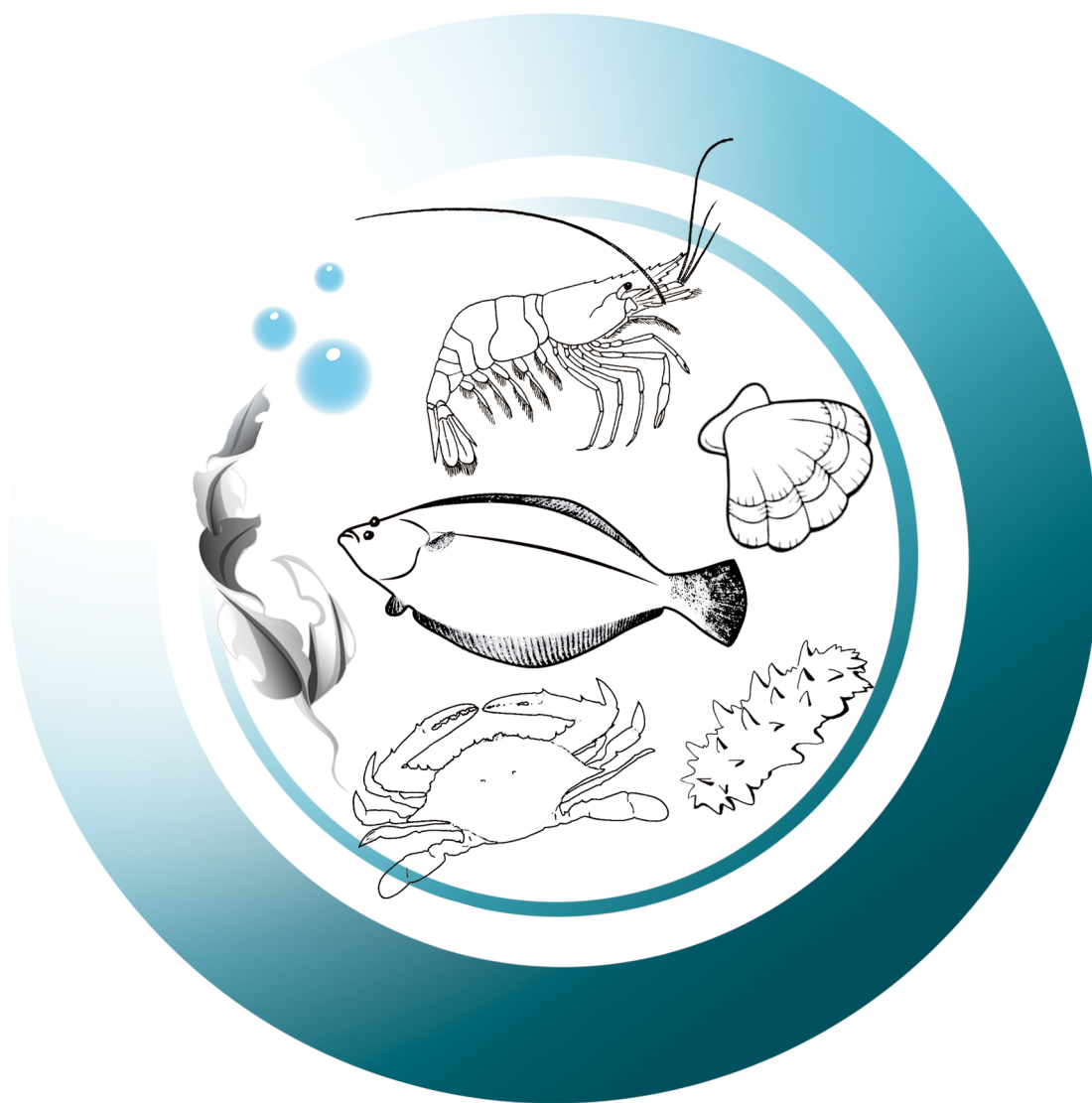


# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第39卷 VOL.39 第2期 NO.2



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 2 期

2018 年 4 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

- 近 30 年渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替 ..... 卞晓东 万瑞景 金显仕 单秀娟 关丽莎 (1)  
渤海夏季甲壳类群落结构的年际变化 ..... 吴 强 李忠义 王 俊 单秀娟 金显仕 (16)  
海洋暖化和酸化对黄姑鱼早期生长发育的影响 ..... 姚建平 单秀娟 陈云龙 魏秀锦 (24)

### 研究论文

- 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区生态环境质量分析与评价 ..... 滕 瑶 陈碧鹃 夏 斌 曲克明 冯 娟 崔正国 张旭志 丁东生 (34)  
三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈养殖水质的净化效果 ..... 康传磊 李秋芬 张 艳 陈世波 王 越 (42)  
牙鲆 *tyrp1a* 和 *tyrp1b* 的鉴定及 *tyrp1a* 与 *mmu-miR-143-5p\_R+2* 的调控关系 ..... 王若青 王 娜 王仁凯 陈松林 (49)  
短期温度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响 ..... 刘 玲 陈 超 李炎璐 刘 莉 陈建国 李文升 马文辉 (59)  
云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代染色体核型分析 ..... 成美玲 田永胜 吴玉萍 李振通 张晶晶 王林娜 李文升 马文辉 王晓梅 翟介明 李 波 (67)  
翘嘴鲈主要形态性状与体重的相关性及雌雄形态性状差异分析 ..... 董浚键 孙成飞 田园园 曾庆凯 师红亚 卢迈新 叶 星 (76)  
饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长、体组成及消化酶活力的影响 ..... 公绪鹏 李宝山 张利民 张 燕 王际英 (85)  
维生素 C 对圆斑星鲈早期发育的影响 ..... 王贞杰 叶保民 常 青 陈四清 刘长琳 胡建成 王志军 (96)  
中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析 ..... 王 军 王清印 孔 杰 孟宪红 曹家旺 王明珠 冯亚萍 吕 丁 (104)  
中国明对虾 FBA 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析 ..... 史晓丽 孟宪红 孔 杰 栾 生 罗 坤 曹宝祥 曹家旺 陈宝龙 (112)  
不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑综合征病毒(WSSV)耐受性比较 ..... 冯亚萍 孔 杰 罗 坤 栾 生 李旭鹏 史晓丽 曹家旺 王明珠 王 军 董丽君 孟宪红 (120)  
2015 年中国典型对虾养殖区 WSSV 流行株高变异区序列的分析比较 ..... 秦梦雪 孙新颖 万晓媛 刘庆慧 黄 捷 (128)  
凡纳滨对虾网格重链蛋白与 WSSV 结构蛋白在体外的相互作用 ..... 王中一 刘庆慧 黄 捷 (138)  
三疣梭子蟹 *Toll4* 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析 ..... 张 杰 吕建建 刘 萍 李 健 王竹青 张小辉 (146)  
三疣梭子蟹线粒体基因组 SNP 在增殖放流家系识别中的应用 ..... 赵 莲 李志辉 张 培 薛 蓓 赖晓芳 张庆起 高 焕 阎斌伦 (156)  
西非沿岸乌贼角质颚形态及生长特征 ..... 瞿俊跃 李建华 陈 芑 陈新军 靳 楠 (164)  
反相高效液相色谱法测定褐藻中岩藻黄素的含量 ..... 刘小芳 蒋永毅 侯钦帅 苗钧魁 冷凯良 (171)  
海参中单糖检测方法的建立及含量测定 ..... 刘 芬 孙晓杰 朱文嘉 郭莹莹 何 柳 杨祯祯 王媛媛 文艺晓 王联珠 (177)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.39 No.2 April 2018

Ichthyoplankton Succession and Assemblage Structure in the Bohai Sea During the Past 30 Years Since the 1980s .....	(1)
..... BIAN Xiaodong, WAN Ruijing, JIN Xianshi, SHAN Xiujuan, GUAN Lisha	
Inter-Annual Variation in the Community Structure of Crustaceans in the Bohai Sea During Summer .....	(16)
..... WU Qiang, LI Zhongyi, WANG Jun, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi	
Effects of Ocean Warming and Acidification on the Growth and Development of <i>Nibeal albiflora</i> Richardson During Its Early Life History .....	(24)
..... YAO Jianping, SHAN Xiujuan, CHEN Yunlong, WEI Xiujin	
Ecological Environment Quality Analysis and Evaluation of <i>Trachidermus fasciatus</i> Heckel in Jinghai Bay National Germ Plasm Resource Area .....	(34)
..... TENG Yao, CHEN Bijuan, XIA Bin, QU Keming, FENG Juan, CUI Zhengguo, ZHANG Xuzhi, DING Dongsheng	
Purifying Effect of Three Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacteria Strains on the Farming Water of <i>Verasper variegates</i> .....	(42)
..... KANG Chuanlei, LI Qiufen, ZHANG Yan, CHEN Shibo, WANG Yue	
The Identification of <i>tyrp1a</i> and <i>tyrp1b</i> in Japanese Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) and the Regulation Study of <i>tyrp1a</i> and mmu-miR-143-5p_R+2 .....	(49)
..... WANG Ruoping, WANG Na, WANG Renkai, CHEN Songlin	
Effects of Short-Term Temperature Stress on Antioxidant and Digestive Enzymes of Hybrid Progeny ( <i>Cromileptes altivelis alenciennes</i> ♀ × <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂) .....	(59)
..... LIU Ling, CHEN Chao, LI Yanlu, LIU Li, CHEN Jianguo, LI Wensheng, MA Wenhui	
Chromosome Karyotype Analysis of Hybrids of <i>Epinephelus moara</i> ♀ × <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂ .....	(67)
..... CHENG Meiling, TIAN Yongsheng, WU Yuping, LI Zhentong, ZHANG Jingjing, WANG Linna, LI Wensheng, MA Wenhui, WANG Xiaomei, ZHAI Jieming, LI Bo	
Correlation Analysis of the Main Morphological Traits and Body Weight of Mandarin Fish ( <i>Siniperca chuatsi</i> ) and Morphological Traits Between Males and Females .....	(76)
..... DONG Junjian, SUN Chengfei, TIAN Yuanyuan, ZENG Qingkai, SHI Hongya, LU Maixin, YE Xing	
Effects of Dietary Protein and Energy Levels on Growth, Body Composition and Digestive Enzymes Activities of Juvenile Hybrid Grouper, <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂ × <i>E. moara</i> ♀ .....	(85)
..... GONG Xupeng, LI Baoshan, ZHANG Limin, ZHANG Yan, WANG Jiyong	
Effects of Vitamin C on Early Development of Spotted Halibut ( <i>Verasper variegatus</i> ) .....	(96)
..... WANG Zhenjie, YE Baomin, CHANG Qing, CHEN Siqing, LIU Changlin, HU Jiancheng, WANG Zhijun	
SSR Analysis on Genetic Diversity in Breeding and Wild Populations of <i>Fenneropenaeus chinensis</i> .....	(104)
..... WANG Jun, WANG Qingyin, KONG Jie, MENG Xianhong, CAO Jiawang, WANG Mingzhu, FENG Yaping, LÜ Ding	
cDNA Cloning of the FBA Gene in <i>Fenneropenaeus chinensis</i> and Its Expression and Functional Analysis After WSSV Infection .....	(112)
..... SHI Xiaoli, MENG Xianhong, KONG Jie, LUAN Sheng, LUO Kun, CAO Baoxiang, CAO Jiawang, CHEN Baolong	
The Difference of Tolerance to White Spot Syndrome Virus Between <i>Litopenaeus vannamei</i> and <i>Fenneropenaeus chinensis</i> at Different Temperatures .....	(120)
..... FENG Yaping, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng, LI Xupeng, SHI Xiaoli, CAO Jiawang, WANG Mingzhu, WANG Jun, DONG Lijun, MENG Xianhong	
Variable Sequence Comparison of WSSV Regions from Different Parts of China in 2015 .....	(128)
..... QIN Mengxue, SUN Xinying, WAN Xiaoyuan, LIU Qinghui, HUANG Jie	
<i>In vitro</i> Interaction Between Domain of Clathrin Heavy Chain in <i>Litopenaeus vannamei</i> and WSSV Structural Proteins .....	(138)
..... WANG Zhongyi, LIU Qinghui, HUANG Jie	
Cloning of <i>Toll4</i> in <i>Portunus trituberculatus</i> and Its Expression in Responding to Pathogenic Infection and Low Salinity Stress .....	(146)
..... ZHANG Jie, LÜ Jianjian, LIU Ping, LI Jian, WANG Zhuqing, ZHANG Xiaohui	
Identification on Stock Enhancement Pedigrees of the Swimming Blue Crab <i>Portunus trituberculatus</i> Using mtDNA SNPs .....	(156)
..... ZHAO Lian, LI Zhihui, ZHANG Pei, XUE Bei, LAI Xiaofang, ZHANG Qingqi, GAO Huan, YAN Binlun	
The Morphology and Growth Characteristics of Beaks of European Common Cuttlefish ( <i>Sepia officinalis</i> ) in the Coast of West Africa .....	(164)
..... QU Junyue, LI Jianhua, CHEN Peng, CHEN Xinjun, JIN Nan	
Determination of Fucoxanthin in Brown Seaweed Samples by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography .....	(171)
..... LIU Xiaofang, JIANG Yongyi, HOU Qinshuai, MIAO Junkui, LENG Kailiang	
Establishment and Determination of Monosaccharide in Sea Cucumber .....	(177)
..... LIU Fen, SUN Xiaojie, ZHU Wenjia, GUO Yingying, HE Liu, YANG Zhenzhen, WANG Yuanyuan, WEN Yixiao, WANG Lianzhu	

DOI: 10.19663/j.issn2095-986.20170911001

http://www.ykxjz.cn/

卞晓东, 万瑞景, 金显仕, 单秀娟, 关丽莎. 近30年渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 1-15  
Bian XD, Wan RJ, Jin XS, Shan XJ, Guan LS. Ichthyoplankton succession and assemblage structure in the Bohai Sea during the past 30 years since the 1980s. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 1-15

# 近 30 年渤海鱼类种群早期补充群体 群聚特性和结构更替\*



卞晓东<sup>1,2</sup> 万瑞景<sup>1</sup> 金显仕<sup>1,2①</sup> 单秀娟<sup>1,2</sup> 关丽莎<sup>1</sup>

(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** 基于 30 余年渤海鱼卵、仔稚鱼历史调查资料的整理分析并结合产卵场补充调查,以 1982~1983 年周年逐月调查资料为本底,采用多元统计学方法分析 30 余年渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性(物种多样性和关键种群)的季节变化和年代际变化,并掌握结构更替过程中优势种和重要种协同消长规律。分析结果显示,渤海各调查季节(冬季除外)鱼卵、仔稚鱼种类数以及资源丰度指数呈先降后升变动趋势。当前鱼卵种类数仅为 20 世纪 80 年代 1/2 左右,资源丰度不足 20 世纪 80 年代的 1/10;仔稚鱼种类数和资源丰度仅为 20 世纪 80 年代的 3/4 左右,但冬季仔稚鱼种类数和资源丰度指数呈现上升趋势。各调查时期相同季节鱼卵优势种变化不明显,但仔稚鱼优势种变化幅度超过鱼卵,底层重要经济种类早期补充群体优势度急剧下降;鱼卵和仔稚鱼物种多样性水平在升温季节较高而在降温季节较低,调查期内各季主要呈现先降后升变动趋势。鱼类早期补充群体种类更替现象明显,近年来种类更替率呈现明显加快趋势。各调查时期相同季节各适温类型产卵亲体种数均呈现先降后升变动趋势,但各适温类型种数所占比例和全年综合各适温类型种数所占比例基本稳定。各调查时期相同季节各主要栖所类型产卵亲体种类数也均呈现先降后升变动趋势,全年综合陆架浅水中上层鱼类种数所占比例升高,中底层和底层鱼类所占比例有所下降。近 30 年在多重外来干扰作用下,渤海鱼类早期补充过程各个关键环节已随其栖息地(产卵场)生境要素发生不可逆变化或变迁。渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替是环境-捕捞胁迫下鱼类群落内多重生态位的交替失调和渔业资源结构性衰退的具体表现。

**关键词** 渤海; 鱼卵仔稚鱼; 早期补充; 群聚特性; 结构更替; 年际变化  
**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0001-15

渤海属半封闭型的浅海,包括辽东湾、渤海湾和 莱州湾 3 个海湾,中部存在浅滩地形,其南、北、西

\* 国家重点基础研究发展规划项目(2015CB453302)、国家自然科学基金项目(41506168)、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 Key Basic Research Program of China (2015CB453302), the National Natural Science Foundation of China (41506168), the Special Fund of the Taishan Scholar Project and the “Aoshan Talent” Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology 2017ASTCP-ES07] 卞晓东, E-mail: bianxd@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2017-09-11, 收修改稿日期: 2017-11-14



三面环陆,仅在东部通过渤海海峡与黄海相连,平均水深 18 m。注入渤海的河流有黄河、海河、滦河和辽河等,其中黄河的年径流量几乎占到了 1/2(马伟伟等, 2016)。渤海曾是数十种重要经济渔业生物的繁衍生息地,生物资源量丰富,是我国的“战略鱼仓”;“三湾一河口”是集产卵场、育幼场和渔场于一体的关键栖息地(金显仕等, 2015)。渤海渔业资源种群早期发生量和补充量直接影响到渤海乃至黄海渔业资源动态及其可持续产出(金显仕等, 1998)。

渔业种群早期生活史阶段是其生命中最脆弱、对栖息环境变化敏感性最强的阶段,小规模环境变化也可能对其资源补充过程产生剧烈影响(Houde, 1987)。多重外来干扰作用下,渤海鱼类早期补充过程各个关键环节已随其栖息地(产卵场)生境要素发生不可逆变化或变迁。如大规模环湾围填海工程和临港工业区的建设,造成湿地、滩涂和海湾等鱼虾蟹贝的栖息地大量消失,甚至改变区域性海域的水动力条件和自净能力,进而影响补充群体的分散输运动力学基础;陆源污染物入海总量呈波动式上升趋势,多数近海水域受到不同程度的营养盐、重金属、持续性有机污染物和新型污染物等污染,以“三湾一河口”的污染尤为严重;黄河、辽河、海河等大河径流的减少等,更是严重改变了河口生态环境;另外,大规模海水养殖既直接占用了渔业生物的栖息地和饵料基础,引起滩涂、湿地、海草床等生境的改变,并加剧近海水域富营养化,引发赤潮等生态灾害(金显仕等, 2015)。特别是海洋生物资源的高强度捕捞,破坏了生物资源的自我更新机制,导致生物群落内多重生态位交替失调和渔业资源衰退(朱鑫华等, 2002; 唐启升等, 2013)。

从 20 世纪 50 年代开始,黄海水产研究所开展了渤海鱼卵、仔稚鱼的监测调查工作。当时调查对象主要为小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)等经济种类;1964~1981 年在开展渤海中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)产卵场调查时也坚持收集过鱼卵、仔稚鱼资料(姜言伟等, 1988)。此后,尤以 1982~1983 年的周年逐月调查(姜言伟等, 1988)和 1992~1993 年的周年季度月调查较为全面(万瑞景等, 1998)。进入 21 世纪,特别是 2013~2017 年,黄海水产研究所执行的多项科研项目,又在渤海进行了多轮周年季度月调查。30 余年渤海各类调查积累了大量翔实的鱼卵仔稚鱼资料。本研究拟基于历史调查资料,结合近年来渤海产卵场调查结果,以 1982~1983 年周年调查资料为本底,探讨环境-捕捞胁迫下渤海

鱼类种群早期补充群体时序分布规律,为保护和修复渔业种群早期生活史关键栖息地提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

黄海水产研究所 1982 年 4 月~1983 年 5 月进行的周年逐月渤海渔业资源增殖基础调查(姜言伟等, 1988);1992 年 8 月、10 月和 1993 年 2 月、5 月下旬至 6 月上旬 4 个航次渔业资源监测调查(万瑞景等, 1998);2013~2014 年、2014~2015 年、2015~2016 年以及 2016~2017 年进行的多轮周年季度月渔业资源监测调查中,鱼卵仔稚鱼调查均为主要内容之一,其与资源底拖网调查和渔场环境调查同步进行。本研究采用不同调查时期渤海鱼卵仔稚鱼采样站位及时间见表 1 和图 1。

鱼卵、仔稚鱼样品采集用口径 80 cm、长 270 cm、38 GG 筛绢制成大型浮游生物网,采用水平拖网,每站表层拖网 10 min,拖曳速度为 2 n mile/h。标本用 5%海水福尔马林溶液固定。实验室内从大型浮游生物网采集样品中挑出鱼卵和仔稚鱼。样品全样本分析,体视显微镜下经形态学鉴定并反复核实,确认至每一物种单元,并按种类及其发育阶段分别记录个体数。发育阶段包括卵(分裂期、原肠期、胚胎期、孵化期、死卵)和仔稚幼鱼(前期仔鱼、后期仔鱼、稚鱼和幼鱼)。

### 1.2 鱼卵仔稚鱼生态密度和种类数

本研究所用生态密度为个体数生态密度(Ecological density of number)。不同调查时期鱼卵生态密度取黄渤海区主要产卵季节 5~8 月数据来计算;仔稚鱼生态密度则取周年调查各月数据来计算。在数据整理过程中,由于水平拖网速度难以严格控制,为便于同质比较和数据质量控制,样品定量分析时以每站每网的实际鱼卵仔稚鱼(粒、尾)作为指标进行比较(姜言伟等, 1988; 万瑞景等, 1998)。因不同时期各月调查站位和数量不同,以 1982~1983 年调查结果作为本底(效应值为 1),采用 R 中的 GLM 模型(Generalized linear model, 广义线性模型),考虑捕捞努力量的空间分布(渔区)和数据尺度特征(季节),分别对鱼卵或仔稚鱼生态密度进行标准化,以构建资源丰度指数(Abundance index)指示鱼卵、仔稚鱼生态密度(官文江, 2015)。鱼卵或仔稚鱼种类数则为考察期出现鱼卵或仔稚鱼物种数。

表 1 不同调查时期渤海鱼卵仔稚鱼采样时间、区域和站位数  
Tab.1 Survey time, area and number of sampling stations in the Bohai Sea in different survey periods

年份 Year	调查站位数和时间(月-日) The number of sampling stations and survey time (month-day)				
	春季 Spring	春-夏季 Spring-Summer	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
1982~1983	67 05-06~05-19	71 06-07~06-17	78 08-05~08-25	74 10-07~10-25	32 01-28~02-05
1992~1993	—	57 05-25~06-07	55 08-08~08-18	59 10-07~10-21	30 02-15~02-21
2013~2014	56 05-17~05-26	52 06-18~06-26	49 08-10~08-20	50 10-13~10-31	51 02-23~03-05
2014~2015	52 05-17~05-26	52 06-15~06-24	49 08-13~08-22	50 10-09~10-24	45 01-09~01-20
2015~2016	98 05-17~05-30	98 06-13~06-25	98 08-05~08-17	—	41 01-09~02-08
2016~2017	98 05-16~05-26	98 06-18~06-28	98 08-02~08-12	90 10-13~10-26	55 12-15~12-24

注: “—”空值

Note: ‘—’ means no data

### 1.3 不同调查时期各季节鱼卵仔稚鱼优势种类和重要种类

运用 Pinkas 相对重要性指数[Index of relative importance, IRI, (1)](Pinkas *et al.*, 1971)对每航次调查过程中出现鱼卵和仔稚鱼种类组成分别进行分析,以确定鱼卵或仔稚鱼优势种类(Dominant species)、重要种类(Important species)和主要种类(Main species)的成分;

$$IRI = (N\% + W\%) \cdot F\% \quad (1)$$

$$IRI = N\% \cdot F\% \quad (2)$$

式(1)中  $N\%$ 为每航次调查过程中某种鱼卵或仔稚鱼个体数量占鱼卵或仔稚鱼总量比例;  $W\%$ 为每航次调查过程中某种鱼卵或仔稚鱼生物量比例。由于鱼卵和仔稚幼鱼个体都很小,因此不考虑生物量,只考虑个体数量这一因素,IRI的计算公式可以简化为式(2)(卞晓东等, 2010)。取 IRI 值大于 1000 种类定义为鱼卵或仔稚鱼优势种; 鱼卵重要种类 IRI 值为 500~1000, 仔稚鱼重要种类 IRI 值为 350~1000。

### 1.4 不同调查时期各季节鱼卵仔稚鱼物种多样性水平及其种类更替

采用  $\alpha$  多样性测度方法—香农-威纳指数 [Shannon-Wiener index,  $H'(3)$ ] 和辛普森多样性指数 [Simpson's diversity index,  $D_S(4)$ ] 研究渤海不同调查时期各季节鱼卵和仔稚鱼物种多样性; 采用  $\beta$  多样性测度方法—Jaccard 群落种类组成相似性指数 [Coefficient of community, CC (5)] 比较各年间鱼类早期补充群体(鱼卵仔稚鱼种数合并计数)种类相似程度(Whittaker, 1972)。

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad (3)$$

$$D_S = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad (4)$$

$$CC = S_s / (S_j + S_k - S_s) \quad (5)$$

式(3)和式(4)中  $S$  为不同调查时期各季节鱼类早期补充群落中出现的鱼卵或仔稚鱼种类数,  $P_i$  为群落中第  $i$  种鱼卵或仔稚鱼所占鱼卵或仔稚鱼总量的个体比例。式(5)中  $S_s$  为 2 个比较年份间鱼类早期补充群体共有种类数,  $S_j$  和  $S_k$  为 2 个比较年份各自拥有种数。当 CC 为 0~0.25 时, 群落之间极不相似; 当 CC 为 0.25~0.50 时, 群落之间中等不相似; 当 CC 为 0.50~0.75 时; 群落之间中等相似; 当 CC 为 0.75~1.00 时, 群落之间极相似。

### 1.5 产卵亲体适温类型和栖所类型分析

根据鱼类区系分类的有关文献索引(田明诚等, 1993)将产卵亲体的适温类型划分为暖温种(Warm temperate species, WT), 暖水种(Warm water species, WW)和冷温种(Cold temperate species, CT)。根据刘静等(2011)将渤海产卵亲体栖所类型划分为大陆架浅水底层鱼类(Continental shelf demersal fish, CD), 大陆架岩礁性鱼类(Continental shelf reef-associated fish, CRA), 大陆架浅水中上层鱼类(Continental shelf pelagic-neritic fish, CPN), 大陆架浅水中底层鱼类(Continental shelf benthopelagic fish, CBD), 大陆架大洋洄游性中上层鱼类(Oceanic pelagic fish, OEP)和大洋深水底层鱼类(Oceanic bathydemersal fish, OMP)。

