由于幼鱼生长周期长以及成体体型个体差异大,对它们的研究相对困难。到目前为止,对体色及体表图案形成的分子和发育基础以及进化多样性的研究只集中在斑马鱼(*Danio rerio*)和青鳉(*Oryzias latipes*)等少数模式生物中(Meyer *et al.*, 1993、1995; Kelsh *et al.*, 1996; Nagao *et al.*, 2014; Irion *et al.*, 2019; Patterson *et al.*, 2019),对硬骨鱼类体表图案的发育形成和进化仍知之甚少(朱杰等, 2002; 马学坤等, 2006; 于道德等, 2012)。

小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)是碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链(bHLH-Zip)蛋白家族的成员,作为细胞发育的主要调节因子调节黑色素细胞的存活、增值和分化(Hou *et al.*, 2008)。*mitf*基因最初因小鼠(*Mus musculus*)小眼畸形位点的基因发生突变而被发现(Hodgkinson *et al.*, 1993)。在哺乳动物中,单个*mitf*基因通过使用不同的替代启动子和外显子产生多个亚型(刘文艳等, 2017)。在鱼类中,与小鼠*mitf-A*和*mitf-M*相对应的*mitfa*和*mitfb*基因已经在包括斑马鱼、剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)和红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)等多个物种中被报道。其中,*mitfa*基因在皮肤色素细胞发育过程中发挥重要作用(Lister *et al.*, 1999),而*mitfb*主要在眼内表达,在缺少*mitfa*活性的情况下为视网膜色素上皮(RPE)细胞的发育发挥必需的功能(Lister *et al.*, 2001)。*mitf*纯合子斑马鱼突变体在胚胎发育的整个过程中均缺乏黑色素细胞,但虹彩色素细胞的数量则较野生型有所增加(Lister *et al.*, 1999)。

泥鳅是一种小型经济鱼类,广泛分布于亚洲海岸的中国、日本、朝鲜、俄罗斯和印度等地(Wang *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2019)。江西鄱阳湖地区存在3种花斑类型的泥鳅,根据其皮肤黑色斑点的有无及大小分别

命名为大花斑泥鳅、小花斑泥鳅和无花斑泥鳅,且在成体泥鳅皮肤中存在3种类型的色素细胞(Sheng *et al.*, 2022)。然而,到目前为止,尚无关于其皮肤色素细胞发育特征报道,对泥鳅色素沉积过程的分子机制也知之甚少。本文重点研究鄱阳湖泥鳅皮肤色素细胞的发育特征,对3种花斑泥鳅的黑色素细胞发育特征进行比较,并分析*mitfa*基因的序列特征以及该基因在泥鳅不同发育阶段胚胎及成体不同组织中的转录表达水平,以期为探索泥鳅体表颜色图案的形成、发展和调控机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 动物样品采集

泥鳅人工繁殖实验在南昌大学江西省水产动物资源与利用重点实验室进行,所用亲本取自高安市嘉诚特种泥鳅养殖基地。选取性腺发育成熟、无损伤、无畸形的泥鳅作为人工繁殖的亲鱼,按照大花斑泥鳅(♀)×大花斑泥鳅(♂)、小花斑泥鳅(♀)×小花斑泥鳅(♂)、无花斑泥鳅(♀)×无花斑泥鳅(♂)建立家系。雌雄亲本采用在胸鳍后肌肉注射催产素的方法进行人工催产,每尾雌鳅注射40 IU的催产素(上海生物工程有限公司),雄鳅注射剂量减半。精子和卵子经人工授精结合产生受精卵,随后将受精卵转移至孵化桶中,于(23±1)℃的微流水中孵化。

2021年5—7月,在从受精卵期到60日龄幼鱼期各个发育阶段的泥鳅胚胎、仔鱼、稚鱼和幼鱼中各随机选取适量发育正常的胚胎或鱼苗样品,用于观察色素细胞类型及黑色素细胞的发育。收集的另一份样品用于检测*mitfa*基因在泥鳅不同发育阶段胚胎中的mRNA表达水平。体重为(20.0±0.2)g的泥鳅成体在水温为(23±1)℃的自动循环水养殖系统中暂养3d,期间每天投喂2次新鲜饵料。之后,从中选取健康的泥鳅3尾,取背部皮肤、腹部皮肤、尾鳍、肠、肝脏、心脏、全脑和肌肉组织用于基因表达分析。

1.2 色素细胞及黑色素细胞的形态

采用0.04%三卡因(MS-222, Sigma-Aldrich)对泥鳅进行麻醉处理,观察并拍摄记录了泥鳅从胚胎至孵化后60d幼鱼的色素细胞形成过程和黑色素细胞形态,并比较了3种类型泥鳅皮肤黑色素细胞的发育特征。

1.3 *mitfa*基因全长cDNA克隆

使用SuperScript™ III逆转录酶试剂盒(Invitrogen),以4 μL泥鳅皮肤总RNA为模板,利用SMART寡核苷酸引物和5'/3'-CDS引物合成第1链cDNA。根据

鲤科(Cyprinidae)鱼类 *mitf* 基因的保守同源序列设计引物(*mitf*-F 和 *mitf*-R, 表 1), 通过同源克隆获得泥鳅 *mitfa* 基因的中间序列。根据 *mitfa* 中间片段序列设计 2 对特异性引物(3'-GSP 和 3'-NGSP, 5'-GSP 和 5'-NGSP, 表 1), 利用 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒 (TaKaRa), 通过 cDNA 末端快速扩增法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 经 2 轮 PCR 克隆获得 *mitfa* cDNA 的 3' 和 5' 端序列。实验时, 首先使用引物 3'-GSP (或 5'-GSP) 和通用引物混合物 (UPM, 表 1)

进行第 1 轮 PCR。用 ddH₂O 将 PCR 产物稀释作为模板, 使用引物 3'-NGSP (或 5'-NGSP) 和通用引物混合物 (UPM) 进行第 2 轮 PCR。2 轮 PCR 均采用降落式 PCR 程序 (Golden Star T6 Super PCR Mix Ver.2, 擎科, 北京): 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, T_m 15 s, 35 个循环; 72 °C 20 s; 72 °C 5 min。目的片段均使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (擎科, 北京) 进行回收, 回收产物用于构建重组质粒, 经检验后送至测序公司 (擎科, 北京) 测序获得相应核酸序列。

表 1 *mitfa* 克隆及基因表达分析引物
Tab.1 Primers for *mitfa* cloning and gene expression analysis

| 引物 Primer | 引物序列 Primer sequences (5'~3') | $T_m/^\circ\text{C}$ | 用途 Purpose |
|------------------|---|----------------------|-------------------|
| mitf-R | GGTGCCGTTGTTGAGGTCTA | 55 | 中间片段 Partial cDNA |
| mitf-F | GCCCTTCTCACCCCTCAACTG | | |
| 3'-GSP | AGTCCAATGACCCAGACATGAGGTGG | 66 | 3'-RACE |
| 3'-NGSP | TCGAGCGATCAAGCAGGAGCCCAG | 67 | |
| 5'-GSP | GGCGTGCTCCAGTCTCTTCTGTCGGTTC | 65 | 5'-RACE |
| 5'-NGSP | CATCATGCCGGGTGCTGGGGTAG | 67 | |
| Short UPM | CTAATACGACTCACTATAGGGC | | 3'/5'-RACE |
| Long UPM | CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | | |
| β -actin-F | CCCATCCATCGTCCACAG | 55 | qRT-PCR |
| β -actin-R | CTTTCAGTTTCCGCATC | | |
| mitfa-F | ATTCTCAAGGCTTCGGTGGAT | 55 | |
| mitfa-R | TCGGAGGAATAAAGCGTGGAA | | |

1.4 *mitfa* mRNA 表达分析

使用 Trizol 试剂 (TaKaRa) 从收集到的组织样品中提取总 RNA。获得的总 RNA 经微量分光光度计 (Genova Nano, 英国) 和琼脂糖凝胶电泳检测后置于 -80 °C 冰箱备用, 或立即使用反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa) 合成单链 cDNA。

通过 qRT-PCR 技术, 使用 CFX96 Touch™ 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad, 美国) 检测不同发育阶段泥鳅胚胎和成体不同组织中 *mitfa* mRNA 的表达情况。qRT-PCR 体系如下: 12.5 μL 2 \times TB Green Premix Ex Taq II, 2 μL cDNA 模板, 上下游引物 (*mitfa*-F 和 *mitfa*-R, 表 1) 各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 9.5 μL ddH₂O, 总体积为 25 μL 。qRT-PCR 程序如下: 95 °C 5min; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。实验设置空白组 (不添加模板) 作为阴性对照。实验结束后, 通过熔解曲线检测扩增的特异性, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *mitfa* 基因的相对表达量。

2 结果

2.1 泥鳅发育早期体表色素细胞出现的时间顺序

3 种花斑泥鳅胚胎发育阶段均未见色素细胞形成。以大花斑泥鳅为例, 出膜后, 1 日龄泥鳅体表出现黑色素细胞 (图 1a), 2 日龄仔鱼眼睛中出现虹彩细胞 (图 1b), 7 日龄时体表出现黄色素细胞 (图 1c), 12 日龄时体表出现虹彩细胞 (图 1d)。随着泥鳅的进一步发育, 其体表黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞的数量越来越多。

从仔鱼期到稚鱼后期 (21 日龄), 泥鳅体表均可见幼体型黑色素细胞; 从稚鱼晚期 (22 日龄) 到成体期泥鳅的皮肤上可见成体型黑色素细胞。仔鱼期时, 泥鳅体表黑色素细胞由星状发育成雪花状/树突状 (图 2a、b); 从仔鱼晚期到稚鱼后期 (21 日龄), 黑色素细胞形态由大的浅黑点状向深黑点状发育, 最后向细黑点状发育 (图 2c、d); 从稚鱼后期 (22 日龄) 到成鱼期, 细黑点

状的幼体型黑色素细胞逐渐发育成树突状或圆点状的成体型黑色素细胞(图 2e、f)。

2.2 3种花斑泥鳅体表黑色素细胞发育进程的比较

显微观察并比较 3 种花斑泥鳅体表黑色素细胞的发育进程。结果显示, 孵化后 2~21 d 的大花斑泥

鳅处于仔鱼期和稚鱼期发育阶段, 其体表黑色素细胞均为幼体型黑色素细胞(图 3a、b)。孵化后 22 d, 泥鳅体表开始出现成体型黑色素细胞, 多为细黑点状, 随后黑色素细胞逐渐聚集形成规则的大黑点(图 3c、d)。孵化后 45 d, 大花斑泥鳅体表黑色素细胞有规则地聚集, 呈黑斑状(图 3e、f)。经局部放大后观察,

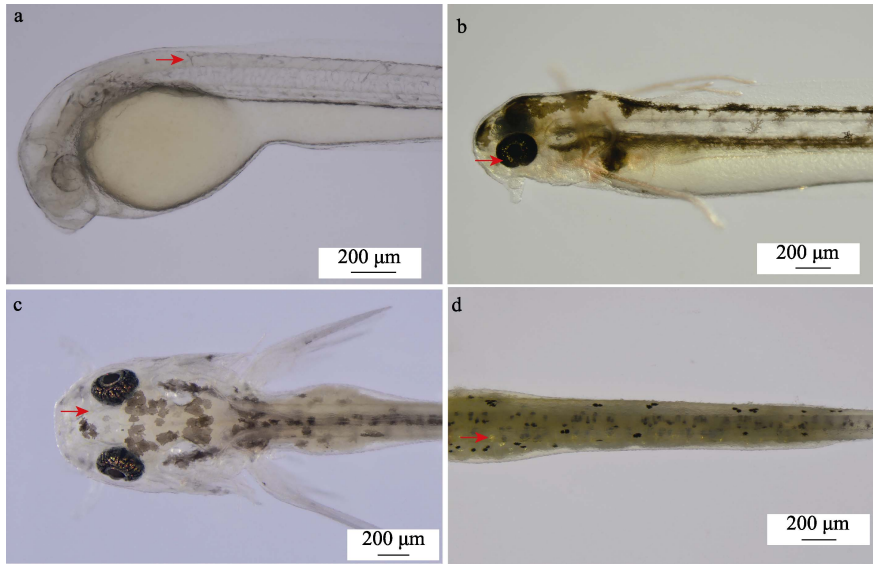


图 1 大花斑泥鳅早期发育阶段 3 种色素细胞发育过程

Fig.1 Development progression of three types of pigment cells in early development stage of large-blackspot loach

- a: 1 日龄仔鱼(红色箭头示黑色素细胞); b: 2 日龄仔鱼(红色箭头示虹彩细胞);
c: 7 日龄稚鱼(红色箭头示黄色素细胞); d: 12 日龄稚鱼(红色箭头示虹彩细胞)。

a: 1-day-old larva, the red arrow points to the melanocytes; b: 2-day-old larva, the red arrow points to the iridophores;
c: 7-day-old juvenile, the red arrow points to xanthophore; d: 12-day-old juvenile, the red arrow points to iridophores.

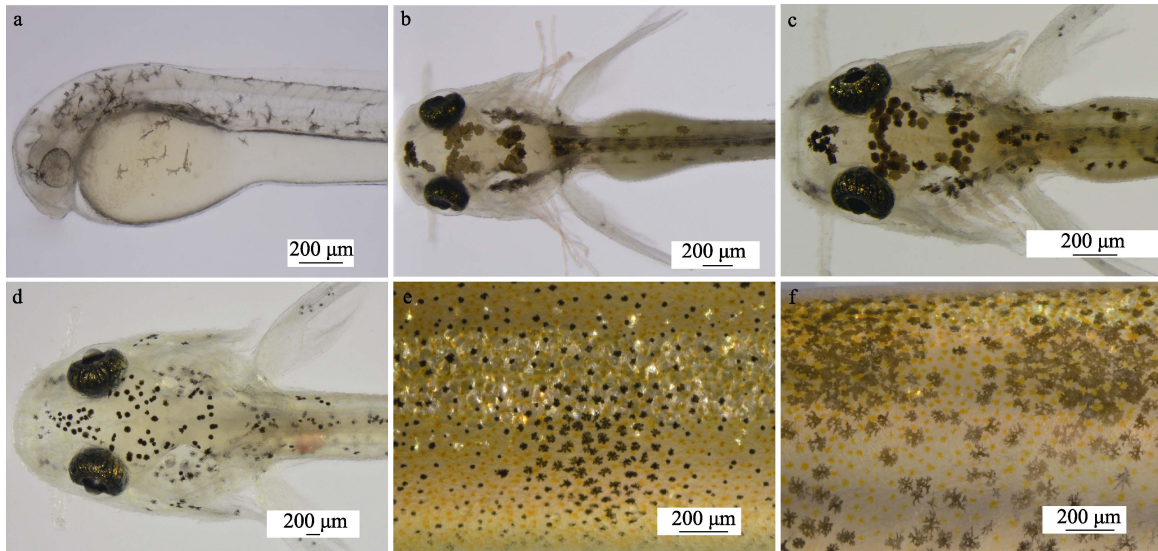


图 2 大花斑幼体泥鳅体表黑色素细胞发育

Fig.2 Development of melanocytes on body surface of large-blackspot larvae loach

- a: 1 日龄仔鱼; b: 5 日龄仔鱼; c: 6 日龄稚鱼; d: 21 日龄稚鱼; e 和 f: 45 日龄泥鳅体表黑色素细胞。

a: 1-day-old larvae; b: 5-day-old larvae; c: 6-day-old juveniles; d: 21-day-old juveniles;
e and f: Melanocytes on body surface of 45-old-day loach.

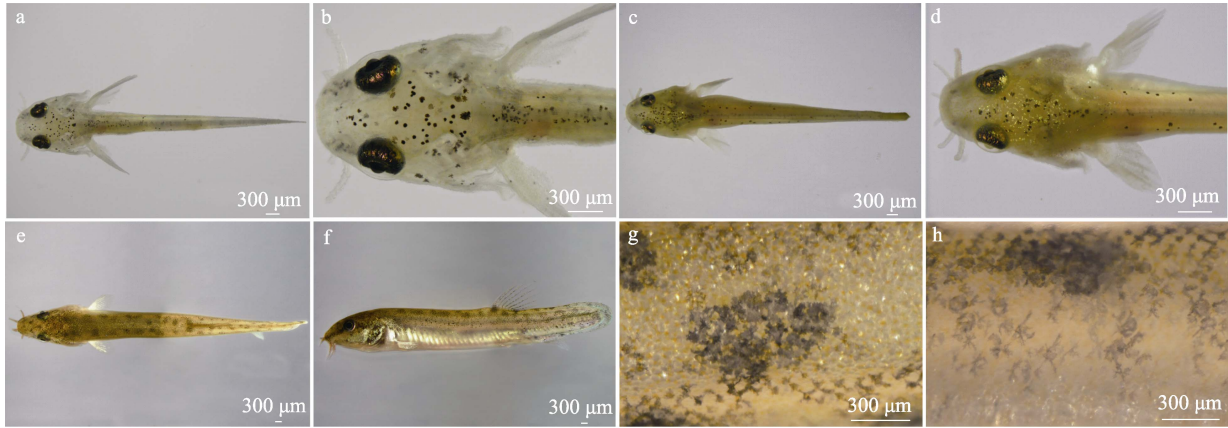


图 3 大花斑泥鳅体表黑色素细胞的早期发育

Fig.3 Early development of melanocytes on body surface of large-blackspot loach

a 和 b: 20 日龄泥鳅; c 和 d: 22 日龄泥鳅; e 和 f: 45 日龄泥鳅;

g: 60 日龄泥鳅侧面皮肤黑色素细胞; h: 60 日龄泥鳅背部皮肤黑色素细胞。

a and b: 20-day-old loach; c and d: 22-day-old loach; e and f: 45-day-old loach;

g: Melanocytes on side skin of 60-day-old loach; h: Melanocytes on the back skin of 60-day-old loach.

可见 60 日龄大花斑泥鳅体表黑色素细胞呈菊花状, 许多细长突起从细胞体延伸至外周(图 3g、h)。

孵化后 2~21 d, 小花斑泥鳅体表黑色素细胞均为幼体型黑色素细胞(图 4a、b)。从 22 日龄开始, 泥鳅体表皮肤可见成体型黑色素细胞, 此时, 大多数黑色素细胞呈点状(图 4c、d)。从 45 日龄开始, 泥鳅的形态已与成年泥鳅无异, 此时, 黑色素细胞呈点状, 相当数量的黑色素细胞聚集成小黑点, 形成肉眼可见的小花斑(图 4e、f)。继续跟踪观察, 可见一部分黑色素细胞从细胞体延伸出短粗的突起而呈树突状, 其余则保持点状(图 4g、h)。

在无花斑泥鳅孵化 2~21 d 内, 其体表黑色素细胞为幼体型黑色素细胞(图 5a、b)。从 22 日龄开始, 体表可见成体型黑色素细胞, 此时, 大多数黑色素细胞呈树突状(图 5c、d)。孵化后 47 d, 泥鳅体表的黑色素细胞均为深黑色的成体型黑色素细胞(图 5e、f)。60 日龄时, 可见黑色素细胞从胞体延伸出 3~6 个粗大的树突, 树突上再延伸出许多小树突, 此时的黑色素细胞均匀分布在泥鳅背部(图 5g、h)。

2.3 *mitfa* 基因序列特征

mitfa 基因 cDNA 序列全长为 1 482 bp, 包含一个

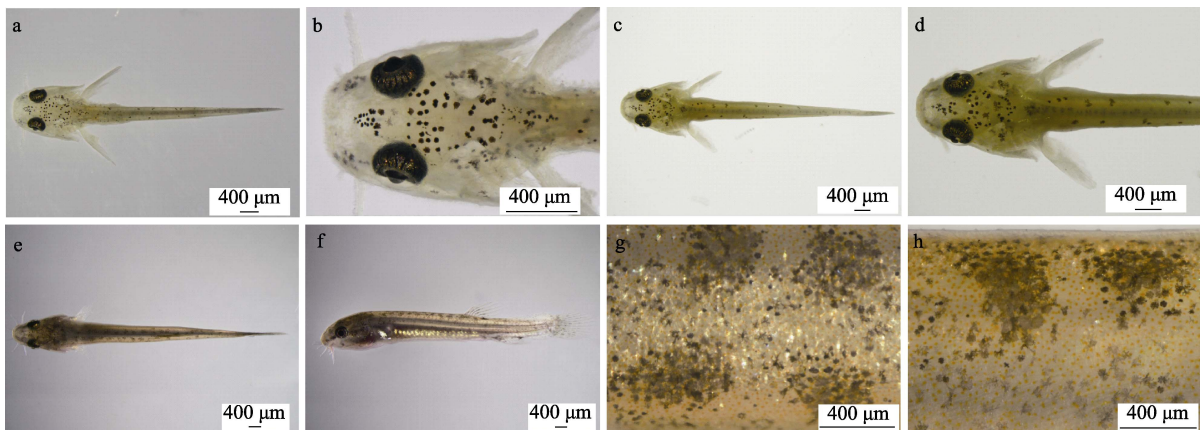


图 4 小花斑泥鳅体表黑色素细胞的早期发育

Fig.4 Early development of melanocytes on body surface of small-blackspot loach

a 和 b: 7 日龄泥鳅; c 和 d: 22 日龄泥鳅; e 和 f: 45 日龄泥鳅;

g: 60 日龄泥鳅侧面皮肤黑色素细胞; h: 60 日龄泥鳅背部皮肤黑色素细胞。

a and b: 7-day-old loach; c and d: 22-day-old loach; e and f: 45-day-old loach;

g: Melanocytes on side skin of 60-day-old loach; h: Melanocytes on the back skin of 60-day-old loach.

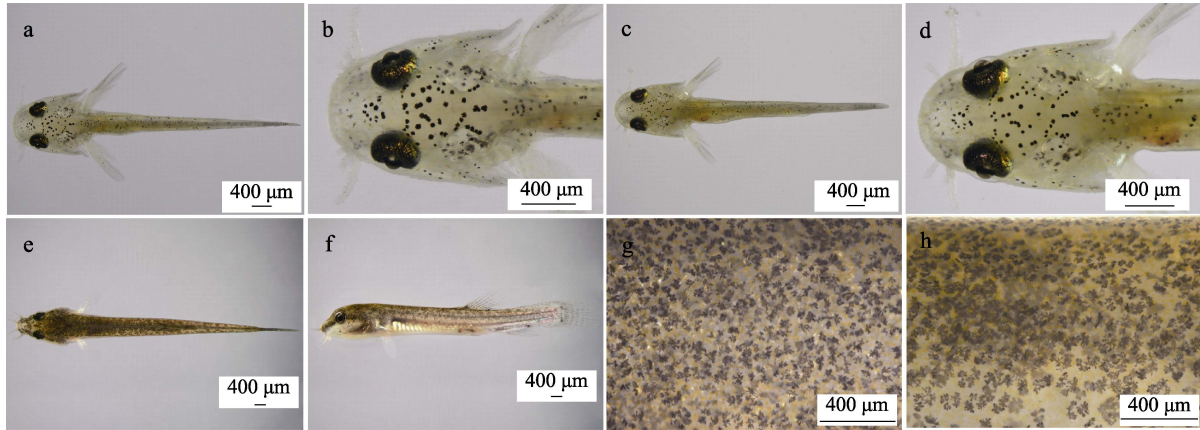


图5 无花斑泥鳅体表黑色素细胞的早期发育

Fig.5 Early development of melanocytes on body surface of non-blackspot loach

a 和 b: 7 日龄泥鳅; c 和 d: 22 日龄泥鳅; e 和 f: 45 日龄泥鳅;

g: 60 日龄泥鳅侧面皮肤黑色素细胞; h: 60 日龄泥鳅背部皮肤黑色素细胞。

a and b: 7-day-old loach; c and d: 22-day-old loach; e and f: 45-day-old loach;

g: Melanocytes on side skin of 60-day-old loach; h: Melanocytes on the back skin of 60-day-old loach.

长度为 1 227 bp 的开放阅读框。推导的蛋白质序列含 408 个氨基酸, 相对分子质量为 45.68 kDa, 预测等电点为 7.16, 为非跨膜蛋白。预测的 MITF_TFEB_C3_N、bHLH-Zip 和 DUF 3371 结构域分别位于 118~396、727~1 038 和 1 018~1 194 位点(图 6)。序列相似性分析显示, *mitfa* 与大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和斑马鱼的同源性较高(58.8%~83.2%), 与真海鞘(*Halocynthia roretzi*) (34.8%) 的同源性较低。MITFa 的三级结构预测结果显示, 其含有 MITF_TFEB_C3_N 和 bHLH-Zip 结构域, 其中, bHLH-Zip 结构域包含下游 DNA 结合位点和亮氨酸拉链。

2.4 不同胚胎发育阶段泥鳅胚胎 *mitfa* 的转录水平

qRT-PCR 结果显示, *mitfa* 基因在泥鳅胚胎发育的各个阶段均有表达。在大花斑泥鳅胚胎中, *mitfa* 的表达水平在受精卵期最高($P < 0.01$), 其次是多细胞期和原肠胚期($P > 0.05$), 并在原肠胚期之后趋于稳定($P > 0.05$)(图 7a); 在小花斑泥鳅胚胎中, *mitfa* 的表达水平在受精卵阶段最高($P < 0.01$), 其次是多细胞和囊胚阶段, 之后, *mitfa* 表达水平在原肠胚期极显著降低($P < 0.01$), 且与后续几个发育阶段泥鳅胚胎 *mitfa* 的表达水平无显著差异($P > 0.05$)(图 7b); 在无花斑泥鳅胚胎中, *mitfa* 的表达水平在受精卵阶段最高, 在多细胞期极显著降低($P < 0.01$), 并逐步降低至极低表达水平, 但多细胞期胚胎与后续胚胎发育各时期胚胎 *mitfa* 的表达水平差异并不显著($P > 0.05$)(图 7c)。

2.5 泥鳅不同组织中 *mitfa* 基因的表达模式

qRT-PCR 结果显示, 在 3 种泥鳅所有受检组织中都能检测到 *mitfa* mRNA 的表达, 且在肌肉和背部皮肤中表达水平最高($P < 0.01$)(图 8)。在大花斑泥鳅中, *mitfa* 在肠中的表达水平比在腹部皮肤和肝脏中高($P < 0.05$), 在脑和心脏中的表达水平无显著差异($P > 0.05$)(图 8a); 在小花斑泥鳅中, 肌肉组织中 *mitfa* 的表达水平极显著高于背部皮肤($P < 0.01$), 且二者极显著高于其他组织($P < 0.01$), 除此之外, *mitfa* 在其他组织中的表达水平均无显著差异($P > 0.05$)(图 8b); 在无花斑泥鳅中, *mitfa* 在背皮中的表达水平极显著高于肌肉($P < 0.01$), 在尾鳍、腹皮、脑和内脏器官中的表达水平较低(图 8c)。

