

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第39卷 VOL.39 第1期 NO.1



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 39 卷 第 1 期

2018 年 2 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

“973”专栏——近海环境变化引起的资源效应

- 莱州湾春季鱼类群落关键种的长期变化 杨 涛 单秀娟 金显仕 陈云龙 滕广亮 魏秀锦 (1)
- 黄海高眼鲱卵巢发育特征及卵径分布 滕广亮 单秀娟 金显仕 戴芳群 陈云龙 杨 涛 (12)
- Using SSR Marker to Trace Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Released in Natural Sea — A Feasible Strategy for Assessment of Release Effect in Natural Resources Recovery Program WANG Weiji, WANG Mosang, XIAO Guangxia, HU Yulong, SONG Wenping, KONG Jie, JIN Xianshi (21)

研究论文

- 山东南部沿海夏季大型底栖动物群落结构特征 涂梁莉 刘卫霞 隋吉星 曲方圆 赵凡淇 钟海霞 张蒙生 于子山 (27)
- 渤海湾近岸海域浮游纤毛虫丰度和生物量的季节变化 于 莹 周 锋 房恩军 郭 彪 张博伦 张武昌 (37)
- 黄渤海鱼类优先监控重金属污染物的筛选与评价 韩丹丹 赵 峰 牟伟丽 张道旭 周德庆 (46)
- 獐子岛邻近海域悬浮颗粒物的时空分布特性 李 敏 张继红 吴文广 刘 毅 王 巍 蔺 凡 马 莎 杨艳云 (54)
- 基于约束线性回归的柔鱼栖息地指数渔场预报模型构建 崔雪森 周为峰 唐峰华 戴 阳 张胜茂 程田飞 (64)
- 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析 王玉红 尹晓雪 丁明媚 付胜利 陈 萌 郭 政 叶剑敏 (73)
- 凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对 WSSV 敏感性的差异分析 卢 霞 栾 生 曹宝祥 郝登春 孟宪红 曹家旺 代 平 罗 坤 孔 杰 (83)
- 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计 郝登春 栾 生 曹宝祥 郭聚涛 罗 坤 陈宝龙 孟宪红 许圣钰 孔 杰 (90)
- 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶 β 亚基(*F-ATPase β*)基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化 王竹青 任宪云 高保全 刘 萍 张小辉 张 杰 于 旋 (97)
- 基于高通量测序的虾夷扇贝基因组微卫星特征分析 倪守胜 杨 钰 柳淑芳 庄志猛 (107)
- 长牡蛎高糖原含量新品系正反交家系的生理代谢 刘 雨 王卫军 杨建敏 孙国华 马敬骏 李焕军 (114)
- 大竹蛎 β -整合素基因 *Sg β Int* 的特性分析和重组表达 刘佳乐 韦秀梅 杨顶珑 童 潼 刘相全 (120)
- 魁蚶 C 型凝集素基因 cDNA 的克隆及表达分析 沈淑芳 朱 玲 李加琦 薛素燕 李 阳 陈琼琳 毛玉泽 庄志猛 方建光 (128)
- 3 株 O3 血清型鳗弧菌灭活疫苗的免疫原性和免疫保护效果 李淑芳 唐 磊 李 杰 李贵阳 王晓冉 王小鹿 丁 山 莫照兰 (137)
- 加工方式对海水虾及其制品中 SO₂ 含量的影响 何 柳 郭莹莹 王联珠 朱文嘉 刘 芬 杨祯祯 (144)
- 《渔业科学进展》录用定稿网络首发征稿启事 (150)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.39 No.1 February 2018

- Long-term Changes in Keystone Species in Fish Community in Spring in Laizhou Bay.....
..... YANG Tao, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi, CHEN Yunlong, TENG Guangliang, WEI Xiujin (1)
- A Study on the Ovary-Development Characters and Oocyte Size-Distribution of *Cleisthenes Herzensteini* in the Yellow Sea.....
..... TENG Guangliang, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi, DAI Fangqun, CHEN Yunlong, YANG Tao (12)
- Using SSR Marker to Trace Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Released in Natural Sea — A Feasible Strategy for
Assessment of Release Effect in Natural Resources Recovery Program.....
..... WANG Weiji, WANG Mosang, XIAO Guangxia, HU Yulong, SONG Wenping, KONG Jie, JIN Xianshi (21)
- The Community Structure of Macrobenthos in the Southern Coastal Waters Nearby the Shandong Peninsula in Summer.....
..... TU Liangli, LIU Weixia, SUI Jixing, QU Fangyuan, ZHAO Fanqi, ZHONG Haixia, ZHANG Mengsheng, YU Zishan (27)
- Seasonal Variations of Planktonic Ciliates in the Coastal Area of the Bohai Bay.....
..... YU Ying, ZHOU Feng, FANG Enjun, GUO Biao, ZHANG Bolun, ZHANG Wuchang (37)
- Hazard Analysis and Screening of the Prior Heavy Metals of Priority Pollution in Fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea.....
..... HAN Dandan, ZHAO Feng, MU Weili, ZHANG Daoxu, ZHOU Deqing (46)
- The Spatial-Temporal Distribution of the Suspended Particulate Matter in the Water Adjacent to the Zhangzidao Island.....
..... LI Min, ZHANG Jihong, WU Wenguang, LIU Yi, WANG Wei, LIN Fan, MA Sha, YANG Yanyun (54)
- The Construction of Habitat Suitability Index Forecast Model of *Ommastrephes bartramii* Fishing Ground Based on Constrained
Linear Regression..... CUI Xuesen, ZHOU Weifeng, TANG Fenghua, DAI Yang, ZHANG Shengmao, CHENG Tianfei (64)
- Molecular Cloning and Expression Analysis of *Xbp1-S* of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).....
..... WANG Yuhong, YIN Xiaoxue, DING Mingmei, FU Shengli, CHEN Meng, GUO Zheng, YE Jianmin (73)
- Investigation on the Susceptibility Difference to WSSV between Ammonia Tolerant and Sensitive *Litopenaeus vannamei*
Populations..... LU Xia, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, HAO Dengchun,
MENG Xianhong, CAO Jiawang, DAI Ping, LUO Kun, KONG Jie (83)
- Genetic Parameters of Survival of Juvenile Families of *Litopenaeus vannamei* During Desalination and Culture Stages.....
..... HAO Dengchun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, GUO Jutao,
LUO Kun, CHEN Baolong, MENG Xianhong, XU Shengyu, KONG Jie (90)
- cDNA Cloning and Expression Analysis of *F-ATPase β* Subunit Gene in *Portunus trituberculatus* and Its Variation in Family
Inbreeding..... WANG Zhuqing, REN Xianyun, GAO Baoquan, LIU Ping, ZHANG Xiaohui, ZHANG Jie, YU Xuan (97)
- Microsatellite Analysis of *Patinopecten yessoensis* Using Next-Generation Sequencing Method.....
..... NI Shousheng, YANG Yu, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng (107)
- Analysis on Physiological Metabolism in Reciprocal Cross Families of High Glycogen Content Line of Pacific Oyster
(*Crassostrea gigas*)..... LIU Yu, WANG Weijun, YANG Jianmin, SUN Guohua, MA Jingjun, LI Huanjun (114)
- Recombinant Expression and Characterization of the β -Integrin Gene of *Solen grandis*.....
..... LIU Jiale, WEI Xiumei, YANG Dinglong, TONG Tong, LIU Xiangquan (120)
- Molecular Cloning and Expression Analysis of C-Type Lectin from *Scapharca broughtonii*.....
..... SHEN Shufang, ZHU Ling, LI Jiaqi, XUE Suyan, LI Yang,
CHEN Qionglin, MAO Yuze, ZHUANG Zhimeng, FANG Jianguang (128)
- Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Inactivated *Vibrio anguillarum* Serotype O3 Vaccine Preparations.....
..... LI Shufang, TANG Lei, LI Jie, LI Guiyang, WANG Xiaoran, WANG Xiaolu, DING Shan, MO Zhaolan (137)
- Effects of Processing Methods on the Content of Sulfur Dioxide in Shrimp and Its Products.....
..... HE Liu, GUO Yingying, WANG Lianzhu, ZHU Wenjia, LIU Fen, YANG Zhenzhen (144)

DOI: 10.11758/yykxjz.20170912001

http://www.yykxjz.cn/

杨涛, 单秀娟, 金显仕, 陈云龙, 滕广亮, 魏秀锦. 莱州湾春季鱼类群落关键种的长期变化. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 01-11

Yang T, Shan XJ, Jin XS, Chen YL, Teng GL, Wei XJ. Long-term changes in keystone species in fish community in spring in Laizhou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 01-11

莱州湾春季鱼类群落关键种的长期变化*



杨涛¹ 单秀娟^{1,2①} 金显仕^{1,2} 陈云龙¹ 滕广亮¹ 魏秀锦¹

(1. 农业部海洋渔业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 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 关键种对生态系统结构和功能发挥了重要作用,其变化可以引起群落结构振荡和演替,导致生态系统功能紊乱乃至崩溃,因此,了解生态关键种的长期变化有助于解析整个生态系统演替过程。本研究基于莱州湾 1959 年、1982 年、1993 年、2003 年和 2015 年春季(5 月)底拖网渔业资源调查数据,构建了莱州湾春季鱼类群落食物网拓扑结构,分析了其关键种的长期变化。1959~2015 年莱州湾鱼类食物网包含物种 21~46 个,摄食关系范围 70~296 个,食物网拓扑结构密度范围为 0.155~0.300,种间关联度 0.140~0.182,符合自然条件下群落种间摄食关系。1959~2015 年莱州湾鱼类群落关键种如下:1959 年为六丝矛尾虾虎鱼(*Amblychaeturichthys hexanema*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)和黄鲛鲷(*Lophius litulon*),1982 年为鳀(*Engraulis japonicus*)、黄鲛鲷和小黄鱼(*Larimichthys polyactis*),1993 年为带鱼(*Trichiurus lepturus*)、鳀和蓝点马鲛,2003 年为细纹狮子鱼(*Liparis tanakae*)、鳀和黄鲛鲷,2015 年为细纹狮子鱼、大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)和六丝矛尾虾虎鱼;关键种由经济价值较高的花鲈、小黄鱼和蓝点马鲛等演变为细纹狮子鱼、鳀和六丝矛尾虾虎鱼等经济价值较低的种类;同时,关键种的栖息环境也由中上层与底层生境(蓝点马鲛、花鲈、鳀等)演变为底层单一生境(细纹狮子鱼、大泷六线鱼和六丝矛尾虾虎鱼);关键种的这种更替导致食物网拓扑结构向简单化发展,在某种程度上也增加了鱼类群落结构脆弱性。

关键词 莱州湾; 鱼类群落; 食物网拓扑结构; 网络分析法; 关键种

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0001-11

关键种(Keystone species)是指当群落中单个这样种发生变化,会引起群落结构振荡,甚至导致生态功能紊乱乃至整个系统崩溃,因此,关键种对整个生态

系统结构和功能发挥了重要作用。关键种可以是濒危种、土著种、外来种,甚至是广布种(Mills *et al*, 1993; Libralato *et al*, 2006; Modlmeiera *et al*, 2015), 并且随

* 国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022016003)、农业部财政项目“黄渤海渔业资源调查”、山东省泰山学者专项基金和青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才培养计划项目(2017ASTCP-ES07)共同资助[This work was supported by the National Basic Research Program of China (2015CB453303), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016003), Ministry of Agriculture Financial Project “Fisheries Assessment in the Yellow Sea & Bohai Sea” Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province, and Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-ES07)]. 杨涛, E-mail: yangtao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 单秀娟, 副研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-09-12, 收修改稿日期: 2017-10-23

着区域、时间、生态系统的变化而不同,环境条件的改变也会导致其更替(Jordán *et al*, 2002; Gili, 2002),关键种决定了水域生态系统食物网结构变化的方向,了解生态关键种的长期变化有助于解析整个生态系统的演替过程(Pauly *et al*, 2001)。如何筛选和识别关键种就变得尤为关键,也成为近年来渔业生态学的国际研究热点(Libralato *et al*, 2006; Jordán, 2009; Coll *et al*, 2012; Eddy *et al*, 2014; Modlmeiera *et al*, 2015; Valls *et al*, 2015; Torres *et al*, 2017)。国内对关键种的报道主要是综述性的文章(葛宝明等, 2004; 陈清潮, 2012; 杜洪业等, 2012),有关水域生态系统关键种的筛选仅见于张豫等(2013)、杨涛等(2016)等。本研究基于 1959~2015 年莱州湾春季渔业资源调查数据,构建了该水域鱼类群落食物网拓扑结构,分析了该水域关键种的长期变化,以为莱州湾生态系统的演变和渔业资源的适应性管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源

本研究基于 1959 年、1982 年、1993 年、2003 年和 2015 年莱州湾春季(5 月)底拖网渔业资源调查数据,其中 1959~2003 年数据参考金显仕等(1998, 2000, 2001, 2005)、邓景耀等(2000)、Jin(2004)、Jin 等(2013)和李显森等(2008)。2015 年数据来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所 973 项目莱州湾调查,调查站位延续中国水产科学研究院黄海水产研究所历史调查站位设计方案(图 1),调查船租用 205 kW 双拖渔船,调查网具参数为网口高度 6 m,网口宽度 22.6 m,

网口周长 1740 目,网目 63 mm,囊网网目 20 mm,拖速 3 kn,拖网 1 h。渔获物中所有鱼类种类均被记录,并留取胃样品进行实验室胃含物分析。食性数据参考邓景耀等(1988a, 1988b)、唐启升等(1990)、金显仕等(1999, 2005)及调查取样的胃含物分析。

1.2 研究方法

鱼类群落食物网拓扑结构指标计算参考杨涛等(2016),群落多样性指数计算参照金显仕等(1999),群落种间聚类系数计算参照 Watts 等(1998)。

鱼类群落食物网拓扑结构节点密度(Density, D_d)、种间关联度(Connectance, C)参照 Dunne 等(2002),具体如下:

节点密度 D_d :

$$D_d = S/L$$

种间关联度指数 C :

$$C = L/(S)^2$$

式中, S 为鱼类群落中种类数量; L 为群落内各种间存在的摄食关系的数量, L 值越大,说明群落内存在的摄食关系越多; D_d 为节点密度, D_d 值越大,群落内物种的摄食关系的平均值就越大; C 为种间关联度, C 值越大, 2 个物种间存在捕食-被捕食关系的概率就越大。

采用群落离散变量(Fragmentation differences, $\Delta F'$)和距离权重离散变量(Distance-weighted fragmentation differences, $\Delta^D F'$) (Borgatti, 2013)评估鱼类群落中某些种类的消失对群落结构离散程度的影响,其中, $\Delta > 0$, 则群落离散程度增大; $\Delta = 0$, 则离散度不变; $\Delta < 0$, 则离散度降低。

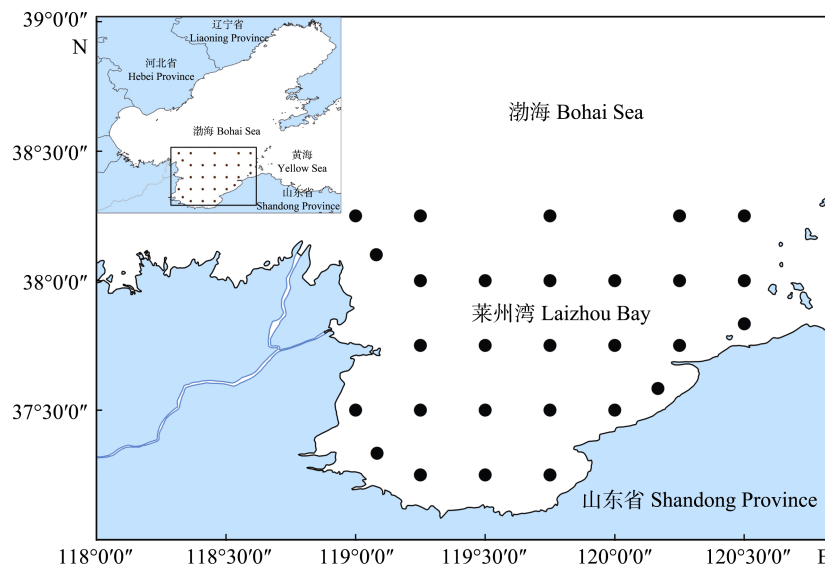


图 1 莱州湾渔业资源调查站位
Fig.1 Sampling stations in Laizhou Bay

2 结果

2.1 鱼类群落和食物网拓扑结构

1959~2015 年, 莱州湾渔业资源调查共捕获鱼类 66 种(表 1), 隶属于 10 目 34 科 56 属, 其中 1982 年种类最多, 共 48 种, 隶属于 8 目 24 科 42 属。其中 1982~2015 年春季莱州湾鱼类优势种见表 2, 1959 年优势种为: 带鱼、小黄鱼、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、鲷(*Platycephalus indicus*)和白姑鱼(*Pennahia argentata*) (金显仕等, 2000), 可知莱州湾春季鱼类群落优势种群经历了由 1950 年代的带鱼、

半滑舌鳎等重要经济种类向鳀、黄鲫(*Setipinna taty*) 等小型经济种类演替, 再经本世纪初的小黄鱼、银鲳(*Pampus argenteus*)等重要经济物种向六丝矛尾虾虎鱼、短吻红舌鳎(*Cynoglossus joyneri*)和方氏云鳎(*Pholis fangi*)等低质底层鱼类演替过程。

本研究通过丰富度指数(R)、Shannon-Weaver 多样性指数(H')和均匀度指数(J')分析了莱州湾鱼类群落的多样性。莱州湾鱼类多样性在年间变化较大(图 2), 其中, 种类丰富度指数(R_w 和 R_n 分别表示以重量和数量计算的 R , H'_w 、 H'_n 和 J'_w 、 J'_n 与此相同)总体呈下降趋势, 1982 年最高, 随后逐渐降低, 至 2003 年降至最低,

表 1 1959~2015 年莱州湾春季鱼类种类组成
Tab.1 Fish species composition of the Laizhou Bay in spring during 1959~2015

编号 Number	种类 Species	编号 Number	种类 Species
1	白斑星鲨 <i>Mustelus manazo</i>	34	玉筋鱼 <i>Ammodytes personatus</i>
2	赤魮 <i>Dasyatis akajei</i>	35	褐菖鲈 <i>Sebasticus marmoratus</i>
3	孔鳐 <i>Okamejei kenojei</i>	36	黄鲛鳕 <i>L. litulon</i>
4	鳀 <i>E. japonicus</i>	37	长蛇鲻 <i>Saurida elongata</i>
5	赤鼻棱鳀 <i>Thryssa kammalensis</i>	38	油鲚 <i>Sphyrna pinguis</i>
6	中颌棱鳀 <i>T. mystax</i>	39	细纹狮子鱼 <i>L. tanakae</i>
7	尖海龙 <i>Syngnathus acus</i>	40	云鳎 <i>P. crassispina</i>
8	银鲳 <i>P. argenteus</i>	41	短鳍红娘鱼 <i>Lepidotrigla microptera</i>
9	黄鲫 <i>S. taty</i>	42	短鳍鳊 <i>Repomucenus huguenini</i>
10	青鳞小沙丁鱼 <i>Sardinella zunasi</i>	43	鲱鳊 <i>Callionymus beniteguri</i>
11	斑鲆 <i>Konosirus punctatus</i>	44	矛尾虾虎鱼 <i>Chaeturichthys stigmatias</i>
12	凤鲚 <i>Coilia mystus</i>	45	六丝矛尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i>
13	刀鲚 <i>C. nasus</i>	46	矛尾复虾虎鱼 <i>Acanthogobius hasta</i>
14	蓝点马鲛 <i>S. nipponius</i>	47	中华栉孔虾虎鱼 <i>Ctenotrypauchen Chinensis</i>
15	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	48	丝虾虎鱼 <i>Myersina filifer</i>
16	黑鳃梅童 <i>Collichthys niveatus</i>	49	红狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus rubicundus</i>
17	棘头梅童 <i>C. lucidus</i>	50	普氏吻虾虎鱼 <i>Acentrogobius pflaumii</i>
18	白姑鱼 <i>P. argentata</i>	51	裸项栉虾虎鱼 <i>Ctenogobius gymnauchen</i>
19	黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	52	多鳞鳢 <i>Sillago sihama</i>
20	叫姑鱼 <i>Johnius belengerii</i>	53	虫纹东方鲀 <i>Takifugu vermicularis</i>
21	鲉鱼 <i>Miichthys miiuy</i>	54	星点东方鲀 <i>T. niphobles</i>
22	真鲷 <i>Pagrus major</i>	55	铅点东方鲀 <i>T. alboplumbeus</i>
23	花鲈 <i>L. japonicus</i>	56	假睛东方鲀 <i>T. pseudommus</i>
24	梭鱼 <i>Liza haematocheila</i>	57	绿鳍马面鲀 <i>Thamnaconus septentrionalis</i>
25	长绵鳎 <i>Zoarces elongatus</i>	58	褐牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>
26	小杜父鱼 <i>Cottus Pygmaeus</i>	59	高眼鲾 <i>Cleisthenes herzensteini</i>
27	方氏云鳎 <i>P. fangi</i>	60	黄盖鲾 <i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>
28	鲷 <i>P. indicus</i>	61	石鲾 <i>Kareius bicoloratus</i>
29	许氏平鲉 <i>Sebastes schlegelii</i>	62	圆斑星鲾 <i>Verasper variegatus</i>
30	大泷六线鱼 <i>H. otakii</i>	63	短吻红舌鳎 <i>C. joyneri</i>
31	小带鱼 <i>Eupleurogrammus muticus</i>	64	半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>
32	带鱼 <i>T. lepturus</i>	65	带纹条鳎 <i>Zebrias zebra</i>
33	绿鳍鱼 <i>Chelidonicthys kumu</i>	66	莱氏舌鳎 <i>C. lighti</i>

表2 1982~2015年莱州湾春季鱼类优势种组成

Tab.2 Dominant species composition of the Laizhou Bay in spring during 1982~2015

年份 Years	种类 Species	W(%)	N(%)	IRI
1982	鳀 <i>E. japonicus</i>	25.80	48.93	5870.01
	黄鲫 <i>S. taty</i>	42.65	34.80	5438.15
	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	10.68	0.60	717.64
1993	鳀 <i>E. japonicus</i>	68.11	75.80	9392.92
	赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>	12.18	16.48	2067.41
	黄鲫 <i>S. taty</i>	7.38	3.82	907.76
2003	赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>	31.73	50.50	7047.96
	黄鲫 <i>S. taty</i>	46.14	29.67	7039.38
	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	6.47	2.26	748.54
	银鲳 <i>P. argenteus</i>	7.08	1.60	619.89
	2015	赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>	35.46	53.85
	短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	10.35	12.00	1242.11
	六丝矛尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i>	3.81	8.00	852.68
	方氏云鲷 <i>P. fangi</i>	6.07	5.72	785.90
	黄鲫 <i>S. taty</i>	7.51	5.40	717.20

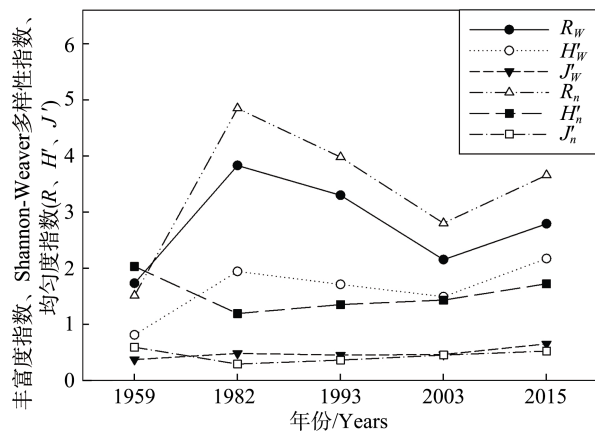


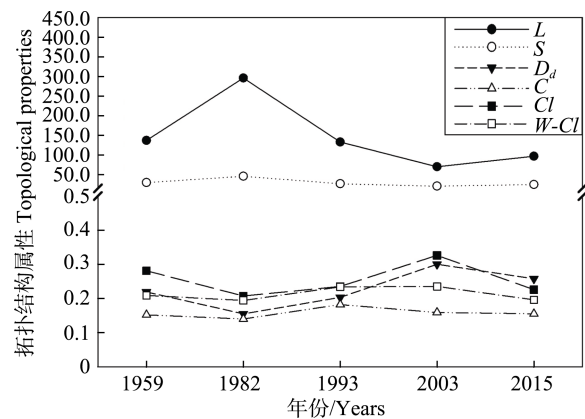
图2 1959~2015年莱州湾春季鱼类多样性变化

Fig.2 Fish community biodiversity in the Laizhou Bay in spring during 1959~2015

然后略有回升。多样性指数总体呈增加趋势, H'_w 在1982年后略有降低, 2003年后开始回升并超过1982年, 而 H'_n 一直升高, 但 H'_n 在各年份均未超过 H'_w 。均匀度指数 (J'_w 和 J_n) 在1982到2015年期间变化并不大, 但均有少量增加, 2015年增至最高。

1959~2015年, 莱州湾春季鱼类食物网包含物种21~46, 摄食关系数量70~296个, 平均值为146.6, 其中, 摄食关系数量1982年最多, 2003年最低; 食

物网拓扑结构密度为0.155~0.300, 平均密度为0.227, 2003年最高, 1982年最低; 种间关联度为0.140~0.182, 平均值为0.158, 最高值出现在1993年, 最低值出现在1982年; 聚类系数为0.207~0.326, 加权聚类系数为0.194~0.235, 平均值分别为0.255和0.214(图3)。鱼类食物网拓扑学指标 S 在1959~2015年期间呈先增加后降低再增加的趋势, 但鱼类群落物种数量整体呈下降趋势; L 从1959年到1982年呈上升趋势, 此后迅速下降, 2003年以后保持相对稳定; D_d 、 C 、 CI 和 $W-CI$ 从1959年到1982年均呈下降趋势, 而 $W-CI$ 下降相对缓慢, 1982年到1993年期间均缓慢增加; 1993年 D_d 和 CI 开始上升, 而 C 缓慢下降, $W-CI$ 基本稳定; 2003年后 D_d 、 C 、 CI 和 $W-CI$ 均开始下降, CI 降幅最大。这与丰富度指数 R_w 和 R_n 的变化趋势基本相反, 其中 D_d 与 R_w 呈显著负相关 ($P < 0.01$), 与 R_n 呈显著负相关 ($P < 0.05$) (表3)。

图3 1959~2015年莱州湾春季鱼类食物网拓扑结构属性
Fig.3 Topological properties of the fish community in the Laizhou Bay in Spring 1959~2015

L (Links)为摄食关系数量, S (Species)为鱼类群落中物种数量, D_d (Density)为鱼类群落食物网拓扑结构的节点密度, C (Connectance)为鱼类群落中种间关联度, CI (Clustering coefficient)为聚类系数, $W-CI$ (Weighted clustering coefficient)为加权聚类系数

L (Links): The number of predator-prey relationships in the food web; S (Species): Species number of fish community; D_d (Density): Node density in food-web topological structure; C (Connectance): Connectance between species in fish community; CI : Clustering coefficient; $W-CI$: Weighted clustering coefficient

2.2 鱼类群落关键种

1959年共捕获鱼类34种, 其中, 短鳍红娘鱼、莱氏舌鲷、星点东方鲀和铅点东方鲀与其他鱼类无任何摄食关系, 因此, 食物网拓扑结构分析不包括上述4种鱼类。通过构建其余30种鱼类食物网拓扑结构

表 3 莱州湾鱼类多样性指数与食物网拓扑学指标的相关性
Tab.3 Correlations between fish biodiversity indices and topological indicators of food web in Laizhou Bay

	S	D_d	C	Cl	$W-Cl$	R_W	H'_W	J'_W	R_n	H'_n	J'_n
L	0.997**	-0.913	-0.559	-0.673	-0.574	0.895	0.306	-0.237	0.923	-0.727	-0.839
S		-0.895	-0.609	-0.684	-0.628	0.882	0.356	-0.175	0.920	-0.683	-0.798
D_d			0.210	0.822	0.445	-0.995**	-0.347	0.240	-0.978*	0.670	0.846
C				0.206	0.766	-0.215	-0.406	-0.279	-0.345	0.135	0.131
Cl					0.715	-0.874	-0.793	-0.332	-0.894	0.128	0.392
$W-Cl$						-0.503	-0.890	-0.647	-0.620	-0.131	0.040
R_W							0.433	-0.147	0.989*	-0.593	-0.790
H'_W								0.827	0.519	0.419	0.187
J'_W									-0.050	0.839	0.702
R_n										-0.543	-0.741
H'_n											0.961*

*: 在 $P < 0.05$ 水平(双侧)上相关性显著; **: 在 $P < 0.01$ 水平(双侧)相关性显著

*: Correlation was significant at the 0.05 level (2-tailed); **: Correlation was significant at the 0.01 level (2-tailed)

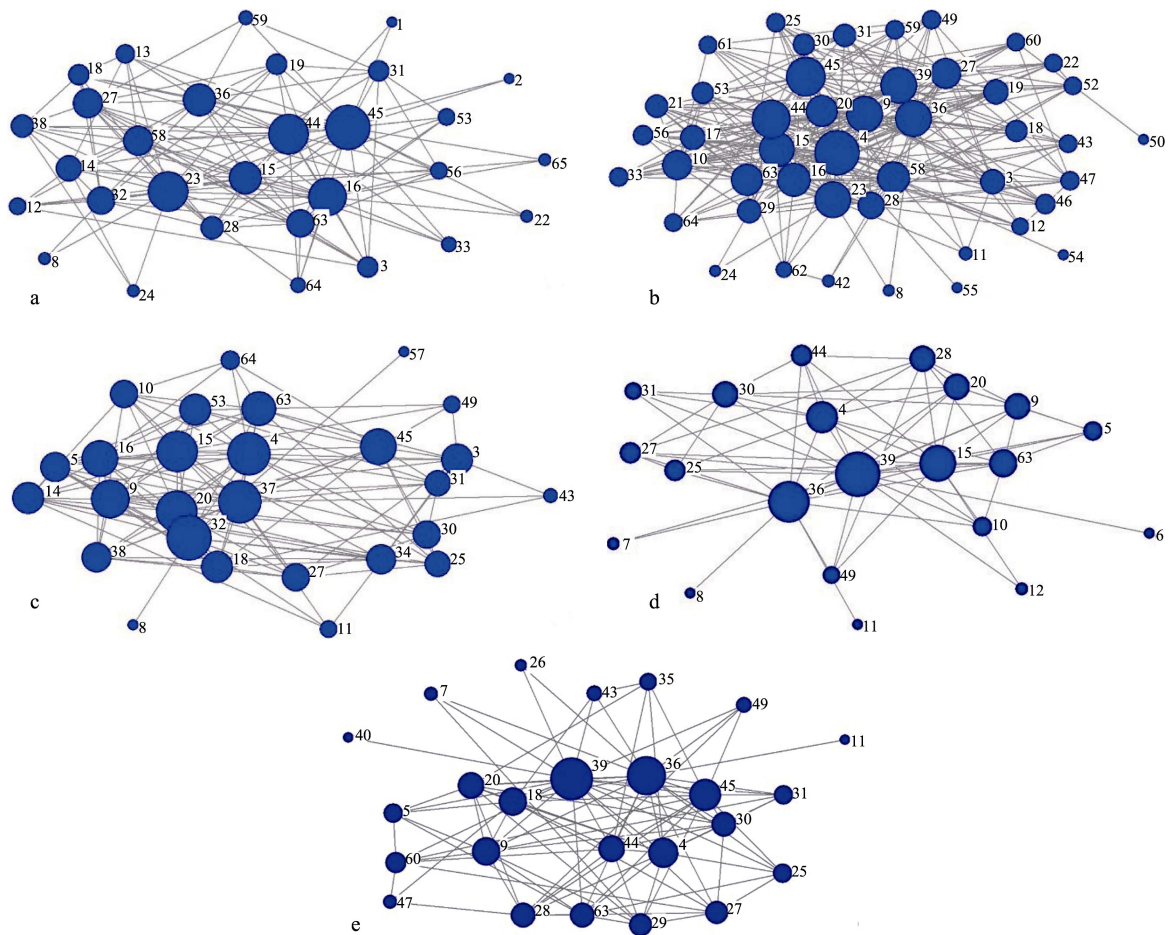


图 4 莱州湾鱼类群落食物网拓扑结构(1959~2015)

Fig.4 Topological structure of food-web in the Laizhou Bay fish community during 1959~2015

1) a: 1959 年; b: 1982 年; c: 1993 年; d: 2003 年; e: 2015 年; 2) 图中数字代表鱼类种类, 见表 1, 下同
1) a: 1959; b: 1982; c: 1993; d: 2003; e: 2015; 2) The numbers represented different kinds of fish species, the details were shown in Tab. 1, the same below

(图 4a), 计算其拓扑学指标发现, 六丝矛尾虾虎鱼与群落中 22 种鱼类存在被捕食关系, 即 $D=D_{out}=22$, 是该群落中重要的饵料鱼类; 花鲈可以捕食群落中其他 19 种鱼类, 即 $D=D_{in}=19$, 是该群落的顶级捕食者。同时, 六丝矛尾虾虎鱼的 BC 、 TI^1 、 TI^7 、 CC 和 $\Delta^D F'$ 在 30 种鱼类中最大, 说明其对群落内信息交换的控制能力及扩散能力最强、传递信息的速度最快, 当六丝矛尾虾虎鱼从该群落剔除时, 群落距离权重离散变量增加且增加量最大; 但蓝点马鲛从该群落剔除时群落离散变量增加且增加量最大 ($\Delta F'=0.022$)。在群落中, 六丝矛尾虾虎鱼的 K 和 K_b 值最高, $K=K_b=20.60$, 表明六丝矛尾虾虎鱼对群落能量流动和信息传递影响最大, 其可以通过上行控制效应影响种间作用进而影响整个群落结构。黄鲛鰩的 K_i 最大, 为 11.31, 说明其对群落下行控制效应最大, 即黄鲛鰩通过摄食其他鱼类对整个群落产生调节作用(表 4)。

1982 年共捕获鱼类 48 种, 其中, 中颌棱鲉和普氏吻虾虎鱼与该群落其余 46 种鱼类无任何摄食关系, 因此, 食物网拓扑结构分析不包括上述 2 种鱼类。通过构建 46 种鱼类食物网拓扑结构(图 4b)、计算出其拓扑学指标发现, 鳀与群落中 32 种鱼类存在被捕食关系, 即 $D=D_{out}=32$, 是该群落中重要的饵料鱼类; 黄鲛鰩 D_{in} 值最大为 24, 黄鲛鰩可以摄食群落中其他 24 种鱼类, $D=D_{in}=24$, 是该群落的顶级捕食者。另外, 鳀的 BC 、 TI^1 、 TI^7 和 CC 值最大, 即 46 种鱼类中鳀对群落内信息交换的控制能力及扩散能力最强、传递信息速度最快; 小黄鱼的 $\Delta F'$ 和 $\Delta^D F'$ 的值最大, 分别为 0.016 和 0.01, 当小黄鱼从该群落剔除时, 该群落结构离散变量和距离权重离散变量均会增加且增加量最大; 黄鲛鰩的 K 和 K_i 值最大, 这表明其对群落能量流动和信息传递影响最大, 且该影响全部来自于下行控制效应 ($K=K_i=26.07$), 即黄鲛鰩通过摄食其他鱼类作用于整个群落结构; 鳀的 K_b 值最大, 即鳀通过上行控制效应影响着该群落的结构平衡和稳定(表 4)。

1993 年共捕获鱼类 29 种, 其中, 丝虾虎鱼和尖海龙与该鱼类群落其余 27 种鱼类无任何摄食关系, 因此, 不将上述 2 种鱼类作为研究对象。通过构建其余 27 种鱼类食物网拓扑结构(图 4c)、计算出其拓扑学指标发现, 带鱼与群落中 17 种鱼类存在捕食和被捕食关系, $D=D_{out}+D_{in}=17$, 其中, $D_{out}=1$, $D_{in}=16$, 这说明带鱼主要以捕食者的角色存在于该鱼类群落, 被其捕食的种类达 16 种, 但也会出现被其他鱼类捕食的情况, 如被蓝点马鲛捕食。因此, 带鱼不仅可以捕食其他鱼类影响群落结构, 还可以改变自身种

群密度影响鱼类群落结构。鳀和长蛇鲻与 16 种鱼类均存在摄食关系, 其中, 鳀为被捕食者 ($D=D_{out}=16$), 是该群落中重要的饵料鱼类, 而长蛇鲻在该群落中的生态地位与带鱼相似, 摄食关系共包括 2 部分: $D=D_{out}+D_{in}$, $D_{out}=15$, $D_{in}=1$ 。另外, 27 种鱼类中带鱼的 BC 、 TI^1 、 TI^7 、 CC 、 $\Delta F'$ 和 $\Delta^D F'$ 值均最大, 即其对群落内信息交换的控制能力及扩散能力最强、传递信息速度最快, 当带鱼从该群落中剔除时, 群落结构的离散变量和距离权重离散变量均增加, 且增加量最大。蓝点马鲛的 K 和 K_i 值最大, $K=K_i=15.45$, 蓝点马鲛对该群落能量流动和信息传递影响最大, 且该影响全部来自于下行控制效应。鳀的 K_b 值最大为 5.92, 说明鳀对该群落的上行控制效应最大, 因此, 鳀通过生物量的变化影响与其他鱼类的种间关系, 进而作用于群落结构的稳定(表 4)。

2003 年共捕获鱼类 21 种, 通过构建鱼类食物网拓扑结构(图 4d)、计算出其拓扑学指标发现, 细纹狮子鱼与该群落 17 种鱼类存在摄食关系, $D=D_{out}+D_{in}$, 其中, $D_{out}=1$, $D_{in}=16$, 细纹狮子鱼主要以捕食者的角色存在于该群落, 被其捕食的种类达 16 种, 也会出现被其他鱼类捕食的情况, 如被黄鲛鰩捕食。黄鲛鰩与群落中 15 种鱼类存在摄食关系, $D=D_{in}=15$, 是该群落的顶级捕食者, 主要依靠捕食其他鱼类影响群落结构的稳定。鳀的 D_{out} 值最大为 11, $D=D_{out}=11$, 是该群落中重要的饵料鱼类。群落中细纹狮子鱼的 BC 、 TI^7 、 CC 、 $\Delta F'$ 和 $\Delta^D F'$ 值最大, 即其对群落内信息交换的控制能力、间接扩散能力最强、信息传递速度最快, 当细纹狮子鱼从该群落中剔除时, 群落结构的距离权重离散变量增加且增加量最大。黄鲛鰩的 $\Delta F'$ 值与细纹狮子鱼相同, 当黄鲛鰩和细纹狮子鱼从该群落剔除时, 群落离散程度的增加量相同。另外, 黄鲛鰩的 TI^1 、 K 和 K_i 均最大, $K=K_i=20$, 其对该群落内信息直接传递速度最快, 对该群落的能量流动和信息传递影响最大, 且该影响全部来自于下行控制效应。鳀的 K_b 最大, 即鳀对该群落的上行控制效应最大(表 4)。

2015 年共捕获鱼类 28 种, 其中, 银鲳、丝虾虎鱼和裸项栉虾虎鱼与其他 25 种鱼类无摄食关系, 因此, 不将上述 3 种鱼类作为研究对象。通过构建其余 25 种鱼类群落的食物网拓扑结构(图 4e)、计算出其拓扑学指标发现, 细纹狮子鱼与群落中 19 种鱼类存在摄食关系, $D=D_{out}+D_{in}$, $D_{out}=2$, $D_{in}=17$, 是主要的捕食者, 也会被黄鲛鰩和大洸六线鱼捕食。六丝矛尾虾虎鱼的 D_{out} 值最大为 13, $D=D_{out}=13$, 即群落中 13 种鱼类可以捕食六丝矛尾虾虎鱼, 六丝矛尾虾虎鱼是该群落中重要的饵料鱼类。25 种鱼类中细纹狮子鱼的

BC 、 TI^1 、 TI^7 、 CC 、 $\Delta F'$ 和 $\Delta^D F'$ 值最大, 其对群落内信息交换的控制能力及扩散能力最强、信息传递速度最快, 当纹狮子鱼从该群落剔除时, 群落结构的离散变量和距离权重离散变量均增加且增加量最大。大泷六线鱼对该群落的能量流动和信息传递影响最大, 且该影响全部来自于下行控制效应($K=K_i=17.52$)。六丝矛尾虾虎鱼的 $K_b=4.64$ 最大, 其对群落的上行控制效应最大(表 4)。

综合上述分析结果, 取各指标中最大种类为关键种(Jordán, 2006), 1959~2015 年莱州湾春季鱼类群落关键种见表 5。

3 讨论

近 60 年来, 莱州湾水域春季鱼类群落结构发生了明显改变, 鱼类种群趋于小型化、低质化, 群落结构组成趋于简单化, 平均营养级明显下降(Shan *et al.*, 2013; 张波等, 2015)。生物多样性变化较大, 种类丰度指数整体呈下降趋势, 多样性指数和均匀度指数整体呈增加趋势。生态群落结构的改变会对鱼类群落食物网的结构和功能产生一定影响, 如人类活动对海洋生物资源的选择性开发已导致种群结构与数量的变动, 使得全球海洋渔获物的营养级由 50 年代的 3.3 下降至 1994 年的 3.1 (Pauly *et al.*, 1998)。本研究中, D_d 与 R_w 呈极显著负相关($P<0.01$), 与 R_n 呈显著负相关($P<0.05$), 一定程度上可以反映出鱼类群落多样性的变化直接影响着群落食物网的结构和功能。而食物网结构可以帮助确定生态系统中物种的营养关系, 并能够评估在不同营养级种类间直接或间接影响(Jordán, 2001; Kitchell *et al.*, 2002; Navia *et al.*, 2010; Bornatowski *et al.*, 2014)。莱州湾鱼类群落食物网经历了以鱼食性种类为主的食物网到以底栖生物食性种类为主的食物网的演变过程(张波等, 2015)。1959~2015 年莱州湾春季鱼类群落食物网拓扑结构中 D_d 的取值为 0.155~0.300, 最高值出现在 2003 年, 最低值出现在 1982 年, 不同年间存在较大波动情况, 这与巴西南部巴拉那沿岸等其他的海洋生态系统的食物网拓扑结构相似(Dunne *et al.*, 2002; Gaichas *et al.*, 2008; Bornatowski *et al.*, 2014); 而在 Cohen 等(1984) 早期研究结果认为, 物种多样性不同的食物网可能具有相同的种间关联度, 但因该研究的数据质量和研究方法等原因使得这一研究结果受到 Riede 等(2010)的质疑。在本研究中莱州湾春季鱼类群落的关联度值为 0.140~0.182, 较为稳定, 在 0.03~0.30 的范围以内, 基本可以排除该群落内种群的摄食可能存在某种特

定关系或群落受到外界因素干扰等情况(Dunne *et al.*, 2002; Bornatowski *et al.*, 2014); 而过于极端取值可能出现上述情况, 如 Martinez 等(1999)在对 Grassland 生态群落摄食关系的研究中, C 值相对较小为 0.026, 其原因可能是该生态群落中作为被捕食者的基层物种较少, 群落能量流动的来源过于单一; 而在 Polis(1991)对 Coachella Valley 的研究中, 因受人为因素影响导致 C 值相对偏大。因此, 本研究认为 1959~2016 年莱州湾春季鱼类群落符合自然条件下的群落种间摄食关系。

海洋中的物质能量通过食物链(食物网)转化为海洋生态系统各营养层次的生产力, 同时, 海洋生态系统对各种物理化学过程的响应通常表现为食物网结构的变化。关键种的生物量未必较高, 并不依靠生物量影响群落结构, 而是通过种群间的摄食关系密切联系群落的其他种群, 并经过食物网的拓扑关系控制着群落的结构和能流, 而优势种最明显的特征则是依靠庞大的生物量影响群落结构(Power *et al.*, 1996)。本研究中发现莱州湾 5 个不同时期的关键种中, 既是关键种又是优势种的仅有鳀 1 个种类, 分别为 1982 年、1993 年和 2003 年莱州湾鱼类群落关键种。而 1982 年、1993 年鳀既是关键种又是优势种, 2003 年鳀是关键种但非优势种。关键种在一定时间内对其他物种的分布起着直接或间接的调控作用, 其存在对于维持群落的种类组成、生态群落的功能和物种多样性等比其他的物种更重要, 对生物群落稳定性、物种多样性和许多生态过程的持续和改变起决定性作用, 是生态系统的物质循环、能量流动和生物量的调控者。关键捕食者可以通过捕食作用控制着群落中其他重要食物竞争者和捕食者密度, 关键被捕食者则可以通过维持捕食者的密度来限制另外被捕食者的密度, 是鱼类群落种间关系的第一纽带, 其种群数量的变动影响着其他种群的生长、发育和繁殖, 是决定鱼类群落动态的重要因素(陈大刚, 1997)。关键捕食者的能量流动与转换又是影响该水域生态系统结构与功能稳定的重要因素, 其演变趋势对鱼类群落结构组的发展有一定的诱导作用。

过度捕捞导致近海渔业资源严重衰退, 鱼群抵御环境变化的能力降低, 近海资源问题日益凸显(王跃中等, 2012; 金显仕等, 2015; 张波等, 2015)。Pitcher (2001)认为受人类活动的影响, 20 世纪 60 年代以来须鲸类濒临灭绝, 而人类早期的捕捞活动可能已经导致水域生态中关键种濒临灭绝。而过度捕捞将会导致食物网中的关键种由海洋哺乳类、鳕鱼类、

鲛鳕鱼类以及大型中上层鱼类向小型底栖无脊椎动物、小型中上层鱼类转变(Coll *et al.*, 2009), 本研究中莱州湾春季鱼类群落关键种由经济价值较高的花鲈、小黄鱼和蓝点马鲛等演变为以细纹狮子鱼、鲉和六丝矛尾虾虎鱼等经济价值较低的种类; 同时, 关键种的栖息环境也由中上层与底层生境(蓝点马鲛、花鲈、鲉等)演变为底层单一生境(细纹狮子鱼和六丝矛尾虾虎鱼); 关键种的这种更替导致食物网拓扑结构向简单化发展, 在某种程度上也增加了鱼类群落结构脆弱性。气候变化直接影响渔业生物的多样性和分布, 而全球变暖将通过对近岸湿地生境的破坏, 进而破坏众多鱼类的育肥场所, 而水温变化将直接影响鱼类的生长、摄食、产卵及洄游等, 驱使在河口或沿岸产卵的鱼类向较冷的地区洄游(樊伟等, 2001; 王跃中等, 2012; 单秀娟等, 2017), 是影响鱼类群落结构变化的重要因素, 也是改变的群落关键种的潜在因素。Drezner (2013)认为一定条件下水源是限制陆地生态系统中关键物种仙人掌(*Carnegiea gigantea*)分布的重要环境因素。而水域生态系统中, Sanford (1999)的研究表明野外和室内实验中水温降低, 关键捕食者赭色海星(*Pisaster ochraceus*)对主要被捕食者的捕食明显减弱。因此, 在某一生态群落中关键种受多种外界因素的影响, 如环境变化、人为活动等, 由于物种洄游性季节分布导致鱼类群落结构的时序相对不稳定, 因此季节变化是影响关键种的不可忽视的重要因素, 关键种存在季节性分布的可能, 后续继续深入对鱼类群落结构关键种季节性变化的研究。

参 考 文 献

- Borgatti SP. Analyzing social networks. Sage, 2013
- Bornatowski H, Navia AF, Braga RR, *et al.* Ecological importance of sharks and rays in a structural foodweb analysis in southern Brazil. *ICES Journal of Marine Science*, 2014, 71(7): 1586–1592
- Chen DG. Fishery resources biology. Beijing: China Agricultural Press, 1997: 80–100 [陈大刚. 渔业资源生物学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 80–100]
- Chen QC. Conservation and sustainable development of marine keystone species. *Green Leaf*, 2012(10): 35–38 [陈清潮. 保护海洋关键物种与可持续发展. 绿叶, 2012(10): 35–38]
- Cohen JE, Briand F. Trophic links of community food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(13): 4105–4109
- Coll M, Libralato S. Contributions of food web modelling to the ecosystem approach to marine resource management in the Mediterranean Sea. *Fish and Fisheries*, 2012, 13(1): 60–88
- Coll M, Palomera I, Tudela S. Decadal changes in a NW Mediterranean Sea food web in relation to fishing exploitation. *Ecological Modelling*, 2009, 220(17): 2088–2102
- Deng JY, Jin XS. Study on fishery biodiversity and its conservation in Laizhou Bay and Yellow River Estuary. *Zoological Research*, 2000, 21(1): 76–82 [邓景耀, 金显仕. 莱州湾及黄河口水域渔业生物多样性及其保护研究. 动物学研究, 2000, 21(1): 76–82]
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Species composition, abundance and distribution of fishes in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988a, 9: 11–89 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988a, 9: 10–89]
- Deng JY, Meng TX, Ren SM. Food web of fishes in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988b, 9: 151–171 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民. 渤海鱼类的食物关系. 海洋水产研究, 1988b, 9: 151–171]
- Drezner TD. The paradoxical distribution of a shallow-rooted keystone species away from surface water, near the water-limited edge of its range in the Sonoran Desert: Seed-seedling conflicts. *Acta Oecologica*, 2013, 47: 81–84
- Du HY, Xu CY. Research progress of the relationship between keystone species and the dynamic of community in forestry ecosystem. *World Forestry Research*, 2012, 25(5): 35–39 [杜洪业, 徐程扬. 森林生态系统中关键种与群落动态的关系研究进展. 世界林业研究, 2012, 25(5): 35–39]
- Dunne JA, Williams RJ, Martinez ND. Food-web structure and network theory: the role of connectance and size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 12917–12922
- Eddy TD, Pande A, Gardner JPA. Massive differential site-specific and species-specific responses of temperate reef fishes to marine reserve protection. *Global Ecology and Conservation*, 2014, 1: 13–26
- Fan W, Cheng YH, Shen XQ. Effects of global environment change and human activity on fishery resources. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4): 91–94 [樊伟, 程炎宏, 沈新强. 全球环境变化与人类活动对渔业资源的影响. 中国水产科学, 2001, 8(4): 91–94]
- Gaichas SK, Francis RC. Network models for ecosystem-based fishery analysis: a review of concepts and application to the Gulf of Alaska marine food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2008, 65: 1965–1982
- Ge BM, Bao YX, Zheng X. A review on key species study in ecology. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(6): 102–106. [葛宝明, 鲍毅新, 郑祥. 生态学中关键种研究综述. 生态学杂志, 2004, 23(6): 102–106]
- Gili JM. Towards a transitory or ephemeral key habitat concept. *Trends in Ecology and Evolution*, 2002, 17(10): 453
- Jin XS, Deng JY. Variations in community structure of fishery resources and biodiversity in the Laizhou Bay. *Chinese Biodiversity*, 2000, 8(1): 65–72 [金显仕, 邓景耀. 莱州湾渔业资源群落结构和生物多样性的变化. 生物多样性,

- 2000, 8(1): 65–72]
- Jin XS, Deng JY. Yearly variations of fishery resources and biodiversity in the Laizhou Bay. *Marine Fisheries Research*, 1999, 20(1): 6–12 [金显仕, 邓景耀. 莱州湾春季渔业资源及生物多样性的年间变化. *海洋水产研究*, 1999, 20(1): 6–12]
- Jin XS, Dou SZ, Shan XJ, *et al.* Hot spots of frontiers in the research of sustainable yield of chinese inshore fishery. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 124–131 [金显仕, 窦硕增, 单秀娟, 等. 我国近海渔业资源可持续产出基础研究的热点问题. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 124–131]
- Jin XS, Shan XJ, Li XS, *et al.* Long-term changes in the fishery ecosystem structure of Laizhou Bay, China. *Science China Earth Sciences*, 2013, 56(3): 366–374
- Jin XS, Tang QS. The structure, distribution and variation of the fishery resources in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5(3): 18–24 [金显仕, 唐启升. 渤海渔业资源结构、数量分布及其变化. *中国水产科学*, 1998, 5(3): 18–24]
- Jin XS, Zhao XY, Meng TX, *et al.* The yellow sea and bohai sea biological resources and habitats. Beijing: Science Press, 2005: 262–351 [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: 262–351]
- Jin XS. Long-term changes in fish community structure in the Bohai Sea, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2004, 59(1): 163–171
- Jin XS. The dynamics of major fishery resources in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 7(4): 22–26 [金显仕. 渤海主要渔业生物资源变动的研究. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 22–26]
- Jordán F, Liu WC, Davis AJ. Topological keystone species: measures of positional importance in food webs. *Oikos*, 2006, 112(3): 535–546
- Jordán F, Scheuring I. Searching for keystones in ecological networks. *OIKOS*, 2002, 99(3): 607–612
- Jordán F. Keystone species and food webs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2009, 364(1524): 1733–1741
- Jordán F. Trophic fields. *Community ecology*, 2001, 2: 181–185
- Kitchell JF, Essington TE, Boggs CH, *et al.* The role of sharks and longline fisheries in a pelagic ecosystem of the Central Pacific. *Ecosystems*, 2002, 5: 202–216
- Li XS, Niu MX, Dai FQ. The characteristics of structure and distribution of spawning stock of fishery species in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 15–21 [李显森, 牛明香, 戴芳群. 渤海渔业生物生殖群体结构及其分布特征. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 15–21]
- Libralato S, Christensen V, Pauly D. A method for identifying Keystone species in food web models. *Ecological Modelling*, 2006, 195(3–4): 153–171
- Martinez ND, Hawkins BA, Dawah HA, *et al.* Effects of sampling effort on characterization of food web structure. *Ecology*, 1999, 80: 1044–1055
- Mills LS, Soule ME, Doak DF. The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience*, 1993, 43(4): 219–224
- Modlmeiera AP, Laskowskib KL, Brittinghama HA, *et al.* Adult presence augments juvenile collective foraging in social spiders. *Animal Behaviour*, 2015, 109: 9–14
- Navia AF, Cortés E, Mejía-Falla PA. Topological analysis of the ecological importance of elasmobranch fishes: a food web study on the Gulf of Tortugas, Colombia. *Ecological Modelling*, 2010, 221: 2918–2926
- Pauly D, Christensen VV, Dalsgaard J, *et al.* Fishing down marine food webs. *Science*, 1998, 279(5352): 860–863
- Pauly D, Palomares ML, Froese R, *et al.* Fishing down Canadian aquatic food webs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2001, 58(1): 51–62
- Pitcher TJ. Fisheries managed to rebuild ecosystems? Reconstructing the past to salvage the future. *Ecological Applications*, 2001, 11(2): 601–617
- Polis GA. Complex desert food webs: An empirical critique of food web theory. *American Naturalist*, 1991, 138: 123–155
- Power ME, Tilman D, Estes JA, *et al.* Challenges in the quest for keystones. *BioScience*, 1996, 46(8): 609–620
- Riede JO, Rall BC, Banasek-Richter C, *et al.* Scaling of food-web properties with diversity and complexity across ecosystems. In: Woodward G (ed): *Advances in ecological research*. Burlington: Academic Press, 2010, 139–170
- Sanford E. Regulation of keystone predation by small changes in ocean temperature. *Science*, 1999, 283(5410): 2095–2097
- Shan XJ, Chen YL, Jin XS. Projecting fishery ecosystem health under climate change scenarios: Yangtze River Estuary and Yellow River Estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 1–7 [单秀娟, 陈云龙, 金显仕. 气候变化对长江口和黄河口渔业生态系统健康的潜在影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 1–7]
- Shan XJ, Sun PF, Jin XS, *et al.* Long-term changes in fish assemblage structure in the Yellow River Estuary ecosystem, China. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science*, 2013, 5: 65–78
- Tang QS, Ye MZ. The exploitation and conservation of nearshore fisheries resources off Shandong. Beijing: China Agriculture Press, 1990: 90–115 [唐启升, 叶懋中. 山东近海渔业资源开发与保护. 北京: 农业出版社, 1990: 90–115]
- Torres MA, Casini M, Huss M, *et al.* Food-web indicators accounting for species interactions respond to multiple pressures. *Ecological Indicators*, 2017, 77: 67–79
- Valls A, Coll M, Christensen V. Keystone species: toward an operational concept for marine biodiversity conservation. *Ecological Monographs*, 2015, 85(1): 29–47
- Wang YZ, Sun DR, Lin ZJ, *et al.* Analysis on responses of hairtail catches to fishing and climate factors in the Yellow Sea and Bohai Sea, China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 1043–1050 [王跃中, 孙典荣, 林昭进, 等. 捕捞压力和气候因素对黄渤海带鱼渔获量变化的影响. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 1043–1050]

- Watts DJ, Strogatz SH. Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature*, 1998, 393(6684): 440–442
- Yang T, Shan XJ, Jin XS, *et al.* The keystone species of fish community in the Laizhou Bay. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1613–1623 [杨涛, 单秀娟, 金显仕, 等. 莱州湾鱼类群落关键种. *水产学报*, 2016, 40(10): 1613–1623]
- Zhang B, Wu Q, Jin XS. Interannual variation in the food web of commercially harvested species in Laizhou Bay from 1959 to 2011. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 278–287 [张波, 吴强, 金显仕. 1959~2011 年莱州湾渔业资源群落食物网结构的变化. *中国水产科学*, 2015, 22(2): 278–287]
- Zhang Y, Guo FQ, Hu SJ, *et al.* Priority of conservation of keystone species of aquatic ecosystem in Huizhou reach of the Dongjiang main river. *Journal of Anhui University (Natural Science Edition)*, 2013, 37(5): 100–108 [张豫, 郭凤清, 胡顺军, 等. 东江干流(惠州段)水生生态系统关键物种的优先保护顺序. *安徽大学学报(自然科学版)*, 2013, 37(5): 100–108]

(编辑 江润林)

Long-term Changes in Keystone Species in Fish Community in Spring in Laizhou Bay

YANG Tao¹, SHAN Xiujuan^{1,2①}, JIN Xianshi^{1,2}, CHEN Yunlong¹, TENG Guangliang¹, WEI Xiujin¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Keystone species play an important role in the structure and function of an ecosystem. Changes in keystone species can cause oscillations in community structure and ecological succession, or even result in the dysfunction and collapse of ecosystems. Therefore, understanding long-term changes in keystone species of an ecosystem provides insights into the processes of ecological succession. We built a food-web topological structure for the fish community in Laizhou Bay for each of five years, based on the spring bottom trawl survey data for Laizhou Bay during 1959, 1982, 1993, 2003, and 2015, and then, conducted network analysis to evaluate long-term changes in keystone fish species from 1959 to 2015. The constructed food webs included 21–46 different fish species and 70–296 prey-predator relationships. The structural density of these food webs ranged from 0.155 to 0.300, and interspecific connectivity ranged between 0.140 and 0.182, which matched the ecology of fish communities under natural conditions. The keystone fish species in Laizhou Bay changed from *Amblychaeturichthys hexanema*, *Lateolabrax japonicus*, *Scomberomorus niphonius*, and *Lophius litulon* in 1959 to *Engraulis japonicus*, *L. litulon*, and *Larimichthys polyactis* in 1982, and then, to *Trichiurus lepturus*, *E. japonicus*, and *S. niphonius* in 1993. After ten years, *Liparis tanakae*, *E. japonicus*, and *L. litulon* became the new keystone fish species, which were replaced by *L. tanakae*, *Hexagrammos otakii*, and *A. hexanema* in 2015. Conclusively, the keystone fish species in Laizhou Bay gradually changed from economically valuable species (e.g., *L. japonicus*, *L. polyactis*, and *S. niphonius*) to those of less economic value (e.g., *A. hexanema* and *L. tanakae*). Meanwhile, the diversity of the keystone fish species reduced from different pelagic or groundfishes (e.g., *L. japonicus* and *S. niphonius*) to those inhabiting only the bottom. These changes have simplified the topological structure of food webs in Laizhou Bay, which to some extent, has reduced the functional stability of the fish community.

Key words Laizhou Bay; Fish community; Food-web topological structure; Network analysis; Keystone species

① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20170415001

http://www.yykxjz.cn/

滕广亮, 单秀娟, 金显仕, 戴芳群, 陈云龙, 杨涛. 黄海高眼鲷卵巢发育特征及卵径分布. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 12-20
Teng GL, Shan XJ, Jin XS, DAI Fangqun, Chen YL, Yang T. A study on the ovary-development characters and oocyte size-distribution of *Cleisthenes herzensteini* in the Yellow Sea. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 12-20

黄海高眼鲷卵巢发育特征及卵径分布*



滕广亮^{1,3} 单秀娟^{2,3①} 金显仕^{2,3} 戴芳群³ 陈云龙³ 杨涛³

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 农业部海洋渔业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 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 本研究通过组织学观察, 描述了黄海高眼鲷(*Cleisthenes herzensteini*)卵母细胞发育特征及其退化过程。高眼鲷卵母细胞发育分为 5 个时相: 第 1 时相为卵原细胞, 细胞体积小, 细胞质少, 细胞核明显; 第 2 时相卵母细胞细胞核附近出现卵黄核; 第 3 时相由胞质外缘向内层逐渐产生液泡并生成卵黄颗粒, 出现双层滤泡膜; 第 4 时相卵母细胞内充满卵黄, 细胞核向动物极移动, 放射膜增厚; 第 5 时相细胞核溶解, 卵母细胞从滤泡膜中释放出来并发生水合作用; 产卵期过后, 卵巢发生退化, 卵黄颗粒逐渐被吞噬, 放射膜溶解断裂。通过比较卵巢中各时相卵母细胞组成比例, 表明卵母细胞发育具有非同步性。IV、V、VI-IV'期卵巢内卵径(长径)呈单峰分布, 优势粒径组分别为 0.45~0.55 mm、0.60~0.65 mm 和 0.40~0.50 mm; V'期卵巢, 卵径分布呈双峰型, 峰值分别为 0.50~0.55 mm 和 0.90~0.95 mm, 水合卵母细胞与卵径较小的小生长期卵母细胞比例增大, 呈现出明显的双峰分批产卵型特征。

关键词 高眼鲷; 卵巢发育; 组织学; 卵径分布

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0012-09

鱼类繁殖是种群延续的基础, 直接决定了其资源量变动。性腺发育是鱼类繁殖的关键过程, 是鱼类把所获得的物质和能量用于繁殖再分配的过程。了解鱼类性腺发育特征以及性腺发育的调控因子, 准确确定鱼类的产卵特性, 对于鱼类繁殖生态、种群结构和资源增殖研究, 以及掌握鱼汛和中心渔场的变动均具有重要意义。

近年来, 受环境变化和人为因素的影响, 很多鱼类生物学特征发生了显著变化, 渔获个体小型化、低龄

化日趋严重(宓崇道, 1997; 林龙山等, 2004; 李显森等, 2006; 张国政等, 2010), 同时, 伴随着繁殖生物学的相应变化(凌建忠等, 2005; 李建生等, 2015), 性成熟提早、相对繁殖力提高已经是普遍现象(李城华, 1983; 曾玲等, 2005; 林龙山等, 2009)。

黄海高眼鲷(*Cleisthenes herzensteini*)隶属于鲷形目 Pleuronectiformes、鲷科 Pleuronectidae、高眼鲷属 *Cleisthenes*, 为冷温性底层鱼类, 主要分布于 33°N 以北的海区(Wan *et al.*, 1998), 是黄、渤海鲷类中数

* 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-05)、农业部财政项目“黄渤海渔业资源调查”、青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才培养计划项目(2017ASTCP-ES07)和山东省泰山学者专项基金共同资助。[This work was supported by Aoshan the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02-05), Ministry of Agriculture Special Fund “Fisheries Assessment in Yellow & Bohai Sea”, Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-ES07), and the Special Funds for Taishan Scholars Project of Shandong Province]. 滕广亮, E-mail: tenggliang@126.com

① 通讯作者: 单秀娟, 副研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-15, 收修改稿日期: 2017-06-06

量最多的种类,也是黄海渔业生态系统中的主要种类。研究证明,黄海高眼鲈种群结构已经改变,其资源量明显下降,体长分布集中,优势体长减小,“小型化”明显(Shan *et al.*, 2012)。因此,本研究基于近年来高眼鲈黄海调查资料,对高眼鲈卵巢发育特征及卵径分布进行了分析,以期对黄海高眼鲈补充动态研究和资源的合理开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

高眼鲈样品来源于“北斗”号调查船 2016 年 8 月、10 月、11 月及 2017 年 1 月在黄海的渔业资源调查,取样站位见图 1。样品采集 159 尾,体长为 80~353 mm,体重为 7~531 g。现场进行解剖留取卵巢,自卵巢血管面的前、中、后三部分各切取组织小块保留。采用 Davidesons AFA 固定液固定,24 h 后换浓度为 70%乙醇保存,组织学测定 40 尾。

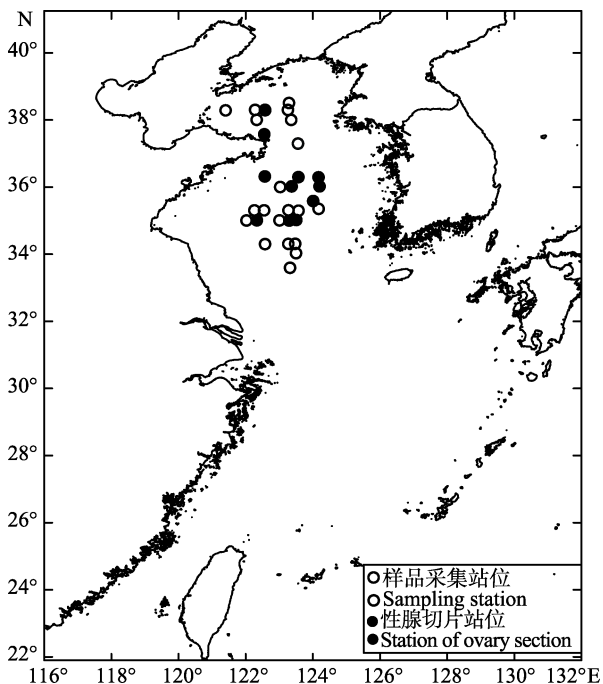


图 1 黄海高眼鲈样品采集点

Fig.1 Sampling stations of *C. herzensteini* in the Yellow Sea

1.2 组织切片

固定的卵巢组织经过自动脱水机(LEICA TP1020)脱水,二甲苯透明和浸蜡后,用包埋机(LEICA 1160)包埋,用半自动切片机(LEICA RM2145)切片,切片厚度为 6 μm ,自动染色机(SHANDON Varistain 24-4)进行 HE 染色,每份样品非连续切片 2 张,用中性树脂进行封片。

1.3 卵巢发育观测

用 ZEISS Scope.A1 显微镜与配套的图像处理软件 Axiovision LE64 观察卵巢内卵母细胞的发育特征并进行时相组成分析。卵巢发育分期及卵母细胞时相的划分采用 Meïeh BA(1939)的原则,同时参考楼允东(1980)和刘筠(1993)。每张切片统计视野为 5~10 个(约 100~500 个卵母细胞),以平均数的百分数表示。

1.4 卵径分布分析

取保存完好的卵巢左右 2 叶的前、中、后共六部分,随机取 500~1000 粒,在 ZEISS Scope.A1 显微镜下进行观察,用 Axiovision LE64 专业图像处理软件测量卵径(长径)。以 0.05 mm 分组间距统计卵径分布,各卵径组统计包括卵径组下限的卵母细胞,不包括卵径组上限的卵母细胞。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞的发育特征

2.1.1 第 1 时相 卵原细胞或卵原细胞向初级卵母细胞过渡期。细胞圆形或椭圆形、体积小,卵径为 17.40~48.42 μm ,细胞质少,细胞核明显。核内染色质细丝状,形成稀疏的网。

2.1.2 第 2 时相 小生长期的初级卵母细胞。细胞体积变大,卵径为 22.46~193.04 μm ,呈多角形。细胞质嗜碱性,呈疏松微粒状,细胞核仁数增加,靠核膜内侧分布,核径为 20.01~86.41 μm ,细胞核周围出现生长环,强嗜碱性(图 2A);后期卵膜稍微增厚,出现 1 层较薄的滤泡细胞,核仁外移到核膜边缘,胞质外围出现卵黄核(图 2B)。

2.1.3 第 3 时相 大生长期的初级卵母细胞。细胞体积进一步增大,基本呈圆形,卵径为 98.04~286.33 μm ,核径为 39.07~77.96 μm 。细胞外出现 2 层滤泡膜,外层厚内层薄,界限不明显,放射膜开始形成。早期的卵母细胞细胞核呈不规则叶状,核仁多位于核膜内缘,细胞质弱嗜碱性。并且胞质边缘出现液泡,形成环状结构(图 2C),随着卵母细胞体积的增大,液泡从胞质边缘向内逐渐增多、变大;后期的卵母细胞放射膜逐渐增厚,核膜变得凹凸不平,大部分核仁在核膜边缘分布,少数分散在核中央,卵黄核消失,卵膜内缘液泡之间卵黄开始形成,随着生长逐渐增多(图 2D)。

2.1.4 第 4 时相 发育晚期的初级卵母细胞。体积大幅增大,卵径为 271.21~623.19 μm 。在本时相早期,细胞核位于卵母细胞中央,核径为 58.32~127.56 μm ,

核仁分散于核中央,并逐渐溶解,放射膜增厚为 10.56~18.47 μm ,除核周及靠近卵膜边缘含有较多嗜碱性细胞质外,其余充满卵黄颗粒(图 2E);后期的卵母细胞核膜开始溶解,细胞核逐渐向卵膜孔方向移动,核仁逐渐消失,动物极形成,卵母细胞进入成熟期(图 2F)。

2.1.5 第5时相 初级卵母细胞向次级卵母细胞过渡期。卵母细胞体积达到最大,卵径为 420.12~806.24 μm 。本时相早期,卵母细胞仍可见细胞核,核仁变成细小颗粒状,多聚集于中间,放射膜变薄,细胞质中充满粗大的卵黄颗粒(图 2G);后期,卵黄颗粒变大并逐渐形成较大的卵黄板块,核膜、核仁溶解(图 2H),成熟的卵从滤泡膜中释放出来,形成空滤泡(图 2I)。即将排出的卵母细胞发生水合作用,游离于卵巢腔中,水合卵母细胞在石蜡切片上透明并收缩成阿米巴形(图 2J)。

2.1.6 退化卵母细胞 退化吸收前期,充满卵黄的卵母细胞卵膜界限不清,放射膜开始溶解,滤泡膜内 2 层滤泡细胞排列混乱,滤泡膜增厚,层数增加,有

单个细胞游离出来,并且侵入细胞内,卵黄颗粒胶液化,逐渐被分解,卵母细胞内开始出现不规则空腔(图 2K);退化后期,滤泡膜基本不存在,由于滤泡细胞的吞噬作用,靠近卵膜的卵黄粒基本消失,中间只剩下吸收的残余组织和少量未吸收卵黄颗粒,放射膜断裂,卵膜发生皱褶,最后断裂而消失(图 2L)。

2.2 卵巢形态与组织学特征

2.2.1 I 期 卵巢整体大致呈细条状、透明,前部延伸短小,表面无血管或甚微弱。外观不能与雄性精巢区分。卵巢壁薄,为 30.02~38.24 μm ,细胞排列紧密、体积较小、形成明显的蓄卵片,其上主要为第 1 时相的卵原细胞以及发育早期的第 2 时相卵母细胞(图 3A)。

2.2.2 II 期 卵巢体积增大,呈浅粉色或浅白色,前部稍大逐渐往后延伸,后端细长,呈圆锥形,表面可见微细的血管。卵巢内结缔组织和血管发达,卵巢壁较薄,为 34.65~39.25 μm 。卵母细胞发育整齐,为第 1、2 时相的卵母细胞(图 3B)。

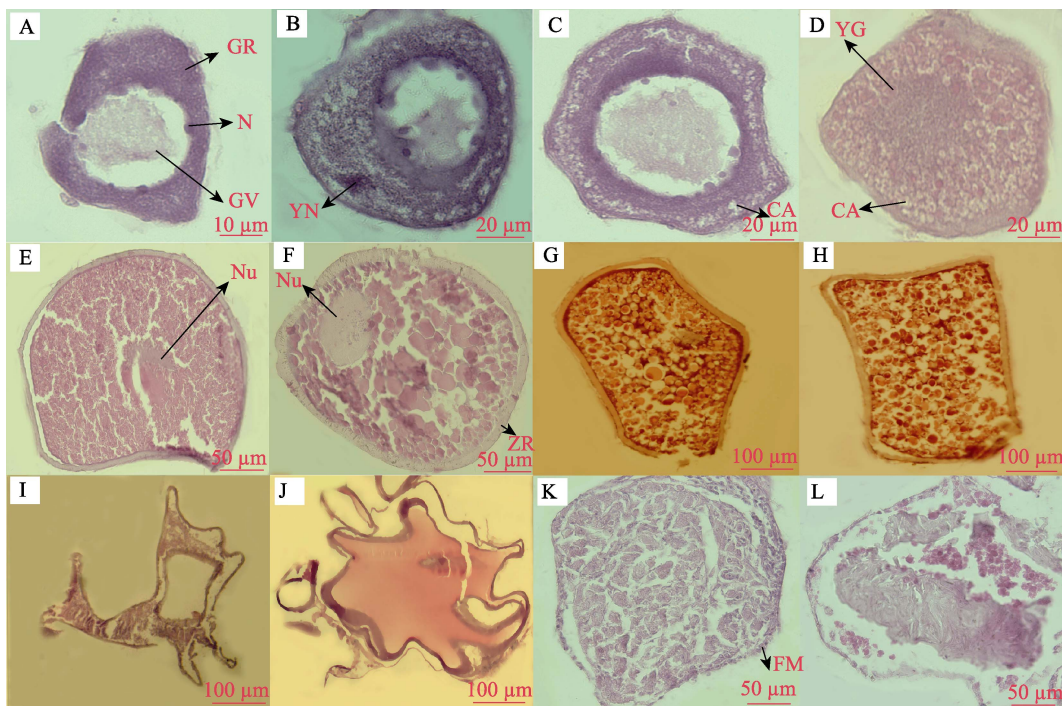


图 2 各时相卵母细胞形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of oocytes in different phases

- A. 第 2 时相早期; B. 第 2 时相后期; C. 第 3 时相早期; D. 第 3 时相后期; E. 第 4 时相早期; F. 第 4 时相后期;
G. 第 5 时相早期; H. 第 5 时相后期; I. 空滤泡; J. 水合卵母细胞; K. 早期退化卵母细胞; L. 后期退化卵母细胞; GR:
生长环; GV: 胚泡; CA: 液泡; N: 核仁; Nu: 细胞核; YG: 卵黄颗粒; YN: 卵黄核; ZR: 放射膜; FM: 滤泡膜
A. Oocyte at early phase 2; B. Oocyte at late phase 2; C. Oocyte at early phase 3; D. Oocyte at late phase 3;
E. Oocyte at early phase 4; F. Oocyte at late phase 4; G. Oocyte at early phase 5; H. Oocyte at late phase 5; I. Evacuated follicle;
J. Hydrated oocyte; K. Degenerated oocyte at early phase; L. Degenerated oocyte at late phase
GR: Growth Ring; GV: Germinal Vesicle; CA: Cortical Alveoli;
N: Nucleolus; Nu: Nucleus; YG: Yolk Globules; YN: Yolk Nucleus; ZR: Zone Radiate; FM: Follicle Membrane

2.2.3 III期 卵巢呈黄白色, 体积明显增大, 占据整个腹腔的 1/2, 总体呈扁平状, 前段膨胀延长, 呈三角形。肉眼可见黄色卵粒, 卵子紧密连接于蓄卵片, 较难剥离, 表面血管丰富。卵巢内卵母细胞为圆形, 体积增大, 卵巢壁增厚, 为 46.37~116.43 μm , 主要由第 2 时相晚期卵母细胞以及第 3 时相卵母细胞组成, 也有出现第 4 时相早期卵母细胞(图 3C)。

2.2.4 IV期 卵巢体积进一步增大、呈橘黄色或橘红色, 体表可见明显隆起, 占据腹腔的 2/3。卵巢表面血管发达, 前部三角形变得更加丰满, 在腹腔内向后延伸明显。肉眼可见饱满卵粒, 其中还出现少量半透明卵粒。卵巢中同时存在 1、2、3、4、5 五个时相的卵母细胞, 其中第 4 时相卵母细胞占主要优势, 卵巢壁为 40.34~135.56 μm (图 3D)。

2.2.5 V期 卵巢进入临产期, 充满整个体腔, 松软而膨大, 呈橘黄色, 对鱼体腹部稍加压力, 卵粒即能流出体外。卵粒清晰易辨、大而透明。此时卵巢内第 5 时相卵母细胞占主要成分, 除此之外, 还存在不同发育程度的第 4 时相卵母细胞和初积卵黄的第 3 时相卵母细胞以及处于小生长期的第 1、2 时相卵母细胞分布在大型卵母细胞之间。卵巢壁为 35.17~74.24 μm (图 3E)。V 期停留阶段较短, 产完 1 次卵后卵巢处于 VI-IV' 期。

2.2.6 VI-IV'期 产卵后的卵巢外层包膜变成紫黄色, 体积变小, 卵巢腔间隙变大, 仍然能看到有大量卵粒存在。卵巢内存在较多结缔组织, 血管布满卵巢膜, 卵巢壁较厚, 为 80.78~116.46 μm 。卵母细胞排列较为稀松, 具有大量第 2 时相卵母细胞、第 3 时相早期卵母细胞, 以及充满卵黄的第 4 时相的卵母细胞和部分未排出的成熟的第 5 时相卵母细胞。此外, 有空滤泡和呈泡沫状的退化卵(图 3F)。VI-IV' 期停留时间不长便转入 V' 期, 再次进行产卵。

2.2.7 V'期 外观和未产卵 V 期没有明显差别, 体积稍有减小, 外观橘黄色, 卵巢壁稍有松弛、柔软, 卵巢壁为 50.40~86.51 μm , 卵粒彼此分离, 透明卵的比例略有增加。主要由第 4、5 时相卵母细胞以及水合卵母细胞组成, 同时, 第 2、3 时相的卵母细胞变多(图 3G), 卵母细胞之间存在空滤泡以及排卵痕迹。

2.2.8 VI期 产完卵后的卵巢进入 VI 期, 卵巢退化, 体积和重量明显减小, 血管丰富, 呈紫红色, 卵巢腔萎缩, 卵巢膜松弛变厚, 呈褶皱的囊状。排卵后卵巢成为中空状态, 未排出的卵在卵巢周围, 卵巢腔内有一些紫色粘浆液。卵巢有很多空滤泡、结缔组织和血管, 后部空虚, 前、中部尚有未成熟卵母细胞和少量的未排出的成熟卵母细胞。隔壁崩溃, 未排出的

成熟卵母细胞被吸收(图 3H)。

2.2.9 VI-II期 卵巢为深红色, 基部颜色深, 卵母细胞发育转入 II 期, 早期卵母细胞明显增加, 卵巢腔内空滤泡和残留卵被吸收, 还能见未吸收完的退化卵母细胞。卵母细胞发育较未产卵 II 期不整齐, 除了第 1、2 时相卵母细胞, 还有少数已经开始积聚卵黄的发育到第 3 时相前期的卵母细胞。卵巢壁厚, 为 232.46~274.59 μm (图 3I)。

2.2.10 退化卵巢 外观特征与 VI-II 期卵巢相似, 呈现暗红色, 个体较大且饱满, 卵巢松弛有明显褶皱。卵巢内有结缔组织, 细胞排列较为紧密。卵母细胞退化, 细胞内变为泡沫状, 同时存在发育早期卵母细胞(图 3J)。

2.3 卵巢中卵母细胞组成

I 期主要由第 1、2 时相卵母细胞组成, 其中第 1 时相卵母细胞占绝对优势, 85.05%。

II 期主要由第 1、2 时相卵母细胞组成, 相比于 I 期卵巢, 第 2 时相卵母细胞比例增加, 为 59.24%。

III 期主要由第 2、3 时相卵母细胞组成, 第 1 时相卵母细胞比例下降为 12.86%, 并且出现第 4 时相早期卵母细胞, 为 12.89%。

IV 期主要由第 2、4 时相卵母细胞组成, 相比较 III 期卵巢, 第 3 时相卵母细胞比例下降为 13.27%, 第 4 时相卵母细胞增加为 30.93%。

V 期主要第 2、4 时相卵母细胞组成, 第 4 时相卵母细胞占绝对优势 49.09%, 同时, 出现第 5 时相卵母细胞且部分已经发生水合作用。

VI-IV' 期中第 2 时相卵母细胞比例较高, 为 59.44%, 其余各时相卵母细胞同时存在且比例接近。

V' 期卵巢中第 4 时相卵母细胞比例最高, 第 4、5 时相卵母细胞比例有较大提高, 分别为 40.51%、24.85%, 并且第 5 时相卵母细胞大部分处于水合状态。

VI-II 期卵巢存在第 1、2、3 时相卵母细胞, 其中第 2 时相卵母细胞占优势 60.73%, 并且第 3 时相卵母细胞占较高比例 19.62%(表 1)。

2.4 卵径分布

IV 期卵巢中卵母细胞卵径呈单峰分布, 卵径主要分布在 0.45~0.55 mm。

V 期卵巢中卵母细胞呈单峰分布, 卵径分布范围扩大, 在 0.70~1.15 mm 间呈浅锯齿状分布, 主要分布在 0.50~0.70 mm, 其中 0.60~0.65 mm 所占比例最高, 为 24.27%。

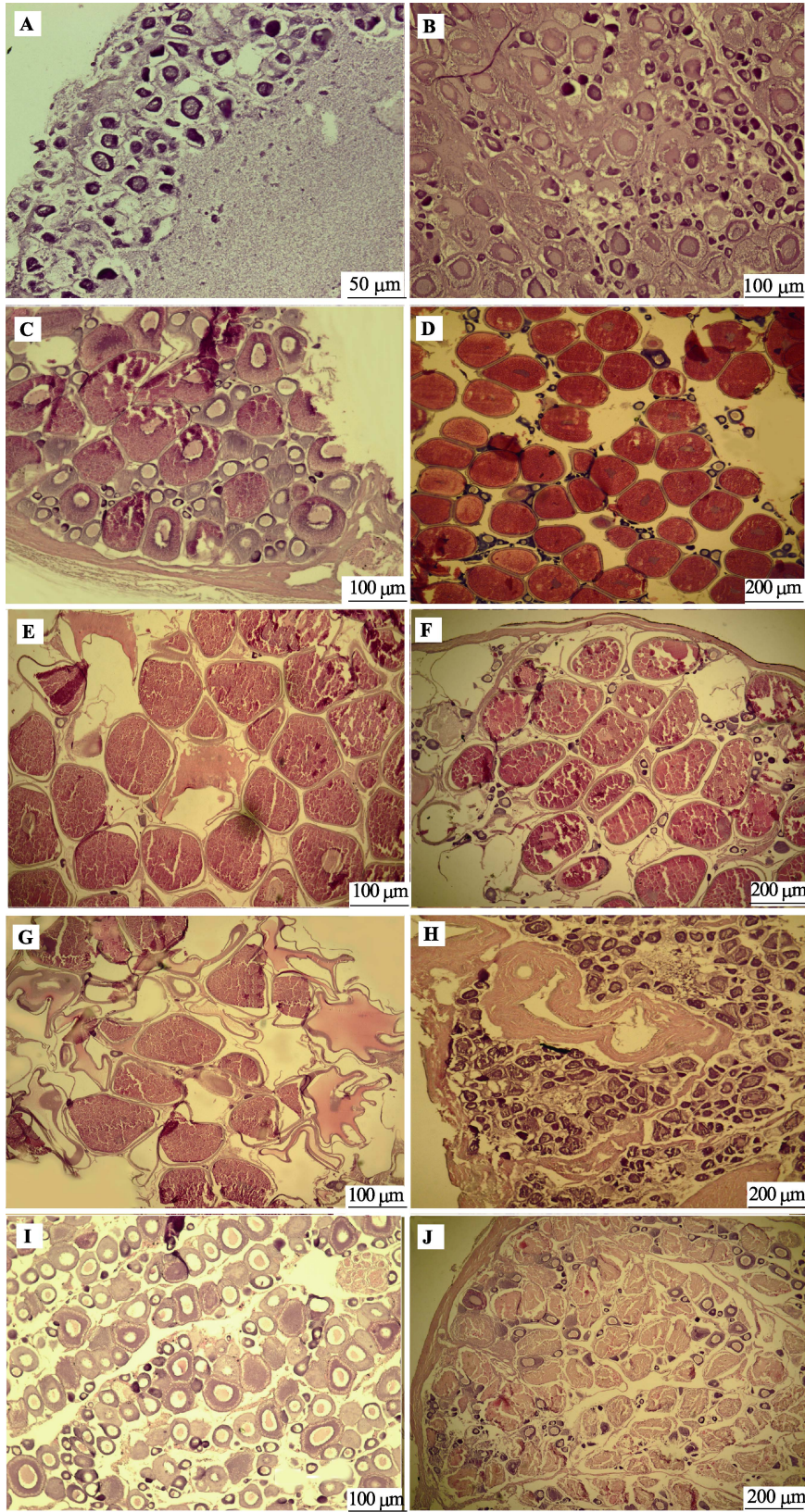


图 3 各发育期卵巢

Fig.3 Ovary at different stages

A: I 期; B: II 期; C: III 期; D: IV 期; E: V 期; F: VI-IV' 期; G: V' 期; H: VI 期; I: VI-II 期; J: 退化卵巢
A: Stage I ; B: Stage II ; C: Stage III; D: Stage IV; E: Stage V ; F: Stage VI-IV' ; G: Stage V' ; H: Stage VI; I: Stage VI-II ;
J: Degenerated ovary

表 1 各期卵巢中不同时相卵母细胞组成比例
Tab.1 Percentage of the oocytes in different development phases at different stages

卵巢发育阶段 Development stages	各时相卵母细胞组成比例(%) Percentage of the oocytes in different development phases					尾数 Quantity	备注 Remarks
	1	2	3	4	5		
I	85.05	14.95				1	
II	40.76	59.24				2	
III	12.86	45.74	28.52	12.89		2	
IV	11.75	44.06	13.27	30.93		2	
V	4.86	28.25	5.42	49.09	12.38	3	
VI-IV'	11.70	59.44	11.83	9.65	7.37	2	有空滤泡 Empty follicles
V'	10.03	23.14	1.49	40.51	24.85	2	有空滤泡 Empty follicles
VI- II	19.65	60.73	19.62			2	空滤泡和退化卵 Empty follicles and degenerated oocytes

VI-IV'期卵巢中卵母细胞呈单峰分布, 卵径分布在 0.40~0.50 mm, 其中 0.45~0.50 mm 占比例最高, 为 37.77%。

V'期卵巢中卵母细胞呈双峰分布, 在 0.50~0.55 mm 和 0.90~0.95 mm 处形成峰值(图 4)。水合卵母细胞以及处于小生长期的卵径较小的卵母细胞比例均有所提高。

3 讨论

3.1 卵母细胞的发育与退化

在硬骨鱼类中, 由于遗传因素和长期环境影响,

卵母细胞的发育和生长方式存在一定区别, 其中卵黄和液泡的发生顺序在不同种类存在显著差异, 这与不同的营养吸收方式有关(施琼芳, 1988)。高眼鲈卵母细胞发育是先出现卵黄, 随后液泡出现, 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、宽体舌鳎(*Cynoglossus robustus*)、圆斑星鲈(*Verasper variegates*)等相同(孙朝徽等, 2008; 柳学周等, 2009; 倪海儿等, 1999; 徐永江等, 2011); 而大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)、欧洲黄盖鲈(*Limanda limanda*)等(Merson *et al*, 2000; Htun-Han, 1978)卵母细胞发育过程中液泡、油滴和卵黄颗粒同时出现; 鳊

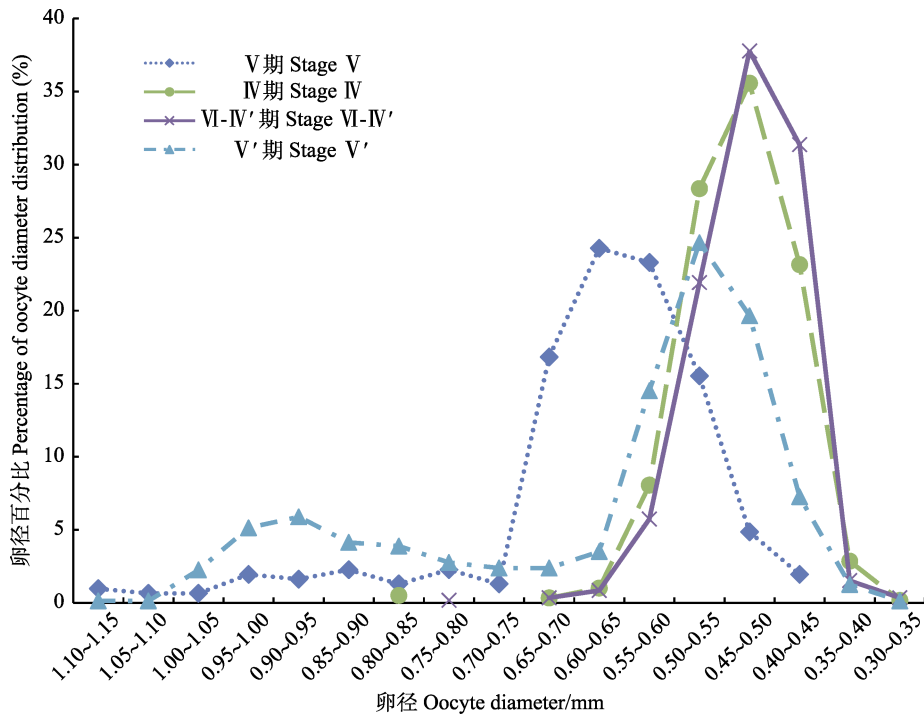


图 4 各期卵巢的卵径分布
Fig.4 Oocyte size distribution at different stages

鱼(*Mugil cephalus*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)等卵母细胞发育时液泡首先出现,紧靠在核的外周,随着液泡中脂肪物质的积累,逐渐均匀地分散在细胞质的各个部位,卵黄首先在靠近卵膜边缘的细胞质中形成,逐步向中央填充(吴佩秋,1981;何大仁,1998;方永强等,2004)。这种卵黄和液泡发生方式的差异,反映了卵母细胞发育过程中营养积累及代谢的差异,也直接决定了卵母细胞的发育速度和时间,种群不同是造成这种差异的原因,另外,与不同生态类群也有关(倪娜等,2011)。高眼鲱卵母细胞第2时相随着卵黄核的出现,细胞外围出现1层滤泡膜,滤泡膜是鞘膜细胞层和颗粒细胞层组成的细胞结构,是鱼类合成卵巢类固醇激素的基础结构,而雌激素对于卵黄合成具有诱导作用(Young *et al*, 1983),随着卵母细胞发育,出现双层滤泡结构,滤泡上皮细胞突出许多微绒毛深入卵母细胞中,卵母细胞由此获得营养(Riehl, 1980)。当卵母细胞完全成熟时,由于微绒毛移出,滤泡膜脱离,卵母细胞营养积累结束。

高眼鲱卵母细胞退化时滤泡细胞排列紊乱、体积变大,卵黄颗粒从边缘往中心逐渐变小、分解。该时期卵母细胞对不利的外界条件非常敏感,极易受到损伤(何大仁,1981)。高眼鲱卵巢退化期样品主要采集于11月,此时水温下降,产卵季节结束,卵母细胞被吸收,卵巢退化。另外,卵巢退化可能与鱼类营养状态及其他外部环境有关。通过观察发现,产卵时间早的高眼鲱个体有充足的时间进行排卵,卵巢基本能够达到排空状态,而产卵时间晚的个体在产卵季节结束时残存数量较多的卵母细胞。

3.2 卵巢的发育与卵径分布

高眼鲱卵母细胞发育存在不同步性,其卵巢中同时存在不同时相卵母细胞,并且各期卵巢中均存在一定数量的早期卵母细胞。研究证明,此部分卵母细胞的多少与亲鱼食物供给及生理状态相关(Bower *et al*, 1961)。另外,各时相卵母细胞的比例、被产出和被吸收数量,与资源状态有一定的关系,如北太平洋无须鲷(*Merluccius productus*)因资源减少,进而引起被排出的卵母细胞数量增加,被吸收的卵母细胞数量减少(Foucher *et al*, 1980),这是鱼类维持其种群延续的内在繁殖机制的调节。

高眼鲱卵巢中各卵母细胞分离生长,卵径在IV、V期卵巢中均呈单峰型分布,产卵后的VI-IV'期卵巢,卵径也呈单峰型分布,随着卵母细胞的进一步发育,卵巢到达V'期,此时卵巢主要由水合卵母细胞和第4时相的卵母细胞组成,卵径呈双峰型分布。高眼鲱的这

种双峰分批产卵,卵母细胞的补充以第4、5时相卵母细胞为主,这种方式不需要同时形成大量卵黄物质,减少了对能量的需求。鱼类卵巢中不同时相卵母细胞分布及排卵规律受神经内分泌和外部环境的双重调控(宋海霞等,2005),因此,关于高眼鲱的繁殖机制需结合内分泌及环境因素进一步研究。

参 考 文 献

- Bower AB, Holliday FGT. Histological changes in the gonad associated with the reproductive 1961, 5: 1-16
- Fang YQ, Lin JZ, Weng YZ, *et al*. The process of the ovary development and oogenesis in the cultured-pond *Mugil cephalus*. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(4): 353-359 [方永强,林君卓,翁幼竹,等.池养鲮的卵巢发育和卵子发生过程.水产学报,2004,28(4):353-359]
- Foucher RP, Beamish RJ. Production of nonviable oocytes by Pacific hake (*Merluccius productus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1980, 37(1): 41-48
- He DR, Xiao JH, Shi YF. A histological study on the gonad of grey mullets in Xinglin Wan, Xiamen. Journal of Fisheries of China, 1981, 5(4): 329-342 [何大仁,肖金华,石燕飞.厦门杏林湾普通鲮鱼性腺组织学研究.水产学报,1981,5(4):329-342]
- Htun-Han M. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: Seasonal changes in the ovary. Journal of Fish Biology, 1978, 13: 351-359
- Li CH. A study on the individual fecundity and its dynamics of *Trichiurus haumela* (Forsk.) of the East China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1983, 14(3): 220-239 [李城华.东海带鱼个体生殖力及其变动的研究.海洋与湖沼,1983,14(3):220-239]
- Li JS, Yan LP, Hu F. Inter-decadal changes in biological characteristics of reproductive stocks of chub mackerel, *Scomber japonicas*, in the East China Sea. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1253-1259 [李建生,严利平,胡芬.东海日本鲭繁殖群体生物学特征的年代际变化.中国水产科学,2015,22(6):1253-1259]
- Li XS, Zhao XY, 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]
- Lin LS, Jiang YZ, YAN LP, *et al*. Study on the distribution characteristics and fecundity of Spawning stock of *Larimichthys polyactis* in the Southern Yellow Sea and the East China Sea. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(4): 453-459 [林龙山,姜亚洲,严利平,等.黄海南部和东海小黄鱼产卵亲体分布特征与繁殖力的研究.上海海洋大学学报,2009,18(4):453-459]

- Lin LS, Cheng JY, Ren YP, *et al.* Analysis of population biology of small yellow croaker *pseudosciaena polyactis* in the East China Sea region. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(4): 333–338 [林龙山, 程家骅, 任一平, 等. 东海区小黄鱼种群生物学特性的分析. *中国水产科学*, 2004, 11(4): 333–338]
- Ling JZ, Yan LP, Lin LS, *et al.* Reasonable utilization of hairtail *Trichiurus japonicus* resource in the East China Sea based on its fecundity. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(6): 726–730 [凌建忠, 严利平, 林龙山, 等. 东海带鱼繁殖力及其资源的合理利用. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 726–730]
- Liu J. Reproductive physiology of cultural fishes in China. Beijing: Agriculture Press, 1995(5): 29 [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1995(5): 29]
- Liu XZ, Xu YJ, Liu NZ, *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数量特征研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25–35]
- Lou YD. Histology and embryology. Beijing: China Agriculture Press, 1980: 131–137 [楼允东. 组织胚胎学(第二版). 北京: 中国农业出版社, 1980: 131–137]
- Merson RR, Casey CS, Martincz C. Oocyte development in summer flounder: Seasonal changes and steroid correlates. *Journal of Fish Biology*, 2000, 57(1): 182–196
- Мейер ВА, Вопросы К, годовом О. УНКле КОСТНЫХ РЫБ. ИЗЪ АН СССР. Булл, 1939, 3: 389–420
- Mi CD. A study on resources, stock structure and variation of reproductive habit of hairtail, *Trichiurus haumela* in East China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1997, 4(1): 7–14 [宓崇道. 东海带鱼资源状况, 群体结构及繁殖特性变化的研究. *中国水产科学*, 1997, 4(1): 7–14]
- Ni HE, Yu H, Zheng ZM. On the change of the ovary in annual cycle of *Cynoglossus robustus* from the East China Sea. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 1999, 18(1): 34–39 [倪海儿, 於宏, 郑忠明. 东海宽体舌鳎卵巢周年变化的组织学观察. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 1999, 18(1): 34–39]
- Ni N, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* The study of gonadal development and steroid hormone annual change in barfin flounder *Verasper moseri*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(3): 16–25 [倪娜, 柳学周, 徐永江, 等. 条斑星鲈卵巢发育规律和性类固醇激素周年变化研究. *渔业科学进展*, 2011, 32(3): 16–25]
- Riehl R. Ultracytochemical localization of Na⁺, K⁺-activated ATPase in the oocytes of *Heterandria formosa* Agassiz, 1853 (Pisces, Poecilidae). *Reproduction Nutrition Development*, 1980, 20(1A): 191–196
- Shan XJ, Jin XJ, Zhou, ZP, *et al.* Stock dynamics of *Cleisthenes herzensteini* in the central and southern Yellow Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(5): 244–252
- Shi QF. Recent advances in the studies on gonad development in fishes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1988, 12(3): 248–258 [施琼芳. 鱼类性腺发育研究新进展. *水生生物学报*, 1988, 12(3): 248–258]
- Song HX, Wen HS. Histological studies on the ovarian development and its mechanism of regulation-controlling in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2005, 4: 75–83 [宋海霞, 温海深. 养殖牙鲆卵巢发育及其调控的组织学研究. *海洋湖沼通报*, 2005, 4: 75–83]
- Sun ZH, Liu HJ, Si F, *et al.* Histological observation of gonadal differentiation in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(6): 451–454 [孙朝徽, 刘海金, 司飞, 等. 养殖牙鲆性腺分化的组织学观察. *大连水产学院学报*, 2008, 23(6): 451–454]
- Wan RJ, Jiang YW. 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]
- Wu PQ. The morphological characters and seasonal changes in development of the oocytes of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* Bleeker. *Acta Zoologica Sinica*, 1980, 26(4): 337–345, 401 [吴佩秋. 小黄鱼卵母细胞发育的形态特征和季节变化. *动物学报*, 1980, 26(4): 337–345, 401]
- Xu YJ, Liu XZ, Liu JG, *et al.* Histological and morphometric studies on the annual gonadal maturation cycle of spotted halibut *Verasper variegatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(3): 7–15 [徐永江, 柳学周, 刘君刚, 等. 圆斑星鲈卵巢发育的组织学和数量形态特征研究. *渔业科学进展*, 2011, 32(3): 7–15]
- Young G, Crim LW, Kagawa H, *et al.* Plasma 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*oncorhynchus rhodurus*): Correlation with plasma gonadotropin and in vitro production by ovarian follicles. *General & Comparative Endocrinology*, 1983, 51(1): 96–105
- Zeng L, Li XS, Zhao XY, *et al.* Fecundity and its variations of anchovy *Engraulis japonicus* in the central and southern Yellow Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(5): 569–574 [曾玲, 李显森, 赵宪勇, 等. 黄海中南部鳀鱼的生殖力及其变化. *中国水产科学*, 2005, 12(5): 569–574]
- Zhang GZ, Li XS, Jin XS, *et al.* Changes of biological characteristics of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in the central and southern Yellow Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(24): 6854–6861 [张国政, 李显森, 金显仕, 等. 黄海中南部小黄鱼生物学特征的变化. *生态学报*, 2010, 30(24): 6854–6861]

A Study on the Ovary-Development Characters and Oocyte Size-Distribution of *Cleisthenes herzensteini* in the Yellow Sea

TENG Guangliang^{1,3}, SHAN Xiujuan^{2,3}^①, JIN Xianshi^{2,3}, DAI Fangqun³, CHEN Yunlong³, YANG Tao³

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract This study investigated the development and resorption of the oocyte of *Cleisthenes herzensteini* in the Yellow Sea, using light microscopy and morphometric methods. Oocyte development was divided into five phases, based on morphological criteria and nutrition accumulation. Oocytes in phase I were small, with little cytoplasm. In phase II, oocytes were distinguished by the appearance of yolk nucleus near the cell nucleus. In phase III, cortical vacuoles first appeared on the edge of the cytoplasm and then extended to the center, with the occurrences of crystalline yolk and double follicular membrane. Oocytes in phase IV were full of non-crystalline yolk, with the cell nucleus moving towards the animal pole and the zona radiate becoming thicker. In phase V, the cell nucleus of the oocyte dissolved, and the hydrated oocyte was released from the follicular membrane. Ripe ovary that had not ovulated completely was in turn resolved, with the yolk absorbed and the zona radiate ruptured after the spawning season. In addition, this study showed that *C. herzensteini* was characterized by asynchronous oocyte development and batch spawning, based on histologic observations of the different stages of the ovary and the oocyte size-distribution method. The sizes (major axes) of the oocytes in the stage IV, V, and VI-IV' ovaries had unimodal distributions, with the three modes at 0.45~0.55 mm, 0.60~0.65 mm, and 0.40~0.50 mm, respectively. Oocyte size distribution was bimodal for stage V' ovary, the oocytes mainly distributed at both 0.50~0.55 mm and 0.90~0.95 mm, with the percentage of hydrated oocytes and small oocytes increased. The two dominant size groups of oocytes in the stage V' ovary were well separated with a clear hiatus, and the oocytes in the larger-size group were all hydrated, which was in accordance with the characteristics of batch spawners. In the course of protecting *C. herzensteini* resources, we should take into account their reproductive characteristics.