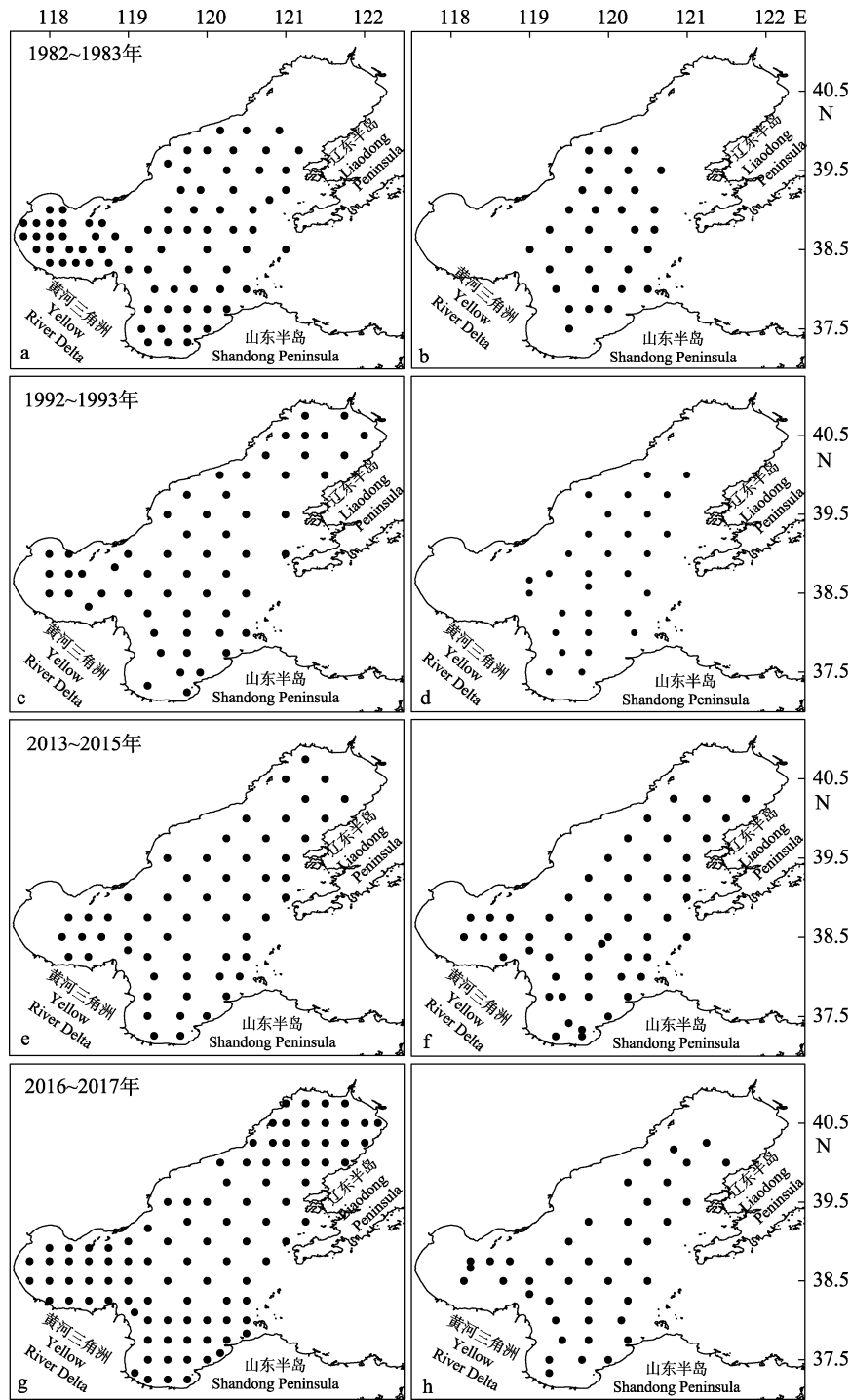


图 1 不同调查时期渤海鱼卵、仔稚鱼采样区域和站位

Fig.1 Survey area and sampling stations in the Bohai Sea in different survey periods

a, b: 1982~1983 年站位(a为 1982 年 5 月、6 月、8 月、10 月;b 为 1983 年 1~2 月); c, d: 1992~1993 年站位(c 为 1992 年 8 月、10 月, 1993 年 5~6 月;d 为 1993 年 2 月); e, f: 2013~2015 年站位(e 为 2013 年 5 月、6 月、8 月、10 月及 2014 年 5 月、6 月、8 月、10 月; f 为 2014 年 2~3 月, 2015 年 2 月); g, h: 2015~2017 年站位(g 为 2015 年 5 月、6 月、8 月和 2016 年 5 月、6 月、8 月、10 月; h 为 2016 年 1 月、12 月)

a, b: Sampling stations in 1982~1983 (a: May, June, August and October in 1982; b: January~February in 1983);

c, d: Sampling stations in 1992~1993 (c: August and October in 1992 and May~June in 1993; d: February in 1993);

e, f: Sampling stations in 2013~2015 (e: May, June, August and October in 2013 and 2014; f: February~March in 2014 and February in 2015); g, h: Sampling stations in 2015~2017 (g: May, June and August in 2015 and 2016, October in 2016; h: January and December in 2016)

## 2 结果

### 2.1 渤海各调查时期不同季节鱼卵、仔稚鱼种类数和生态密度

近 30 年来, 渤海各调查季节鱼卵种类数(冬季除外)和资源生态密度与 1982~1983 年相比均呈现不同程度下降, 在春和春夏季均呈现先降后升格局(图 2a, 图 2b)。渤海主要产卵季节(5 月、6 月和 8 月)鱼卵种数由 1982~1983 年的 38 种, 逐次下降到 2015~2016 年的 18 种(不足 1982~1983 年的 1/2), 在 2016~2017 年调查中鱼卵种类数小幅回调至 26 种(图 3a)。1982~1983 年鱼卵资源丰度指数为 1, 1992~1993 年跃升为 3.09, 进入 2010 年后, 鱼卵资源丰度指数急剧下跌, 近年来一直维持在 0.05~0.09 水平(图 3a), 当前鱼卵资源丰度不足 1982~1983 年的 1/10。渤海各调查时期不同季节出现仔稚鱼种类数和资源生态密度在春季、春夏季、秋季均呈现先降后升格局; 而在冬季则均呈现明显的增加趋势(图 2c, 图 2d)。渤海仔稚鱼种数则由 1982~1983 年的 52 种(其中虾虎鱼类 3 种), 下降

到 2014~2015 年的 25 种(种类数不足 1982~1983 年的 1/2), 随后上升至 2016~2017 年的 40 种(其中虾虎鱼类 9 种; 图 3b)。仔稚鱼资源丰度指数 1982~1983 年为 1, 在 1992~1993 年指数上升为 1.087, 此后仔稚鱼资源丰度指数急剧下跌, 近年来则维持在低位(0.679~0.761; 图 3b), 当前仔稚鱼资源丰度不足 1982~1983 年的 3/4。

### 2.2 渤海各调查时期不同季节鱼卵仔稚鱼优势和重要种类

各调查季节鱼卵优势种变化不明显, 在增温季节(5 月、6 月)优势种类为暖温性 CPN 鱼类, 1982~1983 年为青鳞沙丁鱼(*Sardinella zunasi*)、斑鰾(*Konosirus punctatus*)和鳀鱼(*Engraulis japonicas*) 3 种, 1992~1993 年是鳀鱼大暴发年, 鳀鱼优势度显著提高, 成为唯一优势种类; 进入 2010 年, 仍然以鳀鱼为优势种类(2013~2015 年), 2016~2017 年 CD 和 CBD 鱼类如鲷(*Platycephalus indicus*)、叫姑鱼(*Johnius grypotus*)和短吻红舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)优势度均显著提

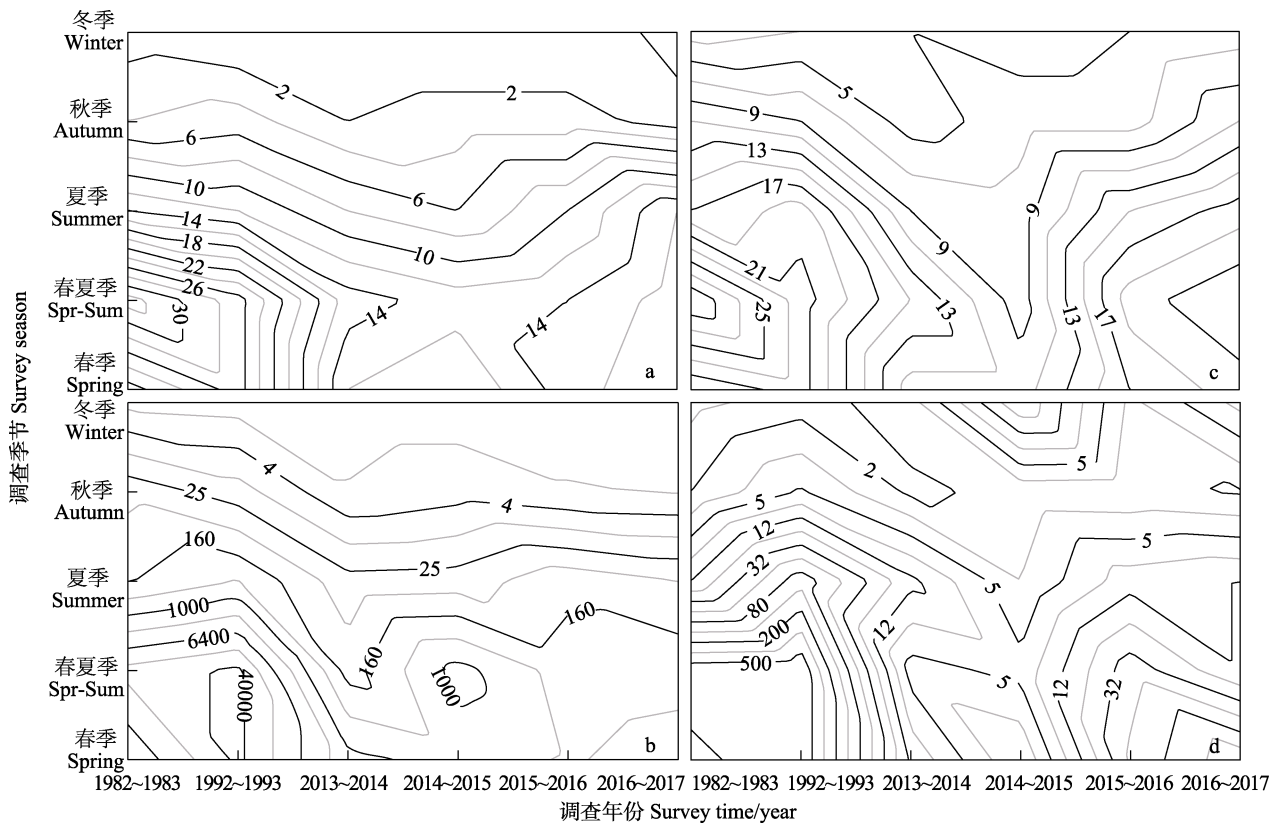


图 2 渤海各调查时期不同季节鱼卵、仔稚鱼种类数和生态密度概况

Fig.2 Number of species and ecological density to fish eggs and larvae profiles along the survey season across different survey times

- a: 鱼卵种类; b: 鱼卵生态密度(粒/网); c: 仔稚鱼种类; d: 仔稚鱼生态密度(尾/网)
- a: Number of egg species; b: Ecological density of fish eggs (ind/haul);
- c: Number of larvae species; d: Ecological density of fish larvae (ind/haul)

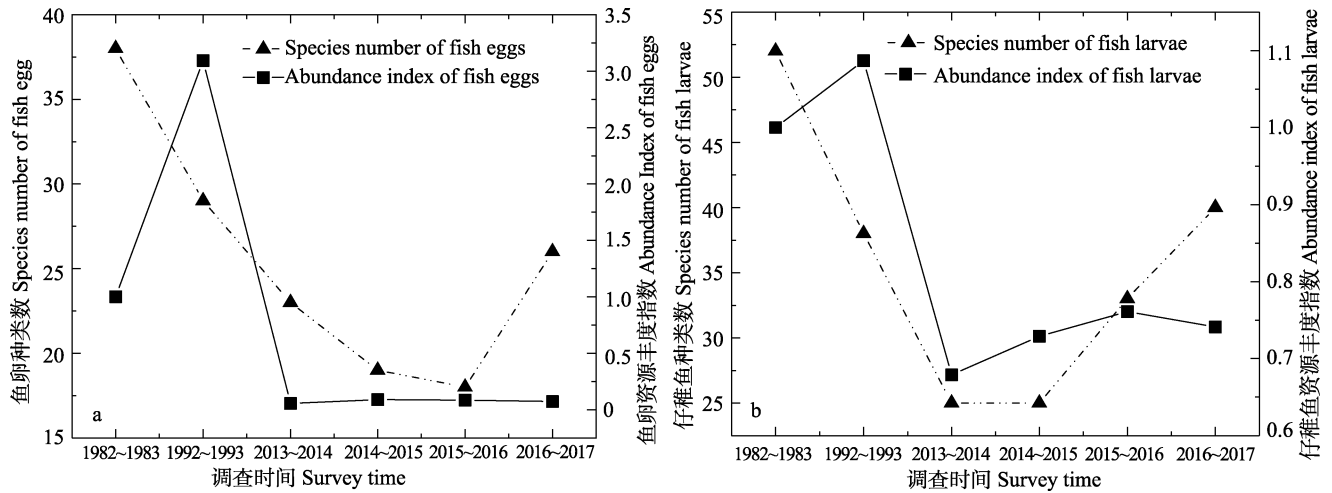


图3 渤海各调查时期不同季节鱼卵(a)仔稚鱼(b)资源丰度指数和种类数  
Fig.3 Abundance Index and species number of fish eggs (a) and larvae (b)

表2 渤海各调查时期鱼卵优势(IRI>1000)和重要(IRI>500)种类及其亲体适温和栖所类型  
Tab.2 The dominant (IRI>1000) and important (IRI>500) species of fish eggs with temperature adaptation (TA) and habitat types (HT) to their adult fish in the Bohai Sea in recent 30 years

月份 Month	年份 Year	鱼卵优势重要种类 Dominant and important species	N(%)	F(%)	IRI	适温类型 TA	栖所类型 HT
5月 May	1982~1983	青鳞沙丁鱼 <i>S. zunasi</i>	49.20	45.82	2254.65	WT	CPN
		斑鲹 <i>K. punctatus</i>	42.86	24.29	1041.07	WT	CPN
		鳀 <i>E. japonicus</i>	38.09	14.61	556.49	WT	CPN
	2013~2014	鳀 <i>E. japonicus</i>	23.21	96.34	2236.39	WT	CPN
		鳀 <i>E. japonicus</i>	91.60	46.15	4227.48	WT	CPN
		鳀 <i>E. japonicus</i>	45.06	45.56	2052.55	WT	CPN
		鲷 <i>P. indicus</i>	21.80	35.56	775.27	WW	CRA
2016~2017	鳀 <i>E. japonicus</i>	47.74	27.84	1328.81	WT	CPN	
6月 June	1982~1983	鳀 <i>E. japonicus</i>	92.82	69.01	6406.11	WT	CPN
	1992~1993	鳀 <i>E. japonicus</i>	1.00	96.70	9670.67	WT	CPN
	2013~2014	鳀 <i>E. japonicus</i>	86.93	30.77	2674.63	WT	CPN
	2014~2015	鳀 <i>E. japonicus</i>	98.01	47.06	4612.43	WT	CPN
	2015~2016	鳀 <i>E. japonicus</i>	32.99	74.99	2473.99	WT	CPN
	2016~2017	叫姑鱼 <i>J. grypotus</i>	18.57	38.38	712.69	WW	CBD
	短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	14.42	47.47	684.80	WT	CD	
	鳀 <i>E. japonicus</i>	27.07	19.19	519.57	WT	CPN	
8月 August	1982~1983	短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	57.51	43.48	2500.29	WT	CD
		少鳞鳉 <i>S. japonica</i>	27.19	50.72	1379.03	WW	CD
		鳀 <i>E. japonicus</i>	34.55	92.43	3193.21	WT	CPN
	1992~1993	鳀 <i>E. japonicus</i>	56.78	22.92	1301.32	WT	CPN
		短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	38.63	33.33	1287.69	WT	CPN
	2014~2015	鳀 <i>E. japonicus</i>	56.78	25.00	1419.62	WT	CPN
		短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	38.63	33.33	1287.69	WT	CD
		短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	68.40	46.94	3210.49	WT	CD
2016~2017	短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	9.86	43.43	827.42	WT	CD	
10月 October	1982~1983	花鲈 <i>L. maculatus</i>	64.38	97.81	6297.46	WT	CRA
	1992~1993	花鲈 <i>L. maculatus</i>	56.99	44.07	2511.45	WT	CRA
	鳀鱼 <i>E. japonicus</i>	41.11	20.34	836.21	WT	CPN	
	2013~2014	花鲈 <i>L. maculatus</i>	91.43	14.00	1280.00	WT	CRA
	2014~2015	花鲈 <i>L. maculatus</i>	22.00	87.21	1918.60	WT	CRA
	2016~2017	花鲈 <i>L. maculatus</i>	100.00	10.00	1000.00	WT	CRA



高与鳀鱼共同成为优势种类(表 2)。在夏季 8 月, 表层水温最高, 水平温差小, 优势种类为暖温性和暖水性 CD 鱼类, 1982~1983 年为短吻红舌鲷和少鳞鳊(*Sillago japonica*), 1992~1993 年, 鳀鱼是唯一优势种类; 进入 2010 年, 过渡为以鳀鱼和短吻红舌鲷(2013~2015 年)为主, 近年来(2015~2017 年)短吻红舌鲷成为单一优势种类(表 2)。在降温季节(10 月), 优势种类为 CRA 鱼类, 如 1982~1983 年为花鲈(*Lateolabrax maculatus*), 随后在 1992~1993 年, 鳀鱼优势度上升

与花鲈同为优势种, 近年来又恢复至以花鲈为单一优势种类(表 2)。

各调查季节仔稚鱼优势种变化幅度超过鱼卵, 在增温季节(5 月、6 月)优势种以暖温性 CPN 鱼类为主, 1982~1983 年和 1992~1993 年为鳀鱼、斑鲈和青鳞沙丁鱼, 近年来暖温性 CPN 鱼类鲃(*Liza haematocheila*)、CD 鱼类矛尾虾虎鱼(*Chaeturichthys stigmatias*)和冷温性 CD 鱼类许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)优势度迅速上升, 在某些年份成为优势种类(表 3)。在 8 月, 优势

表 3 渤海各调查时期仔稚鱼优势(IRI>1000)和重要(IRI>350)种类及其亲体适温和栖所类型  
Tab.3 The dominant (IRI>1000) and important (IRI>350) species of fish larvae with temperature adaptation (TA) and habitat types (HT) to their adult fish in the Bohai Sea in recent 30 years

月份 Month	年份 Year	仔稚鱼优势重要种 dominant and important species	N(%)	F(%)	IRI	适温类型 TA	栖所类型 HT
2 月 February	1982~1983	花鲈 <i>L. maculatus</i>	6.25	66.67	416.67*	WT	CRA
	1992~1993	大泷六线鱼 <i>H. otakii</i>	58.82	26.67	1568.63	CT	CD
	2013~2014	方氏云鲷 <i>E. fangi</i>	62.50	25.49	1593.14	CT	CD
	2014~2015	方氏云鲷 <i>E. fangi</i>	96.34	56.82	5474.05	CT	CD
	2015~2016	方氏云鲷 <i>E. fangi</i>	82.19	26.83	2205.15	CT	CD
	2016~2017	大泷六线鱼 <i>H. otakii</i>	44.42	30.91	1372.99	CT	CD
		方氏云鲷 <i>E. fangi</i>	35.89	18.18	652.48	CT	CD
5 月 May	1982~1983	鳀 <i>E. japonicus</i>	4.76	86.87	413.65*	WT	CPN
	2013~2014	鲃 <i>L. haematocheila</i>	4.76	86.87	413.65*	WT	CPN
	2014~2015	鲃 <i>L. haematocheila</i>	81.57	19.23	1568.63	WT	CPN
	2015~2016	鲃 <i>L. haematocheila</i>	27.78	12.86	357.31*	WT	CPN
	2016~2017	鲃 <i>L. haematocheila</i>	97.85	41.24	4035.22	WT	CPN
6 月 June	1982~1983	青鳞沙丁鱼 <i>S. zunasi</i>	40.88	28.17	1151.46	WT	CPN
		斑鲈 <i>K. punctatus</i>	41.00	21.13	866.29	WT	CPN
	1992~1993	斑鲈 <i>K. punctatus</i>	17.54	51.11	896.59	WT	CPN
		青鳞沙丁鱼 <i>S. zunasi</i>	17.54	42.15	739.50	WT	CPN
	2013~2014	矛尾虾虎鱼 <i>C. stigmatias</i>	18.82	21.15	398.16*	WT	CD
	2014~2015	许氏平鲈 <i>S. schlegeli</i>	53.33	35.29	1882.35	CT	CD
	2015~2016	沙氏下鱚鱼 <i>H. sajori</i>	21.18	27.45	581.31	WT	CPN
		鲃 <i>L. haematocheila</i>	48.45	23.79	1152.74	WT	CPN
		鲃 <i>L. haematocheila</i>	13.64	28.28	385.79*	WT	CPN
		2016~2017	鲃 <i>L. haematocheila</i>	13.64	28.28	385.79*	WT
8 月 August	1982~1983	尖嘴扁颌针鱼 <i>S. anastomella</i>	12.92	39.13	505.37	WT	OEP
		鳀 <i>E. japonicus</i>	38.18	37.81	1443.73	WT	CPN
	1992~1993	斑鲈 <i>K. punctatus</i>	21.82	43.61	951.51	WT	CPN
		白氏银汉鱼 <i>A. bleekeri</i>	72.84	33.33	2427.92	WW	CPN
		沙氏下鱚鱼 <i>H. sajori</i>	16.84	56.25	947.46	WT	CPN
	2013~2014	白氏银汉鱼 <i>A. bleekeri</i>	72.84	33.33	2427.92	WW	CPN
		沙氏下鱚鱼 <i>H. sajori</i>	16.84	56.25	947.46	WT	CPN
	2014~2015	白氏银汉鱼 <i>A. bleekeri</i>	72.84	33.33	2427.92	WW	CPN
		沙氏下鱚鱼 <i>H. sajori</i>	16.84	56.25	947.46	WT	CPN
	2015~2016	沙氏下鱚鱼 <i>H. sajori</i>	29.80	50	1490.17	WT	CPN
沙氏下鱚鱼 <i>H. sajori</i>		12.78	42.42	542.21	WT	CPN	
10 月 October	1982~1983	少鳞鳊 <i>S. japonica</i>	16.44	56.00	920.55	WW	CD
	1992~1993	鳀 <i>E. japonicus</i>	79.53	25.42	2021.89	WT	CPN
	2013~2014	鳀 <i>E. japonicus</i>	85.37	8.00	682.93	WT	CPN
	2014~2015	花鲈 <i>L. maculatus</i>	16.00	23.08	369.23*	WT	CRA
	2016~2017	鳀 <i>E. japonicus</i>	33.77	14.44	487.73*	WT	CPN

\* IRI 值均未超过 500, 取最大值

\* means no IRI value exceed 500, the maximum value would be used

种类由暖温性 OEP 鱼类尖嘴扁颌针鱼(*Strongylura anastomella*)变为 1992~1993 年的鳀鱼和斑鲆,近年来暖水性 CPN 鱼类白氏银汉鱼(*Allanetta bleekeri*)和暖温性 CPN 鱼类沙氏下鱚鱼(*Hyporhamphus sajori*)优势度显著提高,逐渐变成优势种类(表 3)。降温季节(10月),在强厄尔尼诺年 1982~1983 年(Wu *et al*, 2016)优势种为暖水性 CD 鱼类少鳞鳕,1992~1993 年后优势种变为鳀鱼和 CRA 鱼类花鲈(表 3)。冬季(1~3 月)渤海表层水温最低,在强厄尔尼诺年 1982~1983 年冬季(暖冬; Wu *et al*, 2016)优势种类为暖温性 CRA 鱼类花鲈;

其余年份冷温性 CD 鱼类大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)和方氏云鲷(*Enedrias fangi*)成为优势种类(表 3)。

### 2.3 渤海鱼卵仔稚鱼物种多样性和种类更替

多轮周年调查结果显示,鱼卵物种多样性水平( $H'$ 和 $D_s$ )季节变化特征为在升温季节春夏季较高,在降温季节秋冬季较低,冬季(1~2 月)最低; $H'$ 和 $D_s$ 呈“双峰分布”,分别在春季(5 月)和夏季(8 月)达到峰值,春夏季(6 月)物种多样性水平略低(图 4a, 图 4c)。各调查时期,春季鱼卵  $H'$  范围为 0.20~1.95, 峰值为

表 4 渤海各调查时期鱼类种群早期补充群体种类组成年间  $\beta$  相似性指数矩阵

Tab.4 Matrix of the  $\beta$  similarity index (CC) of ichthyoplankton communities in the Bohai Sea between different survey periods

年份 Year	1982~1983	1992~1993	2013~2014	2014~2015	2015~2016	2016~2017
1982~1983		0.62	0.46	0.48	0.45	0.48
1992~1993	0.62		0.57	0.54	0.46	0.49
2013~2014	0.46	0.57		0.64	0.47	0.51
2014~2015	0.48	0.54	0.64		0.59	0.58
2015~2016	0.45	0.46	0.47	0.59		0.63
2016~2017	0.48	0.49	0.51	0.58	0.63	

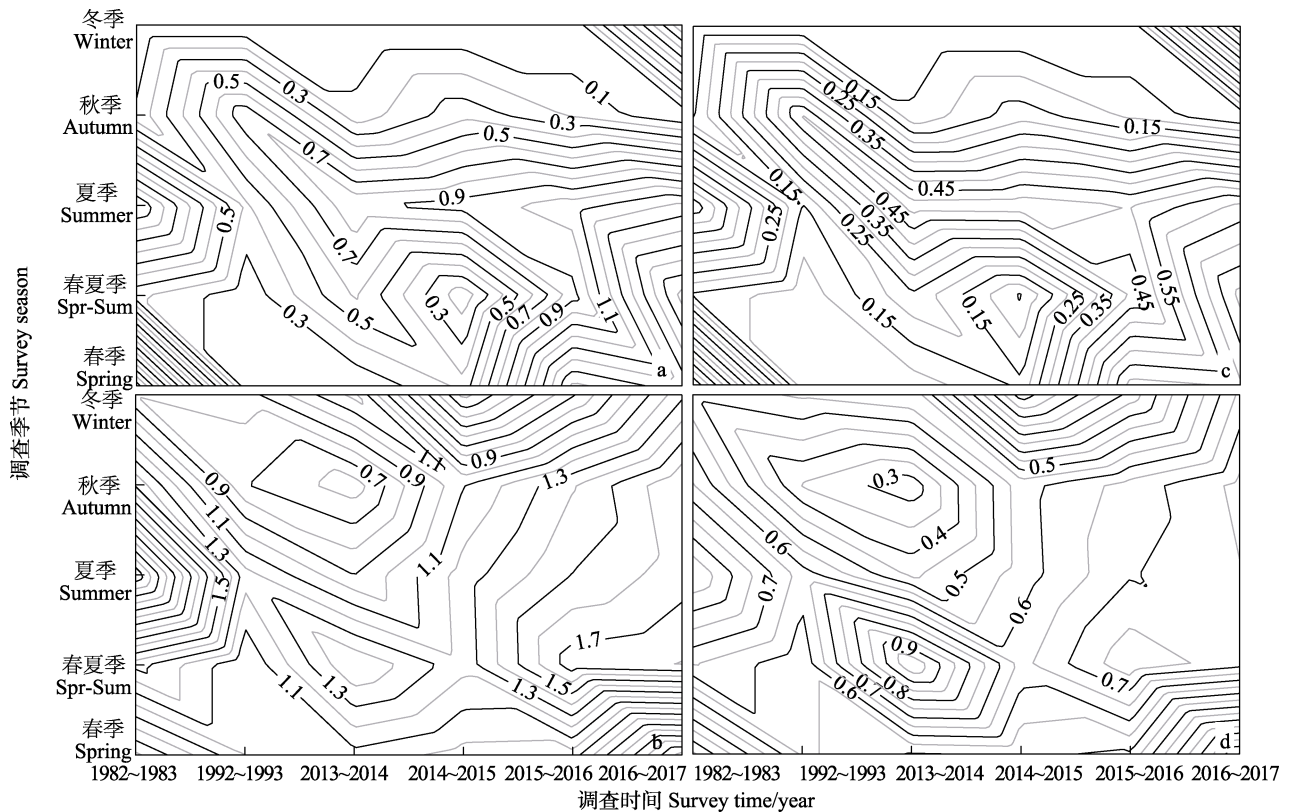


图 4 渤海各调查时期不同季节鱼卵和仔稚鱼香农-威纳和辛普森多样性指数

Fig.4 Shannon-Wiener and Simpson's diversity index to fish eggs and larvae profiles along the survey season across different survey times

a 鱼卵, b 仔稚鱼香农-威纳指数; c 鱼卵, d 仔稚鱼辛普森多样性指数

(a) eggs and (b) larvae Shannon-Wiener index; (c) eggs and (d) larvae Simpson's diversity index