3 讨论

3.1 泥鳅仔、稚鱼色素细胞发育时序和类型

在泥鳅色素细胞的发育时序中, 黑色素细胞最先出现, 其次是黄色素细胞和虹彩细胞, 这与大部分硬骨鱼类如大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)(朱杰等, 2002)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)(于道德等, 2012)中的出现时序一致。在翘嘴鳊(*Siniperca chautsi*)(刘伟等, 2019)和圆斑星鲃(*Verasper variegatus*)(严俊丽等, 2017)的胚胎发育阶段观察到黑色素细胞, 而橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*)(韦敏侠等, 2015)和七彩神仙鱼(*Symphysodon* spp.)(刘晓东等, 2008)则在胚后阶段才出现黑色素细胞。泥鳅体表黑色素细胞的形

```

1   ATTACGCACCCAGGCTTTCCTTTAGCTTCCGCTCGTTGGGGGAATTGTGAGCGGATACCAATTCGCC
74  CCAGAAACAGCTATATGGGGACAGCGTGTACCCTGATTCAGACAGTTTCTACGAGCTGAAGAGTCAG
1   M G D S V F T A D S D S F Y E L K S Q
146 CCTATTACCTCAAGTGGCTCTTTGACCTTGCTGACTCCGTGACCCCGTGATGACGTCACGCGTGTGATG
20  P I T S S G S L T S A D S V T P V M T S R V L M
218 AGGCAGGAGCTGATGCGTCAGCAGGCTCAGACCAGGAGCGGGAGGCTCAAAAACAGCCTCCAGCATT
44  R Q E L M R Q Q A Q D Q E R R E A Q K Q A S S I
290 CAGCTGGTCTCGCCGACGCCACCCCTGCCATCTGTGTGCCCTCAACCTGCCTGCCACACCTGCCAGGTG
68  Q L R L A D A T P A I S V A S N L P A T P A Q V
362 CCCGTGAAGTGTGAAGTTCAGACCCATTAGAAAACCAACAAGTACCACATTGACGAGCTCAGAGA
92  P V E V L K V Q T H L E N P T K Y H I Q Q A Q R
434 CAGCAAGTGAAGCAGTACCTCTCTCACACCTGGGAAATAAATAGCCCTTCTCACCCCTCAACTGTGAGAAA
116 Q Q V K Q Y L S H T L G N K L A L L T L N C E K
506 GAGATGGACGATTAATCGAAGACATCATCAGTTGGAGCCAAGCTATAATGATGATATCTTGGATTATG
140 E M D D V I E D I I S L E P S Y N D D I L G F M
578 GATGCTGGACTTCAGATGACTAATACGATCCAGTTTTCGCGAACATATGGATATGTACAACAATCCCT
164 D A G L Q M T N T I P V S A N I L D M Y N N H P
650 CTCTCCAGCTGGGGTGGCATTAGCAACACCTGTCATCTAACCTACCAGCCGTGAAAAGGGAATTATCC
188 L P P A G V A I S N T C P S N L P A V K R E L S
722 GCTACCCGACCCCGCATGATGCACATAATGGAGAAGCCGGACCATGGCAATTTGACTCTTATCAA
212 A T P A P G M M H I M E K P G P C G N F D S Y Q
794 AGCCCGAAGGGTTCCAGTAGAAGCTGAGGTCAGAGCTTGGCAAAGGAGACAAAAGAAGGACAACCCAC
236 R P E G F P V E A E V R A L A K E R Q K K D N H
866 AACCTAATGAACGAAGACGGCGTTAATATAAACGACAGAATTAAGAGCTGGGAACATTAANTCCCAAG
260 N L I E R R R R F N I N D R I K E L G T L I P K
938 TCCAATGACCCAGACATGAGGTGGAATAAGGGGACCATCTCAAGCTTCGGTGGATTATATTAGGAGACTG
284 S N D P D M R W N K G T I L K A S V D Y I R R L
1010 CAGAAAAGCAACAGAAAAGCAAAAGAACTCGAGAACCAGAGAAGAGACTGGAGCAGCCACAGACATCTT
308 Q K E Q Q K A K E L E N R Q K R L E H A N R H L
1082 TTGCTTCGAATTCAGGAGCTTGAGATTCAAGCCGTGCTCACGGACTCGCTGTAGTGGCCTCTCCACGCTT
332 S H L P S P D M S R P T T L D L N N G T R G R L
1154 TATTCTCCGATCTGGTAGCTCGAGCGATCAAGCAGGAGCCAGCATGGGGACTGCTCCTCAGATCTCTAC
356 Y S S D L V A R A I K Q E P S M G D C S S D L Y
1226 TCTCACCTCCCAGCCCTGACATGTCGCCACCCACTCTAGACCTCAACAACGGCACCAGAGGAGGCTT
380 S H L P S P D M S R P T T L D L N N G T R G R L
1298 AGCCCGTGGACGGTGTGAGCCCGGTGACGCCCCCCCCCGCGGGCGCGGACTTCTCGAGTCCGGTGTG
404 S P W T V *
1370 TTGGGAAGCAGCCAAAGCGGGTGGTAAACTCCCTTTAAGGCTAAATACCGCCCGAGACCGATAGTCGACA
1442 AGTACCGTAAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 6 鄱阳湖泥鳅 *mitfa* 基因核酸序列和预测氨基酸序列
 Fig.6 The nucleotide and predicted amino aquences of *mitfa* in loach

M 为 MITF_TFEB_C_3_N 结构域; H 为 bHLH-Zip 结构域; D 为 DUF3371 结构域;
 *表示终止密码子; 灰色区域为结构域, 深灰色区域为 bHLH-Zip 结构域和 DUF3371 结构域的重叠区。
 M means MITF_TFEB_C_3_N domain, H means bHLH-Zip domain, D means DUF3371 domain. * shows stop codon.
 The grey region shows domains, dark grey shows overlapping region between bHLH-Zip and DUF3371 domain.

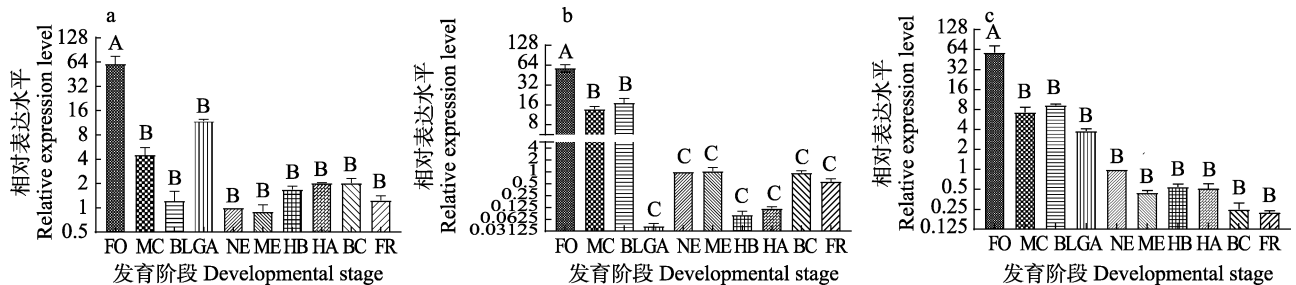


图 7 不同发育阶段 3 种花斑泥鳅 *mitfa* 基因的相对表达量
 Fig.7 The relative expression level of *mitfa* in different developmental stages of loach with three types of black spots

a: 大花斑泥鳅; b: 小花斑泥鳅; c: 无花斑泥鳅。
 FO: 受精卵期; MC: 多细胞期; BL: 囊胚期; GA: 原肠胚期; NE: 神经胚期; ME: 肌肉效应期; HB: 心跳期; HA: 孵化期; BC: 血液循环期; FR: 鱼苗期。不同大写字母表示存在极显著差异($P<0.01$), 下同。
 a: Large-blackspot loach; b: Small-blackspot loach; c: Non-blackspot loach.
 FO: Fertilized ovum stage; MC: Multicellular stage; BL: Blastula stage; GA: Gastrula stage; NE: Neurula stage; ME: Muscle effect stage; HB: Heartbeat stage; HA: Hatching stage; BC: Blood circulation stage; FR: Fry stage.
 Different capital letters indicate highly significant differences ($P<0.01$). The same below.

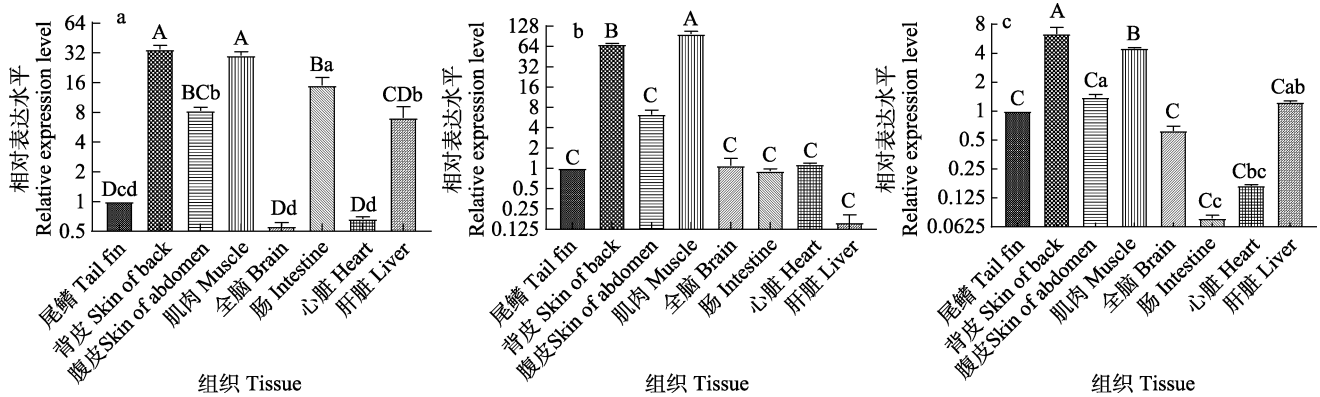


图8 3种花斑泥鳅不同组织中 *mitfa* 基因的相对表达量

Fig.8 The relative expression levels of *mitfa* in different tissues of loach with three types of black spots

a: 大花斑泥鳅; b: 小花斑泥鳅; c: 无花斑泥鳅。条形柱上方不同小写字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

a: Large-blackspot loach; b: Small-blackspot loach; c: Non-blackspot loach.

Different lowercase letters above the bar indicate significant differences ($P < 0.05$).

态与橘色双冠丽鱼和七彩神仙鱼相似。可见，黑色素细胞的发育时间在硬骨鱼中并不完全一致。

在斑马鱼的胚胎期、仔鱼期和稚鱼期，黑色素细胞均为来源于神经嵴细胞的仔鱼型黑色素细胞。在变态期，成体型色素细胞开始出现并逐渐覆盖鱼体 (Patterson *et al*, 2019)。在成鱼阶段，黑色素细胞均为成体型黑色素细胞，由神经嵴细胞发育、分化形成 (Budi *et al*, 2008)。大菱鲂仔鱼早期发育阶段体表的黑色素细胞为幼体型黑色素细胞，在黑鲷和橘色双冠丽鱼幼鱼阶段，幼体型黑色素细胞发育成为成体型黑色素细胞 (朱杰等, 2002; 于道德等, 2012; 韦敏侠等, 2015)。泥鳅黑色素细胞的发育特征与大菱鲂和橘色双冠丽鱼相似。大花斑泥鳅皮肤黑色素细胞的胞体比小花斑和无花斑泥鳅的大; 在小花斑和无花斑泥鳅的皮肤中，黑色素细胞的胞体致密，呈树突状 (Sheng *et al*, 2022)。因此，小花斑泥鳅黑色素细胞的发育和形态可能与大花斑泥鳅不同，但与无花斑泥鳅相似。总的来说，黑色素细胞在许多硬骨鱼中发育较早，它们分为幼体型黑色素细胞和成体型黑色素细胞，具有不同的形态变化。

3.2 泥鳅色素图案的形成

作为最显著的外部形态特征之一，色素沉着图案在动物的生存和交流中起着重要的作用。据报道，胸斧鱼 (*Gasteropelecus sternicla*) 的体表布满黑色斑块和纵向条纹，睛斑鲃 (*Bothus ocellatus*) 的体表也布满大小不一的斑块 (Ramachandran *et al*, 1996); 翘嘴鲃体表有条状或斑状花纹 (刘伟等, 2019); 泥鳅体表亦有许多大小不一的黑色斑点。所有这些色素图案有助于

鱼的隐蔽，利于其捕食和躲避捕食者。

据报道，50日龄的幼体圆斑星鲃体表会形成黑斑 (严俊丽等, 2017)。在斑马鱼的早期发育阶段，3种色素细胞 (黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞) 经特定分布形成其特征性的水平条纹色素图案，这些色素细胞在斑马鱼身体明暗条纹的皮下区域呈现复杂有序的排列，仅单个基因突变就可以显著改变斑马鱼的条纹图案 (Parichy, 2006; Ceinos *et al*, 2015)。本研究发现，黑色斑点在45日龄的泥鳅幼鱼体表形成。进一步观察发现，大花斑泥鳅、小花斑泥鳅和无花斑泥鳅的黑色斑点的形状有所不同。大花斑泥鳅的体表黑色素细胞主要为菊花状，通过细胞聚集形成大黑斑; 小花斑泥鳅的体表黑色素细胞聚集形成小黑斑，单个黑色素细胞呈点状和树突状; 无花斑泥鳅的体表黑色素细胞分布均匀，其形状主要为点状和树突状。由于色素图案的形成涉及不同类型色素细胞的发育、迁移、聚集和相互作用等一系列过程，因此，泥鳅色素图案形成的细胞和分子机制有待进一步研究。

3.3 *mitfa* 基因序列及其在不同发育时期胚胎和成体组织中的表达

在脊索到哺乳动物中都发现 *mitf* 基因，*mitf* 基因的长度和某些碱基在不同物种间存在差异。MITF 蛋白在不同物种间均含有 MITF_TFEB_C_3_N、bHLH-Zip、DUF3371 结构域和非跨膜区 (吴深基等, 2021)。MITFa 蛋白与其他物种 MITF 蛋白具有许多保守的结构特征，且相对于无脊椎动物，MITFa 蛋白显示出与脊椎动物更一致的氨基酸序列 (未附氨基酸序列对比图)。作为一种转录因子，MITF 可以通过 bHLH-zip

结构与一系列具有 E-box 序列的基因结合发挥作用, 包括维持黑色素细胞发育分化相关的基因和控制细胞周期相关的基因, 进而启动相关的信号通路(Li *et al.*, 2013; Makimura *et al.*, 1993)。对这些保守结构和序列的鉴定表明, MITFa 蛋白在其进化过程中具有基本的生化功能, 如参与色素沉着。

在青鳉的神经胚阶段, *mitf* 基因的表达在黑色素细胞分化之前就被检测到(Béjar *et al.*, 2003)。*mitfa* mRNA 在泥鳅胚胎发育的各阶段均有表达, 且在受精卵期表达量最高。*mitfa* 在没有黑色素细胞形成的胚胎发育早期表达, 原因可能是 *mitfa* 基因不仅参与黑色素细胞的发育和分化, 而且在与体色形成相关的非黑色素细胞的分化中发挥重要作用(Johnson *et al.*, 2011)。对比来看, *mitfa* 在小花斑泥鳅胚胎发育阶段的表达水平与大花斑泥鳅略有不同, 但与无花斑泥鳅相似。

mitf 基因与多种细胞功能有关, 除了调节黑色素细胞的分化、成熟以及黑色素细胞中黑色素的合成外, *mitf* 基因还可以调节肥大细胞的发育和功能以及骨修复过程中成骨细胞的功能(Jippo *et al.*, 2003; Mansky *et al.*, 2002)。在皮肤中, *mitf* mRNA 的表达水平与体色表型相关(Wu *et al.*, 2020)。在本研究中, *mitfa* 基因在泥鳅的所有受检组织中均有表达, 背部皮肤 *mitfa* mRNA 表达水平显著高于腹部皮肤。另外, 泥鳅背部皮肤包含了躯体最大数量的黑色素细胞(Sheng *et al.*, 2022), 皮肤颜色的深浅与 *mitfa* mRNA 的表达水平呈正相关。这些积累的数据暗示了 *mitfa* 在泥鳅皮肤色素沉着中具有潜在的潜在作用。

参 考 文 献

- AHI E P, SEFC K M. Anterior-posterior gene expression differences in three Lake Malawi cichlid fishes with variation in body stripe orientation. *PeerJ*, 2017, 5: e4080
- BAGNARA J T, MATSUMOTO J. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, Blackwell Publishing, 2006, 11–59
- BÉJAR J, HONG Y, SCHARTL M. Mitf expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes. *Development*, 2003, 130(26): 6545–6553
- BUDI E H, PATTERSON L B, PARICHY D M. Embryonic requirements for ErbB signaling in neural crest development and adult pigment pattern formation. *Development*, 2008, 135(15): 2603–2614
- BURTON D, BURTON M. Essential fish biology: Diversity, structure, and function. Oxford University Press, 2017
- BURTON D. The physiology of flatfish chromatophores. *Microscopy Research and Technique*, 2002, 58(6): 481–487
- CEINOS R M, GUILLOT R, KELSH R N, *et al.* Pigment patterns in adult fish result from superimposition of two largely independent pigmentation mechanisms. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 2015, 28(2): 196–209
- FU J J, ZHU W B, LUO W T, *et al.* Comparison of growth, tyrosinase activity, melanin content, and gene expression between common carps with different pigmentations. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 939–947 [傅建军, 朱文彬, 罗文韬, 等. 不同体色鲤的生长、酪氨酸酶活性、黑色素含量及基因表达比较. *中国水产科学*, 2021, 28(8): 939–947]
- FUJII R. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(5): 300–319
- HENDRICK L A, CARTER G A, HILBRANDS E H, *et al.* Bar, stripe and spot development in sand-dwelling cichlids from Lake Malawi. *Evodevo*, 2019, 10(1): 1–18
- HIRATA M, NAKAMURA K I, KONDO S. Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. *Developmental Dynamics*, 2005, 234(2): 293–300
- HIRATA M, NAKAMURA K, KANEMARU T, *et al.* Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish. *Developmental Dynamics*, 2003, 227(4): 497–503
- HODGKINSON C A, MOORE K J, NAKAYAMA A, *et al.* Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 1993, 74(2): 395–404
- HOU L, PAVAN W J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: Do all roads lead to Mitf? *Cell Research*, 2008, 18(12): 1163–1176
- HUBBARD J K, UY J A C, HAUBER M E, *et al.* Vertebrate pigmentation: From underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics*, 2010, 26(5): 231–239
- IRION U, NÜSSLEIN-VOLHARD C. The identification of genes involved in the evolution of color patterns in fish. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2019, 57: 31–38
- JIPPO T, MORII E, ITO A, *et al.* Effect of anatomical distribution of mast cells on their defense function against bacterial infections: Demonstration using partially mast cell-deficient tg/tg mice. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 197(11): 1417–1425
- JOHNSON S L, NGUYEN A T N, LISTER J A. *mitfa* is required at multiple stages of melanocyte differentiation but not to establish the melanocyte stem cell. *Developmental Biology*, 2011, 350(2): 405–413
- KELSH R N, BRAND M, JIANG Y J, *et al.* Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development*, 1996, 123(1): 369–389
- KELSH R N. Genetics and evolution of pigment patterns in fish.

- Pigment Cell Research, 2004, 17(4): 326–336
- KRATOCHWIL C F, LIANG Y, GERWIN J, *et al.* Agouti-related peptide 2 facilitates convergent evolution of stripe patterns across cichlid fish radiations. *Science*, 2018, 362(6413): 457–460
- KRATOCHWIL C F, URBAN S, MEYER A. Genome of the Malawi golden cichlid fish (*Melanochromis auratus*) reveals exon loss of *oca2* in an amelanistic morph. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 2019, 32(5): 719–723
- LI M, ZHU F, HONG Y. Differential evolution of duplicated medakafish *mitf* genes. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, 9(5): 496–508
- LISTER J A, CLOSE J, RAIBLE D W. Duplicate *mitf* genes in zebrafish: Complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Developmental Biology*, 2001, 237(2): 333–344
- LISTER J A, ROBERTSON C P, LEPAGE T, *et al.* Nacre encodes a zebrafish micropthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development*, 1999, 126(17): 3757–3767
- LIU W Y, LI Y, CAI Y Q, *et al.* Research progress of the regulators involved in MITF-related signaling pathways in melanocytes. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 49(8): 125–128 [刘文艳, 李园, 蔡永强, 等. 黑色素细胞中 MITF 相关信号通路调控因子的研究进展. *畜牧与兽医*, 2017, 49(8): 125–128]
- LIU W, ZHAO J L, WEI L, *et al.* The early pigmentation and color pattern formation of mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Chinese Journal of Zoology*, 2019, 54(2): 236–244 [刘伟, 赵金良, 魏磊, 等. 鳊早期色素发育和色彩图案的形成. *动物学杂志*, 2019, 54(2): 236–244]
- LIU X D, CHEN Z Z. Study on the chromatophores and the carotenoid components in the skin of discus fish (*Symphysodon* spp.). *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(3): 339–343 [刘晓东, 陈再忠. 七彩神仙鱼皮肤色素细胞观察及类胡萝卜素组分分析. *上海水产大学学报*, 2008, 17(3): 339–343]
- MA X K, LIU X Z, WEN H S, *et al.* Changes of melanophores in the larval skin of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 62–68 [马学坤, 柳学周, 温海深, 等. 半滑舌鲷早期发育过程中体表色素变化的研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 62–68]
- MAAN M E, SEFC K M. Colour variation in cichlid fish: Developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press, 2013, 24(6/7): 516–528
- MAKIMURA M, HIRASAWA M, KOBAYASHI K, *et al.* Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *Journal of Periodontology*, 1993, 64(7): 630–636
- MANSKY K C, SULZBACHER S, PURDOM G, *et al.* The micropthalmia transcription factor and the related helix-loop-helix zipper factors TFE-3 and TFE-C collaborate to activate the tartrate-resistant acid phosphatase promoter. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002, 71(2): 304–310
- MEYER A, BIERMANN C H, ORTI G. The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 1993, 252(1335): 231–236
- MEYER A, RITCHIE P A, WITTE K E. Predicting developmental processes from evolutionary patterns: A molecular phylogeny of the zebrafish (*Danio rerio*) and its relatives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 1995, 349(1327): 103–111
- NAGAO Y, SUZUKI T, SHIMIZU A, *et al.* Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development. *PLoS Genetics*, 2014, 10(4): e1004246
- PARICHY D M. Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity*, 2006, 97(3): 200–210
- PATTERSON L B, PARICHY D M. Zebrafish pigment pattern formation: insights into the development and evolution of adult form. *Annual Review of Genetics*, 2019, 53: 505–530
- PHANG V P E, LIM T M, KHOO G. Ultrastructure of erythrophores and xanthophores of the siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2012, 64: 20620
- RAMACHANDRAN V S, TYLER C W, GREGORY R L, *et al.* Rapid adaptive camouflage in tropical flounders. *Nature*, 1996, 379(6568): 815–818
- REISS P, ABLE K W, NUNES M S, *et al.* Color pattern variation in *Cichla temensis* (Perciformes: Cichlidae): Resolution based on morphological, molecular, and reproductive data. *Neotropical Ichthyology*, 2012, 10: 59–70
- ROBERTS R B, SER J R, KOCHER T D. Sexual conflict resolved by invasion of a novel sex determiner in Lake Malawi cichlid fishes. *Science*, 2009, 326(5955): 998–1001
- RODRIGUEZ F H, CACERES G, LHOREN J P, *et al.* Genetics variation in skin pigmentation patterns and growth in rainbow trout. *Animal*, 2019, 13(4): 675–682
- SANTOS M E, BALDO L, GU L, *et al.* Comparative transcriptomics of anal fin pigmentation patterns in cichlid fishes. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 1–16
- SAZIMA I, CARVALHO L N, MENDONÇA F P, *et al.* Fallen leaves on the water-bed: diurnal camouflage of three night active fish species in an Amazonian streamlet. *Neotropical Ichthyology*, 2006, 4: 119–122
- SHENG J, GUAN L, SHENG B, *et al.* Analysis of pigment cell composition, pigment content, tyrosinase content and activity of three kinds of loaches *Misgurnus anguillicaudatus* from Poyang Lake. *Journal of Fish Biology*, 2022, 100(2): 366–377
- SUGIMOTO M. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology.

- Microscopy Research and Technique, 2002, 58(6): 496–503
- WANG J, PEI X, LIU H, *et al.* Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 544–550
- WEI M X, SONG H M, QI B L, *et al.* Pigment cells development and body color variation of postembryonic development in *Amphilophus citrinellus* (Günther 1864). Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(1): 28–35 [韦敏侠, 宋红梅, 祁宝伦, 等. 橘色双冠丽鱼胚后色素细胞发育与体色变化. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 28–35]
- WU M, CHEN X, CUI K, *et al.* Pigmentation formation and expression analysis of tyrosinase in *Siniperca chuatsi*. Fish Physiology and Biochemistry, 2020, 46(4): 1279–1293
- WU S J, HUANG J Q, LI Y J, *et al.* Cloning and expression analysis of body colour-related gene *mitfa* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(4): 753–763 [吴深基, 黄进强, 李永娟, 等. 虹鳟体色相关基因 *mitfa* 的克隆和表达分析. 农业生物技术学报, 2021, 29(4): 753–763]
- YAN J L, CHEN S Q, CHANG Q, *et al.* Early ontogeny of chromatophores and skin color changes of spotted halibut (*Verasper variegatus*). Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 678–686 [严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 圆斑星鲈仔稚鱼色素细胞发育和体色变化. 水产学报, 2017, 41(5): 678–686]
- YI S, WANG W, ZHOU X. Genomic evidence for the population genetic differentiation of *Misgurnus anguillicaudatus* in the Yangtze River basin of China. Genomics, 2019, 111(3): 367–374
- YU D D, LIU H J, GUAN J, *et al.* Early ontogeny of chromatophores and body color changes of *Acanthopagrus schlegelii*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(5): 1–7 [于道德, 刘洪军, 关键, 等. 黑棘鲷早期色素细胞发育与体色变化. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 1–7]
- ZHU J, ZHANG X M, GAO T X, *et al.* The metamorphosis of turbot *Scophthamus maximus* and morphological observation on melanophores in larval skin. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(3): 193–200 [朱杰, 张秀梅, 高天翔, 等. 大菱鲆早期变态发育和体表黑色素细胞形态学观察. 水产学报, 2002, 26(3): 193–200]

(编辑 冯小花)

Observation of Black Spot Formation and *mitfa* Expression Analysis of *Misgurnus anguillicaudatus* from Poyang Lake

LI Zhixiong^{1,2}, SHENG Junqing^{1,2①}, SHENG Bin^{1,2},
WANG Xinchun¹, ZHAO Yafei¹, DING Jiali¹, YI Xiaobing³

(1. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Resources and Utilization of Jiangxi, Nanchang 330031, China; 3. Jiangxi Jiacheng Loach Breeding Base, Yichun 330800, China)

Abstract Color pattern plays a vital role in animal survival and communication. The type, distribution, and pigment state of pigment cells, and the reflective ability of iridophores determines body color. It varies adaptively in response to external environmental changes and physiological states. The skin pigmentation pattern reflects the number and arrangement of chromatophores. Some fish with rich color patterns, including egg spot patterns, blotch patterns, melanism, horizontal stripe patterns, and vertical bar patterns, have been studied increasingly. This study observed the formation, distribution, and main pattern of chromatophores in 1–60-day-old *Misgurnus anguillicaudatus* after hatching. Larval melanocytes were first observed in the yolk sac of loach larvae at 3 h post-hatching. From the larval to juvenile stage at 21 days, larval melanocytes appeared on the loach body surface. From the juvenile stage at 22 days to the adult stage, adult melanocytes appeared on the loach body surface. Iridocytes were first observed in the eyes of one-day-old larvae but not on the body surface until they were 12 days old. Xanthophores appeared on the body surface of seven-day-old juveniles. At 2–21 days post-hatching, the melanocytes in the loaches were larval, and their shape changed from star- to snowflake-shaped before forming a black spot. From 22 days, different morphological adult melanocytes formed on the body surface of the loaches with three types of black spots. Chrysanthemum-shaped melanocytes regularly

aggregated into large black spots on large black spot loaches. Round and dendritic melanocytes gathered to form small black spots on small black spot loaches. Dendritic melanocytes were evenly distributed on non-black spot loaches. The pigmentation-related *mitfa* gene was obtained from *M. anguillicaudatus* using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach with the SMARTer RACE 5'/3' Kit User Manual according to the manufacturer's recommendations and was analyzed using bioinformatics and quantitative methods. The results showed that the *mitfa* gene encoded a protein with 408 amino acids with a calculated molecular mass of 45.68 kDa and an estimated isoelectric point of 7.16. MITFa contained MITF_TFEB_C_3_N, bHLH-Zip, and DUF 3371 domains. MITFa was well-conserved compared to MITF of various species with a higher degree of sequence similarity with other fishes (58.8%–83.2%). The qRT-PCR results showed that the *mitfa* mRNA was expressed at all stages of embryonic development and reached a peak value at the fertilization stage. *mitfa* expression was detected in all examined tissues of the three types of loaches, and the highest level of expression was detected in both muscle and dorsal skin ($P < 0.01$). This study explored pigmentation formation and *mitfa* expression, serving as a foundation for gaining further insight into the genetic mechanism of body color formation in *M. anguillicaudatus*.

Key words Poyang Lake; *Misgurnus anguillicaudatus*; Pigmentation formation; *mitfa*; Expression analysis

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230210002

http://www.yykxjz.cn/

陈璐, 杨臻, 徐锦华, 乔璐, 宋金龙, 孙慧武, 穆迎春. 基于转录组学探究除虫脲暴露对鲤肝脏基因表达的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 129-139

CHEN L, YANG Z, XU J H, QIAO L, SONG J L, SUN H W, MU Y C. Effect of diflubenzuron exposure on gene expression in *Cyprinus carpio* liver based on transcriptomics. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 129-139

基于转录组学探究除虫脲暴露 对鲤肝脏基因表达的影响*



陈璐^{1,2} 杨臻² 徐锦华² 乔璐² 宋金龙² 孙慧武² 穆迎春^{2①}

(1. 渤海大学食品科学与工程学院 辽宁 锦州 121000;

2. 中国水产科学研究院 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室 北京 100141)

摘要 除虫脲(diflubenzuron, DFB)是一种常用的杀虫剂,其代谢物残留会威胁水生动物及人体健康。为探究水产动物响应DFB胁迫的分子机制,本研究以鲤(*Cyprinus carpio*)为对象,选定0.1 mg/L和1.0 mg/L的药浴浓度对鲤进行15 d暴露实验。采用RNA-Seq技术对肝脏开展转录组测序,以 $P_{adj} < 0.05$ 和 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ 为标准筛选差异表达基因(DEGs)进行GO功能注释和KEGG富集分析等生物信息学分析。结果显示,0.1 mg/L暴露浓度下有2406个DEGs发生显著变化,1.0 mg/L暴露浓度下有2688个DEGs发生显著变化,2组共表达的DEGs有821个。GO分析结果显示,DFB暴露组DEGs富集在生物过程、细胞组成和分子功能上。KEGG富集分析显示,低浓度DFB暴露组DEGs显著富集到异生物质的生物降解和代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、信号分子与相互作用、内分泌系统、免疫系统等代谢通路;高浓度DFB暴露组DEGs除了富集到上述代谢通路外,还显著富集到折叠、分类和降解、运输和分解代谢等代谢通路。结果表明,DFB暴露对鲤造成异生物质的生物降解和代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢紊乱,并产生内质网应激、炎症反应和免疫毒性。本研究从转录层面上解析了DFB暴露对鲤毒性作用的分子机制,为DFB在水产领域的限量标准制定和环境安全评价提供基础数据。

关键词 鲤; 除虫脲; 肝脏; 转录组学; 毒理

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0129-11

鱼虱病是水产养殖中常见的寄生虫病,会导致鱼体生长速率降低、死亡率提高,且鱼肉品质严重降低,对水产养殖业造成巨大经济损失。除虫脲(diflubenzuron, DFB)作为一种病虫害防控的新型药剂,其杀虫机理主要是通过抑制体内几丁质的生物合

成(乔璐等, 2022),进而阻碍害虫蜕皮、变态发育及直接杀卵等方面来控制其生长发育和繁殖。因其具有杀虫谱广、选择性强、生物活性高等特点,在水产动物(刘亿婕, 2021)、畜禽动物(徐玉珍等, 2022)、农作物(辛天蓉等, 2019)等病虫害防治领域广泛应用。

* 国家农产品质量安全风险评估专项项目(GJFP20210401)和虾蟹及淡水鱼质量安全风险评估与防控创新团队项目(2020TD75)共同资助。陈璐, E-mail: 947239621@qq.com

① 通信作者: 穆迎春, E-mail: muyc@cafs.ac.cn

收稿日期: 2023-02-10, 收修改稿日期: 2023-02-23

近年来,已有学者在农田灌溉水、河水、湖水以及海域表层沉积物等环境基质中监测到DFB的存在(贾叶青等,2019;Placencia *et al.*,2018),并发现其在水中降解半衰期长达80~96 d。残存的DFB及其代谢产物不仅会对自然环境造成污染,同时很容易在水产动物体内残留积累,并伴随着食物链进入人体,可能会影响人体器官的基本功能,损伤遗传基因,具有潜在致畸、致癌、致突变性(胡存中,2019)。Parsons等(2021)研究发现,DFB会在海洋沉积物上积累,并对底栖海洋生物群落结构与物种多样性造成影响。DFB对淡水鱼的急性毒性研究发现,除虫脒对鱼类的半致死浓度(LC₅₀)为10~12 mg/L,而且除虫脒会对鱼体造成组织损伤,并以剂量依赖的方式造成鱼类死亡(Abe *et al.*,2019)。目前,国内外有关DFB杀虫剂的研究仅限于用法用量、残留代谢情况及其对环境的毒理影响,有关DFB对鱼类暴露分子毒性响应机制尚鲜有报道。

随着科技的发展,转录组学技术逐渐成为研究水生生物毒理学机制的重要手段,通过获取水生生物响应环境因子相关转录组学信息,进而从分子层面阐释其对水生生物的作用机制(Zhang *et al.*,2017;罗辉等,2015)。Xu等(2022)利用转录组学技术揭示了水环境中四环素暴露对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鳃的毒理机制。Zheng等(2021)利用转录组学揭示了2,2',4,4'-四溴二苯醚暴露对斑马鱼(*Danio rerio*)早期神经发育毒性的影响。孙晶等(2022)采用转录组学技术解析了环境中氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露对成年斑马鱼脑组织的分子毒理效应。

鲤(*Cyprinus carpio*)是我国重要的淡水鱼养殖品种,广泛分布于江河、湖泊、池沼等水体底层,是探究DFB对鱼类毒理作用的理想模型。肝脏作为机体参与糖代谢、脂质代谢、蛋白质代谢以及能量代谢的代谢中枢(Kietzmann *et al.*,2019),能够率先感知外界环境的有害刺激并迅速做出机体响应,是研究DFB分子毒害机制的理想靶器官。

本研究采用RNA-Seq转录组测序技术对不同DFB暴露浓度下鲤肝脏的基因表达差异进行分析,探讨其对水生动物在基因层面的毒理作用,揭示环境相关浓度DFB暴露对鱼类的毒理分子响应机制,以期为其在水产领域的限量标准制定和环境安全评价提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验样品及处理

1.1.1 实验鱼 从天津某养殖场选择个体质量为

(150±20) g/尾的福瑞鲤,运输至中国水产科学研究院房山五渡实验基地实验室,用2%食盐水消毒10 min,然后投放于用高锰酸钾消毒过的水族缸(直径200 cm,高45 cm)中暂养2周。暂养期间每日08:00~09:00和16:00~17:00各投喂1次饲料,日投喂总量为鱼体总重量的1.5%,每天换水1次(20%体积)。

1.1.2 暴露实验 暂养结束后,选择规格整齐、活跃、无明显外伤的个体进行实验,实验前停饲24 h。文献报道除虫脒对罗非鱼的LC₅₀为10~12 mg/L,药浴实验时,根据GB/T 31270.7-2014《化学农药环境安全评价试验准则第7部分:生物富集试验》,设置2个除虫脒浓度组:高浓度药浴浓度为1.00 mg/L,该浓度低于半致死浓度10倍,为可生存较高浓度;低浓度药浴浓度为0.10 mg/L,低于半致死浓度100倍。将实验设置为低浓度组、高浓度组和对照组,每组3个重复,每个重复20条。养殖实验用水为存放并曝气去氯处理24 h以上的自来水。采用连续充氧,保持水中溶氧>8.0 mg/L,水温为(20.0±1.0) °C, pH为7.2±0.2,总硬度为(28.00±0.05) mg/L,盐度为0.60±0.02,白天和黑夜的光照时间保持在12/12 h。采用半静态换水补药的方式,于0.10 mg/L和1.00 mg/L DFB暴露浓度下养殖15 d。

1.1.3 样品采集 于第15天采样,采样前24 h停止喂食。3组各取6条鲤(每个平行组随机取2条鲤)用MS-222麻醉后将其放置在医用垫上,并用冰袋保持鱼处于低温状态下,快速分离其肝脏,放置于无酶管中,随后置于低温冰盒中,用于后续转录分析使用。

1.2 总RNA提取、文库构建及测序

分别取低浓度组、高浓度组和对照组鲤的肝脏组织(每个平行组中2条鲤的肝脏组织混合),采用TRIzol液(Ambion/Invitrogen,美国)提取鱼肝脏的总RNA,通过Oligo(dT)富集mRNA,随后在fragmentation buffer中用二价阳离子片段化RNA,接着反转合成DNA连接adaptor。使用NanoDrop 2000分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分别对RNA纯度和质量进行检验。使用Agilent 2100生物分析仪和Qubit 2.0荧光计分别对RNA进行完整性和定量检测。对检测合格的RNA样品构建文库,文库构建所用试剂盒为NEBNext® Ultra™ RNA library prep kit for Illumina®。转录组文库建成后,用qRT-PCR对文库有效浓度进行准确定量(文库有效浓度高于2 nmol/L),并用Agilent 2100和Qubit 2.0分别检测文库的插入片段和定量分析。库检合格后,采用Illumina NovaSeq 6000(Illumina,美国)进行高通量测序。

1.3 数据质控统计

去除原始序列数据(raw reads)中带接头(adapter)的 reads、含 N (N 表示无法确定碱基信息)的 reads 和低质量 reads ($Q_{\text{phred}} \leq 20$ 的碱基数占全部 read 长度的 50% 以上的 reads)。利用 HISAT2 软件将 clean reads 与参考基因组进行快速精确的比对, 获取 reads 在参考基因组上的定位信息(Mortazavi *et al.*, 2008), 将得到的 unique map 用于后续定量数据分析。使用 StringTie 软件完成新转录本组装, 对新转录本进行 GO、KEGG 数据库注释。

1.4 基因定量分析

采用 subread 软件中 featureCounts 工具(Liao *et al.*, 2014)计算各样本所有基因的表达值(FPKM), 用于估计不同样本间的基因表达水平, 并先后对测序深度和基因长度进行校正(Bray *et al.*, 2016)。根据各样本所有基因的 FPKM 值计算组内及组间样本的相关性系数 R^2 , 并绘制样本相关性图。为了评估组间差异及组内

样本重复情况, 本研究对所有样本的基因表达值(FPKM)采用主成分分析(PCA)方法对数以万计的基因变量进行降维及主成分提取。

1.5 差异表达基因的筛选及分析

通过 DESeq2 软件包以 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 和 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ 为标准筛选差异表达基因(DEGs), 使用 clusterProfiler (3.8.1)软件完成 DEGs 的功能富集分析和通路分析(GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析)。

2 结果

2.1 转录组的测序与组装

鲤肝脏转录组测序的数据质量及比对结果见表 1, GC 含量为 46.25%~47.96%, Q20 为 97.49%~97.82%, Q30 为 93.23%~93.86%, 错配率为 0.03%。将各样品的 clean_reads 与鲤参考基因组进行序列比对, 比对比率达 79.59% 以上。上述结果表明, 转录组测序质量良好, 可以开展后续的生物信息分析。

表 1 转录组测序质量和序列比对

Tab.1 Quality and sequence alignment of transcriptomics sequencing

| 样本名 Sample | 原始数据 Raw reads | 质控数据 Clean reads | 质控碱基/G Clean bases | 测序错误率 Error rate/% | Q20 /% | Q30 /% | GC 含量 GC/% | 比对率 Total mapped/% |
|------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|-----------|---------------|-----------------------|
| 对照组 Liver control | 40 722 452 | 39 903 926 | 5.99 | 0.03 | 97.68 | 93.53 | 46.68 | 81.47 |
| 低浓度 Liver low concentration | 45 204 806 | 44 309 698 | 6.65 | 0.03 | 97.82 | 93.86 | 47.44 | 79.99 |
| 高浓度 Liver high concentration | 40 405 270 | 39 348 500 | 5.90 | 0.03 | 97.55 | 93.36 | 46.25 | 79.59 |

注: Q20、Q30 分别表示碱基测序质量值大于 20 和 30 的碱基占总体碱基的百分比。

Note: Q20 and Q30 represent the percentage of bases with mass values greater than 20 and 30 in the total bases.

2.2 样本基因表达水平分析

将鲤肝脏的对照组与 DFB 急性胁迫组样本所匹配的基因进行对比分析。如图 1A 所示, 在肝脏组织中 3 组之间共表达的基因有 31 950 个, 分别有 1 990、2 917、1 759 个基因在 LC 组、LL 组、LH 组特异表达; 样本间基因表达水平相关性是检验实验可靠性和样本选择是否合理的重要指标。根据各样本所有基因的 FPKM 值计算组内及组间样本的皮尔逊相关系数, R^2 越接近 1, 表明样本间相关性系数越高, 其表达模式越接近。图 1B 为样本相关性热图。

2.3 DFB 暴露鲤肝脏差异表达基因的筛选

对 DFB 暴露组的肝脏 DEGs 以 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 和 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ 为标准进行筛选。采用层次聚类分析法对各组基因的 FPKM 值进行均一化处理 (Z-score), 各组间 DEGs 的相对表达量和它们之间的

关系以热图的形式展示。如图 2A 所示, 这些 DEGs 在对照组与各实验组之间有明显的分色, 并且随着 DFB 浓度的增加, 这种差异愈发明显。图 2C~D 的火山图展示了各组 DEGs 的总体分布情况。与对照组相比, LL 组含有 1 195 个上调的 DEGs 和 1 211 个下调的 DEGs, LH 组含有 1 394 个上调的 DEGs 和 1 294 个下调的 DEGs, 2 组共表达的 DEGs 有 821 个(图 2B), 结果表明, 3 组之间存在显著差异表达。提示 DEB 暴露对鲤肝脏的转录有显著影响。

2.4 差异表达基因的 GO 功能注释及富集分析

将对照组和各 DFB 暴露组的 DEGs 进行 GO 数据库功能注释和富集分析, 这些 DEGs 注释到生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cell composition, CC)和分子功能(molecular function, MF) 3 个 GO 分类中。对各个 GO 分类中 DEGs 富集排列前 10 的通路进行展示(图 3A~B)。与对照组 LC 相比, 暴露于

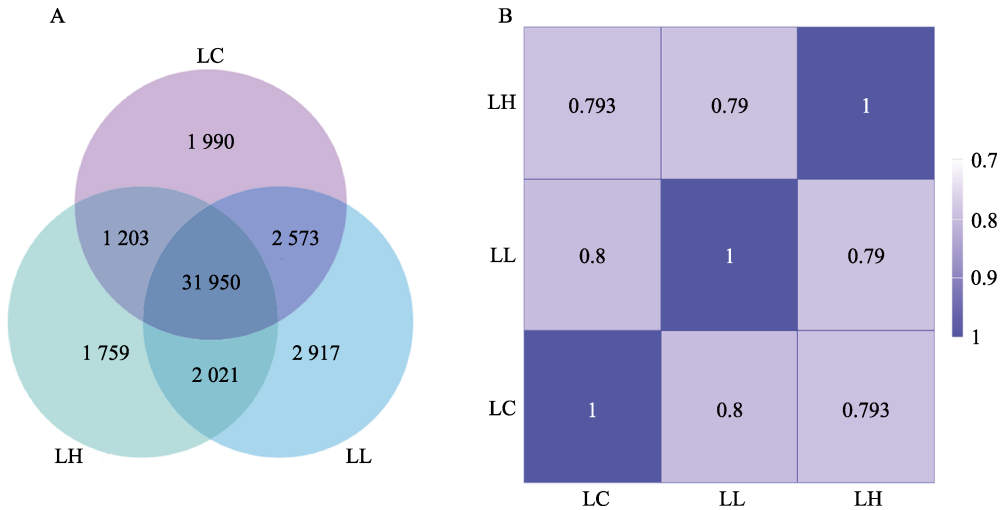


图 1 样本基因表达水平分析

Fig.1 Sample gene expression level analysis

A 为基因表达韦恩图，B 为样本相关性热图。LC、LL 和 LH 分别表示对照组、低浓度组和高浓度组。图 2 同。
A: Venn diagram of gene expression; B: Sample correlation heatmap. LC, LL, and LH are liver control group, liver low concentration group, and liver high concentration group respectively. The same as in Fig.2.

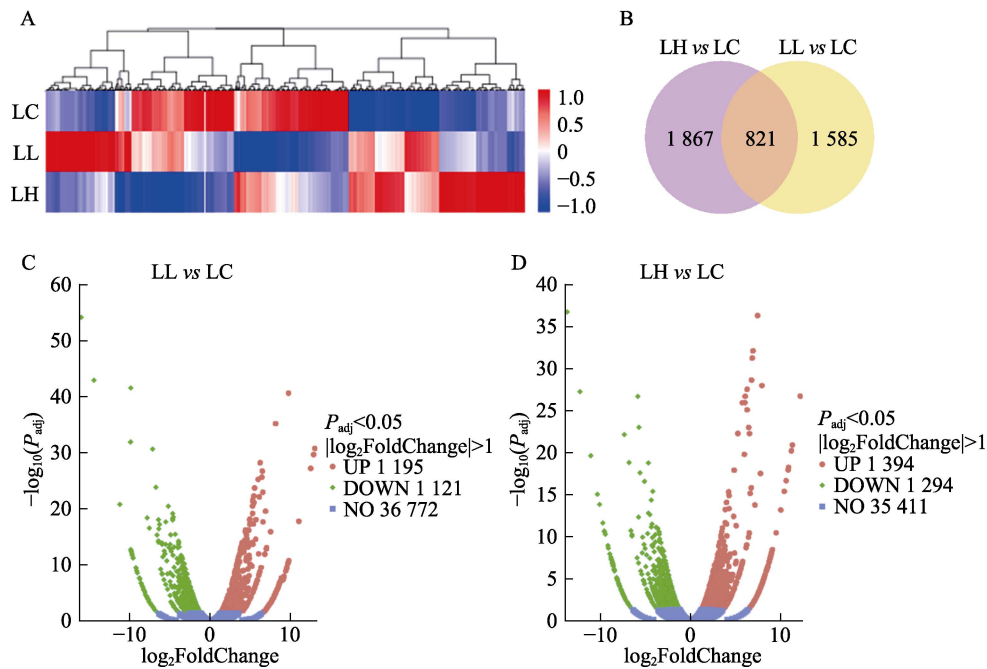


图 2 差异表达基因分析

Fig.2 Analysis of differentially expressed genes

A: 差异表达基因聚类热图；B: 差异表达基因韦恩图；C 和 D: 差异表达基因火山图。

A: Heatmap of DEGs; B: Venn diagram of DEGs; C and D: Volcano map of DEGs.

0.1 mg/L DFB 的 LL 组中的差异表达基因显著富集在 255 个 GO terms 中，涉及 108 个生物学过程、38 个细胞组分和 109 个分子功能；暴露 1.0 mg/L DFB 的 LH 组中的 DEGs 共富集到 298 个 GO 条目，包括 141 个生物过程、35 个细胞组成以及 122 个分子功能。在不同暴露水平下，鲤肝脏差异表达基因主要参与

“DNA 整合”、“氧化还原过程”等生物学过程，参与“细胞外区”、“细胞外空间”等细胞组成，集中在“NAD 结合”、“核苷结合”等分子功能。差异基因 GO 富集分析结果显示(图 3C~D)，0.1 mg/L DFB 暴露主要影响鲤肝脏“GTP 结合”、“嘌呤核苷结合”、“核苷结合”以及“NAD 结合”等分子功能相关基

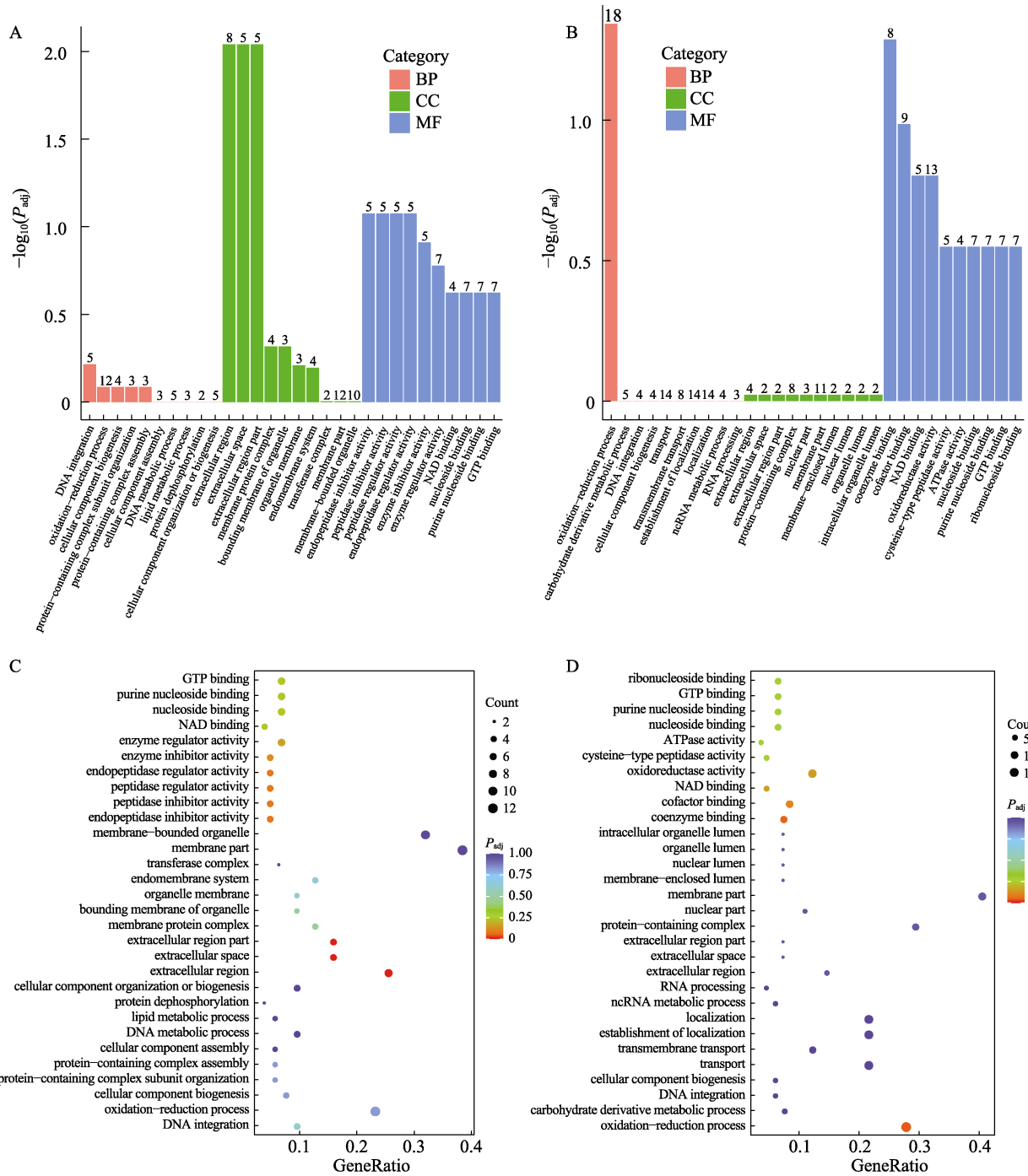


图 3 DEGs 的 GO 功能注释及富集分析(富集排名前 30)
Fig.3 GO annotation and enrichment analysis of DEGs (top30)

A: LL 组中 DEGs 的 GO 功能注释; B: LH 组中 DEGs 的 GO 功能注释;

C: LL 组中 DEGs 的 GO 富集分析; D: LH 组中 DEGs 的 GO 富集分析。

A: GO annotation of DEGs in the LL group; B: GO annotation of DEGs in the LH group;

C: GO enrichment analysis of DEGs in the LL group; D: GO enrichment analysis of DEGs in the LH group.

因表达, 1.0 mg/L DFB 暴露除了影响上述分子功能, 还显著影响鲤肝脏“ATP 酶活性”、“半胱氨酸型肽酶活性”和“氧化还原酶活性”等分子功能相关基因的表达。

2.5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

将所有 DEGs 定位到 KEGG 通路, 各 DFB 暴露组的前 20 条富集度较高的代表性通路如图 4 所示。

在 0.1 mg/L DFB 急性暴露条件下, 肝脏中 DEGs 富集到 146 条 KEGG 通路, 其中, 24 条通路受到显著影响($P_{adj}<0.05$)。对 24 条显著 KEGG 通路进行分类统计, 主要涉及 16 条代谢、3 条有机体系统、2 条细胞过程以及 2 条环境信息等 4 大类别。具体而言, 包括细胞色素 P450 对异生素的代谢、药物代谢-细胞色素 P450、药物代谢-其他酶等与异生物质的生物降解和代谢有关的通路, 类固醇激素生物合成、初级胆汁酸生物合成及花生四烯酸代谢等与脂质代谢相关的通路, 抗坏血酸和醛糖代谢、丙酮酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化等与碳水化合物代谢有关的通路以及有关氨基酸代谢通路等 16 条新陈代谢通路均发生显著改变。除了与新陈代谢相关的通路外, 差异表达基因还富集在有机体的免疫系统和内分泌系统相关的代谢途径中, 如 RIG-I 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路和 PPAR 信号通路。其次, 与细胞过程

相关的基因在铁死亡和过氧化酶体等细胞生长和死亡, 运输和分解代谢过程中被显著富集。此外, 环境信息加工中的信号分子和相互作用通路在 pathway 中也被富集, 如神经活性配体-受体相互作用及细胞因子受体相互作用。

在 1.0 mg/L DFB 急性暴露条件下, 肝脏中 DEGs 富集到 149 条 KEGG 通路, 其中, 15 条被显著富集($P_{adj}<0.05$)。对 15 条显著 KEGG 通路进行分类统计, 主要涉及 10 条代谢、2 条遗传信息处理、1 条细胞过程、1 条有机系统、1 条环境信息加工等 5 大类别。差异表达基因数目较多的次级富集通路依次为异生物质的生物降解与代谢、折叠、分拣和降解、运输和分解代谢、脂类代谢、辅助因子和维生素的代谢、内分泌系统、膜运输、氨基酸代谢、碳水化合物代谢。随着 DFB 暴露浓度的提高, 鲤肝脏中与遗传信息处理相关的蛋白质的折叠、分类和降解受到显著影响。

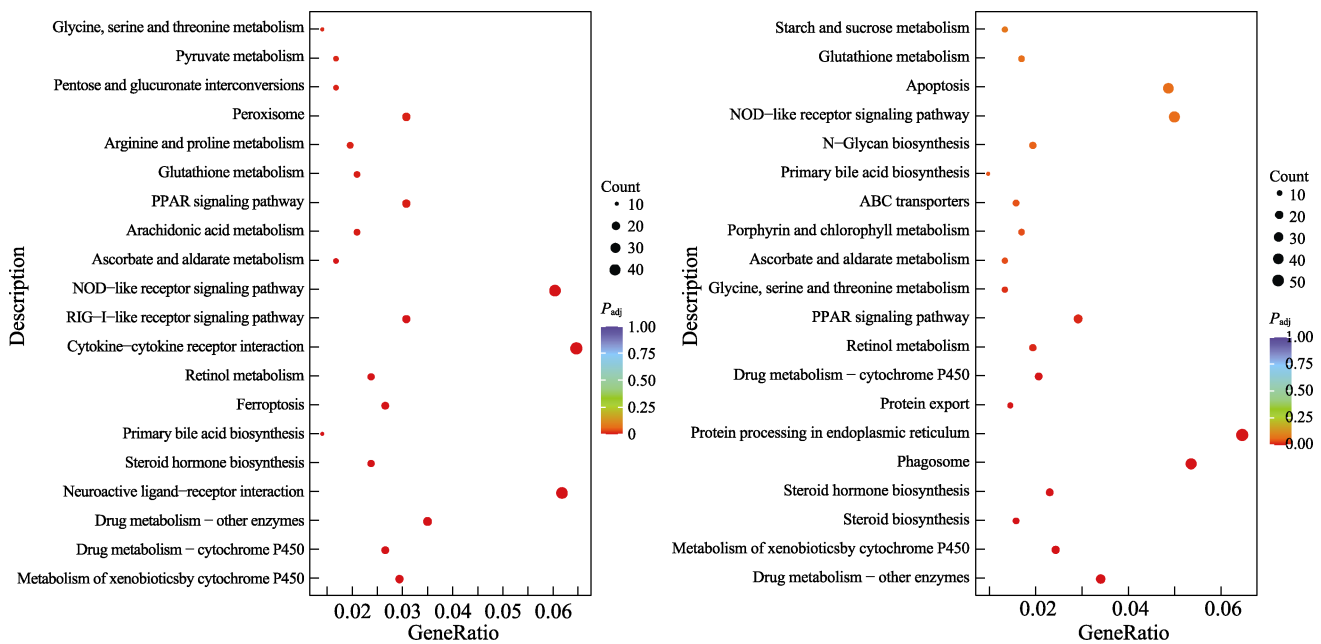


图 4 DEGs 的 KEGG 富集分析(富集排名前 20)
Fig.4 KEGG enrichment analysis of DEGs (top 20)

3 讨论

DFB 是农作物等病虫害防治常用的杀虫剂, 已在包括中国在内的全球各地的地表水和地下水以及土壤中检测到。目前, 大多数 DFB 的研究集中在用法用量、残留代谢情况、毒性研究及其对环境的影响, 有关其对水产动物的暴露毒性及其分子响应机制研究较少。转录组测序可以大规模表征基因表达水平, 是研究水生生物毒理学的有力手段。因此, 本研究采用 RNA-Seq 测序技术探究 DFB 暴露对鲤肝脏转录组

的影响, 结果表明 DFB 暴露严重干扰了鲤肝脏生物学过程、细胞组分以及分子功能, 并造成异生物质的生物降解和代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢紊乱, 产生急性炎症反应、内质网应激以及免疫毒性等。

3.1 细胞色素 P450 酶系失衡

细胞色素 P450 家族(CYP450)是降解和代谢内源性物质、参与外源性药物和环境毒物的代谢过程的主要酶系, CYP450 中约有三分之一用于外源性物质的代谢(Guengerich, 2013)。本研究的转录组学结果表

明,在 DFB 急性暴露条件下,鲤肝脏中细胞色素 P450 对异生物质的代谢、药物代谢-细胞色素 P450 代谢途径被显著富集, *CYP1A*、*CYP1B* 以及编码谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)、葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)、羧基还原酶 1 的基因 *GST*、*UGT*、*CBR1* 表达水平都显著上调。*CYP450* 属于生物转化的 I 相解毒酶,而 GSTs 和 UGT 属于 II 相解毒酶。许多外源性有害物质在 *CYP450* 第一相生物转化过程中极易形成某些生物活性中间产物,与细胞生物大分子重要成分发生共价结合,对机体造成损害;而 GSTs 和 UGT 可以和第一相与反应的活性中间产物结合,可防止发生共价结合从而起到解毒作用。在 2 种暴露浓度水平下,上述基因表达情况反映了鲤肝脏启动了对外源性物质 DFB 的生物降解和代谢,这与 Zaidi 等(2011)和 Maduenho 等(2008)研究结果一致。另外, *CYP450* 作为一类单加氧酶,参与许多类固醇激素、胆固醇和其他脂质合成等生物过程(Di Giulio *et al*, 2008; Olsvik *et al*, 2013)。在本研究中, *CYP450* 家族成员 *CYP1A*、*CYP1B*、*CYP7A1*、*CYP24A1*、*CYP27B1*、*CYP26A1* 等基因表达水平显著上调。*CYP7A1* 是胆固醇敏感的核激素受体即肝脏 X 受体 α (*LXR α*)的靶基因,具有抑制炎症、抑制肿瘤细胞增殖、调节脂质代谢、抑制自身免疫等生物学效应, *CYP7A1* 呈现高表达则与肝组织炎症和纤维化的发生、发展密切相关(贾沛轩等, 2016)。*CYP24A1* 和 *CYP27B1* 参与维生素 D 的分解代谢,从而维持机体钙磷代谢平衡以及促进细胞的增殖、分化和凋亡(Jones *et al*, 2012)。*CYP1A* 和 *CYP26A1* 是参与视黄醇代谢常见的基因,视黄醇及其衍生物是动物体内维生素 A 的主要存在形式,在卵巢类固醇激素生成、卵母细胞成熟和早期胚胎发育中发挥重要作用(杨言昭等, 2019)。本研究中 *CYP450* 家族基因的显著上调,不仅促进了对 DFB 外源性化合物的代谢和降解,还影响了鲤肝脏组织中类固醇激素生物合成、类固醇生物合成、初级胆汁酸生物合成以及视黄醇代谢。值得注意的是,随着 DFB 暴露浓度水平的增加,鲤肝脏中 *CYP450* 酶系的基因表达水平呈下降趋势,说明高浓度 DFB 暴露水平会破坏鲤肝脏 *CYP450* 酶系活性。本研究结果与拟除虫菊酯杀虫剂诱导大鼠肝(Martínez *et al*, 2018)和邻苯二甲酸盐酯增塑剂诱导鲫(*Ctenopharyngodon idella*)鳃(Liu Y *et al*, 2022)细胞色素 P450 酶系失衡的结果具有相似性。

3.2 脂质代谢紊乱

脂质代谢在大多数真核生物中调节膜流动性、稳定性、渗透性和细胞信号传导等方面起着至关重要的

作用。已有研究证实,丁草胺、邻苯二甲酸酯、重金属等环境内分泌干扰物会诱导水生生物脂质代谢异常(Farombi *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2018; 孙胜香等, 2019)。花生四烯酸代谢在介导炎症反应过程中发挥重要作用(蔡亚玮等, 2021)。过氧化物酶体能够清除细胞中的分子氧和过氧化物,并与糖脂、胆固醇、胆酸的合成有关,是在氧化还原信号和脂质稳态中起关键作用的细胞器(Schrader *et al*, 2020; 褚贝贝等, 2015; Wanders *et al*, 2013)。在本研究中,在低浓度 DFB 暴露下,鲤肝脏中参与花生四烯酸代谢与亚油酸代谢的磷脂酶 A2 的 *PLA2G1B*、前列腺素 E 合酶的 *PTGES3B*,以及参与过氧化物酶体的 *PXMP2*、*PEX19* 等基因表达水平显著升高。结果表明,低浓度 DFB 会造成鲤肝脏脂质代谢异常,肝脏通过加强过氧化物酶体的基因表达来清除 DFB 产生的毒害物质。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)是由不饱和脂肪酸及其产生物所活化的核激素受体,PPARs 包括 *PPAR α* 、*PPAR β/δ* 和 *PPAR γ* 三种亚型,广泛参与机体的脂质和碳水化合物代谢以及细胞生长分化及生殖等过程(叶林秀等, 2002)。其中, *PPAR α* 能够调控和参与多个脂质代谢过程中有关基因的表达,是脂质代谢过程的重要因子(全巧云等, 2016)。在低浓度 DFB 暴露浓度下,PPAR 信号通路中脂肪酸结合蛋白的 *FABP1*、长链脂酰辅酶 A 合成酶的 *LACS1*、载脂蛋白的 *ApoA-1*、*CYP7A1* 等基因表达水平显著升高,极长链脂酰辅酶 A 合成酶的 *VLACS1*、肝脏 X 受体 α 的 *LXR α* 等基因表达水平显著下降。在高浓度 DFB 暴露下,鲤肝脏 PPAR 信号通路中 *PPAR α* 、*FABP1*、*CYP7A1* 等基因表达水平显著升高, *ApoA-1*、*LXR α* 、肉碱棕榈酰转移酶的 *CPT1*、与脂滴相关蛋白的 *Plin2* 以及血管生成素样蛋白的 *ANGPTL4* 等表达水平显著下降。*CPT1* 是脂肪酸氧化过程中的一种限速酶(陈书健等, 2020),其基因表达水平下降表明高浓度 DFB 暴露会抑制鲤肝脏中脂肪酸 β -氧化。由于作为天然 *PPAR α* 配体的脂肪酸代谢物的存在,肝细胞中脂肪酸/甘油三酯的积累可能导致 *PPAR α* 的持续激活,而在高浓度 DFB 暴露下,肝脏 *PPAR α* 表达水平显著升高,说明随着 DFB 暴露浓度的增加,鲤肝脏脂肪酸 β -氧化严重受阻,甚至发生脂肪滴在肝脏中积累,可能诱变为脂肪肝,对鲤肝脏造成严重损伤。

3.3 内质网应激和免疫失调

研究表明,内质网(endoplasmic reticulum, ER)是细胞内负责蛋白质合成、加工及转运的细胞器,也是细胞内 Ca^{2+} 贮存的主要场所,对应激因素极为敏感

(Liu H *et al*, 2022)。当受到内外部环境因素刺激后, 由于细胞内质网稳态和功能发生改变, 导致蛋白质的加工和运输受到阻碍, 使大量未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网中积累。当应激导致内质网内错误折叠与未折叠蛋白聚集以及钙离子平衡紊乱等状况, 会激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)和内质网超负荷反应(endoplasmic reticulum overload response, EOR)来维持内质网的正常功能。在本研究中, 在高浓度 DFB 暴露下, 有 53 个 DEGs 显著富集到蛋白质内质网加工通路, 其中, *HSP90A*、*CALR3B*、*ERO1A*、*EDEM2*、*RBX1* 等 46 个基因表达显著上调。*HSP90* 作为蛋白成熟过程中的分子伴侣, 在蛋白质的折叠、组装、翻译后修饰、运输、分泌以及降解过程中具有重要作用, 参与细胞周期调节、DNA 损伤修复及细胞凋亡等多个生物学过程(罗紫蝶等, 2022), 其表达情况反映了鱼类的应激程度, 这与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)通过上调 *HSP90* 提高其盐度适应性研究结果一致(周启苓等, 2022)。*ERO1* 在维持内质网氧化还原稳态和促进蛋白质二硫键合成过程中起到重要作用(吴敏等, 2021)。*EDEM2* 与错误折叠蛋白通过内质网相关蛋白降解(ER-associated degradation, ERAD)途径的逆向转运和降解有关(Hosokawa *et al*, 2021)。*CALR* 是一种高度保守的内质网 Ca^{2+} 结合蛋白, 具备分子伴侣活性、调节细胞内钙稳态以及细胞凋亡等多种生物学功能(Pandya *et al*, 2020)。研究表明, 0.1 mg/L DFB 暴露浓度对鲤肝脏产生的内质网应激不显著, 但 1.0 mg/L 暴露浓度造成了严重的内质网应激损伤, 通过诱导内质网分子伴侣的表达激活 UPR、ERAD 等相关保护机制维持内质网稳态, 但持续而强烈的内质网应激可诱导内质网相关性细胞凋亡, 最终影响应激细胞的损伤或凋亡。

天然免疫通路是保护机体免受病原侵袭的第一道屏障(Hou *et al*, 2016), 主要包括 RIG-I 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路以及 Toll 样受体通路等。病毒、细菌和死细胞的 RNA 进入细胞质后, 可以与 RIG-I 受体或者 NOD 样受体结合并引起 *NF- κ B* 信号的激活和基因表达的改变, 导致炎症复合体的形成。在由 cGAS 介导的胞质 DNA 传感途径中, STING 已被确定为 RIG-I 的信号辅助因子和关键衔接蛋白, 并与位于线粒体外膜表面的衔接蛋白 MAVS 相互作用, 从而激活下游的转录因子 IRF3、IRF7 和 *NF- κ B*, 诱导 I 型干扰素和促炎细胞因子的产生(张颖等, 2022)。白细胞介素 8 (CXCL8) 是一种由巨噬细胞和上皮细胞等分泌的趋化细胞因子, 将中性粒细胞从血管募集到受到影响的组织, 从而引发机体局部的急性炎症反

应, 达到杀菌的目的(Awwad *et al*, 2018)。半胱天冬酶在程序性细胞死亡的启动和执行中起关键作用, Casp8 既可作为死亡受体诱导的细胞凋亡的关键分子, 又可作为抗原受体激活 *NF- κ B* 的选择性信号转导器(Zou *et al*, 2021)。本研究中, 低浓度 DFB 的暴露条件下, 43 个 DEGs 显著富集到了 RIG-I 样受体信号通路和 NOD 样受体信号通路, *MAPK12B*、*STING1*、*TKFC* 等 8 个基因表达水平上调, *IRF7*、*CXCL8*、*CASP8* 等 35 个基因表达水平显著下调, 说明 DFB 能够诱发鲤肝脏产生急性炎症反应, 导致肝脏在全身免疫稳态中的作用受损。

4 结 论

本研究通过 RNA-Seq 技术对不同除虫脲暴露浓度下鲤肝组织进行了转录组测序。结果显示, DFB 严重影响鲤肝脏生物学过程、细胞组分及分子功能, 严重干扰了细胞色素 P450 对异生素的代谢、PPAR 信号通路、内质网中的蛋白质加工、RIG-I 样受体信号通路和 NOD 样受体信号通路等。其中, 参与细胞色素 P450 对异生素的代谢通路的 *CYP7A1* 呈现高表达, 表明发生了肝组织炎症和纤维化。与此同时, 除虫脲导致鲤机体免疫失调, 参与 RIG-I 样受体信号通路和 NOD 样受体信号通路的 *STING1* 表达水平显著升高, *CXCL8*、*CASP8* 表达水平显著下降, 表明 DFB 能够引发肝急性炎症反应、内质网应激以及免疫毒性, 导致肝脏受损。本研究在转录层面为 DFB 暴露下影响鱼类的分子响应机制提供了新的见解, 为 DFB 在水产领域的限量标准制定和环境安全评价提供了科学数据, 也为探讨其他有机污染物对水生生物和人类健康的影响提供了技术方法和理论参考。

参 考 文 献

- ABE F R, MACHADO A A, COLEONE A C, *et al*. Toxicity of diflubenzuron and temephos on freshwater fishes: Ecotoxicological assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2019, 230(3): 1–10
- AWWAD O, COPERCHINI F, PIGNATTI P, *et al*. The AMPK-activator AICAR in thyroid cancer: Effects on CXCL8 secretion and on CXCL8-induced neoplastic cell migration. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2018, 41(11): 1275–1282
- BRAY N L, PIMENTEL H, MELSTED P, *et al*. Near-optimal probabilistic RNA-Seq quantification. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 525–527
- CAI Y W, LIU J H, MA N. Research status of arachidonic

- acid-targeted metabolomics in inflammation. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2021, 37(19): 2721–2723, 2728 [蔡亚玮, 刘建宏, 马宁. 花生四烯酸靶向代谢组学在炎症中的研究现状. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(19): 2721–2723, 2728]
- CHEN S J, WU C L, YE J Y, *et al.* Effect of dietary vitamin A on growth, serum biochemical index, digestive enzyme activities and glucose and lipid metabolism in juvenile *Mylopharyngodon piceus*. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(1): 85–98 [陈书健, 吴成龙, 叶金云, 等. 饲料中维生素 A 对青鱼幼鱼生长、血清生化指标和肝脏糖脂代谢酶活性及基因表达的影响. *水产学报*, 2020, 44(1): 85–98]
- CHU B B, SONG B L. Lysosome-peroxisome membrane contacts mediate cholesterol transport. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(6): 759–763 [褚贝贝, 宋保亮. 溶酶体与过氧化物酶体形成膜接触介导胆固醇转运. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(6): 759–763]
- DI GIULIO R T, HINTON D E. *The toxicology of fishes*. CRC Press, 2008
- FAROMBI E O, AJIMOKO Y R, ADELOWO O A. Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African catfish, (*Clarias gariepinus*). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2008, 5(5): 423–427
- GUENGERICH F P. *Cytochrome P450 activation of toxins and hepatotoxicity: Drug-induced liver disease*. Elsevier, 2013, 15–33
- HOSOKAWA N, WADA I, HASEGAWA K, *et al.* A novel ER α -mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Reports*, 2001, 2(5): 415–422
- HOU C W, LAURO M L, LEIMKUHNER GRIMES C. Redefining the defensive line: Critical components of the innate immune system. *ACS Infectious Diseases*, 2016, 2(11): 746–748
- HU C Z. *Studies on residual degradation of diflubenzuron in Chinese kale and dietary risk assessment*. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 [胡存中. 除虫脲在芥蓝中的残留及膳食风险评估研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2019]
- JIA P X, FU C X, RONG P, *et al.* Microcystin effects on the expression of GST and CYP7A1 genes in the liver of silver carp. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2016, 18(6): 158–163 [贾沛轩, 付春雪, 荣萍, 等. 微囊藻毒素对鲢鱼肝脏 GST 和 CYP7A1 基因表达的影响. *中国农业科技导报*, 2016, 18(6): 158–163]
- JIA Y Q, NIAN Q X, ZHANG L, *et al.* Determination of 4 benzoylurea pesticides in irrigation water by high performance liquid chromatography with magnetic solid-phase extraction. *Journal of Instrumental Analysis*, 2019, 38(1): 46–51 [贾叶青, 念琪循, 张磊, 等. 磁固相萃取结合高效液相色谱检测农田灌溉水中 4 种苯甲酰脲类农药. *分析测试学报*, 2019, 38(1): 46–51]
- JONES G, PROSSER D E, KAUFANN M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (*CYP24A1*): Its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 523(1): 9–18
- KIETZMANN T. Liver zonation in health and disease: Hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors as concert masters. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9): 2347
- LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923–930
- LIU H J, DONG M, JIANG W D, *et al.* Acute nitrite exposure-induced oxidative damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis caused gill tissue damage of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Relieved by dietary protein. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 243: 113994
- LIU Y J. Determination of diflubenzuron residues in salmon by LC-MS/MS with QuEChERS. *Food Industry*, 2021, 42(12): 436–440 [刘亿婕. QuEChERS/LC-MS/MS 法测定三文鱼中除虫脲残留. *食品工业*, 2021, 42(12): 436–440]
- LIU Y, CHEN Z, LI S, *et al.* Multi-omics profiling and biochemical assays reveal the acute toxicity of environmental related concentrations of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the gill of crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 2022, 307: 135814
- LUO H, YE H, XIAO S J, *et al.* Application of transcriptomics technology to aquatic animal research. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 598–607 [罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用. *水产学报*, 2015, 39(4): 598–607]
- LUO Z D, GUO S J, ZENG C, *et al.* Toxic effects of cadmium exposure on zebrafish embryo development. *Research of Environmental Sciences*, 2022, 35(5): 1315–1322 [罗紫蝶, 郭少娟, 曾晨, 等. 镉暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应研究. *环境科学研究*, 2022, 35(5): 1315–1322]
- MADUENHO L P, MARITINEZ C B R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2008, 148(3): 265–272
- MARTÍNEZ M A, ARES I, RODRÍGUEZ J L, *et al.* Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats. *Science of the Total Environment*, 2018, 631: 1371–1382
- MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621–628
- OLSVIK P A, SAMUELSEN O B, *et al.* Toxicological assessment of the anti-salmon lice drug diflubenzuron on Atlantic cod *Gadus morhua*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 27–43
- PANDYA U M, MANZANARES M A, TELLECHEA A, *et al.* Calreticulin exploits TGF- β for extracellular matrix induction engineering a tissue regenerative process. *The FASEB Journal*, 2020, 4(12): 15849–15874
- PARSONS A E, SAMUELSEN O B, JOHNSEN I A, *et al.* Distribution and persistence of diflubenzuron and

- teflubenzuron in the marine environment around salmonid aquaculture facilities. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 780
- PLACENCIA J A, SAAVEDRA F, FERNANDEZÁNDEZ J, *et al.* Occurrence and distribution of deltamethrin and diflubenzuron in surface sediments from the Reloncavi Fjord and the Chiloé Inner-Sea (~39.5°S–43°S), Chilean Patagonia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2018, 100(3): 384–388
- QIAO L, CHEN L, XU J H, *et al.* Residual risk of benzoylurea insecticides and their research progress in aquaculture. *Freshwater Fisheries*, 2022, 52(4): 65–76 [乔璐, 陈璐, 徐锦华, 等. 苯甲酰脲类杀虫剂的残留风险及在水产养殖中的研究进展. *淡水渔业*, 2022, 52(4): 65–76]
- SCHRADER M, KAMOSHITA M, ISLINGER M. Organelle interplay-peroxisome interactions in health and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2020, 43(1): 71–89
- SUN J, LI W, CONG R, *et al.* Toxicity and metabolism of adult zebrafish brain tissue induced by combined exposure to graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(7): 1417–1423 [孙晶, 李伟, 丛瑞, 等. 氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱导成年斑马鱼脑组织毒性及其代谢研究. *农业环境科学学报*, 2022, 41(7): 1417–1423]
- SUN S X, DU Z Y. The effects of environmental endocrine disrupting chemicals on lipid metabolism in fish: Review and perspectives. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 1–14 [孙胜香, 杜震宇. 环境内分泌干扰物对鱼类脂质代谢的影响: 回顾与展望. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 1–14]
- TONG Q Y, GE C J, ZHENG S H. Expression of *PPAR α* and *Acox1* in rats with alcoholic fatty liver disease. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2016, 45(3): 288–291 [仝巧云, 葛存锦, 郑世华. *PPAR α* 及 *Acox1* 在酒精性脂肪肝中的表达. *华中科技大学学报: 医学版*, 2016, 45(3): 288–291]
- WANDERS R J A. Peroxisomes in human health and disease: Metabolic pathways, metabolite transport, interplay with other organelles and signal transduction. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2013, 69: 23–44
- WU M, HUANG Y G. Research progress of endoplasmic reticulum oxidoreductin *ERO1* and its relationship with tumor. *Chongqing Medicine*, 2021, 50(6): 1048–1052 [吴敏, 黄尤光. 内质网氧化还原蛋白 1 及其与肿瘤关系的研究进展. *重庆医学*, 2021, 50(6): 1048–1052]
- XIN T R, LIAN T, LI X E, *et al.* Sublethal effects of diflubenzuron on the growth and reproduction of an experimental population of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56(4): 736–743 [辛天蓉, 练涛, 李雪儿, 等. 亚致死浓度除虫脒对朱砂叶螨生长和繁殖的影响. *应用昆虫学报*, 2019, 56(4): 736–743]
- XU Y C, LIU G H, XU Y H, *et al.* Physiological and transcriptomic analyses reveal the toxicological mechanism and risk assessment of environmentally-relevant waterborne tetracycline exposure on the gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science of the Total Environment*, 2022, 806: 151290
- XU Y Z, LIU X W, QIN Z, *et al.* Methodology study on determination of diflubenzuron in swine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022, 49(7): 2746–2756 [徐玉珍, 刘希望, 秦哲, 等. 液相色谱-串联质谱法检测猪血浆中除虫脒的方法学研究. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(7): 2746–2756]
- YANG Y Z, ZHANG Y M, LIU Y, *et al.* Research progress oil the role of retinol in ovary development. *Chinese Journal of Animal Science*, 2019, 55(5): 1–5 [杨言昭, 张艳敏, 刘颖, 等. 视黄醇在卵巢发育中的作用研究进展. *中国畜牧杂志*, 2019, 55(5): 1–5]
- YE L X, XU Y C, ZHU Y L. Nuclear transcription factor PPARs and metabolic syndrome. *International Journal of Genetics*, 2002, 25(4): 232–234 [叶林秀, 徐焱成, 朱宜莲. 核转录因子 PPARs 与代谢综合征. *国际遗传学杂志*, 2002, 25(4): 232–234]
- ZAIDI N, SOLTANI N. Environmental risks of two chitin synthesis inhibitors on *Gambusia affinis*: Chronic effects on growth and recovery of biological responses. *Biological Control*, 2011, 59(2): 106–113
- ZHANG L, HU Y, SUN W, *et al.* Transcriptomic responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver to environmental concentration of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 165: 70–77
- ZHANG X, ZHOU Q, ZOU W, *et al.* Molecular mechanisms of developmental toxicity induced by graphene oxide at predicted environmental concentrations. *Environmental Science and Technology*, 2017, 51(14): 7861–7871
- ZHANG Y, CHEN C Y, FU Y. Research progress on the CGAS-STING signaling pathway in autoimmune diseases. *Current Immunology*, 2022, 42(3): 254–258 [张颖, 陈超越, 付好. cGAS-STING 信号通路在自身免疫性疾病中的研究进展. *现代免疫学*, 2022, 42(3): 254–258]
- ZHENG S, HUANG W, LIU C, *et al.* Behavioral change and transcriptomics reveal the effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposure on neurodevelopmental toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) in early life stage. *Science of the Total Environment*, 2021, 752: 141783
- ZHOU Q L, MA Q, MAO F F, *et al.* Analysis of the transcriptomic response to salinity acclimation in the scale of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(5): 168–178 [周启苓, 马骞, 毛非凡, 等. 盐度驯化影响虹鳟鳞组织基因表达的转录组分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(5): 168–178]
- ZOU J, XIA H, ZHANG C, *et al.* Casp8 acts through A20 to inhibit PD-L1 expression: The mechanism and its implication in immunotherapy. *Cancer Science*, 2021, 112(7): 2664–2678

Effect of Diflubenzuron Exposure on Gene Expression in *Cyprinus carpio* Liver Based on Transcriptomics

CHEN Lu^{1,2}, YANG Zhen², XU Jinhua², QIAO Lu², SONG Jinlong², SUN Huiwu², MU Yingchun²^①

(1. College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121000, China;

2. Key Laboratory of Control of Quality and Safety for Aquatic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

Abstract As a benzoylurea insecticide, diflubenzuron (DFB) has been widely used in the prevention and control of diseases and insect pests in vegetables, fruits, grain cultivation, and other fields in recent years. In addition, because of its low acute toxicity, excellent biological activity, and specific action mechanism, DFB has been widely used in aquaculture to kill bacteria and lice. With its large-scale production and widespread use, its partial residue remains in environmental media, such as water, soil, and the atmosphere, and causes direct or indirect chronic toxicity to aquatic organisms. The residual DFB enters the human body along the food chain and poses a threat to human health when it reaches a certain concentration through chronic exposure and long-term accumulation. At present, research on DFB insecticides has been limited to the usage and dosage, residual metabolism, and its toxicological effects on the environment. There have been no reports, to our knowledge, on the effect of DFB on gene expression in carp liver in China. The purpose of this study was to explore the differential expression of genes in carp liver under DFB stress.

In this study, carp (*Cyprinus carpio*) was selected as the research subject, and three exposure experiments for 15 days under 0.1 and 1.0 mg/L medicated bath concentrations were carried out in parallel for each concentration. High-throughput sequencing of the liver was performed using the Illumina NovaSeq 6000. Differentially expressed genes (DEGs) were screened by $P_{\text{adj}} < 0.05$ and $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$, and bioinformatics analysis, such as Gene Ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis, were performed. The transcriptome analysis results showed that 2 406 and 2 688 DEGs changed significantly at 0.1 and 1.0 mg/L exposure concentrations, respectively, and 821 DEGs were co-expressed between the two groups. GO analysis results showed that DEGs in the DFB exposure group were enriched in biological processes, cell compositions, and molecular functions. KEGG enrichment analysis showed that DEGs in the low DFB concentration exposure group were significantly enriched in metabolic pathways, such as biodegradation and metabolism of xenobiotics, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, signal molecules and interactions, endocrine system, and immune system. In addition to the above metabolic pathways, DEGs in the high DFB concentration exposure group were significantly enriched in metabolic pathways, such as folding, classification and degradation, transport, and catabolism.

Studies have shown that DFB exposure causes the biodegradation and metabolism of xenobiotics, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, and amino acid metabolism, and generates endoplasmic reticulum stress, inflammatory response, and immune toxicity. In summary, the results of this study provide basic data and a theoretical basis for further research on the molecular mechanism of DFB stress in carp.

Key words Carp *Cyprinus carpio*; Diflubenzuron; Liver; Transcriptomics; Toxicology

① Corresponding author: MU Yingchun, E-mail: muyc@cafs.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230220001

http://www.yykxjz.cn/

周丽颖, 钟立强, 张世勇, 陈校辉, 刘洪岩, 王明华. 发酵饲料投喂方式对斑点叉尾鲴生长、肠道菌群及代谢组学的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 140–148

ZHOU L Y, ZHONG L Q, ZHANG S Y, CHEN X H, LIU H Y, WANG M H. Effects of fermented feed feeding mode on intestinal flora and metabolomics of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 140–148

发酵饲料投喂方式对斑点叉尾鲴生长、 肠道菌群及代谢组学的影响*



周丽颖^{1,2,3} 钟立强^{1,3}① 张世勇^{1,3} 陈校辉^{1,3} 刘洪岩^{1,3} 王明华^{1,3}①

(1. 江苏省淡水水产研究所 江苏 南京 210017; 2. 扬州大学动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009;
3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台 江苏 南京 210014)

摘要 本研究对斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)的发酵饲料进行了合理饲喂,并确定了其对斑点叉尾鲴生长、肠道菌群和代谢组学的影响。实验设置 3 组:持续投喂组(A)(即在膨化饲料中持续添加发酵饲料),间隔投喂组即向膨化饲料中按周间隔添加发酵饲料(B),对照组仅投喂膨化饲料(C)。实验共持续 6 个月。实验结束后,对斑点叉尾鲴进行称重,并用 16S rRNA 扩增子测序技术和基于液相色谱的代谢组学技术分别检测斑点叉尾鲴肠道菌群组成以及代谢组学。结果显示,间隔投喂组斑点叉尾鲴终末体重(FBW)显著高于对照组和持续投喂组($P<0.05$)。间隔投喂组的群落丰富度和多样性最高,持续投喂组群落丰富度最低($P>0.05$)。厚壁杆菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteriota)、蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)和异常球菌门(Deinococcota)是优势细菌门。优势肠道菌属包括未命名的叶绿体科中的一个属(*norank_f_norank_o_Chloroplast*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)和狭义梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)。代谢组学分析表明,持续投喂组主要通过 *N*-乙酰-*D*-半乳糖胺显著上调影响肠道菌群半乳糖和磷酸转移酶系统代谢通路($P<0.05$),进而影响鱼体对碳水化合物的消化吸收。而间隔投喂组差异代谢产物 *L*-丝氨酸和 *L*-苯丙氨酸显著上调($P<0.05$),影响斑点叉尾鲴肠道菌群硫代谢、氨基酸代谢等,继而影响斑点叉尾鲴能量吸收、抗炎症和免疫等能力。本研究为斑点叉尾鲴发酵饲料投喂方式的探索和健康绿色养殖提供了理论依据。

关键词 斑点叉尾鲴; 发酵饲料; 肠道菌群; 代谢组学

中图分类号 S963.7 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0140-09

斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)因其肉质鲜美少刺,且生长迅速、环境适应性强,受到消费者和养殖者的喜爱,已成为我国重要的淡水养殖鱼类(Mischke,

2012; Zhong *et al*, 2016)。然而,随着斑点叉尾鲴养殖密度的增加,病害的发生尤为频繁。传统的抗生素治疗水产养殖动物疾病会产生耐药性和药物残留的问

* 江苏现代农业(大宗鱼类)产业技术体系种质创新与苗种繁育创新团队[JATS(2023)374]、国家自然科学基金(32002378)和国家特色淡水鱼产业技术体系(CARS-46)共同资助。周丽颖, E-mail: 2332238540@qq.com

① 通信作者: 钟立强, 副研究员, E-mail: stevezhong1985@163.com;

王明华, 正高级工程师, E-mail: w19731224@sina.com

收稿日期: 2023-02-20, 收修改稿日期: 2023-03-17

题(Amable *et al*, 2022; Song *et al*, 2022)。因此, 许多科研人员致力于开发安全无害的抗生素替代品, 研究表明, 饲料中添加益生菌可显著提高水产动物的免疫力, 减少疾病的发生。

发酵饲料是指利用乳杆菌(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、酵母菌(*Saccharomyces*)等有益菌对饲料原料进行厌氧或好氧发酵, 使原料中的纤维素、果胶等分解为动物易消化吸收的成分, 可以减轻动物肠道负担, 提高动物消化吸收能力, 促进生长(Socol *et al*, 2017)。同时, 发酵饲料中添加益生菌可以提高机体抗氧化酶活性, 提高动物免疫力, 及时抵御和消灭病原(徐亚飞, 2018)。与普通饲料相比, 发酵饲料中的益生菌在代谢过程中可以形成各种酶, 用于分解水中的有害物质和有机物, 进而优化水质(于梦楠等, 2021)。张书环等(2021)研究发现, 饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可降低杂交鲟(*Acipenser sinensis*)的饵料系数, 增强其对血糖和脂肪的利用率, 并可改善肠道微生物菌群结构。唐杨等(2017)研究表明, 饲料中添加蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)可改善凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)肠道菌群, 提高其生长速度。王海瑞等(2020)在饲料中添加丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)可显著提高黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的血清抗氧化能力, 且黄颡鱼肠道内的短链脂肪酸含量显著升高。然而, 过量投喂饲料会产生一系列不良后果, 如增加饲料成本和饵料系数, 增加水产动物发病率和死亡率, 还会带来环境污染的问题, 使得养殖成本和养殖风险升高(Zhang *et al*, 2020)。目前, 关于斑点叉尾鲴发酵饲料科学投喂方式尚属空白, 本研究通过对发酵饲料投喂方式的探索, 研究其对斑点叉尾鲴生长、肠道微生物组成及代谢组学的影响, 旨在为发酵饲料在斑点叉尾鲴饲料中的合理利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验设置

实验在江苏省淡水水产研究所永宁基地开展, 选择标准化养殖池塘 9 个(面积为 0.667 hm² 左右, 水深为 1.5 m)。6 月初, 按 18 000 尾/hm² 的密度投放规格 60 g 左右的斑点叉尾鲴鱼种。实验设持续投喂组(A)、间隔投喂组(B)和空白对照组(C), 每组 3 个重复。实验用配合饲料为斑点叉尾鲴膨化配合饲料(浙江澳华饲料有限公司), 饲料成分和营养组成: 水分≤12.0%, 粗蛋白≥32.0%, 粗脂肪≥4.0%, 粗灰分≤16.0%, 粗纤维≤8.0%, 总磷≥0.5%, 赖氨酸≥1.6%。发酵

饲料为生物饲料丰鱼肽宝 I 型(广西澳华农牧科技有限公司), 饲料成分和营养组成: 水分≤32.0%, 粗蛋白≥35.0%, 粗灰分≤12.0%, 粗纤维≤12.0%, 总磷≥0.4%, 赖氨酸≥1.8%, 有机酸≥2.0%, 益生菌总量为 3×10⁶ CFU/g。每日早晚 2 次投喂, 6 月饲料投喂量为鱼体重的 4%, 之后逐步下降, 10—11 月投喂量为 2%。发酵饲料按投喂总量的 20% 添加, 与膨化饲料混匀后直接投喂。持续投喂组即在 6 个月实验期间持续在膨化饲料中添加发酵饲料, 间隔投喂组即在膨化饲料中按周间隔添加发酵饲料, 空白对照组实验期间只投喂膨化饲料。

1.2 样品采集和处理

实验养殖周期 6 个月, 期间所有池塘开展正常养殖管理。11 月末养殖实验结束, 饥饿 24 h 后, 每口池塘随机捕捞 3 尾个体(每组 9 尾, 共 27 尾), 75% 酒精擦拭鱼体表面消毒后置于冰上迅速解剖, 取出肠道, 挤出肠道内容物于无菌 EP 管中, 经液氮速冻后于 -80 °C 保存, 用于后续分析。在实验结束后, 对各组实验用鱼的体质量进行测量, 测量前饥饿 24 h。

1.3 高通量测序和数据分析

实验组的肠道微生物总 DNA 使用 FastPure[®] 细胞/组织 DNA 试剂盒(DC102, 诺唯赞)提取。DNA 浓度和纯度使用 NanoDrop2000 检测。以通用引物 338F 和 806R 扩增 16S rRNA 基因 V3~V4 区。建库和测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。测序平台为 Illumina NovaSeqPE250, 对原始数据进行拼接质控后, 使用美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>) 进行数据分析, 共获得 1 133 769 个优化序列, 平均序列长度为 412 bp。

1.4 代谢组学测定

代谢物非靶向代谢组学测定由上海美吉生物医药科技有限公司进行。原始数据经去噪平滑、基线校正等 LC/MS 分析信息提取, 以及原始数据缺失值过滤和填充、数据归一化、数据转换等数据预处理, 最终得到用于后续分析的数据矩阵。预处理后的数据在美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>) 进行分析。

1.5 数据统计分析

实验数据使用 Excel 2020 和 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示, $P < 0.05$ 为差异显著。多样性指数分析, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA), 多重比较分析用 Duncan's

法进行。差异代谢物分析采用 Student's *T* 检验分析。

2 结果与分析

2.1 不同投喂方式对斑点叉尾鲷生长的影响

发酵饲料不同投喂方式喂养斑点叉尾鲷 6 个月, 称量各组实验鱼体重。结果发现, 间隔投喂组终末体重为(745.60±214.57) g, 显著高于对照组与持续投喂组($P<0.05$)。其中, 对照组终末体重为(588.10±168.62) g, 持续投喂组终末体重为(624.10±194.70) g。

2.2 不同投喂方式对斑点叉尾鲷肠道菌群多样性的影响

Simpson 指数值与群落多样性呈反比, 而 Shannon 指数值与群落多样性呈正比。持续投喂和间隔投喂方式下的斑点叉尾鲷肠道细菌群落 Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 指数和 Chao 指数无显著性差异($P>0.05$) (表 1)。间隔投喂组的 Shannon 指数最大, Simpson 指数最小, 说明间隔投喂肠道菌群多样性最大。ACE 指数和 Chao 指数反映群落丰富度, 间隔投喂组 ACE 指数和 Chao 指数最大, 说明间隔投喂组微生物群落的丰富度最高。持续投喂组的 Shannon 指数仅次于间隔投喂组, 但高于对照组, 说明添加发酵饲料可以改变斑点叉尾鲷肠道菌群的多样性, 并且发酵饲料不同投喂方式在不同程度上影响多样性。持续投喂组的 Simpson 指数大于对照组, 并且 ACE 指数和 Chao 指数小于对照组, 可见持续添加发酵饲料反而使得斑点叉尾鲷肠道菌群的多样性和丰富度有所下降(表 1)。

表 1 不同投喂方式对斑点叉尾鲷肠道菌群多样性的影响
Tab.1 Effects of different feeding methods on the diversity of intestinal bacterial community of channel catfish

| 指数 Index | 持续投喂组 Continuous feeding group (A) | 间隔投喂组 Interval feeding group (B) | 对照组 Control group (C) |
|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Shannon 指数 Shannon index | 3.10±0.48 | 3.89±0.29 | 3.05±0.88 |
| Simpson 指数 Simpson index | 0.20±0.10 | 0.07±0.03 | 0.19±0.13 |
| ACE 指数 ACE index | 358.61±75.28 | 490.52±71.98 | 436.08±72.11 |
| Chao 指数 Chao index | 353.53±73.19 | 472.86±73.31 | 426.22±67.92 |

注: 同一行中无字母表示差异不显著($P>0.05$)。

Note: Values in the same row without letter means no significant difference ($P>0.05$).

2.3 不同投喂方式对斑点叉尾鲷肠道微生物群落组成的影响

门水平上, 3 组中, 优势门是厚壁杆菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteriota)、蓝藻门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)、异常球菌门(Deinococcota)。与对照组相比, 持续投喂组和间隔投喂组的厚壁杆菌门相对丰度上升, 持续投喂组放线菌门和蓝藻门相对丰度下降, 而在间隔投喂组中放线菌门和蓝藻门相对丰度上升。变形菌门的相对丰度在持续投喂组最高, 在间隔投喂组中最低。同时, 3 组中, 间隔投喂组的梭杆菌门相对丰度最低, 绿弯菌门相对丰度最高, 而异常球菌门的相对丰度在持续投喂组中最低(图 1)。

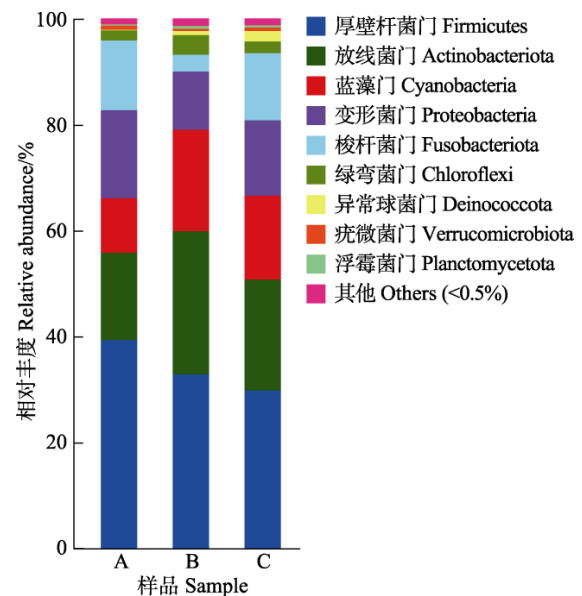


图 1 斑点叉尾鲷肠道微生物在门水平上的群落丰度
Fig.1 Community abundance at the phylum level in the intestine microbiota of the channel catfish

A: 持续投喂组; B: 间隔投喂组; C: 对照组。
A: Continuous feeding group; B: Interval feeding group; C: Control group.

属水平上, 未命名的叶绿体科中的一个属(*norank_f_norank_o_Chloroplast*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、狭义梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)在样本中占比较大。未命名的叶绿体科中的一个属和分枝杆菌属相对丰度在持续投喂组中最低, 而在间隔投喂组中相对丰度最高。与对照组相比, 间隔投喂组中鲸杆菌属相对丰度最低, 持续投喂组和间隔投喂组中罗姆布茨菌属和狭义梭菌属的相对丰度升高, 而条件致病菌葡萄球菌属的相对丰度降低(图 2)。

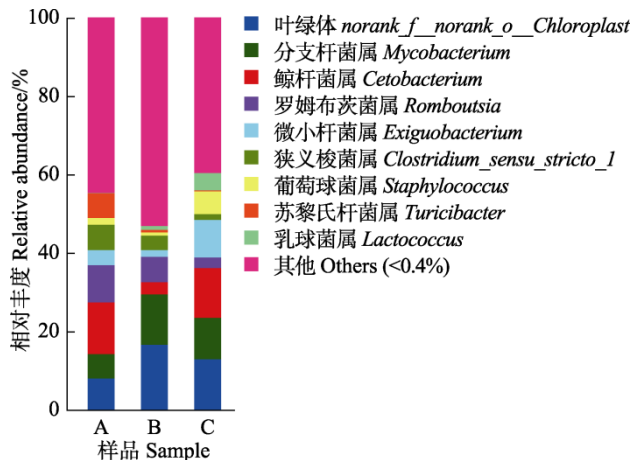


图 2 斑点叉尾鲷肠道微生物在属水平上的群落丰度百分比

Fig.2 Relative abundance of species at the genus level in the intestine microbiota of the channel catfish

A: 持续投喂组; B: 间隔投喂组; C: 对照组。

A: Continuous feeding group; B: Interval feeding group; C: Control group.

2.4 差异代谢物分析

采用 Student's *T* 检验对照组与持续投喂组之间的差异代谢物, 在正负离子模式下, 以 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 以及 $FC>1$ 或 $FC<1$ 对持续投喂组与对照组差异代谢产物进行筛选, 共获得 44 种显著差异代谢物。与对照组相比, 持续投喂组获得 24 个显著上调产物和 20 个显著下调产物, 其中, 差异代谢物胆酸甲酯、2-甲氧基-4-十五烷基苯甲酸极显著上调($P<0.01$), 而去甲基雷帕霉素、丙氨酰-脯氨酸极显著下调($P<0.01$)。与对照组相比, 间隔投喂组共有 3 种差异代谢物极显著下调($P<0.01$), 分别为 2-苯乙基 β -D-吡喃葡萄糖苷、*O*-琥珀酰-L-高丝氨酸和 2-吡啶羧酸。与持续投喂组相比, 间隔投喂组差异代谢物 2-甲氧基-4-十五烷基苯甲酸和尼亚齐米辛 A 显著下调($P<0.05$), 2-吡咯酰基甘氨酸和丙氨酰-脯氨酸显著上调($P<0.05$)。

2.5 代谢通路分析

KEGG 通路富集分析中, 当 $P<0.05$ 时, 认为此通路存在显著富集情况。对 P 值在前 10 的通路进行分析, 与对照组相比, 持续投喂组显著富集的代谢通路见图 3 I, 其中, 半乳糖代谢通路和磷酸转移酶系统通路都涉及上调代谢产物 *N*-乙酰-D-半乳糖胺($P<0.05$)。间隔投喂组显著富集的通路见图 3 II, 其中, 色氨酸代谢通路中差异代谢物 5-羟基-L-色氨酸和 L-犬尿氨酸的含量显著下调($P<0.05$)。同时, L-丝氨酸在硫代谢、鞘脂信号代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏

氨酸代谢及半胱氨酸和蛋氨酸代谢中显著上调($P<0.05$), 在持续投喂组与间隔投喂组之间显著富集的通路见图 3 III, 间隔投喂组托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成、癌症的中枢碳代谢、植物次生代谢产物的生物合成、植物激素的生物合成、苯丙烷类化合物的生物合成和鸟氨酸及赖氨酸和烟酸生物碱的生物合成代谢通路中 L-苯丙氨酸显著上调($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 投喂方式对斑点叉尾鲷肠道微生物群落的影响

本研究中, 在斑点叉尾鲷肠道中优势菌门为厚壁杆菌门、放线菌门、蓝藻门、变形菌门、梭杆菌门和绿弯杆菌门。耿彬等(2021)研究表明, 梭菌门、厚壁杆菌门、变形菌门和拟杆菌门是斑点叉尾鲷肠道中优势菌门; 熊向英等(2022)研究发现, 斑点叉尾鲷肠道中主要菌群是厚壁杆菌门、拟杆菌门和梭杆菌门, 合计占细菌总量 92.43%; 雷宇杰等(2020)研究表明, 在斑点叉尾鲷肠道中, 丰度前 3 分别是拟杆菌门、梭杆菌门和厚壁杆菌门。以上研究和本研究结果稍有不同, 本研究中, 拟杆菌门的占比很小, 可能是养殖环境差异造成的。

肠道微生物多样性被认为是宿主健康和代谢能力的指标, 低多样性表明肠道微生物群落稳定性差, 宿主患病风险大(Jena *et al*, 2018; 金若晨等, 2020)。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)病毒感染组的 Shannon 指数和 Pielou 均匀度显著低于对照组(朱文根等, 2019)。金若晨(2020)同样发现, 对健康池塘和发病池塘中的凡纳对虾进行多样性分析发现, 发病虾肠道菌群的多样性指数显著低于健康池塘, 并且菌群组成单一。本研究中, 与对照组相比, 持续投喂发酵饲料和间隔投喂发酵饲料斑点叉尾鲷肠道微生物群落的多样性均无显著差异, 但间隔投喂组的 ACE 指数和 Chao 指数值大于对照组和持续投喂组, 且 Shannon 指数最大, Simpson 指数最小, 说明间隔投喂组群落多样性和丰富度最高。结果表明, 间隔投喂可维持肠道菌群功能稳定, 降低斑点叉尾鲷患病的风险。

厚壁杆菌门中部分菌群有促进食物消化的功能, 拟杆菌门可参与糖类代谢和运输, 促进宿主生长, 为宿主提供能量(吴金凤等, 2016; 卢德胤, 2019)。厚壁杆菌门与拟杆菌门的比值与脂质代谢和存储呈正相关(Jiao *et al*, 2021)。放线菌门在肠道通透性调节、免疫调节及代谢中起着关键作用(Binda *et al*, 2018)。水体中含有大量的变形菌门细菌, 但大量出现在养殖动物肠道内则反映肠道群落的失调, 炎症反应发生的

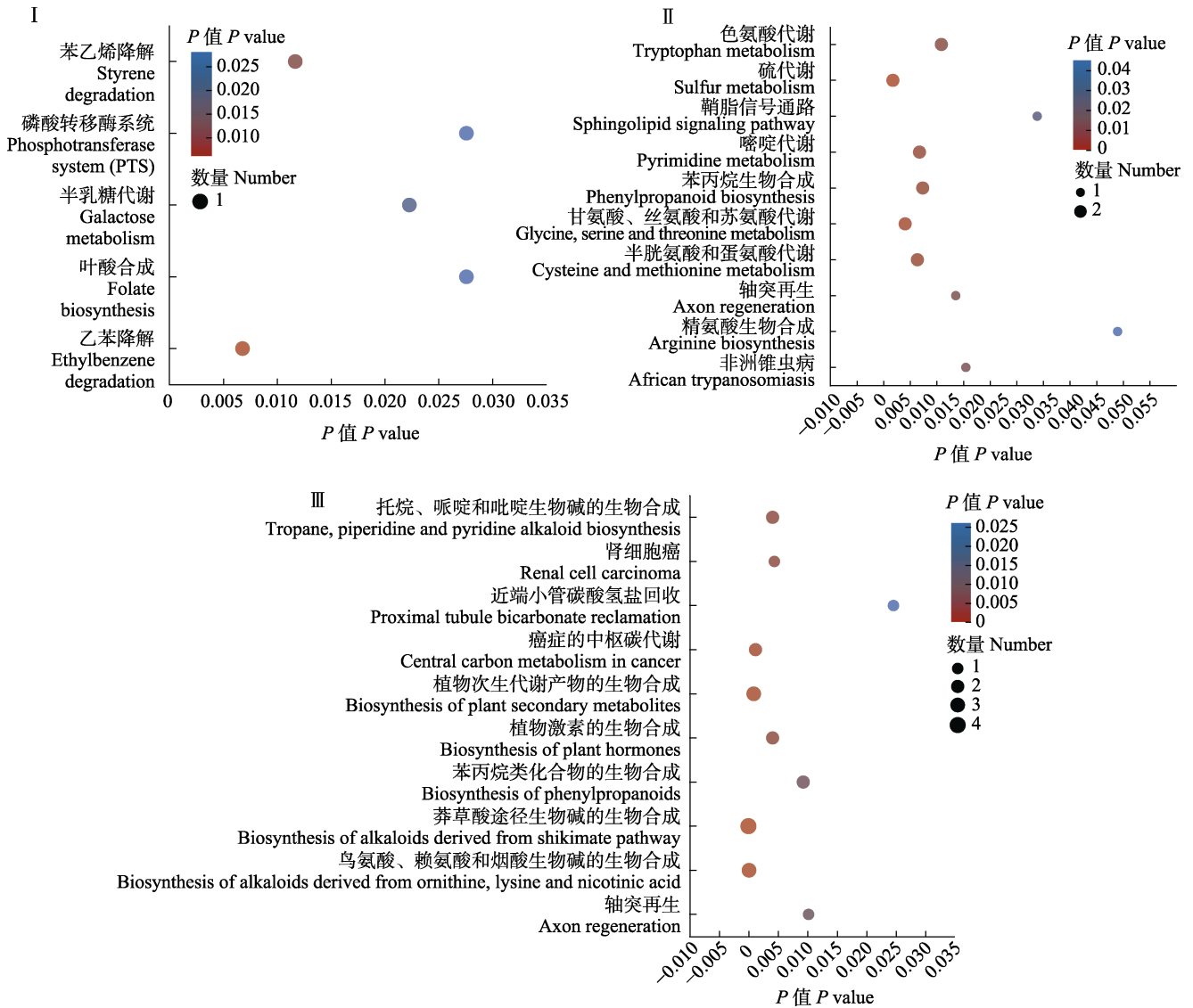


图 3 差异代谢通路富集分析
Fig.3 Differential metabolic pathway enrichment analysis

I : 对照组与持续投喂组差异代谢通路富集分析； II : 对照组与间隔投喂组差异代谢通路富集分析；
III : 持续投喂组与间隔投喂组差异代谢通路富集分析。

I : Enrichment analysis of differential metabolic pathways between control group and continuous feeding group;

II : Enrichment analysis of differential metabolic pathways between control group and interval feeding group;

III : Enrichment analysis of differential metabolic pathways between continuous feeding group and interval feeding group.

险增大(Shin *et al*, 2015)。本研究中，与对照组相比，持续投喂组和间隔投喂组中的拟杆菌门相对丰度下降，并且间隔投喂组中，厚壁杆菌门与拟杆菌门的比值最高，持续投喂组中，厚壁杆菌门与拟杆菌门的比值次之。持续投喂组的厚壁杆菌门相对丰度增加，放线菌门相对丰度降低，变形菌门的相对丰度增加。而在间隔投喂组中，厚壁杆菌门和放线菌门的相对丰度均增加，变形菌门的相对丰度相对对照组下降。持续投喂组和间隔投喂组中，厚壁杆菌门丰度无显著

差异($P>0.05$)，可见投喂发酵饲料可使肠道内厚壁杆菌门的丰度增加，可促进斑点叉尾鲷的消化吸收。间隔投喂组中，放线菌门丰度的增加有利于斑点叉尾鲷肠道内稳态和免疫的调节。而持续投喂组中，变形菌门占比的增加有诱发斑点叉尾鲷炎症反应的风险。梭杆菌门则与低密度脂蛋白胆固醇的含量呈正相关，与机体与脂类的利用率呈负相关(徐佳莹等, 2020)。同时，梭杆菌门也是水体中的条件致病菌，为革兰氏阴性菌。实验组中，间隔投喂组中梭杆菌门相对丰度最

低,梭杆菌门丰度的降低能提高宿主对脂质的利用,进而改善斑点叉尾鲷的消化吸收能力,降低患病率。

鲸杆菌属参与宿主维生素代谢,可产生维生素B12和抗菌肽,并且具有发酵多肽碳水化合物的功能(Roeselers *et al*, 2011)。李东亮(2016)的研究表明,鲸杆菌属丰度的降低反而会提高机体免疫力。本研究中,间隔投喂组的鲸杆菌属相对丰度最低,可在一定程度上提高鱼体的免疫力,而持续投喂组与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。罗姆布茨菌属可利用简单碳水化合物合成鱼体所需的氨基酸和维生素,进而促进鱼体生长(Koren *et al*, 2011)。梭菌属可以发酵碳水化合物和糖类,为鱼体提供营养和能量,进而促进生长,增强免疫功能(Larsen *et al*, 2014)。本研究中,属水平上,罗姆布茨菌属和梭菌属相对丰度在持续投喂组和间隔投喂组中的升高可促进鱼体对碳水化合物的代谢,不断给鱼体供能,促进其生长发育。乳球菌属是养殖动物肠道内重要益生菌,对宿主免疫调节有着重要作用,其在繁殖过程中可产生乳酸等抑制有害菌的入侵和生长(Tsuchiya *et al*, 2008)。然而,随着发酵饲料的投入,相比对照组,实验组中鱼体内乳球菌属的含量明显降低,乳球菌属含量在持续投喂组中最低,具体影响机制待进一步研究。苏黎世杆菌属属于双歧杆菌目,作为产短链脂肪酸的靶向菌群,可产丁酸,而丁酸在调节肠道健康、抑制炎症等方面意义重大(Feng *et al*, 2018)。车浩等(2022)研究发现,丁酸盐作为肠道菌群代谢产物,可通过G蛋白耦连受体促进肠道上皮屏障的形成,进而降低致病菌及其代谢产物对机体的影响。本研究中,苏黎世杆菌属在持续投喂组中的相对丰度最高,说明持续投喂发酵饲料可在一定程度上提高苏黎世杆菌属的相对丰度,通过其代谢产物丁酸调节肠道健康,增强抵制病原菌的能力。

同时,实验所用发酵料中含有的益生菌为芽孢杆菌和乳酸菌两大类。在肠道菌群组成分析中,芽孢杆菌属与乳酸杆菌属的相对丰度均 $<0.4\%$,占比很小。组间差异显著性检验结果表明,芽孢杆菌属与乳酸杆菌属在3组中无显著差异($P>0.05$),可以排除斑点叉尾鲷肠道菌群及代谢组学差异是由发酵饲料本身带来的。

3.2 投喂方式对斑点叉尾鲷肠道代谢组学的影响

有研究表明,乳酸球菌摄入乳糖或半乳糖主要通过酶系统和磷酸转移酶系统代谢乳糖和半乳糖(Wu *et al*, 2017)。本研究中,与对照组相比,持续投喂组富集的代谢通路是半乳糖代谢和磷酸转移酶系统代谢,且在物种组成分析中,持续投喂组乳球菌属相对

丰度最低,推测持续投喂组可能影响乳球菌属的半乳糖代谢和磷酸转移酶代谢作用,进而影响斑点叉尾鲷的能量代谢,具体作用机理有待研究。色氨酸代谢主要有3条代谢途径,其中,犬尿氨酸途径由限速酶介导,生成烟酸、犬尿酸、喹啉酸等,可参与神经递质、炎症和免疫反应(Kennedy *et al*, 2017)。研究表明,阿尔茨海默症小鼠血清中的犬尿氨酸浓度明显上升时,可引起神经毒性反应,造成认知损伤(王荣杰等, 2021)。本实验中,与对照组相比,间隔投喂组中色氨酸代谢产物5-羟基-L-色氨酸和L-犬尿氨酸含量显著下调。表明斑点叉尾鲷在间隔投喂发酵料后,下调色氨酸代谢产物L-犬尿氨酸,可降低斑点叉尾鲷神经毒性的发生。

L-丝氨酸可代谢为丙酮酸参与三羧酸循环,也可生成甘氨酸。同时,L-丝氨酸还能为蛋氨酸提供碳原子,促进相关功能代谢产物的合成,进而影响免疫因子的表达(Labuschagne *et al*, 2014; Maddocks *et al*, 2016)。甘氨酸参与肌酸、嘌呤、血红素等代谢产物的合成,在机体生命活动中发挥重要作用(Manso Filho *et al*, 2009)。蛋氨酸可参与多种代谢过程,如核苷酸和多胺的合成(Sanderson *et al*, 2019)。本研究间隔投喂组中,L-丝氨酸在硫代谢、鞘脂信号代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢及半胱氨酸和蛋氨酸代谢中显著上调,说明间隔投喂发酵料会使斑点叉尾鲷肠道菌群代谢产物L-丝氨酸显著上调,使斑点叉尾鲷获得更多的能量,其免疫表达水平得到提高。精氨酸是合成蛋白质、鸟氨酸、肌酸以及多胺的前体,其中,多胺中的腐胺和精胺影响细胞生长和调节(Puleston *et al*, 2017)。然而,高含量的腐胺具有遗传毒性,容易导致机体病变,诱导肿瘤的发生(Rist *et al*, 2013)。本研究间隔投喂组精氨酸生物合成代谢通路中,N2-乙酰-L-鸟氨酸显著下调,影响精氨酸的生物合成,进而降低腐胺等多胺的生成,保证细胞正常生长,预防斑点叉尾鲷机体病变。

同时,L-苯丙氨酸是机体的必需氨基酸,对机体的脂肪代谢和糖代谢有着促进作用(Aubi *et al*, 2021)。动植物缺乏苯丙氨酸,会导致酪氨酸合成受阻,造成甲状腺素水平下降,影响机体正常代谢活动,严重时影响智力水平(吴迪等, 2022)。与持续投喂组相比,间隔投喂组中托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成、癌症的中枢碳代谢、植物次生代谢产物的生物合成等6条代谢通路中的L-苯丙氨酸显著上调,说明间隔投喂发酵饲料可提高机体脂肪代谢和糖代谢,预防鱼体神经性疾病,促进斑点叉尾鲷健康生长。本研究中,间隔投喂组斑点叉尾鲷的终末体重显著高于对

照组与持续投喂组($P < 0.05$), 可见在斑点叉尾鲷养殖期间持续投喂发酵料, 不但增加养殖成本, 还使得饲料中营养成分利用率降低, 不利于鱼体增重。

4 结 论

本研究表明, 斑点叉尾鲷采用间隔投喂发酵饲料的投饲方式可提高其肠道菌群的 α 多样性, 提高鲸杆菌属、罗姆布茨菌属、梭菌属和苏黎世杆菌属等有益菌群的相对丰度, 降低条件致病菌葡萄球菌属的相对丰度, 还可增加鱼体终末体重。综上, 间隔投喂组的优势菌群在提高鱼体免疫力、抑制有害菌等方面优于持续投喂组, 并且可通过显著上调 *L*-丝氨酸和 *L*-苯丙氨酸含量, 影响硫代谢、氨基酸代谢等代谢通路, 提高斑点叉尾鲷免疫、抗炎症的能力, 再结合饲料成本, 养殖斑点叉尾鲷时采用间隔投喂发酵饲料的方式更有利于其生长和繁殖。

参 考 文 献

- AMABLE V I, VAIDÉZ AMARILLA M J, SALAS P L, *et al.* Fluoroquinolones and tetracyclines as growth factors in aquaculture: Increase of biometrical parameters versus emergence of resistant bacteria and residues in meat. *Aquaculture*, 2022, 561: 640–655
- AUBI O, PRESTEGARD K S, JUNG-KC K, *et al.* The *Pah-R261Q* mouse reveals oxidative stress associated with amyloid-like hepatic aggregation of mutant phenylalanine hydroxylase. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2073
- BINDA C, LOPETUSO L R, RIZZATTI G, *et al.* Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, 2018, 50(5): 421–428
- CHE H, YING X J, LI Z J, *et al.* Regulation of Toll-like receptors and their downstream factors by butyrate. *Acta Physiologica Sinica*, 2022, 74(5): 827–836 [车浩, 应晓江, 李振军, 等. 丁酸盐对 Toll 样受体及其下游因子的调节. *生理学报*, 2022, 74(5): 827–836]
- FENG W Q, WU Y C, CHEN G X, *et al.* Sodium butyrate attenuates diarrhea in weaned piglets and promotes tight junction protein expression in colon in a GPR109A-dependent manner. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 47(4): 1617–1629
- GENG B, CHEN K J, LIU X, *et al.* Effects of different supplemental levels of corn distillers' dried grains with soluble in diets on growth, body color, flesh color, serum biochemical indexes and intestinal microbiota structure of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(5): 2864–2874 [耿彬, 陈开健, 刘祥, 等. 饲料中添加不同水平玉米干酒糟及其可溶物对斑点叉尾鲷生长、体色、肉色、血清生化指标及肠道菌群结构的影响. *动物营养学报*, 2021, 33(5): 2864–2874]
- JENA P K, SHENG L L, NAGAR N, *et al.* The effect of synbiotics *Bifidobacterium infantis* and milk oligosaccharides on shaping gut microbiota community structure and NASH treatment. *Data in Brief*, 2018, 19: 1025–1029
- JIAO P, HU G, LIANG G, *et al.* Dietary supplementation with *Macleaya cordata* extract inclusion affects growth performance, rumen fermentation, bacterial communities, and immune responses of weaned lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 2021, 282: 115127
- JIN R C, JIANG M, SUN S Y, *et al.* Microbial community in *Litopenaeus vannamei* intestine and its aquaculture environment. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(12): 2037–2054 [金若晨, 江敏, 孙世玉, 等. 凡纳滨对虾养殖环境及肠道微生物群落特征分析. *水产学报*, 2020, 44(12): 2037–2054]
- JIN R C. Study on water quality and microbial community in *Litopenaeus vannamei* intestine and aquaculture environment. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020, 40–42 [金若晨. 凡纳滨对虾养殖池塘水质及养殖环境和虾肠道微生物群落结构研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020, 40–42]
- KENNEDY P J, CRYAN J F, DINAN T G, *et al.* Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology*, 2017, 112: 399–412
- KOREN O, SPOR A, FELIN J, *et al.* Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(S1): 4592–4598
- LABUSCHAGNE C F, VAN DEN BROEK N J F, MACKAY G M, *et al.* Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Reports*, 2014, 7(4): 1248–1258
- LARSEN A M, MOHAMMED H H, ARIAS C R. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm water fish species. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(6): 1396–1404
- LEI Y J, LIU K F, LI Z, *et al.* Effect of yeast culture on growth performance, nutrient digestibility, immunity and intestinal flora of juvenile channel catfish. *Feed Research*, 2020, 43(7): 52–57 [雷宇杰, 刘开放, 李峥, 等. 饲料添加酵母培养物对斑点叉尾鲷幼鱼生长性能、营养物质消化率、免疫性能和肠道菌群的影响. *饲料研究*, 2020, 43(7): 52–57]
- LI D L. Study of the intestinal flore structure of grass carp infection with *Aeromonas hydrophila*. Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016, 51–52 [李东亮. 感染嗜水气单胞菌草鱼肠道菌群结构研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2016, 51–52]
- LU D Y. Studies on molting, metabolomics and gut microbiotas under different foods and temperatures of Chinese mitten crab. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019, 37–39 [卢德胤. 不同饵料组合、温度对中华绒螯蟹的蜕

- 壳、代谢组学与肠道微生物研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019, 37–39]
- MADDOCKS O D K, LABUSCHAGNE C F, ADAMS P D, *et al.* Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through *de novo* ATP synthesis in cancer cells. *Molecular Cell*, 2016, 61: 210–221
- MANSO FILHO H C, COSTA H E, WU G, *et al.* Equine placenta expresses glutamine synthetase. *Veterinary Research Communications*, 2009, 33(2): 175–182
- MISCHKE C C. Channel catfish pond fertilization. *Aquaculture pond fertilization*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012, 135–146
- PULESTON D J, VILLA M, PEARCE E L. Ancillary activity: Beyond core metabolism in immune cells. *Cell Metabolism*, 2017, 26(1): 131–141
- RIST V T S, WEISS E, EKLUND M, *et al.* Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: A review. *Animal*, 2013, 7(7): 1067–1078
- ROESELERS G, MITTGE E K, STEPHENS W Z, *et al.* Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal*, 2011, 5(10): 1595–1608
- SANDERSON S M, GAO X, DAI Z, *et al.* Methionine metabolism in health and cancer: A nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 19: 625–637
- SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496–503
- SOCOL C R, COSTA E S F D, LETTI L A J, *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 2017, 1(1): 52–71
- SONG Z W, YANG F, LIU Y, *et al.* Residue depletion of danofloxacin in Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*) following multiple oral administration. *Aquaculture*, 2022, 562: 738–747
- TANG Y, LIU W L, SONG X L, *et al.* Effects of dietary with *Bacillus cereus* on the growth rate and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 766–774 [唐杨, 刘文亮, 宋晓玲, 等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长及其肠道微生物组成的影响. *水产学报*, 2017, 41(5): 766–774]
- TSUCHIYA C, SAKATA T, SUGITA H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(1): 43–48
- WANG H R, MO W Y, ZHAO H X, *et al.* Effects of adding *Clostridium butyricum* in diets on growth performance, serum biochemical indices, immune function and antioxidant ability of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 34(8): 1–9 [王海瑞, 莫文艳, 赵红霞, 等. 饲料添加丁酸梭菌对黄颡鱼生长性能及血清生化指标、免疫功能和抗氧化能力的影响. *动物营养学报*, 2020, 34(8): 1–9]
- WANG R J, HAN Y Q, WANG Z R, *et al.* Research progress in relationship between kynurenic acid and cognitive impairment. *Journal of Nanchang University (Medical Sciences)*, 2021, 61(5): 83–86 [王荣杰, 韩彦青, 王志荣, 等. 犬尿喹啉酸与阿尔茨海默病的研究进展. *南昌大学学报(医学版)*, 2021, 61(5): 83–86]
- WU D, WANG L, WANG L S. Research progress of phenylalanine in aquatic animals. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(7): 4189–4199 [吴迪, 王良, 王连生. 水产动物苯丙氨酸研究进展. *动物营养学报*, 2022, 34(7): 4189–4199]
- WU J F, XIONG J B, WANG X, *et al.* Intestinal bacterial community is indicative for the healthy status of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(2): 611–621 [吴金凤, 熊金波, 王欣, 等. 肠道菌群对凡纳滨对虾健康的指示作用. *应用生态学报*, 2016, 27(2): 611–621]
- WU Q, SHAH N P. The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods. *Food Microbiology*, 2017, 62: 178–187
- XIONG X Y, ZHAO Y F, WANG Z C, *et al.* Analysis of microbial community structure of channel catfish *Ictalurus punctatus* intestine and culture water. *Fisheries Science*, 2022, 41(4): 589–596 [熊向英, 赵艳飞, 王志成, 等. 斑点叉尾鲷肠道及其养殖环境菌群结构分析. *水产科学*, 2022, 41(4): 589–596]
- XU J Y, LI Y, XIE Z L, *et al.* Comparison of intestinal microbiota of three freshwater fishes in two regions of north and south China. *Acta Laser Biology Sinica*, 2020, 29(1): 68–74 [徐佳莹, 李演, 谢芝玲, 等. 三种淡水鱼类在中国南北两个地区的肠道菌群差异比较. *激光生物学报*, 2020, 29(1): 68–74]
- XU Y F. Research progress on application of *Bacillus licheniformis* in aquaculture. *Journal of Fisheries Research*, 2018, 40(1): 83–88 [徐亚飞. 地衣芽孢杆菌在水产养殖中的应用研究进展. *渔业研究*, 2018, 40(1): 83–88]
- YU M N, CHEN Y K, ZHANG Y R, *et al.* Application of microbial fermented feed in aquaculture. *China Feed*, 2021(2): 70–73 [于梦楠, 陈玉珂, 张宇柔, 等. 微生物发酵饲料在水产养殖中的应用. *中国饲料*, 2021(2): 70–73]
- ZHANG S H, WU J P, CHU Z P, *et al.* Effects of feeding *Bacillus subtilis* on growth and intestinal microflora of hybrid sturgeon. *Marine Fisheries*, 2021, 43(1): 71–80 [张书环, 吴金平, 褚志鹏, 等. 饲喂枯草芽孢杆菌对杂交鲟生长和肠道菌群结构的影响. *海洋渔业*, 2021, 43(1): 71–80]
- ZHANG Y, LU R, QIN C, *et al.* Precision nutritional regulation and aquaculture. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100496
- ZHONG L Q, SONG C, CHEN X H, *et al.* Channel catfish in China: Historical aspects, current status, and problems. *Aquaculture*, 2016, 465: 367–373

ZHU W G, LI X H, RAO L Y, *et al.* Effects of reovirus infection on the intestinal microbiota diversity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Acta Hydrobiologica Sinica*,

2019, 43(1): 109–116 [朱文根, 李星浩, 饶刘瑜, 等. 感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响. *水生生物学报*, 2019, 43(1): 109–116]

(编辑 冯小花)

Effects of Fermented Feed Feeding Mode on Intestinal Flora and Metabolomics of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)

ZHOU Liying^{1,2,3}, ZHONG Liqiang^{1,3}①, ZHANG Shiyong^{1,3},
CHEN Xiaohui^{1,3}, LIU Hongyan^{1,3}, WANG Minghua^{1,3}①

(1. *Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China;*

2. *College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;*

3. *Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China*)

Abstract This study performed rational feeding of fermented feed to channel catfish and determined its effects on growth, the intestinal bacterial community, and metabolomics of channel catfish. There were three groups: continuous feeding (A, continuous addition of fermented feed to the puffed feed), interval feeding involving weekly intervals addition of fermented feed added to the puffed feed (B), and the control group only fed the puffed feed (C). The experiment lasted 6 months. Channel catfish were weighed and the intestinal flora and metabolomics were detected by 16S rRNA sequencing technology and liquid chromatography-based metabolomics technology, respectively after the experiment. The final body weight (FBW) of channel catfish was significantly higher in the interval feeding group than that in the control group and the continuous feeding group ($P < 0.05$). The richness and microbial diversity of the intestine was the highest in the interval feeding group, while the richness of the continuous feeding group was the lowest ($P > 0.05$). Firmicutes, Actinobacteriota, Cyanobacteria, Proteobacteria, Fusobacteriota, Chloroflexi, and Deinococcota were the dominant bacterial phyla among the intestinal flora. The dominant intestinal genera included *norank_f_norank_o_Chloroplast*, *Mycobacterium*, *Cetobacterium*, *Romboutsia*, *Exiguobacterium* and *Clostridium_sensu_stricto_1*. Metabolomic analysis showed that the continuous feeding group mainly affected galactose metabolism and the phosphotransferase system of the intestinal flora in channel catfish through the significant upregulation of *N*-acetyl-*D*-galactosamine ($P < 0.05$) that affected the digestion and absorption of carbohydrates by fish. The differential metabolites *L*-serine and *L*-phenylalanine were significantly upregulated ($P < 0.05$) in the interval feeding group. This affected sulfur metabolism and amino acid metabolism of the intestinal flora, and affected energy absorption, anti-inflammation, and immunity of the channel catfish. This study provided a theoretical basis for the exploration of feeding methods using fermentation feed and healthy green breeding of channel catfish.

Key words *Ictalurus punctatus*; Fermented feed; Intestinal bacterial community; Metabolomics

① Corresponding author: ZHONG Liqiang, E-mail: stevezhong1985@163.com; WANG Minghua, E-mail: w19731224@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230109002

http://www.yykxjz.cn/

王旭蕾, 高进, 齐鑫, 王永波, 陈傅晓, 刘金叶, 符书源. 5 种石斑鱼全基因组微卫星筛选与特征分析. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 149–158

WANG X L, GAO J, QI X, WANG Y B, CHEN F X, LIU J Y, FU S Y. Screening and characteristics analysis of microsatellites in the whole genome of five groupers. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 149–158

5 种石斑鱼全基因组微卫星筛选与特征分析*

王旭蕾^{1,3} 高进^{1,2,4} 齐鑫³ 王永波^{1,2}
陈傅晓^{1,2} 刘金叶¹ 符书源^{1,2,4}^①

(1. 海南省海洋与渔业科学院 海南 海口 571126; 2. 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院 海南 三亚 572025; 3. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003; 4. 海南省热带海水养殖工程技术研究中心 海南 海口 571126)