Key words *Cleisthenes herzensteini*; Ovary development; Histological characters; Oocyte size-distribution

^① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20170829001

<http://www.yykxjz.cn/>

Wang WJ, Wang MS, Xiao GX, Hu YL, Song WP, Kong J, Jin XS. Using SSR marker to trace Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* released in natural sea — A feasible strategy in release effect assessment in natural resources recovery program. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 21–26

Using SSR Marker to Trace Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Released in Natural Sea — A Feasible Strategy for Assessment of Release Effect in Natural Resources Recovery Program



WANG Weiji¹, WANG Mosang^{1,2}, XIAO Guangxia³, HU Yulong¹,
SONG Wenping³, KONG Jie¹, JIN Xianshi¹①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Bohai Fisheries Research Institute of Tianjin, Tianjin 300457)

Abstract Enhancement release has been proven effective in natural resources recovery of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in the last several decades in China, however, to assess the effectiveness of enhancement release, we still need to develop a high-efficient and easy-operational method to replace those physical-tagging release method with labor intensive, size- and number-limited. In the present study, single (with maternal known) parentage identification using eight simple sequence repeat (SSR) markers genotype fingerprint was used to trace Chinese shrimp released in Bohai Bay in 2013. A total of 884 shrimp spawners were collected from two hatcheries in Tianjin City respectively after enhancement release of shrimp larvae in May 2013. A total of 844 shrimp samples were recaptured around the release location approximately 4 months after the shrimp larvae were released into the natural sea. Genotype data of 8 SSR loci of the 1,726 samples were used for maternal-offspring parentage identification using CEervus 3.0 software. The allele number in each locus ranged from 8 to 68 with an average value of 33.25, which produced the cumulative exclusion probability with one parent known of all these sight loci up to 99%. Among the 844 recaptured shrimp samples, 448 (♂:♀=212:232, gender information was lost for 4 samples) were successfully traced to their 337 maternal parents using a logarithm of odds (LOD) > 3.0 threshold. Among these 337 maternal parents, 253 had a single offspring, 62 had two offspring, 18 had three offspring, 3 had four offspring, and 1 had five offspring. For the first time, a large number of released shrimp were identified from recapture samples, and this study showed that it is possible to trace all released Chinese shrimp without using any type of physical tag in enhancement release activities. This not only means more precise recapture ratio assessment than ever expected, but also this method demonstrates an effective method for large-scale hatchery release as well as for organisms used in hatchery enhancement which are not suitable for physical tagging.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; Parentage identification; SSR; Enhancement release

Chinese Library Classification Number S931 **Document code** A **Article No.** 2095-9869(2018)01-0021-06

* This work was supported by National Basic Research Program of China (973 Program)(2015CB453303) and International Science and Technology Cooperation Program of China (2013DFA31410). WANG Weiji, E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn

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

Received: 2017-08-29, Accepted: 2017-09-15

Introduction

One of the most important native marine shrimp species in China, with smaller populations also found along the west coast of the Korean Peninsula, the Chinese fleshy shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) has played an indispensable role in Chinese fishery and marine culture (Deng, 1998). However, since the 1980s, the once plentiful captures of Chinese shrimp in the Yellow and Bohai Seas has dramatically declined. This decline has been attributed to an increase in fishing, pollution and natural habitat destruction. Additionally, the traditional spring shrimp fishing season disappeared approximately in 1986 (Deng *et al.*, 2001). After several decades of continuous practice, hatchery release enhancement was proven to be an alternative strategy for natural population recovery, with the fishing industry also gradually benefiting from the strategy (Wang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012). During this period, different methods were developed to assess the recapture rate. These methods mainly include marker- recapture methods with physical markers such as eye tags, visible implant elastomers (VIE, <http://www.nmt.us>), code wire tags (CWT, <http://www.nmt.us>) and radio frequency identification (RFID, <http://www.biomark.com>) (Klima, 1965; Luo *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2014). However, they do have deficiencies in common, such as labor-intensive tagging processes, damage to tagged individuals, and impracticality for large-scale application, all of which make it difficult to calculate precise recapture rates for assessing the effect of the release. Therefore, there is an urgency to develop a new marker for precise recapture rate assessments.

Wang *et al.* (2014) introduced a new method that was based on individual identification and pedigree tracing using simple sequence repeat (SSR) markers, and it was successfully applied in release effect assessments in Jiaozhou Bay and Bohai Bay in China in 2012. In that study, a large number of shrimp from several full-sib families were replaced and functioned as the previously physically tagged individuals, thereby skipping the labor-intensive tagging process and significantly increasing the tagged individuals' number at the same time, consequently producing a more precise recapture rate. However, during this "molecular marker-recapture" process, several problems emerged, particularly regarding family development, which was tedious and prone to failure, and the number of shrimp carrying the "molecular marker" was still finite compared to the whole released stock (Wang *et al.*, 2014). This prompted us to develop a more thorough and precise assessment method, where all released shrimp could be traced through parentage identification using an SSR marker. A previous study has verified the accuracy of SSR markers on single- parent parentage identification in Chinese shrimp (Zhang *et al.*, 2014). In the current study, all of the 884 spawners from the two

hatcheries responsible for larvae hatchery release in Tianjin City were collected and involved in a four-month-later single-parent parentage identification using 844 recaptured samples and genotype information from 8 SSR loci. For the first time, all offspring from those 884 spawners were identified from recapture samples; further, we could theoretically expect that all released shrimp could also be traced.

Materials and methods

Sample collection

In early March 2013, approximately 2000 shrimp spawners (sexual matured female shrimp carrying spermatophore) were collected along their spawning migration route in the Yellow Sea. The spawners were cultured at the Bohai Fishery Enhancement Station of the Bohai Fisheries Research Institute of Tianjin and the Dashentang Shrimp Seedling Plant in Tianjin. These stations are the two exclusively designated hatcheries for Chinese shrimp larvae production used for enhancement release in Bohai Bay in Tianjin City. After one and half month indoor domestication and nutrient enrichment period, a total of 884 spawners in both hatcheries started a 15-day spawning period. During this time, any dead individuals were collected and stored at -20°C . After the spawning period, all 884 spawners (successful and unsuccessful) were numbered and transported at -20°C to the laboratory in the Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI), Qingdao, P. R. China and stored at -75°C until use.

In early June, after a 45-day growth period, the fertilized eggs in the two hatcheries had developed into the post larval phase with body lengths of 1.2 cm, and an estimated 1.487 billion post-larvae were released into the Bohai Sea near Tianjin City. By the end of August, just before the natural Chinese shrimp population initiated their wintering migration, 844 shrimp were recaptured from the area around the original release location. The recaptured shrimp were transported alive to the YSFRI laboratory. The body length, weight, and gender were recorded for further analysis. All samples were maintained at -75°C for DNA isolation.

Methods

The swimming apparatus of each shrimp sample was dissected for genomic DNA isolation using the protocol described by Wang (2008). Pure DNA was dissolved in double-distilled water to obtain a final concentration of $50\text{ ng}/\mu\text{l}$. A total of 8 unlinked mutually SSR loci were used in genotyping all DNA samples, among which, 6 were the same as those used in previous reports by Zhang *et al.* (2014) and Wang *et al.* (2014). The first four of these six were EN0032, RS0622, FCKR002, and FCKR013, which formed a high-temperature group (HTG) of the quadruple SSR-PCR system to save PCR

and genotyping processing time. The other two were RS1101 and FCKR005. In the present study, two new SSR loci, FC019 and RS0683, were introduced to replace the previous FCKR005 and FCKR007 loci for more ideal genotyping results. The PCR reaction components and procedures were adopted according to the description of Li *et al* (2012), and all other SSR primer details were displayed in Tab. 1 (Li *et al*, 2012; Dong *et al*, 2014). An ABI 3130 auto-sequencer

(Applied Biosystems Inc.) was used for the PCR amplification product separation. Allele size estimation and recording were completed using the DNA marker GeneScan-500 Liz (Applied Biosystems Inc.) and Genemapper software (Applied Biosystems Inc.). Cervus 3.0 software (<http://www.fieldgenetics.com>), a computer program for the assignment of parents to their offspring using genetic markers, was used for single-parent (maternal only) parentage identification.

Tab.1 Details of 4 SSR markers composing one set of quadruple-fold fluorescent-labeled PCR system and four single SSR-PCR systems

SSR-PCR system	Locus name	GenBank No.	Annealing temperature (°C)	Primer sequences (5'~3') and labeled fluorescent dye
Quadruple-fold fluorescent-labeled SSR-PCR system	EN0033	AY132813	64	F: 6-FAM-CCTTGACACGGCATTGATTGG R: TACGTTGTGCAAACGCCAAGC
	RS0622	AY132778	66	F: ROX-TCAGTCCGTAGTTCATACTTGG R: CACATGCCTTTGTGTGAAAACG
	FCKR002	JQ650349	60	F: HEX-CTCAACCCTCACCTCAGGAACA R: AATTGTGGAGGCGACTAAGTTC
	FCKR013	JQ650353	61	F: TAMRA-GCACATATAAGCACAAACGCTC R: CTCTCTCGCAATCTCTCCAAC
Single-fold PCR system	RS1101	AY132811	52	F: 6-FAM-CGAGTGGCAGCGAGTCTC R: TATTCCCACGCTCTTGTC
	FC019	/	45	F: ROX-GTTGATGCCAGCAGTTAT R: TTCCAAGGGTCAGAGGTG
	RS0683	AY132823	64	F: HEX-ACACTCACTTATGTCACACTGC R: TACACACCAACTCAATCTCC
	FCKR009	JQ650352	52	F: TAMRA-GCACGAAAACACATTAGTAGGA R: ATATCTGGAATGGCAAAGAGTC

Note: 6-FAM, ROX, HEX and TAMRA were the labeled fluorescent dyes

Results

The genotyping results of 8 SSR loci indicated that 1728 shrimp samples, including 884 spawners and 844 recapture samples, displayed high genetic variability. The allele number at each locus ranged from 8 to 68 with an average value of 33.25 (Tab.2). The polymorphic information content (PIC) values were 0.776~0.951 with an average value of 0.857. Further more, the cumulative exclusion probability with one parent known [combined non-exclusion probability (NE-1P): 8.913×10^{-5}] of all 8 SSR loci was in excess of 0.99% (Tab. 2), with which high reliable parentage identification results were expected.

Subsequently, 1728 samples were involved in single-parent parentage identification analysis between the 884 spawners and 844 recapture samples using the 8 SSR loci and Cervus 3.0 software. The results indicate that a total of 448 offspring from the 844 recapture samples were traced to 337 of the 884 spawners with a LOD value > 3.0. The identified maternal-offspring relationship was comprised of the six following cases:

among most of traced spawners (253), only one offspring was detected; in 62 traced spawners, two offspring were detected; in 18 traced spawners, three offspring were detected; in 3 traced spawners, four offspring were detected; and in one traced spawner, one offspring was detected.

Discussion

Parentage identification

With both parents known, only several SSR loci (given there are abundant alleles in each locus) could produce a high enough cumulative exclusion probability to meet authentic parentage identification, even in high-capacity sample analysis, as shown in previous research (Li *et al*, 2012; Dong *et al*, 2014). However, in practice, it is not always the case that both parents are simultaneously available, especially in some crustacean species that mature asynchronously. In the instance of Chinese shrimp, the male first transfers the spermatophore to the female during winter migration and then dies in the following autumn. In the following spring, the females

Tab.2 Summary of genetic variability of 8 SSR loci crossing the whole 1728 samples and exclusion probability they could offer

Locus	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>H</i> _{Obs}	<i>H</i> _{Exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP
EN0033	68	1680	0.768	0.953	0.951	0.170	0.094	0.015
RS0622	26	1703	0.854	0.912	0.905	0.304	0.179	0.052
FCKR002	40	1423	0.921	0.952	0.950	0.177	0.097	0.017
FCKR013	27	1720	0.885	0.925	0.921	0.259	0.149	0.036
RS1101	23	1697	0.778	0.804	0.776	0.558	0.382	0.200
FC019	43	1725	0.774	0.901	0.894	0.323	0.193	0.057
RS0683	8	1718	0.856	0.615	0.541	0.809	0.667	0.515
FCKR009	31	1517	0.697	0.926	0.921	0.258	0.149	0.036
Mean number of alleles per locus	33.25							
Mean observed heterozygosity			0.817					
Mean expected heterozygosity				0.874				
Mean polymorphic information content (PIC)					0.857			
Combined NE-1P						8.913×10 ⁻⁵		
Combined NE-2P							1.790×10 ⁻⁶	
Combined NE-PP								1.009×10 ⁻¹⁰

Note: *k*: Number of alleles at the locus; *N*: Number of individuals typed at the locus; *H*_{Obs}: Observed heterozygosity; *H*_{Exp}: Expected heterozygosity; NE-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent; NE-2P: Average non-exclusion probability for one parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; NE-PP: Average non-exclusion probability for a candidate parent pair

bearing spermatophores simultaneously produce eggs and release the matured sperm from spermatophore at the spawning sites. In this case, single parentage identification using more SSR markers than used when oth parents are known is an alternative for tracing released individuals or other related studies. The accuracy of parentage identification using SSR markers has been confirmed by an indoor sealed pond experiment using physically tagged individuals (VIE) as the reference (Li *et al*, 2012). The accuracy of maternal only parentage identification was indirectly confirmed by two enhancement release studies of Chinese shrimp in Bohai Bay and Jiaozhou Bay in 2012 (Wang *et al*, 2014). In the present study, two SSR loci from the previous study, FCKR005 and FCKR007, were replaced with two newly introduced loci, FC019 and RS0683 for better genotyping resolution (Wang *et al*, 2014; Dong *et al*, 2014). There were 43 and 8 alleles detected at FC019 and RS0683, respectively. The sum of alleles is slightly less than what was detected at loci FCKR005 and FCKR007 in the previous study, indicating that the cumulative exclusion probability produced by the present 8 SSR loci is slightly less than or equal to that produced by the previous 8 SSR loci. Moreover, in the present study, at each assignment where the 8 SSR loci matched between the candidate parent and offspring, only when the locus-by-locus logarithm (base 10) of odds (LOD) score was ≥ 3.0 . Could it be declared as a true parentage relationship?

Previous studies have shown that where the LOD score was not considered in the parentage assignment,

even when alleles at each locus from offspring matched the parents or a single parent, the chance of a false positive would significantly increase. In regards to the precision of tracing released individuals using SSR markers, the following measures were suggested in the study by Bravington *et al* (2004): (i) Use as few broodstock as possible. Generally, a wild Chinese shrimp spawner can produce 400,000 to 1,800,000 fertilized eggs, among which, 40%~60% could develop to the post larvae phase in plants and be released into the sea. In practice, plants fishing shrimp spawners along their spawning migration route at each spring for shrimp larvae production. Then, for a better profit, they usually produce as many post larvae as possible using as few spawners as possible, which in fact increases the chance to produce authentic parentage identification results, meanwhile increasing the risk of inbreeding depression. (ii) Obtain paternal as well as maternal genotypes. Chinese shrimp are a type of asynchronous-maturing crustacean, in other words, the male transfers the spermatophore to the female and subsequently dies. The female bearing the spermatophore simultaneously releases the egg and the sperm the next spring after they have finished their over-wintering phase. Removing the spermatophore directly would seriously damage the female. Therefore, in the present study, only the genotype information from the female was involved in the parentage identification analysis. (iii) Stock as many as possible, are similar to premise (i). In fact, the two shrimp seedling plants produced and released approximately 1.2×10^9 post larvae shrimp using only

approximately 1,200 captured spawners in the spring of 2012. (iv) Finally, capture and genotype are as many as prawns as possible. The number of recaptured samples in this study was 844, among which, a total of 448 released individuals were identified, representing two large sample sizes. On account of the above-mentioned measures, the accuracy of the parentage identification results in this study is reliable.

Release effect assessment

Using SSR markers to trace released individuals played an important part in assessing the accuracy of the effect of hatchery enhancement of Chinese shrimp. Due to the tiny size (the released shrimp post larvae were approximately 1.2 cm), and the large scale release number (approximately $0.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ shrimp post larvae were released into Bohai Bay every year), there was no appropriate physical marker that could be used. This problem has persisted over several decades which was one of the most puzzling problems in the accuracy assessment of the effect of hatchery release since the Chinese shrimp hatchery release activity was initiated. Bravington *et al* (2004) evaluated the potential of using SSR markers for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in an enhancement program, which prompted us to introduce the use of SSR markers in the assessment of the effect of Chinese shrimp hatchery enhancement. The first attempts were carried out in Jiaozhou Bay and Bohai Bay in 2012. In each bay, six full-sib families were released with a hatchery stock. During the late autumn fishing season, a total of 12 individuals from 7 families were identified from 5739 recaptured samples using SSR markers. This was the first time that molecular marker recapture assessment was applied to the Chinese shrimp hatchery enhancement (Wang *et al*, 2014). However, due to the small number of molecular-marked individuals released from the 12 full-sib families (but far more than previous studies that released physically tagged shrimp), the ratios between the molecular-marked individuals and the hatchery stock in Bohai Bay and Jiaozhou Bay were approximately 1:800 and 1:300, respectively. The reliability of the recapture ratio using molecular marker recapture in that study still needs be considered, although it produced a molecular marker recapture ratio very close to those of traditional methods (Wang *et al*, 2014).

To improve the accuracy of molecular marker recapture assessment in Chinese shrimp, one strategy could be the release of all stock throughout full-family development. In that case, all released shrimp could be traced using SSR genotyping information under the condition that all parents were known. However, it was only theoretical, since large scale artificial fertilization is labor-extensive and easily fails. Additionally, mated female over-wintering cultures and specific family culture

installations are only available at small plants. Since hatcheries release spawner shrimp every spring and the spawners that finished producing could be collected, the alternative is parentage identification with only maternal parents known. In the present study, the number of shrimp spawners used in the seedling development was close to 2000. The original plan was to sample all of these spawners after they finished spawning. However, for uncontrolled reasons, only 844 spawners were sampled for subsequent SSR genotyping, and only 337 individuals were identified as the previously released individuals from the 844 recaptured samples, with the remaining 505 individuals originating from both the wild population and the released stock. The genetic variation between the released stock and the wild population could not be further assessed in this study. This problem has been assessed in the Chinese shrimp hatchery enhancement field for the last thirty years.

Before they initiate their over-wintering migration in the late autumn, all shrimp, including the wild population and the released stock concentrate and forage in a relatively fixed area. When all spawner shrimp used in the hatchery enhancement are sampled in an area (for example, Bohai Bay), then there is no difficulty in discriminating the wild population from the released stock in the recaptured samples. Additionally, It could also be clarified whether the released stock "dilute" the genetic diversity of the wild population (Kitada *et al*, 2009). Further, the number and proportion of the released stock in the following year's spawner population could be accurately identified by investigation over consecutive years, which is also critical to evaluate the effect of the hatchery enhancement and has not yet been assessed. Chinese shrimp exhibit migration behavior over their entire life period, and their migration route spans northern latitudes from 33° (over-wintering) to 41° (spawning) (Deng *et al*, 1990). Deng *et al* (1990) investigated the distribution of the migration routes of the species, including spawning migration, foraging migration and over-wintering migration using physical tagging release assessment. Due to the limited number of physically tagged shrimp, however, the different geographic distribution of the population still needs to be evaluated. Using the parentage identification strategy in this study, this puzzle may be clarified in the future.

References

- Bravington MV, Ward RD. Microsatellite DNA markers: Evaluating their potential for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in a stock enhancement programme. *Molecular Ecology*, 2004, 13(5): 1287–1297
- Deng JY, Ye CC, Liu YC. Penaeid shrimp—Its biology and management in the Yellow-Bohai Seas. Beijing: Ocean Press,

- 1990, 256–258 [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 1990, 256–258]
- Deng JY, Zhuang ZM. The cause of recruitment variation of *Penaeus chinensis* in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 7(4): 125–128 [邓景耀, 庄志猛. 渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 125–128]
- Deng JY. The research status of shrimp fishery biology. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 1998, 10(4): 191–194, 1997 [邓景耀. 对虾渔业生物学研究现状. *生命科学*, 1998, 10(4): 191–194, 1997]
- Dong SR, Luan S, Kong J. Screening of microsatellite DNA markers associated with growth traits in a single *Fenneropenaeus chinensis* family. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(5): 936–943 [董世瑞, 栾生, 孔杰. 中国明对虾单个家系中与生长性状相关微卫星标记的初步筛选. *中国水产科学*, 2014, 21(5): 936–943]
- Gao H, Yan BL, Lai XF, *et al.* Progress on the identification technology used in stock enhancement for crustacean organisms. *Transactions of Oceanology and Limnology*. 2014(1): 94–100 [高焕, 阎斌伦, 赖晓芳, 等. 甲壳类生物增殖放流标志技术研究进展. *海洋湖沼通报*, 2014(1): 94–100]
- Kitada S, Shishidou H, Sugaya T, *et al.* Genetic effects of long-term stock enhancement programs. *Aquaculture*, 2009, 290(1–2): 69–79
- Klima EF. Evaluation of biological stains, inks, and fluorescent pigments as marks for shrimp. Washington: U.S. Department of the Interior, Bureau of Commercial Fisheries, 1965
- Li WY, Wang WJ, Kong J, *et al.* Establishment of the microsatellite quadruple PCR technology for *Fenneropenaeus chinensis* and its application in the evaluation on the effect of releasing simulation. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(5): 213–220 [李伟亚, 王伟继, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星四重 PCR 技术的建立及其在模拟放流效果评估方面的应用. *海洋学报*, 2012, 34(5): 213–220]
- Li ZY, Wang J, Zhao ZL, *et al.* Resources enhancement of *Fenneropenaeus orientalis* in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 1–7 [李忠义, 王俊, 赵振良, 等. 渤海中国对虾资源增殖调查. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 1–7]
- Luo K, Zhang TS, Kong J, *et al.* Study on techniques of internal tagging by visible implant fluorescent elastomer in *Fenneropenaeus chinensis*. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(3): 48–52 [罗坤, 张天时, 孔杰, 等. 中国对虾幼虾荧光体内标记技术研究. *海洋水产研究*, 2008, 29(3): 48–52]
- Wang QY, Zhuang ZM, Deng JY, *et al.* Stock enhancement and translocation of the shrimp *Penaeus chinensis* in China. *Fisheries Research*, 2006, 80(1): 67–69
- Wang WJ, Zhang K, Luo K, *et al.* Assessment of recapture rates after hatchery release of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Jiaozhou Bay and Bohai Bay in 2012 using pedigree tracing based on SSR markers. *Fisheries Science*, 2014, 80(4): 749–755
- Wang WJ. I Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping. II Genetic linkage mapping using AFLP markers and primarily study on sex-determination of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 [王伟继. I 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状的 QTL 定位分析 II 蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建及性别决定机制初探. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008]
- Zhang K, Wang WJ, Kong J, *et al.* Accuracy of short sequence repeats on single-parent parentage identification in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquatic Biology*, 2014, 20(1): 45–51

(编辑 马瑰艳)

DOI:10.11758/yykxjz.20161123001

http://www.yykxjz.cn/

涂梁莉, 刘卫霞, 隋吉星, 曲方圆, 赵凡淇, 钟海霞, 张蒙生, 于子山. 山东南部沿海夏季大型底栖动物群落结构特征. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 27-36

Tu LL, Liu WX, Sui JX, Qu FY, Zhao FQ, Zhong HX, Zhang MS, Yu ZS. The community structure of macrobenthos in the southern coastal waters nearby the Shandong Peninsula in summer. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 27-36

山东南部沿海夏季大型底栖动物群落结构特征*

涂梁莉¹ 刘卫霞¹ 隋吉星² 曲方圆³
赵凡淇¹ 钟海霞¹ 张蒙生¹ 于子山^{1①}



(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003;

2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 3. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

摘要 2006年8月在山东南部沿岸海域32个站位进行了大型底栖动物研究,共发现大型底栖动物182种,其中,多毛类92种,甲壳类42种,软体动物29种,棘皮动物9种,其他类群10种。研究海域大型底栖动物总平均丰度为2001 ind./m²,总平均生物量为15.92 g/m²。根据IRI指数,优势种前4种分别是寡鳃齿吻沙蚕(*Nephtys oligobranchia*)、中蚓虫(*Mediomastus* sp.)、独指虫(*Aricidea fragilis*)和巴氏钩毛虫(*Sigambra bassi*)。Shannon-Wiener多样性指数(H')为2.20~4.59,平均值为3.92; Margalef丰富度指数(d)为0.99~5.39,平均值为3.98; Pielou均匀度指数(J)为0.61~0.89,平均值为0.80。根据CLUSTER分析结果,在36%的相似性水平上可将研究站位划分为2个群落。多样性分析表明,研究海域底栖生态环境总体为清洁。Pearson相关性分析显示,大型底栖动物丰度和水深呈显著负相关($r=-0.38, P<0.05$)。BIOENV分析表明,与群落结构关系最密切的环境因子组合是粉砂+水深+有机碳($r=0.46$)。

关键词 山东南部沿海; 大型底栖动物; 群落结构; 多样性; BIOENV

中图分类号 S932 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)01-0027-10

大型底栖动物是海洋生态系统的重要组成部分,它们通过摄食、掘穴和建管等扰动活动直接或间接地影响着海洋生态系统(田胜艳等,2009)。大型底栖动物迁移能力弱、区域性强,对于环境污染及变化通常少有回避能力,可以较好地反映环境质量状况,在海洋生物监测中具有重要意义(罗先香等,2009; Callier *et al*, 2008; Coyle *et al*, 2007)。

山东半岛南部濒临南黄海,海岸线曲折蜿蜒,沿岸多港口、海湾。近年来,有关山东半岛南部海域大型底栖动物已有报道,研究内容涉及种类组成、丰度生物量分布、物种多样性、群落结构和次级生产力等,但这些研究仅限于几个重要的海湾(季相星,2012; 于海燕等,2006; 赵宁等,2013)及邻近海区(齐磊磊等,2013; 王全超等,2013; 王宗兴等,2010)。目前,尚没

* 国家自然科学基金(41576153)、中国海砂质潮间带猛水蚤的多样性研究:格局及形成机制和国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室开放基金项目(MEB201507)和富钴结壳勘探区深海猛水蚤的分类学和生态学研究课题共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41576153), Harpacticoid Copepod Diversity on Intertidal Sandy Beaches in China Sea: Patterns and Formation Mechanisms and Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry (MEB201507), and Taxonomy and Ecology of Deep Sea Harpacticoids From Cobalt-Rich Crusts Area].

涂梁莉, E-mail: m13335059509@163.com

① 通讯作者: 于子山, 副教授, E-mail: yu_zishan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-11-23, 收修改稿日期: 2017-01-16

有对整个山东南部沿岸海域大型底栖动物的研究报道。本文对 2006 年 8 月在山东半岛南部沿海采集的大型底栖动物样品进行了种类组成、丰度生物量分布、群落结构和多样性等进行研究, 以期为该海域生态系统的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 站位设置

在山东南部沿岸海域设置了 12 个断面, 共 32 个站位。研究海域北起乳山湾南侧海域, 南至日照港, 站位见图 1。

1.2 样品的采集、处理与分析

2006 年 8 月 14~22 日, 乘坐鲁即渔水 0669 船进

行大型底栖动物样品的采集。使用 0.05 m² 抓斗式采泥器采泥, 每站 3~4 次, 采用 0.5 mm 孔径的网筛分选沉积物样品, 分选后所得样品用 10% 的福尔马林溶液保存固定。样品的处理、保存、计数和称量等均按照中华人民共和国质量监督检验检疫总局(2007)《海洋调查规范》方法进行。

1.3 环境因子测定

每站取适量沉积物样品, 分别用于沉积物粒度和有机碳的测定。沉积物粒度采用 Cilas 940L 型激光粒度仪。依据矩值法计算粒度参数(McManus, 1988), 通过 Folk 法分析沉积物类型(王中波等, 2007)。有机碳测定则按照中华人民共和国质量监督检验检疫总局(2007)《海洋调查规范》中重铬酸钾-硫酸氧化法及刘昌岭等(2007)的改进方法进行。

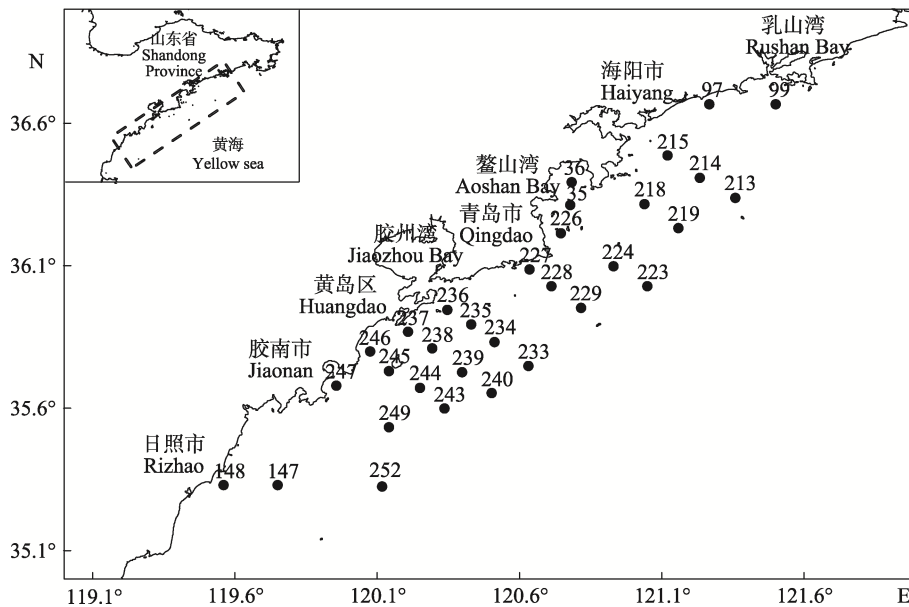


图 1 研究海域站位

Fig.1 The map of sampling stations in the investigated waters

1.4 数据处理

1.4.1 优势种确定 采用相对重要性指数 IRI(Index of Relative Importance)进行优势种的确定。计算公式如下:

$$IRI = (W + N) \times F$$

式中, W 为每种的生物量占总生物量的百分比, N 为每种的丰度占总丰度的百分比, F 为该种出现的频率。

1.4.2 多样性指数计算 本研究采用了 Margalef 丰富度指数(d)、Shannon-Wiener 多样性指数(H')以及 Pielou's 均匀度指数(J)进行多样性分析, 公式如下:

$$H' = - \sum (n_i/N) \times \log_2(n_i/N)$$

$$J = H' / \log_2 S$$

$$d = (S - 1) / \log_2 N$$

式中, S 为样品的总种数, N 为样品的总个体数, n_i 为第 i 种的个体数。

1.4.3 群落结构分析 利用 PRIMER 5.0 软件对大型底栖动物进行 CLUSTER 分析和 MDS 分析。应用 ANOSIM 检验各群落之间是否有显著差异, SIMPER 分析并了解表征群落的特征种及造成群落差异的物种。通过 PCA 分析环境因子主成分, 再使用 BIOENV 分析出与群落相关性最密切的环境因子组合, 并对其进行 RELATE 检验。使用 SPSS 17.0 软件进行 Pearson

相关性分析。

2 结果与分析

2.1 大型底栖动物种类组成

本研究共采集到大型底栖动物 182 种。其中, 多毛类 92 种, 占总物种数的 51%; 甲壳类 42 种, 占总物种数的 23%; 软体动物 29 种, 占总物种数的 16%; 棘皮动物 9 种, 占总物种数的 5%; 其他类群 10 种, 分别是腔肠动物(5 种)、扁形动物(1 种)、纽形动物(1 种)、腕足动物(1 种)、头索动物(1 种)和鱼类(1 种), 占总物种数的 5%。

表 1 为 IRI 指数前 10 位的种。其中, 8 种多毛类, 1 种软体动物, 1 种甲壳类, 说明了多毛类在研究海域底栖动物群落中的重要性。

表 1 相对重要性指数排名前 10 位的种
Tab.1 The top 10 IRI species

种类 Species	相对重要性指数 IRI
寡鳃齿吻沙蚕 <i>Nephtys oligobranchia</i>	1043
中蚓虫 <i>Mediomastus</i> sp.	532
独指虫 <i>Aricidea fragilis</i>	519
巴氏钩毛虫 <i>Sigambra bassi</i>	462
微型小海螂 <i>Leptomya minuta</i>	336
拟特须虫 <i>Paralacydonia paradoxa</i>	287
不倒翁虫 <i>Sternaspis scutata</i>	279
太平洋方甲涟虫 <i>Eudorella pacifica</i>	264
柔弱索沙蚕 <i>Lumbrineris debilis</i>	197
稚齿虫 <i>Prionospio</i> sp.	191

2.2 大型底栖动物丰度与生物量组成及空间分布

研究海域大型底栖动物的总平均丰度为 2001 ind./m², 多毛类占绝对优势, 平均丰度为 1332 ind./m², 占总

平均丰度的 66%; 甲壳类平均丰度为 358 ind./m², 占总平均丰度的 18%; 软体动物平均丰度为 264 ind./m², 占总平均丰度 13%; 棘皮动物平均丰度为 33 ind./m², 占总平均丰度的 2%; 其他类群平均丰度为 14 ind./m², 占总平均丰度的 1%。

研究海域大型底栖动物的总平均生物量为 15.92 g/m², 软体动物和多毛类比重最大, 分别为 5.28 和 4.91 g/m², 占总平均生物量的 33% 和 31%; 甲壳动物平均生物量为 1.41 g/m², 占总平均生物量的 9%; 棘皮动物平均生物量为 0.80 g/m², 占总平均生物量的 5%; 其他类群平均生物量为 3.52 g/m², 占总平均生物量的 20%。

从丰度的空间分布来看(图 2a), 最高值出现在乳山湾南侧外部海域的 99 站位, 其丰度达到 4040 ind./m², 出现了大量的稚齿虫、锥头似帚毛虫(*Lygdamis giardi*)、西方似蛭虫(*Amaeana occidentalis*)、秀丽波纹蛤(*Raetellops pulchella*)、边鳃拟刺虫(*Linopherus paucibranchiata*)和脆壳理蛤(*Theora fragilis*)等, 以上物种构成该站总丰度的 75%, 其中, 稚齿虫占绝对优势, 其丰度高达 980 ind./m²; 次高值出现在靠近胶州湾湾口的 235 号站, 其丰度为 3400 ind./m², 微型小海螂以 1600 ind./m² 的丰度占绝对优势。最低值出现在靠近胶南南部外部海域的 252 站位, 其丰度仅为 647 ind./m²; 次低值出现在日照近岸海域 148 站位, 其丰度为 790 ind./m²。丰度高值区主要集中在鳌山湾、北部沿岸海域以及胶南附近海域。低值区主要集中在研究海域南部的南部外部海域及日照沿岸海域。

从大型底栖动物生物量的空间分布看(图 2b), 最高值出现在海阳海域外部的 213 号站, 其生物量达到 50.93 g/m², 其主要原因是采集到了生物量较大的间褶拟蚶(*Arcopsis interplicata*), 其生物量高达 39.50 g/m²;

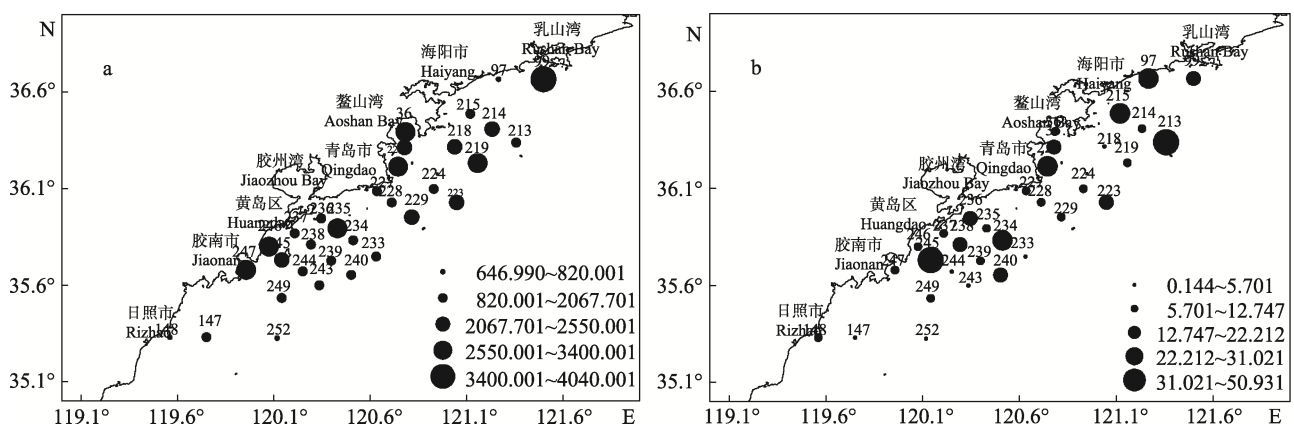


图 2 大型底栖动物丰度(ind./m²)(a)及生物量(g/m²)(b)分布

Fig.2 The distribution of abundance (ind./m²) (a) and biomass (g/m²) (b) of macrobenthos

次高值出现在胶南沿岸的 245 站,生物量为 50.67 g/m², 其主要的贡献种为经氏壳蛭蛄(*Philine kinglippini*)和异足索沙蚕(*Lumbrinereis heteropoda*); 最低值出现在青岛沿岸外部海域的 233 号站, 生物量仅为 0.14 g/m²; 次低值出现在日照沿岸海域的 147 号站, 其生物量为 2.46 g/m²。各海区均有生物量较高的站位, 生物量分布无明显规律。

2.3 大型底栖动物多样性指数分析

从表 2 可以看出, 大型底栖动物 d 最高值出现在青岛沿岸外部海域的 229 号站(5.39), 最低值在日照近岸海域的 147 号站(0.99); J 最高值出现在黄岛沿岸外部海域的 243 号站(0.89), 最低值出现在胶南近岸海域的 247 号站(0.61); H' 分布范围为 2.20~4.59, 平均值为 3.92, 分布在 4.00~5.00 之间的有 17 个站,

表 2 大型底栖动物丰度、生物量、多样性指数和沉积物类型

Tab.2 The abundance, biomass, diversity indexes and sediment types of macrobenthos in the investigated waters

站位 Stations	丰度 Abundance(ind./m ²)	生物量 Biomass(g/m ²)	物种数 S	丰富度 指数 d	均匀度 指数 J	Shannon-Wiener 多样性指数 $H'(\log_2)$	沉积物类型 Sedimental type
35	2550	16.92	38	4.72	0.87	4.59	粉砂 Silt
36	3300	12.42	40	4.81	0.77	4.12	粉砂 Silt
97	820	30.70	21	2.98	0.77	3.37	粉砂 Silt
99	4040	19.74	26	3.01	0.77	3.64	*
147	1180	2.46	8	0.99	0.73	2.20	砂 Sand
148	790	10.67	36	5.25	0.88	4.53	砂 Sand
213	1190	50.93	28	3.81	0.87	4.16	粉砂 Silt
214	2430	11.71	34	4.23	0.80	4.05	粉砂 Silt
215	2068	26.25	40	5.11	0.81	4.31	*
218	2410	3.62	28	3.47	0.80	3.83	粉砂 Silt
219	3310	8.01	36	4.32	0.82	4.23	粉砂 Silt
223	2310	22.21	31	3.87	0.75	3.71	*
224	1127	10.03	29	3.98	0.82	4.01	*
226	2960	31.02	31	3.75	0.87	4.33	粉砂 Silt
227	1890	9.57	31	3.98	0.81	4.00	砂 Sand
228	2061	12.75	39	4.98	0.81	4.27	砂 Sand
229	2430	12.65	43	5.39	0.85	4.59	砂 Sand
233	1570	0.14	22	2.85	0.86	3.85	砂质粉砂 Sandy silt
234	1040	27.73	24	3.31	0.84	3.84	砂 Sand
235	3400	11.23	28	3.32	0.62	3.00	砂质粉砂 Sandy silt
236	2020	20.57	28	3.55	0.75	3.58	砂 Sand
237	1145	8.43	33	4.54	0.75	3.78	砂质粉砂 Sandy silt
238	1310	16.15	27	3.62	0.85	4.05	砂质粉砂 Sandy silt
239	1530	10.35	28	3.68	0.83	4.01	砂质粉砂 Sandy silt
240	1100	21.50	24	3.28	0.85	3.88	砂质粉砂 Sandy silt
243	1540	5.70	27	3.54	0.89	4.21	砂质粉砂 Sandy silt
244	1450	9.90	39	5.22	0.69	3.66	砂质粉砂 Sandy silt
245	2490	50.67	39	4.86	0.80	4.24	砂 Sand
246	2835	11.18	39	4.78	0.61	3.21	砂 Sand
247	3060	11.41	41	4.98	0.82	4.41	砂质粉砂 Sandy silt
249	2040	9.96	28	3.54	0.81	3.89	砂 Sand
252	647	2.99	25	3.71	0.83	3.86	砂 Sand
平均 Average	2001	15.92	31	3.98	0.80	3.92	

*为未采集到沉积物 *indicated the sediment was not collected

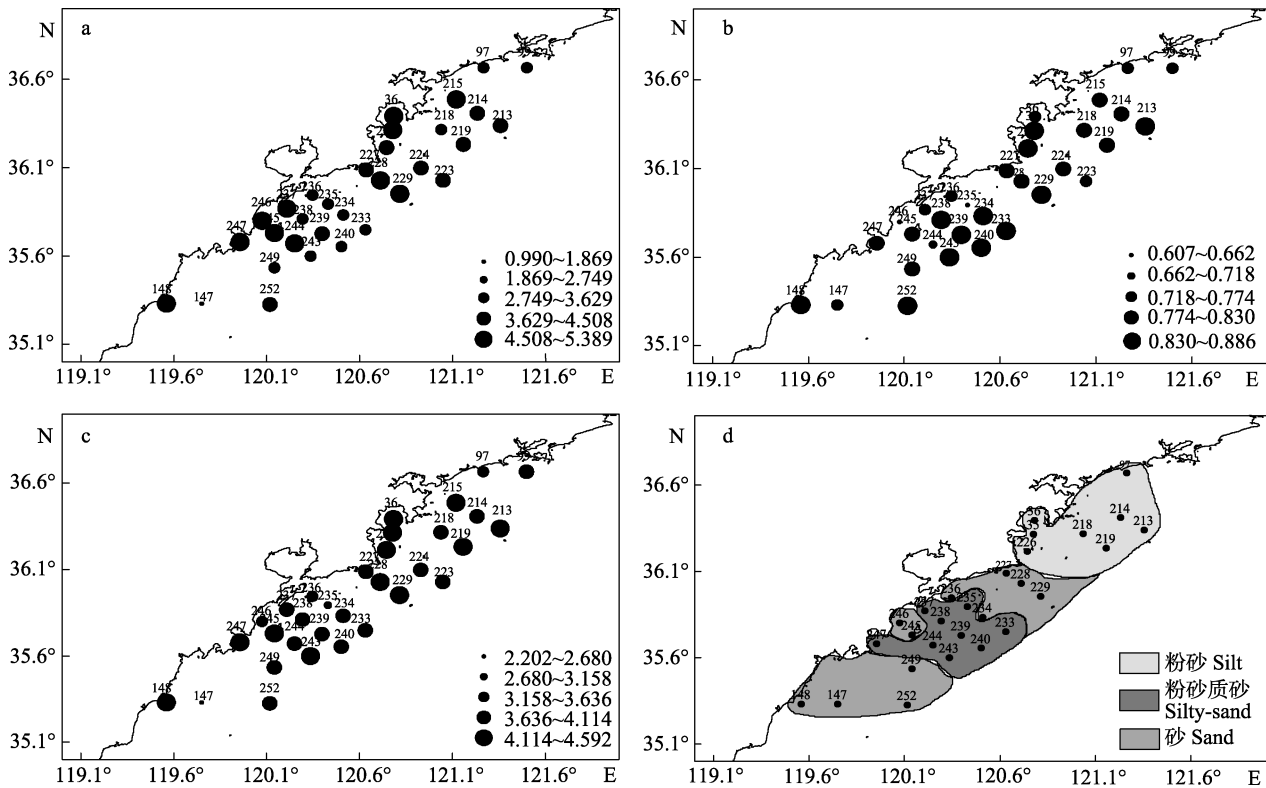


图 3 大型底栖动物多样性指数及沉积物类型分布

Fig.3 The spatial distribution of diversity index of macrobenthos and sedimental types

a: 丰富度指数; b: 均匀度指数; c: 多样性指数; d: 沉积物类型
a: d ; b: J ; c: H' ; d: Sedimental types

分布在 3.00~4.00 之间的有 14 个站; 最高值位于 229 号站(4.59), 最低值分布在 147 号站(2.20)。

研究海域多样性指数及沉积物类型的空间分布见图3。从图3可以看出, d 的高值区主要位于青岛-鳌山湾-海阳沿岸海域以及胶南附近海域, 低值区主要位于南部黄岛-胶南沿岸的外部海域。除鳌山湾内站位(35、36号站)及个别站位(223、226、236、244和148号站)外, J 总体呈现出由近岸海域向远岸海域逐渐增加的趋势。整个研究海域的 H' 总体较高, 北部海域大于南部海域。研究海域北部沉积物类型多为粉砂, 南部多为粉砂质砂, 除个别站位(227、228、229、234和236号站)外, 由北至南呈现沉积物粒径增大的趋势, 这与张晓波(2014)对山东半岛南部近岸海域沉积物研究的结果一致。

H' 指数通常被认为是一种评价水域有机质污染的有效工具, 对其进行分级以评价海域的污染情况。按照蔡立哲等(2002)对 H' 的污染评价方法进行分类, 本研究中仅有位于日照近岸海域的 147 号站为轻度污染, 其他站位均为清洁。20 世纪 90 年代以来, 日照市对其沿海地区加大了开发利用, 如扩建码头、围海

造地、建造发电厂及其垃圾掩埋地等, 使得日照近海环境发生了巨大的改变(齐磊磊等, 2013)。从总体上看, 海域的底栖生态环境为清洁。

2.4 大型底栖动物群落结构

依据大型底栖动物的丰度, 对研究海域站位进行聚类分析结果见图4。从图4可以看出, 在 36% 的相似度水平上, 可将大型底栖动物分为 2 个群落(147 站作为单独站位不适宜划分为一个群落)。ANOSIM 分析显示, 2 个群落之间差异极显著($r=0.39$, $P<0.01$)。各群落空间分布及基本参数见图5和表3。

群落 I: 由 35、36、97、99、214、215、218、219、223 和 226 站共 10 个站位组成。群落 I 分布于鳌山湾-海阳-乳山湾沿岸海域, 沉积物类型均为粉砂质, 平均水深最浅, 但平均有机碳含量(0.44%)和平均 H' (4.02)均为最高。群落 I 共出现 100 种大型底栖动物, 其平均丰度为 2620 ind./m², 平均生物量为 18.26 g/m²。SIMPER 分析表明, 群落 I 各站位平均相似性为 38.28%, 特征种为中蛭虫、寡鳃齿吻沙蚕、稚齿虫、脆壳理蛤和不倒翁虫等。

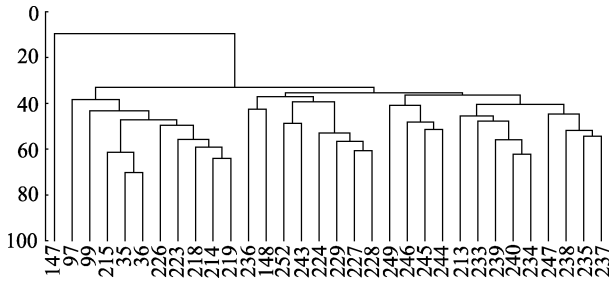


图 4 大型底栖动物丰度聚类结果

Fig.4 Results of cluster analysis on macrobenthic abundance in the investigated waters

群落 II：包括余下除 147 站外的 21 个站位。群落 II 主要分布于日照-胶南-黄岛-青岛沿岸海域，沉积环境多为粉砂质砂，其中，213 号站在地理分布上比较特殊，分布在海阳沿岸外部海域，被群落 II 站位包围，其分布原因有待进一步研究。该群落共出现 150 种大型底栖动物，平均丰度、平均生物量和平均多样性指数分别为 1746 ind./m²、15.45 g/m² 和 3.95，平均有机碳含量为 0.36%。SIMPER 分析表明，群落 II 站位间的平均相似性为 28.32%，寡鳃齿吻沙蚕、独

指虫、巴氏钩毛虫、拟特须虫和中蚓虫为该群落的特征种。

位于日照沿岸的 147 号站，只采集到 4 种多毛类和 4 种软体动物。大型底栖动物的丰度为 1140 ind./m²，生物量为 2.46 g/m²。紫壳阿文蛤(*Alvegnis ojanus*)丰度达到 540 ind./m²，占绝对优势；其次是日本长尾虫(*Apeades nipponicus*)和拟特须虫，丰度分别为 220 和 200 ind./m²。该站的沉积物类型为砂质，沉积物中砾石含量为 15.87%，有机质含量最低，只有 0.11%，可推测出该站的环境较为贫瘠，不适宜生物生存。

SIMPER 分析表明，I、II 两个群落的非相似性为 77.21%，造成群落差异的主要物种为中蚓虫、寡鳃齿吻沙蚕、稚齿虫、脆壳理蛤、巴氏钩毛虫、不倒翁虫、微型小海螂、秀丽波纹蛤、独指虫、轮双眼钩虾(*Ampelisca cyclops*)和拟特须虫，这些种的累积贡献率为 50.72%。

2.5 丰度生物量与环境因子相关性分析

利用 SPSS 软件对大型底栖动物各站位的丰度、

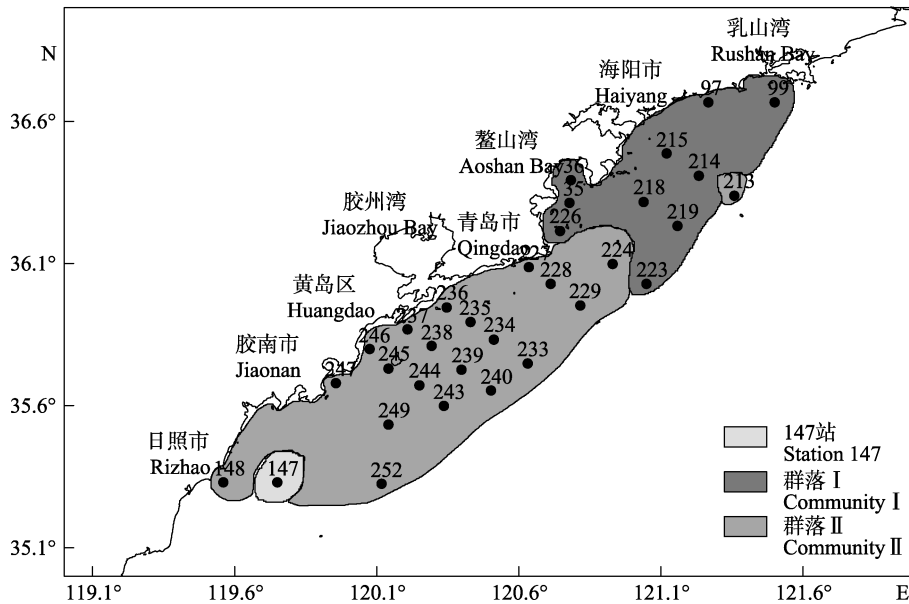


图 5 大型底栖动物群落分布

Fig.5 The distribution of macrobenthic communities in the investigated waters

表 3 大型底栖动物各群落基本参数

Tab.3 The environmental and biotic parameters of each macrobenthic community

项目 Items	平均中值 粒径 Average Mdφ	平均水深 Average water depth (m)	平均有机碳 Average organic carbon (%)	种数 S	平均 H' Average H'	平均丰度 Average abundance (ind./m ²)	平均生物量 Average biomass (g/m ²)
群落 I Community I	6.50	20.57	0.44	100	4.02	2620	18.26
群落 II Community II	3.78	27.80	0.36	150	3.95	1746	15.45
147 号站 Station 147	2.00	26.00	0.11	8	2.20	1140	2.46

生物量与各环境因子进行 Pearson 相关性分析。结果显示,丰度与水深呈显著负相关($r = -0.38, P < 0.05$) (表 4)。对照研究海域的等深线图(图 6)和大型底栖动物丰度分布图(图 3a), 在胶南附近和鳌山湾以北部分的丰度高值区水体深度浅,而在南部外部海域的丰度低值区水深达到最深,即深度越深,底栖动物的丰度越小。周然等(2014)的研究也指出,水深是影响底栖生物分布的重要因子。Mutlu 等(2010)研究则指出,水深通常是影响多毛类分布的主要环境因子。对水深和优势种进行 Pearson 相关性分析,显示独指虫和稚齿虫的丰度与水深呈显著相关($r = 0.366, r = -0.368$)。

2.6 环境因子 PCA 分析

主成分分析计算结果见表 5。从表 5 可以看出,

第 1 主成分的贡献率为 66.30%, 负载主要集中在中值粒径、粉砂、黏土和砾石上,说明第 1 主成分代表的是沉积物粒径的不同。第 2 主成分贡献率为 14.80%, 主要相关的环境因子是水深。2 个主成分的累积贡献率为 81.10%, 即前 2 个主成分能相当好地反映出各站位真实的环境差异(Clarke *et al*, 2001)。基于环境的差异将所有站位划分成 3 组,结果见图 7a, 对比 MDS 的结果见图 7b。从图 7 可以看出,PCA 和 MDS 不是很匹配,说明所测的环境因子不能对观察到的群落结构给予很好的解释(周红等, 2003)。PCA 和 MDS 的不匹配可能是因为缺乏关键环境因子(Clarke *et al*, 2001), 例如水温等,水温是影响大型底栖动物群落结构的主要环境因子(周然等, 2014)。

表 4 大型底栖动物丰度、生物量与环境因子相关系数
Tab.4 Pearson correlation between the macrobenthic abundance, biomass and environmental factors

变量 Variable	中值粒径 Md ϕ	砾石含量 Gravel content	砂含量 Sand content	粉砂含量 Silt content	黏土含量 Clay content	水深 Depth(m)	有机碳 Organic carbon
丰度 Abundance	0.17	-0.15	-0.16	0.220	0.12	-0.38*	-0.23
生物量 Biomass	0.09	-0.17	0.09	0.002	0.06	-0.02	0.13

*为 0.05 水平上显著相关 *indicated significant correlation at 0.05 level

表 5 环境因子 PCA 结果
Tab.5 The results of principal component analysis of environmental factors

变量 Variable	中值 粒径 Md ϕ	砾石含量 Gravel content	砂含量 Sand content	粉砂含量 Silt content	黏土含量 Clay content	水深 Depth (m)	有机碳 Organic carbon	贡献率 Contribution (%)
第 1 主成分 PC1	0.45	-0.430	-0.37	0.45	0.46	-0.01	0.25	66.30
第 2 主成分 PC2	0.02	0.022	0.11	-0.07	0.02	0.95	0.29	14.80

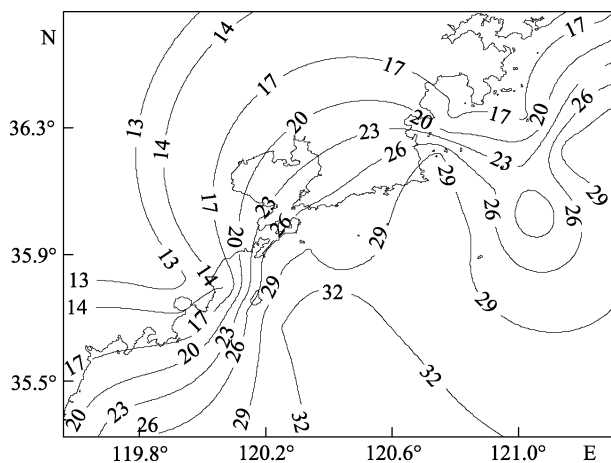


图 6 研究海域等深线

Fig.6 The depth contour map of the investigated waters

用 BIOENV 分析丰度矩阵与环境因子矩阵的相关性,得出与群落结构相关性最密切的环境因子组合为粉砂+水深+有机碳(0.46),该组合是对观察到的群

落结构最好的解释。Relate 检验得出丰度相似性矩阵和最佳环境因子相似性矩阵之间呈极显著相关($r = 0.39, P < 0.01$)。

3 讨论

将本研究结果与其他相近的研究结果对比见表 6。从表 6 可以看出,在优势种方面,本研究及山东沿岸各海域的研究均是多毛类占优势,再次说明了多毛类在山东沿岸大型底栖动物群落中的重要性。与本研究优势种(表 1)相比较,不倒翁虫也是乳山湾及邻近海域、日照近海、烟台近海及南黄海研究中的优势种,寡鳃齿吻沙蚕作为优势种,同样出现在乳山湾及邻近海域、日照近海和青岛近海,巴氏钩毛虫、拟特须虫同样是日照近海、青岛近海的优势种。这 4 种多毛类多为个体小,生活周期较短的广温种(刘瑞玉等, 1986; 杨德渐等, 1988)。

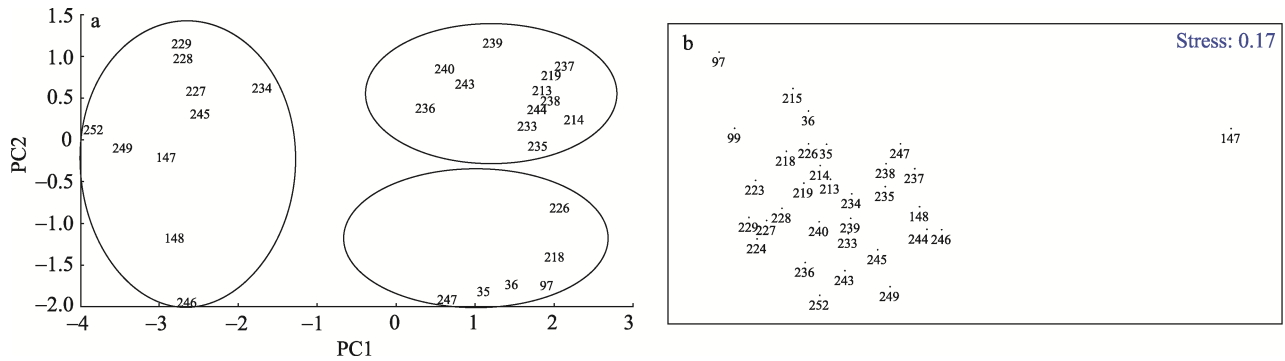


图 7 PCA 排序图(a)及 MDS 排序图(b)

Fig.7 PCA ordination (a) and MDS ordination (b)

本研究中的大型底栖动物丰度在所有的研究海域中为最高,原因可能是沉积物底质的不同。沉积物是影响大型底栖分布的重要因素(刘瑞玉等,1986; Commito *et al.*, 2006)。另一个原因可能是水温、水深和盐度等水文条件的不同。陆强等(2013)研究显示,水温是影响春、夏季大型底栖动物分布的主要环境因子。张敬怀(2014)研究发现,夏季大型底栖动物丰度与盐度呈显著正相关,浅水区相对于深海具有更高丰度、生物量和次级生产力。此外,网筛孔径、取样站位数和采泥器类型等人为因素的不同也是可

能的原因。李新正等(2005)的研究指出,使用 0.5 mm 网筛所得到底栖样品的丰度是 1.0 mm 网筛的 1.36 倍。

在生物量上,乳山湾及邻近海域研究中的生物量最高,为 229.22 g/m²,原因是在靠近养殖区的站位采到了生物量占绝对优势的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)。本研究中的生物量在所有研究海域中最低,为 15.92 g/m²,其原因可能与山东近岸海域陆源排污、人为捕捞以及过度开发利用等引起的生态环境变化有关。

表 6 本研究结果与有关研究的对比

Tab.6 Comparison between this study and other related studies

研究海域 Survey area	研究时间 Survey date	采泥器类型 Sampler types	网筛孔径 Mesh size (mm)	站位数 Total stations	种数 Total species	总平均丰度 Abundance (ind./m ²)	总平均生物 Biomass (g/m ²)	参考 文献 Reference
乳山湾及邻近海域 Rushan Bay and its adjacent waters	2007-08	0.1 m ² 抓斗式	0.5	19	87	201.00	229.22	王晓晨 (2009)
烟台近海 Coastal water of Yantai	2010-08	0.05 m ² 抓斗式	0.5	30	84	1128.00	25.09	王全超等 (2013)
青岛近海 Coastal waters of Qingdao	2007-10	0.25 m ² 抓斗式	0.5	15	160	431.73	22.30	王宗兴等 (2010)
日照近海 Coastal waters of Rizhao	2007-10	0.05 m ² 抓斗式	0.5	7	-	1096.86	26.18	齐磊磊等 (2013)
南黄海 South Yellow Sea	2006-07-08	0.1 m ² 箱式	0.5	137	192	102.00	29.30	徐琴增等 (2009)
Gamak 湾 Gamak Bay	2009-07	0.1 m ² 抓斗式	1.0	20	123	592.00	132.2	Seo 等(2012)
Deukryang 湾 Deukryang Bay	2012-08	0.1 m ² 抓斗式	1.0	44	145	998.00	224.5	Seo 等(2014)
山东近岸 Coastal waters of Shandong	2006-08	0.05 m ² 抓斗式	0.5	32	182	2001.34	15.92	本研究

参 考 文 献

- Cai LZ, Ma L, Gao Y, *et al.* Analysis on assessing criterion for polluted situation using species diversity index of marine macrofauna. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2002, 41(5): 641–646 [蔡立哲, 马丽, 高阳, 等. 海洋底栖动物多样性指数污染程度评价标准的分析. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2002, 41(5): 641–646]
- Callier MD, Mckindsey CW, Desrosiers C. Evaluation of indicators used to detect mussel farm influence on the benthos: Two case studies in the Magdalen Islands, Eastern Canada. *Aquaculture*, 2008, 278(1–4): 77–88
- Clarke KR, Warwick RM. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. *PRIMER-E: Plymouth*, 2001: 25–50
- Commito JA, Dow WE, Grupe BM. Hierarchical spatial structure in soft-bottom mussel beds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 330(1): 27–37
- Coyle KO, Konar B, Blanchard A, *et al.* Potential effects of temperature on the benthic infaunal community on the southeastern Bering Sea shelf: Possible impacts of climate change. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2007, 54(23–26): 2885–2905
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Specifications for Oceanographic Survey, Part 6: Marine Biological Survey (GB/T12763.6-2007). Beijing: China Standards Press, 2007 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范—海洋生物调查(GB/T 12763.6-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007]
- Ji XX. The ecological study of macrofauna in Qingdao Bay Intertidal zone. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012, 1–71 [季相星. 青岛湾潮间带大型底栖动物生态学. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–71]
- Li XZ, Wang HF, Wang JB, *et al.* Comparison of sampling results of macrobenthos using different apertures of sampling sieve in Jiaozhou Bay. *Marine Sciences*, 2005, 29(12): 68–74 [李新正, 王洪法, 王金宝, 等. 不同孔径底层筛对胶州湾大型底栖动物取样结果的影响. *海洋科学*, 2005, 29(12): 68–74]
- Liu CL, Zhu ZG, He XL, *et al.* Rapid determination of organic carbon in marine sediment samples by potassium dichromate oxidation-ferrous sulphate titrimetry. *Rock and Mineral Analysis*, 2007, 26(3): 205–208 [刘昌岭, 朱志刚, 贺行良, 等. 重铬酸钾氧化-硫酸亚铁滴定法快速测定海洋沉积物中有机碳. *岩矿测试*, 2007, 26(3): 205–208]
- Liu RY, Cui YH, Xu FS, *et al.* Ecological characteristics of macrobenthos of the Yellow Sea and the East China Sea. *Studia Marina Sinica*, 1986(27): 154–173 [刘瑞玉, 崔玉珩, 徐凤山. 黄海、东海底栖生物的生态特点. *海洋科学集刊*, 1986(27): 154–173]
- Luo Q, Chen HL, Shao XY, *et al.* Ecological characteristics of macrobenthic communities and its relationships with environmental factors in Hangzhou Xixi Wetland. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(9): 2803–2815 [陆强, 陈慧丽, 邵晓阳, 等. 杭州西溪湿地大型底栖动物群落特征及与环境因子的关系. *生态学报*, 2013, 33(9): 2803–2815]
- Luo XX, Yang JQ. Progress in researches on benthic indices of assessing marine ecosystem health. *Marine Science Bulletin*, 2009, 28(3): 106–112 [罗先香, 杨建强. 海洋生态系统健康评价的底栖生物指数法研究进展. *海洋通报*, 2009, 28(3): 106–112]
- McManus J. Grain size determination and interpretation. *Technique in Sedimentology*, 1988, 63–85
- Mutlu E, Cinar ME, Ergev MB. Distribution of soft-bottom polychaetes of the Levantine coast of Turkey, eastern Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, 2010, 79(1): 23–25
- Qi LL, Wang QX, Guan SG, *et al.* Community structure of macrobenthos in coastal waters of Rizhao. *Marine Fisheries Research*, 2013, 34(1): 97–102 [齐磊磊, 王其翔, 官曙光, 等. 日照近海大型底栖动物群落结构. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 97–102]
- Seo JY, Lim HS, Choi JW. Distribution patterns of macrobenthic fauna communities in Deukryang Bay, one of the environment conservation areas of Korea. *Ocean Science Journal*, 2014, 49(2): 97–113
- Seo JY, Park SH, Lee JH, *et al.* Structural changes in macrozoobenthic communities due to summer hypoxia in Gamak Bay, Korea. *Ocean Science Journal*, 2012, 47(1): 27–40
- Tian SY, Zhang WL, Zhang R. Role of macrobenthos in marine ecosystem. *Journal of Salt and Chemical Industry*, 2009, 38(2): 50–54 [田胜艳, 张文亮, 张锐. 大型底栖动物在海洋生态系统中的作用. *盐业与化工*, 2009, 38(2): 50–54]
- Wang QC, Li BQ. Community structure of macrobenthos in coastal water off Yantai, east China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(6): 1667–1680 [王全超, 李宝泉. 烟台近海大型底栖动物群落特征. *海洋与湖沼*, 2013, 44(6): 1667–1680]
- Wang XC. Ecological of macrobenthic community in Rushan bay and its adjacent waters. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009, 29–30 [王晓晨. 乳山湾及邻近海域大型底栖动物群落的生态学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009, 29–30]
- Wang ZB, Yang SY, Zhang ZX. Comparison of two classifications of clastic sediments. *Marine Geology Letters*, 2007, 23(3): 36–40 [王中波, 杨守业, 张志珣. 两种碎屑沉积物分类方法的比较. *海洋地质动态*, 2007, 23(3): 36–40]
- Wang ZX, Fan SL, Xu QZ, *et al.* Characters of macrobenthic community in autumn in the coastal water of Qingdao. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010, 30(1): 59–64 [王宗兴, 范士亮, 徐勤增, 等. 青岛近海秋季大型底栖动物群落特征. *海洋湖沼通报*, 2010, 30(1): 59–64]
- Xu QZ, Li RX, Wang ZL, *et al.* Macrobenthos distribution of the south Yellow Sea in summer. *Advances in Marine Science*, 2009, 27(3): 393–399 [徐勤增, 李瑞香, 王宗灵, 等. 南黄海夏季大型底栖动物分布现状. *海洋科学进展*, 2009, 27(3): 393–399]
- Yang DJ, Sun RP. China offshore polychaetes. Beijing: China Agriculture Press, 1988 [杨德渐, 孙瑞平. 中国近海多毛类. 北京: 农业出版社, 1988]
- Yu HY, Li XZ, Li BQ, *et al.* The species diversity of macrobenthic fauna in Jiaozhou Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(2): 416–422 [于海燕, 李新正, 李宝泉, 等. 胶州湾大型底栖动物生物多样性现状. *生态学报*, 2006, 26(2): 416–422]
- Zhang JH. The variation of biodiversity of macrobenthic fauna with salinity and water depth near the Pearl Estuary of the

- northern South China Sea. *Biodiversity Science*, 2014, 22(3): 302–310 [张敬怀. 珠江口及邻近海域大型底栖动物多样性随盐度、水深的变化趋势. *生物多样性*, 2014, 22(3): 302–310]
- Zhang XB. Provenance analysis of surface sediments in the Holocene mud area of the southern coastal waters off Shandong Peninsula, China. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014, 31–32 [张晓波. 山东半岛南部近岸海域全新世泥质区沉积特征与物源. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 31–32]
- Zhao N, Ji XX, Wang ZZ, *et al.* Ecological characteristics of macrobenthos from Rushan Bay in spring and autumn. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2013(4): 80–88
- [赵宁, 季相星, 王振钟, 等. 乳山湾春秋大型底栖动物生态学特征. *海洋湖沼通报*, 2013(4): 80–88]
- Zhou H, Zhang ZN. Rationale of the multivariate statistical software PRIMER and its application in benthic community ecology. *Journal of Ocean University of Qingdao(Natural Science)*, 2003, 33(1): 58–64 [周红, 张志南. 大型多元统计软件 PRIMER 的方法原理及其在底栖群落生态学中的应用. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 2003, 33(1): 58–64]
- Zhou R, Qin XB, Peng ST, *et al.* Macroinvertebrate investigation and their relation to environmental factors in Bohai Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(1): 50–58 [周然, 覃雪波, 彭士涛, 等. 渤海湾大型底栖动物调查及与环境因子的相关性. *生态学报*, 2014, 34(1): 50–58]

(编辑 陈严)

The Community Structure of Macrobenthos in the Southern Coastal Waters Nearby the Shandong Peninsula in Summer

TU Liangli¹, LIU Weixia¹, SUI Jixing², QU Fangyuan³, ZHAO Fanqi¹,
ZHONG Haixia¹, ZHANG Mengsheng¹, YU Zishan¹①

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

3. The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061)

Abstract The community of macrobenthos was investigated at 32 stations in the southern coastal waters nearby the Shandong Province in August 2006. A total of 182 species were identified, including 92 species of Polychaeta, 29 species of Mollusca, 42 species of Crustacea, 9 species of Echinodermata, and 10 species of minor phyla. Nine of the top ten dominant species (*Nephtys oligobranchia*, *Mediomastus* sp., *Aricidea fragilis* and *Sigambra bassi*, *Leptomya minuta*, *Paralacydonia paradoxa*, *Sternaspis scutata*, *Eudorella pacifica*, *Lumbrinereis debilis*, *Prionospio* sp.) were polychaetes. The average abundance of the macrobenthos was 2001 ind./m², and the average biomass was 15.92 g/m² in the investigated area. The value of Shannon-Wiener index (H') of macrobenthos was 2.20~4.59 with an average of 3.92. The value of Margalef's richness index (d) was 0.99~5.39 with an average of 3.98. The value of Pielou's evenness index (J) was 0.61~0.89 with an average of 0.80. According to the results of CLUSTER analysis, the macrobenthos at the 32 stations could be clustered into two infaunal communities at 36% similarity, which were *Mediomastus* sp.–*N. oligobranchia*–*Prionospio* sp. Community (Community I), and *N. oligobranchia*–*A. fragilis*–*S. bassi* Community (Community II). The dissimilarity between Community I and Community II was 77.21%. Analysis on Shannon-Wiener index (H') showed that all stations were unpolluted except for the 147th station, which suggested that the macrobenthic environment in the investigated area was generally clean. Pearson correlation analysis showed that the abundance and the depth of the water were significantly and negatively correlated ($r=-0.38$, $P<0.05$). BIOENV analysis indicated that the most crucial combination of environmental factors for the structure of community was silt + depth + organic carbon ($r=0.46$). Compared to the results of other previous reports, the average abundance value in our study was the highest. while the average biomass value was the lowest.