1982~1983 年的 1.95, 1992~1993 年急剧下降至 0.22, 并在 2013~2014 年至谷值 0.20; 自 2014~2015 年始呈现上升趋势, 在 2016~2017 年升至 1.4 左右。春夏季鱼卵  $H'$  范围为 0.13~1.84, 其中 1982~1983 年为 0.42, 1992~1993 年降至 0.22, 并在 2014~2015 年至谷值 0.12; 自 2015~2016 年始呈现快速上升趋势, 2016~2017 年至峰值 1.84。夏季  $H'$  范围为 0.38~1.22, 其中 1982~1983 年为 1.21, 1992~1993 年急剧下降至谷值 0.38 外; 此后逐渐上升, 于 2016~2017 年达峰值 1.23。秋季  $H'$  范围为 0~0.78, 其中 1982~1983 年为 0.12, 峰值在 1992~1993 年的 0.78, 谷值则在 2016~2017 年的 0。冬季调查除 2016~2017 年外没有采集到鱼卵(图 4a)。

仔稚鱼  $H'$  和  $D_5$  在升温季节(5~8 月)逐次升高, 降温季节(10 月至翌年 2 月)逐次降低。仔稚鱼  $H'$  和  $D_5$  呈“单峰分布”, 夏季达到全年峰值, 谷值在春季(图 4b, 图 4d)。各调查时期, 春季  $H'$  范围为 0.15~1.06, 其变化趋势与鱼卵相反, 其中 1982~1983 年为次谷值 0.57, 峰值为 1992~1993 年的 1.00, 此后在 2013~2016 年间均维持在 0.95 以上, 而 2016~2017 年为  $H'$  值仅为 0.15。春夏季  $H'$  范围为 0.55~1, 其中 1982~1983 年为 0.65, 谷值为 1992~1993 年的 0.56, 近年来(2013~2017 年)由于虾虎鱼科(Gobiidae)鱼类被鉴定种类大幅增加(至 2016~2017 年被鉴定种类为 9 种),  $H'$  出现较大幅度上升, 并在 2016~2017 年升至峰值 1.81。夏季仔稚鱼  $H'$  范围均较高, 在 0.89~2.59 之间, 其中峰值出现在 1982~1983 年的 2.59, 1992~1993 年降至 1.24, 并在 2013~2014 年跌至谷值 0.89, 近年来(2014~2017 年)出现增长趋势, 2016~2017 年  $H'$  上升至 1.65 左右。秋季仔稚鱼  $H'$  范围均较高, 在 0.54~1.69 之间, 其中 1982~1983 年值为 1.48, 1992~1993 年降至 0.70, 并在 2013~2014 年回落至谷值 0.54, 近年来又呈现回调趋势, 并在 2016~2017 年升至峰值 1.69。冬季  $H'$  范围为 0.15~1.06, 年间变异比较大, 1982~1983 年  $H'$  为 0.80, 峰值出现在 2016~2017 年的 1.27, 谷值为 2014~2015 年的 0.16(图 4b)。

渤海各调查时期鱼类种群早期补充群体种类更替现象明显。1982~1983 年和 1992~1993 年鱼类早期补充群体 CC 值位于 0.50~0.75 区间, 群落中等相似; 而与 2013~2017 年各年间鱼类早期补充群体 CC 值均位于 0.25~0.50 区间, 群落间中等不相似(表 4)。1992~1993 年 CC 值与 1982~1983 年、2013~2014 年和 2014~2015 各年间鱼类早期补充群体 CC 值位于 0.50~0.75 区间, 群落中等相似; 而与 2015~2016 年和 2016~2017 年 CC 值均位于 0.25~0.50 区间, 群落

间中等不相似。近年来种类更替率呈现明显加快趋势, 即便是在最近调查年份 2013~2014 年, 其鱼类早期补充群体 CC 值与 2015~2016 年为 0.47, 位于 0.25~0.50 区间, 群落间中等不相似(表 4)。渤海鱼类种群早期补充群体种类组成年间  $\beta$  相似性指数聚类分析结果显示群落相似性程度依次为 2015~2016 年, 2016~2017 年, 2013~2014 年, 2014~2015 年, 1982~1983 年和 1992~1993 年。

#### 2.4 渤海各调查时期产卵亲体栖所类型和适温类型种类数

不同调查时期渤海鱼类早期补充群体对应亲体各栖所类型均以 CD 种数最高, 其次为 CPN、CBD、CRA 和 OEP, 而 OMP 种类年间波动较大(图 5)。自 1982~1983 年起至 2014~2015 年, CD 和 CBD 鱼类种类数由 41 种急剧下降至 19 种, 占总种类数百分比也由 1982~1983 年的最高 67.21%, 下降至 2014~2015 年的 54.28%; 2016~2017 年种数又上升至 34 种, 所占比率恢复至 64.15%(图 5)。CPN 种类数由 1982~1983 年 16 种, 逐渐下降至 2014~2015 年的 11 种, 占总种类数百分比与之相反呈现上升趋势, 由 1982~1983 年的 26.23% 上升至 2014~2015 年的 31.43%; 2016~2017 年 CPN 种类数小幅上升至 12 种, 占总种类数百分比则下降至 22.64%。自 1982~1983 年起 CRA 种类数基本保持稳定(2015~2016 年除外), 占总种类数百分比率呈现上升趋势, 近年来出现小幅回调。OEP(尖嘴扁颌针鱼)和 OMP 种类(黄鲛鰕 *Lophius litulon*)年间波动较大。不同调查时期渤海鱼类早期补充群体对应亲体各适温类型均以暖温性种数最高, 暖水性种类次之, 冷温性种类最低, 没有出现冷水性鱼类(图 6)。不同调查时期各适温类型鱼类年间占总种类数百分比波动不大。暖温性鱼类占总种类数百分比在各调查时期均超过 50%, 其中 1992~1993 年暖温性鱼类占总种类数百分比为 62.22% 最高, 2016~2017 年暖温性鱼类占总种类数百分比最低为 50.94%。暖水性鱼类占总种类数百分比在 2015~2016 年最低为 23.68%。冷温性鱼类占总种类数百分比则呈上升趋势, 由 1982~1983 年的 11.48%, 上升至 2016~2017 年的 20.75%(图 6)。

### 3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来我国乃至全球范围内, 渔业资源普遍衰退, 资源结构发生了很大的变化, 这在渤海尤为突出, 表现为渔获小型化和低质化, 种类交替明显, 重要渔业资源已不能形成渔汛, 对渤海海渔

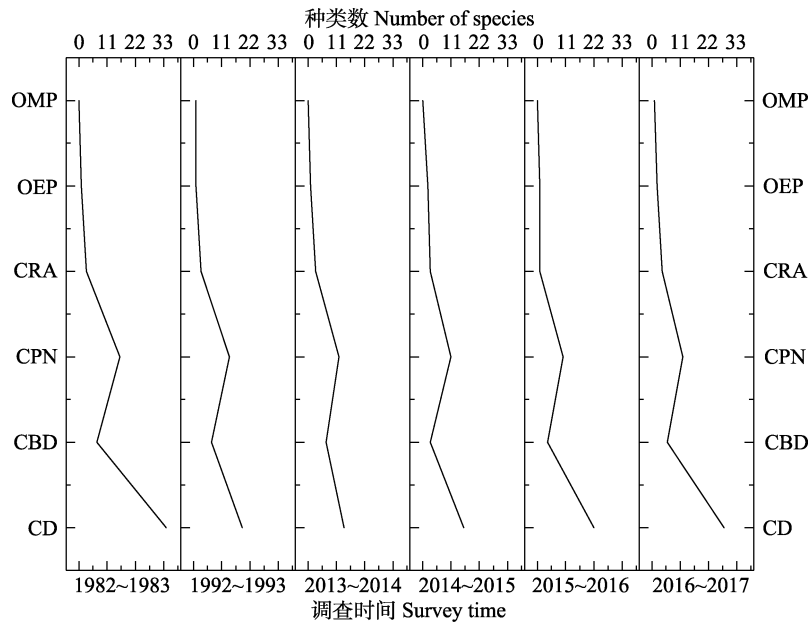


图 5 渤海鱼类种群早期补充群体对应亲体各栖所类型年间种数比较  
Fig.5 Comparison of the number of species to different habitat type in parent of the recruitment stock between different survey periods

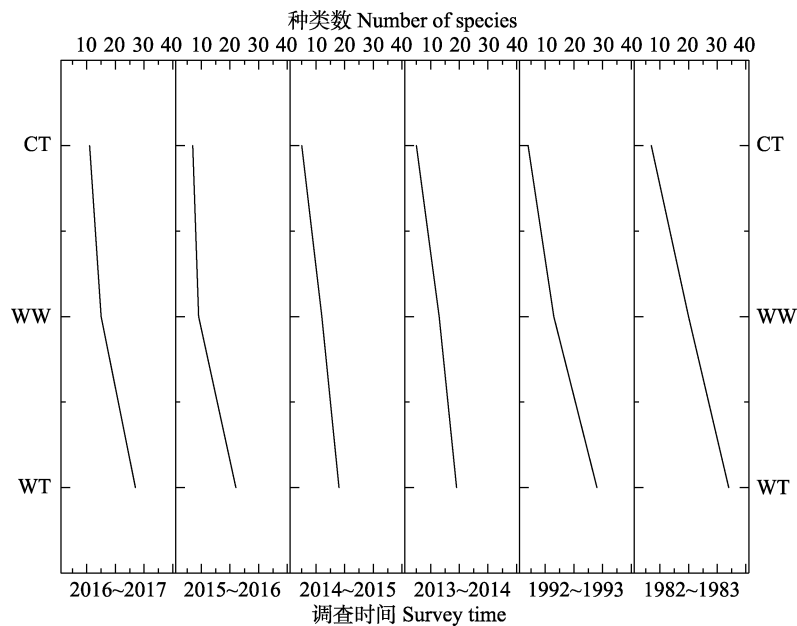


图 6 渤海鱼类种群早期补充群体对应亲体各适温类型年间种类数比较  
Fig.6 Comparison of the number of species to different temperature adaptation type in parent of the recruitment stock between different survey periods

业的支持功能日益衰退(Tang *et al*, 2003; Shan *et al*, 2016; 李忠义等, 2017)。渔业种群的变动主要由补充量变化驱动, 过度捕捞和早期补充不足是渔业资源衰退的两个重要原因。30 余年鱼卵仔鱼调查一直沿用相同调查网具和方法, 样品鉴定分析则采用参考资料和分类标准一致的传统形态学分类方法。作为渔业资源的早期补充资源, 与 1982~1983 年调查相比当前各季节(冬季除外)鱼卵和仔稚鱼种类数和资源丰度指数

均已呈现较大程度下降。当前鱼卵种类数仅为 20 世纪 80 年代的 1/2 左右, 资源丰度不足彼时的 1/10; 仔稚鱼种类数和资源丰度仅为 20 世纪 80 年代的 3/4 左右。各调查时期相同季节鱼卵优势种变化不明显, 春季和春夏季优势种类由小型 CPN 鱼类如青鳞沙丁鱼、斑鲽和鲷鱼变为当前的鲷鱼(近年来小型 CD 和 CBD 鱼类如叫姑鱼和短吻红舌鲷优势度在春夏季显著提高, 与鲷鱼共同成为优势种类); 夏季由暖温性

和暖水性的小型 CD 鱼类如短吻红舌鲷和少鳞鱈变为当前短吻红舌鲷; 秋季优势种无明显变化。仔稚鱼优势种变化幅度超过鱼卵, 春季和春夏季由小型 CPN 鱼类斑鱈、青鳞沙丁鱼和鳀鱼变为 CPN 鱼类鲛鱼; 夏季由 OEP 鱼类尖嘴扁颌针鱼变为小型 CPN 鱼类沙氏下鱈鱼; 秋季由小型 CD 鱼类少鳞鱈变为小型 CPN 鱼类鳀鱼; 冬季由 CRA 鱼类花鲈变为 CD 鱼类大泷六线鱼和方氏云鲷。底层重要经济种类早期补充群体优势度急剧下降。鱼类早期补充群体种类更替现象明显, 近年来种类更替率呈现明显加快趋势。各调查时期相同季节鱼卵和仔稚鱼物种多样性水平、各适温类型产卵亲体种数、各主要栖所类型产卵亲体种类数均呈现先降后升变动趋势。全年综合陆架浅水中上层鱼类种数所占比例升高, 中底层和底层鱼类所占比例有所下降。

### 3.1 环境变化对渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替影响的认识

近海环境变化对渔业生物种群补充过程的影响及其资源效应是海洋渔业科学前沿领域的基础科学问题。挪威著名鱼类学家 Hjort(1914)提出了渔业资源评估最早的 3 个学说之一“波动论”, 指出鱼类早期生活阶段仔幼鱼的成活率取决于鱼类初次摄食时开口饵料的丰度和栖息地海流、水温、盐度等非生物因素, 环境条件是形成鱼类世代变动的主要原因。Cushing (1975、1990) 将 Hjort(1914)理论进行了扩展, 提出了“匹配与不匹配”假说(“match-mismatch” hypothesis), 指出鱼类仔稚鱼及其饵料生物在时间和空间上的一致性与否是决定补充强度的关键因素。鱼类在繁殖期间对环境要求较为严格, 需选择最适于其生殖活动并对卵子和仔鱼存活最为有利环境栖息, 并在长期演化过程中形成不同的生活史策略来提高其早期补充幼体与饵料生物的时空匹配性从而达到快速生长, 以提高幼体成活率(Peck *et al.*, 2012)。渤海鱼类区系主要品种具低盐河口近岸海区产卵特性(朱鑫华等, 1994)。渤海河口和近岸海区海况变化复杂, 主要存在低盐和高盐性质 2 种水系(Chen *et al.*, 2009), 这 2 种水系锋带(即盐度水平梯度大的混合区)在适温条件下往往成为多数鱼群最密集产卵中心亦即鱼卵、仔稚鱼密集区, 且鱼群集散程度在很大程度上取决于盐度水平梯度的大小, 亦即水系锋带是否显著; 因适宜环境在锋带区范围很小, 因而造成鱼群(亦或鱼卵仔鱼)高度集中并随着锋区而移动(邱道立等, 1965; Wei *et al.*, 1992; 万瑞景等, 2008、2014)。

在捕捞强度基本保持不变的前提下, 全球变化下

ENSO(El Niño/La Niña-Southern Oscillation)等气候事件会通过影响主要水系的水动力条件(如温盐场、流场)和营养基础等造成东西太平洋两侧海域主要经济鱼类资源量剧烈变动(金显仕等, 2015)。这种影响在渤海表现也比较明显, 如自 1960~1997 年, 渤海表层盐度升高了 2.82 PSU, 气温升高了 0.92℃, 表层水温上升了 0.41℃(方国宏等, 2002); 且受气候因素时空变异和人类活动影响, 海区内鱼类赖以产卵繁殖的黄河入海径流量自 1980~2002 年, 一直呈现负增长, 并在 1997~2002 年间维持在历史底位; 2002 年后入海径流量呈现一定程度回升, 但是自 1978 年以来入海径流量显著线性降低趋势仍未改变(Fan *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2015)。从生物物候学角度, 作为初级生产者和鱼类早期补充群体饵料的硅藻类春季水华发生时间及其季节性周期多数保持固定时间节点, 其主要由白昼时长和光照强度决定而非由水温调节(Eilertsen *et al.*, 1995; Mcquoid *et al.*, 2010)。鱼类早期补充群体(季节性浮游生物)其发生和生命周期时间节点则主要受温度调节的生理反应控制(Edwards *et al.*, 2004), 随着近年来海水温度的不断上升, 其生理周期(胚胎发育、仔鱼孵化和开口摄食等)将提前, 在变暖趋势不变情景下其将继续持续下去(Edwards *et al.*, 2004)。这可能造成鱼类早期补充群体与饵料生物的错配, 从而导致早期补充能力下降进而出现渔业种群的衰退, 即上行控制(Bottom-up control)。此外, 自 20 世纪 50 年代始, 特别是近 20 年来渤海区不断出现的暖冬现象(Wu *et al.*, 2017)使得近年来冬季产卵繁殖鱼类仔稚鱼种类和资源丰度指数呈现上升趋势(因冬季产卵鱼类主要为产沉性卵或卵胎生, 采用传统鱼卵仔稚鱼调查取样方法无法获取, 从而使得冬季仔稚鱼优势种变化幅度超过鱼卵)。尽管多数鱼类早期浮游幼体对全球气候变化有响应, 但不同鱼种响应程度不同, 为准确评估近海环境变化对渔业种群补充过程的影响, 应当进一步了解气候变化驱动的非生物(海水温度)和生物因素(饵料生物的匹配与不匹配)对特定鱼种早期生活史的影响, 并厘清其在不同类群以及同类群不同栖息地间的影响程度(Peck *et al.*, 2012)。

### 3.2 捕捞对渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替影响的认识

捕捞主要通过对目标鱼种的开发利用以及栖息地底质扰动, 导致渔业生物资源量、群落结构和群体生物学特征改变, 其对各鱼种影响程度则主要取决于相应种类生活史特征、营养关系及其栖息地环境受损程度(Bianchi *et al.*, 2000)。自 2000 年以来补充型过度



捕捞导致的生殖群体资源量降低(Zhao *et al.*, 2003), 小型化、低龄化和性成熟提前(Tang *et al.*, 2007)及其亲体效应(后代成活率降低; Wan *et al.*, 2012)等成为解释渔业种群早期补充不足和整个渔业种群衰退的主要因素。在高强度捕捞压力下(渤海内捕捞强度自 1950 年以来增长了近 40 倍; Shan *et al.*, 2013)渤海鱼类资源的早期补充能力较 20 世纪 80 年代已急剧下降, 伴随着鱼类早期补充群落结构的变化, 年间和季节间种类数密度也随之降低, 优势种、优势度以及个体生态密度降低, 特别是底层重要经济种类早期补充群体优势度呈现急剧下降趋势, 如带鱼、真鲷(*Pagrosomus major*)、褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)、小黄鱼等, 有些种类则因产卵群体过度捕捞或栖息地丧失在近年调查中绝迹如鳊鱼(*Ilisha elongata*)等。同在渔业资源衰退背景下, 仔稚鱼优势种变化幅度超过鱼卵, 究其原因可能是捕捞(捕捞结构和捕捞强度的时空差异)等人类活动影响下具有特殊繁殖生物学特性的鱼类, 如具卵膜丝卵鱼类(虾虎鱼科矛尾虾虎鱼、鱯科 Hemiramphidae 沙氏下鱯鱼、银汉鱼科 Atherinidae 白氏银汉鱼)和卵胎生鱼类(鲉科 Scorpaenidae 的许氏平鲉)等仔稚鱼自 2010 年以来在特定调查季节成为优势种类。而此类鱼类鱼卵由于其特殊繁殖生物学特性, 采用传统调查取样方法无法获取, 从而不能反映在鱼卵种类的优势度组成上。而物种多样性指数的改变则主要是由物种均匀度和丰富度改变, 在较高捕捞压力下, 群落物种多样性指数反而有时会呈现上升现象(Bianchi *et al.*, 2000)。这在渤海春、夏季鱼卵仔稚鱼物种多样性水平变化趋势中表现也较明显, 其峰值均出现在高捕捞压力资源严重衰退背景下的 2016~2017 年。而在某些情境下多样性指数改变主要是由于调查方法的改进和物种鉴定方法提升而引起(Bianchi *et al.*, 2000), 如自 2010 年以来因海区内鉴定的虾虎鱼类仔稚鱼种类数增加也使得仔稚鱼物种多样性水平计算结果的准确性有所提高。

全球范围内中上层小型鱼类是海洋生态系统的主要组成部分, 支撑了重要的渔业(Maynou, 2014), 这在渤海也无例外。鳀鱼、斑鲹、青鳞沙丁鱼、沙氏下鱯鱼和白氏银汉鱼等中上层小型鱼类鱼卵或仔稚鱼也是各调查年份鱼类早期补充群体主体成分。以鳀鱼为例, 鳀鱼主要摄食浮游动物, 如中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)、太平洋磷虾(*Euphausia pacifica*)等, 又是 40 多种高营养层次重要经济鱼类, 如蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)、小黄鱼、带鱼等主要饵料(Wei *et al.*, 1992), 在食物网中是将浮游动物转化为高营养级鱼类重要

中间环节, 对海洋生态系统的能量流动和转换有着重大的作用, 是海洋生态系统中的关键物种(Tang *et al.*, 2005)。在黄渤海区自 20 世纪 90 年代以来开始兴起的鳀鱼大规模开发利用使得该种群遭受的捕捞压力急剧增加, 其资源出现了严重的衰退现象, 其繁殖生物学特性对种群长期承受巨大的捕捞压力产生适应性响应, 表现为卵子卵径明显变小, 自然死亡卵子所占的比例呈现较大幅度的上升等(Wan *et al.*, 2012)。同时整个渤海生态系统中由于对顶级捕食者的高强度持续过度捕捞, 食物网变得愈来愈简单, 低营养级的物种成为控制渔业生态系统能量流动的主要种类, 优势种群更替和饵料生物更替而产生的下行控制作用(Top-down control)影响整个生态系统生物资源的可持续产出(Tang *et al.*, 2003)。随着下行控制影响时间的推移, 以次级生产力(浮游动物)作为主控因子的丰腰控制(Wasp-waste control)持续影响生态系统的可持续产出, 并最终导致各营养层级产出年际变化呈现出不稳定和有序(Tang *et al.*, 2003), 这可能是不同调查时期生态习性和食性各异的鱼类早期补充群体的种类更替明显并且近年来呈现加快趋势的原因。

30 余年调查结果显示, 鱼卵和仔稚鱼种类数和资源丰度指数、物种多样性水平等均在 2013~2015 年间跌至谷底。经分析除捕捞和气候变化因素外, 发生于 2011 年 6 月蓬莱 19-3 油田的两起严重溢油事故(周利, 2014; 李忠义等, 2017)对海域海洋生态环境的持续影响或许是主要原因之一。渔业种群早期补充群体的时序分布规律既决定于生物本身生理发育阶段间行为适应因素, 又受制于水域温盐度场势季节消长趋势等环境要素, 这种生物的行为特征与生态环境变化的适应性调节, 直接影响到渔业种群早期补充群体空间分布的可塑性动态格局; 任何一种控制机制如“上行控制”、“下行控制”或“丰腰控制”均不足以直接或清楚解释其长期变化规律, 其时序变化特征则是对人类活动和环境变化的综合反映。

致谢: 中国水产科学研究院黄海水产研究所资源室的前辈和同事协助取样和数据收集, 谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- Bianchi G, Gislason H, Graham K, *et al.* Impact of fishing on size composition and diversity of demersal fish communities. ICES Journal of Marine Science, 2000, 57(3): 558-571
- Bian XD, Zhang XM, Gao TX, *et al.* Category composition and distributional patterns of ichthyoplankton in the Yellow River estuary during spring and summer 2007. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 815-827 [卞晓东,

- 张秀梅, 高天翔, 等. 2007 年春、夏季黄河口海域鱼卵、仔稚鱼种类组成与数量分布. 中国水产科学, 2010, 17(4): 815–827]
- Chen CTA. Chemical and physical fronts in the Bohai, Yellow and East China Seas. *Journal of Marine Systems*, 2009, 78(3): 394–410
- Cushing DH. *Marine ecology and fisheries*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1975
- Cushing DH. Plankton production and year-class strength in fish populations: An update of the match/mismatch hypothesis. *Advances in Marine Biology*, 1990, 26(6): 249–293
- Edwards M, Richardson AJ. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature*, 2004, 430(7002): 881–884
- Eilertsen HC, Sandberg S, Tellefsen H. Photoperiodic control of diatom spore growth: A theory to explain the onset of phytoplankton blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 1995, 116: 303–307
- Fang GH, Wang K, Gou FY, *et al.* Long-term changes and interrelations of annual variations of the hydrographical and meteorological parameters of the Bohai Sea during recent 30 years. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(5): 515–525 [方国洪, 王凯, 郭丰毅, 等. 近 30 年渤海水文和气象状况的长期变化及其相互关系. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 515–525]
- Fan H, Huang H. Response of coastal marine eco-environment to river fluxes into the sea: A case study of the Huanghe (Yellow) River mouth and adjacent waters. *Marine Environmental Research*, 2008, 65(5): 378–387
- Jiang YW, Wan RJ, Chen RS. Investigation of eggs and larvae of osteichthyes in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 121–149 [姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛. 渤海硬骨鱼类鱼卵、仔稚鱼调查研究. 海洋水产研究, 1988(9): 121–149]
- 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, 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]
- Guan WJ. *Application of R program in marine fisheries*. Beijing: China Ocean Press, 2015, 224–229 [官文江. R 语言在海洋渔业中的应用. 北京: 海洋出版社, 2015, 224–229]
- Hjort J. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe, viewed in the light of biological research. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions du Conseil Permanent International Pour L'Exploration de la Mer*, 1914, 20: 1–228
- Houde, ED. Fish early life dynamics and recruitment variability. *American Fisheries Society Symposium*, 1987, 2: 17–29
- Liu J, Ning P. Species composition and faunal characteristics of fishes in the Yellow Sea. *Biodiversity Science*, 2011, 19 (6): 764–769 [刘静, 宁平. 黄海鱼类组成、区系特征及历史变迁. 生物多样性, 2011, 19 (6): 764–769]
- Li ZY, Wu Q, Shan XJ, *et al.* Interannual variations in fish community structure in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 403–413 [李忠义, 吴强, 单秀娟, 等. 渤海鱼类群落结构的年际变化. 中国水产科学, 2017, 24(2): 403–413]
- Ma WW, Wan XQ, Wan K. Interannual variation and formation of wind-driven currents of Bohai Sea in winter. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(2): 295–302 [马伟伟, 万修全, 万凯. 渤海冬季风生环流的年际变化特征及机制分析. 海洋与湖沼, 2016, 47(2): 295–302]
- Maynou F, Sabatés A, Salat J. Clues from the recent past to assess recruitment of Mediterranean small pelagic fishes under sea warming scenarios. *Climatic Change*, 2014, 126(1–2): 175–188
- Mcquoid MR, Hobson LA. Diatom resting stages. *Journal of Phycology*, 2010, 32(6): 889–902
- Peck MA, Huebert KB, Llopiz JK. Intrinsic and extrinsic factors driving match-mismatch dynamics during the early life history of marine fishes. *Advances in Ecological Research*, 2012(47): 177–302
- Pinkas L, Oliphant MS, Iverson I. Food habits of albacore, bluefin tuna and bonito in California waters. *California Department of Fish and Game, Fish Bulletin*, 1971(152): 1–105
- Qiu DL, Liu XS, Wang ZX. Migration of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* in the Bohai Sea and Yellow Sea in relation to the hydrographic conditions. In *Anthology sequel of papers on marine fishery resources* (Editorial Committee of the China Scientific Council on the Marine Fisheries Resources 1962, eds). Beijing: Agriculture Press, 1965, 43–35 [邱道立, 刘效舜, 王遵孝. 渤、黄海小黄鱼的洄游与水文环境的关系. 海洋渔业资源论文选集续集 (1962 年海洋渔业资源学术会议论文编审委员会). 北京: 农业出版社, 1965, 43–55]
- Ren H, Li G, Cui L, *et al.* Multi-scale variability of water discharge and sediment load into the Bohai Sea from 1950 to 2011. *Journal of Geographical Sciences*, 2015, 25(1): 85–100
- Shan XJ, Jin XS, Dai FQ, *et al.* Population dynamics of fish species in a marine ecosystem: A case study in the Bohai Sea, China. *Marine and Coastal Fisheries*, 2016, 8(1): 100–117
- Shan XJ, Sun P, Jin XS, *et al.* Long-term changes in fish assemblage structure in the Yellow River Estuary ecosystem, China. *Marine and Coastal Fisheries*, 2013, 5(1): 65–78
- Tang QS, Jin XS, Wang J, *et al.* Decadal-scale variations of ecosystem productivity and control mechanisms in the Bohai Sea. *Fisheries Oceanography*, 2003, 12(4–5): 223–233
- Tang QS, Guo XW, Sun Y, *et al.* Ecological conversion