摘要 为了解赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)、云纹石斑鱼(*E. moara*)、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)和鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)全基因组中微卫星的分布特征, 本研究使用 Micro-Satellite (MISA) 软件对公共数据库中获取的 5 种石斑鱼全基因组序列进行微卫星筛选, 分析了微卫星重复类型、重复拷贝类别及核心拷贝数的分布特征。结果显示, 在 5 种石斑鱼全基因组中, 均筛选出超过 28 万个微卫星位点, 相对丰度介于 271~296 个/Mb 之间, 平均长度在 22 bp 左右, 微卫星数量在全基因组中的占比为 0.59%~0.67%, 其重复类型数量、占比和相对丰度的分布趋势一致, 二碱基重复最多, 其次为单碱基, 且随着重复单元碱基数目的增加而减少。重复拷贝类别 A、AC、AAT、AAG、AGC、AATC、AAAT、AGAT、AATG、AGAGG、AAAAT、AAGAT、ACAGAG、AAANNN 和 AANNNN (N 为除 A 外其他 3 种碱基) 为优势类别。不同重复类型微卫星的拷贝数变化范围较大, 但每种重复类型的拷贝数变化趋势一致, 即随着拷贝数增加, 微卫星数目随之递减, 拷贝数为 6 和 12 时微卫星数目出现峰值。其中, 各个重复类型中均有拷贝数量尤为突出的位点: 鞍带石斑鱼中 T、TA 和 AGACAG 分别拷贝 502、803 和 48 次, 云纹石斑鱼中 GAG、CACT 和 CCACA 分别拷贝 205、652 和 111 次。5 种石斑鱼全基因组微卫星分布特征基本一致, 鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼中存在与其他 3 种石斑鱼显著差异的重复拷贝位点。本研究可为 5 种石斑鱼高质量微卫星分子标记开发提供数据参考, 并为其基因组进化、遗传变异、亲缘关系和新品种选育等方面的工作奠定基础。

关键词 石斑鱼; 全基因组; 微卫星; 分布特征

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0149-10

石斑鱼广泛分布于全球热带、亚热带的暖水性中下层水域, 是一种珊瑚礁鱼类。石斑鱼营养丰富、市场价值高、消费需求大, 为大宗海洋经济鱼类, 深受

消费者欢迎, 养殖潜力巨大(Ge *et al.*, 2019)。《中国渔业统计年鉴》数据显示, 我国石斑鱼养殖产量逐年上升, 2021 年产量超过 20 万 t, 同比上一年增长 6.29%

* 海南省重大科技计划(ZDKJ2021017)、海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目(320LH030)和海南省省级部门预算项目(KYL-2022-08)共同资助。王旭蕾, E-mail: wangxulei98@foxmail.com

^① 通信作者: 符书源, 副研究员, E-mail: fulank23@sohu.com

收稿日期: 2023-01-09, 收修改稿日期: 2023-03-12

(农业农村部渔业渔政管理局等, 2022), 位居我国海水养殖鱼类产量前十, 我国现已成为石斑鱼主产国(Rimmer *et al*, 2019)。然而, 随着养殖规模的扩大, 石斑鱼产业出现了种质退化、优质苗种匮乏等诸多问题(Shapawi *et al*, 2019), 亟需开展其重要经济性状遗传解析和良种选育工作。目前, 石斑鱼的良种选育主要采用选择育种和杂交育种等传统方式(Rimmer *et al*, 2019)。随着分子生物技术的快速发展和高通量测序成本的下降, SSR(micro-satellite)、SNP (single nucleotide polymorphism)等分子标记相继出现(黎裕等, 1999), 分子标记开发逐渐成为石斑鱼性状解析和遗传育种的重要手段。其中, 微卫星因具有遗传共显性、多态性高、信息含量丰富、种间可转移性好、可视化和基因组覆盖率高等优点(Deng *et al*, 2014), 被广泛应用于物种区分、群体遗传结构分析、遗传多样性评估、亲子鉴定和标记辅助选择育种等研究。

石斑鱼作为重要的海水经济鱼类, 其分子标记被广泛开发并应用。樊欣等(2022)利用 SSR 标记, 鉴定了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)人工雌核生殖子代的遗传物质来源。Xiao 等(2018)结合荧光 AFLP 标记技术揭示了七带石斑鱼(*Hyporthodus septemfasciatus*)养殖群体的遗传多样性和种群遗传结构。蒙子宁等(2007)利用 RAPD 技术分析了斜带石斑鱼繁育亲本与子代的遗传多样性。唐江等(2018)利用微卫星标记分析了新品种云石斑鱼[鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*) (♂)×云纹石斑鱼(*E. moara*)(♀)]与其父母本群体间的遗传变异情况。目前, 石斑鱼分子标记开发数量有限, 在育种上的应用也鲜有报道。因此, 开发大量具有实用价值的分子标记对提高石斑鱼育种效率具有重大意义。

近年来, 随着高通量测序技术的快速发展和测序成本的下降, 全基因组和转录组分析促进了石斑鱼分子标记的开发(Tóth *et al*, 2000; 高峰涛等, 2017)。目前, 赤点石斑鱼(*E. akaara*)、斜带石斑鱼、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、鞍带石斑鱼、云纹石斑鱼已完成全基因组测序。为开发与经济性状相关联的分子标记, 构建分子辅助育种技术体系, 本研究基于全基因组数据对 5 种石斑鱼 SSR 进行筛选, 并对其种类、数量进一步比较分析, 以期为具有生长、抗逆和抗病等性状的石斑鱼新品种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 微卫星位点筛选

从 CNGB (<https://www.cngb.org>)、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp>)和 Dryad (<https://datadryad.org/stash>)数据库中获取 5 种石斑鱼的基因组序列(Ge *et al*, 2019; Zhou *et al*, 2019、2021; Yang *et al*, 2021), 详细信息见表 1。利用 Micro-Satellite (MISA) 软件(<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) (Beier *et al*, 2017)进行 5 种石斑鱼基因组微卫星序列的筛选: 重复单元: 1~6 bp, 单碱基重复拷贝数 ≥ 12 , 二碱基重复拷贝数 ≥ 6 , 三、四、五和六碱基重复拷贝数均 ≥ 5 。

1.2 数据分析

导出 MISA 检索数据, 利用自编脚本整合数据, 挑选完美型微卫星, 利用 Excel 软件统计 5 种石斑鱼基因组完美型微卫星序列总长度、相对丰度(个/Mb; 微卫星数量/基因组总长度)、SSR 平均距离(bp/个; 基因组总长度/微卫星数量)、重复单元类型[微卫星重复拷贝序列中的碱基, 如(AT)₁₆中的 AT]、重复类型(单、二、三、四、五和六碱基重复)、核心拷贝数[重复单元出现的次数, 如: (AT)₁₆中的 16]、重复拷贝类别(表示重复类别具体由哪些碱基组成)。根据碱基互补配对原则和起始碱基顺序的排列差异, 将同类重复兼并为同一种重复拷贝类别, 如 AGC 类别包括 AGC、GCA、CAG、GCT、TGC 和 CTG, AGCG 类别包括 GCGA、CGAG、GAGC、AGCG、TCGC、CTCG、GCTC 和 CGCT (Jurka *et al*, 1995)。

2 结果与分析

2.1 5 种石斑鱼基因组各重复类型微卫星总体分布特征

从公共数据库中获取 5 种石斑鱼全基因组数据(表 1), 使用 MISA 软件与自编脚本筛选整合其完美型微卫星序列, 统计结果见表 2。5 种石斑鱼基因组大小均超过 1G, 微卫星相对丰度介于 271~296 个/Mb 之间, 总长度为 6.30~7.06 Mb, 平均长度为 22 bp 左右, 各统计参数总体差别不大, 分布规律一致。5 种石斑鱼各重复类型的数量、占比、相对丰度排序一致, 皆为二碱基重复最多, 其次为单碱基, 并随着重复单元碱基数目的增加而减少。

2 结果与分析

2.1 5 种石斑鱼基因组各重复类型微卫星总体分布特征

2.2 5 种石斑鱼基因组微卫星重复拷贝类别特征

通过分析 5 种石斑鱼基因组中各重复拷贝类别的特征发现, 不同和相同重复类别的数量、占比稍有差异, 但整体趋势一致(表 3 和表 4)。单碱基重复类别中, A、C 类别间数目差距巨大, A 类别重复的数

表 1 5 种石斑鱼全基因组信息

Tab.1 The information of whole genome in the five species of grouper

| 物种 Species | 登录号 Reference or Accession No. | 基因组大小 Genome size | Contig N50 | 组装质量 BUSCO analysis | 组装水平 Assembly level | 发表时间 Publish date |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i> | DRYAD: 4398b9f | 1.136 Gb | 5.25 Mb | 96.80% | Chromosome | 2019-06-25 |
| 点带石斑鱼 <i>E. coioides</i> | NCBI:GCA_900536245.1 | 1.024 Gb | 2.49 Mb | — | Scaffold | 2019-12-05 |
| 棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> | NCBI:GCA_011397635.1 | 1.047 Gb | 13.8 Mb | 97.49% | Chromosome | 2020-02-22 |
| 鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i> | NCBI:GCF_005281545.1 | 1.087 Gb | 119.9 kb | 96.40% | Chromosome | 2019-05-13 |
| 云纹石斑鱼 <i>E. moara</i> | NCBI:GCA_006386435.1 | 1.084 Gb | 2.22 Mb | 95.60% | Chromosome | 2020-05-26 |

表 2 5 种石斑鱼微卫星数量及分布特征

Tab.2 Amount and distribution of microsatellite in the five species of grouper genome

| 项目 Items | 赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i> | 斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i> | 棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> | 鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i> | 云纹石斑鱼 <i>E. moara</i> |
|--|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 基因组大小 Genome size/Mb | 1 135.73 | 1 023.56 | 1 047 | 1 087.42 | 1 083.59 |
| 微卫星总数 Microsatellites count | 307 537 | 284 438 | 310 028 | 297 402 | 305 214 |
| 微卫星总长度 Total length of microsatellites/bp | 6 877 655 | 6 304 559 | 7 056 845 | 6 421 185 | 6 854 645 |
| 平均长度 Average length/bp | 22.36 | 22.16 | 22.76 | 21.59 | 22.46 |
| 占基因组序列比例 Proportion of genome sequence | 0.61% | 0.62% | 0.67% | 0.59% | 0.63% |
| 相对丰度 Relative abundance/(pieces/Mb) | 270.78 | 277.89 | 296.11 | 273.49 | 281.67 |
| 单碱基数目及占比 Number and proportion of mononucleotide | 74 443 (24.21%) | 79 860 (28.08%) | 94 003 (30.32%) | 90 363 (30.38%) | 87 946 (28.81%) |
| 二碱基数目及占比 Number and proportion of dinucleotide | 166 081 (54.00%) | 146 363 (51.46%) | 151 984 (49.02%) | 146 940 (49.41%) | 152 421 (49.94%) |
| 三碱基数目及占比 Number and proportion of trinucleotide | 43 688 (14.21%) | 35 492 (12.48%) | 37769 (12.18%) | 36 367 (12.23%) | 37 942 (12.43%) |
| 四碱基数目及占比 Number and proportion of tetranucleotide | 18 531 (6.03%) | 17 563 (6.17%) | 20 970 (6.76%) | 18 583 (6.25%) | 20 430 (6.69%) |
| 五碱基数目及占比 Number and proportion of pentanucleotide | 4 069 (1.32%) | 4 664 (1.64%) | 5 015 (1.62%) | 4 839 (1.63%) | 5 679 (1.86%) |
| 六碱基数目及占比 Number and proportion of hexanucleotide | 725 (0.24%) | 496 (0.17%) | 287 (0.09%) | 310 (0.10%) | 796 (0.26%) |

量在 5 种石斑鱼基因组中占据绝对优势, 在该类别中占比达 90.00%左右(表 3)。在二碱基重复类别中, AC 类别数量占据绝对优势, 在该重复类别中占比接近 80.00%, 同时, 是所有重复拷贝类别中数量最多的类别(表 4); CG 类别含量最少, 在 5 种石斑鱼二碱基重复类别中仅占 0.04%~0.10%。三碱基重复类别中, 数量占前三的类别为 AAT、AGG 和 AGC, 比例分别为 29.62%~31.41%、17.38%~18.69%、12.55%~16.26%。

四碱基重复类别中, AATC、AAAT、AGAT 和 AATG 为优势类别, 4 种类别数量排序稍有不同, 但差距不大; 其中, 云纹石斑鱼中 AATC 类别的含量位居所有重复类别数量前十名。五碱基优势重复类别为 AGAGG、AAAAT 和 AAGAT; 其中, 赤点石斑鱼的重复类别数量排序与其他 4 种鱼类相比有些许差别。六碱基优势重复类别各不相同, 但多为 AAANN (N 代表除 A 以外的其他 3 种碱基)、AANNNN 和 ACAGAG。

2.3 5 种石斑鱼基因组微卫星序列重复拷贝数分布特征

通过分析 5 种石斑鱼基因组微卫星重复拷贝数,发现不同重复类型微卫星的拷贝数变化具有显著差异,但每种重复类型的重复拷贝数变化趋势一致,微卫星数量均随拷贝数的增加而减少(图 1)。5 种石斑鱼(赤点石斑鱼、斜带石斑鱼、棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼)单碱基重复拷贝数均集中在 12~25 次(图 1a),

分别占单碱基重复数量的 99.35%、96.54%、97.54%、95.39%和 97.34%。二碱基重复中,拷贝数主要集中在 6~32 次之间(图 1b),占二碱基重复数量的 97.53%、98.91%、98.58%、99.59%和 97.79%;其中,分布数量在 11~14 次之间小幅度上涨。在三碱基重复中,拷贝数主要集中于 5~16 次(图 1c),分别占 99.33%、99.18%、99.65%、98.99%和 99.34%。四碱基重复拷贝数主要集中在 5~17 次之间(图 1d),分别占 99.51%、

表 3 5 种石斑鱼各重复类型中前 3 种优势重复拷贝类别

Tab.3 The top three dominant duplicated copy categories for each duplication type in the five species of grouper genome

| 碱基 Bases | 赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i> | 斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i> | 棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> | 鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i> | 云纹石斑鱼 <i>E. moara</i> |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 单碱基 Mononucleotide | A(67 960)91.29% | A(69 052)86.47% | A(85 760)91.23% | A(80 222)88.78% | A(78 792)89.59% |
| | C(6 483)8.71% | C(10 808)13.53% | C(8 243)8.77% | C(10 141)11.22% | C(9 154)10.41% |
| 二碱基 Dinucleotide | AC(131 654)79.27% | AC(111 722)76.33% | AC(114 330)75.23% | AC(113 806)77.45% | AC(114 533)75.14% |
| | AG(20 244)12.19% | AG(20 214)13.81% | AG(23 389)15.39% | AG(20 993)14.29% | AG(23 630)15.50% |
| 三碱基 Trinucleotide | AT(14 121)8.50% | AT(14 362)9.81% | AT(14 210)9.35% | AT(12 046)8.20% | AT(14 109)9.26% |
| | AAT(13 119)30.03% | AAT(10 846)30.56% | AAT(11 187)29.62% | AAT(11 423)31.41% | AAT(11 697)30.83% |
| 四碱基 Tetranucleotide | AGG(7 595)17.38% | AGG(6 616)18.64% | AGG(6 749)17.87% | AGG(6 674)18.35% | AGG(7 090)18.69% |
| | AGC(7 102)16.26% | AGC(4 762)13.42% | AGC(5 503)14.57% | AGC(4 564)12.55% | AGC(4 994)13.16% |
| 五碱基 Pentanucleotide | AATC(3 684)19.88% | AATC(2 850)16.23% | AATC(3 417)16.29% | AATC(3 136)16.88% | AATC(4 593)22.48% |
| | AAAT(2 356)12.71% | AAAT(2 203)12.54% | AAAT(3 332)15.89% | AAAT(2 627)14.14% | AAAT(2 338)11.44% |
| 六碱基 Hexanucleotide | AGAT(2 291)12.36% | AGAT(1 954)11.13% | AATG(2 606)12.43% | AGAT(2 045)11.00% | AGAT(2 085)10.21% |
| | AGAGG(492)12.09% | AGAGG(598)12.82% | AGAGG(527)10.51% | AGAGG(586)12.11% | AGAGG(660)11.62% |
| 七碱基 | AAAAT(320)7.86% | AAGAT(357)7.65% | AAGAT(441)8.79% | AAGAT(409)8.45% | AAAAT(533)9.39% |
| | AAGAT(297)7.30% | AAAAT(319)6.84% | AAAAT(435)8.67% | AAAAT(402)8.31% | AAGAT(482)8.49% |
| 八碱基 | AAATAT(178)24.55% | AATCTG(52)10.48% | AAATCT(37)12.89% | AATCAG(20)6.45% | AATCTG(68)8.54% |
| | AAAATT(110)15.17% | AAATCT(46)9.27% | AAATAT(25)8.71% | ACAGAG(19)6.13% | AAATCT(67)8.42% |
| 九碱基 | AAATCT(98)13.52% | AATCAG(28)5.65% | ACAGAG(15)5.23% | AGATAT(13)4.19% | AATCTG(64)8.04% |

注: 括号内数字为该类别微卫星数量; 百分数为该类别所占该类型微卫星百分比。下表同。

Note: The number in parentheses refers to the number of microsatellites in this category, and the percentage refers to microsatellites in this category. The same below.

表 4 5 种石斑鱼中出现次数最多的 10 种重复拷贝类别的计数和百分比

Tab.4 The counts and percentage of most frequent top 10 duplicated copy categories observed in the five species of grouper

| 排序 Sort | 赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i> | 斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i> | 棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> | 鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i> | 云纹石斑鱼 <i>E. moara</i> |
|------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1 | AC(131 654) 79.27% | AC(111 722) 76.33% | AC(114 330) 75.23% | AC(113 806) 77.45% | AC(114 533) 75.14% |
| 2 | A(67 960) 91.29% | A(69 052) 86.47% | A(85 760) 91.23% | A(80 222) 88.78% | A(78 792) 89.59% |
| 3 | AG(20 244) 12.19% | AG(20 214) 13.81% | AG(23 389) 15.39% | AG(20 993) 14.29% | AG(23 630) 15.50% |
| 4 | AT(14 121) 8.50% | AT(14 362) 9.81% | AT(14 210) 9.35% | AT(12 046) 8.20% | AT(14 109) 9.26% |
| 5 | AAT(13 119) 30.03% | AAT(10 846) 30.56% | AAT(11 187) 29.62% | AAT(11 423) 31.41% | AAT(11 697) 30.83% |
| 6 | AGG(7 595) 17.38% | C(10 808) 13.53% | C(8 243) 8.77% | C(10 141) 11.22% | C(9 154) 10.41% |
| 7 | AGC(7 102) 16.26% | AGG(6 616) 18.64% | AGG(6 749) 17.87% | AGG(6 674) 18.35% | AGG(7 090) 18.69% |
| 8 | C(6 483) 8.71% | AGC(4 762) 13.42% | AGC(5 503) 14.57% | AGC(4 564) 12.55% | AGC(4 994) 13.16% |
| 9 | AAG(4 708) 10.78% | AAG(3 741) 10.54% | AAG(4 191) 11.10% | AAG(4 021) 11.06% | AATC(4 593) 22.48% |
| 10 | AAC(4 129) 9.45% | AAC(3 493) 9.84% | AAC(4 026) 10.66% | AAC(3 714) 10.21% | AAG(4 250) 11.20% |

99.41%、99.36%、99.81%和 99.65%；其中，AGAT 和 AAAG 重复拷贝数较大时分布数量较多。五碱基重复中，拷贝数主要集中在 5~14 次(图 1e)，分别占 98.21%、99.06%、99.52%、99.90%和 99.56%；其中，AAGAG、AATAT 和 AGAGG 重复拷贝数较大时，分布数量较多。在六碱基重复中，拷贝数主要集中于 5~12 次之间(图 1f)，分别占 100%、99.60%、100%、99.68%和 99.75%。

不同重复类型微卫星的重复拷贝数分布显示(图 2)，拷贝数在 6 和 12 次时微卫星分布数量出现峰值，并随着拷贝数的增加而递减；其中，微卫星数量在重复拷贝数为 6 次时最多，其数量在 4~5 万之间，分别占总微卫星数量的 16.75%、15.77%、14.78%、15.80%和 16.00%。此外，重复拷贝数最大的 SSR 位点均分布于鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼中。鞍带石斑鱼中重复拷贝数最大的位点为单碱基重复 T、二碱基重复 TA 和六碱基重复 AGACAG，分别重复 502、803 和 48 次。云纹石斑鱼的三碱基重复 GAG、四碱基重复 CACT、五碱基重复 CCACA 为重复拷贝数最大的位点，分别重复 205、652 和 111 次。

3 讨论

随着下一代测序(next generation sequencing, NGS)

技术的进步，全基因组、转录组序列等数据迅速积累，越来越多的微卫星被快速识别并应用。军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (马骞等, 2023)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (张芹等, 2022)、凡纳对虾(*Penaeus vannamei*) (王佳佳等, 2023)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) (崔建洲等, 2006)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*) (张永德等, 2020)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) (徐杰杰等, 2021)、金钱鱼(*Scatophagus argus*) (王耀嵘等, 2020)、斑鳢(*Channa maculata*) (上官清等, 2020)等都进行了基因组微卫星分子标记的筛选。本研究利用已发布的石斑鱼全基因组数据，筛选出大量微卫星位点。相比于 RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Ramirez *et al*, 2006) 和 AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Xiao *et al*, 2018)等一次性仅能开发 9 个和 600 个微卫星标记的传统方式，全基因组数据筛选微卫星数量多达 28 万个以上，数量更多，经济快捷，且覆盖范围广。

3.1 5 种石斑鱼微卫星全基因组分布分析

5 种石斑鱼全基因组数据筛选出的微卫星序列总长分别占各自基因组序列的 0.59%~0.67% (表 2)，低于人类(*Homo sapiens*)(3%)(Subramanian *et al*, 2003)、牛(*Bos taurus*)(4.7%)、绵羊(*Ovis aries*)(4.8%) (戚文华等,

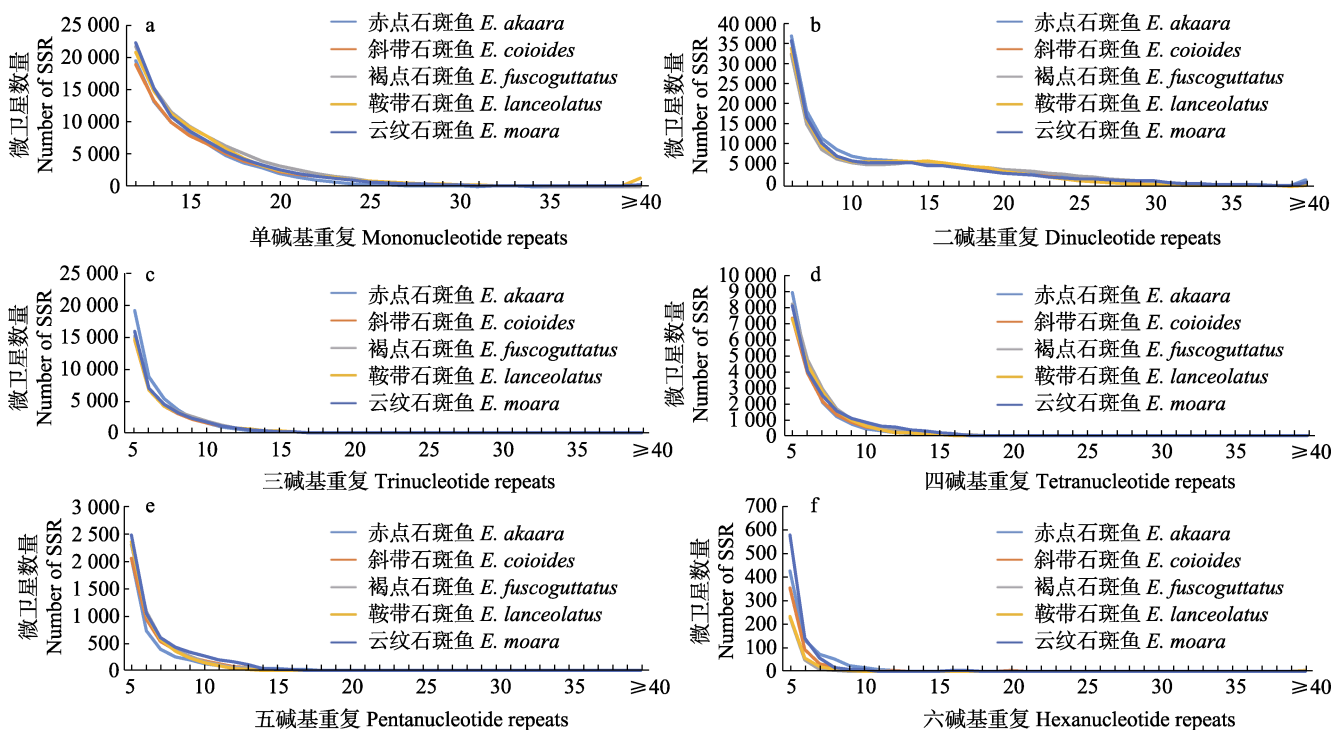


图 1 5 种石斑鱼全基因组中微卫星不同重复类型拷贝数分布

Fig.1 Distribution of copy numbers in different microsatellites repeat types in the whole genomes of five species of groupers

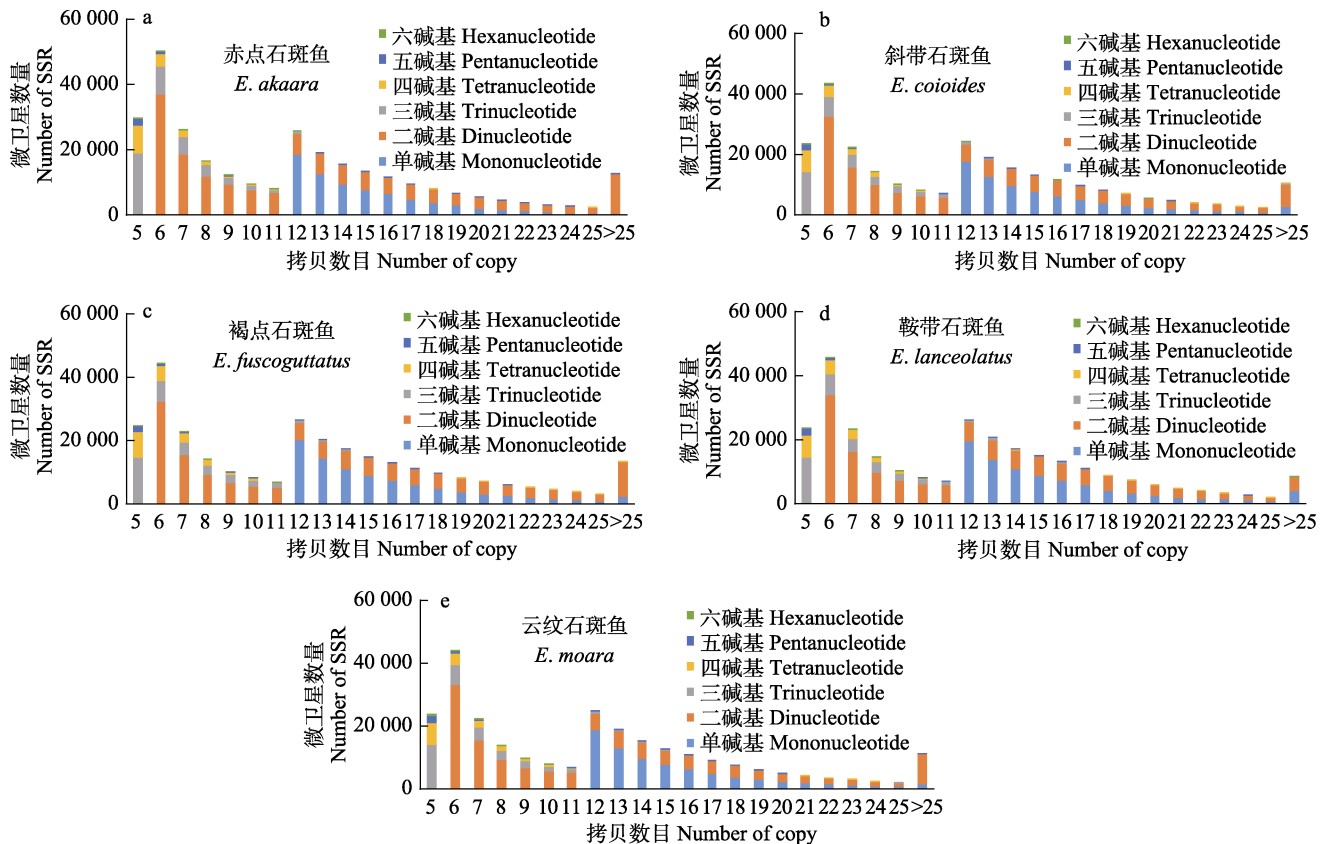


图2 5种石斑鱼微卫星各重复拷贝数分布特征

Fig.2 The distribution characteristics of copy numbers of microsatellite repeat in five species of groupers

2013)等哺乳动物所占比例;但棕点石斑与大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)(0.64%)(李午佼等, 2014)相比,所占比例较高。这种现象可能归因于基因组大小和基因组内碱基组成及排列方式的差异(Hancock, 1996)。在鱼类中,黄颡鱼(1.8%)(徐杰杰等, 2020)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(1.45%)(唐荣叶等, 2022)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(1.43%)(黄纬杰等, 2022)、红鳍东方鲀(0.77%)(崔建洲等, 2006)等鱼类微卫星在基因组序列中的比例均比石斑鱼高,表明5种石斑鱼基因组重复序列中可能存在稀疏性(Xu *et al*, 2020)。

在5种石斑鱼基因组中,除单碱基外,随着微卫星重复单元碱基数目的增加,微卫星分布频率均逐渐下降。与斑点叉尾鲷(唐荣叶等, 2022)、斑鳢(上官清等, 2020)、草鱼(黄纬杰等, 2022)等鱼类及与牛、绵羊(戚文华等, 2013)、大熊猫、北极熊(*Ursus maritimus*)(李午佼等, 2014)等哺乳动物中单碱基重复的微卫星优势类型不同,5种石斑鱼基因组中二碱基微卫星数目最多,占微卫星总数的49.02%~54.00%。导致此现象的原因之一是所用微卫星筛选软件及筛选规则不同。本研究采用碱基数目均 ≥ 12 bp原则,而其他动物的筛选规则采用单碱基从10 bp开始筛选(若本研

究采用 ≥ 10 bp筛选原则,则优势重复类型为单碱基)。但在豚鹿(*Axis porcinus*)(耿广耀等, 2022)等哺乳动物和金钱鱼(王耀嵘等, 2020)、凡纳对虾(王佳佳等, 2023)等水生动物中,二碱基微卫星是数量最具优势的碱基类型,与本研究结果一致。由此可见,不同物种的优势微卫星重复类型不同,而物种在微卫星分布上的差异一定程度上可以表现为物种基因组的进化现象。虽然优势类型不同,但各重复类型分布比例未有较大变化,表现出微卫星的进化保守性。

3.2 各重复拷贝类别微卫星特征分析

5种石斑鱼中,A类别的数量在单碱基重复中占据绝对优势,其比例为90%左右,与人类、大熊猫、北极熊、黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)、斑点叉尾鲷、草鱼等情况相似。这可能与上述动物中大量穿插的Alu和LINE-1(Long interspersed nuclear elements-1)等反转录序列和假基因有关(Edwards *et al*, 1998)。在二碱基重复中,AC、AG、AT类别在5种石斑鱼该重复拷贝类别的微卫星分布数量排行前三,而CG类别的含量最低,仅占据二碱基重复数量的0.04%~0.10%,CG类别重复在大部分物种中数量都极少(Tóth *et al*, 2000)。这是因为不同物种基因组内4种碱

基组成含量本身具有差异性,另一方面也可能是不同碱基存在结构上的问题(Edwards *et al*, 1998)。在三碱基重复中,排名前三的类别均为 AAT、AGG 和 AGC,其中, AAT 的高频率分布与人类、大熊猫、凡纳滨对虾、草鱼、红鳍东方鲀等大多数动物一致, AGG 与 AGC 在大多数物种中分布数量较少。有研究表明, AGG 是参与其他物种早期生长发育的许多转录因子已知结合位点,而 AGG 类别中的 GGA 和 GAA 重复序列能减弱大鼠(*Rattus norvegicus*)多聚免疫球蛋白受体基因的表达调控(徐杰杰等, 2021)。除此以外, AGC 类别的碱基重复多态性变化与遗传疾病直接相关,具有进化和医学研究意义。研究发现,在 AGC 类别的 CTG 重复序列中, CTG 作为肌营养不良症肌强直蛋白激酶(DMPK)基因 3'UTR 区的组成成分,其异常扩增会引起人 I 型强直性肌营养不良症(DM1)(Brook *et al*, 1992),同时出现男性不育、白内障、智力障碍、心律不齐等症状(Ergoli *et al*, 2020)。因此, AGG 和 AGC 类别的高频率分布很可能在石斑鱼免疫、疾病等基因的表达调控中发挥重要作用。在四、五、六碱基重复类别中, AAAN、AAAAN 和 AAAAAAN 类别均为各碱基重复类别中优势碱基类别的前 3 名,其中, AAAN 类别在哺乳动物中含量十分丰富(Tóth *et al*, 2000);而 AAAAN 在灵长类动物中分布较多,在啮齿类动物中较少。

3.3 不同微卫星重复类型的拷贝数特征分析

5 种石斑鱼全基因组中,各重复类型的微卫星总数均在重复拷贝数为 6 或 12 次时出现峰值,并均随着重复拷贝数的增加,微卫星分布数逐渐减少(图 2)。这与绒杜父鱼(*Hemitripterus villosus*)、金钱鱼、卵形鲳鲹等鱼类全基因组中微卫星的变化规律一致。这种各重复类型微卫星含量随序列长度变化的规律性现象,主要是由于微卫星的序列长度与其稳定性呈负相关,而微卫星的突变率与其重复拷贝数呈正相关,即微卫星序列越长,其稳定性降低,突变频率升高,导致数量越少(Wierdl *et al*, 1997);另一方面,单碱基和二碱基分别从 ≥ 12 和 ≥ 6 次重复开始筛选,因此,在这 2 个点形成了峰值。由此可见,不同的筛选原则导致不同物种得到的统计结果不同。然而,目前没有统一的微卫星筛选原则,在各个物种比较时出现结果与实际不符或无法比较的情况。

在比较 5 种石斑鱼各重复类型中重复拷贝数的分布时发现,鞍带石斑鱼(T、TA 和 AGACAG)和云纹石斑鱼(GAG、CACT、和 CCACA)存在重复拷贝数最大的微卫星位点。有研究表明, AT 是高等真核生

物中最具扩展性的重复类型,反映了鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼对应位点上的微卫星在进化过程中可能更容易扩张(Tóth *et al*, 2000)。该重复位点也可能在物种进化和生长等自身发展起到重要作用,对物种的适应性和生存能力产生影响。其中, GAG 重复序列是胃癌中具有高度微卫星不稳定性的突变靶点(Ge *et al*, 2019),其多态性的变化可能会导致疾病的发生。重复拷贝数的增加可能代表着相应功能的变化,因此,对核心拷贝数最高的重复类型进行进一步的研究,有助于探索石斑鱼的进化机制和功能表达。

目前,少见关于石斑鱼全基因组筛选微卫星的报道,而利用其他方式筛选出的微卫星标记多应用于石斑鱼遗传多样性的研究(Xiao *et al*, 2018; 蒙子宁等, 2007),在育种方面的应用研究较少。本研究利用生物信息学软件,在 5 种石斑鱼全基因组中筛选符合条件的微卫星,为进一步研究其基因组特征、进化、表达奠定基础。同时,利用在石斑鱼全基因组中筛选得到的微卫星位置信息,可为批量开发微卫星引物,为石斑鱼功能标记筛选、亲子鉴定及新品种培育等育种工作提供基础资料。

参 考 文 献

- BEIER S, THIEL T, MÜNCH T, *et al*. MISA-web: A web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics*, 2017, 33(16): 2583–2585
- BROOK J D, MCCURRACH M E, HARLEY H G, *et al*. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 1992, 68(4), 799–808
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2022. Beijing: China Agriculture Press, 2022, 22 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2022, 22]
- CUI J Z, SHEN X Y, YANG G P, *et al*. The analysis of simple sequence repeats in *Takifugu rubripes* genome. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(2): 249–254 [崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀基因组微卫星特征分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(2): 249–254]
- DENG Y W, LEI Q N, TIAN Q L, *et al*. De novo assembly, gene annotation, and simple sequence repeat marker development using Illumina paired-end transcriptome sequences in the pearl oyster *Pinctada maxima*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 78(10): 1685–1692

- EDWARDS Y J, ELGAR G, CLARK M S, *et al.* The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese puffer fish, *Fugu rubripes*: Perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 278(4): 843–854
- ERGOLI M, VENDITTI M, PICILLO E, *et al.* Study of expression of genes potentially responsible for reduced fitness in patients with myotonic dystrophy type 1 and identification of new biomarkers of testicular function. *Molecular Reproduction and Development*, 2020, 87(1): 45–52
- FAN X, ZHANG W W, WU Y C, *et al.* Introduction of diploid gynogenesis in orange-spot grouper *Epinephelus coioides* by giant grouper *Epinephelus lanceolatus* sper. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(11): 1675–1683 [樊欣, 张维伟, 吴廷昌, 等. 鞍带石斑鱼精子诱导斜带石斑鱼雌核生殖. *水生生物学报*, 2022, 46(11): 1675–1683]
- GAO F T, SHAO C W, CUI Z K, *et al.* Development and population genetic diversity analysis of microsatellite markers in *Epinephelus awoara*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2017, 47(4): 52–57 [高峰涛, 邵长伟, 崔忠凯, 等. 基于高通量测序的青石斑鱼基因组微卫星开发及评价. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(4): 52–57]
- GE H, LIN K B, SHEN M, *et al.* *De novo* assembly of a chromosome-level reference genome of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) using nanopore sequencing and Hi-C. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(6): 1461–1469
- GENG G Y, YOU Y Y, LIU Q X. SSR molecular marker development and genetic diversity analysis of *Axis porcinus*. *Chinese Journal of Wildlife*, 2022, 43(3): 816–820 [耿广耀, 由玉岩, 刘群秀. 豚鹿 SSR 标记开发与遗传多样性分析. *野生动物学报*, 2022, 43(3): 816–820]
- HANCOCK J M. Simple sequences in a “minimal” genome. *Nature Reviews Genetics*, 1996, 14(1): 14–15
- HUANG W J, GUO X Z, ZHANG Z H, *et al.* Analysis of microsatellite in the entire grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome and the application in parentage identification. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(2): 161–172 [黄纬杰, 郭向召, 张子豪, 等. 草鱼全基因组微卫星特征分析与亲子鉴定. *水产学报*, 2022, 46(2): 161–172]
- JURKA J, PETHIYAGODA C. Simple repetitive DNA sequences from primates: Compilation and analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 40(2): 120–126
- LI W J, LI Y Z, DU L M, *et al.* Comparative analysis of microsatellite sequences distribution in the genome of giant panda and polar bear. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, 33(6): 874–878 [李午佼, 李玉芝, 杜联明, 等. 大熊猫和北极熊基因组微卫星分布特征比较分析. *四川动物*, 2014, 33(6): 874–878]
- LI Y, JIA J Z, WANG T Y. Types of molecular markers and their development. *Biotechnology Information*, 1999, 15(4): 21–24 [黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展. *生物技术通报*, 1999, 15(4): 21–24]
- MA Q, WU Y W, WANG L Y, *et al.* Screening and characterization of polymorphic SSR markers based on whole genome sequencing of cobia (*Rachycentron canadum*). *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(4): 135–144 [马骞, 吴雨薇, 王刘永, 等. 军曹鱼全基因组微卫星特征分析与多态性标记的筛选及应用. *渔业科学进展*, 2023, 44(4): 135–144]
- MENG Z N, YANG L P, WU F, *et al.* Genetic diversity in cultured stocks of *Epinephelus coioides* by RAPD analysis. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, 26(2): 44–48 [蒙子宁, 杨丽萍, 吴丰, 等. 斜带石斑鱼养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析. *热带海洋学报*, 2007, 26(2): 44–48]
- QI W H, JIANG X M, XIAO G S, *et al.* Seeking and bioinformatics analysis of microsatellite sequence in the genomes of cow and sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(11): 1724–1733 [戚文华, 蒋雪梅, 肖国生, 等. 牛和绵羊全基因组微卫星序列的搜索及其生物信息学分析. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(11): 1724–1733]
- RAMIREZ M A, PATRICIA-ACEVEDO J, PLANAS S. New microsatellite resources for groupers (Serranidae). *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(3): 813–817
- RIMMER M A, GLAMUZINA B. A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily Epinephelinae) aquaculture from a sustainability science perspective. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11: 58–87
- SHANGGUAN Q, CHEN K C, LIU H Y, *et al.* Characteristics of microsatellites and genetic structure of wild *Channa maculata*. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(3): 47–60 [上官清, 陈昆慈, 刘海洋, 等. 斑鳢基因组中微卫星分布特征及野生种群遗传结构分析. *南方水产科学*, 2020, 16(3): 47–60]
- SHAPAWI R, ABDULLAH F C, SENOO S, *et al.* Nutrition, growth and resilience of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) × giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) hybrid: A review. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(4): 1285–1296
- SUBRAMANIAN S, MISHRA R K, SINGH L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: Their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biology*, 2003, 4(2): R13
- TANG J, TIAN Y S, LI Z T, *et al.* Analysis of genetic characters in *Epinephelus moara*, *E. lanceolaus* and their hybrids. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(5): 819–829 [唐江, 田永胜, 李振通, 等. 云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼及其杂交后代遗传性状分析. *农业生物技术学报*, 2018, 26(5): 819–829]
- TANG R Y, SU M Y, YANG W S, *et al.* Analysis of microsatellite distribution characteristics in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) genome. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 89–97 [唐荣叶, 苏孟园, 杨汶珊, 等. 斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 89–97]
- TÓTH G, GÁSPÁRI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 2000, 10(7): 967–981
- WANG J J, WANG Q, QIN Z, *et al.* Development of SSR

- markers from genomic data for *Litopenaeus vannamei* and analysis of genetic diversity in different cultured populations. *Journal of Fisheries of China*, 2023: 47(6): 64–74 [王佳佳, 王琼, 秦桢, 等. 凡纳滨对虾全基因组 SSR 标记开发及不同养殖群体的遗传多样性. *水产学报*, 2023: 47(6): 64–74]
- WANG Y R, YANG W, REN X L, *et al.* Distribution patterns of microsatellites and development of polymorphic markers from *Scatophagus argus* genome. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(4): 7–14 [王耀嵘, 杨尉, 任席林, 等. 金钱鱼基因组微卫星分布特征分析及多态性标记开发. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(4): 7–14]
- WIERDL M, DOMINSKA M, PETES T D. Microsatellite instability in yeast: Dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*, 1997, 146(3): 769–779
- XIAO Y S, GUAN S G, LIU Q H, *et al.* Genetic characteristics of broodstock and offspring of the seven-band grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*) using fluorescent-AFLP markers. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2018, 98(2): 261–267
- XU J J, ZHENG X, LI J, *et al.* Distribution characteristics of whole genome microsatellite of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5488–5498 [徐杰杰, 郑翔, 李杰, 等. 黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 全基因组微卫星分布特征分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5488–5498]
- XU J J, ZHENG X, ZHANG X Y, *et al.* Analysis of distribution characteristics of microsatellites in four genomes of puffer fish. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(4): 1441–1451 [徐杰杰, 郑翔, 张鑫宇, 等. 4 种河鲀全基因组微卫星分布特征分析. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(4): 1441–1451]
- YANG Y, WANG T, CHEN J F, *et al.* Whole-genome sequencing of brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) provides insights into adaptive evolution and growth differences. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 22(2): 711–723
- ZHANG Q, WANG Y H, WANG B K, *et al.* Characterization of genomic microsatellites and development of SSR markers of *Megalobrama amblycephala*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(3): 79–85 [张芹, 王延晖, 王冰柯, 等. 团头鲂基因组微卫星特征及 SSR 位点开发. *江苏农业科学*, 2022, 50(3): 79–85]
- ZHANG Y D, WEN L T, LUO H L, *et al.* Genome survey and development of SSR molecular markers for *Trachinotus ovatus*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(5): 983–994 [张永德, 文露婷, 罗洪林, 等. 卵形鲳鲹基因组调研及其 SSR 分子标记的开发应用. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 983–994]
- ZHOU Q, GAO H Y, XU H, *et al.* A chromosomal-scale reference genome of the kelp grouper *Epinephelus moara*. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(1): 12–16
- ZHOU Q, GAO H Y, ZHANG Y, *et al.* A chromosome-level genome assembly of the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) provides insights into its innate immunity and rapid growth. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(5): 1322–1332

(编辑 冯小花)

Screening and Characteristics Analysis of Microsatellites in the Whole Genome of Five Groupers

WANG Xulei^{1,3}, GAO Jin^{1,2,4}, QI Xin³, WANG Yongbo^{1,2}, CHEN Fuxiao^{1,2}, LIU Jinye¹, FU Shuyuan^{1,2,4}①

(1. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, China;

2. Yazhou Bay Innovation Institute, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572025, China;

3. Ocean University of China, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

4. Hainan Provincial Engineering Research Center for Tropical Sea-Farming, Haikou 571126, China)

Abstract Grouper, a species of coral reef fish, exhibits a wide geographical distribution within the warm waters of the tropical and subtropical regions across the globe, primarily inhabiting the middle and lower layers of water. Characterized as a substantial marine economic fish, grouper possesses considerable nutritional value, boasts a high market worth, and garners significant consumer demand. Its popularity among consumers is attributed to its inherent attributes, and it holds immense potential for further cultivation and breeding endeavors. This study utilized micro-satellite (MISA) software to investigate the distribution characteristics of microsatellites in the genomes of five grouper species (*Epinephelus akaara*, *E. coioides*, *E. fuscoguttatus*, *E. lanceolatus*, and *E. moara*). A custom script was

① Corresponding author: FU Shuyuan, E-mail: fulank23@sohu.com

developed to analyze the screening results, and statistical analyses were conducted on the microsatellite repeat types, duplicate copy types, and core copy numbers in the genomes of the five grouper species. Over 280 000 microsatellite sites were identified from the entire genomes of the five grouper species. The relative abundance of microsatellites ranged from 271–296, with a total length ranging from 6.30–7.06 Mb. The average length of the microsatellites was approximately 22 bp, and their proportion in the genomes ranged from 0.59%–0.67%. These results provide insights into the distribution characteristics of microsatellites in the genomes of these five grouper species and can inform future studies on their genomic architecture and evolution. The repetitive types of microsatellites were analyzed in terms of number, proportion, and relative abundance. The number, proportion, and relative abundance of repetitive types followed a consistent pattern, with the highest number of double base repeats, followed by single base repeats. This pattern decreased as the number of repeat units increased. A, AC, AAT, AAG, AGC, AATC, AAAT, AGAT, AATG, AGAGG, AAAAT, AAGAT, ACAGAG, AAANN, and AANNNN (N represents any of the three bases except A) were the most dominant types of each duplicate copy type. Type A accounted for 90.00% of single base repeats, while type AC was the most dominant in double base repeats, accounting for nearly 80.00%. Interestingly, the content of the CG duplication category was the least, accounting for only 0.04%–0.10% in the five grouper species. This may be owing to the fact that the composition content of the four bases in the different species' genomes is different, and there may be structural problems with different bases. The results of this study provide insight into the distribution characteristics of microsatellites in the genomes of these five grouper species. The high frequency distribution of AGG and AGC in the dominant types of triple base repeats may play a crucial role in regulating genes involved in immunity, disease, and other genes in groupers. Previous studies show that AGG is a well-known binding site for numerous transcription factors involved in early growth and development of various species. Additionally, the change of base repeat polymorphism of the AGC category is directly linked to genetic diseases and holds significant evolutionary and medical research value. AAAN, AAAAN, and AAAAAN are dominant repeat types that are widely distributed in mammals among the four, five, and six base repeat types, respectively. Different types of microsatellites show significant variability in the number of core copy numbers. Nevertheless, the number of duplicate copies of each type of microsatellite exhibit a consistent trend in the five groupers, and the number of microsatellites decrease with an increase in the number of duplicate copies. The analysis of microsatellite distribution revealed several key findings. First, over 95% of single base repeat copies were concentrated in a range of 12 to 25 times. The main number of copies for two base repeats ranged from 6 to 32 times, with a small peak between 11 and 14 copies, and decreasing numbers with increasing copies. The number of copies for four and five base repeats was mainly concentrated in the ranges of 5–16 and 5–17, and 5–14, respectively. Notably, AGAT, AAAG, AAGAG, AATAT, and AGAGG repeats exhibited a large number of copies, even when the number of copies was high. The increase in copy number may represent changes in polymorphism at these loci that may lead to disease or changes in corresponding functions. Overall, these findings provide important insights into the distribution and potential functional significance of microsatellites in the genome of the studied species. The distribution characteristics of microsatellites in the genomes of the five groupers provide a valuable basis to understand the evolutionary mechanisms and functional expression of these species. The distribution of duplicate copy numbers of each type of duplication displays two peaks at 6 and 12 repetitions, with the number of microsatellites decreasing with increasing numbers of core copies. Some duplication types show particularly prominent numbers in specific species, such as T, TA, and AGACAG in *E. lanceolatus*, copied 502, 803, and 48 times respectively; GAG, CACT, and CCACA in *E. moara*, copied 205, 652, and 111 times respectively. These variations highlight the importance of exploring the role of microsatellite loci to develop a better understanding of the genetic distance and kinship among the five groupers. This analysis lays the groundwork to develop high-quality microsatellite molecular markers, and facilitates the selection of favorable varieties and the development of new varieties. In general, these research results provide important data to understand the genomic characteristics of the five groupers and helps to conduct advanced genetic research on these species.

Key words Grouper (*Epinephelus*); Whole genome; Microsatellite; Distribution characteristics

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221227001

http://www.yykxjz.cn/

王立威, 李薨, 宋协法, 李贤, 董登攀, 陈钊, 白雪松. 投喂率对凡纳对虾中间培育生长、生理和水环境的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 159-170

WANG L W, LI M, SONG X F, LI X, DONG D P, CHEN Z, BAI X S. Effects of feeding rate on the intermediate cultivation of *Penaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 159-170

投喂率对凡纳对虾中间培育生长、 生理和水环境的影响



王立威¹ 李薨¹ 宋协法^{1①} 李贤¹
董登攀¹ 陈钊² 白雪松³

(1. 中国海洋大学水产学院海洋生物水环境工程重点实验室 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071;

3. 东营市阔海水产科技有限公司 山东 东营 257000)

摘要 中间培育是凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)养殖的重要阶段, 投喂率是影响此阶段养殖成效的重要参数。本研究开展为期 30 d 的养殖实验, 研究 3 组投喂率(投喂率分别为体重的 5%、7.5%、10%, 分别命名为 T5、T7.5 和 T10)对凡纳对虾中间培育养殖水质、微生物群落结构、非特异性免疫指标及生长性能的影响。实验期间, 水体 pH、盐度、温度及溶解氧均保持在适宜对虾生长的范围内。结果显示, 随着实验进行, 总氨氮(TAN)、亚硝态氮(NO₂-N)和化学需氧量(COD)浓度出现上升趋势, 实验结束时, 其浓度随投喂率升高呈现显著差异: T10>T7.5>T5。微生物群落结构分析表明, 养殖水体的微生物群落丰富度和多样性随投喂率升高呈下降趋势, 不同投喂率的优势门类均为变形菌门(Proteobacteria, 50.36%~67.53%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 12.09%~67.53%); 在属水平上, 对凡纳对虾有害的弧菌(*Vibrio*)相对丰度在 T10 组最高(37.33%)、T5 组最低(0.13%); 对其有益的假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)相对丰度在 T10 组最低(0.28%)、T7.5 组最高(9.78%)。凡纳对虾肝胰腺的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性在 T10 组最低、T7.5 组最高($P<0.05$)。T7.5 和 T10 组对虾的体长和体重均显著大于 T5 组($P<0.05$), 但 T7.5 和 T10 组之间无显著差异($P>0.05$), 投喂率与存活率呈负相关, 且 3 组间存在显著差异($P<0.05$)。利用因子分析对非特异性免疫指标和生长指标进行综合评价, 结果表明, T7.5 组得分最高, 为 0.92, 凡纳对虾中间培育的投喂率在 7.5% 左右为宜。

关键词 投喂率; 凡纳对虾; 中间培育; 养殖水环境; 非特异性免疫; 生长性能; 综合得分
中图分类号 S966.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0159-12

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)生长速度快、产量高、肉质鲜美, 为我国的主要养殖虾类(Jin *et al.*, 2018)。凡纳对虾分段养殖对提高虾苗的环境适应能力, 降低病害和苗种质量的负面影响, 提高养殖成功

率具有重要的意义, 目前已成为对虾养殖的主要模式之一(李俊伟等, 2016)。中间培育(又称“标粗”)是凡纳对虾养殖的重要阶段, 经此阶段的虾苗生长状态良好, 有利于后续养殖(赵玉超等, 2019)。

* 国家重点研发计划(2019YFD0900500)资助。王立威, E-mail: wangliwei@stu.ouc.edu.cn

① 通信作者: 宋协法, 教授, E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2022-12-27, 收修改稿日期: 2023-01-14

目前,凡纳对虾养殖高度依赖饵料投喂,最优的投喂率是获得更大养殖效益的基础(Luo *et al.*, 2021)。投喂率是指饵料量占养殖对象体重的百分数,是影响对虾工厂化养殖的重要因素(褚志鹏等, 2020),也是影响养殖物种存活率和特定生长率的重要因素。投喂率过低会使养殖对象生长缓慢,影响正常发育(Hung *et al.*, 1989);投喂率过高会增加养殖成本,造成残饵过量堆积,引起水质恶化、滋生病菌,导致养殖对象死亡等(刘文逵等, 2007; Silva *et al.*, 2007)。因此,有必要确定适当的投喂率,以提高饵料效率,进而满足可持续水产养殖的需要。有学者从外源和内源因素的角度分别分析了外界环境改变对凡纳对虾生长、生理和水环境的影响机制,如 Kaya 等(2020)在生物絮团养殖模式中,研究不同投喂率对凡纳对虾生长性能的影响;宫晗等(2023)研究工厂化循环水养殖系统水质指标与微生物群落结构的影响;邢明威等(2022)研究不同饵料投喂对凡纳对虾非特异性免疫的影响。但在中间培育期间,投喂率的确定依赖于养殖经验,缺乏科学依据,鲜有学者对投喂率综合影响进行全面研究。因此,迫切需要阐述不同指标之间的内在联系,确定适宜中间培育的投喂率。

综上,本研究通过分析不同投喂率对凡纳对虾中间培育水质条件、微生物群落结构、非特异性免疫及生长性能的影响,阐明投喂率与中间培育养殖水体及对虾生理、生长指标之间的内在关系,确定凡纳对虾中间培育的适宜投喂率,以期为提高凡纳对虾养殖成功率提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 样品获取与实验条件

实验在山东省东营市阔海水产有限公司对虾养殖车间进行,随机选取活力好的凡纳对虾仔虾[平均每尾体重为(5.0±0.5) mg]开展实验研究。

1.2 实验设计

根据前期养殖经验,中间培育投喂率为对虾体重的6%~8%,因此,本实验设置3个投喂梯度(投喂率分别为体重的5%、7.5%和10%,分别命名为T5、T7.5和T10),每个实验组设置3个重复。实验期间,每日于06:00、10:00、14:00、18:00和22:00进行投喂,每次投喂率分别为体重的1%、1.5%和2%,每隔6d,随机抽取部分对虾,称量其体重,随之对投喂量进行调整。实验使用容积为200L的养殖桶(聚乙烯材质,上直径为0.79m,下直径为0.59m,高为0.71m)。

养殖过程中投喂浙江恒兴饲料有限公司生产的标粗专用饲料(赖氨酸≥2.8%、粗蛋白≥49.0%、粗脂肪≥7.5%、灰分≤15.0%、总磷1.0%~2.0%、水分≤10.0%)。养殖密度为5000尾/m³,每个养殖桶虾苗数量为1000尾。整个实验持续30d,保证24h持续充氧,每2d更换1/3水体,更换水体前清理桶内残饵粪便。

1.3 对虾指标测定

实验开始和结束时,在每个养殖桶内随机捞取凡纳对虾10尾,使用游标卡尺和分析天平测定其体长和体重。根据公式计算对虾存活率和特定生长率。

$$\text{存活率(survival rate, SR, \%)} = (X_2/X_1) \times 100\%$$

$$\text{特定生长率(specific growth rate, SGR, \% / d)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / t \times 100\%$$

式中, X_1 代表初始对虾尾数; X_2 代表终末对虾尾数; W_1 代表初始对虾体重; W_2 代表终末对虾体重; t 为养殖天数。

1.4 水质指标测定

在养殖期间,每隔2d取水样进行水质测定。利用YSI多参数水质分析仪测定温度、溶解氧、pH和盐度。总氨氮(TAN)和亚硝态氮(NO₂-N)分别采用次溴酸盐氧化分光光度法和萘乙二胺分光光度法进行测定(GB17378.4-2007),化学需氧量(COD)利用高锰酸钾氧化滴定法进行测定。

1.5 非特异性免疫指标测定

实验结束时,在每个养殖桶内随机抽取5尾对虾,用无菌海水冲洗干净体表附着物,在无菌条件下解剖对虾,取出肝胰脏,保存于-80℃冰箱。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)均采用南京建成生物工程研究所有限公司试剂盒测定。

1.6 微生物群落多样性测定

实验结束时,在每个养殖桶内取水样0.5L,用于养殖水体微生物群落分析。水样均用0.22μm孔径无菌滤膜进行抽滤。抽滤后的滤膜使用Illumina MiSeq测序平台(Illumina, 美国)进行16S rRNA深度测序。利用PCR对16S rRNA的V3~V4区域进行特异性扩增,上游引物为338F: ACT CCTACGGGAGGCAGCA,下游引物为806R: GGAC TACHVGGGTWTCTAAT。PCR完成后,切胶回收PCR产物,用QuantiFluor-ST蓝色荧光定量系统(Promega)进行定量检测,每个样品的扩增根据DNA浓度以相同的摩尔比混合。最后,

在 Illumina MiSeq 平台上对纯化后的混合物进行测序。

1.7 因子分析目的和过程

根据前期所得数据,利用因子分析把数据进行降维,整合为数量较少的公共因子,用具有代表性的公共因子来表达不同变量之间的相互关系。利用 IBM SPSS 25.0 统计软件对原始数据进行标准化处理,进行 KMO 检验和 Bartlett 球形检验,当检验结果表明数据的大部分信息可以被公共因子解释,则可以进行因子分析。通过计算,得到因子载荷矩阵,利用凯撒正态化最大方差法进行旋转,得到旋转后的载荷矩阵。根据所得矩阵,构建因子综合评价模型,由此根据综合得分确定排名。

1.8 数据分析与处理

使用 Microsoft Excel 软件进行数据统计,实验所得数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 IBM SPSS 25.0 统计软件进行显著性分析、单因素方差分析(one-way ANOVA)、因子分析,以 $P<0.05$ 表示差异显著,以 $P<0.01$ 表示差异极显著。使用 Qiime 软件计算 α 多样性指数,使用“pheatmap”软件包绘制微生物菌群热图,使用“vegan”软件包进行冗余分析(RDA),微生物菌群分析在上海美吉生物医药科技有限公司 I-sanger 云平台完成。

2 结果

2.1 投喂率对养殖水质的影响

整个养殖过程中, pH、盐度、温度和溶解氧均保持在适宜对虾生长的范围内,具体数据如表 1 所示。不同投喂率养殖水体中 TAN、NO₂-N 和 COD 的浓度变化曲线如图 1 所示,随着养殖的进行,各组 TAN、NO₂-N 和 COD 的浓度均呈逐渐升高的趋势,且投喂率越高, TAN、NO₂-N 和 COD 的浓度越高。当养殖结束时,3 个投喂组中 TAN 浓度分别为 4.76、6.87 和 7.85 mg/L,差异显著($P<0.05$)。NO₂-N 浓度在养殖前期积累缓慢,养殖后期的 NO₂-N 浓度显著升高,实验结束时,其浓度分别为 1.35、1.98 和 2.95 mg/L,差异显著($P<0.05$)。COD 浓度随着养殖进行逐渐积累,养殖结束时,其浓度分别为 15.43、17.75 和 25.96 mg/L,差异显著($P<0.05$)。

表 1 不同投喂率养殖水质指标
Tab.1 Water quality in breeding bucket with different feeding rates

| 组别 Group | pH | 盐度 Salinity | 温度 Temperature/°C | 溶解氧 DO /(mg/L) |
|-------------|-----------|----------------|----------------------|-------------------|
| T5 | 7.84±0.04 | 32.03±0.28 | 26.96±0.19 | 5.08±0.29 |
| T7.5 | 7.84±0.05 | 31.99±0.24 | 26.97±0.14 | 5.03±0.26 |
| T10 | 7.85±0.05 | 31.98±0.37 | 26.98±0.18 | 5.01±0.24 |

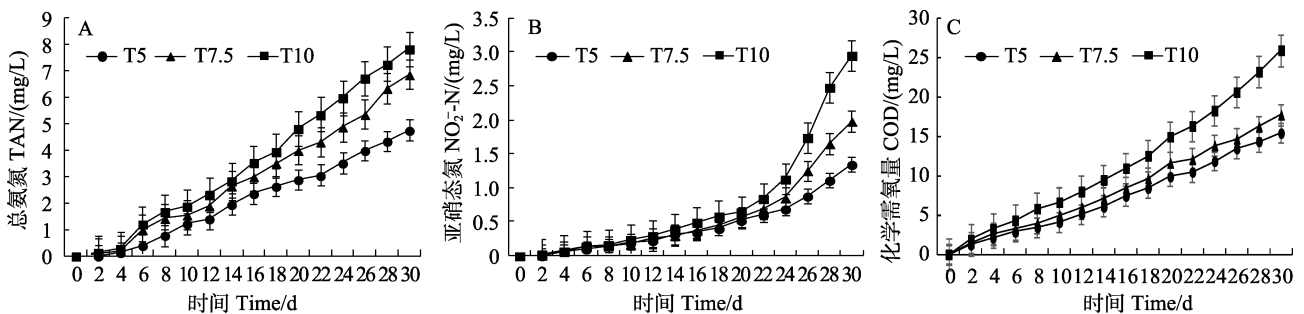


图 1 不同投喂率养殖水体总氮(A)、亚硝态氮(B)和化学需氧量(C)浓度变化

Fig.1 Variations of TAN (A), NO₂-N (B), and COD (C) concentrations of aquaculture water in breeding bucket with different feeding rates

2.2 投喂率对养殖水环境微生物群落多样性的影响

不同投喂率养殖水环境微生物群落多样性指数如表 2 所示, Coverage 数值均大于 99%, 这表明测序结果中几乎包含养殖水环境中的所有分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs), 多样性结果分析具有较高的可靠性。Chao 指数和 Shannon 指数均在 T5 组最高, 分别为 447.86 和 4.14, 在 T10 最低, 分别为 190.16 和 2.73, 各组间差异显著($P<0.05$)。门水

平的养殖水体细菌群落的主要成分如图 2 所示, 养殖水环境中的优势菌门分别为变形菌门(Proteobacteria, 50.36%~67.53%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 12.09%~67.53%)、粘菌门(Myxococcota, 1.14%~10.86%)和放线菌门(Actinobacteria, 1.41%~8.61%)。变形菌门占主导地位, 其他菌门的相对丰度存在差别。为深入了解投喂率对水环境微生物群落结构的影响, 在属水平建立热图, 如图 3 所示, 热图分析显示了不同投喂率微生物群落结构的差异。在不同投喂率下, 弧菌(Vibrio)

的相对丰度较高,为主要优势属,此外,副球菌(*Paracoccus*)、黏着杆菌(*Tenacibaculum*)均为相对丰度较高的菌属。假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)在不同投喂组中均存在,在 T7.5 组相对丰度最高,为 9.78%,在 T10 组相对丰度最低,仅为 0.28%。对养殖水环境的 pH、盐度、温度、溶解氧、TAN、NO₂-N 和 COD 的方差膨胀因子(VIF)进行分析。VIF 数值越大代表自变量之间的多重共线性关系越强。通常把 VIF>10 的因子视为无效因子,最终筛选出 pH、盐度、温度、TAN 和 COD 5 个水质因子。利用 RDA 分析来研究微生物群落与水质因子之间的相关性(图 4)。RDA 轴 1 和 2 的总方差贡献率为 61.46%,箭头长度代表水质因子与不同投喂率养殖水体微生物群落之间的关联程度。结果发现, T5 组养殖水体中微生物群落与盐度和温度呈正相关,盐度对微生物群落的影响大于温度; T7.5 和 T10 组养殖水体中微生物群落与 TAN、COD 和 pH 呈正相关, TAN 对微生物群落的影响大于 COD 和 pH。

表 2 不同投喂率养殖环境 α 多样性指数

Tab.2 The α diversity index in breeding bucket with different feeding rates

| 组别 Group | OTUs | 丰富度指数 Chao index | 香浓指数 Shannon index | 覆盖率 Coverage |
|-------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------|
| T5 | 443±4.58 ^a | 447.86±1.04 ^a | 4.14±0.53 ^a | 0.99 |
| T7.5 | 194±4.38 ^b | 197.62±0.81 ^b | 3.11±0.25 ^b | 0.99 |
| T10 | 179±3.06 ^c | 190.16±1.56 ^c | 2.73±0.36 ^c | 0.99 |

注: 同列数据不同上标字母表示组间存在显著差异 ($P<0.05$)。下同。

Note: Data in each column with different superscripts letter are significantly different ($P<0.05$). The same below.

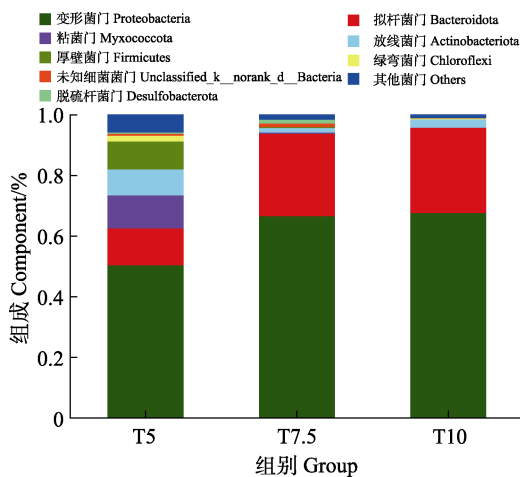


图 2 不同投喂率养殖水体样品在门水平上的物种丰富度
Fig.2 Community abundance of samples in breeding bucket with different feeding rates on phylum level

2.3 投喂率对凡纳对虾中间培育非特异性免疫的影响

使用试剂盒对凡纳对虾肝胰腺的 SOD、CAT、ACP 和 AKP 进行测定,结果如图 5 所示,凡纳对虾肝胰腺的 SOD 和 CAT 在不同投喂组中存在显著差异 ($P<0.05$),但 ACP 和 AKP 在 T5 和 T7.5 组中无显著差异 ($P>0.05$),受投喂率影响较小,但在 T10 组中,ACP 和 AKP 活性较低,且显著低于 T5 和 T7.5 组 ($P<0.05$)。SOD、CAT、ACP 和 AKP 活性均在 T7.5 组最高,分别为 160.34、70.16、7.08 和 68.27 U/L;在 T10 最低,分别为 112.88、50.57、5.06 和 150.64 U/L。

2.4 投喂率对凡纳对虾中间培育生长性能的影响

采用不同投喂率的凡纳对虾生长指标如表 3 所示。实验结束时, T7.5 和 T10 组对虾的体长和体重均显著大于 T5 组 ($P<0.05$),但 T7.5 和 T10 组之间无显著差异 ($P>0.05$)。存活率与投喂率呈负相关,且 3 组间存在显著差异 ($P<0.05$)。T5 组的特定生长率最低,为 15.14%/d, T7.5 和 T10 组的特定生长率分别为 15.63%/d 和 15.64%/d,无显著差异 ($P>0.05$)。

2.5 因子分析过程

针对本研究所得数据,利用 IBM SPSS 25.0 统计软件进行因子分析。KMO 值为 0.635,超过临界值 0.6; Bartlett 球形度检验的值为 128.511,自由度为 28, $P<0.001$,表明数据相关性极强,适合进行因子分析。使用主成分分析法对数据进行提取,并利用凯撒正态化最大方差法进行旋转,所得结果如表 4 所示。前 2 个公因子包含总方差的 95.971%,对所测指标的方差贡献率分别为 48.967%和 47.004%,因此,提取 2 个公因子。因子载荷表明生长性能指标、非特异性免疫指标与公因子之间的关联程度。由表 5 可知,第 1 因子对 AKP、ACP、SOD 和 CAT 具有高载荷,将该因子命名为免疫因子;第 2 因子对终末均体长 (FL)、终末均体重 (FW)、SR 和 SGR 具有高载荷,将该因子命名为生长因子。根据以上分析,得出成分得分系数矩阵(表 6),建立凡纳对虾中间培育的因子评价模型:

$$F_1 = 0.026FL + 0.12FW + 0.034SR + 0.15SGR + 0.192AKP + 0.239ACP + 0.31SOD + 0.33CAT$$

$$F_2 = 0.231FL + 0.319FW - 0.207SR + 0.336SGR - 0.047AKP + 0.013ACP + 0.119SOD + 0.156CAT$$

为准确分析,便于对凡纳对虾中间培育做出评价,采用加权计算的方法进行综合分析,得到综合评价模型: $F = 0.511F_1 + 0.489F_2$ 。计算不同投喂率的综合得分,结果显示, T7.5 得分最高,为 0.92, T5 得分最低,为 -0.43。

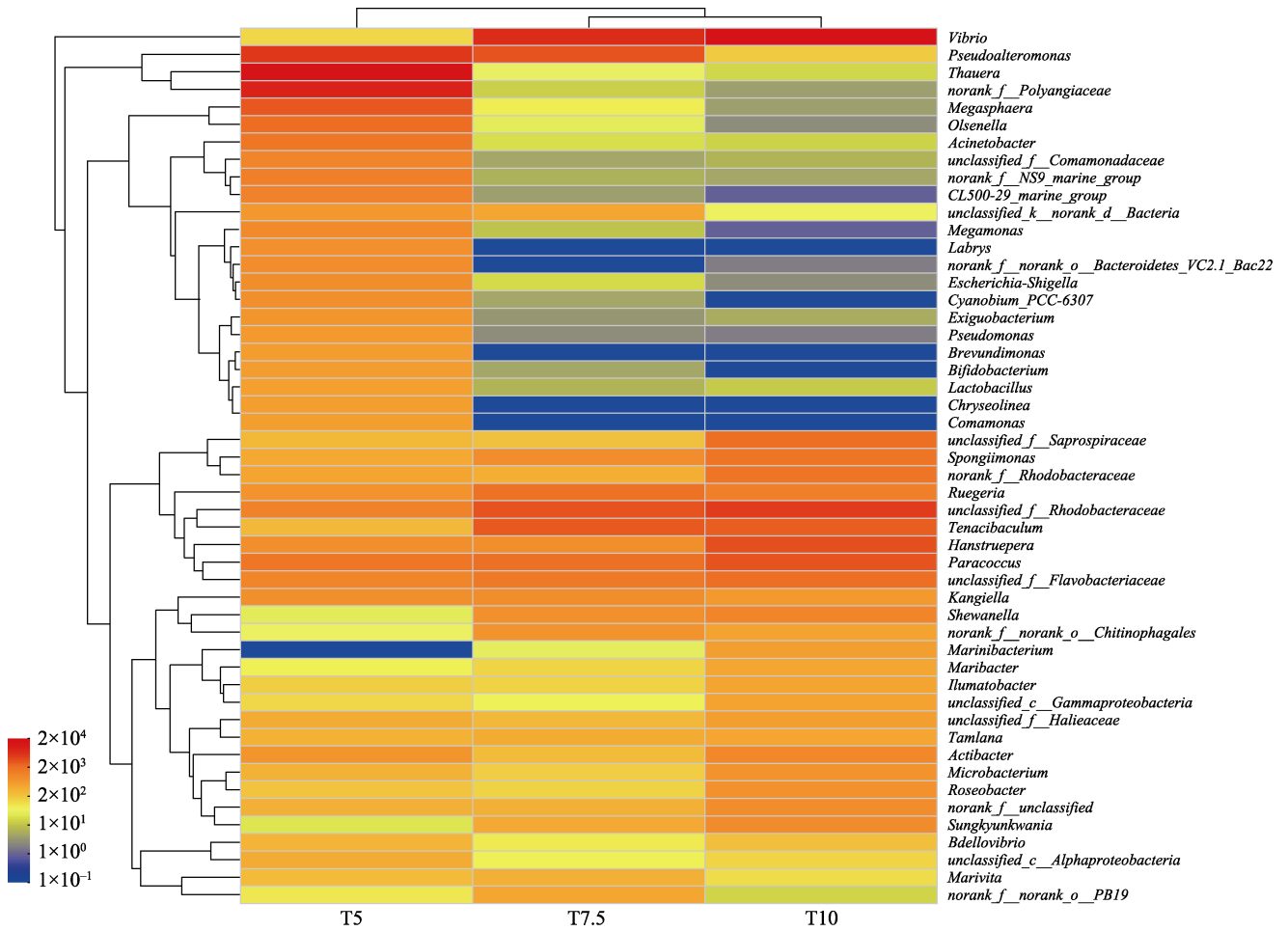


图 3 不同投喂率组养殖水体主要细菌菌属热图

Fig.3 Heat map of major bacterial genus in breeding bucket with different feeding rates

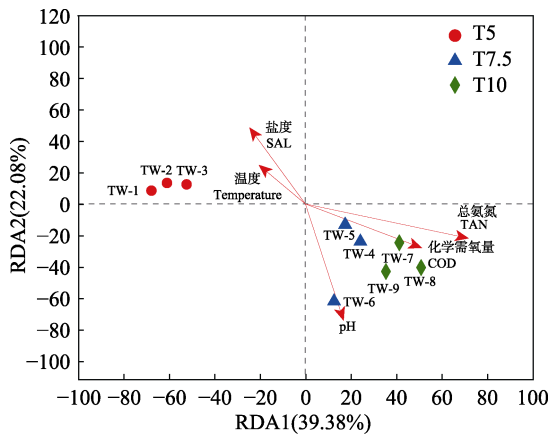


图 4 微生物群落与环境参数的冗余分析

Fig.4 Redundancy analysis (RDA) of the microbial communities and environmental parameters

TW 代表不同投喂组, TW1~TW3、TW4~TW6、TW7~TW9 分别为 T5、T7.5、T10 组 3 个样本。

TW represents different feeding rates groups, TW1~TW3, TW4~TW6, and TW7~TW9 are three samples of T5, T7.5, and T10 group, respectively.

表 3 不同投喂率凡纳对虾生长指标

Tab.3 Growth index of *P. vannamei* with different feeding rates

| 组别 Group | 终末均体长 FL/cm | 终末均体重 FW/g | 存活率 SR/% | 特定生长率 SGR/(%/d) |
|-------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| T5 | 3.61±0.13 ^a | 0.47±0.25 ^a | 83.12±0.12 ^a | 15.14±0.18 ^a |
| T7.5 | 3.77±0.09 ^b | 0.54±0.61 ^b | 75.88±0.61 ^b | 15.63±0.35 ^b |
| T10 | 3.77±0.39 ^b | 0.54±0.35 ^b | 68.52±1.09 ^c | 15.64±0.22 ^b |

3 讨论

3.1 投喂率对凡纳对虾中间培育水质及微生物群落结构的影响

在中间培育养殖过程中, 适宜投喂率有助于养殖水环境的保持。Herawati 等(2020)研究表明, 水质是影响凡纳对虾生长的重要因素。在本研究中, 随着养殖进行, TAN 浓度升高, 且投喂率越高其升高幅度越大。这可能因为过量投喂使饵料在水体中的密度增

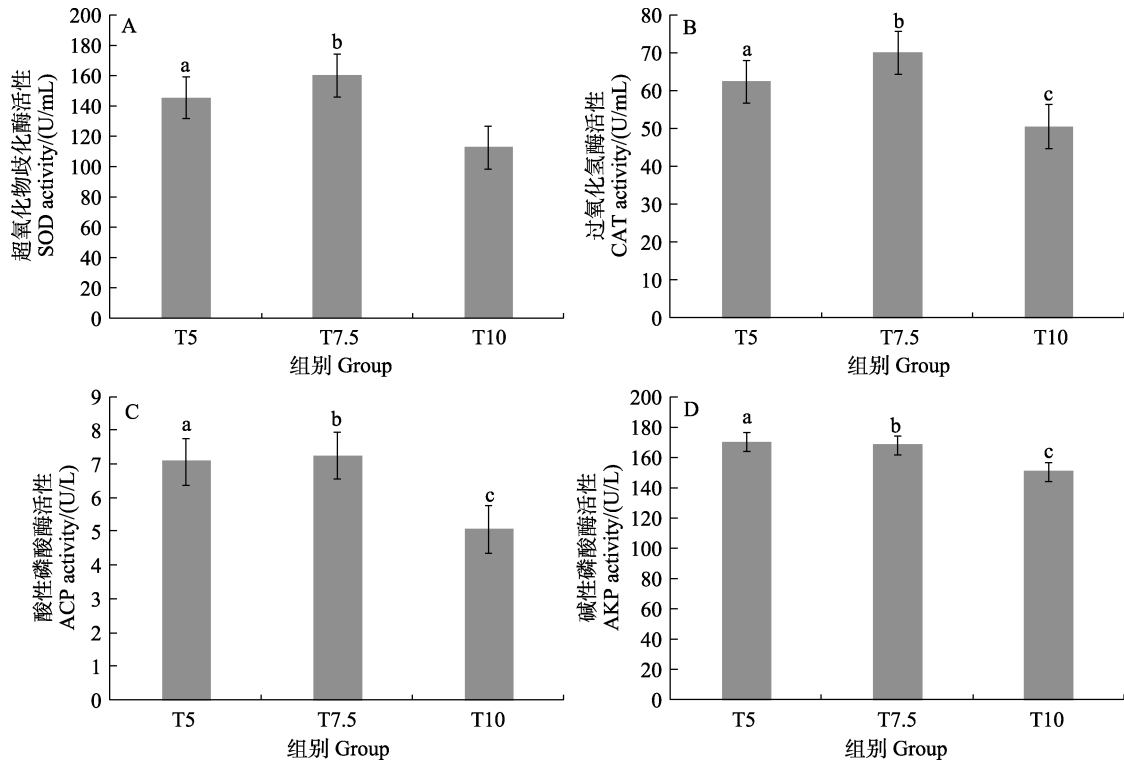


图5 不同投喂率超氧化物歧化酶(A)、过氧化氢酶(B)、酸性磷酸酶(C)和碱性磷酸酶(D)活性变化
 Fig.5 Variations of superoxide dismutase (A), catalase (B), acid phosphatase (C) and alkaline phosphatase (D) activity of aquaculture water in breeding bucket with different feeding rates

柱子上标不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。
 Columns with different superscripts letter are significantly different ($P<0.05$).

表4 提取因子方差解释
 Tab.4 Total variance explained of the extract factor

| 成分 Component | 项目 Item | 合计 Total | 方差贡献率 Variance contribution rate/% | 累计方差贡献率 Cumulative variance contribution rate/% |
|------------------|--|----------|------------------------------------|---|
| 成分 1 Component 1 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 5.735 | 71.687 | 71.687 |
| | 提取平方载入 Extraction sums of squared loadings | 5.735 | 71.687 | 71.687 |
| | 旋转平方和载入 Rotation sums of squared loadings | 3.917 | 48.967 | 48.967 |
| 成分 2 Component 2 | 初始特征值 Initial Eigenvalues | 1.943 | 24.284 | 95.971 |
| | 提取平方载入 Extraction sums of squared loadings | 1.943 | 24.284 | 95.971 |
| | 旋转平方和载入 Rotation sums of squared loadings | 3.760 | 47.004 | 95.971 |
| 成分 3 Component 3 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 0.269 | 3.363 | 99.334 |
| 成分 4 Component 4 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 0.028 | 0.352 | 99.686 |
| 成分 5 Component 5 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 0.020 | 0.246 | 99.931 |
| 成分 6 Component 6 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 0.004 | 0.055 | 99.986 |
| 成分 7 Component 7 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 0.001 | 0.013 | 99.999 |
| 成分 8 Component 8 | 初始特征值 Initial eigenvalues | 0.001 | 0.001 | 100.000 |

表 5 公因子载荷矩阵
Tab.5 Load matrix for factors

| 因子 Factor | 成分矩阵 Component matrix | | 旋转后的成分矩阵 Rotated component matrix | |
|--------------|--------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | 终末均体长 FL | -0.808 | 0.360 | -0.334 |
| 终末均体重 FW | -0.770 | 0.608 | -0.135 | 0.972 |
| 存活率 SR | 0.961 | -0.244 | 0.525 | -0.841 |
| 特定生长率 SGR | -0.715 | 0.673 | | 0.981 |
| 碱性磷酸酶 AKP | 0.979 | -0.193 | 0.840 | -0.539 |
| 酸性磷酸酶 ACP | 0.936 | 0.340 | 0.911 | -0.403 |
| 超氧化物歧化酶 SOD | 0.811 | 0.583 | 0.989 | -0.141 |
| 过氧化氢酶 CAT | 0.748 | 0.662 | 0.998 | |

表 6 成分得分系数矩阵
Tab.6 Component score coefficient matrix

| 因子 Factor | 成分 Component | |
|--------------|--------------|--------|
| | 1 | 2 |
| 终末均体长 FL | 0.026 | 0.231 |
| 终末均体重 FW | 0.120 | 0.319 |
| 存活率 SR | 0.034 | -0.207 |
| 特定生长率 SGR | 0.150 | 0.336 |
| 碱性磷酸酶 AKP | 0.192 | -0.047 |
| 酸性磷酸酶 ACP | 0.239 | 0.013 |
| 超氧化物歧化酶 SOD | 0.310 | 0.119 |
| 过氧化氢酶 CAT | 0.330 | 0.156 |

加, 残饵未被及时清理, 引起水体中的 TAN 浓度上升(陈亨等, 2018; de Melo Filho *et al.*, 2020)。NO₂-N 是硝化反应的中间产物, 其浓度过高会对养殖物种产生毒害作用(寇红岩等, 2014)。NO₂-N 浓度前期较低, 但到养殖中后期, 其浓度显著升高。该结果与张龙等(2019)的研究结论相似, 这可能因为养殖前期 TAN 浓度较低, 硝化反应进行缓慢, 但随着 TAN 的积累, TAN 转化为 NO₂-N, 导致其浓度显著升高(Wang *et al.*, 2019)。COD 反映了水体受污染及水质恶化的程度, 其浓度过高可能导致养殖物种疾病暴发(马建新等, 2002)。本研究表明, T10 组的 COD 持续升高, 且高于 T5 和 T7.5 组, 这反映出高投喂率可能会增加虾病暴发的风险。基于上述研究结果, 过高的投喂率会加剧养殖水质恶化, 因此, 适当控制中间培育的投喂率对促进对虾健康养殖具有重要意义。

在中间培育养殖过程中, 适宜的投喂率有助于维持养殖水体微生物群落结构稳定。外界环境会对养殖水体的微生物群落结构产生影响, 微生物群落结构的多样性和丰富度与养殖水体的稳定性密切相关(Yan

et al., 2016)。本研究表明, T5 组养殖水体微生物群落的 Chao 指数和 Shannon 多样性指数显著高于 T7.5 和 T10 组。这可能因为 T7.5 和 T10 组水体的残饵粪便积累过多, 导致水质恶化, 使微生物群落的多样性和丰富度下降。袁琼芬等(2013)等研究表明, 当养殖水体微生物群落的多样性和丰富度降低时, 更易发生养殖病害。因此, 投喂率过高会加剧养殖物种的患病风险。本研究发现, 变形菌门为养殖水体的优势菌门。在不同养殖条件下, 变形菌门分布广泛且通常为最优势菌群(Shin *et al.*, 2015), 在中间培育也得到验证。从属水平看, 弧菌在 T7.5 和 T10 组含量较高, 且尤以 T10 组最高(37.33%), 弧菌是水产养殖中的主要致病菌, 弧菌浓度超标会导致虾病暴发, 从而引起对虾死亡(Quiroz-Guzman *et al.*, 2013)。本研究还发现, 假交替单胞菌在不同投喂组中均存在, 在 T7.5 组相对丰度最高, 在 T10 组相对丰度最低。Bowman (2007)研究发现, 假交替单胞菌是抑菌、降解纤维素的有益菌, 能提高对虾的存活率和特定生长率, 这可从侧面反映高投喂率会导致假交替单胞菌丰度下降, 对凡纳对虾的生长产生影响。上述菌属相对丰度的差异表明, 不同投喂率使养殖水体的群落结构发生改变。RDA 分析表明, TAN 和 COD 是影响中间培育养殖水体微生物群落结构的主要因素。这可能是由于不同投喂率使养殖水体有机物含量产生差异, 导致水质指标浓度不同, 而不同浓度造成养殖水体的微生物群落组成和相对丰度存在差异(张浩, 2015)。张星(2010)对凡纳对虾养殖池的微生物群落和环境因子进行相关性分析, 结果表明, TAN 和 COD 等环境因子对养殖池的微生物群落组成起到重要作用, 该结论与本研究结果相似。Ruan 等(2015)研究表明, 养殖水体微生物群落结构受多种因素的共同作用, 因此, 要分析中间培育微生物群落的多样性及其影响因素还需进行更深入的探究。

3.2 投喂率对凡纳对虾中间培育非特异性免疫及生长性能的影响

在中间培育养殖过程中, 适宜投喂率有利于对虾提高自身非特异性免疫力。凡纳对虾自身缺乏特异性免疫系统, 依靠非特异性免疫来抵抗外界环境的变化(何树青等, 2021)。养殖水体浓度的变化会对凡纳对虾的非特异性免疫系统产生显著影响。葛红星(2014)研究发现, TAN 浓度过高会使凡纳对虾的非特异性免疫酶活性降低, 同时提高凡纳对虾感染弧菌的几率。本研究中, T10 组 TAN 和 COD 浓度最高, 且非特异性免疫酶活性最低, 这表明养殖水体中含氮有机物过高会抑制凡纳对虾的非特异性免疫力(李晨露等,

2022)。Fu 等(2018)研究表明, 水生动物的应激反应与饵料资源密切相关。因此, 研究投喂率与凡纳对虾非特异性免疫之间的关系, 将有助于分析外界条件改变对凡纳对虾内在生理的影响, 对中间培育对虾的健康养殖具有重要作用。SOD 与 CAT 是机体自由基代谢及反映组织氧化损伤的重要指标, 二者活性高低反映机体对外界环境抵抗能力的强弱(Muniswamy *et al.*, 2008)。本研究发现, 不同投喂率显著影响 SOD 和 CAT 的活性, 当改变投喂率时, 其活性在 T7.5 组最高, T10 组最低, 这表明中间培育凡纳对虾的非特异性免疫力在 T7.5 组最高, T10 组最低, 投喂率的增加会使凡纳对虾的非特异性免疫力增加, 但过量投喂会对非特异性免疫产生抑制作用, 上述结果与赵志刚等(2017)的研究结果一致。ACP 和 AKP 是反映机体免疫和健康的指标, 对抵抗外界疾病侵害有重要作用(Muta *et al.*, 1996)。闫戈等(2022)在研究克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的非特异性免疫时也发现, ACP 和 AKP 活性下降会导致克氏原螯虾患病风险增加。在本研究中, ACP 和 AKP 在 T5 和 T7.5 组差异不大, 但在 T10 组中, 其活性显著降低。这表明, 高投喂率可能导致中间培育凡纳对虾的非特异免疫力减弱, 增加患病风险, 影响对虾的正常生长。

因子分析结果表明, T7.5 组综合得分最高, 是本研究条件下凡纳对虾中间培育的最佳投喂率。投喂率是影响对虾生长发育的重要因素, 适宜的投喂率可以减少浪费, 降低饵料成本(Amirkolaie, 2011)。投喂率过低会导致对虾摄食不足, 生长发育缓慢, 投喂率过高会增加对虾肠道负担, 并且引起水质恶化, 甚至导致对虾死亡(Wang *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2019)。在本研究中, 投喂率从 5% 提高至 7.5%, 对虾的体长和体重显著升高, 但继续提高投喂率, 体长和体重无显著变化。Anh 等(2021)研究不同养殖密度和投喂率对凡纳对虾的影响, 结果发现, 当养殖密度和投喂率过高时, 凡纳对虾生长发育迟缓。周晖等(2022)研究发现, 在生物絮团养殖模式下, 适当降低饵料投喂, 凡纳对虾能够维持正常的生长速度。这些研究均表明, 与高投喂率相比, 适当降低饵料投喂能促进凡纳对虾的生长和存活, 对虾未从高投喂率中获益, 不能利用额外的饵料。投喂率与中间培育不同指标之间存在密切联系, 不同投喂率会引起水中残饵粪便存在差异, 造成水质恶化, 引起养殖水环境中微生物群落结构紊乱, 使对虾自身能量代谢消耗过大, 以维持胁迫状态下的能量稳态, 进而诱导对虾产生氧化应激反应, 造成肝脏胰脏应激和细胞凋亡, 对凡纳对虾的生存造成较大威胁(Liang *et al.*, 2016; Sarsangi Aliabad *et al.*, 2022)。因

此, 在实际生产中, 应在生长不同阶段设置合理的投喂率, 促进对虾生长, 保持对虾健康状态, 实现高效养殖。

4 结 论

通过研究投喂率对凡纳对虾中间培育养殖水环境、免疫及生长的影响, 得到如下结论: (1)在中间培育养殖过程中, 适宜的投喂率可以提高凡纳对虾的生长性能和非特异性免疫力, 但过量投喂会导致水质恶化, 引起弧菌暴发, 影响对虾的正常生长和存活。(2)在本研究条件下, 综合考虑饵料成本、水质条件、非特异性免疫和生长性能等因素, 凡纳对虾中间培育的投喂率在 7.5% 左右为宜。

参 考 文 献

- AMIRKOLAIE A K. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Reviews in Aquaculture*, 2011, 3(1): 19–26
- ANH N T N, SHAYO F A, NEVEJAN N, *et al.* Effects of stocking densities and feeding rates on water quality, feed efficiency, and performance of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in an integrated system with sea grape *Caulerpa lentillifera*. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(5): 3331–3345
- BOWMAN J P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 2007, 5(4): 220–241
- CHEN H, CHEN C, WU J Q, *et al.* Growth and feed intake of *Litopenaeus vannamei* under stress-environment interaction. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(2): 168–174 [陈亨, 陈琛, 於俊琦, 等. 不同环境胁迫因子耦合对凡纳滨对虾生长与摄食的影响. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(2): 168–174]
- CHU Z P, JIN J L, CHEN X H, *et al.* Effects of different feeding rates and frequencies on the growth performance, body composition, and biochemical parameters of juvenile hybrid sturgeon. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(2): 177–185 [褚志鹏, 金佳利, 陈细华, 等. 不同投喂率和投喂频率对大杂交鲟幼鱼生长、体成分和生化指标的影响. *中国水产科学*, 2020, 27(2): 177–185]
- DE MELO FILHO M E S, OWATARI M S, MOURIÑO J L P, *et al.* Application of nitrification and denitrification processes in a direct water reuse system for Pacific white shrimp farmed in biofloc system. *Aquacultural Engineering*, 2020, 88: 102043
- FU S J, PENG J, KILLEN S S. Digestive and locomotor capacity show opposing responses to changing food availability in an ambush predatory fish. *Journal of Experimental Biology*,

- 2018, 221(12): jeb173187
- GE H X. Effects of two main inorganic nitrogen on the immune response of *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 18–22 [葛红星. 两种主要无机氮胁迫下凡纳滨对虾免疫因子变化及其对副溶血弧菌易感性的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 18–22]
- GONG H, CHEN P, QIN Z, *et al.* Analysis of water quality and bacterial community characterization in an industrialized recirculating aquaculture system of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 125–136 [宫晗, 陈萍, 秦桢, 等. 凡纳滨对虾工厂化循环水养殖系统水质指标及微生物菌群结构的分析. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 125–136]
- HE S Q, LI R M, YANG Q H, *et al.* Effects of dietary zinc on growth, serum non-specific immune indexes, disease resistance and intestinal flora structure in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(10): 1726–1739 [何树青, 李日美, 杨奇慧, 等. 锌对凡纳滨对虾生长、非特异性免疫指标、抗病力及肠道菌群结构的影响. *水产学报*, 2021, 45(10): 1726–1739]
- HERAWATI V E, PINANDOYO, DARMANTO Y S, *et al.* Effect of feeding with *Phronima* sp. on growth, survival rate and nutrient value content of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-larvae. *Aquaculture*, 2020, 529: 735674
- HUNG S S O, LUTES P B, CONTE F S. Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub-yearling at different feeding rates. *Aquaculture*, 1989, 80(1/2): 147–153
- JIN M, XIONG J, ZHOU Q C, *et al.* Dietary yeast hydrolysate and brewer's yeast supplementation could enhance growth performance, innate immunity capacity and ammonia nitrogen stress resistance ability of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 121–129
- JIN S Y, JACQUIN L, REN Y, *et al.* Growth performance and muscle composition response to reduced feeding levels in juvenile red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Aquaculture Research*, 2019, 50(3): 934–943
- KAYA D, GENÇ E, GENÇ M A, *et al.* Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding rates and stocking densities. *Aquaculture*, 2020, 528: 735526
- KOU H Y, XIAN J A, GUO H, *et al.* Research progress of toxic effects of nitrite on shrimp. *Marine Sciences*, 2014, 38(2): 107–115 [寇红岩, 冼健安, 郭慧, 等. 亚硝酸盐对虾类毒性影响的研究进展. *海洋科学*, 2014, 38(2): 107–115]
- LI C L, LI J H, CHENG Y X, *et al.* Effects of different initial diets on water quality, growth, digestive enzymes and non-specific immune enzymes of *Procambarus clarkii*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(4): 883–892 [李晨露, 李京昊, 成永旭, 等. 不同饵料对克氏原螯虾仔虾养殖水质、生长、消化酶和非特异性免疫酶的影响. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(4): 883–892]
- LI J W, JIE X Y, GUO Y J, *et al.* Application of culturing in stages in the shrimp culturing pond. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 74–80 [李俊伟, 顾晓勇, 郭永坚, 等. 分段养殖模式在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中的应用. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 74–80]
- LIANG Z X, LIU R, ZHAO D P, *et al.* Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 523–528
- LIU W K, FAN Q X, ZHU B K, *et al.* Effects of prey density on the growth and survival of larval hybrid snakehead. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(3): 367–370 [刘文逵, 樊启学, 朱邦科, 等. 饵料密度对杂交鳢仔鱼生长、存活的影响. *华中农业大学学报*, 2007, 26(3): 367–370]
- LUO S, LI X Q, ONCHARI M, *et al.* High feeding level alters physiological status but does not improve feed conversion efficiency and growth performance of juvenile red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Aquaculture*, 2021, 537: 736507
- MA J X, LIU A Y, SONG A Q. A study on the relationship between COD and shrimp viral disease. *Marine Sciences*, 2002, 26(3): 68–71 [马建新, 刘爱英, 宋爱芹. 对虾病毒病与化学需氧量相关关系研究. *海洋科学*, 2002, 26(3): 68–71]
- MUNISWAMY D, MUNASWAMY V, HALAPPA R, *et al.* Impact of sodium cyanide on catalase activity in the freshwater exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92(1): 15–18
- MUTA T, IWANAGA S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 1996, 8(1): 41–47
- QUIROZ-GUZMAN E, BALCAZAR J L, VAZQUEZ-JUAREZ R, *et al.* Proliferation, colonization, and detrimental effects of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during brine shrimp hatching. *Aquaculture*, 2013, 406/407: 85–90
- RUAN Y J, GUO X S, YE Z Y, *et al.* Bacterial community analysis of different sections of a biofilter in a full-scale marine recirculating aquaculture system. *North American Journal of Aquaculture*, 2015, 77(3): 318–326
- SARSANGI ALIABAD H, NAI I A, MORTEZAEI S R S, *et al.* Effects of restricted feeding levels and stocking densities on water quality, growth performance, body composition and mucosal innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry in a biofloc system. *Aquaculture*, 2022, 546: 737320
- SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: Microbial

- signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends in Biotechnology, 2015, 33(9): 496–503
- SILVA C R, GOMES L C, BRANDAO F R. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. Aquaculture, 2007, 264(1/2/3/4): 135–139
- WANG J J, SHEN M F, XUE H, *et al.* Effects of feeding frequency on growth performance, antioxidant status and disease resistance of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Pakistan Journal of Zoology, 2021, 53(2): 467–474
- WANG X D, SHEN Z H, WANG C L, *et al.* Dietary supplementation of selenium yeast enhances the antioxidant capacity and immune response of juvenile *Eriocheir sinensis* under nitrite stress. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 87: 22–31
- XI Q F, ZHANG D M, Ye X S, *et al.* The bacterial community of coastal sediments influenced by cage culture in Xiangshan Bay, Zhejiang, China. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(2): 483–491 [袁琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物细菌群落的影响. 生态学报, 2013, 33(2): 483–491]
- XING M W, DENG H G, GAO M R, *et al.* Effects of *Artemia* from different origins on growth, muscle composition, and stress resistance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(1): 70–78 [邢明威, 邓洪刚, 高美荣, 等. 不同产地卤虫幼体对凡纳滨对虾仔虾生长、肌肉组分和抗胁迫能力的影响. 中国水产科学, 2022, 29(1): 70–78]
- YAN G, GU C, WANG C X, *et al.* Effect of *Euryale ferox* extract on growth, antioxidant capacity, and immunity of *Procambarus clarkii*. Freshwater Fisheries, 2022, 52(1): 83–89 [闫戈, 顾晨, 王承鑫, 等. 芡实提取物对克氏原螯虾生长、抗氧化能力及免疫功能的影响. 淡水渔业, 2022, 52(1): 83–89]
- YAN Q Y, LI J J, YU Y H, *et al.* Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. Environmental Microbiology, 2016, 18(12): 4739–4754
- ZHANG H. The dynamic changes of microbial communities in aquaculture environment and interactions with water environment. Master's Thesis of Soochow University, 2015, 46–48 [张浩. 养殖环境微生物群落的动态变化及与水环境的互作. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2015, 46–48]
- ZHANG L, CHEN Z, WANG L, *et al.* Effect of stocking density on intermediate cultivation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 76–83 [张龙, 陈钊, 汪鲁, 等. 放养密度对凡纳滨对虾苗种中间培育效果的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 76–83]
- ZHANG X. Bacterial community structure analysis in typical aquaculture water by PCR-DGGE technology and its correlation with environmental factors. Master's Thesis of South China University of Technology, 2010, 60–64 [张星. 典型养殖水体中细菌群落结构的 DGGE 分析及其与环境因子相关性研究. 华南理工大学硕士研究生学位论文, 2010, 60–64]
- ZHAO Y C, WANG R J, SHEN M, *et al.* Effects of high-salt stress on daily weight gain, osmoregulation and immune related enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 833–840 [赵玉超, 王仁杰, 沈敏, 等. 高盐对凡纳滨对虾仔虾生长、渗透调节及免疫相关酶活性的影响. 水产学报, 2019, 43(4): 833–840]
- ZHAO Z G, LI J N, XU Q Y, *et al.* Effects of different ration levels in temperature fluctuation on digestive enzyme, metabolic enzyme and antioxidase activities of juvenile amur sturgeon (*Acipenser schrenckii* Brandt). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(1): 127–133 [赵志刚, 李晋南, 徐奇友, 等. 变温条件下不同投喂水平对施氏鲟幼鱼消化酶、代谢酶和抗氧化酶活性的影响. 动物营养学报, 2017, 29(1): 127–133]
- ZHOU H, HAN M Q, TANG B G, *et al.* Indoor biofloc culture of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in low temperature season. Fisheries Science, 2022, 41(3): 424–430 [周晖, 韩满强, 汤保贵, 等. 低温季节凡纳滨对虾室内生物絮团养殖研究. 水产科学, 2022, 41(3): 424–430]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Feeding Rate on the Intermediate Cultivation of *Penaeus vannamei*

WANG Liwei¹, LI Meng¹, SONG Xiefa^{1①}, LI Xian¹, DONG Dengpan¹,
CHEN Zhao², BAI Xuesong³

(1. Hydro-Environmental Engineering Laboratory, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China;

3. Dongying Kuohai Aquatic Technology Company Ltd, Dongying 257000, China)

Abstract *Penaeus vannamei* Boone is an important economic species in aquaculture. It has become the main species of shrimp cultured in China due to its fast growth rate, high yield, and delicious meat. Segmented culture, which is important for promoting the environmental adaptation of shrimp, reducing the negative impact of diseases and improving the success of culture, is considered one of the major methods of shrimp farming. The intermediate cultivation stage is an important stage of shrimp farming as it determines the success or failure of economic benefits. *P. vannamei* are usually reared in intensive aquaculture systems that are highly dependent on bait feeding, which makes optimizing feeding rates fundamental to obtaining farming benefits. The feeding rate is the amount of bait as a percentage of the body mass of the cultured object, which is an important factor affecting the shrimp factory farming. Feeding rate directly affects the survival and specific growth rate of the cultured species; an excessively slow feeding rate will slow the growth of cultured objects and affect the normal development, while an excessively high feeding rate will increase the cost of breeding and cause accumulation of residual bait, which reduces water quality and may even result in death of the cultured objects. Therefore, it is necessary to determine the appropriate feeding rate to improve baiting efficiency and to satisfy the needs of sustainable aquaculture. However, in the intermediate cultivation stage, the determination of feeding rates relies on farming experience and lacks a scientific basis. To the best of our knowledge, few scholars have analyzed the influencing mechanisms of different feeding rates on shrimp growth, physiology, and water environment separately from the perspectives of exogenous and endogenous factors; however, there is a lack of comprehensive studies on the combined effects of feeding rates. Therefore, there is an urgent need to elaborate on the intrinsic connections between different parameters, such as the growth and physiological indicators of *P. vannamei*, water quality, as well as the microbial communities in the culture environment. The main objectives of this study are (1) to analyze the effects of different feeding rates on water quality conditions, microbial community structure, non-specific immunity indicators, and the growth performance of shrimp during the intermediate cultivational stage; (2) to elucidate the interaction between feeding rates and different indicators; and (3) to determine the appropriate feeding rate of the intermediate cultivation of *P. vannamei*.

In this study, three groups of feeding rates, namely T5 (5%), T7.5 (7.5%), and T10 (10%), were used to feed *P. vannamei* during the intermediate cultivation stage for 30 d. The effects of different feeding rates on water quality, microbial community structure, non-specific immune indices, and growth performance in the intermediate cultivation of *P. vannamei* were analyzed. During the experiment, water

① Corresponding author: SONG Xiefa, E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn

quality and shrimp growth were regularly tested, and pH, salinity, temperature, and dissolved oxygen were maintained in a range suitable for shrimp growth. At the end of the experiment, the hepatopancreas of shrimp was used for non-specific immunity activity testing, and the microbial community characteristics of different culture densities were analyzed using high-throughput sequencing technology (Illumina MiSeq). Results showed that the concentrations of total ammonia nitrogen (TAN), $\text{NO}_2\text{-N}$, and chemical oxygen demand (COD) gradually increased as the experiment continued, and significant difference could be observed at the end of the experiment, $T10 > T7.5 > T5$ ($P < 0.05$). Analysis of the microbial community structure showed an increasing tendency in richness and diversity with increasing feeding rates. At the phylum level, Proteobacteria (50.36%–67.53%) and Bacteroidota (12.09%–67.53%) were dominant in all samples; at the genus level, the relative abundance of *Vibrio* (harmful to *P. vannamei*) was the highest at T10 (37.33%) and lowest at T5 (0.13%), while the relative abundance of *Pseudoalteromonas* (beneficial to *P. vannamei*) was the highest at T7.5 (9.78%) and lowest at T10 (0.28%). Results of the redundancy analysis showed that the microbial community in the culture water with a feeding rate of 5% was positively correlated with salinity and temperature, and salinity had greater effect on microbial communities than temperature. The microbial community with feeding rate of 7.5% and 10% was positively affected by TAN, COD, and pH, and the effect of TAN on microbial community was greater than that of COD and pH. The superoxide dismutase, catalase, alkaline phosphatase, and acid phosphatase activities were the highest in T7.5 and were the lowest in T10 ($P < 0.05$). The final average weight and length of T7.5 and T10 were significantly greater than those of T5 ($P < 0.05$), while there was no significant difference between T7.5 and T10 ($P > 0.05$). Survival rate was the highest at T5 (83.12%) and lowest at T10 (68.52%), with a significant difference ($P < 0.05$). Factor analysis showed that the highest overall score of 0.92 was achieved at T7.5. This study showed that a feeding rate of 7.5% could improve growth performance and non-specific immunity in *P. vannamei*, and T7.5 was recommended for the intermediate cultivation of *P. vannamei*. This study elucidated the interactions between feeding rates and different indicators and determined the appropriate feeding rate for the intermediate cultivation of *P. vannamei*. This study might help optimize the feeding rates for the intermediate cultivational stage with a view to providing technical guidance for the improvement of the success rate of *P. vannamei*.

Key words Feeding rates; *Penaeus vannamei*; Intermediate cultivational stage; Aquaculture water environment; Non-specific immunity; Growth performance; Composite score

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221124002

http://www.yykxjz.cn/

王印庚, 于永翔, 蔡欣欣, 张正, 王春元, 廖梅杰, 朱洪洋, 李昊. 基于 Deep Forest 算法的对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)预警数学模型构建. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 171-181

WANG Y G, YU Y X, CAI X X, ZHANG Z, WANG C Y, LIAO M J, ZHU H Y, LI H. Construction of an early warning mathematical model for *Penaeus vannamei* AHPND based on the Deep Forest algorithm. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 171-181

基于 Deep Forest 算法的对虾急性肝胰腺坏死病 (AHPND)预警数学模型构建*

王印庚^{1,2①} 于永翔^{1,2} 蔡欣欣¹ 张正^{1,2} 王春元¹
廖梅杰^{1,2} 朱洪洋¹ 李昊¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食品产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 为预报池塘养殖凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)急性肝胰腺坏死病(AHPND)的发生,自2020年开始,笔者对凡纳对虾养殖区开展了连续监测工作,包括与疾病发生相关的环境理化因子、微生物因子、虾体自身健康状况等18个候选预警因子指标,通过数据标准化处理后分析病原、宿主与环境之间的相关性,对候选预警因子进行筛选,基于Python语言编程结合Deep Forest、LightGBM、XGBoost算法进行数据建模和预测性能评判,仿真环境为Python2.7,以预警因子指标作为输入样本(即警兆),以对虾是否发病指标作为输出结果(即警情),根据输入样本和输出结果各自建立输入数据矩阵和目标数据矩阵,利用原始数据矩阵对输入样本进行初始化,结合函数方程进行拟合,拟合的源代码能利用已知环境、病原及对虾免疫指标数据对目标警情进行预测。最终建立了基于Deep Forest算法的虾体(肝胰腺内)细菌总数、虾体弧菌(*Vibrio*)占比、水体细菌总数和盐度的4维向量预警预报模型,准确率达89.00%。本研究将人工智能算法应用到对虾AHPND发生的预测预报,相关研究结果为对虾AHPND疾病预警预报建立了预警数学模型,并为对虾健康养殖和疾病防控提供了技术支撑和有力保障。

关键词 对虾;急性肝胰腺坏死病;预警数学模型;Deep Forest算法;Python语言

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0171-11

对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)流行面广、致病性强、死亡率高,在全球对虾养殖地区肆虐,一旦暴发难以治疗,造成大批对虾发病死亡,给中国乃至全球对虾养殖业带来了数百亿元的经济损失(贾丹等, 2018; Soto-Rodriguez et al, 2015; 韩琳等, 2018)。从AHPND流行特点和防

控实践来看,该病传播速度快、治愈难度大,一直是国内对虾养殖业面临的严峻考验(陈蒙蒙等, 2018)。随着AHPND病理病因的深入研究,人们逐步认识到及时预警和预防能够有效地规避或减少因该疾病发生导致的经济损失,并有利于防控操作和健康养殖生产。

* 国家重点研发计划(2019YFD0900102)、山东省泰山产业领军人才项目(LJNY201802)和苏北科技专项(SZ-LYG202028)共同资助。

① 通信作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-11-24, 收修改稿日期: 2023-03-21

病害预测以病原生态学为基础,定量调查与动植物病害发生发展和传播密切相关的影响因素,运用数理分析方法,依据若干关键的主效因素建立疾病流行发展的数学模型,进而实现预报疾病的发生。符合客观规律的疾病预测的准确度和精确度在很大程度上取决于所选择的数学分类方法。目前常用的有近 40 种之多(高争光, 2020; Ha *et al.*, 2017)。近 30 年来,人工智能被广泛地应用到许多学科领域,取得的成果也较为丰富多样(Underwood *et al.*, 2021; 万强等, 2016; Hamer *et al.*, 2020)。

预警预报是目前病害防控研究的热点和焦点。近年来,国内外研究人员在农作物灾害风险预警方面取得了丰硕的研究成果,并将该技术广泛应用于农作物生产实践中的病害防控领域,对于农业病害的防控和维持农业经济稳定有较强的指示作用(Huang *et al.*, 2019; Rumpf *et al.*, 2010; 毕春光等, 2021)。我国水产动物病害预警预报的相关研究比较薄弱,主要是依据采集分析养殖水质来对鱼类疾病发生趋势进行预测预报研究(马真, 2013; 徐云娟, 2017)。水产动物疾病的发生是病原、宿主与环境因素相互作用的结果,确定与疾病发生相关的主效因子,再结合合适的数学分类算法进行疾病的预报,能保证预警模型的精确性和可靠性(Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Paillard *et al.*, 2004)。而关于对虾 AHPND 预测方面的预报模型尚未有报道,研究建立对虾 AHPND 预警预报模型,不仅能为

对虾疾病的预警预报体系构建提供人工智能算法,也可为对虾养殖业的健康发展提供技术支撑。

本研究通过采集关于对虾 AHPND 发生相关的环境理化因子、微生物因子和机体自身免疫因子等 18 个候选预警因子参数,通过归一化处理 and Pearson 相关性分析,逐一剔除不相关因子,基于 Python 语言编程结合 Deep Forest 算法进行数据建模,仿真环境为 Python2.7,同时采用不同的基于决策树的优化方法进行预测准确率和性能比较,初步构建基于 Deep Forest 算法的池塘养殖凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)急性肝胰腺坏死病的预警模型。

1 数据采集

从 2020 年 7 月开始,对于河北省沧州市某对虾养殖区域内 4 口池塘的养殖参数、发病情况进行监测。池塘面积为 2.4~3.3 hm²,投放密度约为 22.5 万尾/hm²,检测起始期凡纳对虾平均体重约为(7.0±1.0) g/只;每次采样记录凡纳对虾的体色、活力、摄食强度、健康程度和生产管理情况以及理化因子和生物因子。根据“环境-病原-宿主”三者间的辩证关系,结合 AHPND 发生相关因子的定性分析,本研究选取 18 个可能影响对虾 AHPND 发生的环境、病原及免疫因子进行监测(表 1),包括环境因子(气温、水温、盐度、pH、DO、氨氮、亚硝态氮),病原因子[水体内可培养细菌和弧

表 1 数据分析所用参数列表

Tab.1 List of parameters used in data analysis

| 参数 Parameters | 参数代号 Parameter code | 单位 Unit |
|--|---------------------|---------|
| 气温 Air temperature | 1 | ℃ |
| 水温 Water temperature | 2 | ℃ |
| 盐度 Salinity | 3 | |
| 酸碱度 pH | 4 | |
| 溶解氧(DO) Dissolved oxygen | 5 | mg/L |
| 氨氮(NH ₄ ⁺ -N) Ammonia nitrogen | 6 | mg/L |
| 亚硝态氮(NO ₂ -N) Nitrite | 7 | mg/L |
| 水体细菌总数 Bacteria in water | 8 | CFU/mL |
| 水体弧菌总数 <i>Vibrio</i> in water | 9 | CFU/mL |
| 水体弧菌占比 Proportion of <i>Vibrio</i> in water | 10 | % |
| 虾体细菌总数 Bacteria in shrimp | 11 | CFU/g |
| 虾体弧菌总数 <i>Vibrio</i> in shrimp | 12 | CFU/g |
| 虾体弧菌占比 Proportion of <i>Vibrio</i> in shrimp | 13 | % |
| 碱性磷酸酶 AKP | 14 | U/mg |
| 酸性磷酸酶 ACP | 15 | U/mg |
| 超氧化物歧化酶 SOD | 16 | U/mg |
| 溶菌酶 LZM | 17 | U/mg |
| 酚氧化酶 PO | 18 | U/mg |

菌(*Vibrio*)总数及弧菌占比、虾体内(肝胰腺内)可培养细菌和弧菌总数及弧菌占比], 宿主免疫因子[碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)、酚氧化酶(PO)], 相关样品采集方法及数据信息参考于永翔等(2023)。

气温根据采样时的天气预报显示值记录, 水温、盐度、DO 和 pH 采用 YSI 便携式水质测定仪(美国)测定, 氨氮和亚硝态氮采用 WTW 6600 分光光度仪(德国)结合氨氮和亚硝态氮检测试剂盒测定, 可培养细菌和弧菌数量根据 TSB 和 TCBS 平板培养计数推算测定, 虾体和水质弧菌占比通过计算获得, 对虾肌肉免疫酶活性使用南京建成生物技术有限公司的免疫酶活试剂盒测定(于永翔等, 2023)。

2 数据预处理

2.1 剔除无效数据

同一模式条件下共采集到相关数据 140 组, 对养殖过程中采集到的额外泼洒外源投入品的组别进行剔除, 保证数据具有一定的自然客观性和科学性。通过删除无效数据, 已分类监测数据有 100 组, 包括发病数据 25 组, 健康数据 75 组。

2.2 数据标准化处理

由于不同影响因子之间存在的量纲和数量大小差异会对构建模型造成影响, 为提高后续实验训练的速度和预测的精度, 对处理好的 100 组训练测试数据采用 mapminmax 函数对其进行归一化处理, 使处理后的数据分布在[0, 1]之间。用 X 表示第 1 个变量, 用 Y 表示第 2 个变量, 它们分别是 $X=(x_1, x_2, \dots, x_i)$; $Y=(y_1, y_2, \dots, y_i)$, 其中, $\max(x)$ 和 $\min(x)$ 分别表示 X 变量的最大值和最小值。函数公式如下:

$$y_i = \frac{x_i - \min(x)}{\max(x) - \min(x)} \quad (1)$$

2.3 预报因子的删选

对虾病害发生与环境因子、微生物因子以及对虾机体自身免疫因子密切相关, 而这些因子之间又存在错综复杂的联系, 其中一个变量的变动会引起另一些变量的联动。使用 SPSS 21 软件进行 Pearson 相关分析, 分析各个影响因子与疾病发生情况以及相互之间的相关性, 并进行假设检验计算 P 值。如果用 X 表示第 1 个变量, 用 Y 表示第 2 个变量, 它们分别是 $X=(x_1, x_2, \dots, x_n)$; $Y=(y_1, y_2, \dots, y_n)$, 那么 Pearson 相关系数由下式定义:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2)$$

式中, \bar{x} 和 \bar{y} 分别是 2 个变量的平均数。各参数因子与预测对象的相关系数可以反映每个参数对预测对象的影响程度, 因此, 相关系数可作为筛选预测因子的依据。根据通常规定的临界值, 选取那些与预测对象的相关系数大于临界值的因子, 即将与预测对象相关性程度较高的一些因子作为预报的预选指标。

3 Deep Forest 模型构建

Deep Forest 算法的预测过程分为 2 个阶段: 多粒度扫描阶段(multi-grained scanning)和级联森林阶段(cascade forest)。Deep Forest 算法流程具体实现步骤主要是对原始数据序列进行算法的预处理, 利用 Deep Forest 算法对训练样本集进行训练, 最后利用预测样本的特征序列进行预测(林鹏程等, 2019)。

4 结果与分析

4.1 确定训练集和测试集

通过预处理的 100 组数据, 随机挑选 70% 的样本数据作为训练集, 另外的 30% 样本数据作为测试集。

4.2 对虾发病与参数因子的相关性分析

Pearson 相关分析表明(表 2), 对虾发病与虾体细菌总数、虾体弧菌总数、LZM、虾体弧菌占比、水体细菌总数、盐度、ACP、水体弧菌和 PO 等 9 个参数具有显著正相关性($P < 0.05$), 相关系数分别为 0.574 1、0.521 1、0.438 2、0.391 1、0.374 7、0.350 1、0.257 1、0.238 3 和 0.228 9, 表明在一定范围内这些参数值升高, 该病害更易发生、更严重; 与高温期水温呈显著负相关性($P < 0.05$), 其相关系数为 -0.227 9, 表明在高温期, 水温降低病害更容易发生。而气温、pH、DO、氨氮、亚硝态氮、水体弧菌占比、AKP 和 SOD 等 8 个参数与对虾发病相关性不大($P > 0.05$)。

一般界定变量相关系数的绝对值处于 0.8~1.0 之间为极强相关关系, 0.6~0.8 之间为强相关关系, 0.4~0.6 为中等程度相关关系, 0.2~0.4 为弱相关关系, 0~0.2 为极弱相关或不相关(Schober *et al*, 2018)。其中, 病害发生与虾体细菌总数、虾体弧菌总数和 LZM 的相关系数的绝对值均介于 0.4~0.6 之间, 为中等程度相关关系; 虾体弧菌占比、水体细菌总数、盐度、

表2 各参数因子与病害发生的相关性分析结果
Tab.2 Correlation analysis results of each parameter factor and disease occurrence

| 参数 Parameters | Pearson 相关系数 Pearson correlation | P 值检验 P value |
|---|-------------------------------------|------------------|
| 气温 Air temperature | -0.189 6 | 0.059 |
| 水温 Water temperature | -0.227 9* | 0.023 |
| 盐度 Salinity | 0.350 1** | 0.000 |
| 酸碱度 pH | 0.017 9 | 0.859 |
| 溶解氧 (DO) Dissolved oxygen | -0.024 8 | 0.806 |
| 氨氮 (NH ₄ ⁺ -N) Ammonia nitrogen | 0.128 2 | 0.204 |
| 亚硝态氮 (NO ₂ -N) Nitrite nitrogen | 0.117 7 | 0.244 |
| 水体细菌总数 Bacteria in water | 0.374 7** | 0.000 |
| 水体弧菌总数 <i>Vibrio</i> in water | 0.238 3* | 0.017 |
| 水体弧菌占比 Proportion of <i>Vibrio</i> in water | 0.037 3 | 0.713 |
| 虾体细菌总数 Bacteria in shrimp | 0.574 1** | 0.000 |
| 虾体弧菌总数 <i>Vibrio</i> in shrimp | 0.521 1** | 0.000 |
| 虾体弧菌占比 Proportion of <i>Vibrio</i> in shrimp | 0.391 1** | 0.000 |
| 碱性磷酸酶 AKP | 0.010 7 | 0.916 |
| 酸性磷酸酶 ACP | 0.257 1* | 0.010 |
| 超氧化物歧化酶 SOD | -0.101 6 | 0.315 |
| 溶菌酶 LZM | 0.438 2** | 0.000 |
| 酚氧化酶 PO | 0.228 9* | 0.022 |

注: *表示相关性呈显著水平, **表示相关性呈极显著水平。下同。

Note: * indicates a significant level of correlation, and ** indicates a highly significant level of correlation. The same below.

ACP、水体弧菌、PO 和水温等参数的相关系数绝对值均介于 0.2~0.4 之间, 为弱相关性关系, 说明各种影响发病显著的参数因子影响程度也存在差异, 进一步说明各参数与病害发生的关系较为复杂。

4.3 预报因子的删选

相关性分析表明(图 1), 虾体细菌总数、虾体弧菌总数、LZM、虾体弧菌占比、水体细菌总数、盐度、ACP、水体弧菌、PO 和水温等 10 个参数与对虾 AHPND 发生都存在显著相关性, 是最相关的前 10 个特征值, 可以作为预报模型构建的预选指标。

考虑到这些参数因子之间可能相互影响, 即一个参数的变动会引起另一些参数的变动, 因此, 通过 Pearson 分析进一步探究各因子之间的相关性关系, 逐一剔除对因变量影响不显著或间接作用的因子, 因子间相关系数见表 3。

(1)监测高温期水温与虾体细菌、虾体弧菌、虾体弧菌占比、水体细菌和 LZM 等因子呈一定的负相关性关系, 且相关系数绝对值均介于 0.2~0.4 之间, 为弱相关性关系, 说明随着高温期水温降低这些因子会呈一定程度的升高。与盐度、水体弧菌、PO 和 ACP

等因子相关系数绝对值均低于 0.2, 说明监测期内水温与这些因子之间为极弱相关关系。

(2)盐度与虾体弧菌占比、PO、ACP 和 LZM 等因子呈一定的正相关性关系, 且与 PO、ACP 和 LZM 相关系数的绝对值均大于 0.4, 为中等程度相关, 与虾体弧菌占比相关系数的绝对值为 0.37, 呈弱相关, 说明盐度升高会引起这些因子不同程度的升高; 与其他因子相关系数绝对值均低于 0.2, 为极弱相关。

(3)虾体细菌与虾体弧菌、虾体弧菌占比、水体细菌、水体弧菌、PO、ACP 和 LZM 均呈正相关性关系, 因为虾体弧菌数量也包含在细菌总数中, 所以虾体弧菌直接影响虾体细菌的数量, 其相关系数绝对值为 0.91, 为极强相关, 与水体细菌、虾体弧菌占比和 LZM 相关系数绝对值介于 0.4~0.6 之间, 为中等程度相关, 与水体弧菌和 ACP 相关系数绝对值介于 0.2~0.4 之间, 为弱相关。与 PO 相关系数绝对值为 0.17, 为极弱相关。

(4)虾体弧菌与虾体弧菌占比、水体细菌、水体弧菌、PO、ACP 和 LZM 均呈正相关性关系, 其中虾体弧菌占比是虾体弧菌与细菌的比值, 受虾体弧菌数量的直接影响, 相关系数绝对值为 0.69, 为强相关;

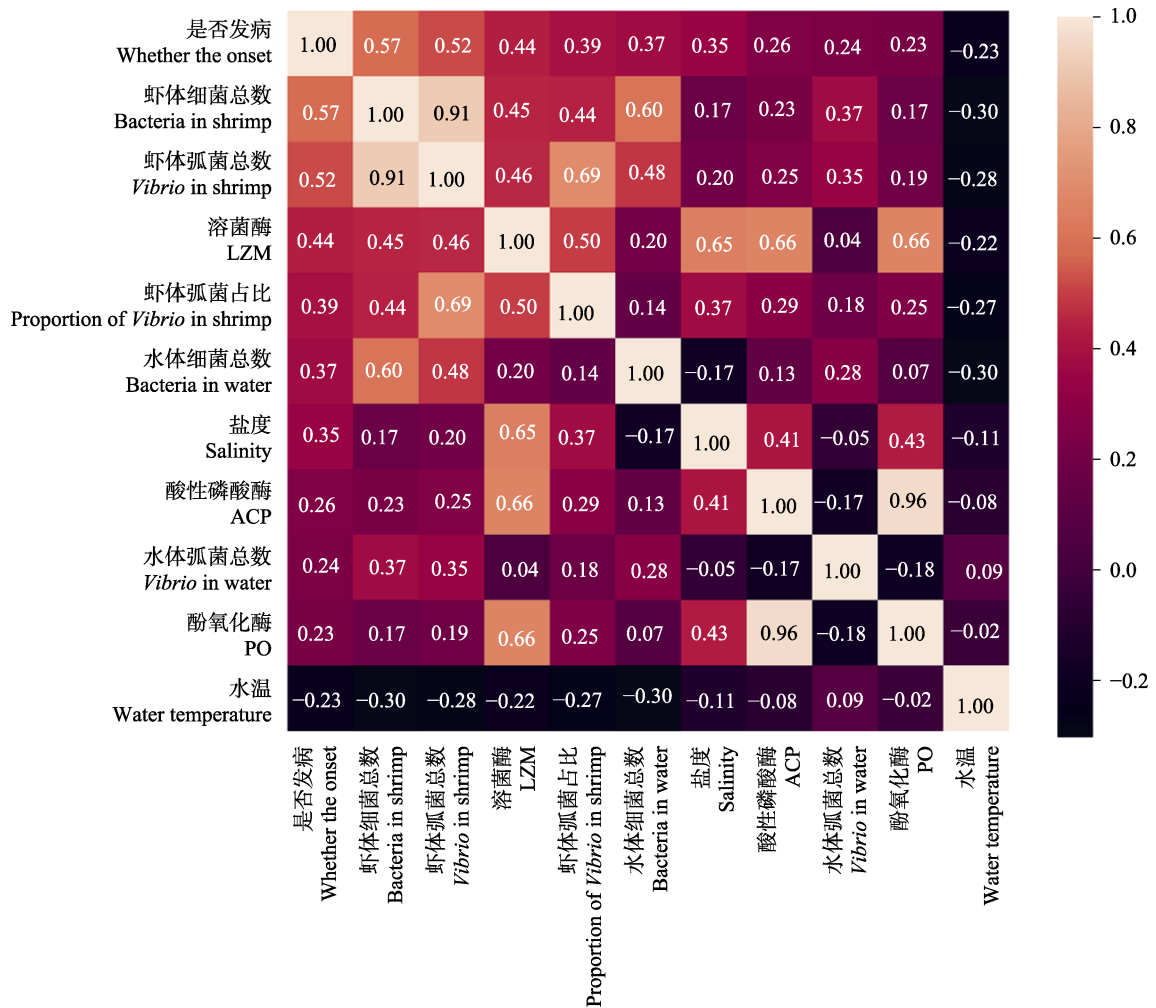


图 1 对虾 AHPND 发生最相关的 10 个特征值相关性热力图

Fig.1 Heatmap of the correlation between the 10 most relevant eigenvalues for the incidence of AHPND

与水体细菌和 LZM 相关系数绝对值介于 0.4~0.6 之间, 为中等程度相关; 与水体弧菌和 ACP 相关系数绝对值介于 0.2~0.4 之间, 为弱相关; 与 PO 相关系数绝对值为 0.19, 为极弱相关。

(5) 虾体弧菌占比与水体细菌、水体弧菌、PO、ACP 和 LZM 均呈正相关性关系, 与 LZM 相关系数绝对值为 0.49, 为中等程度相关; 与 PO 和 ACP 相关系数绝对值介于 0.2~0.4 之间, 为弱相关; 与水体细菌和水体弧菌相关系数绝对值介于 0~0.2 之间, 为极弱相关。

(6) 水体细菌与水体弧菌、PO、ACP 和 LZM 均呈一定程度的正相关性关系, 其中, 与水体弧菌和 LZM 相关系数绝对值介于 0.2~0.4 之间, 为弱相关; 与 PO 和 ACP 相关系数绝对值介于 0~0.2 之间, 为极弱相关。

(7) 水体弧菌与 PO、ACP 和 LZM 相关系数的绝对值均介于 0~0.2 之间, 为极弱相关;

(8) PO 与 ACP、LZM 相关系数的绝对值分别为

0.96 和 0.66, 均为强相关; 与 ACP 和 LZM 相关系数的绝对值为 0.66, 为强相关。

综上所述, 在与对虾发病特征排序前 10 的因子中, 虾体细菌与虾体弧菌高度相关, 与虾体弧菌占比、水体细菌和 LZM 中等程度相关, 虾体弧菌占比直接受虾体弧菌和虾体细菌的共同调控, 水体细菌与虾体弧菌也呈中等程度相关, 说明在对虾整个养殖系统中, 可培养微生物在水体和动物机体中的关联度较高; LZM 与盐度、PO 和 ACP 强相关, 与虾体细菌和虾体弧菌等中等程度相关, 盐度与 PO 和 ACP 中等程度相关, 说明环境因子和病原微生物的外界刺激可能会激发宿主免疫应激反应, 且 LZM、PO 和 ACP 可能存在一定的协同作用。在参数进行降维处理构建模型的过程中, 根据参数因子之间的相关性关系对参数进行剔除, 优先可以采用虾体细菌总数、虾体弧菌总数或虾体弧菌占比、LZM、水体细菌总数、盐度和水体弧菌作为预报模型构建的预选指标。

表3 参数因子之间的相关性分析结果
Tab.3 Correlation analysis results between parameter factors

| 参数 Parameters | 水温 Water temperature | 盐度 Salinity | 虾体细菌 Bacteria in shrimp | 虾体弧菌 Vibrio in shrimp | 虾体弧菌占比 Proportion of Vibrio in shrimp | 水体细菌 Bacteria in water | 水体弧菌 Vibrio in water | 酚氧化酶 PO | 酸性磷酸酶 ACP | 溶菌酶 LZM |
|--|-------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|--|---------------------------|-------------------------|------------|--------------|------------|
| 水温 Water temperature | 1.000 0 | | | | | | | | | |
| 盐度 Salinity | -0.111 0 | 1.000 0 | | | | | | | | |
| 虾体细菌 Bacteria in shrimp | -0.296 0* | 0.169 5 | 1.000 0 | | | | | | | |
| 虾体弧菌 Vibrio in shrimp | -0.281 6* | 0.197 5 | 0.910 0** | 1.000 0 | | | | | | |
| 虾体弧菌占比 Proportion of Vibrio in shrimp | -0.272 1* | 0.3712** | 0.444 9** | 0.693 5** | 1.000 0 | | | | | |
| 水体细菌 Bacteria in water | -0.304 0* | -0.1712 | 0.604 0** | 0.483 9** | 0.142 6 | 1.000 0 | | | | |
| 水体弧菌 Vibrio in water | 0.088 2 | -0.052 1 | 0.370 9** | 0.353 1** | 0.178 3 | 0.279 4* | 1.000 0 | | | |
| 酚氧化酶 PO | -0.021 5* | 0.431 8** | 0.168 6 | 0.185 6 | 0.248 4* | 0.074 0 | -0.182 0 | 1.000 0 | | |
| 酸性磷酸酶 ACP | -0.082 2 | 0.410 7** | 0.229 5* | 0.252 7* | 0.291 1* | 0.129 7 | -0.168 2 | 0.961 0** | 1.000 0 | |
| 溶菌酶 LZM | -0.216 6 | 0.649 4 | 0.453 7** | 0.456 9** | 0.496 2** | 0.201 0* | 0.037 5 | 0.663 8** | 0.661 3** | 1.000 0 |

4.4 预报模型的构建

利用 Deep Forest 算法进行模型构建的同时, 选取了 LightGBM (LGB)和 XGBoost (XGB)等 2 种基于决策树的集成学习方法算法对相同预报因子参数构建模型, 并将预测效果与 Deep Forest 预测效果进行比较分析, 评判不同维度参数和不同算法构建模型的预测效果和可行性, 进而选择最适于对虾 AHPND 发生的预报模型。本章预测算法程序均基于 Python 语言编程, 主要程序运行代码如下:

Deep Forest 算法:

```
from sklearn.datasets import load_digits
from sklearn.model_selection import train_test_split
from sklearn.metrics import accuracy_score
from sklearn.model_selection import KFold
from deepforest import CascadeForestClassifier
import pandas as pd
```

LightGBM 算法:

```
import lightgbm as lgb
import pandas as pd
from sklearn.metrics import mean_squared_error
from sklearn.metrics import accuracy_score
from sklearn.model_selection import train_test_split
from sklearn.model_selection import GridSearchCV
from sklearn.model_selection import KFold
```

XGBoost 算法:

```
from sklearn.datasets import load_iris
from sklearn.model_selection import train_test_split
import xgboost as xgb
import pandas as pd
from sklearn.model_selection import KFold
```

4.5 预报模型的准确度评判

将与发病影响显著的特征排序前 10 的因子, 即: 虾体细菌总数、虾体弧菌总数、LZM、虾体弧菌占比、水体细菌总数、盐度、ACP、水体弧菌、PO 和水温, 按照相关性从大到小排列, 从低维度到高维度依次进行组合, 建立 1~10 参数的对虾 AHPND 预测模型, 并通过模型预测准确率来评判。

模型预测结果如表 4 所示, 不同维度参数组合基于不同算法构建的模型的预测准确率不同, 最高可达 89.00%。基于 Deep Forest 算法, 参数维度由 1~8 的模型准确率随着维度增加逐步提高, 同时, 随着维度增加, 其准确率降低但幅度较小, 其中, 只有 8 维模型的预测准确率最高(89.00%), 其次是 6 维和 9 维模型(88.00%), 5 维和 10 维模型准确率为 87.00%, 2~4 维模型准确率为 85.00%, 1 维模型准确率最低(73.00%), 说明维度过高或过低参数组合的模型都会影响模型的准确率。

表 4 不同维度参数组合、不同算法分类结果比较

Tab.4 Comparison of classification results of different dimension parameter combinations and different algorithms

| 参数个数 Number of parameters | 参数组合 Combination of parameters | 算法 Algorithms | | |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------|----------|
| | | Deep Forest | XGBoost | LightLGB |
| 1 | X1 | 73.00% | 83.00% | 75.00% |
| 2 | X1+X2 | 85.00% | 85.00% | 75.00% |
| 3 | X1+X2+X3 | 85.00% | 83.00% | 75.00% |
| 4 | X1+X2+X3+X4 | 85.00% | 83.00% | 75.00% |
| 5 | X1+X2+X3+X4+X5 | 87.00% | 89.00% | 75.00% |
| 6 | X1+X2+X3+X4+X5+X6 | 88.00% | 85.00% | 75.00% |
| 7 | X1+X2+X3+X4+X5+X6+X7 | 86.00% | 83.00% | 75.00% |
| 8 | X1+X2+X3+X4+X5+X6+X7+X8 | 89.00% | 82.00% | 75.00% |
| 9 | X1+X2+X3+X4+X5+X6+X7+X8+X9 | 88.00% | 83.00% | 75.00% |
| 10 | X1+X2+X3+X4+X5+X6+X7+X8+X9+X10 | 87.00% | 78.00% | 75.00% |

注: X1~X10 分别代表虾体细菌、虾体弧菌、LZM、虾体弧菌占比、水体细菌、盐度、ACP、水体弧菌、PO 和水温。下同。

Note: X1–X10 represent bacteria in shrimp, *Vibrio* in shrimp, LZM, proportion of *Vibrio* in shrimp, bacteria in water, salinity, ACP, *Vibrio* in water, PO, and water temperature, respectively. The same below.

基于 XGBoost 算法, 参数维度 1~10 的模型准确率范围随着维度增加存在较大幅度波动, 预测模型的稳定性还需进一步研究, 只有 5 维模型准确率最高(89.00%), 其次是 6 维模型(85.00%)。1 维模型比基于 Deep Forest 算法的模型准确率高出 10.00%, 为 83.00%, 10 维模型比基于 Deep Forest 算法的模型准确率低 9.00%, 为 78.00%, 其精确度和可适用性还需要后续进一步验证。基于 LightGBM 算法, 参数维度 1~10 的模型准确率不随维度的变化而变化, 一直保持在 75.00%, 预测效果稳定、准确率较低, 缺乏针对性和特异性, 推测该算法可能不适用本研究数据的模型构建。3 种算法对比结果显示, Deep Forest 算法针对对虾 AHPND 发生构建的模型性能要优于 XGBoost 和 LightGBM 两种算法。

4.6 模型的进一步构建

根据参数因子之间的相关性分析结果进一步筛选剔除后, 将与发病影响显著的特征排序前 7 的因子, 即: 虾体细菌总数、虾体弧菌总数、LZM、虾体弧菌占比、水体细菌总数、盐度和水体弧菌, 按照相关性从大到小排列, 从低维度到高维度依次进行组合, 建立 2~7 维参数的对虾 AHPND 预测模型, 并通过模型预测准确率来评判。

模型预测结果如表 5 所示, 不同维度参数组合基于不同算法构建模型的预测准确率也各有不同。其中基于 Deep Forest 算法, 整体比参数因子筛选之前的同维度模型的准确率有了一定程度的提高。准确率最高(89.00%)的模型为 4、5、7 维参数组合, 分别比之

前提高了 4.00%、2.00%、3.00%; 其次为 88.00% 的 4 维(序号 4)和 6 维模型(序号 8), 4 维模型比之前提高了 3.00%, 6 维模型准确率与之前相同; 5 维模型的准确率保持不变(87.00%)(序号 6); 3 维和 4 维模型的准确率均提高了 1.00%, 为 86.00% (序号 2、3)。

基于 XGBoost 算法, 模型准确率随着参数维度的增加依然存在较小范围内的波动, 整体比基于 Deep Forest 算法模型的准确率偏低。其中, 准确率最高(89.00%)的模型依然为 4 维参数组合模型(序号 5), 相比之前提高了 6.00%; 其次为准确率为 86.00% 的 4 维模型(序号 3), 准确率提高了 3.00%; 准确率为 85.00% 的 4 维模型比之前提高了 2% (序号 4)、5 维模型比之前降低了 4.00% (序号 6、7), 预测效果不稳定。基于 LightGBM 算法, 所有参数维度的模型准确率一直保持在 75.00% 不变, 且远远低于另外 2 种算法, 可能对于对虾 AHPND 模型预警没有指导意义。

综合看来, Deep Forest、XGBoost、LightGBM 三种算法对于不同维度参数组合构建模型的预测效果各不相同, 其中, 基于 Deep Forest 算法的模型准确率较高, 随着参数组合维度变化, 构建的模型准确率变化也较稳定, 在一定程度上认为对于对虾 AHPND 发生具有积极的指导意义, 所以本研究优先选择 Deep Forest 算法来构建对虾 AHPND 发生的预警模型。

其中, 基于 Deep Forest 算法准确率最高(89.00%)的有 4、5、7 维模型, 因为高维度的预测模型参数数量较多, 较为复杂, 在实际操作过程中的工作量较大, 采集数据难以及时完成, 因此, 基于实践应用优先选择低维度、准确率高的参数组合来建立对虾 AHPND

表5 筛选因子的不同维度组合、不同算法分类结果比较

Tab.5 Comparison of classification results of different dimension combinations and different algorithms of screening factors

| 序号 Number | 参数个数 Number of parameters | 参数组合 Combination of parameters | 算法 Algorithms | | |
|--------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------|----------|
| | | | Deep Forest | XGBoost | LightGBM |
| 1 | 2 | X1+X4 | 81.00% | 82.00% | 75.00% |
| 2 | 3 | X1+X4+X5 | 86.00% | 82.00% | 75.00% |
| 3 | 4 | X1+X2+X4+X8 | 86.00% | 86.00% | 75.00% |
| 4 | 4 | X1+X2+X5+X6 | 88.00% | 85.00% | 75.00% |
| 5 | 4 | X1+X4+X5+X6 | 89.00% | 89.00% | 75.00% |
| 6 | 5 | X1+X2+X4+X5+X6 | 87.00% | 85.00% | 75.00% |
| 7 | 5 | X1+X4+X5+X6+X8 | 89.00% | 85.00% | 75.00% |
| 8 | 6 | X1+X2+X4+X5+X6+X8 | 88.00% | 82.00% | 75.00% |
| 9 | 7 | X1+X2+X3+X4+X5+X6+X8 | 89.00% | 84.00% | 75.00% |

的预测模型。本研究选择由 X1、X4、X5 和 X6 参数所构建的 4 维模型,即虾体细菌总数、虾体弧菌占比、水体细菌和盐度 4 个参数来构建对虾 AHPND 发生预警预测模型。

5 讨论

Deep Forest 的深度学习将传统机器学习模型中的随机森林作为基础模型,是基于集成模型的深度模型,它也可以在除了大规模图像数据之外的任务中获得和深度神经网络相似的表现,通过在现有模型基础上改进能够比较快进入应用。目前,在保险购买预测场景领域(林鹏程等, 2019)、电力系统短期负荷预测领域(陈吕鹏等, 2018)已实现广泛应用。本研究构建了基于 Deep Forest 算法的 4 维预警模型即虾体细菌总数、虾体弧菌占比、水体细菌和盐度 4 个参数来对对虾 AHPND 发生进行预测预报,准确率为 89.00%。Deep Forest 算法构建的模型准确率高、预测效果稳定,对于预测对虾 AHPND 发生具有积极的实践性应用价值。其中,虾体内病原微生物含量扩增是影响对虾 AHPND 暴发的主要因素,与水体中病原微生物存在一定相互影响,和盐度共同影响导致机体的免疫力下降。有研究表明,随着盐度等环境因子的变化,引起水生动物因渗透压不适而抗病力下降,病原微生物大量扩增会在短时间内引起发病和死亡,这与本研究结果一致(Schofield *et al*, 2021)。盐度高也代表着池水有机物大量积累、病原微生物增殖的状态,意味着疾病发生的风险增大。因此,本研究在预警模型中保留盐度参数具有重要含义和意义。温度变化会导致水质变化加快,水质的不稳定容易引起疾病暴发(Karvonen *et al*, 2010; 张健龙, 2016)。池塘养殖过程中,水温受气温和降雨的影响,其改变会引起水体中

DO、pH、氨氮和亚硝态氮的联动变化(于永翔等, 2023)。但水温变化短期波动较慢,并且在适宜范围内的水温变化对微生物增殖和对虾机体免疫的影响较低且具有滞后性, Pearson 相关分析也表明,当日检测的水温与病原微生物丰度和对虾免疫酶活性的相关性较低。而虾体细菌总数、虾体弧菌占比、水体细菌和盐度 4 个参数的权重高于温度。

目前,国内外许多学者已报道了较多水产动物病害预警模型,大量研究在水质预警方面积累了丰富的经验。其中, Silva 等(2016)构建了基于潮汐、水温和盐度等环境因子的有害藻华预警系统,预测准确性高达 85%。周瑞娟(2011)利用多元线性回归、灰色系统理论和 BP 神经网络等构建了基于水温、透明度和风力等环境因子的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)主要细菌性疾病预警模型,其中 BP 神经网络模型准确率最高达到 81.53%。蔡晓鹏(2013)利用多元线性回归、随机森林算法构建了基于水温、溶解氧和化学耗氧量等环境因子的大黄鱼刺激隐核虫病(cryptocaryoniosis)预警预报模型,其中随机森林模型准确率最高达到 83.60%。

水产养殖动物的病原主要以病毒、细菌和寄生虫 3 类为主,目前国内外关于病原相关指标应用于水产病害预警方面的研究报道还较少,其中,冯振飞等(2009)利用多元线性统计方法构建了基于盐度、降雨量和弧菌数的养殖锯缘青蟹(*Scylla serrata*)黄水病预报模型,其准确率达 84.90%,可以较好地用于测报黄水病发病率。宋林生(2020)利用 BP 神经网络构建了基于海水温度、叶绿素含量、弧菌丰度、养殖动物总抗氧化能力和闭壳肌糖原含量的虾夷扇贝病害预警预报体系,其预测效果较好。传统的水产疾病学理论认为,疾病的发生是病原、宿主和环境三者相互影响和作用的结果。笔者认为,病原的存在是疾病发生的重要前提,疾病预警模型体系中包含病原这一指标

是有必要的。本研究构建的基于 Deep Forest 算法的 4 维预警模型的准确率为 89.00%，高于上述没有病原指标的几种预警模型的准确度。

本研究通过对凡纳对虾 AHPND 发生前后的水质因子、健康指标、病原结构三者的协同属性进行分析，建立量化评判指标，解析其变化情况与疾病发生的相关性，并运用多元统计理论和数学演算模型，建立不同参数的相关性方程，确定各个参数在疾病发生过程中的权重大小，进而构建不同疾病的预警数学模型。其中，基于 Deep Forest 算法构建的 AHPND 预警模型准确率较高，并依据因子之间的相关性关系逐步分析剔除，选择以虾体细菌总数、虾体弧菌占比、水体细菌和盐度 4 个参数构建对虾 AHPND 发生预警预测模型。本研究突破了水产养殖系统环境因子、病原数量和宿主健康程度在疾病预警模型中的相关性分析技术，创新水产动物疾病预警的理论体系，为我国水产病害的科学预警和有效防控奠定了技术基础。

参 考 文 献

- BEAZ-HIDALGO R, BALBOA S, ROMALDE J L, *et al.* Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(1): 34–43
- BI C G, WANG J L, HU N, *et al.* A Bayesian neural network-based early warning model for maize diseases. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2021, 43(2): 189–195 [毕春光, 王金龙, 胡楠, 等. 基于贝叶斯神经网络的玉米病害预警模型. 吉林农业大学学报, 2021, 43(2): 189–195]
- CAI X P. Preliminary construction of large yellow croak disease diagnosis and pre-warning models system. Master's Thesis of Xiamen University, 2013 [蔡晓鹏. 大黄鱼疾病诊断与预警系统初步构建. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2013]
- CHEN L P, YIN L F, XU T, *et al.* Short-term power load forecasting based on deep forest algorithm. *Electric Power Construction*, 2018, 39(11): 42–50 [陈吕鹏, 殷林飞, 余涛, 等. 基于深度森林算法的电力系统短期负荷预测. 电力建设, 2018, 39(11): 42–50]
- CHEN M M, DONG X, QIU L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (V_{pAHPND}) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93–100 [陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(V_{pAHPND})的定量分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 93–100]
- FENG Z F, WANF G L, NI H E. The forecast model of yellow water disease in mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, 2009, 28(12): 713–716 [冯振飞, 王国良, 倪海儿. 养殖锯缘青蟹黄水病流行病学及其预报模型. 水产科学, 2009, 28(12): 713–716]
- GAO Z G. Research on prediction for quality of transmission and optimization for resource allocation in optical networks based on machine learning. Doctoral Dissertation of Beijing University of Posts and Telecommunications, 2020 [高争光. 基于机器学习的光网络传输质量预测方法与资源优化技术. 北京邮电大学博士研究生学位论文, 2020]
- HA J G, MOON H, KWAK J T, *et al.* Deep convolutional neural network for classifying fusarium wilt of radish from unmanned aerial vehicles. *Journal of Applied Remote Sensing*, 2017, 11(4): 042621
- HAMER W B, BIRR T, VERREET J A, *et al.* Spatio temporal prediction of the epidemic spread of dangerous pathogens using machine learning methods. *International Journal of Geo-Information*, 2020, 9(1): 44
- HAN L, WANG X H, YANG B, *et al.* Analysis of pathogen in an outbreak death of *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 431–441 [韩琳, 王秀华, 杨冰, 等. 一例日本囊对虾暴发性死亡的病原分析. 水产学报, 2018, 42(3): 431–441]
- HUANG L S, ZHANG H S, DING W J, *et al.* Monitoring of wheat scab using the specific spectral index from ASD hyperspectral dataset. *Journal of Spectroscopy*, 2019, 2019(1): 9153195
- JIA D, SHI C Y, HUANG J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103–111 [贾丹, 史成银, 黄健, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 103–111]
- KARVONEN A, RINTAMKI P, JOKELA J, *et al.* Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. *International Journal for Parasitology*, 2010, 40(13): 1483–1488
- LIN P C, TANG H. Application of an improved Deep Forest algorithm in insurance purchase prediction scenario. *Modern Information Technology*, 2019, 3(22): 116–122 [林鹏程, 唐辉. 一种改进 Deep Forest 算法在保险购买预测场景中的应用研究. 现代信息科技, 2019, 3(22): 116–122]
- MA Z. The construction of DSS in water quality management of intensive *Litopenaeus vannamei* shrimp tanks. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [马真. 凡纳滨对虾集约化养殖水质管理决策支持系统的构建. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- PAILLARD C, LE ROUX F, BORREGO J J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 2004, 17(4): 477–498
- RUMPF T, MAHLEIN A K, STEINER U, *et al.* Early detection and classification of plant diseases with support vector machines based on hyperspectral reflectance. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2010, 74(1): 91–99
- SCHOBER P, BOER C, SCHWARTE L A. Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 2018, 126(5): 1763–1768

- SCHOFIELD P J, NOBLE B L, CARO L F A, *et al.* Pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) on the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture Research*, 2021, 52(4): 1480–1489
- SILVA A, PINTO L, RODRIGUES S M, *et al.* A HAB warning system for shellfish harvesting in Portugal. *Harmful Algae*, 2016, 53: 33–39
- SONG L S. An early warning system for diseases during mollusc mariculture: Exploration and utilization. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 1–9 [宋林生. 海水养殖贝类病害预警预报技术及其应用. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(1): 1–9]
- SOTO-RODRIGUEZ S A, GOMEZ-GIL B, LOZANO-OLVERA R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689–1699
- UNDERWOOD K L, RIZZO D M, DEWOOLKAR M M, *et al.* Analysis of reach-scale sediment process domains in glacially-conditioned catchments using self-organizing maps. *Geomorphology*, 2021, 382: 107684
- WAN Q, WANG Q L, WANG R H, *et al.* Short-term load forecasting of a regional power grid based on support vector machine. *Power Grids and Clean Energy*, 2016, 32(12): 14–20 [万强, 王清亮, 王睿豪, 等. 基于支持向量机的某地区电网短期电力负荷预测. *电网与清洁能源*, 2016, 32(12): 14–20]
- XU Y J. Early warning model for water eutrophication based on BP artificial neural network and genetic algorithm. *Computer Science*, 2017, 44(6A): 126–128 [徐云娟. 基于BP神经网络和遗传算法的养殖水域预警模型. *计算机科学*, 2017, 44(6A): 126–128]
- YU Y X, WANG Y G, CAI X X, *et al.* The occurrence of AHPND in pond cultured *Litopenaeus vannamei* and its influence on environment, pathogen and immune factors. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(1): 1–10 [于永翔, 王印庚, 蔡欣欣, 等. 环境、病原、免疫因子三要素与池塘养殖对虾 AHPND 发生的关联性. *水生生物学报*, 2023, 47(1): 1–10]
- ZHANG J L. Research on water quality factors and aquatic organism in *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [张健龙. 凡纳滨对虾养殖池水质因子及水生生物研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- ZHOU R J. Studies on the forecasting of the main disease in cage-cultured *Pseudosciaena crocea*. Master's Thesis of Ningbo University, 2011 [周瑞娟. 网箱养殖大黄鱼主要疾病的预报模型研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2011]

(编辑 马瑾艳)

Construction of an Early Warning Mathematical Model for *Penaeus vannamei* AHPND Based on the Deep Forest Algorithm

WANG Yingeng^{1,2}①, YU Yongxiang^{1,2}, CAI Xinxin¹, ZHANG Zheng^{1,2},
WANG Chunyuan¹, LIAO Meijie^{1,2}, ZHU Hongyang¹, LI Hao¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China)

Abstract Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is widely prevalent, has a rapid onset, and has high mortality in shrimp culture, making it a key limiting factor affecting shrimp aquaculture development in recent years, resulting in massive economic losses to the industry worldwide. Systematic studies that investigate which factors significantly correlate with the occurrence of AHPND, and further establishment of a prediction model for the occurrence of shrimp AHPND, are important for preventing and controlling the disease. In this study, *Penaeus vannamei* in pond culture were preliminarily analyzed for the coupling relationship between the occurrence and prevalence of AHPND in shrimps and pathogens, and for environmental and host autoimmune factors by assessing the environmental factors, pathogen

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

abundance, and host health indicators under AHPND incidence. Then, a mathematical early warning model of AHPND occurrence in pond-cultured *P. vannamei* was constructed using Deep Forest algorithm. The occurrence of AHPND and its environment, pathogen, and shrimp immunity factors in pond-cultured *P. vannamei* were continuously monitored to explore the relationship between the occurrences of AHPND in relation to these factors. A total of 18 parameters were assessed, including the air and water temperature, salinity, pH, dissolved oxygen (DO), ammonia nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) and nitrite ($\text{NO}_2\text{-N}$) concentrations, culturable bacteria and *Vibrio* in water, culturable bacteria and *Vibrio* in the shrimp hepatopancreas, the proportion of *Vibrio* in water and the shrimp hepatopancreas, and the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LZM), and phenol oxidase (PO) in shrimp muscles. The parameter simulation prediction data based on the *P. vannamei* AHPND occurrence-related factor sequence (environmental factor, microbial factor, and shrimp health indicator) were constructed for the first time. The one-dimensional sequence was mapped into the three-dimensional space, different kernel functions were selected in combination with the actual classification problem to compare the model fitting accuracy, and the test algorithm optimized the parameters in the model. A total of 140 relevant data groups were collected under the same mode, and the groups of additional exogenous inputs during the breeding process were eliminated. After deleting invalid data, there were 100 groups of classified monitoring data, including 25 groups of morbidity data and 75 groups of health data. Moreover, the model was affected due to the dimensional and quantitative differences among different factors. In order to improve the speed of subsequent experimental training and prediction accuracy, the 100 groups of training test data processed by the mapminmax function were normalized for data processing. The relationship between 18 parameters and the occurrence of AHPND in *P. vannamei* was analyzed using Pearson's correlation, and the main influencing factors were further screened using pairwise analysis between the factors. Pearson's correlation analysis indicated that the incidence of AHPND positively correlated ($P < 0.05$) with salinity, the number of culturable bacteria and *Vibrio* in the shrimp, the proportion of *Vibrio* in the shrimp, the number of culturable bacteria and *Vibrio* in water, and the activities of LZM, ACP, and PO in shrimp muscles. The correlation coefficients were 0.350 1, 0.574 1, 0.521 1, 0.391 1, 0.374 7, 0.238 3, 0.438 2, 0.257 1, and 0.228 9, respectively, indicating that AHPND was more likely to occur with an increase of these parameter values within a certain range. The incidence of AHPND negatively correlated with water temperature ($P < 0.05$), and the correlation coefficient was $-0.227 9$. Moreover, the water temperature, pH, DO, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ concentrations, *Vibrio* proportion in water, AKP, and SOD had a weak correlation with the incidence of AHPND ($P > 0.05$). Furthermore, parameters were removed in the model construction process according to the correlation between parameters and factors. The occurrence of AHPND in *P. vannamei* directly and significantly correlated with seven parameters, including the total number of shrimp bacteria, the total number of shrimp *Vibrio*, LZM, the proportion of shrimp *Vibrio*, the total number of water bacteria, salinity, and the total number of water *Vibrio*. The prediction performance of three popular integrated learning method algorithms based on decision tree, Deep Forest, LightGBM, and XGBoost was evaluated using Python language programming, and, finally, a four-dimensional vector early warning prediction model based on the Deep Forest algorithm for the total number of shrimp bacteria, the proportion of *Vibrio* shrimp, the total number of water bacteria, and salinity was established (accuracy: 89.00%). Although the prediction performance of the Deep Forest model decreased somewhat compared with that of the support vector machine model established in this study, the algorithm was gradually screened out based on the correlation between factors, including the effects of all factors. It was proven that the Deep Forest model established in this study was the ideal prediction model for predicting the occurrence of AHPND in *P. vannamei* among the 10 dimension parameters tried, and the superiority of the Deep Forest algorithm was also further verified. The results provide basic data and technical support for shrimp AHPND disease prediction, prevention and control, and lay a theoretical foundation for further establishment of aquaculture animal disease early warning theory.

Key words Shrimp; AHPND; Early warning mathematical model; Deep Forest algorithm; Python programming language

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230211001

http://www.yykxjz.cn/

刘定远, 王春元, 于永翔, 王印庚, 李京泽, 张晓松, 秦蕾, 张正. 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *dly* 基因缺失株构建及其生物学特性研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 182–192

LIU D Y, WANG C Y, YU Y X, WANG Y G, LI J Z, ZHANG X S, QIN L, ZHANG Z. Construction and biological characteristics of the *dly*-deleted mutant strain of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 182–192

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *dly* 基因缺失株构建及其生物学特性研究*

刘定远^{1,2} 王春元² 于永翔² 王印庚² 李京泽²
张晓松² 秦蕾¹ 张正^{2①}

(1. 江苏海洋大学 江苏 连云港 222005;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071)

摘要 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是广泛分布于全球海洋环境中的一种致病菌。本研究以实验室保存的一株高致病性 PDD 菌株(PDD1608)作为对象,初步探究毒力基因 *dly* 对 PDD 菌株的生物学特性和致病力的影响。利用 λ Red 重组技术成功构建毒力基因 *dly* 缺失株 Δdly PDD1608::Cm,比较野生株和缺失株的生长、涌动性、药物敏感性、生理生化特性、生物被膜形成能力、菌株及胞外产物(extracellular products, ECP)的溶血性和磷脂酶活性等生物学特性。选用海水青鲳鱼(*Oryzias melastigma*)作为实验动物,通过人工感染实验测定野生株和缺失株及其 ECP 对海水青鲳鱼的致病性。结果显示,毒力基因 *dly* 缺失后导致 PDD 菌株生长变慢,涌动性、溶血性和磷脂酶活性均降低;野生株和缺失株的药物敏感性和生理生化特性未产生变化;与野生株相比,缺失株的生物被膜形成能力有显著差异($P<0.05$);人工感染实验表明,缺失株及其 ECP 对海水青鲳鱼的致病性降低。毒力基因 *dly* 影响 PDD 菌株的生长、涌动性、溶血性和磷脂酶活性等多种生物学特性,并且与 PDD 菌株及其 ECP 的致病力强弱密切相关。

关键词 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; 缺失株; 胞外产物; 生物学特性; 致病性

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0182-11

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种在全球海洋环境中广泛分布的革兰氏阴性病原菌,可感染多种海洋生物如鱼类、软体动物以及哺乳动物(Takahashi *et al*, 2008)。2016、2017年间,山东省长岛深远海网箱养殖的许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)先后2次暴发疾病,病鱼表现

出鳍基出血和皮肤溃疡等临床症状,经过组织剖检、细菌分离鉴定和人工感染实验验证,证实 PDD 是造成网箱养殖许氏平鲷暴发大规模疾病的主要致病菌(Zhang *et al*, 2019)。目前, PDD 在海水养殖产业内的致病案例逐渐增多,且致病宿主多样化,对我国海水养殖行业的健康发展造成了新的危害(施琳妮, 2019)。

* 山东省自然科学基金(ZR2021MC027; ZR2020QC216)和山东省重点研发计划(科技示范工程)(2021SFGC0701)共同资助。刘定远, E-mail: 83966953@qq.com

① 通信作者: 张正, 研究员, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-02-11, 收修改稿日期: 2023-02-26

国内外研究表明, PDD 的毒力因子主要由胞外蛋白酶类, 胞外溶血素以及细胞毒素三大类组成 (Terceti *et al*, 2016), 细菌毒力因子是导致宿主感染、产生病理损伤和避开宿主防御的主要因素 (Austin *et al*, 2007)。溶血素在多种致病菌中均有发现 (Labella *et al*, 2020), 是多种致病菌的重要毒力因子之一, 尤其在弧菌属 (*Vibrio*) 细菌中普遍存在, 如哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 就具有多种溶血素 (Zhang *et al*, 2001)。宿主感染 PDD 后的症状通常表现为出血性败血症 (吴同全等, 2018), 因此, 针对 PDD 致病机理的研究多集中于其溶血能力的研究。现有的研究结果显示, PDD 产生的毒素分别为毒性质粒 pPHDD1 编码产生的毒素 damselysin (Dly) 和 phobalysin P (PhlyP) (Rivas *et al*, 2011), 以及染色体 I 编码产生的磷脂酶 (phospholipase) (PlpV) 和溶血素 (phobalysin C, PhlyC) (Terceti *et al*, 2017), 同时, 质粒编码的溶血素与染色体编码的溶血素之间的协同作用同样对菌株的溶血能力及毒力具有重要影响 (Vences *et al*, 2017)。

本实验室目前分离收集到 45 株 PDD, 经过 *dly*、*PhlyP*、*PhlyC* 和 *PlpV* 等多个毒力基因的鉴定结合动物感染实验, 将收集保存的 PDD 菌株分为强毒株、中毒株和弱毒株 (刘潇等, 2021), 其中, 具有高致病性的强毒株的实验室编号为 PDD1608 和 PDD1605, 与其他中毒株和弱毒株相比, 高致病性的强毒株含有上述 4 种毒力基因且溶血性最强, 对宿主具有很强的致病力。中毒株和弱毒株未携带毒力基因 *dly* 和 *PhlyP*, 对宿主的致病力与强毒株相比明显降低, 并且中、弱毒株分别表现为弱溶血活性和无溶血活性。本研究以其中的 1 株高致病性强毒株 PDD1608 作为对象, 通过构建野生株 PDD1608 毒力基因 *dly* 缺失株, 比较野生株和缺失株的生长、耐药性、生理生化

表型和菌株及其胞外产物 (extracellular products, ECP) 的溶血性、磷脂酶活性等多种生物学特性, 同时, 进行野生株和缺失株及其 ECP 对海水青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*) 的人工感染实验并计算 LD₅₀, 以期为 PDD 致病机制研究和疫苗研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验选取的菌株 PDD1608 现存于中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖病原菌株库内, 分离自海水网箱养殖患病许氏平鲈的体表溃疡处 (Zhang *et al*, 2019)。质粒 pACYC184 和 pCVD442 购自武汉森灵生物科技有限公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) β2155 购自宝赛生物公司。

1.2 主要试剂及引物

高保真酶 PrimeSTAR[®] Max DNA polymerase 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 20×PBS 缓冲液和革兰氏染色液购自北京索莱宝科技有限公司; 限制性内切酶 *Sma* I 购自赛默飞世尔科技公司; T4 DNA 连接酶、细菌 DNA 提取试剂盒、胶回收 DNA 纯化试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 无菌脱纤维绵羊血购自南京森贝伽生物科技有限公司; 抗菌药物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司; 生化鉴定管和 50% 卵黄乳液购自青岛海博生物技术有限公司; NaCl 购自国药集团化学试剂有限公司; 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 和 TCBS 琼脂培养基购自北京陆桥技术股份有限公司; 琼脂、LB 培养基和引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

表 1 PDD 毒力基因 *dly* 缺失株构建的引物信息

Tab.1 Primers for the virulence gene *dly*-deleted mutant strain construction

| 引物 Primes | 序列(5'~3') Sequence(5'~3') | 产物大小 Product size/bp |
|------------------|---|-------------------------|
| <i>dly</i> -5F | GATAGTAATGACCGCTGAATGTGATATTAATAGC | 893 |
| <i>dly</i> -5R | GGATCTAATTGATGAGAGATTTTCAAGTC | |
| <i>dly</i> -3F | CGTTTTTATTTTCATAAGTAAATGTCCATATAACC | 990 |
| <i>dly</i> -3R | GTTGAGCAGAAGATTGCAGATAGAAATATA | |
| <i>dly</i> -CmF | GACTTGAAAAATCTCTCATCAATTAGATCCGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA | 1 071 |
| <i>dly</i> -CmR | GGTTATATGGACATTTACTTATGAAAAATAAAAACGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC | |
| <i>dly</i> -outF | GAGCACCTGTGTTTACTGGAGG | 3 058 |
| <i>dly</i> -outR | GTGCAGGGACAATATTGCCAACAG | |
| <i>dly</i> -inF | GATAGCCATGTATCAATTAATTGTTGTG | 335 |
| <i>dly</i> -inR | CTAGAGCATACTGTTTCGATTACCA | |

1.3 缺失株构建

以美人鱼发光杆菌美人鱼亚种野生株 PDD1608 基因组 DNA 为模版,用引物 *dly*-5F/5R 和 *dly*-3F/3R 扩增 *dly* 基因上、下游同源臂片段;用引物 *dly*-CmF/*dly*-CmR 从 pACYC184 质粒上扩增氯霉素抗性基因 (Cm 抗性基因)作为替换 *dly* 基因的片段,通过融合 PCR 技术将 *dly* 基因上、下游同源臂片段和 Cm 抗性基因片段连接构成为打靶片段 $\Delta dly1608::Cm$,再将其克隆入自杀质粒 pCVD442,获得打靶质粒 pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 。

通过电转化法 (Lee *et al.*, 2009) 将打靶质粒 pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 转入大肠杆菌 DH5 α λ pir, 在双抗 LB 平板(氨苄青霉素和氯霉素含量分别为 50 μ g/mL 和 17 μ g/mL)上,于 37 $^{\circ}$ C 培养至单克隆形成。单克隆经测序验证正确后,将其接种于 3 mL 双抗 LB 液体培养基(氨苄青霉素和氯霉素含量分别为 50 μ g/mL 和 17 μ g/mL),在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下过夜培养,次日使用试剂盒纯化提取质粒 DNA。

将打靶载体 pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 电转化进入大肠杆菌 β 2155 菌株,涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 0.5 mmol/L 二氨基庚二酸(DAP, 阿拉丁试剂)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养至单克隆菌落形成,此克隆即为用于接合实验的供体菌株 *E. coli* β 2155/pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 。

供体菌株 *E. coli* β 2155/pCVD442- $\Delta dly1608::Cm$ 和野生株 PDD1608 分别过夜培养,各取 500 μ L 菌液混合,进行接合实验,取 50 μ L 接合后的菌液涂布于含有氯霉素(10 μ g/mL)的 1.5% NaCl LB 平板,30 $^{\circ}$ C 培养至单克隆形成,随机挑取数个($n \geq 5$)单克隆菌体,用引物 *dly*-inF/*dly*-inR、*dly*-outF/*dly*-outR 对单克隆菌体进行 2 次 PCR 产物测序验证,引物 *dly*-inF/*dly*-inR 检测结果阴性,而引物 *dly*-outF/*dly*-outR 检测结果阳性的单克隆菌株即为毒力基因 *dly* 缺失株,命名为 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 。

1.4 野生株和 *dly* 基因缺失株的表型测定

菌液制备:将菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 划线接种于含 1.5% NaCl 的 TSB 固体培养基,于 28 $^{\circ}$ C 培养箱内静置培养,挑取 2 株菌的单菌落分别接种于 10 mL 含 1.5% NaCl 的 TSB 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下过夜培养,调整各菌株 $OD_{600\text{ nm}}=0.6$ 。

1.4.1 生长曲线测定 将制备的菌液按 1:100 比例稀释接种于 96 孔板中,每孔 300 μ L,每株菌做 3 个平行,含 1.5% NaCl 的 TSB 液体培养基为空白对照。

用全自动生长曲线分析仪(型号: Bioscreen C $^{\circ}$ Pro)每隔 2 h 测 1 次 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,绘制生长曲线。

1.4.2 涌动性 (swarming) 检测 用移液枪分别吸取 3 μ L 菌液垂直滴加到半固体 TSB 培养基(含 0.6% 琼脂)中,每株菌设 5 个平行,将平板正置放于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 24 h,观察记录各菌株涌动圈大小。

1.4.3 生理生化特性测定 用购自青岛海博生物技术有限公司的细菌微量生化鉴定管进行菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的生理生化特性测定,于 28 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h 后观察不同菌株的生理生化反应实验结果。

1.4.4 生物被膜形成能力测定 将菌液按 1:100 稀释。取 200 μ L 稀释后的菌液添加至无菌 96 孔板中,每株菌设 3 个平行,以新鲜 TSB 液体培养基作为阴性对照。96 孔板加盖后用封口膜密封,静置于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 48 h,吸净菌液,使用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗添加过菌液的加样孔,自然风干后,每孔加 200 μ L 甲醇固定 15 min,吸净甲醇,晾干后用 1% 结晶紫溶液染色 5 min,使用 ddH $_2$ O 清洗 3 次。完全干燥后,使用 95% 乙醇溶液溶解黏附的被膜,使用酶标仪测定 $OD_{595\text{ nm}}$ 值(Zhang *et al.*, 2021)。

1.5 药物敏感性实验

采用 K-B 纸片扩散法进行菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的抗生素药敏实验,用灭菌镊子夹取药敏纸片(购自杭州微生物试剂有限公司)贴于涂有菌液的平板之上,28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中静置培养 12 h,测量抑菌圈直径,药敏实验结果与美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准对比,从而判定不同菌株的药物敏感度。

1.6 菌株及 ECP 溶血活性和磷脂酶活性测定

1.6.1 菌液制备和 ECP 的提取 菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 在 TSB 平板上活化并纯化培养后,挑取 2 株菌的单菌落,接种于 50 mL 的液体 TSB 培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 10 h 制备种子液。分别取 5 mL 种子液稀释至 10^5 CFU/mL 备用。参考李永杰等(2022)的方法,进行 10^9 CFU/mL 高浓度菌液和 ECP 原液的制备,并对 ECP 原液进行有无活菌的检验,吸取 100 μ L 的 ECP 原液涂布于 TSB 平板,经检验,培养基上无菌落长出,将 ECP 原液分装进 50 mL 离心管中备用。

1.6.2 菌株及 ECP 的溶血性测定 在含有 1.5% NaCl 的 TSB 中添加 5% (V/V) 脱纤维绵羊血,并在平板中央放置一枚牛津杯制备成打孔绵羊血平板,用于

测定菌株及 ECP 的溶血能力(刘潇等, 2021)。每个绵羊血平板的牛津杯孔中分别加入 100 μ L 的菌液和 ECP 原液进行溶血性的测定, 在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中静置 24~48 h, 及时观察并拍照记录, 对照组为无菌 TSB 液体培养基, 重复实验 3 次。

1.6.3 菌株及 ECP 的磷脂酶活性测定 在含有 1.5% NaCl 的 TSB 中添加 3% (V/V) 卵黄乳液, 并在平板中央放置一枚牛津杯制备成打孔卵黄平板, 用于测定菌株及 ECP 分解卵磷脂的能力(刘潇等, 2021)。每个卵黄平板的牛津杯孔中分别加入 100 μ L 的菌液和 ECP 原液进行卵磷脂分解能力的测定, 在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中静置 24~48 h, 及时观察并拍照记录, 对照组为无菌 TSB 液体培养基, 重复实验 3 次。

1.7 菌株及 ECP 的致病力验证

从山东省青岛市某公司购买健康海水青鲮鱼, 平均体长为 2.5 cm, 平均体重为 55 mg。参照海水青鲮鱼饲养方法(Wittbrodt *et al.*, 2002; Takao *et al.*, 2010), 养殖系统为充分曝气的水循环系统, 水温为(23 \pm 1) $^{\circ}$ C, 每日投喂 1 次卤虫(*Artemia salina*)饵料, 投喂量以 5 min 内吃完为宜。320 尾实验鱼在水循环和增氧条件下暂养 7 d, 实验前 24 h 停止喂食。

参照 1.6 制备 10⁹ CFU/mL 的高浓度菌液和 ECP 原液, 菌液经 10 倍稀释法涂布、计算后, 记录初始菌液浓度; 使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定 ECP 的蛋白浓度。

实验选用海水青鲮鱼作为宿主, 在对鱼体进行背部肌肉轻微创伤后, 分别进行 PDD1608、 Δ *dly*PDD1608::Cm 菌液及 ECP 的浸浴攻毒实验。每

个菌液的攻毒实验设定 5 个浓度梯度(10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ 和 10⁴ CFU/mL), 每个梯度攻毒实验组 10 条海水青鲮鱼, 设置 2 组平行实验, 使用无菌 PBS 作为对照。每个菌株 ECP 的攻毒实验设定 5 个浓度梯度(1、1/2、1/4、1/8 和 1/16 ECP 原液), 每个实验组 10 条海水青鲮鱼, 设置 2 组平行实验, 以无菌 PBS 为对照实验组。

于攻毒后 2、4、6、8、12、16、20、24、48、72、96、120、144 和 168 h 进行观察, 及时记录不同浓度组的死亡数量, 直至连续 3 d 以上未出现死亡后可结束实验, 参考 Bliss 算法计算半数致死量 LD₅₀。

1.8 数据处理及分析

本研究中, 生长曲线测定、涌动性、生物被膜测定和宿主攻毒感染等实验中得到的数据, 均利用统计学软件 Graphpad Prism8 进行数据汇总、分析及作图。

2 结果

2.1 缺失株 Δ *dly* PDD1608::Cm 的鉴定

利用 λ Red 重组法构建获得 *dly* 基因缺失株, 随机挑取单克隆菌落($n>10$)进行 PCR 鉴定。用检测毒力基因 *dly* 的引物 *dly*-inF/*dly*-inR 进行 PCR 扩增, 结果见图 1a。野生株 PDD1608 作为阳性对照扩增出 335 bp 的目的片段(编号 23), 挑取的 22 个单克隆(编号 1~22)菌落中有 19 个未扩增出目的片段, 3 个单克隆扩增出目的片段(编号 2、5、11)。从未扩增出条带的单克隆菌落中选取一个单克隆(1 号单克隆)进行毒力基因

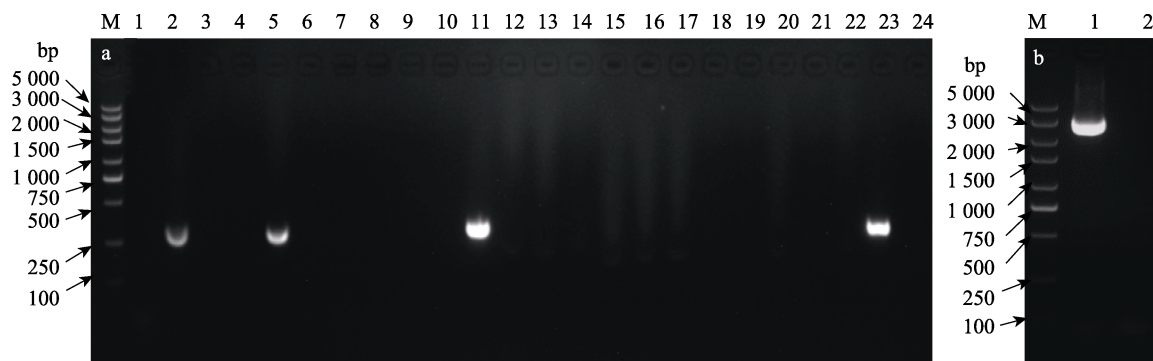


图 1 *dly* 基因缺失株的鉴定结果

Fig.1 Results of *dly*-deleted mutant strain identification

a: 单克隆菌落毒力基因 *dly* 琼脂糖凝胶电泳检测结果;

b: 1 号单克隆菌落毒力基因 *dly* 的上下游同源臂(含 Cm 基因片段)琼脂糖凝胶电泳检测结果。

a: Agarose gel electrophoresis test of monoclonal colony virulence genes *dly*;

b: Agarose gel electrophoresis test of the upstream and downstream homology arms (containing Cm gene fragment) of the No.1 monoclonal colony virulence gene *dly*.

dly 外部基因的检测, 利用引物 *dly-outF/dly-outR* 进行 PCR 扩增得到 3 058 bp 的目的片段(图 1b), 经过测序验证后, 表明毒力基因 *dly* 缺失株构建成功, 命名为 Δdly PDD1608::Cm。

2.2 野生株和缺失株的表型差异

2.2.1 生长差异比较

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 在 TSB 液体培养基中经过全自动生长曲线分析仪 32 h 的检测记录($OD_{600\text{ nm}}$)后, 导出数据并绘制生长曲线。结果显示, 野生株 PDD1608 生长速度较快, 在 2~10 h 内处于生长对数期阶段。缺失株 Δdly PDD1608::Cm 生长速度与野生株 PDD1608 生长速度相比有所降低, 在 8~16 h 内处于对数生长期(图 2)。由此得出, *dly* 基因的缺失在一定程度上减缓了 PDD1608 菌株在 TSB 液体培养基中的生长速度。

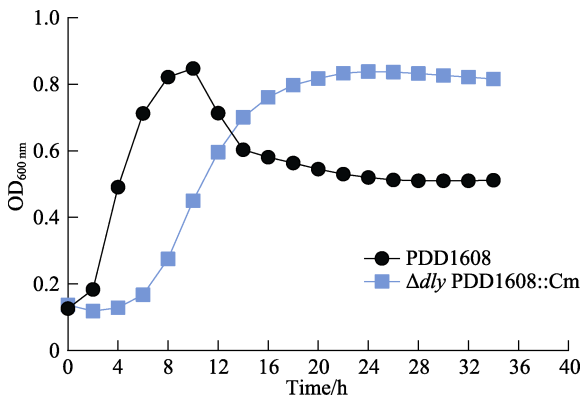


图 2 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的生长曲线

Fig.2 Growth curves of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

2.2.2 涌动性差异

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 在 28 °C 培养 24 h, 测量对比发现, *dly* 基因缺失后, 缺失株 Δdly PDD1608::Cm 与野生株 PDD1608 相比涌动性降低, 有极显著差异($P<0.01$) (图 3)。

2.2.3 生理生化特性分析

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的 26 种生化鉴定管结果显示, 2 株菌 26 种生化鉴定管的结果一致, 毒力基因 *dly* 缺失后对菌株的生理生化表型未造成改变(表 2)。

2.2.4 生物被膜形成能力比较

使用结晶紫染色法对 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 两株菌的生物被膜形成测定结果显示, 与野生株 PDD1608 相比, Δdly PDD1608::Cm 的生物被膜形成能力显著下降($P<0.05$)(图 4), 这表明毒力基因 *dly* 可能参与调控了 PDD 菌株生物被膜的形成。

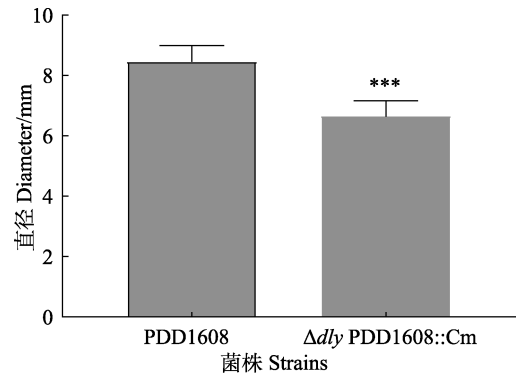


图 3 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 涌动性分析

Fig.3 Swarming motility of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

***表示差异极显著($P<0.01$)。

*** indicate highly significant difference ($P<0.01$).

2.3 药物敏感性实验分析

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 的 38 种抗生素药敏结果显示, 毒力基因 *dly* 缺失后, 菌株对氯霉素的敏感性减弱, 氯霉素抗性减弱的原因是构建缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的过程中插入了氯霉素抗性基因(Cm); 其他 37 种抗生素药敏实验的结果不存在差异(表 3)。

2.4 菌株及 ECP 的溶血活性和磷脂酶活性的差异

野生株 PDD1608 及 ECP 表现出极强的溶血活性和磷脂酶活性, 而缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及 ECP 的溶血性和磷脂酶活性较低, 与野生株 PDD1608 的实验结果相比, 溶血活性和磷脂酶活性均表现为降低(图 5)。结果表明, 毒力基因 *dly* 的缺失对 PDD1608 的溶血活性和磷脂酶活性产生较为显著的影响, 导致溶血活性和磷脂酶活性降低。

2.5 菌株及 ECP 的致病力差异

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 对海水青鳞鱼的攻毒实验测得 2 株菌的 LD_{50} 分别为 1.31×10^5 CFU/mL 和 1.71×10^7 CFU/mL, 毒力基因 *dly* 缺失株的 LD_{50} 升高, 是野生株的 130.53 倍。同时, 2 株菌攻毒后的生存曲线表明, 相同攻毒浓度条件下, 缺失株的致死速率降低, 且低浓度条件下, 缺失株攻毒的海水青鳞鱼存活率明显高于野生株(图 6a~b), 说明毒力基因 *dly* 的缺失影响了菌株 PDD1608 的致病性, 导致其毒力降低。

菌株 PDD1608 和 Δdly PDD1608::Cm 胞外产物 ECP 的攻毒实验测得 2 株菌 ECP 的 LD_{50} 分别为 101.46 μ g/mL 和 110.19 μ g/mL, 缺失株 ECP 的 LD_{50}

表 2 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的生理生化特性

Tab.2 The physiological and biochemical characteristics of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

| 项目 Item | 菌株 Strain | | 项目 Item | 菌株 Strain | |
|---|-----------|--------------------------|--|-----------|--------------------------|
| | PDD1608 | Δdly PDD1608::Cm | | PDD1608 | Δdly PDD1608::Cm |
| 3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl glucose | + | + | 肌醇 Inositol | - | - |
| 3% NaCl 明胶 3% NaCl gelatine | - | - | 6% NaCl 胰胨水 6% NaCl pepton water | - | - |
| 鼠李糖 Rhamnose | - | - | 山梨醇 Sorbitol | - | - |
| 10% NaCl 胰胨水 10% NaCl pepton water | - | - | 3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl lysine decarboxylase | + | + |
| 3% NaCl 甘露醇 3% NaCl mannitol | + | + | Kovacs 试剂 Kovacs reagent | - | - |
| 丙二酸盐 Malonate | - | - | 苦杏仁苷 Amygdalin | - | - |
| 0% NaCl 无盐胰胨水 0% NaCl pepton water | - | - | 木糖 Xylose | - | - |
| 3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl ornithine decarboxylase | - | - | 3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl Arabionse | - | - |
| 3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl arginine dihydrolase | + | + | 3% NaCl 硫化氢 3% NaCl hydrogen sulfide | - | - |
| 西蒙氏枸橼酸盐 Simmont citrate | - | - | 3% NaCl 尿素酶 3% NaCl urease | - | - |
| 蜜二糖 Melibiose | + | + | 3% NaCl 乳糖 3% NaCl lactose | - | - |
| 3% NaCl 胰胨水 3% NaCl pepton water | + | + | 3% NaCl 蔗糖 3% NaCl sucrose | - | - |
| 3% NaCl MR-VP | - | - | 3% NaCl ONPG | - | - |

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

Note：“+” means positive,“-” means negative.

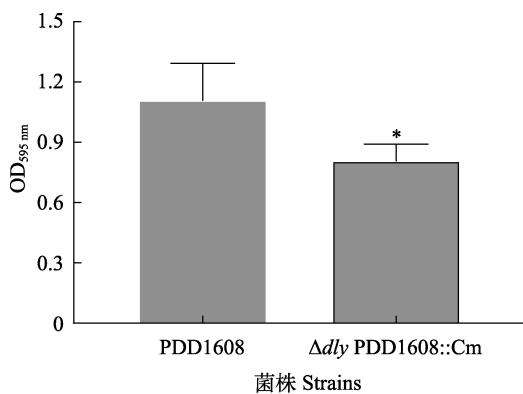


图 4 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 生物被膜形成能力

Fig.4 Biofilm formation ability of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

*表示差异显著($P < 0.05$)。

* indicate significant difference ($P < 0.05$).

与野生株 ECP 相比,提高了 0.09 倍,但二者的致死时间存在明显差异(图 6c~d),缺失株 ECP 在相同稀

释倍数条件下对海水青鳞鱼的致死速率降低,说明毒力基因 *dly* 的缺失对 PDD 菌株胞外产物 ECP 的毒力产生了一定影响,结合溶血活性的实验结果,推测 *dly* 基因的缺失降低了 PDD 菌株胞外产物 ECP 的溶血能力,进而降低了 PDD 菌株 ECP 的致病性。

菌株的致病性结果和菌株 ECP 的致病性结果具有正相关性,野生株 PDD1608 及其 ECP 的致病性均高于缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及其 ECP 的致病性,说明毒力基因 *dly* 对菌株 PDD1608 的致病性存在促进作用。

3 讨论

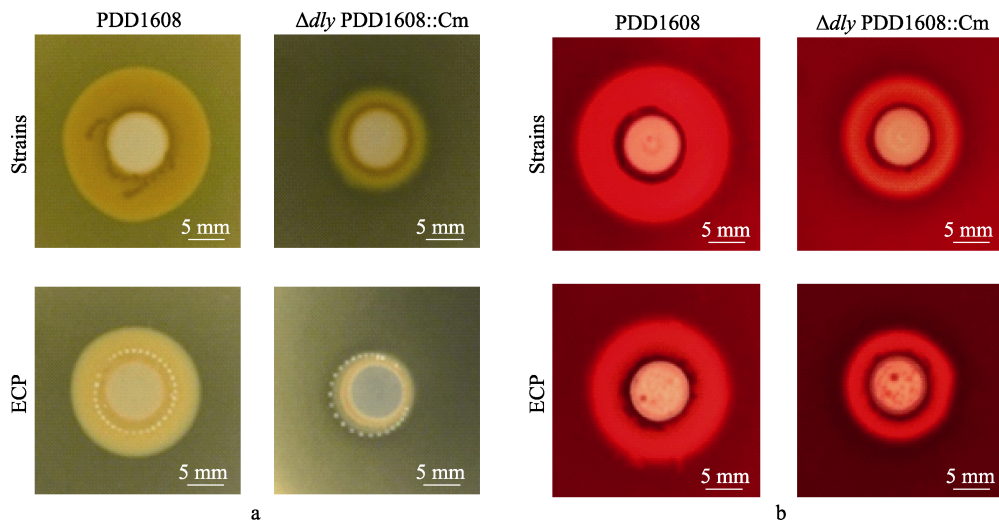
PDD 在海洋环境中广泛分布,最初在 1981 年由 *Vibrio damsela* 命名报道(Love et al, 1981),经 Smith 等(1991)进一步研究后,将其命名修改为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)。近 10 多年来,有关 PDD 对海洋动物致病的报道逐渐增多,且 PDD 致病的宿主种类也呈现多

表3 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 的的抗生素敏感性实验结果Tab.3 Antibiotic susceptibility test results of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm

| 抗生素 Antibiotic | 菌株 Strain | | 抗生素 Antibiotic | 菌株 Strain | |
|----------------------|-----------|--------------------------|---------------------|-----------|--------------------------|
| | PDD1608 | Δdly PDD1608::Cm | | PDD1608 | Δdly PDD1608::Cm |
| 丁胺卡那 Amikacin | R | R | 新生霉素 Novobiocin | S | S |
| 链霉素 Streptomycin | R | R | 四环素 Tetracycline | S | S |
| 苯唑青霉素 Oxacillin | R | R | 强力霉素 Doxycyclin | S | S |
| 复方新诺明 SMZ-TMP | S | S | 美满霉素 Minocycline | S | S |
| 乙酰螺旋霉素 Spiramycin II | R | R | 先锋IV Cefalexin | R | R |
| 氟罗沙星 Fleroxacin | S | S | 克拉霉素 Clarithromycin | R | R |
| 萘啶酸 Nalidixic Acid | S | S | 青霉素 Penicillin | R | R |
| 洛美沙星 Lomefloxacin | S | S | 红霉素 Erythromycin | R | R |
| 头孢胺噻肟 Cefotaxime | S | S | 新霉素 Neomycin | R | R |
| 菌必治 Ceftriaxone | S | S | 氨苄青霉素 Ampicillin | R | R |
| 盖伯斯林 Ceftizoxime | S | S | 先锋必 Cefobid | R | R |
| 氟苯尼考 Florfenicol | S | S | 卡那霉素 Kanamycin | R | R |
| 氧氟沙星 Ofloxacin | S | S | 庆大霉素 Gentamycin | R | R |
| 氟哌酸 Norfloxacin | S | S | 恩诺沙星 Enrofloxacin | S | S |
| 多粘菌素 b Bpolymyxin b | R | R | 痢特灵 Furazolidone | R | R |
| 环丙沙星 Ciprofloxacin | S | S | 利福平 Rofampicin | R | R |
| 头孢他啶 Ceftazidime | S | S | 阿奇霉素 Azithromycin | R | R |
| 氯霉素 Chloramphenicol | S | R | 先锋VI Cefradine | R | R |
| 先锋V Cefazolin | S | S | 吡哌酸 Pipemidic | I | I |

注：R 为不敏感；I 为中度敏感；S 为高度敏感。

Note: R is insensitive; I is moderately sensitive; and S is highly sensitive.

图5 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及其 ECP 的磷脂酶活性和溶血活性Fig.5 Phospholipase and hemolytic activities of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm and their ECP

a: 2 个菌株及其 ECP 的磷脂酶活性; b: 2 个菌株及其 ECP 的溶血活性。

a: Phospholipase activity of the two strains and their ECP; b: Hemolytic activity of the two strains and their ECP.

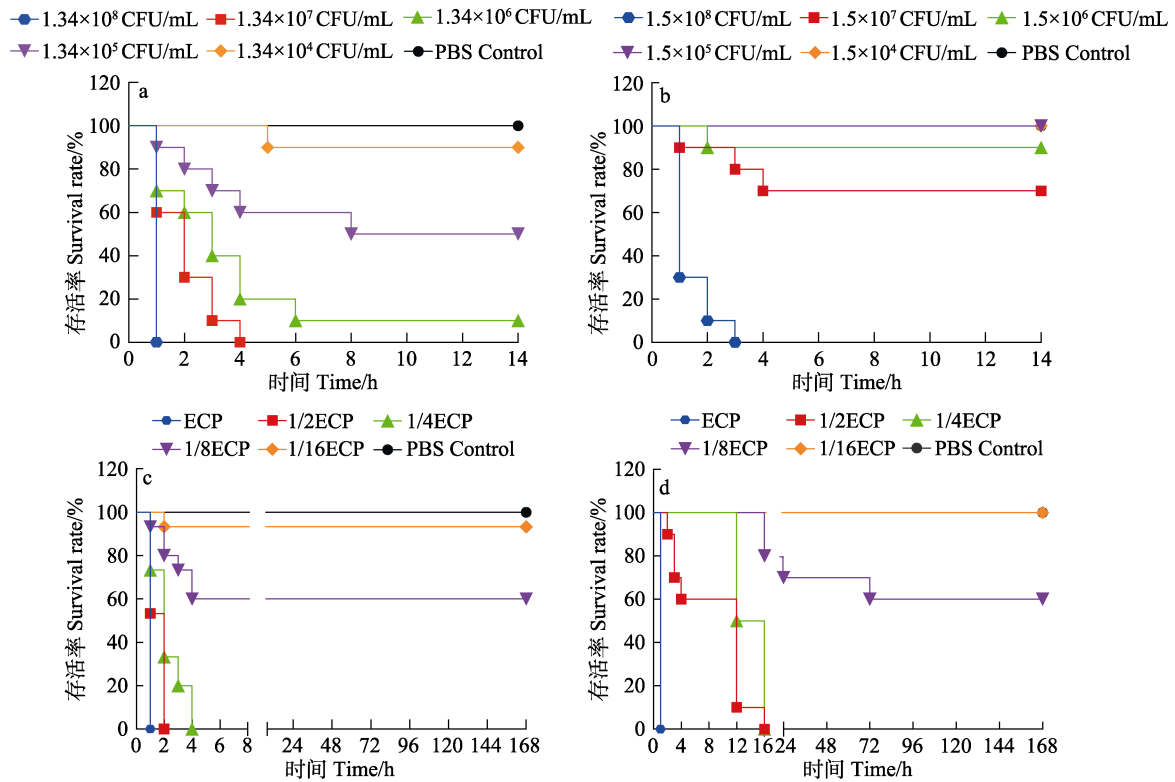


图 6 野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 及其 ECP 人工感染实验结果

Fig.6 Artificial infection test results of wild type strain PDD1608 and mutant strain Δdly PDD1608::Cm and their ECP

a: 野生株 PDD1608; b: 缺失株 Δdly PDD1608::Cm; c: 野生株 PDD1608 ECP; d: 缺失株 Δdly PDD1608::Cm ECP.
a: PDD1608; b: Δdly PDD1608::Cm; c: PDD1608 ECP; d: Δdly PDD1608::Cm ECP.

样性, 宿主包括六带鲈(*Caranx sexfasciatus*) (Yashgin *et al*, 2015)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Vaseeharan *et al*, 2007)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) (Liu *et al*, 2016)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Shao *et al*, 2019)等。因此, 需要深入研究 PDD 的致病机制, 以期有针对性地建立防控技术措施, 降低其对海洋生物的危害。

研究表明, 位于质粒 pPHDD1 上的毒力基因 *dly*、*PhlyP* 和位于染色体的毒力基因 *PhlyC* 为 PDD 菌株溶血性相关基因, 且毒力基因 *dly* 具有一定磷脂酶-D 的活性(Osorio *et al*, 2000)。位于染色体的毒力基因 *PlpV* 为磷脂酶活性相关基因, 这 4 种毒力基因与 PDD 菌株致病力强弱密切相关(Rivas *et al*, 2015)。为深入研究实验室保存的高致病性野生株 PDD1608 的致病机制, 选择构建溶血性相关基因 *dly* 的缺失株 Δdly PDD1608::Cm, 进行生长特性、药物敏感性、溶血活性、磷脂酶活性和菌株致病性等多个验证实验, 探究 *dly* 基因在 PDD1608 致病过程中的关键作用。

本研究发现, *dly* 基因缺失未改变菌落形态特征, 但导致缺失株的生长速度变慢, 缺失株进入对数生长期的时间比野生株推迟 6 h 左右。而在其他学者的相

关研究中也存在类似情况, 如延凯娜等(2020)构建的肠出血型大肠杆菌 *vscG* 基因缺失株生长速度与野生株相比有所减慢, 而张海洋等(2021)构建的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) VP2918 基因缺失株、彭新亮等(2022)构建的溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) *VcrV* 基因缺失株等的生长速度与野生株相比未产生变化。由此推测, PDD1608 菌株的 *dly* 基因与生长调控基因之间可能存在协同效应, 但 *dly* 基因是如何参与 PDD 菌株生长的调控机制还需进行深入的研究。

PDD 菌株在海水环境中生存适应能力很强, 并且对多种海洋动物都有致病性, 因此, 需要挑选合适的抗生素来抑制其生长繁殖或消杀, 但滥用抗生素会导致耐药细菌的出现(Santos *et al*, 2018)。因此, 本研究选取了 38 种抗生素和 26 种生理生化鉴定管, 对野生株 PDD1608 和缺失株 Δdly PDD1608::Cm 进行定性和定量实验, 目的是为了更好的研究毒力基因 *dly* 对菌株的耐药和理化特性的影响。*dly* 基因缺失株与野生株相比, 药物敏感性和生理生化特性的结果并未有差异, 缺失株对氯霉素药物敏感性降低是由于在构建 *dly* 基因缺失株的过程中, 通过引入外源 Cm 抗性基因将 *dly* 基因替换, 从而降低了缺失株对氯霉素的敏感

性。因此推断, 毒力基因 *dly* 不参与菌株 PDD 耐药基因的调控表达, 同时, 对菌株的理化特性没有影响。

但当毒力基因 *dly* 缺失后, 缺失株的涌动性表现为极显著性降低($P < 0.01$), 生物被膜形成能力显著性降低($P < 0.05$)。生物膜不仅有助于细菌附着于宿主细胞, 同时, 还能协助细菌逃避宿主免疫反应(Göçer *et al.*, 2017)。细菌生物膜形成与细菌的鞭毛具有一定关联性, 有研究表明, 鞭毛的调控蛋白对细菌的运动能力也有影响, 如空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)鞭毛基因 *flgA* 产生插入突变后, 细菌的运动性和依附于食物表面形成生物膜的能力显著降低(Kim *et al.*, 2015)。对溶藻弧菌的相关研究证实, 基因 *FlhF* 能够正向调节极性鞭毛数量和细菌的涌动性(Kusumoto *et al.*, 2006)。本研究中, 毒力基因 *dly* 缺失后, PDD 菌株的涌动性降低, 生物膜形成能力降低, 而涌动性和生物膜形成能力与细菌运动性相关, 进而影响 PDD 菌株对宿主的黏附能力, 最终, 对 PDD 菌株的致病力产生影响。

本研究中, 缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的溶血性和磷脂酶活性与野生株 PDD1608 相比都有所降低, 且缺失株 ECP 的溶血性和磷脂酶活性与野生株 ECP 相比也是降低的。各菌株及 ECP 的实验结果之间呈现正相关性, 证实了毒力基因 *dly* 在野生株 PDD1608 中起到增强溶血性和磷脂酶活性的作用, *dly* 基因的缺失可能对 PDD 菌株胞外产物的成分产生了影响, 一些溶血活性相关的产物减少, 进而导致其 ECP 的溶血能力降低, 这一实验结果与 Osorio 等(2000)的研究结果相类似。

本研究挑选了模式生物海水青鲷鱼作为人工感染实验的宿主, 利用梯度稀释的菌液和 2 倍稀释的 ECP 分别进行鱼体创伤后的浸浴感染实验, 最终测定野生株 PDD1608 和缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的 LD_{50} 分别为 1.31×10^5 CFU/mL 和 1.71×10^7 CFU/mL, PDD1608 ECP 和缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ ECP 的 LD_{50} 分别为 101.46 μ g/mL 和 110.19 μ g/mL。缺失株 $\Delta dlyPDD1608::Cm$ 的 LD_{50} 是野生株的 130.53 倍; 缺失株 Δdly PDD1608::Cm ECP 的 LD_{50} 是野生株 ECP 的 1.09 倍。菌液和 ECP 的攻毒实验结果之间存在正相关性, 缺失株及其 ECP 的致病性降低, 表明 *dly* 基因的缺失影响了 PDD 菌株的毒力。

ECP 作为病原菌致病感染过程中的重要物质, 其中包含多种产物, 如溶血素、脂多糖和活性酶等, 是细菌致病的关键毒力因子(Pablos *et al.*, 2010)。细菌通过黏附、寄生在宿主细胞和血液中, 繁殖生长并产生 ECP 而引起宿主发病死亡, 整个过程中, ECP 起到了极其重要的作用(Ben *et al.*, 2018)。因此, 本研究中缺

失株 ECP 致病性降低, 推测由于毒力基因 *dly* 参与调控 PDD 菌株毒力因子的表达和分泌, 并且影响 PDD 菌株对宿主细胞及组织的侵染能力, 这需要进行进一步的组织病理和细胞毒理实验来验证。

本研究结果有助于进一步了解毒力基因 *dly* 对 PDD 菌株生物学特性的影响, 从而研究合适的防控措施来控制其传播和感染。而关于模式生物海水青鲷鱼的攻毒实验有助于为深入探究 PDD 菌株对宿主的致病机制和侵染过程提供动物参考模型, ECP 的相关实验结果可以为 PDD 亚单位疫苗的研发提供理论参考。

参 考 文 献

- AUSTIN B, AUSTIN D A. Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish (4th edition). Springer, 2007
- BEN H S, TAVARES R P M J, TACHIBANA L, *et al.* Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunol*, 2018, 80: 550–562
- GÖÇER H, EMIR D, ÖNGER M E, *et al.* Effects of bone cement loaded with teicoplanin, N-acetylcysteine or their combination on *Staphylococcus aureus* biofilm formation: An *in vitro* study. *Joint Diseases and Related Surgery*, 2017, 28(1): 13–18
- KIM J S, PARK C W, KIM J Y. Role of *flgA* for flagellar biosynthesis and biofilm formation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 25(11): 1871–1879
- KUSUMOTO A, KAMISAKA K, YAKUSHI T, *et al.* Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biochemistry*, 2006, 139(1): 113–121
- LABELLA A M, ROSADO J J, BALADO M, *et al.* Virulence properties of three new *Photobacterium* species affecting cultured fish. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(1): 37–50
- LEE D J, BINGLE L E, HEURLIER K, *et al.* Gene doctoring: A method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1): 252–265
- LI Y J, YU Y X, WANG Y G, *et al.* Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2995–3006 [李永杰, 于永翔, 王印庚, 等. 高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种胞外产物的毒力特性分析. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2995–3006]
- LIU F, LIU G X, LI F H. Characterization of two pathogenic *Photobacterium* strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of shrimp. *Aquaculture*, 2016, 464: 129–135
- LIU X, ZHANG Z, WANG L F, *et al.* Phenotypic and genetic diversity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from aquatic animals in Hainan Province and Bohai

- Sea region. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 2101–2111 [刘潇, 张正, 王丽芳, 等. 海南地区与环渤海湾美人鱼发光杆菌美人鱼亚种水产动物分离株的表型与遗传特征分析. *微生物学报*, 2021, 61(7): 2101–2111]
- LOVE M, TEEBKEN-FISHER D, HOSE J E, *et al.* *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 1981, 214(4525): 1139–1140
- OSORIO C R, ROMALDE J L, BARJA J L, *et al.* Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microbial Pathogenesis*, 2000, 28(2): 119–126
- PABLOS M, REMACHA M A, RODRÍGUEZ J M, *et al.* Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2010, 29(9): 1163–1172
- PENG X L, JIAN J C, DING Y. Construction of *VcrV*-deleted mutant of *Vibrio alginolyticus* and its biological characteristics. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(8): 3062–3075 [彭新亮, 简纪常, 丁燊. 溶藻弧菌 *VcrV* 基因缺失株的构建及生物学特性. *生物工程学报*, 2022, 38(8): 3062–3075]
- RIVAS A J, BALADO M, LEMOS M L, *et al.* The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity*, 2011, 79(11): 4617–4627
- RIVAS A J, VON HOVEN G, NEUKIRCH C, *et al.* Phobalysin, a small beta-pore-forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 2015, 83(11): 4335–4348
- SANTOS L, RAMOS F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(2): 135–143
- SHAO P, YONG P, ZHOU W, *et al.* First isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from half-smooth tongue sole suffering from skin-ulceration disease. *Aquaculture*, 2019, 511: 734208
- SHI L N. Pathogenicity difference of different *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* strains to *Sebastes schlegelii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 [施琳妮. 不同美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株对许氏平鲈致病力差异分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- SMITH S K, SUTTON D C, FUERST J A, *et al.* Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love *et al.*) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41(4): 529–534
- TAKAHASHI H, MIYA S, KIMURA B, *et al.* Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(2): 150–158
- TAKAO S, MINORU T, KAYO K, *et al.* The national bioresource project *Medaka* (NBRP *Medaka*): An integrated bioresource for biological and biomedical sciences. *Experimental Animals*, 2010, 59(1): 13–23
- TERCETI M S, OGUT H, OSORIO C R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the Black Sea: Evidence of a multiclonal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3736–3745
- TERCETI M S, RIVAS A J, ALVAREZ L, *et al.* *rstB* regulates expression of the *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors damselysin, phobalysin P and phobalysin C. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 582
- VASEEHARAN B, SUNDARARAJ S, MURUGAN T, *et al.* *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* associated with diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* fabricius in India. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(1): 82–86
- VENCES A, RIVAS A J, LEMOS M L, *et al.* Chromosome-Encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): 401–417
- WITTBRODT J, SHIMA A, SCHARTL M. *Medaka*—A model organism from the Far East. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(1): 53–64
- WU T L, JIN X M, WANG H B, *et al.* Prokaryotic expression and preparation of immune serum of hlych gene of *Photobacterium damsela*. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(10): 31–35 [吴同垒, 靳晓敏, 王洪彬, 等. 美人鱼发光杆菌溶血素 Hly_{ch} 基因的原核表达及免疫血清制备. *动物医学进展*. 2018, 39(10): 31–35]
- YAN K N, WANG X Y, WAN C S. Construction of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 espG knockout strain and analysis of its biological characteristics. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(10): 1144–1150 [延凯娜, 王湘雨, 万成松. 肠出血型大肠埃希菌 O157:H7 espG 基因缺失株的构建及其生物学特性分析. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(10): 1144–1150]
- YASHGIN H, NIMA B, MAJID B S. First time isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from *Caranx sexfasciatus* in Persian Gulf, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 2015, 7(3): 178–184
- ZHANG H Y, WANG Q, LIU S, *et al.* Gene deletion and functional analysis of vp2918 gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3705–3714 [张海洋, 王权, 刘爽, 等. 副溶血弧菌 VP2918 基因缺失株的构建及功能研究. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3705–3714]
- ZHANG X H, MEADEN P G, AUSTIN B. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3161–3167
- ZHANG Y Q, DENG Y Q, FENG J, *et al.* CqsA inhibits the virulence of *Vibrio harveyi* to the pearl gentian grouper (♀*Epinephelus fuscoguttatus* × ♂*Epinephelus lanceolatus*). *Aquaculture*, 2021, 535: 736346

ZHANG Z, YU Y X, WANG K, *et al.* First report of skin ulceration caused by *Photobacterium damsela* subsp.

damsela in net-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*, 2019, 503: 1–7

(编辑 马瑾艳)

Construction and Biological Characteristics of the *dly*-Deleted Mutant Strain of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

LIU Dingyuan^{1,2}, WANG Chunyuan², YU Yongxiang², WANG Yingeng²,
LI Jingze², ZHANG Xiaosong², QIN Lei¹, ZHANG Zheng^{2①}

(1. *Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China*; 2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academic of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China*)

Abstract As a pathogen, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (PDD) is distributed widely in the marine environment, and the host species of PDD are diverse. Although in the past decade the number of reports on the pathogenicity of PDD to marine animals has gradually increased, it is necessary to study this further in order to establish targeted prevention and technical control measures to reduce harm to marine organisms. In this study, a high-virulence PDD strain (PDD1608) was selected to explore the effect of the virulence gene *dly* on the biological characteristics and pathogenicity. The *dly*-deleted mutant strain Δdly PDD1608::Cm was successfully constructed using the λ Red recombination technique. The biological characteristics of the wild-type and mutant strains were compared, including growth, swarming motility, drug susceptibility, physiological and biochemical characteristics, biofilm formation ability, and hemolytic and phospholipase activity of extracellular products (ECP). Meanwhile, *Oryzias melastigma* was used as the target host, and the pathogenicity of wild-type and mutant strains and their ECPs to *O. melastigma* was detected by the artificial infection test. There was a positive correlation between the results of the bacterial solution and ECP challenge, indicating that deletion of the *dly* gene affects the virulence of the PDD strain. Deletion of the virulence gene *dly* resulted in slower growth of the PDD mutant strain; reduced swarming and hemolytic and phospholipase activity; no change in the drug susceptibility or physiological and biochemical characteristics of the wild type and mutant strains; compared with the wild type strain, significant different ($P < 0.05$) biofilm formation ability of the mutant strain; the artificial infection test showed that the pathogenicity of the mutant strain and its ECP decreased. The results of this study revealed that the virulence gene *dly* affects many biological characteristics of PDD strains, such as growth, swarming motility, and hemolytic and phospholipase activity, and it was found to be closely related to the pathogenicity of the PDD strain and ECP.

The results of this study contribute to further study of the influence of the virulence gene *dly* on the biological characteristics of the PDD strain in order to determine the appropriate prevention and control measures to curtail its spread and infection. The artificial infection test of the model organism *O. melastigma* helps provide an animal reference model for further exploration of the pathogenic mechanism and infection process of the PDD strain on the host. The results of the ECP experiments provide a theoretical reference for the research and development of PDD subunit vaccines.

Key words *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; Mutant strain; Extracellular products; Biological characteristics; Pathogenicity

① Corresponding author: ZHANG Zheng, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221216001

http://www.ykxjz.cn/

连新宇, 王秀华, 李晨, 张庆利, 苟紫玥, 吕若萱, 杨冰. FTA卡保存对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒 DNA 洗脱方法的优化. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 193-202

LIAN X Y, WANG X H, LI C, ZHANG Q L, GOU Z Y, LÜ R X, YANG B. Optimization of DNA elution method of infectious hypodermic and hematopoietic necrosis virus preserved by FTA card. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 193-202

FTA卡保存对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒 DNA 洗脱方法的优化*



连新宇^{1,2} 王秀华² 李晨² 张庆利²
苟紫玥² 吕若萱² 杨冰^{2①}

(1. 浙江海洋大学水产学院 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室
青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071)

摘要 传染性皮下和造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV)是危害虾类健康养殖的重要病原,为寻找一种快捷保存及分离 IHNV DNA 的方法,为后续研究提供完整的核酸材料,选用 FTA (flinders technology associates)卡为保存介质,以 FTA 纯化试剂、TE (Tris-EDTA)缓冲液及去离子水为基础洗脱液,设计 7 种 FTA 卡黏附 DNA 洗脱方法,通过荧光定量 PCR 检测方法检验不同核酸洗脱分离效果及最低的点膜核酸量。结果显示,于 4 mm² 的 FTA 卡上,点样体积为 2.5 μL,用洗脱液作为模板时,最低点膜核酸浓度需要 1.47×10⁴ copies/μL 以上,可获得最佳的检测灵敏度和 100%检出率的洗膜方法为 50 μL TE 缓冲液于 95 °C 下浸洗 5 min;用膜片做模板,点膜核酸浓度需要 1.82×10³ copies/μL 以上,室温(20~25 °C)条件下,用 FTA 纯化试剂洗脱 3 次,再用 TE 缓冲液洗脱 2 次,洗脱时间均为 5 min,可获得最佳的检测灵敏度和 100%的准确度。以 FTA 卡保存对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)、虾十足目虹彩病毒 1 (Decapod iridescent virus 1, DIV1)、偷死野田村病毒(covert mortality noda virus, CMNV)、致急性肝胰腺坏死副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, V_{PAHPND})核酸,测试所建洗脱方法的效果,证实了该方法对其他虾类病原核酸的洗脱具有通用性。该研究给出了 FTA 卡保存和洗脱 IHNV DNA 的适用性方案,为野外对虾样品采集、病毒核酸样品跨区域传递的保存和运输条件提供了科学数据。

关键词 IHNV; FTA 卡; 洗脱方法; 优化

中图分类号 S949 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0193-10

对虾传染性皮下和造血组织坏死病(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis, IHNV)也称

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2022GH01)、中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022021012)、国家重点研发计划(2019YFD0900101)和国家现代农业产业技术体系(CARS48)共同资助。连新宇, E-mail: 1799833487@qq.com

① 通信作者: 杨冰, 副研究员, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-16, 收修改稿日期: 2023-02-01

慢性矮小畸形综合症(runt-deformity syndrome, RDS) (Kalagayan *et al*, 1991), 是虾类重要疾病之一, 严重危害世界对虾养殖业。被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)列为须向其申报的甲壳类动物疫病(WOAH, 2023)。该病病原为对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒(IHHNV), 1981 年在美国夏威夷地区首次被发现(Lightner *et al*, 1983), 随后传播至澳大利亚、新加坡、马来西亚、韩国、巴西和中国等全球多个国家和地区(Saksmerprome *et al*, 2010; Kim *et al*, 2011; Yang *et al*, 2007)。IHHNV 属于细小病毒科(Parvoviridae), 是目前发现对虾病毒中最小的病毒, 单链 DNA, 无囊膜, 病毒粒子大小约为 20~22 nm (Bonami *et al*, 1990)。细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)感染 IHHNV 后可导致其 90% 的死亡率(Lightner *et al*, 1983), 凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)感染该病原后不会导致较高死亡率, 但会引起幼虾生长缓慢、畸形, 造成较大的经济损失, 在缺乏有效的防治措施防控 IHHNV 感染的情况下, 早检测早预防显得尤为重要。

IHHNV 检测方法包括组织病理学法、普通 PCR 方法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测法、测序法、原位杂交法、环介导等温扩增技术(LAMP)和生物指示法等(Bell *et al*, 1988; Lightner, 1996; Tang *et al*, 2007; Arunrut *et al*, 2011; Sun *et al*, 2006; Tang *et al*, 2006; Mari, 1993; Tang, 2000)。目前, 较为广泛使用的分子生物学方法为 WOAH 推荐的 IHHNV 普通 PCR 方法和 RT-qPCR 检测法。在分子生物学检测方法中, 病毒的核酸提取质量直接影响检测的准确度, 因此, 为提高样品质量, 通常选用冰冻、冰鲜、乙醇或其他核酸保存试剂保护病毒核酸(杜迎彬等, 2013; 陈大恭等, 2015)。但低温保存条件和保存溶液的成分限制了产业调研和生物样品的长途运输, 尤其给跨境跨区域传递带来一定困难, 为此探寻一种高效便捷的病毒核酸保存技术有助于水产养殖疾病病原的检测。

FTA (flinders technology associates)卡是一种用于快速收集、储存各种遗传物质的介质(Rajendram *et al*, 2006), 可以方便、快捷地保存核酸并达到远距离运输样品的目的。FTA 卡是英国 Whatman 公司的专利产品, 该卡片用于在室温条件下采集、储存和运输组织、核酸等样品, 并可直接提取核酸进行检测, FTA 卡通过邮寄方式常温寄送且无需作为危险及特殊物品处理。经化学处理的 FTA 卡作为核酸载体, 具有许多优点, FTA 卡不仅对核酸的吸附性好, 能使核酸紧密附着在卡片上, 还能使核酸免于紫外线的降解, 且抑制真菌的生长。研究发现, DNA 固定在卡片上, 可常温保存十几年, 因此, 应用 FTA 卡存储生物样

品 DNA 受到广泛重视(Corradini *et al*, 2019; Smith *et al*, 2004), 并在医学及微生物相关等多个领域进行了研究与应用(贾霄等, 2020; Shalaby *et al*, 2020; 毛乃颖等, 2015; 李伟昊等, 2009)。毛乃颖等(2015)研究显示, FTA 卡常温运输麻疹病毒(measlesvirus, MV)会导致病毒滴度降低, 但不影响病毒的检测效果。

FTA 卡已在人类和动物医学等领域得到广泛应用(赵兴春等, 2012; 陶晓岚等, 2014; 刘亚举等, 2012; 聂同钢等, 2009; 王新杰等, 2012; 刘建兴等, 2014), 并成功用于家畜病原及病毒核酸的存储运输(蔡颖等, 2008; Picard-Meyer *et al*, 2007; Perozo *et al*, 2006; Muthukrishnan *et al*, 2008; Maldonado *et al*, 2009; Inoue *et al*, 2007)。在水产动物方面, 已有研究者将 FTA 卡用于保存白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)等(Sudhakaran *et al*, 2010; Patil *et al*, 2013; Karthikeyan *et al*, 2020), 但尚未有对其所保存 DNA 洗脱效果的相关研究报道, 限制了 FTA 卡的应用。

FTA 卡用于保存感染病原的生物组织需要经过洗脱环节, 以便游离出病原的 DNA 成分, 为探讨 FTA 卡作为 IHHNV 核酸载体的应用效果, 本研究设计 7 种 FTA 卡的洗脱方案, 通过 RT-qPCR 方法检测其黏附 IHHNV 核酸的洗脱效果, 并选用对虾病原 WSSV、EHP、虾十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1, DIV1)、偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV)、致急性肝胰腺坏死副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, V_{PAHPND})为实验材料, 测试本方法用于其他虾类病原保存及洗脱的效果, 以期建立一种简易的 DNA 保存方法提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 样本来源及核酸提取

IHHNV DNA 样品制备: 阳性样品为本实验室保存, 采自山东省潍坊地区感染 IHHNV 的凡纳对虾; 阴性样品为采集于江苏赣榆地区的中国对虾(*Penaeus chinensis*)。分别取 IHHNV 阳性和阴性的对虾鳃组织 30 g, 使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 DNA, 提取方法参考试剂盒说明书。

WSSV、 V_{PAHPND} 、EHP、DIV1 和 CMNV 核酸样品均为本实验室提取保存。

FTA 卡购自 GE Healthcare UK Limited, TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0)购自天根生化科技有限公司, FTA 纯化试剂购自上海金畔生物科技有限公司。

1.2 IHNV DNA 浓度梯度液制备及最佳点膜浓度的确定

将 IHNV DNA 提取液进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍梯度稀释, 各稀释梯度用涡旋振荡充分混匀, 应用 RT-qPCR 方法测定病毒载量, 根据检测结果选择合适的梯度, 用作 FTA 卡膜片点样目标核酸。

1.3 点样

将 China FTA™ Card (Whatman™, 英国)剪成边长为 2 mm 的正方形膜片, 将膜片置于平皿中, 分别在各膜片上点各梯度浓度的 IHNV DNA, 每片点样 2.5 μL , 设置阴性膜片(点阴性样品), 膜片点样后室温晾干 1 d。同时, 对虾类其他病原(WSSV、 V_{PAHPND} 、EHP、DIV1、CMNV)一并点样, 处理方法相同, 每个浓度设置 3 个平行。

1.4 洗脱方案

根据不同的洗脱液配方, 共设计 7 种洗脱方案, 具体方法如表 1 所示。方案 1: 室温条件下, 先用 FTA 纯化试剂洗脱 3 次, 再用 TE 缓冲液洗脱 2 次, 每次均为 5 min; 方案 2: 室温条件下, 先用 FTA 纯化试剂洗脱 1 次, 再用 TE 缓冲液洗脱 1 次, 每次均为 5 min; 方案 3 和方案 4 均只用 TE 缓冲液洗脱 1 次, 洗脱时间均为 5 min; 方案 5: 只用去离子水洗脱 2 次, 每次均为 5 min; 方案 6: 只用去离子水洗脱 1 次, 洗脱时间为 30 min; 方案 7: 只用 FTA 纯化试剂洗脱 1 次, 洗脱时间为 2 min。所有方案室温条件下洗脱均为浸泡, 95 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱方式为 PCR 仪加热, 其中方案 1、5 和 7 最后一次洗脱液洗脱后的膜片均在室温下干燥 1 h, 剩余方案洗脱后的膜片无需处理。IHNV DNA

的每种方案的洗脱液和膜片均留待检测, 并设置 1 组未经洗脱而直接用于各个稀释梯度的膜片进行 RT-qPCR 检测。

1.5 RT-qPCR 检测

RT-qPCR 检测 IHNV、WSSV、EHP、 V_{PAHPND} 、DIV1 和 CMNV 等 6 种病原的核酸, 引物探针、体系和程序等信息见表 2。

引物和 TaqMan 探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系: Luna Universal Probe qPCR Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 0.8 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 0.4 μL , 无核酸酶水 7 μL , DNA 模板 1 μL , 总体积 20 μL 。IHNV 反应程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。EHP、 V_{PAHPND} 、DIV1 和 WSSV 反应程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。CMNV 反应程序: 反转录 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。

1.6 不同洗脱方案洗脱液中 IHNV DNA 溶出情况

RT-qPCR 检测 7 种方案洗脱过程中洗脱液中 IHNV DNA 的病毒载量, 观察不同洗脱方法洗脱过程中各洗脱阶段 IHNV DNA 的溶出情况。选择稀释梯度为 10^{-1} 的膜片用 7 种洗脱方案进行洗脱, 检测各个阶段洗脱液中 IHNV DNA 病毒载量, 验证不同洗脱方案各个洗脱阶段是否有核酸溶出。

1.7 FTA 卡保存 IHNV 最佳洗脱条件的确定

根据 RT-qPCR 检测 7 种方案最后一次洗脱液和最后一次洗脱后的膜片中 IHNV DNA 的病毒载量, 结合检出率等综合分析 FTA 卡保存 IHNV 最佳洗脱条件。

表 1 7 种洗脱方案

Tab.1 Seven elution programs

| 方案 Program | 洗脱液 Eluent/ μL | | | 洗脱条件 Elution conditions | | | 参考文献 References |
|---------------|--------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------|-----------------------|---------------------|
| | FTA 纯化试剂 FTA purification reagent | TE 缓冲液 TE buffer | 去离子水 Deionized water | 温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$ | 时间 Time/min | 洗脱次数 Elution times | |
| 1 | 200 | | | 室温 RT (20~25) | 5 | 3 | 本研究 This study |
| | | 200 | | 室温 RT (20~25) | 5 | 2 | 本研究 This study |
| 2 | 100 | | | 室温 RT (20~25) | 5 | 1 | 本研究 This study |
| | | 100 | | 室温 RT (20~25) | 5 | 1 | 本研究 This study |
| 3 | | 100 | | 室温 RT (20~25) | 5 | 1 | 本研究 This study |
| 4 | | 50 | | 95 | 5 | 1 | 本研究 This study |
| 5 | | | 200 | 室温 RT (20~25) | 5 | 2 | 匡金枝等(2008) |
| 6 | | | 50 | 95 | 30 | 1 | Karthikeyan 等(2020) |
| 7 | 200 | | | 室温 RT (20~25) | 2 | 1 | Shalaby (2020) |

表2 6种病原引物及探针信息
Tab.2 Information of six pathogenic primers and probes

| 病原 Pathogens | 引物及探针 ^a Primers and probe | 序列 Sequence (5'~3') | 标准/参考文献 Standards/references |
|---------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| IHHNV | 1608F | TACTCCGGACACCCAACCA | WOAH |
| | 1688R | GGCTCTGGCAGCAAAGGTAA | |
| | 探针 Probe | ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTTG | |
| WSSV | 1011F | TGGTCCCGTCCCTCATCTCAG | WOAH |
| | 1079R | GCTGCCTTGCCGAAATTA | |
| | 探针 Probe | AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA | |
| EHP | 157F | AGTAAACTATGCCGACAA | SC/T 7232-2020 |
| | 157R | AATTAAGCAGCACAAATCC | |
| | 探针 Probe | TCCTGGTAGTGTCCCTTCCGT | |
| <i>Vp_{AHPND}</i> | VpPirA-F | TTGGACTGTGCAACCAAACG | SC/T 7233-2020 |
| | VpPirA-R | GCACCCCATTTGGTATTGAATG | |
| | 探针 Probe | AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGA | |
| DIV1 | 142F | AATCCATGCAAGGTTCTCAGG | Qiu 等(2020) |
| | 142R | CAATCAACATGTCGCGGTGAAC | |
| | 探针 Probe | CCATACGTGCTCGCTCGGCTTCGG | |
| CMNV | CMN-CP-TaqIDT-F2 | AACTACATCTGCACCCCATG | Wang 等(2022) |
| | CMN-CP-TaqIDT-R2 | TTGATGGTGTGCTAGTCTTC | |
| | 探针 Probe | ATCCCTGCCGCTTAATGTGAGATCG | |

注: a: 探针 5'端加 FAM 标记, 3'端加 TAMRA 标记。

Note: a: Probe was labeled by FAM on the 5' end and TAMRA on the 3' end.

1.8 FTA 卡洗脱效果验证

根据 IHHNV FTA 卡洗脱方案结果, 选取最优的方案, 验证所建立方法在 WSSV、*Vp_{AHPND}*、EHP、DIV1 和 CMNV 等 5 种病原上的应用效果。WSSV、*Vp_{AHPND}*、EHP、DIV1 和 CMNV 在核酸未点膜前的 RT-qPCR 检测病毒载量分别为 6.40×10^7 、 1.41×10^6 、 2.39×10^5 、 1.94×10^6 和 4.22×10^6 copies/ μ L。测试选择方案 1 和 4。方案 1 检测最后一次洗脱后的膜片, 方案 4 检测最后一次洗脱液。

2 结果

2.1 IHHNV DNA 最佳点膜浓度的确定

为确定最佳点膜浓度, 采用 RT-qPCR 方法检测不同稀释梯度的 IHHNV 含量, 结果显示, 原液病毒拷贝数为 2.75×10^6 copies/ μ L, 溶液每稀释 10 倍, 拷贝数降低 1 个数量级, 稀释到 10^{-4} 病毒拷贝数为 1.78×10^2 copies/ μ L, 稀释到 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 数量级时检测不出病毒拷贝数。根据结果选择原液及稀释梯度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 用作 FTA 卡膜片点样核酸目标样品。

2.2 不同洗脱方案洗脱液中 IHHNV DNA 溶出情况

检测 7 种方案洗脱过程中洗脱液中的 IHHNV 核酸溶出情况, 结果见表 3。由表 3 可知, 每种方案洗脱过程中的洗脱液均检测出病毒拷贝数, 方案 1 中 FTA 纯化试剂 3 次洗脱病毒拷贝数相差不大, TE 缓冲液 2 次洗脱病毒拷贝数相差略大于 FTA 纯化试剂洗脱, 但二者洗脱后病毒拷贝数总体相差不大; 方案 2 中, TE 缓冲液洗脱后的病毒拷贝数略高于 FTA 卡纯化试剂洗脱后的病毒拷贝数; 方案 5 中, 灭菌去离子水 2 次洗脱后, 病毒拷贝数相差不大; 方案 4 和方案 6 洗脱后病毒拷贝数比其他 5 种方案洗脱后病毒拷贝数高 1 个数量级, 且方案 4 拷贝数略高于方案 6。表明, FTA 卡在不同的洗脱过程中均存在核酸的溶出。

2.3 FTA 卡保存 IHHNV 最佳洗脱条件的确定

将 7 种方案的各种稀释梯度膜片最后一次洗脱液和膜片中的 IHHNV DNA 进行 RT-qPCR 检测, 洗脱液检测结果如表 4 所示, 病毒原液经过 10^4 倍稀释后进行点膜, 各膜片组的洗脱液中检测不到病毒, 而 10^{-3} 稀释组中病毒核酸检出最高浓度组为洗脱方案 5,

表 3 7 种方案不同洗脱阶段洗脱液中核酸的溶出情况(DNA 浓度)/(copies/μL)

Tab.3 Lose of nucleic acid by eluate during the elution process of seven programs (DNA concentration)/(copies/μL)

| 方案 Program | 3 次 FTA 纯化试剂洗涤 Eluted 3 times by FTA purification reagent | | | 2 次 TE 缓冲液洗涤 Eluted twice by TE buffer | | 2 次去离子水洗涤 Eluted twice by eionized water | |
|---------------|--|----------------------|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | 1 | 2.06×10 ³ | 2.02×10 ³ | 2.81×10 ³ | 1.91×10 ³ | 7.87×10 ² | — |