Key words Southern coastal waters of Shandong Peninsula; Macrobenthos; Community structure; Diversity; BIOENV

① Corresponding author: YU Zishan, E-mail: yu_zishan@ouc.edu.cn

DOI:10.11758/yykxjz.20161222001

http://www.yykxjz.cn/

于莹, 周锋, 房恩军, 郭彪, 张博伦, 张武昌. 渤海湾近岸海域浮游纤毛虫丰度和生物量的季节变化. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 37-45
Yu Y, Zhou F, Fang EJ, Guo B, Zhang BL, Zhang WC. Seasonal variations of planktonic ciliates in the coastal area of the Bohai Bay. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 37-45

渤海湾近岸海域浮游纤毛虫丰度和生物量的季节变化*



于莹¹ 周锋² 房恩军¹ 郭彪¹ 张博伦¹ 张武昌^{3①}

(1. 天津渤海水产研究所 天津 300457;

2. 国家海洋局第二海洋研究所 卫星海洋环境动力学国家重点实验室 杭州 310012;

3. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 2015年春季(5月)、夏季(7月)和秋季(9月)在渤海湾近岸海域进行浮游纤毛虫丰度和生物量的调查。浮游纤毛虫丰度、生物量及种类组成均表现出明显的季节变化。春、夏和秋季纤毛虫的平均丰度分别为(1016±868)、(2011±1327)和(2456±1776) ind./L, 平均生物量分别为(1.91±2.53)、(5.78±4.45)和(3.11±2.40) μg·C/L。3个季节砂壳纤毛虫占纤毛虫丰度的比例平均为(26.7±23.3)%, 夏季最高, 为(43.4±25.1)%, 秋季最低, 为(12.3±8.1)%。无壳纤毛虫和砂壳纤毛虫丰度和生物量的水平分布特点不同, 无壳纤毛虫在3个季节中没有表现出明显的分布规律, 在近岸和远岸都有丰度和生物量高值的出现; 砂壳纤毛虫丰度和生物量则一般在近岸较高。3个季节共鉴定出砂壳纤毛虫8属25种, 其中, 拟铃虫属(*Tintinnopsis*)种类最多。春季砂壳纤毛虫优势种为波罗的拟铃虫(*Tintinnopsis baltica*)、百乐拟铃虫(*Tintinnopsis beroidea*)和原始筒壳虫(*Tintinnidium primitivum*); 夏季砂壳纤毛虫优势种为妥肯丁拟铃虫(*Tintinnopsis tocaninensis*)、原始筒壳虫和厦门拟铃虫(*Tintinnopsis amoyensis*); 秋季砂壳纤毛虫优势种为原始筒壳虫。春季砂壳纤毛虫群落口径较小, 为(31.5±2.5) μm, 夏季和秋季较大, 分别为(35.9±8.2)和(34.8±5.2) μm。夏季砂壳纤毛虫群落 Shannon 指数及 Pielou 指数均较春季和秋季大。本研究可为该海区浮游纤毛虫分布的长期变化、浮游生态系统的研究及渔业资源的发展提供基础数据。

关键词 浮游纤毛虫; 丰度; 生物量; 季节变化; 渤海湾

中图分类号 Q958.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0037-09

海洋浮游纤毛虫是一类个体微小(粒径为5~200 μm)、营浮游生活的单细胞原生动物, 在海洋中广泛分布, 主要包括无壳寡毛类纤毛虫及砂壳纤毛

虫两大类。目前, 已经报道过的无壳寡毛类纤毛虫约有140种(Agatha, 2011), 砂壳纤毛虫有900多种(张武昌等, 2012), 无壳纤毛虫占纤毛虫丰度中的比

* 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室开放课题(KLMEEES201307)、卫星海洋环境动力学国家重点实验室开放课题(SOED1610)和天津市水产局青年科技项目(J2014-04)共同资助[This work was supported by Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Open Project (KLMEEES201307), State Key Laboratory of Satellite Ocean Environment Dynamics, Key Laboratory of Open Project (SOED1610), and Tianjin Municipal Bureau of Fisheries Science and Technology Project (J2014-04)]. 于莹, E-mail: yuyingxl001@163.com

① 通讯作者: 张武昌, 研究员, E-mail: wuchangzhang@163.com

收稿日期: 2016-12-22, 收修改稿日期: 2017-01-12

例较高(Verity *et al.*, 2010; Dolan *et al.*, 2007)。浮游纤毛虫是微型浮游动物的重要类群,是微食物环的顶级摄食者,其主要摄食桡足类,不能摄食微小的浮游植物、细菌、鞭毛虫等,同时被浮游动物和鱼类幼体等所摄食,进一步转化为鱼虾等资源,是连接微食物环和经典食物链的重要媒介,在海洋浮游生态系统的物质循环和能量流动中发挥重要的作用(Pierce *et al.*, 1992; Sherr *et al.*, 1988)。

渤海湾位于渤海西部,是一个典型的半封闭性海湾,是许多经济鱼虾类的产卵场和索饵场,对黄渤海的渔业经济意义重大。浮游纤毛虫是仔稚鱼的重要饵料,目前,只对渤海湾 2011 年春季和夏季 2 个航次大型砂壳纤毛虫(>76 μm)的丰度、生物量及种类组成进行了研究(于莹等, 2016)。本研究报道了 2015 年春、夏、秋季渤海湾近岸浮游纤毛虫丰度和生物量(由于冬季渤海湾结冰,无法进行海上作业,故本文暂缺冬季数据),增加小型砂壳纤毛虫的研究,为该海区浮游纤毛虫分布的长期变化、浮游生态系统的研究及渔业资源的发展提供基础数据。

1 材料与方法

2015 年春季(5 月 12、14 日)、夏季(7 月 23、24 日)和秋季(9 月 8、9 日)在渤海湾近岸海区 15 个站位进行浮游纤毛虫的调查(图 1),水深为 5~15 m。在各站位表层取 1 L 水样,用 Lugol's 液固定,终浓度为 1%。

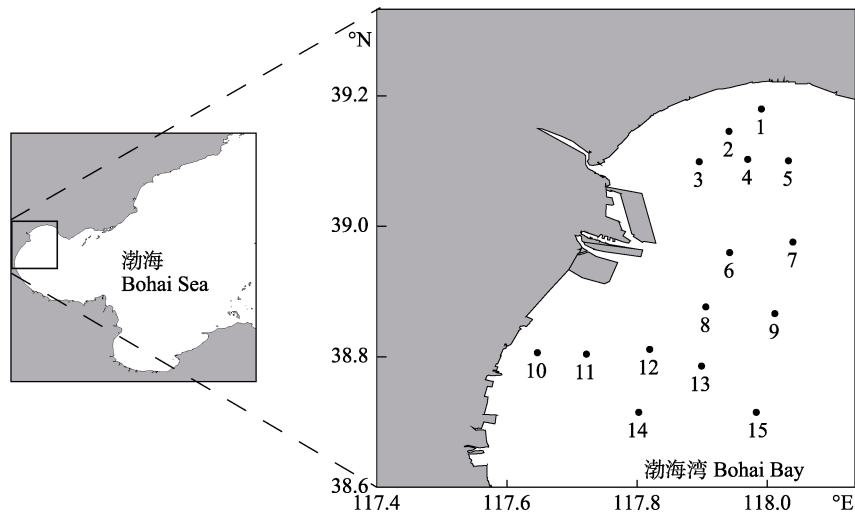


图 1 渤海湾调查站位

Fig.1 Locations of the sampling stations in the Bohai Bay

2 结果与分析

2.1 丰度和生物量

春、夏、秋季纤毛虫丰度和生物量的变化特点见表 1。从表 1 可以看出,无壳纤毛虫丰度秋季最高,

样品分析按照 Utermöhl(1958)的方法进行,自然沉淀至少 48 h,用虹吸管将水样上层清液小心吸出,剩余约 150 ml,于阴凉处保存。取 12 ml 放于沉降杯内,在 Olympus IX71 倒置显微镜下 100 倍或 400 倍镜检。记录无壳纤毛虫、砂壳纤毛虫的丰度,砂壳纤毛虫根据张武昌等(2012)、尹光德(1952)方法鉴定到种。测量纤毛虫的体长、体宽,按最接近的几何形状(如柱体、球体和锥体)计算体积。生物量由体积乘转换系数($0.19 \text{ pg}\cdot\text{C}/\mu\text{m}^3$) (Putt *et al.*, 1989)得来,砂壳纤毛虫的体积直接按照肉体体积计算。

根据徐兆礼等(1989)的公式计算优势度(Y),公式如下:

$$Y = \frac{n_i}{N} f_i$$

式中, n_i 为第 i 种的个体数; N 为总个体数; f_i 为第 i 种在各个站位出现的频率; $Y > 0.02$ 时,该种为优势种。

砂壳纤毛虫群落的多样性采用 Shannon 指数(H') (Shannon *et al.*, 1949),均匀度采用 Pielou 指数(J) (Pielou, 1966),其公式分别如下:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

$$J = \frac{H'}{\log_2 S}$$

式中, S 为物种种类数; P_i 为第 i 种的个体数与总个体数的比值。

为(2178 ± 1661) ind./L; 春季最低,为(752 ± 748) ind./L。无壳纤毛虫生物量夏季最高,为(4.19 ± 4.43) $\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$; 春季最低,为(1.52 ± 2.35) $\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$ 。砂壳纤毛虫丰度和生物量均在夏季最高[(725 ± 657) ind./L, (1.59 ± 1.41) $\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$], 春季最低[(264 ± 317) ind./L, (0.39 ± 0.41) $\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$]; 纤毛

虫丰度秋季最高[(2456±1776) ind./L], 春季最低[(1016±868) ind./L], 纤毛虫生物量夏季最高[(5.78±4.45) µg·C/L], 春季最低[(1.91±2.53) µg·C/L]。

3 个季节砂壳纤毛虫占纤毛虫丰度的比例平均为(26.7±23.3)%, 夏季最高, 为(43.4±25.1)%; 秋季最低, 为(12.3±8.1)%, 春季为(24.4±22.0)%。

表 1 3 个季节纤毛虫丰度(ind./L)和生物量(µg·C/L)的变化特点
Tab.1 Variation in the abundance (ind./L) and biomass (µg·C/L) of the ciliates during three seasons

季节 Season	无壳纤毛虫 Aloricate ciliates		砂壳纤毛虫 Tintinnids		纤毛虫 Total ciliates	
	丰度 (平均值/范围) Abundance (average/range)	生物量 (平均值/范围) Biomass (average/range)	丰度 (平均值/范围) Abundance (average/range)	生物量 (平均值/范围) Biomass (average/range)	丰度 (平均值/范围) Abundance (average/range)	生物量 (平均值/范围) Biomass (average/range)
	春 Spring	(752±748)/ 112~2552	(1.52±2.35)/ 0.07~8.60	(264±317)/ 0~1147	(0.39±0.41)/ 0~1.26	(1016±868)/ 168~2929
夏 Summer	(1286±1261)/ 66~4446	(4.19±4.43)/ 0.12~14.75	(725±657)/ 132~2296	(1.59±1.41)/ 0.38~4.80	(2011±1327)/ 198~4652	(5.78±4.45)/ 0.97~15.98
秋 Autumn	(2178±1661)/ 137~5712	(2.57±2.32)/ 0.08~7.33	(278±284)/ 18~866	(0.53±0.77)/ 0.01~2.38	(2456±1776)/ 156~5772	(3.11±2.40)/ 0.08~7.58
全年 Total	(1406±1384)/ 66~5712	(2.76±3.31)/ 0.07~14.75	(422±492)/ 0~2296	(0.84±1.08)/ (0~4.80)	(1828±1475)/ 156~5772	(3.60±3.58)/ 0.07~15.98

2.2 水平分布

2.2.1 春季 春季无壳纤毛虫丰度的高值区主要分布在调查海区的北部和中部近岸海区, 无壳纤毛虫生物量的高值区主要分布在中部近岸海区; 砂壳纤毛虫丰度和生物量的高值区主要分布在北部近岸和南部海区; 纤毛虫丰度和生物量的分布特点与无壳纤毛虫类似(图 2)。

2.2.2 夏季 夏季无壳纤毛虫丰度和生物量的高值区主要分布在调查海区中部离岸和南部近岸海区; 砂壳纤毛虫丰度的高值区主要分布在调查海域的北部和南部近岸海区, 砂壳纤毛虫生物量的高值区主要分布在调查海域的北部近岸海区; 纤毛虫丰度和生物量的分布特点与无壳纤毛虫类似(图 3)。

2.2.3 秋季 秋季无壳纤毛虫丰度和生物量的高值区主要分布在调查海区的北部近岸和南部离岸海区; 砂壳纤毛虫丰度的高值区主要分布在调查海域的北部和南部近岸海区, 砂壳纤毛虫生物量的高值区主要分布在调查海域的南部近岸海区; 纤毛虫丰度和生物量的分布特点与无壳纤毛虫类似(图 4)。

2.3 砂壳纤毛虫

2.3.1 种类组成 春、夏、秋季共鉴定出砂壳纤毛虫 8 属 25 种, 其中, 拟铃虫属(*Tintinnopsis*) 种类最多, 为 15 种(表 2)。夏季鉴定出砂壳纤毛虫种类最多(20 种), 且透明壳种类, 如管状真铃虫(*Eutintinnus tubulosus*)、钟状网纹虫(*Favella campanula*)、巴拿马网纹虫(*Favella panamensis*)及兆氏类杯虫(*Metacylis jorgensenii*)

主要在夏季出现。

春季优势种为波罗的拟铃虫(*Tintinnopsis baltica*, $Y=0.44$)、百乐拟铃虫(*Tintinnopsis beroidea*, $Y=0.11$)和原始筒壳虫(*Tintinnidium primitivum*, $Y=0.05$)。波罗的拟铃虫和原始筒壳虫均主要分布在调查海域的南部, 百乐拟铃虫主要分布在调查海域的北部和南部(图 5)。夏季优势种为妥肯丁拟铃虫(*Tintinnopsis tocaninensis*, $Y=0.15$)、原始筒壳虫($Y=0.15$)和厦门拟铃虫(*Tintinnopsis amoyensis*, $Y=0.13$)。妥肯丁拟铃虫和原始筒壳虫均主要分布在调查海域的南部近岸, 厦门拟铃虫则主要分布在调查海域北部近岸(图 6)。秋季优势种为原始筒壳虫($Y=0.72$), 其高值区在调查海域的近岸和远岸都有分布(图 7)。

2.3.2 口径范围 按砂壳纤毛虫口径(Lorica oral diameter, LOD)划分, 春季砂壳纤毛虫群落分为 5 个粒径组, 24~28 (百乐拟铃虫)及 32~36 µm [波罗的拟铃虫和寇氏拟铃虫(*Tintinnopsis kofoidi*)]的粒径组在砂壳纤毛虫群落中占优, 其丰度占砂壳纤毛虫总丰度的比例分别为 26.4%和 63.5%。夏季分为 10 个粒径组, 包括 3 个较大粒径组, 24~28 (百乐拟铃虫和妥肯丁拟铃虫)、28~32 [原始筒壳虫和管状拟铃虫(*Tintinnopsis tubulosa*)]及 32~36 µm [厦门拟铃虫、清兰拟铃虫(*Tintinnopsis chinglanensis*)、最小拟铃虫(*Tintinnopsis minima*)和筒状拟铃虫(*Tintinnopsis tubulosoides*)]的粒径组丰度占砂壳纤毛虫总丰度的比例分别为 22.9%、18.7%和 26.2%。秋季分为 6 个粒径组, 包括 1 个较大粒径组, 28~32 µm 的粒径组[尖底类瓮虫(*Amphorellopsis acuta*)和原始筒壳虫]丰度占砂壳纤毛虫总丰度的比例为 75.8% (图 8)。

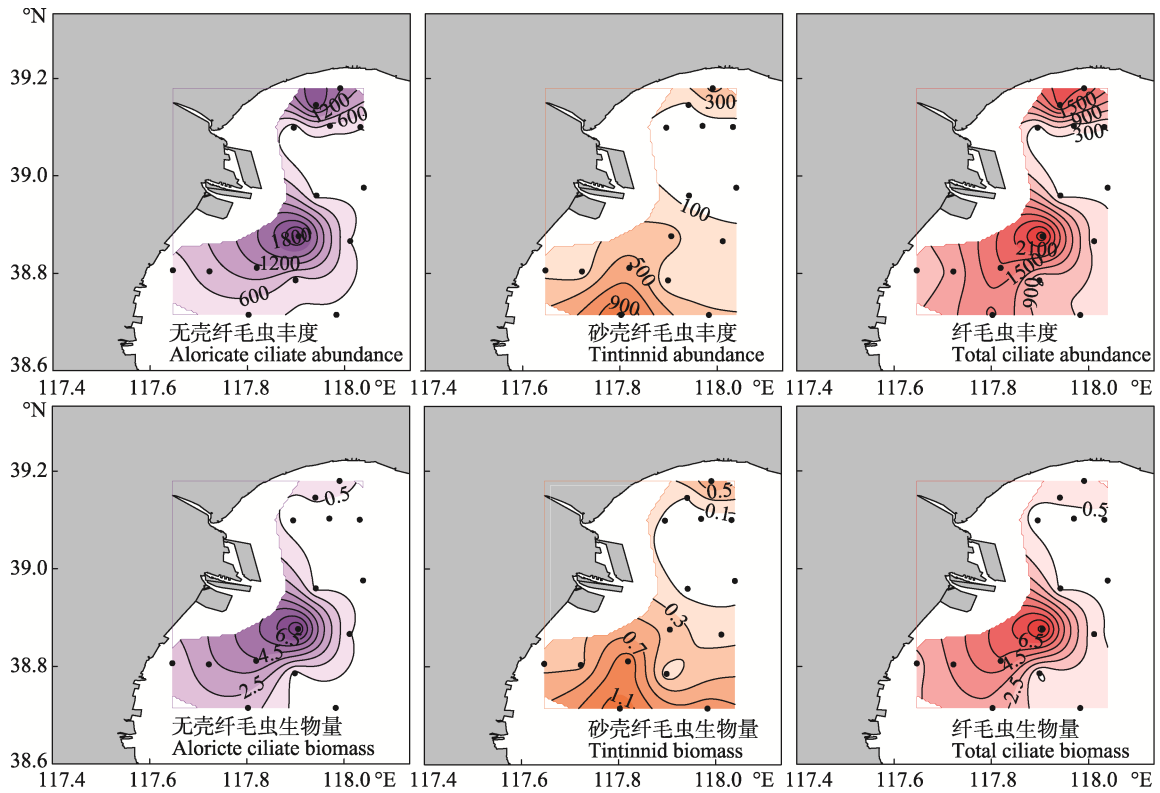


图2 春季无壳纤毛虫、砂壳纤毛虫及纤毛虫丰度(ind./L)和生物量($\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$)的水平分布

Fig.2 The horizontal distribution of the abundance (ind./L) and biomass ($\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$) of aloricate ciliates, tintinnids and total ciliates in the spring

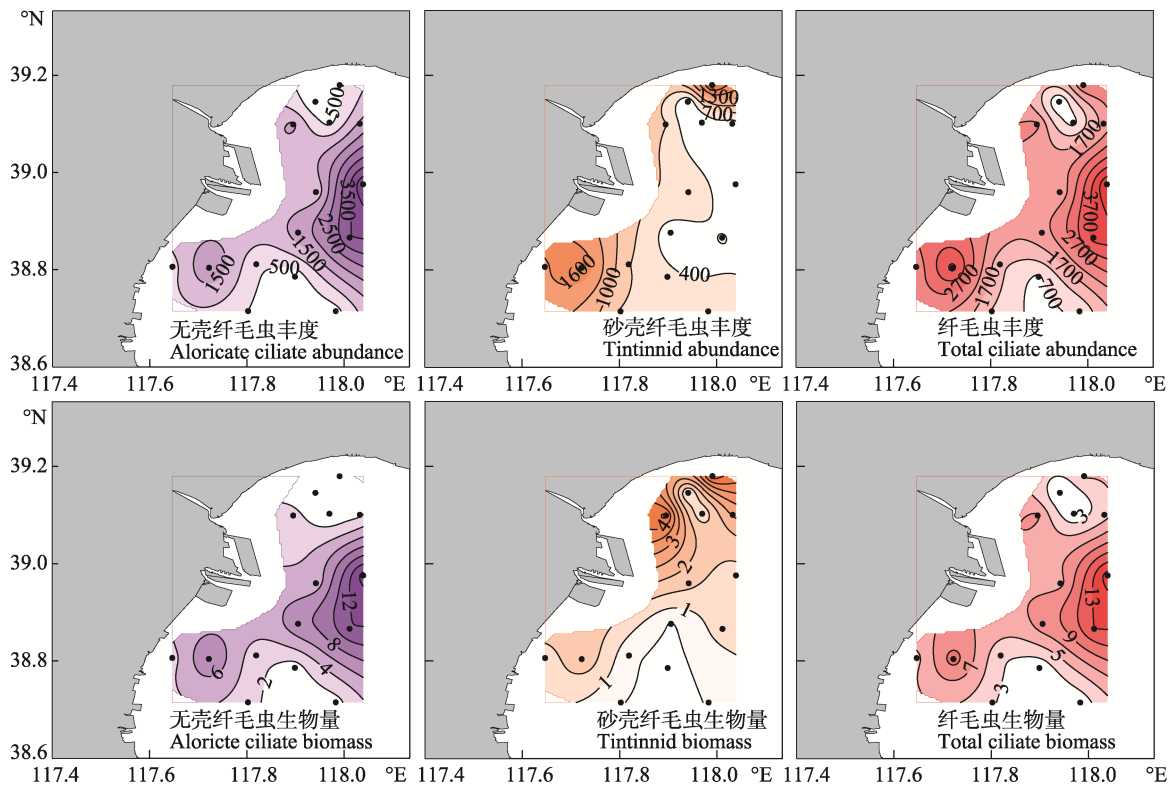


图3 夏季无壳纤毛虫、砂壳纤毛虫及纤毛虫丰度(ind./L)和生物量($\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$)的水平分布

Fig.3 The horizontal distribution of the abundance (ind./L) and biomass ($\mu\text{g}\cdot\text{C}/\text{L}$) of aloricate ciliates, tintinnids and total ciliates in the summer

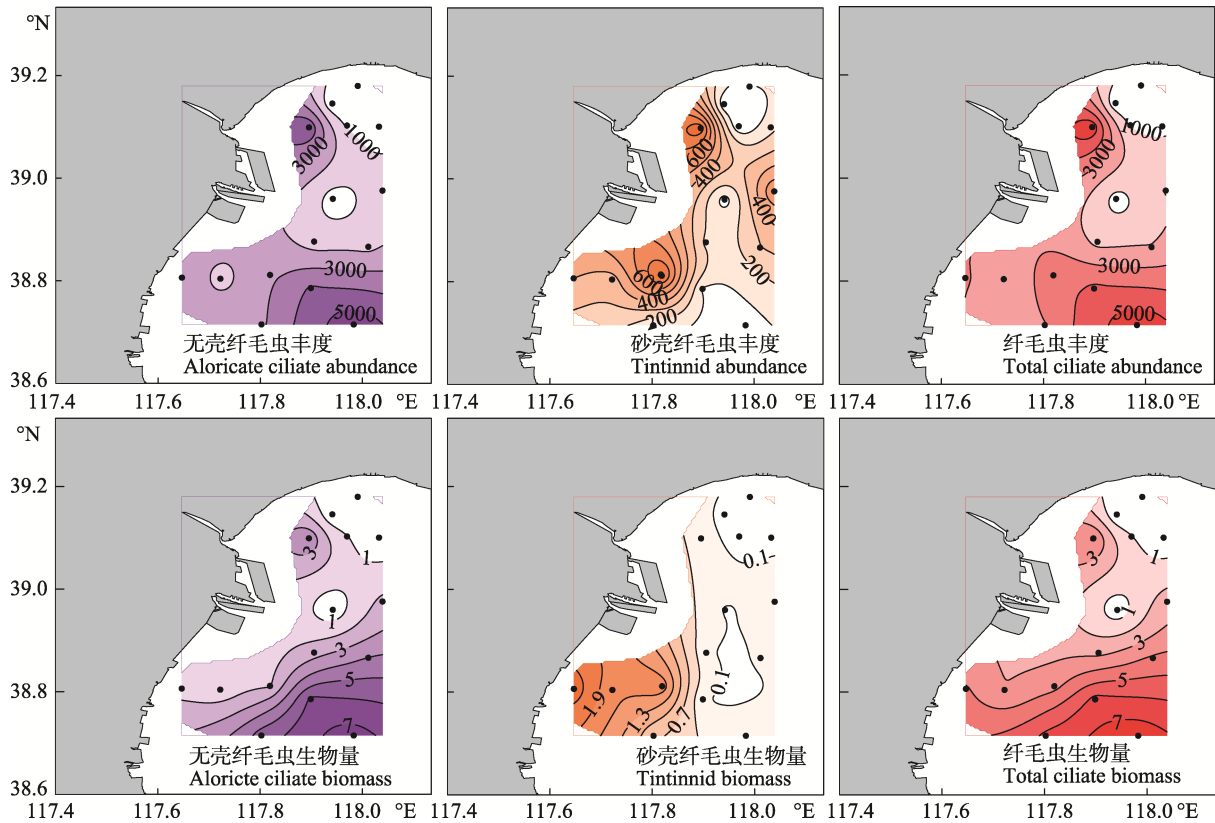


图 4 秋季无壳纤毛虫、砂壳纤毛虫及纤毛虫丰度(ind./L)和生物量($\mu\text{g}\cdot\text{C/L}$)的水平分布

Fig.4 Horizontal distribution in terms of abundance (ind./L) and biomass ($\mu\text{g}\cdot\text{C/L}$) of aloricate ciliates, tintinnids and total ciliates in autumn

春季砂壳纤毛虫群落口径较小,为 $(31.5\pm 2.5)\mu\text{m}$,夏季和秋季较大,分别为 (35.9 ± 8.2) 和 $(34.8\pm 5.2)\mu\text{m}$ 。从全年来看,口径范围在 $24\sim 36\mu\text{m}$ 的砂壳纤毛虫(尖底类瓮虫、原始筒壳虫、厦门拟铃虫、百乐拟铃虫、波罗的拟铃虫、清兰拟铃虫、寇氏拟铃虫、最小拟铃虫、妥肯丁拟铃虫、管状拟铃虫和筒状拟铃虫)是渤海湾砂壳纤毛虫群落的优势类群,其种类数占砂壳纤毛虫总种数的44.0%,其丰度占砂壳纤毛虫总丰度的82.6%,口径大于 $60\mu\text{m}$ 的砂壳纤毛虫种类较少且丰度较低(图8)。

2.3.3 群落特征 春季砂壳纤毛虫群落 Shannon 指数的平均值为 (0.93 ± 0.55) ,最大值为1.70,出现在1号站;Pielou 指数的平均值为 (0.62 ± 0.34) ,最大值为0.92,出现在3号站。夏季砂壳纤毛虫群落 Shannon 指数的平均值为 (2.13 ± 0.43) ,最大值为3.24,出现在3号站;Pielou 指数的平均值为 (0.81 ± 0.13) ,最大值为0.98,出现在3号站。秋季砂壳纤毛虫群落 Shannon 指数的平均值为 (0.85 ± 0.75) ,最大值为1.82,出现在11号站;Pielou 指数的平均值为 (0.50 ± 0.43) ,最大值为1.00,出现在13号站。

3 讨论

渤海湾纤毛虫生态学资料很少,只有于莹等(2016)研究了2011年春季和夏季大型砂壳纤毛虫的种类和丰度。本研究是首次记录渤海湾无壳纤毛虫的丰度,其在春、夏、秋3个季节均占纤毛虫总丰度的50%以上,无壳纤毛虫是渤海湾浮游纤毛虫的优势类群,在渤海湾微食物网中占据重要地位。

对比于莹等(2016)网采的样品,本研究第1次通过直接采集水样的方法研究渤海湾砂壳纤毛虫群落,鉴定出的砂壳纤毛虫种类比网采样品更多。本研究夏季比2011年夏季(于莹等,2016)多鉴定出9种砂壳纤毛虫[鲁西塔尼亚类铃虫(*Codonellopsis lusitanica*)、管状真铃虫、简单薄铃虫(*Leprotintinnus simplex*)、兆氏类杯虫、百乐拟铃虫、直颈拟铃虫(*Tintinnopsis directa*)、矮小拟铃虫(*Tintinnopsis nana*)、管状拟铃虫和筒状拟铃虫],其多为小型砂壳纤毛虫,在砂壳纤毛虫总丰度中约占6%。结果表明,虽然网采样品可以采集大部分优势类群,但往往遗漏一些丰度不高的小型砂壳纤毛虫,很难全面了解全部砂壳纤毛虫,在今后调查中应尽量用采水的方法研究砂壳纤毛虫群落组成,更全

表2 3个季节鉴定的砂壳纤毛虫种类
Tab.2 The species list of tintinnids in the spring, summer and autumn

中文名 Chinese name	拉丁名 Latin name	春季最大丰度 Max abundance in the spring (ind./L)	夏季最大丰度 Max abundance in the summer (ind./L)	秋季最大丰度 Max abundance in the autumn (ind./L)	口径范围 LOD (μm)
尖底类瓮虫*	<i>A. acuta</i>	-	-	46	28~32
鲁西塔尼亚类铃虫*	<i>C. lusitanica</i>	-	224	-	20~24
运动类铃虫	<i>Codonellopsis mobilis</i>	63	-	-	56~60
管状真铃虫*	<i>E. s tubulosus</i>	-	52	-	20~24
钟状网纹虫*	<i>F. campanula</i>	-	45	-	68~72
巴拿马网纹虫	<i>F. panamensis</i>	-	103	-	>80
诺氏薄铃虫	<i>Leprotintinnus nordqvisti</i>	-	110	50	40~44
简单薄铃虫	<i>L. simplex</i>	31	19	45	52~56
兆氏类杯虫*	<i>M. jorgensenii</i>	-	17	-	52~56
原始筒壳虫	<i>T. primitivum</i>	400	983	866	28~32
厦门拟铃虫	<i>T. amoyensis</i>	-	1605	89	32~36
百乐拟铃虫*	<i>T. beroidea</i>	293	69	20	24~28
波罗的拟铃虫*	<i>T. baltica</i>	588	-	-	32~36
布氏拟铃虫	<i>T. butschlii</i>	-	52	-	76~80
清兰拟铃虫	<i>T. chinglanensis</i>	-	86	-	32~36
直颈拟铃虫*	<i>T. directa</i>	-	16	-	40~44
寇氏拟铃虫*	<i>T. kofoidi</i>	55	-	-	32~36
罗氏拟铃虫	<i>T. lohmanni</i>	-	93	-	44~48
最小拟铃虫	<i>T. minima</i>	-	90	-	32~36
矮小拟铃虫*	<i>T. nana</i>	-	22	-	20~24
根状拟铃虫	<i>T. radix</i>	-	56	-	44~48
斯氏拟铃虫	<i>T. schotti</i>	-	-	83	>80
妥肯丁拟铃虫	<i>T. tocaninensis</i>	-	432	-	24~28
管状拟铃虫*	<i>T. tubulosa</i>	-	34	-	28~32
筒状拟铃虫*	<i>T. tubulosoides</i>	-	67	83	32~36

*为渤海湾的新纪录种；-为未出现

*New record in the Bohai Bay, -: Not recorded

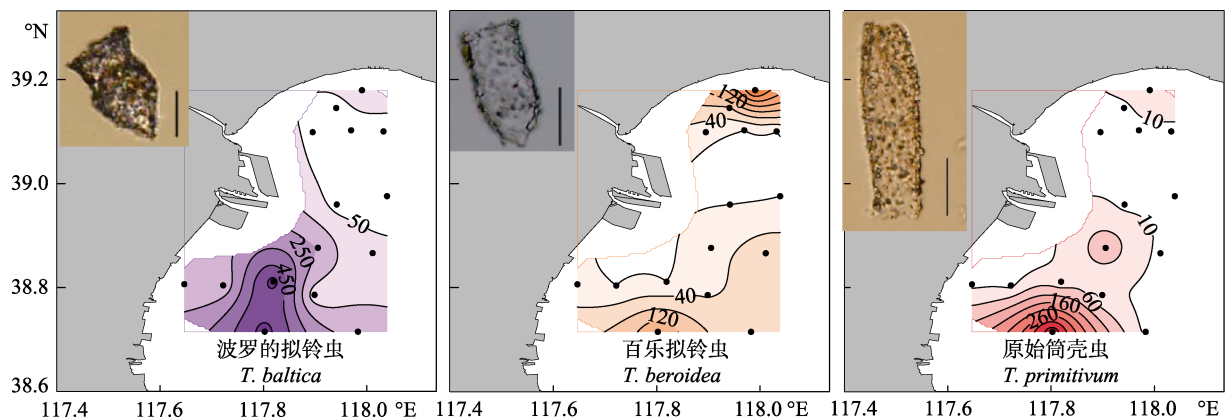


图5 春季渤海湾砂壳纤毛虫优势种丰度(ind./L)的水平分布(比例尺: 25 μm)

Fig.5 The horizontal distribution of the abundance dominant tintinnid (ind./L) in the spring (Scale bar: 25 μm)

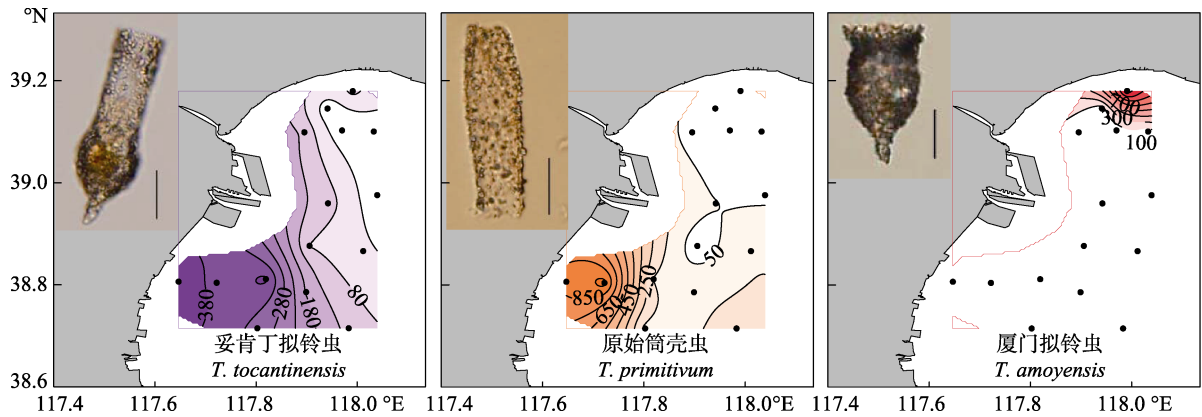


图 6 夏季砂壳纤毛虫优势种丰度(ind./L)的水平分布(比例尺: 25 μm)

Fig.6 The horizontal distribution of the abundance dominant tintinnid (ind./L) in the summer (Scale bar: 25 μm)

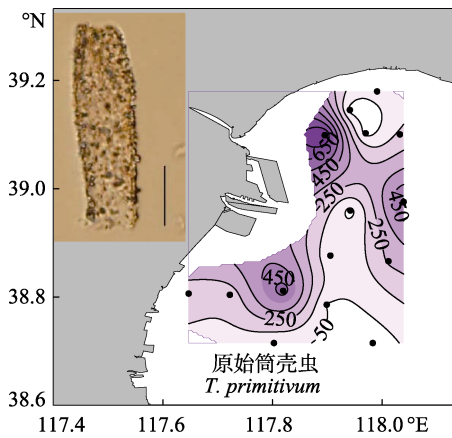


图 7 秋季渤海湾砂壳纤毛虫优势种丰度 (ind./L)的水平分布(比例尺: 25 μm)

Fig.7 The horizontal distribution of the abundance of the dominant tintinnid (ind./L) in the autumn (Scale bar: 25 μm)

面地了解所有粒径的砂壳纤毛虫。

3.1 水平分布

本研究中,无壳纤毛虫和砂壳纤毛虫丰度和生物量的水平分布特点不同,无壳纤毛虫在 3 个季节中没有表现出明显的分布规律,在近岸和远岸都有丰度和生物量的高值出现;砂壳纤毛虫丰度和生物量则一般在近岸较高。砂壳纤毛虫的分布特点与多数温带近岸海区,如 Ise Bay (Uye *et al*, 2000)及 2011 年渤海湾(于莹等, 2016)砂壳纤毛虫的分布规律一致。这可能与其饵料的可利用性有关,近岸海域由陆源输入带来丰富营养盐,刺激浮游植物大量生长,从而为砂壳纤毛虫提供较高水平的饵料(于莹等, 2011)。由于缺乏环境因子数据,无法分析无壳纤毛虫分布特点形成的原因。在今后研究中,需加强温度、盐度数据的调查,分析影响纤毛虫时空变化的原因;并结合饵料水平(如分粒级 Chl-*a* 数据及鞭毛虫、蓝细菌丰度等)及桡

足类的摄食水平(需进行稀释培养实验)进一步探究纤毛虫丰度和生物量分布格局的成因。

3.2 砂壳纤毛虫

与莱州湾(陈雪等, 2014、2015)及桑沟湾(于莹等, 2013)同期相比,本研究中鉴定出的砂壳纤毛虫种类数相当,且夏季鉴定出的砂壳纤毛虫种类数最多,这与世界其他海区的报道一致,如 Narragansett Bay (Verity, 1987)及 Hiroshima Bay (Kamiyama *et al*, 1996),砂壳纤毛虫种类数一般在夏季较多。

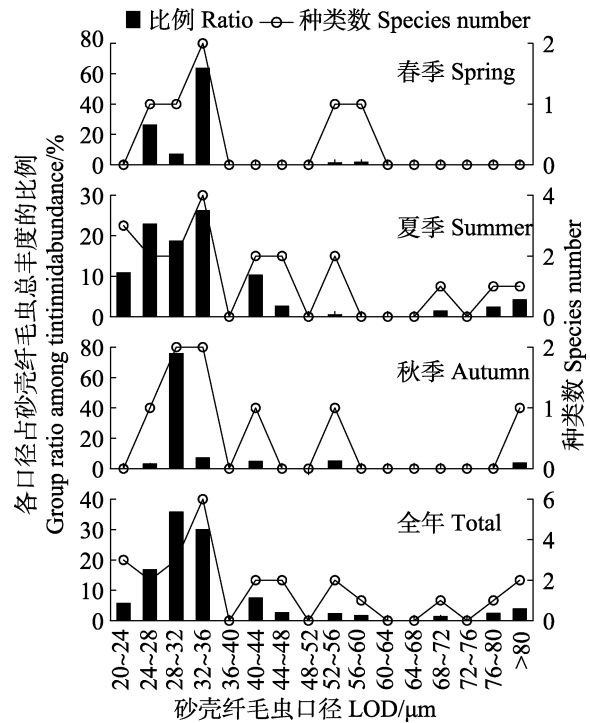


图 8 3 个季节各口径

砂壳纤毛虫占砂壳纤毛虫总丰度的比例

Fig.8 The percentages of tintinnids with different lorica oral diameters in the total tintinnid abundance in the three seasons

渤海湾砂壳纤毛虫占纤毛虫丰度的比例比桑沟湾(于莹等, 2013)及胶州湾(于莹等, 2011)高, 这可能与海区的富营养状况有关。砂壳纤毛虫在富营养化的海区, 一般具有较高的生长能力(Kamiyama *et al*, 1994), 由于渤海湾自身的水交换能力较差, 加上近年来环渤海经济圈的快速发展, 渤海湾一直处于富营养化的状态(Wang *et al*, 2009), 这可能是渤海湾砂壳纤毛虫占纤毛虫丰度比例较高的原因之一。

与体长相比, 口径是表征砂壳纤毛虫壳大小的更稳定的指标, 其大小决定其摄食颗粒的大小, 往往随浮游植物群落的结构组成而改变, 呈现一定的季节变化(Middlebrook *et al*, 1987; Verity *et al*, 1987)。渤海湾春季砂壳纤毛虫群落口径较小, 夏季和秋季较大, 这可能反映了其主要饵料——浮游植物群落粒级的季节变化, 在今后的调查中应增加观测分粒级 Chl-*a* 浓度, 从砂壳纤毛虫饵料的角度分析砂壳纤毛虫口径大小呈现明显季节变化的成因。

原始筒壳虫在渤海湾 3 个季节中占优势, 这在我国黄海(Yu *et al*, 2014)、东海(Yu *et al*, 2016)及南海北部湾(于莹等, 2014)等都有过报道。这表明原始筒壳虫在我国海区分布较广, 从温带到热带海区都有分布, 且优势度较高, 是我国海区重要的广温性种类。

参 考 文 献

- Agatha S. Global diversity of aloricate oligotricha (Protista, Ciliophora, Spirotricha) in marine and Brackish Sea water. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22466. doi:10.1371/journal.pone.0022466
- Chen X, Zhang WC, Wu Q, *et al*. Seasonal change of the community of large-sized tintinnids (Ciliophora, Tintinnida) in Laizhou Bay. *Biodiversity Science*, 2014, 22(5): 649–657 [陈雪, 张武昌, 吴强, 等. 莱州湾大型砂壳纤毛虫群落季节变化. *生物多样性*, 2014, 22(5): 649–657]
- Chen X, Wu Q, Luan QS, *et al*. The horizontal distribution of dominant large tintinnid (Ciliophora, Tintinnida) in Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 11–22 [陈雪, 吴强, 栾青杉, 等. 莱州湾大型砂壳纤毛虫丰度的水平分布. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 11–22]
- Dolan JR, Ritchie ME, Ras J. The “neutral” community structure of planktonic herbivores, tintinnid ciliates of the microzooplankton, across the SE Tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences Discussions*, 2007, 4(3): 297–310
- Kamiyama T. The impact of grazing by microzooplankton in northern Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea, Japan. *Marine Biology*, 1994, 119(1): 77–88
- Kamiyama T, Tsujino M. Seasonal variation in the species composition of tintinnid ciliates in Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea of Japan. *Journal of Plankton Research*, 1996, 18(12): 2313–2327
- Middlebrook K, Emerson CW, Roff JC, *et al*. Distribution and abundance of tintinnids in the Quoddy Region of the Bay of Fundy. *Canadian Journal of Zoology*, 1987, 65(3): 594–601
- Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 1966, 13(1): 131–144
- Pierce RW, Turner JT. Ecology of planktonic ciliates in marine food webs. *Reviews in Aquatic Sciences*, 1992, 6(2): 139–181
- Putt M, Stoecker DK. An experimentally determined carbon: Volume ratio for marine “oligotrichous” ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnology and Oceanography*, 1989, 34(6): 1097–1103
- Shannon CE, Weaver W. *The mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois Press, 1949, 1–114
- Sherr EB, Sherr BF. Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. *Limnology and Oceanography*, 1988, 33(5): 1225–1227
- Utermöhl H. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 1958, 9: 1–38
- Uye SI, Nagano N, Shimazu T. Abundance, biomass, production and trophic roles of micro-and net-zooplankton in Ise Bay, central Japan, in winter. *Journal of Oceanography*, 2000, 56(4): 389–398
- Verity PG. Abundance, community composition, size distribution, and production rates of tintinnids in Narragansett Bay, Rhode Island. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 1987, 24(5): 671–690
- Verity PG, Borkman DG. A decade of change in the Skidaway River Estuary. III: Plankton. *Estuaries and Coasts*, 2010, 33(2): 513–540
- Wang XL, Cui ZG, 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
- Xu ZL, Chen YQ. Aggregated intensity of dominant species of zooplankton in autumn in the East China Sea and Yellow Sea. *Chinese Journal of Ecology*, 1989, 8(8): 13–15 [徐兆礼, 陈亚瞿. 东黄海秋季浮游动物优势种聚集强度与鲐鲱渔场的关系. *生态学杂志*, 1989, 8(4): 13–15]
- Yin GD. Preliminary investigation of tintinnopsis in Jiaozhou Bay. *Journal of Shandong University*, 1952, 2(1): 36–56 [尹光德. 胶州湾砂壳纤毛虫之初步调查. *山东大学学报*, 1952, 2(1): 36–56]
- Yu Y, Ma YY, Chen W, *et al*. Community structure of large tintinnids (Ciliophora, Tintinnida) in Bohai Bay during spring and summer. *Marine Science*, 2016, 40(11): 57–64 [于莹, 马玉艳, 陈卫, 等. 春季和夏季渤海湾近岸海域大型砂壳纤毛虫的群落结构. *海洋科学*, 2016, 40(11): 57–64]
- Yu Y, Zhang WC, Cai YM, *et al*. Abundance and biomass of planktonic ciliates in the Beibu Gulf during summer 2009.

- Journal of Tropical Oceanography, 2014, 33(2): 60–65 [于莹, 张武昌, 蔡显明, 等. 2009年夏季北部湾浮游纤毛虫的丰度和生物量. 热带海洋学报, 2014, 33(2): 60–65]
- Yu Y, Zhang WC, Feng MP, *et al.* Differences in the vertical distribution and response to freshwater discharge between aloricate ciliates and tintinnids in the East China Sea. Journal of Marine Systems, 2016, 154(A): 103–109
- Yu Y, Zhang WC, Jiang ZJ, *et al.* Seasonal variation of planktonic ciliates in Sanggou Bay, Huanghai Sea. Acta Oceanologica Sinica, 2013, 35(3): 215–224 [于莹, 张武昌, 蒋增杰, 等. 桑沟湾浮游纤毛虫丰度和生物量分布的季节变化. 海洋学报, 2013, 35(3): 215–224]
- Yu Y, Zhang WC, Zhao N, *et al.* Annual variations in the abundance and biomass of planktonic ciliate in the Jiaozhou Bay. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(5): 690–701 [于莹, 张武昌, 赵楠, 等. 胶州湾浮游纤毛虫丰度和生物量的周年变化. 海洋与湖沼, 2011, 42(5): 690–701]
- Yu Y, Zhang WC, Zhang CX, *et al.* Basin-scale variation in planktonic ciliate distribution: A detailed temporal and spatial study of the Yellow Sea. Marine Biology Research, 2014, 10(7): 641–654
- Zhang WC, Feng MP, Yu Y, *et al.* An illustrated guide to contemporary tintinnids in the world. Beijing: Science Press, 2012, 1–499 [张武昌, 丰美萍, 于莹, 等. 砂壳纤毛虫图谱. 北京: 科学出版社, 2012, 1–499]

(编辑 陈严)

Seasonal Variations of Planktonic Ciliates in the Coastal Area of the Bohai Bay

YU Ying¹, ZHOU Feng², FANG Enjun¹, GUO Biao¹, ZHANG Bolun¹, ZHANG Wuchang^{3①}

(1. Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute, Tianjin 300457; 2. State Key Laboratory of Satellite Ocean Environment Dynamics, Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012;

3. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Studies on the abundance and biomass of planktonic ciliates were conducted in the Bohai Bay during spring (May), summer (July) and autumn (September) of 2015. Fifteen stations were investigated in each season. One-liter sample of seawater from the surface layer was collected and fixed in 1% acid Lugol's iodine solution. Water samples were pre-concentrated using the Utermöhl method and observed using an Olympus IX71 inverted microscope. The dimensions of the ciliates were measured and the cell volume of each species was estimated using appropriate geometric shapes. The carbon/volume ratio used to calculate the biomass was $0.19 \text{ pg C}/\mu\text{m}^3$. The classification of tintinnids was based on previous literatures about taxonomy. The abundance and biomass of ciliates and the community structure varied in the three seasons. The average abundance of ciliates in the spring, summer and autumn was $(1016 \pm 868) \text{ ind./L}$, $(2011 \pm 1327) \text{ ind./L}$ and $(2456 \pm 1776) \text{ ind./L}$ respectively. The average biomass of ciliates in the spring, summer and autumn was $(1.91 \pm 2.53) \mu\text{g}\cdot\text{C/L}$, $(5.78 \pm 4.45) \mu\text{g}\cdot\text{C/L}$ and $(3.11 \pm 2.40) \mu\text{g}\cdot\text{C/L}$ respectively. Tintinnids accounted for $(26.7 \pm 23.3)\%$ of the total ciliate abundance, and the value was the highest in the summer $(43.4 \pm 25.1\%)$ and the lowest in the autumn $(12.3 \pm 8.1\%)$. Aloricate ciliates and tintinnids exhibited different distribution patterns. The abundance and biomass of aloricate ciliates were higher in the coastal and offshore areas, while tintinnids tended to accumulate in the coastal area. Twenty five tintinnid species were identified that belonged to 8 genera, 15 of which were in genus *Tintinnopsis*. The most dominant species were *Tintinnopsis baltica*, *Tintinnopsis beroidea* and *Tintinnidium primitivum* in the spring. The most dominant species were *Tintinnopsis tocaninensis*, *Tintinnidium primitivum* and *Tintinnopsis amoyensis* in the summer. The most dominant specie was *Tintinnidium primitivum* in the autumn. The lorica oral diameter of the tintinnid community was larger in the summer $[(35.9 \pm 8.2) \mu\text{m}]$ and autumn $[(34.8 \pm 5.2) \mu\text{m}]$ than in the spring $[(31.5 \pm 2.5) \mu\text{m}]$. The Shannon index and Pielou index of the tintinnid community were both higher in the summer than in the spring and autumn. Our study may provide basic data for the future research on both the planktonic ecosystem and the development of the fishery industry.

Key words Planktonic ciliate; Abundance; Biomass; Seasonal variation; Bohai Bay

① Corresponding author: ZHANG Wuchang, E-mail: wuchangzhang@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20161227002

http://www.yykxjz.cn/

韩丹丹, 赵峰, 牟伟丽, 张道旭, 周德庆. 黄渤海鱼类优先监控重金属污染物的筛选与评价. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 46–53
Han DD, Zhao F, Mu WL, Zhang DX, Zhou DQ. Hazard analysis and screening of the prior heavy metals of priority pollution in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 46–53

黄渤海鱼类优先监控重金属 污染物的筛选与评价*



韩丹丹^{1,2} 赵峰¹ 牟伟丽³ 张道旭³ 周德庆^{1①}

(1. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 3. 蓬莱京鲁渔业有限公司 烟台 265600)

摘要 本研究采用文献检索及历史数据分析的方法,对黄渤海鱼类体内重金属污染情况进行分析,最终筛选出需优先监控的重金属污染物。结果显示,通过对黄渤海鱼类体内重金属含量的超标率、检出率和限量标准进行分析,甄别出需优先监控的重金属有 Cr、As、Cd、Pb 和 Hg。结合各污染物的生物富集因子(Bioconcentration Factors, BCF)、毒性效应、污染指数和超标率等,用综合评价法分析确定黄渤海鱼类优先监控重金属污染物。总体评价结果为 Cd>Hg>As^{*}>Cr>Pb,其中, Cd 的综合评价总分最高,需高度关注。按照鱼类品种进一步分析显示,舌鳎(*Cynoglossus robustus*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)体内的 Cd 和矛尾复鰕虎鱼(*Symeochogobius hasta*)体内的 As^{*}属于优先监控对象。对黄渤海 8 个沿岸城市进行取样,检测结果表明,舌鳎和蓝点马鲛体内的 Cd 属于优先监控污染物,与筛选结果基本一致,证明了此评价方法的可靠性。

关键词 黄渤海; 优先监控重金属; 筛选; 综合评价

中图分类号 TS201.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0046-08

据《中国渔业统计年鉴》(2016)显示,2015 年我国海产鱼的产量超过 1036.13 万 t, 占我国水产品总产量的 30.4% 以上。海产鱼是一种优质的食物蛋白来源,对解决我国食物供给问题,改善食物营养结构发挥了重要作用。海产鱼的质量安全现状与海洋环境息息相关,随着人们对海洋资源的开发,海洋环境的污染问题也日趋显现,重金属的污染问题已成为最受关注的问题之一。

重金属可通过大气沉降、自然活动(岩石风化、火山爆发等)和人类活动(工业废水、生活污水、采矿等)等进入水生系统。人类活动是海洋环境中重金属

污染物的主要来源(李晶等, 2015; 田金等, 2009)。重金属在生物体内具有易富集、难降解的特点,处于生物链顶端的人类摄入的重金属比其他生物多,过多的重金属在人体内会影响酶的活性、新陈代谢,甚至导致死亡(Varsha, 2013)。因此,国内外开展了大量实验来研究重金属的来源及其分布(Zuo *et al*, 2009; 张彦等, 2014; 董彬, 2012)、生物毒性作用(Diacomanolis *et al*, 2014; Hirano *et al*, 2013)及消减的方法(陈志良等, 2001; 聂亚平等, 2016)。由于重金属污染物的种类较多,在水产品检测中逐项检测耗时费力,如何快速有效筛选出水产品中优先监控的重金属污染物成为保

* 国家科技支撑计划课题(2015BAD17B01)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016002)共同资助[This work was supported by the National Science and Technology Support Plan Project (2015BAD17B01), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016002)]. 韩丹丹, E-mail: silent_hdd@163.com

① 通讯作者: 周德庆, 研究员, E-mail: zhoudeq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-12-27, 收修改稿日期: 2017-01-17

证鱼类质量安全的重要环节。

目前,关于优先监控污染物筛选的研究主要应用在水质监测(Yan *et al*, 2015; 于云江等, 2013)、空气质量监测(Elbir *et al*, 2004; 黄震, 1997)、土壤质量监测(Matamoros *et al*, 2007)等方面,而在食品安全领域,尤其是水产品质量安全领域中的研究和应用较少。本研究的主要目的是采用综合评价方法对黄渤海海产鱼体内优先监控重金属进行筛选和分析评价,通过大数据文献检索获得黄渤海海域鱼类中重金属的污染监测状况、危害、限量标准等数据,确定不同评价因子的权重进行初步的危害分析,筛选出需要优先进行监控和重点关注的重金属危害因子,以期为我国海产鱼类的质量安全监管、保障消费者食用安全和促进渔业的健康可持续发展提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 资料检索

检索范围:政府类资源,包括国家食品药品监督管理局、中华人民共和国农业部、中华人民共和国国家卫生部、世界卫生组织(WHO)、国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC);近 20 年的学术研究成果等。

检索途径:以电子文献为主,图书等实体资料为辅,包括国内外各政府部门发布的研究报告和监测数据、中(英)文期刊数据库、国际会议论文数据库、食品卫生类、化学类书籍等。

检索关键词:重金属、重金属+毒性效应、水产品+重金属、鱼+重金属、水产品+污染物、水产品+优先污染物、海洋+重金属等。

1.2 资料分析

频率分析:主要包括国内外污染物限量标准和禁用情况的统计、相关部门规定的必检项目的统计、水产品中重金属污染物的检出率及超标率的计算。

理化性质与毒理学分析:污染物致癌性的相关数据来自 IARC;健康指导剂量参考联合国粮农组织和

世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)给出的暂定每 7 d 可耐受摄入量(PTWI);遗传毒性、其他毒性、人体危害资料及半数致死量来自文献(王明强, 2008; 余晓星等, 1997; 金树兴等, 2009; 孙相等, 2014; 吴丰昌等, 2011; 刘建明, 2015; Govind *et al*, 2014; Baby *et al*, 2010)。

1.3 数据整理

对近 20 年的相关文献进行检索,收集有效数据(包括作者、采样时间、采样地点、样品种类及污染物含量),对其进行分类整理并及时建立相应数据库。

1.4 综合评价法

综合评价法采用打分的方式,对各污染物的指标进行分级并加权赋分,再将各单项的得分进行叠加,即为每一种污染物的综合得分,按综合得分的多少进行排序,筛选出特征污染物,从而达到筛选和评价的目的(崔建升等, 2009)。本研究采用周泽义等(2000)提出的模糊数学综合评价法,评价因子包括污染指数(P_i =污染物含量/限量标准)、超标率(ω)、毒性效应(I)及生物富集因子(B),评分标准见表 1、表 2。综合评价的具体公式为: $U=2\times P_i+3\times\omega+3\times I+2\times B$ 。

1.5 样品采集

实验样品于 2016 年 9~10 月分别在辽宁大连、天津、山东东营、莱州、烟台、威海、青岛、日照的港口及码头上采集,样品采集后加冰于 16 h 之内运至实验室,用蒸馏水洗净样品表面杂质,装在样品袋中, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,直至测样时取出。样品种类包括舌鳎(*Cynoglossus robustus*)、鲮鱼(*Mugil cephalus*)、矛尾复鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus nipponius*)和小黄花(*Larimichthys polyactis*)。

1.6 检测方法

样品中的重金属检测按照国家标准中的方法进行, Pb、Cd 和 Cr 采用石墨炉原子吸收光谱法,无机砷、甲基汞采用液相色谱-原子荧光光谱法。

表 1 污染指数评分标准(贾晓平等, 2000)
Tab.1 The score principle of pollution index (Jia *et al*, 2000)

分值 Score	污染指数 Pollution index	污染程度 Degree of pollution
1	$P_i \leq 0.2$	正常背景值水平 Normal background level
2	$0.2 < P_i \leq 0.6$	轻污染水平 Light pollution levels
3	$0.6 < P_i \leq 1.0$	中污染水平 Medium pollution levels
4	$1.0 < P_i$	重污染水平, 即超标 Heavy pollution level, exceeding standard

表 2 超标率和生物富集因子评分标准(周泽义等, 2000)
Tab.2 The score principle of exceeding standard rate and BCF (Zhou *et al*, 2000)

分值 Score	超标率 Exceeding standard rate (%)	生物富集因子 BCF
1	$\omega \leq 10.0$	$B < 10$
2	$10.0 < \omega \leq 20.0$	$B < 100$
3	$20.0 < \omega \leq 30.0$	$B < 1000$
4	$30.0 < \omega \leq 40.0$	$B < 10000$
5	$40.0 < \omega \leq 50.0$	$B > 100000$
6	$50.0 < \omega$	

1.7 数据统计分析

运用 Excel 2013 和 Origin 8.5 软件进行数据处理和制图。

2 结果与分析

2.1 水产品中重金属污染物的甄别

重金属超标一直是影响我国食品污染的主要原因之一, 不仅影响了我国居民的身体健康, 而且影响了我国食品的出口贸易。近几年, 欧盟食品和饲料快速预警系统(Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF)通报的我国食品安全问题主要是霉菌毒素、重金属超标、污染物迁移、兽药残留和标签不正确等, 其中, 重金属超标问题已成为仅次于霉菌毒性的第二大问题, 具体趋势见图 1。从图 1 可以看出, 2007 年的重金属超标事件的通报数量最多, 达 50 起。近 5 年, RASFF 通报我国食品重金属超标的数量约为 18 起/年, 仅在 2014 年略有增加。搜集到的有效文献资料中(截止到 2016 年 9 月 21 日), 1996~2001 年黄渤海海产鱼体内重金属检测的文献资料占 23%, 2007~2011 年占 38%, 2012~2016 年占 31%, 由此可以看出, 人们对水产品中重金属的关注度呈上升趋势; 2002~2006 年重金属的关注度较低, 可能是因为

这期间水产品药物残留事件频发, 如 2005 年的孔雀石绿事件、2006 年的多宝鱼事件等。

自然界的重金属约有 45 种, 环境污染监测主要关注的重金属有 Pb、Hg、Cd、As、Cr、Cu、Zn、Mn、Ni、Ag 等, 通过黄渤海海域鱼类中重金属的检测频次、超标率以及限量标准 3 个指标对重金属种类进行甄别, 在甄别中优先选用中华人民共和国卫生部食品安全国家标准(GB2762-2012)(2013)。从表 3 中可以看出, Mn 和 Ag 基本不作为重金属污染物来检测, Cu、Zn、Ni 虽然有检测数据, 但国标中没有相应的限量标准, 不对其进行分析。通过以上数据分析, 甄别出的重金属污染物有 Pb、Hg、Cd、As 和 Cr。

2.2 毒性效应因子的评分标准

根据风险评估的原则, 毒性效应的评价因子包括健康指导剂量、半数致死量、致癌性、遗传毒性、其他毒性和人体危害资料, 各因子的权重分值见周少君等(2015), 打分结果见图 2。从图 2 可以看出, Cr、

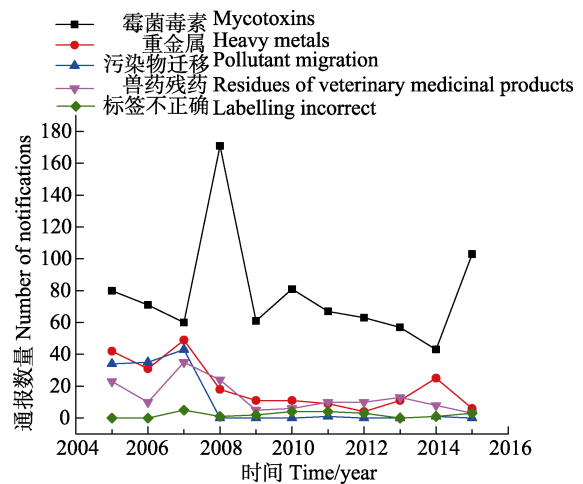


图 1 2000~2011 年 RASFF 通报中国食品风险因素
Fig.1 The first five risk factors on Chinese food safety in 2000~2011 notified by RASFF

表 3 不同重金属的检测频次及超标率
Tab.3 Tested frequency and exceeding standard rates of different heavy metals

项目 Items	铬 Cr	锰 Mn	镍 Ni	铜 Cu	锌 Zn	砷 As*	银 Ag	镉 Cd	汞 Hg	铅 Pb
频次 Testing frequency	66	0	9	73	61	65	0	97	68	96
超标率 Exceeding standard rate (%)	10.9	0	-	-	-	12.3	0	16.5	0	32.3

- 为没有进行数据分析; *为本次参考的数据大部分是按总 As 进行检测, 为了评价的准确性, 需要将总砷和无机砷进行换算, 在文献资料中, As_i 占总 As 的比值是 0.02%~6.88% (Muñoz *et al*, 2000; 王瑛等, 2014), 为了保证评估的可靠性和食品的安全性, 应该选择能把所有风险都纳入的评估数据, 因此选择比值 6.88%

- meant no data; * most of the data were tested according to the total As. In order to be accurate, we converted the total arsenic to inorganic arsenic. In the literature, the ratio was 0.02%~6.88% of total As (Muñoz *et al*, 2000; Wang *et al*, 2014). In order to ensure the reliability of the evaluation and food safety, we chose data that included all risk assessments and the selected value was 6.88%

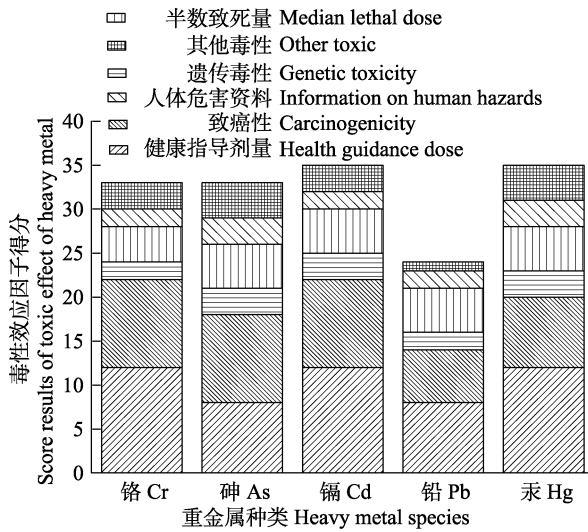


图 2 重金属毒性效应因子打分结果

Fig.2 The scores of toxic effects of heavy metals

As 和 Cd 的致癌分值都是最高的,属于已经确认的人类致癌物;从遗传毒性分析,As、Cd、Hg 的毒性是最高的;从总分来看,Cd 和 Hg 的毒性效应最强。

2.3 黄渤海海产鱼体内优先监控重金属污染物的筛选

从近 20 年黄渤海海产鱼体内重金属含量的数据

中查找获得有效文献 113 篇,有效数据 535 个,对不同重金属的平均污染物、超标率、毒性效应、富集因子(贺志鹏等, 2008; 孙剑等, 2010; 周德庆, 2013)及综合评分进行计算整理,根据文献分析,结合我国海域环境中重金属的污染现状,将污染物是否需要优先监控的阈值定为 120。从表 4 可以看出,Cd 的综合评分最高,优先顺序为 Cd> Hg> As^{*}> Cr> Pb。

2.4 黄渤海海域不同鱼体内优先监控重金属污染物的筛选

在整理出的数据中,筛选出研究数据较多的 5 种鱼,分别是舌鳎、鲷鱼、矛尾复鰕虎鱼、蓝点马鲛和小黄花,通过综合评价法对其进行优先监控重金属污染物的分析结果见图 3。从图 3 可以看出,根据各评价因子得分及其权重,计算得到的各鱼体内重金属的综合评价分值,Pb 的综合评分在 5 种鱼体内都是最低的;鲷鱼和小黄花体内的 5 种重金属综合评分都在阈值以下,均不属于优先监控范围;舌鳎、蓝点马鲛体内的 Cd 和矛尾复鰕虎鱼体内的 As^{*}分值都大于 120,属于优先监控的污染物。

表 4 黄渤海鱼体内重金属含量情况及综合评分结果

Tab.4 The heavy metal contents in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea and scores of the comprehensive assessment

污染物种类	平均污染指数	超标率	毒性效应	富集因子	综合评分
Pollutant species	Average pollution index	Exceeding standard rate (%)	Toxic effect	BCF	Comprehensive assessment
铬 Cr	0.375	10.9	33	3	115
砷 As [*]	0.987	13.8	33	3	117
镉 Cd	0.578	16.5	35	4	123
铅 Pb	0.780	32.3	24	4	98
汞 Hg	0.085	0	35	4	118

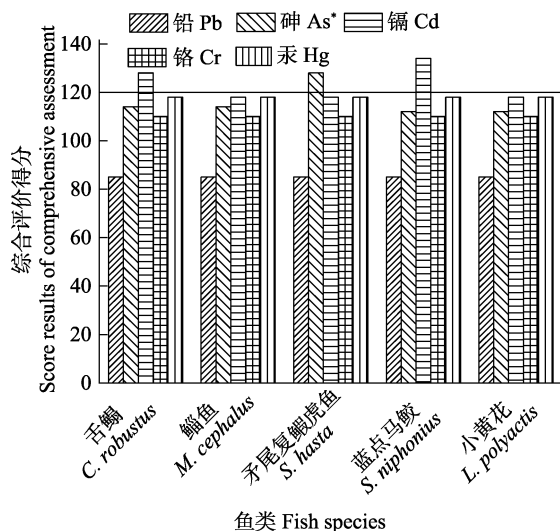


图 3 不同鱼体内重金属综合评分

Fig.3 The scores of the comprehensive assessment of heavy metals in different fish species

2.5 黄渤海沿海城市海产鱼体内重金属含量分析

在黄渤海沿岸 8 个采样点采集具有代表性的 5 个鱼品种,共 40 个样品。检测结果显示,Cd 的超标率是最高的,为 17.5%;Hg 的检出率是最高的,为 57.5%,但都未超标;这与之前历史数据分析得到的优先顺序(Cd>Hg>As^{*}>Cr>Pb)相吻合。鱼体内 As、Pb、Cr 和 Hg 的含量均属于正常背景值($P_i \leq 0.2$)范围,整体来看,黄渤海海产鱼体内重金属优先监控的顺序是 Cd>Hg>Cr>Pb>As,这与之前筛选出来的优先顺序基本一致,具体结果见图 4、图 5。在本研究中鱼体内没有检出 As_i,这与黄强等(2015)、杨惠芬等(2003)的研究结果一致。

对不同重金属在不同鱼体内的含量情况进行综合评价,结果见图 5。从图 5 中对比发现,舌鳎和蓝点马鲛体内 Cd 仍属于优先监控的目标。历史数据分

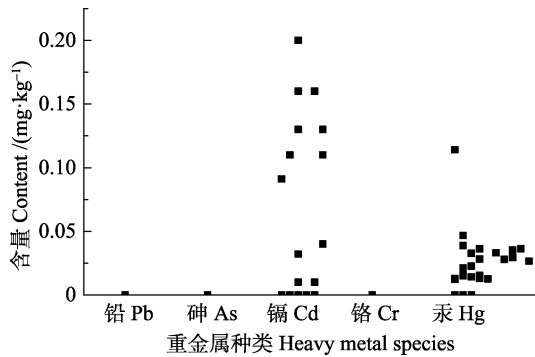


图4 黄渤海鱼体内重金属含量分布

Fig.4 The distribution of contents of heavy metals in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea

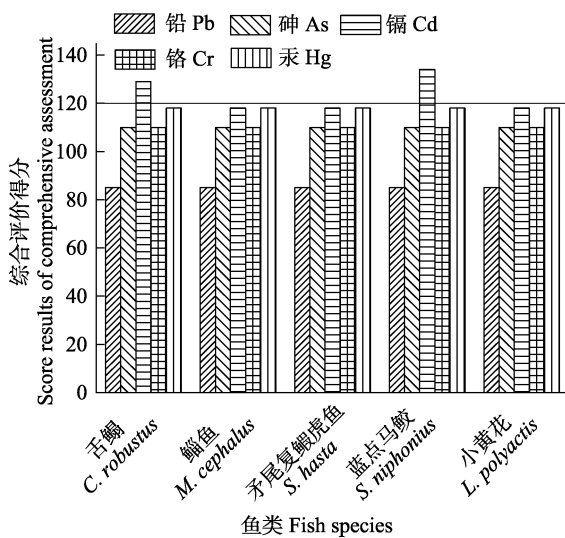


图5 黄渤海鱼体内重金属检测结果

Fig.5 The test results of heavy metals in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea

析显示, 矛尾复鰕虎鱼体内的 As 属于优先监控重金属污染物, 但现阶段的综合评价结果比历史综合评价低, 在后期需加强监控; 另外, 现阶段的研究显示, 5 种鱼体内的 As_i 均不属于优先监控的范围。已有确切研究表明, As_i 对人体的危害较大, 而对有机 As 的毒性评价尚且存在争议, 因此, 海产鱼体内 As 含量的检测仍需加以关注。本研究结果与历史数据分析得到的结论基本一致, 说明本筛选方法的可行性, 但是, 要想更加准确地筛选出污染物的种类, 应加强监测频率并及时更新数据库。

3 讨论

As 按形态可分为无机砷和有机砷, 其中, 无机砷主要包括 $As(III)$ 和 $As(V)$, 鱼体内的有机砷主要包括 AsB 、 AsC 、 DMA 、 MMA 、 $TMAO$ 、 TMA^+ , 其毒性排序为 $As(III) > As(V) > TMA^+ > MMA > DMA > TMAO >$

$AsC > AsB$ (Gong *et al.*, 2002)。鱼体内的 As 主要以有机砷的形式存在(李卫华, 2011), 有机砷的毒性较低, 甚至有些被认为是无毒的, 如 AsC 、 AsB (Gong *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2014)。但近年来研究发现, 有机砷可以改变人体基因的表达, 具有遗传毒性和致癌性(Mauro *et al.*, 2016); 也有研究发现, 甲基化三价砷比 $As(V)$ 的毒性更大(Petrick *et al.*, 2000), 同时, Cullen 等(2016)也发现, 甲基亚砷酸可能比 $As(III)$ 的毒性更大。不同鱼体内无机砷占总砷的比值不同, 张文德(2007)研究发现, 海产鱼体内 As_i 占总 As 的比例为 0.2%~3.4%, 李卫华等(2011)在对海产品体内无机砷研究表明, 鱼体内的 As_i 占总 As 的 0.8%~1.7%, Muñoz 等(2000)研究表明, 海产鱼体内无机砷的比例为 0.018%~6.88%, 王瑛等(2014)研究显示, 海鱼体内无机砷比例为 0.59%~1.13%, 作为食品安全评估, 应该把所有危险性都进行考虑, 本研究在综合评价中, 选择资料中无机砷比例的最大值 6.88% 为参考值。

水体环境可以影响水生生物对重金属的富集能力。水体中营养元素的含量会影响水生生物机体对重金属的吸收, 低营养水平的水体会促进机体对重金属进行更有效的吸收, 在低钙水体中, 鱼类通过摄食会吸收更多重金属元素, 如 Hg、Cd 和 Pb, 另外, 水的 pH 对化合物的存在形式和金属的溶解性有较大影响, 进一步影响鱼类对金属的富集能力以及金属离子的毒性效应(Qiu, 2015)。相同环境下, 不同食物链级别的鱼类体内重金属含量不同, 食物链高端的肉食性鱼类对重金属的富集能力高于杂食性和滤食性鱼类(杨婉玲等, 2007), 蓝点马鲛等大型肉食性鱼类体内富集 Hg 的能力比浮游生物、碎屑食性的鱼类高, 同时, Coelho 等(2013)研究发现, Hg 有明显的生物放大作用; 总体看来, 底层鱼类体内重金属含量较高。不同鱼类对重金属的富集能力不同, 这与本研究结果一致。在本研究中, 鲷鱼体内重金属综合评分都低于阈值, Cd 只在舌鳎和蓝点马鲛体内属于优先监控污染物。同种鱼类对不同重金属富集能力不同, 张敬怀等(2005)研究发现, 鱼类对重金属的富集能力顺序为 $Pb > Hg > As > Cd$ 。影响重金属在海洋生物体内富集的因素有很多, 主要包括有机体的代谢机制、生长发育阶段、摄食习性等生物自身条件以及水体中重金属的浓度、暴露时间、重金属形态、水环境的理化性质等外界条件的影响(葛奇伟, 2012; 孙珊等, 2017)。

优先监控污染物的筛选是水产品质量安全领域新的研究方向。该方法把历史数据作为参考进行甄别

分析, 对水产品质量安全监管具有重要的实际意义。但是, 污染物筛选过程中存在不确定性因素, 如何更全面地对这些因素进行综合评价将是今后研究探讨的重点。

参 考 文 献

- Baby J, Raj JS, Biby ET, *et al.* Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2010, 4(4): 939–952
- Chen ZL, Qiu RL, Zhang JS, *et al.* Removed technology of heavy metal pollution in soil. *Engineering and Technology*, 2001(8): 21–23 [陈志良, 仇荣亮, 张景书, 等. 重金属污染土壤的修复技术. *环境保护*, 2001(8): 21–23]
- Coelho JP, Mieiro CL, Pereira E, *et al.* Mercury biomagnification in a contaminated estuary food web: Effects of age and trophic position using stable isotope analyses. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 69(1–2): 110–115
- Cui JS, Xu FC, Liu D, *et al.* Progress in methods of screening priority pollutants. In: Chinese Society for Environmental Science in 2009, Wuhan [崔建升, 徐富春, 刘定, 等. 优先污染物筛选方法进展. 见: 中国环境科学学会 2009 年学术年会, 武汉]
- Culler WR, Liu Q, Lu X, *et al.* Methylated and thiolated arsenic species for environmental and health research and mdash: A review on synthesis and characterization. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 49(7): 7–27
- Diacomanolis V, Noller BN, Ng JC. Bioavailability and pharmacokinetics of arsenic are influenced by the presence of cadmium. *Chemosphere*, 2014, 112: 203–209
- Dong B. Research advance of soil heavy metal pollution in China. *Ecological Science*, 2012, 31(6): 683–687 [董彬. 中国土壤重金属污染修复研究展望. *生态科学*, 2012, 31(6): 683–687]
- Elbir T, Muezzinoglu A. Estimation of emission strengths of primary air pollutants in the city of Izmir, Turkey. *Atmospheric Environment*, 2004, 38(13): 1851–1857
- Fisheries and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture. *China Fishery Statistics Yearbook*. Beijing: China Agriculture Press, 2016 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- Ge QW. Studies on characteristic selection of heavy metal pollution for cultured molluscs and their risk assessment. Master's Thesis of Ningbo University, 2012, 51–52 [葛奇伟. 养殖贝类重金属特征污染物的筛选及其风险评价. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2012, 51–52]
- Gong Z, Lu X, Ma M, *et al.* Arsenic speciation analysis. *Talanta*, 2002, 58(1): 77–96
- Govind P, Madgyru S. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, 2014, 2(2): 17–23
- He ZP, Song JM, Zhang NX, *et al.* Variation characteristic and controlling factors of heavy metals in the South Yellow Sea surface sea waters. *Environmental Science*, 2008, 29(5): 1153–1162 [贺志鹏, 宋金明, 张乃星, 等. 南黄海表层海水重金属的变化特征及影响因素. *环境科学*, 2008, 29(05): 1153–1162]
- Hirano S, Watanabe T, Kobayashi Y. Effect of arsenic on modification of promyelocytic leukemia (PML): PML responds to low levels of arsenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 273(3): 590–599
- Huang Q, Zhao J, Chen SG, *et al.* Investigation and evaluation of heavy metal content in edible fish available in a seafood market of Laizhou. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(5): 248–251 [黄强, 赵静, 陈升桂, 等. 莱州海产品市场食用鱼类中重金属含量调查及评价. *安徽农业科学*, 2015, 43(5): 248–251]
- Huang Z. Application of comprehensive marking index system to screening environmental prior pollutants. *Shanghai Environmental Sciences*, 1997, 16(6): 19–21 [黄震. 综合评价指标体系在环境优先污染物筛选中的应用. *上海环境科学*, 1997, 16(6): 19–21]
- Jia XP, Lin Q, Li CH, *et al.* Concentrations and temporal-spatial variation trend of Pb in the oysters from Guangdong coastal waters. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(06): 527–532 [贾晓平, 林钦, 李纯厚, 等. 广东沿海牡蛎体 Pb 含量水平及时空变化趋势. *水产学报*, 2000, 24(6): 527–532]
- Jin SX, Zhu KC, Xu M. Studies on accumulative toxicity of cadmium in experimental mice. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36(08): 200–202 [金树兴, 朱奎成, 徐敏. 小鼠镉的蓄积性毒性试验研究. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(8): 200–202]
- Li J, Luan YN, Sun XY, *et al.* Research advances in remediation of heavy metal contaminated water bodies by aquatic plants. *World Forestry Research*, 2015, 28(2): 31–35 [李晶, 栾亚宁, 孙向阳, 等. 水生植物修复重金属污染水体研究进展. *世界林业研究*, 2015, 28(2): 31–35]
- Li WH, Liu YH. Analysis of arsenic speciation in sea fish and shellfish by using anion/cation exchange high performance chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39(10): 1577–1581 [李卫华, 刘玉海. 阴/阳离子交换色谱-电感耦合等离子体质谱法分析鱼和贝类海产品砷的形态. *分析化学*, 2011, 39(10): 1577–1581]
- Liu JM. Influence of main contaminants in water environment on aquatic organism. *Sichuan Environment*, 2015, 34(3): 69–72 [刘建明. 水体中主要污染物对水生生物的影响. *四川环境*, 2015, 34(3): 69–72]
- Matamoros V, Puigagut J, García J, *et al.* Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: A preliminary screening. *Chemosphere*, 2007, 69(9): 1374–1380
- Mauro M, Caradonna F, Klein CB. Dysregulation of DNA methylation induced by past arsenic treatment causes

- persistent genomic instability in mammalian cells. *Environment and Molecular Mutagenesis*, 2016, 57(2): 137–150
- Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard. Limit of pollutants in food(GB 2762-2012), 2013 [中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准. 食品中污染物限量(GB 2762-2012), 2013]
- Muñoz O, Devesa V, Suner MA, *et al.* Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(9): 4369–4376
- Nie YP, Wang XW, Wan JR, *et al.* Research progress on heavy metal (Pb, Zn, Cd, Cu) hyperaccumulating plants and strengthening measures of phytoremediation. *Ecological Science*, 2016, 35(2): 174–182 [聂亚平, 王晓维, 万进荣, 等. 几种重金属(Pb、Zn、Cd、Cu)的超富集植物种类及增强植物修复措施研究进展. *生态科学*, 2016, 35(2): 174–182]
- Patrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR, *et al.* Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 163(2): 203–207
- Qiu YW. Bioaccumulation of heavy metals both in wild and mariculture food chains in Daya Bay, South China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2015, 163(B): 7–14
- Sun J, Gu XY, Zhang AQ, *et al.* Organism qualities and pollution assessment at the Yellow Sea of Jiangsu Province. *Marine Sciences*, 2010, 34(6): 28–33[孙剑, 顾雪元, 张爱茜, 等. 江苏省黄海海域生物质量调查及污染评价. *海洋科学*, 2010, 34(6): 28–33]
- Sun S, Zhao YT, Wang LM, *et al.* Status of heavy metal pollution in the shellfish culture area of Shandong Province and the risk analysis of heavy metal elements in the shellfish. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 118–125[孙珊, 赵玉庭, 王立明, 等. 山东省主要贝类养殖区重金属环境状况及贝类安全风险. *渔业科学进展*, 38(4): 118–125]
- Sun XH, Ning HM, Li C, *et al.* Acute toxic effects of lead acetate on mice. *Journal of Northwest A and F University (Natural Sciences)*, 2014, 42(9): 11–16 [孙相和, 宁红梅, 李冲, 等. 醋酸铅对小鼠的急性毒性效应. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(9): 11–16]
- Tian J, Li C, Wan L, *et al.* The advances of heavy metal pollution in marine environment. *Fisheries Science*, 2009, 28(07): 413–418 [田金, 李超, 宛立, 等. 海洋重金属污染的研究进展. *水产科学*, 2009, 28(7): 413–418]
- Varsha G. Mammalian feces as bio-indicator of heavy metal contamination in Bikaner Zoological Garden, Rajasthan, India. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, 2013, 1(5): 1–4
- Wang MQ. Hazards and prevention of arsenic pollution in food. *China Brewing*, 2008(20): 87–88 [王明强. 食品中砷污染的危害及其防治. *中国酿造*, 2008(20): 87–88]
- Wang Y, Chen MM, Tan TT, *et al.* Research progress on arsenic species in seafood and their metabolic mechanisms. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(11): 256–265 [王瑛, 陈苗苗, 谭婷婷, 等. 海产品中的砷及其代谢机制的研究进展. *现代食品科技*, 2014, 30(11): 256–265]
- Wu FC, Feng CL, Cao YJ, *et al.* Toxicity characteristic of zinc to freshwater biota and its water quality criteria. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(4): 367–382 [吴丰昌, 冯承莲, 曹宇静, 等. 锌对淡水生物的毒性特征与水质基准的研究. *生态毒理学报*, 2011, 6(4): 367–382]
- Wu X, Gao M, Wang L, *et al.* The arsenic content in marketed seafood and associated health risks for the residents of Shandong, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 102: 168–173
- Yan Z, Wang W, Zhou J, *et al.* Screening of high phytotoxicity priority pollutants and their ecological risk assessment in China's surface water. *Chemosphere*, 2015, 128: 28–35
- Yang HF, Liang CS, Dong SL, *et al.* Research for hygienic standard of inorganic arsenic in foods. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2003, 15(1): 27–31 [杨惠芬, 梁春穗, 董仕林, 等. 食品中无机砷限量卫生标准的研究. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(1): 27–31]
- Yang WL, Lai ZN, Wei TL, *et al.* The content of lead in the aquatic products in Qingyuan Basin of Beijing River. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(3): 67–69, 75 [杨婉玲, 赖子尼, 魏泰莉, 等. 北江清远段水产品中铅含量调查. *淡水渔业*, 2007, 37(3): 67–69, 75]
- Yu XX, Peng BC. Accumulative toxicity and effects on marrow cell micronucleus rate and sperm formation of CrCl₃. *Journal of Hebei Medical University*, 1997, 18(3): 14–16 [余晓星, 彭宝成. 三氯化铬的蓄积毒性及其对骨髓细胞微核率和精子形成的影响. *河北医科大学学报*, 1997, 18(3): 14–16]
- Yu YJ, Fu YW, Sun P, *et al.* Screening analysis of characteristic pollutants in Songhua River in Jilin City. *Journal of Environmental Hygiene*, 2013, 3(3): 175–181, 185 [于云江, 付益伟, 孙朋, 等. 松花江吉林市江段水体特征污染物筛选研究. *环境卫生学杂志*, 2013, 3(3): 175–181, 185]
- Zhang JH, Ou Q. Situation and assessment of heavy metal contents in benthons in Pearl River estuary. *Marine Environmental Science*, 2005, 24(2): 50–52 [张敬怀, 欧强. 珠江口底栖生物重金属含量现状与评价. *海洋环境科学*, 2005, 24(2): 50–52]
- Zhang WD. Arsenic speciation and food safety in seafoods. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2007, 19(4): 345–350 [张文德. 海产品中砷的形态分析现状. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(4): 345–350]
- Zhang Y, Lu XQ, Liu HL, *et al.* Distribution characteristics and source identification of heavy metal in surface sediments of Bohai Bay near Tianjin. *Research of Environmental Sciences*, 2014, 27(6): 608–614 [张彦, 卢学强, 刘红磊, 等. 渤海湾天津段表层沉积物重金属分布特征及其来源解析. *环境科学研究*, 2014, 27(6): 608–614]
- Zhou DQ. The theories and cases of risk assessment on aquatic

- products safety. Qingdao: China Ocean University Press, 2013 [周德庆. 水产品安全风险评估. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2013]
- Zhou SJ, Dun ZJ, Liang JH, *et al.* Risk ranking method for chemical and biological hazards in food based on semi-quantitative risk assessment. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2015, 27(5): 576–585 [周少君, 顿中军, 梁骏华, 等. 基于半定量风险评估的食品风险分级方法研究. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(5): 576–585]
- Zhou ZY, Fan YB, Wang MJ. Fuzzing mathematics method in the comprehensive assessment of food contamination. *Environmental Science*, 2000, 21(3): 22–26 [周泽义, 樊耀波, 王敏健. 食品污染综合评价的模糊数学方法. *环境科学*, 2000, 21(3): 22–26]
- Zuo P, Wang YP, Min FY, *et al.* Distribution characteristic of heavy metals in surface sediments and core sediments of the Shenzhen Bay in Guangdong Province. *China Acta Oceanologica Sinica*, 2009, 28(6): 53–60

(编辑 陈严)

Hazard Analysis and Screening of the Prior Heavy Metals of Priority Pollution in Fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea

HAN Dandan^{1,2}, ZHAO Feng¹, MU Weili³, ZHANG Daoxu³, ZHOU Deqing¹

(1. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Penglai Jinglu Fishery Co., Ltd., Yantai 265600)

Abstract With increasingly serious heavy metal pollution in the aquatic environment, the pollution status in fish has affected the food safety and attracted much attention. It is urgent to know the condition of heavy metal pollution in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea. It is also crucial to know different metal pollutions in one fish species and to identify the prominent type of heavy metal. Here we analyzed the status of heavy metal pollution in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea based on the literature and historical data, and compared the different situations to determine the prior pollution. We analyzed the exceeding standard rate, the detection rate and the limitation standard of heavy metals and found the priority order as Cr, As, Cd, Pb and Hg. The prior pollution in fish in the Yellow Sea and the Bohai Sea were determined using the comprehensive evaluation method with the bio concentration factors (BCF), the toxicity effect, the pollution index and the exceeding standard rate. The score of Cd was the highest, and the order of scores was Cd > Hg > As* > Cr > Pb. Different fish species had different prior heavy metal pollution. Cd was the prior heavy metal in *Cynoglossus robustus* and *Scomberomorus niphonius*, and As* was the prior one in *Synechogobius hasta*. Then we conducted the validation experiment with samples including *C. robustus*, *Mugil cephalus*, *Synechogobius hasta*, *S. niphonius* and *Larimichthys polyactis* that were collected from eight coastal cities along the Yellow Sea and the Bohai Sea. The results of the validation experiments were consistent with those of the screening method, therefore the screening method should be reliable.