- efficiency and its influencers in twelve species of fish in the Yellow Sea ecosystem. *Journal of Marine Systems*, 2007, 67(3-4): 282-291
- Tang QS, Su JL, Sun S, *et al.* A study of marine ecosystem dynamics in the coastal ocean of China. *Advanced in Earth Sciences*, 2005, 20(12): 1288-1299 [唐启升, 苏纪兰, 孙松, 等. 中国近海生态系统动力学研究进展. *地球科学进展*, 2005, 20(12): 1288-1299]
- Tang QS, Fang JG, Zhang JH, *et al.* Impacts of multiple stressors on coastal ocean ecosystems and Integrated Multi-trophic aquaculture. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 1-11 [唐启升, 方建光, 张继红, 等. 多重压力胁迫下近海生态系统与多营养层次综合养殖. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 1-11]
- Tian MC, Sun BL, Yang JM. Analysis of the fish fauna of the Bohai Sea. *Studia Marina Sinica*, 1993(1): 157-167 [田明诚, 孙宝龄, 杨纪明. 渤海鱼类区系分析. *海洋科学集刊*, 1993(1): 157-167]
- Wan RJ, Jiang YW. The distribution and variation of eggs and larvae of osteichthyes in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5(1): 43-50 [万瑞景, 姜言伟. 渤海硬骨鱼类鱼卵和仔稚鱼分布及其动态变化. *中国水产科学*, 1998, 5(1): 43-50]
- Wan RJ, Bian XD. Size variability and natural mortality dynamics of anchovy *Engraulis japonicus* eggs under high fishing pressure. *Marine Ecology Progress Series*, 2012(465): 243-251
- Wan RJ, Wei H, Sun S, *et al.* Spawning ecology of the anchovy *Engraulis japonicus* in the spawning ground of the Southern Shandong Peninsula I. Abundance and distribution characters of anchovy eggs and larvae. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(5): 785-797 [万瑞景, 魏皓, 孙珊, 等. 山东半岛南部产卵场鳀鱼的产卵生态 I. 鳀鱼鱼卵和仔稚幼鱼的数量与分布特征. *动物学报*, 2008, 54(5): 785-797]
- Wan RJ, Ni XB, Bian XD, *et al.* Species composition and abundance distribution pattern of ichthyoplankton and their relationship with environmental factors in the East China Sea ecosystem. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38 (9): 1375-1398 [万瑞景, 曾定勇, 卞晓东, 等. 东海生态系统中鱼卵、仔稚鱼种类组成、数量分布及其与环境因素的关系. *水产学报*, 2014, 38(9): 1375-1398]
- Wei S, Jiang WM. Study on food web of fishes in the Yellow Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1992, 23(2): 182-192 [韦晟, 姜卫民. 黄海鱼类食物网的研究. *海洋与湖沼*, 1992, 23(2): 182-192]
- Wei H, Su J, Wan RJ, *et al.* Tidal front and the convergence of anchovy (*Engraulis japonicus*) eggs in the Yellow Sea. *Fisheries Oceanography*, 2003, 12(4-5): 434-442
- Wu R, Li C, Lin J. Enhanced winter warming in the Eastern China coastal waters and its relationship with ENSO. *Atmospheric Science Letters*, 2017, 18(1): 11-18
- Whittaker RH. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 1972, 21(2-3): 213-251
- Zhao X, Hamre J, Li F, *et al.* Recruitment, sustainable yield and possible ecological consequences of the sharp decline of the anchovy (*Engraulis japonicus*) stock in the Yellow Sea in the 1990s. *Fisheries Oceanography*, 2003, 12(4-5): 495-501
- Zhou L. Ecological responses of marine phytoplankton to the oil spills. Master's Thesis of Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2014 [周利. 海洋浮游植物对溢油的生态响应研究. 中科院研究生院硕士研究生学位论文, 2014]
- Zhu XH, Tang QS. Structuring dominant components within fish community in Bohai Sea system. *Studia Marina Sinica*, 2002(44): 159-168 [朱鑫华, 唐启升. 渤海鱼类群落优势种结构及其种间更替. *海洋科学集刊*, 2002(44): 159-168]
- Zhu XH, Wu HZ, Xu FS, *et al.* The heterogeneity of spatiotemporal patterns of nekton community structure in the coastal waters of Yellow Sea and Bohai Sea. *Acta Zoologica Sinica*, 1994, 40(3): 241-252 [朱鑫华, 吴鹤洲, 徐凤山, 等. 黄、渤海沿岸水域游泳动物群落结构时空格局异质性研究. *动物学报*, 1994, 40(3): 241-252]

(编辑 江润林)

## Ichthyoplankton Succession and Assemblage Structure in the Bohai Sea During the Past 30 Years Since the 1980s

BIAN Xiaodong<sup>1,2</sup>, WAN Ruijing<sup>1</sup>, JIN Xianshi<sup>1,2①</sup>, SHAN Xiujuan<sup>1,2</sup>, GUAN Lisha<sup>1</sup>

(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** The ichthyoplankton assemblage structure and succession in the Bohai Sea were studied using multivariate statistical analysis of monthly investigation data collected from April 1982 to May 1983 as background. Based on a pooled analysis of the historical data of fish eggs and larvae sampled from the horizontal trawl surveys during oceanographical expedition cruises over the past 30 years combined with the field survey of current fish habitat conditions, this study aimed to investigate the seasonal and interdecadal variations in the species diversity and key species, and the changing collaboration between the dominant species and the important species in the succession process. Compared with the survey results of 1982~1983, the profiles of the species number and abundance index of fish eggs and larvae during the survey season across different survey times present different degrees of decline (except in winter), and display a tendency towards decline at the beginning and an increase later. The species number of the fish eggs was only one half in the 1980s, and its abundance index was only one tenth in the 1980s. The species number and abundance index of fish larvae were only three fourths in the 1980s, however, these have shown an obvious increasing tendency in the recent years during winter. During the investigation period, species substitution in the early life stages of fish was obvious, otherwise, the substitution rate was significantly accelerated in the recent years. The dominant species of fish eggs did not change significantly during the same season in each investigation period, however, variation in the dominant species in fish larvae was more obvious. The dominance of the continental shelf demersal fish communities with high commercial value decreased sharply, although some species disappeared in recent surveys. The biodiversity index of fish eggs and larvae was higher during the sea temperature rising season and lower during the sea temperature cooling season. The index profiles during the survey season across different survey times showed a tendency of decreasing first and then increasing. Temperature adaptation studies on the spawning stock profiles during the survey season across different survey times showed that species number in each temperature adaptation type showed a tendency of decreasing first and then increasing. Even so, the seasonal or annual percentage of each type remained stable. Habitat studies on the spawning stock showed that the species number of the main habitat type also rose after showing a declining trend first, and presented different degrees of decline. The annual percentage of the continental shelf pelagic-neritic fish increased, in conjunction with the continental shelf demersal and benthopelagic fish decrease. Under the multiple sources of exogenous interference factors, irreversible changes have been taking place in every key link of the recruitment process in the early life stages of the fish, with habitat loss or fragmentation in the Bohai Sea during the past 30 years. Stressors such as overfishing and climate change promote multidimensional niche disturbances in the fish community and structural decline in the fishery resources, while the succession and assemblage structure of the fish eggs and larvae are the embodiment of this development.

**Key words** Bohai Sea; Fish eggs and larvae; Recruitment in early life stages; Assemblage structure; Succession; Decadal variability

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171111001

http://www.yykxjz.cn/

吴强, 李忠义, 王俊, 单秀娟, 金显仕. 渤海夏季甲壳类群落结构的年际变化. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 16-23  
Wu Q, Li ZY, Wang J, Shan XJ, Jin XS. Inter-annual variation in the community structure of crustaceans in the Bohai Sea during summer. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 16-23

## 渤海夏季甲壳类群落结构的年际变化\*

吴强<sup>1,2</sup> 李忠义<sup>1,2</sup> 王俊<sup>1,2</sup> 单秀娟<sup>1,2</sup> 金显仕<sup>1,2①</sup>

(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** 基于 2009~2010 年及 2012~2015 年夏季(8 月)进行的底拖网调查资料, 研究了渤海甲壳类群落结构的年际变化。结果显示: (1)调查共捕获甲壳类 33 种, 隶属于 2 目 21 科 29 属, 其中虾类 16 种, 蟹类 16 种, 虾蛄 1 种; (2)甲壳类生态优势种类组成随年份变化, 口虾蛄在每个年份均为绝对优势种; (3)2009~2013 年, 渤海甲壳类的物种数目、生物量和个体数密度均持续下降, 2014~2015 年逐步恢复; (4)聚类分析(CLUSTER)和多维标度分析(MDS)将 6 个调查年分为 4 个群组, 单因子相似性分析(ANOSIM)表明群组间的群落结构呈显著性差异( $P < 0.05$ ), 相似性百分比分析(SIMPER)表明口虾蛄、葛氏长臂虾和海蜃虾对群组区分的贡献率最高; (5)群落更替指数和迁移指数显示, 渤海甲壳类群落的稳定性以 2010 年最好、2013 年最差。总体来看, 2011 年蓬莱 19-3 平台溢油后的第 3~4 年, 即 2014~2015 年渤海的甲壳类群落已逐渐恢复。

**关键词** 甲壳类; 群落结构; 稳定性; 年际变化; 渤海

**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0016-08

全球大约 1/2 人口生活在海岸线 60 km 以内, 海洋渔业资源为千百万人口提供着食物和生计(唐启升, 2006)。甲壳类是海洋渔业资源的重要组成部分。2015 年中国近海甲壳类捕捞量为 242.79 万 t, 占近海捕捞总量的 18.47%(国家统计局, 2015)。渤海作为我国的 4 个海区之一, 是多种经济鱼虾类的产卵场和索饵场, 在黄渤海渔业生产上占有极其重要的地位, 素有黄渤海“生物资源摇篮”之称(邓景耀等, 1988; 金显仕, 2000)。近几十年来, 受过度捕捞和环境污染等方面的影响, 渔业生物群落结构发生了巨大改变(Jin, 2003、

2004、2013), 优势种类从高值的大个体鱼种替代为低值的小型鱼种和虾蟹类等无脊椎动物(Iversen *et al.*, 1993; Iversen *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2016), 营养级由 1959 年的 4.4 下降至 2011 年的 3.4(张波等, 2015)。作为海洋生态系统中层营养级的重要生态组成(Farina, 1997), 甲壳类的生态重要性不断提升。与此同时, 随着传统经济鱼类资源的衰退, 虾蟹类的捕捞压力日益增加, 进而导致甲壳类群落结构的变化(李惠玉等, 2009)。此外, 渤海发生的多次溢油事故(沈光玉, 2012)也对渔业生物群落产生一定的影响, 尤其以 2011 年

\* 国家基础研究计划项目(2015CB453303)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02-03)、公益性行业(农业)科研专项(201303050)和山东省泰山学者专项基金(2008-67)共同资助[This work was supported by the National Basic Research Program of China (No.2015CB453303), Aoshan S&T Innovation Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology(2015ASKJ02-03), the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No.201303050), and the Taishan Scholar Program of Shandong Province (2008-67). 吴强, E-mail: wuqiang@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2017-11-11, 收修改稿日期: 2017-12-13



发生的蓬莱 19-3 油井平台溢油事件对渤海生态的影响最大(宋鹏远, 2013)。本研究以渤海经济甲壳类(虾类、蟹类和虾蛄)为对象, 基于 2009~2010 年与 2012~2015 年夏季(8 月)的底拖网调查数据, 分析了渤海甲壳类的种类组成、资源变动、数量分布、物种多样性及群落稳定性等群落特征, 旨在了解渤海甲壳类的资源现状及其群落动态, 以期为渤海甲壳类资源的可持续利用和保护提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

数据来自 2009~2010 年与 2012~2015 年夏季(8 月)的底拖网调查, 调查区域及站位设置参考李忠义等(2017)。调查采用 205 kW 双拖渔船, 调查网具规格为网口宽度 22.6 m、网口周长 1740 目、网口高度 6 m、囊网网目 20 mm, 拖速 3 knot, 每站拖曳 1 h, 不足 1 h 渔获率统一为单位时间生物量(kg/h)或丰度(ind./h)。

### 1.2 分析方法

**1.2.1 相对重要性指数** 利用相对重要性指数(Pinkas *et al.*, 1971)(The index of relative importance, IRI)评价不同种类在群落中的重要程度, 当  $IRI > 500$  时定为优势种(Ambrose *et al.*, 2013), 计算公式为:

$$IRI = (w + n) \times f \quad (1)$$

式中,  $w$  为生物量百分比,  $n$  为个体数百分比,  $f$  为出现频率(即出现站位百分比)。

**1.2.2 物种多样性** 物种多样性分析采用 Margalef 丰富度指数(Margalef *et al.*, 1958)、Pielou 均匀度指数(Pielou *et al.*, 1966)和 Shannon-Wiener 多样性指数  $H$ (Shannon & Wiener, 1963)。其中, Margalef 丰富度指数反映群落物种丰富度, 指一个群落或环境中物种数目的多寡, 亦表示生物群聚(或样品)中种类丰富度程度; Pielou 均匀度指数反映一个群落或生境中全部物种个体数目的分配状况, 即各物种个体数目分配的均匀程度; Shannon-Wiener 多样性指数中包含 2 个因素: 一是种类数目即丰富度; 二是种类中个体分配上的平均性或均匀性, 种类数目多, 可增加多样性; 同样, 种类之间个体分配的均匀性增加也会使多样性提高。各指数的具体计算公式如下:

$$D = (S-1)\ln N \quad (2)$$

$$J' = H'/\ln S \quad (3)$$

$$H = -\sum P_i \ln P_i \quad (4)$$

式中,  $S$  为种类数,  $N$  为总个体数,  $P_i = n_i/N$  为第  $i$  种占总个体数的比例。

**1.2.3 群落相似性指数** 利用 Bray-Curtis 相似性指数计算各年份群落结构间的相似性(Bray *et al.*, 1957), 然后采用等级聚类分析(CLUSTER)和多维标度分析(MDS)来分析甲壳类群落结构相似性的年际变化。进一步利用单因子相似性分析(ANOSIM)对不同组群的群落结构进行差异显著性检验, 并利用相似性百分比分析(SIMPER)分析各物种对群落结构差异的贡献率。Bray-Curtis 相似性指数的计算公式为:

$$B = 100 \times \left[ 1 - \frac{\sum_{i=1}^s |x_{ij} - x_{im}|}{\sum_{i=1}^s |x_{ij} + x_{im}|} \right] \quad (5)$$

式中,  $B$  为群落间的相似性指数,  $S$  为种类数目,  $X_{ij}$  和  $X_{im}$  分别为第  $i$  种类在  $j$  月份和  $m$  月份的个体数密度(经 4 次方根转换)。MDS 分析用胁迫系数(Stress)来衡量二维点图的优劣, 当  $0.1 < \text{Stress} < 0.2$  时, 具有一定的解释意义; 当  $0.05 < \text{Stress} < 0.1$  时, 排序效果基本可信; 当  $\text{Stress} < 0.05$  时, 二维点图对群落结构排序具有很好的代表性(Clarke *et al.*, 1993、2001)。

**1.2.4 群落更替和迁移指数** 群落更替指数 AI 反映了物种更替导致群落稳定性降低的节律, 数值越大表示群落稳定性越差。迁移指数表示系统外迁入与迁出种在群落中的相对比例, MI 为正值表示迁入种多于迁出种, MI 为 0 时表示群落动态平衡, MI 为负值表示迁出种多于迁入种(Bray *et al.*, 1957)。

$$AI = \frac{C+B}{A-R} \times 100 \quad (6)$$

$$MI = \frac{C-B}{A-B} \times 100 \quad (7)$$

式中,  $A$  为本年份实际物种数,  $C$  为本年份新迁入物种数,  $B$  为本年份将要迁出物种数,  $R$  为公共物种数目(各年份均出现)。

## 2 结果

### 2.1 种类组成

2009~2015 年夏季(8 月)于渤海共捕获甲壳类 33 种, 隶属于 2 目 21 科 29 属, 其中虾类 16 种, 蟹类 16 种, 虾蛄 1 种。按年份, 2009 年和 2012 年捕获甲壳类物种数最高, 均为 25 种; 2013 年捕获甲壳类物种数最低, 仅为 16 种。按类别, 虾类物种数以 2009 年最高, 为 14 种, 以 2013 年最低, 仅为 8 种; 蟹类物种数以 2012 年最高, 为 13 种, 以 2013 年最低, 仅为 7 种; 口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)在各调查年份均有捕获(表 1)。

表1 2009~2015年渤海甲壳类种类组成的年际变化  
Tab.1 Variations of the crustacean species composition in the Bohai Sea during 2009~2015

年 Year	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	虾类 Shrimp	蟹类 Crab	虾蛄 Squillid
2009	2	16	21	25	14	10	1
2010	2	18	22	24	12	11	1
2012	2	20	24	25	11	13	1
2013	2	14	16	16	8	7	1
2014	2	14	18	20	11	8	1
2015	2	15	20	22	11	10	1

## 2.2 优势种

根据相对重要性指数(IRI),夏季渤海甲壳类的优势种(IRI>500)随年际变化(表2)。口虾蛄在6个年份均为绝对优势种(4768<IRI<13713),其生物量百分比(29.27%~79.39%)与出现频率(68.63%~89.13%)在所有物种中均稳居第一,其数量百分比也在5个年份居第一(仅2015年第二);其次,日本蟳(*Charybdis japonica*)在4个年份为优势种,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、葛氏长臂虾(*Palaemon gravieri*)、脊腹褐虾(*Crangon affinis*)和海蜚虾(*Latreutes anoplonyx*)在2个年份为优势种,三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和泥脚隆背蟹(*Carcinoplax vestitus*)在1个年份为优势种。

表2 2009~2015年渤海甲壳类优势种的年际变化  
Tab.2 Variations of the dominant crustacean species in the Bohai Sea during 2009~2015

年 Year	物种 Species	W(%)	N(%)	F(%)	IRI
2009	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	79.39	74.46	89.13	13713
	日本蟳 <i>C. japonica</i>	9.84	5.65	54.35	842
2010	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	27.59	34.66	76.60	4768
	葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	8.90	25.73	29.17	1011
	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	14.56	4.85	50.00	973
	日本蟳 <i>C. japonica</i>	18.30	3.42	36.17	786
2012	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	15.06	2.46	36.17	634
	脊腹褐虾 <i>C. affinis</i>	5.30	8.76	36.17	508
	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	48.86	48.95	68.63	6713
	日本蟳 <i>C. japonica</i>	8.81	5.36	41.18	583
2013	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	13.61	8.58	25.49	566
	口虾蛄 <i>C. japonica</i>	43.66	33.12	77.55	5955
	海蜚虾 <i>L. sanoplonyx</i>	0.57	20.40	42.86	899
2014	日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	21.41	4.82	28.57	749
	口虾蛄 <i>C. japonica</i>	51.05	70.79	81.25	9899
2015	泥脚隆背蟹 <i>C. vestitus</i>	27.80	0.19	25.00	700
	海蜚虾 <i>L. anoplonyx</i>	0.86	7.42	60.42	500
	口虾蛄 <i>C. japonica</i>	78.71	29.27	88.10	9513
2015	葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	9.41	51.15	66.67	4037
	脊腹褐虾 <i>C. affinis</i>	1.96	12.50	47.62	688

## 2.3 资源密度及结构组成

2009~2015年夏季,渤海甲壳类的平均网获生物量为5.87 kg/h;其中以2009年最高(16.88 kg/h),2013年最低(0.64 kg/h)。按类别,虾类的平均网获生物量为0.71 kg/h,其中以2015年最高(1.77 g/h),2013年最低(0.09 kg/h);蟹类的平均网获生物量为0.97 kg/h,其中以2009年最高(2.34 kg/h),2013年最低(0.28 kg/h);口虾蛄的平均网获生物量为4.19 kg/h,其中以2009年最高(13.40 kg/h),2013年最低(0.28 kg/h)(图1)。

2009~2015年夏季,渤海甲壳类的平均网获个体数为622.49 ind./h;其中,以2015年最高(694.71 ind./h)、2013年最低(56.01 ind./h)。按类别,虾类的平均网获个体数为369.01 ind./h,以2015年最高(1169.87 ind./h)、2013年最低(27.97 ind./h);蟹类的平均网获个体数为37.81 ind./h,以2015年最高(68.41 ind./h)、2013年最低(9.49 ind./h);口虾蛄的平均网获个体数为307.95 ind./h,以2009年最高(695.11 ind./h)、2013年最低(18.55 ind./h)(图1)。

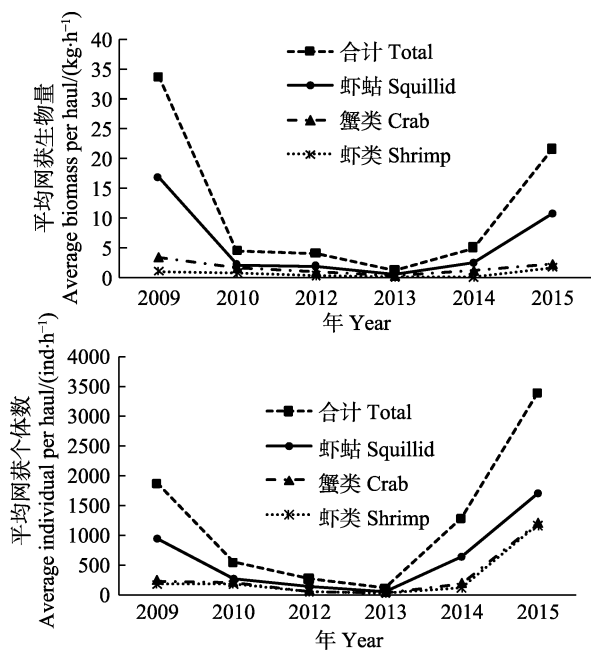


图1 2009~2015年渤海甲壳类生物量与个体数组成的年际变化

Fig.1 Variations of the biomass and individual composition of crustaceans in the Bohai Sea during 2009~2015

## 2.4 数量分布

2009~2015年夏季渤海甲壳类的个体数分布见图2。2009年甲壳类密度以渤海中部较高,莱州湾及辽东湾口相对较低;2010年以黄河口、渤海湾中东部和渤海中部密度较高,辽东湾及莱州湾东南部密度

较低; 2012 年以莱州湾及天津近岸密度较高, 辽东湾及河北近岸密度较低; 2013 年以莱州湾西部及渤海湾东南部密度较高, 渤海中部及辽东湾密度较低; 2014 年以渤海中部密度较高, 莱州湾东南部及渤海海峡邻近水域密度较低; 2015 年以渤海中部及辽东湾密度较高, 莱州湾密度较低。图 2 显示了蓬莱 19-3 油井平台的位置, 可以看到, 平台毗邻水域甲壳类的资源密度于 2009~2010 年较高, 2012~2013 年则极低, 2014~2015 年恢复至较高水平。

## 2.5 物种多样性

2009~2015 年夏季渤海甲壳类物种多样性指数的年际变化见图 3。可以看到, 物种丰富度指数和 Shannon-Weiner 指数年际变化的趋势是一致的, 整体均呈先上升、后下降、再回升的趋势。物种丰富度指数( $d$ )由 2009 年的 0.60 上升至 2010 年的 0.76, 此后下降至 2012 年的 0.71, 2013 年和 2014 年分别回升

至 0.75 和 0.96。Shannon-Weiner 指数( $H$ )由 2009 年的 0.58 上升至 2010 年的 0.79, 2012 年下降至 0.70, 此后分别回升至 2013 年的 0.79、2014 年的 0.87 和 2015 年的 0.90。Pielou 均匀度指数( $J'$ )的年际变化呈先升后降, 回升后再次下降的趋势, 2009 年的 0.39 上升至 2010 年的 0.59, 此后下降至 2012 年的 0.48, 回升至 2013 年的 0.57 后、再次下降至 2014 年的 0.53 和 2015 年的 0.50。

## 2.6 群落结构相似性

根据 2009~2015 年 8 月渤海甲壳类个体数矩阵, 通过聚类(CLUSTER)和非度量多维标度(MDS)分析, 6 个调查年在 70% 相似性水平上被区分为 4 个群组。2010 年、2014 年和 2015 年分别独立为一个群组, 2009 年、2012 年和 2013 年划为同一个群组(简称为群组 2009)。其中, 以 2010 年与其他年份的群落结构相似性指数最低, 仅为 49%~57%, 平均值为 51%; 以 2013 年

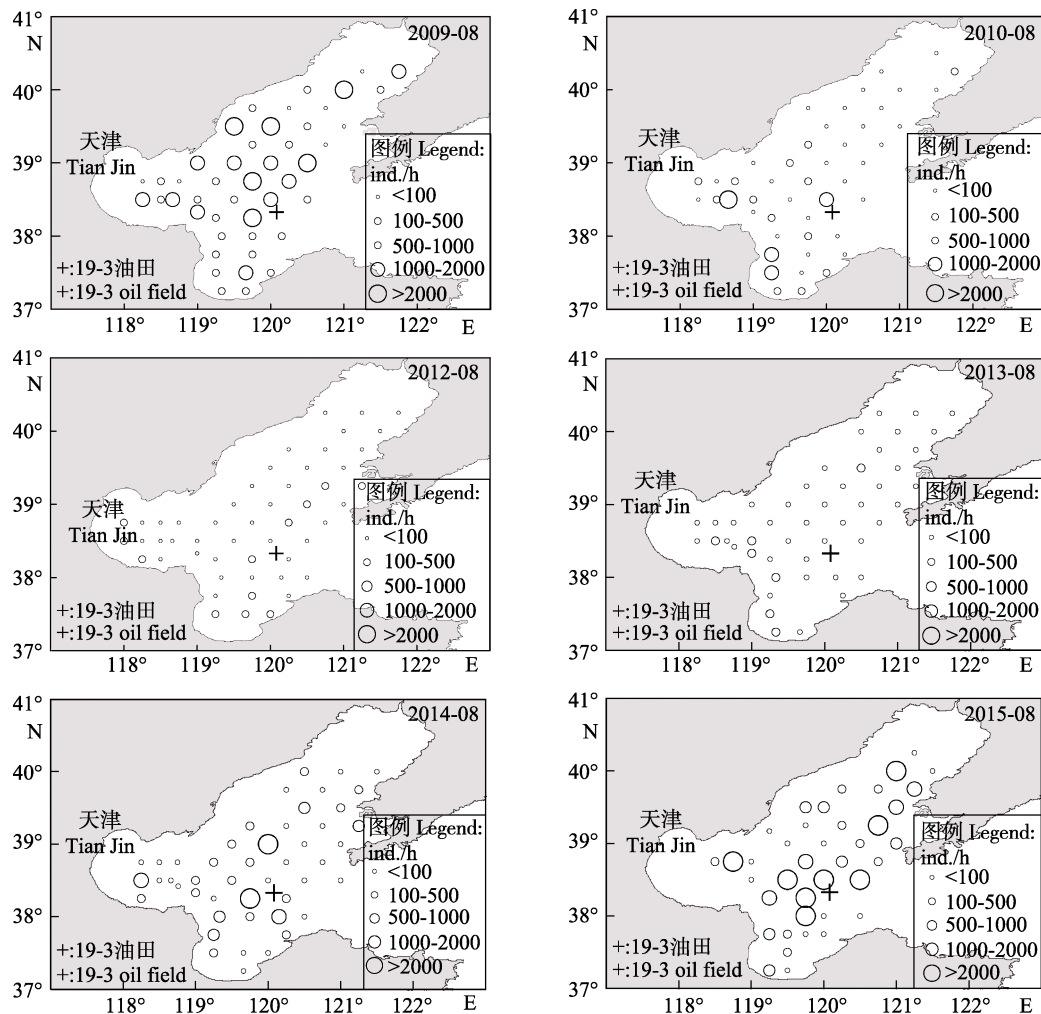


图 2 2009~2015 年渤海甲壳类个体数分布的年际变化

Fig.2 Variations of the crustacean individual distribution in the Bohai Sea during 2009~2015

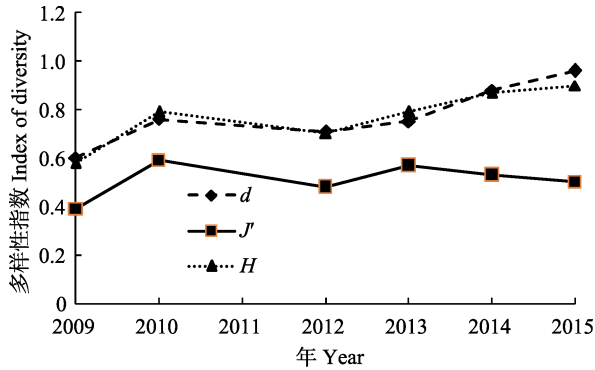


图 3 2009~2015 年渤海甲壳类的多样性指数  
Fig.3 Index of crustacean diversity in the Bohai Sea during 2009~2015