| 2 | 5.38×10 ³ | — | — | 7.86×10 ³ | — | — | — |
| 3 | — | — | — | 4.98×10 ³ | — | — | — |
| 4 | — | — | — | 2.32×10 ⁴ | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — | — | 2.70×10 ³ | 2.90×10 ³ |
| 6 | — | — | — | — | — | 2.05×10 ⁴ | — |
| 7 | 1.55×10 ³ | — | — | — | — | — | — |

注：“—”表示检测不出病毒拷贝数，下同。

Note: “—”means no virus copies was detected, the same below.

表 4 不同点膜浓度膜片 7 种方案洗脱液中 IHHNV DNA RT-qPCR 检测结果

Tab.4 The RT-qPCR results of eluents from 7 programs with different concentrations of virus

| 方案 Program | 各稀释梯度组检测值 Serial dilution | | | | |
|---------------|---|--|--|--|-------------------------------|
| | 10 ⁰ /(×10 ⁴ copies/μL) | 10 ⁻¹ /(×10 ³ copies/μL) | 10 ⁻² /(×10 ³ copies/μL) | 10 ⁻³ /(×10 ² copies/μL) | 10 ⁻⁴ /(copies/μL) |
| 1 | 0.54±0.05 | 0.77±0.06 | 0.93±0.11 | 7.41±1.19 | — |
| 2 | 10.11±4.60 | 7.67±0.57 | 1.11±1.20 | 2.45±0.53 | — |
| 3 | 3.93±0.78 | 4.89±0.63 | 2.33±2.03 | 13.60±17.50 | — |
| 4 | 20.72±2.30 | 20.32±3.00 | 4.02±0.50 | 3.50±1.05 | — |
| 5 | 1.95±0.56 | 2.88±0.28 | 1.26±0.80 | 15.90±3.40 | — |
| 6 | 22.20±2.80 | 20.40±2.40 | 1.43±0.92 | 4.87±0.57 | — |
| 7 | 3.46±0.99 | 1.54±0.60 | 1.63±0.96 | 7.92±0.00 | — |
| 对照 Control | — | — | — | — | — |

检测值为(15.9±3.40)×10² copies/μL, 最接近初始点样液浓度, 即灵敏度最高; 最低组为洗脱方案 2, 检测值为(2.45±0.53)×10² copies/μL, 即灵敏度最低。分析该稀释度下的洗脱组的病毒阳性检出率(表 5), 由表 5 可知, 该稀释浓度条件下病毒阳性检出率最高的组为

方案 2、4、6, 均为 55.56%, 其他各洗脱方案的检出率均低于 45%, 表明, 点膜的核酸浓度在 10⁻³ 稀释组(浓度 1.82×10³ copies/μL), 各方案的准确度均较低。

病毒原液经过 10² 倍稀释后, 病毒核酸检出最高浓度组为洗脱方案 4, 检测值为(4.02±0.50)×10³ copies/μL, 最接近初始点样液浓度, 即灵敏度最高; 最低组为洗脱方案 1, 检测值为(0.93±0.11)×10³ copies/μL, 即灵敏度最低。分析该稀释度下的洗脱组的病毒阳性检出率(表 5), 由表 5 可知, 该稀释浓度条件下病毒阳性检出率最高的组为洗脱方案 2 和 4, 均为 100.00%, 其他各洗脱方案的检出率均低于 88.89%。综上可知, 按照洗脱方案 4 进行膜洗脱, 采用洗脱液为模板进行检测, 可获得较高的灵敏度和准确度。综上, 采用 FTA 卡作为 IHHNV DNA 载体, 适宜的点膜浓度在 1.47×10⁴ copies/μL 以上。

若以膜片为模板, 仅有洗脱方案 1 能获得检测结果, 其他方案的膜片均无病毒数检出(见表 6), 且各稀释梯度组的检出率均为 100%。表明, 若采用膜片为 IHHNV 病毒检测模板, 最佳的洗脱方案为方案 1。

表 5 不同点膜浓度膜片 7 种洗脱方案末次洗脱液 RT-qPCR 病毒阳性检出率

Tab. 5 Detection rate of eluents from 7 programs with different concentrations of virus by the RT-qPCR

| 方案 Program | 各稀释梯度检出率 Detection rate/% | | | | | |
|---------------|---------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 原液 | Stock solution | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
| 1 | 100 | 100 | 33.33 | 33.33 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 100 | 100.00 | 55.56 | 0 | 0 |
| 3 | 100 | 100 | 88.89 | 44.44 | 0 | 0 |
| 4 | 100 | 100 | 100.00 | 55.56 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 100 | 88.89 | 22.22 | 0 | 0 |
| 6 | 100 | 100 | 77.78 | 55.56 | 0 | 0 |
| 7 | 100 | 100 | 44.44 | 11.11 | 0 | 0 |

该方案下,点膜的 DNA 浓度达到 1.82×10^3 copies/ μ L 即可检出。

2.4 FTA 卡用于其他核酸保存效果验证

根据 FTA 卡保存 IHHNV DNA 7 种洗脱方案的结果,选择最佳的方案 1 和 4 来验证 WSSV、DIV1、CMNV、 Vp_{AHPND} 和 EHP DNA 的保存效果。结果显

示,5 种核酸均为方案 1 病毒拷贝数略高于方案 4,核酸(除 EHP 外)均为洗脱后拷贝数比未点膜前原液拷贝数低 1 个数量级, EHP 为低 2 个数量级。由于 5 种核酸未点膜前的原液拷贝数数量级高于 10^4 ,因此,结果与 IHHNV 洗脱结果一致,则表明选出的最优方案适用于其他病毒。5 种核酸 2 种方案的洗脱结果见表 7。

表 6 不同点膜浓度膜片 7 种方案膜片中 IHHNV DNA RT-qPCR 检测结果

Tab.6 The RT-qPCR results of eluted diaphragm from 7 programs with different concentrations of virus

| 方案 Program | 各液稀释梯度检测值 Serial dilution | | | | |
|------------|---|--|--|--|---------------------------------------|
| | $10^0/(\times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{L})$ | $10^{-1}/(\times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L})$ | $10^{-2}/(\times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L})$ | $10^{-3}/(\times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L})$ | $10^{-4}/(\text{copies}/\mu\text{L})$ |
| 1 | 4.50±0.47 | 5.90±0.59 | 1.35±1.68 | 1.25±1.32 | — |
| 2 | — | — | — | — | — |
| 3 | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — | — |
| 6 | — | — | — | — | — |
| 7 | — | — | — | — | — |
| 对照 Control | — | — | — | — | — |

表 7 5 种病原核酸洗脱结果

Tab.7 Elution results of nucleic acids of five pathogens

| 病原 Pathogens | 病原核酸种类 Type of nucleic acid | 方案 Program | 点膜前病原载量 Load of pathogen nucleic acid in FTA/(copies/ μ L) | 洗脱后载量 Load of pathogen after treatment/(copies/ μ L) |
|--------------|-----------------------------|------------|--|--|
| WSSV | DNA | 1 | 6.40×10^7 | 5.93×10^6 |
| | | 4 | | 3.44×10^6 |
| DIV1 | DNA | 1 | 1.94×10^6 | 2.42×10^5 |
| | | 4 | | 1.73×10^5 |
| CMNV | RNA | 1 | 4.22×10^6 | 4.58×10^5 |
| | | 4 | | 4.52×10^5 |
| Vp_{AHPND} | DNA | 1 | 1.41×10^6 | 2.64×10^5 |
| | | 4 | | 1.79×10^5 |
| EHP | DNA | 1 | 2.39×10^5 | 5.20×10^3 |
| | | 4 | | 2.86×10^3 |

3 讨论

FTA 卡固定核酸具有诸多优点,在核酸回收方面也具有较大的优势。Karthikeyan 等(2020)比较了 FTA-DNA 的回收法、试剂盒法 DNA 提取方法(DNeasy[®] Blood & Tissue)和盐酸胍法,通过半定量 PCR 分析 DNA 提取率,发现 FTA 卡 DNA 回收极限为 10^{-4} ,试剂盒法为 10^{-2} ,盐酸胍法为 10^{-3} ,可以看出,FTA 卡提取法回收 DNA 效果最佳;Sudhakaran (2010)使用 FTA 卡从垂死虾血淋巴的 10 倍稀释液中制备 DNA 样品,通过半定量和定量 PCR 分析,获得

了良好的实验结果。本研究将 IHHNV DNA 吸附于 FTA 卡上,利用 RT-qPCR 方法检测洗脱后的洗脱液及膜片,同时进行其他 5 种虾类病原(DIV1、CMNV、WSSV、 Vp_{AHPND} 和 EHP)核酸的实验验证,证明了 FTA 卡在保存甲壳类病原方面具有广泛的应用空间。

目前,对 FTA 卡的应用研究多见于其保存和运输组织样品的核酸效果,对保存样品量、分离方法与检出效果的关系研究报道较少。本研究显示,由方案 1 和 2 的各洗脱液体积及洗脱次数不同可得出,洗脱液的体积和洗脱次数会影响检出结果;由方案 3 和 4 的温度差异可得出,洗脱的温度会影响检出结果;由

方案 5 和 7 洗脱液的不同可得出, 洗脱液的种类也会影响检出结果。因此, FTA 卡用于虾病原核酸保存, 不仅对样品的核酸量有要求, 不同的膜片洗脱方法也直接影响样品的检出结果。本研究结果显示, 在膜面积及点样体积一定的条件下, 膜片上的核酸浓度高于 10^4 copies/ μ L, PCR 检测可获得理想的灵敏度及检测准确度; 在膜片的后处理中, 洗脱是重要的环节之一, 用未经洗脱的膜片做模板得不到理想的病原核酸扩增效果, 因为 FTA 卡上含有的蛋白变性剂及核酸吸附剂阻碍核酸的溶出, 而洗脱剂的种类、洗脱的温度和时间也直接影响检测结果。本研究还表明, 膜片经 FTA 纯化试剂、TE 缓冲液及去离子水洗脱, 各阶段均有目标核酸的溶出, 导致膜片中核酸载量的降低, 进而影响模板效果, 同时, 发现溶解有核酸的洗脱液可以作为模板进行 PCR 检测, 可以弥补 FTA 卡作为模板在检测中带来的不足。

常规保存运输病毒 DNA 的方法在跨区域跨境运输过程中因保存介质和运输条件的限制会对检测结果造成不同程度的影响, 且用于保存 DNA 的乙醇和甲醛等有机物作为保存溶液的成分在交通运输中是被严格禁止的, 制约了实验室间国内及国际生物样品传递和交流, FTA 卡保存 DNA 可以在常温下进行运输, 寄送方便, 是一种方便、快捷、可靠的保存运输方式。FTA 卡保存运输组织样品可以为野外采样提供更便利的途径, 具有更广泛的应用价值。FTA 卡保存感染 IHNV 生物组织样品的时效性及保存温度、湿度等条件对保存效果的影响有待后续的深入研究。

参 考 文 献

- ARUNRUT N, PROMBUN P, SAKSMERPROME V, *et al.* Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1): 21–25
- BELL T A, LIGHTNER D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, 1988
- BONAMI J R, TRUMPER B, MARI J, *et al.* Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*, 1990, 71(11): 2657–2664
- CAI Y, LU C Y, XIANG D P, *et al.* Identification of *Listeria monocytogenes* by FTA card-16S rRNA sequencing method. *Chinese Journal of Public Health*, 2008, 24(10): 1276–1277 [蔡颖, 卢次勇, 相大鹏, 等. 李斯特菌 FTA 卡-16S rRNA 测序法鉴定. *中国公共卫生*, 2008, 24(10): 1276–1277]
- CHEN D T, HUANG J, WANG H L, *et al.* Selection and optimization of simple and convenient sample solutions for shrimp tissue preservation at normal temperature. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 71–80 [陈大恭, 黄健, 王海亮, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织样品常温保存液的筛选和优化. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 71–80]
- CORRADINI B, ALÙ, M, MAGNANINI E, *et al.* The importance of forensic storage support: DNA quality from 11-year-old saliva on FTA cards. *International Journal of Legal Medicine*, 2019, 133(6): 1743–1750
- DU Y B, WANG Z J, YANG B, *et al.* Ammonium preservation of shrimp tissue RNA at normal temperature and its effects. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 88–96 [杜迎彬, 王志杰, 杨冰, 等. 对虾组织样品中 RNA 的铵盐常温保存法及其效果. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 88–96]
- INOUE R, TSUKAHARA T, SUNABA C, *et al.* Simple and rapid detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus from pig whole blood using filter paper. *Journal of Virological Methods*, 2007, 141(1): 102–106
- JIA X, CAO D, WANG W W, *et al.* Collection and preservation of costicartilage tissue with FTA card at room temperature. *Forensic Science and Technology*, 2020, 45(5): 503–506 [贾霄, 曹丹, 王文雯, 等. FTA 卡采集和常温保存肋软骨组织的方法. *刑事技术*, 2020, 45(5): 503–506]
- KALAGAYAN H, GODIN D, KANNA R, *et al.* IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1991, 22(4): 235–243
- KARTHIKEYAN K, SARANYA R, BHARATH R, *et al.* A simple filter paper-based method for transporting and storing *Enterocytozoon hepatopenaei* DNA from infected *Litopenaeus vannamei* tissues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2020, 169: 107305
- KIM J H, CHORESCA C H, SHIN S P, *et al.* Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp cultured in South Korea. *Aquaculture*, 2011, 313(1/2/3/4): 161–164
- KUANG J Z, NIE T G, YANG Z, *et al.* A simple and rapid modified-new method for DNA extraction of FTA bloodstains. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2008, 23(2): 108–110 [匡金枝, 聂同钢, 杨智, 等. FTA-DNA 直接提取法的研究与应用. *中国法医学杂志*, 2008, 23(2): 108–110]
- LI W H, ZHANG H Y, LIU W H, *et al.* FTA filter paper-based template preparation for the PCR detection of *Salmonella* in meat. *Food Science*, 2009, 30(16): 254–257 [李伟昊, 张会彦, 刘卫华, 等. FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中的沙门氏菌. *食品科学*, 2009, 30(16): 254–257]
- LIGHTNER D V, REDMAN R M, BELL T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1983, 42(1): 62–70
- LIGHTNER D V. A handbook of shrimp pathology and

- diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, 1996
- LIU J X, LIN T B, LIU J. Genetic polymorphisms of 15 STR loci in Fujian Han population. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2014, 29(5): 479–480 [刘建兴, 林天彬, 刘杰. 福建汉族人群 15 个 STR 基因座遗传多态性. 中国法医学杂志, 2014, 29(5): 479–480]
- LIU Y J, GUO L H, ZHANG B, *et al.* Genetic polymorphisms of Penta D and Penta E loci in Henan Han population. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2012, 27(3): 235 [刘亚举, 郭利红, 张博, 等. 河南汉族人群 Penta D 和 Penta E 基因座遗传多态性. 中国法医学杂志, 2012, 27(3): 235]
- MALDONADO J, VALLS L, RIERA P, *et al.* Method for rapid detection of swine influenza virus. Veterinary Record, 2009, 165(11): 328
- MAO N Y, WANG Y, LI F C, *et al.* Comparison of the room temperature transport by flinders technology associates cards and conventional refrigerated transport for measles isolates. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2015, 21(3): 260–262, 351 [毛乃颖, 王艳, 李芳彩, 等. FTA 卡常温运输和常规冷藏运输麻疹病毒分离株的比较. 中国疫苗和免疫, 2015, 21(3): 260–262, 351]
- MARI J, BONAMI J R, LIGHTNER D V. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. Journal of General Virology, 1993, 74(12): 2637–2643
- MUTHUKRISHNAN M, SINGANALLUR N B, RALLA K, *et al.* Evaluation of FTA cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 2008, 151(2): 311–316
- NIE T G, SUN R, KUANG J Z. Genetic polymorphisms of D12S391 and D6S1043 in Tianjin Han population. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2009, 24(5): 330–331 [聂同钢, 孙睿, 匡金枝. 天津汉族人群 D12S391 和 D6S1043 遗传多态性. 中国法医学杂志, 2009, 24(5): 330–331]
- PATIL R, SHANKAR K M, KUMAR B T N, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based flow-through immunoassay (FTA) for detection of white spot syndrome virus (WSSV) in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(9): 753–762
- PEROZO F, VILLEGAS P, ESTEVEZ C, *et al.* Use of FTA[®] filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. Avian Pathology, 2006, 35(2): 93–98
- PICARD-MEYER E, BARRAT J, CLIQUET F. Use of filter paper (FTA[®]) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. Journal of Virological Methods, 2007, 140(1/2): 174–182
- QIU L, CHEN X, GUO X M, *et al.* A TaqMan probe based real-time PCR for the detection of Decapod iridescent virus 1. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 173: 107367
- RAJENDRAM D, AYENZA R, HOLDER F M, *et al.* Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(3): 582–592
- SAKSMERPROME V, PUIPROM O, NOONIN C, *et al.* Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. Aquaculture, 2010, 298(3/4): 190–193
- SHALABY A G, BAKRY N R, MOHAMED A A E, *et al.* Evaluating flinders technology associates card for transporting bacterial isolates and retrieval of bacterial DNA after various storage conditions. Veterinary World, 2020, 13(10): 2243–2251
- SMITH L M, BURGOYNE L A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. BMC Ecology, 2004, 4(1): 4
- SUDHAKARAN R, MEKATA T, KONO T, *et al.* A simple non-enzymatic method for the preparation of white spot syndrome virus (WSSV) DNA from the haemolymph of *Marsupenaeus japonicus* using FTA matrix cards. Journal of Fish Diseases, 2010, 32(7): 611–617
- SUN Z F, HU C Q, REN C H, *et al.* Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods, 2006, 131(1): 41–46
- TANG K F J, DURAND S V, WHITE B L, *et al.* Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. Aquaculture, 2000, 190(3/4): 203–210
- TANG K F J, LIGHTNER D V. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. Virus Research, 2006, 118(1/2): 185–191
- TANG K F J, NAVARRO S A, LIGHTNER D V. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, 2007, 74(2): 165–170
- TAO X L, YAO H B, HAO S J. Genetic polymorphisms of 15 STR loci in the Dongxiang population of Gansu. Journal of Forensic Medicine, 2014, 30(2): 135–136 [陶晓岚, 姚宏兵, 郝思静. 甘肃东乡族人群 15 个 STR 基因座遗传多态性. 法医学杂志, 2014, 30(2): 135–136]
- WANG W, LIU S, YAO L, *et al.* Development of a novel RT-qPCR detecting method of covert mortality Nodavirus (CMNV) for the national proficiency test in molecular detection. Viruses, 2022, 14(7): 1475
- WANG X J, HUANG L, JU L, *et al.* 25 Y-STR genetic

polymorphisms in the Han population in Weifang area. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2012, 27(5): 400–402 [王新杰, 黄磊, 鞠兰, 等. 潍坊地区汉族人群 25 个 Y-STR 遗传多态性. 中国法医学杂志, 2012, 27(5): 400–402]

World Organization for Animal Health (WOAH). Diagnostic manual for aquatic animal diseases Paris France: 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standard/s/aahm/current/2.2.04_IHHN.pdf

YANG B, SONG X L, HUANG J, *et al.* Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. Veterinary Microbiology, 2007, 120(1/2): 63–70

ZHAO X C, JIANG B W, YE J. Development of PCR enhancer for direct amplification of samples on FTA cards. Forensic Science and Technology, 2012(3): 13–15 [赵兴春, 姜伯玮, 叶健. FTA卡直接扩增缓冲增强剂的研制. 刑事技术, 2012(3): 13–15]

(编辑 马璀璨)

Optimization of DNA Elution Method of Infectious Hypodermic and Hematopoietic Necrosis Virus Preserved by FTA Card

LIAN Xinyu^{1,2}, WANG Xiuhua², LI Chen², ZHANG Qingli²,
GOU Ziyue², LÜ Ruoxuan², YANG Bing^{2①}

(1. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071, China)

Abstract Flinders technology associates (FTA) card (Whatman[®]) is a paper-based matrix designed to fix, purify, and store genetic material from various biological sources. It can conveniently and quickly preserve nucleic acids and may fulfil the requirements of long-distance and cross-border sample transportation. The FTA card can store and transport tissue, nucleic acid, and other sample types at room temperature (20–25 °C). Nucleic acid can be extracted directly for detection and be sent by express as an ordinary parcel without being treated as dangerous or as special goods, eliminating tedious processes, saving time, and ensuring sample quality. It is widely used in the human and animal medicine field. It has been successfully used for the storage and transportation of livestock pathogens and viral nucleic acids. In terms of aquatic animals, the FTA card has been used by researchers to store white spot syndrome virus (WSSV) and the shrimp *Enterovirus hepatopoei* (EHP): However, there is no relevant research report on the elution effect of the nucleic acid stored in the FTA card, which affects the application of the FTA card. The infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is an important shrimp pathogen and severely impacts the shrimp culture industry. It was first found in Hawaii, United States, in 1981 and then spread to several countries, including to Australia, Singapore, Malaysia, South Korea, Brazil, and China. The IHHNV infecting *Penaeus vannamei* does not cause high mortality, but growth would become slow and deformed, resulting in great economic losses. Early detection and prevention management are particularly important in current situations, which lack effective control measures for the disease. Several IHHNV detection methods have been established that use molecular biological methods, including conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (these are recommended in the aquatic animal disease diagnosis Manual of the World Organization for Animal Health). Nucleic acid extraction by the above methods meets the requirements for samples, usually frozen, ethanol, or other nucleic acid

① Corresponding author: YANG Bing, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

preservation reagents. Low temperature preservation conditions and composition restrictions of preservation solutions present certain difficulties in disease investigation, surveillance, and monitoring of shrimp farming. It is particularly important to address this dilemma. To find a fast method for the preservation and separation of IHHNV DNA and provide complete nucleic acid materials for subsequent research, we selected FTA cards as the preservation medium, and designed seven kinds of FTA cards with attached DNA elution methods based on the FTA purification reagent, TE buffer, and deionized water. We evaluated the elution and separation effects of different nucleic acids and the minimum amount of dot FTA card nucleic acids through real-time PCR detection. The appropriate solution was spotted onto FTA cards according to the manufacturer's protocol, labeled, and air-dried for 1 day at room temperature. The result shows that on the 4 mm² FTA card, the sample volume was 2.5 μL. When the eluent is used as the template, the minimum FTA card nucleic acid concentration needs to be 1.47×10^4 copies/μL above the best detection sensitivity, and 100% detection rate can be obtained by washing the FTA card with 50 μL TE buffer solution at 95 °C for 5 min. Using the FTA card as the template, the nucleic acid concentration of the dot FTA card needs to be above 1.82×10^3 copies/μL, eluted with FTA purified reagent thrice at room temperature, and then eluted with TE buffer twice. Each elution time is 5 min as this can obtain the best detection sensitivity and demonstrates 100% accuracy. The elution effect of the above two schemes was better than that of the other five schemes. The nucleic acids of WSSV, EHP, decapod iridescent virus 1, covert mobility Noda virus, and *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis were preserved using FTA card to test the efficiency of the established elution method. It is assumed that this method is universal for the elution of other shrimp pathogenic nucleic acids. At present, research on the application of FTA card is mostly seen in the nucleic acid effect of its preservation and transportation of tissue samples. There are few reports on the relationship between the amount of preserved nucleic acid, separation methods, and detection effect. This study shows that FTA cards used to preserve pathogenic nucleic acid requires a specific amount of nucleic acid in the sample and directly affects the detection results of the sample with different FTA card elution methods. This study provides a feasible scheme for the preservation and elution of IHHNV DNA with FTA cards. The application of this technology has potential use as storage and transport strategy for surveillance programs and can enhance biosecurity in shrimp culture, which provides a scientific basis for the preservation and transportation conditions for the collection of wild shrimp samples and the regional transmission of viral nucleic acid samples.

Key words IHHNV; Flinders technology associates cards; Elution method; Optimization

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221228001

http://www.yykxjz.cn/

杜鑫鑫, 牛东红, 张树源, 邓敏, 王杰, 李家乐. 不同缢蛭群体应对高盐养殖环境的潜沙和摄食响应能力. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 203–213

DU X X, NIU D H, ZHANG S Y, DENG M, WANG J, LI J L. Burrowing and feeding responses of different populations of *Sinonovacula constricta* to high-salt culture environment. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 203–213

不同缢蛭群体应对高盐养殖环境的 潜沙和摄食响应能力*



杜鑫鑫¹ 牛东红^{1,3} 张树源¹ 邓敏¹ 王杰² 李家乐^{1,3}

(1. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心 上海市协同创新中心 上海 201306;

2. 三门东航水产育苗科技有限公司 浙江 三门 317100;

3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 为研究缢蛭(*Sinonovacula constricta*)生态行为应对高盐养殖环境的响应能力,以2个缢蛭群体(“申浙一号”群体 SZSC 和自然群体 ZRSC)为实验对象,研究了不同盐度(20、24、28 和 32)对缢蛭群体潜沙行为、摄食生理的影响。对比2个群体潜沙指标和摄食率(FR)的差异,其中,潜沙行为实验设置盐度应激组(缢蛭从暂养池取出放进各盐度组开始实验)和胁迫组(缢蛭在各盐度条件下胁迫 24 h 后开始实验)。结果显示, SZSC 的 120 h 半致死盐度为 34.04, ZRSC 的 120 h 半致死盐度为 32.04。应激组中, SZSC 的半数潜沙时间(BT₅₀)显著大于 ZRSC ($P<0.05$),盐度为 24 时, SZSC 的 BT₅₀ 为 4.2 min, 显著低于盐度为 28 和 32 时的 BT₅₀; 盐度为 32 时, SZSC 潜沙深度分布更集中, 潜沙率为 88.33%, 显著高于 ZRSC ($P<0.05$)。而在胁迫组, SZSC 中 BT₅₀ 显著低于 ZRSC, 潜沙率显著大于 ZRSC ($P<0.05$)。摄食生理上, 除对照组外, SZSC 的 FR 均显著大于 ZRSC ($P<0.05$), SZSC 的 FR 在盐度为 24 时达到最大值[89.54 mL/(g·h)], 显著大于其他盐度组 ($P<0.05$)。研究表明, 2 个群体的生态行为均会受到盐度的影响, 盐度越高, 应激反应越强烈, 其中, SZSC 对高盐环境具有较好的耐受性。本研究从生态行为水平评估了 2 个缢蛭群体对高盐环境的耐受性, 揭示了高盐养殖环境下缢蛭在底泥中的垂直分布情况和摄食能力, 研究结果为进一步开展缢蛭耐高盐新品系的选育提供了理论参考。

关键词 缢蛭; 潜沙行为; 摄食率; 高盐

中图分类号 S967.5 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0203-11

缢蛭(*Sinonovacula constricta*)是我国滩涂养殖的主要经济贝类(Niu *et al*, 2016), 南起广东、北至辽宁均有人工养殖。2021 年我国缢蛭养殖产量达 859 651 t (农业农村部渔业渔政管理局等, 2021)。

盐度是影响贝类生长发育、生态行为和生理变化的重要环境因子, 贝类无论在地理分布还是养殖区域

都始终处于盐度动态变化中。在河口、近海潮间带滩涂和半封闭海域等地区, 盐度状况会因降水、淡水径流或季节性蒸发而波动(Casas *et al*, 2018; Molly *et al*, 2016; Ran *et al*, 2017)。全球变暖和人类活动加剧了沿海生态环境因子发生变化, 给养殖贝类带来不同程度的损伤, 甚至死亡(Carregosa *et al*, 2014)。缢蛭主要

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0900700)资助。杜鑫鑫, E-mail: 1934616073@qq.com

① 通信作者: 牛东红, 教授, E-mail: dhniu@shou.edu.cn

收稿日期: 2022-12-28, 收修改稿日期: 2023-02-06

栖息于淡、咸水交汇的河口附近和沿海滩涂中,最适盐度范围为15~25,对于池塘混养模式下的缢蛏,其容易受到高盐度海水的影响(丁红兵等,2022)。

目前,我国山东和江苏沿海地区较高的盐度给缢蛏的养殖带来了一定的影响(Chen *et al.*, 2022)。近年来,在缢蛏养殖及增殖放流过程中,因高盐度海水诱发的大规模死亡、生长慢和行为应激能力差的现象越来越普遍,随之而来的是这些地区的整体生产力和良种保护率不断下降(李炼星等,2016;陈铭等,2021;陈义华,2022;丁红兵等,2022)。本研究以缢蛏为对象,探究了高盐度环境对2个不同群体生态行为的影响,以期从行为学水平为缢蛏耐高盐新品种选育提供具体策略,同时,为评估缢蛏高盐耐受性和行为应激能力提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验缢蛏为“申浙1号”新品种群体(SZSC)和浙江省三门湾的自然群体(ZRSC),SZSC具备生长快、抗逆性强等特点。实验前,在三门湾滩涂不同位置挖取深度为5 cm左右的泥沙,运回实验车间,经100目筛绢网过滤后用于实验。实验在浙江省三门县实验基地进行。实验前,将缢蛏置于泥沙中暂养,暂养海水为近海经沉淀的沙滤海水,pH为8.2,暂养盐度为20,水温为23~24 °C,养殖密度为300只/m²。暂养期间,投喂牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*),每日2次。实验所用容器为聚乙烯塑料水箱(42 cm×30 cm×22 cm)和2 L的烧杯,实验前,采用漂白粉溶液浸泡消毒2 h,再用海水反复冲洗备用。缢蛏生物学信息见表1。

表1 缢蛏生物学信息测定
Tab.1 Biological data of *S. constricta*

| 群体 Populations | 壳长 Shell length/cm | 壳高 Shell height/cm | 壳宽 Shell width/cm | 湿重 Wet mass/g |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| “申浙一号” 群体 SZSC | 2.75±0.15 | 0.99±0.07 | 0.74±0.07 | 1.33±0.26 |
| 自然群体 ZRSC | 2.74±0.22 | 0.99±0.12 | 0.73±0.10 | 1.32±0.50 |

1.2 实验方法

1.2.1 半致死盐度 2个缢蛏群体经过3 d暂养后,置于实验水箱中进行半致死盐度实验。根据李炼星等(2016)的研究方法,设置6个盐度梯度31、32、33、34、35、36和1个对照组(20),每组设置3个平

行,每个平行30个个体。各实验组从盐度为20开始按每小时升高1的速率升至设定盐度,统计缢蛏在胁迫120 h后的死亡个数,计算相对存活率(relative survival rate, *P*, %),并运用概率单位法计算120 h的半致死盐度(120 h LC₅₀)。

绝对存活率(absolute survival rate, *R*, %)

=实验结束时缢蛏存活数/总数;

相对存活率=绝对存活率/对照组存活率。

1.2.2 潜沙行为实验 潜沙行为实验分2组:一组是直接缢蛏从暂养池取出放进各盐度组开始实验(以下简称应激组),另一组是将缢蛏在各盐度条件下胁迫24 h后开始实验(以下简称胁迫组),设置4个不同的盐度梯度,分别为20、24、28和32,其中,盐度为20设为对照组,将海盐和淡水按照一定比例调配到实验盐度充气备用。每个盐度设3个平行,每个平行缢蛏总数为20只。

在洗净的水箱底部铺上处理后的底质,厚度为15 cm,使用PVC软管贴紧箱壁,在底质上层缓慢加入深度为5 cm的配制海水,稳定后,使各水箱盐度同设定盐度保持不变。待海水澄清后,将缢蛏个体缓慢置于底质表面,使用佳能EOS 600D照相机(日本)观察并记录缢蛏的潜沙过程,采用秒表记录缢蛏的潜沙时间(*T*)以及50%受试个体潜沙所用的时间,即半数潜沙时间(BT₅₀),同时,记录缢蛏在30 min内成功潜沙的个数(*n*)。使用鱼线(金色,直径为0.12 mm,长度为30 cm)通过强力胶固定于缢蛏外壳纵轴方向的斧足端,2 h后,测量泥层下鱼线长度即为缢蛏潜沙深度(*D*)。潜沙时间指缢蛏从放置于底质表面开始到完全没入泥层的一段时间。缢蛏潜沙率计算公式:潜沙率=成功完成潜沙的个体数量(*n*)/实验总数(*N*)。

1.2.3 摄食实验 缢蛏摄食实验在2 L烧杯中进行,所投喂饵料为广盐性牟氏角毛藻,密度为2.5×10⁶个/mL,盐度梯度设置同1.2.2。实验前,在烧杯中倒入1 L藻水,调配到设定盐度,持续充气,待盐度稳定后,每个烧杯投放6只缢蛏,实验进行6 h。实验结束后,将采集的水样加鲁戈氏液固定,待镜检,采用血球计数板于显微镜下计数,重复3次。将实验缢蛏去除双壳保留软体组织放入烘箱,在60 °C条件下烘干至恒重并称量,软组织干质量精确到0.001 g。

缢蛏摄食率[feeding rate, FR, mL/(g·h)]计算公式(刘其根,2020):

$$FR = V[\ln(C_{e0}/C_{et}) - \ln(C_{c0}/C_{ct})]/wt$$

式中,*V* (mL)为实验水体体积;*w* (g)为实验用贝组织干质量;*t* (h)为实验持续时间;*C*_{e0} (cells/mL)为实验开始时空白对照组的藻类初始浓度;*C*_{et} (cells/mL)为*t*

时间空白对照组的藻类浓度; C_{e0} (cells/mL)为实验开始时实验组的藻类浓度; C_{et} (cells/mL)为 t 时间实验组的藻类浓度。

1.3 数据处理

实验所得数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 并运用 IBM SPSS26 统计软件进行统计分析。采用三因素方差分析(three-way, ANOVA), 探讨群体、盐度和实验组别对缢蛏潜沙指标的影响, 采用双因素方差分析(two-way ANOVA)探讨群体和盐度对缢蛏 FR 的影响, 使用 Duncan's 检验进行多重比较。 $P<0.05$ 为显著性水平, $P<0.01$ 为极显著性水平。使用 Origin

2019 软件制图。

2 结果

2.1 半致死盐度

本研究显示, 2 个缢蛏群体的相对存活率随着盐度的升高呈下降趋势(图 1)。其中, SZSC 在盐度为 34 和 35 时, 平均相对存活率分别为 55.68% 和 45.69%; ZRSC 在盐度为 32 和 33 时, 其平均相对存活率分别为 56.63% 和 37.35%。通过概率单位法确定 SZSC 的 120 h 半致死盐度为 34.04, ZRSC 的 120 h 半致死盐度为 32.04 (表 2)。

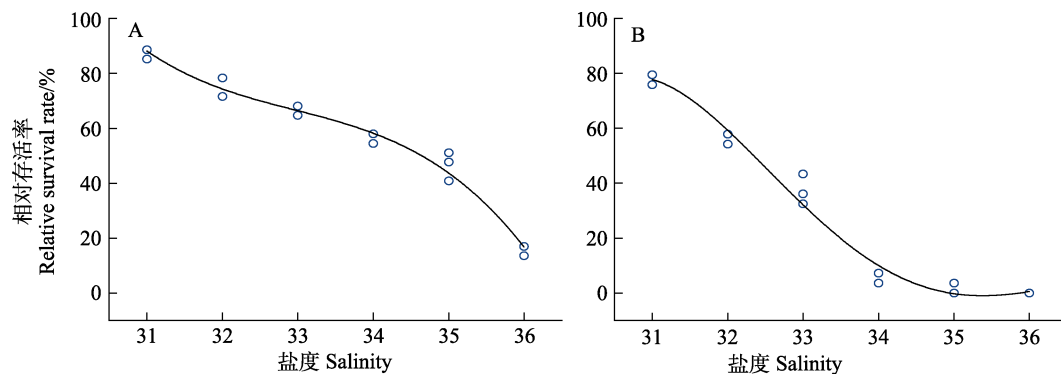


图 1 缢蛏在不同盐度下的相对存活率

Fig.1 Relative survival rates of *S. constricta* at different salinity levels

A: “申浙一号” 群体; B: 自然群体

A: “Shenzhen No.1” *S. constricta* population; B: Natural *S. constricta* population

表 2 概率单位法分析缢蛏 120 h 的半致死盐度

Tab.2 The salinity LC₅₀ of *S. constricta* at 120 h using the probit analysis method

| 群体 Populations | 回归方程 Regression equation | 120 h 半致死盐度 120 h LC ₅₀ | 下限 Lower limit | 上限 Upper limit |
|---|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| “申浙一号” 群体 “Shenzhen No.1” <i>S. constricta</i> | $y=0.361x-12.301$ | 34.04 | 33.43 | 34.81 |
| 自然群体 Natural <i>S. constricta</i> | $y=0.684x-21.916$ | 32.04 | 31.55 | 32.43 |

2.2 缢蛏潜沙行为的过程

缢蛏的潜沙过程包括闭壳准备期、斧足运动期、掘泥竖壳期和潜沙结束期。闭壳准备期是指缢蛏被放置于底质表面直至开始运动这段过程(图 2A); 随后, 缢蛏双壳微微张开, 斧足开始伸出并摩擦底质, 这段过程称为斧足运动期(图 2B); 掘泥竖壳期间, 缢蛏斧足开始挖掘底质, 并不断摆动躯体将壳竖起, 依靠斧足吸附力不断下潜(图 2C); 潜沙结束期指缢蛏完全没入底质后时期, 表面留下供气体和食物交换的通道(图 2D)。

2.3 高盐对缢蛏潜沙时间的影响

实验观察到缢蛏潜沙时间跨度较大, 为了更准确地对比 2 个缢蛏群体在高盐条件下潜沙时间的差异, 本研究统计了缢蛏半数潜沙时间(BT₅₀), 即 50% 受试个体潜沙所用的时间。三因素方差分析表明, 群体、盐度和实验组对缢蛏的 BT₅₀ 均有极显著影响($P<0.01$), 且 3 个因素对缢蛏的 BT₅₀ 有交互作用(表 3)。从图 3 可以看出, 无论是 SZSC 还是 ZRSC, 各盐度梯度下胁迫组缢蛏 BT₅₀ 均大于应激组, 但 SZSC 在盐度为 20 和 28 时, 胁迫组和应激组的 BT₅₀ 相比无显著差异。

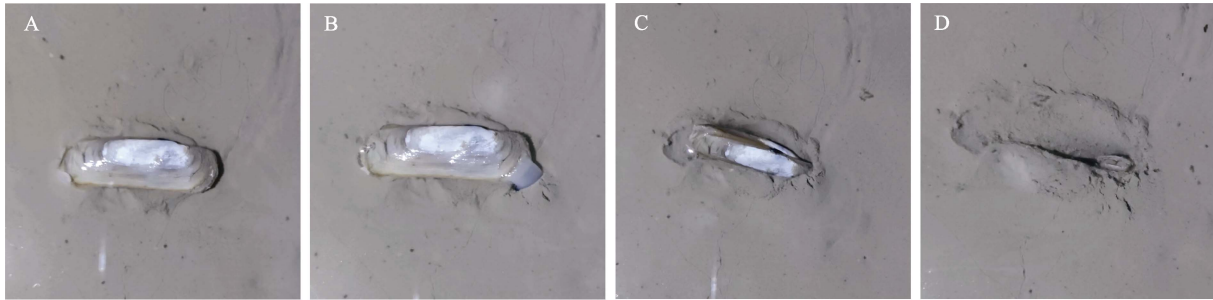


图2 缢蛏的潜沙过程

Fig.2 Burrowing process of *S.constricta*

A: 闭壳准备期; B: 斧足运动期; C: 掘泥竖壳期; D: 潜沙结束期

A: Preparation; B: Moving axefoot; C: Drilling mud and stacking shell; D: Burrowing into mud

表3 群体、盐度和实验组别对缢蛏半数潜沙时间影响的三因素方差分析

Tab.3 Three-way ANOVA of population, salinity and group on BT₅₀ of *S. constricta*

| 变异来源 Source of variation | 平方和 Sum of squares | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F | P |
|---|-----------------------|--------------------------|-------------------|---------|---|
| 群体 Population | 9.105 | 1 | 9.105 | 150.782 | 0 |
| 盐度 Salinity | 69.255 | 3 | 23.085 | 382.284 | 0 |
| 实验组别 Group | 66.488 | 2 | 33.244 | 550.519 | 0 |
| 群体×盐度 Population×Salinity | 6.521 | 3 | 2.174 | 35.996 | 0 |
| 群体×实验组别 Population×Group | 38.245 | 1 | 38.245 | 633.328 | 0 |
| 盐度×实验组别 Salinity×Group | 40.766 | 3 | 13.585 | 224.972 | 0 |
| 群体×盐度×实验组别 Population×Salinity×Group | 27.910 | 3 | 9.303 | 154.062 | 0 |
| 误差 Deviation | 1.872 | 31 | 0.060 | | |
| 总计 Total | 1 817.794 | 48 | | | |

在应激组中, 盐度为 20、28 和 32 时, SZSC 的 BT₅₀ 显著大于 ZRSC; 在胁迫组中, 除对照组外, ZRSC 的 BT₅₀ 均显著大于 SZSC ($P<0.05$)。

在应激组中, 盐度为 24 时, SZSC 的 BT₅₀ 为 4.20 min, 显著低于盐度为 28 和 32 的 BT₅₀ ($P<0.05$); 胁迫组中, SZSC 在盐度为 24 和 28 时, BT₅₀ 分别为 5.12 min 和 5.28 min, 显著高于对照组, 同时, 显著低于盐度为 32 时的 BT₅₀ ($P<0.05$)。而应激组 ZRSC 在盐度为 32 时, BT₅₀ 最小, 仅为 3.48 min, 显著低于 SZSC ($P<0.05$); 在盐度为 24 和 28 时, ZRSC 的 BT₅₀ 相比无显著差异, 但显著高于盐度为 20 和 32 时的 BT₅₀ ($P<0.05$); 胁迫组 ZRSC 在各个盐度条件下的 BT₅₀ 均存在显著差异 ($P<0.05$), 且与盐度成正比关系, 在盐度为 32 时达到最大(13.11 min)。通过比较发现, SZSC 在盐度为 24 和 28 时, BT₅₀ 与对照组更接近, 在盐度胁迫 24 h 后, SZSC 活力显著优于 ZRSC。

2.4 高盐对缢蛏潜沙率及潜沙深度的影响

三因素方差分析表明, 群体、盐度和实验组对缢蛏的潜沙率均有极显著影响 ($P<0.01$), 与缢蛏 BT₅₀ 的分析结果一致, 但 3 个因素对缢蛏的潜沙率无交互作用(表 4)。

从图 4 可以看出, 在应激组中, SZSC 潜沙率在盐度为 24 时达到最高(96.67%); 盐度为 32 时, 潜沙率为 88.33%, 显著高于 ZRSC ($P<0.05$); 随着盐度的升高, ZRSC 潜沙率呈显著下降的趋势。在胁迫组中, 盐度为 24、28 和 32 时, SZSC 潜沙率均显著高于 ZRSC ($P<0.05$); 盐度为 24 时, SZSC 潜沙率达到最高(93.33%), 显著高于盐度为 28 和 32 的潜沙率 ($P<0.05$); 盐度为 32 时, SZSC 潜沙率为 78.33%, 远高于 ZRSC 的潜沙率(56.67%); 与应激组趋势相同, 随着盐度的升高, ZRSC 的潜沙率也呈下降的趋势, 但在盐度为 28~32 时, 下降的幅度更大。

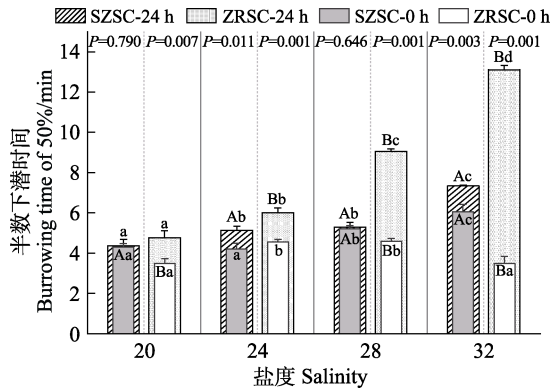


图 3 缢蛏在不同盐度下的半数潜沙时间

Fig.3 BT₅₀ of *S. constricta* at different salinity levels

不同大写字母表示同一盐度下不同缢蛏群体存在显著差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示不同盐度下同一群体存在显著差异 ($P < 0.05$); 0 h 是应激实验组, 24 h 是胁迫实验组。

SZSC: “申浙一号” 群体; ZRSC: 自然群体。下同。

Different uppercase letters indicate significant differences in BT₅₀ among different populations of *S. constricta* at each salinity, different lowercase letters indicate significant differences in BT₅₀ of the same population at different salinity levels, 0 h is the non-stress group and 24 h is the stress group.

SZSC: “Shenzhen No.1” *S. constricta* population;

ZRSC: Natural *S. constricta* population. The same below.

实验得到的缢蛏潜沙深度因个体而异, 故通过箱线图来反映 2 个缢蛏群体潜沙深度的垂直分布情况。三因素方差分析表明, 缢蛏潜沙深度无显著的群体间差异, 但盐度和实验组别显著影响缢蛏的潜沙深度 ($P < 0.01$), 且 3 个因素对缢蛏的潜沙深度有交互作用 (表 5)。从图 5 可以看出, 在应激组中, 2 个群体在盐

度为 24 时, 平均潜沙深度均显著小于其他盐度组, 随着盐度的升高, 其潜沙深度也随之加深。盐度为 32 时, ZRSC 平均潜沙深度最深, 达到 8.22 cm, 显著大于 SZSC ($P < 0.05$)。SZSC 在盐度为 32 时, 潜沙分布更集中, 50% 的个体分布在 7.29~7.55 cm 之间, 而 ZRSC 在盐度为 24 时, 潜沙分布更集中。

在胁迫组中, 2 个群体的平均潜沙深度均小于应激组, 随着盐度的升高, 单个群体的潜沙深度无明显趋势, 盐度为 32 时, ZRSC 平均潜沙深度为 7.45 cm, 显著大于 SZSC 的 6.56 cm ($P < 0.05$); 盐度为 28 时, 潜沙深度趋势和对照组相同, SZSC 的平均潜沙深度显著大于 ZRSC ($P < 0.05$)。本研究发现, 在高盐条件下, SZSC 比 ZRSC 潜沙分布集中, 潜沙深度较浅。

2.5 高盐对缢蛏摄食率(FR)的影响

缢蛏属于滤食性贝类, 其摄食行为主要依靠入水管摄取食物。本研究通过 FR 衡量缢蛏在高盐条件下摄食行为的变化。从图 6 可以看出, 高盐条件对缢蛏摄食行为具有显著影响, 对照组中, ZRSC 的 FR 大于 SZSC, 但无显著差异; 在其他盐度条件下, SZSC 的 FR 均显著大于 ZRSC ($P < 0.05$)。随着盐度的升高, ZRSC 的 FR 呈显著下降趋势, 而 SZSC 的 FR 在盐度为 24 时达到最高 [89.54 mL/(g·h)], 显著大于其他盐度组 ($P < 0.05$)。双因素方差分析表明, 不同缢蛏群体和盐度对 FR 的影响均极显著 ($P < 0.01$), 群体和盐度的交互作用对 FR 的影响同样极显著 ($P < 0.01$) (表 6)。

表 4 群体、盐度和实验组别对缢蛏潜沙率影响的三因素方差分析

Tab.4 Three-way ANOVA of population, salinity and group on burrowing rate of *S. constricta*

| 变异来源 Source of variation | 平方和 Sum of squares | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F | P |
|---|-----------------------|--------------------------|-------------------|--------|-------|
| 群体 Population | 0.064 | 1 | 0.064 | 41.178 | 0.000 |
| 盐度 Salinity | 0.233 | 3 | 0.078 | 50.237 | 0.000 |
| 实验组别 Group | 0.106 | 2 | 0.053 | 34.138 | 0.000 |
| 群体×盐度 Population×Salinity | 0.026 | 3 | 0.009 | 5.550 | 0.004 |
| 群体×实验组别 Population×Group | 0.014 | 1 | 0.014 | 8.896 | 0.006 |
| 盐度×实验组别 Salinity×Group | 0.021 | 3 | 0.007 | 4.616 | 0.009 |
| 群体×盐度×实验组别 Population×Salinity×Group | 0.005 | 3 | 0.002 | 1.006 | 0.403 |
| 误差 Deviation | 0.048 | 31 | 0.002 | | |
| 总计 Total | 36.225 | 48 | | | |

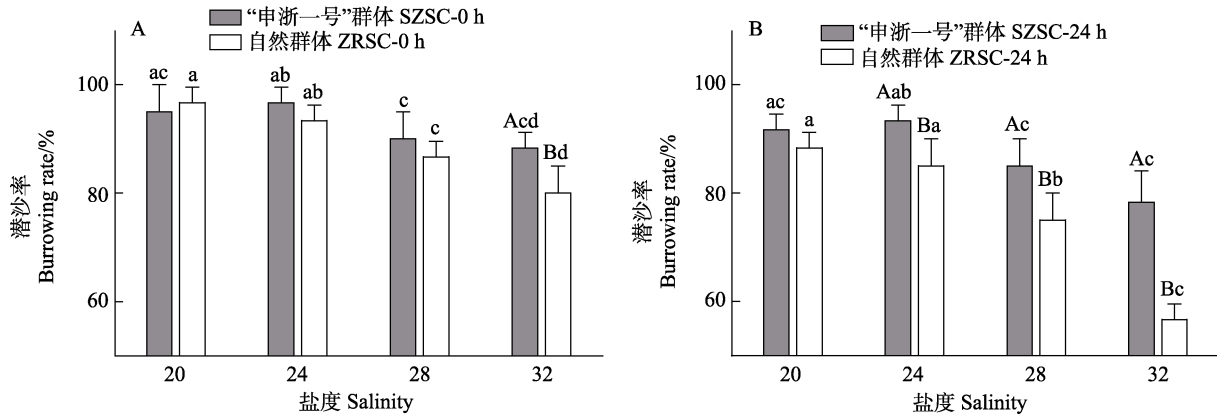


图 4 缢蛏在不同盐度下应激实验组(A)和胁迫实验组(B)的潜沙率

Fig.4 Burrowing rate of *S. constricta* in non-stress test group (A) and salt stress test group (B) at different salinity levels

表 5 群体、盐度和实验组别对缢蛏潜沙深度影响的三因素方差分析

Tab.5 Three-way ANOVA analysis of population, salinity and group on burrowing depth of *S. constricta*

| 变异来源 Source of variation | 平方和 Sum of squares | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F | P |
|---|-----------------------|--------------------------|-------------------|---------|-------|
| 群体 Population | 1.519 | 1 | 1.519 | 3.729 | 0.054 |
| 盐度 Salinity | 40.778 | 3 | 13.593 | 33.380 | 0.000 |
| 实验组别 Group | 106.030 | 2 | 53.015 | 130.188 | 0.000 |
| 群体×盐度 Population×Salinity | 7.545 | 3 | 2.515 | 6.176 | 0.000 |
| 群体×实验组别 Population×Group | 4.919 | 2 | 2.459 | 6.039 | 0.002 |
| 盐度×实验组别 Salinity×Group | 25.904 | 6 | 4.317 | 10.602 | 0.000 |
| 群体×盐度×实验组别 Population×Salinity×Group | 9.921 | 6 | 1.654 | 4.061 | 0.001 |
| 误差 Deviation | 327.403 | 804 | 0.407 | | |
| 总计 Total | 35 170.420 | 828 | | | |

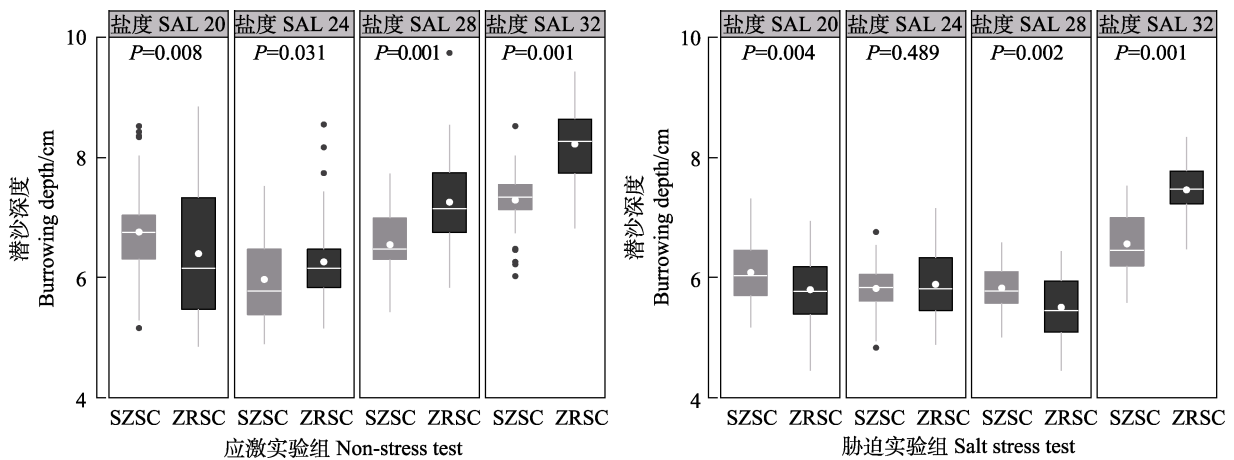


图 5 缢蛏在不同盐度下的潜沙深度

Fig.5 Burrowing depth of *S. constricta* at different salinity levels

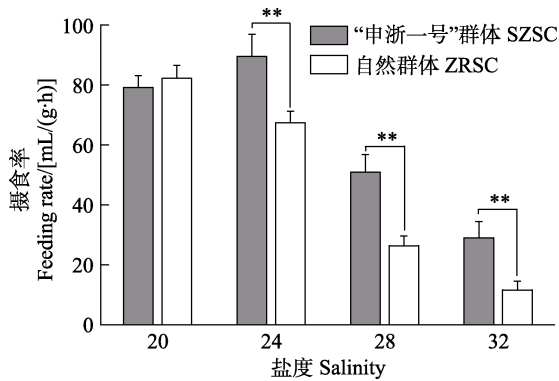


图 6 缢蛏在不同盐度下的摄食率

Fig.6 Feeding rate of *S. constricta* at different salinity levels

**表示差异极显著($P < 0.01$)。

** shows highly significant differences($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 缢蛏潜沙行为的变化过程

缢蛏跟大部分双壳贝类一样营埋栖生活,其足部

呈斧刃状,适于挖掘泥沙将自身完全埋藏泥底。目前,还未有文献去定义缢蛏的潜沙行为。本研究根据缢蛏的潜沙过程,首次将其分为闭壳准备期、斧足运动期、掘泥竖壳期和潜沙结束期 4 个阶段。前 3 个阶段在底质表面完成,可肉眼观察到缢蛏潜沙的运动方式,最后一个阶段,缢蛏向下垂直运动完全没入底质,表面出现距离相近的由出、入水管形成的 2 个小孔供呼吸和摄食。缢蛏与其他埋栖型贝类比较发现,缢蛏平均潜沙时间比文蛤(*Meretrix meretrix*) (李磊等, 2017)、菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*) (杨凤等, 2016)、侏儒蛤(*Mulinia lateralis*) (黄晓婷等, 2020)等贝类更短,而潜沙深度更深,但与同为竹蛏科(*Solen strictu*)的大竹蛏(*Solen grandis*) (王焱等, 2019)相近。与已报道的魁蚶(*Anadara broughtonii*) (王为民等, 2018)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*) (陈雷等, 2016)等有所不同,由于蚶类不具备水管,因此,在埋栖行为完成后,不会像缢蛏一样在表面留下清晰可辨的由水管形成的孔。

表 6 群体和盐度对缢蛏摄食率影响的双因素方差分析

Tab.6 Two-way ANOVA of population and salinity on feeding rate of *S. constricta*

| 变异来源 Source of variation | 平方和 Sum of squares | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F | P |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|---------|-------|
| 群体 Population | 1 395.117 | 1 | 1 395.117 | 59.550 | 0.000 |
| 盐度 Salinity | 16 103.061 | 3 | 5 367.687 | 229.117 | 0.000 |
| 群体×盐度 Population×Salinity | 711.913 | 3 | 237.304 | 10.129 | 0.001 |
| 误差 Deviation | 374.844 | 16 | 23.428 | | |
| 总计 Total | 89 928.830 | 24 | | | |

3.2 盐度对埋栖型贝类潜沙行为的影响

盐度是生理和行为方面最具影响力的环境变量之一,其波动可能会破坏机体的渗透压平衡,从而影响贝类的生理生态。本研究中,高盐环境对缢蛏的潜沙行为具有显著影响,大部分缢蛏在 30 min 内均能完成潜沙,其潜沙率在盐度为 24 时达到最高,但潜沙深度最小,当盐度达到 32 时,其潜沙率显著下降,潜沙深度达到最大。这与张安国等(2015)对文蛤潜沙行为的研究结果相一致,随着盐度的升高,其潜沙率逐渐升高并在盐度为 26 时达到最高值,当盐度达到 30 时,小规格文蛤潜沙率最低,仅为 43%。黄晓婷等(2020)研究表明,高盐和低盐条件均影响侏儒蛤的潜沙行为,但随着盐度胁迫时间的增加,其受到的影响逐渐减弱。本研究中,缢蛏随着胁迫时间的增加受到的影响更大,具体表现为潜沙时间增加和潜沙率的降低,而经过选育的“申浙一号”新品种缢蛏

耐高盐性能优于未经选育的自然群体,其受到盐度波动的影响更小。

目前,国内外有关盐度对贝类潜沙行为影响的研究较多。除高盐外,在低盐条件下,四角蛤蜊(*Macrta veneriformis*)的潜沙率随着盐度降低呈下降的趋势,在盐度为 6.7 条件下,潜沙率仅为 30% (Nakamura *et al*, 2009)。菲律宾帘蛤盐度由 30 突变至 10 时,没有蛤仔潜沙,突变至 20 时,有 20%~30%潜沙(20 °C, 庄河蛤仔)或 100%潜沙(15 °C, 福建蛤仔)(杨凤等, 2016)。砂海螂(*Mya arenaria*)在低盐度(5)或波动盐度(5~15)条件下,驯化 21~28 d,潜沙速度和复埋次数都呈下降趋势,低盐胁迫会导致其潜沙能力的降低(Haider *et al*, 2018)。Woodin 等(2020)研究表明,在盐度低于 15 时,菲律宾帘蛤、沟纹蛤仔(*Ruditapes decussatus*)和比利时波纹浅蛤(*Venerupis corrugate*)的潜沙活动都会减少,表面出现虹吸的次数也随之减少。上述研究表明,盐度过高或过低都会对埋栖型贝类的潜沙行

为产生一定阻碍作用。本研究中,缢蛭在盐度突然升高时,其潜沙率总体呈下降趋势,但均能保持在 80% 以上,说明相较于其他贝类,缢蛭在不良环境下的应激躲避反应更强烈,自我保护能力更强。

3.3 盐度对埋栖型贝类摄食率的影响

摄食是生物的基本生态行为之一,是从外界获得营养物质维持正常生命活动的方式(王新安等,2006)。关于埋栖型贝类的摄食生理研究多集中在双壳滤食性贝类,其主要依靠入水管摄取藻类,FR 是反映滤食性贝类生理状态的一项动态指标(包永波等,2006;侯兴等,2021;潘绘竹,2020;彭剑等,2017)。研究表明,盐度变化会显著影响贝类的摄食行为,目前,在海洋经济贝类的研究中,四角蛤蜊、光滑河蓝蛤(*Potamocorbula laevis*) (滕炜鸣等,2018)、文蛤(杨杰青等,2016)、大珠母贝(*Pinctada maxima*)和合浦珠母贝(*Pinctada fucata*) (范嗣刚等,2014)、尖紫蛤(*Soletellina acuta*) (黄洋等,2014)等贝类的 FR 均会随盐度的增加呈先上升后下降的趋势,FR 达到峰值时的盐度一般被认为是最佳摄食盐度。本研究通过 FR 衡量缢蛭在高盐度条件下摄食行为的变化,与其他贝类一致,缢蛭的 FR 随盐度的增加呈先上升后下降的趋势,SZSC 的 FR 在盐度为 24 时达到最高,而 ZRSC 的最佳摄食盐度为 20,这与吕昊泽等(2016)研究的缢蛭最佳摄食盐度为 20 结果一致。这些研究表明,低盐和高盐环境都会打破机体的渗透压平衡,从而影响摄食行为,大多数海洋埋栖型贝类的最佳摄食盐度为 20~30,这是贝类长期适应自然海区盐度选择的结果。

综上所述,适当提高盐度有利于缢蛭快速潜沙和摄食,在高盐条件下,“申浙一号”群体的潜沙和摄食能力优于自然群体,具有更好的选育潜力。本研究首次从行为学水平评估了缢蛭对高盐的耐受性,为缢蛭耐高盐选育提供了参考资料。

参 考 文 献

BAO Y B, YOU Z J. The present researching status of ingestion rate's influence factors of marine suspension-feeding shellfish. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(1): 76-80 [包永波, 尤仲杰. 海洋滤食性贝类摄食率影响因子研究现状. 海洋水产研究, 2006, 27(1): 76-80]

Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2021*. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021

中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2021]

CARREGOSA V, FIGUEIRA E, GIL A M, *et al.* Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2014, 171: 36-43

CASAS S M, FILGUEIRA R, LAVAUD R, *et al.* Combined effects of temperature and salinity on the physiology of two geographically-distant eastern oyster populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2018, 506: 82-90

CHEN L, GUO L Y, ZHANG S, *et al.* The observation and analysis of burrowing behaviors of ark shell *Scapharca subcrenata* in different substrates and sowing conditions. *Fishery Modernization*, 2016, 43(4): 22-26 [陈雷, 郭良勇, 张嵩, 等. 毛蚶在不同底质与撒播方式下潜沙行为的观测与分析. 渔业现代化, 2016, 43(4): 22-26]

CHEN M, LIN Z H, XU X, *et al.* Effects of salinity stress on blood ion concentration and carbonic anhydrase gene expression in *Sinonovacula constricta*. *Journal of Biology*, 2021, 38(1): 83-87 [陈铭, 林志华, 徐娴, 等. 盐度胁迫对缢蛭血液离子浓度及碳酸酐酶基因表达的影响. 生物学杂志, 2021, 38(1): 83-87]

CHEN Y H, DU X X, DONG Z G, *et al.* Heritability estimation of high salt tolerance in razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Aquaculture*, 2022, 559: 738423

CHEN Y H. Evaluation and genetic analysis of high salt tolerance in razor clams *Sinonovacula constricta*. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2022 [陈义华. 缢蛭耐高盐性能评价以及相关性状遗传解析. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2022]

DING H B, LI H Y, CHEN Y H, *et al.* Effects of high salinity on growth and survival, Na^+/K^+ -ATPase activity and energy metabolism related indexes of razor clam *Sinonovacula constricta*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(4): 831-838 [丁红兵, 李浩宇, 陈义华, 等. 高盐对缢蛭生长存活、 Na^+/K^+ -ATPase 活性及能量代谢相关指标的影响. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 831-838]

FAN S G, HUANG G J, LIU B S, *et al.* Effects of salinity and temperature on the filtration rate and ingestion rate of *Pinctada maxima* and *Pinctada fucata*. *Journal of Hydroecology*, 2014, 35(3): 61-65 [范嗣刚, 黄桂菊, 刘宝锁, 等. 盐度与温度对大珠母贝和合浦珠母贝滤水率及摄食率的影响. 水生态学杂志, 2014, 35(3): 61-65]

HAIDER F, SOKOLOV E P, SOKOLOVA I M. Effects of mechanical disturbance and salinity stress on bioenergetics and burrowing behavior of the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 2018, 221(P4): jeb172643

HOU X, WANG Y, LIU T H, *et al.* Effects of feeding activities by four common economic bivalves on the production of dimethyl sulfur compounds from *Isochrysis galbana*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 124-131 [侯兴,

- 王颖, 刘天红, 等. 4种常见经济滤食性贝类摄食活动对球等鞭金藻产生二甲基硫化物的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 124–131]
- HUANG X T, YANG Z J, WANG H, *et al.* A study on burrowing behavior of *Mulinia lateralis*. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2020, 50(9): 64–71 [黄晓婷, 杨祖晶, 王浩, 等. 侏儒蛤潜沙行为研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(9): 64–71]
- HUANG Y, HUANG H L, DENG L P, *et al.* Effects of salinity, pH and sizes on clearance rate, ingestion rate and absorption efficiency of *Soletellina acuta*. Journal of Guangdong Ocean University, 2014, 34(1): 42–47 [黄洋, 黄海立, 邓乐平, 等. 盐度、pH和规格对尖紫蛤滤水率、摄食率、吸收率的影响. 广东海洋大学学报, 2014, 34(1): 42–47]
- LI L X, DU W J, WANG C D, *et al.* Comparative analysis of growth and heat tolerance, salt tolerance traits among *Sinonovacula constricta* families. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(4): 515–521 [李炼星, 杜文俊, 王成东, 等. 缢蛭家系生长和耐热、耐高盐性能的对比研究. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 515–521]
- LI L, BAI Y C, HUANG S L. *et al.* Substrate preference and sand burrowing ability assessment of *Meretrix meretrix*. Marine Fisheries, 2017, 39(5): 548–553 [李磊, 柏育材, 黄士林, 等. 文蛤的底质选择性及潜沙能力研究. 海洋渔业, 2017, 39(5): 548–553]
- LIU Q G, ZHANG M X, CHEN L P, *et al.* Effects of algal species, shellfish body size and density on the feeding rates of *Anodonta woodiana* and *Corbicula fluminea*. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(3): 331–338 [刘其根, 张明星, 陈丽平, 等. 藻种、贝类密度和大小对背角无齿蚌和河蚬摄食率的影响. 上海海洋大学学报, 2020, 29(3): 331–338]
- LÜ H Z, LIU J, CHEN J H, *et al.* Effects of salinity on filtration, ingestion, and assimilation rates of three filter-feeding bivalves in the Yangtze River estuary. Marine Sciences, 2016, 40(8): 10–17 [吕昊泽, 刘健, 陈锦辉, 等. 盐度对长江口3种滤食性贝类滤水率、摄食率、同化率的影响. 海洋科学, 2016, 40(8): 10–17]
- MOLLY R, MEGAN K L P, STEVEN G H, *et al.* Increased temperatures combined with lowered salinities differentially impact oyster size class growth and mortality. Journal of Shellfish Research, 2016, 35(1): 101–113
- NAKAMURA Y, HASHIZUME K, KOYAMA K, *et al.* Effects of salinity on sand burrowing activity, feeding and growth of the clams *Macra veneriformis*, *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix lusoria*. Journal of Shellfish Research, 2009, 24(4): 1053–1059
- NIU D H, WANG F, XIE S M, *et al.* Developmental transcriptome analysis and identification of genes involved in larval metamorphosis of the razor clam, *Sinonovacula constricta*. Marine Biotechnology, 2016, 18(2): 168–175
- PAN H Z. Study on feeding selectivity of different phytoplankton assemblages by several typical bivalve species in the Yellow Sea and Bohai Sea. Master's Thesis of Jinan University, 2020 [潘绘竹. 黄渤海海域几种典型双壳贝类对浮游植物的摄食规律研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2020]
- PENG J, ZHANG A, LI Y M, *et al.* Effect of main factors on shellfish feeding analysis. South China Agriculture, 2017, 11(24): 77–78 [彭剑, 张奥, 李由明, 等. 影响贝类摄食的主要因素分析. 南方农业, 2017, 11(24): 77–78]
- RAN Z S, LI S, ZHANG R T, *et al.* Proximate, amino acid and lipid compositions in *Sinonovacula constricta* (Lamarck) reared at different salinities. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(13): 4476–4483
- TENG W M, GAO S L, LIU X, *et al.* Effects of salinity on filtration and ingestion rates of surf clam *Macra veneriformis* and clam *potamocorbula laevis* in Liaodong Bay. Fisheries Science, 2018, 37(5): 622–627 [滕炜鸣, 高士林, 刘谓, 等. 盐度对辽东湾四角蛤蜊和光滑河蓝蛤摄食率和滤水率的影响. 水产科学, 2018, 37(5): 622–627]
- WANG W M, ZHANG T W, LIU G X, *et al.* Effects of elevated seawater pCO₂ on the burrowing ability and three enzymes of *Scapharca broughtonii* (Bivalvia: Arcidae) juvenile. Periodical of Ocean University of China(Natural Science), 2018, 48(5): 19–24 [王为民, 张天文, 刘光兴, 等. CO₂加富对魁蚶稚贝潜沙能力和3种酶活性的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(5): 19–24]
- WANG X A, MA A J, ZHANG X M, *et al.* A review on feeding behavior ecology of early development stage of marine fish. Marine Sciences, 2006(11): 69–74 [王新安, 马爱军, 张秀梅, 等. 海洋鱼类早期摄食行为生态学研究进展. 海洋科学, 2006(11): 69–74]
- WANG Y, DONG S S, LI D D, *et al.* Effect of sediment thickness and sand ratio on the burrowing behavioral and enzyme activities of *Solen grandis*. Journal of Economic Animal, 2019, 23(2): 84–88, 93 [王垚, 董莎莎, 李东东, 等. 不同底质厚度和泥沙比例对大竹蛭潜沙行为及酶活性的影响. 经济动物学报, 2019, 23(2): 84–88, 93]
- WOODIN S A, WETHEY D S, OLABARRIA C, *et al.* Behavioral responses of three venerid bivalves to fluctuating salinity stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2020, 522: 151256
- YANG F, ZENG C, WANG H, *et al.* Effects of environmental factors and clam size on the burrowing behavior of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(3): 795–802 [杨风, 曾超, 王华, 等. 环境因子及规格对菲律宾蛤仔幼贝潜沙行为的影响. 生态学报, 2016, 36(3): 795–802]
- YANG J Q, JIANG M, LI L, *et al.* Effects of salinity and pH on the filtration rate and ingestion rate of *Meretrix meretrix*. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(6): 87–93 [杨杰青,

蒋玫, 李磊, 等. 盐度、pH对文蛤(*Meretrix meretrix*)滤水率和摄食率的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 87–93]
ZHANG A G, YUAN X T, YANG F Y, *et al.* Effects of temperature, salinity and sediment on the burrowing

behavior of clam *Meretrix meretrix*. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(6): 1595–1601 [张安国, 袁秀堂, 杨凤影, 等. 温度、盐度及底质对文蛤潜砂行为的影响. 生态学杂志, 2015, 34(6): 1595–1601]

(编辑 陈 严)

Burrowing and Feeding Responses of Different Populations of *Sinonovacula constricta* to High-Salt Culture Environment

DU Xinxin¹, NIU Donghong^{1,3}①, ZHANG Shuyuan¹, DENG Min¹, WANG Jie², LI Jiale^{1,3}

(1. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Sanmen Eastern Fisheries Limited, Sanmen 317100, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract The razor clam (*Sinonovacula constricta*, Class Bivalvia) is a kind of burial filter-feeding shellfish. Salinity fluctuation is an important source of pressure for water habitats. High salinity in some coastal areas of Shandong and Jiangsu impact the survival and germplasm conservation of razor clam. To study the ecological behavior response of *S. constricta* to high salt culture environment, two populations of razor clams were used, including "Shenzhe No.1" population (SZSC) and a natural population (ZRSC). The semi-lethal salinity level of each population was determined. The effects of control group (20) and high salinity (24, 28, 32) on burrowing and feeding behavior of razor clams were studied. The differences in burrowing indices and feeding physiology between the two populations were compared. In the burrowing behavior experiment, two groups were set; razor clams from the temporary pond were put into each salinity group to start the experiment, while the other group of razor clams were stressed under each salinity condition for 24 h and then put into each salinity group to start the experiment. The results showed that the 120 h LC₅₀ of SZSC was 34.04, while the 120 h LC₅₀ of ZRSC was 32.04. The burrowing behavior of razor clams could be divided into four periods: The preparation period of shell closure, the period of axe foot movement, mud digging period, and the end period of mud diving. In the non-stressed group, the burrowing time of 50% (BT₅₀) of SZSC was significantly higher than that of ZRSC ($P < 0.05$). The BT₅₀ of SZSC at 24 salinity was the minimum, which was significantly lower than that of BT₅₀ at 28 and 32 salinity. The distribution of burrowing depth of SZSC was highly concentrated: 50% of the individuals were between 7.29 and 7.55 cm. The burrowing rate was 88.33% at 32 salinity, which was significantly higher than that of ZRSC ($P < 0.05$). In the stressed group, the BT₅₀ of SZSC was significantly lower than that of ZRSC, while the burrowing rate was significantly higher than that of ZRSC ($P < 0.05$). With the increase in salinity, the burrowing rate of ZRSC decreased significantly ($P < 0.05$). The average burrowing depth of ZRSC was 7.45 cm at 32 salinity, which was significantly higher than that of SZSC ($P < 0.05$). By comparing the experimental results of the two populations, whether in SZSC or ZRSC, the BT₅₀ of razor clams in the stressed group was higher than that in non-stressed group at each salinity. However, there was no significant difference in BT₅₀ between the stressed and non-stressed groups at 20 and 28 salinity among SZSC ($P > 0.05$). The BT₅₀ of SZSC was closer to that of the control group at 24 and 28 salinity, and the vitality of SZSC was significantly better

① Corresponding author: NIU Donghong, E-mail: dhniu@shou.edu.cn

than that of ZRSC after 24 h of salinity stress. Under high salinity, the distribution of SZSC in mud was more concentrated than that in ZRSC, and the burrowing depth was shallower. In terms of feeding physiology, the feeding rate of SZSC was significantly higher than that of ZRSC under high salinity ($P<0.05$). The feeding rate of SZSC reached the maximum 89.54 mL/(g·h) at 24 salinity, which was significantly higher than that of other salinity groups ($P<0.05$). In summary, the ecological behaviors of both populations were affected by high salinity. The higher the salinity, the stronger the stress response, with the SZSC having a higher salinity tolerance than ZRSC. In this study, the tolerance of two populations of razor clams to high salinity was evaluated at the level of ecological behavior, and the vertical distribution and feeding ability of *S. constricta* in sediment in a high-salt environment was revealed. The results provide a theoretical reference for the further breeding of novel high-salt-tolerant strains of *S. constricta*.

Key words *Sinonovacula constricta*; Burrowing behavior; Feeding rate; High salinity

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230120001

http://www.yykxjz.cn/

邱达观, 兰帅勤, 陈煜, 毛晶, 臧战, VASQUEZ Hebert Ely, 於锋, 王爱民, 郑兴, 顾志峰. 不同铵离子浓度与 pH 人工海水对栉江瑶精子激活效果的比较. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 214–223

QIU D G, LAN S Q, CHEN Y, MAO J, ZANG Z, VASQUEZ H E, YU F, WANG A M, ZHENG X, GU Z F. Comparing the effects of ammonia ion concentration and pH on *Atrina pectinata* sperm activation in artificial seawater. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 214–223

不同铵离子浓度与 pH 人工海水对 栉江瑶精子激活效果的比较*



邱达观¹ 兰帅勤¹ 陈煜¹ 毛晶¹ 臧战¹ VASQUEZ Hebert Ely^{1,2,3}
於锋^{1,2} 王爱民^{1,3} 郑兴^{1,2,3} 顾志峰^{1,2,3}

(1. 海南大学海洋学院 海南 海口 570228; 2. 海南大学三亚南繁研究院 海南 三亚 572000;
3. 海南大学 南海海洋资源利用国家重点实验室 海南省热带水生生物技术重点实验室 海南 海口 570228)

摘要 栉江瑶(*Atrina pectinata*)为我国重要的海洋经济双壳贝类,近年来,其养殖生产活动备受养殖企业关注,为发展和优化其人工繁殖技术,本研究探究了人工海水中铵离子浓度和 pH 的变化对栉江瑶新鲜精子游泳运动的激活作用,定量描述了高度活化状态下精子曲线运动速率(VCL)、直线运动速率(VSL)、平均路径运动速率(VAP)和鞭毛摆动频率(BCF)的运动学特征,并对精子 ATP 含量、ATP 酶与超氧化物歧化酶(SOD)活性进行了记录。结果显示,简单提高海水 pH 可略微提高栉江瑶精子运动率,但无法使精子进入高度活化状态;含有铵离子的碱化海水可有效激发精子游泳运动,3 mmol/L 氨海水激活效果最佳。经 3 mmol/L 氨海水激活后,精子活力等级(MI)在 21 min 内一直保持在 ≥ 4 的状态,在激活的前 3 min 内精子运动率都在 80%以上, $VCL > 56 \mu\text{m/s}$, $VSL > 17 \mu\text{m/s}$, $VAP > 30 \mu\text{m/s}$, $BCF > 6 \text{ Hz}$ 。精子 ATP 含量在激活 5 min 后降低至初始含量的 30.29% [(128.80 \pm 66.92) $\mu\text{mol/g prot}$], 随后,无显著变化($P > 0.05$)。精子 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性在运动过程中较为稳定,其中, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性较低[(0.62 \pm 0.03) U/mg prot], $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性较高[(6.08 \pm 0.04) U/mg prot]。精子 SOD 活性在 15 min 内逐步降低至[(1.23 \pm 0.73) U/mg prot], 随后维持稳定。本研究可为栉江瑶精子激活机制深入研究提供基础,助力发展栉江瑶人工繁育技术。

关键词 栉江瑶; 精子; 运动率; 离子氨; pH; 能量代谢

中图分类号 S981.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0214-10

栉江瑶(*Atrina pectinata*)是一种大型双壳贝类,俗称带子、海铖、大海红,广泛栖息于日本、韩国、中国沿海潮下带的泥质或砂质沉积物中,具有极高的商业价值(Lee *et al*, 2015)。据《中国渔业年鉴 2022》

不完全统计,我国 2021 年海水贝类养殖产量为 1 526.07 万 t,是全国海水养殖产量(2 211.14 万 t)的 69.02% (农业农村部渔业渔政管理局等, 2022)。我国贝类养殖产业取得的巨大成绩,与经济贝类人工育苗

* 海南省自然科学基金(320QN207)、海南大学科研启动基金(KYQD(ZR)20061)和海南省海南省院士创新平台建设基金项目(HD-YSZX-202011)共同资助。邱达观, E-mail: dg_qiu@163.com

① 通信作者: 郑兴, E-mail: zhengxing_edu@163.com; 顾志峰, 教授, E-mail: guzhifeng@hainanu.edu.cn

收稿日期: 2023-01-20, 收修稿日期: 2023-02-19

技术的突破有直接关系, 加上养殖技术的创新与进步, 使我国贝类产业在海水养殖业中有着举足轻重的作用。

马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)等多数双壳贝类以体外受精的方式进行生殖繁育, 精子与卵子在水环境中发生受精作用(Alavi *et al.*, 2014; Boulais *et al.*, 2019)。这类受精方式的贝类精子在排出亲本体外前一直处于静止或低迷运动状态, 只有当精子被激活游泳运动时才具备与卵子结合的能力, 且游泳运动能力会直接影响受精率的高低(Arita *et al.*, 2012; Demoy-Schneider *et al.*, 2012; 周丽青等, 2011)。由此可见, 精子游泳运动有效激活对海洋双壳贝类人工授精的成功有着重要意义, 也是发展及优化人工繁殖技术的关键之一。栉江瑶与上述双壳贝类相似, 以体外受精的方式进行繁殖。

双壳贝类的精子收集方法可分为亲本刺激排放收集法和人工剥离收集法。亲本刺激排放收集法是指亲本自然或经人工阴干、升温等方式刺激后将精子排出体外, 是在水体中进行精子样品收集的方法; 人工解剖获得法是指直接解剖亲本个体从性腺中获得精子的方法。2种精子收集方法各有利弊: 亲本刺激排精法具有方法简单、操作简便、对亲本伤害较小等优点, 但易受到黏液和粪便等杂质的影响, 导致精子活力下降; 人工剥离法可直接获取性腺内的成熟精子, 通过使用缓冲液进行稀释保存, 可避免精子受到污染, 但该方法获得的精子样品质量和成熟度参差不齐, 需要进一步的激活处理, 但可以控制精子激活时间, 在精卵排放不同步的情况下更利于人工育苗的操作(Beirão *et al.*, 2019; 许帅等, 2021; 郑兴, 2019)。

在贝类的人工授精过程中, 由于存在精子质量不一、活化后精子活力不足等现象, 商业育苗场常面临精子供应短缺的问题(Rurangwa *et al.*, 2004)。不同贝类精子所需要的激活液种类与浓度具有差异性, 筛选出有效的激活液可推动其人工繁殖技术进一步发展。现有研究针对栉江瑶精子所采取的激活方式不一, 多参考其他双壳贝类的激活液进行选择, 所获得的精子激活率从20%~90%不等(Awaji *et al.*, 2018; 于非非等, 2016), 尚未形成标准化的精子激活方案, 且均未对栉江瑶精子的运动学指标和能量代谢内容进行研究。此外, 关于栉江瑶配子的研究主要围绕卵母细胞开展(Awaji *et al.*, 2018、2022; Qiu *et al.*, 2014), 鲜见关于精子游泳运动特征量化描述及相关能量代谢特征的

基础研究。

本文以海南地区繁殖季节的栉江瑶为研究对象, 探究了海水中铵离子浓度和 pH 的变化对新鲜精子运动率及运动特征的作用, 并对高度活化状态下栉江瑶精子的能量代谢特征进行研究, 以期为栉江瑶精子激活机制研究奠定基础, 支持栉江瑶人工繁育技术的发展与优化。

1 材料与方法

1.1 实验材料与管理

实验于2021年6月至2022年1月在海南省文昌市烟墩养殖场进行。栉江瑶亲本来源于海棠湾蜈支洲岛海域, 获得亲本后马上运至文昌市烟墩养殖场, 置于水泥池中暂养, 水温为(27±1)℃, pH为8.18, 盐度为29, 投喂亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)和角毛藻(*Chaetoceros* sp.)混合液, 每天早晚各投喂1次。

1.2 精子收集方法

经显微镜进行性别辨别后, 取性腺成熟的雄性亲本作为实验个体。使用解剖刀切断闭壳肌, 打开贝壳, 用干净纸巾吸干海水及组织液混合物, 取下性腺放入干净烧杯中, 加入适量无钙生理缓冲液(Ca-free HBSS, Sigma), 随后采用消毒后的剪刀充分剪碎性腺, 获得精浆悬浮液, 再用300目筛绢过滤精浆悬浮液, 去除多余组织碎片, 获得较干净的精子悬浮液, 用无菌离心管装好、标记, 放于冰上待用。

1.3 精子激活方法与实验设计

本研究所采用的激活方法是以1:500的比例将精子悬浮液与激活液在2 mL圆底EP管中混合, 用旋涡混合器快速混合后, 取3 μL样品点入Leja玻片中, 在精子质量分析系统下进行连续性观察, 直至大部分精子不再运动。实验在室温[(25±1)℃]及控温平台(25℃)条件下进行。

研究以人工无氨海水(ASW, pH为8.20, 盐度为30)作为实验对照组, 观察用不同浓度氨海水(1、2、3、4和5 mmol/L)激活精子后21 min内精子运动率的变化规律; 观察精子被与氨海水组pH相对应的人工配置的不同pH海水(8.64、9.10、9.27、9.36、9.42)激活后21 min内运动率的变化规律; 观察最佳活化状态下精子的曲线运动速率(VCL)、直线运动速率(VSL)、平均路径运动速率(VAP)、鞭毛摆动频率(BCF)、ATP含量、Na⁺-K⁺-ATP酶活性、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性和SOD活性的变化规律。

1.4 缓冲液及激活液的配置与保存

无钙生理缓冲液：取 1 mL 的 10×Ca-free HBS (Sigma, 美国) 加入到 9 mL 无菌超纯水中，混匀，4 °C 保存待用。

无氨人工海水(ASW)：参照 Cavanaugh (1975) 的方法，称取 24.837 g NaCl、0.671 g KCl、0.910 g CaCl₂、4.676 g MgCl₂、6.161 g MgSO₄、0.181 g NaHCO₃ 溶于 1 L 无菌超纯水中，曝气 2 h，为氨海水配制的基础液，常温保存。

不同氨浓度人工海水：使用 25%浓氨水及无氨人工海水分别配制成 1、2、3、4、5 mmol/L 的人工氨海水。常温保存待用，现用现配。作为精子激活液使用。

不同 pH 人工海水：使用 Good's buffer 调节无氨人工海水 pH，分别配制成 pH 为 8.64、9.10、9.27、9.36 和 9.42 的人工海水。常温保存待用。作为精子激活液使用。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 激活率与运动学参数 使用 SCA 精子质量分析仪(v.6.1)进行精子激活率及运动学参数测定。SCA 精子质量分析系统选择无脊椎动物模型模块，其镜像采集设置参数：最大采集面积为 80 μm²；帧数频率为 300 f/s；样品漂移参数为 4 μm/s。将每次镜头捕捉的精子个数控制在 300~400 个之间。

本研究涉及具体指标及标准设定如下：精子总运动率(TM, %，VCL ≥ 10 μm/s)、VCL (μm/s)、VSL (μm/s)、VAP (μm/s)和 BCF (Hz)。

1.5.2 精子活力等级划分方法 根据 Billard (1983)和 Cosson 等(2008)的方法，将精子活力等级(MI)分为 6 个水平(表 1)，即 MI=0~5。MI=0 表示精子处于未活化状态；MI=1 表示活化精子<1%；MI=2 表示活化精子在 1%~<25%之间；MI=3 表示活化精子在 25%~<50%之间；MI=4 表示活化精子在 50%~<75%之间；MI=5 表示活化精子在 75%~100%之间。

表 1 精子活力等级划分标准
Tab.1 Criteria for grading sperm motility

| 活力等级(MI) Motility index | 总运动率(TM) Total motility | 基本描述 Description |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| 0 | 0 | 精子处于未活化状态 |
| 1 | <1% | 活化精子<1% |
| 2 | 1%~<25% | 活化精子在 1%~<25%之间 |
| 3 | 25%~<50% | 活化精子在 25%~<50%之间 |
| 4 | 50%~<75% | 活化精子在 50%~<75%之间 |
| 5 | 75%~100% | 活化精子在 75%~100%之间 |

1.5.3 精子 ATP 含量与酶活性的测定 将精子悬浮液在 4 °C、4 000 r/min 条件下离心 15 min，收集精子细胞沉淀，舍去上清液。沉淀经生理盐水混匀后进行超声波破碎，分别按照试剂盒提供的方法测量上清液的 ATP 浓度、Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性和 SOD 活性。实验所用试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.6 数据处理与统计

实验数据用统计分析软件 DPS 14.5 进行统计分析，*P*<0.05 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 铵离子浓度、pH 对精子总运动率活化效果的影响及比较

人工氨海水的 pH 会随着海水中的铵离子浓度增加而变高，人工海水所含铵离子浓度分别为 1、2、3、4 和 5 mmol/L 时，溶液的 pH 分别为 8.64、9.10、9.27、9.36 和 9.42。

不同铵离子浓度和 pH 的人工海水处理栉江珧新鲜精子后的总运动率如图 1 所示。栉江珧精子在对照组(无氨人工海水)中呈不运动或极低迷的运动状态(MI ≤ 1)，在激活 21 min 内，精子总运动率在(1.89±1.44)%~(6.66±1.22)%范围内浮动变化。在合适范围内，随着铵离子浓度和 pH 的升高，栉江珧新鲜精子总运动率也会显著提高，但所对应的最佳激活时间有所不同。

如图 1A 所示，在浓度为 1 mmol/L 的氨海水激活溶液中，栉江珧精子被激活 1 min 后，TM 显著升高至(33.89±2.60)% (*P*<0.05)，活力在 MI=2 状态保持了 5 min；被激活 6 min 后，TM 开始明显降低，活力直至实验结束一直维持在 MI=1 的状态，最低 TM 为(13.84±1.14)%。而在与 1 mmol/L 氨海水激活溶液 pH 值对应的无氨人工海水激活液中(pH=8.64)，栉江珧精子活力状态则一直维持在 MI=1，TM 最高为(19.88±1.28)%，激活效果显著差于 1 mmol/L 氨海水溶液，但显著高于对照组，即 pH=8.64 的实验组与对照组相比也存在一定程度的运动激活效果。

如图 1B 所示，栉江珧精子运动被 2 mmol/L 的氨海水激活后，活力在激活 14 min 内一直维持在 MI=2 的状态，TM 最高为(36.48±1.91)%，而在激活第 15 分钟开始呈现逐步降低的趋势，精子活力降至 MI=1 的状态，直至实验结束。而在与 2 mmol/L 氨海水激活溶液 pH 值对应的无氨人工海水激活液中(pH=9.10)，栉

江珧精子活力状态一直维持在 $MI=1$, TM 最高为 $(17.82 \pm 1.24)\%$, 激活效果显著差于氨海水溶液, 但显著高于对照组, 且呈略微上升的趋势。

如图 1C 所示, 栉江珧精子运动被 3 mmol/L 的氨海水激活后, 活力在激活 21 min 内一直保持在 $MI \geq 4$ 的状态, 在激活的前 3 min 内, 总运动率都在 80% 以上, 第 4 分钟开始呈下降趋势并进入较平稳状态 ($MI=4$), 直至实验结束精子运动率均高于 60%, 在整个实验组中精子激活效果最优。而在与 3 mmol/L 氨海水激活溶液 pH 值对应的无氨人工海水激活液中 ($pH=9.27$), 栉江珧精子活力状态一直维持在 $MI=1$, TM 最高为 $(23.32 \pm 1.93)\%$, 激活效果显著差于氨海水溶液, 且呈逐步下降趋势。

如图 1D 所示, 栉江珧精子运动被 4 mmol/L 的氨海水激活后, 活力在激活 21 min 内一直保持在 $MI=2$ 的状态, 精子运动率在 $(43.96 \pm 1.92)\% \sim (32.44 \pm 1.26)\%$

范围内浮动变化。而与 4 mmol/L 氨海水激活溶液 pH 值对应的无氨人工海水激活液中 ($pH=9.36$), 栉江珧精子运动率整体低于在 4 mmol/L 氨海水激活液中, 但优于对照组, 在激活后第 2 分钟显著上升至 $(26.40 \pm 1.88)\%$, 并在 5 min 内维持着 $MI=2$ 的状态活力, 随后运动率呈波动状态, 保持活力 $MI=1$ 的状态。

如图 1E 所示, 栉江珧精子运动被 5 mmol/L 的氨海水激活后, 活力在激活前 5 min 内一直保持在 $MI=2$ 的状态, 精子运动率在 $(25.04 \pm 1.22)\% \sim (30.64 \pm 1.93)\%$ 范围内浮动变化。随后呈逐步降低的趋势, 活力降至 $MI=1$ 的状态, 实验结束后, TM 显著降低至 $(7.44 \pm 1.26)\%$ 。在与 5 mmol/L 氨海水激活溶液 pH 值对应的无氨人工海水激活液中 ($pH=9.42$), 栉江珧精子运动率在实验过程中只有略微上升, 在激活 4 min 时, TM 达最高值, 仅为 $(7.71 \pm 1.26)\%$, 随后呈波动变化, 活力一直为 $MI=1$ 的状态, 其运动率出现低于对照组的现象。

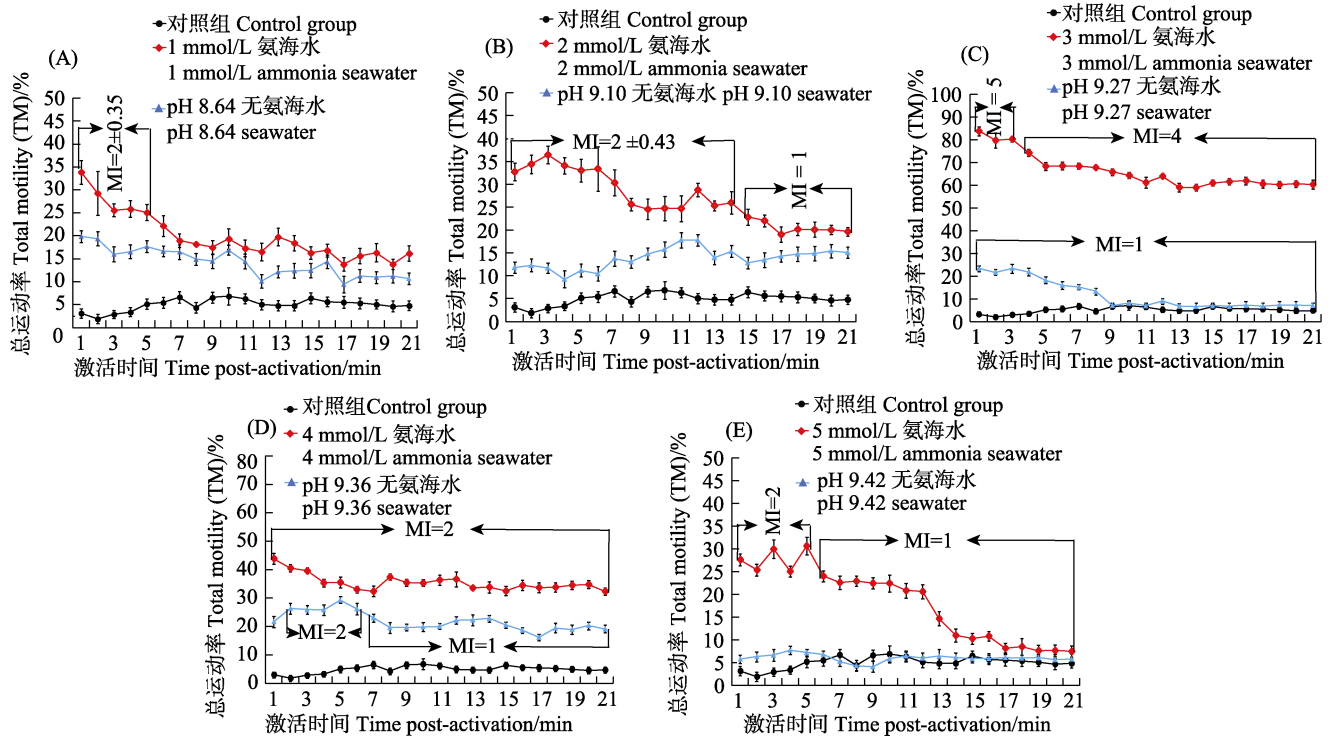


图 1 不同浓度铵离子和 pH 的人工海水激活后栉江珧精子总运动率的变化

Fig.1 The kinetics of *A. pectinata* total motility (TM) after dilution with artificial seawater of different ammonia ion concentration and pH

2.2 高度活化状态下栉江珧精子游泳运动特征分析

由总运动率实验结果可知, 3 mmol/L 氨海水可有效激活栉江珧精子游泳运动, 为进一步分析栉江珧精子游泳运动特征, 本研究选择 3 mmol/L 氨海水作为栉江珧新鲜精子最优激活液, 继而开展精子激活后游泳速度参数和鞭毛摆动频率特征的分析。

2.2.1 游泳速度变化特征 栉江珧新鲜精子经

3 mmol/L 氨海水激活后, 游泳运动速度参数都随着激活时间的推移而呈逐步降低的趋势(图 2)。VCL 在 3 mmol/L 氨海水激活后, 3 min 内保持着较高速率 ($>56 \mu\text{m/s}$), 在第 5 分钟显著降低至 $(47.69 \pm 1.40) \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$), 在第 9 分钟显著降低至 $(40.87 \pm 1.08) \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$), 随后保持较平稳的状态。VSL 在激活后第 4 分钟由 $(17.51 \pm 1.64) \mu\text{m/s}$ 显著降低至 $(12.14 \pm 1.35) \mu\text{m/s}$

($P < 0.05$), 随后基本在 $(7.41 \pm 1.43) \sim (8.46 \pm 1.37) \mu\text{m/s}$ 之间浮动变化 ($P > 0.05$)。VAP 在激活后第 3 分钟由 $(30.37 \pm 1.32) \mu\text{m/s}$ 显著降低至 $(26.25 \pm 1.30) \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$), 在第 6 分钟时, 再次显著降低至 $(21.32 \pm 1.36) \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$), 随后, 未出现显著变化, 基本维持在 $20 \mu\text{m/s}$ 左右 ($P > 0.05$)。

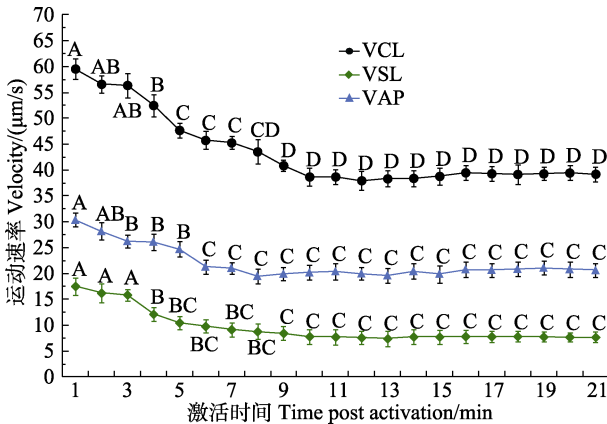


图2 经 3 mmol/L 氨海水激活后栉江珧精子运动速度参数(VCL、VSL、VAP)的变化

Fig.2 Variation of velocity parameters (VCL, VSL, VAP) of the *A. pectinata* sperm movement after activated by artificial seawater of 3 mmol/L ammonia ion

VCL: 曲线运动速率($\mu\text{m/s}$); VSL: 直线运动速率($\mu\text{m/s}$); VAP: 平均路径运动速率($\mu\text{m/s}$);

不同字母代表显著性差异($P < 0.05$), 下同。

VCL: Curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: Straight line velocity ($\mu\text{m/s}$); VAP: Average path velocity ($\mu\text{m/s}$). Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$), the same below.

2.2.2 鞭毛摆动频率变化特征 栉江珧新鲜精子经 3 mmol/L 氨海水激活后, BCF 随着激活时间的推移呈先升高后快速降低的趋势(图 3)。栉江珧精子在 3 mmol/L 氨海水中激活后, 前 4 min 的鞭毛摆动频率在 $(6.14 \pm 0.58) \sim (6.60 \pm 0.32) \text{Hz}$ 之间浮动变化 ($P > 0.05$), 在第 5 分钟显著降低至 $(4.97 \pm 0.33) \text{Hz}$ ($P < 0.05$), 随后呈持续缓慢降低的趋势。在第 10 分钟降低至 $(3.68 \pm 0.40) \text{Hz}$ 后, 基本维持在 3.3 Hz 左右。

2.3 精子激活后 ATP 含量的变化

栉江瑶精子激活后的 ATP 含量随时间的变化如图 4 所示。未经激活液处理的精子具有最高的 ATP 含量 [$(425.17 \pm 45.36) \mu\text{mol/g prot}$], 精子 ATP 含量在激活后的 5 min 内显著下降至 $(128.80 \pm 66.92) \mu\text{mol/g prot}$, 约为初始含量的 30.29% ($P < 0.05$), 并在随后略微升高, 最终稳定在 $200 \mu\text{mol/g prot}$ 左右。

2.4 精子激活后 ATP 酶活性的变化

栉江瑶精子激活后 ATP 酶活性随时间的变化如

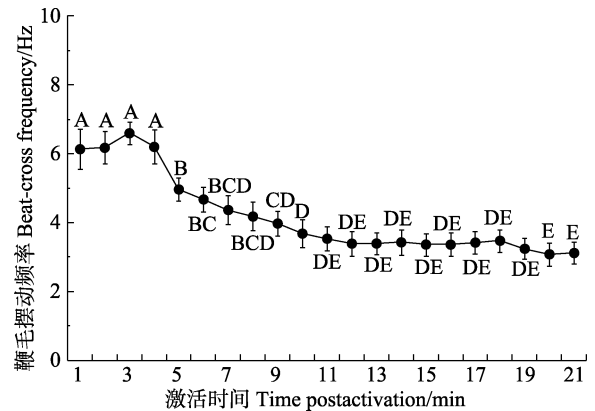


图3 经 3 mmol/L 氨海水激活后栉江珧精子鞭毛摆动频率的变化

Fig.3 Variation of beat-cross frequency (BCF) of *A. pectinata* sperm after activated by artificial seawater of 3 mmol/L ammonia ion

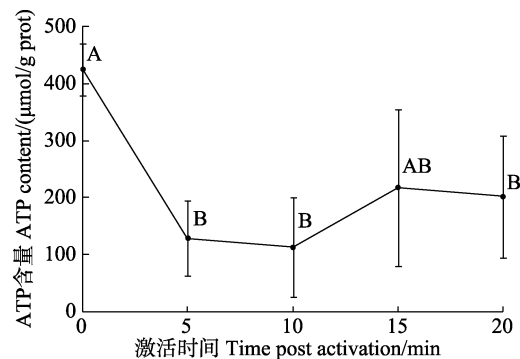


图4 精子激活后 ATP 含量随时间的变化
Fig.4 Variation of ATP content of the *A. pectinata* sperm post activation

图 5 所示。精子 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活性在前 15 min 保持稳定, 无显著差异 ($P > 0.05$), 并在 15~20 min 内显著升高 ($P < 0.05$)。精子 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性基本保持稳定, 并在激活后 15 min 内逐渐升高, 随后稍下降。其中, 栉江瑶精子 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活性较低 [$(0.62 \pm 0.03) \text{U/mg prot}$], $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶具有较高的活性 [$(6.08 \pm 0.04) \text{U/mg prot}$]。

2.5 精子激活后 SOD 活性的变化

栉江瑶精子激活后 SOD 活性变化如图 6 所示。在激活后的 15 min 内精子 SOD 活性呈逐渐下降的趋势, 并在激活 15 min 后达到最低值 [$(1.23 \pm 0.73) \text{U/mg prot}$]。随后, SOD 活性维持稳定且不再有显著性变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 海水铵离子浓度与 pH 对栉江瑶精子激活效果的影响

大多数海洋无脊椎动物精子的激活机制相对而

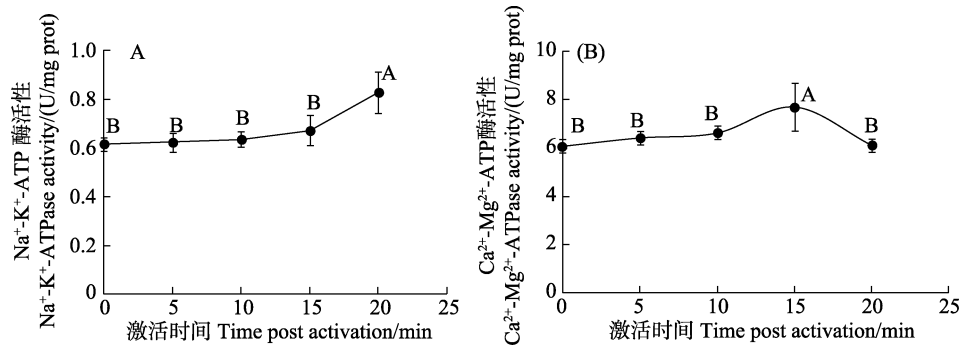


图 5 精子激活后 ATP 酶活性随时间的变化

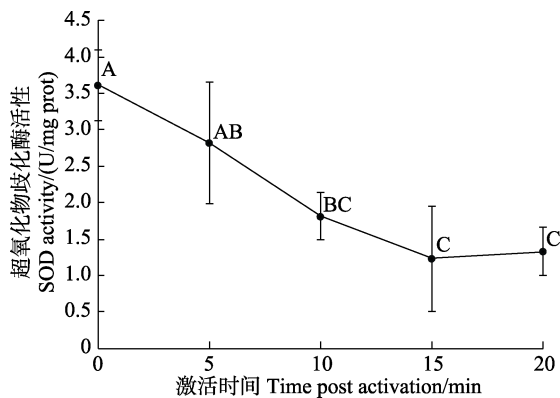
Fig. 5 Variation of ATPase activity of the *A. pectinata* sperm post activation

图 6 精子激活后 SOD 酶活性随时间的变化

Fig. 6 Variation of SOD activity of the *A. pectinata* sperm post activation

言比较保守,以体外受精方式繁殖的海洋双壳贝类精子游泳运动的调控被认为是受水环境中诸多因素共同作用的,其中,离子和 pH 起着主要作用(Boulais *et al*, 2019; Zheng *et al*, 2018)。诸多研究认为,外界水环境的 pH 偏碱化会使在水体中的游离精子细胞内的 pH 也发生碱化,从而进一步催化精子的运动;而酸性或中性介质则会抑制精子运动。在该过程中, K⁺、Na⁺等离子也会参与其中并协同发挥作用(Boulais *et al*, 2018; Christen *et al*, 1983)。牡蛎和扇贝等双壳贝类的精子可被自然海水直接激活,正是这种精子运动催化机制在发挥作用。

然而,海洋双壳贝类精子游泳运动的激活存在着物种间的差异。Boulais 等(2018)研究发现,海水盐度的变化会显著影响太平洋牡蛎精子的运动率及游泳速度;而同为广盐性生物的马氏珠母贝精子运动激活研究发现,海水的盐度变化对其精子运动能力并未直接造成显著影响(Zheng *et al*, 2020)。本研究表明,直接从性腺中剥离的栉江珧精子是未被活化的、不运动的,即使把它和新鲜自然海水混合在一起,也只有极少部分的精子呈现低迷的运动状态,且仅通过简单碱化人工海水的方式并不会明显影响其精子游泳运动,

而与之相反的是,通过铵离子碱化人工海水的方式可有效触发栉江珧精子的游泳运动。在马氏珠母贝(Zheng *et al*, 2020)和皱纹盘鲍(*Haliotis discus*) (蒋玉荣等, 2017)精子游泳运动的相关研究中也得到海水中铵离子的存在可有效激发精子发生强烈游泳运动的结论。这意味着栉江珧和马氏珠母贝等物种的精子在体外激活过程中,可能存在一套与牡蛎和扇贝等不一样的精子激活机制,精子在海水中无法得到直接激活,还需要铵离子等其他条件的额外刺激。氨水、NaOH 和 KOH 在以往的精子相关研究中主要是作为碱化水体的媒介,即起到提高水体 pH 的作用(Alavi *et al*, 2014; Christen *et al*, 1983; Wada, 1961),因此,这些研究的关注点主要还是在水体的 pH 变化,而其他离子的作用则往往被忽略。本研究表明,水体 pH 的碱化并不是触发和催化栉江珧精子运动的关键因素,而铵离子的存在则可能是催化栉江珧精子发生游泳运动的关键原因。此外,本研究认为,3 mmol/L 的氨海水对栉江珧精子具有较好的激活效果,可获得较高的精子运动率。

3.2 精子游泳运动特征分析

精子运动能力对体外人工授精成功率是至关重要的,精子必须要有足够的运动能力到达卵子表面并进入卵子完成受精作用(Billard, 1983; Pandey *et al*, 2017)。精子游泳运动的相关速度是精子运动能力的典型特征,近年来,越来越多的学者加强了对精子游泳速度的研究(De Los Angeles *et al*, 2018; Demoy-Schneider *et al*, 2012; Zheng *et al*, 2018),这使得对精子运动能力的评价更为全面和客观。本研究表明,海水中的铵离子可有效提高栉江珧精子游泳运动的相关速度,而高速的精子运动能力有可能提高受精成功率。此外,较高的游泳运动速度及相对较长的运动持续时间的特性可使繁殖亲本减少近距离配对的麻烦,可以保证未和精子同时排放的卵子也有机会成功受