Key words Yellow Sea and Bohai Sea; Priority pollution of heavy metals; Screening; Comprehensive assessment

① Corresponding author: ZHOU Deqing, E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20170107001

http://www.yykxjz.cn/

李敏, 张继红, 吴文广, 刘毅, 王巍, 蔺凡, 马莎, 杨艳云. 獐子岛邻近海域悬浮颗粒物的时空分布特性. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 54-63

Li M, Zhang JH, Wu WG, Liu Y, Wang W, Lin F, Ma S, Yang YY. The spatial-temporal distribution of the suspended particulate matter in the water adjacent to the Zhangzidao Island. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 54-63

獐子岛邻近海域悬浮颗粒物的时空分布特性*

李敏^{1,3} 张继红^{2,3}^① 吴文广³ 刘毅³
王巍³ 蔺凡³ 马莎^{1,3} 杨艳云³



(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 根据2015年秋季(10月)和2016年冬季(1月)、春季(4月)、夏季(7月)4个航次的调查研究,分析了獐子岛养殖海域表、底层水体中总悬浮颗粒物(TPM)、颗粒有机物(POM)和颗粒有机物比例(PCOM, %)的时空分布特征,结合POM与叶绿素a(Chl-a)及环境因子的相关性分析,探讨了悬浮颗粒物的影响因素及其与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)底播养殖之间的潜在联系。结果显示,獐子岛海域TPM和POM的浓度变化范围分别为16.76~97.54、2.20~17.20 mg/L,年平均浓度分别为(31.65±9.58)、(6.97±2.08) mg/L。PCOM值的变化范围为8.69%~37.09%,平均值为(22.25±4.18)%。TPM浓度的季节变化趋势为秋季>春季>夏季>冬季,最大值出现在秋季表层。而POM和PCOM的最高值出现在夏季,冬季的值最低。POM与TPM的平面分布趋势相似,大部分海域的平面分布比较均匀;春、夏季POM的分布呈现中部略高、四周略低的特点,秋、冬季与之相反;夏季底层显著高于表层($P<0.01$),其他季节表、底层无显著差异($P>0.05$)。4个季节中,獐子岛海域的POM与Chl-a的含量呈极显著正相关关系($P<0.01$);其中,春季底层和夏季表层的POM与Chl-a均存在极显著正相关关系($P<0.01$)。另外,只有夏季表层POM与盐度之间存在显著负相关关系($P<0.05$),说明夏季陆源输入对该海域的悬浮颗粒有机物有显著影响。

关键词 獐子岛; 总悬浮颗粒物; 颗粒有机物; 时空分布特征

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0054-10

悬浮颗粒物包括浮游植物、浮游动物及其碎屑、微生物、无机颗粒等,是海水的重要组成成分,是各种营养盐的重要载体(逢勇等, 2008)。悬浮颗粒物不仅是海洋环境质量的评价指标,而且颗粒有机物(POM)也是滤食性贝类的主要食物来源,是海洋食物

链的物质基础(刘占飞等, 2000)。海水中悬浮颗粒物的数量和质量直接影响滤食性生物的滤食和生理反应,是制约滤食性生物的重要因素(匡世焕等, 1996),因此,了解悬浮颗粒物的时空分布特性对于滤食性贝类养殖活动具有重要的指导作用。

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014A01YY01)、国家“十二五”支撑计划(2011BAD13B06)和国家自然科学基金项目(41276172)共同资助[This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Chinese Academy of Fishery Sciences(2014A01YY01), National Science and Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period (2011BAD13B06), and National Natural Science Foundation of China (41276172)]. 李敏, E-mail: 1464365904@qq.com

^① 通讯作者: 张继红, 研究员, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-07, 收修改稿日期: 2017-02-10

獐子岛邻近海域是我国虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 的主产区(段丽琴等, 2015), 以往对该海域的调查多集中于浮游植物、营养盐、颗粒有机碳等研究(蒋增杰等, 2015; 张继红等, 2009; 刘毅等, 2016), 关于獐子岛邻近海域悬浮颗粒物的数量、质量及其与虾夷扇贝养殖关系的研究报道较少(李洪波等, 2001)。本研究根据獐子岛邻近海域 4 个季节的调查研究, 分析了该海域总悬浮颗粒物(TPM)和颗粒有机物(POM)的时空分布特性, 结合 POM 与叶绿素 a (Chl-*a*)及环境因子的相关性分析, 探讨了悬浮颗粒物的影响因素及其与虾夷扇贝底播养殖之间的潜在联系, 掌握了该海域滤食性生物的饵料质量及动态变化规律, 为北方海域虾夷扇贝的养殖容纳量评估及其底播养殖布局提供依据。

1 材料与方法

1.1 站位设置

2015 年 10 月和 2016 年 1、4、7 月共进行了 4 个航次的水文要素和悬浮颗粒物的综合调查, 调查海区位于辽东半岛东侧的黄海北部海域, 范围介于 38.8°~39.4°N、122.6°~123.3°E 之间。该海域的平均水深在 30 m 以上, 底播增殖是主要的养殖方式, 养殖种类有虾夷扇贝、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hanai*)、紫海胆(*Anthocidaris crassispina*)等。调查共布设 30 个站位(图 1), 由于海况条件限制, 2016 年 1 月只调查了 18 个站位。

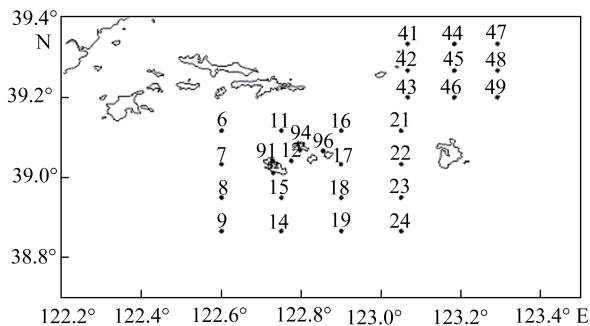


图 1 獐子岛邻近海域调查站位

Fig.1 Investigation stations in the Zhangzidao Island and the adjacent area

1.2 采样与分析

样品的采集与保存严格按照中华人民共和国质量监督检验检疫总局等(2007)规定的《海洋调查规范》(GB/T12763-2007)要求进行。用 Niskin 采水器在各调查站位取表层(水面下 1.0 m)、底层(离底 1.0 m)水样, 冷藏保存, 带回实验室分析; 采用 YSI-6600 多参数

水质分析仪(美国)对温度、盐度、溶氧、pH 等水环境参数进行现场测定。

悬浮颗粒物的测定采用重量法, 取 1000 ml 水样, 使用经过 450℃ 灼烧 4 h 后称重并做好标记(W_0)的空白 GF/C 玻璃纤维滤膜(直径为 47 mm)进行抽滤。首先, 将过滤后的滤膜在 60℃ 烘干 48 h 至恒重后称重(W_{60}), 再经过 450℃ 灼烧 4 h 后称重(W_{450})。TPM= $W_{60}-W_0$, POM= $W_{60}-W_{450}$ 。称重用电子天平, 精确到 0.00001 g。Chl-*a* 的测定采用萃取荧光法, 准确量取 1000 ml 水样经孔径为 0.45 μm 的醋酸纤维滤膜过滤, 90% 丙酮萃取后, 用叶绿素荧光仪(Turner Designs 998-7210, 美国)测定。

1.3 悬浮颗粒物的数量和质量浓度评估

调查海区悬浮颗粒物的数量浓度用 TPM 和 POM (mg/L) 的含量表示, 质量浓度根据 POM 含量(mg/L)占 TPM 含量(mg/L)的百分比[PCOM(%)=POM/TPM×100]和 Chl-*a* 含量(μg/L)占 POM 含量(mg/L)的比重 SES_Q(μg/g)进行评估。

1.4 数据分析

实验数据采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS Statistics 21.0 软件进行统计分析。单因子方差分析(One-way, ANOVA)检验组间差异, Pearson 相关分析检验 POM、TPM 与 Chl-*a* 及环境因子回归关系显著性, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。等值线图采用 Suffer 8.0 软件绘制。

2 结果

2.1 獐子岛邻近海域的水环境参数

獐子岛邻近海域的水环境参数见表 1。从表 1 可以看出, 调查期间, 水温的变化范围为 4.33~23.19℃, 春季和夏季底层水温显著低于表层($P<0.01$), 秋、冬季节水温的垂直分布比较均匀; 盐度的变化范围为 30.55~32.44, 夏季表层的盐度明显低于其他季节; pH 的变化范围为 8.02~8.62, 表、底层的最大值均出现在夏季, 最小值出现在秋季。

2.2 TPM、POM、Chl-*a* 的季节变化

獐子岛邻近海域表、底层 TPM 平均浓度的季节性变化见图 2。从图 2 可以看出, 4 次调查中, TPM 的范围为 16.76~97.54 mg/L, 平均浓度为(31.65±9.58) mg/L, TPM 平均值的季节变化趋势为秋季>春季>夏季>冬季。LSD 多重比较结果显示, 冬季 TPM 显著低于春、秋季($P<0.05$), 其他季节之间差异不显著($P>0.05$)。调查海区表、底层 TPM 的平均值分别为

表1 獐子岛邻近海域环境参数的季节性变化

Tab.1 Seasonal variation of the parameters in the Zhangzidao Island and the adjacent area

月份 Month	水温 Temperature (°C)		盐度 Salinity		pH	
	表层 Surface	底层 Bottom	表层 Surface	底层 Bottom	表层 Surface	底层 Bottom
1月 Jan.	4.40±0.66	4.33±0.96	32.44±0.15	32.39±0.08	8.36±0.83	8.34±0.86
4月 Feb.	5.53±0.78	4.85±0.40	31.76±0.36	31.82±0.22	8.14±0.29	8.16±0.29
7月 Jul.	23.19±1.21	15.32±2.98	30.55±1.29	32.07±0.29	8.41±0.12	8.62±0.10
10月 Oct.	17.43±0.57	17.43±0.73	32.04±0.29	31.92±0.13	8.02±0.15	8.04±0.15

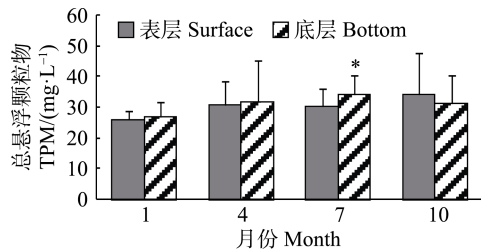


图2 獐子岛邻近海域表、底层 TPM 平均浓度的季节变化

Fig.2 Seasonal variation of average TPM in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

*为底层与表层差异显著($P<0.05$), 下同

* Represents significant difference, the same as below

(28.46±2.53)、(31.70±3.31) mg/L。除夏季底层 TPM 的浓度显著高于表层外($P<0.01$), 其他季节表、底层的 TPM 浓度无显著性差异($P>0.05$)。

獐子岛邻近海域表、底层 POM 平均浓度的季节性变化见图3。从图3可以看出, 4个季节调查中, POM 的范围为2.20~17.20 mg/L, 平均浓度为(6.97±2.08) mg/L。其中, 夏季 POM 的平均值最高[(8.14±1.49) mg/L], 冬季最低[(4.35±0.87) mg/L]。POM 与 TPM 浓度的季节变化趋势相似, 冬季表、底层的 POM 平均浓度显著低于春、夏、秋季($P<0.01$), 仅夏季表、底层 POM 的平均浓度之间存在极显著性差异($P<0.01$), 底层 [(8.63±1.40) mg/L]明显高于表层[(7.65±1.43) mg/L], 其他季节表、底层差异性不显著($P>0.05$)。

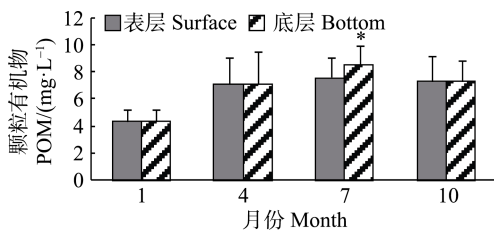


图3 獐子岛邻近海域表、底层 POM 平均浓度的季节变化

Fig.3 Seasonal variation of average POM in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

獐子岛邻近海域表、底层平均 Chl-a 浓度的季节性变化见图4。从图4可以看出, 4个季节调查中,

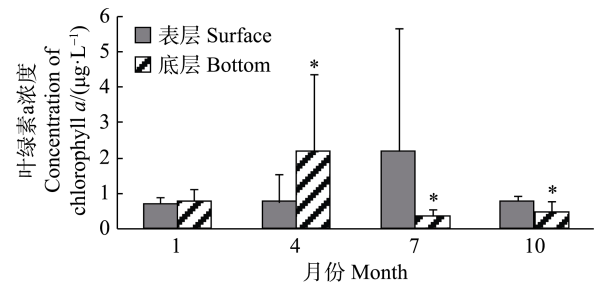


图4 獐子岛邻近海域平均叶绿素 a 浓度的季节变化

Fig.4 Seasonal variation of average Chlorophyll a in the Zhangzidao Island and the adjacent area

Chl-a 的浓度范围为 0.03~12.96 µg/L, 平均浓度为 (1.05±1.71) µg/L。Chl-a 浓度季节变化明显, 春季的总平均浓度最高, 为(1.46±1.79) µg/L, 秋季最低, 为(0.61±0.29) µg/L。表层平均浓度的最高值出现在夏季, 为(2.18±3.49) µg/L, 最低值出现在春季, 为(0.75±0.80) µg/L; 底层平均浓度的最高值出现在春季, 为(2.18±2.20) µg/L, 最低值出现在夏季, 为(0.33±0.21) µg/L。春季表层 Chl-a 浓度显著低于底层($P<0.05$), 夏、秋季表层 Chl-a 浓度均显著高于底层($P<0.05$)。冬季表、底层 Chl-a 浓度无显著性差异($P>0.05$)。

獐子岛调查海区 4 个季节表、底层 PCOM 平均值见图5。从图5可以看出, PCOM 变化范围为 8.69%~37.09%, 平均值为(22.25±4.18)%。季节变化趋势为夏季>秋季>春季>冬季。除秋季底层 PCOM 的平均值高于表层外, 其他季节底层均低于表层。春季

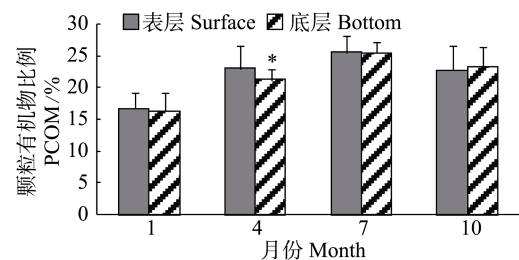


图5 獐子岛邻近海域表、底层 PCOM 平均值的季节变化

Fig.5 Seasonal variation of average PCOM in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

表、底层之间差异极显著($P < 0.01$), 其他季节表、底层之间均无显著性差异($P > 0.05$)。

獐子岛邻近海域 4 个季节悬浮颗粒物的 SES_Q 平均值见图 6。从图 6 分析表明, 獐子岛邻近海域 4 个季节的 SES_Q 平均值为 $(0.15 \pm 0.20) \mu\text{g}/\text{mg}$, 春季 SES_Q 平均值最高, 为 $(0.20 \pm 0.23) \mu\text{g}/\text{mg}$, 秋季最低, 为 $(0.09 \pm 0.05) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。除冬季表、底层之间 SES_Q 无显著性差异($P > 0.05$)外, 其他季节表、底层之间差异极显著($P < 0.01$); 表层 SES_Q 的最大值出现在夏季, 底层最大值出现在春季。

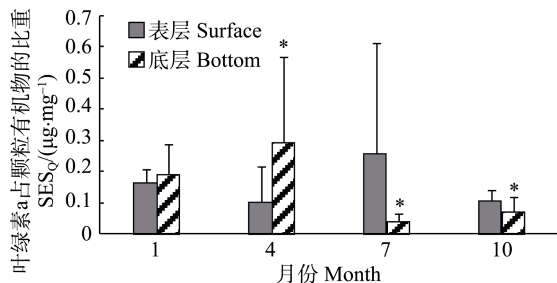


图 6 獐子岛邻近海域表、底层 SES_Q 平均值的季节变化

Fig.6 Seasonal variation of average SES_Q in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

2.3 悬浮颗粒物的时空分布特征

2.3.1 TPM 獐子岛邻近海域 TPM 浓度的平面分布情况见图 7。从图 7a 和图 7e 可以看出, 冬季 TPM 的平面分布总体上较为均匀, 表层 TPM 的高值区在小耗子岛(17 号站)(图 1)附近海域; 底层 TPM 分别在獐子岛的东部及东南部海域出现 2 个高值区。从图 7b 和图 7f 可以看出, 春季表层 TPM 的高值区出现在东南部外海区, 17 号站附近浓度较高, 东北部海域浓度略低; 底层 TPM 的高值区出现在南部外海区, 浓度达 $97.54 \text{ mg}/\text{L}$, 乌蟒岛东北部区域等值线稀疏, 浓度变化小。从图 7c 和图 7g 可以看出, 夏季表、底层 TPM 的分布趋势相似, 中部海域浓度略低; 獐子岛南部外海区出现高值区, 浓度达 $49 \text{ mg}/\text{L}$, 41~48 号站(图 1)浓度偏高。从图 7d 和图 7h 可以看出, 秋季表层 TPM 呈现东北高、西南低的趋势; 底层 TPM 的高值区在獐子岛附近海域, 等值线较密集, 其他区域浓度变化很小。

2.3.2 POM 獐子岛邻近海域 POM 浓度的平面分布情况见图 8。从图 8a 和图 8e 可以看出, 冬季 POM 与 TPM 的分布趋势相似, 表层 POM 浓度的高值区出现在 17 号站附近(图 1), 底层 POM 在獐子岛东南海域出现高值区, 由此向周围递减。从图 8b 和图 8f 可

以看出, 春季表层 POM 的高值区出现在 17 号站, 达到 $13.60 \text{ mg}/\text{L}$, 低值区在 22 号站附近(图 1), 为 $2.2 \text{ mg}/\text{L}$ 左右; 底层靠近外海的南部区域 POM 浓度较高, 其他区域浓度较低且分布较为均匀。从图 8c 和图 8g 可以看出, 夏季 POM 分布的总体趋势是中部海域浓度略低, 逐渐向四周增大。表层 POM 的高值区在西南部、东南部以及乌蟒岛东北部; 底层 POM 在獐子岛附近及南部海域的等值线较密集, 浓度变化较大。14 号站附近有高值区(图 1), 浓度达 $12.68 \text{ mg}/\text{L}$ 。从图 8d 和图 8h 可以看出, 秋季 POM 与 TPM 的平面分布趋势相一致。表层 POM 的高值区出现在 16 号站附近(图 1), 达到 $12.30 \text{ mg}/\text{L}$; 底层 POM 的高值区集中在獐子岛等岛屿附近, 呈现出中部浓度略高, 四周浓度略低的趋势。

2.4 悬浮颗粒物的质量状况

獐子岛邻近海域各季节表、底层的 PCOM 平面分布状况见图 9。从图 9 总体来看, 除秋季外, 大部分海域的水平分布比较均匀。从垂直分布看, 表层 PCOM 略高于底层。从图 9a、图 9e 可以看出, 冬季表、底层 PCOM 的分布趋势相似, 从东南部向西北部递减, 中南部海域浓度变化较小。春季表层 PCOM 的高值区在 13 号站附近(图 1), 东南部海域值略低; 底层分布趋势与表层相反, 岛屿附近及东南部海域的 PCOM 值略高。从图 9c、图 9g 可以看出, 夏季表层 PCOM 的高值区在西南部外海区, 其他海域分布比较均匀; 底层 PCOM 大部分海域分布比较均匀, 獐子岛附近海域的等值线较密集, 水平差异较大。从图 9d、图 9h 可以看出, 秋季表层 PCOM 在 13 号站附近出现高值区, 并由此向周围递减, 东北部海域 PCOM 值略低; 底层是中部 PCOM 值略低, 四周略高, 岛屿附近海域的水平分布差异较大。

2.5 POM 与 Chl-a 的关系

对獐子岛邻近海域各季节表、底层的 POM 与 Chl-a 之间的线性回归分析表明, 只有春季底层和夏季表层的 POM 与 Chl-a 间存在极显著的正相关关系($P < 0.01$)(图 10 和图 11)。线性趋势表示 POM 浓度与 Chl-a 之间密切对等, 春季底层和夏季表层 POM 的浓度均随着 Chl-a 浓度的升高而升高。

3 讨论

3.1 悬浮颗粒物浓度的时空分布特征

与相同海域的历史数据及其他海域的数据相比,

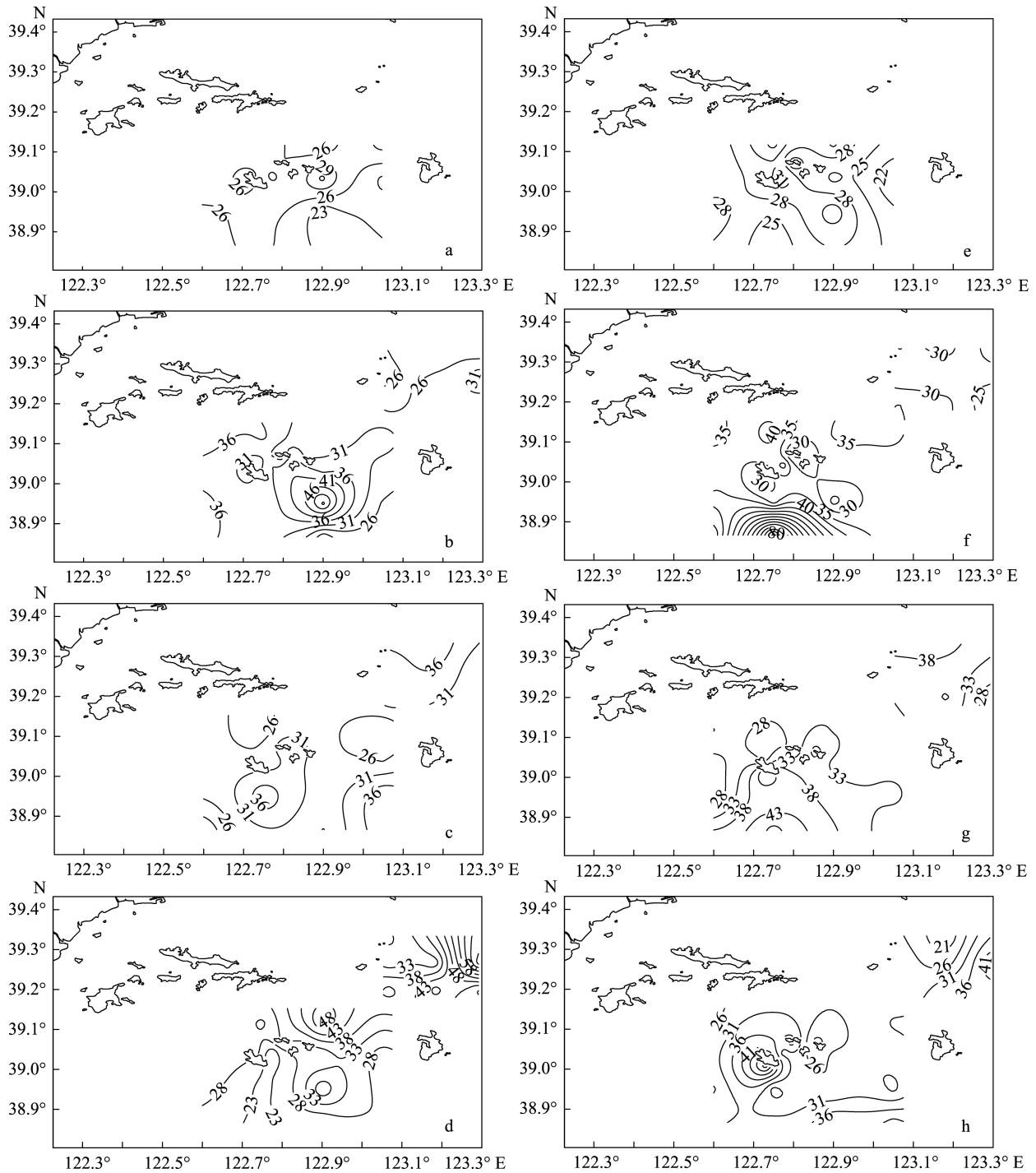


图 7 獐子岛邻近海域四季表层、底层 TPM 浓度的平面分布特征

Fig.7 Seasonal and spatial distribution of TPM in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

表层: a: 冬季; b: 春季; c: 夏季; d: 秋季; 底层: e: 冬季; f: 春季; g: 夏季; h: 秋季
Surface: a: Winter; b: Spring; c: Summer; d: Autumn; Bottom: e: Winter; f: Spring; g: Summer; h: Autumn

獐子岛邻近海域 TPM 和 POM 的浓度较高,虽然与已有报道的 TPM 的季节变化趋势一致,都是秋季>春季>夏季>冬季,但本研究的 TPM 浓度为 (31.65 ± 9.58) mg/L,显著高于历史数据 3.17~4.71 mg/L (李洪波等, 2010)。

同时,与其他养殖海湾相比,獐子岛邻近海域 TPM 和 POM 的平均浓度均高于莱州湾(梁兴明等, 2001)和桑沟湾(匡世焕等, 1996)。

本研究发现,高浓度 TPM 主要出现在春、夏季

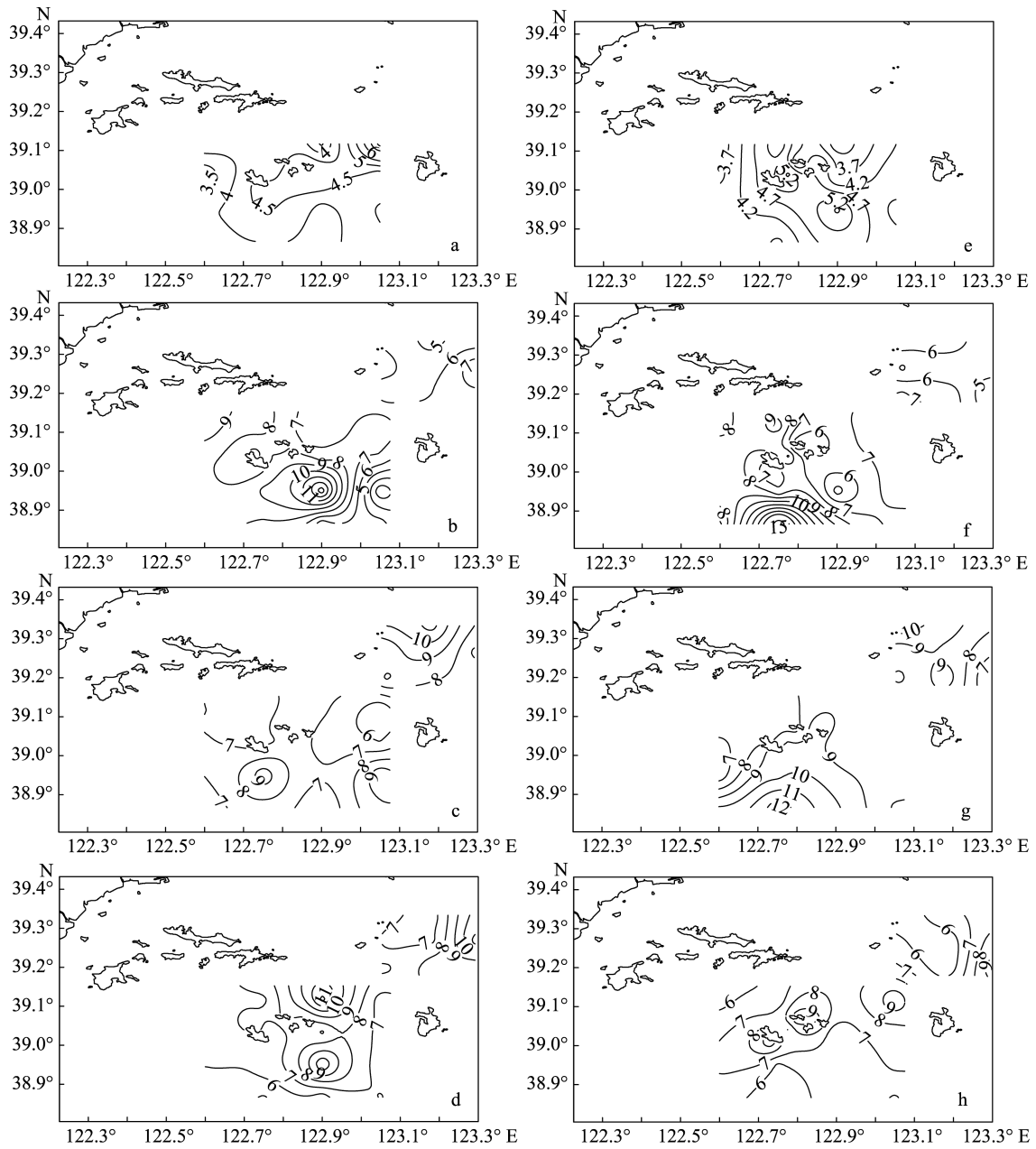


图 8 獐子岛邻近海域四季表层、底层 POM 浓度的平面分布特征

Fig.8 Seasonal and spatial distribution of POM in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

表层: a: 冬季; b: 春季; c: 夏季; d: 秋季; 底层: e: 冬季; f: 春季; g: 夏季; h: 秋季
Surface: a: Winter; b: Spring; c: Summer; d: Autumn; Bottom: e: Winter; f: Spring; g: Summer; h: Autumn

的 14、17 及 43 号站及秋季的 47 号站附近海域, 最高浓度可达 97.54 mg/L, 出现在位于獐子岛南部外海区的 14 号站底层, 可能是由外海水带来的外源性悬浮颗粒物增加了 TPM 的浓度。根据室内模拟实验的结果, 在 90.72 mg/L 浓度下, 虽然虾夷扇贝的死亡率不高, 仅为 10%, 但是滤水率和摄食率均降低(待发表数据)。马明辉等(2004)研究发现, 高浓度的 TPM

会对虾夷扇贝的生长产生负面影响。因此, 在该区域进行虾夷扇贝底播增殖时应该予以重视。

从 TPM 和 POM 浓度的垂直分布来看, 只有夏季底层的 TPM 和 POM 浓度显著高于表层。由于獐子岛调查海域位于黄渤海交汇处, 水域开阔, 从大、小潮流的结果看, 流速的最小值为 23.61 cm/s, 最高值为 90.04 cm/s, 平均值为 48.83 cm/s, 水体交换能力良好

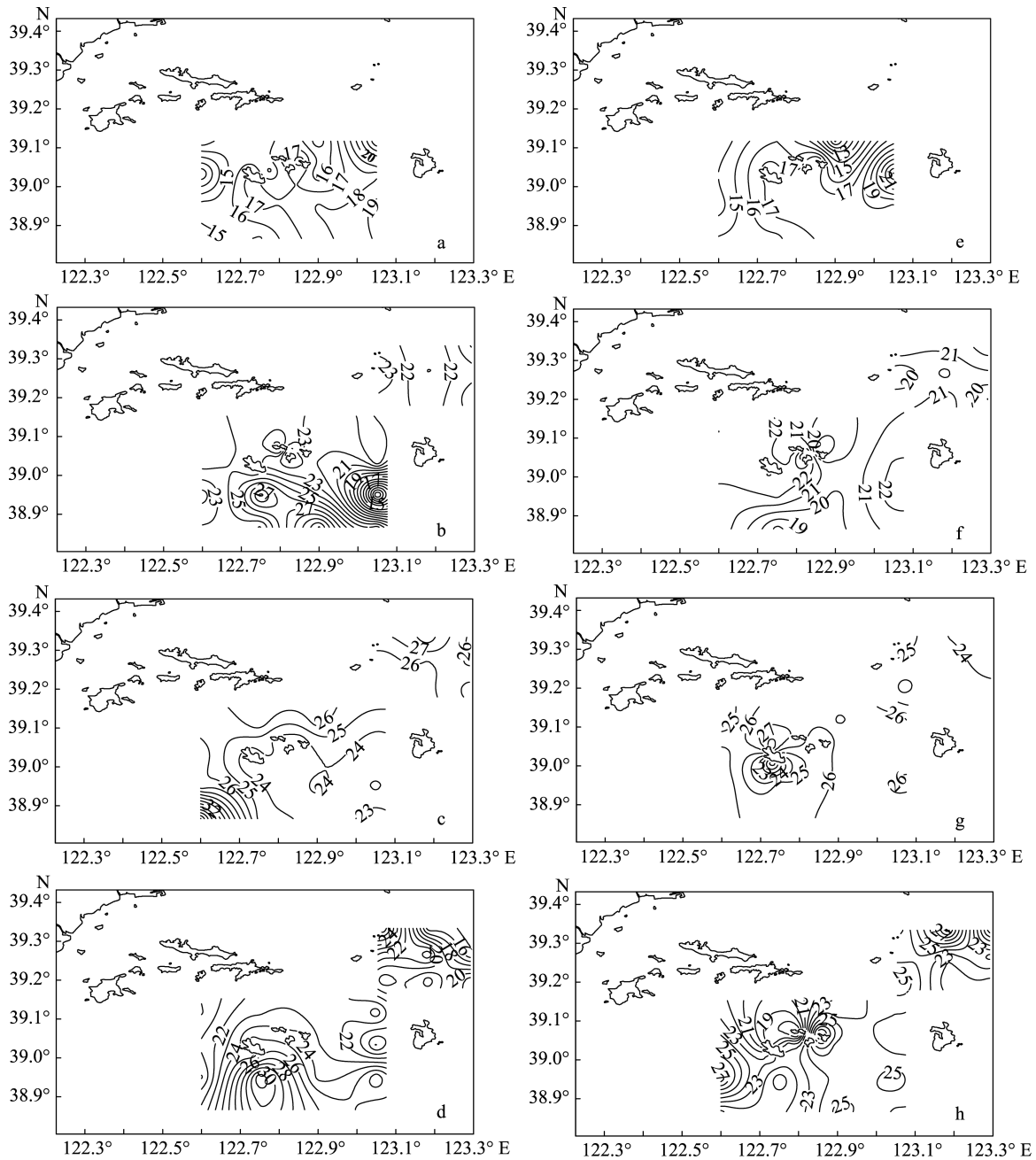


图9 獐子岛邻近海域四季表层、底层 PCOM%的平面分布特征

Fig.9 Seasonal and spatial distribution of PCOM% in the surface and bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area

表层: a: 冬季; b: 春季; c: 夏季; d: 秋季; 底层: e: 冬季; f: 春季; g: 夏季; h: 秋季
Surface: a: Winter; b: Spring; c: Summer; d: Autumn; Bottom: e: Winter; f: Spring; g: Summer; h: Autumn

(张继红等, 2008)。再加上海区内养殖筏架设施较少, 不会对海流造成阻碍作用。因此, 该海区 TPM 和 POM 的垂直分布整体上比较均匀。夏季由于风力作用的减弱以及强烈的日照辐射, 在獐子岛南部海域会出现比较明显的温跃层, 随深度的增加, 潮流的速度也随之降低, 水域的垂直混合能力进一步下降, 底层沉积物的再悬浮作用随之减弱, 表层有机碎屑及其他外源颗

粒物质更容易在重力的作用下向底层沉降(韦钦胜等, 2013), 辅以水体交换所带来的外源输入, 使得底层悬浮颗粒物的含量显著高于表层。

浮游植物是海水中悬浮颗粒物的重要物质组分, 海水中的 Chl-*a* 可以代表浮游植物的现存数量(李绪禄等, 2013), 分析海水中 Chl-*a* 与 POM 的相关关系可了解有生命的浮游植物对 POM 的贡献(赵明辉等, 2014)。

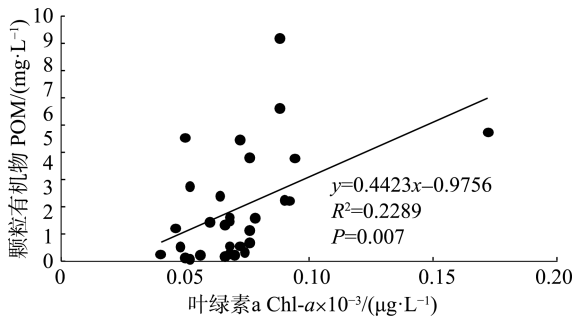


图 10 獐子岛邻近海域春季底层 POM 与 Chl-a 的关系
Fig.10 Scatter plotting of POM versus Chl-a in the bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area in spring

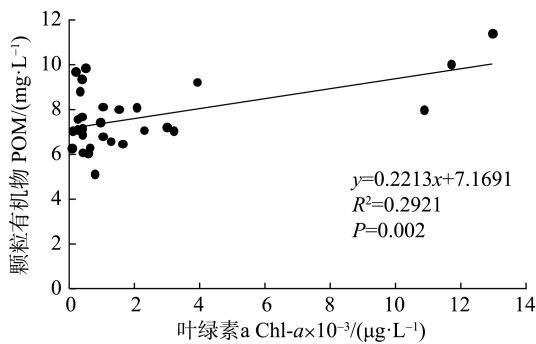


图 11 獐子岛邻近海域夏季表层 POM 与 Chl-a 的关系
Fig.11 Scatter plotting of POM versus Chl-a in the bottom seawater in the Zhangzidao Island and adjacent area in summer

在北黄海海域,通常夏季随着水温升高,光照强度增大,再加上陆源输入的营养盐补充增多,刺激表层浮游植物大量生长繁殖,这就使得夏季表层水中POM的含量随着叶绿素浓度的增加而增高。然而,由于夏季层化现象增强,表、底层混合不均,使得表、底层的叶绿素浓度存在显著差异。但是,研究发现,夏季底层的POM浓度与表层没有显著性差异,底层POM的来源有待进一步研究。另外,调查结果显示,只有夏季表层POM与盐度之间存在显著的负相关关系($r=-0.423$, $P<0.05$) (图12),且夏季表层盐度呈现由南向北递减的趋势,低值区主要出现在41、42、43、44、45号站位,可以推测夏季陆地径流冲淡水对该海域表层POM有一定程度的补充。

3.2 悬浮颗粒物与虾夷扇贝养殖之间的关系

悬浮颗粒物的数量和质量会制约滤食性动物的生长(Bayne *et al*, 1992)。虾夷扇贝作为獐子岛海域主要的底播增殖品种之一,其滤食性行为和生理反应与海水中悬浮颗粒物的质量状况密不可分。Bayne 等(1987)研究发现,除 POM 外,饵料质量 PCOM 能够促进饵料的吸收效率,对双壳类类的生长具有显著影

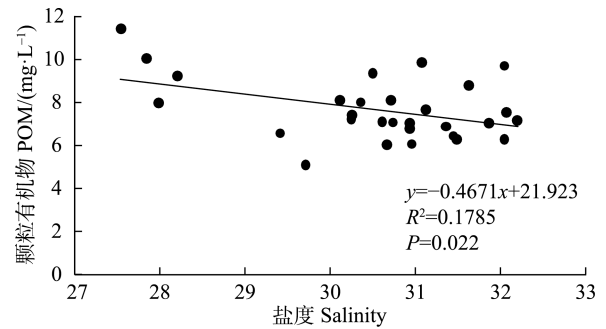


图 12 獐子岛邻近海域夏季表层 POM 与盐度的关系
Fig.12 Scatter plotting of POM versus salinity in the bottom seawater in the Zhangzidao Island and the adjacent area in summer

响。本研究中,PCOM 值在夏季最高,冬季最低,春、秋季没有显著性差异($P>0.05$),PCOM 平均值在 22.25%左右(图 7)。秋季 PCOM 值仅低于夏季,且底层高于表层,加上秋季水温适宜,适合底播虾夷扇贝的摄食生长。扇贝等滤食性动物对叶绿素含量较高的悬浮颗粒物摄食选择性较大(Shumway *et al*, 1985),因此,Chl-a 含量占 POM 含量的比重 SES_Q 成为评价悬浮颗粒物质量的指标,根据 SES_Q 值的大小分为 3 个等级:低等质量($<0.1 \times 10^{-3}$),中等质量($0.1 \sim 1.0 \times 10^{-3}$),高等质量($>1.0 \times 10^{-3}$) (Macdonal *et al*, 1994)。獐子岛养殖海域悬浮颗粒物的质量(SES_Q)除秋季处于低等质量水平外,其他季节均处于中等质量水平,春季达到最高值,年平均值为 0.15×10^{-3} ,处于中等质量水平。该结果与李洪波等(2010年)的调查结果一致。

悬浮颗粒物的数量和质量是多种因素共同作用的结果,需要进行长期监测和数值模型的研究,以了解獐子岛及邻近海域悬浮颗粒物浓度的时空变化特性和规律,为虾夷扇贝的底播增殖提供理论指导。

参 考 文 献

- Bayne BL, Hawkins AJS, Navarro E. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1987, 111(1): 1-22
- Bayne BL, Hawkins AJS. Ecological and physiological aspects of herbivory in benthic suspension-feeding molluscs. *Systematics Association Special*. Clarendon Press (Oxford), 1992, 46: 265-288
- Duan LQ, Song JM, Yuan HM, *et al*. Estimation of nutrient level and fishery yield of *Patinopecten yessoensis* in mariculture area near the Zhangzidao Island of the north Yellow Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(4): 1004-1013 [段丽琴, 宋金明, 袁华茂, 等. 北黄海獐子岛养殖海域营养水平与虾

- 夷扇贝增殖渔获量评估. 生态学报, 2015, 35(4): 1004–1013]
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Specifications for oceanographic survey-Part 9: Guidelines for marine ecological survey (GB/T 12763.9-2007). Beijing: Standards Press of China. 2007[中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范-第9部分: 海洋生态调查指南(GB/T 12763.9-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007]
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Specifications for oceanographic survey-Part 6: Marine biological survey (GB/T12763.6-2007). Beijing: Standards Press of China. 2007[中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范-第6部分: 海洋生物调查(GB/T 12763.6-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007]
- Jiang ZJ, Du MR, Jiang X, *et al.* Size-fraction of phytoplankton and photosynthetic carbon flow pathway in the coastal area of Zhangzidao Island. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(4): 36–43 [蒋增杰, 杜美荣, 姜绪, 等. 獐子岛海域浮游植物的粒径结构及碳流途径. 渔业科学进展, 2015, 36(4): 36–43]
- Kuang SH, Fang JG, Sun HL, *et al.* Seston dynamics in Sanggou Bay. Marine Fisheries Research, 1996, 17(2): 60–67[匡世焕, 方建光, 孙慧玲, 等. 桑沟湾海水中悬浮颗粒物的动态变化. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 60–67]
- Li HB, Liang YB, Yuan XT, *et al.* Distribution of organic matter in Changhai waters, Liaoning. Marine Environmental Science, 2010, 29(6): 853–858 [李洪波, 梁玉波, 袁秀堂, 等. 辽宁长海海域有机物含量分布概况. 海洋环境科学, 2010, 29(6): 853–858]
- Li XL, Zhang JX, Zhou YP, *et al.* Temporal and spatial distributions of dissolved organic nitrogen in the Mirs Bay from 2000 to 2010. China Environmental Science, 2013, 33(10): 1799–1807[李绪录, 张军晓, 周毅频, 等. 2000–2010年大鹏湾溶解有机氮的时空分布. 中国环境科学, 2013, 33(10): 1799–1807]
- Liang XM, Fang JG, Cui Y, *et al.* Seston dynamics in bay scallop (*Argopecten irradians* Lamarck) mariculture areas of Laizhou Bay. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32(6): 636–639 [梁兴明, 方建光, 崔毅, 等. 莱州湾海湾扇贝养殖区海水中悬浮颗粒的动态变化. 海洋与湖沼, 2001, 32(6): 636–639]
- Liu Y, Zhang JH, Du MR, *et al.* Spatial-temporal distribution of particulate organic carbon and particulate nitrogen in the mariculture areas of Zhangzhi Island. Marine Sciences, 2016, 40(5): 9–18[刘毅, 张继红, 杜美荣, 等. 獐子岛养殖海域颗粒有机碳、颗粒氮的时空分布特征. 海洋科学, 2016, 40(5): 9–18]
- Liu ZF, Peng XY, Xu L, *et al.* Particulate organic carbon (POC) in Taiwan Strait during two cruises in summer 1997 and winter 1998. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2000, 19(1): 95–101[刘占飞, 彭兴跃, 徐立, 等. 台湾海峡1997年夏季和1998年冬季两航次颗粒有机碳研究. 台湾海峡, 2000, 19(1): 95–101]
- Ma MH, Gong Q, Liu SX, *et al.* Study on the lethal effects of suspended solids on Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. Marine Environmental Science, 2004, 23(3): 46–48[马明辉, 宫强, 刘述锡, 等. 悬浮物对虾夷扇贝致死效应的研究. 海洋环境科学, 2004, 23(3): 46–48]
- Macdonald BA, Ward JE. Variation in food quality and particle selectivity in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). Marine Ecology Progress, 1994, 108(3): 251–264
- Pang Y, Yan RR, Li YP, *et al.* Contribution of combined action of exogenous source and internal load on water nutrient in Taihu Lake. Journal of Hydraulic Engineering, 2008, 39(9): 1051–1059[逢勇, 颜润润, 李一平, 等. 内外源共同作用对太湖营养盐贡献量研究. 水利学报, 2008, 39(9): 1051–1059]
- Shumway SE, Cucci TL, Newell CR. Particle selection ingestion and absorption in filter feeding bivalves. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1985, 91(1–2): 77–92
- Wei QS, Wang HW, Ge RF, *et al.* Vertical distribution of suspended matter and implications in the southern Yellow Sea. Advances in Earth Science, 2013, 28(3): 374–390[韦钦胜, 王辉武, 葛人峰, 等. 南黄海悬浮体的垂直分布特性及其指示意义. 地球科学进展, 2013, 28(3): 374–390]
- Zhang JH, Fang JG, Jiang ZJ, *et al.* Seasonal variation of primary production and spatial-temporal distribution of chlorophyll a in mariculture area of Zhangzidao Island. Marine Fisheries Research, 2008, 29(4): 22–28[张继红, 方建光, 蒋增杰, 等. 獐子岛养殖水域叶绿素含量时空分布特征及初级生产力季节变化. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 22–28]
- Zhang JH, Wang W, Jiang ZJ, *et al.* Distribution features of nitrogen and phosphorus in Zhangzi Island maricultural area. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(6): 89–95[张继红, 王巍, 蒋增杰, 等. 獐子岛养殖海域氮、磷的分布特征. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 89–95]
- Zhao MH, Li XL. Temporal and spatial distributions and sources of particulate organic matter in the Shenzhen Bay and adjacent coastal waters from 2000 to 2011. China Environmental Science, 2014, 34(11): 2905–2911[赵明辉, 李绪录. 2000–2011年深圳湾及邻近水域颗粒有机物的来源和时空分布. 中国环境科学, 2014, 34(11): 2905–2911]

The Spatial-Temporal Distribution of the Suspended Particulate Matter in the Water Adjacent to the Zhangzidao Island

LI Min^{1,3}, ZHANG Jihong^{2,3①}, WU Wenguang³, LIU Yi³,
WANG Wei³, LIN Fan³, MA Sha^{1,3}, YANG Yanyun³

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Water samples at different depth were collected during 4 cruises nearby the Zhangzidao Island in October 2015 and January, April and July 2016. The spatial-temporal distribution of total particulate matter (TPM), particulate organic matter (POM) and organic content (defined as PCOM, %) in the surface and bottom layers were analyzed. With the results of the regression analysis of POM with Chlorophyll a (Chl-*a*) and other environmental factors, the potential interaction between the scallop culture and the suspended particulate matter was analyzed, and the major influencing factors of the latter were also discussed. The results were described as follows. Concentration ranges of TPM and POM nearby the Zhangzidao Island were (16.760~97.54) mg/L and (2.20~17.20) mg/L respectively, and their annual averages were (31.65±9.58) and (6.97±2.08) mg/L. The PCOM ranged from 8.69% to 37.09%, with an average of (22.25±4.18)%. The TPM concentration showed a seasonal trend as autumn>spring>summer>winter. The highest TPM concentration was found in the surface layer in autumn. However, the highest and lowest POM concentrations and the organic contents appeared in summer and winter respectively. The concentrations of POM and TPM had a similar pattern of horizontal distribution in most areas. Higher POM concentration was found in the central area compared to the surroundings in spring and summer, and the opposite pattern was found in autumn and winter. The concentrations of POM and TPM in the bottom water were significantly higher ($P<0.01$) than in the surface water in summer, but there was no difference in the other seasons ($P>0.05$). In all 4 seasons, there was significantly positive correlation ($P<0.01$) between POM and Chl-*a* nearby the Zhangzidao Island. In addition, there was also positive correlation ($P<0.01$) between POM and Chl-*a* in the bottom layer in spring and the surface layer in summer. A negative correlation was found between POM and salinity only in the surface water in summer, which indicated that the land sources might affect the concentration of POM in summer.

Key words Zhangzidao Island; Total particulate matter; Particulate organic matter; Spatial-temporal distribution

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

DOI: 10.11758/yykxjz.20161114001

http://www.yykxjz.cn/

崔雪森, 周为峰, 唐峰华, 戴阳, 张胜茂, 程田飞. 基于约束线性回归的柔鱼栖息地指数渔场预报模型构建. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 64–72

Cui XS, Zhou WF, Tang FH, Dai Y, Zhang SM, Cheng TF. The construction of habitat suitability index forecast model of *Ommastrephes bartramii* fishing ground based on constrained linear regression. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 64–72

基于约束线性回归的柔鱼栖息地指数 渔场预报模型构建*



崔雪森^① 周为峰 唐峰华 戴 阳 张胜茂 程田飞

(中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室 上海 200090)

摘要 柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)是我国在西北太平洋重要的商业捕捞对象,对其渔场进行准确预报是提高渔业生产能力的重要内容。本研究分别选取 2005~2013 年我国在该海域的柔鱼渔获量和捕捞努力量作为计算适宜度指数(SI)的 2 种指标,利用包括海表温度、叶绿素 a (Chl-a)浓度、表温梯度强度和 100 m 水深的 Argo 浮标水温数据在内的海洋环境因子,通过非线性回归,生成了不同环境因子的 SI 曲线。在考虑约束条件的前提下,建立 2 种柔鱼渔场的栖息地指数(HSI)模型,并利用逐步回归剔除不显著的解释变量。2 种模型拟合优度比较的结果显示,利用渔获量建立的模型具有更高的精度,其中,7~11 月模型的调整后相关系数分别为 0.853 ($P<0.001$)、0.773 ($P<0.001$)、0.789 ($P<0.001$)、0.745 ($P<0.001$)和 0.724 ($P<0.0001$)。各环境因子的 SI 权重系数符合约束条件,并随着季节的变化,权重值有所不同。在主要渔汛期间(7、8 和 10 月),100 m 水深温度的 SI 对 HSI 得分起到了最关键作用;而在渔汛末期(11 月),与海表温度相关的 SI 成为影响 HSI 的最重要因子。利用该模型对 2014 年进行预报实验,预报结果与实际渔场在空间分布上具有一致性。全年统计结果显示,高 HSI (>0.7)的区域渔获量占总渔获量的 49.06%,而低 HSI (<0.3)区域渔获量仅占 9.06%,表明该模型具有一定的渔场预报能力。

关键词 柔鱼; 西北太平洋; 约束条件; 栖息地指数

中图分类号 S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0064-09

柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)是西北太平洋重要的经济鱼种之一,其种群通常分为东部秋生群、中部秋生群、西部冬春生群和中东部冬春生群,其中,西部冬春生群位于 170°E 以西渔场(Yatsu *et al*, 1998; Chen *et al*, 2003),是中国在西北太平洋从事鱿钓作业的传统捕捞对象(陈新军等, 2011)。作为一种短生命周期的生态机会主义者,柔鱼的资源丰度与分布对产

卵与索饵场的环境条件很敏感(Chen *et al*, 1999; Nigmatullin *et al*, 2001)。根据该鱼种的这一特性,国内外学者分别设计了诸如 MaxEnt(Alabia *et al*, 2015a、2015b)、GLM 和 GAM(Tian *et al*, 2009b)、贝叶斯方法(Cao *et al*, 2014; 崔雪森等, 2015)、支持向量机(崔雪森等, 2016)等多种柔鱼资源评估和渔场分析预报模型。除此之外,栖息地指数(Habitat suitability

* 国家科技支撑计划(2013BAD13B01)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015T07)共同资助[This work was supported by National Key Technology R&D Program (2013BAD13B01) and Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes (2015T07)].

① 通讯作者: 崔雪森, 副研究员, E-mail: cui1012@sh163.net

收稿日期: 2016-11-14, 收修改稿日期: 2017-01-08

index, HSI)模型也在渔业领域得到了越来越广泛的应用(Vinagre *et al*, 2006; 冯波等, 2007; Chen *et al*, 2009; 丁琪等, 2015), 柔鱼渔场与环境因子之间关系的研究也有相关报道(陈新军等, 2009; Tian *et al*, 2009a; Chen *et al*, 2010; Igarashi *et al*, 2013)。

相关渔业研究中, HSI 模型的最基本算法包括连乘法、最小值法、最大值法、几何平均法和算术平均法等 5 种(龚彩霞等, 2011), 其中算术平均法是较为常用的一种方法, 在柔鱼的相关研究中, 通常比其他方法能更好地定义最适栖息地指数(陈新军等, 2009; Chen *et al*, 2010)。过去算术平均法中各个要素的适宜度指数多采用相同的权重, 近年来, 学者越来越注重不同环境因子对综合栖息地指数的贡献大小。通过专家知识赋予各个环境因子的 SI 变量不同的权重, 或采用对不同变量权重的排列组合, 用枚举法从中筛选出最优模型的权重, 从而提升了分析和预报渔场的准确性(胡贯宇等, 2015; 范江涛等, 2016)。但专家知识常带有一定的主观性, 而通过权重组合筛选得到的结果也可能只是一组近似的最优权重组合, 也未考虑不同环境因子 SI 之间的共线性问题。另外, 当环境变量数目增大到一定程度时, 上述枚举法也会更繁琐。

本研究拟在算术平均法 HSI 模型基础上, 利用约束条件的线性回归, 得出不同环境适宜指数权重的最优值组合, 从而为简化模型参数筛选过程、提升利用模型分析和预报渔场精度提供一定的参考。

1 材料与方 法

1.1 数据处理

1.1.1 渔获数据 本研究中的渔获数据由上海海洋大学鱿钓技术组提供, 时间范围为 2005~2013 年, 空间范围为 145°~170°E、35°~47°N, 内容包括生产日期、空间信息(经度和纬度)、产量、作业次数等, 按 1°×1°网格分月进行统计。尽管单位捕捞努力量渔获量(Catch per unit effort, CPUE)常用作渔业资源的丰度指数, 但在基于商业目的捕捞数据中, CPUE 与资源量的关系常会受到渔民捕捞行为的影响(易明华等, 2009), 因此, 并不能很好地表征柔鱼的资源丰度。虽然渔获量受捕捞努力量的影响, 但多年累加的渔获量重心可反映柔鱼资源的空间位置变化(唐峰华等, 2015), 因此, 本研究利用分月的多年累加渔获量作为计算适宜度指数的指标。另外, 以分月累加捕捞努力量(作业渔船数)为基础计算适宜度指数, 以便同由渔获计算的适宜度指数模型进行比较, 从而获得更优

的模型。

1.1.2 环境数据来源与处理 大量研究表明, 柔鱼渔场与海表温度(SST, °C)、叶绿素 a 浓度(Chl-a, mg/m³)和 SST 梯度强度(Grad, °C/km)有密切关系(Chen *et al*, 1999; 余为等, 2015; Chen *et al*, 2014)。本研究中 SST 与 Chl-a 的月平均数据均从 NASA 的 Oceancolor 网站 (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>) 获得, 按照 1°×1°网格进行平均化处理, 并根据 Pi 等(2010)的方法计算 SST 梯度强度。本研究对 SST 梯度和 Chl-a 分布进行 D'Agostino 检验, 结果显示, 偏度值(Skewness)分别达到 2.082($P<0.001$)和 0.659($P<0.001$), 均为显著正偏分布, 因此, 对其均取自然对数, 分别记作 lnGrad 和 lnChl-a。

另外, 研究表明, 西北太平洋柔鱼西部渔场水温垂直结构对柔鱼资源分布有重要影响, 白天该水域柔鱼栖息水层约为 100 m (陈新军, 2015)。本研究将该深度水温(T_{100} , °C)也作为参考环境因子之一。该数据由日本海洋地球科技机构(JAMSTEC)提供 (<http://www.jamstec.go.jp/>), 为 Argo 月平均客观分析结果, 水平空间分辨率为 1°×1°。

1.2 HSI 模型的建立

HSI 模型是 20 世纪 80 年代美国鱼类和野生动物保护署提出的, 是定量研究生物对栖息地适应程度与栖息地生境因子之间关系的经典方法, 模型所得指数越高, 栖息地质量越高, 指数取值范围在 0~1 之间(Bain *et al*, 1982)。

任中华等(2014)在长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)渔场分析中采用了非线性回归, 获得各环境的 SI 曲线。本研究也采用了类似方法, 以渔获量或捕捞努力量作为因变量, 分别建立与各环境因子的回归曲线(公式 1), 再对拟合值进行归一化处理, 从而确定各环境因子的 SI(公式 2)。

$$Y = ae^{b(m-u)^2} \quad (1)$$

$$SI = Y/a = e^{b(m-u)^2} \quad (2)$$

式中, a 、 b 和 u 均为待定的参数, Y 为渔获产量或捕捞努力量, m 为环境变量的集合, 即 $m \in (SST, \lnGrad, \lnGhla, T_{100})$ 。

同时, 分别以渔获量和捕捞努力量为基础, 计算综合栖息地指数(HSI)(Tian *et al*, 2009; Igarashi *et al*, 2013)。根据 Brooks(1997)的建议, 当 $0 \leq HSI \leq 0.3$ 时, 可视为低质量栖息地, 而当 $0.7 \leq HSI \leq 1$ 时为高质量栖息地, 本研究将以此为标准对预报结果进行统计, 并对渔场预报效果进行评价。

1.3 带有约束的线性回归

将历史数据中各环境因子的适宜度指数与综合适宜指数匹配后,在一定约束条件下进行回归。回归模型形式(公式3)为:

$$HSI = \sum_m \beta_m SI_m \quad (3)$$

约束条件为:

$$0 \leq \beta_m \leq 1 \text{ 且 } \sum_m \beta_m = 1$$

式中, m 定义同 1.2, β 为回归方程中解释变量的系数,利用统计分析软件 SAS(Statistical analysis system)进行求解。

由于 SI 均由环境因子与渔获量或捕捞努力量的关系建立,在理论上二者不应出现负相关,但在 SAS 中不能以不等式的形式对 β_m 进行限定,而一旦结果中 β_m 出现负值的情况,则可能是由于不同环境因子

的 SI 之间存在多重共线性造成,这会导致模型估计失真。针对这种可能出现的情况,本研究拟通过以 AIC(Akaike information criterion)最大值为筛选标准的逐步回归方法,调整进入模型的解释变量个数,确保模型具有正确的物理意义。另外,模型添加的约束条件是否恰当,取决于模型在施加约束条件前后的解释能力有无较大变化,或者是约束条件对模型的影响是否显著。如果约束条件对模型的影响显著,则可判定模型中的约束条件不成立(Pringle *et al*, 1971)。

2 结果

2.1 各环境因子的 SI 拟合参数

根据各月份渔获量和捕捞努力量在不同环境因子下的分布情况,利用公式(1)分别进行非线性回归,获得各环境因子的 SI 拟合曲线的参数值(表 1 和表 2),

表 1 以渔获量为基础的 4 种环境因子 SI 曲线的拟合参数
Tab.1 Fitting parameters of SI curves for 4 environmental factors based on catch

环境因子 Environmental factor	参数 Parameter	7月 July	8月 August	9月 September	10月 October	11月 November
海表温度 SST	a	1396.093	9733.155	4420.723	4377.309	2734.804
	b	-0.097	-0.640	-0.135	-0.280	-0.456
	u	18.156	18.727	18.112	15.005	13.232
叶绿素 a 浓度 lnChl- a	a	1520.892	5738.650	3789.270	4044.069	2790.793
	b	-3.568	-5.178	-2.363	-5.028	-8.856
	u	-1.809	-1.650	-1.173	-0.768	-1.010
SST 梯度强度 lnGrad	a	2938.713	9902.128	9882.691	4913.897	1371.952
	b	-9.871	-8.577	-15.175	-4.799	-1.198
	u	-4.646	-4.398	-4.329	-4.305	-4.183
100 m 海水温度 T_{100}	a	1921.776	7131.652	5625.570	2898.164	1493.591
	b	-0.155	-0.308	-0.224	-0.104	-0.109
	u	8.659	4.627	3.654	4.726	6.311

表 2 以捕捞努力量为基础的 4 种环境因子 SI 曲线的拟合参数
Tab.2 Fitting parameters of SI curves for 4 environmental factors based on fishing effort

环境因子 Environmental factor	参数 Parameter	7月 July	8月 August	9月 September	10月 October	11月 November
海表温度 SST	a	1274.084	3336.964	1861.086	2778.124	1299.522
	b	-0.107	-0.398	-0.110	-0.409	-0.363
	u	18.995	18.918	18.363	15.360	13.170
叶绿素 a 浓度 lnChl- a	a	2648.514	3400.434	2479.571	4862.455	1924.206
	b	-12.063	-4.206	-2.093	-12.414	-5.219
	u	-1.982	-1.645	-1.280	-0.737	-1.203
SST 梯度强度 lnGrad	a	3778.298	5496.910	6365.371	4900.782	1742.264
	b	-3.743	-3.301	-5.574	-3.099	-0.389
	u	-4.622	-4.485	-4.349	-4.471	-3.319
100 m 海水温度 T_{100}	a	1625.169	2524.857	2498.248	1622.894	804.219
	b	-0.118	-0.218	-0.233	-0.074	-0.104
	u	9.188	4.822	3.748	5.398	6.619

P 值均小于 0.0001, 由 b 和 u 值计算各环境因子 SI 值(公式 2)。

2.2 模型选择与模型参数

利用不同的 SI 来源(渔获量和捕捞努力量)的环境因子 SI 值和综合栖息地指数 HSI, 在约束条件(公式 3)限制下进行逐步回归, 构建 7~11 月的渔预报模型。对模型进行检验, 调整后相关系数见表 3($P < 0.001$)。

由表 3 可知, 当以渔获量作为 SI 来源构建模型时, 各月调整后相关系数在 0.724~0.853 之间, 全年平均值为 0.777, 均大于以捕捞努力量为 SI 来源的模型, 表明以渔获量为基础的模型拟合结果更为准确。

其中, 7~9 月以及 11 月的模型剔除了作用不显著的变量(7 月为 SI_{InGrad} , 8、9 月均为 SI_{SSST} , 11 月为 $SI_{InChl-a}$); 而在 10 月的模型中, 4 个解释因子均得到保留。经 t 检验, 各解释变量 P 值均小于 0.05。各月份模型中解释变量的系数和均为 1 且都为正值, 符合事先的约束条件。RESTRICT 值均不显著, 表明约束条件对模型的解释能力无明显影响。所有模型中方差膨胀因子(VIF)均小于 10, 说明解释变量之间不存在多重共线性现象, 从而不会影响到回归模型参数的正确估计。最大参数估计值和最大第 II 类平方和的变量随季节有所变化, 7 月为 SI_{T100} 和 $SI_{InChl-a}$, 8 月均为 SI_{T100} , 9 月为 $SI_{InChl-a}$, 10 月均为 SI_{T100} , 而 11 月均为 SI_{SSST} (表 4)。

表 3 基于 2 种不同 SI 来源的模型拟合优度

Tab.3 The goodness-of-fit of models based on 2 different SI sources

SI 来源 Source of SI	调整后相关系数 Adjusted correlation coefficient					
	7 月 July	8 月 August	9 月 September	10 月 October	11 月 November	全年平均 Annual average
渔获量 Catch	0.853	0.773	0.789	0.745	0.724	0.777
捕捞努力量 Fishing effort	0.485	0.606	0.566	0.564	0.477	0.540

表 4 回归模型的各项参数估计

Tab.4 Parameter estimation of regression model

月份 Month	变量 Variable	参数估计值 Parameter estimation	标准误差 Standard error	t 统计量 t -Statistic	P 值 P value	第 II 类平方和 Type II SS	方差膨胀因子 VIF
7 月 July	SI_{SSST}	0.258	0.075	3.450	0.001	1.328	5.635
	SI_{T100}	0.436	0.074	5.890	0.000	3.864	4.386
	$SI_{InChl-a}$	0.306	0.049	6.270	0.001	4.372	1.575
	RESTRICT	0.824	2.667	0.310	0.758	0.011	
8 月 August	SI_{T100}	0.477	0.053	8.940	0.000	9.179	1.222
	SI_{InGrad}	0.381	0.067	5.700	0.000	3.731	3.246
	$SI_{InChl-a}$	0.142	0.068	2.090	0.038	0.501	2.783
	RESTRICT	2.835	2.278	1.240	0.214	0.178	
9 月 September	SI_{T100}	0.268	0.077	3.500	0.001	1.335	4.288
	SI_{InGrad}	0.234	0.047	4.950	0.000	2.666	0.908
	$SI_{InChl-a}$	0.498	0.084	5.890	0.000	3.783	5.436
	RESTRICT	2.783	2.103	1.320	0.187	0.191	
10 月 October	SI_{SSST}	0.153	0.067	2.290	0.023	0.635	2.237
	SI_{T100}	0.365	0.083	4.420	0.000	2.367	4.866
	SI_{InGrad}	0.206	0.058	3.520	0.001	1.503	2.074
	$SI_{InChl-a}$	0.276	0.080	3.440	0.001	1.433	4.890
	RESTRICT	-4.352	2.493	-1.750	0.081	0.369	
11 月 November	SI_{SSST}	0.401	0.072	5.590	0.000	3.478	1.669
	SI_{T100}	0.289	0.098	2.940	0.004	0.958	4.683
	SI_{InGrad}	0.310	0.070	4.410	0.000	2.159	3.353
	RESTRICT	-0.641	1.998	-0.320	0.750	0.011	

2.3 2014年预报结果检验

将2014年7~11月的环境数据分别输入模型,计算该海域柔鱼渔场的HSI值,与各月的相对渔获量值进行叠加,结果见图1。其中,各月渔获量的相对值高低采用四分位数的级别来表示(1~4级依次增高)。

结果显示,综合适宜度指数高值在7月处于40°N左右,主要分布在155°E以西和160°E以东两块水域,实际生产主要在西部的高HSI值区;8月预报渔场向东北方向移动,与实际渔场移动方向一致,9月的预报和实际渔场面积均达到最大;10~11月渔场向西南方向移动。总体上看,HSI相对较大值(暖色)区域和实际渔场的位置大体接近或重合,二者的移动方向在空间上具有一致性。统计结果见表5,2014年HSI>0.7的渔区(高质量栖息地)的产量占全年总产量的49.06%,而低质量栖息地的渔区(HSI<0.3)中的渔获量的占比不足10%。从分月产量分布看,7~10月产量

占比随着HSI 3个级别(栖息地质量由低到高)依次递增,而11月HSI介于低和高质量栖息地之间的产量百分比最高,达42.12%,说明该月预报效果相对稍差。

3 讨论

西北太平洋柔鱼属于外洋性高度洄游的头足类。在渔汛初期,柔鱼向北或东北洄游,进入黑潮与亲潮交汇区,8~10月主要分布在亲潮前锋区域及其周边水域。10~11月后,柔鱼随着亲潮冷水团的扩展向南洄游(陈新军,1995),其渔场分布、变动与海洋生物、物理因子关系极其密切(Chen *et al*, 1999; Ichii *et al*, 2009; Chen *et al*, 2014; 余为等, 2015)。本研究虽未直接使用环境因子建立模型,但模型中某个环境SI变量的存在与否以及系数大小的变动,在一定程度上也代表了环境因子对渔场影响程度的变化。研究表明,在不同月份不同环境因子对渔场分布的作用也有所差异。

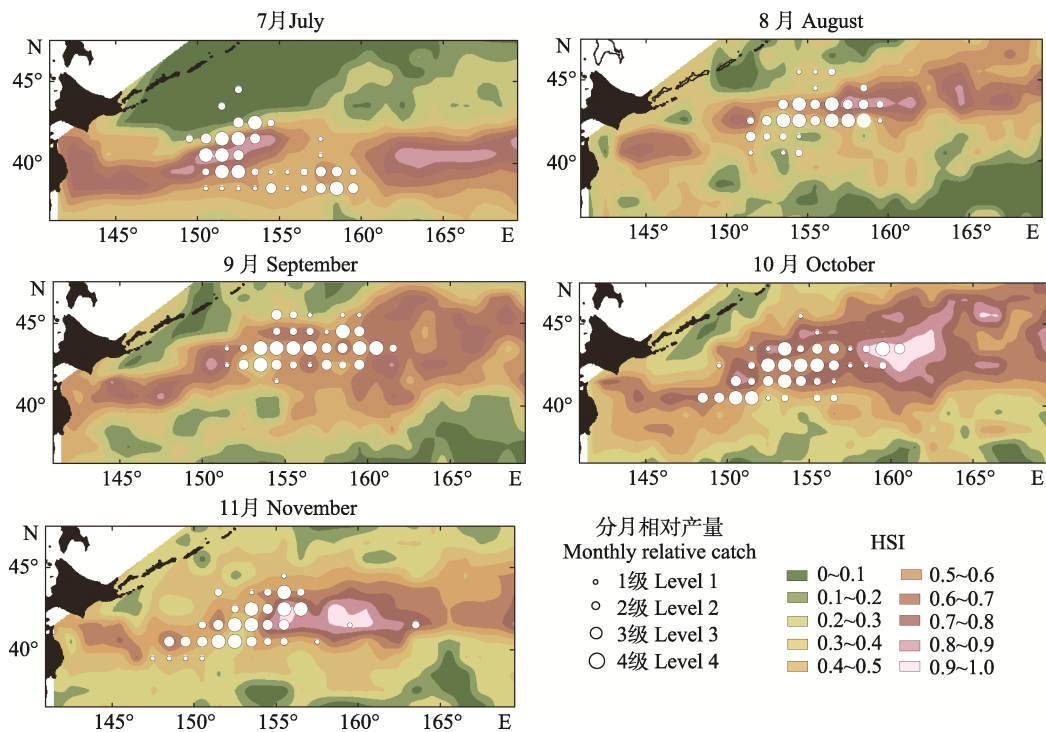


图1 2014年实际作业渔场与HSI模型预报结果比较

Fig.1 The comparison of practical fishing grounds and predicted ones based on HSI model

表5 2014年实际产量在不同HSI级别中所占比例

Tab.5 Proportion of practical catch for different levels of HSI in 2014 (%)

HSI 级别 HSI level	实际渔获产量占比 Proportion of practical total catch					
	7月 July	8月 August	9月 September	10月 October	11月 November	全年 Full year
0~0.3	6.77	16.10	4.48	0.01	22.69	9.06
0.4~0.7	34.75	33.68	47.53	45.02	42.12	41.88
0.7~1	58.49	50.23	47.99	54.97	35.19	49.06

3.1 不同季节的环境因子重要性分析

研究表明, SST 对柔鱼渔场的分布影响显著(陈新军, 1995; Tian *et al.*, 2009), 但由于柔鱼具有垂直洄游现象, 一般白天栖息水层较深, 因此, 深层水温结构在渔场形成中起到了重要的作用(王尧耕等, 2005)。超声波发射器得到的信号显示, 西部冬春生种群白天(日出 1 h 后到日落 1 h 前)较高频率的栖息深度应为 120 m 左右(酒井等, 2016), 而 0~100 m 温度梯度是影响渔获量主要因子之一(陈新军等, 2004)。村田等(1983)认为, 北太平洋 170°E 以西海域的主要分布水域, 6~8 月 100 m 水深的水温与柔鱼渔场有密切关系: 其中, 6 月位于黑潮暖水分支的 10°C 等温线, 7 月和 8 月位于黑潮分支与亲潮前锋之间的 5°C 等温线附近。表 4 显示, 7、8 和 10 月 SI_{T100} 系数在模型中具有最大权重或最高的第 II 类平方和, 表明了 100 m 水深温度的 SI 对 HSI 的起到了最重要作用, 也间接反映了该水层水温对渔场的较大影响, 这与之前的学者所得出的结论一致。同时, 从模型参数表中也可发现, 尽管 100 m 水深温度在几乎整个渔汛期中都起到了重要的作用, 但当进入 11 月后, 其作用有所减弱(表 4)。该月与 SST 相关的 SI 成为影响综合适应度指数的最重要因子。11 月以后亲潮势力增强, 柔鱼会随着亲潮的南下而向南洄游, 因此, 在渔汛期后期, 亲潮 SST 的特征等值线应成为确定渔场位置的重要参考指标。

柔鱼在夏秋季索饵洄游阶段, 渔场位置主要处于黑潮锋面附近; 而到了冬季的产卵洄游阶段, 中心渔场集中于亲潮的锋面或暖水团中(陈新军, 1995; 余为等, 2015)。由此可知, 柔鱼渔场与水温的锋面关系相当密切。本研究显示, 除 7 月外, 柔鱼的综合适应度指数都与海表温度梯度 SI 显著相关($P < 0.001$), 说明锋面对柔鱼的汇聚作用明显。另一方面, 因 Chl-*a* 浓度与柔鱼饵料生物密切相关(余为等, 2015), 因此, 其对渔场的作用也不可忽略。从柔鱼产量与 Chl-*a* 浓度的关系来看, 柔鱼渔发期 Chl-*a* 含量分布集中, 并呈偏态分布(王文宇等, 2003)。在本研究中, 7~10 月模型中与 Chl-*a* 相关的 SI 变量均表现为显著($P < 0.05$), 也印证了这一点。而到了 11 月, 随着水温降低, 模型中与 Chl-*a* 浓度相关的 SI 变量因不显著而在逐步回归中剔除。Wang 等(2010)研究表明, 11 月北太平洋叶绿素平均浓度在整个渔汛期处于最高水平, 叶绿素分布较均匀。同时, 进入 10、11 月后, 随着海水混合的增加和层化的减弱, 对于某些鱼类[(如秋刀鱼(*Cololabis saira*))]来说, 决定渔场位置和洄游路

线的主要因子不再是食物, 而是生理忍耐温度(Saitoh *et al.*, 1986)。可能正是由于以上原因, 使得该月份的叶绿素浓度不再成为影响柔鱼分布的显著因子, 取而代之的是与海水温度相关的环境因子。

3.2 模型的检验精度问题

2014 年的检验结果虽能在一定程度上体现出本模型的预报效果, 但与前人的相关研究比较, 预报精度并无明显提高, 究其原因可能有以下三方面: (1)环境指标的选择不同。本研究采用了海表温度、叶绿素浓度、SST 梯度和 100 m 水深温度 4 个因子构建模型, 过去类似研究中所涉及的环境指标还包括表层或次表层盐度(SSS)、海面高度(SSHA)等(Chen *et al.*, 2010; Igarashi *et al.*, 2013), 环境指标的不同导致了预报能力的差异。(2)空间分辨率的设定问题。考虑到 Argo 数据的空间分辨率较低, 本研究以 1°×1°为空间单位构建了模型, 而过去研究多采用 0.5°×0.5° (Tian *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010)。较低的空间分辨率会损失更多的有用环境细节信息, 从而降低了模型的预报能力。(3)空间上固定的约束权重系数。陈新军等(2007)研究表明, 不同海域柔鱼分布的适宜环境会随着空间位置的改变而发生变化。如在 150°E 以西海域, 柔鱼的最适 SST 为 13~18°C, 150°~165°E 海域为 14~18°C, 165°~180°E 海域为 11~14°C。而本模型在整个渔场范围内都采用了固定的约束权重系数, 从而导致某些月份预报结果与实际生产位置有所偏离。

3.3 与其他模型比较

鱼类通常会受多个环境因子的影响, 因此, 将多个适宜度指数相结合, 计算其综合的适宜度指数, 其物理意义明确, 相对于神经网络、支持向量机等黑盒模型, 更便于直接对海洋环境与渔场关系做出合理解释。传统渔业 HSI 的应用研究中, 不同环境的 SI 权重值通常由渔业专家知识获得, 但该方法带有一定的主观判断成分(Prager *et al.*, 1990)。冯永玖等(2014)通过遗传算法自动优化鱼类 HSI 的建模并获取参数, 但该模型复杂性和建模难度均较高。本研究通过带约束条件的回归, 计算出各个环境因子 SI 的不同权重, 从而体现出各个栖息地变量的相对重要性, 过程相对容易。

另一方面, 本研究中由于考虑了回归系数的约束条件, 使该模型在应用中也受到了一定的限制。如果参数 RESTRICT 值过大, 就有可能影响模型的参数估计的正确性。同时, 解释变量间的多重共线性问题也是值得注意的一点。尤其是当观测数量相对解释变

量不大时,问题可能更为突出。在这种情况下,可结合 Lasso 回归等方法,消除多重共线性带来的负面影响,从而对回归系数给出更为稳健的估计(易雨君等, 2013)。

综上所述,本研究在前人 HSI 模型已有成果的基础上,利用带约束的线性回归方法,获得了不同环境 SI 的最佳权重组合和参数估计,构建了西北太平洋柔鱼渔场的 HSI 预报模型,具有一定的实用性。研究表明,该方法不仅有利于分析不同环境因子对渔场生成的重要性,而且也降低 HSI 模型结构的复杂度提供了一种有效手段。

参 考 文 献

- Alabia ID, Saitoh S, Mugo R, *et al.* Identifying pelagic habitat hotspots of neon flying squid in the temperate waters of the central North Pacific. *PLoS One*, 2015a, 10(11): e0142885
- Alabia ID, Saitoh S, Mugo R, *et al.* Seasonal potential fishing ground prediction of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the western and central North Pacific. *Fisheries Oceanography*, 2015b, 24(2): 190–203
- Bain MB, Bain JL. Habitat suitability index models: Coastal stocks of striped bass. U.S. Fish and Wildlife Service, Office of Biological Services, 1982, FWS/OBS–82/10.1.29
- Brooks RP. Improving habitat suitability index models. *Wildlife Society Bulletin*, 1997, 25(1): 163–167
- Cao J, Chen X, Tian S. A Bayesian hierarchical DeLury model for stock assessment of the west winter-spring cohort of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the northwest Pacific Ocean. *Bulletin of Marine Science*, 2014, 91(1): 1–13
- Chen CS, Chiu TS. Abundance and spatial variation of *Ommastrephes bartramii* (Mollusca: Cephalopoda) in the eastern North Pacific observed from an exploratory survey. *Acta Zoologica Taiwanica*, 1999, 10(2): 135–144
- Chen CS, Chiu TS. Variations of life history parameters in two geographical groups of the neon flying squid, *Ommastrephes bartramii*, from the North Pacific. *Fisheries Research*, 2003, 63(3): 349–366
- Chen X, Li G, Feng B, *et al.* Habitat suitability index of Chub mackerel (*Scomber japonicus*) from July to September in the East China Sea. *Journal of Oceanography*, 2009, 65(1): 93–102
- Chen X, Tian S, Chen Y, *et al.* A modeling approach to identify optimal habitat and suitable fishing grounds for neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean. *Fishery Bulletin*, 2010, 108(1): 1–14
- Chen X, Tian S, Guan W. Variations of oceanic fronts and their influence on the fishing grounds of *Ommastrephes bartramii* in the Northwest Pacific. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 33(4): 45–54
- Chen XJ, Cao J, Liu BL, *et al.* Stock assessment and management of *Ommastrephes bartramii* by using a Bayesian Schaefer model in the Northwestern Pacific Ocean. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1572–1581 [陈新军, 曹杰, 刘必林, 等. 基于贝叶斯 Schaefer 模型的西北太平洋柔鱼资源评估与管理. *水产学报*, 2011, 35(10): 1573–1581]
- Chen XJ, Liu BL, Tian SQ, *et al.* Forecasting the fishing ground of *Ommastrephes bartramii* with SST-based habitat suitability modelling in Northwestern Pacific. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(6): 707–713 [陈新军, 刘必林, 田思泉, 等. 利用基于表温因子的栖息地模型预测西北太平洋柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)渔场. *海洋与湖沼*, 2009, 40(6): 707–713]
- Chen XJ, Tian SQ. Effects of SST and temp-spatial factors on abundance of neon flying squid *Ommastrephes bartrami* in the Northwestern Pacific using generalized additive models. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007(2): 104–133 [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 XJ, Xu LX. Analysis of relationship between fishing ground of *Ommastrephes bartrami* and surface water temperature and its vertical distribution from 150°E to 165°E in the Northwestern Pacific. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(2): 36–44 [陈新军, 许柳雄. 北太平洋 150°E ~ 165°E 海域柔鱼渔场与表温及水温垂直结构的关系. *海洋湖沼通报*, 2004(2): 36–44]
- Chen XJ. An approach to the relationship between the squid fishing ground and water temperature in the Northwestern Pacific. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1995, 4(3): 181–185 [陈新军. 西北太平洋柔鱼渔场与水温因子的关系. *上海水产大学学报*, 1995, 4(3): 181–185]
- Chen XJ. Fisheries resources and oceanography. Beijing: China Ocean Press, 2015 [陈新军. 渔业资源与渔场学. 北京: 海洋出版社, 2015]
- Cui XS, Tang FH, Zhang H, *et al.* The establishment of Northwest Pacific *Ommastrephes bartramii* fishing ground forecasting model based on naive Bayes method. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(2): 37–43 [崔雪森, 唐峰华, 张衡, 等. 基于朴素贝叶斯的西北太平洋柔鱼渔场预报模型的建立. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(2): 37–43]
- Cui XS, Tang FH, Zhou WF, *et al.* Fishing ground forecasting model of *Ommastrephes bartramii* based on support vector machine (SVM) in the Northwest Pacific. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(5): 1–7 [崔雪森, 唐峰华, 周为峰, 等. 基于支持向量机的西北太平洋柔鱼渔场预报模型构建. *南方水产科学*, 2016, 12(5): 1–7]
- Ding Q, Chen XJ, Wang JT. Comparison habitat suitability index model of *Illex argentinus* and its application into fishing ground forecasting. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 8–13 [丁琪, 陈新军, 汪金涛. 阿根廷滑柔鱼 (*Illex argentinus*) 适宜栖息地模型比较及其在渔场预报中的应用. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 8–13]
- Fan JT, Chen ZZ, Zhang J, *et al.* *Sthenoteuthis oualaniensis* fishing grounds analysis based on marine environmental factors and different weight coefficients in the Zhongsha

- and Xisha Islands, South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(4): 57–63 [范江涛, 陈作志, 张俊, 等. 基于海洋环境因子和不同权重系数的南海中沙西沙海域鸚乌贼渔场分析. *南方水产科学*, 2016, 12(4): 57–63]
- Feng B, Chen XJ, Xu LX. Study on distribution of *Thunnus obesus* in the Indian Ocean based on habitat suitability index. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(6): 805–812 [冯波, 陈新军, 许柳雄. 应用栖息地指数对印度洋大眼金枪鱼分布模式的研究. *水产学报*, 2007, 31(6): 805–812]
- Feng YJ, Chen XJ, Yang XM, *et al.* HSI modeling and intelligent optimization for fishing ground forecasts using a genetic algorithm. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(15): 4333–4346 [冯永玖, 陈新军, 杨晓明, 等. 基于遗传算法的渔情预报 HSI 建模与智能优化. *生态学报*, 2014, 34(15): 4333–4346]
- Gong CX, Chen XJ, Gao F, *et al.* Review on habitat suitability index in fishery science. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(2): 260–269 [龚彩霞, 陈新军, 高峰, 等. 栖息地适宜性指数在渔业科学中的应用进展. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(2): 260–269]
- Hu GY, Chen XJ, Wang JT. Forecasting fishing ground of *Illex argentinus* based on different weight habitat suitability index in the southwestern Atlantic. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(8): 88–95 [胡贯宇, 陈新军, 汪金涛. 基于不同权重的栖息地指数模型预报阿根廷滑柔鱼中心渔场. *海洋学报*, 2015, 37(8): 88–95]
- Ichii T, Mahapatra K, Sakai M, *et al.* Life history of the neon flying squid: Effect of the oceanographic regime in the North Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress*, 2009, 378: 1–11
- Igarashi H, Awaji T, Ishikawa Y, *et al.* Development of a habitat suitability index model for neon flying squid by using 3-D ocean reanalysis product and its practical use. *JAMSTEC Report of Research and Development*, 2014, 18: 89–101
- Murata M, Ishii M, Shingu C. Seasonal changes in location and water temperature of the fishing grounds by Jigging fishery for flying Squid, *Ommastrephes bartrami*(LESUEUR), with some considerations on migration and occurrence of the fishing ground. *Bulletin of the Hokkaido Regional Fisheries Research Laboratory, Fisheries Agency*, 1983(48): 53–77 [村田守, 石井正, 新宫千臣. アカイカの釣漁場の位置と水温の季節変化、並びに回遊と漁場形成に関する若干の考察. *水産庁北海道区水産研究所研究報告*, 1983(48): 53–77]
- Nigmatullin ChM, Nesis KN, Arkhipkin AI. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 2001, 54(1): 9–19
- Pi QL, Hu JY. Analysis of sea surface temperature fronts in the Taiwan Strait and its adjacent area using an advanced edge detection method. *Science China Earth Sciences*, 2010, 53(7): 1008–1016
- Prager MH, Fabrizio MC. Comparison of logistic regression and discriminant analyses for stock identification of anadromous fish, with application to striped bass (*Morone saxatilis*) and american shad (*Alosa sapidissima*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1990, 47(8): 1570–1577
- Pringle RM, Rayner AA. *Generalized inverse matrices with applications to statistics*. London: Griffin, 1971
- Ren ZH, Chen XJ, Fang XY. Forecasting fishing grounds of *Thunnus alalunga* in the eastern Pacific based on habitat suitability index. *Marine Fisheries*, 2014, 36(5): 385–395 [任中华, 陈新军, 方学燕. 基于栖息地指数的东太平洋长鳍金枪鱼渔场分析. *海洋渔业*, 2014, 36(5): 385–395]
- Saitoh S, Kosaka S, Iisaka J. Satellite infrared observations of Kuroshio warm-core rings and their application to study of Pacific saury migration. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 1986, 33(11–12): 1601–1615
- Sakai M, Kato Y. Research on *Ommastrephes bartrami* migration action for HSI model [EB/OL]. [2016-11-21] <https://www.jamstec.go.jp/drc/j/recca/akaika/H23seika/H23seika2.1.5.pdf> [酒井光夫, 加藤慶樹. HSI モデルのためのアカイカの回遊行動調査[EB/OL] [2016-11-21] <https://www.jamstec.go.jp/drc/j/recca/akaika/H23seika/H23seika2.1.5.pdf>
- Tang FH, Fan W, Wu YM, *et al.* Seasonal changes of relationship between marine environment and squid fishing resources in North Pacific Ocean. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2015, 32(3): 242–249 [唐峰华, 樊伟, 伍玉梅, 等. 北太平洋柔鱼渔场资源与海洋环境关系的季节性变化. *农业资源与环境学报*, 2015, 32(3): 242–249]
- Tian S, Chen X, Chen Y, *et al.* Evaluating habitat suitability indices derived from CPUE and fishing effort data for *Ommastrephes bartrami* in the northwestern Pacific Ocean. *Fisheries Research*, 2009a, 95(2–3): 181–188
- Tian S, Chen X, Chen Y, *et al.* Standardizing CPUE of *Ommastrephes bartrami* for Chinese squid-jigging fishery in Northwest Pacific Ocean. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009b, 27(4): 729–739
- Vinagre C, Fonseca V, Cabral H, *et al.* Habitat suitability index models for the juvenile soles, *Solea solea*, and *Solea senegalensis*, in the Tagus estuary: Defining variables for species management. *Fisheries Research*, 2006, 82(1–3): 140–149
- Wang WY, Zhou CH, Shao QQ, *et al.* An application of RS/GIS on study on the migration dynamics of *Ommastrephes bartrami*. *High Technology Letters*, 2003, 13(11): 90–93 [王文宇, 周成虎, 邵全琴, 等. RS/GIS 支持下的柔鱼中心渔场时空动态迁移研究. *高技术通讯*, 2003, 13(11): 90–93]
- Wang WY, Zhou CH, Shao QQ, *et al.* Remote sensing of sea surface temperature and chlorophyll-*a*: Implications for squid fisheries in the north-west Pacific Ocean. *International Journal of Remote Sensing*, 2010, 31(17–18): 4515–4530
- Wang YG, Chen, XJ. *The resource and biology of economic oceanic squid in the world*. Beijing: China Ocean Press, 2005 [王尧耕, 陈新军. 世界大洋性经济柔鱼类资源及其渔业. 北京: 海洋出版社, 2005]
- Yatsu A, Tanaka H, Mori J. Population structure of the neon

- flying squid, *Ommastrephes bartramii*, in the North Pacific Ocean. In: Okutani T. Contributed papers to international symposium on large pelagic squids. Tokyo: Japan Marine Fishery Resources Research Center, 1998: 31–48
- Yi MH, Guan WJ, Chen XJ. The relationship between CPUE and fish abundance based on ideal free distribution theory: Take the large light purse seine fishery of mackerel in Yellow Sea and East China Sea as an example. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(4): 325–330 [易明华, 官文江, 陈新军. 基于理想自由分布理论对CPUE与渔业资源关系的探讨——以我国近海鲐灯光围网渔业为例. 大连水产学院学报, 2009, 24(4): 325–330]
- Yi YJ, Cheng X, Zhou J. Research progress in habitat suitability assessment methods. Ecology and Environment Sciences, 2013, 22(5): 887–893 [易雨君, 程曦, 周静. 栖息地适宜度评价方法研究进展. 生态环境学报, 2013, 22(5): 887–893]
- Yu W, Chen XJ. Analysis of environmental conditions and their influence on the abundance of neon flying squid in the Northwest Pacific Ocean. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(15): 5032–5039 [余为, 陈新军. 西北太平洋柔鱼栖息地环境因子分析及其对资源丰度的影响. 生态学报, 2015, 35(15): 5032–5039]

(编辑 马瑾艳)

The Construction of Habitat Suitability Index Forecast Model of *Ommastrephes bartramii* Fishing Ground Based on Constrained Linear Regression

CUI Xuesen^①, ZHOU Weifeng, TANG Fenghua, DAI Yang,
ZHANG Shengmao, CHENG Tianfei

(Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization of Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract Neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) is an important commercial fishing target for China in Northwest Pacific. Accurate prediction of fishing grounds can improve the squid production capacity. The present study selected historical catch and fishing effort data of Chinese squid-jigging fishery from 2005 to 2013 as suitability index (SI) sources. SI curves were created through nonlinear regression based on 4 environmental factors, including sea surface temperature (SST), chlorophyll-*a* concentration (Chl-*a*), SST gradient (Grad) and the temperature of 100 m water layer (T_{100}) from Argo float dataset. On the premise of given constrained conditions, two habitat suitability index (HSI) models were constructed based on catch and fishing effort. Non-significant explanatory variables in the model were eliminated *via* the stepwise regressions. By comparing the goodness-of-fit of two models, catch-based model provided higher accuracy than fishing effort-based one. The adjusted correlation coefficients were 0.853 ($P<0.001$), 0.773 ($P<0.001$), 0.789 ($P<0.001$), 0.745 ($P<0.001$) and 0.724 ($P<0.0001$) from July to November, respectively. The weight coefficients of SI for environmental factors were in accord with the constraint and seasonally varied. In particular, the SI of T_{100} played the most important role in the HSI score in the main fishing season (July, August and October) while the SI of SST was the major factor to affect HSI in November. The forecast experiment of HSI model was carried out with environmental factors in 2014. Spatial position of forecasted fishing grounds were consistent with actual ones, and catch in high HSI (>0.7) regions accounted for 49.06% of the total catch, while catch in low HSI (<0.3) regions accounted for only 9.06% of the total catch. These findings indicate that the HSI model is able to predict neon flying squid fishing grounds in Northwest Pacific.