与其他年份的群落结构相似性指数最高, 为 57%~77%, 平均值为 66%。MDS 胁迫系数(Stress)为 0, 说明二维点图对群落结构排序具有很好的代表性(图 4)。ANOSIM 分析显示, 不同群组的群落结构均呈显著性差异( $P < 0.05$ )。SIMPER 分析表明, 口虾蛄对区分群组 2009 与群组 2014、群组 2010 与群组 2014

的贡献率分别达 67.41%和 32.95%; 葛氏长臂虾在区分群组 2009 与群组 2015、群组 2010 和群组 2015 以及群组 2014 和群组 2015 的贡献率分别达到 54.44%、44.97%和 67.07%; 海蜚虾、鹰爪虾和口虾蛄对区分群组 2009 和群组 2010 的累积贡献率达 71.87%。

## 2.7 群落结构的稳定性

根据相关参数(表 3)计算各年份渤海甲壳类群落更替指数与迁移指数, 进而分析甲壳类群落稳定性的变化趋势。2012 年、2010 年和 2015 年渤海甲壳类群落的稳定性较好, 其更替指数 AI 均在 100 以下; 2014 年渤海甲壳类群落的稳定性较差, 其更替指数 AI 为 112.5; 2013 年甲壳类群落稳定性最差, 其更替指数高达 300。2010 年和 2012 年渤海甲壳类群落基本处于动态平衡, 迁入和迁出物种数大体相当; 2014 年和 2015 年渤海甲壳类迁入物种数远大于迁出物种数; 2013 年甲壳类迁出物种数远大于迁入物种数(图 5)。综合更替指数和迁移指数, 渤海甲壳类群落的稳定性以 2010 年最好、2013 年最差。

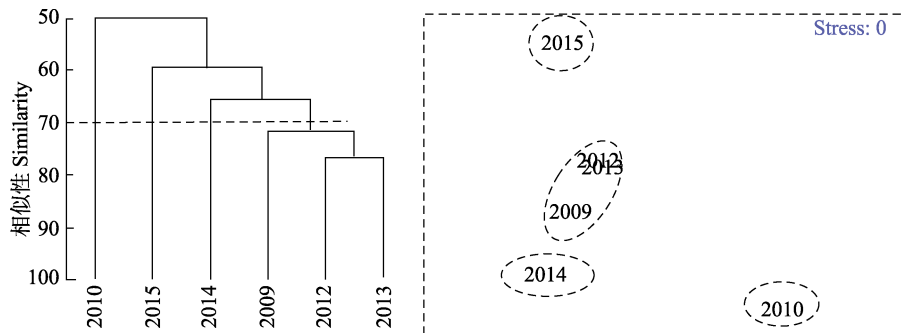


图 4 渤海甲壳类个体数密度的时间聚类及 MDS 分析

Fig.4 Temporal clustering and MDS analysis on the individual density of of crustaceans in the Bohai Sea

表 3 群落更替指数和迁移指数的参数

Tab.3 The parameters of the alternating index and the migration index of crustacean community

调查时间 (年-月) Survey time (Year-Month)	物种数 Number of species (A)	迁入物种数 Number of species migrated in (C)	迁出物种数 Number of species migrated out (B)	公共物种 数目 Number of common species (R)
2009-08	25	?	5	13
2010-08	24	4	5	13
2012-08	25	3	2	13
2013-08	16	0	9	13
2014-08	20	7	2	13
2015-08	22	5	3	13

## 3 讨论

### 3.1 种类组成及优势种

李忠义等(2017)研究了 2010 年和 2012~2014 年夏季(8 月)渤海鱼类群落的年际变化, 发现鱼类物种数目由 2010 年的 40 种下降至 2012 年的 34 种以及 2013 年的 29 种, 2014 年恢复至 33 种。本研究发现渤海甲壳类物种数目的变化趋势与鱼类近似, 均以 2013 年最低、并且 2014 年逐渐恢复, 不同之处在于鱼类物种数目 2012 年已大幅下降, 而甲壳类物种数目 2012 年时仍然在高位, 2013 年大幅下降。

本研究中, 口虾蛄在 2009~2015 年各年份均为渤海甲壳类的绝对优势种, 其生物量百分比及出现频率

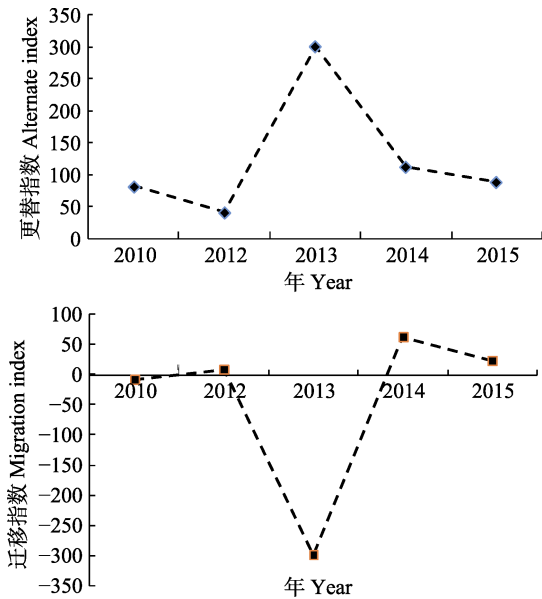


图 5 渤海甲壳类群落的更替指数和迁移指数  
Fig.5 The alternating index and the migration index of crustacean communities in the Bohai Sea

在所有物种中稳居第一。吴强等(2016)曾于 2011~2012 年对莱州湾的甲壳类群落进行了逐月调查,发现甲壳类的周年优势种为口虾蛄、褐虾、葛氏长臂虾、日本蛄和日本鼓虾(*Alpheus japonicus*),尤其以口虾蛄为绝对优势种,这与本研究的结果一致。综合来看,口虾蛄已经成为渤海甲壳类的绝对优势种。

### 3.2 资源密度及结构组成

2010 年 8 月渤海因斑鲆(*Konosirus punctatus*)暴发导致鱼类资源密度极高,2012 年则急剧下降至 2010 年的 5.80%,2013 年进一步下降至 2010 年的 5.44%,2014 年恢复至 2010 年的 7.33%(李忠义等,2017)。本研究中,渤海甲壳类资源密度的年际变化趋势与鱼类完全一致,由 2010 年的 2.26 kg/h 下降至 2012 年的 2.02 kg/h,2013 年进一步下降至 0.64 kg/h,2014 年恢复至 2.54 kg/h。总体来看,2013 年鱼类和甲壳类的资源密度均为近年来最低,并且 2014 年鱼类与甲壳类的资源密度均逐渐恢复。由此可以推断,过度捕捞、环境污染等外部因素是导致上述现象的原因,而不是鱼类和甲壳类之间的相互作用(如捕食、栖息地竞争等)。

作为渤海唯一的十足类物种,口虾蛄已经成为渤海甲壳类的绝对优势种,2009~2015 年其生物量和个体数百分比的平均值分别为 54.88%和 46.94%,在虾、蟹和虾蛄 3 个类别中均最高。其次,蟹类和虾类的生物量百分比平均值分别为 29.44%和 15.68%,个体数百分比平均值分别为 10.66%和 42.40%。这一研究结果

与近年来对渤海渔业资源结构的报道一致(李显森等,2016;李凡等,2013)。口虾蛄之所以能够成为渤海甲壳类的绝对优势种,一方面与渤海粉砂泥土底质的比例较高(刘晓收等,2014)、适宜口虾蛄的掘穴习性有关;另一方面,鉴于其穴居习性,口虾蛄既能避暑抗寒、又能减少台风等灾害性天气的伤害,并且抗病能力强(王波等,1998);此外,鱼类资源的衰退也降低了口虾蛄被敌害生物捕食的风险。

### 3.3 蓬莱 19-3 油井溢油的影响

渤海石油平台、管线的数量和密度在中国 4 个海区中最高,历史上曾发生过多起溢油事故(刘明等,2015),尤其以 2011 年蓬莱 19-3 油井平台溢油对生态系统的影响最大(宋朋远,2013)。Pan(2015)从捕捞及养殖方面分析了蓬莱 19-3 油田溢油的影响,认为甲壳类、贝类、藻类和海参等地方性物种产量下降的程度远高于移动性较强的鱼类。除中国对虾、日本对虾和鹰爪虾外,渤海绝大部分甲壳类物种为地方性物种,溢油对其产生的影响相对较大。Dauvin(2000)在研究了 Amoco Cadiz 号溢油对底栖生物群落的影响后,认为污染海域的生物群落需要 10 年或更久才能恢复至原来水平。本研究在统计整个渤海甲壳类数量变动的同时,还针对性地分析了蓬莱 19-3 油田毗邻水域甲壳类的数量变动,发现其变动趋势与整个渤海一致,即无论从整个渤海还是蓬莱 19-3 油田毗邻水域,2012~2013 年甲壳类的资源密度较 2009~2010 年均大幅下降,此后 2014~2015 年逐渐恢复。这与周政权等(2016)关于蓬莱 19-3 油田溢油对大型底栖生物的影响及其恢复年限的结果一致。据报道,蓬莱 19-3 平台溢油事故 1 年后渤海中部底质沉积物中石油烃含量显著减少(Pan *et al.*, 2015)。与石油烃的情况相比,溢油对鱼类(李忠义等,2017)和大型底栖生物(周政权等,2016)的影响会更加深远。根据本研究,2011 年蓬莱 19-3 平台溢油后的第 3~4 年,即 2014~2015 年,甲壳类资源已基本恢复,而无需等到 Dauvin(2000)提出的 10 年或更久,这也反映出蓬莱 19-3 油田的溢油规模远低于 Amoco Cadiz 号。

## 4 总结

基于 2009~2015 年夏季(8 月)的底拖网调查数据,对渤海甲壳类群落的研究表明:1) 渤海甲壳类的生态优势种类组成随年际变化,口虾蛄在每个年份均为绝对优势种;2) 2009~2013 年渤海甲壳类的物种数目、生物量和个体数密度均持续下降,2014~2015 年逐步恢复;3) 聚类分析(CLUSTER)和多维标度分析



(MDS)将 6 个调查年份分为 4 个群组, 群组间的群落结构差异性显著( $P < 0.05$ ), 口虾蛄、葛氏长臂虾和海蜚对群组区分的贡献率最高; 4)群落更替指数和迁移指数显示, 渤海甲壳类群落的稳定性以 2010 年和 2012 年最好, 以 2013 年最差。总体来看, 2011 年蓬莱 19-3 平台溢油后的第 3~4 年, 即 2014~2015 年渤海的甲壳类群落已逐渐恢复。

## 参 考 文 献

- Ambrose ST, Froneman PW, Smale MJ, *et al.* Winter diet shift of long-beaked common dolphins (*Delphinus capensis*) feeding in the sardine run off Kwa Zulu-Natal, South Africa. *Marine biology*, 2013, 160(7): 1543–1561
- Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 1957, 27(4): 326–349
- Clarke KR, Ainsworth M. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress*, 1993, 92(3): 205–219
- Clarke KR, Warwick RM. Change in the marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation. PRIMER-E Ltd., Plymouth P144, 2001
- Dauvin JC. The muddy fine sand *abra alba-melinna palmata*, community of the bay of morlaix twenty years after the amoco cadiz oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 40(6): 528–536
- Deng JY, Zhu JS, Cheng JS, *et al.* Main invertebrates in the bohai sea and their fishery biology. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 91–120 [邓景耀, 朱金声, 程济生, 等. 渤海主要无脊椎动物及其渔业生物学. *海洋水产研究*, 1988(9): 91–120]
- Fariña AC, Freire J, González-Gurriarán E. Megabenthic decapod crustacean assemblages on the Galician continental shelf and upper slope (north-west Spain). *Marine Biology*, 1997, 127(3): 419–434
- Iversen SA, Johannessen A, Jin XS, *et al.* Development of stock size, fishery and biological aspects of anchovy based on R/V "Bei Dou" 1984–1999 surveys. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(4): 33–39 [Iversen SA, Johannessen A, 金显仕, 等. Development of stock size, fishery and biological aspects of anchovy based on R/V "Bei Dou" 1984–1999 surveys. *海洋水产研究*, 2001, 22(4): 33–39]
- Iversen SA, Zhu DS, Johannessen A, *et al.* Stock size, distribution and biology of anchovy in the Yellow Sea and East China Sea. *Fisheries research*, 1993, 16(2): 147–163
- 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. 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*, 2000, 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*, 2000, 7(4): 22–26]
- Jin XS. Fishery biodiversity and community structure in the Yellow and Bohai Seas. *American Fisheries Society Symposium*, 2003, 643–650
- Li F, Zhang HJ, Lv ZB, *et al.* Species composition and community diversity of nekton in Laizhou Bay, China. *Biodiversity Science*, 2013, 21(5): 537–546 [李凡, 张焕君, 吕振波, 等. 莱州湾游泳动物群落种类组成及多样性. *生物多样性*, 2013, 21(5): 537–546]
- Li HY, Ling JZ, Li SF. Seasonal composition of crustacean species in the East China Sea and Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 13–19 [李惠玉, 凌建忠, 李圣法. 黄、东海底栖性甲壳动物种类组成的季节变化. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 13–19]
- Li XS, Wu YF, You ZB, *et al.* Analysis on the the catch composition by trammel net and its fishing performance for *Oratosquilla oratoria* in the Bohai Sea. *Marine Fisheries*, 2016, 38(5): 516–524 [李显森, 吴亚飞, 尤宗博, 等. 渤海口虾蛄三重刺网渔获组成及其捕捞性能分析. *海洋渔业*, 2016, 38(5): 516–524]
- Li ZY, Wu Q, Shan XJ, *et al.* Interannual variations in fish community structure in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 403–413 [李忠义, 吴强, 单秀娟, 等. 渤海鱼类群落结构的年际变化. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 403–413]
- Liu M, Zhang AB, Liao YJ, *et al.* Environmental quality of petroleum hydrocarbons in the surface sediment of the oil and gas exproation zone in the central of Bohai Sea. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(1): 12–16 [刘明, 张爱滨, 廖永杰, 等. 渤海中部油气开采区沉积物中石油烃环境质量. *海洋环境科学*, 2015, 34(1): 12–16]
- Liu XS, Fan Y, Shi SJ, *et al.* Stduies on the species composition and structure of macrofauna in the Bohai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(12): 53–66 [刘晓收, 范颖, 史书杰, 等. 渤海大型底栖动物种类组成与群落结构研究. *海洋学报*, 2014, 36(12): 53–66]
- Margalef DR. Information theory in ecology. *Society for General Systems Research*. 1958, 36–71
- National Bureau of Statistics of China. Chinese fishery statistical yearbook. Beijing: Science Press, 2015 [国家统计局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国统计出版社, 2015]
- Pan G, Qiu S, Liu X, *et al.* Estimating the economic damages from the Penglai 19-3 oil spill to the Yantai fisheries in the Bohai Sea of northeast China. *Marine Policy*, 2015(62): 18–24
- Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 1966, 13(1): 131–144
- Pinkas L, Oliphant S, Iverson I. Food habits of albacore, bluefin tuna and bonito in Californian waters. *Fish Bulletin*, 1971 (152): 1–105
- Shannon CE, Weaver, W. *Mathematical theory of communication*. University Illinois Press, 1963
- Shen GY. The research on risk assessment and avoidance of Bohai Sea ship oil spill accident. Master's Thesis of Dalian Maritime University, 2012 [沈光玉. 渤海及邻近海域船舶溢油事故风险评价及规避研究. 大连海事大学硕士研究

- 生学位论文, 2012]
- Song PY. Numerical simulation research on oil spill diffusion and drift process of the Bohai Sea oil field. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [宋朋远. 渤海油田溢油扩散与漂移的数值模拟研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Tang QS. Chinese marine biological resources in the exclusive economic zone and habitats. Beijing: Science Press, 2006, 364–407 [唐启升. 中国专属经济区海洋生物资源与栖息环境. 北京: 科学出版社, 2006, 364–407]
- Wang B, Zhang XL, Sun PX. On biological characters and artificial seedling-rearing techniques of Mantis Shrimp (*Oratosquilla oratoria*). Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas, 1998(2): 64–73 [王波, 张锡烈, 孙丕喜. 口虾蛄的生物学特征及其人工苗种生产技术. 黄渤海海洋, 1998(2): 64–73]
- Wu Q, Wang J, Zhang B, *et al.* Monthly variation in crustacean assemblage (Decapod and Stomatopod) structure and its relationships with environmental variables in Laizhou Bay, China. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(2): 370–378
- Zhang B, Jin XS, Wu Q, *et al.* Enhancement and release of Chinese shrimp in Laizhou Bay. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 361–370 [张波, 金显仕, 吴强, 等. 莱州湾中国明对虾增殖放流策略研究. 中国水产科学, 2015, 22(3): 361–370]
- Zhou ZQ, Li XJ, Chen LL, *et al.* Long-term effects of Penglai 19-3 oil spill event on the microbenthic community structure in Bohai Sea. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2016, 32(2): 92–100 [周政权, 李晓静, 陈琳琳, 等. 蓬莱 19-3 平台溢油事故对渤海大型底栖生物群落结构的长期影响. 广西科学院学报, 2016, 32(2): 92–100]

(编辑 江润林)

## Inter-Annual Variation in the Community Structure of Crustaceans in the Bohai Sea During Summer

WU Qiang<sup>1,2</sup>, LI Zhongyi<sup>1,2</sup>, WANG Jun<sup>1,2</sup>, SHAN Xiujuan<sup>1,2</sup>, JIN Xianshi<sup>1,2①</sup>

(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** The Penglai 19-3 oil spill in 2011 is considered as one of the most serious oil spill incidents in the Bohai Sea. However, the effect of the oil spill on benthic crustaceans is unclear. In this study, we analyzed the inter-annual variation in the community structure of crustaceans in the Bohai Sea based on the survey data collected by bottom trawls in summer (August) from 2009 to 2015. A total of 33 benthic crustacean species belonging to 2 orders, 21 families, and 29 genera were captured, which included 16 shrimp species, 16 crab species, and 1 stomatopod. The ecologically dominant species changed every year. However, *Oratosquilla oratoria* was the most dominant species every year from 2009 to 2015. Both the number of crustacean species and the biomass or individual yields declined from 2009 to 2013, and then increased from 2014 to 2015, synchronously. Cluster analysis (CLUSTER) and multidimensional scaling (MDS) analysis indicated that the crustacean community during 2009 to 2015 can be divided into 4 groups. The single factor analysis of similarities (ANOSIM) indicated that the difference in the community structure of crustaceans was significant ( $P < 0.05$ ). The similarity analysis of percentage (SIMPER) indicated that *O. oratoria*, *Palaemon gravieri*, and *Latreutes anoplonyx* contributed maximum to the intergroup similarity. The community alternating and community migration indices indicated that the stability of the crustacean community was the best in 2010 and the worst in 2013. The results indicate that the benthic crustacean community in the Bohai Sea recovered gradually during 2014 to 2015, three to four years after the Penglai 19-3 oil spill incident.

**Key words** Crustaceans; Community structure; Stability; Inter-annual variation; Bohai Sea

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171023002

http://www.ykxjz.cn/

姚建平, 单秀娟, 陈云龙, 魏秀锦. 海洋暖化和酸化对黄姑鱼早期生长发育的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 24-33  
Yao JP, Shan XJ, Chen YL, Wei XJ. Effects of ocean warming and acidification on the growth and development of *Nibea albiflora* Richardson during its early life history. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 24-33

## 海洋暖化和酸化对黄姑鱼早期生长发育的影响\*

姚建平<sup>1,3</sup> 单秀娟<sup>2,3①</sup> 陈云龙<sup>3</sup> 魏秀锦<sup>3,4</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 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; 4. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**摘要** 以黄姑鱼(*Nibea albiflora*)为研究对象, 根据 IPCC 2013 典型浓度排放路径(RCP)对 2100 年海洋温度和 pH 的预测值, 分别选择减缓温室气体排放情景(RCP 2.6)和高温温室气体排放情景(RCP 8.5), 设置温度和 pH 两个因素, 在实验室条件下模拟气候变化, 探究海洋暖化和酸化对黄姑鱼早期生长、发育的影响。结果显示, 在基础温度 24.0°C 条件下, 黄姑鱼进入稚鱼期的时间为 25 d, 高温处理(26.0°C~28.0°C)生长加快, 仅为 22 d, 同时, 随着温度升高(26.0°C、26.6°C 和 28.0°C), 生长率逐渐增加(0.73、0.74 和 0.78 mm/d), 并且各处理组之间生长率存在显著差异( $P < 0.05$ ), 但死亡率在 26.6°C 最高, 26.0°C 最低。黄姑鱼死亡率在 pH 为 7.80、7.73 和 7.49 时分别为 3.9%、19.4% 和 21.7%, 各处理组死亡率差异显著( $P < 0.05$ ), 但 pH 对黄姑鱼早期生长率影响不显著( $P > 0.05$ )。通过逻辑斯蒂生长方程拟合, 结合 IPCC 对 2100 年温度和 pH 的预测, 到 2100 年, 在 RCP 2.6 情景下, 黄姑鱼早期生长率为 0.71 mm/d, 死亡率为 31.1%; 在 RCP 8.5 情景下, 黄姑鱼生长率最高达到 0.76 mm/d, 死亡率为 23.9%。在海洋酸化和暖化的共同作用下, 黄姑鱼的早期补充将会受到影响。

**关键词** 海洋酸化; 海洋暖化; 黄姑鱼; 生长发育

**中图分类号** S931.16 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0024-10

气候变化导致的海洋酸化和暖化对海洋生物及海洋生态系统有显著影响(刘晓辉等, 2017)。温度是重要的环境因子, 影响海洋生物的繁殖(吴伟峰等, 1999)、生长、发育、生物量、分布迁移等方面。首先, 温度影响海洋鱼类的性别分化(程晓春等, 2007), 升温能促进性腺发育(张亚晨等, 2016)和生殖(徐永江等, 2011; 管卫兵等, 2011; 张亚晨等, 2016), 缩短发育时间(陈政强等, 1996)。其次, 在适宜的温度下,

随温度升高, 酶活性加强, 代谢加快(戴超等, 2014; Messmer *et al*, 2017), 发育周期缩短(吴珍等, 2016)。再者, 海水温度影响海洋资源生物量(谷德贤等, 2017), 随温度升高, 平均浮游生物量和海洋渔获产量增加(李恒等, 2013; 靳少非等, 2014; Punzón *et al*, 2016; 赵希岳等, 2016); 温度直接作用于产卵群体、鱼卵仔稚鱼及成体的空间分布(万瑞景等, 2014; Holmquist *et al*, 2016), 如暖化造成海洋生物向纬度更高、水层

\*国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)、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)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022016003)共同资助 [This work was supported by the National Basic Research Program of China (2015CB453303), the “Aoshan Talents” Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-ES07), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (20603022016003)]. 姚建平, E-mail: 1192375138@qq.com

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

收稿日期: 2017-10-23, 收修改稿日期: 2017-11-20

更深处偏移(苏杭等, 2015; Punzón *et al*, 2016)。pH 也是重要的环境因子之一, 一方面, 酸化通过降低珊瑚、贝类、甲壳类等海洋钙化生物的钙化率(Zhan, 2017), 造成死亡率上升(Hoegh-Guldberg *et al*, 2007); 另一方面, pH 对海洋鱼类等非钙化生物的生殖、发育、感官等方面有影响, pH 值的高低会影响鱼卵的活性(刘鉴毅等, 2014; 顾正选等, 2017)和孵化率(冯广朋等, 2009), 并影响其代谢速率及蛋白质合成量(Franke *et al*, 2011), 从而关系到鱼类生长(Munday *et al*, 2011; Branch *et al*, 2013)及死亡(Munday *et al*, 2009; Baumann *et al*, 2012)。酸化还能够降低海洋鱼类嗅觉、听觉等感觉器官的敏感性(Munday *et al*, 2009、2010; 王晓杰等, 2015), 从而增加低营养级鱼类被捕食的风险, 并降低高营养级鱼类的捕食效率(杨林林, 2014)。

综上所述, 海洋酸化和暖化不仅会对海洋生物产生影响, 还对海洋生态系统的结构和功能发挥作用(Munday *et al*, 2010; Pimentel *et al*, 2016)。本文以重要的经济种类黄姑鱼(*Nibea albiflora*)为研究对象, 基于 IPCC 对 2100 年海洋温度和 pH 的预测值, 通过温度和 pH 调控, 研究了海洋暖化和酸化对黄姑鱼早期生长发育的影响, 以期气候变化背景下海洋鱼类生态学研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用的黄姑鱼受精卵、鱼苗均购于福建省宁德市南海水产科技有限公司。黄姑鱼受精卵为端黄卵, 无色透明, 平均卵径为(0.82±0.27) mm。放卵时, 剔除死卵, 选择处于尾鳍形成期(64%)、尾部游离期(30%)、晶体形成期和出膜前期(6%)的活受精卵约计 45000 ind., 每桶(150 L)鱼卵密度 0.3 ind./ml。鱼苗购入时已孵化 35 d, 在实验室自然海水(T=25.0℃, pH=7.80, DO=4.5~5.5 mg/L, S=23)条件下暂养 1 d, 放苗时, 平均鱼体长为(27.60±6.70) mm, 平均体重为(0.42±0.27) g, 放养密度为 0.6 ind./L。

### 1.2 实验方法

根据 IPCC(2013)对 2100 年全球海洋变化的预测, 选择减缓温室气体排放情景(RCP 2.6)和高温温室气体排放情景(RCP 8.5): 根据 RCP 2.6, 到 2100 年全球海洋平均温度将升高 0.6℃, 海水 pH 将下降 0.07 个单位; 根据 RCP 8.5, 到 2100 年全球海洋平均温度将升高 2.0℃, 海水酸度将下降 0.31 个单位, 设置温度和酸度 2 个因子开展实验, 设定当前海洋温度和 pH

分别为 26.0℃和 7.8, 实验梯度分别是  $T_1=26.0^\circ\text{C}$ 、 $T_2=26.6^\circ\text{C}$ 、 $T_3=28.0^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH}_1=7.80$ 、 $\text{pH}_2=7.73$ 、 $\text{pH}_3=7.49$ 。实验采用 3×3 交叉组合设计, 每组设置 2 个重复。选择  $T_1(26.0^\circ\text{C}) \times \text{pH}_1(7.80)$ 、 $T_2(26.6^\circ\text{C}) \times \text{pH}_2(7.73)$ 、 $T_3(28.0^\circ\text{C}) \times \text{pH}_3(7.49)$  分别作为对照组、处理组(一)和处理组(二)。根据鱼类早期生长发育阶段, 把实验分为两部分, 第一部分为黄姑鱼受精卵孵化及仔稚鱼期生长发育阶段, 第二部分为幼鱼期生长发育阶段。实验周期为 2 个月。

实验过程中, 通过恒温加热棒控制养殖温度, 温度变化幅度控制在±0.2℃; 用 CO<sub>2</sub> 法控制养殖水体 pH 值, pH 变化幅度控制在±0.05, 每天隔 4 h 测量 1 次化学指标, 包括 T、S(±23)、pH、DO(4.5~5.5 mg/L), 受精卵孵化 2 d 后开始投喂轮虫(*Brachionus rotundiformis*) [加小球藻(*Nannochloropsis oculata*)强化]作为开口饵料, 从 12 d 后开始投喂卤虫(*Artemia salina*), 35 日龄后的幼鱼投喂粒径为 2.00 mm 的配合饲料。养殖过程中, 仔细观察和记录受精卵的孵化和死亡情况, 并记录幼鱼死亡个体数。定期用吸管吸出浮在表面的死鱼, 每天用虹吸法吸出底层杂质并换水, 前一个月换水量为 30%, 后期换水量为 100%。实验前 8 d, 每天取样 20~30 尾鱼; 孵化后 9~23 d, 隔 3 d 取样 1 次, 每次取 10~20 尾鱼; 24 d 后, 每周取样 1 次, 每次取 8 尾鱼。样品用 75% 的乙醇现场固定保存, 带回实验室进行生物学测量。第一阶段(0~24 d)显微镜下测量鱼体长; 第二阶段(24 d 后)测量鱼体长和体重, 鱼体长以 mm 为单位, 测量标准为从吻前端到脊椎骨末端的长度作为鱼体长, 体重以 g 为单位, 精确到 0.01 g。