精,这可被认为是其在自然界中繁殖策略的表现形式之一(Demoy-Schneider *et al*, 2012; Pandey *et al*, 2017)。

精子鞭毛的摆动频率是评价精子鞭毛运动的一个典型参数,精子细胞通过线粒体合成 ATP,为鞭毛运动提供能量(Gagnon *et al*, 2006)。鞭毛摆动频率越高,间接代表着精子细胞鞭毛结构及功能越完整,精子细胞线粒体能量的产生越稳定(Murphy *et al*, 2018)。近年来,精子鞭毛的运动特点也受到了研究者的关注,因为鞭毛运动可以在一定程度上对精子的运动轨迹进行定量描述。在水生动物精子鞭毛的研究中,海胆(*Paracentrotus lividus*)精子鞭毛的研究较为广泛,相关研究表明,海胆鞭毛的摆动频率为 36 Hz 左右(Fabrocini *et al*, 2017; Gibbons, 1986; Gray, 1955)。本研究表明,栉江珧精子激活后鞭毛摆动频率约为 6 Hz,这可为栉江珧精子运动学的后续研究提供一定的理论基础。

3.3 精子能量代谢特征分析

精子需要消耗大量的 ATP 以维持其高速游泳运动,精子的 ATP 初始含量常被认为与其受精潜力密切相关(Kommissrud *et al*, 2020)。在包括鱼类和海胆在内的大多数海洋生物中,精子的 ATP 含量控制着精子的运动时间,精子运动会因 ATP 的耗尽而停止(Cosson *et al*, 2008; Kommissrud *et al*, 2020)。其中,海洋鱼类的精子运动时间相对较短,通常在 30 s~20 min 之间(Boulais *et al*, 2019; Dzyuba *et al*, 2017);而海洋双壳贝类的精子运动时间可长达数小时(Alavi *et al*, 2014; Suquet *et al*, 2013)。本研究中,栉江瑶精子的 ATP 含量在激活后的前 15 min 持续下降,在这一过程中,约有 70%的存储 ATP 被消耗。表明在栉江瑶精子运动初期,其 ATP 合成速率较低,ATP 消耗速率高于 ATP 合成速率。随后,其 ATP 合成速率逐渐升高,并与 ATP 消耗速率相平衡,以保持 ATP 含量趋于稳定。诸多研究表明,精子在性腺内可预先储存部分 ATP,用于精子运动初期的迅速消耗(Boulais *et al*, 2015; Fedorov *et al*, 2015)。Boulais 等(2015)研究表明,精子运动初期 ATP 含量的持续下降触发了相应的调控机制,促使精子加强产能作用以平衡运动阶段的能量消耗。

精子鞭毛轴丝的微管呈“9+2”形式排列,微管上存在大量的动力蛋白,动力蛋白通过消耗 ATP 产生力与运动来调节鞭毛的摆动频率、振幅和波形,进而调控精子的游泳运动(Bondarenko *et al*, 2019)。动力蛋白的活性在酸性条件下受抑制(pH<7.2),并受细胞内 Na⁺、K⁺和 Ca²⁺等离子浓度变化的影响,精子的胞内

碱化与离子浓度的动态调控对精子运动的激活与延续至关重要(Boulais, 2019)。Na⁺-K⁺-ATP 酶与 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶是精子细胞膜与细胞器膜上重要的蛋白酶,其通过调节细胞内 Na⁺、K⁺和 Ca²⁺等离子的浓度来调控精子的能量代谢过程,并在维持细胞内稳态、细胞膜电化学梯度、细胞器功能完整等方面具有关键作用,常被作为评定细胞代谢是否紊乱的重要指标(Bradley *et al*, 1980; Jimenez *et al*, 2012)。当 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性受抑制时,会导致精子运动的中止(Woo *et al*, 2000),当 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性降低时,易造成细胞内 Ca²⁺浓度过高,导致线粒体功能受损(Boulais *et al*, 2019)。本研究中,栉江瑶精子的 Na⁺-K⁺-ATP 酶与 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性基本保持不变,这表明精子在运动过程中可维持良好的细胞内稳态,并通过稳定的代谢途径来保证持续性运动(Medrano *et al*, 2006)。

精子通过糖酵解与氧化磷酸化合成 ATP,其中氧化磷酸化是精子在运动过程中的主要产能途径(Boulais *et al*, 2019)。许多研究表明,精子持续产能的过程会引发细胞内活性氧(ROS)的过度累积,致使精子处于氧化应激状态(Chianese *et al*, 2021; Guthrie *et al*, 2012)。精子作为高度特化的细胞,其细胞膜内含有大量的多不饱和脂肪酸。当精子细胞内的活性氧含量过高时,会造成精子细胞膜脂质的过氧化,导致离子通道活性下降与线粒体功能受损,致使无法产生 ATP(Correa *et al*, 2018; Guthrie *et al*, 2012)。本研究发现,栉江瑶精子的抗氧化酶活性在其激活后的 15 min 内逐渐降低。抗氧化能力的降低表明,栉江瑶精子有处于氧化应激状态的风险(Li *et al*, 2023),进一步导致的线粒体受损或许是因为 ATP 含量在激活后无法继续维持较高水平。

4 结论

本研究表明,简单提高海水 pH 对栉江瑶精子活化效果不明显,铵离子对精子运动的触发具有重要的促进作用。其中,3 mmol/L 氨海水对栉江珧人工剥离获得的精子具有较佳的激活效果,可使精子获得较高的运动率和游泳运动速度。栉江瑶精子在运动阶段初期伴有大量的能量消耗,并在后续的运动过程中维持稳定的 ATP 含量。尽管精子的 Na⁺-K⁺-ATP 酶与 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性在激活后保持稳定,但抗氧化能力的下降或使精子有暴露于氧化应激状态的风险。

参 考 文 献

ALAVI S M H, MATSUMURA N, SHIBA K, *et al*. Roles of

- extracellular ions and pH in 5-HT-induced sperm motility in marine bivalve. *Reproduction*, 2014, 147(3): 331–345
- ARITA K, ISOWA K, ISHIKAWA T, *et al.* Effects of cooling rate on post-thaw motility and fertility of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* spermatozoa. *Fisheries Science*, 2012, 78(3): 625–630
- AWAJI M, MATSUMOTO T, FUNAYAMA S, *et al.* Artificial fertilisation method for the production of pen shell *Atrina pectinata* juveniles in hatcheries. *Aquaculture*, 2022, 553: 738101
- AWAJI M, MATSUMOTO T, OJIMA D, *et al.* Oocyte maturation and active motility of spermatozoa are triggered by retinoic acid in pen shell *Atrina pectinata*. *Fisheries Science*, 2018, 84(3): 535–551
- BEIRÃO J, BOULAIS M, GALLEGÓ V, *et al.* Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology*, 2019, 133: 161–178
- BILLARD R. Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep-freezing. *Cell and Tissue Research*, 1983, 228(2): 205–218
- BONDARENKO V, COSSON J. Structure and beating behavior of the sperm motility apparatus in aquatic animals. *Theriogenology*, 2019, 135: 152–163
- BOULAIS M, DEMOY-SCHNEIDER M, ALAVI S M H, *et al.* Spermatozoa motility in bivalves signaling, flagellar beating behavior, and energetics. *Theriogenology*, 2019, 136: 15–27
- BOULAIS M, MARC S, ARSENAULT-PERNET E J, *et al.* pH controls spermatozoa motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*, 2018, 7(3): bio031427
- BOULAIS M, SOUDANT P, LE GOÏC N, *et al.* Involvement of mitochondrial activity and OXPHOS in ATP synthesis during the motility phase of spermatozoa in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biology of Reproduction*, 2015, 93(5): 118
- BRADLEY M P, FORRESTER I T. A $[Ca^{2+}+Mg^{2+}]$ -ATPase and active Ca^{2+} transport in the plasma membranes isolated from ram sperm flagella. *Cell Calcium*, 1980, 1(6): 381–390
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2022. Beijing: China Agriculture Press, 2022, 23–58 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2022, 23–58]
- CAVANAUGH G M. Formulae and methods of the marine biological chemical room. Marine Biological Laboratory: Woods Hole, 1975
- CHIANESE R, PIERANTONI R. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production alters sperm quality. *Antioxidants*, 2021, 10(1): 92
- CHRISTEN R, SCHACKMANN R W, SHAPIRO B M. Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(9): 5392–5399
- CORREA F, PAVÓN N, BUELNA-CHONTAL M, *et al.* Calcium induces mitochondrial oxidative stress because of its binding to adenine nucleotide translocase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2018, 76(4): 445–450
- COSSON J, GROISON A L, SUQUET M, *et al.* Marine fish spermatozoa: Racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, 2008, 136(3): 277–294
- DE LOS ÁNGELES P M M, JAVIER V S, ALBERTO R O D. Evaluation of sperm quality in adult white fish (*Chirostoma estor*) Jordan 1879, Mexico. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2018, 6(1): 121–126
- DEMOY-SCHNEIDER M, LEVÊQUE A, SCHMITT N, *et al.* Motility activation and metabolism characteristics of spermatozoa of the black-lip-pearl oyster *Pinctada margaritifera* var: *cumingii* (Jameson, 1901). *Theriogenology*, 2012, 77(1): 53–64
- DZYUBA B, BONDARENKO O, FEDOROV P, *et al.* Energetics of fish spermatozoa: The proven and the possible. *Aquaculture*, 2017, 472: 60–72
- FABBROCINI A, D'ADAMO R. Motility of sea urchin *Paracentrotus Lividus* spermatozoa in the post-activation phase. *Aquaculture Research*, 2017, 48(11): 5526–5532
- FEDOROV P, DZYUBA B, FEDOROVA G, *et al.* Quantification of adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, and creatine phosphate in sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa during maturation. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(11): 5214–5221
- GAGNON C, DE LAMIRANDE E. Controls of sperm motility. In: DE JONGE C J, BARRATT C L R. The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration. New York: Cambridge University Press, 2006, 108–132
- GIBBONS I R. Transient flagellar waveforms in reactivated sea urchin sperm. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 1986, 7(3): 245–250
- GRAY J. The movement of sea-urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 1955, 32(4): 775–801
- GUTHRIE H D, WELCH G R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 2012, 78(8): 1700–1708
- JIANG Y R, LI X, QIN Y J, *et al.* Activation and cryopreservation of spermatozoa in *Haliotis discus*. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2017, 30(4): 348–351 [蒋玉荣, 李霞, 秦艳杰, 等. 皱纹盘鲍精子的激活及超低温保存研究. 烟台大学学报(自然科学与工程), 2017, 30(4): 348–351]
- JIMENEZ T, SÁNCHEZ G, BLANCO G. Activity of the Na, K-ATPase $\alpha 4$ isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. *Journal of Andrology*, 2012, 33(5): 1047–1057
- KOMMISRUUD E, MYROMSLIEN F D, STENSETH E B. Viability, motility, ATP content and fertilizing potential of sperm from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in milt stored before cryopreservation. *Theriogenology*, 2020, 151: 58–65

- LI J Z, DONG C F, WU H Y, *et al.* Transcriptomic analysis and stress response of *Chlamys farreri* to paralytic shellfish toxins. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(6): 166–176 [李谨祯, 董晨帆, 吴海燕, 等. 栉孔扇贝对麻痹性贝类毒素的生理响应及转录组分析. *渔业科学进展*, 2023, 44(6): 166–176]
- LEE Y, CHOI K, LEE D, *et al.* The role of the adductor muscle as an energy storage organ in the pen shell *Atrina japonica* (Reeve, 1858). *Journal of Molluscan Studies*, 2015, 81(4): 502–511
- MEDRANO A, FERNÁNDEZ NOVELL J M, RAMÍO L, *et al.* Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2006, 73(3): 369–378
- MURPHY E M, O'MEARA C, EIVERS B, *et al.* Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on *in vitro* sperm kinematics and *in vivo* fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 2018, 191: 70–75
- PANDEY D, RYU Y W, MATSUBARA T. Features of sperm motility and circadian rhythm in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*). *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2017, 8(2): 203
- QIU T L, ZHANG T, BAI Y C, *et al.* Gonad development of the pen shell *Atrina pectinata* from Shandong Province, China. *Journal of Shellfish Research*, 2014, 33(2): 465–471
- RURANGWA E, KIME D E, OLLEVIER F, *et al.* The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 2004, 234(1/2/3/4): 1–28
- SUQUET M, QUERE C, MINGANT C, *et al.* Effect of sampling location, release technique and time after activation on the movement characteristics of scallop (*Pecten maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources*, 2013, 26(3): 215–220
- WADA S K. Fertilizability of *Crassostrea* and *Pinctada* eggs as related to germinal vesicle breakdown. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 1961, 1–8
- WOO A L, JAMES P F, LINGREL J B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(27): 20693–20699
- XU S, SUN J C, LIU S L, *et al.* Progress in research on cryopreservation technology for echinoderm sperm. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(3): 26–37 [许帅, 孙景春, 刘石林, 等. 棘皮动物精子超低温冷冻保存技术研究进展. *渔业科学进展*, 2021, 42(3): 26–37]
- YU F F, YU X Y, ZHENG J, *et al.* Cryopreservation of spermatozoa in pen shell (*Atrina pectinata*) and suminoe oyster (*Crassostrea rivularis*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(2): 305–312 [于非非, 余祥勇, 郑娇, 等. 栉孔扇贝和近江牡蛎的精子超低温冷冻保存. *农业生物技术学报*, 2016, 24(2): 305–312]
- ZHENG X, DENG Z H, QIN J G, *et al.* Noble scallop, *Chlamys nobilis*, sperm motility duration in the post-activation phase. *Animal Reproduction Science*, 2018, 196: 197–204
- ZHENG X, FU Z Y, LIN S Q, *et al.* Which is the major trigger in aquatic environment for pearl oyster *Pinctada fucata martensii* sperm from gonad: Ammonia ion or pH? *Aquaculture*, 2020, 520: 734673
- ZHENG X. Sperm swimming movement characteristics and cryopreservation for *Pinctada fucata martensii* and *Chlamys nobilis*. *Doctoral Dissertation of Hainan University*, 2019 [郑兴. 马氏珠母贝和华贵栉孔扇贝精子的游泳运动学特征及超低温保存技术研究. 海南大学博士研究生学位论文, 2019]
- ZHOU L Q, YANG A G, LIU Z H, *et al.* Fertilization biology of eggs and sperms in two scallop species, *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 75–81 [周丽青, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 扇贝精子及卵子的受精生物学特征. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 75–81]

(编辑 马璀璨)

Comparing the Effects of Ammonia Ion Concentration and pH on *Atrina Pectinata* Sperm Activation in Artificial Seawater

QIU Dagan¹, LAN Shuaiqin¹, CHEN Yu¹, MAO Jing¹, ZANG Zhan¹, VASQUEZ Hebert Ely^{1,2,3},
YU Feng^{1,2}, WANG Aimin^{1,3}, ZHENG Xing^{1,2,3}⊙, GU Zhifeng^{1,2,3}⊙

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya 57200, China; 3. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract Pen shell (*Atrina pectinata*) is a Bivalvia species with high commercial value in China.

⊙ Corresponding author: ZHENG Xing, E-mail: zhengxing_edu@163.com; GU Zhifeng, E-mail: guzhifeng@hainanu.edu.cn

However, large scale production is difficult owing to the lack of seed. Pen shell uses external fertilization with sperm stored in the testis in a nonmotile state. Sperm motility is initiated when they are released from the reproductive tract into the aquatic environment, which enables fertilization. Various chemical signals including pH, ions, and cyclic nucleotides control sperm motility. However, there are interspecific differences in activation conditions between different Bivalvia species. Screening out an effective activating medium is the basis of artificial breeding technology.

Swimming parameters, such as total motile sperm (TM), movement velocity, and beat-cross frequency (BCF) are common indicators to evaluate sperm quality. Sperm must have sufficient motility to reach the egg to complete fertilization. In addition, sperm needs a large amount of ATP to maintain its swimming movement. Intracellular ATP content controls the duration of the sperm movement phase in most marine species. Studying the movement characteristics and energy metabolism of sperm during activation will help develop and optimize artificial breeding technology. Studies of *A. pectinata* mainly focus on their oocytes. However, the activation conditions, moving characteristics, and energy metabolism of sperm during activation remains unknown. Thus, there is an urgent need to screen appropriate media and study the activation mechanisms of *A. pectinata* sperm.

Adult *A. pectinata* were collected from Wuzhizhou Island, Hainan Province in November 2021. Artificial seawater with different levels of ammonia ions and pH were used to activate sperm. This study examined *A. pectinata* sperm activation in artificial seawater by varying the ammonia ion concentration and pH. The change in sperm motility, curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), and BCF were described. The ATP content, ATPase activities, and superoxide dismutase (SOD) activity were quantitatively recorded during the full activated stage. The motility was slightly improved by increasing the pH of seawater, but could not achieve the fully activated stage. Furthermore, the motility was significantly improved when activated by alkalized seawater containing ammonia ions, and the best results were observed in groups containing 3 mmol/L ammonia ion: The sperm motility index (MI) was in the fully activated stage ($MI \geq 4$) until the end of the experiment, with $TM \geq 80\%$, $VCL > 56 \mu\text{m/s}$, $VSL > 17 \mu\text{m/s}$, $VAP > 30 \mu\text{m/s}$, and $BCF > 6 \text{ Hz}$. Sperm ATP content decreased to 30.29% of their initial values [$(128.80 \pm 66.92) \mu\text{mol/g prot}$] during 5 min post activation and was maintained at this level during post-activation. ATPase activities were maintained at a constant level. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity was lower [$(0.62 \pm 0.03) \text{ U/mg prot}$] compared to $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ activity [$(6.08 \pm 0.04) \text{ U/mg prot}$]. The SOD activity of sperm steadily decreased to [$(1.23 \pm 0.73) \text{ U/mg prot}$] during 15 min post activation and remained stable.

In conclusion, pH was not the decisive factor in pen shell sperm motility. Instead, ammonium ion promoted sperm activation. There was a significant decrease in sperm ATP concentration ($P < 0.05$) at the beginning of the post-activation stage and the ATP concentration followed by stabilization at a lower level. The reduction in SOD activity may cause oxidative stress. The findings in this study can be instructive to conduct further research on sperm activation mechanisms, and help develop artificial breeding technology for *A. pectinata*.

Key words *Atrina pectinata*; Sperm; Motility; Ammonia ion; pH; Energy metabolism

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230129001

http://www.yykxjz.cn/

杨金龙, 于相冰, 胡晓梦, 贺楚晗, 梁箫. 人工鱼礁表面分离细菌形成单一生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 224–234

YANG J L, YU X B, HU X M, HE C H, LIANG X. The effect of mono-species bacterial biofilms formed on the surface of artificial reef on settlement of plantigrades in *Mytilus coruscus*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 224–234

人工鱼礁表面分离细菌形成单一生物被膜 对厚壳贻贝稚贝附着的影响*

杨金龙^{1,2,3①} 于相冰^{1,2} 胡晓梦^{1,2} 贺楚晗^{1,2} 梁箫^{1,2}

(1. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306; 2. 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心 上海 201306; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) 广东 广州 511458)

摘要 为探讨存在于人工鱼礁表面的海洋细菌与贝类附着之间的互作关系,本研究从自然海域中的人工鱼礁表面上分离了 9 株海洋细菌,并分别构建单一细菌生物被膜,探索不同细菌种属形成的生物被膜特性与厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)稚贝附着之间的关系。结果显示,9 株人工鱼礁表面细菌形成的生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性存在显著差异,其中, *Mesoflavibacter* sp.2 对稚贝附着的诱导活性最高, *Phaeobacter* sp.2 的诱导活性最低。 *Sutcliffiella* sp.1 和 *Jeotgalibacillus* sp.1 的细菌密度与诱导活性呈显著正相关, *Cytobacillus* sp.1 和 *Phaeobacter* sp.2 的细菌密度与诱导活性呈显著负相关。通过比较分析 *Mesoflavibacter* sp.2 和 *Phaeobacter* sp.2 生物被膜的蛋白质及多糖含量发现,生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性与多糖含量呈显著负相关,与蛋白质含量呈正相关。本研究初步探索了人工鱼礁表面细菌形成的生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响,为后续在自然海区进一步解析人工鱼礁表面生物被膜与海洋无脊椎动物附着的互作关系具有重要理论研究意义,同时,对于人工鱼礁表面海洋生物附着机制的研究具有重要的实践价值。

关键词 人工鱼礁; 厚壳贻贝; 稚贝; 附着; 生物被膜

中图分类号 S968.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0224-11

海洋向人类提供了丰富的优质蛋白,被誉为“蓝色粮仓”。近 40 年来,我国将开发利用海洋渔业资源作为一项发展重点,其中,以海水养殖为主要发展对象,带动了海藻、海洋虾类、海洋贝类、海洋鱼类和海珍品等养殖产业的浪潮,使我国的养殖总产量自 20 世纪 90 年代以来一直稳居世界首位(杨金龙等, 2004)。而今,局部水域环境遭受污染、养殖过程各环节中病害加重等因素导致海产品的质与量均无法得到有力保障,且传统的海水养殖模式已难以适应我

国对健康发展海洋渔业及其相关生态环境的要求。因而,除浅海网箱养殖向多营养层次综合养殖转变、深远海大型围栏不断优化构建智能化生态养殖模式等一系列海洋渔业产业升级外,海洋牧场作为我国海洋渔业发展的重要方向之一,如何进一步提升其功效受到广泛关注(杨金龙等, 2004; 杨红生, 2016; 吴文广等, 2022; 宋炜等, 2022)。

海洋牧场通常指资源增殖,主要通过增殖放流和人工鱼礁取得增殖效益,其目标是增加生物

* 国家重点研发计划(2020YFD0900804)、上海市优秀学术带头人计划(20XD1421800)、南方海洋科学与工程广东省实验室人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)和国家自然科学基金项目(41876159)共同资助。

① 通信作者: 杨金龙, 教授, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

收稿日期: 2023-01-29, 收修改稿日期: 2023-02-19

量、恢复资源和修复海洋生态系统(唐启升, 2019)。海洋牧场是一种以环境和生态和谐为目的导向的海洋渔业经济新业态, 其中, 人工鱼礁是指将人工构造物有目的地投放于海底, 用以改善海域生态环境的人工设施, 主要功能为丰富饵料生物、聚集渔业资源(Seaman, 2000; Manoudis *et al.*, 2005; 唐启升, 2019; 索安宁等, 2022)。人工鱼礁的投放能改变礁体周围几百米海域的水环境状况(Wilding *et al.*, 2002), 包括对营养盐的循环及传输的影响(Alongi *et al.*, 2008; 林军等, 2006), 对沉积物生物化学变化的影响(Falcao *et al.*, 2007)。与此同时, 人工鱼礁也能为海洋生物提供良好的栖息环境(Henderson *et al.*, 2014)。

人工鱼礁投放后, 可以作为一种附着基, 诱集周边生物逐渐附着在其表面。而附着的生物通常可作为礁区栖息鱼类和其他大型生物的主要饵料来源, 因此, 礁体表面附着生物的丰富度和多样性越高, 能够诱集的生物数量就越多, 种类也更加丰富。礁体上附着生物种类和数量的多寡是人工鱼礁生物效应的重要体现(姜昭阳等, 2019)。目前, 对人工鱼礁的研究主要集中在鱼礁材料、结构的设计及其生态效果的评估等方面。如王震等(2019)研究发现, 3种材料鱼礁中, 添加贝壳粉硅酸盐水泥的附着基上收集到的生物种类和生物量最大, 生物附着效果最好; 李真真等(2017)研究发现, 5种混凝土鱼礁中, 火山灰质硅酸盐水泥上的附着生物量最多, 粉煤灰硅酸盐水泥上的生物种类最多; 陈传曦等(2021)研究发现, 渤海莱州湾芙蓉岛人工鱼礁区浮游动物群落组成存在明显的季节差异, 但区域间无显著差异。

通常情况下, 将具有洁净表面的附着材料投放到海水中, 在其表面会迅速形成生物被膜(杨金龙等, 2013)。生物被膜在许多海洋无脊椎动物幼虫的附着和变态过程中发挥着极其重要的作用。Yu 等(2010)研究表明, 自然生物被膜可以促进珍珠牡蛎(*Pinctada fucata*)的幼虫附着; Unabia 等(1999)研究发现, 华美盘管虫(*Hydroides elegans*)幼体趋向附着于附有生物被膜的表面而非洁净的表面, 且从生物被膜分离出的34株细菌中有11株成功诱导了华美盘管虫幼虫的附着。人工鱼礁投入水体后, 可作为海洋水体细菌的附着基, 在人工鱼礁表面形成生物被膜。但目前有关人工鱼礁表面细菌及其形成的生物被膜与贝类附着行为之间关系的研究鲜有报道。

本研究以我国东海重要的经济贝类厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)为对象, 利用从人工鱼礁表面分离的9株细菌分别形成生物被膜并诱导厚壳贻贝稚贝

附着, 筛选得到一株高诱导活性细菌和一株低诱导活性细菌, 对比分析这2株细菌形成单一细菌被膜的细菌密度、蛋白质及多糖含量等生物学特性, 进一步探究不同细菌生物被膜与厚壳贻贝稚贝附着之间的关系, 以期为人造鱼礁表面生境营造技术研发、以人工鱼礁为基础的海洋生态养殖业以及海洋资源的可持续发展提供支撑。

1 材料与方 法

1.1 人工鱼礁海区投放与样品采集

2021年10月, 在浙江省舟山市嵊泗县枸杞乡后头湾码头贻贝养殖海区, 以坐标点(122°46' E; 30°43' N)为中心, 半径50 m的范围里投放9个边长为30 cm的白色亚克力板-正四面体结构型人工鱼礁, 投放水深约为1 m。人工鱼礁投放后1个月在投放区域内随机选择人工鱼礁进行样品采集。用灭菌后的载玻片在拆卸后的人工鱼礁表面上随机刮取2 cm×2 cm区域的自然生物被膜至盛有20 mL灭菌过滤海水(autoclaved filtered sea water, AFSW)的小烧杯中形成悬浮液, 每个面刮取3次, 12个样品为一组。

1.2 人工鱼礁表面细菌的分离

人工鱼礁表面细菌的分离参考Bao等(2007)的方法, 将样品采集后得到的悬浮液稀释10 000倍后, 通过2216E平板培养法分离、纯化, 最终得到单一菌株。分离的海洋细菌均匀混合于保种液(0.9% NaCl, 30%甘油)中, -80℃保存。

1.3 分离细菌种属的鉴定

细菌种属的鉴定参考Li等(2014)的方法。使用细菌基因组DNA试剂盒(上海博彩生物科技有限公司)提取所分离细菌的DNA, 进行PCR扩增, 再将扩增的PCR产物送至生工生物工程(上海)进行基因测序。将获得的基因序列上传至NCBI数据库, 并进行Blast序列比对, 得到分离菌株的种、属名及序列号等相关信息。

1.4 系统发育分析

序列比对及系统发育分析参考杨金龙等(2015)的方法。使用MEGA 6.06软件进行分析, 首先将序列与其近源物种的16S rRNA序列进行比对, 再根据最大简约法(MP)、最小进化法(ME)和邻接法(NJ)3种方法来进行系统发育分析, 遗传距离的构建则使用Jukes-Cantor法。

1.5 制备单一细菌生物被膜

生物被膜的制备参考杨金龙等(2015)的方法。将此前分离纯化的不同种属人工鱼礁表面细菌分别通过 2216E 液体培养基避光扩大培养 24 h, 培养温度为 25 °C。在 1 600×g 的条件下离心 15 min 去除培养基, 并用 AFSW 清洗并重悬细菌细胞。细菌悬浮液稀释 100 倍后在 0.22 μm 滤膜上过滤, 使用 0.1% 的吡啶橙染液避光染色 5 min, 在奥林巴斯 BX51 显微镜下放大 1 000 倍, 随机选取 10 个视野计细菌密度, 再根据计数结果将所对应的细菌悬浮液适量加入到盛有灭菌玻璃片的培养皿中, 以达到实验所需的 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 和 5×10^8 cells/mL 初始细菌密度, 最后在 18 °C 下避光培养 48 h 完成生物被膜的制备。

1.6 厚壳贻贝稚贝附着实验

本实验所用的厚壳贻贝稚贝来源于浙江省嵊泗县, 由东海贻贝科技创新服务有限公司提供。所有稚贝需在实验室中避光暂养 7 d, 每隔 2 d 换水一次, 养殖在 18 °C 恒温环境下。以湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)作为喂食饵料, 每天投喂 1 次。

稚贝附着实验参考 Yang 等(2014)的方法。首先准备好灭菌的玻璃培养皿, 每个培养皿中加入 20 mL AFSW。再将表面附着有不同初始细菌密度下形成的生物被膜的玻片转移至玻璃培养皿中, 每皿中加入 10 只稚贝, 放置在 18 °C 避光条件下, 分别记录 12、24 和 48 h 的附着情况, 计算不同时间点的稚贝附着率。每株菌的 4 个初始细菌密度实验组均设置 9 个平行, 以玻璃培养皿中盛有等量 AFSW 和稚贝数的灭菌玻片作为空白对照组。

1.7 生物被膜细菌密度计数

实验方法参考 Yang 等(2013)。将制备好的生物被膜使用福尔马林溶液固定 24 h, 再用 AFSW 轻轻涮洗 3 次, 使用 0.1% 吡啶橙避光染色 5 min 后在奥林巴斯 BX51 显微镜下放大 1 000 倍, 随机选取 10 个视野计细菌密度。每组设置 3 个平行。

1.8 生物被膜蛋白含量测定

将 Tissue Protein Extraction Reagent 置于冰上预冷后, 取适量试剂按照 1 : 99 比例加入 Protease Inhibitor Cocktail 配制成 $1 \times$ 工作液。用灭菌载玻片将生物被膜刮至盛有 5 mL ddH₂O 的小烧杯中形成悬浮液, 分次加入同一个 1.5 mL 离心管中, 16 000×g 离心 1 min 后去除上清液, 得到生物被膜沉淀物。向所得沉淀物中加入 300 μL $1 \times$ 工作液, 吹打混匀 2 min,

并在冰上孵育 20 min 后 10 000×g 离心 20 min, 转移上清液至新的离心管中, 利用改良型 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒(上海生工生物工程)进行生物被膜蛋白质含量测定。每株菌设置 3 个平行组。

1.9 生物被膜多糖含量测定

多糖含量测定参考张哲等(2017)的方法。采用灭菌载玻片将 12 片玻片上的生物被膜刮至盛有 1 mL ddH₂O 的 1.5 mL 离心管中形成悬浮液, 100 °C 沸水浴加热 10 min, 13 000×g 离心 15 min, 收集上清液, 加 ddH₂O 至 2 mL 得到待测试液, 并以 2 mL 蒸馏水作为对照组。分别加入 1 mL 苯酚水溶液(5%, m/V)和 5 mL 浓硫酸, 80 °C 水浴加热反应 20 min, 冷却至室温后用分光光度计测定 485 nm 处的吸光度, 每株菌设置 3 个平行组。

1.10 卡尔科弗卢尔定量分析纤维素含量

纤维素含量测定参照 Zeng 等(2015)的方法。使用 2216E 液体培养基培养 24 h 的菌液, 稀释至 OD_{600 nm} 为 1.5, 加入 15 μg/mL 的卡尔科弗卢尔, 在 30 °C 条件下震荡混匀 2 h, 并以未加入菌液的卡尔科弗卢尔作为阳性对照。在 13 000×g 条件下离心 15 min 后, 在 350 nm 处测定吸光度, 每株菌设置 3 个平行组。

1.11 数据处理

人工鱼礁表面细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性通过稚贝附着率来反映。通过 JMP 软件进行数据的统计分析。细菌诱导活性与细菌密度之间的相关性通过 JMP 中的 Spearman 多元分析法进行分析, $P < 0.05$ 时则认为有显著性差异。

2 结果

2.1 人工鱼礁表面细菌的测序结果

本实验分离鉴定得到的 9 株人工鱼礁表面细菌中, *Mesoflavibacter* sp.2 属于拟杆菌门(Bacteroidetes), *Pseudoalteromonas* sp.31、*Pseudoalteromonas* sp.32、*Vibrio* sp.22 和 *Phaeobacter* sp.2 同属于变形菌门(Proteobacteria), *Exiguobacterium* sp.1、*Sutcliffiella* sp.1、*Cytobacillus* sp.1 和 *Jeotgalibacillus* sp.1 同属于厚壁菌门(Firmicutes), 细菌具体的种、属名及序列号见表 1。

2.2 人工鱼礁表面细菌对厚壳贻贝稚贝的诱导活性

本实验中的 9 株细菌在所有实验时间内对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性趋势基本相同, 因此, 仅展示 48 h 时的附着率(图 1)。结果显示, 9 株人工鱼礁

表 1 人工鱼礁表面细菌测序结果

Tab.1 Sequencing results of bacteria on the surface of artificial reefs

| 比对菌株 Comparison strain | 比对应序列号 Matching sequence number | 测试菌株 Test strain | 上传序列号 Upload serial number | 相似度 Similarity/% |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>Mesoflavibacter</i> sp.2 | OP740538 | ECSMB21121 | NR134082 | 99 |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp.31 | OP740539 | ECSMB21122 | MN746173 | 91 |
| <i>Exiguobacterium</i> sp.1 | OP740540 | ECSMB21123 | NR043005 | 99 |
| <i>Sutcliffiella</i> sp.1 | OP740541 | ECSMB21124 | NR040852 | 99 |
| <i>Cytobacillus</i> sp.1 | OP740542 | ECSMB21125 | NR112635 | 99 |
| <i>Vibrio</i> sp.22 | OP740543 | ECSMB21126 | NR036929 | 98 |
| <i>Jeotgalibacillus</i> sp.1 | OP740544 | ECSMB21127 | NR114573 | 97 |
| <i>Phaeobacter</i> sp.2 | OP740545 | ECSMB21128 | NR042673 | 99 |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp.32 | OP740546 | ECSMB21129 | NR114547 | 99 |

表面细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性存在显著差异, 其中, *Mesoflavibacter* sp.2 诱导活性最高, 在 5×10^8 CFU/mL 时, 稚贝附着率达 63.33%, 而 *Phaeobacter* sp.2 诱导活性最低, 在 5×10^8 CFU/mL 时, 稚贝附着率仅有 10%。

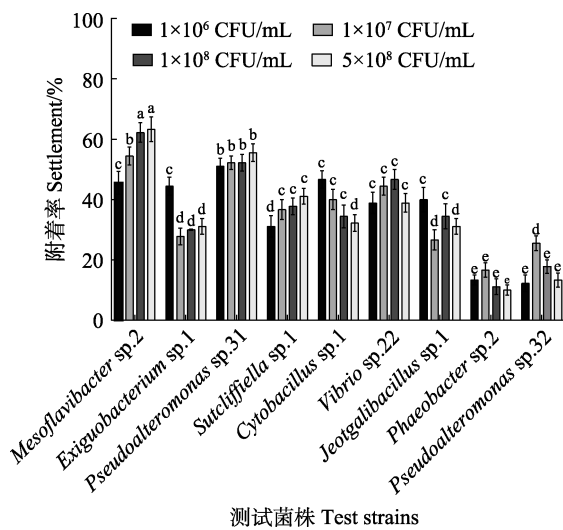


图 1 人工鱼礁表面细菌生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导率

Fig.1 Inducing activity of *M. coruscus* plantigrade settlement on the different bacterial biofilm on the surface of artificial reefs

不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。下同。

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

2.3 单一细菌生物被膜的细菌密度与诱导活性之间的相关性分析

本实验中的 9 株细菌在初始细菌密度不同的情况下, 最终其生物被膜的细菌密度也呈现出不同的变化趋势。如图 2 所示, 在 5×10^8 CFU/mL 初始细菌密

度下, 9 株细菌的细菌密度均达到最高。同时, 9 株细菌中 *Pseudoalteromonas* sp.32 形成的生物被膜细菌密度最高, 和其他 8 株细菌相比均有显著差异 ($P < 0.05$), *Mesoflavibacter* sp.2 和 *Sutcliffiella* sp.1 形成的生物被膜细菌密度最低。

本实验中的 9 株细菌的细菌密度与诱导活性之间的相关性分析结果如表 2 所示。 *Sutcliffiella* sp.1 和 *Jeotgalibacillus* sp.1 的细菌密度与诱导活性呈显著正相关, *Cytobacillus* sp.1 和 *Phaeobacter* sp.2 的细菌密度与诱导活性呈显著负相关 ($P < 0.05$)。

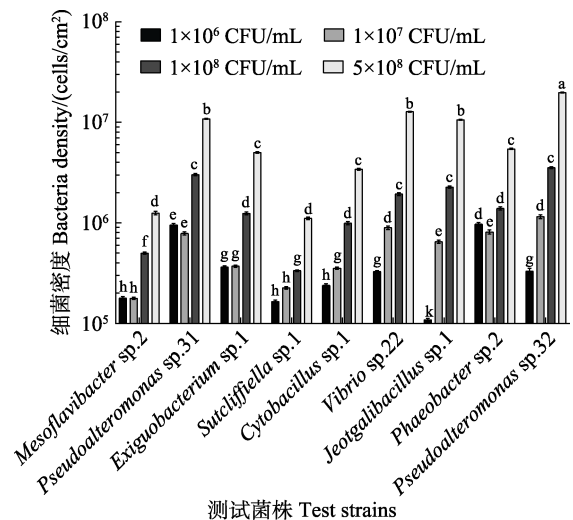


图 2 人工鱼礁表面细菌生物被膜的细菌密度

Fig.2 Bacteria density of different bacterial biofilm on the surface of artificial reefs

2.4 系统发育分析

通过 3 种方法进行人工鱼礁表面细菌的系统发育所得到的结果一致, 本研究展示以邻接法的分析结果(图 3)。表 3 为本研究所用细菌的遗传距离。结果显示, 同属于假交替单胞菌属的 *Pseudoalteromonas*

sp.31 与 *Pseudoalteromonas* sp.32 之间遗传距离为 0.027 9, 是所有人工鱼礁表面分离得到的细菌中遗传距离最近的; *Mesoflavibacter* sp.2 与 *Jeotgalibacillus* sp.1 的遗传距离为 0.414 6, 是所有人工鱼礁表面细菌中遗传距离最远的。上述 2 株细菌聚为一支后与 *Jeotgalibacillus* sp.1 和 *Exiguobacterium* sp.1 聚为一支。这一分支再与 *Phaeobacter* sp.2 聚为一支, 之后与同属于变形菌门的 *Pseudoalteromonas* sp.31、*Pseudoalteromonas* sp.32 和 *Vibrio* sp.22 聚为另一分支, 最后再和属于拟杆菌门的 *Mesoflavibacter* sp.2 聚类。

2.5 不同菌株生物被膜蛋白质及多糖含量比较

低诱导活性细菌 *Phaeobacter* sp.2 形成的生物被膜多糖含量要显著高于高诱导活性细菌 *Mesoflavibacter* sp.2 ($P<0.05$), 提高了近 5 倍(图 4a)。*Phaeobacter* sp.2 形成的生物被膜所含蛋白质总量显著低于 *Mesoflavibacter* sp.2 ($P<0.05$), 相比之下降低了 57.79% (图 4b)。通过分析蛋白质、多糖含量与其

诱导活性的相关性发现(表 4), 多糖与稚贝的诱导活性呈显著负相关($P<0.05$), 而蛋白质与对稚贝的诱导活性呈正相关性($P<0.05$)。

表 2 人工鱼礁表面细菌生物被膜细菌密度与诱导活性之间的相关性

| 测试菌株 Test strains | r | P |
|--------------------------------|----------|-----------|
| <i>Mesoflavibacter</i> sp.2 | 0.745 3 | 0.2 |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp.31 | -0.260 8 | 0.6 |
| <i>Exiguobacterium</i> sp.1 | 0.983 6 | 0.051 3 |
| <i>Sutcliffiella</i> sp.1 | 0.800 7 | <0.000 1* |
| <i>Cytobacillus</i> sp.1 | -0.773 2 | <0.000 1* |
| <i>Vibrio</i> sp.22 | -0.472 6 | 0.894 6 |
| <i>Jeotgalibacillus</i> sp.1 | 0.908 7 | <0.000 1* |
| <i>Phaeobacter</i> sp.2 | -0.706 3 | <0.000 1* |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp.32 | -0.403 1 | 0.8 |

注: *表示存在显著性差异($P<0.05$)。下同。

Note: * indicates significant differences ($P<0.05$). The same below.

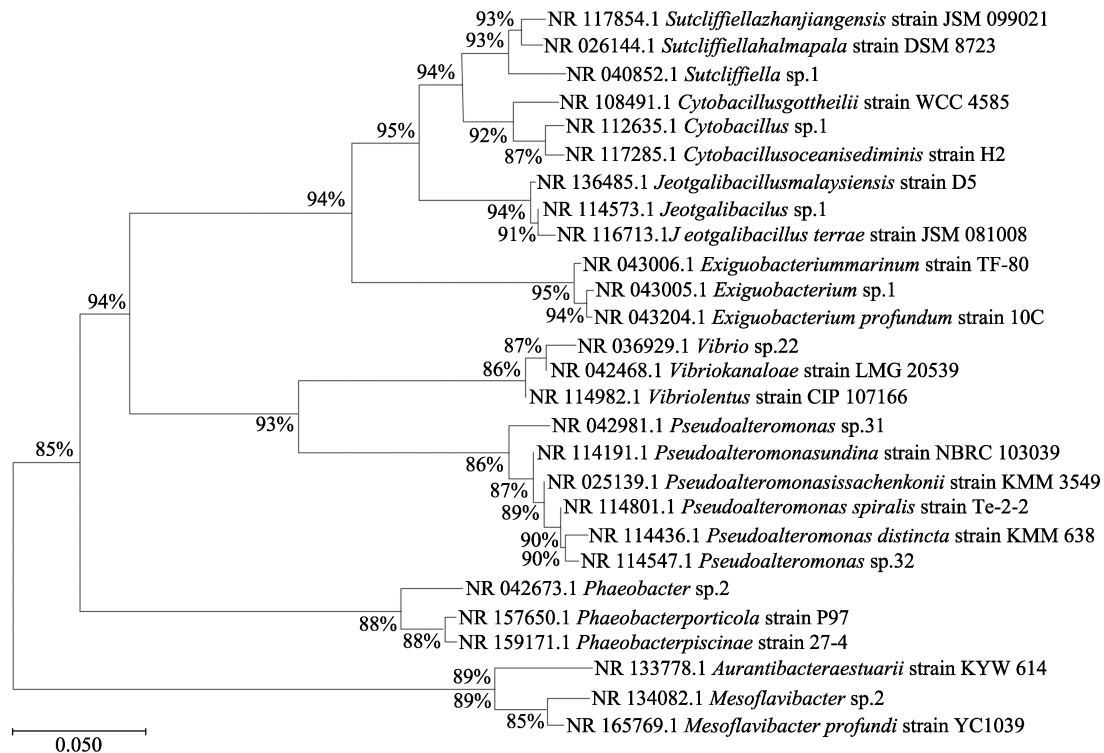


图 3 本研究中人工鱼礁表面细菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of bacteria on the surface of artificial reefs in this study

2.6 纤维素含量分析

通过卡尔科弗卢尔试剂对高诱导活性细菌 *Mesoflavibacter* sp.2 和低诱导活性细菌 *Phaeobacter*

sp.2 进行荧光增白, 发现生物被膜多糖含量较高的细菌 *Phaeobacter* sp.2 含有的纤维素含量也更高, 相较于 *Mesoflavibacter* sp.2 菌株, 其纤维素含量增加 3.07 倍(图 5) ($P<0.05$)。

表 3 本研究中人工鱼礁表面细菌的遗传距离

Tab.3 Genetic distance of bacteria on the surface of artificial reefs in this study

| | ECSMB 21121 | ECSMB 21122 | ECSMB 21123 | ECSMB 21124 | ECSMB 21125 | ECSMB 21126 | ECSMB 21127 | ECSMB 21128 | ECSMB 21129 |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ECSMB21121 | | | | | | | | | |
| ECSMB21122 | 0.401 6 | | | | | | | | |
| ECSMB21123 | 0.413 0 | 0.346 1 | | | | | | | |
| ECSMB21124 | 0.407 3 | 0.333 3 | 0.156 2 | | | | | | |
| ECSMB21125 | 0.411 3 | 0.330 8 | 0.148 0 | 0.076 4 | | | | | |
| ECSMB21126 | 0.400 5 | 0.165 4 | 0.344 2 | 0.335 7 | 0.351 9 | | | | |
| ECSMB21127 | 0.414 6 | 0.331 6 | 0.166 7 | 0.107 2 | 0.090 7 | 0.359 3 | | | |
| ECSMB21128 | 0.382 1 | 0.308 5 | 0.313 6 | 0.318 4 | 0.323 2 | 0.309 4 | 0.322 6 | | |
| ECSMB21129 | 0.384 8 | 0.027 9 | 0.347 5 | 0.327 0 | 0.326 8 | 0.167 8 | 0.324 5 | 0.296 8 | |

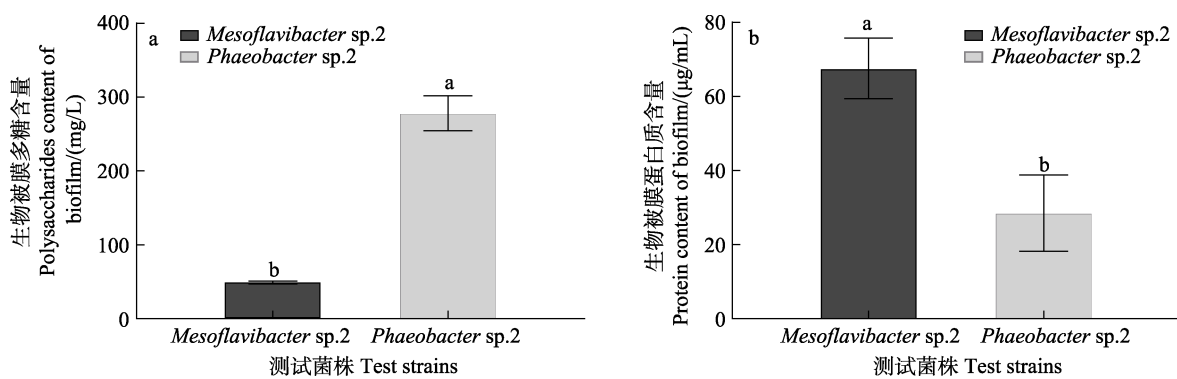


图 4 生物被膜蛋白质及多糖含量分析

Fig.4 Content analysis of proteins and polysaccharides in biofilms

表 4 生物被膜蛋白质及多糖含量与稚贝诱导活性的相关性分析

Tab.4 Correlation analysis of proteins and polysaccharides in biofilms and inducing activity of *M. coruscus* plantigrade settlement

| 项目 Item | 蛋白质 Protein | | 多糖 Polysaccharide | |
|----------------|-------------|-----------|-------------------|-----------|
| | r | P | r | P |
| 附着率 Settlement | 0.891 | <0.000 1* | -0.878 | <0.000 1* |

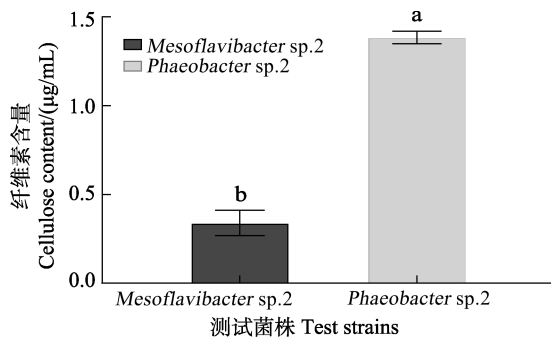


图 5 纤维素含量比较

Fig.5 Comparison of cellulose content

3 讨论

本研究中,从人工鱼礁表面分离的 9 株海洋细菌

分别属于 *Mesoflavibacter*、*Pseudoalteromonas*、*Exiguobacterium*、*Sutcliffeiella*、*Cytobacillus*、*Vibrio*、*Jeotgalibacillus* 和 *Phaeobacter* 等 8 个菌属,其中, *Mesoflavibacter*、*Pseudoalteromonas*、*Vibrio* 和 *Phaeobacter* 菌属在以往的厚壳贻贝肠道细菌相关研究中同样存在(徐嘉康等, 2021; 杨娜等, 2017)。9 株细菌形成的单一细菌生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性不同,且同一菌属的不同菌种之间诱导活性也不同,这说明单一细菌生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性与细菌菌种无关,此前的研究也证实了这一点(Yang *et al*, 2013; Li *et al*, 2014; 杨金龙等, 2015)。

以往研究表明,细菌密度作为生物被膜的生物学特性之一,与海洋无脊椎动物的附着过程息息相关。孙俊杰等(2015)研究表明,从硅烷基化的附着基表面获取的 9 株测试菌株中,有 7 株海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性与其生物被膜细菌密度显著相关。Li 等(2014)研究发现,从玻璃表面附着的自然生物被膜上分离得到的 10 株海洋细菌中,9 株对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性与单一细菌生物被膜的细菌密度呈显著相关。而在厚壳贻贝肠道菌群的相关研究中,杨娜等(2017)研究发现,10 株测试的厚壳贻贝

肠道细菌中, 仅有 5 株呈显著相关; 徐嘉康等(2021)研究表明, 测试的 10 株厚壳贻贝肠道细菌中, 有 6 株的厚壳贻贝稚贝诱导活性与其生物被膜细菌密度显著相关。在本研究中, 测试的 9 株人工鱼礁表面细菌中, 仅有 4 株细菌形成的生物被膜密度与附着率呈显著相关。由此推测, 虽然细菌密度在厚壳贻贝稚贝附着的过程中发挥着一定的作用, 但并不适用于所有的海洋细菌, 可能与菌株的来源有关。此外, 本研究还发现, 随着初始细菌密度的升高, 各菌株对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性变化趋势也不尽相同, 这说明并非初始细菌密度越高, 稚贝的附着率就越高, 各菌株都有各自的最适细菌密度, 且与细菌种属有关, 这与以往研究结果相同(杨娜等, 2017; Peng *et al.*, 2020b)。

对本研究分离得到的 9 株细菌的遗传进化与厚壳贻贝稚贝附着诱导活性进行相关性分析, 系统发育分析的结果显示, *Pseudoalteromonas* sp.31 与 *Pseudoalteromonas* sp.32 的遗传距离最近, 其对厚壳贻贝稚贝的诱导活性具有显著差异; 而 *Mesoflavibacter* sp.2 与 *Jeotgalibacillus* sp.1 的遗传距离最远, 二者对厚壳贻贝稚贝的诱导活性也具有显著差异, 这说明细菌遗传距离的远近与厚壳贻贝稚贝的附着无关, 与以往结论相一致(Yang *et al.*, 2013)。

以往的研究表明, 某些特定细菌分泌的化学信号诱导分子可能在贝类等海洋无脊椎动物的附着变态中发挥着一定的作用(Yang *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2010; Fuqua *et al.*, 1994; Tran *et al.*, 2011)。本研究选取了对厚壳贻贝稚贝具有高诱导活性的 *Mesoflavibacter* sp.2 及低诱导活性的 *Phaeobacter* sp.2 两株细菌进行生物被膜胞外蛋白分析, 发现其生物被膜对厚壳贻贝稚贝的诱导活性与蛋白含量呈显著正相关。结合实验室以往对胞外蛋白质的研究, 发现 *P. marina* 鞭毛蛋白合成基因 *fliP* 缺失和鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失均导致生物被膜上蛋白质含量显著增高、 β -多糖含量显著降低, 同时降低了厚壳贻贝幼虫的附着变态率(Liang *et al.*, 2020; 蔡雨姗等, 2022); 且在 *P. marina* 形成生物被膜的过程中, 添加鞭毛蛋白能够显著增加生物被膜上蛋白质、多糖等物质的含量, 促进厚壳贻贝稚贝的附着(蔡雨姗等, 2021)。在本研究中, *Phaeobacter* sp.2 形成的生物被膜蛋白质含量较 *Mesoflavibacter* sp.2 低, 据此推测, *Mesoflavibacter* sp.2 生物被膜中的某类蛋白质可能影响了多糖类物质的产生, 导致形成的生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着表现出低诱导活性。

本研究中, 2 株测试菌株的生物被膜多糖含量与

诱导活性呈显著负相关。根据以往对多糖的研究可知, 弧菌形成的生物被膜上胞外多糖的变化规律则与稚贝附着情况变化相一致(梁箫等, 2020a); 在徐嘉康等(2021)的研究中, 2 株测试菌株的生物被膜胞外产物中, α -多糖与厚壳贻贝附着诱导活性呈显著负相关, 该发现与本实验结果类似。多糖类物质对厚壳贻贝附着变态诱导能力的研究表明, 脂多糖(吴静娴等, 2022)、藻酸盐(陈慧娥等, 2022)、可拉酸(Peng *et al.*, 2020a)等多糖类物质会促进厚壳贻贝的附着变态。然而, 本研究 *Phaeobacter* sp.2 形成的生物被膜多糖含量较 *Mesoflavibacter* sp.2 显著升高, 据此推测可能是 *Phaeobacter* sp.1 分泌的多糖类物质中含有抑制性活性物, 对厚壳贻贝稚贝表现出低诱导活性。通过测定 *Mesoflavibacter* sp.2 和 *Phaeobacter* sp.2 两株菌株产生纤维素的能力发现, 低诱导活性菌株 *Phaeobacter* sp.2 的纤维素含量是高诱导活性菌株 *Mesoflavibacter* sp.2 的 4 倍, 由此推测, 2 株细菌的诱导活性差异是纤维素含量变化的结果。相似的, 以往研究发现, 纤维素能够抑制厚壳贻贝附着变态的作用(梁箫等, 2020b; 邵安琪等, 2023)。同时, 在对 *P. marina* 纤维素合成基因 *bcsQ* 的研究中发现, 该基因的缺失会导致生物被膜的形成能力下降, 胞内 c-di-GMP 含量下降, 通过影响 c-di-GMP 含量调控多糖分泌, 降低了厚壳贻贝幼虫附着变态率(Liang *et al.*, 2021)。这一结果表明, 细菌种属虽然对厚壳贻贝稚贝的附着没有直接影响, 但细菌可能通过影响胞外产物分泌间接影响厚壳贻贝的附着。

综上所述, 本研究中的 9 株人工鱼礁表面细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导能力存在显著性差异, 但与细菌之间的遗传距离无必然关联。通过测试 2 株对厚壳贻贝稚贝具有不同程度诱导活性的菌株生物被膜所含活性物质的含量, 发现生物被膜中蛋白质与多糖含量均对厚壳贻贝稚贝附着有一定的影响作用, 同时, 对纤维素含量测定的实验验证了特定多糖类物质对厚壳贻贝稚贝附着的负调控作用。本研究首次探索了人工鱼礁表面细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 为后续进一步在自然海区开展人工鱼礁表面生物被膜与海洋无脊椎动物附着的互作关系研究奠定理论基础, 同时, 对于人工鱼礁表面海洋生物附着机制的研究具有重要的实践价值。

参 考 文 献

ALONGI D M, TROTT L A, PFITZNER J. Biogeochemistry of

- inter-reef sediments on the northern and central Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 2008, 27(2): 407–420
- BAO W Y, YANG J L, SATUITO C G, *et al.* Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Alteromonas* sp.1: Evidence for two chemical cues? *Marine Biology*, 2007, 152(3): 657–666
- CAI Y S, REN H Y, ZHU Y T, *et al.* Deletion of *fliC-02330* from *Pseudoalteromonas marina* affects the biofilm formation and the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*. *Microbiology China*, 2022, 49(3): 899–910 [蔡雨珊, 任泓好, 竹攸汀, 等. 海假交替单胞菌 *fliC-02330* 基因缺失影响生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态. *微生物学通报*, 2022, 49(3): 899–910]
- CAI Y S, ZHANG X K, ZHU Y T, *et al.* Effects of *Pseudoalteromonas marina* flagellin on biofilm formation and settlement of *Mytilus coruscus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2021, 43(4): 75–83 [蔡雨珊, 张秀坤, 竹攸汀, 等. 海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*)鞭毛蛋白对生物被膜形成及厚壳贻贝附着的影响. *海洋学报*, 2021, 43(4): 75–83]
- CHEN C X, ZHANG J B, WANG X M, *et al.* Zooplankton community structure and its relationship with environmental factors in an artificial reef near Furong Island, Laizhou Bay, Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(3): 299–313 [陈传曦, 张建柏, 王新萌, 等. 渤海莱州湾芙蓉岛人工鱼礁区浮游动物群落结构特征及其与环境因子的关系. *中国水产科学*, 2021, 28(3): 299–313]
- CHEN H E, HE K, HE C H, *et al.* Effects of alginate on biofilm formation of *Pseudoalteromonas marina* and larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(4): 620–626 [陈慧娥, 贺康, 贺楚晗, 等. 藻酸盐对海假交替单胞菌生物被膜形成及厚壳贻贝附着变态的影响. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(4): 620–626]
- CHUNG H C, LEE O O, HUANG Y L, *et al.* Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *ISME Journal*, 2010, 4(6): 817–828
- FALCAO M, SANTOS M N, VICENTE M, *et al.* Biogeochemical processes and nutrient cycling within an artificial reef off Southern Portugal. *Marine Environmental Research*, 2007, 63(5): 429–444
- FUQUA W C, WINANS S C, GREENBERG E P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 269–275
- HENDERSON M J, FABRIZIO M C, LUCY J A. Movement patterns of summer flounder near an artificial reef: Effects of fish size and environmental cues. *Fisheries Research*, 2014, 153: 1–8
- JIANG Z Y, GUO Z S, ZHU L X, *et al.* Structural design principle and research progress of artificial reef. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(9): 1881–1889 [姜昭阳, 郭战胜, 朱立新, 等. 人工鱼礁结构设计原理与研究进展. *水产学报*, 2019, 43(9): 1881–1889]
- LI Y F, GUO X P, YANG J L, *et al.* Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Aquaculture*, 2014, 433: 434–441
- LI Z Z, GONG P H, GUAN C T, *et al.* Study on the organisms attachment of artificial reefs constructed with five different cements. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 57–63 [李真真, 公丕海, 关长涛, 等. 不同水泥类型混凝土人工鱼礁的生物附着效果. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 57–63]
- LIANG X, LIU H Y, YANG L T, *et al.* Effects of dynamic succession of *Vibrio* biofilms on settlement of the mussel *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2020a, 44(1): 118–129 [梁箫, 刘红雨, 杨丽婷, 等. 弧菌生物被膜的动态演替对厚壳贻贝附着的影响. *水产学报*, 2020a, 44(1): 118–129]
- LIANG X, TONG H, PENG L H, *et al.* Regulation of formation of biofilms and larval settlement and metamorphosis of mussel *Mytilus coruscus* by cellulose. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020b, 35(1): 75–82 [梁箫, 童欢, 彭莉华, 等. 纤维素对海洋细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态的调控. *大连海洋大学学报*, 2020b, 35(1): 75–82]
- LIANG X, ZHANG X K, PENG L H, *et al.* The flagellar gene regulates biofilm formation and mussel larval settlement and metamorphosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 710
- LIANG X, ZHANG J B, SHAO A Q, *et al.* Bacterial cellulose synthesis gene regulates cellular c-di-GMP that control biofilm formation and mussel larval settlement. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2021, 165: 105330
- LIN J, ZHANG S Y. Research advances on physical stability and ecological effects of artificial reef. *Marine Fisheries*, 2006, 28(3): 257–262 [林军, 章守宇. 人工鱼礁物理稳定性及其生态效应的研究进展. *海洋渔业*, 2006, 28(3): 257–262]
- MANOUDIS G, ANTONIADOU C, DOUNAS K, *et al.* Successional stages of experimental artificial reefs deployed in Vistonikos Gulf (N. Aegean Sea, Greece): Preliminary results. *Belgian Journal of Zoology*, 2005, 135(2): 209–215
- PENG L H, LIANG X, CHANG R H, *et al.* A bacterial polysaccharide biosynthesis-related gene inversely regulates larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*. *Biofouling*, 2020a, 36(7): 753–765
- PENG L H, LIANG X, XU J K, *et al.* Monospecific biofilms of *Pseudoalteromonas* promote larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*. *Scientific Reports*, 2020b, 10(1): 2577
- SEAMAN W J. *Artificial reef evaluation: With application to natural marine habitats*. CRC Press, 2000
- SHAO A Q, LI J Z, ZHANG J B, *et al.* Effect of cellulose on *Pseudoalteromonas marina* biofilm extracellular products

- and larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(8): 118–125 [邵安琪, 李嘉政, 张俊波, 等. 纤维素对海假交替单胞菌生物被膜生物学特性及厚壳贻贝幼虫附着变态的影响. *水产学报*, 2023, 47(8): 118–125]
- SONG W, HAN X C, XIE Z L, *et al.* Development status and the prospect of deep-sea large-scale fence culture in China. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(6): 111–120 [宋炜, 韩昕辰, 谢正丽, 等. 我国深远海大型围栏养殖发展现状与展望. *渔业科学进展*, 2022, 43(6): 111–120]
- SUN J J, ZHANG X, GUO X P, *et al.* Effects of marine bacteria from silanizing surfaces on plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1530–1538 [孙俊杰, 张显, 郭行磐, 等. 硅烷化表面海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响. *水产学报*, 2015, 39(10): 1530–1538]
- SUO A N, DING D W, YANG J L, *et al.* Application analysis of “three fields and one channel” theory in marine ranching habitat construction. *Marine Fisheries*, 2022, 44(1): 1–8 [索安宁, 丁德文, 杨金龙, 等. 海洋牧场生境营造中“三场一通道”理论应用研究. *海洋渔业*, 2022, 44(1): 1–8]
- TANG Q S. Fishery resources breeding, marine pasture, breeding fishery and its development orientation. *China Fisheries*, 2019(5): 28–29 [唐启升. 渔业资源增殖、海洋牧场、增殖渔业及其发展定位. *中国水产*, 2019(5): 28–29]
- TRAN C, HADFIELD M G. Larvae of *Pocillopora damicornis* (Anthozoa) settle and metamorphose in response to surface-biofilm bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 2011, 433: 85–96
- UNABIA C R C, HADFIELD M G. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Biology*, 1999, 133(1): 55–64
- WANG Z, GONG P H, GUAN C T, *et al.* Effect of different artificial reefs on the community structure of organisms in Shique Beach of Qingdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 163–171 [王震, 公丕海, 关长涛, 等. 青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 163–171]
- WILDING T A, SAYER M D J. Evaluating artificial reef performance: approaches to pre- and post-deployment research. *ICES Journal of Marine Science*, 2002, 59: S222–S230
- WU J X, LI J Z, HU X M, *et al.* Effects of lipopolysaccharide on biofilm formation and larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(11): 2134–2142 [吴静娴, 李嘉政, 胡晓梦, 等. 脂多糖对细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫变态的影响. *水产学报*, 2022, 46(11): 2134–2142]
- WU W G, ZHANG J H, LIU Y, *et al.* Analysis of the effectiveness of the polyculture of shellfish and algae and influencing factors in the Xuejiadao sea cage aquaculture area. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 146–155 [吴文广, 张继红, 刘毅, 等. 薛家岛海水网箱养殖海域贝藻综合养殖效果及其影响因素分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 146–155]
- XU J K, WANG J S, FANG Y H, *et al.* Effects of intestinal bacterial biofilms on settlement process of larvae and plantigrades in *Mytilus coruscus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2021, 43(9): 81–91 [徐嘉康, 王劲松, 方怡涵, 等. 厚壳贻贝肠道细菌的生物被膜对其幼虫和稚贝附着的影响. *海洋学报*, 2021, 43(9): 81–91]
- YANG H S, HUO D, XU Q. Views on modern marine ranching. *Journal of Oceans and Limnology*, 2016, 47(6): 1069–1074 [杨红生, 霍达, 许强. 现代海洋牧场建设之我见. *海洋与湖沼*, 2016, 47(6): 1069–1074]
- YANG H S. Construction of marine ranching in China: Reviews and prospects. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1133–1140 [杨红生. 我国海洋牧场建设回顾与展望. *水产学报*, 2016, 40(7): 1133–1140]
- YANG J L, GUO X P, CHEN Y R, *et al.* Effects of bacterial biofilms formed on middle wettability surfaces on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 421–428 [杨金龙, 郭行磐, 陈芋如, 等. 中湿度表面的海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响. *水产学报*, 2015, 39(3): 421–428]
- YANG J L, LI X, LIANG X, *et al.* Effects of natural biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Aquaculture*, 2014, 424: 228–233
- YANG J L, SHEN P J, LIANG X, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms. *Biofouling*, 2013, 29(3): 247–259
- YANG J L, SHEN P J, WANG C, *et al.* Effects of biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 904–909 [杨金龙, 慎佩晶, 王冲, 等. 微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响. *水产学报*, 2013, 37(6): 904–909]
- YANG J L, WU X Y, SHI G F, *et al.* Overview of marine ranching technology. *Chinese Fisheries Economics*, 2004(5): 48–50 [杨金龙, 吴晓郁, 石国峰, 等. 海洋牧场技术的研究现状和发展趋势. *中国渔业经济*, 2004(5): 48–50]
- YANG N, LIANG X, PENG L H, *et al.* Effects of gut bacteria on the settlement of spats of *Mytilus coruscus*. *Journal of Marine Sciences*, 2017, 41(11): 45–54 [杨娜, 梁箫, 彭莉华, 等. 肠道细菌对厚壳贻贝稚贝附着的作用研究. *海洋科学*, 2017, 41(11): 45–54]
- YU X J, HE W H, LI H X, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the pearl oyster *Pinctada fucata* in response to biofilms. *Aquaculture*, 2010, 306(1/2/3/4): 334–337
- ZENG Z, GUO X P, LI B, *et al.* Characterization of self-generated variants in *Pseudoalteromonas lipolytica* biofilm with increased antifouling activities. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(23): 10127–10139

ZHANG Z, YANG F, LI X P, *et al.* Optimization fo extraction and content determination of capsular polysaccharide from

Streptococcus agalactiae. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(7): 41–45 [张哲, 杨峰, 李新圃, 等. 无乳链球菌荚膜多糖的粗提及多糖含量测定条件优化. 动物医学进展, 2017, 38(7): 41–45]

(编辑 冯小花)

The Effect of Mono-Species Bacterial Biofilms Formed on the Surface of Artificial Reef on Settlement of Plantigrades in *Mytilus coruscus*

YANG Jinlong^{1,2,3}①, YU Xiangbing^{1,2}, HU Xiaomeng^{1,2}, HE Chuhan^{1,2}, LIANG Xiao^{1,2}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-Culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

Abstract Aquaculture is the fastest growing food production industry. The Chinese mariculture industry has made great progress in the past 40 years to become the dominant producer of aquaculture. However, the current deterioration of the water environment and the aggravation of farming diseases poses challenges for the traditional culture model to meet the new requirements of healthy development in marine fishery resources. This problem was addressed using marine ranching. This is a new mariculture model that includes two approaches (artificial reefs and stocking) with the goal of achieving environmental and ecological harmony. Artificial reefs are an important component of this marine ranching model since they can help improve the water environment around the reefs, promote nutrient circulation, provide a suitable habitat for marine organisms, and encourage colonization of the reef surface by sessile organisms. The placement of artificial reefs into seawater may serve as a substrate for bacteria to form a biofilm on the surface. Biofilms play a crucial role in the settlement of many marine invertebrate species. However, limited research was conducted into the relationship between bacteria on the surface of artificial reefs, biofilm formation, and the settlement behavior of *Mytilus coruscus*.

This study placed white acrylic plates and tetrahedral structured artificial reefs in Gouqi Island, Zhoushan City, Zhejiang Province, China (122°46' E; 30°43' N). Nine strains of bacteria isolated from the surface of the artificial reefs were used to construct mono-species bacterial biofilms and induce plantigrade settlement of *M. coruscus*. The aim of the study was to investigate the interactions between marine bacteria and the settlement of *M. coruscus* on the surface of artificial reefs. The marine biofilms impacted the settlement process of *M. coruscus*. The bacterial species from the marine biofilm were screened for high and low inducing activity and analyzed for bacterial density, protein, and polysaccharide content to further explore the relationship between different bacterial biofilms and *M. coruscus* settlement.

There were significant differences in the induction activity of biofilms formed by the nine strains of artificial reef bacteria on the settlement of *M. coruscus*: *Mesoflavibacter* sp.2 and *Phaeobacter* sp.2 showed the highest and lowest induction activity, respectively. Bacteria within the same genus

① Corresponding author: YANG Jinlong, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

exhibited differences in induction activity. This indicated that the induction activity of bacterial biofilms on mussel settlement was independent of bacterial species. Phylogenetic analysis showed that genetically similar strains (such as *Pseudoalteromonas* sp.31 and *Pseudoalteromonas* sp.32) and genetically distant strains (such as *Mesoflavibacter* sp.2 and *Jeotgalibacillus* sp.1) showed significant differences in the induction activity of *M. coruscus* settlement. Only four of the nine bacterial strains showed significant correlation between biofilm density and the settlement rate. *Sutcliffiella* sp.1 and *Jeotgalibacillus* sp.1 exhibited a positive correlation between bacterial density and induction activity. This indicated that bacterial density may play a role in *M. coruscus* settlement, although it may be strain specific. Additionally, the trend of induction activity of mussel larvae attachment varied with increasing initial bacterial density. The optimal density for settlement is strain specific. Further analysis of biofilm active substance content in *Mesoflavibacter* sp.2 and *Phaeobacter* sp.2 revealed that polysaccharide content negatively correlated with induction activity of *M. coruscus* and positively correlated with protein content. This suggests that bacterial species may not directly affect *M. coruscus* settlement, although bacteria may indirectly influence settlement by affecting the secretion of extracellular products.

This study showed that nine bacterial strains had significant differences in their ability to induce mussel settlement on the surface of artificial reefs. Interestingly, these differences did not necessarily correlate with the genetic distance between the marine bacteria. Further investigations were conducted on two selected strains of bacteria (*Mesoflavibacter* sp.2 and *Phaeobacter* sp.) that exhibited different levels of inductive activity on *M. coruscus*. The polysaccharide content and protein content negatively and positively correlated with the induction activity of *M. coruscus*, respectively. This suggests that the presence of specific polysaccharides may negatively affect the settlement of *M. coruscus* according to cellulose content measurements.

This is the first study investigating the effect of bacteria on *M. coruscus* settlement on the surface of artificial reefs. This has significant theoretical implications for further research on the interactions between biofilms and marine invertebrates on the surface of artificial reefs in natural marine environments. Understanding the settlement mechanisms of marine benthic organisms on artificial reefs is crucial to manage and conserve marine resources since artificial reefs are widely used to enhance marine habitat and biodiversity. The findings of this study have practical implications for the design and construction of artificial reefs. Understanding the role of bacteria in mussel settlement facilitates the optimization of artificial reef structures to promote or inhibit the settlement of target species. This knowledge can help develop effective strategies to manage biofouling on artificial reefs. This can impact the performance and longevity of these structures. Further research in this field will deepen our understanding of the underlying mechanisms and enable development of management strategies for artificial reefs and marine conservation efforts.

Key words Artificial reef; *Mytilus coruscus*; Mussel juvenile; Settlement; Biofilm

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230110002

http://www.yykxjz.cn/

陶伟丽, 钟晨辉, 张鹏, 郭辰涛, 王铁杆, 林琪. 短波紫外线辐照坛紫菜壳孢子制备色彩突变体的新途径. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 235-244

TAO W L, ZHONG C H, ZHANG P, GUO C T, WANG T G, LIN Q. A novel pathway to produce color mutants by short-wavelength ultraviolet ray irradiation on the germinating conchospore in *Pyropia haitanensis*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 235-244

短波紫外线辐照坛紫菜壳孢子 制备色彩突变体的新途径*



陶伟丽^{1,3} 钟晨辉¹ 张鹏² 郭辰涛¹ 王铁杆² 林琪^{1①}

(1. 福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室 海洋生物种业技术国家地方联合工程研究中心 福建 厦门 361013; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 浙江 温州 325005; 3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 壳孢子萌发时期是坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)减数分裂发生的时期,壳孢子萌发形成的最初4个细胞呈线性排列,形成减数分裂四分体,且发生遗传重组的四分体细胞可以决定叶状体的发育模式和性状分离。因此,诱变产生色彩突变的嵌合叶状体相比诱变叶状体产生的点状色块,将更易于获得突变细胞。本研究为获得坛紫菜人工色彩嵌合突变体,使用不同剂量(50、100、200、300、400、500和600 J/m²)的短波紫外线(UV-C, $\lambda=254$ nm)辐照坛紫菜壳孢子,培养数天后,在壳孢子苗中出现了色彩突变的嵌合叶状体。结果显示,低剂量(50 J/m²)的辐射促进壳孢子萌发,而辐照剂量高于100 J/m²则会抑制壳孢子萌发和分裂。辐照剂量在50~400 J/m²范围内,色彩突变体出现的频率随辐照剂量的增加而增加,辐照剂量分别为300和400 J/m²时,突变率分别达到15.22%和17.18%。其中,出现色彩突变的嵌合叶状体以2色块嵌合体 and 3色块嵌合体居多,4色块嵌合体最少,但辐照剂量增加至400 J/m²以上时,随着辐照剂量的增加,色彩突变体出现的频率反而下降,表明最适宜的诱变剂量为300或400 J/m²。同时,短波紫外线辐照也使色彩突变嵌合体的长宽比下降,采用生物酶解法从色彩嵌合体中分离出了单色的体细胞萌发体。本研究为坛紫菜人工色彩突变体的制备和诱变育种提供了新途径。

关键词 坛紫菜;壳孢子;短波紫外线;色彩突变体;分离

中图分类号 S968.43 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0235-10

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国特有的紫菜栽培品种,主要栽培于浙江、福建和广东沿海地区,其产量约占全国紫菜总产量的75%(曾呈奎等,1985)。至今大规模人工栽培的紫菜品种仍是以自留种为主,且出现了明显的种质退化、产量和质量下降等现象,培育紫菜新种质仍是产业发展的重要需求。

色彩突变是紫菜生活史中发生的一种特殊的生物学现象,对紫菜色彩突变体进行遗传学分析,不仅有助于掌握紫菜的基本遗传规律,还可以为紫菜良种培育提供重要的遗传资源。

目前,紫菜的色彩突变体主要通过诱变途径获得(Yan *et al.*, 2000),最广泛应用的诱变剂为化学诱变剂

* 财政部和农业农村部:现代农业产业技术体系(CARS-50)、浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2021C02069-9)、福建省科技计划(2023R1053)和温州市科技计划(S2020008)共同资助。陶伟丽, E-mail: 1490475261@qq.com

① 通信作者:林琪,研究员, E-mail: xmqlin@sina.com

收稿日期:2023-01-10, 收修改稿日期:2023-02-14

甲基硝基亚硝基胍(MNNG)(Yan *et al*, 2004)和物理诱变剂 γ 射线(Lee *et al*, 2018a; Wang *et al*, 2000)。利用 MNNG 对条斑紫菜(*P. yezonensis*)、坛紫菜等生活史中各阶段的藻体, 如丝状体(王金锋等, 2007; Li *et al*, 2008)、壳孢子萌发体(李琳等, 2006)、叶状体(Lee *et al*, 2018a; 严兴洪等, 2009)等进行诱变处理, 成功地获得了大量的色彩突变体。采用 ^{60}Co - γ 射线分别对条斑紫菜叶状体和长紫菜(*P. dentata*)壳孢子萌发体进行诱变、分离并获得了多个色彩突变体(Lee *et al*, 2018b; 严兴洪等, 2009)。虽然, 以上诱变剂都具有良好的诱变效果, 但化学诱变剂对操作者有一定的污染风险, 操作安全性低, 存在二次污染的问题。物理诱变剂 ^{60}Co - γ 虽不存在化学诱变剂的实验操作问题, 但仅适用于具有一定生物量的实验材料(叶状体和丝状体), 不宜用于对微观孢子和原生质体等进行诱变。而紫外线辐射诱变具有无污染、设备简单、易于操作、成本低等优点(何培民等, 2007; Ding *et al*, 2020; 潘雪等, 2020)。波长范围为 100~275 nm 的短波紫外线(UV-C)可以解除生命体 DNA 和蛋白质之间的交联, 使 DNA 链断裂形成嘧啶二聚体, 从而导致基因突变(Elliott *et al*, 2001)。利用人工制备的 UV-C 光源不仅可以用于日常生活中的杀菌消毒, 且 UV-C 辐照对植物和微生物具有较好的诱变效果(Pfendler *et al*, 2021; Slatinskaya *et al*, 2018; Jeon *et al*, 2018; Rezzan *et al*, 2014)。戴继勋等(1990)和严兴洪(1992)研究表明, 利用紫外线辐照条斑紫菜和坛紫菜的原生质体, 可以获得形态变异体和红色变异体。过去藻类学主要对紫菜原生质体、丝状体和叶状体等进行诱变(严兴洪等, 2000; 张倩等, 2019; 赵爽等, 2019; 陈昌生等, 2008), 却鲜有对壳孢子进行诱变的研究报道。在坛紫菜世代交替的生活史中, 壳孢子萌发初期是双倍丝状体($2n$)转变成单倍叶状体(n)的关键发育阶段, 也是减数分裂的发生时期, 所产生的四分体是经过遗传重组后的产物, 因此, 这个发育转化过程产生的四分子细胞排列变化将决定后续叶状体的发育趋向(Ohme *et al*, 1986; Zhang *et al*, 2013)。基于此背景, 对萌发初期的坛紫菜壳孢子进行诱变处理, 极大地增加基因突变频率, 且易于获取更多的遗传重组表型, 这将不同于诱变叶状体产生的点状突变色块, 也容易获得诱变出来的突变细胞。本研究采用短波紫外线($\lambda=254$ nm)辐照坛紫菜壳孢子, 以期获得具有色彩变异的壳孢子萌发体, 并从色彩嵌合体分离出单色叶状体, 为丰富坛紫菜诱变育种技术途径提供科学基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本研究所用坛紫菜野生型品系采自福建省平潭岛自然岩礁上, 于 2017 年利用单性生殖技术建立遗传纯系, 以自由丝状体的形式保存在实验室内。保存条件: 温度为 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $4 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 10L : 14D, 每半年更换 1/2 的 MES 培养液。

采用小型粉碎机将一定生物量的自由丝状体切碎成约 100 μm 的藻丝, 将其接种到灭菌的贝壳表面。黑暗处理 3 d 后, 将接种的贝壳转移至温度为 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 $5 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 10L : 14D 的条件下培养。培养 10 d 后, 清洗贝壳表面上多余的自由丝状体, 及时更换新鲜培养液, 将光照强度提高到 $20 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 其他培养条件不变。培养数周后, 当整个贝壳表面呈红紫色时, 将培养温度提高到 (28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 同时, 把光照强度低降到 $10 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 10L : 14D。数周后, 当贝壳表面长出膨大藻丝时, 取 1~2 个成熟的贝壳丝状体放入含有 150 mL 培养液和数根尼龙绳单丝的烧杯(250mL)中进行充气培养(Zhong *et al*, 2019), 培养温度为 (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $40 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。当镜检尼龙绳单丝上附着一定数目的壳孢子后, 将放散的壳孢子经过 100 目尼龙筛绢滤去杂质后, 利用细胞漏斗收集到 250 mL 烧杯内以供诱变实验。

1.2 紫外线诱变和色彩突变体的分离

将收集到的坛紫菜壳孢子悬浮液摇晃均匀, 悬浮液中壳孢子的密度在 10×20 倍显微镜下每个视野约有 20 个壳孢子为宜, 平均置于 24 个培养皿($\Phi=9$ cm)中, 培养皿内孢子液水层高度约为 2 mm。采用短波紫外灯管作为辐照源, 使用 LS126C 型紫外照度计测量 UV-C 辐射强度($425 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), 按照公式: 辐照剂量(J/m^2)=辐照时间(s) \times 辐照强度(W/m^2), 分别设置辐照剂量为 0 (对照组)、50、100、200、300、400、500 和 600 J/m^2 , 每个剂量组设置 3 个平行组。经辐照过的壳孢子在黑暗条件下静置培养 3 d, 再转移至白光下继续培养 7 d, 统计每组壳孢子存活数目和萌发数目。培养条件: 温度为 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 10L : 14D。在相同条件下, 将壳孢子萌发体继续培养 7 d, 再统计发生色彩变异的壳孢子萌发体数目。再继续培养 7 d, 随机抽取 30 个样本, 测定各实验组壳孢子萌发体的长度和宽度, 计算其长宽比值。使用 Leica DMi8 倒置显微镜(德国)观察壳孢子萌

发和生长过程中的细胞形态变化, 整个培养期为 35 d。将色彩突变嵌合叶状体进行酶解处理, 制备体细胞单离细胞, 经培养后发育成再生叶状体(Zhang *et al.*, 2011), 且参照色名字典对色彩变异体分别命名(Wada, 1956)。

1.3 数据分析

壳孢子的存活率、萌发率、突变率的计算公式如下:

$$\text{存活率(survival rate, \% , SR)} = D_1/D_0 \times 100\%$$

$$\text{萌发率(germination rate, \% , GR)} = D_2/D_0 \times 100\%$$

$$\text{突变率(mutation rate, \% , MR)} = D_3/D_2 \times 100\%$$

式中, D_0 为实验开始时坛紫菜壳孢子的数目, D_1 为黑暗培养 3 d 后存活的壳孢子数目。 D_2 为光照培养 7 d 后的壳孢子萌发体数目, D_3 为实验结束时发生色彩突变的壳孢子萌发体数目。

采用 Excel 2010 软件进行实验数据的统计, 使用 IBM SPSS 20 软件对实验数据进行差异显著性分析, 所有实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA) 检验, 设置差异水平为 $P < 0.05$, 统计值采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 所有图表使用 Origin 9.0 软件制作。

2 结果

2.1 坛紫菜壳孢子的存活率(SR)与萌发率(GR)

UV-C 辐照对坛紫菜壳孢子有不同程度的致死效应。辐照后, 各组壳孢子 SR 均低于对照组(图 1)。低剂量(50 和 100 J/m^2)的 UV-C 辐照对壳孢子萌发有一定的促进作用, 当辐照剂量超过 100 J/m^2 时, GR 呈下降趋势, 且随着辐照剂量增加, 壳孢子的 SR 明显

下降, 当辐照剂量达到 600 J/m^2 时, 少有壳孢子萌发, 且壳孢子 SR 最低(图 1)。UV-C 辐照剂量为 300 J/m^2 时, 恢复正常光照培养 3 d 后, 可以观察到部分壳孢子出现萎缩, 色素减淡和细胞解体(图 2a), 再经正常光照培养 7 d 后, 少部分壳孢子则发育成双细胞的细胞团(图 2b), 最后经正常光照培养 7 d 后, 少部分壳孢子发育成正常的幼苗(图 2c)。

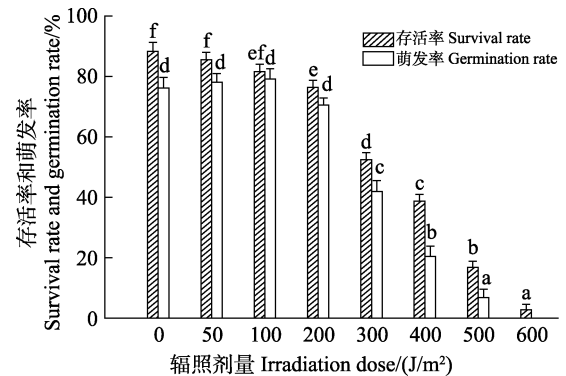


图 1 不同剂量 UV-C 辐照下壳孢子的存活率和萌发率
Fig.1 Survival rate and germination rate of conchospores under different doses of UV-C irradiation

柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。
Different letters on the top of the columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.2 壳孢子萌发体的死亡率与突变率(MR)

辐照剂量在 100~600 J/m^2 范围内, 随着 UV-C 辐照剂量的增加, 壳孢子萌发体死亡率(death rate, DR, %) 呈上升趋势, 辐照剂量为 600 J/m^2 时, 壳孢子几乎全部死亡(DR 为 97.65%)。以色彩变异作为突变性状进行统计, 在辐照剂量为 50~400 J/m^2 时, 色彩嵌合的

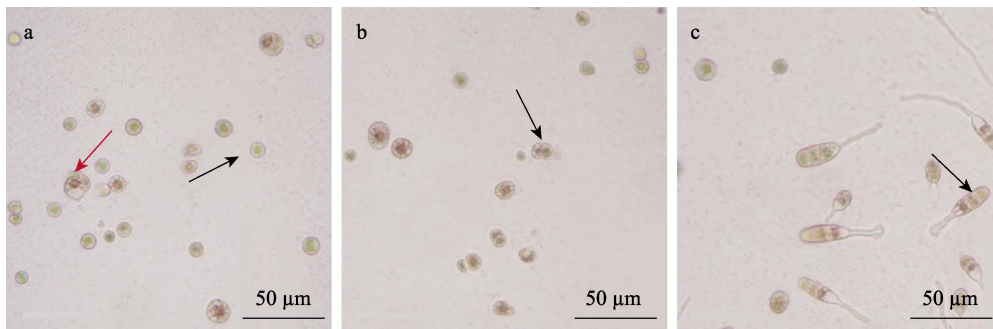


图 2 UV-C 辐照后坛紫菜壳孢子的萌发
Fig.2 Germination of conchospores of *P. haitanensis* after UV-C irradiation

- a: UV-C 辐照后, 部分壳孢子呈现正常的色素体(红色箭头), 但大量壳孢子色素体减淡、细胞萎缩或死亡(黑色箭头);
b: UV-C 辐照后, 出现双细胞团(黑色箭头); c: 在 UV-C 辐照后, 壳孢子发育成正常的幼苗(黑色箭头)。
a: After UV-C irradiation, a few conchospores with normal chromatophores (red arrow), but a large number of conchospores with light colored chromatophores shrunk in shape or died (black arrow); b: Two-celled clusters appeared after UV-C irradiation (black arrow); c: Conchospores developed into normal germings after UV-C irradiation (black arrow).

壳孢子萌发体的频率(MR)随着 UV-C 辐照剂量的增加呈上升的趋势;UV-C 辐照剂量超过 400 J/m²时,MR 则呈下降趋势;UV-C 辐照剂量达到 500 J/m²时,MR 最低。当 UV-C 辐照剂量为 300 和 400 J/m²时,MR 达到较大值,分别为 15.22%和 17.18%,二者之间无显著差异($P>0.05$),但与其他实验组相比差异显著($P<0.05$) (表 1)。

表 1 紫外线辐照对坛紫菜壳孢子的诱变效果
(平均值±标准差, $n=3$)

Tab.1 Mutagenic effect of UV-C irradiation on conchospores of *P. haitanensis* (Mean±SD, $n=3$)

| 辐照剂量 Irradiation dose/(J/m ²) | 突变率 Mutation rate/% | 萌发体死亡率 Germlings death rate/% | 长宽比值 Length-to-width ratio |
|---|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0 | 15.85±3.62 ^a | 8.13±0.63 ^f |
| 50 | 1.343±1.69 ^a | 22.71±11.72 ^{ab} | 7.06±0.77 ^{ef} |
| 100 | 2.330±1.79 ^{ab} | 19.48±3.35 ^{ab} | 6.29±0.53 ^{cd} |
| 200 | 5.140±3.29 ^c | 32.19±22.36 ^b | 5.01±0.68 ^{bc} |
| 300 | 15.220±7.62 ^d | 51.70±11.98 ^c | 4.24±0.57 ^{ab} |
| 400 | 17.180±10.2 ^d | 61.00±5.8 ^d | 3.80±0.89 ^{ab} |
| 500 | 3.310±2.68 ^b | 83.98±4.10 ^e | 3.16±0.48 ^a |
| 600 | 0 | 97.65±2.51 ^f | 3.06±0.55 ^a |

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letter superscripts indicate significant differences ($P<0.05$).

2.3 壳孢子萌发体的长宽比与形态变化

经不同剂量 UV-C 照射后,存活的壳孢子所产生的萌发体在恢复光照培养 21 d 后发育成叶状体。与对照组相比,100~600 J/m² 剂量组叶状体的长宽比存在显著差异($P<0.05$),且高剂量(300~600 J/m²)辐照组的叶状体长宽比显著下降(表 1)。与此同时,观察了 UV-C 辐照对壳孢子所产生的壳孢子萌发体的形态变化。结果显示,对照组壳孢子萌发体始终保持正常的披针形状(图 3a)。但在 UV-C 辐照后恢复光照正常培养 14 d,壳孢子萌发体的颜色和形态明显发生变化(图 3b~f),壳孢子萌发体的顶端细胞出现滞育现象(图 3g~l)。

2.4 色彩嵌合叶状体

不同剂量 UV-C 辐照密度为 10⁴ 个/mL 的壳孢子后产生的壳孢子萌发体中均出现嵌合色块,而对照组未出现(图 4),说明色彩突变体是由 UV-C 辐照诱导所产生的。出现色彩突变的嵌合叶状体以 2 色块嵌合体和 3 色块嵌合体居多,4 色块嵌合体最少(图 5)。组成嵌合叶状体色块的颜色主要有紫褐色、红褐色、

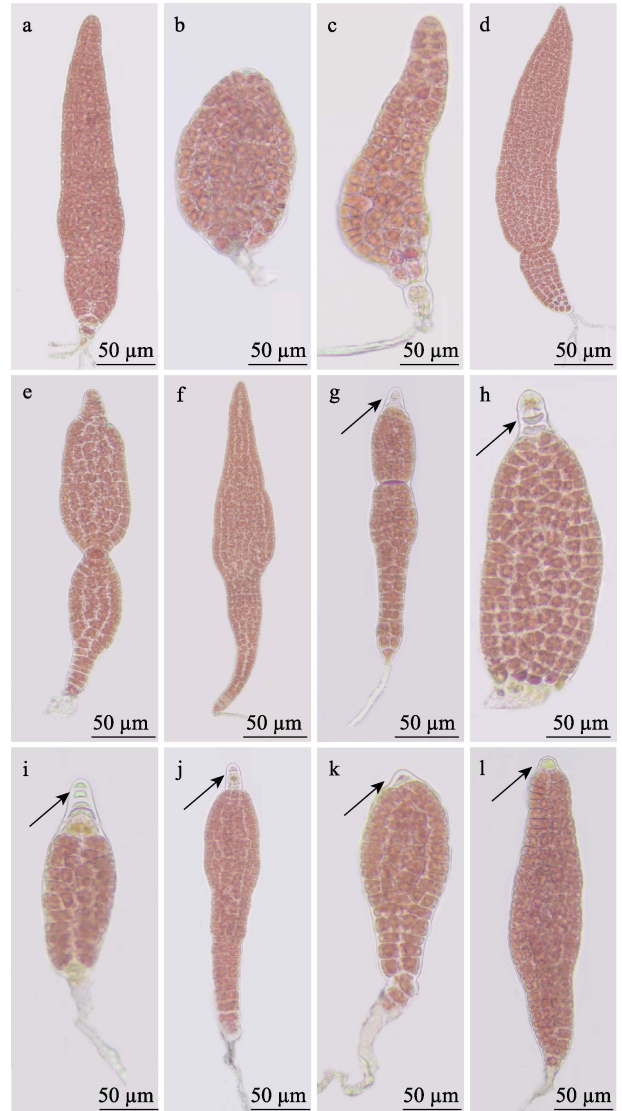


图 3 壳孢子萌发体形态和顶端细胞的滞育
Fig.3 Cell morphology and apical diapause of conchospore germlings

a: 发育正常的壳孢子萌发体; b~f: 形态异常的壳孢子萌发体; g~l: 顶端细胞滞育(箭头)的壳孢子萌发体。
a: Normally developed conchospore germlings; b~f: Abnormally shaped conchospore germlings; g~l: Apical diapaused cells (arrow) of conchospore germlings.

黄褐色、浅红色等,其中,除紫褐色为正常苗体的颜色外,突变色块中以黄褐色出现的频率最高,其次为灰棕色,而紫红色和浅绿色则出现频率最低。在辐照强度为 50~500 J/m² 范围内,随着辐照强度的增加,叶状体上出现色素突变细胞块的数目呈先增高后降低的趋势,辐照强度为 300 和 400 J/m² 时,颜色突变的数量最多,表明这 2 个诱变剂量是诱导坛紫菜壳孢子产生色彩突变的嵌合叶状体有效的辐照强度(表 1 和表 2)。在恢复光照培养 35 d 后,大部分叶状体仍能正常发育,呈现单一的紫褐色(图 6a)。然而,各实验组发生色彩

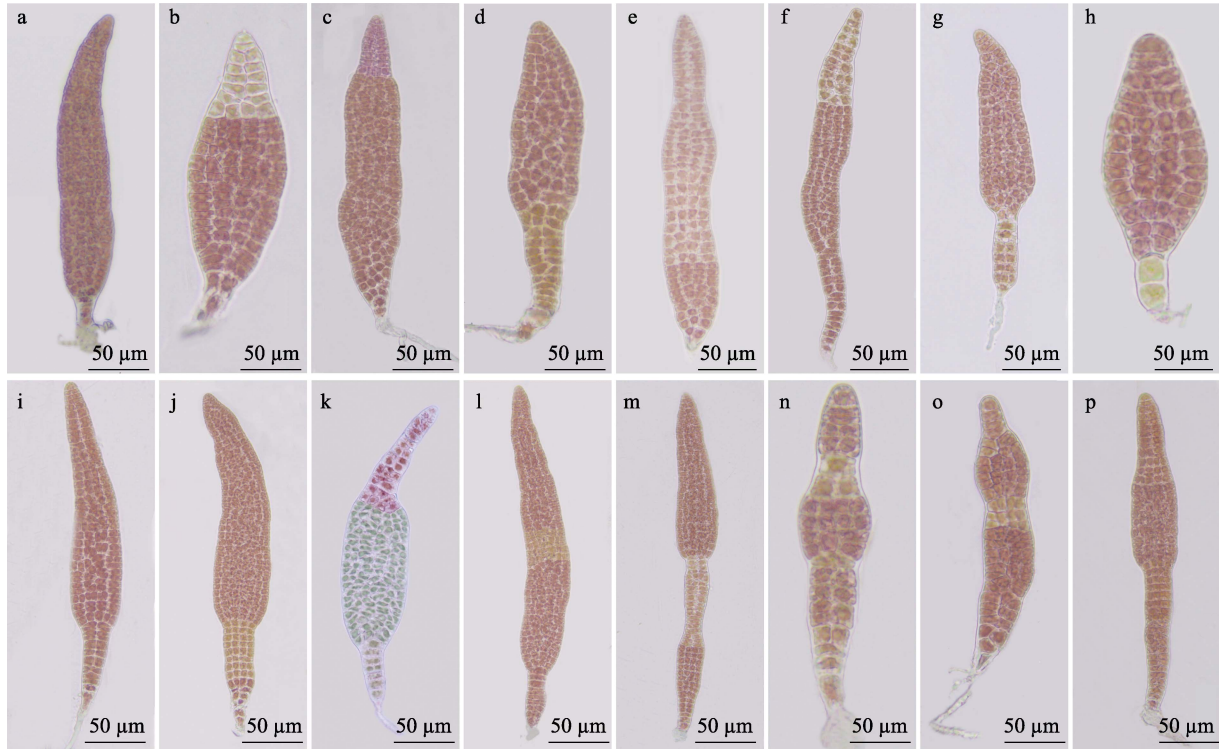


图 4 四分子发生色彩突变的壳孢子萌发体

Fig.4 Apparent pigmentation mutants of tetrads in conchospore germlings

a: 发育正常的壳孢子萌发体; b~p: 色彩突变色块线性排列于嵌合壳孢子萌发体。
a: Normally developed conchospore germlings; b~p: Apparent sectorized pigmentation mutants linearly arranged in conchospore germlings.

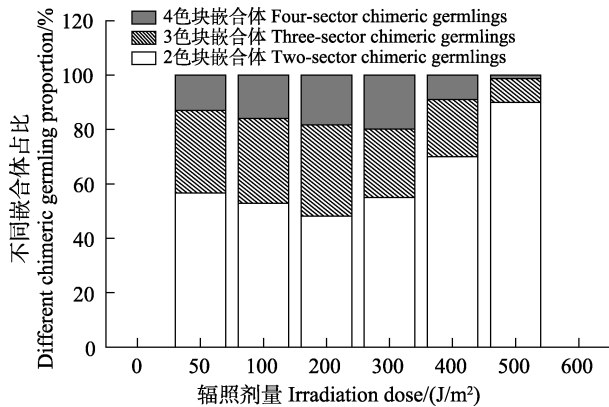


图 5 不同色彩嵌合体的比例

Fig.5 Proportions of different chimeric germlings

突变的嵌合叶状体中出现的 2 色块嵌合体占 50%以上(图 5、图 6b~d)。

2.5 色彩突变体分离

将含有 7 种不同色彩突变色块的嵌合叶状体各选取 1 株进行酶解, 获得了大量的单离体细胞, 经光照培养 60 d 后, 从体细胞再生体中挑选了黄褐、红褐、浅黄、浅绿和浅红等 5 种颜色的单色突变体各 10 株, 变异体的颜色与原有嵌合叶状体上观察到的

色素变异细胞颜色保持一致(图 7)。

3 讨论

在已有的紫菜诱变方法中, 报道最多的是使用诱变剂 MNNG 和 ⁶⁰Co-γ, 但 UV-C 辐照是一种操作简单、应用广泛、污染风险低的诱变方法, 更适合对孢子和原生质体进行诱变。虽然, UV-C 辐射诱变条斑紫菜原生质体的研究已有报道, 但由于实验条件的限制, 并未对诱变效率进行分析(严兴洪, 1992)。本研究以壳孢子为诱变材料, 相比于具有细胞壁结构的叶状体和丝状体细胞, 刚释放的壳孢子无细胞壁, 更易于 UV-C 的穿透。同时, 壳孢子发生减数分裂形成遗传重组的四分体, 对壳孢子进行诱变更利于获得突变细胞, 这完全不同于诱变叶状体和丝状体所产生的点状突变。

本研究使用 UV-C 辐照坛紫菜的壳孢子取得了较好的色彩突变体诱变效果。在辐照强度为 50 和 100 J/m² 时, 随着辐照强度的增加, 壳孢子死亡数量的增加并不明显, 只有少部分壳孢子细胞颜色变淡和内缩, 但壳孢子 GR 却呈上升趋势, 这与使用低剂量 UV-C 辐射对条斑紫菜原生质体的诱变结果相似(严兴洪,

表2 壳孢子经不同剂量UV-C辐照后培养35 d后产生的嵌合叶状体中出现颜色突变的类型和数量
Tab.2 Types and numbers of color mutations in chimeric blades produced by conchospores irradiated with different doses of UV-C for 35 days

| 辐照剂量 Irradiation dose/(J/m ²) | 色彩嵌合体色块的种类与数目 Types and numbers of color mutations in chimeric blades | | | | | | | | | |
|--|---|-----------------|--------------------|------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | 紫褐 Purple brown | 红褐 Red brown | 黄褐 Yellow brown | 紫红 Purple red | 浅红 Light red | 浅黄 Light yellow | 浅灰 Light gray | 浅绿 Light green | 灰棕 Gray brown | 合计 Total number |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 |
| 100 | 13 | 2 | 9 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 5 | 32 |
| 200 | 17 | 3 | 13 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | 40 |
| 300 | 19 | 9 | 12 | 2 | 2 | 1 | 4 | 2 | 6 | 57 |
| 400 | 20 | 11 | 13 | 3 | 3 | 3 | 4 | 1 | 8 | 66 |
| 500 | 6 | 2 | 6 | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | 6 | 28 |
| 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合计 Total number | 79 | 28 | 54 | 5 | 9 | 9 | 12 | 3 | 31 | 230 |

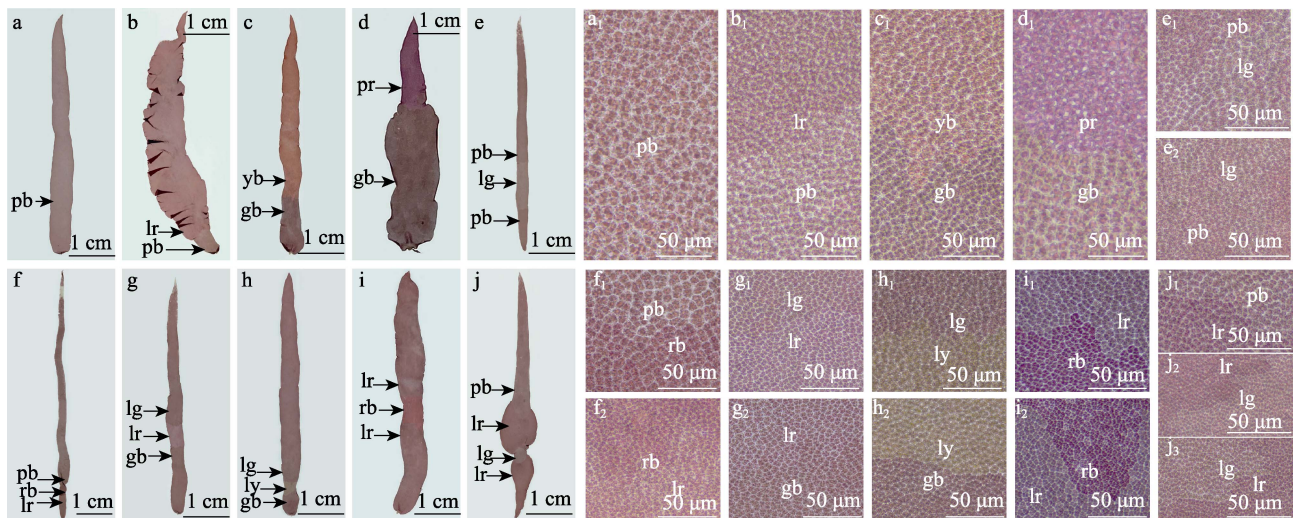


图6 UV-C辐照壳孢子产生色彩突变的嵌合叶状体

Fig.6 Pigmentation mutations in chimeric thallus developed from conchospores irradiated with UV-C

a: 正常发育的单色叶状体; b~d: 两色块嵌合叶状体; e~i: 三色块嵌合叶状体; j: 四色块嵌合叶状体。
pb: 紫褐色; rb: 红褐色; yb: 黄褐色; pr: 紫红色; lr: 浅红色; ly: 浅黄色; lg: 浅灰色; lg: 浅绿色; gb: 灰棕。
a: Normally developed blades with single color; b~d: 2-color sectors; e~i: 3-color sectors; j: 4-color sectors.
pb: Purple brown; rb: Red brown; yb: Yellow brown; pr: Purple red; lr: light red;
ly: Light yellow; lg: Light gray; lg: Light green; gb: Gray brown.

1992), 这可能是因为低剂量的紫外诱变引起细胞在感受DNA损伤胁迫后产生了生理应激反应, 使细胞分裂加快。低剂量的UV-C辐照可以促进壳孢子的生长发育, 而高剂量的UV-C辐照则抑制其生长(Anastasios *et al.*, 2015), 因此, 在生产中使用低剂量的UV-C照射, 以促进壳孢子的萌发, 提高紫菜的生产效率。