Key words *Ommastrephes bartramii*; Northwest Pacific; Constrained conditions; Habitat suitability index (HSI)

① Corresponding author: CUI Xuesen, E-mail: cui1012@sh163.net

DOI: 10.11758/yykxjz.20170123001

http://www.yykxjz.cn/

王玉红, 尹晓雪, 丁明媚, 付胜利, 陈萌, 郭政, 叶剑敏. 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 73–82

Wang YH, Yin XX, Ding MM, Fu SL, Chen M, Guo Z, Ye JM. Molecular cloning and expression analysis of *Xbp1-S* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 73–82

尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析

王玉红¹ 尹晓雪¹ 丁明媚¹ 付胜利¹
陈萌¹ 郭政^{1,2} 叶剑敏^{1,2①}



(1. 广东省水产健康安全养殖重点实验室 华南师范大学生命科学学院 广州 510631;
2. 广东省水产优质环保养殖工程技术研究中心 华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

摘要 为了了解尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)细胞转录因子 *Xbp1-S*(*OnXbp1-S*)的基因序列特征及其在无乳链球菌(*Streptococcus alactolyticus*)应激和在 B 细胞分化中的作用,应用 RACE 克隆技术获得的 *OnXbp1-S* 基因全长 1380 bp, 包括开放阅读框 ORF 为 1155 bp, 5'端非编码区(5' UTR)长 127 bp, 3'端非编码区(3'UTR)长 98 bp。 *OnXbp1-S* 序列分析推测该基因编码 384 个氨基酸, 分子量为 41.32 kDa, 理论等电点为 4.36。 同源性分析显示, *OnXbp1-S* 基因与其他鱼类的聚为一支, 其中, 与南极鳕(*Notothenia coriiceps*)相似性最高。 荧光定量 PCR 及 Western-blot 结果显示, *OnXbp1-S* 在各组织中均有表达, mRNA 水平上在肝脏中表达量最高, 蛋白水平上在胸腺中表达量最高, 而在肌肉中表达量最低。 无乳链球菌应激后, *OnXbp1-S* 基因在肝脏和脾脏中的表达趋势相似, 均在应激期间出现表达量上调, 在 192 h 出现峰值。 另外, 免疫组化分析发现, *OnXbp1-S* 因子在不同分化程度 B 细胞亚类中的表达呈现差异, 在成熟 B 细胞中呈现高表达, 而在未成熟 B 细胞中几乎不表达。 研究结果表明, *OnXbp1-S* 参与尼罗罗非鱼对无乳链球菌的免疫防御, 和在 B 细胞分化中起作用。 本研究将为进一步研究 *OnXbp1-S* 因子应答病原菌感染的机理及促进 B 细胞分化机制提供理论依据。

关键词 尼罗罗非鱼; *Xbp1-S*; 基因克隆; 组织表达; 无乳链球菌

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0073-10

X 盒结合蛋白 1(Xbp1, X-box binding protein 1)是一种重要的细胞转录因子, 与人体许多机能密切相关, 如 B 细胞、肝细胞和树突状细胞的发育分化, 心肌细胞的存活及肝脂肪的调节等(Wang *et al*, 2008; Iwakoshi *et al*, 2007; Tellier *et al*, 2016)。 Xbp1 为碱性亮氨酸拉链蛋白, 有剪切型 Xbp1(Xbp1 spliced, Xbp1-S)和未剪切型 Xbp1(Xbp1 unspliced, Xbp1-U)两种类型。 两种不同剪切类型的 Xbp1 具有不同的转录活性, 其

中, Xbp1-S 的转录活性明显高于 Xbp1-U (Zhou *et al*, 2008)。 Xbp1-S 是 CREB/ATF 蛋白家族的成员, 最早由 Liou 等(1990)在研究人类 B 细胞的时候发现的一种转录因子。 随后在内质网应激时的研究发现不同于 Xbp1-U 的另一种剪切形式 Xbp1-S, 是由 I 型跨膜蛋白激酶核内切酶(Type I transmembrane protein kinase, IRE1)剪切 Xbp1-U 的 mRNA 所产生(Yoshida *et al*, 2001; Calton *et al*, 2002)。 Xbp1 参与 B 细胞向浆细胞

* 国家自然科学基金面上项目(31472302; 31172432)和广东省自然科学基金项目(2014A030313437)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31472302 and 31172432), and Natural Science Foundation of Guangdong (2014A030313437)]. 王玉红, E-mail: wyhong1121@126.com

① 通讯作者: 叶剑敏, 教授, E-mail: yjmying@126.com

收稿日期: 2017-01-23, 收修改稿日期: 2017-02-14

的分化,是经过调控 IL-6 的生成并通过进一步非折叠蛋白质应答(Unfolded protein response, UPR)途径所促进的(Calfon *et al*, 2002; Iwakoshi *et al*, 2003)。在哺乳动物中, Xbp1 的异常活动也可以促进恶性浆细胞的分化(Reimold *et al*, 2001)。作为剪切后的 Xbp1-S 具有更高的转录活性,能进去细胞核调节未折叠的蛋白质反应。

Xbp1-S 是一种高度保守的蛋白,从低等酵母到高等哺乳动物中均有存在(Liou *et al*, 1990)。在硬骨鱼中, Xbp1-S 的研究逐步增加, 现已报道的鱼类包括斑马鱼(*Danio rerio*)(Hu *et al*, 2007; Bennett *et al*, 2007)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(彭少卿等, 2013)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(Ohtani *et al*, 2006)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Barr *et al*, 2011)和大西洋鲑(*Salmo salar*)(Leong *et al*, 2010)等。Hu 等(2007)在斑马鱼的胚胎细胞中发现,当 UPR 应对内质网应激时, Xbp1 可以通过 IGF1/Akt 激活凋亡信号发挥抑制作用; Barr 等(2011)利用 Xbp1 作为标记分子进行鉴定不同分化程度的 B 细胞亚类; Zwollo 等(2005、2008)利用 Xbp1 以及 Pax-5 等转录因子对虹鳟鱼的肾脏进行分区,并进一步揭示虹鳟鱼 B 细胞的发育分化与 Xbp1 的表达相关。但关于尼罗罗非鱼 Xbp1-S 的研究还未见相关报道。另外,与哺乳动物相比,有关硬骨鱼 Xbp1-S 的研究还处于起步阶段,其在宿主应对病原感染中的作用尚待进一步明确。

罗非鱼是联合国推荐养殖的优质水产养殖品种之一。我国是最大的罗非鱼生产国,近些年,因养殖规模扩大、高密度养殖、水体污染等,导致罗非鱼鱼病大规模暴发,如链球菌病,造成巨大经济损失

(卢迈新, 2010)。本研究选用尼罗罗非鱼为实验鱼,旨在克隆 Xbp1-S 基因 cDNA 全长并序列比对,从基因和蛋白水平上分析无乳链球菌应激胁迫后尼罗罗非鱼各组织的时空表达模式,并查明该因子在不同分化程度 B 细胞亚类中的表达水平,为进一步研究尼罗罗非鱼 Xbp1-S 在防御链球菌侵染中所起作用及其调控 B 细胞发育分化机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼购自广东省渔业种质保护基地,健康尼罗罗非鱼的体重为(200±10) g,体长为(13±2) cm。养殖温度为(29±1)°C,早晚投喂饲料,加气泵供氧,饲养 14 d 使其充分适应养殖环境,观察鱼体外观和活动能力,确认完全健康后用于实验。无乳链球菌菌株为本实验室保存菌株。PCR 反应体系所用试剂、pMD-18T Vector、限制性内切酶、Trizol、反转录试剂盒(PrimeScript™RT reagent kit with gDNA eraser)和荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™)均购自 TaKaRa 公司; *E.coli* DH5α 感受态、*E.coli* BL21(DE3)感受态、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(TIANprep mini plasmid kit)购自 TIANGEN 公司; pET32a(+) Vector 由本实验室保存, SMART™ RACE cDNA amplification kit 购自 BD Biosciences Clontech 公司。Trizol、2×Prime Mix、Ex Taq、10×Buffer、dNTP、pMD 18-T Vector、Solution I 和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。氨苄青霉素、氯仿和异丙醇等试剂购自广州化学试剂公司,其余实验试剂均为国产分析纯。引物(表 1)由华大基因科技服务有限公司合成。

表 1 基因克隆和表达所用的引物

Tab.1 Primers used in the cloning and expression

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
Xbp1-F1	ATGGTGGTTGTAGCAGCTGGG	qPCR
Xbp1-R1	TCAGACACTGATAAGCTGGGGG	
Xbp1-F2	CAGGTTATGTTGTCCACCGGGAACG	3'-RACE
Xbp1-F3	GTCCGCAGCACTCAGGCTACGTGTG	
Xbp1-R2	AGCAGGCCATTTGTTTTTCCCGAA	5'-RACE
Xbp1-R3	CTGAATCCGACGACACTTGGCTGGC	
β-actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA	qPCR
β-actin-R	TTCTCCATGTGCTCCAGT	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌液 PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	
Xbp1-F4	CCCGGATCCATGGTGGTTGTAGCAGCTGGG	原核表达酶切
Xbp1-R4	CCCAAGCTTGTGGTGGTGTGCTGCGGACTCAGAAGACC	
Xbp1-qF	GCCTTTCCTGTTACGGAGGTTGTG	RT-PCR
Xbp1-qR	GCCAGGCAGGCTTCTTTCTCC	

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 采用 Trizol(Invitrogen)法进行总 RNA 提取。取健康尼罗罗非鱼头肾, 用匀浆器充分研磨, 并按照 Trizol 试剂的使用说明书提取总 RNA, RNA 完整性和纯度用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用微量分光光度计 NANO2000 检测其浓度, -80°C 保存。利用普通的反转录试剂盒进行反转录合成 cDNA 模板, 使用 SMARTTM RACE cDNA amplification kit 将总 RNA 逆转录成 5'、3'-RACE cDNA 模板(Yao *et al.*, 2016)。反转录结束后对模板进行有效性的检测, 以 β -actin 作为内参基因进行 PCR 鉴定, 合格后 -20°C 保存。

1.2.2 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的基因全长 cDNA 的克隆和测序 在 NCBI 搜索尼罗罗非鱼的 *Xbp1* 基因, 根据预测序列(XM_013276886.1), 应用软件 Primer Premier 5.0 进行引物 *Xbp1-F1* 和 *Xbp1-R1* 设计(表 1), 以尼罗罗非鱼头肾 cDNA 为模板, 以 *Xbp1-F1* 和 *Xbp1-R1* 为引物进行 *Xbp1-S* 的 cDNA 的扩增, PCR 反应的体系为 25 μl , 反应程序: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 58.0°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1.0 min; 30 个循环。扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往北京六合华大基因公司进行测序。测序结果经 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比对, 获得尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的 cDNA 序列。

1.2.3 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的基因 3' 和 5'-RACE 扩增 根据获得的 *Xbp1-S* 的 CDS 序列, 设计 *Xbp1-S* 的 5'-RACE PCR 和 3'-RACE PCR 的引物 *Xbp1-F2*、*Xbp1-F3*、*Xbp1-R2* 和 *Xbp1-R3*(表 1), 采用巢式 PCR 方法进行 3' 和 5'-RACE 的扩增, 先分别用 *Xbp1-F2*、*Xbp1-R2* 和 UPM 混合引物(混合浓度参照试剂盒说明书)进行首轮扩增, 然后利用首轮扩增的 PCR 产物稀释 10 倍作为第二轮模板, 再分别用 *Xbp1-F3*、*Xbp1-R3* 和 NUP 为引物进行第二轮扩增, 全长克隆采用 20 μl PCR 反应体系(Yao *et al.*, 2016)。反应程序: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 68°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min, 35 个循环。扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往北京六合华大基因公司进行测序。测序结果与 *Xbp1-S* 的 cDNA 序列比对结果见图 1, 找出起始密码子和 polyA 加尾信号。

1.2.4 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 的序列分析 用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序去克隆载体, 将 3'、5' 测序结果结合 CDS 序列进行拼接分析, 进一步确认 *Xbp1-S* 扩增获得 CDS 的全长。用 NCBI 网站的 BLAST 程序进行编码蛋白序列的碱基同源性分析; 用 Bioedit 软

件将尼罗罗非鱼与其他鱼类的 *Xbp1-S* 的氨基酸序列进行多重比对; 应用 MEGA 6.0 软件, 采用邻位相接法(NJ 法)构建系统发育树, 并用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。蛋白质理化性质预测使用 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>), 使用 NCBI 网站保守结构域(CDD)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行氨基酸序列的保守结构域预测。

1.2.5 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 多克隆抗体的制备 根据 *Xbp1-S* 的 CDS 序列的锌指结构, 选取包含锌指结构的起始密码子甲硫氨酸开始的前 504 bp 的碱基进行原核表达分析, 构建 pET32A-XBP1 的蛋白表达载体, 并导入到 BL21 中特异性表达出约 40 kDa 的目的片段(包含 pPET32A 载体本身的分子量)。并进一步进行蛋白的大批量表达和纯化, 获得目的蛋白, 将纯化后的重组蛋白浓缩后与弗氏佐剂(Sigma)混合, 腹腔免疫小鼠(BALB/c, 8 周), 2 周免疫 1 次, 连续免疫 4 次, 首次免疫使用弗氏完全佐剂, 再次免疫使用弗氏不完全佐剂, 每次免疫蛋白用量为 50 μg /只。尾部静脉取血, 获得抗血清后检测抗性, 通过直接 ELISA 检测其效价。在第 4 次免疫后 4 d (达到抗体效价最高), 进行尾部静脉取血, 获得抗血清, 用于蛋白的检测和免疫组化等实验。

1.2.6 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 组织表达 采用荧光定量 PCR 的方法检测 *Xbp1* 在 mRNA 水平上在健康罗非鱼各组织中的表达量, 用 Western-blot 的方法检测 *Xbp1* 蛋白在各组织中的分布。取健康的 3 尾尼罗罗非鱼, 取头肾、后肾、脾脏、皮肤、鳃、肠、胸腺、肝脏和肌肉组织, 用液氮速冻后置于 -80°C 保存。并进行各组织 RNA 及组织蛋白的提取后进行 RT-PCR 和 Western-blot 组织蛋白的检测。用于 RT-PCR 检测尼罗罗非鱼不同组织中表达的引物见表 1。反应条件: 95°C 3 min; 95°C 1 min; 60°C 30 s; 72°C 30 s, 35 个循环。每个样本重复 3 次, 根据 C_t (Threshold cycles) 值($15 < C_t < 35$), 以 β -actin 基因为内参, 利用公式 $2^{-\Delta C_t}$ 得出每个样本 *Xbp1* 基因的相对表达值。

1.2.7 无乳链球菌应激实验 取 60 尾健康尼罗罗非鱼随机分成 2 组, 即应激组 and 对照组。应激组腹腔分别注射 100 μl 浓度为 5×10^5 CFU/ μl 的无乳链球菌(Tellez-Bañuelos *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2015); 对照组腹腔注射 100 μl 无菌 PBS, 注射 0、6、24、48、192、264 h 后, 分别在应激组和对照组随机取 3 尾鱼, 取各组织用液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱, 用于后续各组织 *Xbp1* 基因的 RT-PCR 分析检测。RT-PCR

扩增体系为 20 μl ，试剂添加按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书进行。反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min；60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s；72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，35 个循环。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法对荧光定量 PCR 检测结果进行分析，显著性用 SPSS 17.0 软件进行分析并用 SigmaPlot 10.0 作图。

1.2.8 Xbp1 免疫组化 选取健康尼罗罗非鱼的头肾白细胞用于免疫组化实验。头肾白细胞的分离采用 Percoll 密度梯度分离法进行，根据尼罗罗非鱼 B 细胞的比重，分别配制 Percoll 40、50、60 及 70 试剂，叠加后配成 Percoll 密度梯度分离液，从而分离发育分化程度不同的 B 细胞亚类。在超净工作台取健康尼罗罗非鱼的头肾并加入 3 ml 1640 细胞培养液进行充分研磨，吸取上清液，去除大的组织块，备用。根据使用说明书，首先把 Percoll(GE Healthcare)原液用 10 \times PBS($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.286 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.14 g, NaCl 87.75 g) 9 : 1 稀释为备用 Percoll 储存液，然后用 1 \times PBS 进一步配成 Percoll 40、50、60 和 70，进行叠加各层分离 B 细胞。把分离的细胞进一步细胞涂片后进行采用 EnVision[™] 免疫组织化学二步法，主要步骤包括：切片用二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱苯，去离子水水化；3%过氧化氢溶液室温避光孵育 25 min 阻断内源性过氧化物酶；3% BSA 室温封闭 30 min 后滴加一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；荧光二抗室温孵育 30 min；荧光显微镜镜检，阳性细胞呈现明显的荧光，并对图像采集分析。

2 结果与分析

2.1 *OnXbp1-S* 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

根据已经获得的 ORF 序列，进一步设计特异性 RACE 引物 Xbp1-F2、Xbp1-F3 及 Xbp1-R2 和 Xbp1-R3 (表 1)。Xbp1-F2 和 Xbp1-R2 与通用引物 UPM 以及 Xbp1-F3 和 Xbp1-R3 与通用引物 NUP 分别配对，进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增(Yao *et al.*, 2016)，所得产物经测序拼接后，获得尼罗罗非鱼基因全长 cDNA 序列为 1155 bp，3'端非编码区(3'UTR)长 98 bp，5'端非编码区(5'UTR)长 127 bp，3'端含有 polyA 尾以及多聚腺苷酸 AATAA 加尾信号(图 1)。氨基酸序列分析可知，*OnXbp1-S* 基因可以编码 384 个氨基酸残基，其推导的分子量为 41.32 kDa，理论等电点为 4.36。由蛋白质的功能预测可知，*OnXbp1-S* 含有 174 bp 的锌指结构区域(图 1 下划线部分)，该区域是比较保守的蛋白结构，该蛋白属于碱性亮氨酸拉链结构蛋白。

2.2 *OnXbp1-S* 基因的同源性分析

利用 Bioedit 软件对尼罗罗非鱼 *Xbp1* 基因编码的氨基酸序列与红鳍东方鲀、虹鳟、欧洲食用牡蛎(*Ostrea edulis*)、斑马鱼、斑点雀鲷(*Lepisosteus oculatus*)、墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、南极鳕(*Nototothenia coriiceps*)、原鸡(*Gallus gallus*)、小鼠(*Mus musculus*)及人(*Homo sapiens*)进行同源比对，与不同物种中锌指结构的同源性高达 79%(图 2)。如图 2 所示，黑色阴影表示同源性大于 75%的区域，主要是集中在不同物种的锌指结构的保守区域。利用 MEGA 6.0 软件对已经公布的哺乳动物和常见的鱼类进行系统进化分析，显示尼罗罗非鱼 *Xbp1* 与南极鳕同属一个分支，同源性最高，与其他无脊椎动物的 *Xbp1* 聚为一类。而在哺乳类动物、两栖类动物、鸟类和鱼类中有明显分化(图 3)。

2.3 原核蛋白的表达纯化及多克隆抗体的制备

以尼罗罗非鱼 *OnXbp1-S* 基因片段为模板，使用特异性引物 Xbp1-F4、R4(表 1)成功扩增到长度为 504 bp 的目的片段，将目的片段连接到 pET32a 质粒上，获得重组质粒 pET32a-Xbp1。将重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)后，将测序正确的阳性克隆进行诱导表达，诱导前的目的蛋白表达较弱(图 4)，诱导后有明显表达的条带大小约为 40 kDa，与融合蛋白的预测分子量一致(包括目的蛋白 18 kDa 和 pET-32a 标签蛋白 21 kDa)。融合蛋白的可溶性分析结果显示，其主要以包涵体的形式存在。经 SDS-PAGE 检测，纯化蛋白在 40 kDa 处有较为单一条带。用抗 His-tag 的单克隆抗体 Western-blot 检测纯化后的蛋白，发现在 40 kDa 处存在单一条带，确定此蛋白为 *OnXbp1-S* 表达的融合蛋白。浓缩纯化后的蛋白，制作抗原免疫小鼠并获得抗血清，直接 ELISA 法检测其抗体效价为 800,000(units/ml)，表明所制备的小鼠抗罗非鱼 *Xbp1-S* 多克隆抗血清效果良好。

2.4 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因和蛋白水平的组织分布以及链球菌应激表达分析

采用 Real-time qPCR 方法检测 *OnXbp1-S* mRNA 在健康尼罗罗非鱼不同组织中的相对表达量；并利用所制备的 *OnXbp1-S* 多抗 Western-blot 检测 *OnXbp1* 蛋白在不同组织的相对表达水平。mRNA 相对表达量的结果显示，*OnXbp1-S* 在所检测的 8 个组织中的表达量，由低到高依次为肌肉<胸腺<脾脏<皮肤<鳃<肠<头肾<肝脏，在肝脏的表达量最高，在头肾也有较高

的表达, 而在肌肉组织中几乎不表达(图 5 A)。OnXbp1-S 蛋白的相对表达量的结果显示(图 5 B), OnXbp1-S 蛋白在所检测的 9 个组织中的表达量, 由

低到高依次为肠<脾脏<肌肉<皮肤<肝脏<后肾<鳃<头肾<胸腺, 在胸腺的表达量最高, 在头肾、鳃中都有较高的表达, 而在肠道肌肉中几乎没有表达。

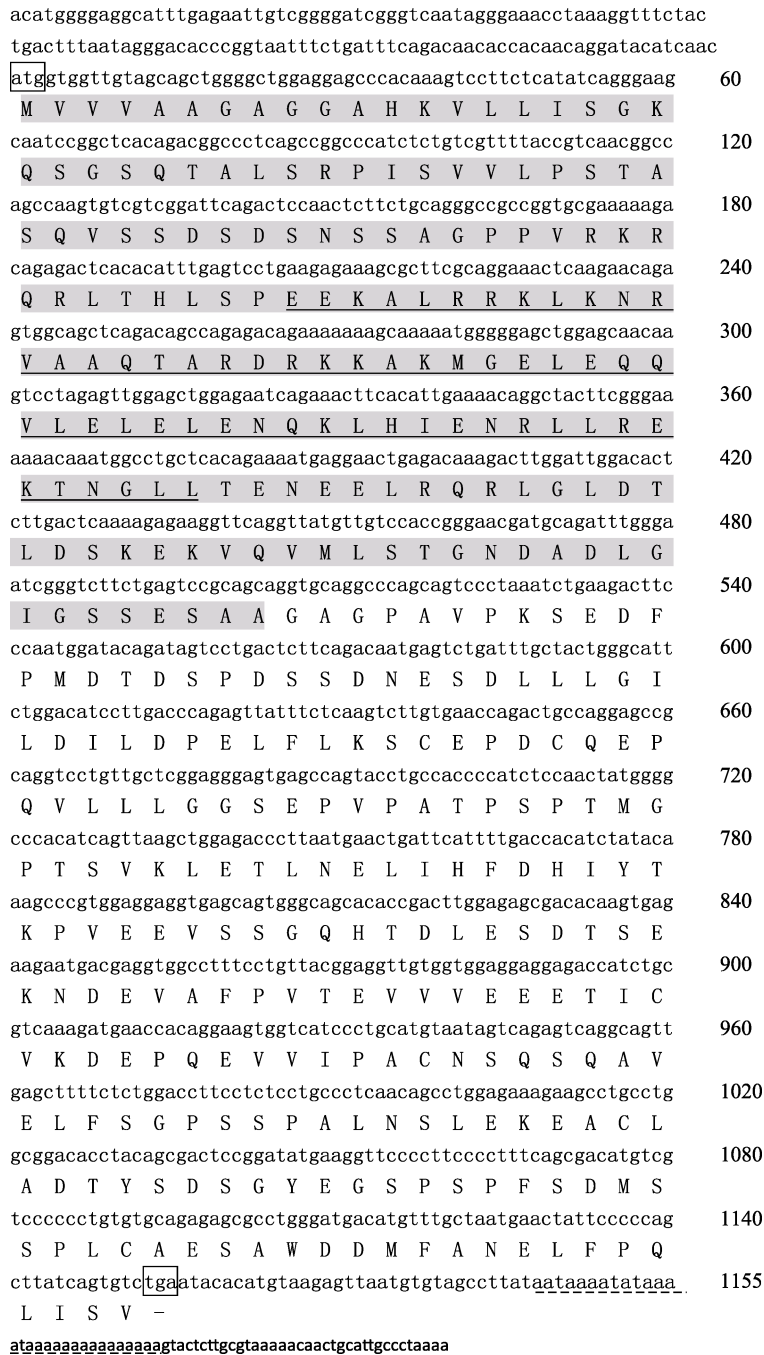


图 1 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因 cDNA 全序列以及由此推测的氨基酸序列
 Fig.1 The cDNA and putative amino acid sequence of *Xbp1-S* in *O. niloticus*

起始密码子和终止密码子由细线框标出; 下划线表示 *Xbp1-S* 的锌指结构区域;
 阴影部分表示原核表达的抗原结合区域; 短虚线表示 RACE 结果的加尾信号

Start codon (atg) and stop codon (tga) were marked with filament box; regular underline represented the basic-region leucine zipper (bZIP) domain of X-box binding protein 1 (Xbp1); shadow represented the Prokaryotic expressed sequence, short dash underline represented tailing signal of RACE

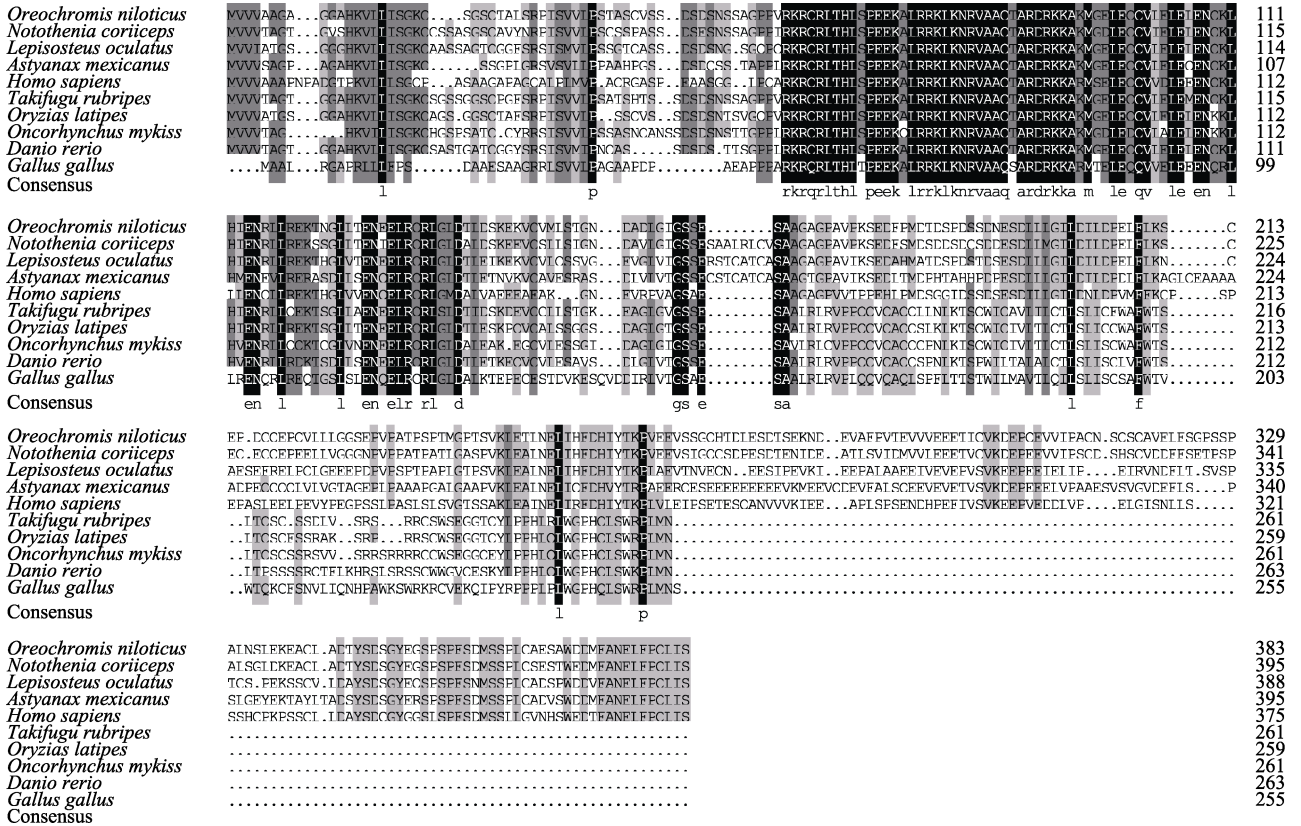


图 2 OnXbp1 氨基酸序列与其他物种 Xbp1 序列比对

Fig.2 Alignment of Xbp1 amino acid sequences of *O. niloticus* with other species

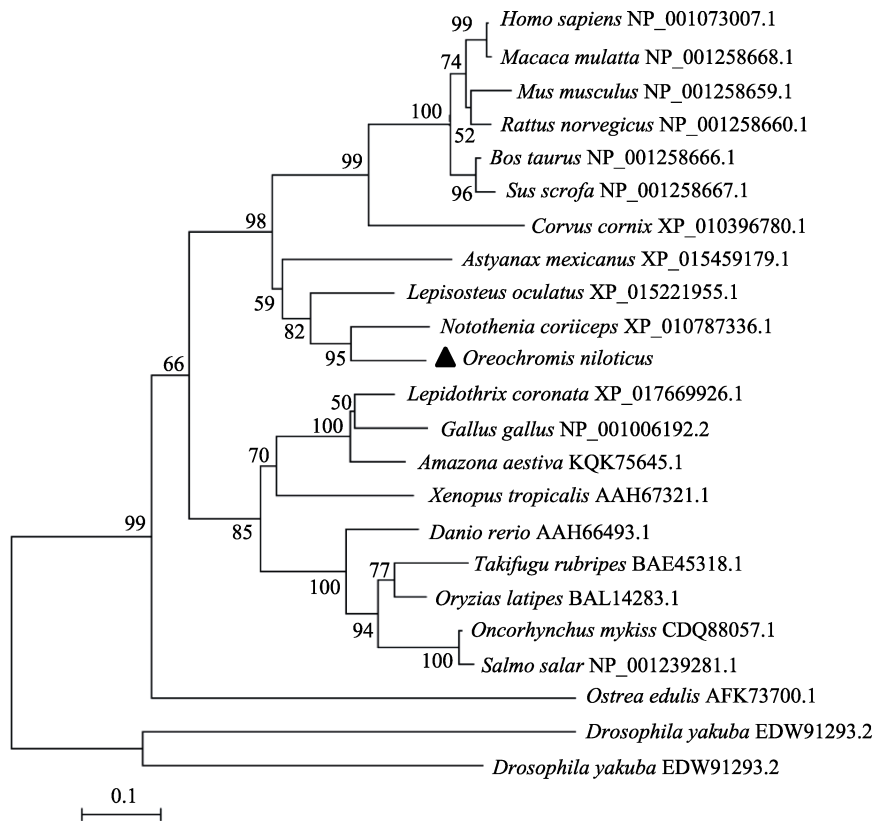


图 3 利用 MEGA 6.0 软件构建的基于 Xbp1 基因所编码氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree based on Xbp1 amino acid sequences by MEGA 6.0

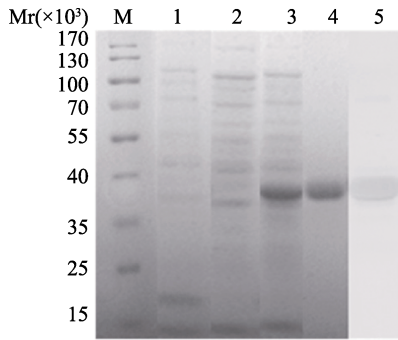


图 4 *Xbp1-S* 蛋白的原核表达及其纯化

Fig.4 Prokaryotic expression and purification of the *Xbp1* protein

M: 蛋白 Marker; 1: 空载菌蛋白; 2: 重组菌 IPTG 诱导前; 3: 重组菌 IPTG 诱导后; 4: 纯化后蛋白; 5: 纯化后蛋白

Western-blot

M: Protein Marker; 1: Protein of empty plasmid vector; 2: Protein before IPTG induction; 3: Protein after IPTG induction; 4: Purification protein; 5: Western-blot of purification protein

在经过腹腔注射链球菌后, 与对照组相比, 所检测的不同时间点里其肝脏和脾脏均呈上调表达的趋势, 且其趋势基本一致。在早期即腹腔注射 6 h 后, *OnXbp1-S* 基因的表达呈现显著性增高, 其后的 24 h 和 48 h 的表达量有所下降, 但在 192 h 达到基因表达量的最高水平(图 6A, 图 6B), 而后在 264 h 逐渐回落下降, 趋向对照组的水平。

2.5 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 在不同 B 细胞亚型中的免疫组化分析

根据 Zwollo 等(2005)报道的 Percoll 密度分离法, 分离出罗非鱼头肾 B 细胞不同亚类细胞: Percoll 40 细胞(多为浆细胞, 图 7A)、Percoll 50 细胞(多为原浆 B 细胞, 图 7B)、Percoll 60 细胞(初分化成熟的 B 细胞, 图 7C)、和 Percoll 70 细胞(多为未成熟的 B 细胞, 图 7D)。如图 7 所示, *OnXbp1-S* 蛋白在不同 B 细胞亚类中表达量水平可由其红色荧光所显示, 表达量的

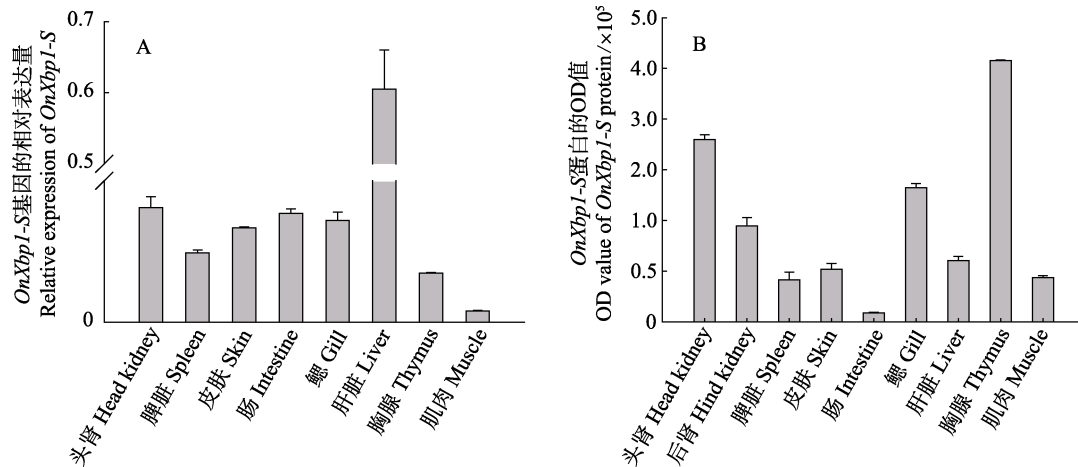


图 5 *Xbp1-S* 基因及蛋白水平在尼罗罗非鱼不同组织中的表达分布

Fig.5 The relative expression of *Xbp1-S* mRNA and protein in different tissues of *O. niloticus*

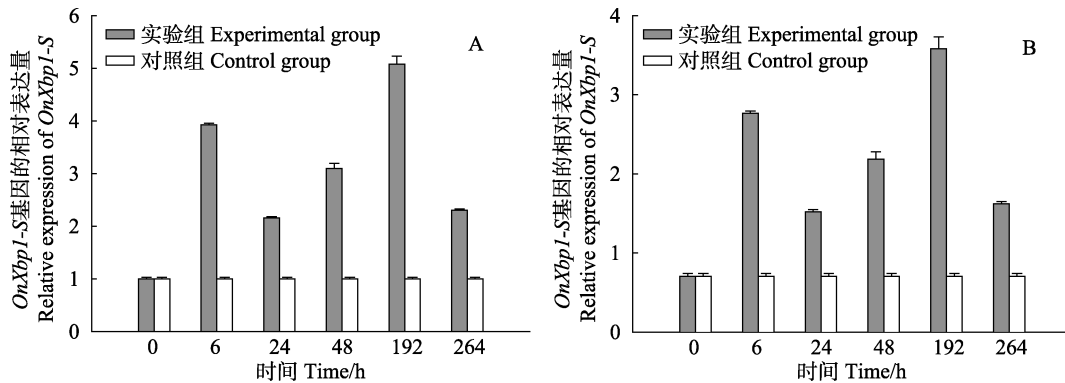


图 6 无乳链球菌应激后尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因的表达量变化

Fig.6 Expression of *Xbp1-S* gene in *O. niloticus* after *Streptococcus agalactiae* infection

A: 肝脏; B: 脾脏

A: Liver; B: Spleen

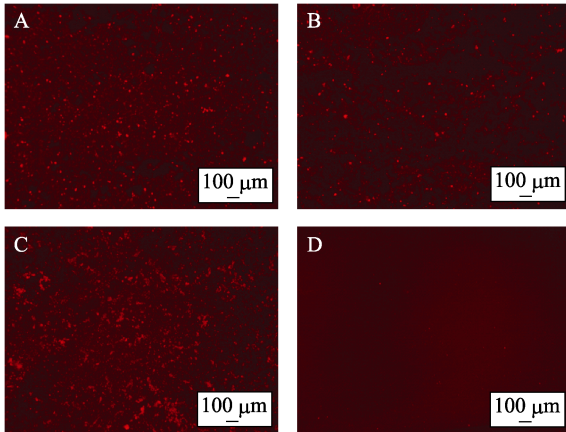


图 7 Xbp1 在尼罗罗非鱼不同 B 细胞亚类中的表达
Fig.7 Xbp1-S protein level in different B cell subclass of *O. niloticus*

A. Percoll 40; B. Percoll 50; C. Percoll 60; D. Percoll 70

变化从低到高依次为 Percoll 70<Percoll 60<Percoll 50<Percoll 40, 即 OnXbp1-S 在浆细胞中的表达最高, 在原浆细胞有较高水平的表达, 在初分化的 B 细胞中有少许表达, 而在未成熟的 B 细胞中几乎不表达。

3 讨论

细胞转录因子 Xbp1 表达与 B 细胞的发育分化及抗体的表达分泌息息相关(Zwollo *et al.*, 2005、2008; Tellier *et al.*, 2016)。Xbp1 是内质网应激中蛋白质折叠能力的主要调控者之一, 具有 2 种不同剪切类型(Xbp1-S 和 Xbp1-U), 其中, Xbp1-S 具有高度转录活性(Zhou *et al.*, 2008)。内质网具有调节蛋白质的折叠、转录后修饰基因表达等多种功能, 一旦发生错误的折叠将导致抗凋亡反应并促进肿瘤细胞的无限增值(Hendershot, 2004; Robinson *et al.*, 1994)。因此, Xbp1 研究对于 B 细胞的发育分化和调控以及其在防御病原菌侵染的免疫功能分析具有重要的意义。

本研究克隆尼罗罗非鱼 *OnXbp1-S* 的基因序列, 并利用外源蛋白原核表达系统(Salinas *et al.*, 2011)成功构建 *OnXbp1-S* 的体外表达系统, 制备多克隆抗体; 组织表达分析发现, *OnXbp1-S* 在尼罗罗非鱼的正常组织中广泛存在; 在无乳链球菌应激实验期, *OnXbp1-S* 在肝脏和脾脏表达具有较强的上调且反应趋于同步; 并证实了在尼罗罗非鱼中可能也存在 *OnXbp1-S* 对于浆细胞即成熟 B 细胞的发育分化调节作用。

Xbp1 在哺乳动物的体内广泛存在, 在各个组织分析中都有表达, 其中在肝细胞中高表达(Liou *et al.*, 1990; Calfon *et al.*, 2002)。本研究结果显示, 尼罗罗非鱼 *OnXbp1-S* 在各个检测组织中都有表达, 在 mRNA

水平上主要表达在肝脏中, 这与哺乳动物中的发现相类似。然而, 蛋白水平上的高表达主要在胸腺和头肾中, 表明 Xbp1-S 的表达与免疫细胞(B 细胞和 T 细胞)的发育分化可能有一定关联(Zwollo *et al.*, 2005、2008; Tellier *et al.*, 2016)。免疫系统中主要免疫细胞的发育分化与 Xbp1-S 表达的正相关反映了 Xbp1-S 转录因子可能在免疫反应中起重要调控作用, 因为 Xbp1-S 因子不仅参与体液免疫, 而且可能参与细胞免疫的促进作用。无乳链球菌应激实验显示, 在应激后 264 h 期间, OnXbp1-S 在脾脏和肝脏中都有明显的表达上调。腹腔注射链球菌 6 h 后, 肝脏和脾脏中 OnXbp1-S mRNA 表达显著上调出现第一个峰值, 这种应激后短时间内表达量激增的现象表明该因子很可能参与天然免疫反应。第二个更显著的表达高峰出现在链球菌应激后的 192 h (8 d), 这个显著上调很可能是由于参与适用性免疫反应的免疫细胞(B 细胞和 T 细胞)中 Xbp1-S 因子的表达明显上调。

硬骨鱼的头肾组织类似于哺乳动物的骨髓, 具有造血功能并且是免疫细胞发育的场所, 因此, 头肾组织含有不同血系的未成熟血细胞(Fange *et al.*, 1986; Zapata *et al.*, 1995)。头肾是免疫细胞发生、发育分化和增殖的重要场所, 也是捕获抗原和产生抗体的主要器官(Kaattari *et al.*, 1985; Bromage *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2013)。本研究尼罗罗非鱼的头肾组织采用 Percoll 密度梯度分离的方法获得不同发育分化程度的 B 细胞亚类(Zwollo *et al.*, 2005), 并采用免疫组化检测各类细胞荧光强度, 发现 *OnXbp1-S* 高表达在分化程度高的成熟浆细胞和原浆细胞中, 而在 naïve B 细胞和未成熟 B 细胞中表达量较低。尼罗罗非鱼不同 B 细胞亚类表达不同水平的 *OnXbp1-S* 现象, 与已报道的红鳍东方鲀(Ohtani *et al.*, 2006)和虹鳟鱼(Zwollo *et al.*, 2008)相类似。B 细胞分化程度与 Xbp1-S 因子的表达正相关表明, 该因子对于成熟浆细胞以及浆母细胞的发育具有重要的促进作用, 即对 B 细胞的分化起正调节作用, 调控原浆细胞是在特定的生态位中进一步发育分化为浆细胞(Ye *et al.*, 2011)。Xbp1-S 的免疫功能尤其对于 B 细胞分化的作用研究有利于探索体液免疫 B 细胞的发育分化调控机制。综上所述, 本研究将为进一步研究尼罗罗非鱼 Xbp1-S 因子应答病原菌侵染的机理及促进 B 细胞分化机制提供理论依据。

参 考 文 献

Barr M, Mott K, Zwollo P. Defining terminally differentiating B cell populations in rainbow trout immune tissues using the

- transcription factor Xbp1. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 727–735
- Bennett JT, Joubin K, Cheng S, *et al.* Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation. *Developmental Biology*, 2007, 304(2): 525–540
- Bromage ES, Ye J, Owens L, *et al.* Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(7–8): 803–814
- Calfon M, Zeng H, Urano F, *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 2002, 415(6867): 92–96
- Fänge R. Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1986, 12(1–4): 153–161
- Gan Z, Wang B, Lu Y, *et al.* Molecular characterization and expression of Lck in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2376–2389
- Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 2004, 71(5): 289–297
- Hu MC, Gong HY, Lin GH, *et al.* XBP-1, a key regulator of unfolded protein response, activates transcription of IGF1 and Akt phosphorylation in zebrafish embryonic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 359(3): 778–783
- Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunological Reviews*, 2003, 194(1): 29–38
- Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(10): 2267–2275
- Kaattari SL, Irwin MJ. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental and Comparative Immunology*, 1985, 9(3): 433–444
- Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR *et al.* *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 279
- Liou HC, Boothby MR, Finn PW, *et al.* A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 1990, 247(4950): 1581–1584
- Lu MX. Review of research on streptococcosis in Tilapia. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(1): 75–79 [卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展. *南方水产*, 2010, 6(1): 75–79]
- Ma C, Ye J, Kaattari SL. Differential compartmentalization of memory B cells versus plasma cells in salmonid fish. *European Journal of Immunology*, 2013, 43(2): 360–370
- Ohtani M, Miyadai T, Hiroishi S. Identification of genes encoding critical factors regulating B-cell terminal differentiation in torafugu (*Takifugu rubripes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics*, 2006, 1(1): 109–114
- Peng SQ, An LG, Zhang Z, *et al.* Cloning and tissue-specific expression analysis of Xbp1 gene in *Cyprinus carpio* L. *Journal of University of Jinan*, 2013, 27(2): 1671–3359 [彭少卿, 安利国, 张珍, 等. 鲤鱼 Xbp1 基因克隆与组织特异性表达分析. *济南大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(2): 1671–3359]
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 2001, 412(6844): 300–307
- Robinson AS, Hines V, Wittrup KD. Protein disulfide isomerase overexpression increase secretion of foreign protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology*, 1994, 12(4): 381–384
- Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1346–1365
- Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, *et al.* Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 105–111
- Tellier J, Shi W, Minnich M, *et al.* Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nature Immunology*, 2016, 17(3): 323–330
- Wang H, Zhang Y, Yehuda-Shnaidman E, *et al.* Liver X receptor alpha is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype. *Molecular and Cell Biology*, 2008, 28(7): 2187–2220
- Yao WL, He YY, Liu P, *et al.* The cDNA cloning and expression analysis of P38 MAPK gene of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 91–98 [姚万龙, 何玉英, 刘萍, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) p38 MAPK 基因克隆及表达分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 91–98]
- Ye J, Bromage ES, Kaattari SL. Plasma blasts and plasma cells and the organization of the teleost immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1273–1281
- Ye J, Bromage ES, Kaattari SL. The strength of B cell interaction with antigen determines the degree of IgM polymerization. *Journal of Immunology*, 2010, 184(2): 844–850
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, *et al.* XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001, 107(7): 881–891
- Zapata AG, Torroba M, Vicente A, *et al.* The relevance of cell

- microenvironments for the appearance of lymphohaemopoietic tissues in primitive vertebrates. *Histology and Histopathology*, 1995, 10(3): 761–778
- Zhou M, Jacob A, Ho N, *et al.* Downregulation of protein disulfide isomerase in sepsis and its role in tumor necrosis factor-alpha release. *Critical Care*, 2008, 12(4): R100
- Zwollo P, Cole S, Bromage E, *et al.* B cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *Journal of Immunology*, 2005, 174(11): 6608–6616
- Zwollo P, Haines A, Rosato P, *et al.* Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(12): 1482–1496

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Expression Analysis of *Xbp1-S* of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WANG Yuhong¹, YIN Xiaoxue¹, DING Mingmei¹, FU Shengli¹,
CHEN Meng¹, GUO Zheng^{1,2}, YE Jianmin^{1,2}^①

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; 2. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Environmentally-Friendly Aquaculture, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract X-box binding protein 1-S (Xbp1-S) is a key transcript factor mainly associated with B cell development and differentiation. The 1380 bp full-length cDNA of *OnXbp1-S* including 1155 bp ORF, 127 bp 5'UTR and 98 bp 3'UTR was cloned with RACE, which encodes 384 amino acids with a molecular weight of 41.32 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.36. Homology analysis revealed that the *OnXbp1-S* gene was homologous to other fish with the most similarity with *Notothenia coriiceps*. *OnXbp1-S* expresses in all tested tissues, with the highest mRNA expression in liver, and the highest protein level in thymus and the lowest protein level in muscle. *Streptococcus agalactiae* stimulation induced the expression of *OnXbp1-S* with the highest level at 192 h post-infection. In addition, mature B cells have a much higher *OnXbp1-S* level than naive B cells. Taken together, the results indicated that *OnXbp1-S* might be involved in the immune response in Nile tilapia against *S. agalactiae* infection, and play a role in B cell development and differentiation.

Key words *Oreochromis niloticus*; *Xbp1-S*; Gene cloning; Tissue expression; *Streptococcus agalactiae*

① Corresponding author: YE Jianmin, E-mail: yjmying@126.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20161207002

http://www.yykxjz.cn/

卢霞, 栾生, 曹宝祥, 郝登春, 孟宪红, 曹家旺, 代平, 罗坤, 孔杰. 凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对 WSSV 敏感性的差异分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 83–89

Lu X, Luan S, Cao BX, Hao DC, Meng XH, Cao JW, Dai P, Luo K, Kong J. Investigation on the susceptibility difference to WSSV between ammonia tolerant and sensitive *Litopenaeus vannamei* populations. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 83–89

凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对 WSSV 敏感性的差异分析*



卢霞^{1,2} 栾生^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 郝登春^{1,2,3} 孟宪红^{1,2}
曹家旺^{1,2} 代平^{1,2} 罗坤^{1,2} 孔杰^{1,2①}

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界范围内举足轻重的水产养殖品种,在普遍的高密度养殖活动及环境恶化的情况下,逆境胁迫是影响其养成率的主要因素之一,其中,高浓度氨氮胁迫是最普遍的毒理因子。由于对虾抗病性状的遗传力较低,且在受限于测试场地的低选择强度情况下,抗病选育的进展比较缓慢。而对虾的抗逆性具有较高的遗传力,且不具备传染性的特点使得其不受测试场地的限制。因此,本研究以氨氮急性胁迫应激敏感群体(SP)和耐受群体(TP)为实验材料,对其进行白斑综合征病毒(WSSV)敏感性差异分析,首次探索了通过提高对虾对逆境急性胁迫应激的耐受性,从而间接提高其抗病力的可能性。本研究每个群体设 3 个处理:高浓度氨氮胁迫下(10 mg/L)WSSV 感染组,两群体分别命名为 SPAV 和 TPAV;正常海水条件下(氨氮水平小于 0.01 mg/L)WSSV 感染组,分别命名为 SPV 和 TPV;正常海水条件无 WSSV 感染组(空白对照组),分别命名为 SPC 和 TPC。结果显示,SP 群体(5 h)在 WSSV 感染后开始死亡的时间显著早于 TP 群体(16 h);从感染 60 h 后,SPAV 组的死亡率呈直线上升趋势,到 137 h 时该组全部死亡,其累积死亡率显著高于 SPV(70.42%)和 TP 群体的 2 个组 TPAV(42.67%)和 TPV(18.99%)($P < 0.05$)。在 144 h 实验结束时,SPV 的累积死亡率为 73.67%,显著高于 TP 群体的 2 个组 TPAV(46.15%)和 TPV(18.99%)以及 SP 群体的对照组 SPC(34.79%);此时,TPAV 组的累积死亡率显著高于 TPV 和 TPC 组($P < 0.05$),而 TPV 与 TPC 组间无显著差异。研究表明,逆境毒理因子(氨氮胁迫)会增加对虾对病原的敏感性,而且对氨氮急性胁迫应激耐受力高的群体对病毒的抵抗力也高。本研究为探索提高对虾抗病力而降低养殖过程中的死亡率提供了新的思路和途径。

* 国家自然科学基金青年基金项目(31302179)、泰山学者良种工程项目、山东省重点研发计划项目(2016GSF115030)和中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022016006)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31302179), Taishan Scholar Program for Seed Industry, Key Research and Development Project of Shandong Province (2016GSF115030) and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016006)]. 卢霞, E-mail: luxia@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-12-07, 收修改稿日期: 2017-02-06

关键词 凡纳滨对虾; 急性胁迫应激; 白斑综合征病毒(WSSV); 耐受群体; 敏感群体
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0083-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾,是世界上产量最高的对虾种类之一,在我国年产量高达 158 万 t(农业部渔业渔政管理局, 2015),占世界对虾总产量的 45%(FAO, 2015)。因其具有广盐性、生长快、高抗病性、适合高密度养殖等特点,成为了半集约化和集约化养殖的最佳选择,是最受欢迎的养殖品种之一(Lu *et al*, 2015)。然而,目前凡纳滨对虾养殖中普遍采用的集约化或半集约化养殖模式常常会导致水质恶化,来自恶化水质中的毒理因子的胁迫应激作用致使在对虾养殖中出现高死亡率现象,严重影响了对虾的产量和质量(Alagappan *et al*, 2010)。在众多毒理因子中,氨氮超标是最普遍的现象之一,其在多种对虾中被检测到具有致死作用,包括凡纳滨对虾、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)等(Cobo *et al*, 2014; Chen *et al*, 1990; Chen *et al*, 1992; Chen *et al*, 1991; 冉繁华等, 1991; Wajsbrodt *et al*, 1990; Ostrensky *et al*, 1995)。除了对对虾有直接的致死作用外,氨氮胁迫还会抑制对虾的免疫系统并增加其对病原的敏感性(Liu *et al*, 2004),而且在贝类和鱼类中也发现了相同现象(Cheng *et al*, 2004; Hurvitz *et al*, 1997)。然而,随着人类活动范围和影响深度的逐渐扩大,加上多变的气候和全球变暖的趋势,使得水产养殖环境不断恶化。因此,探索培育对环境胁迫应激具有较高耐受性的优良对虾品种,将可能成为降低死亡率和病原感染率的有效办法。我们已经对核心育种群体的氨氮急性胁迫应激的耐受性进行了遗传评估,其较高的遗传力(0.575)表明,凡纳滨对虾的抗性可通过选育得到快速的改良(Lu *et al*, 2017a)。

环境毒理因子会对对虾养殖业造成一定的影响,病害问题更是制约其可持续发展的一个重要因素,如白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)。WSSV 是造成养殖对虾死亡的重要病毒(朱卫卫等, 2015),给全球对虾养殖业带来了巨大的经济损失(Verbruggen *et al*, 2016)。为了控制疾病的发生,减少经济损失,诸多学者探究 WSSV 的防治措施(曹家旺等, 2017)。然而,迄今尚未找到可有效控制 WSSV 的方法。本团队通过遗传选育的方式对中国对虾开展了十几代的抗 WSSV 选育,极大地提高了感染 WSSV 对虾的存活时间,但对虾抗病性状遗传力较低,选育

进展缓慢(Gitterle *et al*, 2007; Lu *et al*, 2017b)。另外,由于病原感染测试的传播性、测试场地紧缺,受试个体感染实验耗时耗力且很难达到同时感染的大规模测试要求,使得选择强度不够高,进一步延缓了选育进程。若通过提高对虾对逆境胁迫的耐受性能来间接提高其抗病力,将会加快对虾抗病力选育的进程、克服抗病测试受场地限制的问题、降低对人力和物力的需求。目前,对虾对逆境胁迫应激的耐受性与对病原的抵抗力之间的关系尚不清楚。因此,本研究利用氨氮急性胁迫应激测试获得耐受群体和敏感群体,开展凡纳滨对虾对氨氮急性胁迫应激的耐受性与 WSSV 抗性之间的关系,探索对虾对逆境急性胁迫应激的耐受性与对病原抵抗力的关系,研究结果将对培育抗逆抗病优良新品种具有指导作用。

1 材料与方 法

1.1 氨氮急性胁迫应激测试

实验所用材料来源于在 2011 年启动的凡纳滨对虾育种项目核心群体的第 5 代,参与测试的共 94 个家系,这些家系构建于 2016 年 6 月。为了测试此核心群体对急性毒理胁迫带来的应激抗逆能力,利用 94 个全同胞家系对其进行高浓度氨氮胁迫测试,对虾平均体重为 0.5 g,平均体长为 3.77 cm。测试实验于河北省黄骅市鑫海水产生物技术有限公司进行,由于实验时对虾太小无法进行物理标记,因此,从每个家系中随机选取 40 尾对虾,置于容量为 100 L 的独立白色桶中。测试条件为氨氮浓度 34 mg/L,实验期间 pH 为 8.05,温度为(27.0±0.5)°C,盐度为 30, 24 h 充气。实验期间,每隔 1 h 收集 1 次死虾,判定对虾死亡的标准为失去平衡、侧躺于桶底、对外界刺激无反应。在整个实验期间,每小时的初期利用捞网捞取死亡对虾,并且记录每个个体的家系编号、体长和死亡时间。每日投喂 2 次(06:00、22:00)配合饲料(日投饵量占对虾总体重的 3%),吸污 1 次。为了保持家系间的测试环境一致,整个实验期间各个桶之间的环境维持一致。在实验开始后的第 72 小时,胁迫测试实验结束。

1.2 WSSV 感染测试群体

氨氮急性胁迫应激测试实验结束后,根据每个家

系的平均存活时间对其进行排序。在家系间体长无显著差异的前提下, 从中分别挑选 5 个存活时间较长和 5 个存活时间较短的家系组成耐受群体(TP)和敏感群体(SP), 用于 WSSV 感染测试。

1.3 WSSV 毒饵的制备

取甲壳有明显白斑、濒死的对虾, 实时荧光定量 PCR 检测肌肉中 WSSV 拷贝数, 制成病毒载量为 10^7 copies/mg 的毒饵。在充分预冷的组织匀浆机中搅匀, 加入可食用红色素, 制成混合均匀、颜色醒目的毒饵, 毒饵制备过程在低温环境中快速进行, 并置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.4 WSSV 人工饲喂感染

当 TP 群体和 SP 群体每个家系的对虾个体的平均体重达到 3 g 左右时, 进行 VIE 荧光标记, 以便于混养测试。标记完成、暂养恢复后, 运回中国水产科学研究院黄海水产研究所, 暂养 4 d, 每日投喂 2 次 (06:00、22:00) 配合饲料 (日投饵量占对虾总体重的 3%), 期间利用吸污器将养殖整理箱中的水排出, 添加应激灵后补充干净海水。暂养后, 从每个家系中选取大小相近的 50 尾虾, 用于 WSSV 感染测试。每个群体设置 3 个处理水平: ①高浓度氨氮水平 (10 mg/L) 下 WSSV 感染组, TP 群体和 SP 群体的命名分别为 TPAV 和 SPAV; ②正常海水条件下 (氨氮水平小于 0.01 mg/L) WSSV 感染组, TP 群体和 SP 群体的命名分别为 TPV 和 SPV; ③正常海水无 WSSV 感染的空白对照组, TP 群体和 SP 群体的命名分别为 TPC 和 SPC。

每个家系平均分在 6 个 200 L 的塑料整理箱, 即每个处理有 2 个平行。饲喂毒饵前, 对虾饥饿处理 24 h, 保证其胃肠排空。用 WSSV 毒饵进行单尾人工口饲感染, 将制备的毒饵置于冰上, 用镊子夹取等量的毒饵 (约 10 mg) 轻轻送至对虾口器处, 待抱食后的对虾胃部出现明显的红色, 将其放到装有海水的整理箱。1 h 内完成所有个体的毒饵饲喂工作。根据预实

验结果, 选取 1 周内不会导致对虾显著死亡的氨氮浓度 (10 mg/L), 在 TPAV 和 SPAV 组的整理箱内同时加入 NH_4Cl , 使总氨氮浓度为 10 mg/L。实验期间, pH 为 7.8, 温度为 27°C , 盐度为 30, 24 h 充气, 进行正常的日常管理, 正常投饵、换水, 观察对虾死亡情况。利用同样的方式每隔 1 h 收集 1 次死虾, 记录每个个体的颜色号 (用于区别家系)、体重和死亡时间。为了保持家系间的测试环境一致, 整个实验期间各个桶之间的环境尽量保持一致。

1.5 数据统计及分析

以存活时间和家系半致死存活率为指标, 评价家系对氨氮胁迫的耐受能力。个体存活时间是从胁迫开始到死亡的时间 (h), 家系存活时间是家系内所有个体的平均存活时间 (h), 家系半致死存活率是全部测试个体死亡 50% 时各个家系的存活率 (SS_{50})。以存活率作为 2 个群体的 WSSV 抵抗力高低的指标。采用 SAS 软件对数据进行相关描述性统计分析, 利用 R 绘制箱线图, 利用 SPSS19.0 软件对数据进行其他统计分析。

2 结果

2.1 核心群体氨氮急性胁迫应激耐受性

本研究中共有 3688 个个体参与高浓度氨氮急性胁迫实验, 氨氮胁迫后的个体水平和家系水平的存活时间以及家系半致死存活率见表 1。结果显示, 在个体水平上, 个体间的存活时间表现出较大的差异, 最短存活时间为 2.00 h, 最大存活时间为 78.00 h, 平均存活时间为 36.61 h; 在家系水平上, 家系间的平均存活时间同样表现出较大的差异, 存活时间最短的为 15.63 h, 最长的为 64.56 h; 无论在个体水平还是在家系水平, 存活时间的标准差和变异系数均较大, 且个体水平的变异系数 (46.90%) 比家系水平 (28.50%) 高出近一倍。家系间半致死存活率同样表现出较大的差异, 最小存活率是 0, 最大是 94.87%, 且变异系数较高 (54.71%)。由图 1 可见, 无论是家系存活率 SS_{50}

表 1 氨氮急性胁迫后存活时间和家系半致死存活率
Tab.1 The survival time and survival rate at half lethal time (SS_{50}) after acute ammonia stress

指标 Indices		均值 Mean	最小值 Minimum	最大值 Maximum	标准差 Standard deviation	变异系数 (%) Coefficient variation
存活时间 Survival time (h)	个体水平 Individuals (3688 尾)	36.61	2.00	78.00	17.17	46.90
	家系水平 Families (94)	36.61	15.63	64.56	10.44	28.50
半致死存活率 SS_{50} (%)	家系水平 Families (94)	50.63	0	94.87	27.70	54.71

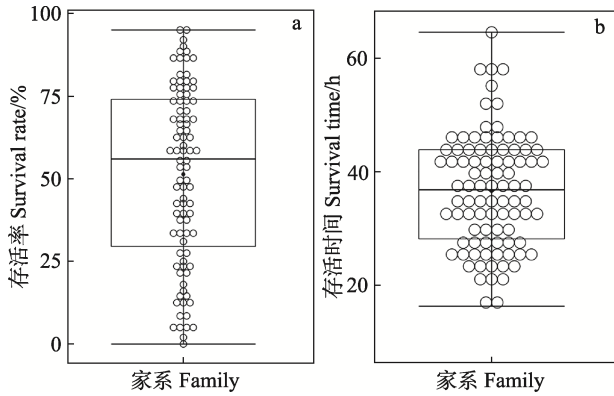


图 1 家系半致死存活率 SS₅₀(a)及平均存活时间(b)

Fig.1 The survival rate at half lethal time (SS₅₀) (a) and the average survival time of the families (b)

25%、50%、75%的家系分别组成了箱子的下、中、上线；最小值、最大值和观测值分别为-、-和○
The 25th (up line), median (inside line) and 75th (bottom line) percentiles of the families were plotted as boxes. The minimum, maximum, and the observed values were shown as -, -, and ○, respectively

(图 1a)还是家系平均存活时间(图 1b)，家系间的差异都比较大，表明家系间在氨氮急性胁迫耐受力方面具有较大的选育潜力，获得的氨氮耐受性差异较大的 2 个群体为 WSSV 感染测试提供了较为理想的材料。

2.2 氨氮敏感群体和耐受群体存活差异

根据平均存活时间对所有家系进行排序，结合半致死存活率，从性能表现的两个极端分别选取 5 个家系组成敏感群体和耐受群体(表 2)。结果显示，敏感家系的存活时间范围是 20.13~27.33 h，显著低于耐受家系的 51.21~64.56 h；敏感家系的半致死存活率范围是 2.38%~17.78%，显著低于耐受家系的 86.36%~94.87%。由这 10 个家系组成的敏感群体和耐受群体用于后续

表 2 氨氮敏感群体和耐受群体的存活时间和半致死存活率

Tab.2 The survival time and survival rate at half lethal time of the ammonia sensitive and tolerant families

家系类型 Family types	平均存活时间 Average survival time (h)	半致死存活率 SS ₅₀ (%)
敏感家系 Sensitive family	20.13	5.26
	23.02	2.38
	23.36	7.69
	25.24	4.76
	27.33	17.78
耐受家系 Tolerant family	51.21	89.74
	55.13	87.50
	57.66	86.36
	57.79	86.84
	64.56	94.87

的 WSSV 感染测试。

2.3 WSSV 感染后敏感群体和耐受群体存活差异

氨氮耐受群体(TP)和敏感群体(SP)在 3 个处理水平下的存活水平见表 3，实验结束时每个处理最终的存活率见图 2。结果显示，SP 群体在 WSSV 感染后的 5 h 开始出现死亡，而 TP 群体在 WSSV 感染后出现死亡的时间较晚，约为感染后的 16 h。实验结束时，SPAV 的存活率显著低于 SPV 和 SPC，同样地，TPAV 的存活率显著低于 TPV 和 TPC。SPAV 在 137 h 时全部死亡，而此时 TPAV 的平均存活率为 57.33%，而且在 144 h 实验结束时的存活率仍然高达 53.85%，显著高于 SPAV，但显著低于 TPC(P<0.05)。在正常海水条件下 WSSV 感染后，SPV 在实验结束时的平均存活率为 26.32%，显著低于 SPC(P<0.05)；此时 TPV 的存活率为 81.01%，显著高于 SPV(P<0.05)，而且与 TPC 之间无显著差异。表明氨氮急性胁迫应激会增加对虾对病毒的敏感性，而且对氨氮急性胁迫应激耐受力高的群体对 WSSV 的抵抗力也高。

表 3 WSSV 感染后氨氮敏感群体和耐受群体的存活水平
Tab.3 The survival level of the ammonia sensitive and tolerant families post WSSV challenge

组别 Groups	起始数 Starting number (ind.)	存活数 (存活率) Survival number (Survival rate) (%)	最小 存活时间 Minimum survival time (h)	最大 存活时间 Maximum survival time (h)
SPAV	77	0 (0) ^a	5	137
SPV	76	20 (26.32) ^b	5	Alive
TPAV	78	42 (53.85) ^c	18	Alive
TPV	79	64 (81.01) ^d	16	Alive
SPC	71	46 (65.22) ^{cd}	14	Alive
TPC	72	53 (73.61) ^d	16	Alive

注：不同字母表示组间差异显著(P<0.05)

Note: Different letters showed significant differences between groups (P<0.05)

2.4 WSSV 感染后累积死亡率的差异

SP 群体和 TP 群体的 3 个处理在实验期间不同时间的累积死亡率见图 3。实验开始 40 h 内，各个组间的累积死亡率无显著差异；随着实验进行，在 60 h 后 SPAV 组的死亡率呈直线上升趋势，到 137 h 时该组个体全部死亡，其累积死亡率显著高于 SPV(70.42%)、TPAV(42.67%)、TPV(18.99%)和 SPC (34.78%)(P<0.05)。在整个实验期间，TPAV、TPV、TPC 和 SPC 的死亡率比较平缓，SPV 在 40~100 h 期间死亡率急剧上升，在 100 h 后开始趋于平缓；在 144 h 实验结束时，SPV

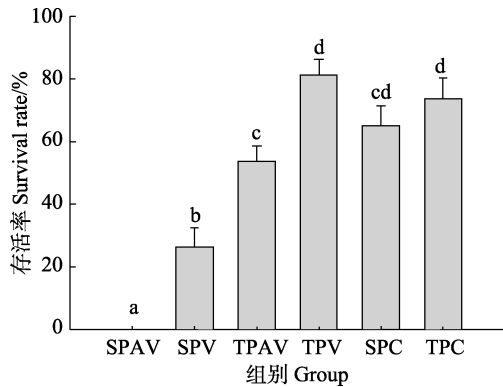


图 2 氨氮耐受和敏感群体感染 WSSV 144 h 的存活率
Fig.2 The survival rate of the ammonia tolerant and ammonia sensitive populations at 144 h post WSSV challenge

不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)
Different letters showed significant differences between groups ($P < 0.05$)

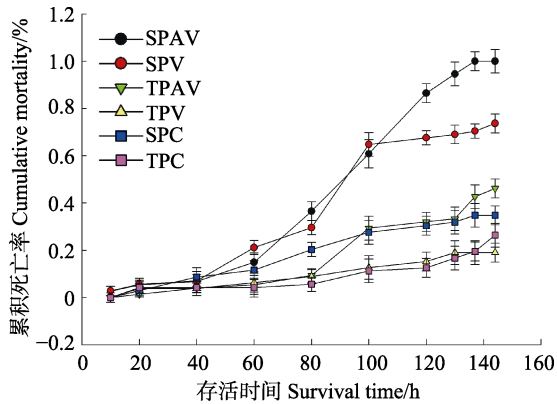


图 3 各组别感染后对虾累积死亡率
Fig.3 Cumulative mortality of infected shrimp of the groups from the two populations

的累积死亡率为 73.67%，显著低于 SPAV 组，但显著高于 TPAV (46.15%)、TPV (18.99%) 和 SPC (34.79%) ($P < 0.05$)；此时，TPAV 组的累积死亡率显著高于 TPV 和 TPC 组 ($P < 0.05$)，而 TPV 与 TPC 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究中，无论氨氮急性胁迫应激耐受群体还是敏感群体，在氨氮急性胁迫应激条件下 WSSV 感染组的死亡率显著高于正常海水条件下 WSSV 感染组 (图 2, 图 3)，表明养殖水环境中的氨氮胁迫会增加对虾对病原的敏感性，进而带来较高死亡率，与前期的研究报道一致。Liu 等 (2004) 利用 0、1、5、10、20 mg/L 浓度的氨氮胁迫凡纳滨对虾 120 h 内，不同浓度氨氮处理间的累积死亡率无显著差异，而且 0~20 mg/L 浓度的氨氮不会影响溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的生

长。在 0.01 (对照)、1.10、5.24、11.10、21.60 mg/L 浓度氨氮的条件下进行弧菌感染测试时，当感染 48~168 h 后，氨氮胁迫组的死亡率显著高于对照组，而且死亡率随着氨氮浓度升高和胁迫时间的延长逐渐升高，表明氨氮胁迫会抑制对虾的免疫防御功能，增加宿主对病原的敏感性。Cheng 等 (2004) 在 0.01 (对照)、1.12、3.22、5.25、10.18 mg/L 浓度氨氮的条件下对鲍鱼 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 进行副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 感染后，鲍鱼的累积死亡率随着氨氮浓度的升高显著增加，当弧菌感染 12 h 后，氨氮浓度为 3.22 mg/L 处理组的死亡率显著高于 1.12 mg/L 处理组及对照组，表明氨氮胁迫会增加鲍鱼对病原的敏感性，死亡率增加。另外，Lu 等 (2016) 利用来自同一家系的个体进行比较转录组分析，揭示氨氮急性胁迫应激对凡纳滨对虾毒理作用的分子机制，结果显示，应答氨氮胁迫的 6 条 KEGG 通路中有 5 条与免疫防御功能有关，而且被显著富集到 GO 类别和 KEGG 通路的绝大多数基因 (75%) 与免疫功能相关，这些被影响的基因的表达变化基本会降低对虾的免疫防御功能，这从分子水平证明了氨氮胁迫会抑制对虾的免疫防御功能。

既然氨氮胁迫会抑制对虾的免疫防御功能、增加其对病原的敏感性，而且已明确凡纳滨对虾的氨氮耐受性具有较高的遗传力 (0.575)，那么能否通过提高凡纳滨对虾的氨氮急性胁迫应激的耐受性而间接地提高其抗病力呢？本研究的结果给予了肯定的答案。由于所在课题组的技术和材料的优势，本研究对遗传多样性丰富的凡纳滨对虾核心群体的氨氮急性胁迫的耐受性进行了遗传评估，结果显示，家系间对氨氮急性胁迫应激的耐受性存在较大的差异 (表 1、图 1)，基于评估结果获得了氨氮急性胁迫耐受群体和敏感群体，为本研究的 WSSV 敏感性差异分析提供了重要的材料。通过对 2 个群体进行 WSSV 感染测试发现，氨氮急性胁迫耐受性高的群体同样对 WSSV 的抵抗力也高。本研究将有助于解决由于抗病测试场地匮乏、耗时耗力而抗病选育进展缓慢的问题。本研究由于场地和样本量的限制，仅设置 2 个平行；由于密度相对较高，1 天 1 次的换水也无法保证正常海水条件处理的氨氮水平一直维持在安全范围；另外，由于残食现象，导致部分个体的缺失。以上几个原因会导致本研究的结果在一定程度上偏离真实值，但仍然具有一定的参考价值。在未来的研究中，将继续利用已有的耐受群体和敏感群体，增加平行设置并扩大水体，进行进一步的验证工作，并逐步增加对其他病原开展感染测试来证实其普遍性。

参 考 文 献

- Alagappan KM, Deivasigamani D, Somasundaram ST, *et al.* Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Current Microbiology*, 2010, 61(4): 235–240
- Cao JW, Kong J, Luo K, *et al.* Immune priming response induced by heat-inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* at different temperature. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 128–136 [曹家旺, 孔杰, 罗坤, 等. 热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在不同温度下的免疫致敏反应. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 128–136]
- Chen JC, Lei SC. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1990, 21(4): 300–306
- Chen JC, Lin CY. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991, 100(3): 466–482
- Chen JC, Lin CY. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1992, 156(1): 139–148
- Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(3): 193–202
- Cobo MDL, Sonnenholzner S, Wille M, *et al.* Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 2014, 45(3): 470–475
- FAO. FAO fishery and aquaculture statistics yearbook. 2015
- Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2015 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2015]
- Gitterle T, Johansen H, Erazo C, *et al.* Response to multi-trait selection for harvest weight, overall survival, and resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2007, 272(1): S262
- Hurvitz A, Bercovier H, Rijn JV. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 1997, 7(1): 45–53
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(3): 321–334
- Lu X, Kong J, Luan S, *et al.* Transcriptome analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under acute ammonia stress. *PLoS One*, 2016; 11(10): e0164396
- Lu X, Luan S, Cao BX, *et al.* Estimation of genetic parameters and genotype-by-environment interactions related to acute ammonia stress in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles at two different salinity levels. *PLoS One*, 2017a, 12(3): e0173835
- Lu X, Luan S, Cao BX, *et al.* Heterosis and heritability estimates for the survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under the commercial scale ponds. *Acta Oceanologica Sinica*, 2017b, 36(2): 62–68
- Lu X, Luan S, Luo K, *et al.* Genetic analysis of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Heterosis and heritability for harvest body weight. *Aquaculture Research* 2015, 47(11): 3365–3375
- Ostrensky A, Wasielesky Jr W. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 1995, 132(3–4): 339–347
- Ran FH, Chen JC. Lethal effect of ammonia to juvenile *Metapenaeus ensis*. *Journal of Taiwan Fishery Society*, 1991, 18(1): 41–46 [冉繁华, 陈建初. 氨对沙虾(*Metapenaeus ensis*)幼虾之致死影响. 台湾水产学会刊, 1991, 18(1): 41–46]
- Verbruggen B, Bickley LK, van Aerle R, *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses*, 2016, 8(1): 23–52
- Wajsbrodt N, Krom MD, Samocha TM, *et al.* Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1990, 9(4): 497–504
- Zhu WW, Qiu DQ, Gan Z, *et al.* Antivirus effects of *Vibrio alginolyticus* peptidoglycan on *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2015, 35(6): 40–46 [朱卫卫, 邱德全, 甘楨, 等. 溶藻弧菌肽聚糖对凡纳滨对虾白斑综合征病毒的抑制作用. 广东海洋大学学报, 2015, 35(6): 40–46]

(编辑 马瑾艳)

Investigation on the Susceptibility Difference to WSSV between Ammonia Tolerant and Sensitive *Litopenaeus vannamei* Populations

LU Xia^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, CAO Baoxiang^{1,2}, HAO Dengchun^{1,2,3}, MENG Xianhong^{1,2},
CAO Jiawang^{1,2}, DAI Ping^{1,2}, LUO Kun^{1,2}, KONG Jie^{1,2}^①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The deterioration of water quality from the intensive culture system and environmental pollution are common problems in the practical farming of *Litopenaeus vannamei*. The toxicity from deteriorating water, such as ammonia accumulation, has lethal effect on shrimp and can increase the susceptibility to pathogens, which might cause frequent high mortality in the period of early stage of *L. vannamei* cultured in the farms. The high heritability of acute ammonia stress in *L. vannamei* (0.575) indicated its ammonia tolerance could be improved largely by selection. However, the genetic gain of the disease resistance is very slow in shrimp because of the low heritability of disease resistance traits and low selection intensity by the limitation of pathogen infection test. To explore and improve the ability of disease resistance, we performed the WSSV infection test with ammonia-sensitive population (SP) and ammonia-tolerant population (TP) under ammonia stress (10 mg/L), named SPAV and TPAV, the normal ammonia level (<0.01 mg/L), named SPV and TPV, and no ammonia stress without WSSV infection as the control group (<0.01 mg/L), named SPC and TPC. The results showed that SP started to die at 5 h after WSSV infection, which was significantly earlier than that of TP (about 16 h). The mortality rate of SPAV increased rapidly after 60 h and reached 100% at 137 h, which was significantly higher than SPV (70.42%), TPAV (42.67%), and TPV (18.99%). The cumulative mortality rate of SPV was 73.67% at 144 h, which was significantly lower than SPAV, but significantly higher than TPAV (46.15%), TPV (18.99%) and SPC (34.79%). The cumulative mortality rate of TPAV at 144 h was significantly higher than TPV and TPC, but there was no significant difference between TPV and TPC. These results indicated that ammonia stress increases the susceptibility to pathogens, and that the population with high ammonia tolerance have high WSSV disease resistance, which will provide new ideas to improve the disease resistance and reduce mortality.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Acute ammonia stress; White spot syndrome virus (WSSV); Ammonia-tolerant population; Ammonia-sensitive population

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20161207001

http://www.yykxjz.cn/

郝登春, 栾生, 曹宝祥, 郭聚涛, 罗坤, 陈宝龙, 孟宪红, 许圣钰, 孔杰. 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 90-96
Hao DC, Luan S, Cao BX, Guo JT, Luo K, Chen BL, Meng XH, Xu SY, Kong J. Genetic parameters of survival of juvenile families of *Litopenaeus vannamei* during desalination and culture stages. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 90-96

凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段 存活性状遗传参数估计*



郝登春¹ 栾生^{2,4} 曹宝祥^{2,4} 郭聚涛³ 罗坤^{2,4}
陈宝龙^{2,4} 孟宪红^{2,4} 许圣钰³ 孔杰^{2,4}①

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 河北鑫海水产生物技术有限公司 黄骅 061100;
4. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 准确估计育种目标性状的遗传参数, 评估其改良潜力, 是制定育种方案、进行选择育种工作的重要前提条件。本研究对 100 个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)家系 15000 尾仔虾个体进行淡化和低盐养殖实验, 分析了 2 个阶段家系间存活率的差异, 并进一步估计存活性状的遗传力。结果显示, 2 个阶段存活率范围分别为 19.3%~100.00%和 11.86%~99.22%, 平均存活率分别为 66.7%和 67.5%。家系幼虾期总体存活率为 6.67%~90.67%, 平均存活率为 46.91%。统计分析显示, 2 个阶段家系间存活率差异极显著($P<0.01$), 存活率的相关系数为 0.61($P<0.01$), 呈中度正相关($0.3<r<0.8$)。利用加性效应(A)和加性+共同环境效应(A+C)模型分别估计了淡化、低盐度养殖以及合并 2 个阶段存活性状转换后的遗传力。基于 A 模型, 淡化阶段、养殖阶段和合并 2 个阶段存活性状转换后的遗传力分别为 0.46、0.41 和 0.53, 与 0 相比, 估计值均达到极显著水平($z>2.58$); 基于 A+C 模型, 3 个阶段遗传力转换后估计值分别为 0.06、0.05 和 0.07, 与 0 相比, 估计值均未达到显著水平($z<1.96$)。基于 A 模型和 A+C 模型, 获得的 2 个阶段间家系存活性状育种值的相关系数分别为 0.41±0.09 和 0.48±0.09。由于半同胞家系比例仅为 47%, 家系单独在网箱中测试, 家系遗传效应与共同环境效应部分混淆, 因此, 基于 A 模型获得的遗传力估计值偏高, 基于 A+C 模型获得的遗传力估计值偏低。本研究结果表明, 通过多代选择育种, 可以改良凡纳滨对虾幼虾淡化和低盐度养殖存活性能。

关键词 凡纳滨对虾; 淡化实验; 存活率; 遗传力

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)04-0090-07

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2015B04XK01)、农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(2016-X39)、泰山学者种业人才团队项目、中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022016006)和山东省重点计划项目(2016GSF115030)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2015B04XK01), Project of the Introduction of International Advanced Agricultural Science and Technology Plan from Ministry of Agriculture (2016-X39); Taishan Scholar Program for Seed Industry, Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016006), and Primary Research and Development Plan for Shandong Province (2016GSF115030)]. 郝登春, E-mail: 2577967083@qq.com

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-12-07, 收修改稿日期: 2016-12-29

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国重要的对虾养殖品种, 2015 年产量达 160 多万 t, 占全国对虾养殖总产量的 80%以上(农业部渔业局, 2015)。凡纳滨对虾可在盐度为 0.5~40 的范围内生存, 仔虾期经淡化后可在低盐度条件下生长。随着凡纳滨对虾淡化培育技术的发展, 低盐度养殖已成为凡纳滨对虾的主要养殖模式之一(杨海朋等, 2014)。国内低盐度养殖产量超过 73 万 t (农业部渔业局, 2015), 但尚未培育出专门针对低盐度养殖的新品种。

在正常海水盐度养殖条件下, 国内外学者对凡纳滨对虾的选育已见成效。Goyard 等(1992)开展了凡纳滨对虾的选育工作, F_4 和 F_5 生长率分别提高了 18% 和 21%; Donato 等(2005)对凡纳滨对虾持续选育 11 代, 显著提高了其存活率和生长速率; 黄永春等(2010)选育了经白斑综合征病毒(WSSV)感染的凡纳滨对虾家系, 其存活率显著高于对照组。国内凡纳滨对虾种虾主要来自正大、SIS 等国际种虾公司, 其性状测试主要在国外测试场进行, 尚未在国内针对包括低盐度养殖在内的各种养殖模式建立性状测试场。种虾引入国内后, 可能会存在较强的基因型与环境互作效应。

已有研究表明, 在低盐条件下, 凡纳滨对虾的生长速率、特定生长率、饲料转化率和抗逆性等均较低(申玉春等, 2010、2012; Wang *et al.*, 2010)。因此, 针对凡纳滨对虾低盐度养殖模式开展选择育种研究势在必行。当前, 主要是以家系为基础开展凡纳滨对虾选择育种, 利用数量遗传学估计重要经济性状的遗传参数, 预测其育种值, 比较不同家系和个体间性能差异, 通过最优化配种技术组配优秀家系和个体, 不断提高育种群体的遗传进展。为有效开展针对低盐度养殖模式的选择育种研究, 首先, 需要估计目标性状的遗传参数; 其次, 为提高选择强度、增加遗传进展和降低近交率等, 要求育种群体维持一定规模的家系数(Gitterle *et al.*, 2005a)。目前, 多数低盐度环境下凡纳滨对虾家系存活性能研究报道涉及的家系数少, 且尚未大规模开展家系在低盐度环境下生长和存活性能的测试和遗传评估研究。本研究从凡纳滨对虾育种核心群 2015G4 代家系中, 随机选择 100 个家系, 在低盐度条件下测试和比较家系幼虾淡化和养殖阶段的存活率, 并进一步估计了 2 个阶段存活性状的遗传参数, 为选育适应低盐度养殖条件下的凡纳滨对虾优良新品种提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 家系构建

在河北鑫海水产生物技术有限公司遗传育种中

心测试车间开展家系幼虾淡化和养殖测试实验。实验用亲虾为 2014G3 代育种核心群个体。该育种群体以生长速度和存活率为育种目标性状, 已经连续选育了 4 个世代(Sui *et al.*, 2016)。由于该群体系谱清楚, 家系间存在遗传联系, 可以更准确地估计存活性状的遗传参数。通过眼柄标记后进行强化培育, 并从中挑选性腺发育成熟的亲虾, 根据配种方案并利用定向交尾技术构建 2015G4 代家系, 在 170 L 白桶孵化。孵化出幼体后, 每个家系随机留取 10000 尾在 170 L 白桶培育至仔虾, 之后再随机留取 1500 尾至 170 L 白桶继续培育, 期间主要投喂虾片、螺旋藻(*Spirulina*)、卤虫(*Artemia*)和配合饲料等。每 4 h 投喂 1 次, 投喂量及比例根据不同发育时期适当调整, 每天换水并逐渐加大换水量, 直至所有家系变为仔虾。

1.2 家系幼虾淡化和养殖测试

随机选取 100 个家系(表 1), 每个家系随机选取 150 尾个体应用于淡化和养殖实验。淡化养殖分 2 个阶段, 第 1 阶段是淡化过程, 盐度从 30 降到 5, 持续 32 d; 第 2 阶段是低盐度养殖过程, 持续 37 d。

第 1 阶段: 每个家系测试个体置于(0.4×0.4×1.0) m³ 的网箱中, 暂养 7 d。淡化过程主要是通过排出高盐度海水并加入人工配制的低盐度海水完成; 低盐度海水由正常盐度海水中加入一定量的淡水并经充分曝气配制而成; 每天降低盐度为 1~2, 直到盐度降低至 5 时淡化过程结束。淡化过程投喂虾片、配合饲料并通过调整比例逐步过渡到仅有配合饲料, 每 6 h 投喂 1 次。淡化结束后, 凡纳滨对虾家系在盐度为 5 的水体中稳定 10 d。

第 2 阶段: 统计每个家系的存活个体数, 计算第 1 阶段每个家系存活率, 然后将存活个体移入 0.7×0.7×1.0 m³ 网箱中, 在盐度为 5 的海水中持续养殖 37 d。养殖过程中投喂配合饲料, 每 6 h 投喂 1 次, 每天换水, 换水量为 20%, 及时捞取残饵。第 2 阶段结束, 达到 VIE(Visible Implant Elastomer)标记规格时, 统计每个家系的存活个体数, 计算本阶段养殖存活率, 取样 30 尾个体测量每个家系的平均体重。上述整个过程温度为(26.5±0.4)°C, pH 为 8.01±0.30。

1.3 数据分析

对于存活性状, 存活个体记录为 1, 死亡个体记录为 0。利用广义线性混合效应模型和 AIREML (Average information restricted maximum likelihood method)方法估计存活性状的方差组分(栾生等, 2013)。育种分析模型为父母本模型:

模型 A:

$$\Pr(y_{ijk}=1)=\Pr(l_{ijk}>0)=\Phi(\mu+\text{Age}_k+s_i+d_j) \quad (1)$$

模型 A+C:

$$\Pr(y_{ijkn}=1)=\Pr(l_{ijkn}>0)=\Phi(\mu+\text{Age}_k+f_n+s_i+d_j) \quad (2)$$

式中, y_{ijk} 或 y_{ijkn} 表示第 k 尾虾的存活状态(1 为存活, 0 为死亡); l_{ijk} 或 l_{ijkn} 为潜在变量, 假定符合累积标准正态分布, 如果 l_{ijk} 或 $l_{ijkn}>0$, 那么 y_{ijk} 或 $y_{ijkn}=1$; 如果 l_{ijk} 或 $l_{ijkn}\leq 0$, 那么 y_{ijk} 或 $y_{ijkn}=0$; μ 为总体均值; Age_k 为第 k 尾虾日龄; s_i 为第 i 个父本的加性遗传效应, d_j 为第 j 个母本的加性遗传效应, f_n 是由于家系单独养殖产生的共同环境效应。

存活性状的遗传力计算公式:

$$\text{模型 A: } h_i^2 = \frac{4\sigma_{sd}^2}{2\sigma_{sd}^2 + \sigma_e^2}$$

$$\text{模型 A+C: } h_i^2 = \frac{4\sigma_{sd}^2}{2\sigma_{sd}^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2}$$

式中, σ_{sd}^2 为存活性状父母本方差组分均值, σ_c^2 为共同环境方差组分, σ_e^2 为残差方差组分。

基于 Probit 模型估计的遗传力, 是基于潜在变量尺度, 需要转换为表型值尺度, 转换公式为(Robertson *et al.*, 1949):

$$h_p^2 = \frac{z^2}{\bar{p}(1-\bar{p})} h_i^2$$

式中, h_p^2 为基于表型值尺度的遗传力估计值, z 是当潜在变量分布上右端面积为 \bar{p} 时截点处纵高。

z -score 用来检验遗传力估计遗传力估计值与 0 之间是否存在显著差异。其公式为:

$$z = \frac{x_i}{\sigma_i}$$

式中, x_i 是存活性状的遗传力估计值, σ_i 是相应的遗传力的标准误。如果 $z \geq 1.96$, 遗传力估计值与 0 存在显著差异; 如果 $z \geq 2.58$, 遗传力估计值与 0 存在极显著差异。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖存活率的描述性统计量

凡纳滨对虾家系幼虾期 2 个阶段存活率的描述性统计参数见表 2。家系幼虾期淡化和养殖阶段存活率平均值分别为 66.69% 和 67.48%, 后者略高于前者。每个阶段家系间存活率差异达到显著性水平 ($P < 0.05$)。家系幼虾期整体存活率均值为 46.91%, 最小值为 6.67%, 最大值为 90.67%, 变异系数高达 53.51%。箱形图也显示(图 1), 家系存活率均值与中位数不重合, 上下 Whisker 长度不一致, 低存活率家系间存较大差异。淡化与养殖阶段家系存活率的相关系数为 0.61 ($P < 0.01$), 表现为中度线性正相关 ($0.3 < r < 0.8$) (图 2)。测试日龄与淡化、养殖阶段和合并阶段的存活率的相关系数分别为 0.46 ± 0.09 ($P < 0.01$)、 0.16 ± 0.10 ($P > 0.05$) 和 0.36 ± 0.09 ($P < 0.01$), 平均体重与养殖阶段存活率的相关系数为 0.19 ± 0.10 ($P > 0.05$)。

表 1 凡纳滨对虾 2015G4 代淡化测试全(半)同胞家系数及其亲本数量

Tab.1 The number of sires, dams, full-sib and half-sib families in the generation G4 of *L. vannamei*

世代 Generation	父本 Male parent	母本 Female parent	全同胞家系 Full-sib families	半同胞家系 Half-sib families
2015G4	83	85	100	47

表 2 凡纳滨对虾幼虾淡化和养殖阶段存活性状的家系数、均值、最小值、最大值、标准差和变异系数

Tab.2 The number, mean, minimum, maximum, standard deviation and coefficient of variation for survival rate of the juvenile Pacific white shrimp *L. vannamei* at desalination and culture stages

项目 Items	淡化阶段 Desalination stage	养殖阶段 Culture stage	合并两阶段 Combination of two stages
家系数数量 Number of full-sib families	100	100	100
入池个体总数 Stocking number	15000	10148	15000
存活个体总数 Survival number	10148	7076	7076
均值 Mean (%)	66.69	67.48	46.91
最小值 Minimum (%)	19.33	11.86	6.67
最大值 Maximum (%)	100.00	99.22	90.67
标准差 Standard deviation (%)	22.97	20.75	25.10
变异系数 Coefficient of variation (%)	34.44	30.75	53.51

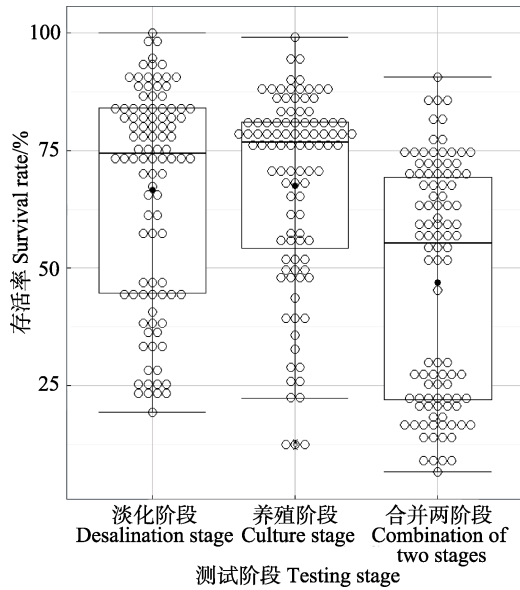


图 1 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活率箱形图

Fig.1 Box plot of the survival rate of the juvenile Pacific white shrimp *L. vannamei* at desalination and culture stages

箱形图盒子由中位数、第 1 四分位数和第 3 四分位数组成。Whisker 上限值和下限值用横线表示, 线外数值为异常值。The median, 25th and 75th percentiles are plotted as boxes. Upper and lower limits of whiskers were shown as lines. Data beyond the end of the whiskers are outliers.