### 1.3 生长研究方法

采用 SPSS 13.0 和 Excel 2013 处理数据, 并检验不同组别之间生长率和死亡率的差异显著性, 显著水平  $P<0.05$ 。分别用 von Bertalanffy 生长方程、Logistic 生长方程、Logarithmic 生长方程和一般线性方程拟合黄姑鱼早期生长方程并检验拟合效果。生长率、死亡率及 AIC(Akaike's information criterion)检验方程如下:

von Bertalanffy 生长方程:

$$L_t = L_\infty(1 - e^{-k(t-t_0)}) \quad (1)$$

式中,  $L_t$  为生长天数为  $t$  时的鱼体长, 单位 mm;  $L_\infty$  为预测条件下, 鱼体长能够达到的最大值;  $k$  为 VB 生长常数;  $t_0$  为预测条件下, 假设鱼体长为 0 时的生长天数。

Logistic 生长方程:

$$L_t = \frac{L_\infty}{1 + e^{(a-rt)}} \quad (2)$$

式中,  $L_t$  为生长天数为  $t$  时的鱼体长, 单位 mm;  $L_\infty$  为预测条件下, 鱼体长能够达到的最大值;  $a$  为逻辑斯蒂生长参数;  $r$  为代表瞬时生长率。

Logarithmic 生长方程:

$$L_t = b_0 + b_1 \ln t \quad (3)$$

式中,  $L_t$  为生长天数为  $t$  时的鱼体长, 单位 mm;  $b_0$ 、 $b_1$  为 Logarithmic 生长参数。

一般线性方程:

$$L_t = b_0 t + b_1 \quad (4)$$

式中,  $L_t$  为生长天数为  $t$  时的鱼体长, 单位 mm;  $b_0$ 、 $b_1$  为生长参数。

死亡率:

$$M = \frac{TM}{T} \quad (5)$$

式中,  $M$  为死亡率, 单位%;  $TM$  为实验过程中鱼死亡个体数, 单位 ind.;  $T$  为放苗总数, 单位 ind., 在本实验中该值为 90 ind.。

生长率:

$$r = \frac{1}{t} \sum (L_t - L_{t-1}) \quad (6)$$

式中,  $r$  为生长率, 单位 mm/d;  $L_t$  为生长天数为  $t$  时的鱼体长, 单位 mm;  $L_{t-1}$  为生长天数为  $t-1$  时的鱼体长, 单位 mm;  $t$  为生长天数。

AIC 准则:

$$AIC = 2 \times k + n \times \ln \left( \frac{SSR}{n} \right) \quad (7)$$

式中,  $k$  为拟合方程中参数常数的数量;  $n$  为样本数;  $SSR$  为残差平方和。

## 2 结果

### 2.1 温度对黄姑鱼早期生长发育的影响

**2.1.1 对发育的影响** 放卵时, 受精卵大部分处于尾鳍形成期(64%), 放卵后, 经 4 h 观察, 受精卵全部孵化, 初孵仔鱼均匀分布于水体。在本实验条件下, 结合第一阶段的数据, 黄姑鱼的早期生活史分为 5 个阶段: 1~2 日龄为卵黄囊期仔鱼, 3~11 日龄为前弯曲期仔鱼, 12~16 日龄为弯曲期仔鱼, 17~22 日龄为后弯曲期仔鱼, 22 日龄后进入稚鱼期(表 1)。

表 1 黄姑鱼早期生活史阶段及特点

Tab.1 The developmental characteristics of *N. albiflora* during early life history

发育阶段 Developmental stage	T=24.0℃	T=26.0℃~28.0℃	特点 Characteristics
卵黄囊期仔鱼 Yolk-sac stage	1~3 日龄	1~2 日龄	内源性营养阶段, 其营养主要来源于卵黄囊
前弯曲期仔鱼 Pre-flexion stage	4~15 日龄	3~11 日龄	卵黄囊消失, 由内源性营养阶段转入外源性营养, 主要以小球藻等单胞藻类和轮虫为饵
弯曲期仔鱼 Flexion stage	16~20 日龄	12~16 日龄	从仔鱼脊椎末端开始上曲, 至尾下骨后缘与尾索垂直时结束, 初具鱼体的雏形, 游泳能力增强, 初步集群, 主要以轮虫为饵, 并且能够摄食少量卤虫
后弯曲期仔鱼 Post-flexion stage	21~25 日龄	17~22 日龄	各部分鳍条基本成形, 体表被菊花状色素, 主要以卤虫为饵
稚鱼期 Juvenile stage	25 日龄后	22 日龄后	体表布满色素, 进入稚鱼阶段
幼鱼期 Young stage		35 日龄后	幼鱼投喂粒径为 2 mm 的配合饲料, 鱼群集群现象明显, 绕养殖水桶底部沿桶壁做顺时针游动

**2.1.2 对死亡率的影响** 以第二阶段实验数据为依据, 分别保持 pH 为 7.80、7.73 和 7.49 时, 生长温度分别为 26.0℃、26.6℃和 28.0℃时, 其死亡率的变化范围分别为 3.9%~22.2%、19.4%~31.1%和 21.7%~32.8%, 生长温度为 26.6℃组死亡率最高, 显著高于其他 2 组( $P < 0.05$ )。生长温度为 28.0℃组的死亡率均高于生长温度为 26.0℃组的死亡率, 但差异不显著( $P > 0.05$ ), 黄姑鱼在温度为 28.0℃组的死亡率相较于温度为 26.6℃组有所降低, 说明黄姑鱼对温度具有较强的适应能力。随着生长温度的升高, 死亡率先升高

后降低, 生长温度为 26.6℃时死亡率最高, 生长温度为 26.0℃时死亡率最低(图 1)。

**2.1.3 对生长率的影响** 黄姑鱼早期生长率随温度升高而升高(图 2), 保持 pH=7.80, 随着温度升高, 生长率增加, 温度为 28.0℃组的生长率要显著高于其他 2 组( $P < 0.05$ ), 达到 0.78 mm/d; 保持 pH=7.73 时, 生长率随温度的升高先降低后升高, 温度为 26.6℃组的生长率最低, 为 0.71 mm/d, 温度为 28.0℃组的生长率显著高于其他 2 组( $P < 0.05$ ), 达到 0.76 mm/d; 保持 pH=7.49, 随着生长温度从 26.0℃升到 28.0℃,



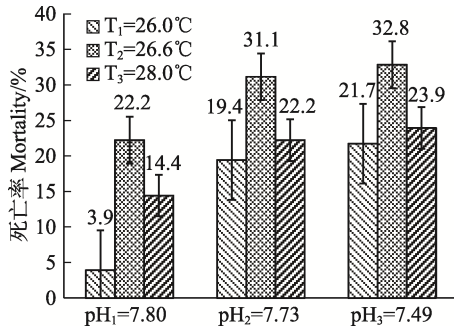


图 1 不同生长温度下黄姑鱼早期死亡率  
Fig.1 The mortality of *N. albiflora* during early development stage under different temperature

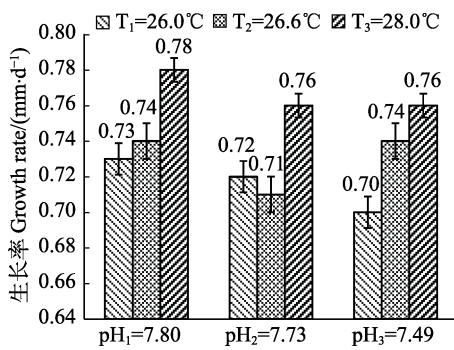


图 2 不同生长温度下黄姑鱼早期生长率  
Fig.2 The growth rate of *N. albiflora* during early development stage under different temperature

其生长率也从 0.70 mm/d 升高到 0.76 mm/d, 且其组间差异显著( $P < 0.05$ ), 说明温度是影响鱼类早期生长率的重要因子。

## 2.2 pH 对黄姑鱼早期生长发育的影响

**2.2.1 对死亡率的影响** 保持温度不变, 对受酸度影响下的黄姑鱼死亡率进行方差分析。随着生长酸度的增加, 黄姑鱼早期死亡率逐渐增加, 酸度是影响早期死亡率的重要环境因子(图 3)。当保持温度为 26.0°C 时, 受酸度的影响, 死亡率由 pH=7.80 时的 3.9% 增加到 pH=7.49 时的 21.7%, 差异显著( $P < 0.05$ ), 约增加了 5.5 倍。当保持生长温度为 26.6°C 时, pH 为 7.80、7.73 和 7.49 时的死亡率分别为 22.2%、31.1% 和 32.8%。生长温度保持在 28.0°C 时, 死亡率随着酸度的降低而升高, pH=7.80 时, 死亡率最低为 14.4%, pH=7.49 时, 死亡率最高为 23.9%。

**2.2.2 对生长率的影响** 通过对不同酸度条件下的黄姑鱼早期生长率进行方差分析, 结果显示, 随着酸度的降低, 生长率有降低趋势, 但差异不显著( $P > 0.05$ )。保持温度为 26.0°C 时, pH 在 7.80~7.49 的变化

范围内, 其生长率分别为 0.73、0.72 和 0.70 mm/d。保持温度为 26.6°C 时, pH 在 7.80~7.49 的变化范围内, 其生长率分别为 0.74、0.71 和 0.74 mm/d。保持温度为 26.6°C 时, 生长率在 pH=7.80 时最高, 为 0.78 mm/d, 其他 2 组生长率相同, 均为 0.76 mm/d (图 4)。

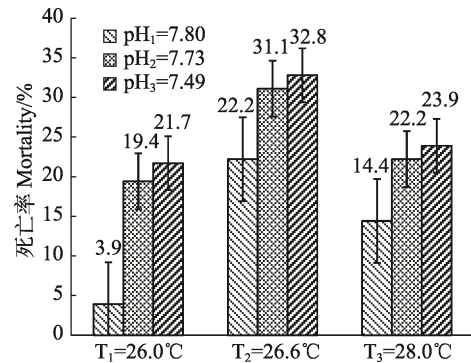


图 3 不同生长酸度下黄姑鱼早期死亡率  
Fig.3 The mortality of *N. albiflora* during early development stage under different acidity

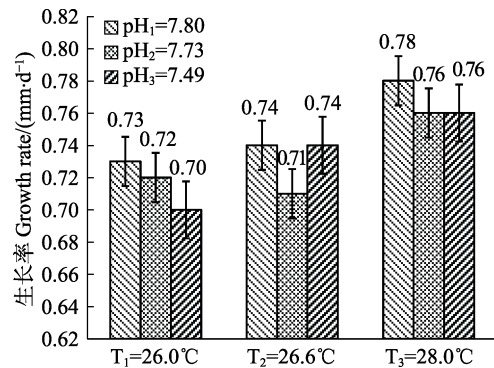


图 4 不同生长酸度下黄姑鱼早期生长率  
Fig.4 The growth rate of *N. albiflora* during early development stage under different acidity

## 2.3 温度和酸度的交互作用

**2.3.1 对死亡率和生长率的影响** 多因素方差分析表明, 在一定的温度范围( $T_1=26.0^\circ\text{C}$ 、 $T_2=26.6^\circ\text{C}$ 、 $T_3=28.0^\circ\text{C}$ )和酸度范围(pH=7.80、pH=7.73、pH=7.49)内, 温度和酸度交互效应对黄姑鱼早期生长率影响不显著( $P > 0.05$ ), 温度和酸度交互作用与温度或酸度单一因子对早期生长率的影响相比较没有显著差异( $P > 0.05$ ), 说明养殖水体的酸度不是影响黄姑鱼早期生长率的主要因素, 但其交互作用对黄姑鱼早期死亡率的影响显著( $P < 0.05$ ), 表现为温度和酸度的交互作用增加了鱼类早期死亡率, 温度和酸度的共同作用效果大于由温度、酸度单一因子的作用(表 2)。



表2 酸化和暖化黄姑鱼早期生长率和死亡率的方差分析  
Tab.2 The variance analysis on the growth rate and mortality of *N. albiflora* under experimental condition

生长率 Growth rate	F	P	死亡率 Mortality	F	P
酸度 Acidity	0.930	0.429	酸度 Acidity	89.870*	<0.001
温度 Temperature	5.260*	0.031	温度 Temperature	93.070*	<0.001
交互 Interaction	0.410	0.799	交互 Interaction	4.130*	0.036

\*代表差异显著

\* denoted significant difference

## 2.4 不同 RCP 情景下黄姑鱼的早期生长

根据 IPCC 2013 典型浓度路径对全球海洋的预测, 依据 RCP 2.6 预测, 在处理组(一)条件下, 到 2100 年, 黄姑鱼早期生长率将会下降至 0.71 mm/d, 相比于对照组下降了 0.02 mm/d, 死亡率将会增加到 31.1%, 约为对照组死亡率(3.9%)的 8 倍。依据 RCP 8.5 预测, 在处理组(二)条件下, 到 2100 年, 其早期生长率和死亡率相较于当前海洋条件(对照组)均会上升, 生长率将会达到 0.76 mm/d, 相比于对照组条件增加了 0.03 mm/d, 死亡率将会增加到 23.9%, 约为对照组死亡率的 6 倍。其生长率的增加和死亡率的上升对黄姑鱼早期补充机制有相互拮抗效应, 如生长率增加在一定程度上会增加黄姑鱼早期补充量, 而死亡率的上升在一定程度上会减少黄姑鱼早期补充量。

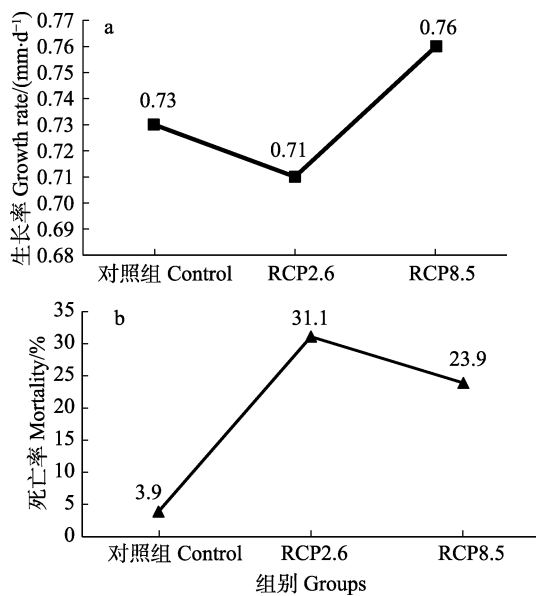


图5 不同 RCP 情景下黄姑鱼早期生长的死亡率和生长率  
Fig.5 The mortality and growth rate of *N. albiflora* during early development stage under different scenarios

对照组 Control group:  $T_1=26.0^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}_1=7.80$ ; RCP 2.6:  
 $T_2=26.6^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}_2=7.73$ ; RCP 2.6:  $T_2=28.0^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}_2=7.49$

2.4.1 最佳生长方程 分别用 4 种生长方程(式 1、2、3、4)拟合鱼类早期生长鱼体长与时间的关系, 生

长模型采用规划求解的方法求得, 通过 AIC 准则检验拟合效果(式 7)。在不同温度和 pH 交互影响下, 黄姑鱼早期生长的生长方程参数存在差异, 但最佳拟合方程均为 Logistic 生长方程, von Bertalanffy 生长方程拟合效果次之, Logarithmic 生长方程拟合效果最差, 下图为 Logistic 生长方程拟合图以及拟合方程参数(图 6, 表 3)。

## 3 讨论

### 3.1 温度和 pH 对黄姑鱼早期生长的影响

黄姑鱼受精卵发育与大多数硬骨鱼类类似, 其早期生活史分为五个阶段(表 1), 与耿智等(2012)在温度为  $24.0^{\circ}\text{C}$  养殖的黄姑鱼早期生活史阶段相比, 当从基础温度  $24.0^{\circ}\text{C}$  上升到  $26.0^{\circ}\text{C}\sim 28.0^{\circ}\text{C}$  时, 生长速度加快, 完成孵化及生活史阶段进入稚鱼期由原来的 25 d 缩短到 22 d, 提前进入稚鱼期。根据有效积温法则, 发育期的平均水温(有效温度)与发育所经过的天数或时数的乘积是一个常数, 说明生长率随温度升高加快, 完成某一阶段的生长需要更短的时间。黄姑鱼是变温动物, 温度通过影响生物化学反应而直接影响其机体的新陈代谢速率, 在适宜的温度范围内, 黄姑鱼的生长速率和温度呈正相关(常杰等, 2016), 如适当升高鱼类发育早期的温度, 可以明显加快代谢速率, 增加基因和肌肉表达, 其心、肝、脑等器官的活性增强, 生长率加快(Gutierrez de Paula *et al*, 2014; 牟金婷等, 2017), 但当超过其最适宜的温度时, 鱼类就会表现出应激反应(李文龙等, 2017)、耗氧率和排氨率下降(邢道超等, 2017)、不正常个体的比例增加(Cole *et al*, 2016; 张廷廷等, 2016)、死亡率增加。在本研究中, 死亡率随着温度的增加( $26.0^{\circ}\text{C}$ 、 $26.6^{\circ}\text{C}$  和  $28.0^{\circ}\text{C}$ )先升高后降低, 其可能原因是温度为  $26.6^{\circ}\text{C}$  时, 更加有利于鱼类寄生虫的生殖和繁衍, 例如, 引发养殖鱼类发生白点病的刺激隐核虫, 同时, 黄姑鱼对水体环境有一个适应机制, 在孵化生长的过程中可能逐渐适应生存环境而出现与常态相反的现象。

pH 也是重要的环境因子之一, 吴萍等(2001)在黄

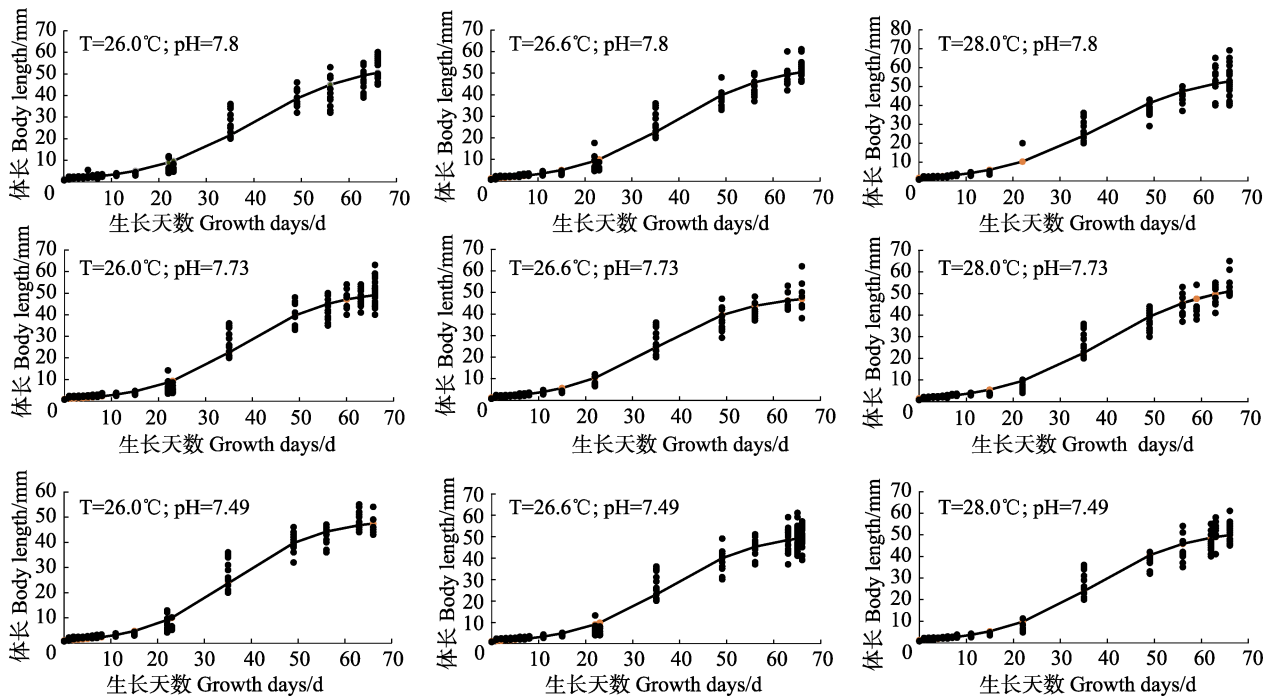


图 6 不同酸度温度组合下的黄姑鱼早期生长(Logistic 生长方程拟合)

Fig.6 The growth of *N. albiflora* during early development stage under different experimental condition (Logistic model)

表 3 不同酸度温度组合下黄姑鱼早期生长方程(Logistic 生长方程)

Tab.3 The growth model of *N. albiflora* during early development stage under different experimental condition (Logistic model)

酸度 Acidity	参数 Parameter	温度 Temperature		
		T <sub>1</sub> =26.0°C	T <sub>2</sub> =26.6°C	T <sub>3</sub> =28.0°C
pH <sub>1</sub> =7.80	$L_{\infty}$	54.90	53.85	56.75
	$a$	3.66	3.69	3.54
	$r$	0.09	0.10	0.09
pH <sub>2</sub> =7.73	$L_{\infty}$	51.56	48.82	55.36
	$a$	3.88	3.55	3.56
	$r$	0.10	0.10	0.09
pH <sub>3</sub> =7.49	$L_{\infty}$	49.25	51.78	55.36
	$a$	3.82	3.83	3.56
	$r$	0.11	0.10	0.09

鲷鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)对 pH 的适应性实验中发现, 黄鲷鱼在 pH 偏低的情况下生长缓慢; 同时, 在较酸水体中生活的鱼类表现为不爱活动、耗氧下降、代谢低落、摄食减少、消化差、生长受到抑制(上海水产学院, 1982), 可能是因为鱼体中的酶发挥活性需要合适的 pH, pH 过高或过低都会影响酶促反应的进行, 从而影响鱼类的早期生长。在本研究中, 随 pH 的降低, 黄姑鱼早期死亡率逐渐升高; 但 pH 对生长率的影响较小, 从整体看, 生长率随 pH 的降低呈

降低趋势。

### 3.2 在 2100 年海洋酸化和暖化条件下黄姑鱼早期生长率和死亡率的变化

在海洋酸化和暖化的共同作用下, 黄姑鱼早期生长受到的影响会加剧, 即“1+1>2 效应”, 酸化能够加剧暖化带来的负面效应, 并与其正面影响有拮抗作用, 随着海洋变化的加剧, 在接下来的一个世纪里, 海洋酸化的影响可能会超过海洋暖化(Horvath *et al*, 2016)。本研究表明, 到 2100 年, 在酸化和暖化的共同作用下, 黄姑鱼早期生长率将增加, 早期死亡率将升高, 早期补充量会因生长率的升高而有所增加, 但同时会因死亡率的升高而有所下降, 其具体补充机制需要进一步探究。

严格来说, 能够准确描述某种鱼类生长特点的生长模型并不存在, 只有通过大量的实验来寻找更加适合鱼类早期生长特点的生长模型。在理想的状态下, 种群可以无限制增加, 但在实际情况中, 种群的增加会受到各种外界环境的影响, 逻辑斯蒂生长方程能够较好地模拟种群生长的趋势(许永明, 1985)。在对黄姑鱼早期生长发育研究中, 通过对鱼类早期生长方程进行拟合, 发现逻辑斯蒂生长方程能够更好地表明黄姑鱼早期生长特点, 在实验过程中, 养殖水体溶解氧含量以及饵料投喂充足, 其生长曲线呈“S”型增长, 主要是因为受到环境因子(温度、酸度)的制约。

国内外研究表明,海洋酸化和暖化对鱼类、贝类、海胆类、藻类等海洋生物均有显著影响。温度升高会缩短大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)胚胎发育的时间(胡发文等, 2012), 并能提高大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼的生长率(李文龙等, 2017), 但当温度超过最适宜温度时, 纹缟鰕虎鱼的受精率和孵化率则会下降(冯广朋等, 2009)。海洋 pH 的变化主要影响海洋鱼类的感觉器官, 如酸化条件下珊瑚礁小丑鱼选择最适栖息地的能力下降(Munday *et al*, 2009), 大型捕食性海洋生物, 如鲨鱼发现被捕食者的能力及捕食效率下降(Pistevos *et al*, 2017)。在酸化条件下, 海洋贝类钙化率下降, 在 pH 下降到 7.3 时, 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的钙化率趋近于 0, 同时, 碳呼吸率和耗氧率明显下降(张明亮等, 2011)。马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)在酸化条件下畸形率升高, D 型幼虫壳体的生长受到抑制(何盛毅等, 2011)。在海洋酸化条件下, 海洋珊瑚礁钙化率下降, 且对酸化适应性较差, 珊瑚白化现象加重(Langdon *et al*, 2011), 紫海胆(*Heliocidaris crassispina*)在酸化条件下, 基因表达受限, 钙化率降低(Todgham *et al*, 2009), 中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)浮游幼体存活率随酸化加重逐渐降低、机体对称性丧失、钙化骨针外露(黄显雅等, 2014)。刘树霞等(2009)研究表明, 在光照大于 100 lx 时, 经济红藻龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)随着温度升高其光合作用逐渐增强, 生物产量升高。海洋酸化和暖化对海洋生物的影响不容忽视, 对海洋鱼类生长的直接影响仍需要进一步探究。

#### 4 结论

本研究根据 IPCC 对 2100 年海洋理化环境的预测设计实验, 探究温度和酸度两个环境因子对黄姑鱼早期生长率和死亡率的影响, 并预测在 2100 年黄姑鱼在海洋酸化和暖化条件下的生长与死亡情况。研究表明, 到 2100 年, 黄姑鱼早期发育周期缩短、生长速率加快、死亡率升高, 这将影响到黄姑鱼的早期补充机制, 从而影响到黄姑鱼海洋捕捞产量。

**致谢:** 感谢福建省宁德市南海水产科技有限公司的总经理彭立成、助理工程师黄伟卿等人提供养殖技术支持及养殖平台。

#### 参 考 文 献

Baumann H, Talmage SC, Gobler CJ. Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon

- dioxide. *Nature Climate Change*, 2012, 2(1): 38–41
- Branch TA, DeJoseph BM, Ray LJ, *et al*. Impacts of ocean acidification on marine seafood. *Trends in Ecology & Evolution*, 2013, 28(3): 178–186
- Chang J, Xu GF, Li SG, *et al*. Effect of temperature and salinity on the survival and growth of larval and juvenile stage manchurian trout (*Brachymystax lenok* Pallas). *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(5): 87–91 [常杰, 徐革锋, 李树国, 等. 温度与盐度对细鳞鲑仔、稚鱼存活和生长的影响. *水生生态学杂志*, 2016, 37(5): 87–91]
- Chen ZQ, Lin JZ, Zhang YZ, *et al*. Effects of temperature on embryonic development and larval and post-larval survival in the autumn-winter spawning groups of the red bream, *Pagrus major*. *Journal of Xiamen Fisheries College*, 1996, 18(1): 63–70 [陈政强, 林锦宗, 张雅芝, 等. 温度对秋冬季生殖真鲷胚胎发育及仔、稚鱼存活的影响. *厦门水产学院学报*, 1996, 18(1): 63–70]
- Cheng XC, Lin DJ, You YL. Influence of temperature on sex differentiation of teleost, *Pseudobarbus vachelli*. *Zoological Research*, 2007, 28(1): 73–80 [程晓春, 林丹军, 尤永隆. 温度对江黄颡鱼性分化的影响. *动物学研究*, 2007, 28(1): 73–80]
- Cole VJ, Parker LM, O'Connor SJ, *et al*. Effects of multiple climate change stressors: Ocean acidification interacts with warming, hyposalinity, and low food supply on the larvae of the brooding flat oyster *Ostrea angasi*. *Marine Biology*, 2016, 163(5): 1–17
- Dai C, Wang F, Fang ZH, *et al*. Effects of temperature on the respiratory metabolism and activities of related enzymes of swimming crab *Protunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 90–96 [戴超, 王芳, 房子恒, 等. 温度对三疣梭子蟹呼吸代谢及其相关酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 90–96]
- Feng GP, Zhuang P, Zhang LZ, *et al*. The adaptability of embryos and larvae of *Tridentiger trigonocephalus* at the Yangtze River estuary to ecological factors. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(10): 5185–5194 [冯广朋, 庄平, 章龙珍, 等. 长江口纹缟鰕虎鱼早期发育对生态因子的适应性. *生态学报*, 2009, 29(10): 5185–5194]
- Franke A, Clemmesen C. Effect of ocean acidification on early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Biogeosciences Discussions*, 2011, 8(4): 7097–7126
- Geng Z, Xu DD, Shi HL, *et al*. Study on development and growth of early life stages of *Nibea albiflora* Richardson. *Advances in Marine Science*, 2012, 30(1): 77–86 [耿智, 徐冬冬, 史会来, 等. 黄姑鱼(*Nibea albiflora* Richardson)早期生长发育研究. *海洋科学进展*, 2012, 30(1): 77–86]
- Gu DX, Liu GS, Wang XY, *et al*. Preliminary study on fish resources and its relationship with environmental factors in Tianjin Sea area based on generalized additive model (GAM). *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2017, 24(1): 38–43 [谷德贤, 刘国山, 王晓宇, 等. 基于 GAM 模型的天津海域鱼类资源和环境因子关系的初步研究.