在辐照剂量为100~400 J/m²范围内, 随着辐照剂量的增强, 突变壳孢子及其萌发体的死亡率随之上升,

突变率也随之增加, 辐照剂量为300和400 J/m²时, 突变率分别达到15.22%和17.18%, 壳孢子萌发体的死亡率分别为51.70%和61.00%。当辐照剂量达到500 J/m²时, 坛紫菜壳孢子细胞大部分死亡, 是死亡率达83.98%, 且出现突变体的频率明显低于300和400 J/m²剂量组。说明UV-C辐照剂量为300和400 J/m²时, 能较好地诱导坛紫菜壳孢子发生突变, 便于获得丰富的遗传基因重组表型。本研究不同于采用⁶⁰Co-γ射线辐照坛紫菜叶状体诱变突变体时, 是死亡率不超过

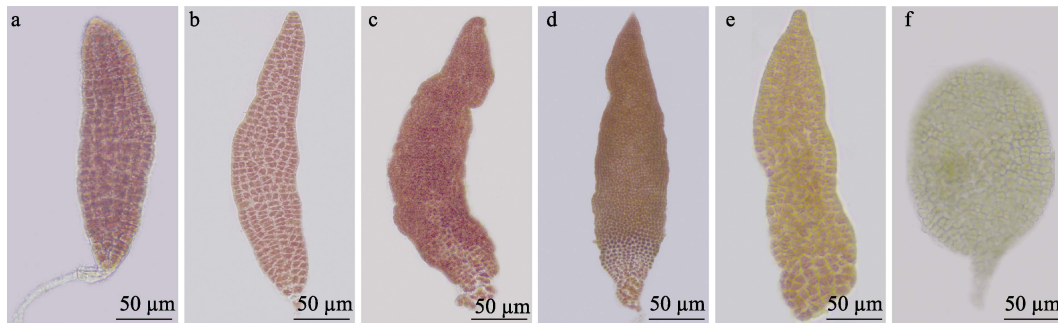


图 7 突变色块的体细胞再生体

Fig.7 Somatic cell germlings with color mutation isolated from chimeric thallus

a: 正常色泽; b: 浅红色; c: 红褐色; d: 黄褐色; e: 浅黄色; f: 浅绿色。

a: Normal color; b: Light red; c: Red brown; d: Yellow brown; e: Light yellow; f: Light green.

50%, 即可获得最大突变率(严兴洪等, 2005), 最适使用剂量也略高于使用 UV-C 辐照诱变圆紫菜(*P. suborbiculata*)与皱紫菜(*P. crispata*)叶状体所获得的最佳剂量($80 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \times 5 \text{ min} = 240 \text{ J}/\text{m}^2$) (张倩等, 2019; 赵爽等, 2019), 这可能是刚刚从壳孢囊枝释放出来的壳孢子, 其细胞壁尚未形成, 抵御不利环境胁迫的能力相对较弱, 水层高度也可能一定程度上影响了 UV-C 辐照的穿透效果。

本研究中, 经 UV-C 照射后, 恢复光照培养 7 d 时发现, 壳孢子萌发体出现了不同于对照组壳孢子萌发体的色彩突变细胞块, 随着培养时间的延长, 色彩突变的壳孢子萌发体逐渐分裂并形成 2~4 个单色块嵌合的叶状体, 单个变异色块的细胞大小和颜色等均完全相同。坛紫菜壳孢子萌发初期, 减数分裂的 2 次细胞分裂所形成的产物为线性排列的四分子嵌合体, 也是基因重组的产物(严兴洪等, 2000、2006)。本研究中, 坛紫菜壳孢子萌发体上的嵌合色块起源于壳孢子萌发初期发生减数分裂的 4 个子细胞(四分子), 单个嵌合块仅与四分子中的 1 个细胞相对应。这种色泽分离现象是由于成熟丝状体释放的壳孢子在萌发初期产生的四分子发生了色彩变异, 且变异细胞持续进行有丝分裂, 最终发育成由 2~4 个色块构成的镶嵌叶状体。将含有色彩突变的嵌合叶状体酶解获得单离细胞, 经过 60 d 的体外培养, 所获得的 5 种单色突变体的颜色种类, 基本上与母体嵌合叶状体上观察到的色素变异细胞种类一致, 这说明获得的色彩突变体来自母体嵌合叶状体上的单个突变细胞。

本研究中, UV-C 引起了壳孢子的不可逆突变或死亡, 对后期坛紫菜叶状体的形态形成有显著影响, 主要表现为细胞形态发生变异和色彩突变嵌合叶状体的形成。坛紫菜叶状体的生长方式为散生长, 当四分子细胞因受辐照影响而出现分裂停滞或分生速度

不同步时, 出现了早期的表观形态形成的多样性(Pueschel *et al*, 1982; Pueschel, 2021)。如壳孢子辐照后产生的叶状体的长宽比显著降低($P < 0.05$), 其主要原因是由于辐照造成了壳孢子萌发体顶部细胞发育滞缓, 中基部细胞向两极发育受到抑制而增加横向发育。这对于揭示紫菜壳孢子萌发体在不适环境条件下的形态形成具有一定的参考意义。

紫菜的质量主要取决于叶状体的色泽, 而叶绿素 *a* (Chlorophyll *a*, Chl-*a*)、藻蓝蛋白(phycoyanin, PC)和藻红蛋白(phycoerythrin, PE) 3 种光合色素的含量和组成比例决定了紫菜的色泽变化。研究表明, Chl-*a* 和藻胆素的含量和组成比例的变化可能是由于某种基因发生突变, 可以直接或间接地干扰色素的合成和稳定性, 从而通过各种合成途径调节色素的比例, 引起色素的变异(张海波等, 2007)。坛紫菜色素突变的形成也可能是色素蛋白合成过程中一些相关调控基因发生突变所致(黄惠珍等, 2012; 曾高雄等, 2023)。本研究使用的诱变剂 UV-C 可以使细胞 DNA 链断裂形成嘧啶二聚体, 从而导致基因突变, 但如何影响坛紫菜色素合成途径的基因表达调控这一问题还有待研究。

4 结论

本研究利用不同剂量 UV-C 诱变坛紫菜处于萌发阶段的壳孢子以影响壳孢子四分体排列变化来获得色彩嵌合突变体, 对壳孢子存活率、萌发率和壳孢子萌发体突变率等进行综合分析。结果显示, UV-C 能有效地诱变坛紫菜壳孢子, 适当的辐照剂量(300 或 $400 \text{ J}/\text{m}^2$)可以获得一定数量的色彩嵌合叶状体, 且可以从这些色彩嵌合叶状体中分离出单色突变体。本研究结果为利用 UV-C 诱变处理坛紫菜壳孢子进行突变株系筛选和新种质选育提供了新途径。

参 考 文 献

- ANASTASIOS I, DARRAS, *et al.* Disease resistance and growth responses in *Pelargonium* × *hortorum* plants to brief pulses of UV-C irradiation. *Scientia Horticulturae*, 2015, 181: 95–101
- CHEN C S, XU Y, XIE C T, *et al.* Preliminary study on mutation breeding of *Porphyra haitanensis* strains. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 327–334 [陈昌生, 徐燕, 谢潮添, 等. 坛紫菜诱变育种的初步研究. *水产学报*, 2008, 32(3): 327–334]
- DAI J X, ZHANG Q Q, BAO Z M, *et al.* Studies on the pure line culture, mutagenization and interspecific fusion of *Porphyra* protoplasts. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1990, 21(3): 293–296 [戴继勋, 张全启, 包振民, 等. 紫菜原生质体的纯系培育、诱变处理和种间细胞融合的研究. *海洋与湖沼*, 1990, 21(3): 293–296]
- DING H C, FEI Q J, ZHANG P, *et al.* Isolation and characterization of a heat-resistant strain with high yield of *Pyropia haitanensis* induced by ultraviolet ray. *Aquaculture*, 2020, 521: 3031–3041
- ELLIOTT M L, JARDIN E A D, BATSON W E, *et al.* Viability and stability of biological control agent son cotton and snap bean seed. *Pest Management Science* 2001, 57(8): 695–706
- HE P M, QIN S, YAN X J, *et al.* Seaweed biological technology and application. Beijing: Chemical Industry Press, 2007, 59–61 [何培民, 秦松, 严小军, 等. 海藻生物技术及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2007, 59–61]
- HUANG H Z, XIE C T, JI D H, *et al.* Quantitative analysis of pigment gene expression in pigment mutants of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 884–892 [黄惠珍, 谢潮添, 纪德华, 等. 坛紫菜色素突变体色素基因的表达定量分析. *水产学报*, 2012, 36(6): 884–892]
- JEON Y M, SON K H, KIM S M, *et al.* Growth of dropwort plants and their accumulation of bioactive compounds after exposure to UV lamp or LED irradiation. *Horticulture Environment & Biotechnology*, 2018, 59(5): 659–670
- LEE H J, CHOI J I, KIM G H. Characterization of *Porphyra lucasii* pigment mutant induced by gamma irradiation. *Phycological Research*, 2018a, 66(3): 199–208
- LEE H J, CHOI J. Isolation and characterization of a high-growth-rate strain in *Pyropia yezoensis* induced by ethyl methane sulfonate. *Journal of Applied Phycology*, 2018b, 30: 2513–2522
- LI L, YAN X H. Isolation and characterization of a green type mutant in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2006, 15(1): 30–35 [李琳, 严兴洪. 坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析. *上海海洋大学学报*, 2006, 15(1): 30–35]
- LI Y X, WANG G C, XU P, *et al.* Induction and characterization of green pigmentation mutant in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Aquaculture*, 2008, 282: 117–123
- OHME M, KUNIFUJI Y, MIURA A. Cross experiments of the color mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Japanese Journal of Phycology*, 1986, 34(2): 101–106
- PAN X, MAO Y X, WANG J H, *et al.* Effects of UV-B ultraviolet radiation on the physiology and biochemistry of *Pyropia yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 125–132 [潘雪, 茅云翔, 王俊皓, 等. UV-B 紫外辐射对条纹紫菜生理生化的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 125–132]
- PFENDLER S, EINHORN O, ALAOUI-SOSSÉ L, *et al.* Factors inducing bryophyte growth on prehistoric pigments and effect of UV-C treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(3): 2987–2994
- PUESCHEL C M, COLE K M. Rhodophycean pit plugs: An ultrastructural survey with taxonomic implications. *American Journal of Botany*, 1982, 69(5): 703–720
- PUESCHEL C M. Formation of secondary pit connections by conjuctor cells in a coralline red alga. *Phycologia*, 2021, 60(6): 644–652
- REZZAN K, MEHMET U K. Biochemical and color changes of fresh-cut melon (*Cucumis melo* L. cv. Galia) treated with UV-C. *Food Science and Technology*, 2014, 34(3): 547–551
- SLATINSKAYA O V, PROTOPOPOV F F, SEIFULLINA N K, *et al.* A study of the state of photosynthetic pigments of hybrid maize seeds exposed to ultraviolet and radiation. *Biophysics*, 2018, 63(4): 611–620
- WADA S. Dictionary of color names. *Journal of the Franklin Institute*, 1956, 261(4): 442–445
- WANG J F, XU P, ZHU J Y, *et al.* Studies on the pigment mutation in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Progress in Fishery Sciences*, 2007, 28(2): 28–35 [王金锋, 许璞, 朱建一, 等. 紫菜属海藻色素突变的研究. *渔业科学进展*, 2007, 28(2): 28–35]
- WANG S J, ZHENG Y Z, MA L B, *et al.* Gamma-rays induction of mutation in conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 18(1): 47–53
- YAN X H, FUJITA Y, ARUGA Y. High monospore-producing mutants obtained by treatment with MNNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 2004, 512(1/2/3): 133–140
- YAN X H, FUJITA Y, ARUGA Y. Induction and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(1): 69–81
- YAN X H, LI L, ARUGA Y. Cross experiments and analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 1–8 [严兴洪, 李琳, 有贺祐胜. 坛紫菜减数分裂位置的杂交试验分析. *水产学报*, 2006, 30(1): 1–8]
- YAN X H, LIANG Z Q, SONG W L, *et al.* Induction and

- isolation of artificial pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 166–172 [严兴洪, 梁志强, 宋武林, 等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离. *水产学报*, 2005, 29(2): 166–172]
- YAN X H, TANAKA J, ARUGA Y. Isolation and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 221–228 [严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析. *水产学报*, 2000, 24(3): 221–228]
- YAN X H, ZHANG S J, HUANG L B. Induction and isolation of pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) by ^{60}Co - γ ray irradiation. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(1): 56–61 [严兴洪, 张淑娟, 黄林彬. ^{60}Co - γ 射线对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的诱变效果与色素突变体分离. *海洋与湖沼*, 2009, 40(1): 56–61]
- YAN X H. Effects of UV irradiation on the development and variations of protoplast progenies in *Porphyra yezoensis*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 1992, 1(1/2): 71–78 [严兴洪. 紫外线辐射与条斑紫菜原生质体后代发育和变异. *上海海洋大学学报*, 1992, 1(1/2): 71–78]
- ZENG C K, WANG S J, LIU S J, *et al.* Seaweed cultivation. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985, 135–150 [曾呈奎, 王素娟, 刘思俭, 等. 海藻栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 135–150]
- ZENG G X, XU K, XU Y, *et al.* cDNA cloning and functional verification of transcription factor *NhbZIP1* from *Neoporphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 201–209 [曾高雄, 许凯, 徐燕, 等. 坛紫菜转录因子 *NhbZIP1* 克隆和功能验证. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 201–209]
- ZHANG B L, YAN X H, HUANG L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(5): 841–847
- ZHANG H B, HOU H S. Research progress in pigment mutants of *Porphyra*. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(2): 4 [张海波, 侯和胜. 紫菜色素突变体研究进展. *生物技术通讯*, 2007, 18(2): 4]
- ZHANG Q, DING H C, YAN X H, *et al.* Isolation and characterization of pigmentation mutants of *Pyropia crispata* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 526–534 [张倩, 丁洪昌, 严兴洪, 等. 皱紫菜色素突变体的分离与特性分析. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 526–534]
- ZHANG Y, YAN X H. The sex and sex determination in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *The Public Library of Science*, 2013, 8: 1–8
- ZHAO S, YAN X H, DING H C, *et al.* Induction and isolation of pigmentation mutants in *Pyropia suborbiculata* Kjellman (Bangiales, Rhodophyta). *Acta Oceanologica Sinica*, 2019, 41(2): 114–122 [赵爽, 严兴洪, 丁洪昌, 等. 圆紫菜人工色素突变体的诱导与分离. *海洋学报*, 2019, 41(2): 114–122]
- ZHONG C H, ARUGA Y, YAN X H. Morphogenesis and spontaneous chromosome doubling during the parthenogenetic development of haploid female gametophytes in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(4): 2729–2741

(编辑 陈 严)

A Novel Pathway to Produce Color Mutants by Short-Wavelength Ultraviolet Ray Irradiation on the Germinating Conchospore in *Pyropia haitanensis*

TAO Weili^{1,3}, ZHONG Chenhui¹, ZHANG Peng², GUO Chentao¹, WANG Tiegan², LIN Qi^{1①}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, National and Local Joint Engineering Research Center of Marine Biological Seed Industry Technology, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Ultraviolet mutagenesis is a safe and efficient method to induce mutations in laver. It has the advantages of non-pollution, high efficiency, easy operation, and low cost. It has been primarily used for mutagenesis of the filament, protoplast, or blade of cultivated *Pyropia* species, but is rarely used to

① Corresponding author: LIN Qi, E-mail: xmqlin@sina.com

induce genetic mutants from germinating conchospore. The germination period of conchospores is the period of meiosis in *Pyropia haitanensis*. The four progeny cells of germinating conchospores are linearly arranged forming a meiotic tetrad. The tetrad cells that undergo genetic recombination can determine the developmental pattern and segregation of traits in the thallus. In this study, short-wave ultraviolet (UV-C) irradiation with different doses (50, 100, 200, 300, 400, 500, and 600 J/m²) was used to induce color mutants during the germination of conchospores in *P. haitanensis*. The results showed that low-dose irradiation (50 J/m²) promoted the germination of conchospores, while irradiation doses above 100 J/m² inhibited the germination and growth of tetrad germlings. Therefore, low-doses of UV-C irradiation were used in the production to promote the germination of conchospores and improve the production efficiency of laver. In the dose range of 50–400 J/m², the frequency of color chimeras increased with increasing irradiation intensity. When the dose was 300 J/m² and 400 J/m², and the pigmentation mutation rate was 15.22% and 17.18%, respectively, and the death rate of conchospores was 51.70% and 61.00%, respectively. In the dose range of 50–500 J/m², with the increase in UV-C irradiation dose, the proportion of 2-color sectorized chimera showed a trend of first decreasing and then increasing, and the proportion of 3- and 4-color sectorized chimera showed a trend of first increasing and then decreasing. Among them, the regenerated color chimeras that appear were generally 2- and 3-color sectorized chimera, yet the proportion of 4-color sectorized chimera was the least. When the irradiation intensity reached 500 J/m², the majority of the conchospores died, and the death rate was 83.98%, and the frequency of color mutants was significantly lower than that of 300 J/m² and 400 J/m² dose groups. These results indicate that the mutagenesis effect was the best when the dose was 300 or 400 J/m², which was convenient to obtain abundant genetic recombination and genetic variation in progeny cells. In addition, UV-C irradiation also had a significant effect on the early development of conchospores and phenotypes of pigmentation mutant arranged in tetrad germlings, which was mainly manifested in the large number of color-sectorized blades developed from the irradiated conchospores. Simultaneously, UV-C irradiation retarded the development of cells at the top of conchospore germlings, inhibited the development of cells at the middle base toward the poles, and increased the lateral development, resulting in the decrease in blade aspect ratios. Somatic cell germlings with single colored pigmentation were also isolated from color sectorized chimeras by enzymatic hydrolysis. The color species of the five monochromatic mutants obtained were basically consistent with the pigment variant sectors observed on color-sectorized thallus, indicating that the obtained color mutants were derived from a single mutant cell on the maternal color-sectorized thallus. In conclusion, UV-C irradiations can effectively mutate the conchospores of *P. haitanensis*, and appropriate irradiation doses (300 or 400 J/m²) can obtain a certain number of color-sectorized thallus. This study provides a novel pathway for the preparation of artificial color mutants and mutation breeding in *P. haitanensis*.

Key words *Pyropia haitanensis*; Conchospores; Short-wavelength ultraviolet; Color mutants; Isolation

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230314002

http://www.yykxjz.cn/

耿海永, 陈丽华, 杨方, 吴仪, 王淑芬, 姜启兴, 许艳顺, 夏文水. 白鲢鱼糜低气味本底模型的构建研究. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 245–257
GENG H Y, CHEN L H, YANG F, WU Y, WANG S F, JIANG Q X, XU Y S, XIA W S. The construction of a low-odor background model of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 245–257

白鲢鱼糜低气味本底模型的构建研究*

耿海永 陈丽华 杨方^① 吴仪 王淑芬
姜启兴 许艳顺 夏文水

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江南大学食品学院
江苏省食品安全与质量控制协同创新中心 江苏 无锡 214122)

摘要 鱼糜制品(如火锅鱼丸)的风味是消费者关心的质量属性之一, 而关键气味活性物质的吸附释放规律并不明确。现有气味研究主要在配置溶液中进行, 与真实的气味活性物质—固态鱼糜之间的相互作用存在一定差异, 因此, 基于固态鱼糜进行气味研究是十分必要的, 其关键在于一个无气味或低气味的鱼糜本底模型, 从而可进一步研究各气味成分与鱼糜本底模型的互作关系。本研究考察了 8 种不同漂洗介质对鱼糜本底模型气味残留的影响。结果表明, 白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)鱼糜经 SPME-GC-MS 共检出 65 种挥发性物质, 气味活性物质(OAV>1)有 18 种; 经 8 种漂洗介质处理后, 鱼糜样品中分别含有 6、8、7、9、6、12、9 和 9 种气味活性物质, 挥发性气味物质的残留率依次为(0.380±0.120)%、(0.610±0.086)%、(0.280±0.033)%、(0.480±0.037)%、(0.150±0.018)%、(4.330±0.160)%、(18.680±0.081)%和(0.490±0.003)%。综合 SPME-GC-MS、电子鼻和感官评价结果比较, 1% NaCl (W/W) + 1% Na₂CO₃ (W/W) + 4.0% C₂H₅OH (V/W)漂洗介质处理后, 白鲢鱼糜的挥发性气味物质残留少, 总含量降低为(6.57±0.77) μg/kg, 17 种气味活性物质的 OAV<1, 仅壬醛的 OAV 为 1.34±0.05, 可构建出低气味的鱼糜本底模型。

关键词 白鲢; 鱼糜气味本底模型; 挥发性物质; 固相微萃取/气质联用; 气味活度值; 电子鼻
中图分类号 TS254.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0245-13

我国渔业总产量已连续多年居世界首位, 其中, 淡水鱼的养殖产量占世界 2/3 以上, 2021 年我国淡水养殖产量达到 3 183.27 万 t, 相比 2020 年增长了 3.06%(农业农村部渔业渔政管理局等, 2022)。白鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)是我国淡水鱼中资源丰富、产量巨大的鱼类之一, 但因其肉薄且骨刺较多、土霉味与鱼腥味较重且不易去除、不宜生鲜食用, 并不十分受广大消费者的喜欢。另外, 白鲢产量充足、

成本低廉, 具有低脂肪、高蛋白等优点, 是制作鱼糜的经济性选择, 目前已被广泛应用于工业化生产鱼糜制品(孙静文, 2016)。鱼糜制品如鱼丸、鱼肠、鱼糕等属于低脂肪、高蛋白的营养健康食品, 深受消费者喜爱(唐淑玮等, 2019), 且其风味是消费者关心的质量属性之一, 而关键气味活性物质的吸附释放规律并不明确。现有对鱼糜气味研究技术十分丰富, 主要为仪器分析法(气相色谱-质谱联用、气相色谱-嗅觉测

* 国家大宗淡水鱼产业技术体系(CARS-45)、江苏省现代农业重点及面上项目“‘三减’健康美味休闲肉制品创制关键技术研究与应用”(BE2021319)和江苏省大宗淡水鱼体系(JATS [2022] 507)共同资助。耿海永, E-mail: haiyonggeng@163.com

^① 通信作者: 杨方, 副研究员, E-mail: yangfang_8_9@126.com

收稿日期: 2023-03-14, 收修改稿日期: 2023-04-22

定法、气相色谱-嗅闻-质谱联用、电子鼻技术等)、感官组学分析法(气味活度值、芳香提取物稀释分析、气味重组、气味遗漏实验等)和酶联免疫法(ELISA)等。目前, 气味感官实验的研究对象大多为米酒类、油类、蔬果类、菌类等(Xu *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021; 卢祺, 2022), 且现有气味研究主要在配置溶液中进行, 主要采用液体模拟体系的气味重组(An *et al.*, 2020; 王国超等, 2012), 这与真实的气味活性物质-固态鱼糜之间的相互作用存在一定差异, 因此, 基于固态鱼糜进行气味研究是十分必要的, 可以更好地研究各气味成分与鱼糜无气味本底之间的互作关系。

如何基于固态鱼糜构建气味重组或缺失模型, 首先要建立一个无气味或低气味的鱼糜本底模型。淡水鱼气味中有多种复杂成分, 主要包括醛类、醇类、酮类、烃类和少量的呋喃类等(王国超等, 2012)。气味物质来源复杂, 主要有养殖环境中存在的土臭素(GEO)和二甲基异茨醇(MIB)、酶的催化分解、游离脂肪酸的氧化分解等因素导致(吴燕燕等, 2016)。目前, 鱼糜加工过程中减少气味残留的方法主要有物理法(感官掩蔽法、浸泡或漂洗法、吸附法、微胶囊法、包埋法、辐照法、电渗析法)、化学法(酸碱盐法、抗氧化剂法、有机溶剂萃取法、臭氧法)、生物法(酵母菌、乳酸菌、醋酸杆菌发酵)等(柳敏, 2015; 苏怡等, 2019; 杨运懿, 2021), 其中, 物理法是应用历史最久的方法, 化学法在鱼糜制品的生产实践中有广泛的应用, 生物法具有去除率高、环境友好、成本低等特点(Yuan *et al.*, 2021)。然而, 国内外报道中关于漂洗鱼糜的研究大多是基于如何更好地应用于食品体系, 在漂洗试剂的选择上存在一定局限性, 对腥味的洗脱能力受限, 腥味成分残留仍较多, 无法用于构建无腥味或低腥味鱼糜模型。因此, 本研究选择盐、盐-醇、酸、碱等漂洗介质, 并不限于食品体系, 通过比较不同漂洗介质对鱼糜气味的脱除效果, 以此构建出无气味或低气味的鱼糜本底模型。

固相微萃取(SPME)具有操作简单、灵敏度高、重现性好的优点, 可以获得更真实的分析结果(Ma *et al.*, 2013)。气相色谱-质谱(GC-MS)是分离和鉴定挥发性化合物的常用方法, 已广泛应用于挥发性化合物分析(Iglesias *et al.*, 2009)。电子鼻是一种分析、识别和检测简单和复杂气味的仪器。因其测定结果客观、重复性好、不损伤样品及快捷等特点, 可以客观地判断不同样品间的挥发性气味是否具有差异性, 被广泛地运用于水产品挥发性物质检测, 为其气味和品质鉴定提供参考依据(杨欣怡等, 2015; 康翠翠等, 2018; 赵玲等, 2021)。本研究以白鲢鱼糜为研究对象, 通过

SPME-GC-MS、电子鼻以及感官评价方法研究鱼糜中挥发性风味物质和盐、盐-醇、酸、碱等漂洗介质对气味物质残留率的影响, 对于建立无气味或低气味的固体鱼糜模型有一定的学术指导意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲜活白鲢鱼购自江苏省无锡市滨湖区欧尚超市, 所选鱼体平均质量为 (2.5 ± 0.2) kg/尾, 于2021年3月下旬至4月中旬采购; 2,4,6-三甲基吡啶标准品(trimethyl pyridine, TMP)购于上海百灵威科技公司; NaCl、无水乙醇、 Na_2CO_3 、 CaCl_2 、HCl 和 NaOH 等化学试剂均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

MDF-U53V 型超低温冰箱, 日本三洋公司; 多功能食品加工机, 浙江温州福菱科技有限公司; 4K15 冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; T10 Basic ULTRA-TURRAX 均质机, 广州 IKA 仪器设备有限公司; 卧式冷藏冷冻转换柜, 山东青岛海尔电冰柜有限公司; TSQ 8000 型三重四级杆气质联用仪(GC-MS), 美国赛默飞世尔科技公司; Heracles II 型快速气相色谱电子鼻, 法国 Alpha MOS S.A. 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 新鲜白鲢鱼宰杀后去鳞、去头、去内脏、去除血块和黑色腹膜, 然后清洗 3~5 次, 从背部切成两半, 去除椎骨, 手工剥离鱼刺, 以获得白肉。由斩拌机绞碎获得白鲢生鲜鱼糜, 用聚乙烯自封袋包装, 储存在冰箱($-20\text{ }^\circ\text{C}$)中备用。

1.3.2 白鲢鱼糜的漂洗方法 鱼糜样品在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下解冻 12 h, 并用漂洗液处理。实验中所用的不同漂洗介质溶液见表 1。参照 Zhou 等(2016), 漂洗介质 A、B、C、D、E 和 F 组的具体漂洗步骤如下: 解冻后的鱼肉样品分别取相同质量, 每个样品漂洗 3 次(5 倍于鱼肉体积的漂洗液), 每次漂洗时间为 15 min, 漂洗后进行冷冻离心脱水($4\text{ }^\circ\text{C}$, 4 000 r/min, 4 min), 以此得到漂洗鱼糜。

漂洗介质 G 组和 H 组的具体漂洗步骤如下: 解冻后的鱼肉样品加入 5 倍体积的蒸馏水, 用均质机缓慢搅拌, 同时缓慢滴加几滴 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调整 pH, pH 分别调到预定值 2.3 (G 组)和 11.8 (H 组), 再搅拌 15 min; 然后离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, 10 000 r/min, 20 min), 去掉沉淀。调整上清液 pH 值到 5.5, 再次

离心(4 °C, 10 000 r/min, 20 min), 下层沉淀即为所得漂洗鱼糜。

以上各介质均溶解在蒸馏水中, 且它们的使用浓度均经预实验优化过。考虑到乙醇具有很强的挥发性, 大量的乙醇在 SPME 提取时可能会吸附到萃取头, 影响其他挥发性成分的吸附。因此, 在冲洗的最后步骤, 漂洗液与鱼糜通过离心分离, 并用清水清洗一次, 确保各漂洗介质在鱼糜中无残留。样品封装于铝箔袋中, 于-80 °C 超低温冰箱中贮存待测。整个过程均在 0~10 °C 下操作。

表 1 不同漂洗介质的组成

Tab.1 The components of different rinsing media

| 组别 Groups | 漂洗介质 Rinse media |
|-----------|--|
| A | 0.5% NaCl (W/W) + 0.35% Na ₂ CO ₃ (W/W) + 4.0 % C ₂ H ₅ OH (V/W) |
| B | 0.5% NaCl (W/W) + 0.35% Na ₂ CO ₃ (W/W) |
| C | 0.5% CaCl ₂ (W/W) + 0.35% Na ₂ CO ₃ (W/W) + 4.0% C ₂ H ₅ OH (V/W) |
| D | 0.5% CaCl ₂ (W/W) + 0.35% Na ₂ CO ₃ (W/W) |
| E | 1% NaCl (W/W) + 1% Na ₂ CO ₃ (W/W) + 4.0 % C ₂ H ₅ OH (V/W) |
| F | 1% NaCl (W/W) + 1% Na ₂ CO ₃ (W/W) |
| G | 1 mol/L HCl |
| H | 1 mol/L NaOH |

1.3.3 GC-MS 测定挥发性成分的条件 固相微萃取法(SPME)条件: 样品在提取前按照 Gao 等(2016)的方法制备, 并进行了一些修改。将 3.0 g 样品放入 20 mL 的棕色顶空瓶中, 加入 7 mL 饱和 NaCl 溶液和 2,4,6-三甲基吡啶(2,4,6-trimethyl pyridine, TMP, 100 mg/kg), 并放入磁力转子, 迅速加盖。纤维萃取头(65 μm, PDMS/DVB)插入样品瓶的顶空, 在 60 °C 吸附 30 min 后, 在 250 °C 的注入口解吸 3 min。

气相色谱(GC)条件(Gao *et al.*, 2020): 使用 TG-5 毛细管柱(60.00 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 载气为 He, 恒定流量 1.0 mL/min。升温程序: 初始温度 40 °C; 初始时间 3 min; 进样口温度 280 °C; 柱温 40 °C, 保持 2 min, 以 5 °C/min 升至 90 °C, 保持 5 min; 不分流模式进样。

质谱(MS)条件: 使用 EI 离子源, 离子源温度 300 °C, 发射电流 25 μA; 电子能量 70 eV; 质量扫描范围设定 35~350 m/z; 接口温度 280 °C; 探测器电压 1 000 V。

1.3.4 定性和定量分析 定性: 挥发性化合物根据系统自带的 NIST 2008 和 Willey 7 标准图库以及文献报道的色谱数据进行定性匹配, 且仅当正反匹配度均大于 800 (最大值为 1 000)的化合物才予以报道。同

时, 以 C7~C40 的正构烷烃作为标准品, 利用标准品的保留时间计算出各个样品中化合物的保留指数, 和文献中的保留指数进行对比, 结合数据库的分析结果, 共同对萃取出的挥发性化合物进行定性分析(康翠翠等, 2018)。

定量: 将 10 μL 原始质量分数为 100 mg/kg 的内标物 2,4,6-三甲基吡啶(TMP)加入(3.000±0.006) g 鱼糜样品中, 通过将各化合物的峰面积与 TMP 的峰面积进行比较, 计算出样品中挥发性化合物的浓度, 单位为 μg/kg (假定各挥发物的绝对校正因子为 1.0)。计算公式如下:

$$\text{挥发性组分的质量分数} = [(A_x \times A_T^{-1}) \times m_T] \times m_x^{-1} \times 10^3$$

式中, A_x 、 A_T 分别为挥发性组分 x 与 TMP 的峰面积, m_T 是加入的 TMP 的质量(μg), m_x 是被测样品的质量(g)(Gu *et al.*, 2013)。

1.3.5 关键气味化合物的确定 为评价白鲢鱼糜气味成分的贡献, 利用气味活度值公式:

$$\text{OAV}_x = C_x / \text{OT}_x$$

式中, OAV_x 表示各风味物质的气味活度值, C_x 表示各化合物的浓度, OT_x 表示各化合物在水中的检测阈值, 其中, $\text{OAV} \geq 1$ 的化合物可定义为气味活性化合物(Xu *et al.*, 2021)。

1.3.6 挥发物残留率的计算方法 漂洗介质的漂洗效果用残留率 R 表示。计算公式如下:

$$R = C_x / C_o \times 100\%$$

式中, C_x 和 C_o 分别为实验组和对照组漂洗后组分 x 检测出的质量分数(μg/kg) (张建友等, 2015)。

1.3.7 电子鼻分析 参考 Wen 等(2020)的方法并稍加修改, 分别准确称取 2.0 g 前处理好的鱼糜样品置于 20 mL 顶空瓶中, 样品气味比较通过 Heracles II 电子鼻进行分析(包含 DB-5 和 DB-1701 柱子, 10.00 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent), 采用自动顶空进样, 每个样品重复 3 次测定。检测条件如下: 在 40 °C 下保温 30 min, FID 检测器温度为 250 °C, 氢火焰离子化检测器温度 260 °C; 捕集温度 50 °C; 阀门温度 250 °C; 进样口温度 200 °C; 进样量 3 000 μL; 进样速度 125 μL/s。柱温从起始柱温 50 °C 以 2 °C/min 逐渐升至 250 °C。

1.3.8 感官评价 鱼糜样品的感官特性由 10 名小组成员(2 男 8 女)以 5 分制进行评估(5 分, 非常强; 4 分, 强; 3 分, 中等; 2 分, 弱; 1 分, 非常弱)(An *et al.*, 2020)。选取脂肪味、鱼腥味、青草味、泥土味、蘑菇味和金属味 6 种气味属性作为感官评价指标, 来评估样品的强度, 结果绘制在雷达图中。所有测试均在室温(22±2) °C 下进行, 每个取样一式 3 份进行。

1.4 数据处理

所有实验重复 3 次, 定量结果用“平均值±标准差”(Mean±SD)表示。通过 Excel 2019 进行数据处理; SPSS 19.0 中的 Duncan 多范围检验评估平均差异方法($P<0.05$)进行显著性分析; Origin 2019b 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 白鲢生鲜鱼糜挥发性成分鉴定

经 SPME-GC-MS 检测分析, 白鲢鱼糜中具体挥发性物质组成及含量如附表 1 所示。经 NIST 谱库检索, 白鲢鱼糜中共确定 65 种挥发性物质, 其成分主要有醛类(23 种)、醇类(13 种)、酮类(10 种)、烷烃类(7 种)和其他类物质(12 种), 各类物质的相对百分含量分别为 37.78%、24.34%、8.83%、2.90%和 9.14%, 其中, 醛类和醇类物质百分含量最高, 对鱼糜的气味起主要作用, 这与文献中已报道的白鲢鱼糜气味组成成分基本相符(An *et al*, 2020; Zhou *et al*, 2016; Geng *et al*, 2022)。经仪器检测的这些气味物质成分中, 醛类中戊醛、己醛、庚醛、辛醛、壬醛含量较高, 分别占总含量的 1.76%、21.10%、3.22%、2.84%和 4.94%; 醇类中正戊醇、正己醇、庚醇、1-辛烯-3-醇、辛醇含量较高, 分别占总含量的 1.31%、6.00%、2.02%、8.31%和 3.4%; 酮类中 2-庚酮、2,5-辛二酮含量较高, 分别占总含量的 1.10%和 5.21%; 烃类化合物中 3,5,5-三甲基-2-己烯含量较高, 占总含量的 1.15%; 其他化合物中氨基甲酸、2-乙基咪喃、八甲基环四硅氧烷含量较高, 分别占总含量的 1.92%、1.54%和 3.10%, 其中, 八甲基环四硅氧烷可能是萃取头涂层上的物质脱落而致。有 18 种物质的气味活度值 $OAV \geq 1$, 如附表 1 所示, 分别是戊醛、己醛、庚醛、辛醛、(E)-2-辛烯醛、壬醛、(E)-2-壬烯醛、癸醛、(E)-2-癸烯醛、十一醛、正己醇、庚醇、1-辛烯-3-醇、辛醇、1-壬醇、2-乙基咪喃、2-戊基咪喃和乙酸乙酯。

2.2 不同漂洗介质对白鲢鱼糜挥发性物质的影响

白鲢鱼糜中气味物质组成复杂, 部分气味物质会与蛋白质等大分子物质结合的形式存在(蒋娅婷等, 2014)。采用不同漂洗介质处理, 不仅可以通过直接漂洗达到脱脂脱腥的目的, 还可以通过破坏气味物质与蛋白等大分子物质之间的结合作用力而达到降低气味残留量的目的(柳敏, 2015)。不同漂洗工艺对白鲢鱼糜挥发性物质的影响如表 2 所示。经 8 种漂洗介质处理后, 鱼糜中挥发性物质均有明显减少, 样品中

分别含有 6、8、7、9、6、12、9 和 9 种气味活性物质, 挥发性气味物质的残留量依次为 16.53 ± 5.11 、 26.72 ± 3.73 、 12.08 ± 1.42 、 21.03 ± 1.59 、 6.57 ± 0.77 、 188.68 ± 6.77 、 812.68 ± 3.54 和 $(21.27 \pm 0.12) \mu\text{g}/\text{kg}$, 其气味残留率分别为 $(0.380 \pm 0.120)\%$ 、 $(0.610 \pm 0.086)\%$ 、 $(0.280 \pm 0.033)\%$ 、 $(0.480 \pm 0.037)\%$ 、 $(0.150 \pm 0.018)\%$ 、 $(4.330 \pm 0.160)\%$ 、 $(18.680 \pm 0.081)\%$ 和 $(0.490 \pm 0.003)\%$, 其中, 漂洗液 A、B、C、D、E 和 H 组这 6 组漂洗方式对白鲢鱼糜处理后, 对醛类物质中的戊醛、己醛、庚醛、辛醛、壬醛和醇类物质中的正己醇、庚醇、1-辛烯-3-醇、辛醇等有明显影响, 均大大降低了气味残留率。但漂洗液 F 组对醛类物质中的己醛气味残留量高达 $(145.53 \pm 4.88) \mu\text{g}/\text{kg}$, 漂洗液 G 组对醛类物质中的戊醛、己醛、庚醛、壬醛和醇类物质中的正己醇、1-辛烯-3-醇起不到良好的去除作用, 原因可能是溶液浓度过高, 可能导致部分鱼糜中的蛋白质变性, 造成蛋白网络结构的物理阻碍, 从而产生更多的挥发性物质。比较 8 种漂洗介质, 发现漂洗液 E 组对鱼糜气味残留的影响较佳, 挥发性物质总含量最低, 其中, 漂洗后己醛和 1-辛烯-3-醇的残留量分别为 2.93 ± 0.32 和 $(0.26 \pm 0.09) \mu\text{g}/\text{kg}$, 各自的气味残留率仅为 0.18%和 0.04%。

NaCl 和 Na_2CO_3 是常用的漂洗介质, NaCl 和 Na_2CO_3 共存的状态下, 水产品中气味成分先与 Na_2CO_3 发生反应生成无腥味的物质, 后者进一步在 NaCl 的作用下从水产品中析出(柳敏, 2015)。 Na^+ 和 Ca^{2+} 等离子的存在能溶出鱼糜中的血红蛋白, 蛋白质损失增加, 削弱了与挥发性气味物质的结合能力, 进而促使溶液中挥发性物质的释放。 Na_2CO_3 可与气味成分反应生成无腥味的物质, 也可将容易降解成醛酮类物质的油脂水解成能溶于水的高级脂肪酸钠盐和甘油(游丽君等, 2008), 从而达到降低气味残留率的目的。图 1 显示了不同漂洗介质对 18 种气味活性物质 OAV 减少量的影响。OAV 变化可以表明不同的漂洗介质可能会导致样品的整体气味分布发生显著变化(Zhou *et al*, 2016)。结合表 2 和图 1 可知, 在 8 组漂洗介质中, 18 种气味活性物质的 OAV 总值分别降低为 7.66 ± 2.56 、 11.02 ± 2.62 、 4.80 ± 0.99 、 9.93 ± 0.68 、 2.52 ± 0.25 、 50.27 ± 1.61 、 283.22 ± 1.60 和 8.77 ± 0.04 , 其中, 漂洗液 E 组对 OAV 的影响最明显; (E)-2-辛烯醛、(E)-2-壬烯醛、癸醛、(E)-2-癸烯醛、十一醛和 2-戊基咪喃等 6 种气味活性物质均未检出气味残留量, 其 OAV 减少率达到最大; 己醛、辛醛、壬醛和 1-辛烯-3-醇的 OAV 下降幅度较大, 其 OAV 减少量均在 200 以上。综上所述, 漂洗液 E 组在加入 4.0%乙醇

表 2 不同漂洗介质处理后气味活性物质的残留量

Tab.2 Residual amount of odour active substances after treatment with different rinsing media/($\mu\text{g}/\text{kg}$)

| 挥发性物质 Volatile substance | 气味阈值 Odor threshold ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 漂洗介质 Rinsing medium | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Control | A | B | C | D | E | F | G | H |
| 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 5.00 | 5.28±1.51 ^{ab} | 1.96±0.79 ^c | 1.56±0.21 ^c | 1.37±0.00 ^c | 1.59±0.00 ^c | 1.04±0.18 ^d | 0.77±0.04 ^e | 7.08±0.09 ^a | 1.24±0.02 ^d |
| 戊醛 Pentanal | 1.00 | 132.73±51.28 ^a | 0.84±0.40 ^{de} | 0.99±0.10 ^d | 0.40±0.03 ^e | 0.87±0.07 ^d | 0.35±0.03 ^e | 4.42±0.02 ^c | 64.11±0.25 ^b | 0.81±0.01 ^d |
| 己醛 Hexanal | 5.00 | 1591.25±220.21 ^a | 6.39±1.38 ^e | 9.17±0.65 ^{de} | 4.22±0.17 ^e | 9.50±0.81 ^d | 2.93±0.32 ^f | 145.53±4.88 ^c | 332.92±0.58 ^b | 9.48±0.02 ^d |
| 庚醛 Heptanal | 2.80 | 242.84±0.75 ^a | 1.12±0.40 ^{ef} | 3.12±0.13 ^c | 0.84±0.03 ^f | 1.56±0.10 ^e | 0.52±0.09 ^g | 3.64±0.17 ^c | 54.84±0.11 ^b | 2.41±0.02 ^d |
| 辛醛 Octanal | 0.59 | 214.18±27.15 ^a | 0 | 0 | 0 | 0.92±0.00 ^c | 0 | 4.00±0.10 ^b | 0 | 0 |
| (E)-2-辛烯醛 (E)-2-Octenal | 3.00 | 30.17±0.75 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 壬醛 Nonanal | 1.10 | 372.55±45.25 ^a | 5.64±2.14 ^{de} | 7.79±2.59 ^{cd} | 2.78±0.63 ^e | 4.79±0.34 ^d | 1.47±0.06 ^f | 9.74±0.06 ^c | 60.14±0.87 ^b | 5.45±0.01 ^d |
| (E)-2-壬烯醛 (E)-2-Nonenal | 0.08 | 9.80±2.26 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 癸醛 Decanal | 2.00 | 12.82±2.26 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (E)-2-癸烯醛 (E)-2-Decenal | 0.30 | 10.56±3.02 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 十一醛 Undecanal | 5.00 | 7.54±1.51 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 正己醇 1-Hexanol | 0.20 | 452.49±35.44 ^a | 0 | 0 | 1.22±0.00 ^d | 0.65±0.03 ^e | 0 | 2.34±0.11 ^c | 119.52±0.67 ^b | 0.30±0.01 ^f |
| 庚醇 Heptanol | 0.43 | 152.34±16.59 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.22±0.23 ^b | 0 | 0.75±0.01 ^c |
| 1-辛醇-3-醇 1-Octen-3-ol | 1.50 | 626.70±67.12 ^a | 0.58±0.00 ^e | 0.88±0.05 ^e | 0.85±0.56 ^{ef} | 1.62±0.24 ^d | 0.26±0.09 ^f | 4.36±0.40 ^c | 166.45±0.30 ^b | 0.83±0.02 ^e |
| 辛醇 Octanol | 0.13 | 256.41±45.25 ^a | 0 | 3.21±0.00 ^c | 0 | 0 | 0 | 8.45±0.74 ^b | 0 | 0 |
| 1-壬醇 1-Nonanol | 1.00 | 61.84±13.57 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.98±0.02 ^b | 0 | 0 |
| 2-乙基呋喃 2-Ethylfuran | 2.30 | 116.14±33.94 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.62±0.67 ^b | 0 |
| 2-戊基呋喃 2-Pentylfuran | 5.80 | 54.30±2.26 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合计 Subtotal | | 4 349.94±558.06 ^a | 16.53±5.11 ^{de} | 26.72±3.73 ^d | 12.08±1.42 ^e | 21.03±1.59 ^d | 6.57±0.77 ^f | 188.68±6.77 ^c | 812.68±3.54 ^b | 21.27±0.12 ^d |

注: 不同字母表示同一行数值差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Data with different letters indicated significant differences in the same row ($P<0.05$).

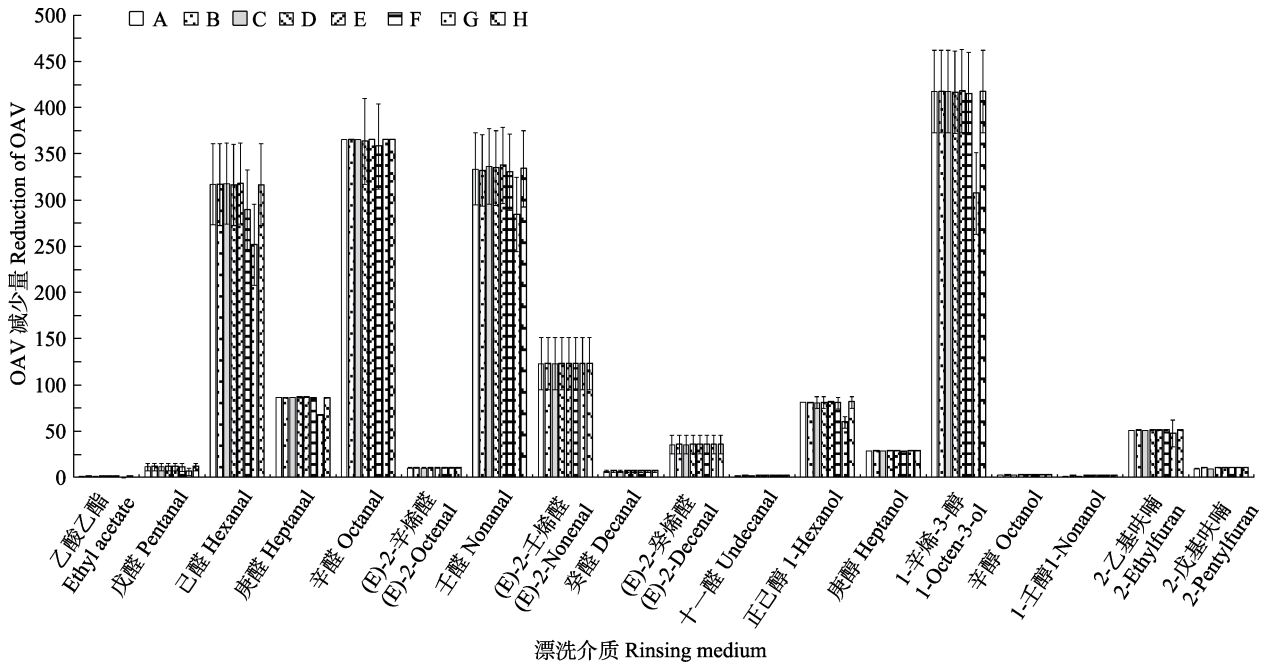


图1 不同漂洗介质对气味活性物质 OAV 的影响

Fig.1 Effects of different rinsing media on OAV of odor active substances

A、B、C、D、E、F、G 和 H 依次为漂洗介质 A、B、C、D、E、F、G 和 H 处理后的鱼糜样品。下同。

A, B, C, D, E, F, G and H were the surimi samples treated with rinsing medium A, B, C, D, E, F, G and H, respectively. The same below.

(V/W)溶液后,有17种气味活性物质的 OAV < 1,仅壬醛的 OAV 为 1.34 ± 0.05 ,这对降低鱼糜气味残留起到了很好的协同增效作用。乙醇的加入,由于相似相容原理,有利于鱼糜脂质的酯化,加快了气味成分的溶出;同时使鱼糜表面脱水,通过溶质浓缩效应造成蛋白质变性,从而破坏挥发性气味物质与蛋白质等大分子物质之间的结合作用力,而高浓度的 NaCl 加速蛋白变性,促进溶液中挥发性物质的释放,大大降低了气味物质中醛类和醇类的残留率,从而可构建出低气味的鱼糜本底模型。

2.3 电子鼻分析

主成分分析法(principal component analysis, PCA)是将传感器提取的原多维矩阵数列通过降维、数据处理和线性分类转换为互不相关的几个综合指标的方法(郑舒文等, 2019)。PCA 作为一种常用的降维分析方法,能够将不同样品按照主成分划分在不同的区域,区域之间的距离表示不同样品之间的差异(吴丹等, 2022)。电子鼻响应数据的 PCA 分析结果如图 2a 所示。PCA 图由 2 个轴 PC1 和 PC2 组成,其中,PC1 的方差贡献率为 99.993 0%, PC2 的方差贡献率为 0.004 5%, 2 组总贡献率为 99.997 5%,表明 PC1 和 PC2 2 个主要成分可以代表几种被测试样品的整体气味特

征。从图 2a 中可以看出, A 组和 E 组样品与新鲜鱼糜样品在 PC1 的距离远大于其他样品,在气味上有部分相似,表明漂洗介质 A 组和 E 组的漂洗效果更为明显。判别因子分析法(discriminant factor analysis, DFA)是用少数几个因子来描述多个因素之间的联系与差异,通过 DFA 分析可以使样品组间距离最大的同时保证组内差异最小,进行定性判别,对样品间的差异较 PCA 有更好的区分度(吴丹等, 2022)。根据 DFA 分析结果, DF1 和 DF2 方差贡献率分别为 85.714%和 9.493%。95.207%的总体方差贡献率,表明 DFA 分析能有效区别各组样品的气味差异。根据图 2b 可知, A 组和 E 组与新鲜鱼糜样品距离较远。电子鼻分析结果与 GC-MS 分析结果基本一致,进一步证实 A 组和 E 组的漂洗处理都能有效降低鱼糜的气味残留量。

2.4 感官评价

不同鱼糜样品漂洗前后的气味感官雷达图如图 3 所示。与新鲜白鲢鱼糜样品的感官评分相比, 8 种漂洗介质处理后的样品都影响了鱼糜的气味感官轮廓,在一定程度上都降低了各个气味属性的评分,尤其是漂洗介质 A、B、C、D 和 E 组漂洗处理后,对“鱼腥味”、“脂肪味”、“泥土味”、“青草味”、“蘑菇味”和“金属味”等 6 种气味属性均有显著影响,这与 GC-MS 和电子

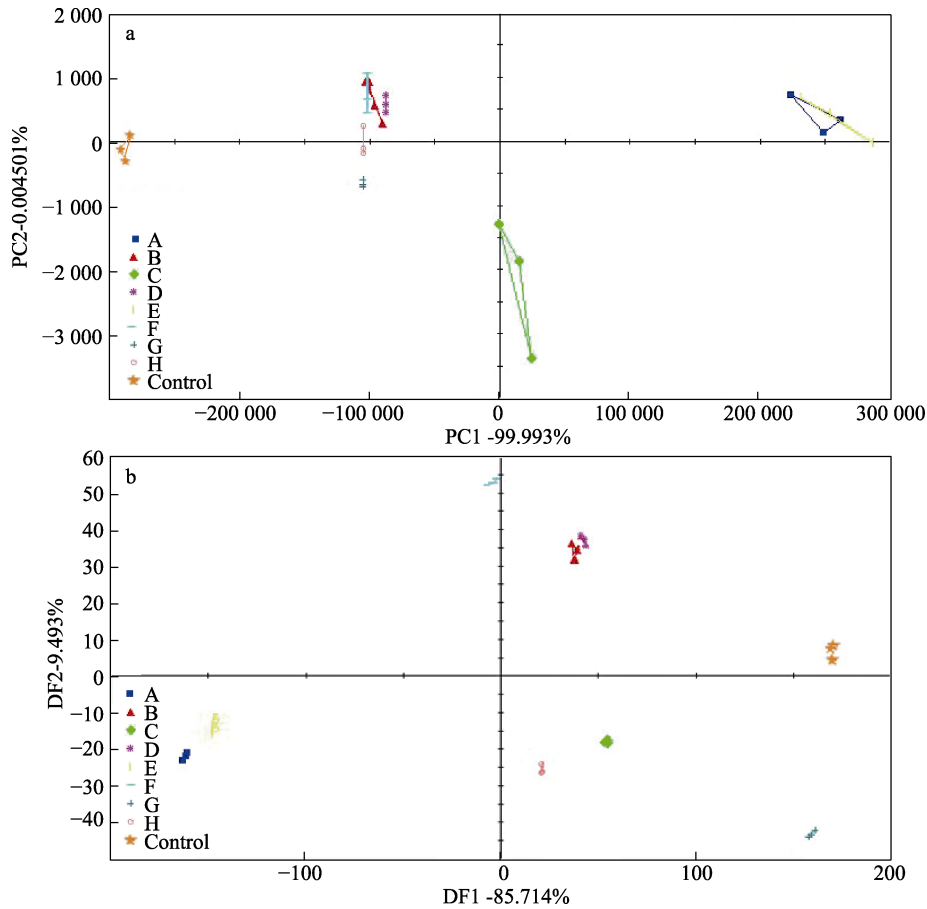


图 2 不同鱼糜样本电子鼻响应数据的 PCA(a)和 DFA(b)
Fig.2 PCA (a) and DFA (b) of e-nose response data for different surimi samples

Control: 新鲜鱼糜。下同。
Control: Fresh surimi. The same below.

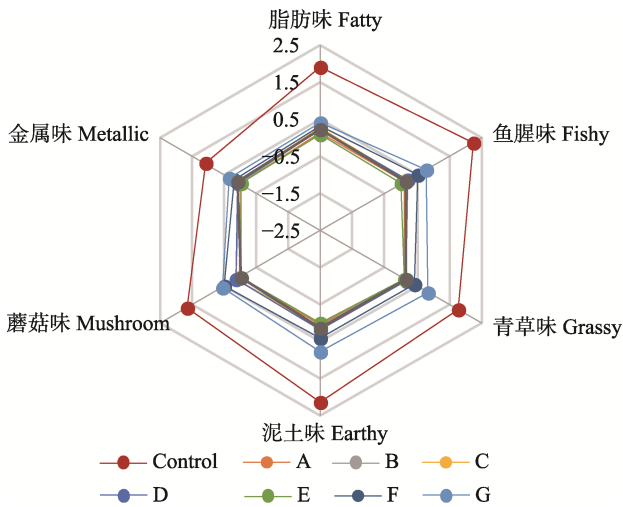


图 3 不同鱼糜样品的气味感官雷达图
Fig.3 Odor sensory radar chart of different surimi samples

鼻的分析结果基本一致。然而,该感官评价实验并不能够很好地区分漂洗后的不同鱼糜样品,尤其是对于 A、B、C、D 和 E 组漂洗介质,它们各气味属性得到的感

官评分值基本在同一水平位置,在雷达图(图 3)中的感官轮廓很难区分开来。其中, E 组漂洗处理后对各气味属性的影响较为明显,6 种气味属性的感官评分值基本为 0,说明漂洗后的样品已经达到了低气味的水平,符合低气味固体鱼糜模型的构建标准。

3 结论

经 SPME-GC-MS 分析,在白鲢鱼糜中共检出 65 种挥发性物质,主要包括醛类 22 种、醇类 13 种、酮类 9 种及烃类 7 种等,其中,醛类和醇类物质含量较高,对白鲢鱼糜的气味有主要的贡献作用。采用气味活度值法(OAV ≥ 1),共鉴定出 18 种气味活性物质,这有助于说明气味活性物质贡献了鱼糜整体气味。由 GC-MS 分析结果可知,8 种漂洗介质在不同程度上洗去或释放了白鲢鱼糜中气味活性物质的残留量,从而影响了样品的整体气味贡献。相较于其他漂洗介质,漂洗介质 E 组由于乙醇的协同作用,检出的挥发性物质

最少, 气味活性物质的总残留量为 (6.57 ± 0.77) $\mu\text{g}/\text{kg}$, 总残留率仅为 0.154%, OAV 总值降低至 2.52 ± 0.25 , 对气味物质的去除效果最佳。同时, 电子鼻检测和感官评价也区分了不同漂洗样品和新鲜鱼糜之间的整体气味特征差异。该研究对于建立低气味的固体鱼糜模型有一定的学术指导意义, 为感官组学分析提供了一种新思路。

参 考 文 献

- AN Y Q, QIAN Y P, MAGANA A A, *et al.* Comparative characterization of aroma compounds in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), Pacific whiting (*Merluccius productus*), and Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi by aroma extract dilution analysis, odour activity value, and aroma recombination studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68: 10403–10413
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2022*. Beijing: China Agriculture Press, 2022 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2022]
- GAO P, JIANG Q X, XU Y S, *et al.* Aroma profiles of commercial Chinese traditional fermented fish (Suan yu) in Western Hunan: GC-MS, odour activity value and sensory evaluation by partial least squares regression. *International Journal of Food Properties*, 2020, 23(1): 213–226
- GAO P, WANG W X, JIANG Q X, *et al.* Effect of autochthonous starter cultures on the volatile flavour compounds of Chinese traditional fermented fish (Suan yu). *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, 51(7): 1630–1637
- GENG H Y, CHEN L H, WANG S F, *et al.* Analysis of volatile compounds contributing to distinctive odour of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi. *International Journal of Food Science and Technology*, 2022, 57: 7774–7786
- GU S Q, WANG X C, TAO N N, *et al.* Characterization of volation of volatile compounds in different edible parts of steamed Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Research International*, 2013, 54(4): 81–92
- IGLESIAS J, MEDINA I, BIANCHI F, *et al.* Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2009, 115(4): 1473–1478
- JIANG Y T, CAO J X, ZHANG Y L, *et al.* A proceeding of research in the interactions of protein with volatile flavor compounds. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(02): 285–291 [蒋娅婷, 曹锦轩, 张玉林, 等. 蛋白质与挥发性风味成分相互作用研究进展. 核农学报, 2014, 28(02): 285–291]
- KANG C C, SHI W Z, FANG L, *et al.* Effects of different freezing methods on the volatile components of grass carp meat. *Food Science*, 2018, 39(14): 229–235 [康翠翠, 施文正, 方林, 等. 不同冻结方式对草鱼肉挥发性成分的影响. 食品科学, 2018, 39(14): 229–235]
- LIU M. Study on the volatile compounds and their combination to proteins of silver carp. Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2015 [柳敏. 白鲢鱼肉挥发性风味物质分析及其与蛋白质结合研究. 浙江工业大学硕士研究生学位论文, 2015]
- LU Q. Identification of American silver carp and characterization of key odor compounds. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 [卢祺. 冷冻美国鲢鱼气味识别及其特征性关键气味物质研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- MA Q L, HAMID N, BEKHIT A E D, *et al.* Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass (GC-MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. *Microchemical Journal*, 2013, 111: 16–24
- SU Y, JIANG Q X, XIA W S. Comparison of effects of different deodorization methods on deodorizing sturgeon fish (*Acipenser sinensis*). *Food Science and Technology*, 2019, 44(10): 138–146 [苏怡, 姜启兴, 夏文水. 不同脱腥方法对鲟鱼肉脱腥效果的比较研究. 食品科技, 2019, 44(10): 138–146]
- SUN J W. Effects of washing on proteins and gel properties of grass carp and silver carp surimi. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 [孙静文. 不同漂洗对草鱼和白鲢鱼糜蛋白及其凝胶性能的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- SUN X Z, DU J W, XIONG Y Q, *et al.* Characterization of the key aroma compounds in Chinese JingJiu by quantitative measurements, aroma recombination, and omission experiment. *Food Chemistry*, 2021, 352: 129450
- TANG S W, GAO R C, ZHAO Y H, *et al.* Optimization of rinsing process for sturgeon surimi and its effect on the quality of productions. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 155–160 [唐淑玮, 高瑞昌, 赵元晖, 等. 鲟鱼鱼糜漂洗工艺优化及其对品质的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 155–160]
- WANG G C, LI L H, HAO S X, *et al.* Research progress in the mechanism of odor compounds in aquatic product and some relative techniques of detection and analysis. *Food Industry Technology*, 2012, 33(5): 401–404 [王国超, 李来好, 郝淑贤, 等. 水产品腥味物质形成机制及相关检测分析技术的研究进展. 食品工业科技, 2012, 33(5): 401–404]
- WEN X Y, CHEN A H, XU Y S, *et al.* Comparative evaluation of volatile profiles of Asian hard clams (*Meretrix meretrix*) with different shell colors by electronic nose and GC-MS. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2020, 30(1): 1–15

- WU D, ZENG W H, XIONG S B, *et al.* Analysis of the deodorization effect of barley green powder on silver carp surimi products by SPME and SDE. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(3): 244–256 [吴丹, 曾文浩, 熊善柏, 等. 基于固相微萃取(SPME)和同时蒸馏萃取(SDE)分析大麦苗粉对白鲢鱼糜制品的去腥作用. *现代食品科技*, 2022, 38(3): 244–256]
- WU Y Y, ZHU X J. Progress on the source of fishiness materials and their control methods. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(2): 14–19 [吴燕燕, 朱小静. 鱼肉腥味物质的来源及控制方法研究进展. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(2): 14–19]
- XU X D, XU R, JIA Q, *et al.* Identification of dihydro- β -ionone as a key aroma compound in addition to C8 ketones and alcohols in *Volvariella volvacea* mushroom. *Food Chemistry*, 2019, 293: 333–339
- XU Y S, YANG Y Y, LIU C K, *et al.* Modification of volatile profiles of silver carp surimi gel by immersion treatment with hydrogen peroxide (H_2O_2). *International Journal of Food Science and Technology*, 2021, 56: 5726–5737
- YANG X Y, LIU Y, XU C H, *et al.* Extraction and analysis of volatile flavor compounds in aquatic products: A review. *Food Science*, 2015, 36(5): 289–295 [杨欣怡, 刘源, 许长华, 等. 水产品中挥发性风味物质提取和分析研究进展. *食品科学*, 2015, 36(5): 289–295]
- YANG Y Y. Effect of hydrogen peroxide moderate oxidation treatment on fishy off-odor deodorization and quality of surimi gel. Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 [杨运懿. 双氧水适度氧化处理对鱼糜凝胶腥味脱除及品质特性的影响. 江南大学硕士研究生学位论文, 2021]
- YOU L J, ZHAO M M. Advances on the formation and deodorization of fishy odor for fish products. *Food and Fermentation Industry*, 2008, 34(2): 117–120 [游丽君, 赵谋明. 鱼肉制品腥味物质形成及脱除的研究进展. *食品与发酵工业*, 2008, 34(2): 117–120]
- YUAN S, LIU H, LIU M. Application status and prospects of biological deodourization in China. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 631(1): 9–12
- ZHANG J Y, LIU M, GU S Q, *et al.* Comparative studies on volatile substances of silver carp by different rinsing mediums. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(10): 1954–1962 [张建友, 柳敏, 顾赛麒, 等. 不同漂洗介质对白鲢鱼肉挥发性物质的影响. *核农学报*, 2015, 29(10): 1954–1962]
- ZHAO L, CAO R, WANG L Z, *et al.* Study on the characteristic flavor change of *Porphyra yezoensis* before and after roasting. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 199–207 [赵玲, 曹荣, 王联珠, 等. 条斑紫菜烤制前后特征风味变化研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 199–207]
- ZHENG S W, CHEN W H. Evaluation of cod freshness based on electronic nose and electronic tongue technology. *Chinese Condiment*, 2019, 44(5): 164–169 [郑舒文, 陈卫华. 基于电子鼻和电子舌技术的鲑鱼鲜度评定. *中国调味品*, 2019, 44(5): 164–169]
- ZHOU X X, CHONG Y Q, DING Y T, *et al.* Determination of the effects of different washing processes on aroma characteristics in silver carp mince by MMSE-GC-MS, e-nose and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 2016, 207: 205–213

(编辑 陈 辉)

The Construction of a Low-Odor Background Model of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Surimi

GENG Haiyong, CHEN Lihua, YANG Fang^①, WU Yi, WANG Shufen, JIANG Qixing, XU Yanshun, XIA Wenshui

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract In the Healthy China Strategy context, fish are increasingly in demand as a source of high-quality protein. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) is a resource-rich and highly productive freshwater fish species found in China that is not edible raw or cooked in its original form due to its many boney spines. However, due to its advantages of being low-cost, low in fat, and high in protein, it is an ideal choice for surimi production. Currently, it is widely used in the industrial

① Corresponding author: YANG Fang, E-mail: yangfang_8_9@126.com

production of surimi products. The development of the freshwater surimi industry can significantly improve the added value of freshwater fish utilization, which has attracted extensive attention. Freshwater surimi is high in protein and low in fat and has a smooth and delicate taste, making it extremely popular with consumers. It has a high output, low price, is growing in demand, and is gradually being accepted throughout domestic and foreign markets. It has also driven the development of some related industries and produced significant economic and social benefits. As domestic consumers experience improved living standards and a faster pace of work, premade dishes containing surimi products as well as recreational snack surimi products with increased shelf-life are more attractive, as they save the consumer processing time, are enjoyed by the consumer, and meet their nutritional demands, affording these products great market potential. With the development of surimi products and related industries, specific requirements are being put forward for its production. Although China supplanted Japan as the largest producer of surimi products worldwide in 2006, ushering in a period of nearly 10 years of high production growth, the annual production of surimi products in China since 2014 has stagnated or even slightly decreased. Moreover, the surimi industry has entered a bottleneck period for quality enhancement caused by the expansion of quantity. The fishy odor of freshwater surimi is one of the industrial problems that affect the quality and efficiency of surimi. The flavor of surimi products (such as fish balls, fish intestines, fish cakes, and others in hot pot) has become one of the quality attributes that consumers are extremely concerned about. However, the adsorption and release laws of key odor-active substances are still unclear. There are existing research technologies for surimi odor, mainly including instrumental analysis (gas chromatography-mass spectrum, gas chromatography-olfactometry, gas chromatography-olfactometry-mass spectrum, electronic nose technology, etc.), sensomics analysis (odor activity value (OAV), aroma extract dilution analysis, odor recombination, odor omission test, etc.), and enzyme-linked immunosorbent assay. The research objects of odor sensory experiments are mostly rice wine, oil, vegetables, fruits, and fungi. Moreover, present odor research is mainly carried out in a prepared solution, mainly using odor recombination of a liquid simulation system, which is different from the interaction between the real odor active substance-solid surimi. Therefore, constructing an odor model based on solid surimi is necessary to better simulate the sensory characteristics of surimi. To build an odor model based on solid surimi, an odorless or low-odor surimi background model must be established in order to investigate the interaction between various odor components and surimi. There are several fishy substances and complex components in freshwater fish and surimi products, including aldehydes, alcohols, ketones, esters, sulfur compounds, nitrogen compounds, and alkanes.

At present, most studies on rinsing surimi reported worldwide are based on how to better apply it to the food system, ignoring interactions between components in the complex system of surimi, which creates certain limitations in establishing a background model of surimi. Therefore, salt, salt-alcohol, acid, alkali, and other rinsing media were selected in this study, which was not limited to food systems. By comparing the removal effects of different rinsing media on the odor residue of surimi, an odorless or low-odor background model of surimi could be constructed. Here, the effect of different rinsing media on the odor residue of a surimi background model was studied. Specific rinsing media were as follows: 0.5% NaCl (W/W) + 0.35% Na₂CO₃ (W/W) + 4.0% C₂H₅OH (W/W) solution (group A), 0.5% NaCl (W/W) + 0.35% Na₂CO₃ solution (group B), 0.5% CaCl₂ (W/W) + 0.35% Na₂CO₃ (W/W) + 4.0% C₂H₅OH (V/W) solution (group C), 0.5% CaCl₂ (W/W) + 0.35% Na₂CO₃ (W/W) solution (group D), 1% NaCl (W/W) + 1% Na₂CO₃ (W/W) + 4.0% C₂H₅OH (V/W) solution (group E), 1% NaCl (W/W) + 1% Na₂CO₃ (W/W) solution (group F), 1 mol/L HCl solution (group G), and 1 mol/L NaOH solution (group H), respectively. The results showed that SPME-GC-MS detected 65 volatile compounds in silver carp surimi, including 22 aldehydes, 13 alcohols, 9 ketones, and 7 hydrocarbons, among which the contents of aldehydes and alcohols were

high, which had a major contribution to the odor of silver carp surimi. A total of 18 odor-active substances were detected by the OAV (≥ 1) method, which helped illustrate that odor-active compounds contribute to the overall odor of surimi. After treatment with eight kinds of rinsing media, the residual amount of the odor-active substances in the silver carp surimi was washed or released to varying degrees, affecting the sample's overall odor contribution. The rinsed surimi samples contained 6, 8, 7, 9, 6, 12, 9, and 9 odor active compounds and residual rates of volatile odor compounds were $(0.380\pm 0.120)\%$, $(0.610\pm 0.086)\%$, $(0.280\pm 0.033)\%$, $(0.480\pm 0.037)\%$, $(0.150\pm 0.018)\%$, $(4.330\pm 0.160)\%$, $(18.680\pm 0.081)\%$, and $(0.490\pm 0.003)\%$, respectively. According to the SPME-GC-MS analysis results, due to the synergistic effect of ethanol, the content of volatile compounds detected in group E was the lowest, the total residual amount of odor-active compounds was reduced to (6.57 ± 0.77) $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the total residue rate was only 0.15%. Meanwhile, the total OAV decreased to 2.52 ± 0.25 , there were 17 odor-active substances with an $\text{OAV}<1$, and the OAV of nonanal was only 1.34 ± 0.05 , which could establish a low-odor background model of surimi. Furthermore, electronic nose and sensory evaluations distinguished the overall odor characteristics between different rinsed samples and fresh surimi.

This study took silver carp surimi as the research object and studied the influence of volatile odor compounds and salts, salt-alcohols, acids, alkalis, and other rinsing media in surimi on the residual rate of odor substances through SPME-GC-MS, electronic nose, and sensory evaluation methods, which will significantly contribute to the establishment of an odorless or low-odor solid surimi model and provide a novel idea for sensory analysis.

Key words Silver carp; Background model of surimi odor; Volatile compounds; SPME-GC-MS; Odor activity value; E-nose

附录:

附表1 白鲢鱼糜的挥发性成分物质组成及含量
Attached Tab.1 Composition and content of volatile components in silver carp surimi

| 化合物种类 Compound species | 化合物编号 Compound number | 挥发性物质 Volatile substance | 保留时间 Retention time/min | 鉴定方式 Identification method | 峰面积百分 比 Peak area percentage /% | 挥发性组分 质量分数 Mass fraction /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 气味阈值 Odor threshold /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 气味活度值 Odor activity value |
|---------------------------|--------------------------|---|----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---|---|------------------------------|
| 醛类 Aldehydes | 1 | 丁醛 Butanal | 5.85 | SI, RSI, MS | 0.12 \pm 0.03 | 9.05 \pm 2.26 | N.A. | N.A. |
| | 2 | 戊醛 Pentanal | 8.11 | SI, RSI, MS | 1.76 \pm 0.68 | 132.73 \pm 51.28 | 12.00 | 11.06 |
| | 3 | (E)-2-戊烯醛 (E)-2-Pentenal | 10.11 | SI, RSI, MS | 0.13 \pm 0.01 | 9.80 \pm 0.75 | 1500.00 | 0.01 |
| | 4 | 己醛 Hexanal | 11.82 | SI, RSI, MS | 21.10 \pm 2.92 | 1591.25 \pm 220.21 | 5.00 | 318.25 |
| | 5 | (E)-2-己烯醛 (E)-2-Hexenal | 14.33 | SI, RSI, MS | 0.21 \pm 0.04 | 15.84 \pm 3.02 | 19.20 | 0.82 |
| | 6 | 庚醛 Heptanal | 16.66 | SI, RSI, MS | 3.22 \pm 0.01 | 242.84 \pm 0.75 | 2.80 | 86.73 |
| | 7 | (E)-2-庚烯醛 (E)-2-Heptenal | 19.54 | SI, RSI, MS | 0.15 \pm 0.03 | 11.31 \pm 2.26 | 13.50 | 0.84 |
| | 8 | 苯甲醛 Benzaldehyde | 19.84 | SI, RSI, MS | 0.40 \pm 0.03 | 30.17 \pm 2.26 | 41.70 | 0.72 |
| | 9 | 辛醛 Octanal | 21.94 | SI, RSI, MS | 2.84 \pm 0.36 | 214.18 \pm 27.15 | 0.59 | 364.87 |
| | 10 | (E,E)-2,4-庚二烯醛 (E,E)-2,4-Heptadienal | 22.40 | SI, RSI, MS | 0.11 \pm 0.03 | 8.30 \pm 2.26 | 15.40 | 0.54 |
| | 11 | (E)-2-辛烯醛 (E)-2-Octenal | 24.85 | SI, RSI, MS | 0.40 \pm 0.01 | 30.17 \pm 0.75 | 3.00 | 10.06 |

续表

| 化合物种类 Compound species | 化合物编号 Compound number | 挥发性物质 Volatile substance | 保留时间 Retention time /min | 鉴定方式 Identification method | 峰面积百分比 Peak area percentage /% | 挥发性组分 质量分数 Mass fraction /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 气味阈值 Odor threshold /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 气味活度值 Odor activity value | |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|---|------------------------------|------|
| 醛类 Aldehydes | 12 | 壬醛 Nonanal | 27.21 | SI, RSI, MS | 4.94±0.60 | 372.55±45.25 | 1.10 | 338.68 | |
| | 13 | (E)-2-壬烯醛 (E)-2-Nonenal | 30.02 | SI, RSI, MS | 0.13±0.03 | 9.80±2.26 | 0.08 | 122.55 | |
| | 14 | 4-乙基苯甲醛 4-Ethylbenzaldehyde | 30.36 | SI, RSI, MS | 0.26±0.03 | 19.61±2.26 | 123.23 | 0.16 | |
| | 15 | 癸醛 Decanal | 32.27 | SI, RSI, MS | 0.17±0.03 | 12.82±2.26 | 2.00 | 6.41 | |
| | 16 | (E)-2-癸烯醛 (E)-2-Decenal | 34.98 | SI, RSI, MS | 0.14±0.04 | 10.56±3.02 | 0.30 | 35.19 | |
| | 17 | 十一醛 Undecanal | 37.07 | SI, RSI, MS | 0.10±0.02 | 7.54±1.51 | 5.00 | 1.51 | |
| | 18 | 椰子醛 Octadecanal | 39.72 | SI, RSI, MS | 0.50±0.03 | 37.71±2.26 | N.A. | N.A. | |
| | 19 | 十二醛 Dodecanal | 41.61 | SI, RSI, MS | 0.15±0.03 | 11.31±2.26 | N.A. | N.A. | |
| | 20 | 十三醛 Tridecanal | 45.90 | SI, RSI, MS | 0.21±0.06 | 15.84±4.52 | N.A. | N.A. | |
| | 21 | 十四烷醛 Tetradecanal | 49.97 | SI, RSI, MS | 0.22±0.09 | 16.59±6.79 | N.A. | N.A. | |
| | 22 | 十五醛 Pentadecanal | 53.82 | SI, RSI, MS | 0.20±0.01 | 15.08±0.75 | N.A. | N.A. | |
| | 醇类 Alcohols | 1 | 1-戊烯-3-醇 1-Penten-3-ol | 7.71 | SI, RSI, MS | 0.85±0.28 | 64.10±21.12 | 358.10 | 0.18 |
| | | 2 | 正戊醇 1-Pentanol | 10.53 | SI, RSI, MS | 0.85±0.28 | 64.10±21.12 | 150.20 | 0.66 |
| 3 | | (Z)-2-戊烯-1-醇 (Z)-2-Penten-1-ol | 10.69 | SI, RSI, MS | 1.31±0.22 | 98.79±16.59 | 89.20 | 0.19 | |
| 4 | | 1-己烯-3-醇 1-Hexen-3-ol | 11.00 | SI, RSI, MS | 0.22±0.02 | 16.59±1.51 | N.A. | N.A. | |
| 5 | | 正己醇 1-Hexanol | 15.02 | SI, RSI, MS | 0.09±0.03 | 6.79±2.26 | 5.60 | 80.80 | |
| 6 | | 1-庚烯-3-醇 1-Hepten-3-ol | 15.59 | SI, RSI, MS | 6.00±0.47 | 452.49±35.44 | N.A. | N.A. | |
| 7 | | 庚醇 Heptanol | 20.19 | SI, RSI, MS | 0.11±0.02 | 8.30±1.51 | 5.40 | 28.21 | |
| 8 | | 1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol | 20.69 | SI, RSI, MS | 2.02±0.22 | 152.34±16.59 | 1.50 | 417.80 | |
| 9 | | 2-乙基-1-己醇 2-Ethyl-1-hexanol | 23.30 | SI, RSI, MS | 8.31±0.89 | 626.70±67.12 | N.A. | N.A. | |
| 10 | | (E)-2-辛烯-1-醇 (E)-2-Octene-1-ol | 25.32 | SI, RSI, MS | 0.50±0.05 | 37.71±3.77 | 40.00 | 1.00 | |
| 11 | | 辛醇 Octanol | 25.44 | SI, RSI, MS | 3.40±0.60 | 256.41±45.25 | 125.8 | 2.04 | |
| 12 | | 1-壬醇 1-Nonanol | 30.53 | SI, RSI, MS | 0.82±0.18 | 61.84±13.57 | 50.00 | 1.24 | |
| 13 | | L-薄荷醇 L-Menthol | 30.85 | SI, RSI, MS | 0.18±0.03 | 13.57±2.26 | N.A. | N.A. | |
| 酮类 Ketones | 1 | 2-戊酮 2-Pentanone | 7.89 | SI, RSI, MS | 0.36±0.04 | 27.15±3.02 | 1550.00 | 0.02 | |
| | 2 | 2,3-戊二酮 2,3-Pentanedione | 8.03 | SI, RSI, MS | 0.65±0.11 | 49.02±8.30 | N.A. | N.A. | |
| | 3 | 2,3-己二酮 2,3-Hexanedione | 11.19 | SI, RSI, MS | 0.09±0.01 | 6.79±0.75 | 316.00 | 0.02 | |

续表

| 化合物种类 Compound species | 化合物编号 Compound number | 挥发性物质 Volatile substance | 保留时间 Retention time/min | 鉴定方式 Identification method | 峰面积百分比 Peak area percentage /% | 挥发性组分 质量分数 Mass fraction /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 气味阈值 Odor threshold /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 气味活度值 Odor activity value | |
|---------------------------|--------------------------|---|---|-------------------------------|-----------------------------------|---|---|------------------------------|------|
| 酮类 Ketones | 4 | 2-庚酮 2-Heptanone | 16.14 | SI, RSI, MS | 1.10 \pm 0.01 | 82.96 \pm 0.75 | 141.00 | 0.59 | |
| | 5 | 6-甲基-2-庚酮 6-Methyl-2-heptanone | 19.47 | SI, RSI, MS | 0.21 \pm 0.04 | 15.84 \pm 3.02 | N.A. | N.A. | |
| | 6 | 2,5-辛二酮 2,5-Octanedione | 20.91 | SI, RSI, MS | 5.21 \pm 0.85 | 392.91 \pm 64.10 | N.A. | N.A. | |
| | 7 | 2-辛酮 2-Octanone | 21.33 | SI, RSI, MS | 0.45 \pm 0.05 | 33.94 \pm 3.77 | 50.20 | 0.68 | |
| | 8 | (E,E)-3,5-辛二烯-2-酮 (E,E)-3,5-Octadien-2-one | 26.68 | SI, RSI, MS | 0.30 \pm 0.10 | 22.62 \pm 7.54 | 100.00 | 0.23 | |
| 烃类 Hydrocarbons | 9 | 2-十一酮 2-Undecanone | 36.44 | SI, RSI, MS | 0.33 \pm 0.07 | 24.89 \pm 5.28 | N.A. | N.A. | |
| | 1 | 苯 Benzene | 7.25 | SI, RSI, MS | 0.16 \pm 0.04 | 12.07 \pm 3.02 | 3630.00 | N.A. | |
| | 2 | 1,3-环己二烯 1,3-Cyclohexadiene | 8.50 | SI, RSI, MS | 0.05 \pm 0.01 | 3.77 \pm 0.75 | N.A. | N.A. | |
| | 3 | 3,5,5-三甲基-2-己烯 3,5,5-Trimethyl-2-hexene | 20.43 | SI, RSI, MS | 1.15 \pm 0.15 | 86.73 \pm 11.31 | N.A. | N.A. | |
| | 4 | 十三烷 Tridecane | 36.69 | SI, RSI, MS | 0.18 \pm 0.03 | 13.57 \pm 2.26 | 2140.00 | 0.01 | |
| | 5 | 十四烷 Tetradecane | 41.17 | SI, RSI, MS | 0.32 \pm 0.03 | 24.13 \pm 2.26 | N.A. | N.A. | |
| | 6 | 十六烷 Hexadecane | 49.41 | SI, RSI, MS | 0.20 \pm 0.05 | 15.08 \pm 3.77 | N.A. | N.A. | |
| 其他 Others | 7 | 十七烷 Heptadecane | 53.20 | SI, RSI, MS | 0.84 \pm 0.06 | 63.35 \pm 4.52 | N.A. | N.A. | |
| | 1 | 氨基甲酸 Ammonium carbamate | 4.08 | SI, RSI, MS | 1.92 \pm 0.10 | 144.80 \pm 7.54 | N.A. | N.A. | |
| | 2 | 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 6.24 | SI, RSI, MS | 0.07 \pm 0.02 | 5.28 \pm 1.51 | 5.00 | 1.06 | |
| | 3 | 三氯甲烷 Trichloromethane | 6.29 | SI, RSI, MS | 0.05 \pm 0.01 | 3.77 \pm 0.75 | 11700.00 | N.A. | |
| | 4 | 六甲基二硅氧烷 Hexamethyl disiloxane | 7.65 | SI, RSI, MS | 0.03 \pm 0.01 | 2.26 \pm 0.75 | N.A. | N.A. | |
| | 5 | 硅烷二醇二甲酯 Dimethyl silanediol | 7.86 | SI, RSI, MS | 0.10 \pm 0.01 | 7.54 \pm 0.75 | N.A. | N.A. | |
| | 6 | 2-乙基呋喃 2-Ethylfuran | 8.25 | SI, RSI, MS | 1.54 \pm 0.45 | 116.14 \pm 33.94 | 2.30 | 50.50 | |
| | 7 | 六甲基环三硅氧烷 Hexamethyl cyclotrisiloxane | 12.99 | SI, RSI, MS | 0.19 \pm 0.01 | 14.33 \pm 0.75 | N.A. | N.A. | |
| | 其他 Others | 8 | 2-戊基呋喃 2-Pentylfuran | 21.40 | SI, RSI, MS | 0.72 \pm 0.03 | 54.30 \pm 2.26 | 5.80 | 9.36 |
| | | 9 | 八甲基环四硅氧烷 Octamethyl cyclotetrasiloxane | 21.60 | SI, RSI, MS | 3.10 \pm 0.03 | 233.79 \pm 2.26 | N.A. | N.A. |
| 10 | | 1-硝基-正己烷 1-Nitro-hexane | 24.13 | SI, RSI, MS | 0.37 \pm 0.05 | 27.90 \pm 3.77 | N.A. | N.A. | |
| 11 | | 茴香脑 Anethole | 36.27 | SI, RSI, MS | 1.05 \pm 0.21 | 79.19 \pm 15.84 | N.A. | N.A. | |

注: “N.A.”表示未获取到。

Note: “N.A.” means not acquired.

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230314001

http://www.ykxjz.cn/

刘龙龙, 罗鸣, 刘洪涛, 陈傅晓, 韩丽娜. 不同规格野生黄鳍金枪鱼肌肉营养分析与评价. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 258-267

LIU L L, LUO M, LIU H T, CHEN F X, HAN L N. Analysis and evaluation of the muscle nutrition of different sizes of wild yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 258-267

不同规格野生黄鳍金枪鱼肌肉营养分析与评价*

刘龙龙^{1,2,3} 罗鸣^{1,2,3①} 刘洪涛⁴ 陈傅晓^{1,2,3} 韩丽娜¹

- (1. 海南省海洋与渔业科学院 海南 海口 571126; 2. 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院 海南 三亚 572025; 3. 海南热带海洋学院 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室 海南 三亚 572022; 4. 海南省热带海水养殖技术重点实验室 海南 海口 571126)

摘要 为探究不同规格黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)肌肉营养成分及品质差异, 实验以野捕的 3 种规格黄鳍金枪鱼 J1 (4.2±1.2) kg、J2 (22.5±2.5) kg 和 J3 (50.8±3.9) kg 为研究对象, 通过常规生化分析方法对金枪鱼肌肉的常规营养成分、氨基酸、脂肪酸及矿物质元素进行比较分析。结果显示, (1) J1 组水分含量显著高于 J2、J3 组; J2、J3 组粗蛋白含量显著高于 J1 组($P<0.05$); J3 组粗脂肪含量显著高于 J1、J2 组($P<0.05$)。 (2) 检出 19 种常见氨基酸, 氨基酸含量最高的为谷氨酸(3.04~3.25 g/100 g), 必需氨基酸中含量最高的为赖氨酸(2.02~2.15 g/100 g), 最低的为色氨酸(0.31~0.45 g/100 g)。非必需氨基酸含量 J3>J2>J1 ($P<0.05$); 必需氨基酸、呈味氨基酸含量 J1 组显著低于 J3 组($P<0.05$)。依据氨基酸评分(AAS), 缬氨酸为第一限制性氨基酸; 以化学评分(CS)为评分标准, J1、J2 组第一限制性氨基酸为色氨酸, J3 组为苯丙氨酸+酪氨酸。 (3) 各组共检出 25 种脂肪酸, 以多不饱和脂肪酸(PUFA)为主, 含量最高的为二十二碳六烯酸(DHA), 占总脂肪酸含量的 37.46%~39.18%。DHA 含量 J3 组显著高于 J1、J2 组; 二十碳五烯酸(EPA)含量 J2、J3 组显著高于 J1 组; DHA:EPA 比值 J1 组显著高于 J2、J3 组($P<0.05$)。单不饱和脂肪酸(MUFA)含量 J3>J2>J1; PUFA 含量 J3 组显著高于 J1、J2 组($P<0.05$)。PUFA/饱和脂肪酸(SFA)、n-3 系多不饱和脂肪酸/n-6 系多不饱和脂肪酸(n-3/n-6)比值 J2、J3 组显著高于 J1 组($P<0.05$)。h/H 比值 J3 组显著高于 J1、J2 组($P<0.05$)。 (4) J2、J3 组 Na、Ca 含量显著高于 J1 组, J1 组 K 含量最高且显著高于 J2、J3 组($P<0.05$)。4 种重金属元素均低于食品中建议的最大允许限量, 其中 Fe 含量最大的为 J3 组, 且 J3>J2>J1 ($P<0.05$); Cu 含量最大的为 J3 组, 且显著高于 J1 组($P<0.05$)。综合分析, 大规格黄鳍金枪鱼具有更好的营养质量, 本研究为居民膳食的选择及黄鳍金枪鱼人工配合饲料的配制提供了科学依据。

关键词 黄鳍金枪鱼; 肌肉; 规格; 营养成分; 氨基酸; 脂肪酸

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)03-0258-10

黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)隶属鲈形目 金枪鱼属(*Thunnus*), 广泛分布于印度洋、太平洋和大西洋的热带、亚热带以及温带的广阔海域, 在我国主

* 海南省重大科技计划 (ZDKJ2021011)和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47-Z18)共同资助。刘龙龙, E-mail: silyboylong@163.com

① 通信作者: 罗鸣, 副研究员, E-mail: hothawk@yeah.net

收稿日期: 2023-03-14, 收修改稿日期: 2023-04-11

要分布于东海和南海,是高度洄游性鱼类。金枪鱼是全球公认的高端海洋经济鱼类,因其肉味鲜美、营养价值高而备受消费者的喜爱,市场需求量巨大,但随着捕捞装备的提高及捕捞强度的增加,金枪鱼资源量急剧下降,捕捞产量降低,难以满足国内外市场需求。为弥补市场金枪鱼供应的不足及保护野生种群,开展金枪鱼人工养殖技术研究,逐步建立金枪鱼人工养殖业是非常必要的。目前,许多国家如日本、澳大利亚和墨西哥等已开展金枪鱼的人工养殖,日本已基本实现了蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)的全周期人工养殖(Nakamura *et al.*, 2007; 彭士明等, 2019),我国沿海虽然也有金枪鱼资源分布,但截至目前,国内在金枪鱼人工养殖的研究几乎处于空白状态,仅见南海水产研究所开展相关的驯养工作(周胜杰等, 2022)。

国内外关于黄鳍金枪鱼肌肉营养组成与评价已有相关研究,如幼鱼消化酶活性及氨基酸组成(Buentello *et al.*, 2011);暗色肌(dark muscle)的品质特征(Elena *et al.*, 2011);不同海区黄鳍金枪鱼脂质质量比较(Domingues *et al.*, 2021);黄鳍金枪鱼和大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)肌肉组织氨基酸和脂肪酸组成比较(Peng *et al.*, 2013);美济礁附近海域3种金枪鱼(大眼金枪鱼、蓝鳍金枪鱼、黄鳍金枪鱼)肉质评价(周胜杰等, 2021);黄鳍金枪鱼食用品质研究(罗殷等, 2008)

等。这些研究大部分只是针对黄鳍金枪鱼某一生长阶段或不同海区的肉质比较,而关于不同规格黄鳍金枪鱼的肌肉营养组成比较尚未见报道,研究野生金枪鱼肉质组分可为金枪鱼的人工养殖营养需求提供参考(Mourente *et al.*, 2009)。本研究通过对不同规格黄鳍金枪鱼肌肉常规营养成分、氨基酸、脂肪酸及矿物质元素综合分析与评价,为居民膳食的选择及黄鳍金枪鱼人工营养饲料的配制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用黄鳍金枪鱼于2021年9月—2022年12月在南海海区海钓捕获(见表1),根据平均体重分为J1(4.2±1.2) kg、J2(22.5±2.5) kg和J3(50.8±3.9) kg 3种规格,各取3尾,取头部与第一背鳍之间背部肌肉,用干冰速冻后转入-80℃冰箱保存备用。

1.2 肌肉常规营养成分的测定

采用GB 5009.3-2016直接干燥法测定肌肉水分,采用GB 5009.6-2016酸水解法测定肌肉粗脂肪,采用GB 5009.5-2016凯氏定氮法测定肌肉粗蛋白,采用GB 5009.4-2016高温炉灼烧法(550℃)测定肌肉总灰分。

表1 3种不同规格黄鳍金枪鱼体重、捕捞时间及地点

Tab.1 Yellowfin tuna with three different sizes weight, sampling date and sampling region.

| 项目 Item | J1 | J2 | J3 |
|----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| 体重 Weight/kg | 4.2±1.2 | 22.5±2.5 | 50.8±3.9 |
| 捕捞时间 Sampling date | 2021.09~2022.01 | 2022.02~2022.07 | 2022.08~2022.12 |
| 捕捞地点 Sampling region | 17°29'N, 111°10' E 附近海区 | | |

1.3 肌肉氨基酸与脂肪酸的测定

肌肉氨基酸测定使用全自动氨基酸分析仪(S-433D, 德国),其中,色氨酸按照GB/T 15400-2018,采用高效液相色谱法测定;胱氨酸、蛋氨酸按照GB/T 15399-2018,采用离子交换色谱法测定,其他氨基酸按照GB 5009.124-2016,采用分光光度法测定。

肌肉脂肪酸的测定使用气相色谱仪(Agilent 7890A, 美国),参照GB 5009.168-2016,采用内标法测定。

1.4 氨基酸与脂肪酸质量评价

根据FAO/WHO(1973)建议的氨基酸评分标准模式和全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式分别计算黄鳍金枪鱼必需氨基酸的氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)(周胜杰等, 2021);脂质营养质量通过以下指标来评估,降胆固醇脂肪酸/升胆固醇脂肪酸(h/H)、多不饱和脂肪酸/饱和

脂肪酸(PUFA/SFA)、n-3系多不饱和脂肪酸/n-6系多不饱和脂肪酸(n-3/n-6)(Domingues *et al.*, 2021)。计算公式:

$$AAS = \frac{\text{样品蛋白质中某种氨基酸含量(mg/g)}}{\text{FAO/WHO评分模式中同种氨基酸含量(mg/g)}}$$

$$CS = \frac{\text{样品蛋白质中某种氨基酸含量(mg/g)}}{\text{全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(mg/g)}}$$

$$h/H = (C18:1n-9 + C18:2n-6 + C18:3n-3 + C20:4n-6 + C20:5n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3)/(C14:0 + C16:0)$$

$$PUFA/SFA = \frac{\sum PUFA}{\sum SFA}$$

$$n-3/n-6 = (\sum n-3)/(\sum n-6)$$

1.5 矿物质元素的测定及评估

Na、K、Mg、Ca、Fe、Cu、Mn、Zn使用电感耦合等离子体发射光谱仪(Optima 8000, 美国)采用GB 5009.268-2016电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-OES)

测定。重金属安全评估参照 FAO (1998)和 WHO (1989) (Mokhtar *et al*, 2009)建议的食品中允许的最大含量。

1.6 数据处理

数据以平均值±标准差(Means±SD)形式表示, 使用 SPSS19.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 LSD 多重比较, 显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 常规营养成分的比较

不同规格黄鳍金枪鱼常规营养成分见表 2。J1 组水分含量显著高于 J2、J3 组($P<0.05$), J2 和 J3 组无显著性差异($P>0.05$); J2、J3 组粗蛋白含量显著高于 J1 组($P<0.05$); 粗脂肪含量 J3 组显著高于 J1、J2 组($P<0.05$), J1 和 J2 组无显著性差异($P>0.05$)。各组灰分含量无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 3 种规格黄鳍金枪鱼肌肉常规营养成分(以湿基计)
Tab.2 Proximate composition of muscle in three different sizes of yellowfin tuna (g/100 g) (in wet basis)

| 营养成分 Proximate composition | J1 | J2 | J3 |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 水分 Moisture | 72.12±2.11 ^a | 70.91±3.19 ^b | 70.38±2.85 ^b |
| 粗蛋白 Crude protein | 25.43±1.21 ^b | 26.68±0.83 ^a | 26.89±1.14 ^a |
| 粗脂肪 Crude fat | 0.51±0.03 ^b | 0.53±0.02 ^b | 0.64±0.01 ^a |
| 灰分 Ash | 2.85±0.4 | 2.82±0.28 | 2.76±0.33 |

注: 同一行不同上标字母表示差异显著($P<0.05$), 下同。

Note: Different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in the same row, the same below.

2.2 氨基酸的组成与评价

黄鳍金枪鱼肌肉中检出 19 种常见氨基酸(表 3), 包括 9 种必需氨基酸(EAA)、2 种半必需氨基酸和 8 种非必需氨基酸。3 种规格黄鳍金枪鱼氨基酸含量最高的均为谷氨酸(3.04~3.25 g/100 g); 必需氨基酸中含量最高的为赖氨酸(2.02~2.15 g/100 g), 最低的为色氨酸(0.31~0.45 g/100 g)。不同规格黄鳍金枪鱼氨基酸含量差异较大, 除苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸各组差异不显著外, 其他氨基酸含量以 J3 组>J2 组>J1 组为主。总氨基酸(TAA)、非必需氨基酸含量 J3 组>J2 组>J1 组($P<0.05$); 必需氨基酸、呈味氨基酸含量 J1 组显著低于 J3 组($P<0.05$), 但与 J2 组无显著性差异($P>0.05$); 半必需氨基酸含量

J1 组显著低于 J2、J3 组($P<0.05$)。各组 EAA/TAA 比值均在 40%以上, 且无显著性差异($P>0.05$)。

表 3 3 种规格黄鳍金枪鱼肌肉氨基酸组成(以湿基计)
Tab.3 Amino acid composition of muscle in three different sizes of yellowfin tuna (g/100 g) (in wet basis)

| 氨基酸 Amino acid | J1 | J2 | J3 |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 天门冬氨酸 Asp▲ | 2.08±0.11 ^b | 2.19±0.09 ^a | 2.21±0.12 ^a |
| 苏氨酸 Thr■ | 0.95±0.05 | 0.99±0.07 | 1.09±0.06 |
| 丝氨酸 Ser | 0.83±0.02 ^b | 0.88±0.06 ^{ab} | 0.95±0.08 ^a |
| 谷氨酸 Glu▲ | 3.04±0.08 ^b | 3.16±0.10 ^a | 3.25±0.11 ^a |
| 甘氨酸 Gly▲ | 0.98±0.06 ^b | 1.10±0.08 ^b | 1.22±0.05 ^a |
| 丙氨酸 Ala▲ | 1.23±0.05 ^b | 1.30±0.09 ^{ab} | 1.38±0.08 ^a |
| 缬氨酸 Val■ | 1.11±0.08 | 1.14±0.08 | 1.18±0.05 |
| 蛋氨酸 Met■ | 0.66±0.01 | 0.69±0.01 | 0.72±0.02 |
| 异亮氨酸 Ile■ | 1.02±0.03 | 1.05±0.02 | 1.10±0.02 |
| 亮氨酸 Leu■ | 1.74±0.05 ^b | 1.78±0.03 ^{ab} | 1.82±0.05 ^a |
| 酪氨酸 Tyr | 0.83±0.01 | 0.88±0.01 | 0.89±0.01 |
| 苯丙氨酸 Phe■ | 0.88±0.01 | 0.91±0.02 | 0.93±0.02 |
| 赖氨酸 Lys■ | 2.02±0.05 ^b | 2.09±0.06 ^{ab} | 2.15±0.09 ^a |
| 组氨酸 His▲ | 1.92±0.02 ^c | 2.23±0.08 ^b | 2.38±0.04 ^a |
| 精氨酸 Arg▲ | 1.31±0.05 ^b | 1.37±0.05 ^{ab} | 1.42±0.03 ^a |
| 脯氨酸 Pro | 0.65±0.01 ^c | 0.74±0.01 ^b | 0.88±0.01 ^a |
| 色氨酸 Trp■ | 0.31±0.01 ^b | 0.35±0.01 ^b | 0.45±0.01 ^a |
| 胱氨酸 Cys | 0.29±0.01 ^b | 0.29±0.02 ^b | 0.39±0.01 ^a |
| 蛋氨酸 Met■ | 0.77±0.01 ^b | 0.82±0.01 ^{ab} | 0.88±0.01 ^a |