2.2 凡纳滨对虾育种群体幼虾淡化和养殖阶段存活性状的遗传参数

幼虾淡化和养殖阶段存活性状的遗传参数见表 3。模型中仅包括加性遗传效应(模型 A), 获得 2 个阶段存活性状的转换后遗传力分别为 0.46 和 0.41, 2 个阶段数据合并后得到的转换后遗传力估计值为 0.53, *z*-score 检验显示, 与 0 相比, 达到极显著水平($z > 2.58$); 在模型中进一步包括共同环境效应(A+C), 获得 2 个阶段存活性状的转换后遗传力分别为 0.06 和 0.05, 2 个阶段数据合并后得到的转换后遗传力估计值为 0.07, 与 0 相比, 估计值均未达到显著水平($z < 1.96$)。

由家系单独养殖产生的共同环境方差所占比例较大, 3 个阶段 c^2 估计值均为 0.23, 且与 0 相比, 统计性检验达到显著。基于 A 模型和 A+C 模型, 获得的 2 个阶段间家系存活性状育种值的相关系数分别为 0.41 ± 0.09 和 0.48 ± 0.09 。对于广义线性模型, 难以用 LogL 值评价模型优劣, 比较 A 模型和 A+C 模型的 BIC 值, 后者小于前者, 因此, A+C 模型更优。

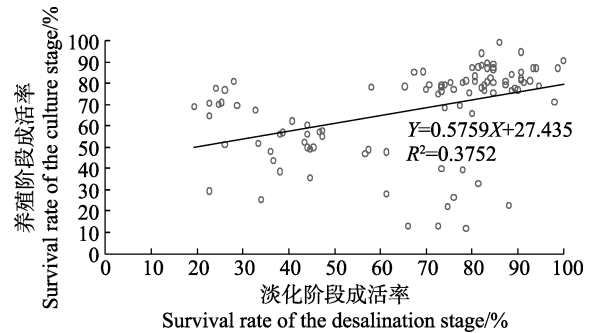


图 2 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活率散点图

Fig.2 Scatter plot of the survival rate of the juvenile Pacific white shrimp *L. vannamei* at desalination and culture stages

3 讨论

3.1 低盐度养殖环境下凡纳滨对虾家系存活率差异

本研究中, 凡纳滨对虾幼虾 100 个家系在淡化阶段和养殖阶段的存活率差异极显著, 变异系数较大 (30.75%~53.51%), 家系间适应低盐度的能力差异可能由家系的遗传差异性导致; 2 个阶段家系存活相关系数为 0.61, 说明整体趋势表现为在淡化阶段存活率高的家系在养殖阶段的存活率也较高。在低盐度条件下, 环境与体液形成的渗透压差会造成对虾生理状态的变化。对虾个体的渗透压调节能力影响着其生长和存活状态。甲壳动物维持渗透压平衡主要是通过调节血淋巴中无机离子以及其他渗透压效应物含量, 调节能力主要取决于血淋巴中水分和无机离子的通透性

表 3 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计

Tab.3 Genetic parameters in survival rate of juvenile families for desalination and culture stage in Pacific white shrimp *L. vannamei*

阶段 Stages	模型 Model	BIC	$4\sigma_{sd}^2$	σ_c^2	σ_e^2	σ_p^2	h_l^2	h_p^2	c^2
淡化阶段 Desalination stage	A	74.65	1.26	/	1	1.63	0.77±0.07	0.46	/
	A+C	55.85	0.14	0.31	1	1.38	0.10±0.11	0.06	0.23±0.06
养殖阶段 Culture stage	A	38.99	1.09	/	1	1.55	0.70±0.07	0.41	/
	A+C	32.63	0.12	0.31	1	1.37	0.09±0.14	0.05	0.23±0.07
合并两阶段 Combined two-stage	A	85.13	1.41	/	1	1.71	0.83±0.07	0.53	/
	A+C	71.55	0.16	0.36	1	1.44	0.11±0.13	0.07	0.23±0.07

以及渗透压效应物的含量(潘鲁青等, 2005)。凡纳滨对虾淡水耐受性实验结果可作为评价虾苗质量的一项指标, 淡水耐受性较强的家系在养殖过程中的生长速度及存活率有一定优势。不同家系由于遗传背景不同致使其渗透压调节能力存在差异。丁森等(2007)研究发现, 对虾不同发育时期的渗透压调节能力不同, 随着个体发育其调节能力逐渐增强。本研究分析也表明, 日龄与淡化、养殖和合并阶段存活率存在一定程度的正相关(0.16~0.46)。因此, 为了准确地估计不同阶段存活性状的遗传参数, 需将日龄作为协变量纳入模型中校正不同家系的存活率。

3.2 凡纳滨对虾家系存活性状的遗传参数

存活性状在数量遗传学上被称为阈值性状, 是一类表型符合二项分布(存活和死亡), 但在遗传上由多基因决定的复杂性状, 水产动物中应用的主要有线性动物模型和父母本阈模型两种方法(张嘉晨等, 2016)。已有学者利用线性动物模型估计了尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)存活率遗传力(0.03~0.14)(Rezk *et al*, 2009), 栾生等(2012)利用父母本阈模型估计了斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)存活率遗传力(0.021~0.053)。殷宗俊等(2005)认为, 利用 GLMM 方法和父母本阈模型优于常规线性模型。本研究利用父母本阈值模型估计了凡纳滨对虾幼虾淡化和养殖阶段存活性状的遗传力, 基于 A+C 模型获得的估计值为 0.05~0.07, 属于低遗传力。Caballero-Zamora 等(2015)和 Gitterle 等(2005a)估计凡纳滨对虾存活率遗传力为(0.06±0.03)和(0.04~0.10), 也均表现为低遗传力。其他水产动物如中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (0.03±0.021) (栾生等, 2008)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (0.06~0.12) (Wang *et al*, 2010)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (0.007±0.020~0.066±0.44) (Luan *et al*, 2015)的存活性状估计值也均属于低遗传力。利用线性动物模型获得的斑节对虾(*Penaeus monodon*)存活率遗传力估计值较高(0.27±0.07 和 0.36~0.71) (Kenway *et al*, 2006; Krishna *et al*, 2011), 主要因为模型中无法有效地剖分出由家系单独养殖产生的共同环境效应。Gitterle 等(2005b)研究表明, 收获体重及存活性状的共同环境效应占有一定的比例, 因此, 在估计体重和存活性状遗传力时应剖分共同环境效应。同时也指出, 应通过标准化各家系的养殖条件以及缩短标记前暂养时间来降低共同环境效应。

本研究中, 利用 A 和 A+C 模型获得的存活性状的遗传力估计值差别较大, 其主要原因有两个。第一

个因素是各网箱的环境差异较大。由于幼虾个体小, 无法标记家系进行混养测试, 每个家系个体不得不在单独的网箱中养殖。尽管各个网箱同处一个养殖池, 整个大环境条件基本一致, 但不同网箱的内部环境还是存在较大差异。在养殖过程中, 由于不同家系的遗传差异性导致在低盐度环境下的存活率不一致, 进而产生养殖密度差异。这种养殖密度差异会导致网箱内个体间的竞争性、饲料利用率存在差异。竞争性的强弱会影响网箱的存活率。网箱面积小, 清理困难, 多余的饲料和粪便等会导致不同网箱的水质存在较大差别, 也会影响存活率。第二个原因是半同胞家系比例较低, 导致难以准确剖分出共同环境效应。本研究群体半同胞家系数仅占 47%, 而且由于二项分布的特点, 使每个家系仅有 1 个存活率数据, 没有重复, 实验数据较少, 导致遗传力估计值存在偏差。随着选育世代的增加, 测试规模的不断扩大, 系谱信息和家系测定数据的不断累积, 存活性状遗传力估计值将更加准确。此外, 仔虾期直接混养家系个体, 然后基于微卫星等分子标记亲子鉴定技术识别不同家系个体, 将会大幅度地降低共同环境效应, 生长和存活性状遗传参数估计值会更加准确。

参 考 文 献

- Caballero-Zamora A, Montaldo HH, Campos-Montes GR, *et al*. Genetic parameters for body weight and survival in the Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* affected by a white spot syndrome virus (WSSV) natural outbreak. *Aquaculture*, 2015, 447: 102-107
- Ding S. The basic research of effects of salinity fluctuation on the ecophysiology of *Fenneropenaeus chinensis*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007, 35-48 [丁森. 盐度变化对中国明对虾生理生态学影响的基础研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 35-48]
- Donato MD, Manrique R, Ramirez RC, *et al*. Mass selection and breeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 159-167
- Gitterle T, Rye M, Salte R, *et al*. Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions. *Aquaculture*, 2005a, 243(1-4): 83-92
- Gitterle T, Salte R, Gjerde B, *et al*. Genetic (co)variation in resistance to white spot syndrome virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2005b, 246(1-4): 139-149
- Goyard E, Patmis J, Peigllon JM. IF-REMER's shrimp genetics program. *Aquaculture Advocate*, 1992, 2(6): 26-28
- Huang YC, Ai HS, Yin ZX, *et al*. Studies on WSSV-resistant and

- immune characteristic of 4th generation selective breeding families for resistant to the white spot syndrome virus (WSSV) of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1549–1557 [黄永春, 艾华水, 殷志新, 等. 第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病及免疫特性研究. 水产学报, 2010, 34(10): 1549–1557]
- Kenway M, Macbeth M, Salmon M, *et al.* Heritability and genetic correlations of growth and survival in black tiger prawn *Penaeus monodon* reared in tanks. Aquaculture, 2006, 259(1): 138–145
- Krishna G, Gopikrishna G, Gopal C, *et al.* Genetic parameters for growth and survival in *Penaeus monodon* cultured in India. Aquaculture, 2011, 318(1–2): 74–78
- Luan S, Bian WJ, Deng W, *et al.* Genetic parameters for growth and survival of the base population in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal of Fisheries of China, 2012, 36(9): 1313–1321 [栾生, 边文冀, 邓伟, 等. 斑点叉尾鲷基础群体生长和存活性状遗传参数估计. 水产学报, 2012, 36(9): 1313–1321]
- Luan S, Kong J, Zhang TS, *et al.* Phenotype and breeding value based correlation analyses of growth and stress-resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis*. Marine Fisheries Research, 2008, 29(3): 14–20 [栾生, 孔杰, 张天时, 等. 基于表型值和育种值的中国对虾生长、抗逆性状相关分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 14–20]
- Luan S, Luo K, Ruan XH, *et al.* Genetic parameter and genotype by environment interaction for body weight and survival of white pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 445–452 [栾生, 罗坤, 阮晓红, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)体重、存活性状的遗传参数和基因型与环境互作效应. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 445–452]
- Luan S, Wang JY, Yang GL, *et al.* Genetic parameters of survival for six generations in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture Research, 2015, 46(6): 1345–1355
- Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. China. China fishery statistics yearbook in 2015. Beijing: China Agriculture Press, 2015, 28–30 [农业部渔业局. 2015年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2015, 28–30]
- Pan LQ, Liu HY. Review on the osmoregulation of crustacean. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 109–114 [潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展. 水产学报, 2005, 29(1): 109–114]
- Rezk MA, Ponzoni RW, Khaw HL, *et al.* Selective breeding for increased body weight in a synthetic breed of Egyptian Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Response to selection and genetic parameters. Aquaculture, 2009, 293(3–4): 187–194
- Robertson A, Lerner IL. The heritability of all-or-none traits: Viability of poultry. Genetics, 1949, 34(4): 395–411
- Shen YC, Chen ZZ, Liu L, *et al.* The effects of salinity and nutrition on molt and growth of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 290–299 [申玉春, 陈作洲, 刘丽, 等. 盐度和营养对凡纳滨对虾蜕壳和生长的影响. 水产学报, 2012, 36(2): 290–299]
- Shen YC, Chen ZZ, Wu ZH, *et al.* Effects of salinity and nutrition on growth, respiration and excretion of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 111–118 [申玉春, 陈作洲, 吴灶和, 等. 盐度和营养对凡纳滨对虾生长、耗氧率及排氨率的影响. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 111–118]
- Sui J, Luan S, Luo K, *et al.* Genetic parameters and response to selection for harvest body weight of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research, 2016, 47(9): 2795–2803
- Wang XA, Ma AJ, Huang ZH, *et al.* Heritability and genetic correlation of survival in turbot (*Scophthalmus maximus*). Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(6): 1200–1205
- Wang XQ, Cao M, Yan BL. Effects of salinity fluctuation and dietary protein/carbohydrate ratio on the survival and growth of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Marine Science Bulletin, 2010, 12(2): 61–72
- Yang HP, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* The relationship between tolerance to fresh water and growth traits for desalination culture in families of Pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of Tropical Oceanography, 2014, 33(4): 69–76 [杨海朋, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾家系淡水耐受性状与生长性状的关系. 热带海洋学报, 2014, 33(4): 69–76]
- Yin ZJ, Zhang Q. Estimation of heritability for threshold traits in livestock using GLMM method. Journal of China Agricultural University, 2005, 10(6): 33–36 [殷宗俊, 张勤. 利用 GLMM 方法估计家畜阈性状的遗传力. 中国农业大学学报, 2005, 10(6): 33–36]
- Zhang JC, Cao FJ, Liu JY, *et al.* Estimation on genetic parameters and genetic gain in growth and hypoxic tolerance traits of *Litopenaeus vannamei*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(4): 869–874 [张嘉晨, 曹伏君, 刘建勇, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长和耐低溶氧性状的遗传参数估计和遗传获得评估. 海洋与湖沼, 2016, 47(4): 869–874]

Genetic Parameters of Survival of Juvenile Families of *Litopenaeus vannamei* During Desalination and Culture Stages

HAO Dengchun¹, LUAN Sheng^{2,4}, CAO Baoxiang^{2,4}, GUO Jutao³, LUO Kun^{2,4}, CHEN Baolong^{2,4}, MENG Xianhong^{2,4}, XU Shengyu³, KONG Jie^{2,4}^①

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Hebei Xinhai Aquatic Biological Technology Co., Ltd, Huanghua 061100; 4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Genetic parameters of breeding object traits are important to design breeding scheme and evaluate selection response before performing a selective breeding program. In this study, a total of 15000 individuals from 100 families of *Litopenaeus vannamei* at the juvenile stage were desalinated and reared at a low salinity of 5 to explore the survival rate and the heritability. The results showed that the range of the survival rate at the desalination stage and culture stage were 19.33%–100.00% and 11.9%–99.2%, and the average survival rate were 66.7% and 67.5%, respectively. The range of the overall survival rate at the juvenile stage was 6.67%–90.67% with the average survival rate 46.91%. There were significant differences on the survival rate between families at two stages ($P < 0.01$). There was significant and moderate positive correlation on the survival rate of families between two stages ($r = 0.61$, $P < 0.01$). The heritabilities of survival for two stages were estimated by the model of the additive genetic effect (A) and the model combining A and the common environmental effect (C). Based on the A model, the heritability of survival for the desalination stage, culture stage and combination of two stages were 0.09, 0.10 and 0.14, respectively, which were significantly different from zero ($z > 2.58$). Based on the A+C model, heritability of survival were 0.06, 0.05 and 0.07, respectively, which were not significantly different from zero ($z < 1.96$). The genetic correlation on the survival rate of families between two stages for the A and A+C models were 0.41 ± 0.09 and 0.48 ± 0.09 , respectively. The additive genetic effect was partially confounded with the common environmental effect because the proportion of half-sib families to full-sib families was only 47% when each family were cultured in a separate cage. Therefore, the heritability estimates based on the A model were overestimated, and the heritability estimates based on the A+C model was underestimated. The results implied that the adaptability of low salinity for Pacific white shrimp can be improved through a selective breeding program.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Desalination; Survival; Heritability

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20161128001

http://www.yykxjz.cn/

王竹青, 任宪云, 高保全, 刘萍, 张小辉, 张杰, 于旋. 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶 β 亚基(*F-ATPase β*)基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 97–106

Wang ZQ, Ren XY, Gao BQ, Liu P, Zhang XH, Zhang J, Yu X. cDNA cloning and expression analysis of *F-ATPase β* subunit gene in *Portunus trituberculatus* and its variation in family inbreeding. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 97–106

三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶 β 亚基(*F-ATPase β*)基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化*

王竹青^{1,2} 任宪云² 高保全² 刘萍^{2①}
张小辉^{1,2} 张杰^{1,2} 于旋²



(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用 RACE 技术(cDNA 末端快速扩增技术)克隆获得三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) F 型 ATP 酶 β 亚基(*F-ATPase β*)基因, 命名为 *ptF-ATPase β* 。该基因 cDNA 全长为 1965 bp, 5'和 3'非编码区分别为 571 bp 和 341 bp, 开放阅读框为 1053 bp, 推测编码 350 个氨基酸, 预测分子量为 37.9 kDa, 理论等电点为 4.86。*ptF-ATPase β* 氨基酸序列含有 F1-ATPase β 标志性蛋白结构域、AAA 结构域和 ATP-synt-ab-C 结构域。同源性及系统分析显示, *ptF-ATPase β* 氨基酸序列与斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性高达 89%。实时荧光定量 PCR 显示, *ptF-ATPase β* 基因在肝胰腺、肌肉、心脏、鳃、胃、肠、精巢和卵巢中均有表达, 其中, 在肝胰腺和心脏中表达量最高, 在肠中最少。随着近交系数的增加, 各代 *ptF-ATPase β* 基因的表达量在肝胰腺和心脏中均下降且显著低于 F₀代($P < 0.05$)。酶活检测结果显示, 心脏中的 ATP 合酶活性从 F₆代开始出现下降且显著低于 F₀代($P < 0.05$), 但肝胰腺中 ATP 合酶活性无显著变化。本研究结果表明, 近交造成了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因表达及 ATP 合酶活力的衰退。

关键词 三疣梭子蟹; *F-ATPase β* ; 基因克隆; 表达分析; 近交

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0097-10

ATP 合酶又称 F 型 ATP 酶(F-ATPase), 广泛分布于线粒体内膜上, 是生物体能量代谢的关键酶, 在生物体内通过氧化磷酸化和光合磷酸化参与到 ATP 的合成过程(王镜岩等, 2002)。ATP 合酶是一个蛋白质复合体, 呈蘑菇状, 分为球形的 F1(头部)和嵌入膜内的 F0(基部)。F1 是由 5 种多肽组成的 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 复合体,

具有 3 个 ATP 合成催化位点, 而只有 β 亚基可催化 ATP 的合成反应。F0 是由 3 个多肽组成的 ab_2c_{12} 复合体, 并嵌入线粒体内膜(倪张林等, 2003)。ATP 合酶 β 亚基在植物叶绿体和线粒体中的研究较多, 证明其功能与植物体胚发育(赖呈纯等, 2010)、盐度适应(李敏等, 2013)、次生代谢(关蕾, 2013)等有关。在水产动物中

* 国家自然科学基金面上项目(41576147)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(20603022015016)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41576147), the Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), and the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes (20603022015016)]. 王竹青, E-mail: leon19910215@outlook.com

① 通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-11-28, 收修改稿日期: 2016-12-27

对 ATP 合酶 β 亚基研究较少。Li 等(2009)发现, ATP 合酶 β 亚基与无脊椎动物造血激素存在特异性结合作用。徐萌霖(2013)发现, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)ATP 合酶 β 亚基 BP53 蛋白可作为受体参与对虾白斑综合征病毒(WSSV)的感染, 并证明了凡纳滨对虾造血激素和 WSSV 的粘附蛋白 V37 分别与 ATP 合酶 β 亚基存在特异性结合作用。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)ATP 酶的研究仅限于 P 型 ATP 酶, 比如 Na^+/K^+ -ATPase 酶和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 酶, 并证明其参与离子转运和渗透压调节等作用(周东等, 2014; 韩晓琳等, 2012; 江山等, 2011)。ATP 合酶在三疣梭子蟹生长发育、能量代谢过程中发挥着重要的作用, 但对三疣梭子蟹 ATP 合酶的研究尚未见报道, 而且目前三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 亚基全长 cDNA 序列尚未被克隆。通过对本实验室三疣梭子蟹转录组数据库的分析与筛选, 发现自交 7 代的大个体组相对于小个体组有 2869 个差异表达的基因。通过对差异基因开展进一步生物学进程 KEGG 富集分析, 筛选出的差异基因富集的代谢通路主要有氧化磷酸化通路、细胞凋亡通路和对应外界刺激。因此, 研究三疣梭子蟹 ATP 合酶对于深入研究其氧化磷酸化等代谢通路有着极其重要的作用。已有研究表明, 近交能引起三疣梭子蟹能量代谢相关基因及代谢酶活力的衰退, 但是否也能引起 ATP 合酶基因及酶活力的衰退还有待研究。

本研究利用 RACE 技术首次成功克隆得到三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 亚基基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *ptF-ATPase β* , 并对得到的序列进行生物信息分析。利用实时荧光定量技术分析了该基因在三疣梭子蟹不同组织以及不同近交世代家系的肝胰腺和心脏中的表达情况。旨在明确三疣梭子蟹 ATP 合酶 β 亚基基因的表达特点, 揭示近交程度对该基因表达及其酶活力的影响, 为深入研究三疣梭子蟹能量代谢机制提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

自 2005 年, 本实验室每年将从山东莱州湾海区、辽宁鸭绿江口海区、江苏海州湾海区和浙江舟山海区获取的 4 个三疣梭子蟹不同地理群体作为基础群体, 在中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地潍坊昌邑海丰水产养殖有限公司利用人工定向交尾技术, 建立了全同胞兄妹交传代家系。良种家系留种传代, 至 2015 年已传至 11 代(F_{11})。分别选取 80 日龄 F_0 、 F_2 、 F_4 、 F_6 、 F_8 和 F_{10} 近交世代家系的三疣梭子蟹, 每代各取 6 只

(3 只雌蟹、3 只雄蟹), 暂养于室内水泥池中, 水池底面积为 20 m^2 , 高度为 1.5 m, 池水深保持在 20~30 cm, 水温为 $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 溶解氧为 5.5 mg/L, 盐度为 31, pH 为 8.2。暂养 7 d, 每日 08:00 定时换掉 1/2 的水, 16:00 投喂新鲜野杂鱼, 投喂量为蟹体重的 1/10。

1.2 三疣梭子蟹总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

三疣梭子蟹各组织的总 RNA 采用 Trizol 法提取, 用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其总 RNA 的质量及完整性。取等量所取各组织的总 RNA 混匀, 合成 3' 和 5' RACE 的 cDNA 第一链, 具体方法参照 SMARTTM RACE Amplification Kit 说明书。

1.3 三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因全长 cDNA 的克隆及验证

根据从三疣梭子蟹转录组数据库得到的 *F-ATPase β* 基因的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3' 和 5' 末端特异性引物。根据克隆出的 *F-ATPase β* 基因序列设计荧光定量引物。最后在该基因的两端设计正反向引物, 进行全长 cDNA 的验证。实验中用到的末端特异性引物和荧光定量引物分别由青岛擎科梓熙生物技术有限公司和上海生工生物有限公司合成(表 1)。利用 TaKaRa LA *Taq* 进行末端扩增, 3' 端用通用引物 UPM 和 NUP 分别与相应的特异性引物 ATPase-F1 和 ATPase-F2 进行巢式 PCR 扩增, PCR 程序: 94°C 30 s, 65°C 1 min, 72°C 3 min, 30 个循环; 5' 末端扩增同上。

表 1 三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 克隆和 mRNA 相对表达分析所用引物序列

Tab.1 Primers used for *ptF-ATPase β* cloning and relative mRNA expression analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
ATPase-F1	CGAGGCATTGCTGAGTTAGGA
ATPase-F2	AAGACATCATTGCTATTCTGGGC
ATPase-R1	CCTTGGAAGAATCGTCGTTGA
ATPase-R2	TTGCCACACCAGCACCGC
QATPase-F	GGCGAACCAATAGACGAGAG
QATPase-R	TGCCAGTCACCAGGATTTG
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC
YATP-F	GACCACGCCTCCATTTCG
YATP-R	CTGCTGGCTCTGGTGTGTTATT

将 3'和 5' RACE 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up 试剂盒(TaKaRa)切胶纯化并连接到 pMD19-T, 转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在 LB 培养基中 37°C 培养 45 min 后, 再将菌液涂布于含 AMP 的 LB 平板上, 37°C 过夜培养。挑取阳性菌落继续培养, 并进行菌落 PCR 鉴定后送交青岛擎科梓熙生物技术有限公司测序。最后利用在基因的两端设计的正反向引物, 对其全长 cDNA 进行验证。

1.4 三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因的生物学分析

使用 ORF Finding 在线工具确定 *ptF-ATPase β* 基因最大开放阅读框和编码区。利用 NCBI 中的 BLAST 主页程序进行三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因的核苷酸和氨基酸序列的比对。利用 CExpres 和 Gene Tool 软件拼接比对核苷酸序列、去除冗余序列和翻译氨基酸。蛋白质理化性质预测、功能结构域分析、信号肽分析利用 InterProScan 和 SMART 等在线软件完成。利用 DNAMAN 进行 *ptF-ATPase β* 与其他物种的相应氨基酸序列的多重序列比对。利用 MEGA 6.0 软件, 以邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育进化树进行聚类分析。

1.5 三疣梭子蟹线粒体的提取及 ATP 合酶活性测定

分别取不同近交世代家系的三疣梭子蟹肝胰腺、心脏, 每 2 只螃蟹(1 雌 1 雄)的组织放入一个冻存管中, 存放于液氮中保存。用研钵将采集的组织样品在液氮中研磨, 每个冻存管单独研磨, 取 100 mg 左右的组织粉末加入 2 ml EP 管中, 分别标记后放入 -80°C 冰箱中保存。

分别利用南京建成线粒体提取试剂盒和蛋白定量测试盒提取所取组织的线粒体并测定其蛋白浓度。使用 ATP 合成酶活性光谱法定量检测试剂盒在 infinite 200 酶标仪中分别测定不同世代家系三疣梭子蟹各组织 ATP 合酶活力, 具体操作参照该试剂盒说明书进行。ATP 合酶活性单位浓度定义: 在 30°C 温度下, pH=7.5 条件下, 每分钟内能够氧化 1 mol 还原性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)所需的酶量为 1 个活性单位。

1.6 三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因的表达定量分析

分别取三疣梭子蟹肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、胃、肠、精巢和卵巢及不同近交世代家系的三疣梭子蟹肝胰腺、心脏等组织, 每 2 只螃蟹(1 雌 1 雄)的组织放入一个冻存管中, 存放于液氮中保存。用 Trizol 试剂

提取三疣梭子蟹所取组织的总 RNA, 利用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 使用 PrimeScript RT Reagent Kit 反转录合成 cDNA, 具体方法参照试剂盒说明书。

根据已知的三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因 cDNA 全长序列, 设计 1 对正反特异引物(QATPase-F 和 QATPase-R)(表 1)。使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂(TaKaRa), 在 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪上分析各组织中 *ptF-ATPase β* 基因的表达情况。PCR 反应体系为 10 μ l, 包括 5 μ l SYBR Premix Ex Taq II、1 μ l cDNA、0.4 μ l 浓度为 10 pmol/ μ l 正反向引物、0.2 μ l ROX Reference dye II 和 3 μ l PCR 反应水。反应程序: 95°C 10 min; 95°C 30 s, 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环; 95°C 15 s; 60°C 1 min; 95°C 15 s。以 β -actin 基因为内参, 样本和内参均设置 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法(Livak *et al.*, 2001)计算 *ptF-ATPase β* 基因的相对表达量。

1.7 数据分析

实验三疣梭子蟹 ATP 合酶活性及相对定量数据采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示; 结果使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 利用 Duncan's 多重比较进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著。最后应用 Origin 2016 软件作图。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因全长 cDNA 的克隆及验证

三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因的 EST 序列长 1692 bp, 用 BLAST 对序列进行在线比对, 结果显示, 该序列与其他物种的 *F-ATPase β* 基因的相似度在 79%以上。3'RACE 扩增结果得到 517 bp 的 cDNA 片段, 5'RACE 扩增结果得到 303 bp 的 cDNA 片段。将这 2 个片段与已知 EST 序列进行拼接得到三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因的全长 cDNA 序列, 并命名为 *ptF-ATPase β* 。对该基因 cDNA 序列全长进行测序验证, 结果显示, 扩增出的大小为 1745 bp 的序列完全覆盖 *ptF-ATPase β* 的开放阅读框(ORF), 表明得到 *ptF-ATPase β* 的 cDNA 序列准确可靠。三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因的 cDNA 序列全长为 1965 bp (GenBank 登录号 KY130458), 其中包含 1053 bp 的 ORF, 571 bp 的 5'端非编码区(UTR)和 341 bp 的 3'端 UTR, 3'端存在多聚腺苷酸 Poly A 尾(图 1)。

2.2 三疣梭子蟹 *ptF-ATPaseβ* 基因序列的生物信息学分析

ExPASy ProtParam tool 在线软件分析显示,三疣梭子蟹 *ptF-ATPaseβ* 基因编码一个由 350 个氨基酸组成的蛋白质,理论等电点为 4.86,分子量为 37.9 kDa,推测其原子总数为 5338,分子式为 C₁₆₈₂H₂₆₇₅N₄₄₇O₅₂₄S₁₀。该蛋白由 18 种氨基酸组成,包括甘氨酸(9.4%)、缬氨酸(9.1%)、丙氨酸(8.9%)、亮氨酸(8.3%)、丝氨酸(6.6%)、谷氨酰胺(6.6%)、异亮氨酸(6.6%)、苏氨酸(6.6%)、天冬氨酸(6.0%)、谷氨酰胺(5.4%)、精氨酸(4.3%)、赖氨酸(4.3%)、苯丙氨酸(4.0%)、脯氨酸

(4.0%)、酪氨酸(3.4%)、蛋氨酸(2.9%)、天冬酰胺(2.3%)、组氨酸(1.4%),带负电的氨基酸残基为 44 个(Asp 和 Glu),带正电的氨基酸残基为 30 个(Arg 和 Lys),亲水性平均数为-0.040,不稳定系数为 39.45,属于稳定蛋白。SMART 和 SignalP 3.0 在线软件分析表明,该蛋白质结构中无跨膜结构域和信号肽序列,且其第 1~235 位为 F1-ATPaseβ 标志性蛋白结构域(IPR005722),其中,第 23~207 位为 AAA(ATPases associated with a variety of cellular activities)结构域(IPR003593),第 243~348 位为 ATP-synt-ab-C 结构域(IPR024034)(图 2)。

```

1 gcagtggtctgcaaaagcccaaccagcagctgaaaagcccgagccagcagctgcaaaagcctgaagcacagcctgtttagcaaaagcagagctctgcagct 100
101 gcagaaacagaagcagcagcagaaccagctgctgagcctcaggaggcggcagcagcctcagcagcagcagcctgttgcctgactcctccactcaccacac 200
201 agactgaggaaggaaccagtgaggcggggcagtggtggcagtgatggcccgctgtggagctggcctccaggggagctgcccgtccactcctcagctgc 300
301 cctggagtgaggacacaggaaccagcagctggtgctggaggtggcacagcagctctaggctggcaacacagtgctaccatcgccatggacggcagggg 400
401 ctggtgagagaatgtgtrgaagcacacagcagccctatctccattccartggcctgccactctcggaggatc ATG AAT GTT ATT GGC 493
E P I D E R G P I S S A S K S A I H P A E A P P F V
494 GAA CCA ATA GAC GAG AGA GGT CCC ATA TCC TCC GCC AGC AAG TCT GCC ATC CAC GCA GAG GCT CCC CCA TTT GTG 568
E M S V E Q I L V T G I K V V D M L A P Y S K G
569 GAG ATG AGT GTG GAG CAA CAA ATC CTG GTG ACT GGC ATT AAG GTT GTG GAT ATG CTG GCT CCA TAC TCC AAG GGT 643
G K I G L F G G A G V G K T V L I M E L I N N V A
644 GGC AAG ATT GGT CTG TTT GGC GGT GCT GGT GTG GGC AAA ACA GTG CTT ATC ATG GAG CTG ATT AAC AAT GTG GCG 718
K A H G G Y S V F A G V G E R T R E G N D L Y H E
719 AAG GCT CAT GGT GGT TAC TCA GTG TTT GCT GGC GTT GGA GAG AGA ACA AGA GAA GGG AAT GAC CTG TAC CAC GAG 793
M I E S G V I S L N D D S S K V A L V Y G Q M N E
794 ATG ATT GAG TCT GGC GTC ATC TCC CTC AAC GAC ATC TCT TCC AAG GTA GCA CTA GTG TAC GGC CAA ATG AAT GAG 868
P P G A R R A R V A L T G G L T V A E Y F R D Q E G Q
869 CCT CCA GGT GCC AGG CGT GTG GCA CTG ACG GGG CTG ACA GTG GCA GAG TAC TTC AGG GAC CAA ATG GGC GAG 943
D Y L F F V D N I F R F T Q A G S E V S A L L G R
944 GAT GTG TTG TTC TTT GTT GAT AAC ATT TTC AGA TTC ACC CAG GCA GGT TCA GAG GTG TCA GCC CTG CTT GGT CGC 1018
I P S A V G Y Q P T L A T D M G S M Q E R I T T T
1019 ATT CCC TCG GCT GTG GGA TAC CAA CCC ACT CTG GCC ACC GAC ATG GGG AGT ATG CAA GAG AGA ATT ACC ACC ACC 1093
T K G S I T S V Q A I Y V P A D D L T D P A A T
1094 ACT AAA GGA TCC ATT ACT TCT GTC GAG GCT ATC TAT GTG CCA GCT GAT GAC CTC ACA GAT CCC GCC CCT GCC ACC 1168
T F A H L D A T T V L S R G I A E L G I Y P A V D
1169 ACT TTT GCA CAT CTC GAC GCC ACC ACT GTG CTG TCC CGA GGC ATT GCT GAG TTA GGA ATA TAC CCA GCA GTG GAG 1243
P L D S T S R I L D P N V I G P R H Y S T A R G V
1244 CCC TTG GAC TCC ACC TCT CGC ATT CTG GAC CCT AAT GTA ATT GGT CCG CGC CAC TAC TCC ACA GCC AGA GGA GTC 1318
Q K I L Q D Y K S L Q D I I A I L G M D E L S E E
1319 CAG AAG ATC CTG CAG GAC TAC AAA TCA CTA CAA GAC ATC ATT GCT ATT CTG GGC ATG GAT GAG CTG TCA GAG GAG 1393
D K L T V S R A R K V Q K F M S Q P F Q V A E V F
1394 GAC AAG TTA ACA GTG TCC AGG GCA AGG AAG GTA CAG AAA TTC ATG TCC CAG CCC TTC CAG GTG GCA GAA GTC TTC 1468
T G Y Q G K F V S L Q D T I R S F E I L E G K H
1469 ACC GGC TAC CAG GGA AAG TTT GTC TCG CTG CAG GAC ACT ATC AGG AGC TTT GAG GAG ATC TTG GAG GGG AAG CAC 1543
D N L P E A A F Y M V G G G I E E V V A K A E Q L A
1544 GAC AAC CTT CCC GAG GCA GCC TTC TAC ATG GTG GGC GGC ATT GAG GAG GTC GTG ACC AAG GCA GAG CAG CTG GCG 1618
Q *
1619 CAG [TGA] gggtagagagagaagagaggggagagggggagtgtgtgtagtctgttttagtattgtaagagtttaaaggaattgtlagagagagagagag 1716
1717 agagagagagagagagagaggtctttagtgttttcagggtgtgtatagcataatataaggaatttgaagagagagagagagagagagagagagagag 1816
1817 agagaatgttacccccagctattacaagaacccaagaaggagaaaggaactgaagaaagaagaaggaatgaaggatagaaggaagtcagaatggaa 1916
1917 gagttaattgaaggaagaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaa 1965

```

图 1 三疣梭子蟹 F-ATPaseβ 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

Fig.1 F-ATPaseβ nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *P. trituberculatus*

ATG: 起始密码子; *: 终止密码子; 阴影为P-loop-NTPase superfamily结构域; 方框中为ATP-synt-ab-C superfamily结构域;

下划线为ATP/GTP结合位点基序A (P-loop); 加粗斜体为ATP合酶α和β亚基特征位点

ATG: start codon; *: stop codon; Shadow: P-loop-NTPase superfamily domain; Block: ATP-synt-ab-C superfamily domain;

Underline: ATP/GTP-binding motif A (P-loop); Bold and italic: ATP synthase α and β subunits signature

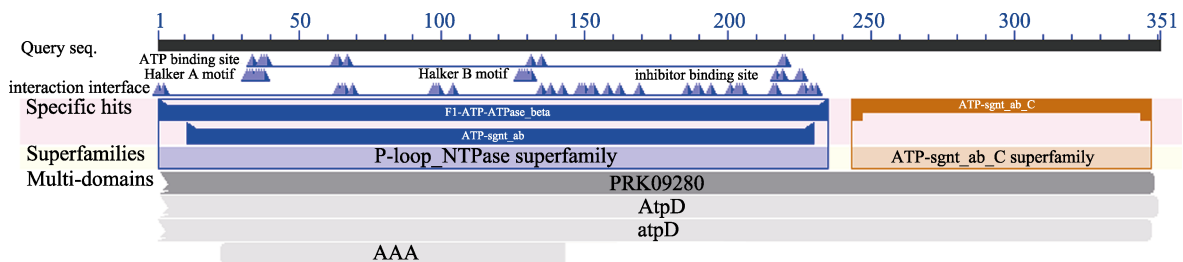


图 2 三疣梭子蟹 F-ATPaseβ 蛋白结构域分析

Fig.2 The SMART diagram of F-ATPaseβ amino acid sequence of *P. trituberculatus*

InterProScan 软件分析结果显示, *ptF-ATPase β* 蛋白质存在 5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 SSK、TTK、TSR、TAR 和 TIR, 7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 SLND、TVAE、SMQE、SLQD、SEED、SLQD 和 SFEE, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 RGIAELGIY, 8 个 N 端酰基化位点 GKGIGL、GLFGGA、GAGVVK、GVGKTV、GLTVAE、GSEVSA、GSITSV 和 GIYPAV, 1 个 ATP 合酶 α 和 β 亚基特征位点 PAVDPLDSTS, 1 个 ATP/GTP 结合位点基序 A(P-loop)GGAGVVKT。通过 CLC Main Workbench 5.6 软件分析其蛋白质二级结构含 104 个 α -螺旋(27.91%), 169 个无规则卷曲(48.29%) (图 3)。

2.3 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因序列同源性分析及系统进化树分析

利用 BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因的氨基酸序列, 发现其与斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性达到 89%, 与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、豌豆长管蚜(*Acyrtosiphon pisum*)、玉带凤蝶(*Papilio polytes*)的同源性分别为 88%、88%、87%、86%和 86%(图 4)。

利用 MEGA 6.0 软件对三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 氨基酸序列进行系统进化分析, 并构建系统进化树

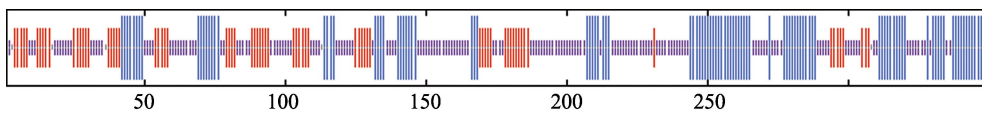


图 3 三疣梭子蟹 F-ATPase β 蛋白二级结构分析

Fig.3 Secondary structure of F-ATPase β amino acid sequence of *P. trituberculatus*

蓝色代表 α 螺旋, 红色代表延伸链, 紫色代表无规则卷曲

Alpha helix is indicated by blue, extended strand is indicated by red, random coil is indicated by purple

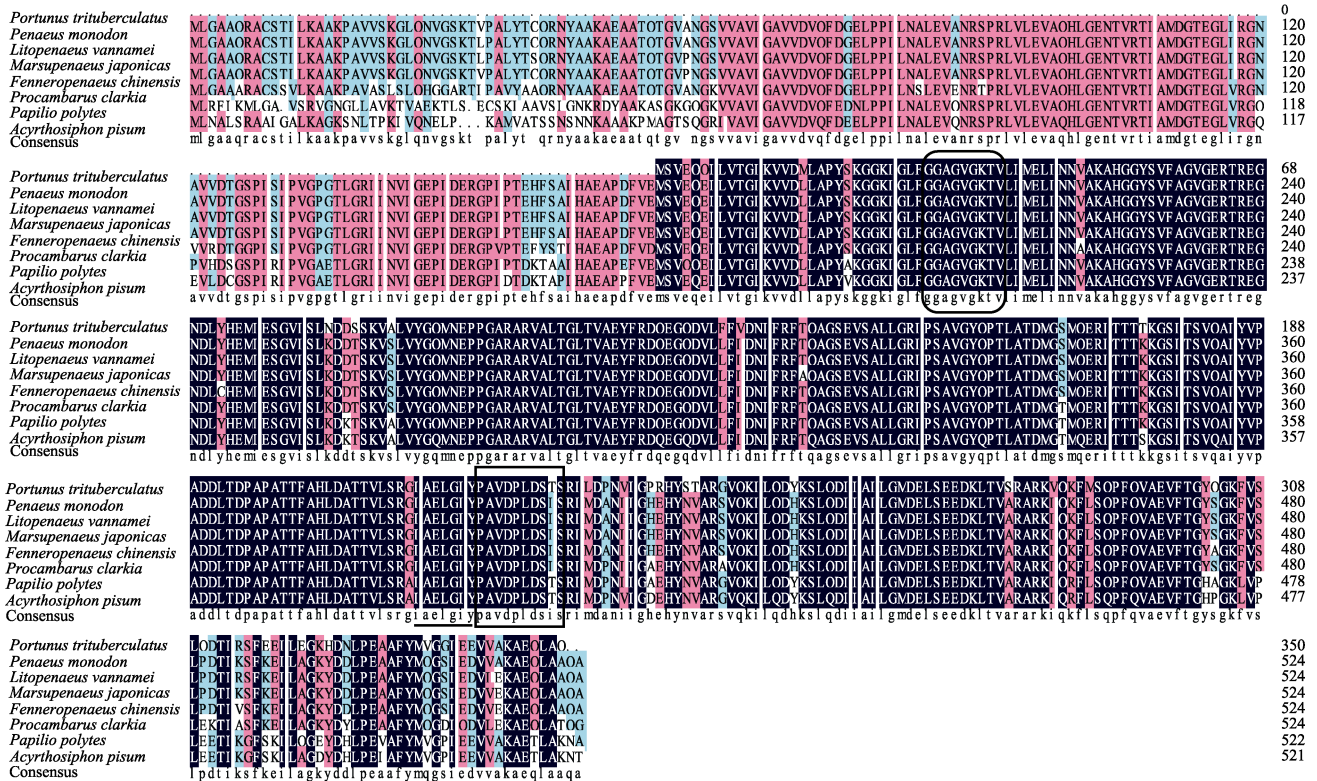


图 4 三疣梭子蟹 F-ATPase β 氨基酸序列与其他物种的 F-ATPase β 氨基酸序列比对

Fig.4 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *P. trituberculatus* F-ATPase β and other species

方框中为 ATP 合酶 α 和 β 亚基特征位点; 圆方框中为 ATP/GTP 结合位点基序 A (P-loop);

下划线为酪氨酸激酶磷酸化位点

Box: ATP synthase α and β subunits signature; Rounded rectangle: ATP/GTP-binding motif A(P-loop);

Underline: Tyrosine kinase phosphorylation site

(图 5)。结果显示, 18 个物种中, 三疣梭子蟹与克氏原螯虾亲缘关系较近, 与鱼类、哺乳类关系较远。在对虾中, 斑节对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾和中国对虾紧密聚为一支, 之后与三疣梭子蟹聚为一支。

2.4 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因在各个组织中的表达情况

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因在各组织中的表达情况(图 6)。结果显示, 该基因在 8 个组织中均有表达, 在肝胰腺、心脏和精巢中表达量最高, 其次是胃、肌肉、鳃、卵巢, 在肠中的表达量最少。

2.5 近交家系三疣梭子蟹 ATP 合酶活力及 *ptF-ATPase β* 基因的表达情况

三疣梭子蟹肝胰腺中的 ATP 合酶活性高于心脏中的活性, 约是心脏中活性的 2 倍(图 7)。随着近交系数的增加, 心脏中的 ATP 合酶活性总体呈现显著

下降趋势; F_2 和 F_4 代心脏中的 ATP 合酶活性与 F_0 代无显著差异, 而从 F_6 代开始 ATP 合酶活力出现下降且显著低于 F_0 代($P < 0.05$) (图 7b)。而肝胰腺中的 ATP 合酶活性无显著变化(图 7a)。

采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析了近交对三疣梭子蟹肝胰腺和心脏中 *ptF-ATPase β* 基因表达情况的影响。结果显示, 随着近交系数的增加, 肝胰腺和心脏中, *ptF-ATPase β* 的表达量均呈现显著下降趋势。在肝胰腺中, 除 F_6 、 F_8 代外, 各代 *ptF-ATPase β* 的表达量均呈显著差异且显著低于 F_0 代($P < 0.05$) (图 8a); 在心脏中, 各代 *ptF-ATPase β* 的表达量显著低于 F_0 代($P < 0.05$), F_2 、 F_4 代之间差异显著($P < 0.05$), 而 F_6 、 F_8 、 F_{10} 代之间无显著差异($P > 0.05$) (图 8b)。

3 讨论

ATP 合酶广泛存在于真核生物线粒体内膜、叶绿体类囊体、异养菌和光合细菌的质膜上, 参与生物体

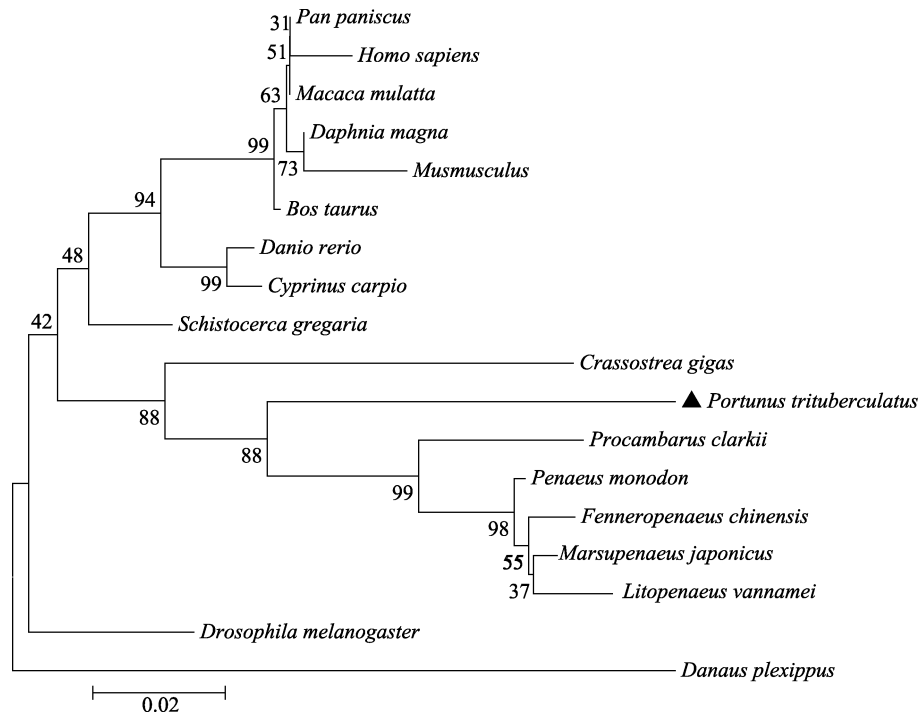


图 5 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建的三疣梭子蟹与其他物种的 F-ATPase β 氨基酸的系统进化树

Fig.5 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *P. trituberculatus* F-ATPase β and other species by MEGA 6.0

各物种基因登录号: 斑节对虾(AEB92164.1), 凡纳滨对虾(ACB36913.1), 日本囊对虾(ACM91676.1), 中国对虾(ACM91675.1), 克氏原螯虾(ACU31053.1), 牡蛎(EKC39411.1), 沙漠蝗(AEV89780.1), 斑马鱼(NP_001019600.2), 鲤鱼(BAA82837.1), 果蝇(NP_001259081.1), 大型溞(JAN00926.1), 黑脉金斑蝶(EHJ67407.1), 牛(NP_786990.1), 家鼠(AAB86421.1), 黑猩猩(XP_003824956.1), 人(AAA51808.1)

GenBank accession numbers of different species: *Penaeus monodon* (AEB92164.1), *Litopenaeus vannamei* (ACB36913.1), *Marsupenaeus japonicus* (ACM91676.1), *Fenneropenaeus chinensis* (ACM91675.1), *Procamburus clarkia* (ACU31053.1), *Crassostrea gigas* (EKC39411.1), *Schistocerca gregaria* (AEV89780.1), *Danio rerio* (NP_001019600.2), *Cyprinus carpio* (BAA82837.1), *Drosophila melanogaster* (NP_001259081.1), *Daphnia magna* (JAN00926.1), *Danaus plexippus* (EHJ67407.1), *Bos taurus* (NP_786990.1), *Mus musculus* (AAB86421.1), *Pan paniscus* (XP_003824956.1), *Homo sapiens* (AAA51808.1)

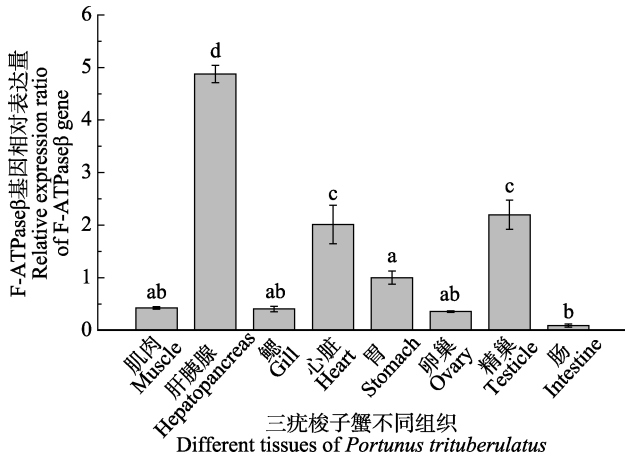


图 6 三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因在各组织中的表达情况

Fig.6 The expression of *F-ATPase β* in different tissues of *P. trituberculatus*

不同组织表达量均以与胃相比较的倍数表示。

不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同

The expression in different tissues was presented as the fold compared to the level in the stomach. Different letters indicated significant differences ($P < 0.05$). The same as below

氧化磷酸化和光合磷酸化作用, 在跨膜质子动力势的推动下合成 ATP, 是生物体能量代谢的关键酶(王镜岩等, 2002)。ATP 合酶主要由 F_1 和 F_0 组成, 不同物种的 ATP 合酶所含的亚基及数目不尽相同。 F_1 由亚基 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 组成, 其中, β 亚基是酶的催化核心, 其构象的变化使它能够结合 ADP 和 ATP, 驱动着 ATP 的合成和水解(Boyer, 1989、1997)。 β 亚基不仅参与催化作用, 它还可位于生物膜表面参与各种生理功能(Champagne *et al*, 2006), 因此, 对三疣梭子蟹 ATP 合酶 β 亚基的研究对于其能量代谢的研究具有重要作用。目前, ATP 合酶 β 亚基在植物叶绿体和线粒体中的研究较多, 证明其功能与植物体胚发育、盐度适应、次生代谢等有关, 而三疣梭子蟹 ATP 合酶的研究尚未见报道。

本实验克隆得到的三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因的 cDNA 序列全长为 1965 bp。与其他动物 *F-ATPase β* 编码区序列比对发现, 三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因编码区保守性较强。该基因编码一个由 350 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白具有 F-ATPase β 标志性蛋白结

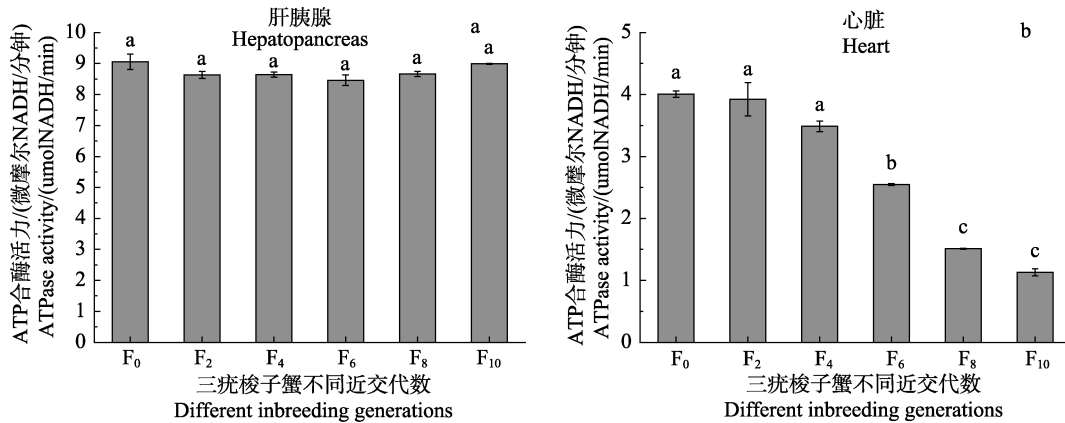


图 7 不同近交世代家系三疣梭子蟹肝胰腺(a)和心脏(b)中 ATP 合酶活力

Fig.7 ATPase activity in the hepatopancreas (a) and heart (b) of *P.trituberculatus* from different inbreeding generations

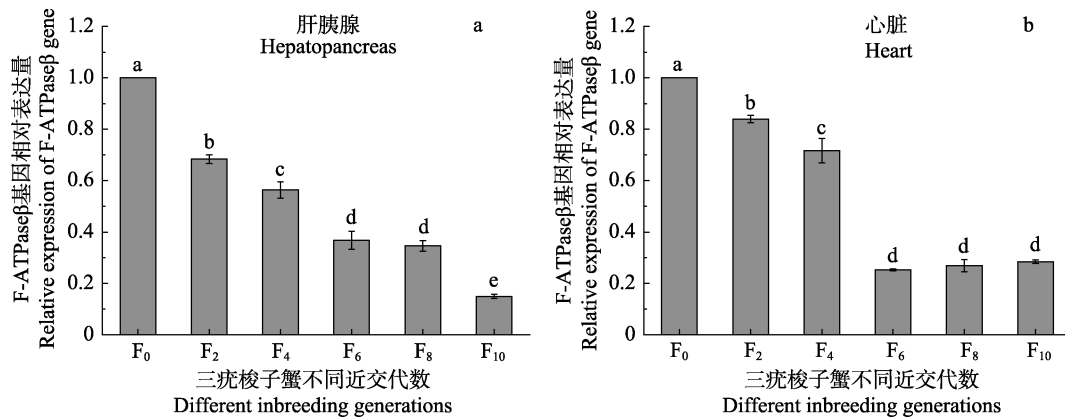


图 8 不同近交世代家系三疣梭子蟹肝胰腺(a)和心脏(b)中 *F-ATPase β* 基因相对表达量

Fig.8 Relative expression of *F-ATPase β* gene in the hepatopancreas (a) and heart (b) of *P.trituberculatus* from different inbreeding generations

构域,无跨膜结构域和信号肽序列。该基因编码的蛋白氨基酸序列与斑节对虾、凡纳滨对虾 *F-ATPase β* 蛋白同源性达到 89%,在系统进化中也与对虾科聚为一支,因此,对三疣梭子蟹 *F-ATPase β* 基因表达及酶活性的研究可为其他海洋生物相关的研究提供参考。实时荧光定量 PCR 结果显示,三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因在所研究组织中均有表达,在肝胰腺、心脏和精巢中表达量最高,说明三疣梭子蟹肝胰腺、心脏和精巢中的能量代谢比其他组织中旺盛,也证实了肝胰腺、心脏和精巢是三疣梭子蟹生长和发育主要供能中心。

由于三疣梭子蟹野生苗种的日益匮乏,苗种大多依靠人工养殖的亲本提供。然而,在苗种生产过程中不可避免地会造成群体内近交,从而导致了三疣梭子蟹种质资源的退化及遗传多样性的降低(王好锋等, 2013; Gao *et al.*, 2015)。近交通常会使得子代一些与繁殖力或生理机能相关的性状所表现的表型平均值降低(Frankham *et al.*, 2001),其程度可以用近交系数(F, coefficient of inbreeding)来表示。目前的研究已经证明,近交会造成本水产动物形态学(Luan *et al.*, 2014)、繁殖力(Moss *et al.*, 2008)、存活和抗逆性(Luo *et al.*, 2014)等表型性状方面的衰退,但关于近交对生理机制相关的影响还鲜有报道。Ren 等(2016)证实了近交能够引起三疣梭子蟹酚氧化酶活力及抗氧化机制等生理机能的衰退。但目前有关近交对三疣梭子蟹能量代谢的影响还未见报道。

本研究结果还显示,随着近交系数的增加,心脏中 ATP 合酶活力呈现显著降低的趋势,说明近交引起了三疣梭子蟹心脏 ATP 活力的衰退,而 ATP 合酶 β 亚基因相对表达量同样是逐代下降。研究表明,激活、过表达或敲降 β 亚基因等会影响细胞内 ATP 的含量(李晶等, 2009),因此,推测 β 亚基的下调表达造成了三疣梭子蟹心脏 ATP 合酶活性的下降。肝胰腺是三疣梭子蟹体内重要的器官,也是代谢最为活跃的组织,近交同样造成了三疣梭子蟹肝胰腺中 ATP 合酶 β 亚基因相对表达量的衰退,但对其 ATP 合酶活力没有显著影响。细胞中某一蛋白在某一时间的表达受到多种因素的影响,如基因的转录、mRNA 的翻译、蛋白质的降解速率等(Gygi *et al.*, 1999)。尽管 mRNA 表达水平在一定程度上反映基因的表达,但近来越来越多的研究表明,mRNA 表达水平并不能完全代表蛋白质的水平,而且蛋白还存在多种多样的翻译后加工修饰等(钱小红等, 2003; Simpson, 2006)。因此,我们预测三疣梭子蟹肝胰腺中的 ATP 合酶 β 亚基基因的表达与 ATP 合酶活力不一致可能与代偿机

制或酶功效增强有关,还需同工酶和酶动力学研究进一步验证。

4 结 论

本研究首次成功克隆三疣梭子蟹 ATP 合酶 β 亚基基因全长 cDNA 序列,该序列全长 1965 bp,包含 1053 bp 核苷酸的 ORF,编码一个由 350 个氨基酸组成的蛋白质。该基因与其他动物 ATP 合酶 β 亚基基因的核苷酸序列和预测氨基酸序列均有着比较高的同源性,可为其他海洋生物相关的研究提供参考。同时,利用实时荧光定量 PCR 技术检测了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因的表达情况,表明该基因在组织中均有表达,且在肝胰腺和心脏中相对表达量最高。本研究还证明,近交造成了三疣梭子蟹 *ptF-ATPase β* 基因表达和 ATP 酶活力的衰退,可为三疣梭子蟹的遗传育种工作提供参考数据。

参 考 文 献

- Boyer PD. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1989, 3(3): 2164–2178
- Boyer PD. The ATP synthase: A splendid molecular machine. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66: 717–749
- Champagne E, Martinez LO, Collet X, *et al.* Ecto-F1F0 ATP synthase/F1 ATPase: Metabolic and immunological functions. Current Opinion in Lipidology, 2006, 17s(3): 279–284
- Frankham R, Gilligan DM, Morris D, *et al.* Inbreeding and extinction: Effects of purging. Conservation Genetics, 2001, 2(3): 279–284
- Gao BQ, Liu P, Li J, *et al.* Effect of inbreeding on growth and genetic diversity of *Portunus trituberculatus* based on the full-sibling inbreeding families. Aquaculture International, 2015, 23(6): 1401–1410
- Guan L. Effects of sodium hydrosulfide on antioxidant system and MSAP analysis of *Dendrobium officinale* under high light stress. Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2013, 5 [关蕾. 强光胁迫下外源硫化氢对石斛抗氧化系统的影响及 MSAP 分析. 安徽农业大学硕士学位论文, 2013, 5]
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, *et al.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular & Cellular Biology, 1999, 19(3): 1720–1730
- Han XL, Liu P, Gao BQ, *et al.* Molecular cloning and salinity-related expression of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in *Portunus trituberculatus*. Academic Annual Meeting of China Fisheries Society, 2012 [韩晓琳, 刘萍, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 Na⁺/K⁺-ATPase α -亚基的克隆与表达. 中国水产学

- 会学术年会, 2012]
- Jiang S, Xu QH. Influence of salinity stress on the activity of gill Na^+/K^+ -ATPase in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1475–1480 [江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 酶活的影响. 水产学报, 2011, 35(10): 1475–1480]
- Lai CC, Lai ZX, Fang ZZ, et al. Cloning of mitochondrial F1-ATPase beta subunit gene from *Embryogenic callus* and its expression analysis by qRT-PCR during somatic embryogenesis in Longan. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(16): 3392–3401 [赖呈纯, 赖钟雄, 方智振, 等. 龙眼胚性愈伤组织线粒体 ATP 合酶 β 亚基基因克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3392–3401]
- Li J, Zhang Y, Guan YF, et al. Effects of ATP synthesis decline on β -cell insulin secretion disorder. Advances in Physiological Sciences, 2009, 40(1): 47–50 [李晶, 张园, 管又飞, 等. ATP 合成下降在 β 细胞胰岛素分泌障碍中的作用. 生理科学进展, 2009, 40(1): 47–50]
- Li M, Zhang J, Feng LG, et al. Cloning and expression analysis of vacuolar ATPase B subunit gene VHA-B in leaves of salt-stressed willow. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2013, 29(5): 1149–1153 [李敏, 张健, 冯立国, 等. 柳树液泡膜 ATP 酶 B 亚基基因克隆及在盐胁迫下的表达分析. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 1149–1153]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402–408
- Luan S, Yang GL, Wang J, et al. Selection responses in survival of *Macrobrachium rosenbergii* after performing five generations of multi-trait selection for growth and survival. Aquaculture International, 2014, 22(3): 993–1007
- Luo K, Kong J, Luan S, et al. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 2014, 420–421(3): 32–37
- Moss DR, Arce SM, Otoshi CA, et al. Inbreeding effects on hatchery and growout performance of pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society, 2008, 39(4): 467–476
- Ni ZL, Wei JM. The structure and catalytic mechanism of ATP Synthase. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29(5): 367–374 [倪张林, 魏家绵. ATP 合酶的结构与催化机理. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 367–374]
- Qian XH, He FC. Proteomics: Theories and methods. Beijing: Science Press, 2003, 1–18 [钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法. 北京: 科学出版社, 2003]
- Ren X, Gao B, Liu X, et al. Comparison of immune responses and antioxidant status of different generations of growth- selected *Portunus trituberculatus* families. Aquaculture Research, 2016, 2017, 48, 1315–1326
- Simpson RJ. Proteins and Proteomics: A laboratory manual. Journal of Proteome Research, 2003, 3(4): 694
- Wang HF, Liu P, Gao BQ, et al. Inbreeding influence to some economic traits of six inbreeding generations of *Portunus trituberculatus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1157–1165 [王好锋, 刘萍, 高保全, 等. 近交对三疣梭子蟹若干经济性状衰退的影响. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1157–1165]
- Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry, 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002 [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002]
- Xu ML. The interactive identification among LvAST, WSSV-VP37 and F1F0-ATP synthase β subunit of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 3 [徐萌霖. 凡纳滨对虾造血激素、F1F0-ATP 合酶 β 亚基和 WSSV-VP37 的相互作用研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 3]
- Zhou D, Mu CK, Song WW, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme and ATPase activities in tissues of swimming crab *Portunus trituberculatus*. Ecological Science, 2014, 33(4): 698–703 [周东, 母昌考, 宋微微, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹组织中抗氧化酶和 ATP 酶活力的影响. 生态科学, 2014, 33(4): 698–703]

cDNA Cloning and Expression Analysis of *F-ATPase β* Subunit Gene in *Portunus trituberculatus* and Its Variation in Family Inbreeding

WANG Zhuqing^{1,2}, REN Xianyun², GAO Baoquan², LIU Ping^{2①},
ZHANG Xiaohui^{1,2}, ZHANG Jie^{1,2}, YU Xuan²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

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

Abstract A full-length cDNA sequence of F-ATPase β subunit gene from *Portunus trituberculatus* (*ptF-ATPase β*) was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The sequence of *ptF-ATPase β* was 1965 bp, containing a 571 bp 5' UTR, 341 bp 3' UTR, and a 1053 bp open reading frame (ORF) that encodes 350 amino acids polypeptides. The isoelectric point (pI) was 4.86 and the molecular mass was 37.9 kDa. The amino acid sequence analysis demonstrated that *ptF-ATPase β* has an F1-ATPase β domain, an AAA domain, and an ATP-synt-ab-C domain. Homology and phylogenetic analysis revealed that the amino acid sequence of *ptF-ATPase β* shared a high similarity (89%) with *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *ptF-ATPase β* mRNA level was detected in all tested tissues including the hepatopancreas, muscle, heart, gill, stomach, intestine, testis, and ovary. The *ptF-ATPase β* had the highest level in the hepatopancreas and heart, and the lowest expression in the intestine. With the increase of inbreeding coefficient, *ptF-ATPase β* expression decreased significantly in the hepatopancreas and heart ($P < 0.05$). The ATP synthase activity in the heart began to fall from F₆ generation and was significantly lower than F₀ generation ($P < 0.05$), but there was no significant change in the hepatopancreas. The results illustrate that inbreeding gradually reduces the expression of *ptF-ATPase β* and the ATP synthase activity in *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; *ptF-ATPase β* ; Gene cloning; Expression analysis; Inbreeding

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20161209001

http://www.yykxjz.cn/

倪守胜, 杨钰, 柳淑芳, 庄志猛. 基于高通量测序的虾夷扇贝基因组微卫星特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 107-113
Ni SS, Yang Y, Liu SF, Zhuang ZM. Microsatellite analysis of *Patinopecten yessoensis* using next-generation sequencing method. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 107-113

基于高通量测序的虾夷扇贝基因组 微卫星特征分析*



倪守胜^{1,2,3} 杨钰^{1,2,4} 柳淑芳^{1,2①} 庄志猛¹

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

摘要 为全面了解虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)微卫星分布频率和数量,深化对虾夷扇贝基因组的认识,本研究运用第二代高通量测序技术,进行虾夷扇贝简化基因组测序(RAD-seq),从基因组水平阐明虾夷扇贝基因组微卫星特征。结果显示,简化基因组测序共获得序列总长为 92,551,435 bp,经过滤筛选,获得 259,535 个 contig,其中,包含微卫星序列 3618 条,经引物设计共获得 3460 对微卫星引物。统计微卫星序列的重复类型,其中,三核苷酸重复单元数量最多(1587 个, 45.87%),其次是二核苷酸重复(1282 个, 37.05%),六核苷酸重复单元数量最少(20 个, 0.58%)。在三核苷酸重复中,以 ATA 重复类型所占比例最高(11.41%),共计 181 个。此外,虾夷扇贝同一重复类型的微卫星随着重复数增加其数量相对减少,而相同重复数的微卫星随着重复单元长度的增加其数量也呈下降趋势,可见微卫星长度与其数量呈负相关,表明长度较短的微卫星变异速率较快。本研究结果为认识虾夷扇贝基因组特征和在基因组水平开展种群遗传学研究提供了基础数据。

关键词 虾夷扇贝; 二代测序; 基因组; 微卫星

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0107-07

微卫星 DNA(Simple sequence repeat, SSR),是由基本单元为 1~6 个核苷酸所构成的简单重复序列,是目前应用较为广泛的分子标记之一(O'Connell *et al.*, 1997),其稳定性和可重复性高,特异性和共显性强,现已应用于生物遗传多样性分析、全基因组相关分析、分子标记辅助育种等诸多方面(刘志毅等, 2001; Alam *et al.*, 2005; Cavagnaro *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012; 王日芳等, 2017)。海洋生物的微卫星筛选及多态性分析、利用微卫星构建连锁图谱和抗病相关标记

的连锁分析等工作已陆续开展(赵莹莹等, 2006a、b; 李春艳等, 2009; Hou *et al.*, 2011)。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)自 20 世纪 80 年代引入中国,经过几十年的培育与发展,现已成为我国重要的海洋养殖物种。目前,已有采用分子标记开展虾夷扇贝种群遗传研究的报道,如同工酶电泳技术(高悦勉等, 2003、2004)、AFLP(鲍相渤等, 2009; 丁君等, 2010)、SSR(Sato *et al.*, 2005; 赵莹莹等, 2006b; 常亚青等, 2007; 李春艳等, 2009; Hou *et al.*, 2011),而

* “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD18B03)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by "12th Five-Year" Rural Areas of National Science and Technology Project(2012BAD18B03), and The Scholars of Taishan Special Construction Project in Shandong Province]. 倪守胜, E-mail: shoushengyongji@126.com

① 通讯作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-12-09, 收修改稿日期: 2016-12-28

对虾夷扇贝基因组水平上的微卫星及其分布特征还知之甚少。本研究采用第二代高通量测序技术对虾夷扇贝进行简化基因组测序(Restriction-site associated DNA sequencing, RAD-seq),通过对基因组中不同类型微卫星的统计与分析,了解其微卫星分布频率和数量,从基因组水平阐明虾夷扇贝基因组 SSR 特征及组成,对进一步利用微卫星开展遗传标记辅助育种和种群遗传学研究具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

虾夷扇贝于 2015 年 7 月采自我国北黄海獐子岛虾夷扇贝底播养殖海域,冰冻保存运送至实验室,解剖处理,取虾夷扇贝闭壳肌组织,存于-20℃备用。

1.2 基因组 DNA 提取

采用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(天根,北京)进行基因组 DNA 的提取,琼脂糖凝胶电泳初步检测提取的 DNA 质量,采用核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度与纯度,选取质量较好的 DNA 样品保存于-20℃备用。

1.3 文库构建及测序

将所获取的虾夷扇贝 DNA 样品送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序。DNA 样品通过随机酶切打断,经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个 RAD 文库的制备,构建好的文库通过 Illumina(测序仪)进行双末端测序,测序个数乘以测序序列长度即为原始数据值。对原始数据进行过滤:去除带接头(Adapter)的 reads pair;去除单端测序 read 中含有的 N(未读碱基)含量超过该条 read 长度比例的 10%的 reads pair;去除单端测序 read 中含有的低质量($Q \leq 5$)碱基数超过该条 read 长度比例的 50%的 reads pair。对所得数据样本含有的酶识别位点 reads 用 cd-hit-est 软件(Li *et al.*, 2006)进行聚类,并保证每类中 reads 支持数在 10~400 之间。根据聚类结果,用 Velvetopt 软件(Zerbino *et al.*, 2008)进行组装,得到最后的组装序列,并对 125 bp 以下的 contig 进行过滤。

1.4 分析方法

使用 SR search 软件(Rozen *et al.*, 2000)对过滤所得的 contig 进行简单重复序列的检测,检测标准如下:(1) SSR 重复的最小长度为 2;(2) SSR 重复的最大长度为 6;(3) SSR 序列的最小长度为 12;(4) SSR

上下游序列长度为 100 bp;(5) 2 个 SSR 的最小距离为 12 bp。使用 Primer 3 软件(Rozen *et al.*, 2000)对鉴定出的含有 SSR 重复基元的序列片段进行引物设计:引物的长度范围为 20~28,最适长度为 24;引物退火温度范围为 60~65℃,最适退火温度为 63℃,且一对引物退火温度差值不超过 1℃。

SSR 分布密度(D)计算公式为:

$$D=N/L$$

式中, D 为不同重复微卫星分布密度(ind./Mb); L 为虾夷扇贝基因组重叠群(contig)总长(Mb); N 为各重复类型微卫星数量(ind.)。

SSR 不同长度的分布频率(F)计算公式为:

$$F=N/T$$

式中, F 为不同长度微卫星的分布频率; N 为各长度微卫星数量(ind.); T 为微卫星总数量(ind.)。

2 结果与分析

2.1 简化基因组测序及拼接

测序结果共产生原始数据 2.872 G,经过滤后共获得有效数据 2.847 G(表 1)。Illumina HiSeq 产生的序列的碱基质量用 Qphred 表示,Phred 值为 20 和 30,碱基正确识别率分别为 99%和 99.9%。本测序中 Phred 数值大于 20 和 30 的碱基占所有碱基的百分比分别为 96.77%和 92.66%,RAD-Tag 捕获率为 93.07%,数据量符合预先设定,表明建库成功,测序质量合格。

表 1 虾夷扇贝简化基因组测序主要数据
Tab.1 Mean data of reduced-representation genome sequencing in *P. yessoensis*

类目 Category	数值 Value
原始数据量 Raw base (bp)	2,871,603,900
有效数据量 Clean base (bp)	2,847,335,100
组装总长度 Total contig base (bp)	92,551,435
组装总个数 Total contig number	259,535
组装平均长度 Average contig length (bp)	356

通过聚类组装获得序列总长度为 92,551,435 bp,过滤掉小于 125 bp 的 contig 后获得 259,535 个 contig,其中, N_{50} (将序列从大到小排列,当长度达到组装总长度一半时,contig 的长度)的长度为 419 bp,组装基因组的平均覆盖深度为 14.55 \times ,其中,4 \times 覆盖度在 86.64%以上,GC 含量为 35.63%,拼接结果正常,拼接序列质量较高。

2.2 基因组微卫星的数量及分布密度

通过对虾夷扇贝基因组的序列进行微卫星查找, 在虾夷扇贝的高通量测序数据库中进一步搜索含有 2~6 重复单元的 SSR, 从总长为 92,551,435 bp 的 259,535 个 contig 中筛选出 3618 个潜在微卫星位点, 经引物设计共获得 3460 个微卫星引物, 利用微卫星密度计算公式可得, 平均 26,748.97 bp 出现 1 个 SSR (表 2)。由表 2 可以看出, 虾夷扇贝微卫星各重复类型之间 SSR 数量均相差较大, 各类型 SSR 分布密度差异明显。所获得的 3460 条微卫星序列中, 分布最多的重复类型为三核苷酸重复(45.87%); 其次是二核苷酸重复(37.05%)、四核苷酸重复(14.48%)、五核苷酸重复(2.02%); 分布最少的是六核苷酸重复(0.58%)。

表 2 虾夷扇贝不同重复类型微卫星所占比例及分布密度
Tab.2 The proportion and density of different repeat types in SSR database of *P. yessoensis*

重复类型 Repeat type	数量 Number	百分比 Percentage(%)	密度 Density (Mb)
二核苷酸 Dinucleotide	1282	37.05	13.93
三核苷酸 Trinucleotide	1587	45.87	17.25
四核苷酸 Tetranucleotide	501	14.48	5.45
五核苷酸 Pentanucleotide	70	2.02	0.76
六核苷酸 Hexanucleotide	20	0.58	0.22
总数 Total	3460	100	37.61

2.3 基因组微卫星不同重复类型中各重复单元数量与频率

统计微卫星各重复类型中不同重复单元的数量显示, 二核苷酸重复有 12 种重复单元, 三核苷酸重复 59 种, 四核苷酸重复 100 种, 五核苷酸重复 47 种, 六核苷酸重复 20 种。统计微卫星各重复类型中不同重复单元的百分比(表 3), 在二核苷酸重复微卫星中, AT/TA 重复单元所占比例最高(79.17%), 共计 1015 个; 其次是 TG/GT 重复单元 103 个(8.03%)。在三核苷酸重复的微卫星中, ATA 重复单元所占比例最高(11.41%), 共计 181 个; AAT、TAT、ATT、TAA 这 4 种重复单元紧随其后, 分别有 155 个(9.77%)、150 个(9.45%)、137 个(8.36%)和 120 个(7.56%)。四核苷酸重复中每种重复单元所占比例相对均匀, 其中, 数量最多的为 CAAA 重复单元, 共计 48 个, 所占比例为 9.58%。五核苷酸重复中, 数量最多的重复单元为 AAACC, 共计 11 个, 占比 15.71%。六核苷酸重复共计 20 个, 每一种重复单元仅有 1 个。

表 3 虾夷扇贝 SSR 重复单元的数量及百分比

Tab.3 The numbers and percentage of SSR repeat motifs in *P. yessoensis*

重复类型 Repeat type	重复单元 Motif	数量 Number	重复单元百分比 Percentage of each repeat motif (%)
二核苷酸 Dinucleotide	AT/TA	1,015	79.17
	TG/GT	103	8.03
	AC/CA	99	7.72
	CT/TC	31	2.42
	AG/GA	28	2.18
	CG/GC	6	0.47
三核苷酸 Trinucleotide	ATA	181	11.41
	AAT	155	9.77
	TAT	150	9.45
	ATT	137	8.63
	TAA	120	7.56
	TTA	71	4.47
	TTC	62	3.91
	Others	711	44.80
	四核苷酸 Tetranucleotide	CAAA	48
AAAT		29	5.79
GACG		26	5.19
ATAA		24	4.79
AAAC		18	3.59
ATCA		18	3.59
Others		338	67.47
五核苷酸 Pentanucleotide	AAACC	11	15.71
	Others	59	84.29

2.4 基因组微卫星变异规律分析

虾夷扇贝基因组微卫星长度范围为 12~36 bp, 平均长度为 14.96 bp。微卫星长度分布频率计算结果显示, 微卫星长度越长其分布频率越低, 其中, 12~16 bp 的微卫星占绝对优势, 比例高达 79.35% (图 1)。

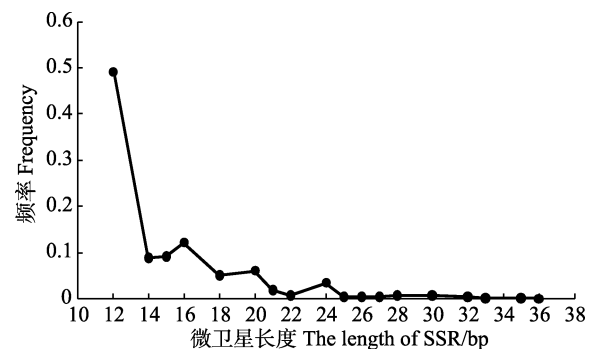


图 1 虾夷扇贝微卫星长度分布及不同长度微卫星频率
Fig.1 The length distribution and frequency of *P. yessoensis* SSR

针对虾夷扇贝基因组微卫星数量进行分析发现, 当同一重复类型的微卫星随着重复数增加其数量相对减少(表 4 纵向), 而相同重复数的微卫星随着重复

单元长度的增加其数量也呈下降趋势(表 4 横向),且随着不同重复单元长度的增加其重复数范围逐渐减小(表 4)。如,二核苷酸重复单元按照重复数多少可分成 11 种,其中,重复数为 6 的二核苷酸重复单元数量有 695,随着重复数增加其数量逐渐减少,当重复数增加至 16 时该重复单元的数量降至 7;当重复单元长度增加至六核苷酸时,该重复类型数量仅有 20 种。可见,随着重复单元长度的增加,微卫星数量和重复数范围均呈下降趋势,推测虾夷扇贝基因组中长度较短的微卫星变异速率比长度较长的微卫星变异速率快。

表 4 虾夷扇贝 SSR 不同重复数及不同重复类型的数量
Tab.4 The number of SSR with different repeat types and different copy number in *P. yessoensis*

重复数 Copy number	二核苷酸 Di- nucleotide	三核苷酸 Tri- nucleotide	四核苷酸 Tetra- nucleotide	五核苷酸 Penta- nucleotide	六核苷酸 Hexa- nucleotide
4		1006	318	53	19
5		315	117	14	1
6	695	123	44	1	
7	308	64	12	2	
8	103	43	9		
9	53	13	1		
10	40	17			
11	27	6			
12	14				
13	14				
14	13				
15	8				
16	7				

3 讨论

3.1 虾夷扇贝基因组微卫星序列特征分析

本研究基于虾夷扇贝基因组获得有效 SSR 数目为 3460 个,其中出现频率最高的为三核苷酸重复(45.87%),主要以 ATA(11.41%)和 AAT(9.77%)重复单元为主,然后依次是 TAT、ATT、TAA 重复单元;而二核苷酸重复中,则是以 AT 最多,其次为 TA。Hou 等(2011)采用 454 测序技术对虾夷扇贝转录组进行测序,在其转录组中搜索到的 2748 个 SSR 中,三核苷酸重复的频率最高(39.4%),其次是二核苷酸重复(21.1%)、四核苷酸重复(15.5%)、五核苷酸重复(14.6%)和六核苷酸重复(9.4%)。可见,无论是在转录组还是基因组水平上,虾夷扇贝微卫星三核苷酸重复类型的出现频率均最高。

通过二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸 3 种重复类型中各重复单元对比研究,在各种长度的重复中,A/T 都较 G/C 含量高很多,这与多数生物基因组微卫星具有的特点相一致,如中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)微卫星(高焕等,2004),红鳍东方鲀(*Sargassum fusiforme*)微卫星(崔建洲等,2006),三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)微卫星(宋来鹏等,2008)。生物基因组微卫星富含 A/T 的可能原因是微卫星序列 A/T 含量高,则 T_m 值降低,DNA 链容易解开,通过 DNA 复制滑动机制和重组机制,产生富含 AT 重复类型的机率更高。此外,Schlotterer 等(1992)认为,基因组 DNA 因 CpG 甲基化的胞嘧啶 C 很容易经过脱氨基作用转变成胸腺嘧啶 T,使其具有较高的突变可能性,并且少量的 GC 又是维持 DNA 热力学稳定性所必需的,一定程度上可解释生物体基因组微卫星中 G/C 含量如此之少的原因(黄杰等,2015)。还有一种可能是,统计结果中 GC 重复过少也可能与 GC 重复的测序工作比较困难有关(高焕等,2004)。具体原因,现今仍无定论,尚有待进一步的研究探讨。

对虾夷扇贝基因组不同重复类型微卫星的长度变异情况进行分析,发现这些微卫星的数量与重复长度成反比,微卫星的数量随着重复长度的增加而降低。Samadi 等(1998)的模拟分析研究认为,重复长度越长,经受的选择压力越大,则它们的重复数就越少,数量越低。此外,在中国对虾(高焕等,2004)、红鳍东方鲀(崔建洲等,2006)、枸杞(*Lycium barbarum*) (党少飞等,2016)等不同种类的动植物基因组微卫星的研究中也得到了相同的结论。这意味着虾夷扇贝基因组中重复长度较短的微卫星比重复长度较长的微卫星变异速率快,为虾夷扇贝进一步的多态性微卫星标记筛选工作提供选择方向和依据。

3.2 SSR 开发与筛选方法对 SSR 特征分析的影响

目前,比较成熟的微卫星开发与筛选技术有磁珠富集法、构建 cDNA 文库筛选 EST-SSR 法以及基于二代测序的转录组测序和简化基因组测序法。不同方法获得微卫星标记数量不同,所体现出的分布特征也不尽相同。传统的磁珠富集法筛选微卫星标记,获得率较低,每次仅能获得百余个微卫星标记,因其筛选探针多用二核苷酸重复的微卫星序列,在富集过程中,磁珠经过多个洗涤过程将一些因重复数目较少而附着不牢固的微卫星序列洗去,仅能获得较长序列的微卫星标记,因此,不能完全反映其微卫星的分布情况(赵莹莹等,2006a;李春艳等,2009)。李云峰等(2010)通过构建虾夷扇贝 cDNA 文库获得 74 个

EST-SSR, 由于 EST 序列仅能反映转录加工后的 mRNA 信息, 除去了许多内含子和其他序列, 因此, 并不能反映基因组 DNA 的真实信息。随着测序技术的发展, 获取效率高、技术难度低且花费成本与传统方法相近的二代测序被广泛应用到微卫星引物开发中, 基于转录组或基因组进行全部或部分高通量测序的方法可以获得大量的核酸序列信息, 微卫星标记的开发也就水到渠成, 而且二代测序一次性开发标记数据量大, 可以比较完整地反应物种的微卫星分布特征。

3.3 与其他贝类微卫星分布特征比较

由虾夷扇贝基因组微卫星特征分析得知, 其三碱基重复类型微卫星数量最多, 在已开展基因组微卫星开发的贝类中(表 5), 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (Zhang *et al.*, 2008)和三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*) (Bai *et al.*,

2009)微卫星数量最多的同样为三碱基重复类型, 而在马氏珠母贝(*Pinctada martensii*) (王忠良等, 2015)、里氏拟石磺(*Paraoncidium reevesii*) (吴欣等, 2015)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) (闫路路等, 2015)和文蛤(*Meretrix meretrix*) (Wang *et al.*, 2011)中, 却呈现出单核苷酸重复数量最多, 二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸重复数量依次递减的趋势。而长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (张琳琳等, 2011)的 EST-SSR 则呈现六核苷酸重复数目最多(851), 单核苷酸次之(805), 二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸重复依次递减的趋势。由此可见, 在已有贝类微卫星研究中, 各重复类型的微卫星分布并未呈现较明显的规律, 产生这样的结果, 一方面可能是微卫星开发手段不同而导致结果不同, 另一方面, 也可能是不同物种其微卫星组成存在较大差异, 这些都有待进一步研究。

表 5 不同贝类 SSR 分布特征

Tab.5 The characteristics of SSR distribution in different molluscs

物种 Species	SSR 类型 SSR type	平台/方法 Method/Sequencing platform	个数 Numbers	主要特征 Main features	参考文献 References
马氏珠母贝 <i>P.martensii</i>	EST-SSR	Illumin/ Hiseq-2000 平台	9872	单核苷酸重复最多(8042), 二核苷酸重复(1035)、三核苷酸重复(630)、四核苷酸重复(158)依次递减	王忠良等, 2015
文蛤 <i>M.meritrix</i>	EST-SSR	454 平台	2970	未考虑单核苷酸重复, 二核苷酸重复最多(1194), 三核苷酸重复(1123)、四核苷酸重复(357)次之	Wang 等, 2011
三角帆蚌 <i>H.cumingii</i>	EST-SSR	构建 cDNA 文库, 3730 测序	201	未考虑单核苷酸重复, 三核苷酸重复最多(110), 二核苷酸重复次之(83)	Bai 等, 2009
长牡蛎 <i>C.gigas</i>	EST-SSR	NCBI 下载 EST 序列标签	2602	六核苷酸重复最多(851), 单核苷酸重复次之(307), 二核苷酸重复(258)和三核苷酸重复(240)个数相差不大	张琳琳等, 2011
里氏拟石磺 <i>P.reevesii</i>	基因组 SSR	Illumin/ Hiseq-2000 平台	67696	单核苷酸重复最多(53948), 二核苷酸重复(7577)、三核苷酸重复(4579)、四核苷酸重复(1572)依次递减	吴欣等, 2015
菲律宾蛤仔 <i>R.philippinarum</i>	基因组 SSR	454 平台	1601	三核苷酸重复最多(903), 其次为二核苷酸重复(492)和四核苷酸重复(160), 单核苷酸重复较少(22)	闫路路等, 2015

参 考 文 献

- Alam MS, Islam MS. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 2005, 246(1-4): 151-160
- Bai Z, Yin Y, Hu S, *et al.* Identification of genes involved in immune response, microsatellite, and SNP markers from expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(4): 520-530
- Bao XB, Dong Y, He CB, *et al.* Studies of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) germplasm by using AFLP markers. *Biotechnology Bulletin*, 2009(4): 126-129 [鲍相渤, 董颖, 赫崇波, 等. 基于 AFLP 技术对中国虾夷扇贝群体种质资源的研究. *生物技术通报*, 2009(4): 126-129]
- Cavagnaro PF, Senalik DA, Yang L, *et al.* Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 569
- Chang YQ, Chen XX, Ding J, *et al.* Genetic diversity in five scallop populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1145-1152 [常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 5 个群体的遗传多样性. *生态学报*, 2007, 27(3): 1145-1152]

- Cui JZ, Shen XY, Yang GP, *et al.* Extraction, purification and chemical composition studies on fucodian from *Sargassum fusiforme*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 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]
- Dang SF, Wang ZL, Zhang DF, *et al.* Characteristic analysis of microsatellites of *Lycium barbarum*. *Journal of Northwest Forestry University*, 2016, 31(1): 97–102 [党少飞, 王占林, 张得芳, 等. 枸杞基因组微卫星特征分析. *西北林学院学报*, 2016, 31(1): 97–102]
- Ding J, Wang T, Chang YQ, *et al.* AFLP analysis on genetic diversity and differentiation of different populations of *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2010, 23(1): 47–53 [丁君, 王婷, 常亚青, 等. 基于 AFLP 技术的不同群体虾夷扇贝遗传结构及多样性研究. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2010, 23(1): 47–53]
- Gao H, Liu P, Meng XH, *et al.* Analysis of microsatellite sequences in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* genome. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(5): 424–431 [高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组微卫星特征分析. *海洋与湖沼*, 2004, 35(5): 424–431]
- Gao YM, Li GX, Zhao YL. Genetic structure of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* hatched population in Dalian Sea areas. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, 19(2): 142–145 [高悦勉, 李国喜, 赵银丽. 大连沿海虾夷扇贝养殖群体遗传结构的研究. *大连水产学院学报*, 2004, 19(2): 142–145]
- Gao YM, Li GX. Biochemical genetic analysis of isozymes from *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2003, 18(4): 269–272 [高悦勉, 李国喜. 虾夷扇贝同工酶的生化遗传分析. *大连水产学院学报*, 2003, 18(4): 269–272]
- Hou R, Bao ZM, Wang S, *et al.* Transcriptome sequencing and de novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21560
- Huang J, Zhou Y, Liu YZ, *et al.* Characteristics of microsatellites in *Arborophila rufipectus* genome sequences using 454 GS FLX. *Sichuan Journal of Zoology*, 2015, 34(1): 8–14 [黄杰, 周瑜, 刘与之, 等. 基于 454 GS FLX 高通量测序的四川山鹧鸪基因组微卫星特征分析. *四川动物*, 2015, 34(1): 8–14]
- Li CY, Ding J, Chang YQ, *et al.* Isolation of microsatellite markers in Japanese scallop and its application in genetic structure analysis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1): 39–46 [李春艳, 丁君, 常亚青, 等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 39–46]
- Li WZ, Godzik A. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658–1659
- Li YF, Liu WD, Gao XG, *et al.* Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 578–585 [李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 578–585]
- Liu ZY, Xiang JH. Application of the microsatellite technique for genetic analysis in marine animals. *Marine Sciences*, 2001, 25(6): 11–13 [刘志毅, 相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用. *海洋科学*, 2001, 25(6): 11–13]
- O'Connell M, Wright JM. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1997, 7(3): 331–363
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 2000, 132(3): 365–386
- Samadi S, Artiguebielle E, Estoup A, *et al.* Density and variability of dinucleotide microsatellites in the parthenogenetic polyploid snail *Melanoides tuberculata*. *Molecular Ecology*, 1998, 7(9): 1233–1236
- Sato M, Kawamata K, Zaslavskaya N, *et al.* Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(6): 713–728
- Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(2): 211–215
- Song LP, Liu P, Li J, *et al.* Analysis of microsatellite sequences in genome of crab, *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(5): 738–744 [宋来鹏, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹基因组微卫星特征分析. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 738–744]
- Wang HX, Huan P, Lu X, *et al.* Mining of EST-SSR markers in clam *Meretrix meretrix* larvae from 454 shotgun transcriptome. *Genes and Genetic Systems*, 2011, 86(3): 197–205
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line. *Progress in Fisheries Science*, 2017, 38(4): 78–86 [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 78–86]
- Wang ZL, Ding J, Xu YH, *et al.* Polymorphism of EST-SSRs from *Pinctada martensii* based on transcriptome datasets. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 687–693 [王忠良, 丁燊, 许尤厚, 等. 基于转录组数据的马氏珠母贝 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 687–693]
- Wu X, Shen HD, Wang DF, *et al.* Development of microsatellite markers for *Paraoncidium reevesii* based on transcriptome sequencing Illumina HiseqTM 2000. *Marine Sciences*, 2015, 39(11): 20–25 [吴欣, 沈和定, 王冬凤, 等. 基于 Illumina HiseqTM 2000 高通量转录组测序的里氏拟石磺 SSR 标记开发. *海洋科学*, 2015, 39(11): 20–25]
- Yan LL, Qin YJ, Yan XW, *et al.* Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation

- sequencing. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1573–1580 [闫路路, 秦艳杰, 闫喜武, 等. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选. *生态学报*, 2015, 35(5): 1573–1580]
- Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 2008, 18(5): 821–829
- Zhang LL, Bao ZM, Wang S, *et al.* FISH mapping and identification of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) chromosomes. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(2): 151–157
- Zhang LL, Li L, Zhang GF. Bioinformatics data mining of EST-tandem repeats of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Sciences*, 2011, 35(4): 9–14 [张琳琳, 李莉, 张国范. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)EST 串联重复序列的组成和分布. *海洋科学*, 2011, 35(4): 9–14]
- Zhao YY, Zhu XC, Sun XW, *et al.* Microsatellite enrichment by magnetic beads in Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006a, 13(5): 749–755 [赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列. *中国水产科学*, 2006a, 13(5): 749–755]
- Zhao YY, Zhu XC, Sun XW, *et al.* Polymorphic microsatellite loci of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Acta Zoologica Sinica*, 2006b, 52(1): 229–233 [赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 虾夷扇贝的多态性微卫星座位. *动物学报*, 2006b, 52(1): 229–233]
- Zhu H, Senalik D, McCown BH, *et al.* Mining and validation of pyrosequenced simple sequence repeats (SSRs) from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124(1): 87–96

(编辑 冯小花)

Microsatellite Analysis of *Patinopecten yessoensis* Using Next-Generation Sequencing Method

NI Shousheng^{1,2,3}, YANG Yu^{1,2,4}, LIU Shufang^{1,2①}, ZHUANG Zhimeng¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Microsatellite has become an important molecular marker for genetic diversity analysis and marker-assisted breeding as its unique advantages, such as high stability and repeatability, strong specificity and codominance. To understand the distribution and frequency of microsatellite of *P. yessoensis* genome, the current study analyzed the microsatellite sequences of *P. yessoensis* genome by establishing and sequencing a RAD library. The sequences were assembled, and SSRs were detected by bioinformatics method. The total length of the DNA sequences of *P. yessoensis* genome is 92,551,435 bp and 3,618 contigs from all filtered 259,535 contigs containing SSR sequences. The 3460 potential SSR loci were identified with the number of repeat motif from 2 to 6 using appropriate amplifying primers. A total of 1587 trinucleotide SSRs (45.87%) were the most common motif, and ATA (11.41% of whole trinucleotide motifs) was the richest motif. The dinucleotide and the tetranucleotide types ranked the second and the third with a proportion of 37.05%(1282) and 14.48%(501), respectively, while the pentanucleotide type accounted for 2.02%(70), and the hexanucleotide type was the least amount with a proportion of 0.58%(20). Interestingly, the abundance of microsatellites of the same repeat type decreased with the increase of copy number, and the abundance of microsatellites of the same copy number decreased with the increase of the repeat unit length. The variation of length distribution frequency, copy numbers and the abundance of the microsatellite suggested that the mutation rate of shorter repeats was larger than that of the longer repeats. These results provide basic information of microsatellite of *P. yessoensis*, which would be useful to study the genome and population genetics of *P. yessoensis*.