- 天津农学院学报, 2017, 24(1): 38–43]
- Gu ZX, Ding SH. Influence of pH and different concentrations of NaCl solution on *Schizothorax prenanit* sperm vitality. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2017, 39(7): 72–76 [顾正选, 丁诗华. pH 值及不同百分浓度 NaCl 溶液对齐口裂腹鱼精子活力的影响. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(7): 72–76]
- Guan WB, Chen HH, He WH. Reproductive characteristics and condition status of *Coilia mystus* (Linnaeus) in the Changjiang River estuary. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(5): 1–9 [管卫兵, 陈辉辉, 何文辉. 长江口凤鲚生殖群体的动态特征. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 1–9]
- Gutierrez de Paula PT, de Almeida FL, Carani FR, et al. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 169(1): 31–37
- He SY, Lin CX, He MX, et al. Impacts of ocean acidification on the development of *Pinctada martensii* embryo and early larva. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(4): 747–751 [何盛毅, 林传旭, 何毛贤, 等. 海洋酸化对马氏珠母贝胚胎和早期幼虫发育的影响. 生态学杂志, 2011, 30(4): 747–751]
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, et al. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. Science, 2007, 318(5857): 1737–1742
- Holmquist JR, Booth RK, Macdonald GM. Boreal peatland water table depth and carbon accumulation during the holocene thermal maximum, Roman Warm Period, and Medieval Climate Anomaly. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 2016, 444: 15–27
- Horvath KM, Castillo KD, Armstrong P, et al. Next-century ocean acidification and warming both reduce calcification rate, but only acidification alters skeletal morphology of reef-building coral *Siderastrea siderea*. Scientific Reports, 2016(6): 29613
- Hu FW, Pan L, Gao FX, et al. Embryonic development of *Hexagrammos otakii* and its relationship with incubation temperature. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 28–33 [胡发文, 潘雷, 高凤祥, 等. 大泷六线鱼胚胎发育及其与水温的关系. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 28–33]
- Huang XY. The impact of ocean acidification on larval development in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2014 [黄显雅. 海洋酸化对中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)浮游幼体发育的影响. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Jin SF, Tang FH, Dai LF, et al. Diversity of zooplankton in the squid fishing ground in the North Pacific Ocean, 2010. Marine Environmental Science, 2014, 33(4): 503–508 [靳少非, 唐峰华, 戴立峰, 等. 2010 年北太平洋柔鱼渔场浮游动物多样性. 海洋环境科学, 2014, 33(4): 503–508]
- Langdon C, Takahashi T, Sweeney C. Effect of calcium carbonate saturation state on the calcification rate of an experimental coral reef. Global Biogeochemical Cycles, 2000, 14(2): 639–654
- Li H, Li MZ, Cao J, et al. Effects of temperature on nitrogen uptake and growth in several species of macroalgae. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(1): 159–165 [李恒, 李美真, 曹婧, 等. 温度对几种大型海藻硝氮吸收及其生长的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 159–165]
- Li WL, Liang XM, Liang MQ, et al. Effects of temperature on growth and enzyme activity related to immunity in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. Fisheries Science, 2017, 36(3): 311–316 [李文龙, 梁兴明, 梁萌青, 等. 温度对大菱鲂幼鱼生长及免疫相关酶活性的影响. 水产科学, 2017, 36(3): 311–316]
- Liu JY, Huang XR, Zhang LZ, et al. Effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility in two kinds of rabbitfish. Marine Fisheries, 2014, 36(6): 523–528 [刘鉴毅, 黄晓荣, 章龙珍, 等. 盐度、温度和 pH 对 2 种篮子鱼精子活性的影响. 海洋渔业, 2014, 36(6): 523–528]
- Liu SX, Xu JT, Jiang DC. The effects of temperature on the growth and photosynthesis of economic red macroalgae *Gracilaria lemaneiformis*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(33): 16322–16324 [刘树霞, 徐军田, 蒋栋成. 温度对经济红藻龙须菜生长及光合作用的影响. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16322–16324]
- Liu XH, Sun DQ, Huang B, et al. Acidification and the factors in surface seawater of the East China Sea coast. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2017, 48(2): 398–405 [刘晓辉, 孙丹青, 黄备, 等. 东海沿岸海域表层海水酸化趋势及影响因素研究. 海洋与湖沼, 2017, 48(2): 398–405]
- Messmer V, Pratchett MS, Hoey AS, et al. Global warming may disproportionately affect larger adults in a predatory coral reef fish. Global Change Biology, 2017, 23(6): 2230–2240
- Mu JT, Xie SD, Yong PZ, et al. Effect of temperature on feeding behavior and growth rate of the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 355–361 [牟金婷, 谢尚端, 雍朋政, 等. 温度对大海马摄食行为及生长速率的影响. 中国水产科学, 2017, 24(2): 355–361]
- Munday PL, Dixson DL, Donelson JM, et al. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(6): 1848–1852
- Munday PL, Dixson DL, McCormick MI, et al. Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(29): 12930–12934
- Munday PL, Gagliano M, Donelson JM, et al. Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. Marine Ecology Progress Series, 2011, 423(12): 211–221

- Pimentel MS, Faleiro F, Marques T, *et al.* Foraging behaviour, swimming performance and malformations of early stages of commercially important fishes under ocean acidification and warming. *Climatic Change*, 2016, 137(3): 1–15
- Pistevos JCA, Nagelkerken I, Rossi T, *et al.* Antagonistic effects of ocean acidification and warming on hunting sharks. *Oikos*, 2017, 126(2): 241–247
- Punzón A, Serrano A, Sánchez F, *et al.* Response of a temperate demersal fish community to global warming. *Journal of Marine Systems*, 2016, 161: 1–10
- Shanghai Fisheries College. *Ichthyology and marine fish culture*. Beijing: Agricultural Press, 1982, 8 [上海水产学院. 鱼类学与海水鱼类养殖. 北京: 农业出版社, 1982, 8]
- Su H, Chen XJ, Wang JT. Influence of sea surface temperature changes on *Scomber japonicas* habitat in the Yellow Sea and East China Sea. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(6): 88–96 [苏杭, 陈新军, 汪金涛. 海表水温变动对东、黄海鲈鱼栖息地分布的影响. *海洋学报*, 2015, 37(6): 88–96]
- Todgham AE, Hofmann GE. Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212, 2579–2594
- Wan RJ, Zeng DY, Bian XD, *et al.* Species composition and abundance distribution pattern of ichthyoplankton and their relationship with environmental factors in the East China Sea ecosystem. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1375–1398 [万瑞景, 曾定勇, 卞晓东, 等. 东海生态系统中鱼卵、仔稚鱼种类组成、数量分布及其与环境因素的关系. *水产学报*, 2014, 38(9): 1375–1398]
- Wang XJ, Song JK, Fan CX, *et al.* Impacts of ocean acidification on sensory system and behavior in marine fish. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(6): 13–20 [王晓杰, 宋佳坤, 范纯新, 等. 海洋酸化对鱼类感觉和行为影响的研究进展. *生态毒理学报*, 2015, 10(6): 13–20]
- Wu P, Cao ZH, Yang LR, *et al.* Effects of pH on survival and growth of *Pseudobagrus fulvidraco* Richardson. *Reservoir Fisheries*, 2001, 21(6): 3–4, 6 [吴萍, 曹振华, 杨立荣, 等. pH 对黄颡鱼生存和生长的影响. *水利渔业*, 2001, 21(6): 3–4, 6]
- Wu WF, Wang DF. Influence of environmental factors on the reproductive activities of fish. *Fisheries Economy Research*, 1999(3): 40–41 [吴伟峰, 王东风. 环境因素对鱼类生殖活动的影响. *渔业经济研究*, 1999(3): 40–41]
- Wu Z, Zhang H, Cen JY, *et al.* Effects of temperature on the growth and carbohydrate production of *Gambierdiscus pacificus*. *Journal of Tropical Oceanography*. 2016, 35(5): 55–61 [吴珍, 张华, 岑竞仪, 等. 温度对太平洋冈比亚藻 *Gambierdiscus pacificus* 的生长和多糖产量的影响. *热带海洋学报*, 2016, 35(5): 55–61]
- Xing DC, Song XF, Peng L, *et al.* Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of juvenile *Epinephelus groupers*. *Fishery Modernization*, 2017, 44(3): 7–14 [邢道超, 宋协法, 彭磊, 等. 温度与盐度对云龙石斑鱼幼鱼耗氧率和排氨率的影响. *渔业现代化*, 2017, 44(3): 7–14]
- Xu YJ, Liu XZ, Wang QY, *et al.* Relationships between serum sex steroids levels and gonadal development and photothermal regulation during the annual maturation of captive *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 67–74 [徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 67–74]
- Xu YM. Preliminary studies on the growth of file fish *Novadon septentrinalis* population. *Chinese Journal of Ecology*, 1985(2): 6–9 [许永明. 鱼类种群增长的初步研究. *生态学杂志*, 1985(2): 6–9]
- Yang LL. Marine acidification makes fish prone to predators. *Fishery Information and Strategy*, 2014(3): 236–237 [杨林林. 海洋酸化对捕食性鱼类有利. *渔业信息与战略*, 2014(3): 236–237]
- Zhan YY, Hu WB, Duan LZ, *et al.* Effects of seawater acidification on early development of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Aquaculture International*, 2017, 25(2): 655–678
- Zhang ML, Zou J, Fang JG, *et al.* Impacts of marine acidification on calcification, respiration and energy metabolism of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 48–54 [张明亮, 邹健, 方建光, 等. 海洋酸化对栉孔扇贝钙化、呼吸以及能量代谢的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 48–54]
- Zhang TT, Chen C, Shi ZH, *et al.* Effects of temperature on the embryonic development and larval activity of *Epinephelus moara*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 28–33 [张廷廷, 陈超, 施兆鸿, 等. 温度对云纹石斑鱼 (*Epinephelus moara*) 胚胎发育和仔鱼活力的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 28–33]
- Zhang YC, Wen HS, Li LM. Effects of acute temperature stress on the reproductive endocrine function of gestational ovoviviparous black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(9): 29–37 [张亚晨, 温海深, 李兰敏, 等. 急性温度胁迫对妊娠期许氏平鲷生殖内分泌机能的影响. *中国海洋大学学报*, 2016, 46(9): 29–37]
- Zhao XY, Song HY, Cai ZQ, *et al.* Study of  $\beta$ -glucanase dynamics at different temperature by batch fermentation. *Food Science*, 2016, 37(19): 211–215 [赵希岳, 宋厚煜, 蔡志强, 等. 不同温度对  $\beta$ -葡聚糖酶分批发酵动力学的影响. *食品科学*, 2016, 37(19): 211–215]

## Effects of Ocean Warming and Acidification on the Growth and Development of *Nibea albiflora* Richardson During Its Early Life History

YAO Jianping<sup>1,3</sup>, SHAN Xiujuan<sup>2,3</sup>①, CHEN Yunlong<sup>3</sup>, WEI Xiujin<sup>3,4</sup>

(1. College of Ocean Sciences, 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; 4. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** The present study used *Nibea albiflora* as an indicator species to evaluate the effects of climate change on the early life history of marine fishes. Based on the forecast of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) provided by the Representative Concentration Path (RCP), the emission of greenhouse gases would cause a significant increase in the temperature with a considerable decrease in pH of the oceans by 2100. We compared the growth, development, and mortality of *N. albiflora* larvae cultured at four different temperatures (24.0°C, 26.0°C, 26.6°C, and 28.0°C) and three different pH (7.80, 7.73, and 7.49). The different temperatures and pH were selected based on the forecast of IPCC in 2100 under two scenarios: scenario 1 with reduced emission of greenhouse gases (RCP 2.6) and scenario 2 with high level of greenhouse gas emission (RCP 8.5). The results showed that it takes approximately 25 d for *N. albiflora* larvae to become juveniles when cultured at 24°C, whereas it takes just 22 d for those cultured at 26°C~28°C. Furthermore, *N. albiflora* larvae exhibited higher growth rates at higher temperatures. The mortality of *N. albiflora* larvae did not show a consistent trend with increase in the surrounding temperature, with the highest and lowest values at 26.6°C and 26.0°C, respectively. In addition, *N. albiflora* larvae tended to have a higher mortality at a lower pH, with 3.9%, 19.4%, and 21.7% mortality at pH 7.80, 7.73, and 7.49, respectively. On the contrary, ocean acidification did not have significant effects on the growth of *N. albiflora* larvae. The present study also predicted that the growth rate and mortality would be 0.71 mm/d and 31.1%, respectively, for *N. albiflora* larvae under RCP 2.6, and the growth rate would increase to 0.76 mm/d with a 23.9% decrease in mortality under RCP 8.5 by 2100.

**Key words** Ocean acidification; Ocean warming; *Nibea albiflora*; Growth and development

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



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170210001

http://www.yykxjz.cn/

滕瑶, 陈碧鹃, 夏斌, 曲克明, 冯娟, 崔正国, 张旭志, 丁东生. 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区生态环境质量分析与评价. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 34-41

Teng Y, Chen BJ, Xia B, Qu KM, Feng J, Cui ZG, Zhang XZ, Ding DS. Ecological environment quality analysis and evaluation of *Trachidermus fasciatus* Heckel in Jinghai Bay National Germ Plasm Resource Area. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 34-41

## 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区 生态环境质量分析与评价\*



滕瑶<sup>1,2</sup> 陈碧鹃<sup>2</sup> 夏斌<sup>2,3①</sup> 曲克明<sup>2</sup> 冯娟<sup>1</sup>  
崔正国<sup>2</sup> 张旭志<sup>2</sup> 丁东生<sup>2</sup>

(1. 青岛大学环境科学与工程学院 青岛 266071; 2. 农业部海洋渔业资源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;  
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** 根据 2014~2016 年夏季对靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区表层海水中营养盐和重金属等相关环境因子的连续监测数据,运用综合质量指数法对该海域生态环境质量进行综合评价,并分别采用有机污染指数法、潜在性富营养化评价法和主成分分析法从不同方面分析该海域的水质情况。结果显示,靖海湾保护区海水环境综合质量指数范围为 1.04~1.69,评价等级为轻污染。有机污染指数范围为 4.66~9.23,处于严重有机污染状态。根据营养化评价模式分析得出,2014 年靖海湾保护区处于富营养状态,2015 年和 2016 年均处于氮限制潜在性富营养状态。主成分分析显示,溶解无机氮(DIN)、As、Zn 具有较高正载荷,为影响该海域水质的主要环境因子,应予以重点监测和防治。

**关键词** 靖海湾; 水产种质资源保护区; 生态环境质量; 主成分分析

**中图分类号** S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0034-08

水产种质资源保护区是指为保护水产种质资源及其主要生存环境免受人为活动破坏,实现其可持续利用,从而依法在具有较高经济及遗传育种价值的保护对象的主要生长繁育区域(即产卵场、索饵场、越冬场以及洄游通道)内划出的予以定期保护、监测和管理的区域。近年来,由于受到近岸涉海工程建设、水体污染等影响,我国水产种质资源保护区的环境质量受到一定程度的损害,因此,在连续监测的基础上,

对水产种质资源保护区进行生态环境质量分析与评价是实现其可持续发展的基础所在。目前,已经对靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区(夏斌等, 2010; 崔毅等, 2013)、盘古河细鳞鱼江鳕水产种质资源保护区(战培荣等, 2010)、莱州湾单环刺螠近江牡蛎水产种质资源保护区(杨建强等, 2014)、海州湾大竹蛏资源保护区(夏斌等, 2014)及象山港蓝点马鲛水产种质资源保护区(黄秀清等, 2015)等进行了监测与评价。

\* 国家自然科学基金委-山东省联合基金项目(U1406404)和国家海洋局项目[DOME(P)(MEA)-01-01; DOME(P)(MEA)-02]共同资助 [This work was supported by the Joint Fund of National Fund Committee and Shandong Province (U1406404), and State Oceanic Administration Project of China: DOME(P)(MEA)-01-01; DOME(P)(MEA)-02]. 滕瑶, E-mail: y\_tfighting@163.com

① 通讯作者: 夏斌, 副研究员, E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-10, 收修改稿日期: 2017-02-25

2007年12月,农业部批准建立靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区,该保护区主要保护对象为松江鲈鱼及其产卵场、越冬场和索饵场。夏斌等(2010)研究表明,2008年6月靖海湾水产种质资源保护区表层海水达到富营养化水平,且有机污染严重,活性磷酸盐是主要污染物;崔毅等(2013)研究发现,2011年靖海湾水产种质资源保护区属于磷限制潜在性富营养水平,2012年属中度营养水平,2013年达到富营养化水平,且受到严重有机污染。徐林波等(2103)报道2011年10月靖海湾表层沉积物重金属的潜在生态危害较轻,属于较清洁水平。已往研究对环境质量的评价关注较多,而运用主成分分析法对靖海湾保护区主要污染因子进行分析评价的研究尚未见报道。本研究以靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区核心区为调查海域,根据2014~2016年夏季对调查海域表层海水中部分环境因子的连续监测数据,运用综合质量指数法对调查海域的生态环境质量状况进行综合分析评价,并基于不同环境因子,运用潜在性富营养化评价法、有机污染指数法以及主成分分析法,针对水体营养状态、有机污染状况以及主要污染因子3个方面对调查海域的海水水质状况进行分析评价,从而准确把握调查海域的生态环境质量现状及其变化趋势,为保障调查海域环境保护与社会经济发展综合决策,实现其可持续发展提供科学依据。

## 1 采样与分析方法

### 1.1 研究区域

靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区位于山东省文登市,总面积为818.89 hm<sup>2</sup>。保护区内设置核心区域1个,面积为664.75 hm<sup>2</sup>,由10个拐点连线围成。设置青龙河和蔡官河口2个实验区,面积分别为59.14 hm<sup>2</sup>和95.00 hm<sup>2</sup>。该保护区的主要保护对象为松江鲈鱼及其产卵场、越冬场和索饵场,特别保护期为每年12月至翌年3月。

### 1.2 采样站位与时间

本研究调查海域位于山东省文登市靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区的核心区,共设9个调查站位(图1),调查时间为2014年7月、2015年7月以及2016年7月。

### 1.3 测定参数与分析方法

检测所需水样采用Niskin采水器进行采集,采样层次为表层。检测项目包括盐度、pH、溶解氧(DO)、

化学需氧量(COD)、活性磷酸盐(DIP)、溶解无机氮(DIN)、铜(Cu)、铅(Pb)、锌(Zn)、镉(Cd)、汞(Hg)和砷(As)。所需样品的采集、现场处理以及检测均按照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)中所规定的方法进行:盐度及pH使用美国YSI556多参数分析仪进行测定;DO用碘量法测定;COD采用碱性高锰酸钾法测定;铵盐采用次溴酸盐氧化法进行测定;硝酸盐用铈-镉还原法测定;亚硝酸盐采用萘乙二胺分光光度法进行测定;磷酸盐采用磷钼蓝分光光度法进行测定;Hg、As用原子荧光分光光度法测定;Cu、Pb、Zn及Cd用原子吸收分光光度法测定。

## 1.4 评价方法与标准

**1.4.1 综合质量指数法** 综合质量指数法是根据监测海域各环境因子污染指数,对该海域的综合污染指数进行计算,进而对其生态环境状况进行综合评价的方法(贾晓平等,2003),评价公式为:

$$Q = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n P_i$$

$$P_i = \frac{C_i}{C_s}$$

式中, $Q$ 为综合污染指数, $n$ 为环境因子项数, $P_i$ 为环境因子污染指数, $C_i$ 为环境因子实际测量值, $C_s$ 为环境因子评价标准值。

由于海水中pH值的评价标准是一个范围值,所以其污染指数用公式计算:

$$S_{(i,pH)} = \frac{|pH_i - pH_{sm}|}{D_s}$$

$$pH_{sm} = \frac{1}{2}(pH_{s\mu} + pH_{sd})$$

$$D_s = \frac{1}{2}(pH_{s\mu} - pH_{sd})$$

式中, $S_{(i,pH)}$ 为第*i*站的pH质量指数, $pH_i$ 为第*i*站的pH实际测量值, $pH_{s\mu}$ 为pH评价标准上限, $pH_{sd}$ 为pH评价标准下限, $pH_{sm}$ 为评价标准的中位值。

本研究调查海域位于靖海湾保护区核心区域内,应采用一类《海水水质标准》(GB 3097-1997)作为评价标准值,综合质量指数与环境分级的关系见表1。

**1.4.2 有机污染评价方法** 有机污染指数(A)计算公式为(蒋国昌等,1987):

$$A = \frac{COD_i}{COD_s} + \frac{DIN_i}{DIN_s} + \frac{DIP_i}{DIP_s} - \frac{DO_i}{DO_s}$$

式中, $A$ 为有机污染指数, $COD_i$ 、 $DIN_i$ 、 $DIP_i$ 、 $DO_i$ 为上述各项环境因子实际测量值, $COD_s$ 、 $DIN_s$ 、 $DIP_s$ 、 $DO_s$ 为上述各项环境因子评价标准值,本研究

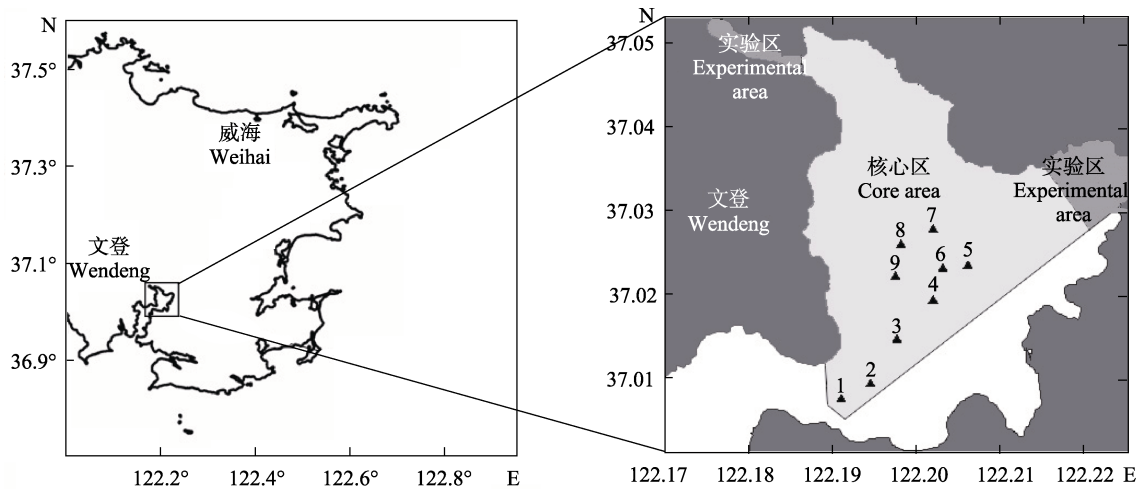


图 1 保护区调查站位

Fig.1 Sampling sites in conservation area

表 1 综合质量指数与环境分级关系

Tab.1 The relationship between the comprehensive quality index and the environmental classification

分级 Classification	水质质量综合指数(Q) Comprehensive quality index	分级 Classification	水质质量综合指数(Q) Comprehensive quality index
清洁 Clean	$Q < 0.3$	污染 Pollution	$2.0 \leq Q < 3.0$
尚清洁 Slight clean	$0.3 \leq Q < 0.7$	重污染 Serious pollution	$3.0 \leq Q < 5.0$
允许 Permit	$0.7 \leq Q < 1.0$	恶性污染 More serious pollution	$Q \geq 5.0$
轻污染 Light pollution	$1.0 < Q < 2.0$		

表 2 有机污染指数与海水有机污染等级关系

Tab.2 The relationship between the organic pollution index and the organic pollution classification in seawater

分级 Classification	有机污染指数(A) Organic pollution index	分级 Classification	有机污染指数(A) Organic pollution index
良好 Good	$A < 0$	轻度污染 Light pollution	$2 < A < 3$
较好 Preferable	$0 < A < 1$	中度污染 Moderate pollution	$3 < A < 4$
开始受到污染 Begin to be polluted	$1 < A < 2$	严重污染 Serious pollution	$A > 4$

采用的是海水一类水质标准(GB3097-1997), 其值分别为 2 mg/L、200  $\mu\text{g/L}$ 、15  $\mu\text{g/L}$ 、6 mg/L。有机污染指数与海水有机污染等级关系见表 2。

**1.4.3 潜在性富营养化评价方法** 运用潜在性富营养化评价方法(郭卫东等, 1998)及其营养分级模式, 参照《海水水质标准》(GB 3097-1997)及有关监测数据对调查海域水质进行评价(表 3)。

**1.4.4 主成分分析法** 主成分分析法是在最大限度保留原始数据的基础上, 采用降维技术对原始数据综合和简化后进行评价的一种分析方法。本研究运用 SPSS 13.0 软件对靖海湾保护区内相关环境因子进行主成分分析。主要分析步骤如下:

(1)将监测数据录入到 SPSS 13.0 数据录入区, 并

根据实际情况对每个数据进行定义; (2)利用命令 Analyze→Data Reduction→Factor Analyze, 对录入的数据进行主成分分析; (3)在 Factor Analyze 过程中, 将定义后的数据输入到待分析变量框, 并根据所需的输出结果点击 Descriptives、Extraction、Rotation、Scores 和 Options 按钮设置相关系数; (4)点击 Factor Analyze 确认, 输出结果, 得出量化描述并进行进一步分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 评价因子的含量水平

2014~2016年夏季靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区表层海水中相关环境因子含量见表 4。

表 3 潜在性富营养化评价  
Tab.3 The standard of potential eutrophication assessment

等级 Grade	营养级 Nutrient level	DIN ( $\mu\text{g/L}$ )	DIP ( $\mu\text{g/L}$ )	N/P
I	贫营养 Poor nutrient	<200	<30	8~30
II	中度营养 Medium nutrient	200~300	30~45	8~30
III	富营养 Rich nutrient	>300	>45	8~30
IV <sub>P</sub>	磷限制中度营养 Medium nutrient with limited phosphorous	200~300	/	>30
V <sub>P</sub>	磷中等限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with medium limited phosphorous	>300	/	30~60
VI <sub>P</sub>	磷限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with limited phosphorous	>300	/	>60
IV <sub>N</sub>	氮限制中度营养 Medium nutrient with limited nitrogen	/	30~45	<8
V <sub>N</sub>	氮中等限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with medium limited nitrogen	/	>45	4~8
VI <sub>N</sub>	氮限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with limited nitrogen	/	>45	<4