| 总氨基酸 TAA | 22.60±1.21 ^c | 23.95±1.32 ^b | 25.29±1.08 ^a |
| 必需氨基酸 EAA | 9.45±0.52 ^b | 9.81±0.38 ^{ab} | 10.32±0.69 ^a |
| 半必需氨基酸 HEAA | 3.22±0.08 ^b | 3.60±0.11 ^a | 3.80±0.09 ^a |
| 呈味氨基酸 DAA | 7.33±0.11 ^b | 7.75±0.08 ^{ab} | 8.06±0.08 ^a |
| 非必需氨基酸 NEAA | 9.93±0.06 ^c | 10.54±0.08 ^b | 11.17±0.06 ^a |
| EAA/TAA /% | 41.81±1.35 | 40.96±1.25 | 40.81±1.32 |

注: ■为必需氨基酸; ▲为半必需氨基酸; ▲为呈味氨基酸。

Note: ■: Essential amino acids; ▲: Semi-essential amino acids; ▲: Delicious amino acids.

采用 AAS 和 CS 评分, 对不同规格黄鳍金枪鱼氨基酸进行营养评价(表 4)。依据 AAS 评分, 各组缬氨酸评分最低且小于 1, 为第一限制性氨基酸, J1、J2 组第二限制性氨基酸为苏氨酸, J3 组为亮氨酸; 以 CS 为评分标准, 除赖氨酸及 J3 组色氨酸外, 其余各氨基酸评分均低于 1, J1、J2 组第一、第二限制性氨基酸分别为色氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸, J3 组第一、第二限制性氨基酸分别为苯丙氨酸+酪氨酸、缬氨酸。

表 4 3 种规格黄鳍金枪鱼肌肉必需氨基酸营养评价

Tab.4 Nutritional evaluation of essential amino acids in muscle of three different sizes of yellowfin tuna

| 氨基酸 Amino acid | FAO/WHO /(mg/g) | 鸡蛋蛋白 Egg protein /(mg/g) | 氨基酸含量/(mg/g) Amino acids content | | | 氨基酸评分 Amino acids score | | | 化学评分 Chemical score | | |
|---------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------|-------|----------------------------|--------|--------|------------------------|--------|--------|
| | | | J1 | J2 | J3 | J1 | J2 | J3 | J1 | J2 | J3 |
| 异亮氨酸 Ile | 40 | 49 | 45.13 | 43.84 | 43.50 | 1.13 | 1.10 | 1.09 | 0.92 | 0.89 | 0.89 |
| 亮氨酸 Leu | 70 | 81 | 76.99 | 74.32 | 71.97 | 1.10 | 1.06 | 1.03** | 0.95 | 0.92 | 0.89 |
| 赖氨酸 Lys | 55 | 66 | 89.38 | 87.27 | 85.01 | 1.63 | 1.59 | 1.55 | 1.35 | 1.32 | 1.29 |
| 蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys | 35 | 47 | 42.04 | 40.92 | 43.89 | 1.20 | 1.17 | 1.25 | 0.89 | 0.87 | 0.93 |
| 苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr | 60 | 86 | 75.66 | 74.33 | 71.97 | 1.26 | 1.24 | 1.20 | 0.88** | 0.86** | 0.84* |
| 苏氨酸 Thr | 40 | 45 | 42.04 | 41.34 | 43.10 | 1.05** | 1.03** | 1.07 | 0.93 | 0.92 | 0.96 |
| 缬氨酸 Val | 50 | 54 | 49.12 | 47.60 | 46.66 | 0.98* | 0.95* | 0.93* | 0.91 | 0.88 | 0.86** |
| 色氨酸 Trp | 10 | 17 | 13.27 | 14.61 | 17.79 | 1.32 | 1.46 | 1.78 | 0.78* | 0.85* | 1.05 |

注: *为第一限制性氨基酸; **为第二限制性氨基酸。

Note: * The first limiting amino acid; **, The second limiting amino acid.

2.3 脂肪酸的组成比较

3 种规格黄鳍金枪鱼肌肉中共检测出 25 种脂肪酸(表 5),包括 10 种 SFA,5 种单不饱和脂肪(MUFA),10 种 PUFA。有 9 种脂肪酸百分含量高于 1%,其平均含量从高到低排列 C22:6n3 (DHA)、C16:0、C18:0、C18:1n9c、C20:5n3 (EPA)、C20:4n6 (ARA)、C18:2n6c、C24:1n9、C16:1n7,在这 9 种脂肪酸中只有 C16:0、C24:1n9 和 C16:1n7 三种脂肪酸无显著性差异($P>0.05$)。黄鳍金枪鱼肌肉中脂肪酸以 PUFA 为主,其中,二十二碳六烯酸(C22:6n3, DHA)含量占总脂肪酸含量的 37.46%~39.18%,DHA 含量 J3 组显著高于 J1、J2 组($P<0.05$),J1、J2 组无显著性差异($P>0.05$);二十碳五烯酸(EPA)含量 J2、J3 组显著高于 J1 组($P<0.05$);DHA:EPA 比值 J1 组显著高于 J2、J3 组($P<0.05$)。各组 SFA 无显著性差异($P>0.05$),MUFA 含量 J3 组>J2 组>J1 组($P<0.05$);PUFA 含量 J3 组显著高于 J1、J2 组($P<0.05$)。PUFA/SFA、n-3/n-6 比值 J2、J3 组显著高于 J1 组($P<0.05$),J2、J3 组无显著性差异($P>0.05$)。h/H 比值 J3 组显著高于 J1、J2 组($P<0.05$)。

2.4 矿物质元素的组成比较

3 种规格黄鳍金枪鱼肌肉中矿物质元素见表 6,4 种常量元素中 Na、Ca 的含量 J2、J3 组显著高于 J1 组($P<0.05$),K 含量 J1 组最高且显著高于 J2、J3 组($P<0.05$);各组 Mg 含量无显著性差异($P>0.05$)。4 种重金属元素均低于 WHO (1989)或 FAO (1998)食品中规定的最大允许限量,Fe 含量最大的为 J3 组,且 J3 组>J2 组>J1 组($P<0.05$);Cu 含量最大的为 J3 组,且

显著高于 J1 组($P<0.05$),各组 Mn、Zn 含量无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 3 种规格黄鳍金枪鱼常规营养成分的分析

鱼类肌肉成分的 96%~98%由水分、蛋白质、脂肪和灰分构成(Rani *et al*, 2016),鱼体成分是检验鱼的质量、营养品质、生理状态等的重要指标(Ravichandran *et al*, 2011)。在本研究中,黄鳍金枪鱼肌肉粗脂肪含量(0.51~0.64 g/100 g)和粗蛋白质含量(25.43~26.89 g/100 g)与大眼金枪鱼(粗脂肪 0.6 g/100 g,粗蛋白 23 g/100 g)、鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*) (粗脂肪 0.6 g/100 g,粗蛋白 25.9 g/100 g)等相近(Venugopal *et al*, 1996)。黄鳍金枪鱼粗蛋白与粗脂肪含量随规格的增大而增加,这与全周期人工养殖蓝鳍金枪鱼(Nakamura *et al*, 2007)、布氏鲷(*Myxus bleekeri*) (Naeem *et al*, 2011)等的研究结果相似;Venugopal 等(1996)研究认为,大部分鱼类肌肉组织中脂肪含量变化与其水分含量变化呈负相关,这也与本研究结果相似。关于不同规格鱼体组分的差异,影响因素较多,通常主要归结于摄入的食物、鱼代谢率及运动量(Ahmed *et al*, 2022),黄鳍金枪鱼不同生长阶段鱼类摄食的食物存在差异(朱国平等, 2008;陶雅晋等, 2017),食物对鱼体组成有很大影响,鱼类通常会食用各种各样的食物,并利用这些食物获取对其正常生长和发育必需的营养物质(Koizumi *et al*, 2009;刘峰等, 2018)。此外,不同生长阶段金枪鱼的代谢率及运动量变化较大(Graham *et al*, 2004),这些都可能导致鱼体组分的差异。

表5 3种规格黄鳍金枪鱼肌肉脂肪酸组成

Tab.5 Fatty acid composition of muscle in three different sizes of yellowfin tuna/%

| 脂肪酸 Fatty acid | J1 | J2 | J3 |
|----------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| C12:0 | 0.06±0.00 | 0.05±0.00 | 0.04±0.00 |
| C14:0 | 0.81±0.02 | 0.81±0.01 | 0.87±0.03 |
| C15:0 | 0.59±0.01 ^a | 0.48±0.01 ^b | 0.48±0.01 ^b |
| C16:0 | 21.14±1.02 | 21.57±1.18 | 22.37±0.98 |
| C17:0 | 0.96±0.03 ^a | 0.82±0.04 ^b | 0.93±0.03 ^a |
| C18:0 | 11.33±0.86 ^a | 10.19±0.95 ^b | 10.30±1.02 ^b |
| C20:0 | 0.24±0.01 | 0.23±0.01 | 0.23±0.01 |
| C21:0 | 0.06±0.00 | 0.05±0.00 | 0.03±0.00 |
| C22:0 | 0.27±0.01 ^a | 0.15±0.01 ^b | 0.12±0.01 ^b |
| C24:0 | 0.34±0.01 ^a | 0.19±0.01 ^b | 0.15±0.01 ^b |
| C16:1n7 | 1.39±0.11 | 1.33±0.09 | 1.43±0.12 |
| C18:1n9c | 8.99±0.25 ^c | 9.78±0.32 ^b | 12.87±0.21 ^a |
| C20:1 | 0.37±0.01 ^b | 0.45±0.02 ^a | 0.32±0.01 ^b |
| C22:1n9 | 0.40±0.02 ^b | 0.95±0.02 ^a | 0.87±0.01 ^a |
| C24:1n9 | 1.54±0.12 | 1.52±0.15 | 1.46±0.09 |
| C18:2n6c | 1.95±0.11 ^a | 1.48±0.12 ^b | 1.54±0.12 ^b |
| C18:3n6 | 0.04±0.00 | 0.07±0.00 | 0.07±0.00 |
| C20:2n6 | 0.29±0.01 ^c | 0.43±0.01 ^b | 0.56±0.01 ^a |
| C20:3n6 | 0.15±0.01 ^a | 0.09±0.01 ^b | 0.09±0.01 ^b |
| C20:4n6 (ARA) | 4.61±0.12 ^b | 4.68±0.16 ^b | 4.72±0.15 ^a |
| C22:2n6 | 0.15±0.01 ^a | 0.11±0.01 ^a | 0.05±0.00 ^b |
| C18:3n3 | 0.34±0.01 ^a | 0.23±0.02 ^b | 0.20±0.01 ^b |
| C20:3n3 | 0.19±0.01 | 0.25±0.01 | 0.19±0.01 |
| C20:5n3 (EPA) | 4.35±0.12 ^b | 5.13±0.13 ^a | 5.37±0.15 ^a |
| C22:6n3 (DHA) | 37.88±2.10 ^b | 37.46±1.54 ^b | 39.18±1.98 ^a |
| SFA | 35.80±1.88 | 34.55±2.11 | 35.53±1.09 |
| MUFA | 12.70±0.98 ^c | 14.03±1.01 ^b | 16.96±1.11 ^a |
| PUFA | 49.95±3.21 ^b | 49.93±1.22 ^b | 51.96±2.14 ^a |
| n-6 PUFA | 7.20±0.88 | 6.86±0.65 | 7.02±1.01 |
| n-3 PUFA | 42.75±3.35 ^b | 43.07±2.84 ^{ab} | 44.94±1.56 ^a |
| DHA:EPA | 8.71±0.35 ^a | 7.30±0.21 ^b | 7.31±0.68 ^b |
| PUFA/SFA | 1.40±0.08 ^b | 1.45±0.05 ^a | 1.46±0.11 ^a |
| n-3/n-6 | 5.94±0.65 ^b | 6.28±0.82 ^a | 6.40±0.39 ^a |
| h/H | 2.65±0.11 ^b | 2.62±0.09 ^b | 2.75±0.15 ^a |

注: SFA 为饱和脂肪酸总量; MUFA 为单不饱和脂肪酸总量; PUFA 为多不饱和脂肪酸总量; n-3 PUFA 为 n-3 系多不饱和脂肪酸; n-6 PUFA 为 n-6 系多不饱和脂肪酸; h/H 为降胆固醇脂肪酸/升胆固醇脂肪酸。

Note: SFA means the sum of saturated fatty acids; MUFA means the sum of monounsaturated fatty acids; PUFA means the sum of polyunsaturated fatty acids; n-3 PUFA means the sum of n-3 polyunsaturated fatty acids; n-6 PUFA means the sum of n-6 polyunsaturated fatty acids; h/H means the ratio of hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic.

3.2 3种规格黄鳍金枪鱼氨基酸含量的比较与营养分析

氨基酸是构建细胞、修复组织的基础材料,是评价食物营养价值的重要指标(Ahmed *et al*, 2022)。许多氨基酸在人体新陈代谢过程中发挥重要作用,谷氨酸对细胞增殖至关重要,而赖氨酸在促进人体生长发育、增强机体免疫力等方面发挥重要作用,是人类第一限制性氨基酸(丁德明等, 2021)。在本研究中,3种规格黄鳍金枪鱼含量最高的氨基酸均为谷氨酸(3.04~3.25 g/100 g),必需氨基酸中含量最高的为赖氨酸(2.02~2.15 g/100 g),最低的为色氨酸(0.31~0.45 g/100 g),这与 Peng 等(2013)的研究结果相近。必需氨基酸的相对含量是决定食物蛋白质营养价值的重要因素,本研究中,不同规格黄鳍金枪鱼 EAA/TAA 比值无显著性差异,比值在 40.81%~41.81%之间,略高于蓝鳍金枪鱼(37.90%~39.01%)(赵玲等, 2023),符合 FAO/WHO 要求,均高于不同年龄人群需求的报告值(即婴儿为 39%,儿童为 26%,成人为 11%)(Oluwaniyi *et al*, 2010),因此,黄鳍金枪鱼是很好的氨基酸来源。呈味氨基酸是鱼肉风味的重要指标,本研究中,天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸 4 种呈味氨基酸均随着规格的增大而增加,这与杂交鲟(*Acipenser schrenckii* × *Acipenser baerii*)研究结果一致(杜强等, 2017),这说明大规模金枪鱼口感更好。

依据 AAS 评分,缬氨酸为第一限制性氨基酸, J1、J2 组第二限制性氨基酸为苏氨酸, J3 组为亮氨酸;以 CS 为评分标准, J1、J2 组第一、第二限制性氨基酸分别为色氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸, J3 组第一、第二限制性氨基酸分别为苯丙氨酸+酪氨酸、缬氨酸,这说明不同规格黄鳍金枪鱼的限制性氨基酸并不完全相同,限制性氨基酸可能与鱼的大小、环境、食物,甚至取样部位等因素相关(程辉辉等, 2016; 刘书臣等, 2013)。蛋白质是鱼类人工饲料中最昂贵的成分,有研究表明,饲料中缺乏某些重要氨基酸,鱼会出现生长停滞、厌食等症状(Ahmed, 2010),饲料中合理的蛋白质及氨基酸的搭配对促进鱼类的生长及增强鱼体免疫力具有重要作用(Craig *et al*, 2017; Ahmed *et al*, 2006)。因此,通过研究黄鳍金枪鱼氨基酸组成,确定在不同生长阶段蛋白质及氨基酸的需求量对人工养殖黄鳍金枪鱼营养饲料的研制具有重要参考价值。

3.3 3种规格黄鳍金枪鱼脂肪酸的比较与营养分析

PUFA 含量是评价鱼类营养价值的重要指标之一,尤其是二十碳五烯酸(EPA, 20:5n-3)和二十二碳六烯酸(DHA, 22:6n-3),他们在体内和体外的多种生化

表6 3种规格黄鳍金枪鱼肌肉中矿物质元素(常量元素、微量元素)含量

Tab.6 Concentrations of macro and micro mineral elements in the muscle of three different sizes of yellowfin tuna /(mg/kg)

| 矿物质元素 Mineral elements | | J1 | J2 | J3 | WHO(1989) | FAO(1998) |
|---------------------------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| 常量元素 Macro elements | Na | 173.36±5.98 ^b | 250.37±4.96 ^a | 268.34±7.65 ^a | | |
| | K | 785.58±13.26 ^a | 719.52±10.92 ^b | 730.79±15.21 ^b | | |
| | Mg | 209.21±9.21 | 195.41±10.68 | 215.58±8.67 | | |
| 微量元素 Micro elements | Ca | 26.82±2.88 ^b | 35.23±1.89 ^a | 38.62±3.28 ^a | | |
| | Fe | 2.83±0.67 ^c | 3.23±0.74 ^b | 5.67±1.13 ^a | 100 | — |
| | Cu | 0.46±0.05 ^b | 0.69±0.04 ^a | 0.75±0.06 ^a | 30 | 10~100 |
| | Mn | 0.25±0.07 | 0.26±0.05 | 0.28±0.05 | 1 | — |
| | Zn | 1.86±0.02 | 1.89±0.02 | 1.95±0.03 | 100 | 30~100 |

过程中发挥着重要作用(Calder, 1997), 包括提高学习能力、促进大脑的发育, 增强免疫力, 降低高血压、动脉粥样硬化和某些癌症等疾病的发生等具有重要作用(Bucher *et al.*, 2002; Damsgaard *et al.*, 2007), 黄鳍金枪鱼肌肉中各脂肪酸含量以 PUFA 为主, DHA 为主要脂肪酸, 含量达 37.46%~39.19%, 远高于石斑鱼 (*Epinephelus* spp.) (王林娜等, 2018) 及卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) (罗辉等, 2020) 等常见海水鱼, 且大规格黄鳍金枪鱼的 PUFA、EPA、DHA 含量高于小规格鱼, 这与苏氏圆腹鲱 (*Pangasius sutchi*) 研究结果相似(韦玲静等, 2020)。此外, 在本研究中, 黄鳍金枪鱼 DHA : EPA 比值 7.30~8.71, 高于大部分已研究过的鱼类(Hossain, 2011), 相对较高的 DHA 和 DHA : EPA 比率可能是金枪鱼物种的一个特征, 在大多数饲料配方的鱼油中, DHA : EPA 比值很少超过 2, 海洋鱼类将 EPA 转化为 DHA 的能力有限(Sargent *et al.*, 1995), 这些都可能对金枪鱼人工营养饲料的配方产生影响。

某些饱和脂肪酸如 C12:0、C14:0 和 C16:0 等会增加血清总胆固醇(Ulbricht *et al.*, 1991), 因此, PUFA/SFA、h/H 比值常用于评估食物的营养质量(Chen *et al.*, 2020), 其数值越高越有助于降低心血管和其他慢性疾病发生的风险。n-3/n-6 比值是比较不同鱼种脂肪酸相对营养价值的较好指标, 食物中 n-3/n-6 比例高的鱼是有益的(Guler *et al.*, 2011), 根据健康饮食建议, n-3/n-6 比值高于 4 能降低食物相关的慢性病的发生(Økland *et al.*, 2005)。在本研究中, J2、J3 组 PUFA/SFA 比值明显高于 J1 组; h/H 比值 J3 组显著高于 J1、J2 组; 各组 n-3/n-6 比值均大于 4, 且 J2、J3 组显著高于 J1 组。通过对 3 种不同规格黄鳍金枪鱼 PUFA/SFA、h/H 和 n-3/n-6 的比较表明, 大规格黄鳍金枪鱼具有更好的营养质量。

3.4 3种规格黄鳍金枪鱼矿物质元素的分析

水生生物从环境中积累和保留的矿物质是高度选择性的, 鱼类肌肉矿物质浓度受到许多因素的影响(Karunarathna *et al.*, 2009)。在本研究中, Na 和 K 的平均浓度分别在 173.36~268.34 mg/kg 和 719.52~785.58 mg/kg 之间, 与养殖的大部分海水鱼含量差异较大(刘芳芳等, 2019), Na : K 比在 1 : 3 到 1 : 4 之间, 这与大部分金枪鱼的 Na、K 比相似(Karunarathna *et al.*, 2009), 在食品中比例适当, 适合食用。

重金属存在于水生环境中, 可以沿着食物链积累, Cu、Fe 和 Zn 等重金属在低浓度时是生物体代谢所必需的, 但在高浓度时可能是有毒的(Chan *et al.*, 2019), 金枪鱼等食肉鱼类比非食肉物种能积累更多的重金属。金枪鱼 Fe 含量范围为 2.7~80.0 mg/kg, 且各部位差异显著, 含量最高的部位为红肌(Karunarathna *et al.*, 2009)。本研究中, Fe 含量在 2.83~5.67 mg/kg 之间, 随规格的增加, 黄鳍金枪鱼肌肉铁含量随着增大; Cu 含量最大的为 J3 组 0.75 mg/kg, 且显著高于 J1 组; 各组的 Mn 和 Zn 无显著差异。WHO (1989)和FAO (1998)关于鱼类食品中 Cu 的最大允许限量分别为 30 μg/g 和 10~100 μg/g, Zn 的最大允许限量分别为 100 μg/g 和 30~100 μg/g (Mokhtar *et al.*, 2009), 黄鳍金枪鱼肌肉重金属 Cu、Zn 浓度远低于食品中规定的最大允许限量。

通过对 3 种不同规格黄鳍金枪鱼氨基酸、脂肪酸的分析, 黄鳍金枪鱼具有较好的营养质量, 大规格金枪鱼呈味氨基酸含量更高, 同时其 PUFA/SFA、h/H 和 n-3/n-6 比值更高, 这说明大规格金枪鱼口感更好, 更适合食用。在人工养殖下金枪鱼营养饲料配制时应考虑不同生长阶段氨基酸及脂肪酸的需求量, 同时金枪鱼肌肉具有相对较高的 DHA 和高 DHA : EPA 比率, 须注意在饲料中补充。

参 考 文 献

- AHMED I, JAN K, FATMA S, *et al.* Muscle proximate composition of various food fish species and their nutritional significance: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2022, 106(3): 690–719
- AHMED I, KHAN M A. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *British Journal of Nutrition*, 2006, 96(3): 450–460
- AHMED I. Response to the ration levels on growth, body composition, energy, and protein maintenance requirement of the Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*-Bloch 1974). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(4): 1133–1143
- BUCHER H C, HENGSTLER P, SCHINDLER C, *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Medicine*, 2002, 112(4): 298–304
- BUENTELLO J A, POHLENZ C, MARGULIES D, *et al.* A preliminary study of digestive enzyme activities and amino acid composition of early juvenile yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Aquaculture*, 2011, 312(1/2/3/4): 205–211
- CALDER P C. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 1997, 41(4): 203–234
- CHAN P T, MATANJUN P, SHAPAWI R, *et al.* Chemical composition of the fillet, fins, bones and viscera of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, 1358(1): 1–9
- CHEN J P, LIU H B. Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini-review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(16): 1–24
- CHENG H H, XIE C X, LI D P, *et al.* The study of muscular nutritional components and fish quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in ecological model of cultivating grass carp with grass. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1050–1059 [程辉辉, 谢从新, 李大鹏, 等. 种青养鱼模式下的草鱼肌肉营养成分和品质特性. *水产学报*, 2016, 40(7): 1050–1059]
- CRAIG S, HELFRICH L, KUHN D, *et al.* Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. *Virginia Cooperative Extension - Virginia State University*, 2017, 1–6
- DAMSGAARD C T, LAURITZEN L, KJAER T M R, *et al.* Fish oil supplementation modulates immune function in healthy infants. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(4): 1031–1036
- DING D M, CHEN X H, WU Y A, *et al.* Comparative analysis on nutritional quality of *Culter alburnus* cultured under different aquaculture modes. *China Feed*, 2021, 1(1): 89–95 [丁德明, 陈杏华, 伍远安, 等. 不同养殖模式翘嘴鲌肌肉营养品质比较. *中国饲料*, 2021, 1(1): 89–95]
- DOMINGUES V F, QUARESMA M, SOUSA S, *et al.* Evaluating the lipid quality of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) harvested from different oceans by their fatty acid signatures. *Foods*, 2021, 10(11): 1–9
- DU Q, WANG Y Y, ZENG S, *et al.* Comparison of meat content and muscle nutrient composition of three different specifications of hybrid sturgeon. *China Feed*, 2017, 24: 15–19 [杜强, 王艳艳, 曾圣, 等. 三种不同规格杂交鲟含肉率及肌肉营养成分比较. *中国饲料*, 2017, 24: 15–19]
- ELENA S Z, MAHASSINE A, ROSA O, *et al.* Quality characteristics of dark muscle from yellowfin tuna *Thunnus albacares* to its potential application in the food industry. *Food and Nutrition Sciences*, 2011, 2(1): 22–30
- GRAHAM J B, DICKSON K A. Tuna comparative physiology. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207(23): 4015–4024
- GULER G O, AKTUMSEK A, CAKMAK Y S, *et al.* Effect of season on fatty acid composition and n-3/n-6 ratios of zander and carp muscle lipids in Altınapa Dam Lake. *Journal of Food Science*, 2011, 76(4): 594–597
- HOSSAIN M A. Fish as source of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which one is better-farmed or wild. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2011, 3(6): 455–466
- KARUNARATHNA K A A U, ATTYGALLE M V E. Mineral Spectrum in different body parts of five species of tuna consumed in Sri Lanka. *Vidyodaya Journal of Science*, 2009, 14(11): 103–111
- KOIZUMI K, HIRATSUKA S. Fatty acid compositions in muscles of wild and cultured ocellate puffer *Takifugu rubripes*. *Fisheries Science*, 2009, 75(5): 1323–1328
- LIU F F, YANG S L, LIN W L, *et al.* Nutritional components and mineral element distribution and health evaluation of back muscle of seven marine fishes. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(11): 2413–2423 [刘芳芳, 杨少玲, 林婉玲, 等. 七种海水鱼背部肌肉营养成分及矿物元素分布与健康评价. *水产学报*, 2019, 43(11): 2413–2423]
- LIU F, LÜ X K, LIU Y Y, *et al.* Effect of starvation on amino acids and fatty acids of juvenile *Larimichthys crocea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 58–65 [刘峰, 吕小康, 刘阳阳, 等. 饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉中氨基酸和脂肪酸组成的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 58–65]
- LIU S C, LI R W, LIAO M T, *et al.* Nutritional components analysis and quality evaluation of different muscle parts of bigeye tuna. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(23): 340–343 [刘书臣, 李仁伟, 廖明涛, 等. 大目金枪鱼不同部位肌肉的营养成分分析与评价. *食品工业科技*, 2013, 34(23): 340–343]
- LUO H, ZHOU M R, JING T S, *et al.* Evaluation of muscle quality of male and female *Trachinotus ovatus*. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(6): 115–123 [罗辉, 周明瑞, 敬庭森, 等. 雌、雄卵形鲳鲹肌肉品质评价. *南方水产科学*, 2020, 16(6): 115–123]

- LUO Y, WANG X C, LIU Y. Study on edible quality of Yellowfin (*Thunnus albacares*) dorsal meat. *Journal of Food Science*, 2008, 29(9): 476–480 [罗殷, 王锡昌, 刘源. 黄鳍金枪鱼食用品质的研究. *食品科学*, 2008, 29(9): 476–480]
- MOKHTAR M B, ARIS A Z, MUNUSAMY V, *et al.* Assessment level of heavy metals in *Penaues monodon* and *Oreochromis* spp. in selected aquaculture ponds of high densities development area. *European Journal of Scientific Research*, 2009, 30(3): 348–360
- MOURENTE G, TOCHER D R. Tuna nutrition and feeds: current status and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science*, 2009, 17(3): 373–390
- NAEEM M, ISHTIAQ A. Proximate composition of *Mystus bleekeri* in relation to body size and condition factor from Nala Daik, Sialkot, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(52): 10765–10773
- NAKAMURA Y N, ANDO M, SEOKA M, *et al.* Changes of proximate and fatty acid compositions of the dorsal and ventral ordinary muscles of the full-cycle cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* with the growth. *Food Chemistry*, 2007, 103(1): 234–241
- ØKLAND H M W, STOKNES I S, REMME J F, *et al.* Proximate composition, fatty acid and lipid class composition of the muscle from deep-sea teleosts and elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(3): 437–443
- OLUWANIYI O O, DOSUMU O O, AWOLOLA G V. Effect of local processing methods (boiling, frying and roasting) on the amino acid composition of four marine fishes commonly consumed in Nigeria. *Food Chemistry*, 2010, 123(4): 1000–1006
- PENG S M, WANG L M, WANG Y J, *et al.* Research Progress on artificial culture and breeding of tuna in the World. *Aquatic Research*, 2019, 6(3): 118–125 [彭士明, 王鲁民, 王永进, 等. 全球金枪鱼人工养殖及繁育研究进展. *水产研究*, 2019, 6(3): 118–125]
- PENG S, CHEN C, SHI Z, *et al.* Amino acid and fatty acid composition of the muscle tissue of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2013, 1(4): 42–45
- RANI P, KUMAR V P, RAO R K, *et al.* Seasonal variation of proximate composition of tuna fishes from Visakhapatnam fishing harbor, east coast of India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2016, 4(6): 308–313
- RAVICHANDRAN S, KUMARAVEL K, FLORENCE E P. Nutritive composition of some edible fin fishes. *International Journal of Zoological Research*, 2011, 7(3): 241–251
- SARGENT J R, BELL J G, BELL M V, *et al.* Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 1995, 11(3/4): 183–198
- TAO Y J, MO M, HE X B, *et al.* Feeding habits and ontogenetic diet shifts of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) in the South China Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 1–10 [陶雅晋, 莫檬, 何雄波, 等. 南海黄鳍金枪鱼摄食习性及其随生长发育的变化. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 1–10]
- ULBRICHT T L V, SOUTHGATE D A T. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet*, 1991, 338(19): 985–992
- VENUGOPAL V, SHAHIDI F. Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 1996, 12(2): 175–197
- WANG L N, TIAN Y S, TANG J, *et al.* Analysis and quality evaluation of nutritional components in the muscle of *Epinehelus moara*, *E. lanceolatus* and hybrid “Yunlong grouper”. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1085–1093 [王林娜, 田永胜, 唐江, 等. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及杂交“云龙斑”肌肉营养成分分析及品质评价. *水产学报*, 2018, 42(7): 1085–1093]
- WEI L J, YE X C, MO F L, *et al.* Analysis of nutritional components in muscle of different specifications of *Pangasius sutchi*. *Animals Breeding and Feed*, 2020, 19(7): 15–20 [韦玲静, 叶香尘, 莫飞龙, 等. 不同规格苏氏圆腹鲢肌肉营养成分分析. *养殖与饲料*, 2020, 19(7): 15–20]
- ZHAO L, HU M Y, CAO R, *et al.* Analysis of nutrition and major flavor of different muscle parts of *Thunnus thynnus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 219–227 [赵玲, 胡梦月, 曹荣, 等. 蓝鳍金枪鱼不同部位肌肉的营养与主要风味分析. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 219–227]
- ZHOU S J, YANG R, YU G, *et al.* Muscle composition determination and nutrition evaluation of three tuna species near Meiji Reef. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(2): 51–59 [周胜杰, 杨蕊, 于刚, 等. 美济礁附近海域3种金枪鱼肌肉成分检测与营养评价. *南方水产科学*, 2021, 17(2): 51–59]
- ZHOU S J, YU G, MA Z H. Preliminary study on deep-water cage culture technology of yellowfin tuna. *Scientific Fish Farming*, 2022(6): 61–62 [周胜杰, 于刚, 马振华. 黄鳍金枪鱼深水网箱养殖技术初探. *科学养鱼*, 2022(6): 61–62]
- ZHU G P, XU L X, ZHOU Y Q, *et al.* Feeding habits of *Thunnus albacares* in the west-central Indian Ocean. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 725–732 [朱国平, 许柳雄, 周应祺, 等. 印度洋中西部水域黄鳍金枪鱼的食性及其季节性变化. *水产学报*, 2008, 32(5): 725–732]

Analysis and Evaluation of the Muscle Nutrition of Different Sizes of Wild Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*)

LIU Longlong^{1,2,3}, LUO Ming^{1,2,3}①, LIU Hongtao⁴, CHEN Fuxiao^{1,2,3}, HAN Lina¹

(1. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, China;

2. Yazhou Bay Innovation Institute, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572025, China;

3. Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources, Ministry of Education, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;

4. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Haikou 571126, China)

Abstract Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) is popular with consumers due to its delicious meat and high nutritional value. It is a globally recognized high-end marine economic fish. With the advancement of fishing equipment and the increase in fishing efforts, the amount of tuna resources has decreased significantly. To make up for the insufficient supply of tuna in the market and protect wild populations, it is essential to carry out research on artificial aquaculture technology for tuna and to gradually establish full-cycle cultures of tuna. In order to study the differences in the nutritional components and quality of yellowfin tuna muscles of different sizes, three different-sized yellowfin tuna, J1 (4.2±1.2) kg, J2 (22.5±2.5) kg, and J3 (50.8±3.9) kg, were used as the research subjects, and conventional biochemical analysis methods were used to compare and analyze the proximate compositions, amino acids, fatty acids, and mineral elements of tuna muscle. The results showed that (1) the moisture level of the J1 group was significantly higher than that of the J2 and J3 groups ($P<0.05$); the crude protein levels of the J2 and J3 groups were significantly higher than that of the J1 group ($P<0.05$); and the crude fat level in the J3 group was significantly higher than that in the J1 and J2 groups ($P<0.05$). (2) A total of 19 common amino acids were detected in yellowfin tuna muscle, including nine essential amino acids (EAA), two semi-essential amino acids, and eight nonessential amino acids. The amino acid with the highest content was glutamic acid (3.04~3.25 g/100 g) of the three tuna sizes; the essential amino acid with the highest content was lysine (2.02~2.15 g/100 g), and the essential amino acid with the lowest content was tryptophan (0.31~0.45 g/100 g). The amino acid content of different-sized yellowfin tuna varied greatly, except for threonine, valine, methionine, isoleucine, tyrosine, and phenylalanine, which were not significantly different among the groups, and the other amino acid contents were mainly J3>J2>J1. The content of nonessential amino acids was J3>J2>J1 ($P<0.05$). The content of essential amino acids and delicious amino acids in the J1 group was significantly lower than that in the J3 group ($P<0.05$). The content of semi-essential amino acids in the J1 group was significantly lower than that in the J2 and J3 groups ($P<0.05$). The ratio of EAA/TAA (total amino acids) in each group was above 40%, and there were no significant differences. According to the Amino acid score (AAS) score, the valine score in each group was the lowest and < 1 , which was the first limiting amino acid. According to the chemical score (CS) score, except for lysine and tryptophan of the J3 group, the scores of other amino acids were all less than 1. The first limiting amino acid of groups J1 and J2 was tryptophan, while the first limiting amino acids of the J3 group were phenylalanine + tyrosine. (3) A total of 25 fatty acids were detected in the muscles of yellowfin tuna of three sizes, including 10 saturated fatty acids (SFAs), 5 monounsaturated fatty acids (MUFAs), and 10 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). There were nine fatty acids whose content was

① Corresponding author: LUO Ming, E-mail: hothawk@yeah.net

greater than 1%, and their average content ranged from high to low: C22:6n3 docosahexaenoic acid (DHA), C16:0, C18:0, C18:1n9c, C20:5n3 eicosapentaenoic acid (EPA), C20:4n6 arachidonic acid (ARA), C18:2n6c, C24:1n9, and C16:1n7. Among these nine fatty acids, only C16:0, C24:1n9, and C16:1n7 showed no significant differences ($P>0.05$). The fatty acids in yellowfin tuna muscle were mainly PUFAs, and the content of DHA accounted for 37.46%~39.18% of the total fatty acid content. The DHA content of the J3 group was significantly higher than that of the J1 and J2 groups ($P<0.05$). The EPA content of the J2 and J3 groups was significantly higher than that of the J1 group ($P<0.05$). The DHA:EPA ratio of the J1 group was significantly higher than that of the J2 and J3 groups ($P<0.05$), and the MUFA content was $J3>J2>J1$ ($P<0.05$). The PUFA content of the J3 group was significantly higher than that of the J1 and J2 groups ($P<0.05$). PUFA/SFA and n-3/n-6 ratios of the J2 and J3 groups were significantly higher than those of the J1 group ($P<0.05$). The h/H ratio of the J3 group was significantly higher than that of the J1 and J2 groups ($P<0.05$). (4) Among the four macro elements, the contents of sodium and calcium of the J2 and J3 groups were significantly higher than those of the J1 group ($P<0.05$), and the potassium content of the J1 group was the highest and was significantly higher than that of the J2 and J3 groups ($P<0.05$). The contents of four heavy metal elements were all far lower than the maximum allowable limit (FAO and WHO) suggested in food, among which the iron content was the highest in the J3 group, and $J3>J2>J1$ ($P<0.05$). The copper content was the highest in the J3 group, and was significantly higher than that in the J1 group ($P<0.05$). Comprehensive analysis showed that large size yellowfin tuna had better nutritional quality, and the results of this study also provide a scientific basis for the selection of residents' diets and the formulation of artificial nutrition feed for yellowfin tuna.

Key words Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*); Muscle; Size; Nutritional components; Amino acids; Fatty acids

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230303001

http://www.yykxjz.cn/

王琳, 赵玲, 刘淇, 齐祥明, 曹荣, 牟伟丽. GC-MS与电子舌联合分析干制方式对秋刀鱼风味的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 268-277

WANG L, ZHAO L, LIU Q, QI X M, CAO R, MU W L. Effect of drying methods on the flavor of *Cololabis saira* assessed by GC-MS coupled with electronic tongue. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 268-277

GC-MS与电子舌联合分析干制方式 对秋刀鱼风味的影响*

王琳^{1,2} 赵玲¹ 刘淇^{1①} 齐祥明² 曹荣¹ 牟伟丽³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院
山东 青岛 266100; 3. 荣成银海水产有限公司 山东 荣成 264308)

摘要 为探究不同干制方式对秋刀鱼(*Cololabis saira*)风味的影响,本研究将腌制后的秋刀鱼分别进行自然干燥、冷风干燥和紫外+冷风干燥,通过气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)和电子舌测定鲜鱼、腌制鱼、自然干制鱼、冷风干制鱼、紫外+冷风干制鱼的风味变化。结果显示,GC-MS共检测到包括醛类、醇类、酮类、酸类、烃类以及含氮化合物等58种挥发性风味物质。以鲜秋刀鱼为参照,醇类、醛类、酮类物质的增加均不同程度丰富了3种干制秋刀鱼的油脂香气;其中,紫外+冷风干制鱼中顺-2-庚烯醛、辛醛、2-乙基呋喃等物质的含量明显增多,分别增加至64.96、569.48和189.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$,使秋刀鱼具有丰富的油脂香味。咸味、鲜味和鲜味回味是干制秋刀鱼重要的滋味指标,电子舌实验结果表明,干制后秋刀鱼的咸味和鲜味回味大幅增加,而鲜味略有降低。3种干制方式均不同程度增加了秋刀鱼的油脂香味,同时丰富了鲜味回味;其中,紫外+冷风干燥最大程度地丰富了干制秋刀鱼的风味。

关键词 秋刀鱼; 自然干燥; 冷风干燥; 紫外+冷风干燥; 风味变化

中图分类号 S986.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0268-10

秋刀鱼(*Cololabis saira*)属颌针鱼亚目(Beloniformes)、竹刀鱼科(Scomberesocidae)、秋刀鱼属(*Cololabis*),是一种重要的远洋捕捞经济鱼类(王琳等, 2022),因具有较高的营养价值和独特的风味,深受消费者青睐。但由于秋刀鱼具有与海产红肉鱼相似的强烈腥味,限制了其资源的开发和综合利用;目前主要以鲜销和初级加工品为主,而深加工方面主要为秋刀鱼罐头、无骨鱼块等,远远不能满足消费者的需求。

干制作为水产品常见的加工方式之一,不仅可以改善水产品品质,延长水产品的赏味期限;还可赋予

干制水产品独特的风味。在水产品加工过程中,脂质等风味前体物质发生水解氧化反应,生成挥发性风味物质,从而表现出独特的气味特征。目前科研人员通常使用气相色谱-离子迁移谱(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)、气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)结合电子鼻/舌技术,探究样品挥发性物质的微观组成的同时,对样品的宏观风味进行描述,最终将仪器分析与感官评价相结合,系统有效地对样品风味进行综合评价。目前,对干制水产品风味方面的研究逐渐

* 国家重点研发计划(2020YFD0901203)资助。王琳, E-mail: arlene703@163.com

① 通信作者: 刘淇, 研究员, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-03-03, 收修改稿日期: 2023-03-28

丰富,主要集中在咸干鲱鱼(*Scomberomorus niphonius*) (简冲等, 2022)、腌腊草鱼(*Ctenpharyngodon idellus*) (顾赛麒等, 2019)、虾干(*Litopenaeus vannamei*) (Hu *et al.*, 2021)、风干武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*) (陈方雪等, 2023)等传统干制水产品风味变化的研究,未见关于干制秋刀鱼风味的研究。因此,本研究选用自然干燥、冷风干燥、紫外+冷风干燥3种方式干制秋刀鱼,通过GC-MS和电子舌测定其风味的变化,探究不同干制方式对秋刀鱼风味形成的影响,旨在为秋刀鱼产品风味品质的提升提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用秋刀鱼购于山东蓬莱京鲁渔业有限公司,规格为(100±7) g/尾,2021年9月捕自北太平洋海域,运回实验室后于-50℃保存。

1.2 仪器与试剂

SNA9-对开门冷风干燥烘箱(江苏宇通干燥工程有限公司); Philips TUV 30 W/G 30 T 8 紫外灯(广东省东莞市森夏电子科技有限公司); 5975C/7980A 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); 75 μm CAR/PDMS/DVB 萃取纤维头(美国 Supelco 公司); TS-5000Z 味觉分析系统(日本 Insent 公司)。

2,4,6-三甲基吡啶、氯化钾和酒石酸均为分析纯,购于国药集团化学试剂公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 (1)将秋刀鱼于4℃低温空气解冻,去内脏、划斜刀、洗净后沥干水分。(2)将预处理后的秋刀鱼于(20±2)℃的室温下置于15%食盐水中浸泡腌制1h,自然沥干水分。(3)分别进行自然干燥(秋季晴日自然晾晒3d,环境温度10~20℃)、冷风干燥[连续冷风干燥3d,设置温度为(15±2)℃]和紫外+冷风干燥[紫外灯照射,冷风连续干燥3d,设置温度为(15±2)℃]。

取样点:取步骤(1)的秋刀鱼样品为鲜鱼(CK),步骤(2)的秋刀鱼样品为腌制鱼(0d),步骤(3)的秋刀鱼样品为自然干制秋刀鱼(N)、冷风干制秋刀鱼(C)和紫外+冷风干制秋刀鱼(U)。每种取3条鱼,去头尾、去骨、去皮后绞碎,置于-20℃冷藏备用。

1.3.2 GC-MS 测定方法 样品前处理:参照 Hu 等(2021)的方法,取3g鱼肉样品切碎后放入20mL顶空瓶中,加入1μL 2,4,6-三甲基吡啶(TMP,

0.5 mg/mL)作为内标物质,于60℃下平衡10min后,用固相微萃取针萃取30min,然后于进样口解析5min。

GC-MS 条件:色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管柱子(30.00 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为 He,流速 1 mL/min,分离比 5:1;进样温度为 250℃;升温程序为起始温度为 40℃,保持 5 min,以 8℃/min 升至 250℃,保持 5 min。

质谱条件:EI 电离源,能量 70 eV;离子源温度 230℃,四极杆温度 150℃,接口温度 250℃,扫描范围 30~400 m/z。

使用正构烷烃(C₆~C₃₀)计算挥发性化合物的线性保留指数,并基于对 GC 保留指数(RI)和质谱数(MS)与 NIST 14 和 Wiley 11 库的比较鉴定挥发性化合物。

使用公式(1)计算各挥发性化合物的含量:

$$\text{含量}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{\text{挥发性物质的峰面积}}{\text{TMP的峰面积}} \times \frac{0.5 \mu\text{g}(\text{TMP含量})}{3 \text{g}(\text{鱼肉样品量})} \times 1000 \quad (1)$$

使用公式(2)计算气味活性度(odor aroma-active, OAV):

$$\text{OAV}_i = \frac{C_i}{\text{OT}_i} \quad (2)$$

式中,C_i为气味物质在样品中的含量,OT_i为该气味物质的风味阈值。

1.3.3 电子舌测定方法 参照曹荣等(2019)的方法,称取一定质量的鱼肉样品置于料理机中,按照1:6的比例添加纯净水,匀浆后过滤,取滤液用于TS-5000Z 味觉分析系统测试,使用具有广域选择特异性的人工脂膜传感器,传感器介绍见表1,模拟生物活体的味觉感受机理,实现对5种基本味(酸、涩、苦、咸和鲜)和甜味的评价。每个样品平行分析3次,采用设备自有数据库对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 GC-MS 测定结果

采用GC-MS定量检测不同干制秋刀鱼的挥发性风味物质组成,使用公式(1)计算各挥发性化合物的含量,结果如表2所示,共检测到包括醛类、醇类、酮类、酸类、烃类以及含氮化合物等58种挥发性风味物质;CK组、0d组、N组、C组与U组分别检测到28、29、55、53、55种挥发性风味物质,其中以醛类物质的含量最为丰富,这表明干制秋刀鱼风味形成的大部分挥发性化合物是由多不饱和脂肪酸氧化组成的(Fábio *et al.*, 2017)。

表1 电子舌传感器
Tab.1 E-tongue sensor

| 传感器名称 Sensor name | 可评价的味道 Evaluable taste | |
|-----------------------------------|--|---|
| | 基本味(相对值) Basic taste (relative values) | 回味(CPA 值) Aftertaste (CPA value) |
| 鲜味传感器(AAE) Umami sensors | 鲜味(氨基酸、核酸引起的鲜味) Umami (amino acid, nucleic acid-induced freshness) | 鲜味丰富度(可持续感知的鲜味) Richness of flavor (consistently perceived freshness) |
| 咸味传感器(CT0) Saltiness sensors | 咸味(食盐等无机盐引起的咸味) Saltiness (saltiness caused by inorganic salts such as table salt) | - |
| 酸味传感器(CA0) Sourness sensors | 酸味(醋酸、柠檬酸和酒石酸等引起的酸味) Sourness (sourness caused by acetic acid, citric acid, and tartaric acid) | - |
| 苦味传感器(C00) Bitterness sensors | 苦味(苦味物质引起的味道, 在低浓度下被感知为鲜味回味) Bitterness (umami aftertaste caused by bitter substances, perceived at low concentrations) | 苦味回味(啤酒和咖啡等一般食品的苦味) Bitterness aftertaste (bitterness of beer, coffee and other general food products) |
| 涩味传感器(AE1) Astringency sensors | 涩味(涩味物质引起的味道, 低浓度下感知为刺激性回味) Astringency (pungent aftertaste caused by an astringent substance, at low concentrations perceived) | 涩味回味(茶和红酒等呈现的涩味) Astringent aftertaste (astringent taste of tea, red wine, etc.) |
| 甜味传感器(GL1) Sweetness sensors | 甜味(糖或糖醇引起的甜味) Sweetness (sweetness caused by sugar or sugar alcohols) | - |

CK组、0 d组、N组、C组与U组中分别检测到9、11、17、16、17种醛类物质。醛类化合物的阈值较低,如己醛(5 µg/kg)、辛醛(0.59 µg/kg)、壬醛(1.1 µg/kg),通常是传统腌腊肉制品的挥发性成分中含量最高的化合物(唐静等, 2014),能够在脂质氧化过程中快速形成,与其他物质共同增强风味效应,因此,对干制秋刀鱼的风味形成有重要贡献。干制过程中产生了大量C₅-C₉中等相对分子质量的醛,为秋刀鱼增添了青草香和油脂香气味(Samar *et al*, 2022; Amjad *et al*, 2022),其中,丙醛、(反,反)-2,4-庚二烯醛主要来源于亚麻酸氧化,己醛、庚醛、辛醛、反-2-辛烯醛主要来源于亚油酸氧化,辛醛还来源于油酸氧化,同时,油酸氧化还会产生壬醛,丰富秋刀鱼的油脂香气(Fereidoon *et al*, 2019)。

酮类物质作为脂肪氧化的中间产物,阈值通常比与其同分异构体的醛类物质高,主要起到丰富秋刀鱼气味的作用。2,3-戊二酮和2,3-辛二酮通常呈现奶油味(吴燕燕等, 2016),对腥味物质有一定的增强作用,其中2,3-辛二酮在3种干制秋刀鱼中均未检出,说明干制能在一定程度减弱其腥味;而2-壬酮、3,5-辛二烯-2-酮、2-十一酮等具有果香味、花香以及蘑菇味的物质(Amjad *et al*, 2022)在干制后含量增加,丰富了干制秋刀鱼的整体气味。

在鲜鱼和腌制鱼中均检测到8种醇类,主要以不

饱和脂肪醇为主,干制后产生戊醇、壬醇等饱和醇。但1-戊烯-3-醇和1-辛烯-3-醇等不饱和醇,是风干鱼中的特征风味物质,其中,1-戊烯-3-醇是由15-脂加氧酶和脂氢过氧化物裂解酶共同催化二十碳五烯酸产生的(唐静等, 2014),具有焦味、肉香味,而1-辛烯-3-醇具有浓郁植物芳香味,使鱼肉具有柔和清香(顾赛麒等, 2019)。

检测到的羧酸主要是己酸和壬酸,游离的羧酸通常是甘油三酯和磷脂的水解产物(Li *et al*, 2020)。秋刀鱼中含有较多的烃类物质,但烃类物质的阈值较高(李倩等, 2022),对肉制品风味的贡献不大。干制过程中的三甲胺可能是秋刀鱼自身内源酶降解脂质及蛋白质产生(Bekhit *et al*, 2021),也可能与微生物分解有关(Eman *et al*, 2016),具有鱼腥味。呋喃类化合物主要源于亚油酸氧化和硫胺素的降解(王朝阳等, 2017),干制后的秋刀鱼中含有较多的具有焦香气味的2-乙基呋喃以及具有类火腿香味的反-2-(2-戊烯基)-呋喃(贡慧等, 2017),对干制秋刀鱼的风味也有重要贡献。

根据挥发性物质在秋刀鱼中的含量和阈值,使用公式(2)计算其OAV,进而确定其对干制秋刀鱼整体气味的贡献度;若OAV>1,则该物质对秋刀鱼的风味有重要影响,是气味活性物质(Jiang *et al*, 2022);若OAV<1,则该物质对秋刀鱼的风味影响较弱,主

表 2 秋刀鱼的挥发性物质组成
Tab.2 Volatile compounds identified from *C. saira*

| 分类 Classification | 保留时间 Retention time/min | 物质名称 Substance name | 含量 Content/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | |
|----------------------|-------------------------------|---|---|--------|--------|--------|----------|----------|
| | | | CK | 0 d | C | N | U | |
| 醛类 Aldehydes | 2.16 | 丙醛 Propanal | — | 138.95 | 221.63 | 383.84 | 577.30 | |
| | 7.21 | 己醛 Hexanal | 668.29 | 499.09 | 541.82 | 894.89 | 1 202.12 | |
| | 7.49 | 2-甲基-2-丁烯醛 2-Methyl-2-Butenal | — | — | — | 61.99 | 101.79 | |
| | 8.43 | 反-2-戊烯醛(E)-2-Pentenal | — | 80.96 | 89.83 | 167.52 | 175.03 | |
| | 9.14 | 2-甲基-2-戊烯醛 2-Methyl-2-Pentenal | — | — | 187.86 | 296.94 | 481.81 | |
| | 9.82 | 庚醛 Heptanal | 288.45 | 160.08 | 254.91 | 245.78 | 429.27 | |
| | 10.55 | 反-2-己烯醛(E)-2-Hexenal | 102.92 | 151.16 | 268.46 | 346.98 | 437.86 | |
| | 11.12 | 顺-4-庚烯醛(Z)-4-Heptenal | 160.91 | 131.61 | 222.20 | 213.07 | 324.18 | |
| | 12.08 | 辛醛 Octanal | 244.70 | 129.87 | 325.52 | 316.02 | 569.48 | |
| | 12.77 | 顺-2-庚烯醛(Z)-2-Heptenal | — | — | 33.24 | 42.19 | 64.96 | |
| | 14.08 | 壬醛 Nonanal | 105.09 | 47.92 | 185.69 | 230.60 | 393.19 | |
| | 14.72 | 反-2-辛烯醛(E)-2-Octenal | — | — | 66.37 | 88.72 | 105.80 | |
| | 15.35 | (反,反)-2,4-庚二烯醛(E,E)-2,4-Heptadienal | 64.51 | 98.07 | 176.94 | 284.02 | 281.38 | |
| | 16.35 | 苯甲醛 Benzaldehyde | 146.65 | 77.73 | 291.97 | 213.31 | 490.17 | |
| | 16.49 | 反-2-壬烯醛(E)-2-Nonenal | — | — | 54.87 | 35.85 | 45.08 | |
| | 17.31 | (反,反)-2,6-壬二醛(E,E)-2,6-Nonadienal | 50.29 | 60.37 | 287.70 | 261.95 | 315.37 | |
| | 19.18 | 4-乙基苯甲醛 4-Ethyl-Benzaldehyde | — | — | 61.10 | 63.27 | 120.60 | |
| | 醇类 Alcohols | 9.25 | 1-戊烯-3-醇 1-Penten-3-ol | 352.06 | 372.45 | 502.40 | 788.51 | 1 137.73 |
| | | 11.24 | 戊醇 1-Pentanol | — | — | 18.31 | 50.53 | 44.34 |
| 12.52 | | 反-2-戊烯-1-醇(E)-2-Penten-1-ol | 164.16 | 52.83 | 56.69 | 84.24 | 109.59 | |
| 12.67 | | 顺-2-戊烯-1-醇(Z)-2-Penten-1-ol | 177.11 | 153.12 | 209.06 | 246.94 | 359.61 | |
| 15.02 | | 1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol | 140.47 | 106.15 | 178.01 | 276.66 | 364.52 | |
| 15.09 | | 庚醇 1-Heptanol | 91.23 | 56.22 | 101.85 | 106.99 | 167.18 | |
| 17.68 | | 顺-2-辛烯-1-醇(Z)-2-Octen-1-ol | — | — | 60.97 | 33.19 | — | |
| 18.33 | | 壬醇 1-Nonanol | — | — | 50.55 | 68.16 | 107.89 | |
| 酮类 Ketones | 6.74 | 2,3-戊二酮 2,3-Pentanedione | 287.75 | 254.15 | 148.17 | 136.08 | 227.87 | |
| | 12.83 | 2,3-辛二酮 2,3-Octanedione | 107.22 | 43.73 | — | — | — | |
| | 13.98 | 2-壬酮 2-Nonanone | 49.17 | 30.89 | 102.44 | 157.98 | 203.50 | |
| | 16.25 | (反,反)-3,5-辛二烯-2-酮(E,E)-3,5-Octadien-2-one | 200.61 | 191.94 | 850.55 | 944.79 | 1 457.92 | |
| | 17.06 | 3,5-辛二烯-2-酮 3,5-Octadien-2-one | 130.43 | 92.51 | 354.84 | 363.38 | 668.30 | |
| | 17.46 | 2-十一酮 2-Undecanone | — | — | 28.68 | 31.12 | 52.81 | |
| 酸类 Acids | 21.46 | 己酸 Hexanoic acid | — | — | 49.68 | 63.14 | 70.45 | |
| | 24.97 | 壬酸 Nonanoic acid | 95.63 | — | — | 79.01 | 92.29 | |
| 烃类 Hydrocarbons | 3.01 | 壬烷 Nonane | — | — | 85.80 | 165.84 | 284.11 | |
| | 3.32 | 2,4-辛二烯 2,4-Octadiene | — | 62.57 | 156.66 | 190.51 | 393.02 | |
| | 3.48 | (顺,顺)-3,5-辛二烯(Z,Z)-3,5-Octadiene | — | — | 91.30 | 68.04 | 166.81 | |
| | 4.87 | 癸烷 Decane | — | — | 142.77 | 232.61 | 422.61 | |
| | 7.55 | 十一烷 Undecane | — | — | 67.06 | 95.35 | 173.84 | |
| | 7.73 | 1,3-顺,5-顺-辛三烯 1,3-Z,5-Z-Octatriene | — | — | 111.04 | 115.65 | 183.53 | |
| | 7.78 | 1-乙基-1,4-环己二烯 1-Ethyl-1,4-cyclohexadiene | — | — | 90.20 | 81.04 | 149.14 | |
| | 10.12 | 十二烷 Dodecane | 76.26 | — | 95.49 | 106.42 | 224.39 | |
| | 10.65 | 1,5-环辛二烯 1,5-Cyclooctadiene | — | — | 39.18 | — | 83.93 | |
| | 12.25 | 十三烷 Tridecane | 90.54 | 39.84 | 79.87 | 84.12 | 175.89 | |

续表 2

| 分类 Classification | 保留时间 Retention time/min | 物质名称 Substance name | 含量 Content /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | |
|----------------------|-------------------------------|--|--|----------|----------|----------|----------|
| | | | CK | 0 d | C | N | U |
| 烃类 | 14.12 | 十四烷 Tetradecane | - | - | 21.57 | 35.56 | 37.18 |
| Hydrocarbons | 15.20 | 3,5,5-三甲基-1-己烯 3,5,5-Trimethyl-2-Hexene | - | - | 34.48 | - | 51.61 |
| | 15.63 | 2,5,5-三甲基-2-己烯 2,5,5-Trimethyl-2-Hexene | 360.30 | 293.89 | 499.91 | 531.56 | 768.77 |
| | 15.83 | 十五烷 Pentadecane | 620.95 | 541.46 | 727.08 | 1073.15 | 1115.51 |
| | 17.61 | 1,2,3,3a,4,6a-六氢戊烯 1,2,3,3a,4,6a-Hexahydro-Pentalene | - | - | 114.86 | 76.71 | 103.94 |
| | 18.48 | 2,6,10,14-四甲基十五烷 2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecane | 4 594.16 | 1 607.78 | 3 005.48 | 1 975.08 | 3 310.61 |
| | 18.71 | 环辛二烯 1,3-Cyclooctadiene | 227.96 | 185.60 | 458.26 | 562.13 | 694.35 |
| | 20.98 | 1-甲基-2-亚甲基环己烷 1-Methyl-2-methylenecyclohexane | - | - | - | 53.06 | 73.03 |
| | 21.69 | 反-5-甲基-3-(甲基乙烯基)-环己烯 (E)-5-Methyl-3-(1-methylethenyl)-Cyclohexene | - | - | 52.40 | 57.74 | 62.13 |
| 其他 | 1.61 | 三甲胺 Trimethylamine | 282.12 | 147.26 | 149.88 | 386.58 | 792.28 |
| Others | 31.21 | 月桂酰胺 Dodecanamide | 49.19 | 27.79 | - | 33.31 | 71.24 |
| | 3.93 | 2-乙基呋喃 2-Ethyl-Furan | - | - | 86.23 | 119.28 | 189.27 |
| | 11.49 | 1-乙酰环己烯 1-Acetyl-1-cyclohexene | - | - | 86.20 | 153.22 | 202.36 |
| | 12.37 | 反-2-(2-戊烯基)-呋喃(E)-2-(2-Pentenyl)furan | - | - | 93.54 | 167.10 | 188.38 |
| | 19.25 | 2-甲氧基呋喃 2-Methoxy-Furan | - | - | 23.71 | 36.78 | - |

注：“-”表示含量低于检出限。CK为鲜秋刀鱼，0 d为腌制的秋刀鱼，N为自然干制的秋刀鱼，C为冷风干制的秋刀鱼，U为紫外+冷风干制的秋刀鱼。下图表同。

Note: “-” represents the content below the detection limit, CK represents fresh *C. saira*, 0 d represents cured *C. saira*, N represents naturally dried *C. saira*, C represents cold air-dried *C. saira*, U represents UV treated and cold air-dried *C. saira*. The same in the figures and tables below.

要起到丰富气味的作用。如表3所示，己醛、庚醛、顺-4-庚烯醛、辛醛、壬醛、(反,反)-2,4-庚二烯醛、(反,反)-2,6-壬二醛、1-戊烯-3-醇、1-辛烯-3-醇、1-庚醇、2,3-戊二酮、3,5-辛二烯-2-酮和三甲胺是5组秋刀鱼样品共有的气味活性物质，作为秋刀鱼的特征风味化合物表征其油脂味及鱼腥味。反-2-壬烯醛、2-乙基呋喃、反-2-辛烯醛、2-壬酮、2-十一酮、壬醇是3种干制秋刀鱼特有的气味活性物质，其中，具有油脂味(Amjad *et al.*, 2022)的反-2-辛烯醛、壬醇、2-十一酮以及具有焦香味(顾赛麒等, 2019)的2-乙基呋喃在紫外+冷风干制鱼中OAV最高，为紫外+冷风干制鱼带来丰富的油脂香味；此外，顺-2-庚烯醛具有油炸味、烤肉味(Amjad *et al.*, 2022)，其在紫外+冷风干制鱼中OAV>1，对于丰富其整体香气也有重要贡献。

2.2 电子舌测定结果

通常使用主成分分析(principal component analysis, PCA)来降低原始数据的维数(Jia *et al.*, 2020)，将多个传感器信号转化为几个具有代表性的

信息数据进行分析。如图1所示，主成分累积贡献率为99.65%，可以表征样品的主要滋味信息。CK组与另外几组样品在图中分布明显，这说明新鲜秋刀鱼与其他秋刀鱼样品在味道上差异极大，其中，CK组和0 d组分布于PCA分析图的左侧，N、C、U组分布于右侧，这表明干制后秋刀鱼的整体滋味发生变化，而C组与U组分布较近，说明冷风干制鱼和紫外+冷风干制鱼在滋味上更为接近。

图2为秋刀鱼的味觉指标雷达图，以参比溶液为基准，5组秋刀鱼样品的酸味、苦味回味和涩味回味均在无味点以下，不具有酸味、苦味回味和涩味回味。而鲜味、咸味和鲜味回味均有较高的响应值，是重要且突出的味觉指标。

以X轴为鲜味响应值，Y轴为鲜味回味，气泡大小表示咸味，绘制气泡图对比5组样品，结果如图3所示，干制后的秋刀鱼具有明显的咸味和鲜味回味，鲜味低于鲜鱼，U组的鲜味降低程度与C、N组相近，但其鲜味回味高于C、N组。鲜味回味反映了样品鲜味的持久性和丰富性，与鲜味物质的种类和含量有

关, CK、0 d、C、N、U 组的鲜味回味依次增大, 紫外+冷风干燥产生了较多的鲜味物质, 使秋刀鱼的鲜味回味最为强烈, 这表明紫外照射在干制秋刀鱼的整体风味提升方面有重要贡献。

3 讨论

干制水产品因其具有独特的风味而深受消费者喜爱, 在干制过程中脂质极易发生氧化, 脂质降解通常会产生脂肪族醛、酮、醇、酸、酯等, 从而产生特

有的肉类香气(Amjad *et al*, 2022)。

热、光、光敏剂、氧等可以催化脂质氧化和风味活性成分的形成(Lilian *et al*, 2017)。基态的分子氧处于其三重态($^3\text{O}_2$), 使不饱和脂肪酸自氧化形成氢过氧化物, 氢过氧化物极不稳定, 分解为许多具有气味活性的挥发性二级脂质氧化产物, 如酮、醛、烃、醇等。紫外光或肌红蛋白等使氧分子激发为单线态氧($^1\text{O}_2$)(Celia *et al*, 2021), 使脂质发生光氧化。 $^1\text{O}_2$ 比 $^3\text{O}_2$ 更亲电, 因此具有强烈的反应性, 导致光氧化时脂肪

表3 秋刀鱼挥发性物质的阈值和 OAV
Tab.3 Odor thresholds and aroma-active compounds of *C. saira*

| 分类 Classification | 物质名称 Substance name | 阈值 Threshold value/($\mu\text{g}/\text{Kg}$) | 风味特征 Flavor profile | OAV | | | | | |
|--------------------------------|---|--|-------------------------------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | | | CK | 0 d | C | N | U | |
| 醛类 Aldehydes | 丙醛 Propanal | 15.00 | 焦糖味、甜味 Caramel, sweet | — | 9.26 | 14.78 | 25.59 | 38.49 | |
| | 己醛 Hexanal | 5.00 | 青草味 Green | 133.66 | 99.82 | 108.36 | 178.98 | 240.42 | |
| | 2-甲基-2-丁烯醛 2-Methyl-2-Butenal | 46.00 | 化学刺激味 Chemical | — | — | — | 1.35 | 2.21 | |
| | 庚醛 Heptanal | 2.80 | 青草味 Green | 103.02 | 57.17 | 91.04 | 87.78 | 153.31 | |
| | 顺-4-庚烯醛(Z)-4-Heptenal | 0.40 | 油脂味、鱼腥味 Oily, fishy | 402.28 | 329.02 | 555.51 | 532.68 | 810.45 | |
| | 辛醛 Octanal | 0.59 | 青草味、柑橘味 Green, citrus | 414.74 | 220.11 | 551.72 | 535.62 | 965.22 | |
| | 顺-2-庚烯醛(Z)-2-Heptenal | 56.00 | 油炸味、烤肉味 Fried, roasted meat | — | — | 0.59 | 0.75 | 1.16 | |
| | 壬醛 Nonanal | 1.10 | 鱼腥味、焦香味 Fishy, caramel | 95.53 | 43.56 | 168.81 | 209.63 | 357.45 | |
| | 反-2-辛烯醛(E)-2-Octenal | 3.00 | 青草味、花香 Green, floral | — | — | 22.12 | 29.57 | 35.27 | |
| | (反,反)-2,4-庚二烯醛 (E,E)-2,4-Heptadienal | 15.00 | 青草味、油脂味 Green, oily | 4.30 | 6.54 | 11.80 | 18.93 | 18.76 | |
| | 反-2-壬烯醛(E)-2-Nonenal | 0.19 | 油脂味 Fatty | — | — | 288.77 | 188.66 | 237.26 | |
| | (反,反)-2,6-壬二醛 (E,E)-2,6-Nonadienal | 0.50 | 青草味、黄瓜味 Green, cucumber | 100.58 | 120.74 | 575.41 | 523.91 | 630.74 | |
| | 醇类 Alcohols | 1-戊烯-3-醇 1-Penten-3-ol | 360.00 | 焦味、肉香味 Caramel, meaty | 0.98 | 1.03 | 1.40 | 2.19 | 3.16 |
| | | 1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol | 1.50 | 蘑菇味 Mushroom | 93.65 | 70.77 | 118.67 | 184.44 | 243.01 |
| 1-庚醇 1-Heptanol | | 5.40 | 油脂味、柑橘味 Fatty, citrus | 16.89 | 10.41 | 18.86 | 19.81 | 30.96 | |
| 顺-2-辛烯-1-醇 (Z)-2-Octen-1-ol | | 20.00 | 蘑菇味 Mushroom | — | — | 3.05 | 1.66 | — | |
| 壬醇 Nonanol | | 46.00 | 油脂味 Oily, fatty | — | — | 1.10 | 1.48 | 2.35 | |
| 酮类 Ketones | 2,3-戊二酮 2,3-Pentanedione | 30.00 | 奶香味、黄油味 Creamy, buttery | 9.59 | 8.47 | 4.94 | 4.54 | 7.60 | |
| | 2,3-辛二酮 2,3-Octanedione | 2.52 | 蘑菇味 Mushroom | 42.55 | 17.35 | — | — | — | |
| | 2-壬酮 2-Nonanone | 82.00 | 花香 Flower | — | 0.75 | 2.50 | 3.85 | 4.96 | |
| | 3,5-辛二烯-2-酮 3,5-Octadien-2-one | 150.00 | 泥土味、蘑菇味 Earthy, mushroom | 0.87 | 0.62 | 2.37 | 2.42 | 4.46 | |
| | 2-十一酮 2-Undecanone | 5.50 | 水果味、油脂味 Fruity, fatty | — | — | 5.21 | 5.66 | 9.60 | |
| 酸类 Acids | 壬酸 Nonanoic acid | 9.00 | 橡胶味 Rubber | 10.63 | — | — | — | 10.25 | |
| | 三甲胺 Trimethylamine | 2.40 | 鱼腥味、胺味 Fishy, amine | 117.55 | 61.36 | 161.08 | 62.45 | 330.11 | |
| 其他 Others | 2-乙基呋喃 2-Ethyl-Furan | 2.30 | 可可豆、焦香味 Cocoa beans, burnt aroma | — | — | 51.86 | 37.49 | 82.29 | |

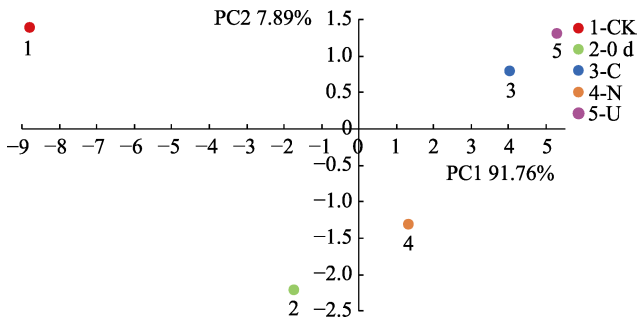


图1 秋刀鱼电子舌主成分分析图
Fig.1 PCA of the E-tongue of *C. saira*

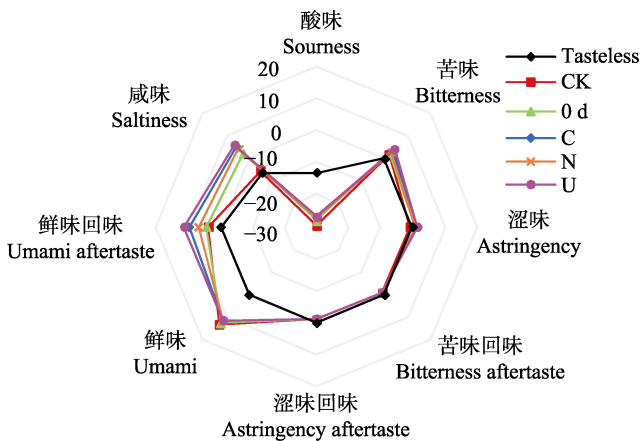


图2 秋刀鱼味觉指标雷达图
Fig.2 Radar map of taste indicators of *C. saira*

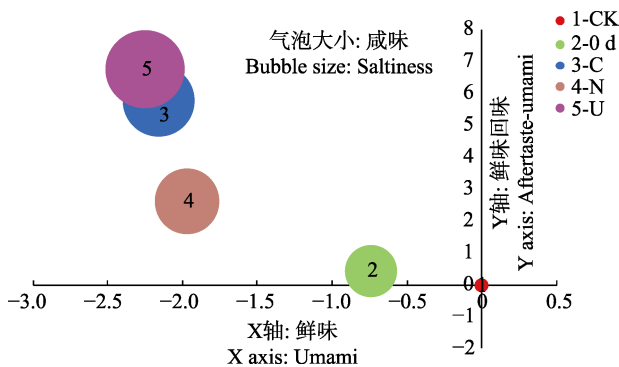


图3 秋刀鱼咸味、鲜味和鲜味回味气泡图
Fig.3 Bubble chart of the saltiness, freshness and richness of *C. saira*

酸的反应速率比自氧化时更快。酶氧化通过脂肪氧合酶立体选择性的催化含有1,4-顺,顺戊二烯基团的多不饱和脂肪酸发生不可逆氧化,并产生立体特异性的共轭二烯脂肪酸氢过氧化物,裂解生成醇、醛、酮等小分子化合物,对食品风味形成有重要贡献(王帮国等,2018)。自然干制秋刀鱼发生光氧化、自氧化、酶氧化共同促进(反,反)-2,4-庚二烯醛、2,3-戊二酮等挥发性化合物大量积累。冷风干燥过程中,冷风循环一

定程度延缓了光氧化和酶氧化,使脂质氧化生成的风味物质减少,导致冷风干制秋刀鱼风味较为平淡。紫外+冷风干燥加工过程中,紫外照射在一定程度上促进了光氧化,使得挥发性化合物的种类和含量均增加,尤其是积累了大量的顺-4-庚烯醛、辛醛、顺-2-庚烯醛和2-乙基呋喃等物质,丰富了干制秋刀鱼的油脂香味。

此外,干制过程中秋刀鱼的脂质氧化产物还参与以Strecker降解为主的非酶褐变反应,如脂质氧化产物(E)-2-(E)-4-烯醛与赖氨酸反应生成2-甲基-2-戊烯醛(尤海琳等,2019),对其风味有重要影响,C、N、U组2-甲基-2-戊烯醛的含量分别为187.86、296.94和481.81 $\mu\text{g}/\text{kg}$,因而,推测3种干制加工中紫外+冷风干燥组的秋刀鱼脂质氧化及Strecker降解程度相对较高。

使用电子舌模拟人类味觉,通过检测各种味物质和人工脂膜之间的静电作用或疏水性相互作用产生的膜电势的变化(Lu *et al.*, 2022),准确、客观地对干制秋刀鱼进行酸味、涩味、苦味、咸味、鲜味、甜味及回味评价。食盐腌制有利于增咸提香,鲜味回味可能与干制过程中组氨酸的积累有关(翁世兵等,2007),使其风味更加浓厚。3种干制方式均能使秋刀鱼咸味和鲜味回味显著增加,而紫外+冷风干制鱼咸味和鲜味回味变化显著,具备较为丰富的滋味和回味。

4 结论

干制后秋刀鱼的挥发性气味发生明显变化,自然干燥、冷风干燥和紫外+冷风干燥3种干制方式均不同程度地增加了秋刀鱼的油脂香味而丰富其香味,其中,紫外+冷风干燥过程中产生了较多的具有油脂香味的物质,同时,顺-2-庚烯醛和2-乙基呋喃等物质的增加丰富了干制秋刀鱼的气味。咸味、鲜味和鲜味回味是干制秋刀鱼重要的味觉指标,3种干制方式均增加了秋刀鱼的咸味和鲜味回味,尤其紫外+冷风干燥极大地丰富了其滋味和回味。综上,上述3种干制方式中,紫外+冷风干制加工能够最大程度地丰富秋刀鱼的风味。

参 考 文 献

- AMJAD S, SAM A, WANG J, *et al.* Aroma compounds identified in cooked meat: A review. *Food Research International*, 2022, 157: 111385
- BEKHIT A, GITERU S, HOLMAN B, *et al.* Total volatile basic nitrogen and trimethylamine in muscle foods: Potential formation pathways and effects on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(4): 3620-3666

- CAO R, ZHAO L, WANG L Z, *et al.* Taste characteristic analysis of *Porphyra yezoensis* during different harvest periods: A study based on electronic tongue technology. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 147–154 [曹荣, 赵玲, 王联珠, 等. 基于电子舌技术分析不同采收期紫菜的滋味特征. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 147–154]
- CELIA A, JOSE M, FRANCISCO J P, *et al.* The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4642
- CHEN F X, DENG Y, CHEN L W, *et al.* Quality change and aroma formation of pre-cooled air-dried Wuchang fish during drying. *Modern Food Science and Technology*, 2023(2): 9–17 [陈方雪, 邓祎, 湛玲薇, 等. 预制冷风干武昌鱼干制过程中的品质变化及香气形成. *现代食品科技*, 2023(2): 9–17]
- EMAN S H, AL-SABAGH. Effect of freezing and frozen storage on amino acid profile and fatty acid pattern in imported and local meat. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 2016, 49(1): 113–121
- FÁBIO A, VALQUÍRIA C, MARTA S, *et al.* Aroma profile and consumer liking of salted and dried chicken meat: Effects of desalting and cooking methods. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(12): 2954–2965
- FEREIDON S, ABREHEM A. Lipid-derived flavours and off-flavours in food. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 2019, 182–192
- GONG H, YANG Z, LIU M, *et al.* Changes in volatile flavor compounds during heat processing of *Cololabis saira*. *Meat Research*, 2017, 31(1): 25–31 [贡慧, 杨震, 刘梦, 等. 秋刀鱼热加工后挥发性风味成分变化的分析. *肉类研究*, 2017, 31(1): 25–31]
- GU S Q, TANG J J, ZHOU X X, *et al.* Quality change and aroma formation in cured fish during traditional sun drying processing. *Food Science*, 2019, 40(17): 36–44 [顾赛麒, 唐锦晶, 周绪霞, 等. 腌腊鱼传统日晒干制过程中品质变化与香气形成. *食品科学*, 2019, 40(17): 36–44]
- HU M, WANG S, LIU Q, *et al.* Flavor profile of dried shrimp at different processing stages. *LWT—Food Science and Technology*, 2021, 146: 111403
- JIA Z, SHI C, WANG Y, *et al.* Nondestructive determination of salmon fillet freshness during storage at different temperatures by electronic nose system combined with radial basis function neural networks. *International Journal of Food Science and Technology*, 2020, 55(5): 2080–2091
- JIAN C, WANG L Z, WANG S Y, *et al.* Changes in flavor substances of traditional dried-salted Spanish mackerel during natural air-drying process. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2022, 12(1): 22–28 [简冲, 王灵昭, 王善宇, 等. 传统咸干鲛鱼自然风干过程风味物质变化. *中国渔业质量与标准*, 2022, 12(1): 22–28]
- JIANG H, ZHANG M, YE J, *et al.* HS-SPME-GC-MS and OAV analyses of characteristic volatile flavour compounds in salt-baked drumstick. *LWT*, 2022, 170: 114041
- LI F, FENG X, ZHANG D, *et al.* Physical properties, compositions and volatile profiles of Chinese dry-cured hams from different regions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14: 492–504
- LI Q, XIA G L, CAO R, *et al.* Changes in the flavor of *Apostichopus japonicus* gonads during enzymatic hydrolysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(6): 239–248 [李倩, 夏光丽, 曹荣, 等. 仿刺参性腺酶解过程风味变化. *渔业科学进展*, 2022, 43(6): 239–248]
- LILIAN R B M, NEURA B. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International*, 2017, 94: 90–100
- LU L, HU Z, HU X, *et al.* Electronic tongue and electronic nose for food quality and safety. *Food Research International*, 2022, 162(Part B): 112214
- SAMAR M B, CLARICE N, MOHAMED A. Dissecting grilled red and white meat flavor: Its characteristics, production mechanisms, influencing factors and chemical hazards. *Food Chemistry*, 2022, 371: 131139
- TANG J, ZHANG Y Y, WU H Z, *et al.* Recent progress on volatile flavor compounds of traditional Chinese cured meat products. *Food Science*, 2014, 35(15): 283–288 [唐静, 张迎阳, 吴海舟, 等. 传统腌腊肉制品挥发性风味物质的研究进展. *食品科学*, 2014, 35(15): 283–288]
- WANG B G, YU Z Y, LIN L, *et al.* Effect of ultrasonic wave and ultra high pressure treatment on conformation and enzyme activity of lipoxigenase in silver carp muscle. *Food Science*, 2018, 39(3): 169–175 [王帮国, 余振宇, 林琳, 等. 超声波、超高压对白鲢鱼肌肉脂肪氧合酶构象及酶活力的影响. *食品科学*, 2018, 39(3): 169–175]
- WANG L, ZHAO L, QI X M, *et al.* Nutritional composition analysis and quality evaluation of muscles of different specifications of *Cololabis saira*. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 12(21): 6815–6820 [王琳, 赵玲, 齐祥明, 等. 不同规格秋刀鱼肌肉的营养成分分析与品质评价. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(21): 6815–6820]
- WANG Z Y, WANG Z Z, LI Y, *et al.* Research on the detection of the volatile substances changes of canned oil skipjack during storage. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(8): 316–321 [王朝阳, 王祖忠, 李晔, 等. 油浸鲣鱼罐头贮藏过程中挥发性成分的变化规律研究. *食品工业科技*, 2017, 38(8): 316–321]
- WENG S B, SUN H L. Marine umami substances and characteristic tastes of seafood. *China Condiment*, 2007(11): 21–27 [翁世兵, 孙恢礼. 海产鲜味物质及海产品特征滋味的研究进展. *中国调味品*, 2007(11): 21–27]
- WU Y Y, WANG Y Q, LI L H, *et al.* Analysis of volatile components in various cured hairtail by electronic nose and HS-SPME-GC-MS. *Journal of Fisheries of China*, 2016,

40(12): 1931–1940 [吴燕燕, 王悦齐, 李来好, 等. 基于电子鼻与 HS-SPME-GC-MS 技术分析不同处理方式腌干带鱼挥发性风味成分. 水产学报, 2016, 40(12): 1931–1940]
YOU H L, JIANG L, LIU K K, *et al.* Effect of marine

phospholipid oxidation on food flavors. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(11): 268–273 [尤海琳, 姜璐, 刘锴锴, 等. 海洋磷脂氧化及其对食品风味的影响. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 268–273]

(编辑 陈 辉)

Effect of Drying Methods on the Flavor of *Cololabis saira* Assessed by GC-MS Coupled with Electronic Tongue

WANG Lin^{1,2}, ZHAO Ling¹, LIU Qi¹①, QI Xiangming², CAO Rong¹, MU Weili³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

3. Rongcheng Yinhai Seafood Co., Ltd., Rongcheng 264308, China)

Abstract Flavor is an important characteristic of seafood products, and drying can produce unique pleasant flavors. Drying is among the most common methods for processing seafood products. It can improve quality and shelf-life of seafood products and produce unique flavors. Oxidative hydrolysis of lipids during dry fish processing in the presence of light, photosensitizers, heat, oxygen, transition metal ions, and microorganisms produces volatile small molecules, including alcohols, ketones, aldehydes, and acids, which contribute to the flavor profile of dried fish. Volatile compounds are important components of seafood flavor. Flavor analyses are usually performed using gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in combination with electronic nose/tongue techniques, which not only characterizes the molecular composition of volatile components in the sample, but also yields macroscopic results via the electronic nose/tongue, ultimately combining instrumental analysis with quantitative sensory data for a comprehensive evaluation of sample flavor. Currently, the market sales model of *Cololabis saira* is mainly based on a single frozen whole *C. saira*, and excludes most types of deep-processed products. There is an urgent need to enrich research into processing effects on *C. saira* quality and flavor, and further develop markets for deep-processed *C. saira* products. To explore the effects of different drying methods on *C. saira* flavor, we assessed flavor molecule profiles using GC-MS and electronic tongue techniques. This study aimed to provide a theoretical basis for improving *C. saira* product flavor, thereby enhancing the economic impact of the *C. saira* industry. In this study, *C. saira* was thawed in low-temperature air, and the giblets were removed and diagonally cut. Pre-treated fish were then soaked in 15% salt water for 1 h, drained naturally, and subjected to natural drying (natural air-drying on a sunny day in autumn for 3 days, environmental temperature 10~20 °C, humidity 25%~42%), cold air-drying (continuous cold air-drying for 3 days, setting temperature (15±2) °C, relative humidity 38%~40%), and UV with cold air-drying (continuous UV with cold air-drying for 3 days, ultraviolet lamp irradiation, setting temperature (15±2) °C, relative humidity 38%~40%). The flavor profiles of fresh fish (CK), cured fish (0 d), naturally dried fish (N), cold air-dried fish (C), and UV treated cold air-dried fish (U) were compared. Significant differences were observed in the odor and taste of dried *C. saira* among products of the different drying methods. GC-MS results showed that a total of 58 volatile flavor substances were detected, including aldehydes, alcohols,

① Corresponding author: LIU Qi, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

ketones, acids, hydrocarbons, and nitrogenous compounds. Increased alcohols, aldehydes, and ketones enriched the fatty aroma of the three dried *C. saira* samples to varying degrees. Among them, the contents of cis-2-heptenal, octylaldehyde, 2-ethylfuran and other substances in U group increased significantly, increasing to 64.96, 569.48 and 189.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively, so that the U group had richer fat flavor. Hexanal, heptanal, Z-4-heptenal, octanal, nonanal, (E,E)-2,4-heptadienal, (E,E)-2,6-nonandialdehyde, 1-octen-3-ol, heptanol, 2,3-pentanedione, 3,5-octadien-2-one, and trimethylamine were the odor-active substances common to the five *C. saira* samples and were used as flavor compounds to characterize the oily and fishy taste of *C. saira*. E-2-nonenal, 2-ethylfuran, E-2-octenal, 2-nonanone, 2-undecanone, and 1-nonanol are three odor-active substances specific to dried *C. saira*, with E-2-octenal, 1-nonanol and 2-undecanone, which have an oily smell, and 2-ethylfuran, which has a burnt smell, having the highest odor aroma-active in the U group. Salty taste, richness, bitterness, astringency, and sourness of the fish increased after the drying process, especially salty taste and richness. Only fresh taste was significantly reduced relative to fresh fish. Saltiness, freshness, and richness of dried fish are important taste indicators. Salty taste and richness increased significantly after the three drying processes, whereas freshness decreased. Group U exhibited the highest salty taste and richness.

In conclusion, the volatile odor and profile of *C. saira* changed significantly with each of three drying processes (natural drying, cold air drying, and UV with cold air drying), all of which increased the fatty flavor and considerably reduced the fishy flavor. Moderate oxidation positively contributes to *C. saira* flavor. Increased fatty flavor reduces the proportion of fishy substances, thus improving *C. saira* flavor. UV irradiation with cold air drying promoted lipid oxidation to some extent, producing more fatty substances, as well as cis-2-heptenal and 2-ethylfuran, which enriched the roasted, charred flavor of dried *C. saira*. Salinity, freshness, and richness are important taste indicators of dried *C. saira*. All three drying methods enhanced the salinity and richness of *C. saira*, and UV irradiation with cold air-drying significantly improved the salinity and richness of the fish and enriched its taste and aftertaste. Therefore, among the three drying methods, the method involving UV with cold air drying significantly enriched the flavor of *C. saira* to the greatest extent.

Key words *Cololabis saira*; Natural drying; Cold air drying; UV with cold air drying; Flavor change

《渔业科学进展》投稿须知

《渔业科学进展》主要刊载水产领域各学科的基础理论和应用研究成果，设研究论文、研究简报，也刊载反映水产学科发展方向的优秀综述文章，但不接收第一作者为硕士生的综述。对于创新性高的论文，本刊承诺在最短时间内予以优先发表。经本刊审定录用的稿件均可在知网版优先发表，并视同正式发表。

期刊使用在线稿件处理系统 <http://www.yykxjz.cn>。请至本刊主页“作者登录”注册、登录，根据提示提交 Word 稿件。投稿前，请进行以下确认：

1. 该论文为作者原创，享有自主知识产权，无抄袭问题，无学术伪造，不涉及泄密。
2. 该论文的相关内容无一稿多投，也未在其他任何刊物上发表。
3. 该论文作者的署名及顺序经每位作者确认，属实且准确，作者之间无署名及排序纠纷。
4. 该论文的研究符合道德准则及学术伦理，并遵守国家相应的法律法规；该论文用做实验的动物享受了其应有的福利及人道处理。

审稿及发表事项

1. 本刊实行同行专家双盲审，您可推荐相关专家若干名，并列明专家姓名、单位、研究方向及邮箱等。
2. 论文经 2 位以上专家审阅、编委会审定，编辑部在 2 个月内将审稿意见反馈给作者，期间作者不得将该论文投往他刊。
3. 论文出版后将收取版面费，300 元/版(≤10 版)，450 元/版(>10 版)，如印刷彩图，费用另计。稿件刊登后酌付稿酬，并赠送 2~3 本当期期刊。

论文写作要求

1. 在摘要里需明确该论文的创新点 1~2 个。英文摘要的字数应不少于 800 单词，需详细描述研究背景、目的、方法、结果、结论及研究的意义，即将英文摘要撰写为一篇小论文，比中文摘要更详细、更丰富，“拥有与论文同等量的主要信息”。
2. 作者单位的中英文需对应，需写明系或学院全称，请写明各层次的重点实验室名称，并核实其准确性。
3. 在文稿首页的脚注处注明资助项目及编号(请同时提供中文和英文)，并注明第一作者的 E-mail 和通讯作者的职称、E-mail。
4. 文章各部分的格式，请参考网站最新发表的文章，无需考虑文章的格式排版。
5. 物种在文中首次出现，应同时写出其拉丁文名。
6. 注意区分蛋白和基因的大小写、正斜体，蛋白用大写、正体，基因用小写、斜体。

7. 图的要求

- (1) 图中不同图例之间要易于区分，如较难区分，可制作彩图。
- (2) 图中所有内容(横坐标、纵坐标、图例、图注等)均需中、英文双语。
- (3) 横、纵坐标需符合规范，包括中英文标目、单位(如有)。如：磷酸盐浓度 Concentration of phosphate/(mg/L)
- (4) 图中的数据、方程等要与文中的描述一致。
- (5) 图件请插入论文 Word 文档的相应位置，供审稿专家审阅。
- (6) 投稿时，请将所有图的原始图打包，作为附件上传，方便排版时调整图中文字的字体和字号。线条图、柱状图等可提供原始软件制作的矢量图，如 emf、wmf、eps、Excel、surf 或 ai 等格式的文件。照片图可提供 ppt 文件，每张照片单独成张，图中的线、点、箭头、文字等可编辑。

8. 表格的要求

- (1) 请制作成三线表(顶线、表头线、底线)。
- (2) 表题、表注等需用中、英文双语标注。
- (3) 表格中的数据精确度(小数点后的位数)保持一致，一般情况下，小数点后的数字不超过 3 位。

9. 参考文献的要求

- (1) 对国内外发表的相关论文，特别是近期的研究成果应充分引用。所有文献按字母顺序排列。
- (2) 中文参考文献需列出对应英文信息，请从数据库查阅其英文题目、期刊名称等。
- (3) 文中提及的文献需和文后列出的文献相对应，请仔细核对：正文中引用的文献，是否在正文后的参考文献部分中列出；参考文献部分中列出的，是否已在正文中引用。
- (4) 参考文献的卷、期(如有)、页码均需详细列出。参考文献的作者需列出前 3 位。英文参考文献，请注意区分外国作者的 Last name 和 First name，姓在前，名在后，名用缩写。英文的姓名所有字母均大写，名的两个字母之间空一格。英文刊名请使用全称。

《渔业科学进展》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 包振民 BAO Zhenmin 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

| | | | |
|------------------|------------------|-------------------|-----------------------|
| 王清印 WANG Qingyin | 王鲁民 WANG Lumin | 王新鸣 WANG Xinming | 戈贤平 GE Xianping |
| 孔杰 KONG Jie | 叶乃好 YE Naihao | 曲克明 QU Keming | 任胜民(新西兰) REN Shengmin |
| 危起伟 WEI Qiwei | 庄平 ZHUANG Ping | 刘英杰 LIU Yingjie | 关长涛 GUAN Changtao |
| 江世贵 JIANG Shigui | 严小军 YAN Xiaojun | 李军(美) LI Jun | 李纯厚 LI Chunhou |
| 李健 LI Jian | 李家乐 LI Jiale | 李琪 LI Qi | 杨红生 YANG Hongsheng |
| 何建国 HE Jianguo | 邹桂伟 ZOU Guiwei | 宋林生 SONG Linsheng | 张国范 ZHANG Guofan |
| 陈松林 CHEN Songlin | 陈勇(美) CHEN Yong | 邵长伟 SHAO Changwei | 林洪 LIN Hong |
| 周永灿 ZHOU Yongcan | 单秀娟 SHAN Xiujuan | 赵宪勇 ZHAO Xiaoyong | 俞志明 YU Zhiming |
| 秦启伟 QIN Qiwei | 徐跑 XU Pao | 徐皓 XU Hao | 黄捷 HUANG Jie |
| 常亚青 CHANG Yaqing | 崔利锋 CUI Lifeng | 董云伟 DONG Yunwei | 解绶启 XIE Shouqi |
| 谭志军 TAN Zhijun | 薛长湖 XUE Changhu | 薛清刚 XUE Qinggang | |

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 叶乃好 YE Naihao

编辑部主任 Editorial Director 常青 CHANG Qing

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第45卷 第3期 2024年6月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.45 No.3 Jun. 2024

| | | | |
|------|--|-------------------------|--|
| 主管单位 | 中华人民共和国农业农村部 | Administrated by | Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China |
| 主办单位 | 中国水产科学研究院黄海水产研究所 中国水产学会 | Sponsored by | Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences China Society of Fisheries |
| 出版单位 | 科学出版社 地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717 | Published by | Science Press Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China |
| 编辑单位 | 中国水产科学研究院黄海水产研究所 地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071 电话: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn | Edited by | Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn |
| 主编 | 金显仕 | Editor-in-Chief | Jin Xianshi |
| 印刷 | 青岛国彩印刷股份有限公司 | Printed by | Qingdao Guocai Printing Co., Ltd. |
| 国内发行 | 中国邮政集团公司山东省分公司 | Domestic Distributed by | China Post Group Corporation Shandong Branch |
| 订购 | 全国各地邮政局 | Subscription | Post Offices All Over China |
| 国外发行 | 中国国际图书贸易集团有限公司 地址: 北京市海淀区车公庄西路35号 邮编: 100048 | Overseas Distributed by | China International Book Trading Corporation Add: 35 Chegongzhuang West Road, Haidian District, Beijing 100048, China |

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定价: 40.00元



中国邮政订阅二维码

ISSN 2095-9869



9 772095 986248

06>