Key words *Patinopecten yessoensis*; Next-generation sequencing; Genomes; Microsatellite

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20161220001

http://www.yykxjz.cn/

刘雨, 王卫军, 杨建敏, 孙国华, 马敬骏, 李焕军. 长牡蛎高糖原含量新品系正反交家系的生理代谢. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 114–119

Liu Y, Wang WJ, Yang JM, Sun GH, Ma JJ, Li HJ. Analysis on physiological metabolism in reciprocal cross families of high glycogen content line of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 114–119

长牡蛎高糖原含量新品系正反交家系的生理代谢*

刘 雨^{1,2} 王卫军² 杨建敏^{2①} 孙国华² 马敬骏³ 李焕军²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院 烟台 264006;

3. 烟台市莱山区渔业海洋站 烟台 264003)



摘要 为了探究糖原含量差异显著的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)自交家系和正反交家系在生理代谢水平上的差异,本研究开展了在一定温度(20℃)和盐度(32)下自交组和正反交组的滤水率、耗氧率和排氨率实验。结果显示,滤水率方面,自交组 AA 最大, BB 最小,二者差异显著($P<0.05$);正反交组 AB 和反交组 BA 二者差异不显著且大小介于 2 个自交组之间,正反交组的杂种优势值为 8.44%。耗氧率方面,自交组 BB 最大,正反交组 AB 最小;自交组 AA 与 BB 差异显著($P<0.05$),正反交组杂种优势值为-43.87%;耗氧率与糖原含量呈负相关,相关系数为-0.884,达到极显著性水平($P<0.01$)。排氨率方面,各组之间的排氨率无显著差异,大小为 0.04 mg NH₃-N/(g·h)。研究表明,糖原含量品系正反交家系的差异在生理代谢上主要表现为滤水率和耗氧率的差异。

关键词 长牡蛎;高糖原含量新品系;正反交;生理代谢

中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0114-06

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎,是一种广温、广盐性贝类,具有生长速度快、抗逆性强等优点,是世界范围内养殖规模最大、产量最高的海产经济贝类,也是我国近几十年来重要的海水养殖种类,2015 年产量高达 457.3 万 t(农业部渔业渔政管理局,2016),为我国渔业的经济增长和人民生活水平的提高做出了重要贡献。但近年来,随着人民生活水平的提高,市场对长牡蛎品质的需求也更高,因此,开展长牡蛎营养品质性状遗传改良和新品种培育具有重要意义。

糖原作为长牡蛎体内最直接有效的储能物质,在生理代谢方面发挥着重要作用,同时,它又是重要的

呈味物质(陈德慰等,2012),属长牡蛎重要的营养品质性状之一,其丰度与品质相关。学者们对于长牡蛎糖原含量性状从生化分析(Li *et al*, 2000)、组织学(Berthelin *et al*, 2000)及糖原代谢相关基因(Bacca *et al*, 2005; 刘思玮等,2013)等方面进行了研究,但长牡蛎高糖原含量品系选育仍缺乏丰富的理论基础。遗传、环境以及长牡蛎在繁殖期大量糖原转化为配子生成所需要的能量,不同程度决定和影响了长牡蛎品质与风味,如果高糖原含量品系成功选育,这一现状有望得以改善。

滤水率、耗氧率和排氨率是滤食性贝类生理代谢的重要指标。本研究以 2 个高糖原含量长牡蛎家系为

* 山东省农业良种工程、国家自然科学基金项目(31402298)和黄河三角洲学者项目共同资助[This work was supported by Seed Improvement Project of Shandong Province, National Natural Science Foundation of China (31402298), and Scholar of Yellow River delta]. 刘 雨, E-mail: 1519975651@qq.com

① 通讯作者: 杨建敏, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2016-12-20, 收修改稿日期: 2017-01-15

亲本, 通过家系内自交和家系间杂交的方式, 获得糖原含量存在差异的自交组和正反交组, 从滤水率、耗氧率、排氨率 3 个指标探讨长牡蛎自交家系和正反交家系在生理代谢水平上的差异, 以为长牡蛎高糖原含量为目标的营养品质性状新品系的选育和评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2014 年 6 月在山东莱州海益育苗场以 2 个不同遗传背景的高糖原含量家系(家系 A 和家系 B)为亲本, 通过完全双列杂交获得 4 个实验组: 自交组 AA(A♀×A♂)、自交组 BB(B♀×B♂)、正交组 AB(A♀×B♂)和反交组 BA(B♀×A♂)。在山东烟台崆峒岛海域经过 21 个月的养成管理后, 从各实验组(每组约 300 个个体)随机抽取 30 个样品用于数据分析, 其中各组的壳高(Shell height, SH)、湿重(Wet weight, WW)和软体部干重(Edible part dry weight, W)无显著差异(表 1); 但正交组 AB 的糖原含量(Glycogen content, GC)最高, 其次为反交组 BA、自交组 AA, 自交组 BB 的糖原含量最低, 具体情况见图 1 和表 2。

表 1 不同实验组的长牡蛎相关性状统计
Tab.1 Statistics characters of *C. gigas* in different experiment groups

实验组 Groups	壳高 Shell height (mm)	湿重 Wet weight (g)	软体部干重 Edible part dry weight (g)
AA	99.47±10.16	96.04±20.26	2.00±0.51
BB	107.18±14.03	106.45±22.88	2.01±1.10
AB	95.90±21.61	97.19±39.08	1.91±0.76
BA	100.32±9.78	88.68±21.31	1.86±0.63

注: 相同性状各组之间均无显著差异($P>0.05$)

Note: There were no significant differences in the same column ($P>0.05$)

1.2 实验方法

1.2.1 暂养与驯化 实验前将贝壳表面的附着物彻底清除后, 暂养 7 d, 期间保持不间断充气, 每天 100%换水 1 次, 并投喂足量的小新月菱形藻(*Nitzschia closterium f. minutissima*)。各实验组入池时的温度和盐度, 分别以每天 1℃和 1 的幅度, 逐渐调节至温度为 20℃、盐度为 32。通过自动温度控制仪控制电加热棒来保持温度的恒定, 采用过滤后的淡水和海水水晶来调节盐度。

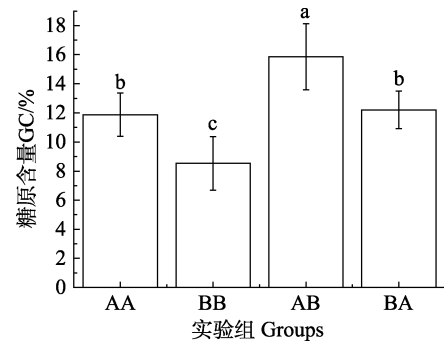


图 1 不同实验组的糖原含量差异比较

Fig.1 The comparison of glycogen content between different experiment groups

不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同
Different letters denoted significant differences ($P<0.05$). The same as below

1.2.2 糖原含量的测定 糖原含量测定参照 Wang 等(2015), 将冷冻干燥后的样品充分研磨成粉末状, 运用 NIRS 技术和已有的长牡蛎软体部干样糖原含量模型对样品的糖原含量进行预测。

1.2.3 滤水率的测定 滤水率(Filtering rate, R_F)的测定参照邓传敏等(2016), 实验在容积为 3 L 的容器中进行, 每个容器中放入 1 个实验个体, 每组设置同规格的 5 个重复和 1 个空白对照。温度控制采用恒温水浴方法, 下同。实验用单胞藻为小新月菱形藻, 初始浓度为 3×10^5 cells/ml, 实验持续时间为 1 h。实验结束后, 取新鲜的样品软体部, 冷冻干燥后称干重, 根据下列公式得出滤水率。

$$R_F = [V(\ln C_{t_0} - \ln C_{t_1})] / (w \cdot t)$$

式中, R_F 为滤水率[L/(g·h)]; V 为实验溶液体积(L); w 为实验贝软体部干重(g); t 为实验时间(h); C_{t_0} 为实验开始时的藻类浓度(cells/ml); C_{t_1} 为 t 时间时的藻类浓度(cells/ml)。

1.2.4 耗氧率的测定 取停食 1 d 的实验贝放入 3 L 容器中测定耗氧率(Oxygen consumption rate, R_O), 设置同规格的 5 个重复和 1 个空白对照。向容器内注满待用海水并用不透水不透气的塑料薄膜完全密封, 避免容器内残留气泡。耗氧率的测定时间为 2~4 h, 以实验结束时水中溶解氧浓度(Dissolved oxygen, DO)不低于实验初始值的 60%为限(毛玉泽等, 2005)。实验结束时, 轻轻搅动待测海水, 直接用溶氧仪(HACH, LDOTM, 美国)进行现场测量, 用下列公式计算耗氧率。

$$R_O = [V \cdot (DO_0 - DO_t)] / (w \cdot t)$$

式中, R_O 为耗氧率[$\text{mg O}_2/(\text{g} \cdot \text{h})$]; DO_0 和 DO_t 为实验开始和结束时水中溶解氧浓度($\text{mg O}_2/\text{L}$); V 为容

器的容积(L); w 为实验贝的软组织干重(g); t 为实验持续时间(h)。

1.2.5 排氨率的测定 排氨率(Ammonia excretion rate, R_N)测定的实验装置与上述耗氧率测定中的相同,不同的是排氨率的测定时间为3 h,实验结束后,将海水搅动均匀用虹吸法采集水样,冷冻保存,解冻后立即测定。水中氨氮含量的测定参照《海洋监测规范》第四部分:海水分析(GB17378.4-2007)(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等,2007)中的次溴酸钠氧化法进行测定,采用紫外分光光度计(日立,U-2900)测定吸光值,用下列公式计算排氨率。

$$R_N = [V \cdot (N_0 - N_t)] / (w \cdot t)$$

式中, R_N 为排氨率[$\text{mg NH}_3\text{-N}/(\text{g}\cdot\text{h})$]; N_0 和 N_t 为实验开始和结束时水中氨氮的浓度($\text{mg NH}_3\text{-N}/\text{L}$); V 为容器的容积(L); w 为实验用贝的软组织干重(g); t 为实验持续时间(h)。

1.3 数据分析

采用 SPSS 22 统计软件对各组之间进行单因素

方差分析(One-way ANOVA),获得各组的平均值和标准差,对组间平均值进行 LSD 多重比较分析,分析各组平均值之间的差异是否显著,各性状之间是否相关,差异显著水平设为 $P < 0.05$ 。

参照郑怀平等(2004)使用的方法来计算 A、B 两个家系杂交子一代的杂种优势率(Heterosis, H)。

2 结果

2.1 滤水率

如表2和图2中所示,自交组 AA 的滤水率最大,自交组 BB 的滤水率最小,正交组 AB 和反交组 BA 的滤水率大小介于2个自交组之间且正交组 AB 较大。自交组 AA 的滤水率显著大于自交组 BB ($P < 0.05$),而正交组 AB 和反交组 BA 之间差异不显著。正交组 AB 的滤水率与自交组 AA 差异不显著,与自交组 BB 的差异显著($P < 0.05$)。反交组 BA 的滤水率与2个自交组的差异均不显著,总的来说正反交组的平均值要大于自交组的平均值,且表现出杂种优势为 8.44%。

表2 不同实验组的生理代谢指标及杂种优势率

Tab.2 The physiological metabolic indices and heterosis of different experiment groups

实验组 Groups	糖原含量 GC (%)	滤水率 R_F [$\text{L}/(\text{g}\cdot\text{h})$]	耗氧率 R_O [$\text{mg O}_2/(\text{g}\cdot\text{h})$]	排氨率 R_N [$\text{mg NH}_3\text{-N}/(\text{g}\cdot\text{h})$]
AA	11.88±1.49 ^b	5.58±0.71 ^a	0.98±0.05 ^b	0.04±0.01 ^a
BB	8.53±1.84 ^c	2.36±0.50 ^b	1.55±0.22 ^a	0.04±0.01 ^a
AB	15.86±2.27 ^a	4.68±0.87 ^a	0.57±0.10 ^c	0.04±0.02 ^a
BA	12.21±1.29 ^b	3.93±0.57 ^{ab}	0.85±0.14 ^{bc}	0.04±0.01 ^a
杂种优势率 Heterosis (%)	37.53	8.44	-43.87	0

注:表格中同列肩标字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: In the same column, values with same superscripts denoted no significant differences, different superscripts denoted significant differences ($P < 0.05$)

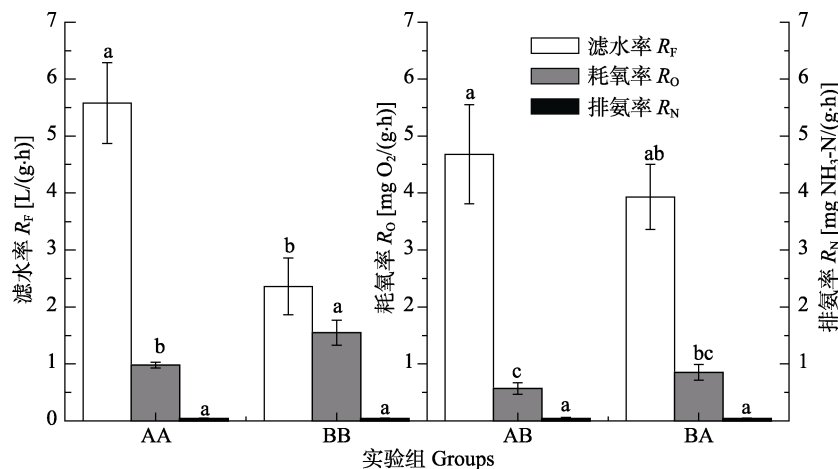


图2 不同实验组滤水率、耗氧率和排氨率的差异比较

Fig.2 The comparison of filtering rate, oxygen consumption rate and ammonia excretion rate among groups

2.2 耗氧率和排氨率

由表 2 和图 2 可知, 各组之间的排氨率不存在显著差异, 约为 $0.04 \text{ mg NH}_3\text{-N}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 正反交组不具有杂交优势。而在耗氧率方面, 自交组 BB 的耗氧率最大, 正交组 AB 的耗氧率最小, 自交组 AA 和反交组 BA 介于两者之间且自交组 AA 较大。自交组 AA 的耗氧率显著小于自交组 BB ($P<0.05$), 正交组 AB 和反交组 BA 之间差异不显著, 正交组 AB 显著小于自交组 AA 和 BB ($P<0.05$), 反交组 BA 显著小于自交组 BB ($P<0.05$), 但与自交组 AA 差异不显著, 总的来说正反交组的耗氧率均小于自交组, 表现出-43.87%的杂种劣势。

2.3 糖原含量与滤水率、耗氧率、排氨率的相关性

对糖原含量与滤水率、耗氧率、排氨率三个指标进行相关性分析, 并在 0.01 水平上进行显著性分析得出以下结果(表 3), 糖原含量与滤水率的 Pearson 相关系数是 0.270, 显著性结果是 0.482, 相关性不显著; 糖原含量与耗氧率的 Pearson 相关系数是-0.884, 显著性结果是 0.004, 达到极显著水平 ($P<0.01$); 糖原含量与排氨率的 Pearson 相关系数是-0.037, 显著性结果是 0.925, 相关性也不显著。

3 讨论

3.1 糖原含量与生理代谢水平的相关性

长牡蛎作为一种滤食性双壳贝类, 滤水率是衡量其摄食能力的重要指标。本研究结果显示, 滤水率与糖原含量存在不显著的正相关性。在滤水率实验中, 各组实验贝所形成假粪的情况也不同, 造成不同实验组长牡蛎糖原含量不同的原因可能与长牡蛎消化腔内消化酶的活性有关。李炼星等(2016)对不同缢蛏(*Sinonovacula constricta*)家系生长与消化酶活性的研究中发现, 缢蛏消化酶活性与生长发育相关, 较快的生长速度对应较强的消化生理机能, 高水平的消化酶活性有利于缢蛏对营养物质的消化吸收并转化为生

长发育所需的能量。这就解释了有着高水平的滤水能力的家系之所以糖原含量低, 在一定程度上是由于消化吸收能力较低所致。

耗氧率和排氨率是长牡蛎生理代谢活动的重要指标, 当长牡蛎体内的蛋白质代谢占主导地位时, 代谢产物主要以氨的形式排出, 此时耗氧率降低, 排氨率增大; 当体内糖原的代谢占据主导时, 耗氧率将明显增大、排氨率则会降低。本研究发现, 在停止投饵的情况下, 同规格的长牡蛎个体排氨率之间无显著差异, 并且糖原含量与排氨率之间相关性不显著, 但糖原含量与其耗氧率呈极显著的负相关关系 ($P<0.01$)。因此, 糖原含量的高低在生理代谢水平上主要表现为耗氧率的高低, 此时糖原是长牡蛎主要的代谢底物。这与毛玉泽等(2005)提出的每年 5~7 月(温度与本研究温度设定 20°C 相近)糖原和脂肪是长牡蛎的主要代谢底物的观点相一致。该代谢机制在薛明等(2011)对方斑东风螺(*Babylonia areolata*)幼螺代谢的研究中也发现类似的结果, 轻度饥饿状态下的方斑东风螺幼螺主要以消耗脂肪和糖原供能, 而且氧氮比(O:N)较高, 耗氧率较大。何伟等(2013)在温度和低氧对白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)乳酸与糖水平的影响研究中得出, 在低氧胁迫下鱼体内肝糖原和肌糖原的含量显著降低。这都说明了耗氧率与糖原含量之间存在着密切的关系, 并且高糖原含量个体可能具有更好的耐低氧胁迫能力。

3.2 杂种优势与正反交效应

本研究表明, 糖原含量性状正反交组比自交组具有杂种优势, 表现在生理代谢上为滤水率和耗氧率的杂种优势。该结果与 Falconer 等(1996)提出的“如果两个基础群体的基因频率不同, 那么它们之间的杂交将表现出杂种优势”、“不同的群体配对表现出不同的杂种优势大小”等观点契合。正反交组之间存在的显著差异, 可能与父母本效应有关。王卫军等(2015)在长牡蛎 3 个选育群体完全双列杂交后代生长性状分析中发现, 中国 F_4 代选育群体作为杂交候选父母本时,

表 3 各生理代谢指标与糖原含量相关性

Tab.3 The correlation between physiological metabolism indices and glycogen content

性状 Traits	滤水率 R_F		耗氧率 R_O		排氨率 R_N	
	Pearson 相关系数 Pearson correlation coefficient	显著性 Significance	Pearson 相关系数 Pearson correlation coefficient	显著性 Significance	Pearson 相关系数 Pearson correlation coefficient	显著性 Significance
糖原含量 GC	0.270	0.482	-0.884**	0.004	-0.037	0.925

**表示相关性在 0.01 水平上显著

** Denoted significant in 0.01 significance level

相对于日本和韩国群体作为父母本时具有高的可稳定遗传给子代的加性效应值。余勇等(2016)在长牡蛎中国群体和日本群体杂交子代的杂种优势分析中发现,长牡蛎幼虫期的存活率存在显著的母性效应。吴杨平等(2014)在对 3 个不同地理群体红壳色文蛤(*Meretrix meretrix*)杂交的配合力分析中也发现,在早期阶段存在父母本效应的结论。与自交组 BB 和反交组 BA 相比,自交组 AA 和正交组 AB 较高的糖原含量说明糖原含量性状受母本效应的影响。

综上所述,不同糖原含量的自交组和正反交组之间的耗氧率和滤水率的差异,提示我们杂交后代生理代谢水平除了反映出相关品质的不同,也会反映出其抗逆能力的不同。本研究从生理代谢角度对长牡蛎糖原含量性状自交组和正反交组的摄食和代谢差异进行了探讨,为长牡蛎高糖原含量品系选育提供重要的生理代谢种质评价参考。在后续研究中,我们将对糖原含量杂交效应的分子机理进行研究,更深层次揭示杂交效应与代谢水平的关系。

参 考 文 献

- Bacca H, Huvet A, Fabioux C, *et al.* Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(4): 635–646
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(2): 136–145
- Chen DW, Su J, Liu XL, *et al.* Taste evaluation of non-volatile taste compounds in bivalve mollusks from Beibu Gulf, Guangxi. *Food Science*, 2012, 33(10): 165–168 [陈德慰, 苏键, 刘小玲, 等. 广西北部湾 3 种贝类中主要呈味物质的测定及呈味作用评价. *食品科学*, 2012, 33(10): 165–168]
- Deng CM, Li Q, Kong LF, *et al.* Comparison of feeding and respiration of the forth golden shell color line and normal culture groups of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 855–863 [邓传敏, 李琪, 孔令锋, 等. 长牡蛎壳金选育系 F₄ 与普通养殖群体摄食和呼吸的比较研究. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 855–863]
- Falconer DS, Mackay TFC. *Introduction to quantitative genetics* (4th ed.). England: Longman Limited, 1996
- Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. *China fisheries statistics yearbook*. Beijing: China Agriculture Press, 2016 [农业部渔业渔政管理局. *中国渔业统计年鉴*. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. *The specification for marine monitoring—Part 4: Seawater analysis* (GB17378.4-2007). Beijing: China Standards Press, 2007 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. *海洋监测规范—第 4 部分: 海水分析* (GB17378.4-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007]
- He W, Cao ZD, Fu SJ. Effects of temperature and hypoxia on lactate and carbohydrate level in Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2013, 30(5): 27–31 [何伟, 曹振东, 付世建. 温度和低氧对白鲢乳酸与糖水平的影响. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 30(5): 27–31]
- Li LX, Li H, Shen HD, *et al.* Comparison of the growth traits and digestive enzyme activities of families of *Sinonovacula constricta*. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2016, 43(3): 431–435 [李炼星, 李浩, 沈和定, 等. 缢蛭家系生长与消化酶活性的比较. *安徽农业大学学报*, 2016, 43(3): 431–435]
- Li Q, Osada M, Mori K. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science*, 2000, 66(3): 502–508
- Liu SW, Li Q, Yu H, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in glycogen phosphorylase gene and their association with growth performance and glycogen content in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 481–489 [刘思玮, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎糖原磷酸化酶基因 SNPs 与生长性状和糖原含量的相关性分析. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 481–489]
- Mao YZ, Zhou Y, Yang HS, *et al.* Seasonal variation in metabolic rate of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and its implication to summer mortality. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(5): 445–451 [毛玉泽, 周毅, 杨红生, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)代谢率的季节变化及其与夏季死亡关系的探讨. *海洋与湖沼*, 2005, 36(5): 445–451]
- Wang WJ, Li Q, Yang JM, *et al.* Analysis of growth trait of Pacific oyster *Crassostrea gigas* using complete diallel cross from three selective breeding strains. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 628–635 [王卫军, 李琪, 杨建敏, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)三个选育群体完全双列杂交后代生长性状分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 628–635]
- Wang WJ, Yang JM, Li Q, *et al.* Development of calibration models for rapid determination of chemical composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Shellfish Research*, 2015, 34(2): 303–309
- Wu YP, Chen AH, Yao GX, *et al.* Combining ability analysis on diallel cross from three different red *Meretrix meretrix* populations. *Marine Fisheries*, 2014, 36(4): 314–319 [吴杨平, 陈爱华, 姚国兴, 等. 3 个不同地理群体红壳色文蛤杂交的配合力分析. *海洋渔业*, 2014, 36(4): 314–319]

- Xue M, Ke CH, Ding GL. Effect of food deprivation on metabolism of hatchery-reared juvenile spotted babylon (*Babylonia areolata*). *Marine Environmental Science*, 2011, 30(2): 203–206 [薛明, 柯才焕, 狄桂兰. 食物缺乏对方斑东风螺幼螺代谢的影响. *海洋环境科学*, 2011, 30(2): 203–206]
- Yu Y, Li Q, Yu H, *et al.* Heterosis of hybrid between Chinese and Japanese populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(2): 35–41 [余勇, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎中国群体和日本群体杂交子代的杂种优势分析. *中国海洋大学学报*, 2016, 46(2): 35–41]
- Zheng HP, Zhang GF, Liu X, *et al.* Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians*. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(3): 267–272 [郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活比较. *水产学报*, 2004, 28(3): 267–272]

(编辑 马璀璨)

Analysis on Physiological Metabolism in Reciprocal Cross Families of High Glycogen Content Line of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)

LIU Yu^{1,2}, WANG Weijun², YANG Jianmin^{2①}, SUN Guohua², MA Jingjun³, LI Huanjun²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 3. Laishan Marine Fishery Station, Yantai 264003)

Abstract Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is an euryhaline and eurythermal shellfish with the advantages of rapid growth and hardiness. Its breeding scale and production is the largest in the aquaculture, which has contributed to the economic growth and the improvement of the people's living standard in China. The annual output of aquaculture in China is 4.57 million tons in 2015, and the market demand for high quality oysters is ascending. Therefore, it is of great significance to improve nutritional quality and create new strain of oyster. In order to discover different physiological metabolisms between selfing lines and reciprocal crosses of *C. gigas* with various glycogen content, the filtration rate, oxygen consumption rate and ammonia excretion rate were studied under certain temperature (20°C) and salinity (32). In terms of the filtering rate, the highest one and the lowest one were selfing group AA and selfing group BB, respectively, which were significantly different ($P < 0.05$). There was no significant difference between reciprocal group AB and reciprocal group BA. The heterosis value of the reciprocal cross was 8.44%. In the oxygen consumption rate, the highest one and lowest one were selfing group BB and reciprocal group AB, respectively. There was significant difference between AA and BB ($P < 0.05$). The heterosis value of the reciprocal cross was -43.87%. The oxygen consumption rate was negatively correlated with the glycogen content with the correlation coefficient -0.884 that was significantly different ($P < 0.01$). There was no significant difference for the ammonia excretion rate with 0.04 mg NH₃-N/(g·h) among all groups. In summary, the major differences among groups were water filtration rate and oxygen consumption rate. This study could provide important physiological metabolic germplasm reference for the breeding of high glycogen content line of *C. gigas*.

Key words *Crassostrea gigas*; High glycogen content line; Reciprocal cross; Physiological metabolism

① Corresponding author: YANG Jianmin, E-mail: ladderup@126.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20161226001

http://www.yykxjz.cn/

刘佳乐, 韦秀梅, 杨顶珑, 童童, 刘相全. 大竹蛭 β -整合素基因*Sg β Int*的特性分析和重组表达. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 120-127

Liu JL, Wei XM, Yang DL, Tong T, Liu XQ. Recombinant expression and characterization of the β -integrin gene of *Solen grandis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 120-127

大竹蛭 β -整合素基因 *Sg β Int* 的特性分析和重组表达*



刘佳乐^{1,2} 韦秀梅³ 杨顶珑³ 童童¹ 刘相全^{3①}

(1. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

3. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 整合素作为一种细胞粘附因子,在细胞粘附、迁移、增殖、凋亡和吞噬等过程中发挥重要作用。本研究利用分子克隆技术获得了大竹蛭(*Solen grandis*) β -整合素基因(*Sg β Int*)的 cDNA 全长,分析了其编码氨基酸序列的进化特点,并以 SWISS-MODEL 预测了氨基酸序列的三级结构。*Sg β Int* 基因序列全长为 1168 bp,5'和 3'非编码区(UTR)分别为 61 bp 和 18 bp,开放阅读框(ORF)为 1089 bp,编码 362 个氨基酸,理论等电点约为 4.98,分子量为 30.0 kDa。通过荧光定量 PCR 法检测了 *Sg β Int* 在健康大竹蛭各组织中以及大竹蛭受到脂多糖、肽聚糖和葡聚糖等微生物多糖刺激后的表达。结果显示, *Sg β Int* 在血细胞、鳃、肝胰腺、性腺、肌肉和外套膜等组织中均可表达,在鳃中的表达量最高;脂多糖、肽聚糖和葡聚糖都可以诱导 *Sg β Int* 表达量上调, *Sg β Int* 的表达量分别在脂多糖和葡聚糖刺激后的 3 h 和 48 h 达到最高;肽聚糖刺激后 *Sg β Int* 表达量上调幅度最大,在 6 h 时达到最高,证实 *Sg β Int* 参与大竹蛭抵御外源微生物的免疫应答。利用基因重组技术构建了 *Sg β Int* 的重组表达载体,为进一步分析软体动物整合素的功能、揭示大竹蛭先天性免疫机制奠定了基础。

关键词 大竹蛭;整合素;免疫应答;荧光定量 PCR

中图分类号 S968.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)01-0120-08

细胞粘附因子(Cell adhesion molecules)介导细胞与细胞之间以及细胞与细胞外基质之间的相互作用,参与信号传导、细胞间识别、细胞增殖和分化、炎症和伤口愈合等过程(Zhuang *et al*, 2008)。根据结构和功能的不同,细胞粘附因子分为整合素(Integrin)、钙粘素(Cadherin)、选择素(Selectin)、免疫球蛋白超家族(Ig-superfamily)和透明质酸粘素(Hyaladherin)五类。其中,整合素是一种由一个 α 亚单位和一个 β 亚

单位通过非共价键连接而成的异二聚体跨膜糖蛋白。目前,已经确认的有 18 种 α 亚单位和 8 种 β 亚单位,共组成 20 余种整合素(Jia *et al*, 2015)。大部分 α 亚基只结合一种 β 亚基,少数的如 α_v 亚基可以与不同的 β 亚基结合。由于不同的 α 亚基和 β 亚基的氨基酸序列存在不同程度上的同源性,使得它们在结构上有共同的特点。整合素在体内表达广泛,大多数细胞表面都可表达一种以上的整合素,在多种生命活动中发挥关

* 广西海洋生物技术重点实验室开放基金资助课题资助[This work was supported by Open Research Fund Program of Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology (GLMBT-201504)]. 刘佳乐, E-mail: liujlwz@163.com

① 通讯作者: 刘相全, 副研究员, E-mail: lxq6808@163.com

收稿日期: 2016-12-26, 收修改稿日期: 2017-01-14

键作用。脊椎动物的 Integrin 作为一种重要的粘附受体,首先在淋巴细胞表面发现,目前,对于 Integrin 发挥的免疫功能的研究已经比较深入。Integrin 细胞外的“头部”结构域可以结合配体,“颈部”是激活单位,而长度可变的细胞质内结构域形成细胞骨架起到链接信号分子的作用。此外,Integrin 蛋白是双向信号转导分子(Hynes, 2002; Schwartz *et al*, 1995),在调控免疫反应过程中也发挥必不可少的作用(Rose *et al*, 2002; von Andrian *et al*, 2003)。近些年的研究表明,Integrin 还参与肿瘤细胞粘附,比如,Integrin 在口腔癌前病变时,起串联受体的作用(Shahidul *et al*, 2010); Integrin 还被证明是人肠道弧菌病毒(Nelsen-Salz *et al*, 1999)、腺病毒(Wickham *et al*, 1993)、手足口病毒(Jackson *et al*, 2000)、乳头瘤病毒(Coulson *et al*, 1997)等多种病毒的受体。

在无脊椎动物中,果蝇(*Drosophila melanogaster*) Integrin 被研究得较为透彻,现已发现 3 个不同的 α 亚基(α PS1、 α PS2 和 α PS3)和 2 个 β 亚基,3 个位置特殊的 Integrin 异构体(PS1、PS2 和 PS3)与已被发现脊椎动物的 β 1-Integrin 最为相似(Relja *et al*, 2011; Stark *et al*, 1997; Yee *et al*, 1993),有研究表明,果蝇 β -Integrin 参与调控其血细胞吞噬细菌(Mamali *et al*, 2009)。在其他无脊椎动物中也相继发现了 Integrin,例如,在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)中克隆得到的 β -Integrin 基因,推测其参与血细胞介导的对大肠杆菌的包裹作用,相应的结构特征可能使其具有吞噬革兰氏阴性菌的能力(Moita *et al*, 2006);在海洋无脊椎动物中,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) β -Integrin 被认为是细胞膜上的对虾白斑综合征病毒(WSSV)受体(Li *et al*, 2007);中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) β -Integrin 作为细胞受体参与抗菌免疫(Huang *et al*, 2015);仿刺参(*Apostichopus japonicus*) β -Integrin 起到细胞凋亡抑制剂的作用(Wang *et al*, 2016)。与高等动物和模式动物相比,目前海洋无脊椎动物 Integrin 的研究尚处在起步阶段,有关贝类 Integrin 的报道十分有限。

本研究从前期已构建的大竹蛭(*Solen grandis*) cDNA 文库中克隆获得大竹蛭 β -Integrin (*Sg β Int*)基因的 cDNA 全长,分析了 *Sg β Int* 编码氨基酸的序列特征,通过荧光定量 PCR 法检测了 *Sg β Int* 基因的 mRNA 在健康大竹蛭不同组织中的表达谱,以及在大竹蛭受到脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)和葡聚糖(Glucan) 3 种不同病原相关分子(PAMPs)刺激后,血细胞中 *Sg β Int* 基因的响应规律,旨在了解 *Sg β Int* 基因在大竹蛭防御外源微生物的免疫应答中发挥的功能,为进一步阐释

无脊椎动物 Integrin 的结构和功能、丰富无脊椎动物先天性免疫学研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生大竹蛭捕取自山东省烟台周边海区,体长为 90 mm 左右,共 210 只,实验前在 20~22℃海水中暂养 7 d。取其中 10 只大竹蛭用于解剖获得组织,剩余的 200 只随机均分为 5 组,用于 PAMPs 刺激实验,LPS、PGN 和 Glucan 等 3 种 PAMPs 分别用 PBS(0.14 mol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 8 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, pH=7.4)溶解,终浓度分别为 0.5、0.8 和 1.0 mg/ml;以 50 μ l/只的剂量注射大竹蛭肌肉(Yang *et al*, 2011)。第 1~3 组分别注射 LPS、PGN、Glucan,第 4 组注射 PBS 作为阴性对照,第 5 组未作任何处理作为空白对照。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 模板的合成

解剖大竹蛭,取肌肉、外套膜、血细胞、性腺、肝胰腺和鳃等,加入 TRIzol (Invitrogen),存于-80℃。

PAMPs 注射后 3、6、12、24 和 48 h 分别从实验组和对照组中随机取 5 只大竹蛭,注射器吸取预冷的抗凝剂(0.1 mol/L 葡萄糖,13 mmol/L 柠檬酸,15 mmol/L 柠檬酸钠,0.45 mol/L NaCl,10 mmol/L EDTA, pH=7.0),抽取血淋巴,4℃ 800 g 条件下离心 5 min,收集血细胞,以 1 ml TRIzol 重悬,存于-80℃。

所有保存于 TRIzol 中的样品,按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 RNA,经 DNase I (Promega)降解 DNA,反应体系:RNA 8 μ l, RQ1 RNase-Free DNase 5 \times Reaction Buffer 2.5 μ l, RQ1 RNase-Free DNase 1 μ l, RNase 抑制剂 0.6 μ l,于 37℃反应 30 min;加入 1 μ l Stop solution,65℃ 10 min 灭活 DNase;加入 2 \times Oligo dT 2.5 μ l,70℃反应 5 min,冰浴 2 min。反应体系:5 \times M-MLV 反应缓冲液 6.5 μ l, RNase-Free dNTP 12.5 μ l, RNase 抑制剂 1.25 μ l, M-MLV 反转录酶 2.5 μ l, RNase-Free 水 1 μ l,42℃反转录 1 h,95℃ 5 min 灭活反转录酶。模板存入-80℃,用于荧光定量 PCR 分析。

1.3 *Sg β Int* 基因 cDNA 全长的克隆

在本研究前期工作构建的大竹蛭 cDNA 文库中,用 BLAST 分析获得 *Sg β Int* 基因的 EST 序列,将对应质粒转入 Trans5 α 感受态细胞(全式金)中,挑取单菌落,以 pBluescript II SK*载体的通用引物 M13F 和

M13R 对其进行重新测序。

1.4 *SgβInt* 基因的序列分析

在 <http://www.expasy.org/> 进行蛋白等电点和分子量预测；用 BLAST 软件进行序列同源性比较和相似性搜索；使用 SignalP 查找信号肽；使用 MEGA 4.1 软件，将 *SgβInt* 基因和家蚕 (*Bombyx mori*)、通讯鳌虾 (*Pacifastacus leniusculus*)、紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*)、双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*)、凡纳滨对虾、中华绒螯蟹、果蝇、冈比亚按蚊、仿刺参、鸭嘴海豆芽 (*Lingula anatina*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、瓜实蝇 (*Bactrocera cucurbitae*)、地中海实蝇 (*Ceratitis capitata*)、意大利蜂 (*Apis mellifer*)、华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)、粘虫 (*Mythimna separata*) 和大乳头水媳 (*Hydra magnipapillata*) 等 20 个物种的 β -Integrin 基因编码的氨基酸序列以邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树；使用 SWISS-MODEL 预测 *SgβInt* 基因编码氨基酸序列的三级结构，利用 pyMOL 软件展示。

1.5 荧光定量 PCR 检测

将 cDNA 模板稀释 100 倍，使用 Mastercycler ep realplex (Eppendorf) 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。反应体系 20 μ l：2 \times SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l、稀释 100 倍后的 cDNA 模板 2 μ l、正反引物各 1 μ l 和 6 μ l 水。*SgβInt* 的正向引物为 5'-AAGCGTGTCCGAGCAAATGTC-3'，反向引物为 5'-TGTGGGGAGGGGTAGGATAAT-3'；内参基因 β -actin 的正反向引物分别为 5'-TGTACGCCAACAC-TGTCCTGTC-3' 和 5'-CATCGTATTCCTGCTTGCT-GATC-3'。反应程序：50 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 10 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，60 $^{\circ}$ C 60 s，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析实验数据，以 *t* 检验分析显著性， $P < 0.05$ 为差异显著， $P < 0.01$ 为差异极显著。

1.6 *SgβInt* 基因重组载体的构建

PCR 反应扩增 *SgβInt* 成熟肽 DNA 序列，反应体系：菌液模板 1 μ l，10 \times Buffer 2.5 μ l，2.5 mmol/L dNTP 2 μ l，正反引物各 1 μ l，Taq 酶 1 μ l，DEPC 水补足至 25 μ l。重组正反引物分别为 5'-AACATGAGGTCCAT-GATAAACGG-3' 和 5'-TCATGTTGTAGTGTATGTC-TCACTGGTC-3'。反应条件：94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，62 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 80 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物 0.5~4.0 μ l；PEASY E1 Expression Vector (全式金) 1 μ l，混合后室温反应 5 min，将连接

产物加入 Trans-T1 (全式金) 感受态细胞中，42 $^{\circ}$ C 水浴热激 60 s；加入 LB 液体培养基，涂布平板，培养过夜。挑选单菌落由北京诺赛基因组研究有限公司测序。

1.7 *SgβInt* 基因重组蛋白的诱导表达

将测序结果正确的菌株使用 EZNA mini plasmid (Omega) 试剂盒按照步骤提取质粒转入 Transetta (全式金) 感受态细胞中，涂布平板，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落，加入含氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 培养基中，200 r/min、37 $^{\circ}$ C 震荡培养至 OD_{600 nm} 约为 0.6；加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达目的蛋白，37 $^{\circ}$ C 200 r/min 诱导培养 4 h；4 $^{\circ}$ C、5000 r/min 离心 10 min，收集菌体沉淀。以 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析诱导表达结果。

2 结果

2.1 *SgβInt* 基因 cDNA 的克隆及序列特点

测序结果拼接获得的 *SgβInt* 基因 cDNA 全长，提交至 GenBank 获得登录号 KX925404，其全长为 1168 bp，5' 和 3' 分别含 61 bp 和 18 bp 的非编码区 (UTR)，开放阅读框 (ORF) 为 1089 bp，共编码 362 个氨基酸，其中，在 42~74 位氨基酸和 103~135 位氨基酸处分别为 EGF like 和 EGF 结构域。同源性分析显示，*SgβInt* 与家山羊 (*Capra hircus*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的相似性最高，分别为 37% 和 36%；利用 SignalP 软件预测发现，*SgβInt* 基因编码区前 22 位氨基酸序列为信号肽序列 (图 1)。ExPASy 预测重组后的 *SgβInt* 基因编码蛋白的理论等电点约为 4.98，分子量大小为 30.0 kDa。

2.2 *SgβInt* 基因系统进化分析

使用 MEGA 4.1 软件的邻接法构建系统进化树，所用 Integrin 的 GenBank 登录号如下：家蚕 (NP_001161754.1)、通讯鳌虾 (CAA67357.1)、紫海胆 (XP_011679515.1)、双脐螺 (AF060203.1)、凡纳滨对虾 (ADK56123.1)、中华绒螯蟹 (AKJ26284.1)、果蝇 (AAC37169.1)、冈比亚按蚊 (AAM11657)、仿刺参 (AMR60824.1)、鸭嘴海豆芽 (XM_013560388.1)、小菜蛾 (GQ178290.1)、豌豆蚜 (XM_003244399.3)、长牡蛎 (EKC27174.1)、瓜实蝇 (XP_011182368.1)、地中海实蝇 (XP_004521716.1)、意大利蜂 (XP_006564503.1)、华支睾吸虫 (GAA31131.2)、粘虫 (BAJ16205.1)、大乳头水媳 (XP_002159375.2)。

用 MEGA 4.1 软件构建出 *SgβInt* 编码的氨基酸与


```

1  GCGATACGTTATATCAGCGTTTGTAAAGACATATCACAACTGAGACTCGTTCAA
1  M A Y E R L E F V L F I L M A F T A L T
61  GATGGCGTATGAGCGTTTGGAGTTTGTGTTTATATAATGGCGTTTACAGCTCTAAC
21  N G T V V S D F N M R S M I N G A L G S
121 GAATGGAACGTAGTAAGTGATTTAACATGAGGTCCATGATAAACGGGCGCTGGGTC
41  Y M C R G Q N G Q L C S G V G S C Y H G
181 ATACATGTGTGCGGACAGAACGGGAGCTGTGAGTGGGTCGGGAGTGTACCATGG
61  V C T C D I G Y I G R V C E F S T E N T
241 TGTCTGTACTTGTGATATTGGGTATATCGGCGGTGTTGCGAATTTAGCACCAGAAATAC
81  H D P T T T R E M T T T T E L V Q P D S
301 CCATGACCCTACAACCACACGGGAGATGACGACAACGACAGAATTGGTTCAGCCTGATAG
101 V I A C I G N N E G V C S G N G V C Q N
361 TGTATAGCCTGTATCGAAATAATGAAGGGTGTGTAGCGAAATGGTGTTCGCAAAA
121 G A C V C M P G W S G I V C E L Y Q A K
421 TGGCGCCTGTGTTGCATGCCGGGATGGTCTGGGATCGTATGTGAGCTCTACCAGGCTAA
141 G F C E T Y R A C A E C T A F M E A C P
481 GGGATTCTGCGAGAGTACAGAGCATGCGCAGAATGTACAGCATTATGGAAGCGTGTCC
161 S K C Q I M A D F Y L V F D F P S G S S
541 GAGCAAATGTCAAATCATGGCAGACTTTATCTCGTCTTCGATTTCCGTCGGAAAGTTC
181 T F H R C R G R S A S R R C S F Y Y Q L
601 AACCTCCACCGTGTGCGAGGAAGGAGTGCCAGTCCAGATGTCCTTTTATTACCAGCT
201 E S T S G S G G K Y I M V K T C L N Y P
661 TGAGAGTACATCAGAAAGTGGAGGAAATACATCATGGTCAAGACATGCTGAATTATCC
221 T P H M T S T V M S Y P N D G D V T T
721 TACCCTCCCATGACTAGCAGCGTGTGTCATATCCAAATGACGGTGACGTACCAC
241 T T E V I S T S T R V A M T T Q S S E
781 TACCACAGAGTTATATCTACATCCACAGCGTTGCTATGACAACACAACAAAGCAGTGA
261 I E T A N D H T T T M T S Y P D G A D
841 AATAGAACTGCAAATGATCACAACTACCACCATGACGTATACCCAGATGGCGCTGA
281 F T I A T E S T S S P V T M T T Q R T S
901 CTTACCATTGCCACAGAGTCTACATCTCGCCCGTTACTATGACAACACAACGGACCAG
301 E T Y T T T E I D G G R T D S V D I S V
961 TGAGACATACACTACAACAGAGATTGATGGTGGGCGCACTGACAGTGTGGATTTCTGT
321 Q D K S K G G A D S A S N R P T C S V A
1021 CCAAGATAAATCGAAAGGAGCGCGGATTCTGCTCCAATAGACCTACATGCAGTGTGC
341 C V I F N S L I G S L F F S R L L K Y I
1081 TTGTGTGATATTAATTCTCTGATTGGATCACTTTCTTTCTAGACTATTGAAATACAT
361 Q T *
1141 ACAAACCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *Sg β Int* 基因的核苷酸及其编码的氨基酸序列Fig.1 The nudeotide and deduced amino acid sequences of *Sg β Int*

黑体加粗表示起始密码子和终止密码子；下划线表示信号肽；阴影部分表示 Integrin 结构域。

The start and stop codons are marked in bold, the signal peptide sequence is underline and the Integrin is shaded.

20 个物种的 β -Integrin 基因编码的氨基酸序列的系统进化树, 结果显示, *Sg β Int* 编码氨基酸与长牡蛎 β -Integrin 编码氨基酸的亲缘关系最近, 二者构成软体动物分支(图 2)。

2.3 *Sg β Int* 编码氨基酸的三级结构预测

使用 SWISS-MODEL 预测 *Sg β Int* 中 EGF-like、EGF 和 Integrin- β -tail 三个结构域的三级结构, 由图 3 可以看出, *Sg β Int* 编码氨基酸的三维结构包括 1 个 α -螺旋和 9 个 β -折叠, α -螺旋靠近其中 3 个 β -折叠, 另外 6 个 β -折叠每 2 个形成 1 组。

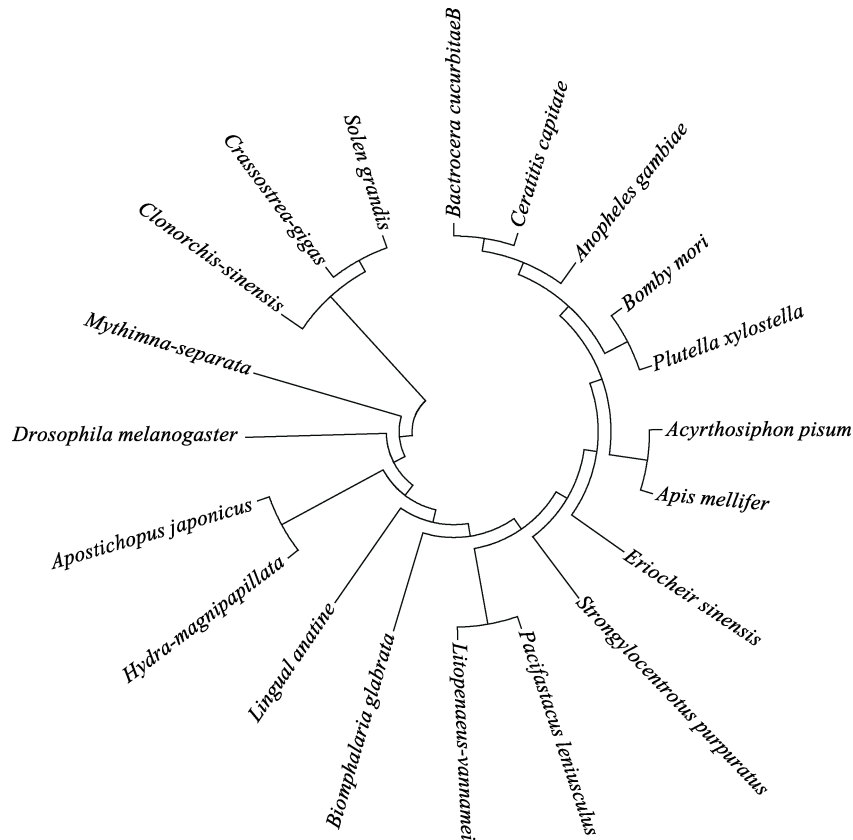
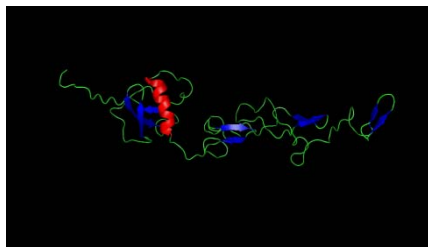
2.4 *Sg β Int* 基因的 mRNA 在健康大竹蛎各组织中的表达谱

运用荧光定量 PCR 方法检测了 *Sg β Int* 基因在健康大竹蛎不同组织中的表达规律, *Sg β Int* 基因在健康大竹蛎的各个组织中均有表达, 在鳃中表达量最高,

是性腺的 487.5 倍; 在肌肉、外套膜、血细胞和肝胰腺的表达量分别为性腺表达量的 105.7、28.3、21.0、14.9 倍; 在性腺中表达量最低(图 4)。

2.5 *Sg β Int* 基因的 mRNA 在大竹蛎受到 PAMPs 刺激后血细胞的表达规律

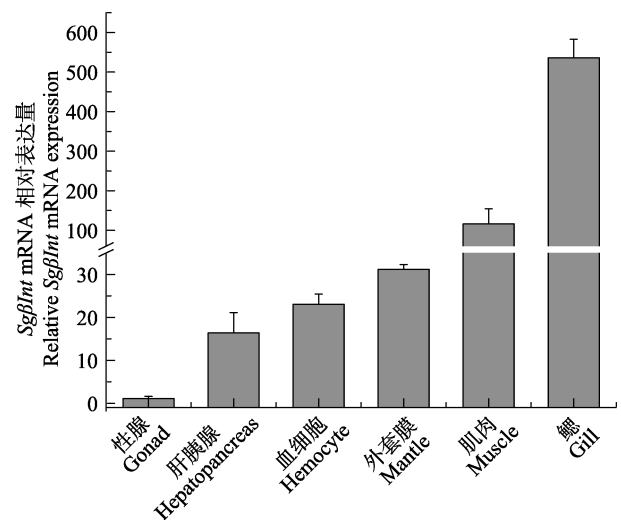
荧光定量 PCR 法检测 LPS、PGN 和 Glucan 刺激后大竹蛎血细胞中 *Sg β Int* 基因的表达规律, 结果显示, *Sg β Int* 基因的表达量在各种 PAMPs 刺激后均呈现上升趋势, 并且都在刺激后 3 h 表现出极显著升高。其中, 受到 LPS 刺激后, *Sg β Int* 基因表达量在 3 h 达到最高($P < 0.01$), 为空白对照的 4.8 倍, 随后逐渐降低, 在 12 h 达到最低($P < 0.01$), 为空白对照的 0.4 倍; PGN 刺激使 *Sg β Int* 基因的表达量上调幅度最大, 继在刺激 3 h 时上升为空白组的 10.8 倍后($P < 0.01$), 在 6 h 达到最高, 是空白对照的 35.3 倍($P < 0.01$), 随后显著降低; Glucan 刺激也能诱导 *Sg β Int* 基因的表达

图 2 *SgβInt* 与其他物种 β -Integrin 的系统进化树Fig.2 Phylogenetic tree based on *SgβInt* sequence with β -Integrin of other species图 3 *SgβInt* 蛋白的三级结构Fig.3 The predicted spatial structure of *SgβInt*蓝色: β -折叠; 红色: α -螺旋Blue: β -sheets; Red: α -helices

量出现上调, 在刺激 3 h 时为空白对照的 3.2 倍 ($P < 0.01$), 随后逐渐降低, 但与 LPS、PGN 刺激后的表达模式不同的是, *SgβInt* 在 24 h 时再次出现显著升高 ($P < 0.05$), 并在 48 h 达到峰值, 为空白对照的 44.1 倍 ($P < 0.01$) (图 5)。

2.6 *SgβInt* 基因在大肠杆菌中的重组表达分析

SDS-PAGE 分析对比诱导前后的 *SgβInt* 蛋白重组菌株, 诱导菌株的泳道明显看到诱导蛋白的条带, 重组蛋白的分子量大小约为 30 kDa, 与预测的结果相一致, 证明 *SgβInt* 基因编码蛋白被诱导表达 (图 6)。

图 4 *SgβInt* mRNA 在不同组织中的表达谱Fig.4 *SgβInt* mRNA expression level in different tissues

3 讨论

整合素是细胞膜上粘附因子的一种, 属于具有保守 $\alpha\beta$ 异构体的细胞表面受体大家族 (Hagen *et al.*, 2001)。高等动物的整合素 Integrin 已被证明可作为人肠道弧菌病毒、腺病毒、手足口病毒、乳头瘤病毒等多种病

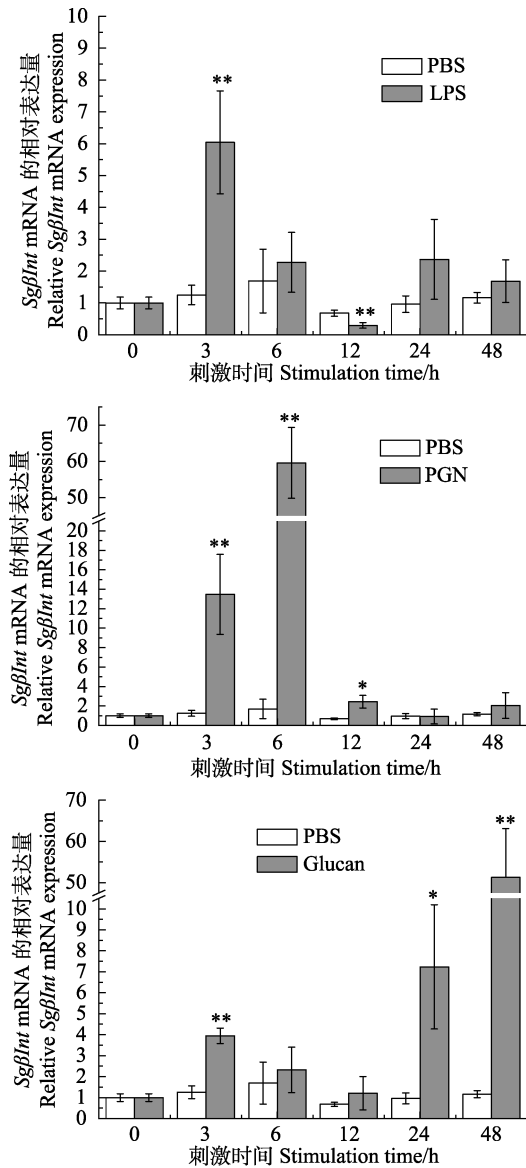


图 5 血细胞中 $Sg\beta Int$ mRNA 在 PAMPs 刺激后的表达水平

Fig.5 The $Sg\beta Int$ mRNA expression level in hemocytes after PAMPs stimulation

毒的受体。近几年,陆续有研究发现,无脊椎动物整合素 Integrin 也参与多种免疫反应。而有关海洋无脊椎动物整合素 Integrin 的研究还相对较少。本研究以大竹蛎为研究对象,克隆得到了 β -Integrin 基因的 cDNA 全长。通过 Blast 分析发现,该基因编码蛋白与家山羊和小鼠等脊椎动物的 β -Integrin 基因编码蛋白相似,而分析 $Sg\beta Int$ 基因编码蛋白的序列特点发现,在以邻接法构建的 $Sg\beta Int$ 与其他物种 β -Integrin 的系统进化树中, $Sg\beta Int$ 与长牡蛎 β -Integrin 构成了软体动物分支;并且其三级结构包括 1 个 α -螺旋和 9 个 β -折叠,与孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)和红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的 β -Integrin 基因编码蛋白三维

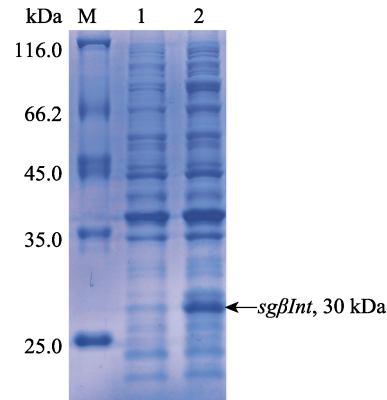


图 6 重组 $Sg\beta Int$ 的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of recombinant $Sg\beta Int$

M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导的重组 $Sg\beta Int$;

2: 诱导的重组 $Sg\beta Int$

M: Protein molecular standard; 1: Negative control for recombinant $Sg\beta Int$ (without induction);

2: IPTG induced recombinant $Sg\beta Int$

结构相似。综合以上分析结果, $Sg\beta Int$ 为 β -Integrin 家族成员。

仿刺参、长牡蛎、凡纳滨对虾等海洋无脊椎动物的 Integrin 基因具有组织分布广泛的特点,与以上报道类似,本研究发现, $Sg\beta Int$ 在所有检测组织中均有表达。组织表达谱广与 β -Integrin 在机体的生命活动中参与多种过程密切相关。但是,这些物种的 β -integrin 基因的组织表达谱存在差异,尤其是它们呈现高表达量的组织部位不同,如仿刺参 β -integrin 在肌肉中的表达量最高(Wang *et al*, 2016),而长牡蛎和凡纳滨对虾 β -integrin 则分别在性腺和血细胞中表达量最高(Lin *et al*, 2013; Jia *et al*, 2015)。 $Sg\beta Int$ 在鳃的表达量最高,由于鳃是大竹蛎用于滤食和气体交换的器官,与水环境直接接触,考虑到水环境中存在多种外源微生物, $Sg\beta Int$ 基因在鳃中的高表达暗示其可能在大竹蛎抵御外源微生物的过程中发挥重要作用。

为分析 $Sg\beta Int$ 是否参与大竹蛎抵御外源微生物的过程,本研究用 LPS、PGN 和 Glucan 等微生物多糖刺激大竹蛎,并检测血细胞中 $Sg\beta Int$ mRNA 的表达规律。微生物多糖 LPS、PGN 和 Glucan 是微生物表面某些共有的高度保守的分子结构,宿主细胞不能自主产生这些多糖,为微生物所特有,是微生物生存或致病必需的。LPS、PGN 和 Glucan 刺激都能诱导 $Sg\beta Int$ 在大竹蛎血细胞中的表达显著上调,揭示 $Sg\beta Int$ 参与大竹蛎抵御多种外源微生物的免疫过程。其中,PGN 和 Glucan 刺激后, $Sg\beta Int$ 的表达量上调最为显著,说明 $Sg\beta Int$ 可能更容易被革兰氏阳性菌和真菌诱导。中华绒螯蟹(Huang *et al*, 2015)和长牡蛎

(Jia *et al.*, 2015)的 β -Integrin 在受到 LPS 刺激后 6 h 时达到最高表达量,而本研究中,一方面 *Sg β Int* 的表达量在 3 h 时达到最高,大竹蛭 *Sg β Int* 对于 LPS 的响应时间早于中华绒螯蟹和长牡蛎 Integrin。另一方面, *Sg β Int* 在大竹蛭受到 PGN 和 Glucan 刺激后达到最高表达量的时间不一致,其对于不同微生物多糖的响应时间不同,推测其清除作用机制存在差异。

重组的基因编码蛋白是研究基因功能的有利工具。利用制备的重组蛋白,已有研究发现,中华绒螯蟹的 β -Integrin 可以包括凝集金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、大肠杆菌在内的多种细菌,并能够协助机体清除副溶血弧菌等致命菌(Huang *et al.*, 2015);而长牡蛎和仿刺参的 β -Integrin 都对 LPS 有较高的亲和力(Lin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016);构建 *Sg β Int* 编码蛋白的重组载体,为获得 *Sg β Int* 重组蛋白,制备抗 Integrin 重组蛋白抗体,进一步分析 *Sg β Int* 编码蛋白的功能提供了必要的实验材料。*Sg β Int* 编码蛋白对于外源微生物的作用方式还不明确,有待于进一步研究。

本研究中 *Sg β Int* 基因的克隆、特性分析及其重组载体的构建,揭示了 *Sg β Int* 基因的序列特点及其对于 PAMPs 的响应规律,为了解大竹蛭对外源微生物的免疫防御机理和进一步分析其作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 5389–5394
- Hagen HE, Kläger SL. Integrin-like RGD-dependent cell adhesion mechanism is involved in the rapid killing of *Onchocerca microfilariae* during early infection of *Simulium damnosum* s.l. *Parasitology*, 2001, 122(4): 433–438
- Huang Y, Zhao LL, Feng JL, *et al.* A novel integrin function in innate immunity from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(2): 155–165
- Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110(6): 673–687
- Jackson T, Sheppard D, Denyer M, *et al.* The epithelial integrin alpha-vbeta 6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2000, 74(11): 4949–4956
- Jia ZH, Zhang T, Jiang S, *et al.* An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 53(1): 253–264
- Li DF, Zhang MC, Yang HJ, *et al.* β -integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 2007, 368(1): 122–132
- Lin YC, Chen JC, Chen YY, *et al.* Characterization of whiteshrimp *Litopenaeus vannamei* integrin β and its role in immunomodulation by dsRNA-mediated gene silencing. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 167–179
- Mamali I, Lamprou I, Karagiannis F, *et al.* A β integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(7): 858–866
- Moita LF, Vriend G, Mahairaki V, *et al.* Integrins of *Anopheles gambiae* and a putative role of a new β integrin, BINT2, in phagocytosis of *E. coli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36(4): 282–290
- Myat MM, Rashmi RN, Manna D, *et al.* *Drosophila* KASH-domain protein Klarsicht regulates microtubule stability and integrin receptor localization during collective cell migration. *Developmental Biology*, 2015, 407(1): 103–114
- Nelsen-Salz B, Eggers HJ, Zimmermann H. Integrin alpha (v) beta3 (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty. *Journal of General Virology*, 1999, 80(9): 2311–2313
- Relja B, Meder F, Wang M, *et al.* Simvastatin modulates the adhesion and growth of hepatocellular carcinoma cells via decrease of integrin expression and ROCK. *International Journal of Oncology*, 2011, 38(3): 879
- Rose DM, Han J, Ginsberg MH. Alpha4 integrins and the immune response. *Immunological Reviews*, 2002, 186(1): 118–124
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 1995, 11: 549–599
- Shahidul A, Yamazaki M, Maruyama S, *et al.* Differential expression of perlecan receptors, α -dystroglycan and integrin β 1, before and after invasion of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2011, 40(7): 552–559
- Stark KA, Yee GH, Roote CE, *et al.* A novel alpha integrin subunit associates with betaPS and functions in tissue morphogenesis and movement during *Drosophila* development. *Development*, 1997, 124(22): 4583–4594
- von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *New England Journal Medicine*, 2003, 348(1): 68–72
- Wang ZH, Shao Y, Li CH. A β -integrin from sea cucumber *Apostichopus japonicus* exhibits LPS binding activity and negatively regulates coelomocyte apoptosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52: 103–110
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, *et al.* Integrins-alpha-v-beta-3 and alpha-v-beta-5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 1993, 73(2): 309–319
- Yang JL, Wang LL, Zhang Huan, *et al.* C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and

opsonization. PLoS One, 2011, 6(2): e17089
Yee GH, Hynes RO. A novel, tissue-specific integrin subunit, beta nu, expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. Development, 1993, 118(3): 845–858

Zhuang SF, Kelo L, Nardi JB, *et al.* Multiple α subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the Manduca immune system. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32(4): 365–379

(编辑 冯小花)

Recombinant Expression and Characterization of the β -Integrin Gene of *Solen grandis*

LIU Jiale^{1,2}, WEI Xiumei³, YANG Dinglong³, TONG Tong¹, LIU Xiangquan³^①

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai 536000;

2. College of Fisheries and Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Key Laboratory of Marine Ecological restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006)

Abstract Integrins are heterodimeric cell surface receptors that consist of α and β subunits to regulate cell adhesion, migration, proliferation, apoptosis and phagocytosis. The present study identified the β -integrin gene from *Solen grandis* (*Sg β Int*) and analyzed the characterization of its encoded protein. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method and the three-dimensional structure was predicted with SWISS-MODEL. The full-length cDNA of *Sg β Int* was 1168 bp, containing a 61 bp 5'UTR, 18 bp 3'UTR and an open reading frame (ORF) of 1089 bp that encodes a polypeptide of 362 amino acids with an estimated molecular mass of 30.0 kDa. The encoded protein of *Sg β Int* shared significant similarities with that in *Capra hircus* and *Mus musculus*. The phylogenetic tree indicated that *Sg β Int* had a close genetic relationship with *Crassostrea gigas* to form a mollusk branch. The three-dimensional structure of *Sg β Int* consisted of one α -helix and nine β -sheets as a member of integrin superfamily. *Sg β Int* expressed in all tested tissues, including mantle, gill, hemocyte, gonad, muscle and hepatopancreas, with the highest expression in gill which was 487.5 times higher than gonad. *Sg β Int* was induced by all the three pathogen associated molecular patterns (PAMPs) including LPS, PGN and glucan with the peak level at 3 and 48 h post LPS and glucan stimulation, respectively. *Sg β Int* expression reached the maximal level at 6 h post PGN stimulation with 53.5-fold induction. All the results revealed that *Sg β Int* might regulate the immune response of *S. grandis* to microorganism. This study shed new light on the research of β -integrin in mollusk and immune defense mechanism of *S. grandis*.

Key words *Solen grandis*; Integrin; Immune response; Real-time PCR

① Corresponding author: LIU Xiangquan, E-mail: lxq6808@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20161221001

http://www.yykxjz.cn/

沈淑芳, 朱玲, 李加琦, 薛素燕, 李阳, 陈琼琳, 毛玉泽, 庄志猛, 方建光. 魁蚶C型凝集素基因cDNA的克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 128-136

Shen SF, Zhu L, Li JQ, Xue SY, Li Y, Chen QL, Mao YZ, Fang JG. Molecular cloning and expression analysis of C-type lectin from *Scapharca broughtonii*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 128-136

魁蚶 C 型凝集素基因 cDNA 的克隆及表达分析*

沈淑芳^{1,2} 朱玲^{2①} 李加琦^{2,3} 薛素燕^{2,3} 李阳^{1,2}
陈琼琳^{1,2} 毛玉泽^{2,3} 庄志猛² 方建光^{2,3}



(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071)

摘要 通过 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆得到魁蚶(*Scapharca broughtonii*) C 型凝集素(C-type lectin, Sb-Lec1)基因, 该基因全长为 700 bp, 其中, 5'-UTR 为 29 bp, 3'-UTR 为 167 bp, 开放阅读框长度为 504 bp, 编码 167 个氨基酸, 包括长度为 23 个氨基酸的信号肽序列、129 个氨基酸的糖识别结构域(CRD)以及参与二硫键形成的 6 个半胱氨酸。预测蛋白分子量为 19.11 kDa, 理论等电点为 4.74。多序列比对结果显示, Sb-Lec1 基因 CRD 编码的氨基酸序列与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*) C 型凝集素的同源性分别为 38%~40%、34%~35%和 38%~39%, Sb-Lec1 基因编码的氨基酸序列与其他物种的凝集素基因具有相似的结构, 均含有形成二硫键的 4 个保守半胱氨酸。系统进化分析结果显示, 魁蚶先与贝类聚为一支, 再与脊椎动物聚在一起, 表明魁蚶 Sb-Lec1 基因在进化树上的位置与其传统分类所处位置一致。采用荧光定量 PCR 技术, 检测了 Sb-Lec1 基因在组织中的表达情况, 发现其在肝胰腺、血淋巴、鳃、外套膜、闭壳肌、斧足中均有表达, 其中, 肝胰腺表达量最高。同时, 分析了 Sb-Lec1 基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的 mRNA 表达量变化情况。结果显示, 与对照组相比, 菌刺激组 Sb-Lec1 基因 mRNA 在各检测组织中的表达量均显著上调($P<0.05$), 随着刺激时间的延长, 表达量呈先升高后降低的趋势。本研究表明, 魁蚶 Sb-Lec1 基因在机体免疫防御方面发挥重要功能。

关键词 C 型凝集素; 魁蚶; 鳃弧菌; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0128-09

C 型凝集素(C-type lectin)是最早发现的动物凝集素, 种类繁多, 几乎存在于所有的多细胞生物中 (Robinson *et al*, 2006)。作为固有免疫中一类重要的模式识别受体(PRR), 能够专一性地识别病原相关分子

* 国家自然科学基金委员会-山东省人民政府联合资助海洋科学研究中心项目(U1406403)、国家海洋局海洋公益性行业科研专项经费项目(201205031; 201305043)和国家贝类产业技术体系(CARS-48)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (NSFC)-Shandong Joint Fund for Marine Science Research Center(U1406403), National Marine Public Welfare Research Project (201205031; 201305043), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-48)]. 沈淑芳, E-mail: shenshufanga@126.com

① 通讯作者: 朱玲, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-12-21, 收修改稿日期: 2017-01-06

模式(PAMP), 与糖类可逆结合, 在病原菌入侵过程中参与“非己”识别, 并能激活一系列免疫防御反应, 从而吸附和凝集异物, 促进机体清除和杀灭异物(Tamplin *et al*, 1989; 张岷, 2010)。C 型凝集素具有钙离子依赖性, 它们均含有约 130 个氨基酸残基构成的糖识别结构域(Carbohydrate-recognition domain, CRD)(Drickamer *et al*, 1993)。每个 CRD 在空间上形成双环状结构, 4 个高度保守的 Cys 形成的 2 对二硫键保持了该结构的稳定性, 含有 4 个 Ca^{2+} 结合位点, 其中 Ca^{2+} 结合位点 2 与糖基特异性结合有关(Zelensky *et al*, 2005)。大多数 C 型凝集素可以与 D 型甘露糖(D-mannose)、D 型葡萄糖(D-glucose)这一类的 Man 型配体(Man-type ligands)或 D 型半乳糖(D-galactose)及其衍生物(Gal 型配体, Gal-type ligands)结合(Kolatkar *et al*, 1996), 在免疫识别方面发挥重要作用。

C 型凝集素作为凝集素家族中研究最多的一类, 越来越受到广泛的关注。近几年, 软体动物 C 型凝集素的研究越来越普遍, 对于其在免疫方面的功能研究越来越深入。目前, 已在皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*)(王圣, 2015)、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)(胡钰婷等, 2011)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)(Zhu *et al*, 2008)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(Wang *et al*, 2007)等软体动物中发现并克隆获得 C 型凝集素的全长序列。

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是一种大型海洋底栖经济贝类, 具有较好的市场前景和开发利用价值, 在太平洋西北部浅海区域广泛分布(唐启升等, 1994)。作为亚洲一种重要的经济贝类(Mao *et al*, 2013), 近几年由于过度捕捞、环境污染、海洋生态系统恶化、不健康养殖导致病害发生, 致使魁蚶资源减退(刘寒苗等, 2017)。魁蚶作为一种软体动物, 固有免疫是其抵御外界病原侵害的主要方式。迄今为止, 国内外对于魁蚶自身免疫系统组成、特点和功能的研究逐渐深入, 有关魁蚶免疫相关基因的报道越来越多, 如杀菌渗透性增强蛋白(BPI)和脂多糖结合蛋白(LBP)(Mao *et al*, 2013)、过氧化氢基因(CAT)(黄永欢等, 2016)、半乳糖凝集素(SbGal)(郑利兵等, 2015)、大防御素(SbBDef1)(Li *et al*, 2012)、锰超氧化物歧化酶(SbMnSOD)(Zheng *et al*, 2015)、铁蛋白(SbFer)(Zheng *et al*, 2016)等基因, 另外, 血细胞作为魁蚶的重要免疫部位, 对其分类和免疫作用也有研究(周丽青等, 2013)。然而, 对魁蚶凝集素的研究几乎空白, 因此, 深入开展魁蚶凝集素相关的研究, 可以丰富魁蚶免疫系统, 为进一步研究魁蚶的免疫防御机制提供材料。

本研究在魁蚶转录组文库的基础上, 筛选得到魁

蚶 C 型凝集素 Sb-Lec1 基因, 运用 RACE 技术扩增得到 cDNA 全长, 同时, 运用实时荧光定量 PCR 技术检测该基因在魁蚶中的组织表达情况及其在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后的表达响应情况, 探究该基因在魁蚶免疫应答方面的作用, 从而为魁蚶病害防治以及育种提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用魁蚶购自山东省莱州市长渔水产有限公司。壳长约为 60 mm, 于 25℃ 实验室充气暂养, 暂养约 1 周后开始实验, 期间投喂螺旋藻, 实验处理前 2 d 停止投喂。鳃弧菌为本实验室保存的菌种。

1.2 魁蚶 C 型凝集素全长的克隆

1.2.1 总 RNA 的提取 Trizol(TaKaRa, 日本)法提取总 RNA: 解剖组织, 用研磨棒充分研磨后, 12000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液, 加入 200 μl 氯仿, 剧烈震荡 3 min, 静置后, 离心 15 min。取上清液 400 μl , 加入相同体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, -20℃ 沉降核酸。75%乙醇洗涤核酸, 干燥后, DEPC 水溶解核酸, 用 DNase(Progema, 美国)去除基因组 DNA。1.0% 琼脂糖检测 RNA 完整性, 核酸分析仪(Eppendorf)检测其纯度和浓度。

1.2.2 基因全长的克隆与测序 根据获得的魁蚶 C 型凝集素的部分序列, 设计特异性引物用于扩增 Sb-Lec1 基因的全长。利用载体上的通用引物 T7 与特异性引物 Sb-Lec1-F1 扩增 Sb-Lec1 基因的 3' 末端, 用 pBluescript SK(+/-)载体上的通用引物 T3 与特异性引物 Sb-Lec1-R1 扩增 Sb-Lec1 基因的 5' 末端(表 1)。具体步骤: 扩增体系为 25 μl , 内含 cDNA 模板 1.0 μl , 10×PCR Buffer 2.5 μl , 1.5 μl of MgCl_2 (25 mmol/L), dNTPs Mixture(2.5 mmol/L) 2.0 μl , 正向引物、反向引物各 1.0 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), Taq 酶(1U) 0.2 μl , ddH₂O 15.8 μl ; 3'RACE 反应程序: 94℃ 30 s, 57.5℃ 30 s, 72℃ 30 s, 33 个循环, 5'RACE 反应程序为 94℃ 35 s, 57℃ 35 s, 72℃ 35 s, 32 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, 将目的条带切胶回收、纯化。纯化获得的片段与 pMD18-T 载体连接, 连接产物转化到感受态细胞 TOP10 中。获得的阳性克隆子经菌液 PCR 鉴定后, 由青岛海大蓝科公司测序。

1.2.3 基因序列分析、同源比对及进化分析 将筛选拼接得到的魁蚶凝集素基因全长序列, 利用 NCBI

表 1 引物序列
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Name of primer	序列 Sequence(5'~3')	作用 Purpose
Sb-Lec1-F1	CTGGTAAACCACATAGCCGA	3' Race PCR
Sb-Lec1-R1	TCGTTAGCGTCGTTTATTTC	5' Race PCR
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	3' Race-PCR
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	5' Race-PCR
β -actin-F	TTGGACTCGGGTGATGGT	β -Actin PCR
β -actin-R	TCTCGGCTGTGGTGGTGA	β -Actin PCR
qSb Sb-Lec1-F2	GCCTGCTGGTCTTGGTATTGTTT	RT-PCR
qSb Sb-Lec1-R2	TCGTTAGCGTCGTTTATTTCGG	RT-PCR

的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)程序进行开放阅读框分析, 预测编码氨基酸序列; 利用 ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)对 C 型凝集素分子量(Mw)及理论等电点 pI 进行预测; SignalIP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)查找 C 型凝集素信号肽; SMART (<http://www.expasy.ch/SMART>)进行蛋白质结构域分析; ExPASy PROSITE(<http://prosite.expasy.org/>)查找形成二硫键的半胱氨酸。用 NCBI 的 Blastp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)对序列进行同源检索, 选取不同物种的 C 型凝集素氨基酸序列, 用 DNAMAN8.0 软件与魁蚶 Sb-Lec1 氨基酸序列进行同源性比对分析, 在此基础上用 MEGA6.0 构建系统发育树。

1.3 魁蚶 C 型凝集素基因对鳗弧菌刺激的反应

1.3.1 鳗弧菌刺激 将魁蚶个体随机分为对照组和处理组, 为鳗弧菌刺激实验做准备。鳗弧菌用 LB 液体培养基重悬后, 扩大培养, 培养至 $OD_{600\text{nm}}=0.4$ ($1\text{ OD}=5\times 10^8\text{ CFU/ml}$)(郑利兵等, 2015), 取一定体积的菌液离心后取沉淀, 用同体积的 PBS 悬浮沉淀备用。用微量注射器向处理组个体的前闭壳肌处注射 50 μl 菌悬液, 然后放回原养殖槽内。分别在注射后 0、2、4、8、12、24、48、72 h, 随机选取 4 个个体解剖, 取血(4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 15 min, 收集血细胞沉淀)、外套膜、闭壳肌、斧足、鳃、肝胰腺, 用于提取总 RNA, 对照组注射等量的 PBS(0.1 mol/L, pH=7.4), 每个时间点取 4 个个体作为对照。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 为了检测魁蚶凝集素基因的组织分布以及其在鳗弧菌刺激下的响应状态, 将解剖获得的各种组织提取总 RNA, 根据 PrimeScriptTM RT reagent kit (TaKaRa, 日本)试剂盒反转录得到的 cDNA 作为进行 qRT-PCR 的模板。根据获得的魁蚶 C 型凝集素全长, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物 qSb Sb-Lec1-F2、qSb

Sb-Lec1-R2(表 1), β -actin 作为内参基因, 运用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行实验, 反应参照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM(TaKaRa, 日本)试剂盒说明书进行。反转录体系为 20 μl : SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (2 \times), 10 μl ; PCR 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μl ; PCR 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μl ; ROX Reference Dye II (50 \times), 0.4 μl ; cDNA 模板, 2.0 μl ; DEPC 水, 6.8 μl , 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。实验设置 4 个平行组。反转录产物置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.3 实验数据分析 根据软件获得的每个反应的 C_T 值, 对实验结果进行统计分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法(Livak *et al.*, 2001)进行。根据每个样品的 4 个平行实验所得的数据计算相对表达量平均值和标准差。

2 结果

2.1 Sb-Lec1 基因 cDNA 序列分析

运用 PCR 和 RACE 技术扩增 Sb-Lec1 基因 3'、5'端, 经过拼接, 该基因的全长为 700 bp, 其中 5'-UTR 为 29 bp, 3'-UTR 为 167 bp。开放阅读框(Open reading frame, ORF)长度为 504 bp, 编码 167 个氨基酸, 预测的分子量为 19.11 kDa, 理论等电点为 4.74, 其起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, polyA 加尾信号为 AATAAA(图 1)。

信号肽预测结果显示, 该氨基酸序列第 1~23 个氨基酸为其信号肽序列, 运用 Smart 预测蛋白质的结构域, 结果显示, 第 2~155 个氨基酸为魁蚶 C 型凝集素的糖识别结构域(CRD), 该 CRD 含有的参与二硫键形成的 6 个半胱氨酸, 分别位于 Cys27、Cys38、Cys56、Cys129、Cys146、Cys154, 其中, Cys56、Cys129、Cys146、Cys154 为其保守的半胱氨酸, 分别在 Cys56 和 Cys154、Cys129 和 Cys146 之间形成 2 个二硫键。在 CRD 区域中具有决定糖结合的特异

性序列为“EPN”和“WND”(图 1)。

```

1          TGTTTAAGCAACAGGAATCCATTTTAAAA
30 ATGCGTATAACTACAAATACACTGATATCAAGCCTGGTCTTGGTATTGTTCAATGTT
1  M R I T T N T L I S S L L V L V L F N V
90 TGTTTGTCAGCGCCTGAGTGCATGATGGATGGACAAGGTCGCGAGTCTTGTGTACCTT
21  C L S A P E C H D G W T R F A S S C Y L
150 CTGGTAAACCACATAGCCGAGGATGGGACAAGCGGAGAATTATTGCAAGTATTATGGC
41  L V N H I A E G W G Q A E N Y C K L F G
210 GGTATTGTCGCGAAATAAACACGCCTAACGAAACAACTATGTAACAAAATGGTTGTCA
61  G Y L A E I N D A N E N N Y V T K W L S
270 GGGCAACATCTCACAGTTCACCTGTGGATTGGCGAAATGACGTAGAAGCAAAGCGCTC
81  G Q H L T V P L W I G G N D V E A K G V
330 TATGTATGGACTAGTAGTCATCAGATTTTGTAGTTTACAACCTGGTACCCCGTGAACCC
101 Y V W T S S H Q I F E F T N W Y P G E P
390 AATGATGTGAACCACTCAGAAGACTGCATAGCTATGTACACAGAGATATAATTTTACA
121 N D V N H S E D C I A M Y T E I Y N F T
450 TGGAAATGATTATATATGCACCCGCAAAAACAACCTTCATCTGCGAAAATCATCCAAAAGTC
141 W N D Y I C T R K N N F I C E N H P K V
510 GAAGTCGATACAATATTGGATGAAGACAATTCGCTTCAGCTTGTACGACATTTAAAAAG
161 E V D T I I G *
570 ATAAATGAAAATGAATATTCAAATTCAAAGAAGCTTGGACTGTATCTTTAAAAGACAAA
630 ATTATGTTTCAATGTATAAATAAAGACTTTGTAACAAAACAAAGTAAATGTAATAAAAAA
690 AAAAAA

```

图 1 魁蚶 Sb-Lec1 基因全长 cDNA 及推测的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of Sb-Lec1 gene of *S. broughtonii*

下划线部分表示信号肽序列, 终止密码子用星号标出; 结构域用波浪线标出, 阴影部分为 Sb-Lec1 的 6 个半胱氨酸, 带框的氨基酸序列为糖结合位点, polyA 信号序列

AATAAA 用双下划线标出

The putative signal peptide is underlined. The asterisk (*) indicated the stop codon. The carbohydrate-recognition domains (CRD) were wave-underlined and six conserved disulfide-bonded cysteine residues that define the CRD were indicated by shadow.

The sugar binding sites were enclosed in a box. PolyA signal AATAAA was double underlined

2.2 Sb-Lec1 基因 cDNA 同源分析

运用 NCBI 将拼接得到的 Sb-Lec1 基因 CRD 编码氨基酸序列进行同源分析。结果显示, 魁蚶 Sb-Lec1 基因 CRD 编码的氨基酸序列与其他物种具有一定的相似性, 例如, 与海湾扇贝(FJ469995、FJ469996)相似性分别为 39%、38%, 与紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*) (KP125900、KP125901)相似性分别为 34%、35%, 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (XM_011438591、XM_011452629、XM_011450108)的相似性分别为 40%、41%、38%, 与九孔鲍(*Haliotis diversicolor*) (JN314432)的相似性为 38%, 与皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*) (EF103335)的相似性为 36%, 与文昌鱼(*Branchiostoma floridae*) (XM_002613005.1)的相似性为 35%, 与网纹鲷(*Poecilia*

reticulata) (XM_008414919)的相似性为 33%, 与家蝇(*Musca domestica*) (XM_011296834)的相似性为 41%。

DNAMAN 软件将 Sb-Lec1 基因与上述物种 C 型凝集素基因进行序列比对(图 2), 结果显示, Sb-Lec1 基因所编码的氨基酸序列与其他物种的凝集素基因具有相似的结构, 如都含有形成二硫键 4 个保守的半胱氨酸, 糖结合位点几乎都具有独特的“WND”和“EPN”结构。用 Mega 6.0 软件以邻位相接法(NJ 法)构建基因系统 Sb-Lec1 进化树, 在该系统进化树中, 魁蚶先与海湾扇贝、长牡蛎、九孔鲍、紫贻贝、菲律宾蛤仔等软体动物聚为一起, 再与文昌鱼、网纹鲷、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)几种鱼类聚在一起(图 3)。

2.3 Sb-Lec1 基因组织分布

以 β -actin 作为内参, 检测 Sb-Lec1 基因在不同组织中的表达(图 4)。结果显示, Sb-Lec1 基因在肝胰腺、血细胞、鳃、斧足、闭壳肌、外套膜 6 种组织中均有表达, 且表达量存在差异。Sb-Lec1 基因在肝胰腺中表达量最大, 为闭壳肌的 21.92 倍($P < 0.05$), 其次是在血细胞中, 其表达量为闭壳肌的 8.40 倍($P < 0.05$)。

2.4 Sb-Lec1 基因在鳃弧菌感染后的表达响应

运用 qRT-PCR 检测魁蚶血细胞、肝胰腺、外套膜、闭壳肌、鳃、斧足 6 种组织中的 Sb-Lec1 基因对鳃弧菌刺激后的响应(图 5)。结果显示, 鳃弧菌刺激后, Sb-Lec1 基因在 6 种组织中的表达量较对照组均呈现出明显上升的趋势。以对照组 Sb-Lec1 基因的表达量为基准, 鳃弧菌刺激 2 h 后, 肝胰腺、血细胞中的表达量明显高于对照组, 分别为对照组的 4.67 倍和 11.53 倍; 而在鳃和斧足中, 8 h 的表达量出现明显的上升趋势, 分别为对照组的 4.50 倍和 2.83 倍; 在闭壳肌中, 刺激 2 h 就开始出现表达量显著升高的现象, 在 4 h 时达到最高, 为对照组的 9.55 倍; 在外套膜中, 刺激 4 h 时的表达量明显升高且达到最大值, 为对照组的 19.55 倍, 随后各组织表达量均出现回落现象。由此可见, 经鳃弧菌刺激后, Sb-Lec1 基因在各组织中的表达量表现为先升高后降低的变化趋势。

3 讨论

由于无脊椎动物缺乏类似于脊椎动物的获得性免疫系统, 只有依靠固有免疫来防止病原的感染, 以维持机体的正常生命活动。C 型凝集素作为固有免疫系统重要的体液免疫因子, 参与固有免疫的多种途径, 包括抗原的识别与清除(张焜, 2010), 在 Ca^{2+} 存

<i>M.galloprovincialis-1</i>	-----MLFLDL-----TKFLLLAVILP----SYVEGAC	24
<i>M.galloprovincialis-2</i>	-----MKSVM-----CVTLFLVLTV----DSVHSIC	21
<i>P.reticulata</i>	-----MASVHYL-----ALLLSLSCVLWNGADAACDCSC	29
<i>B.floridae</i>	-----C	1
<i>M.domestica</i>	-----MVKH-L-----WSALSILCVAT----LMAEAAI	23
<i>H.diversicolor</i>	-----MKTV-LE-----YLAFLSAFVLV----TGQYGTG	24
<i>H.discus</i>	-----MI-----LYIFLAVCFIS----NTAEGFC	20
<i>A.irradians-2</i>	-----MYTV-RV-----SLVFVTLG-----FQVAFGC	21
<i>A.irradians-1</i>	MELQSLFLWIF-FLSGIEGTYFHGVEFNA-----TQRASTC	35
<i>S.broughtonii</i>	-----C	1
<i>C.gigas-2</i>	-----MRIV-LI-----TSFILGTV--L-----SQPAPC	21
<i>C.gigas-1</i>	-----MPYL-TG-----SLFFLGIV--Y-----AVNSQGC	22
<i>C.gigas-3</i>	-----MWCS-LL-----GLILSTIV--I-----SVNAQGC	22
<i>M.galloprovincialis-1</i>	QPG I IHFKTSCYYFSTN--SLN QQ STD KGRSAQ VSV	62
<i>M.galloprovincialis-2</i>	PFG I IRFSSSCYLFHRS--LST ID STY RSHGAH ATV	59
<i>P.reticulata</i>	PTG S QYGKRCFLFQNT--QKD AS ERT NDFGAN ASI	67
<i>B.floridae</i>	SLG S KYGVCVCFRAFTG--SVD AG KAA RTKGGR AMP	39
<i>M.domestica</i>	NDK HNLGDFGTIFVEEQKYN FE WEE AMRNMT IDI	63
<i>H.diversicolor</i>	PAG A SYSESCYKMFPL-A-AT PE AVF KTFGGK AMI	62
<i>H.discus</i>	QDR I QFGDSCYGLIED-D-EG AQ KYL ESRDTH VTI	58
<i>A.irradians-2</i>	PDG S EFDGSCYSVQSQ-E-LN MD MDA HKAHSY VEI	59
<i>A.irradians-1</i>	RVG T RYQNSCYLFVVSQ-EKED AE HYH GVLHGY ADI	74
<i>S.broughtonii</i>	HDG T RFASSCYLLVNH-IAEG GQ ENY KLFGGY AEI	40
<i>C.gigas-2</i>	PHG V NRGSSCYAFITD-APDG TE EFY NLMHSR VEI	60
<i>C.gigas-1</i>	RDG L HHGNSCYAFIDA-EPDG IE MFY SSVGAK VEI	61
<i>C.gigas-3</i>	PGG L HHGSSCYAFIDS-EPDG LE MFF SSVKAK VEI	61
<i>M.galloprovincialis-1</i>	DTSQENGF AEEVARVG----GSF FDGT QDTEGT I	97
<i>M.galloprovincialis-2</i>	QSGSEKDF N GMIQNMP----GQY LDGV DAAEGI E	94
<i>P.reticulata</i>	HDNNEHDF K KLVKTET--GSFQRT VGGH AEKEGV L	105
<i>B.floridae</i>	KDRNTNDF V RLKNGN--SRSVPA IGLN ISHEGR V	76
<i>M.domestica</i>	DTAEKNTI D KVLRNPF--EKCPNL LGGN LGLEGK V	101
<i>H.diversicolor</i>	TDQQEQTF E NYINGLHNSHLTLDI LGGT LLVNQE M	102
<i>H.discus</i>	ESAAENDF K SYARKQ--AVVTDV IGAS IWAEGR R	95
<i>A.irradians-2</i>	GSKKENDF E H-LTGQ--KQDEIF LGGS AVVEDH R	95
<i>A.irradians-1</i>	LDADESTF K TELQRR--HASGCF IGAT VELDQG L	111
<i>S.broughtonii</i>	NDANENNY T KWLSSGQ--HLLVPL IGGN VEAKGV V	77
<i>C.gigas-2</i>	ETAVEDEF R LHLIDS--KATGSF IGLT I LVEGV V	97
<i>C.gigas-1</i>	ETESENNF K RHLQITIG-AT--KNY IGLS AIKEGR V	98
<i>C.gigas-3</i>	ETESENTF K RHLQAIG-TPHNSSY IGLS I IQEGT V	100
<i>M.galloprovincialis-1</i>	ASSKE--LFDFTA LPHE SNYE----KNED LMTQK---	128
<i>M.galloprovincialis-2</i>	ASTGE--KISNNL YPGE NRSS----PLED MDTST---	125
<i>P.reticulata</i>	SDGSK--FDYNK SSGQ DNTG----SNEH LAINY---	135
<i>B.floridae</i>	EDGHVLWPRQFAD APGE NNMPVGH--GD VKIEKANI	113
<i>M.domestica</i>	SSTGK--RFEFNS SKGQ DNYK----SNEH VHYYT---	132
<i>H.diversicolor</i>	TNTLD--RVKYSN KPGE NNVGSGSSVTED LALMT---	137
<i>H.discus</i>	VGSDT--NVTFTD NAGE NGIS----DDEN AELEN---	126
<i>A.irradians-2</i>	MSEYQ--TFNYTN YQDE NNLD----QGES IAAVH---	126
<i>A.irradians-1</i>	TNTDD--PVLTYD GNGE NGDI----AEN ICLHD---	141
<i>S.broughtonii</i>	TSSHQ--IFEFTN YPGE NDVN----HSED IAMYT---	108
<i>C.gigas-2</i>	MSTQT--IAQYTN WPGE NNRN----I-ED AV-ST---	126
<i>C.gigas-1</i>	QTTQD--NVDYTD APGE NDDH----HTED AELFQ---	129
<i>C.gigas-3</i>	QTTQQ--RPDFAD GSDE NDLD----HNED IELYQ---	131
<i>M.galloprovincialis-1</i>	--GYNGQ N NYA YHSIQFI EHASNDP-----PVG---	157
<i>M.galloprovincialis-2</i>	--YNGNL N EE NYDHYSI EKPH-----148	148
<i>P.reticulata</i>	--EDPTYL N AP TFKYVSI AKNA-----159	159
<i>B.floridae</i>	LSAYANR R YI SGHLGFI EK-----136	136
<i>M.domestica</i>	--ITDFE N AP TSKMGFI EENRFLREARRDLQIKKNF	170
<i>H.diversicolor</i>	--SDNYE N AP TDRMYFL EKELDSN-----PIG---	166
<i>H.discus</i>	--SVDYL N DE TKQQHFM ETRFLSV-----VVG---	155
<i>A.irradians-2</i>	--SASRFE R YH EDQNKFI EMRGG-----WM-VVG---	157
<i>A.irradians-1</i>	--NHQFR V VK NRDFSFI KMRLTEPG--PD-VIG---	173
<i>S.broughtonii</i>	--EIYNFT N YI TRKNNFI E-----129	129
<i>C.gigas-2</i>	--GSLFH N VS SSKCNFI EKESHGE--EN-VIG---	157
<i>C.gigas-1</i>	--PFSFH N AP SVKSNFI EKTLTES--ID-IIG---	160
<i>C.gigas-3</i>	--MKNFH N AP SVKSRFI EITLDGD--SG-ILGK--	163

图 2 不同物种 C 型凝集素氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of C-type lectin from different species

各物种 GenBank 登录号为海湾扇贝 1(FJ469995), 海湾扇贝 2(FJ469996), 紫贻贝 1(KP125900), 紫贻贝 2(KP125901), 长牡蛎 1(XM_011438591), 长牡蛎 2(XM_011452629), 长牡蛎 3(XM_011450108), 九孔鲍(JN314432), 皱纹盘鲍(EF103335), 文昌鱼(XM_002613005), 网纹鲷(XM_008414919), 家蝇(XM_011296834)。

黑色背景表示相同的氨基酸, 灰色表示性质相似的氨基酸, 保守的半胱氨酸用三角形标出

*A. irradians*1(FJ469995), *A. irradians*2(FJ469996), *M. galloprovincialis*1(KP125900), *M. galloprovincialis*2 (KP125901), *C. giga*1(XM_011438591), *C. giga*2(XM_011452629), *C. giga*3(XM_011450108), *H. diversicolor* (JN314432), *H. discus discus*(EF103335), *B. floridae*(XM_002613005), *P. reticulata* (XM_008414919), *M. domestica*(XM_011296834)。

The identical amino acids were shown with black shadow and the similar amino acids were indicated by gray shadow.

The cysteines constituting disulfide bonds in the structure domain acids were marked with black triangle "▲"

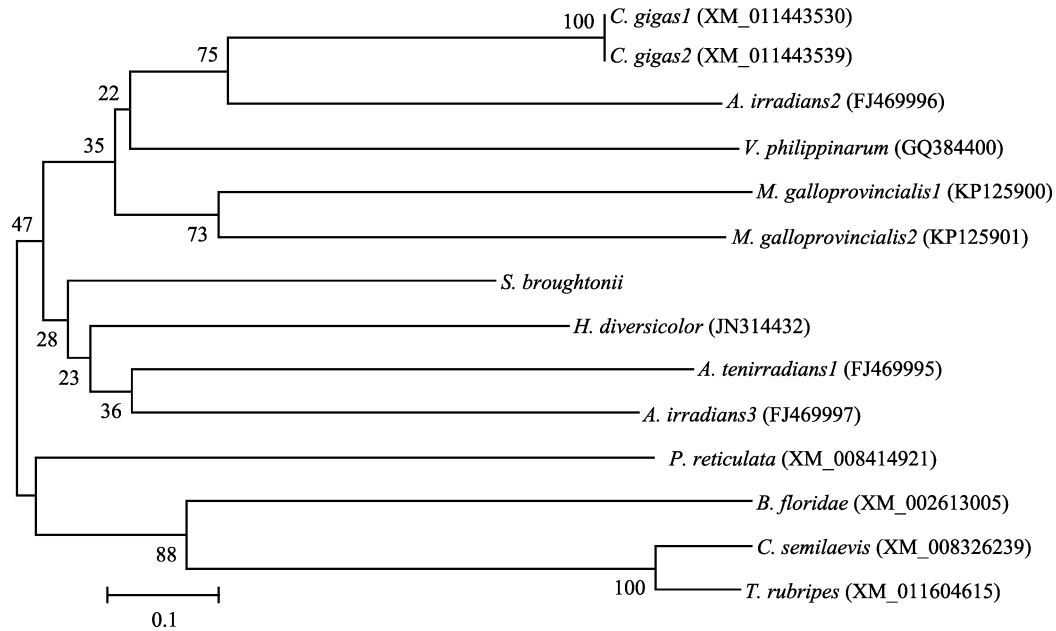


图 3 NJ 法构建 Sb-Lec1 基因系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of Sb-Lec1 gene constructed by Neighbor-Joining method

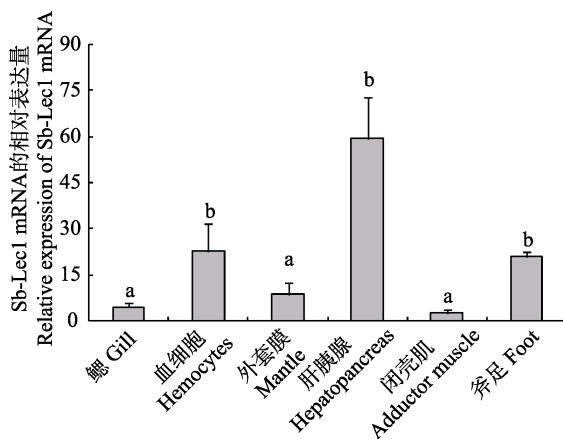


图 4 Sb-Lec1 mRNA 在不同组织中的表达分布

Fig.4 The expression of Sb-Lec1 mRNA in different tissues of *S.broughtonii*

不同字母表示组织之间 Sb-Lec1 基因表达量差异显著 ($P<0.05$)。数据以平均值 \pm 标准差($n=4$)表示,下同
Significant differences among tissues were indicated with different alphabets at $P<0.05$.

Values were shown as Mean \pm SD ($n=4$), the same as below

在下能够特异性识别病原微生物表面的糖类物质,引起一系列免疫反应,从而有效地清除入侵的病原微生物(邢建晓等, 2016),在软体动物尤其是贝类中得到广泛研究。本研究在以前研究的基础上,将魁蚶作为对象,对其免疫相关基因研究进行补充,通过构建魁蚶高通量测序转录组文库,并利用 RACE 技术获得了魁蚶 Sb-Lec1 基因全长 cDNA;检测了其 mRNA 在魁

蚶中各组织的分布情况和在外源微生物刺激下表达量的变化,对探讨 C 型凝集素在固有免疫防御中发挥的作用具有重要意义。

结构分析显示,Sb-Lec1 基因含有 1 个由 23 个氨基酸构成的信号肽序列,说明该 C 型凝集素基因编码的蛋白质是通过经典的分泌方式分泌到细胞外起作用。Sb-Lec1 含有 1 个 CRD,具有丰富的二硫键,这与许多贝类 C 型凝集素的结构相似,如文蛤(*Meretrix meretrix*)Mm-Lec1 和合浦珠母贝 Po-Lec1 序列中也包含 1 个 CRD 和 6 个保守的半胱氨酸(胡钰婷等, 2011; 李猛等, 2015),而栉孔扇贝 C 型凝集素基因 Cflec-3 和 Cflec-4 中分别含有 3 个和 4 个 CRD,海湾扇贝 AiCTL-6 中含有 1 个 CRD(张岷, 2010)。在 C 型凝集素中,一般含有 EPN 基域和 WND 基域与 Ca^{2+} 共同作用完成对糖基分子的结合(胡钰婷等, 2011),Sb-Lec1 含有参与糖基特异性识别的基序 EPN 和 WND,EPN 可以对甘露糖进行识别,且仅在胶原凝集素和选凝素中存在(陈政良等, 1997)。所以,Sb-Lec1 有可能是一种胶凝集素或选择凝集素,而 WND 基序一般只在脊椎动物中有高保守性(胡钰婷等, 2011)。研究发现,文蛤 Mm-Lec1 中含有糖基化位点 QPN,可识别半乳糖(李猛等, 2015),而海湾扇贝 AiCTL-6 中含有 1 个 EPD 基序,栉孔扇贝 Cflec-5 含有的基序为 EPN(张岷, 2010),这些基序与 Ca^{2+} 共同作用参与对糖类的识别,在魁蚶 Sb-Lec1 基因中含有 WND 的特殊性,可能与物种的差异有关,有待进一步研究。

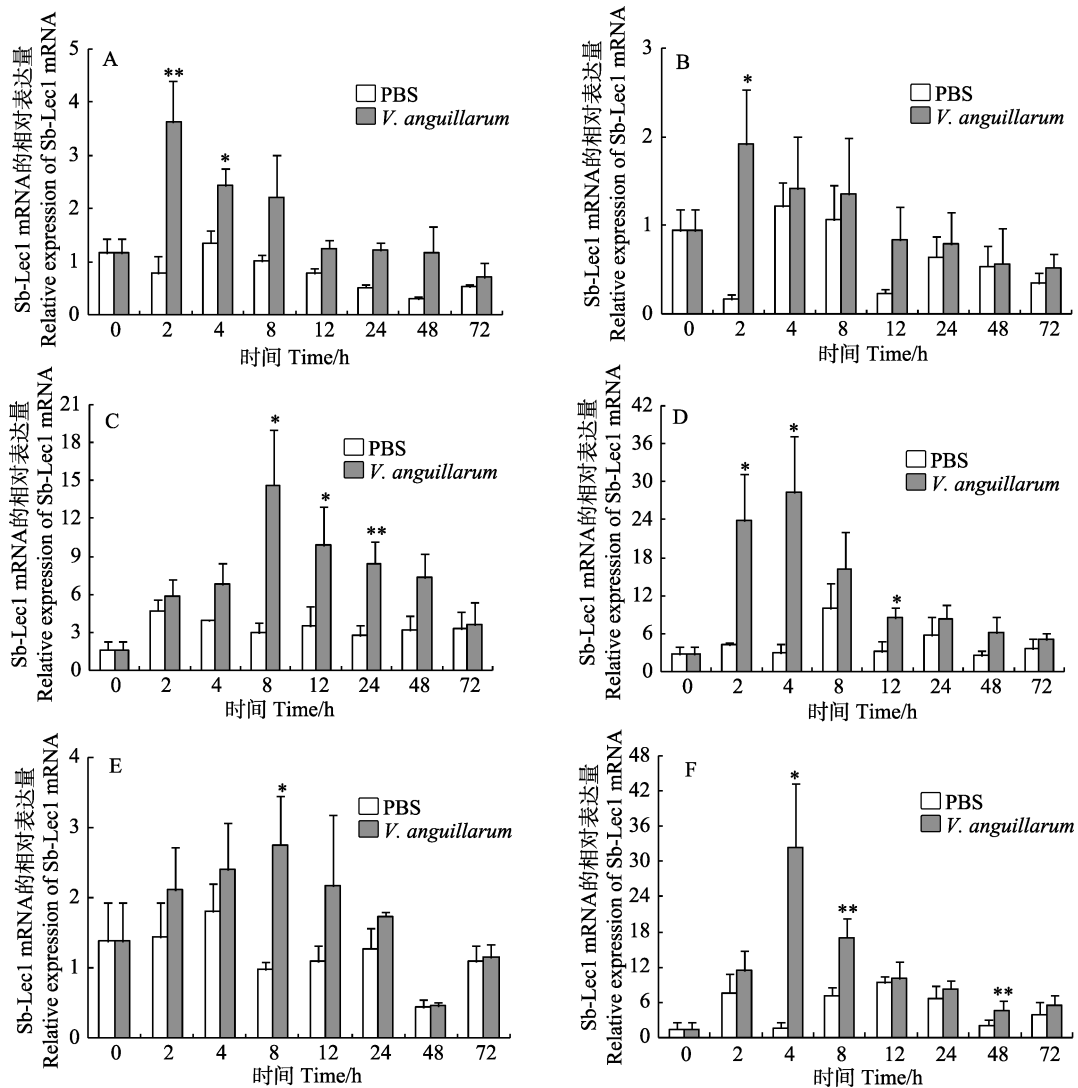


图5 鳗弧菌感染后魁蚶6种组织中Sb-Lec1 mRNA的表达

Fig.5 Sb-Lec1 mRNA expression level after *V. anguillarum* challenge in six tissues

A: 肝胰腺; B: 血细胞; C: 鳃; D: 闭壳肌; E: 斧足; F: 外套膜

与对照组相比, 1个星号表示组间差异显著($P < 0.05$), 2个星号表示组间差异极显著($P < 0.01$)

A: Hepatopancreas; B: Hemocytes; C: Gill; D: Adductor muscle; E: Foot; F: Mantle. Compared with the control group, significant differences were indicated with an asterisk at $P < 0.05$, and with two asterisks at $P < 0.01$

将魁蚶Sb-Lec1基因与其他种类进行同源比对分析并构建进化树, 比对结果显示, 魁蚶Sb-Lec1基因与其他序列同源性在33%~41%之间, 且都具有1个结构域和4个保守的半胱氨酸, 与长牡蛎、家蝇的相似性最高, 为41%, 与网纹鲷的相似性最低, 为33%。进化树分析结果显示, 魁蚶Sb-Lec1基因与软体动物亲缘关系较近, 与鱼类关系较远, 与其分类地位一致。将魁蚶与其他物种的CRD所编码的氨基酸序列进行同源性和相似性比对, 发现它们的同源性和相似性并不是很高。在张岷(2010)的研究中, 栉孔扇贝的Cflec-3基因与其他物种的相似性为40%~56%, 海湾扇贝AiCTL-6基因与其他物种的相似性为

45%~54%, 可见C型凝集素是一个进化较快的基因, 但具有高保守性特征序列。

qRT-PCR检测发现, Sb-Lec1基因在魁蚶所有组织中均有表达, 这与其他贝类C型凝集素基因的研究结果基本一致。Sb-Lec1基因在肝胰腺中的表达量最高, 血细胞次之, 外套膜中的表达量最少, 在合浦珠母贝中, Po-LEC1 mRNA在不同组织中的均有表达量, 消化腺中最高, 血细胞中最低(胡钰婷等, 2011), 而文蛤Mm-Lec1 mRNA在所检测组织中都有表达, 其中, 鳃中表达量最高(李猛等, 2015); 海湾扇贝中AiCTL1和AiLec基因分别在海湾扇贝的血细胞和肝胰腺中表达量最高(Zhu *et al.*, 2009); 栉孔扇贝Cflec-4

基因只在肝胰腺和性腺中表达,而在其他组织中检测不到 mRNA 的表达。鳃是软体动物中免疫系统的“第一道防线”,肝脏和血液是行使免疫功能的主要组织器官。在不同种类的贝类、不同组织中表达量不同,可能是由于不同物种 C 型凝集素的分布及发挥功能不同造成的。

在弧菌刺激下,不同时间、不同组织中 Sb-Lec1 基因表达量均出现先升高后降低的趋势($P < 0.05$),这与文蛤(李猛等, 2015)和栉孔扇贝(胥炜等, 2005)等的表达模式相同。在栉孔扇贝中, C 型凝集素在血细胞中的表达量较低,但在鳃弧菌刺激后, 6 h 时表达量达到最大,随后表达量逐渐减弱,而在文蛤中,弧菌感染 6 h 时, Mm-CTL 基因表达量明显上升,在 12 h 时达到最高值,随后有所下降,说明 C 型凝集素基因的表达受微生物刺激的诱导。本研究表明, 魁蚶 Sb-Lec1 基因能够参与免疫激活反应,并能维持机体的稳态,参与机体的免疫和防御,为进一步研究 C 型凝集素的免疫功能提供了依据。

参 考 文 献

- Chen ZL. Mammalian C-type lectin superfamily. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1997, 24(6): 491–496 [陈政良. 哺乳类 C 型凝集素超级家族. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(6): 491–496]
- Drickamer K, Taylor M. Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell Biology*, 1993, 9: 237–264
- Hu YT, Zhang DC, Cui SG, *et al.* Sequence features and functional analysis of the C-type lectin gene (PoLEC1) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(9): 1327–1336 [胡钰婷, 张殿昌, 崔淑歌, 等. 合浦珠母贝 C-型凝集素基因的序列特征和功能分析. 水产学报, 2011, 35(9): 1327–1336]
- Huang YH, Liu ZH, Wu B, *et al.* Gene cloning and expression analysis of catalase in *Scapharca broughtonii*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(6): 856–866 [黄永欢, 刘志鸿, 吴彪, 等. 魁蚶过氧化氢酶基因克隆及表达分析. 水产学报, 2016, 40(6): 856–866]
- Kolatkhar AR, Weis WI. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 6679–6685
- Li M, Zhou SM, Liu L, *et al.* Molecular clone and expression of C-type lectin in *Meretrix meretrix*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1186–1192 [李猛, 周素明, 刘璐, 等. 文蛤(*Meretrix meretrix*)C-型凝集素基因的分子克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1186–1192]
- Li M, Zhu L, Zhou C Y, *et al.* Molecular characterization and expression of a novel big defensin (*Sb-BDef1*) from ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(5): 1167–1173
- Liu HM, Wu B, Liu ZH, *et al.* Genetic diversity and geographic population structures of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 92–99 [刘寒苗, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同地理群体的遗传多样性及种群结构. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 92–99]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Mao YZ, Zhou CY, Zhu L, *et al.* Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein (BPI)/lipopolysaccharide-binding protein (LBP) of ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 642–652
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, *et al.* Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature Immunology*, 2006, 7(12): 1258–1265
- Tamplin ML, Fosher WS. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(11): 2882–2887
- Tang QS, Qiu XY, Wang J, *et al.* Resource enhancement of arkshell (*Scapharca (Anadara) broughtonii*) in Shandong offshore waters. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1994, 5(4): 396–402 [唐启升, 邱显寅, 王俊, 等. 山东近海魁蚶资源增殖的研究. 应用生态学报, 1994, 5(4): 396–402]
- Wang H, Song LS, Li CH, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology*, 2007, 44(5): 722–731
- Wang S. Study on the selection of reference genes and the expression regulation of C-type lectin gene in *Haliotis discus hannai*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015, 43–45 [王圣. 皱纹盘鲍内参基因筛选及 C 型凝集素基因表达规律的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 43–45]
- Xing JX, Liu YJ, Lu YP, *et al.* Cloning and functional analysis of C-type lectin from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(1): 16–24 [邢建晓, 刘艳娟, 路永鹏, 等. 家蝇 C-型凝集素的克隆与功能分析. 昆虫学报, 2016, 59(1): 16–24]
- Xu W, Wang H, Song LS, *et al.* cDNA Cloning and mRNA expression of C-type lectin from scallop *Chlamys farreri*. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(1): 83–88 [胥炜, 王昊, 宋林生, 等. 栉孔扇贝 C 型凝集素基因的克隆与表达研究. 高技术通讯, 2005, 15(1): 83–88]
- Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domains superfamily. *FEBS Journal*, 2005, 272(24): 6179–6217
- Zhang H. Study on the genes and their functions of the complement-like components from scallops. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2010, 17–20 [张岷. 扇贝补体样成分的基因及其功能研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2010, 17–20]

- Zheng LB, Liu ZH, Wu B, *et al.* Ferritin has an important immune function in the ark shell *Scapharca broughtonii*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 59: 15–24
- Zheng LB, Wu B, Liu ZH, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from ark shell, *Scapharca broughtonii*: Molecular characterization, expression and immune activity analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 656–665
- Zheng LB, Wu B, Liu ZH, *et al.* Cloning and expression analysis of galectin from *Scapharca broughtonii* (SbGal). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1061–1070 [郑利兵, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)半乳糖凝集素(SbGal)基因 cDNA 的克隆及表达分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(5): 1061–1070]
- Zhou LQ, Yang AG, Wang QY, *et al.* Studies on the hemocytes types and their immunological functions in bloody clam (*Scapharca broughtonii*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 599–606 [周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 魁蚶血细胞分类及其免疫功能的初步分析. *水产学报*, 2013, 37(4): 599–606]
- Zhu L, Song LS, Xu W, *et al.* Identification of a C-type lectin from the bay scallop *Argopecten irradians*. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(5): 1167–1173
- Zhu L, Song LS, Xu W, *et al.* Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 231–238

(编辑 马璀璨)

Molecular Cloning and Expression Analysis of C-Type Lectin from *Scapharca broughtonii*

SHEN Shufang^{1,2}, ZHU Ling^{2①}, LI Jiaqi^{2,3}, XUE Suyan^{2,3}, LI Yang^{1,2}, CHEN Qionglin^{1,2}, MAO Yuze^{2,3}, ZHUANG Zhimeng², FANG Jianguang^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract The current study cloned the full-length cDNA of C-type lectin (Sb-Lec1) using RACE (Rapid amplification of cDNA ends) method from *Scapharca broughtonii* with 700 bp that includes a 5' UTR of 29 bp and 3' UTR of 167 bp. The 504 bp open reading frame (ORF) encodes a polypeptide of 167 amino acids, including a signal peptide of 23 amino acids, one carbohydrate-recognition domain (CRD) motif of 129 amino acids and 6 cysteines involved in the formation of disulfide bond. The predicted protein molecular weight is 19.11 kDa, with a theory isoelectric point of 4.74. Multiple sequences alignment and phylogeny analysis showed that the identity of Sb-Lec1 gene shared with *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*, and *Argopecten irradians* was 38%–40%, 34%–35%, and 38%–39%, respectively. The amino acids of CRD motif had many similarities with other species such as 4 conserved Cys. Phylogenetic analysis revealed two main branches including all C-type lectin of molluscs and the C-type lectin of vertebrate, and that the deduced polypeptide of Sb-Lec1 had the characteristics of the C-type lectin family. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to assess the mRNA expression in all tested tissues, including hemocytes, foot, adductor muscle, mantle, gill, and hepatopancreas. The highest and lowest Sb-Lec1 mRNA were in hepatopancreas and adductor muscle, respectively. *Vibrio anguillarum* challenge induced Sb-Lec1 mRNA expression in all tested tissues ($P < 0.05$). These results showed that Sb-Lec1 gene may play an important role in immune defense.

Key words C-type lectin; *Scapharca broughtonii*; *Vibrio anguillarum*; Gene clone; Gene expression

① Corresponding author: ZHU Ling, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20161106001

http://www.yykxjz.cn/

李淑芳, 唐磊, 李杰, 李贵阳, 王晓冉, 王小鹿, 丁山, 莫照兰. 3株O3血清型鳃弧菌灭活疫苗的免疫原性和免疫保护效果. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 137-143

Li SF, Tang L, Li J, Li GY, Wang XR, Wang XL, Ding S, Mo ZL. Immunogenicity and protective efficacy of three inactivated *Vibrio anguillarum* serotype O3 vaccine preparations. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 137-143

3 株 O3 血清型鳃弧菌灭活疫苗的 免疫原性和免疫保护效果*



李淑芳^{1,2} 唐磊^{1,3} 李杰¹ 李贵阳¹ 王晓冉^{1,3}
王小鹿^{1,3} 丁山^{1,2} 莫照兰^{1,2①}

(1. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
农业部海水养殖病害防治重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) O3 血清型菌株是感染鱼类的重要病原菌, 本文研究了 3 株 O3 血清型鳃弧菌(SMP1、SMP3 和 SMP4)灭活疫苗的免疫原性和免疫保护。首先在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体内对 3 株鳃弧菌进行复壮; 检测复壮后的菌株毒力, 检测的 3 株鳃弧菌对蓝鳃龙(*Trichogaster trichopterus*)的半数致死量(LD₅₀)分别为 10^{5.1} CFU/ml (SMP1)、10^{4.7} CFU/ml (SMP3)和 10^{5.4} CFU/ml (SMP4); 制备了 3 株菌的甲醛灭活疫苗, 注射免疫牙鲆, 免疫后第 7 天可检测到牙鲆的血清特异性抗体产生, 免疫后第 28 天的血清特异性抗体效价为 1 : 1280(SMP1)、1 : 640 (SMP3)和 1 : 905 (SMP4), 提供的免疫保护率(Relative percent survival rate, RPS)为 94.4% (SMP1)、100% (SMP3)和 73.7% (SMP4)。研究表明, 3 株致病性 O3 血清型鳃弧菌菌株具有良好的免疫原性, 其中 SMP3 为最适疫苗候选株。本研究为鳃弧菌 O3 血清型疫苗的开发应用奠定了基础。

关键词 鳃弧菌 O3 血清型; LD₅₀; 灭活疫苗; 血清抗体效价; 免疫保护率

中图分类号 S942 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0137-07

随着我国海水鱼类养殖规模和产量逐年增加, 各种疾病日益增多, 给养殖业造成了巨大的经济损失。在我国, 抗生素等化学药物依然是控制水产动物疾病的首要手段, 但长期频繁使用会引起水环境污染恶化、病原菌耐药性增加、水产动物抗病力降低、食品

安全隐患等问题。在国际上, 通过疫苗接种预防动物疾病被认为是一种安全有效的手段, 目前, 已有 100 多种商品化鱼用疫苗在北美、欧洲、日本等国家的市场上销售, 有效地预防了鲑鳟鱼、鳕鱼(*Gadus morhua*)、鲈鱼(*Perca fluviatilis*)、鲷(*Chrysophrys*

* 山东省自主创新及成果转化专项经费项目(2014ZZCX06205)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016HY-ZD0505)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助[This work was supported by the Special Independent Innovation and Achievement Transformation of Shandong Province (2014ZZCX06205), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2016HY-ZD0505) and the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)].
李淑芳, E-mail: lsf891106@163.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-11-06, 收修改稿日期: 2016-12-29

major)、黄条鲷(*Seriola aureovittata*)等重要经济品种的疾病。

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是水产养殖动物的一种主要致病菌,可引起多种养殖鱼类发生弧菌病,严重危害牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、鲈鱼、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)等我国的重要经济鱼类。该病原可引起鱼类出血性败血症,导致鳍部严重出血、眼球突出、体表溃烂直至死亡(边慧慧, 2009; 陈吉祥等, 2005)。鳃弧菌至少有 23 种血清型,其中 O1、O2 和部分 O3 血清型是主要的致病菌(Wang *et al.*, 2009; Colwell, 1984),而 O2 血清型又有 O2a、O2b 和 O2c 三种血清亚型, O3 血清型有 O3a 和 O3b 两种血清亚型(Buch *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2011),不同血清亚型的菌株在生理生化特征、血清学反应、遗传特征等方面有所差别(Mikkelsen *et al.*, 2007)。O1 和 O2 血清型分布在世界各地,是感染鲑鱼、鳕鱼和大菱鲆等海水养殖鱼类最主要的病原菌, O3 血清型在丹麦、意大利和日本等国家偶有发现,曾在患病的欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)中分离得到(Pedersen *et al.*, 1999)。国际上已经商品化的鳃弧菌疫苗有灭活三价疫苗(含 O1、O2a、O2b 血清型)(Mikkelsen *et al.*, 2011; Schröder *et al.*, 2006),主要用于挪威的养殖鳕鱼;其他为多联疫苗,如杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)-鳃弧菌二联灭活疫苗、杀鲑气单胞菌-鳃弧菌-耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)三联灭活疫苗、杀鲑气单胞菌-鳃弧菌-海水病弧菌-冷水病弧菌(*Vibrio salmonicida*)四联灭活疫苗等,主要用于欧洲、美洲的鲑鱼、鳗鱼养殖。我国学者研发了多种鳃弧菌疫苗,如用于鲈鱼的灭活疫苗(肖慧等, 2003),用于鲆鲽类的灭活疫苗(莫照兰等, 2002; 朱开玲等, 2004)、口服疫苗(肖鹏等, 2007)和减毒疫苗(潘燕华等, 2009),但上述疫苗制剂的免疫效果评价均停留在实验室条件阶段,很少进入中试阶段,更没有获得生产批文且正式用于生产的鳃弧菌疫苗。造成我国鱼用疫苗产业化缓慢的一个重要原因是缺乏系统深入的流行病学调查工作,对流行于疫区的病原种类和抗原的变化缺乏明确的了解,对现有疫苗株的血清型或基因型的背景不清晰,因而不能预估疫苗对流行疾病提供的免疫保护,影响了疫苗中试阶段的进展。

本实验室对危害我国海水鱼类养殖的鳃弧菌开展了血清学分型研究,发现流行于我国鲆鲽类养殖的鳃弧菌主要有 O1、O2、O3 血清型,以 O1 血清型为主,其次为 O2 和 O3 血清型,其中 O3 血清型来源于发病大菱鲆(赵鲁宁, 2014)。本研究在确定鳃弧菌 O3

血清型菌株致病性的基础上,制备了灭活疫苗,进一步研究了灭活疫苗对牙鲆的免疫保护效果,为鳃弧菌 O3 血清型及多价疫苗的研发提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和培养基

鳃弧菌 O3 血清型菌株 SMP1、SMP3 和 SMP4 由中国水产科学院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室提供(赵鲁宁, 2014),保存于 -80°C 冰箱。用胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)液体或胰蛋白胨大豆琼脂平板(TSA)培养,培养温度为 28°C 。

1.2 实验用鱼

蓝蔓龙(*Trichogaster trichopterus* Pallas)(Hao *et al.*, 2013)购自山东青岛南山花鸟虫鱼市场,用于鳃弧菌菌株的毒力分析。其平均体长为 7 cm,暂养于 60 L 水箱进行海水养殖驯化,养殖水温为 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$,连续充气,每天在养殖淡水中加适量海水直至盐度为 10(窦海鸽等, 2006)。牙鲆购自山东日照某养殖场,用于疫苗免疫实验。其平均体重为 4.8 g,平均体长为 8.5 cm,于 500 L 水箱暂养,水温为 $13\sim 16^{\circ}\text{C}$,连续通气。实验前,暂养鱼随机取 3~5 尾进行细菌学分析,取鱼的肝、脾、肾组织,于 TSA 平板划线,在 28°C 培养 24~48 h,确定未有细菌生长时,暂养鱼方可用于后续实验。

1.3 菌株复壮

取保存于 -80°C 冰箱的鳃弧菌菌种,于 TSA 平板划线,挑取单菌落,接种于 TSB 液体培养基中, 28°C 、140 r/min 培养过夜,得到浓度为 10^8 CFU/ml 的菌液。取 2 尾健康牙鲆,以 0.1 ml/尾的剂量进行背部肌肉注射。取濒死牙鲆的肝、脾、肾组织于 TSA 平板划线分菌,挑取形态特征一致的优势菌进行分离纯化,经血清学反应鉴定后,同上方法进行第 2 次复壮,菌液浓度为 10^7 CFU/ml,注射剂量为 0.1 ml/尾。复壮 2 次的菌株保种进行后续实验。

1.4 鳃弧菌菌株毒力检测

取上述复壮菌株于 TSA 平板划线,挑取单菌落,接种于 TSB 过夜培养,取培养液按 1%接种量转接新鲜 TSB,继续摇床培养 3 h,菌液于 4°C 、6000 r/min 离心 10 min,用无菌 PBS 重悬,调节 $\text{OD}_{540\text{nm}}=0.5$,进行 10 倍梯度稀释,制备稀释度为 $10^3\sim 10^6$ CFU/ml 的菌液。取健康蓝蔓龙分组,采用背部肌肉注射方式,每组注射一个稀释度的菌液 0.1 ml,对照组注射同等

体积的 PBS。定时观察蓝鳗龙的发病症状和死亡情况,对死亡鱼进行细菌分离,并进行形态学和血清学鉴定。统计 14 d 的累计死亡率,采用改良寇氏法(杨茂成,1990)计算 LD_{50} 。

1.5 鳗弧菌灭活疫苗制备和安全性检验

取上述复壮菌株于 TSA 平板划线,挑取单菌落接种于 TSB 过夜培养,取培养液按 1% 接种量转接新鲜 TSB 培养 24 h,测定 $OD_{540\text{ nm}}$ 后,加入终浓度为 0.2% 的甲醛,在 28℃、140 r/min 摇床条件下进行灭活。进行灭活检验时,取灭活 12 h 和 24 h 的菌液各 0.1 ml 涂布 TSA 平板,同时取灭活菌液按 1% 比例接种 TSB 培养基,培养后观察是否有细菌生长。灭活后的菌液以 6000 r/min 离心 10 min,沉淀菌体用灭菌 PBS 离心洗涤 2 次,重悬菌体至 $OD_{540\text{ nm}}=0.5$,制成疫苗,置于 4℃ 保存。进行安全性检验时,将灭活疫苗以 0.1 ml/尾的剂量腹腔注射牙鲆,每种疫苗注射 5 尾,对照组注射同等体积的 PBS,实验鱼观察 2 周,记录鱼的症状及存活情况。

1.6 疫苗免疫与攻毒实验

健康牙鲆随机分组,每组 50 尾,取浓度为 10^8 CFU/ml 的疫苗,以 0.1 ml/尾的接种量从腹腔注射牙鲆,则每尾鱼的接种剂量为 10^7 CFU;对照组注射等量的无菌 PBS。在免疫后的 7、14、21、28 d,从每个实验组随机取 3 尾鱼,从尾柄静脉采血制备血清,采用微量凝集法(沈萍,1999)检测血清特异性抗体效价。

在免疫后第 28 天进行攻毒实验,取浓度为 10^7 CFU/ml 的活菌从背部肌肉注射免疫组鱼和对照组鱼,每组鱼 20 尾,每尾 0.1 ml。攻毒后,观察鱼临床症状,统计 14 d 内的死亡数,按照如下公式计算:

疫苗免疫保护率(Relative percent survival rate, RPS)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%

1.7 统计分析

血清抗体水平测定数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鳗弧菌菌株复壮

在进行菌株复壮时,将-80℃ 保存的鳗弧菌菌种 SMP1、SMP3 和 SMP4 在 TSA 平板上活化,用 TSB 培养得到菌悬液,以 10^8 CFU/ml 的剂量分别注射感

染牙鲆,感染的牙鲆在注射后 24~48 h 内全部死亡,注射部位红肿、内脏充血、全身性肌肉出血等典型症状,从濒死鱼的肝、脾、肾组织分离得到形态一致的菌落。得到的菌落经血清学鉴定为原发菌株后,以此菌落为菌种,以 10^7 CFU/ml 的剂量再次注射感染牙鲆,感染的牙鲆在注射后 24~48 h 内全部死亡,从濒死鱼的内脏分离得到的菌落经过血清学鉴定后,用于毒力实验和疫苗制备。

2.2 鳗弧菌菌株毒力分析

以 $10^3\sim10^6$ CFU/ml 系列浓度的鳗弧菌 SMP1、SMP3 和 SMP4 感染蓝鳗龙,在感染后的第 1 天,SMP3 组开始出现死亡,在感染后的第 2 天 SMP1 和 SMP4 开始出现死亡,死亡高峰出现在第 2~3 天,第 7 天后不再出现死亡情况。濒死鱼的症状为全身性肌肉出血,肝充血,脾脏肿大。计算得到 SMP1、SMP3 和 SMP4 的 LD_{50} 依次为 $10^{5.1}$ 、 $10^{4.7}$ 和 $10^{5.4}$ CFU/ml (表 1)。

表 1 O3 血清型鳗弧菌的毒力检测

菌株 Strain	细菌浓度 Bacteria concentration (CFU/ml)	累计死亡率 Cumulative mortality rate (%)	半数致死量 Lethal dose 50% (CFU/ml)
SMP1	1.1×10^6	62.5	$10^{5.1}$
	1.1×10^5	37.5	
	1.1×10^4	37.5	
	1.1×10^3	12.5	
SMP3	0.9×10^6	83.3	$10^{4.7}$
	0.9×10^5	66.7	
	0.9×10^4	33.3	
	0.9×10^3	0	
SMP4	1.1×10^6	62.5	$10^{5.4}$
	1.1×10^5	37.5	
	1.1×10^4	0	
	1.1×10^3	12.5	
PBS	/	0	/

2.3 鳗弧菌疫苗灭活及安全性检验

在扩大培养 24 h 的 3 株鳗弧菌(SMP1、SMP3 和 SMP4)的菌悬液中加入终浓度为 0.2% 的甲醛进行细菌灭活,定时取菌液在 TSA 和 TSB 培养,检测灭活情况。结果显示,加入甲醛后 12 h,在 3 种菌悬液中未检测到细菌的生长。灭活后的菌液注射牙鲆,在 14 d 观察期间,牙鲆生长、进食正常,未有死亡,说明灭活的疫苗对动物安全。

2.4 免疫鱼的血清抗体效价

3种鳎弧菌灭活疫苗以 10^7 CFU/尾的剂量注射免疫牙鲆,在免疫后的第7、14、21、28天取血,测定抗体效价。结果如图1所示,在免疫后第7天,各免疫组牙鲆的血清均可检测到明显的抗体效价,并随着时间的延长呈上升趋势,其中,SMP1组和SMP3组在第1~3周呈显著性上升($P<0.05$);在第28天时,SMP1、SMP3和SMP4组的血清抗体效价分别为1:1280、1:640和1:905(图1)。在相同采样时间点,各免疫组之间的血清效价没有显著性差异($P>0.05$)。未免疫的对照组鱼血清未检测到抗体效价。

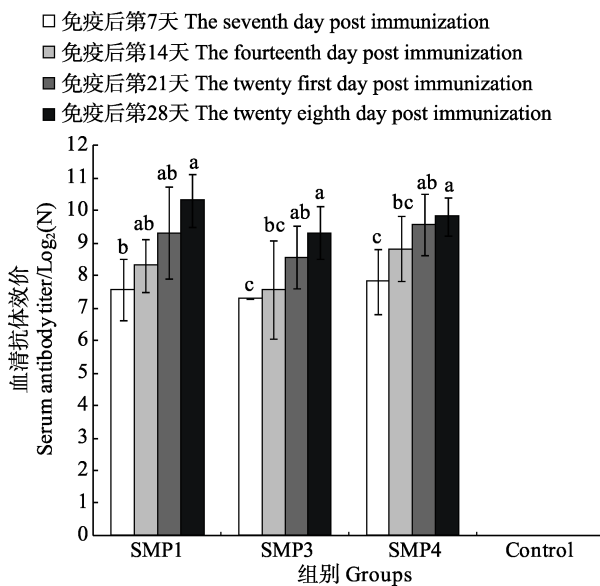


图1 免疫血清效价测定

Fig.1 Determination of serum antibody titer

不同字母表示显著差异($P<0.05$)

Different letters denoted significant differences ($P<0.05$)

2.5 疫苗免疫保护效果

在免疫后的第28天,用浓度为 10^7 CFU/ml 的

SMP1、SMP3和SMP4活菌分别攻毒对应的免疫组和对照组,检测疫苗的免疫保护力。结果显示,攻毒后,未免疫组出现大量死亡,死亡高峰出现在攻毒后第2~5天;而免疫组中,仅SMP1和SMP4组出现少量死亡。根据累积死亡率计算SMP1、SMP3、SMP4组的相对免疫保护率分别为94.4%、100%和73.7%(表2)。

3 讨论

我国学者研制了针对不同养殖品种的鳎弧菌灭活疫苗,但未明确疫苗株的血清型或基因型,在一定程度上限制了疫苗的田间应用示范。本研究开展了3株鳎弧菌O3血清型菌株(SMP1、SMP3和SMP4)的免疫原性和免疫保护效果的初步研究,在确定3株鳎弧菌菌株致病力的基础上,用福尔马林作为灭活剂制备了3种安全的灭活菌剂,比较了3种灭活菌剂免疫牙鲆后的血清抗体效价和免疫保护,结果证明,3种疫苗制剂具有较强的免疫原性,对牙鲆起到了有效的免疫保护。

用于制备疫苗的菌种由于传代次数多、保存时间长,其生长、繁殖以及毒力等会减弱,为了恢复疫苗株的原始毒力和免疫原性,本研究将冷冻保存的鳎弧菌菌株注射感染牙鲆进行2次复壮,从病鱼的内脏组织均分离到与原始菌株表型特征一致的细菌,感染病菌的牙鲆出现典型的出血性败血症症状,结果显示,鳎弧菌菌株的毒力得到了恢复。本研究在致病性实验中选取了蓝曼龙作为实验动物,蓝曼龙也称丝足鱼,是一种繁殖快、饲养简单、便宜的淡水观赏鱼,作为实验动物用于多种水产致病菌的免疫和致病性研究(Ling *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000; Srinivasa *et al.*, 2003)。本实验室对蓝曼龙的耐盐性和盐度驯化进行了研究(窦海鸽等, 2006),并将盐度驯化的鱼应用于海水病原菌的致病性研究和海水疫苗评价(窦海鸽, 2006; 李杰等, 2010; 潘海建等, 2013; Hao *et al.*,

表2 鳎弧菌灭活疫苗的免疫保护力

Tab.2 Relative percent survival rate (RPS) of immunized *P. olivaceus* challenged by 10^7 CFU/ml *V. anguillarum* bacteria

组别 Groups	攻毒后 Post infection		免疫保护率 RPS (%)
	死亡数/总鱼数 Death number/Total number	累积死亡率 Cumulative mortality rate (%)	
SMP1 免疫组 SMP1 vaccinated group	1/20	5	94.4
对照组 Control group	18/20	90	
SMP3 免疫组 SMP3 vaccinated group	0/20	0	100.0
对照组 Control group	19/20	95	
SMP4 免疫组 SMP4 vaccinated group	5/20	25	73.7
对照组 Control group	19/20	95	

2013), 证明了蓝蔓龙作为海水鱼实验动物用于病原毒力分析和疫苗评价的可行性。本研究将海水驯化的蓝蔓龙用于检测复壮的鳃弧菌的毒力, 结果显示, 3 株菌表现出较强的致病力, LD_{50} 在 $10^{4.7} \sim 10^{5.4}$ CFU/ml, 其中, SMP4 最低剂量组 (10^3 CFU/ml) 出现 12.5% 的死亡率, 而 10^4 CFU/ml 组没有死亡, 可能由于实验动物个体差异所导致。鳃弧菌的致病性与外膜蛋白、脂多糖、胞外产物等多种因子有关 (Frans *et al.*, 2011), 这些致病因子是宿主免疫系统识别的抗原分子, 毒力越强的鳃弧菌被认为具有越强的免疫原性。根据上述结果, 3 株菌株可作为候选疫苗株进行免疫原性和免疫保护效果的评价。

采用甲醛灭活的方法可以得到安全和有效的鳃弧菌疫苗 (肖慧等, 2003; 莫照兰等, 2002)。本研究采用终浓度为 0.2% (v/v) 的甲醛作为灭活剂, 在 28°C 、140 r/min 的条件下处理 12 h, 可以完全灭活细菌, 用此方法灭活的 3 种菌剂对牙鲆没有致病性。制备的 3 种疫苗免疫牙鲆, 免疫后第 7 天便可检测到明显的血清抗体产生, 且在一个月抗体效价呈上升趋势, 到第 28 天时, 各免疫组血清效价高于 1 : 640。一般认为较低的温度不适合刺激鱼体的免疫反应, 牙鲆的适合生长温度为 $12 \sim 23^\circ\text{C}$, 本研究期间, 养殖牙鲆的水温为 $13 \sim 16^\circ\text{C}$, 表明在较低的养殖温度鳃弧菌疫苗可以刺激牙鲆产生较强的体液免疫反应。攻毒实验显示, 各免疫组牙鲆均能够抵抗剂量为 10^7 CFU/ml 的鳃弧菌感染, RPS 在 73.7%~100% 范围内, 因此, 可以认为牙鲆血清中针对鳃弧菌疫苗的特异抗体水平与该疫苗提供的免疫保护力相关。从数据来看, 免疫牙鲆后, 每种疫苗在各个检测点的血清抗体效价没有明显区别, 但 RPS 有所不同, 即毒力强的菌株提供的 RPS 更高。因此, 可以选择毒力强的鳃弧菌菌株作为疫苗候选株。其中, SMP3 菌株毒力最强, 免疫牙鲆后产生的血清效价相对较低, 但保护率最高。推测可能由于 SMP3 存在不同于其他菌株的某些毒力因子, 这些毒力因子在体外表达水平不高 (但可能在宿主内有较高水平表达), 因而不能诱导高水平的体液免疫应答; 另外, 某些毒力因子可能参与细胞免疫应答而检测不到抗体水平。上述机制需要进一步的研究进行确证。

本研究利用 3 株 O3 血清型鳃弧菌菌株制备灭活疫苗, 对牙鲆均起到了良好的免疫保护效果, 具有作为疫苗株的开发应用价值。我们将进一步比较不同血清型鳃弧菌菌株的毒力强弱、分布特征等数据, 为鳃弧菌疫苗的开发应用提供基础。

参 考 文 献

- Bian HH. Primary study on a new method of oral *Vibrio anguillarum* vaccine for flounder. Master's Thesis of Hebei University, 2009, 3 [边慧慧. 牙鲆鳃弧菌口服疫苗免疫新途径的初步研究. 河北大学硕士研究生学位论文, 2009, 3]
- Buch C, Sigh J, Nielsen J, *et al.* Production of acylated homoserine lactones by different serotypes of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(3): 338-349
- Chen JX, Li CF, Yan XH, *et al.* Studies on biological characteristics of five pathogenic *Vibrio anguillarum* strains isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in Shandong Province of China. *High Technology Letters*, 2005, 15(6): 92-96 [陈吉祥, 李彩凤, 颜显辉, 等. 大菱鲆病原鳃弧菌生物学及分子特征研究. 高技术通讯, 2005, 15(6): 92-96]
- Colwell RR, Grimes DJ. *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 1984, 37(1-4): 265-287
- Dou HG, Huang J, Wang XH, *et al.* Salinity tolerance and salt water acclimation of gourami *Trichogaster trichopterus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5): 775-780 [窦海鸽, 黄健, 王秀华, 等. 丝足鱼 (*Trichogaster trichopterus*) 耐盐性及盐度驯化. 中国水产科学, 2006, 13(5): 775-780]
- Dou HG. Tentative application of freshwater gourami *Trichogaster trichopterus* on virulence analysis and vaccine evaluation for bacteria isolates from seawater fish. Master's Thesis of Shanghai Fisheries University, 2006, 31-37 [窦海鸽. 淡水丝足鱼用于海水鱼细菌分离物毒力分析和疫苗评价的初步研究. 上海水产大学硕士研究生学位论文, 2006, 31-37]
- Fang HM, Ling KC, Ge R, *et al.* Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas) against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23: 137-145
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(9): 643-661
- Hao B, Mo ZL, Xiao P, *et al.* Role of alternative sigma factor 54 (RpoN) from *Vibrio anguillarum* M3 in protease secretion, exopolysaccharide production, biofilm formation and virulence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2575-2585
- Li J, Mo ZL, Mao YX, *et al.* Effect of *esaC* gene on *Edwardsiella tarda*'s virulence and secretion of T3SS proteins. *High Technology Letters*, 2010, 20(2): 199-203 [李杰, 莫照兰, 茅云翔, 等. *esaC* 基因对迟缓爱德华氏菌

- 的毒力和 T3SS 蛋白分泌的影响. 高技术通讯, 2010, 20(2): 199–203]
- Ling SHM, Wang XH, Lim TM, *et al.* Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. FEMS Microbiology Letters, 2001, 194(2): 239–243
- Mikkelsen H, Lund V, Larsen R, *et al.* Vibriosis vaccines based on various sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O2 induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 330–339
- Mikkelsen H, Lund V, Martinsen LC, *et al.* Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies. Aquaculture, 2007, 266(1–4): 16–25
- Mo ZL, Xu YL, Zhang PJ. Vaccination against *Vibrio anguillarum* on cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Marine Sciences, 2002, 26(4): 63–66 [莫照兰, 徐永立, 张培军. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究. 海洋科学, 2002, 26(4): 63–66]
- Pan HJ, Hao B, Li J, *et al.* Impact of Cpx on the virulence of *Edwardsiella tarda*. Marine Sciences, 2013, 37(2): 17–21 [潘海建, 郝斌, 李杰, 等. Cpx 对迟缓爱德华氏菌毒力的影响. 海洋科学, 2013, 37(2): 17–21]
- Pan YH, Ma Y, Zhao DL, *et al.* Study on immune response of *Paralichthys olivaceus* induced by live attenuated *V. anguillarum* vaccine. Food and Drug, 2009, 11(5): 12–15 [潘燕华, 马悦, 赵东玲, 等. 鳃弧菌减毒活疫苗对牙鲆免疫效果的研究. 食品与药品, 2009, 11(5): 12–15]
- Pedersen K, Grisez L, Houdt R, *et al.* Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. Current Microbiology, 1999, 38(3): 183–189
- Shröder MB, Mikkelsen H, Børdal S, *et al.* Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. Aquaculture, 2006, 254(1–4): 46–53
- Shen P, Fan XR, Li GW. Microbiology experiment (3rd ed). Higher Education Press, 1999, 154–165 [沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版). 高等教育出版社, 1999, 154–165]
- Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Infection and Immunity, 2003, 71(3): 1343–1351
- Wang Z, Vinogradov E, Li J, *et al.* Structural characterization of the lipopolysaccharide O-antigen from atypical isolate of *Vibrio anguillarum* strain 1282. Carbohydrate Research, 2009, 344(11): 1371–1375
- Xiao H, Li J, Wang XH, *et al.* Preparation of vaccine against vibriosis of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and its immune efficiency evaluation. Journal of Ocean University of Qingdao, 2003, 33(2): 226–232 [肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼鳃弧菌病疫苗的制备及免疫防治效果. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(2): 226–232]
- Xiao P, Mo ZL, Zou YX, *et al.* Immune responses and efficacy of an oral-emulsified bivalent vaccine against *Vibrio anguillarum* in turbot (*Scophthalmus maximus*). High Technology Letters, 2007, 17(9): 979–985 [肖鹏, 莫照兰, 邹玉霞, 等. 鳃弧菌油乳化二价口服疫苗免疫养殖大菱鲆的免疫应答及免疫效果的研究. 高技术通讯, 2007, 17(9): 979–985]
- Yang MC. Veterinary statistics. Beijing: China Prospect Publishing House, 1990, 232–234 [杨茂成. 兽医统计学. 北京: 中国展望出版社, 1990, 232–234]
- Zhao LN. Characterization of serotype and genotype of *Vibrio anguillarum* strains isolated from marine fish. Master's Thesis of Qingdao Agricultural University, 2014, 25–30 [赵鲁宁. 海水养殖鱼类鳃弧菌分离株的血清型和基因型鉴定. 青岛农业大学硕士研究生学位论文, 2014, 25–30]
- Zhu KL, Chen JX, Li Y, *et al.* Study on the vaccination against *V. anguillarum* in farmed marine turbot. High Technology Letters, 2004, 14(2): 76–80 [朱开玲, 陈吉祥, 李筠, 等. 鳃弧菌灭活疫苗对海水养殖大菱鲆的免疫预防研究. 高技术通讯, 2004, 14(2): 76–80]

(编辑 马瑰艳)

Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Inactivated *Vibrio anguillarum* Serotype O3 Vaccine Preparations

LI Shufang^{1,2}, TANG Lei^{1,3}, LI Jie¹, LI Guiyang¹, WANG Xiaoran^{1,3},
WANG Xiaolu^{1,3}, DING Shan^{1,2}, MO Zhaolan^{1,2①}

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract *Vibrio anguillarum*, an etiological agent of fish septicemia, has caused great economic losses in many marine and fresh water fish. Vaccination is an effective and safe approach to control fish septicemia. The pathogenicity *V. anguillarum* serotype O3 in cultured marine fish of China promotes us to evaluate the immunogenicity and protective efficacy of three *V. anguillarum* serotype O3 inactivated vaccine. Three *V. anguillarum* serotype O3 strains (SMP1, SMP3, and SMP4) were rejuvenated in flounder *Paralichthys olivaceus* and then were determined for lethal dose 50% (LD₅₀) in *Trichogaster trichopterus* which had been acclimated to 10 salinity. The result showed that LD₅₀ of SMP1, SMP3 and SMP4 were 10^{5.1} CFU/ml, 10^{4.7} CFU/ml and 10^{5.4} CFU/ml, respectively. Three inactivated vaccine were obtained by incubation of *V. anguillarum* with 0.2% formaldehyde for 36 h at 28°C. Each vaccine was used to vaccinate flounder *P. olivaceus* via intraperitoneal injection with a dosage of 10⁸ CFU/ml. Specific serum antibody titers against *V. anguillarum* cells were detected evidently ($P < 0.05$) at 7 d post vaccination, and the highest titers of 1:1280 (SMP1), 1:640 (SMP3) and 1:905 (SMP4) were detected at 4 weeks post vaccination ($P < 0.05$). Meanwhile, the relative percent survival rates (RPS) were 94.4% (SMP1), 100% (SMP3) and 73.7% (SMP4). These results indicated that *V. anguillarum* serotype O3 inactivated vaccines were able to induce immune response in fish and provide effective protection against *V. anguillarum* infection, and SMP3 is the best candidate for vaccine development and application.

Key words *Vibrio anguillarum* serotype O3; LD₅₀; Inactivated vaccine; Serum antibody titer; Relative percent survival rate

① Corresponding author: MO Zhaolan, Email: mozl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20170112001

http://www.yykxjz.cn/

何柳, 郭莹莹, 王联珠, 朱文嘉, 刘芬, 杨祯祯. 加工方式对海水虾及其制品中SO₂含量的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 144-149

He L, Guo YY, Wang LZ, Zhu WJ, Liu F, Yang ZZ. Effects of processing methods on the content of sulfur dioxide in shrimp and its products. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 144-149

加工方式对海水虾及其制品中 SO₂ 含量的影响*

何柳^{1,2#} 郭莹莹^{1#} 王联珠^{1①} 朱文嘉¹ 刘芬^{1,3} 杨祯祯^{1,3}

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 农业部水产品质量安全风险评估实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003;
3. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 亚硫酸盐(以 SO₂ 残留量计)超标是目前影响虾类及其制品质量安全的主要因素之一。本文研究了水煮、蒸、微波烘烤、油炸、风干等加工方式对海水虾中二氧化硫(SO₂)残留量的影响。结果显示, 水煮、蒸、微波烘烤和油炸等加工方式可有效降低虾肉中 SO₂ 残留量, 降低效果从高到低依次为水煮、蒸、微波烘烤和油炸。在风干过程中, 虾肉中 SO₂ 残留量呈先升高后降低的趋势, 温度越高, 对 SO₂ 的脱除效果越好。在 20℃、40℃、60℃、80℃ 条件下风干加工虾米, 当水分含量达到成品要求时, 虾米中 SO₂ 残留率分别为 132.00%、146.70%、78.25% 和 48.90%。常温风干方式不利于海米中 SO₂ 消除。脱壳处理可有效降低虾米和烤虾中 SO₂ 残留量。本研究结果将为海水虾中 SO₂ 残留量的控制和限量指标制定提供科学依据, 对消费者和生产者利用加工手段降低海水虾中 SO₂ 残留量也具有借鉴意义。

关键词 SO₂; 海水虾; 残留量; 烹饪方式

中图分类号 S985 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)01-0144-06

焦亚硫酸钠因其中的SO₂对虾体独特的抑黑变效果成为当前海捕虾最主要的保鲜剂(卓华龙等, 2001; 谭乐义等, 2011), 目前尚无替代产品。若不使用焦亚硫酸钠等防腐剂, 每年约 20% 的海捕虾腐败变质, 约 50% 的海捕虾鲜度下降 1~2 个等级, 海水虾、蟹的品质与食用安全也得不到保证(Bono *et al*, 2012; 胡冬梅等, 2011)。SO₂ 是一种具有多种毒性作用的全身性毒物(孟紫强等, 2001), 过量的SO₂ 进入人体后, 会损害支气管和肺, 进而可能诱发呼吸道炎症, 并对脑、心、肝等器官有毒害作用(Bernstein *et al*, 2004; Ađar

et al, 2000; Sunyer *et al*, 2003)。

近年来, 虾米等虾类制品中 SO₂ 超标是我国食品安全抽查中屡次违禁的重点监测环节(徐慧等, 2014)。2016 年 8 月颁布的关于抗坏血酸棕榈酸酯(酶法)等食品添加剂新品种的公告中(2016 年第 9 号), 将海水虾、蟹类鲜水产品、冷冻水产品及其制品纳入食品添加剂使用标准中(中华人民共和国卫生和计划生育委员会, 2014), 规定焦亚硫酸钠最大使用量为 100 mg/kg (以 SO₂ 残留量计), 其他水产品仍不可检出。消费者购买鲜冻虾后, 通常会经水煮等加工手段处理后食

* 农业部 2015 年捕捞水产品质量安全监测项目(捕捞加工品专项) (2130109)资助[This work was supported by the Project of Ministry of Agriculture 2015 Food Safety and Quality of Fishing Aquatic Products (Fishing Aquatic Products Special) (2130109)]. 何柳, E-mail:15712766078@163.com; 郭莹莹, E-mail: guoyy@ysfri.ac.cn

共同第一作者

① 通讯作者: 王联珠, 研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-12, 收修改稿日期: 2017-02-05

用,而这些加工过程对SO₂残留量具有较大的影响。徐慧等(2015)研究发现,在水煮虾的过程中,去壳和淋洗可以降低虾肉中SO₂残留量,目前,关于不同加工方式对海水虾及其制品中SO₂脱除效果的研究较少。本研究主要探究了鲜、冻海水虾在日常家庭烹饪方式和风干过程中SO₂含量的变化规律,为消费者和生产者提供有效降低鲜冻虾中SO₂残留量的加工方法。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

冻阿根廷红虾(*Pleotious muelleri*),规格为(60±2)g/只;冻阿根廷红虾仁,规格为(30±2)g/只;鲜凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),规格为(25±2)g/只;福临门食用调和油,均购于青岛农贸市场。

盐酸、硫酸(分析纯,莱阳经济技术开发区精细化工厂);可溶性淀粉、氢氧化钠、碳酸钠、乙酸铅、硫代硫酸钠、碘、碘化钾、亚硫酸氢钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);重铬酸钾标准品(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

拜杰 KF03 研磨机(德清拜杰电器有限公司);阿

1	2	3	4	5	6	7	8	9
青色或黑褐色,无光泽,腥味,无虾肉的鲜香,网质粗糙,松散或僵硬柴感,干涩或软烂发粘			色泽较深,光泽暗淡微腥,味暗淡,肉质较有弹性,略微柴感或轻微发粘			肉粉色,具虾独有的鲜甜味,滋味丰满,肉质紧密有弹性,入口爽滑		

1.3.3 样品处理 先将解冻后的阿根廷红虾、虾仁以及鲜凡纳滨对虾进行分选以确保每种样品的规格基本一致,并用焦亚硫酸钠溶液预处理使样品中SO₂含量达到100~120 mg/kg,模拟家庭清洗的方式,按照虾:水=1:10(m:m)的自来水量冲洗2遍。所有样品均经清洗后进行后续加工,将清洗后样品SO₂残留率设为100%。

1.3.4 不同烹饪方法对整虾和虾仁中SO₂含量的影响
烹饪方式:(1)煮制 电磁炉加热,将5倍样品重量的水煮沸后分别放入阿根廷红虾和虾仁样品;(2)蒸制 将蒸锅内注入适量自来水置于电磁炉加热,水沸后将样品放置于蒸笼上;(3)油炸 将适量食用调和油注入常压炸锅,在温度为170℃时放入样品;(4)微波烘烤 将样品放入微波炉,以100%火力(280 W)烘烤。烹饪时长分别为2、4、6、8 min。

1.3.5 风干温度和时长对虾肉中SO₂含量的影响 在洁净的不锈钢锅中注入5倍于虾重量的去离子水,用电

诗顿 EF410 料理机(宁波阿诗顿电器有限公司);电子天平(北京赛多利斯);Miji Gala EI 远红外辐射炉(米技电子电器有限公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);立式低温保存箱(海尔集团);ZRD-A7080 鼓风干燥箱(上海智试分析仪器制造有限公司);98-1-C 型数字控温加热套(天津泰斯特仪器有限公司);蒸汽蒸馏装置;酸式滴定管。

1.3 实验方法

1.3.1 测定方法 SO₂ 按中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会(2016)发布的《食品安全国家标准 食品中二氧化硫的测定》(GB5009.34-2016)进行测定。

水分 按中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会等(2016)发布《食品安全国家标准 食品中水分的测定》(GB5009.3-2016)的第一法进行测定。

1.3.2 感官测定 参考Veli等(2008)的方法并做适当修改,邀请具有一定感官质量评定经验的5位人员组成评价小组,检验方法采用双盲法。本研究主要评定烹饪后整虾和虾仁的色泽、味道、组织状态、口感和整体可接受性,其中,每项最高分为9分,最低分为1分,根据感官评价得分来判断样品的优劣。评分标准如下:

磁炉加热将水煮沸,然后将凡纳滨对虾放入锅中,火力调小保持继续沸腾,2 min后将虾取出沥水。将煮后的虾放入鼓风干燥箱中进行风干,风干温度分别为20℃、40℃、60℃、80℃;风干时长分别4、8、12、16 h。中华人民共和国农业部(2013)发布的(SC/T 3204-2012)《虾米》对水分含量的要求为一级品≤18%、二级品、三级品≤20%,因此,当虾中水分含量低于20%则视为风干完成。

1.3.6 风干时虾壳和虾肉中SO₂含量的变化情况 在洁净的不锈钢锅中注入5倍于虾重量的去离子水,用电磁炉加热将水煮沸。然后将凡纳滨对虾放入锅中,火力调小保持继续沸腾,2 min后将虾取出沥水,剥离分开虾壳(含虾头)、虾肉。将虾壳、虾肉分别放入鼓风干燥箱中进行风干。风干温度为60℃;风干时长分别为4、8、12、16 h。

1.3.7 实验平行与重复 所有不同处理方式均重复3次,不同重复处理样品的单一参数进行2次平行测

定, 取平均值为该样品测定值。

1.4 数据分析方法

使用 t 检验和 F 方差齐性检验来检验虾中 SO_2 含量在加工前后是否有显著性变化 ($P < 0.05$ 为显著性差异)。采用 Excel 2007 和 Origin Pro 9.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 不同烹饪方法对整虾和虾仁中 SO_2 含量的影响

不同烹饪方法加工后, 整虾和虾仁中 SO_2 残留率见表 1、表 2。从表 1、表 2 可以看出, 水煮、隔水蒸、微波烘烤和油炸 4 种家庭常用虾类加工方式, 均

能够脱除整虾和虾仁中 SO_2 , 并且随着加工时间的延长脱除效果增强。不同加工方式对整虾和虾仁中 SO_2 脱除率有不同的影响, 烹饪时间为 2 min 时, 水煮的脱除作用最强, 油炸的脱除率最小; 而虾壳对虾肉中 SO_2 的分解有保护作用, 因此, 不同烹饪方法中, 虾仁的 SO_2 脱除率均高于整虾。结合表 1 和表 2 可看出, 整虾和虾仁均在水煮、隔水蒸和微波烘烤 6 min 时感官评分最高, 油炸 2 min 时感官评分最高。4 种加工方式对整虾中 SO_2 的脱除率分别为水煮 30.10%、隔水蒸 16.30%、微波烘烤 13.90% 和油炸 7.20%; 4 种加工方式对虾仁中 SO_2 的脱除率分别为水煮 55.30%、隔水蒸 34.50%、微波烘烤 26.80% 和油炸 12.10%。

表 1 不同烹饪方法加工后整虾中 SO_2 残留率及感官评分

Tab.1 The sulfur dioxide residual rate and sensory score in the whole shrimp after cooking with different methods (Mean \pm SD)⁽¹⁾

时间 Time (min)	烹饪方式 Cooking modes							
	水煮 Boiling		隔水蒸 Steaming		微波烘烤 Microwave oven baking		油炸 Frying	
	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score
0	100	—	100	—	100	—	100	—
2	74.20 \pm 0.24*	6.01 \pm 0.21	93.90 \pm 0.31*	5.76 \pm 0.41	97.10 \pm 4.90*	5.67 \pm 0.36	92.80 \pm 0.84*	8.91 \pm 0.90
4	67.30 \pm 1.30*	7.11 \pm 0.42	86.70 \pm 1.24*	7.25 \pm 0.50	96.50 \pm 1.51	6.49 \pm 0.68	88.51 \pm 1.31*	6.41 \pm 0.51
6	69.90 \pm 0.14*	9.76 \pm 0.40	83.70 \pm 0.92*	9.23 \pm 0.52	86.10 \pm 5.21*	9.58 \pm 0.67	82.45 \pm 4.11*	3.98 \pm 0.45
8	56.40 \pm 0.82*	8.05 \pm 0.27	72.90 \pm 1.11*	5.29 \pm 0.33	71.90 \pm 3.19	5.37 \pm 1.21	72.60 \pm 3.02*	1.52 \pm 0.31

注: (1) 为 3 次重复的平均值和标准差, 残留率针对清洗后样品中 SO_2 残留量计算; (2)* 为与前一时间点相比, SO_2 残留率显著降低 ($P < 0.05$)。 (3) — 为未测量。下表同

Note: (1) The numerical value is the average and standard deviation of 3 repetitions, the residual rate was calculated for the SO_2 residue after cleaning; (2) * indicates a significant reduction ($P < 0.05$) in SO_2 residue compared with the previous time point; (3) — for not measured. The same as below

表 2 不同烹饪方法加工后虾仁中 SO_2 残留率及感官评分

Tab.2 The sulfur dioxide residual rate and sensory score in peeled fresh shrimp after cooking with different methods (Mean \pm SD)

时间 Time (min)	烹饪方式 Cooking modes							
	水煮 Boiling		隔水蒸 Steaming		微波烘烤 Microwave oven baking		油炸 Frying	
	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score	SO_2 残留率 SO_2 residual rate (%)	感官评分 Sensory score
0	100	—	100	—	100	—	100	—
2	61.80 \pm 0.41*	7.21 \pm 0.38	84.0 \pm 0.31*	5.98 \pm 0.63	80.60 \pm 2.41*	4.54 \pm 0.24	87.90 \pm 3.31*	8.73 \pm 0.69
4	55.30 \pm 0.36*	8.23 \pm 0.66	76.4 \pm 0.51*	7.56 \pm 0.89	72.00 \pm 3.20*	5.87 \pm 0.87	85.10 \pm 2.52*	7.01 \pm 1.01
6	44.70 \pm 0.72*	9.82 \pm 0.24	65.5 \pm 0.50*	9.04 \pm 0.41	73.20 \pm 2.89	8.27 \pm 0.52	71.30 \pm 3.06*	4.22 \pm 0.83
8	33.00 \pm 0.90*	6.95 \pm 0.51	55.6 \pm 1.23*	5.47 \pm 0.34	74.30 \pm 4.21	5.03 \pm 1.03	69.40 \pm 1.52*	1.30 \pm 1.42

2.2 风干温度和时长对虾肉中 SO_2 含量的影响

不同温度风干后, 虾肉中的水分含量和 SO_2 残留率见表 3。从表 3 可以看出, 随着风干时间的延长, SO_2 残留率呈先升高后降低的趋势, 温度越高, SO_2 的分解作用越强, 脱除越多。当水分含量达到 20% 时, 20 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 4 个风干温度得到虾

米成品中的 SO_2 的残留率分别为 132.00%、146.70%、78.25%、48.90%。低温风干不利于虾中 SO_2 残留量的消除。

2.3 烤虾加工时虾肉和虾壳中 SO_2 含量的变化情况

曾名勇等(1996)在研究珍珠烤虾的加工工艺中认为, 最佳烘烤温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至水分为 30%。60 $^{\circ}\text{C}$ 风

表 3 风干时虾肉中水分含量与 SO₂ 残留率(Mean±SD%)(¹)

Tab.3 The moisture content and sulfur dioxide residual rate in the shrimp meat during air drying (Mean±SD,%)

风干时间 Air drying time (h)	风干温度 Air drying temperature (°C)							
	20		40		60		80	
	水分含量 Moisture content	SO ₂ 残留率 SO ₂ residual rate	水分含量 Moisture content	SO ₂ 残留率 SO ₂ residual rate	水分含量 Moisture content	SO ₂ 残留率 SO ₂ residual rate	水分含量 Moisture content	SO ₂ 残留率 SO ₂ residual rate
0	73.65±0.28	100	73.65±0.28	100	73.65±0.28	100	73.65±0.28	100
4	67.40±0.31	102.00±2.71	54.40±0.33	169.10±2.03	45.70±0.53	111.40±2.77	30.10±0.17	57.50±1.62
8	60.40±0.24	139.80±2.61	42.50±0.35	184.50±2.69	25.40±0.18	95.50±3.91*	14.10±0.27	35.60±1.40*
12	45.10±0.30	194.30±1.14	20.30±0.15	148.20±3.51*	17.80±0.67	71.30±3.01*	-	-
16	37.50±0.31	178.20±2.71	14.90±0.41	124.70±2.41*	-	-	-	-
20	28.70±0.25	146.60±1.55*	-	-	-	-	-	-
40	16.40±0.42	128.40±1.02*	-	-	-	-	-	-

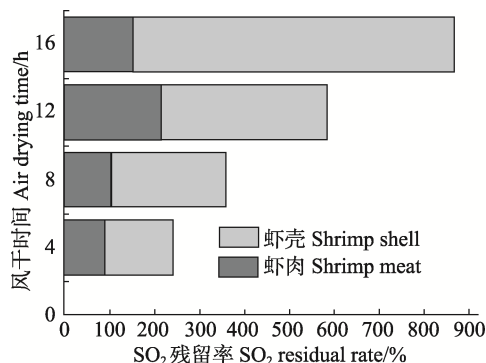
图 1 60℃风干过程中虾肉和虾壳中 SO₂ 残留率

Fig.1 The sulfur dioxide residual rate in the shrimp shell and meat during air drying at 60°C

干时, 虾肉和虾壳中 SO₂ 残留率见图 1。从图 1 可以看出, 在 60℃风干过程中, 虾肉和虾壳中 SO₂ 残留量随着风干时间的延长而增加, 这是因为水分的流失对 SO₂ 起到浓缩作用。虾肉中 SO₂ 残留率呈先升高后降低趋势, 虾壳中的 SO₂ 残留率则一直升高。

3 结论与讨论

3.1 不同烹饪方法对整虾和虾仁中 SO₂ 含量的影响

家庭烹饪可有效降低虾肉中 SO₂ 残留量, 脱除效果从强到弱分别为水煮 > 隔水蒸 > 油炸 > 微波烘烤, 对虾仁中 SO₂ 脱除率从 12.10%~55.31%不等, 罗书吉(2016)和李博雅等(2015)分别以茭白和黄花菜为研究对象, 同样证实了多种方式的家庭烹饪对食品中的 SO₂ 残留量有脱除作用。但是也不能无限延长烹饪的时间, 这是由于 SO₂ 不稳定, 在常温下容易分解, 周围温度升高和蒸汽的流动更能促进 SO₂ 挥发分解。建议消费者在烹饪海水虾时, 为更好地降低 SO₂ 残留风

险, 最好清洗去壳后, 采用水煮的方式烹饪。长时间的烹饪虽有可能达到更好脱除 SO₂ 的效果, 但会损害虾肉的口感, 因此, 烹饪时间不宜过长, 建议 4 种烹饪方式的时长分别为煮制、隔水蒸、微波烘烤 6 min, 油炸 2 min。

3.2 风干温度和时间对虾肉中 SO₂ 含量的影响

在风干过程中, 水分的流失对虾肉中 SO₂ 首先起到浓缩作用, 随着风干的进行, 高温和快速的空气流动促使 SO₂ 扩散到空气中, 对虾肉中 SO₂ 起到脱除作用。20℃常温风干至水分低于 20%时, SO₂ 残留率为 132.00%, 这是造成近年来虾米中 SO₂ 残留量超标严重的原因之一。生产者在生产过程中, 应注意掌握原料虾中 SO₂ 残留情况, 使收购原料符合相关标准, 必要时应对原料进行 SO₂ 含量测定并选择合适的生产工艺。

3.3 烤虾加工时虾肉和虾壳中 SO₂ 含量的变化情况

近年来, 国家食品药品监督管理局网站(2015)及山东省食品药品监督管理局网站(2015)发布的水产品不合格抽检信息中发现, 市售烤虾中 SO₂ 残留超标情况严重。结合实验分析, 主要原因如下: (1)烤虾所使用的原料多为海捕低值虾, 为保鲜而添加的亚硫酸盐较多(林倩英等, 1999); (2)烤虾制作过程添加的砂糖、人工甜味剂、味精调味料将自身的 SO₂ 代入(曾名勇等, 1996); (3)烤虾的原料虾在处理过程中只去除头和胸甲, 保留尾部的虾壳, 而在烤制过程中 SO₂ 极易在虾壳中浓缩。

在日常烹饪时, 消费者可通过选择脱壳、水煮或适当延长烹饪时间的方式来降低海水虾中 SO₂ 的残留量; 海水虾制品生产企业需要全面、系统地分析原料中 SO₂ 残留情况, 适当的选择加工工艺, 使之既能保

持良好的感官风味,又能有效降低成品中 SO₂ 残留超标的安全风险。

参 考 文 献

- Ağar A, Küçükataş V, Yargıçoğlu P, *et al.* The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status, and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, 39(2): 257–264
- Bernstein J, Alexis N, Bacchus H, *et al.* The health effects of non-industrial indoor air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 121(3): 585
- Bono G, Badalucco CV, Cusumano S, *et al.* Toward shrimp without chemical additives: A combined freezing-MAP approach. *Food Science Technology*, 2012, 46(1): 274–279
- China Food and Drug Administration. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0050/130741.html> [关于 89 批次不合格食品情况的通告(2015 年第 68 号)]
- Hu DM, Sun T, Xie J. Research progress on *Penaeus vannamei* preservation. *Food Science*, 2011, 32(13): 365–368 [胡冬梅, 孙涛, 谢晶. 南美白对虾保鲜剂研究进展. *食品科学*, 2011, 32(13): 365–368]
- Li BY, Zhou X, Dai YQ, *et al.* Processing effects of the sulfur dioxide content on day lily. *Food Science and Technology*, 2015(5): 110–113 [李博雅, 周忻, 戴蕴青, 等. 加工对黄花菜中二氧化硫含量的影响. *食品科技*, 2015(5): 110–113]
- Lin QY, Hong J. Study on processing technology for grilled shrimp of which catching from sea with low value. *China Fisheries*, 1999(11): 48–49 [林情员, 洪江. 利用海捕低值虾类加工珍珠烤虾的工艺研究. *中国水产*, 1999(11): 48–49]
- Luo SJ. Study on effect of processing on sulfur dioxide residues and dietary exposure assessment in *Zizania latifolia*. Master's Thesis of Hainan University, 2016 [罗书吉. 加工方式对茭白中二氧化硫残留的影响及其膳食暴露评估. 海南大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Lv HX, Cai F, Zou LF, *et al.* The effect of different cuisine ways and time on the nitrite content in dried small shrimps. *Modern Preventive Medicine*, 2014, 41(9): 1576–1578 [吕鸿鑫, 蔡奋, 邹立芬, 等. 烹饪方式与时间对虾皮亚硝酸盐含量的影响. *现代预防医学*, 2014, 41(9): 1576–1578]
- Meng ZQ, Zhang B, Qin GH. Oxidation damage of sulfur dioxide on various organs of mice. *Acta Scientiae Circumstantia*, 2001, 21(6): 769–773 [孟紫强, 张波, 秦国华. 二氧化硫对小鼠不同组织器官的氧化损伤作用. *环境科学学报*, 2001, 21(6): 769–773]
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. People's Republic of China aquatic industry standard. Dried peeled shrimp(SC/T3204–2012). 2013 [中华人民共和国农业部. 中华人民共和国水产品行业标准. 虾米(SC/T3204–2012). 2013]
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China (GB5009.34–2016). 2017 [中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中二氧化硫的测定(GB 5009.34–2016). 2017]
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Standard for uses of food additives (GB2760–2016). 2016 [中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准(GB 2760–2014), 2015]
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of moisture in foods (GB5009.3–2016). 2016 [中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中国国家标准化管理委员会. 食品中水分的测定(GB5009.3–2016). 2016]
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Supplementary notice about new food additives such as ascorbyl palmitate (enzymatic). <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201608/f06b07409beb4b798fb51e0f3042f99f.shtml>. 2016–08–03 [中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于抗坏血酸棕榈酸酯(酶法)等食品添加剂新品种的公告. <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201608/f06b07409beb4b798fb51e0f3042f99f.shtml>. 2016-08-03]
- Shandong Food and Drug Administration. http://www.sdfda.gov.cn/art/2015/6/2/art_1323_63682.html, 2016(6) [山东省食品安全监督抽检信息公告. http://www.sdfda.gov.cn/art/2015/6/2/art_1323_63682.html, 2016(6)]
- Sunyer J, Ballester F, Tertre AL, *et al.* The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital admissions for cardiovascular diseases in Europe (The Apehea-II study). *European Heart Journal*, 2003, 24(8): 752–760.
- Tan LY, Gong F, Lin LM, *et al.* Sulfite preservatives in shrimp preservation research. International symposium on technology and food safety standards AOAC Chinese conference proceedings, 2011, 104–108 [谭乐义, 龚方, 林黎明, 等. 亚硫酸盐保鲜剂在对虾保鲜中的应用研究. *食品安全技术与标准国际研讨会暨 AOAC 中国区会议论文集*, 2011, 104–108]
- Veli G, Ersel O, Levent A. Effects of packaging method and storage time on the chemical, microbiological, and sensory properties of Turkish pastirma—A dry cured beef product. *Meat Science*, 2008, 80(2): 335–344
- Xu H, Cheng YX, Zheng ZH, *et al.* Detection result and analysis of sulfur dioxide residue in shrimp. *Scientific Fish Farming*, 2014(9): 50 [徐慧, 程岩雄, 郑赵红, 等. 海水虾二氧化硫残留量检测结果分析. *科学养鱼*, 2014(9): 50]
- Xu H, Cheng YX, Zheng ZH, *et al.* Study on comparison of sulfur dioxide residues in shrimp after different pretreatments. *Food Research and Development*, 2015, 36(13): 20–22 [徐慧, 程岩雄, 郑赵红, 等. 不同预处理后海水虾二氧化硫残留量比较的研究. *食品研究与开发*, 2015, 36(13): 20–22]
- Zeng MY, Qin PH. Processing technology for Foasted shrimp. *Fishery Modernization*, 1996(5): 18–19 [曾名勇, 秦培华.

珍珠烤虾的加工工艺. 渔业现代化, 1996(5): 18–19]
Zhuo HL, Liu H, Shentu JK, *et al.* Comparison of effect of 4
fresh-tress-preserving agents and 3 methods of application

on preservation of sea prawn. Chinese Journal Food Hygiene,
2007, 19(3): 228–233 [卓华龙, 柳海, 申屠基康, 等. 海水虾
保鲜效果的比较. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 228–233]

(编辑 陈严)

Effects of Processing Methods on the Content of Sulfur Dioxide in Shrimp and Its Products

HE Liu^{1,2#}, GUO Yingying^{1#}, WANG Lianzhu^{1①}, ZHU Wenjia¹, LIU Fen^{1,3}, YANG Zhenzhen^{1,3}

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Laboratory of
Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China,
Qingdao 266003; 3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Excessive sulfur dioxide (as residual SO₂) residue is currently one of the main factors affecting the quality and safety of shrimp and its products. In the study, the effects of processing methods such as boiling, steaming, microwave oven baking, frying and air drying on SO₂ residue in sea shrimp were studied. The findings were described as follows. Using appropriate cooking methods, such as boiling, steaming, microwave oven baking and frying could remove SO₂ residue to certain extents. Different kinds of cooking mode had different eliminating effects on SO₂ residue in shrimp, and the order of eliminating effect was that boiling > steaming > microwave oven baking > frying. The SO₂ residue in shrimp meat increased first and then decreased in the process of air drying, with the higher temperature, there was better eliminating effect. Under the conditions of air drying at 20°C, 40°C, 60°C and 80°C, the residual rate of SO₂ in dried peeled meat were 132.00%, 146.70%, 78.25% and 48.90% respectively, when the moisture content was in accordance with the standard of dried peeled shrimp. The air drying methods at normal temperature in most dried peeled shrimp production went against the elimination of SO₂. Shell peeling treatment could effectively reduce SO₂ residue in shrimp during the production of dried peeled shrimp and roasted shrimp. The results will provide scientific basis for the control of SO₂ residue in the shrimp, and help the consumers and producers of shrimp industry reduce the risk of SO₂ residue by proper processing methods.

Key words Sulfur dioxide; Shrimp; Residue amount; Cooking modes

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》加入中国知网 《中国学术期刊（网络版）》



录用定稿网络首发征稿启事

为了以规范的网络期刊出版方式更快更好地确立作者的科研成果首发权,全面提高学术论文的传播效率和利用价值,本刊现已与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司(简称电子杂志社)签署《CAJ-N 网络首发学术期刊合作出版协议》,通过《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)正式出版本刊网络版。从 2018 年 1 月 1 日起,凡经本刊审定录用的稿件(录用定稿)均将首先在本刊网络版上首发,后视编排情况发布排版定稿和整期汇编定稿,最后由本刊印刷版出版。针对本刊数字出版转型情况,特发布录用定稿网络首发征稿启事。

来稿要求详见本刊的《投稿指南》。为规范录用定稿发布版式,本刊对稿件的排版格式作如下规定:来稿为 WORD 格式,条目齐全,通栏版式,单倍行距,详见期刊网站中的“文章格式参考模板”、“图表的写作要求”、“参考文献的要求”。

录用定稿网络首发之后,在后续的排版定稿、整期汇编定稿网络版和印刷版中,**不得修改论文题目、作者署名、作者单位、资助课题以及学术内容,只可基于编辑规范进行少量文字的修改。**

CAJ-N 是国家新闻出版广电总局批准创办、国家教育部主管、清华控股有限公司主办、《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司出版的由我国各类学术期刊组成的连续型网络出版物,每篇网络首发论文将被赋予一个唯一的国际 DOI 编码,而且在版本变动中,其 DOI 维持不变。按国家有关网络连续型出版物管理规定,网络首发论文视为正式出版论文,本刊编辑部与电子杂志社共同为论文作者颁发《论文网络首发证书》,作为正式发表的论文提交人事、科研管理等有关部门。

竭诚欢迎海内外专家、学者来稿!

通信地址:山东省青岛市南京路 106 号黄海水产研究所编辑部(1 号楼 312 室)

网 址: <http://journal.yykxjz.cn>

电子信箱: yykxjz@ysfri.ac.cn

联系电话: 0532-85833580

2018 年 1 月 1 日

《渔业科学进展》编辑委员会

THE 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 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	包振民 BAO Zhenmin	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	李健 LI Jian	李军(美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美国)CHEN Yong
林洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐跑 XU Pao
徐皓 XU Hao	黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 李健 LI Jian 孔杰 KONG Jie

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第39卷 第1期 2018年2月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.39 No.1 Feb. 2018

主管单位	中华人民共和国农业部	Administrated by	Ministry of Agriculture, 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.yyqxjz.cn E-mail: yyqxjz@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.yyqxjz.cn; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn
主编	唐启升	Editor-in-Chief	Tang Qisheng
印刷	青岛国彩印刷有限公司	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	中国国际图书贸易总公司 地址: 北京339信箱 邮编: 100044	Overseas Distributed by	China International Book Trading Corporation P.O.Box 399, Beijing 100044, 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

ISSN 2095-9869



9 772095 986187