2014~2016 年盐度的变化范围为 23.67~32.19, 平均值为 29.27; pH 变化范围为 7.22~7.98, 2014 年和 2015 年均符合一、二类《海水水质标准》(GB 3097-1997), 2016 年有 4 个站位 pH 值低于一、二类《海水水质标准》(GB 3097-1997), 所占比例为 44.44%; DO 变化范围为 5.60~6.95 mg/L, 2014~2016 年 9 个站位均符合一类《海水水质标准》(GB 3097-1997); COD 变化范围为 1.17~2.29 mg/L, 最低值出现在 2015 年, 9 个站位 COD 含量均符合一类《海水水质标准》(GB 3097-1997), 2014 年和 2016 年均 有 站位 超 出 一 类 《海 水 水 质 标 准 》(GB 3097-1997), 超 标 率 分 别 为 55.56% 和 11.11%; 3 年 DIN 含 量 变 化 范 围 为 188.54~668.47  $\mu\text{g/L}$ , 每 年 均 有 站 位 DIN 含 量 超 出 《海 水 水 质 标 准 》(GB 3097-1997) 一 类 海 水 水 质 标 准, 平 均 超 标 率 分 别 为 100%、88.89% 和 77.78%; 3 年 的 DIP 含 量 全 部 超 出 国 家 海 水 水 质 标 准(GB3097-1997) 一 类 海 水 水 质 标 准, 平 均 超 标 率 均 为 100%。以 上 监 测 结 果 表 明, 2014~2016 年 靖 海 湾 松 江 鲈 鱼 国 家 级 水 产 种 质 资 源 保 护 区 调 查 海 域 水 质 较 差。靖 海 湾 保 护 区 近 3 年 含 量 较 多 的 重 金 属 为 Pb、Hg、Cu 和 Zn, 其 中, 2014 年 超 出 一 类 《海 水 水 质 标 准 》(GB 3097-1997) 的 重 金 属 为 Hg 和 Pb, 超 标 率 分 别 为 100% 和 22.22%; 2015 年 超 标 重 金 属 为 Hg、Cu、Pb 和 Zn, 超 标 率 分 别 为 55.56%、77.78%、100% 和 22.22%; 2016 年 超 标 重 金 属 为 Pb, 超 标 率 为 22.22%。

## 2.2 海水综合质量评价

选择表 4 所列的 12 项环境因子构建评价指标体系, 运用综合质量指数法对靖海湾保护区的生态环境质量进行综合评价, 综合质量指数如图 2 所示。

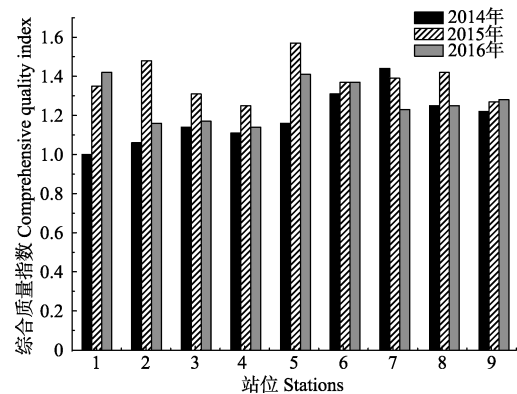


图 2 2014~2016 年夏季靖海湾调查站位的综合质量指数  
Fig.2 The comprehensive quality index of each station in Jinghai Bay in summer of 2014~2016

综合分析 2014~2016 年 9 个调查站位综合质量指数得出, 1、2、3、4 和 9 号调查站位综合质量指数较低, 最低为 4 号站点, 但相差较小; 5、6、7 和 8 号调查站位综合质量指数较高, 最高为 5 号站点。这主要是由于 5、6、7 和 8 站位离湾口距离较远, 自净能力差, 且易受到沿岸居民生活、工业生产的影响, 这与夏斌等(2010)、崔毅等(2013)的研究结果一致。从年际变化趋势分析, 2014 年调查海域海水综合质量指数范围为 1.00~1.44, 平均值为 1.19; 2015 年海水综合质量指数范围为 1.25~1.57, 平均值为 1.38; 2016 年海水综合质量指数范围为 1.14~1.42, 平均值为 1.27。靖海湾调查海域海水综合质量指数排序为 2015 年 > 2016 年 > 2014 年。根据综合质量指数与环境分级关系(表 1), 2014~2016 年靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区海水综合质量指数均处于 1.04~1.69 之间, 这表明保护区水质等级为轻污染。

表4 主要环境因子含量  
Tab.4 Content of the main environmental factors

年份 Year	指标 Index	盐度 Salinity	pH	DO (mg/L)	COD (mg/L)	DIN ( $\mu\text{g/L}$ )	DIP ( $\mu\text{g/L}$ )	Cu ( $\mu\text{g/L}$ )	Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	Zn ( $\mu\text{g/L}$ )	Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	Hg ( $\mu\text{g/L}$ )	As ( $\mu\text{g/L}$ )
2014	范围 Range	23.67~28.51	7.86~7.98	6.28~6.95	1.41~2.29	475.54~668.47	41.56~87.11	0.95~1.26	0.14~1.84	4.88~11.08	0.07~0.27	0.073~0.113	4.66~7.57
	平均值 Average	25.45	7.94	6.65	1.98	548.51	68.84	1.12	0.78	6.84	0.17	0.097	5.71
2015	范围 Range	31.72~31.89	7.70~7.78	6.27~6.74	1.17~1.50	188.54~345.83	73.92~101.23	2.02~7.61	1.09~4.29	3.93~33.55	0.20~0.87	0.006~0.209	1.91~2.60
	平均值 Average	31.81	7.74	6.47	1.35	270.36	87.07	5.54	2.59	13.68	0.48	0.058	2.16
2016	范围 Range	31.59~32.19	7.22~7.64	5.60~6.20	1.42~2.07	195.31~273.42	53.16~75.96	1.22~4.44	0.43~1.21	3.56~7.89	0.22~0.75	0.034~0.049	0.72~1.02
	平均值 Average	31.89	7.50	5.88	1.64	220.5	66.46	2.81	0.79	5.37	0.48	0.042	0.90
平均值 Average		29.72	7.73	6.33	1.66	346.46	74.12	3.16	1.39	8.63	1.13	0.066	2.92

这可能与陆源污染水体排放、大气沉降、海水养殖等多方面因素有关。

### 2.3 有机污染评价

根据有机污染指数(A)计算公式, 得出 2014 年调查海域有机污染指数的变化范围为 4.69~9.23, 平均值为 7.21; 2015 年调查海域有机污染指数的变化范围为 5.62~8.04, 平均值为 6.75; 2016 年调查海域有机污染指数的变化范围为 4.66~6.18, 平均值为 5.38。这表明 2014~2016 年靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区有机污染状况处于严重污染状态。崔毅等(2013)研究表明, 2011~2013 年靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区有机污染指数平均值分别为 8.83、3.49 和 5.64。夏斌等(2010)研究发现, 2008 年夏季靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区有机污染指数平均值为 5.30。通过对比发现, 2014~2016 年靖海湾保护区有机污染状况未见明显好转。赵玉庭等(2016)分析得出, 莱州湾单环刺螠近江牡蛎国家级水产种质资源保护区有机污染指数平均为 1.61, 总体上处于开始受到污染状况。孙伟等(2016)通过调查得出, 双岛湾海水有机污染指数变化区间为 -0.62~1.00。近年来, 靖海湾保护区有机污染指数平均值均大于莱州湾及双岛湾, 应进一步加强对该区域有机污染物排放的规划与管理。

### 2.4 潜在性富营养化评价

根据郭卫东等(1998)提出的潜在性富营养化评价法, 以氮、磷营养盐的含量作为评价参数对靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区的营养化水平进行评价, 得出 2014~2016 年靖海湾保护区营养等级(表 5)。2014 年靖海湾保护区处于富营养状态, 2015、2016 年靖海湾保护区均处于氮限制潜在性富营养状态。崔毅等(2013)研究表明, 靖海湾保护区 2011~2013 年分别处于磷限制潜在性富营养、中度营养及富营养化状态。夏斌等(2010)研究发现, 2008 年夏季靖海湾保护区海水营养水平基本属于富营养化。以上结果表明, 近两年来, 靖海湾保护区富营养化情况有所改善, 但富营养化仍然是靖海湾保护区近年来一直存在的生态环境问题。

### 2.5 主成分分析

通过对靖海湾保护区调查海域表层海水盐度、pH、DO、COD、DIN、DIP、Cu、Pb、Zn、Cd、Hg、As 进行主成分分析, 得出前 2 个主成分的特征值为 12, 累计贡献率为 100%, 故用主成分  $F_1$ 、 $F_2$  这 2 个变量来代替原始变量(盐度、pH、DO、COD、DIN、

DIP、Cu、Pb、Zn、Cd、Hg 和 As), 反映原始数据的绝大部分信息(表 6)。

表 5 靖海湾营养级评价  
Tab.5 The trophic level of Jinghai Bay

年份 Year	DIN ( $\mu\text{g/L}$ )	DIP ( $\mu\text{g/L}$ )	N/P	营养级别 Nutrient level
2014	548.51	68.84	8.23	III
2015	270.36	87.07	3.11	VI <sub>N</sub>
2016	220.50	66.46	3.39	VI <sub>N</sub>

表 6 主成分分析主要计算结果  
Tab.6 The results of the principal component analysis

项目 Items	第一主成分 $F_1$ PCA1	第二主成分 $F_2$ PCA2
盐度 Salinity	-0.998	0.068
pH	0.879	0.477
DO	0.737	0.676
COD	0.849	-0.529
DIN	0.998	0.062
DIP	-0.332	0.943
Cu	-0.701	0.713
Pb	-0.947	-0.322
Zn	0.056	0.998
Cd	-0.873	0.488
Hg	0.968	0.251
As	0.985	0.175
特征值 Characteristic value	8.197	3.803
贡献率 Contribution rate(%)	68.306	31.694
累计贡献率 Cumulative contribution rate(%)	68.306	100

第一主成分的方差贡献率为 68.306%, 其中, DIN 和 As 为影响调查海域水质的主要环境因子, 其特点是因子变量在 DIN 和 As 的浓度上有较高的正载荷, 分别为 0.998 和 0.985。第二主成分的方差贡献率为 31.694%, Zn 为影响调查区域水质的主要环境因子, 其特点是因子变量在 Zn 的浓度上有较高的正载荷, 为 0.998(图 3)。

在这 2 个主成分中, DIN、As 和 Zn 具有较高的正载荷, 说明影响靖海湾保护区调查海域水质的主要污染物为 DIN、As 和 Zn。2008~2013 年 DIN 一直都是影响该海域水质的主要污染物(夏斌等, 2010; 崔毅等, 2013), 近两年来, 富营养化现象一直没有得到有效改善, 该区域的 DIN 含量较高主要是由于近岸工农业污水排放和陆源径流输入。2014~2016 年, 靖海湾保护区主要的重金属污染物为 As 和 Zn。2008 和 2011 年靖海湾保护区内主要重金属含量均符合一类



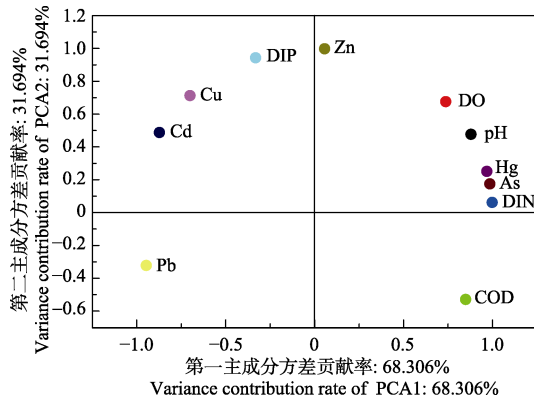


图3 不同评价因子的二维因子载荷

Fig.3 Loading plots of the evaluation factors in the space defined by two components

《海水水质标准》(GB 3097-1997); 2012 年保护区 Pb 含量超过一类海水水质标准(GB 3097-1997), 平均含量为 1.10  $\mu\text{g/L}$ ; 2013 年保护区内 Cu、Pb 和 Hg 平均含量分别为 5.19、2.79 和 0.07  $\mu\text{g/L}$ , 均超出一类海水水质标准(GB 3097-1997) (夏斌等, 2010; 崔毅等, 2013)。通过对比分析得出, 该海域重金属污染不断加重且污染物种类不断增多, 这可能是由于入海河流中重金属含量不断增加和工业污水排放引起。综上所述, DIN、As 和 Zn 可以代表 2014~2016 年靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区海水的污染状况, 因此, 在以后的环境监测和规划过程中应加强对以上环境因子的关注。

### 3 结论

2014~2016 年靖海湾保护区 4 号站位综合质量指数最低, 5 号站位综合质量指数最高; 从年际变化趋势分析, 综合质量指数排序为 2015 年 > 2016 年 > 2014 年, 综合质量指数均处于 1.00~1.57 之间, 海水质量等级为轻污染。

2014~2016 年靖海湾保护区调查海域有机污染指数范围为 4.66~9.23, 处于严重污染状态。2014 年靖海湾保护区调查海域处于富营养状态, 2015 和 2016 年均处于氮限制潜在性富营养状态。运用主成分分析法分析得出, 靖海湾保护区调查海域主要污染物为 DIN、As 和 Zn。以后应加强对靖海湾保护区有机污染、富营养化和重金属(As 和 Zn)的监测和管理。

### 参 考 文 献

Cui Y, Ma FF, Xia B, *et al.* Annual variation and comprehensive evaluation of seawater quality in *Trachidermus fasciatus* Heckel germ plasm resource area at national level in

JingHai Bay. *Progress in Fishery Science*, 2013, 34(6): 1-8 [崔毅, 马菲菲, 夏斌, 等. 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区海水环境质量年际变化趋势及综合评价. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 1-8]

Guo WD, Zhang XM, Yang YP, *et al.* Potential eutrophication assessment for Chinese coastal waters. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1998, 17(1): 64-70 [郭卫东, 章小明, 杨逸萍, 等. 中国近岸海域潜在性富营养化程度的评价. *台湾海峡*, 1998, 17(1): 64-70]

Huang XQ, Qi P, Qin WH, *et al.* Research on the evaluation method of marine ecological environment in Xiangshan Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2015, 37(8): 63-75 [黄秀清, 齐平, 秦渭华, 等. 象山港海洋生态环境评价方法研究. *海洋学报*, 2015, 37(8): 63-75]

Jia XP, Du FY, Lin Q, *et al.* A study on comprehensive assessment method of ecological environment quality of marine fishing ground. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(2): 160-164 [贾晓平, 杜飞雁, 林钦, 等. 海洋渔场生态环境质量状况综合评价方法探讨. *中国水产科学*, 2003, 10(2): 160-164]

Jiang GC, Wang YH, Dong HL, *et al.* A preliminary study of the eutrophic extent in Zhejiang coastal area. *Marine Science Bulletin*, 1987, 6(4): 38-39 [蒋国昌, 王玉衡, 董恒霖, 等. 浙江沿海富营养化程度的初步探讨. *海洋通报*, 1987, 6(4): 38-39]

Sun W, Tang XC, Xu YD, *et al.* Characteristics of nutrients, restrictive analysis and eutrophication assessment in the Shuangdao Bay, Weihai. *Science Technology and Engineering*, 2016, 16(25): 168-173 [孙伟, 汤宪春, 徐艳东, 等. 威海双岛湾海域营养盐特征, 限制性分析与评价. *科学技术与工程*, 2016, 16(25): 168-173]

Xia B, Ma FF, Chen BJ, *et al.* Environmental quality evaluation of *Solen grandis* resources protection area in Haizhou Bay. *Progress in Fishery Science*, 2014, 35(6): 16-22 [夏斌, 马菲菲, 陈碧鹃, 等. 海州湾大竹蛭资源保护区海水环境质量评价. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 16-22]

Xia B, Ma SS, Cui Y, *et al.* Synthetic evaluation on environment quality in *Trachidermus fasciatus* Heckel germ plasm resource protection area of Jinghai Bay, in summer, 2008. *Marin Environmental Science*, 2010, 34(2): 476-483 [夏斌, 马绍赛, 崔毅, 等. 2008 年夏季靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区生态环境质量综合评价. *海洋环境科学*, 2010, 34(2): 476-483]

Xu LB, Gao QF, Dong SL, *et al.* Study on heavy metal contaminations and the sources of Pb pollution in Jinghai Bay using the stable isotope technique. *Environmental Science*, 2013, 34(2): 476-483 [徐林波, 高勤峰, 董双林, 等. 靖海湾重金属污染及铅稳定同位素溯源研究. *环境科学*, 2013, 34(2): 476-483]

Yang JQ, Zhu YG, Song WP, *et al.* The eco-environmental evaluation based on habitat quality and ecological response of Laizhou Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(1):

- 105–114 [杨建强, 朱永贵, 宋文鹏, 等. 基于生境质量和生态响应的莱州湾生态环境质量评价. 生态学报, 2014, 34(1): 105–114]
- Zhan PR, Chen ZX, Qin DL, *et al.* On the physico-chemical monitoring and evaluation of the water environment for lenok and burbot aquatic germplasm resources of Pangu River Reserve, Heilongjiang, China. *Journal of Safety and Environment*, 2010, 10(2): 102–105 [战培荣, 陈中祥, 覃东立, 等. 黑龙江盘古河细鳞和江鳕水产种质资源保护区水环境理化监测与评价. 安全与环境学报, 2010, 10(2): 102–105]
- Zhao YT, Su B, Li JH, *et al.* Evaluation of physicochemical environment and water quality in the Laizhou Bay in spring of 2013. *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(4): 74–80 [赵玉庭, 苏博, 李佳惠, 等. 2013 年春季莱州湾海域理化环境及水质状况分析. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 74–80]

(编辑 冯小花)

## Ecological Environment Quality Analysis and Evaluation of *Trachidermus fasciatus* Heckel in Jinghai Bay National Germ Plasm Resource Area

TENG Yao<sup>1,2</sup>, CHEN Bijuan<sup>2</sup>, XIA Bin<sup>2,3</sup>①, QU Keming<sup>2</sup>, FENG Juan<sup>1</sup>,  
CUI Zhengguo<sup>2</sup>, ZHANG Xuzhi<sup>2</sup>, DING Dongsheng<sup>2</sup>

(1. *Environmental Science and Engineering College, Qingdao University, Qingdao 266071;*

2. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;* 3. *Functional Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory of Marine Science and Technology, Qingdao 266071*)

**Abstract** The successive data of environmental factors such as nutrients and heavy metals in the surface water of Jinghai Bay *Trachidermus fasciatus* Heckel National Aquatic Germ Plasm Resources Conservation Area in the summer of 2014 to 2016 were used to evaluate the ecological environment quality of the survey area by the comprehensive quality index method. The organic pollution index, the potential eutrophication assessment and the principal component analysis were employed to analyze the water trophic status, the organic pollution, and the main pollution factors. The results showed that the comprehensive quality index of seawater in Jinghai Bay was 1.04~1.69. The water quality in this area was light pollution based on the relationship between the comprehensive quality index and environmental classification. The range of organic pollution index was 4.66~9.23 in 2014 to 2016, which was serious organic pollution based on the relationship between the organic pollution index and the organic pollution classification in seawater. According to the nutrition evaluation model, the nutrients levels of the survey area were rich nutrient in 2014 and potential rich nutrient with limited nitrogen in 2015 and 2016. The principal component analysis showed that DIN, As and Zn were the main environmental factors affecting the water quality of this survey area, which represent the pollution status of Jinghai Bay *Trachidermus fasciatus* Heckel National Aquatic Germ Plasm Resource Conservation Area from 2014 to 2016. Thus, we should pay more attention to the nutrients, organic pollution and heavy metal (As and Zn) in the process of environmental monitoring and project.

**Key words** Jinghai Bay; Aquatic germplasm resources conservation area; Ecological environment quality; Principal component analysis

① Corresponding author: XIA Bin, E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170102001

http://www.yykxjz.cn/

康传磊, 李秋芬, 张艳, 陈世波, 王越. 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈养殖水质的净化效果. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 42-48  
Kang CL, Li QF, Zhang Y, Chen SB, Wang Y. Purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on the farming water of *Verasper variegates*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 42-48

## 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈 养殖水质的净化效果\*



康传磊<sup>1,2</sup> 李秋芬<sup>1①</sup> 张艳<sup>1</sup> 陈世波<sup>3</sup> 王越<sup>1,2</sup>

(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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛市卓越海洋集团有限公司 青岛 266408)

**摘要** 为了考察 3 株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈(*Verasper variegates*)养殖废水的净化效果,选择初始体重为(98±6) g 的圆斑星鲈 240 尾,随机分为 8 组。分别接种花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*)SLWX<sub>2</sub>、嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*)X<sub>3</sub>和麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*)SLNX<sub>2</sub>的不同组合。测定了不同组合中各项无机氮及有机物的变化情况。结果显示,在实验过程中,对照组氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮和化学需氧量的浓度均呈持续上升趋势,分别从 0.21 mg/L 升至 15.94 mg/L, 0.08 mg/L 升至 5.68 mg/L, 1.10 mg/L 升至 7.05 mg/L, 1.74 mg/L 升至 38.86 mg/L, 1.19 mg/L 升至 22.87 mg/L。而加菌组的各指标浓度一直低于对照组,其中,SLWX<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>+SLNX<sub>2</sub>组合对圆斑星鲈养殖废水净化效果最佳,氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮、化学需氧量的浓度分别低于对照组 68.55%、48.36%、58.38%、40.02%和 27.47%,SLWX<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>组合的净化效果次之。此外,第 21 天时,对照组出现大量死鱼现象,各实验组中仅有少量死鱼。研究表明,添加的异养硝化-好氧反硝化细菌可在不添加碳源的情况下实现脱氮功能,有效维护养殖水质,并且对圆斑星鲈无毒害及致病作用。

**关键词** 异养硝化-好氧反硝化细菌;净化效果;细菌组合;圆斑星鲈

**中图分类号** X55 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0042-07

近年来,水产养殖业的发展实现了由粗放式到集约化的转变,高密度养殖模式带来高产量、高收益,但同时存在水体残饵、粪便等有机物积累较快的问题。养殖水体氮浓度的快速上升,导致水体自净能力严重下降(刘道玉等,2011)。由于氨氮和亚硝酸氮等物质对水生动物的毒性较大,严重影响了水产动物的健康和生长,给水产养殖业带来巨大损失。同时,未经处理的含高氮、高有机物的养殖废水排入沿海水域,也会加剧近海的富营养化,反过来影响养殖水质。因

此,降低养殖系统中氮浓度是提高养殖水质的关键。

生物脱氮技术被认为是去除养殖污水氮元素最为有效且经济的方式,且无二次污染(Padhi *et al.*, 2013; 姜磊等, 2013; Layva-Diaz *et al.*, 2015)。Kozasa(1986)首次将微生物制剂应用于水产养殖业,此后,越来越多的硝化细菌从不同环境中分离筛选出来,并用于后续脱氮特性研究(汪晓晨等, 2014; 陆洪省等, 2014),但传统自养硝化细菌去除水体氨氮和亚硝酸氮之后,存在硝酸氮积累的问题,同时硝化细菌生长缓慢、培

\* 海洋公益性行业科研专项(201305043)和国家自然科学基金项目(31170113)共同资助 [This work was supported by the National Marine Public Welfare Research Project (201305043), and National Natural Science Foundation of China (31170113)] 康传磊, E-mail: kangcl91@163.com

① 通讯作者: 李秋芬, 研究员, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-02, 收修修改稿日期: 2017-01-20

养困难且价格高(罗小溪等, 2013)。

水产养殖的特殊模式决定了脱氮过程中的硝化作用和反硝化作用只存在于好氧情况下(张小玲等, 2011)。但传统理论认为, 自养硝化作用与厌氧反硝化作用是两个独立的部分, 因此, 硝化作用与反硝化作用不能在同一条件下进行(潘玉瑾等, 2016)。Robertson 等(1984)在除硫和反硝化处理系统中首次分离出好氧反硝化菌泛养副球菌(*Paracoccus pantotropha*), 异养硝化-好氧反硝化细菌的出现表明在好氧情况下可实现同时硝化反硝化(SND)。目前, 筛选到的异养硝化-好氧反硝化细菌种类越来越多, 已报道的脱氮细菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*) (Myahara et al, 2012)、盐单胞菌属(*Halomonas alkaliphila*) (孙雪梅等, 2012)、芽孢杆菌属(*Bacillus*) (何伟等, 2009)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (辛玉峰等, 2011)和产碱菌属(*Alcaligenes*) (余润兰等, 2012)等。目前, 大多数研究集中在异养硝化-好氧反硝化细菌的分离筛选以及脱氮特性(Ren et al, 2014; 梁贤等, 2015; 孙庆花等, 2016; 石小彤等, 2013; 成钰等, 2016), 将异养硝化-好氧反硝化细菌应用于实际海水养殖环节的报道尚少。本研究将实验室筛选的 3 株高效异养硝化-好氧反硝化细菌进行不同组合后应用到圆斑星鲈(*Verasper variegates*)养殖过程中, 以探究其在实际生产中的脱氮效果, 并为其应用技术的建立提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

3 株异养硝化-好氧反硝化细菌均由本实验室筛选、保存, 具有异养硝化-好氧反硝化功能。嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*) X<sub>3</sub> 筛选自浙江象山港网箱鱼类养殖区富营养沉积环境, 在氨氮含量为 42 mg/L 的测试液中, 24 h 时, 对氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的去除率分别为 98.29%、99.07% 和 96.48% (孙雪梅等, 2012)。花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*) SLWX<sub>2</sub> 筛选自青岛市红岛刺参养殖池塘的水体环境, 24 h 对氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的去除率分别达到 100%、99.5% 和 85.6%, 在 1%~8% NaCl 条件下均能生长(成钰等, 2016)。

麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*) SLNX<sub>2</sub> 筛选自青岛市红岛刺参养殖池塘的沉积环境, 24 h 对氨氮、亚硝酸氮的去除率分别达到 100%、36.1%, 72 h 对硝酸氮的去除率达到 82.2% (拟另文发表)。下文以 W 代表 SLWX<sub>2</sub>, X 代表 X<sub>3</sub>, N 代表 SLNX<sub>2</sub>。

圆斑星鲈由青岛卓越海洋集团有限公司提供, 规格为(98±6)g。

实验所用饲料: 碟类慢沉颗粒配合饲料, 由常熟泉兴营养添加剂有限公司生产提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验设计与日常管理** 实验在青岛卓越海洋集团有限公司养殖车间进行, 选取规格一致的圆斑星鲈, 在养殖池中暂养 10 d 后, 从中挑选健康、有活力的 240 尾进行实验, 每个规格为 50 L 的塑料整理箱中加入 30 L 消毒海水和 10 尾已消毒圆斑星鲈; 设置 8 个处理组, 以不添加脱氮细菌的为对照组, 细菌投放组合类型如表 1 所示, 每个处理组 3 个平行。实验期间, 第 5、11、17 天各投菌 1 次, 菌液终浓度控制在  $1.3 \times 10^6$  CFU/ml。实验共进行 21 d。

实验期间, 各池保持不换水, 定时补充新鲜淡水, 维持水体体积不变。使用充气泵充氧, 使溶氧维持在 7~9 mg/L。每日 09:00 投喂饲料。

**1.2.2 水样采集与检测** 每 2 天 09:00 投饵前, 使用 YSI-556 多功能水质分析仪测定水质 pH、溶解氧、温度和盐度。将箱内水混合均匀后, 在中央距离水面 10 cm 处采集水样。使用离心机将水样 6000 r/min 离心 5 min, 取上清液。参照中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007), 氨氮的测定采用次溴酸盐氧化法, 亚硝酸氮的测定采用盐酸萘乙二胺分光光度法, 硝酸氮的测定采用锌-镉还原法, 化学需氧量(COD)的测定采用碱性高锰酸钾法, 总氮测定使用总有机碳(Total organic carbon, TOC)分析仪(TOC-VCPH, TNM-1)。

### 1.3 数据处理

利用 Excel 软件进行数据处理, 实验数据用平均数±标准差(Mean±SD)表示; 采用 SPSS 19 统计软件对数据作统计分析, 显著水平 *P* 采用 0.05, 极显著水平 *P* 采用 0.01。

表 1 实验设计

		Tab.1 The experimental design			
处理组	生理盐水	花津滩芽孢杆菌	嗜碱盐单胞菌	麦氏交替单胞菌	
Treatments	Normal saline (ml)	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> (ml)	<i>Halomonas alkaliphila</i> (ml)	<i>Alteromonas macleodii</i> (ml)	
CK	30				
W		30			
X			30		
N				30	
W+X		15	15		
W+N		15		15	
X+N			15	15	
W+X+N		10	10	10	

## 2 结果与分析

### 2.1 各组 pH、溶氧、温度和盐度的变化

实验期间, pH、溶氧(DO)、温度( $T$ )和盐度( $S$ )指

标各组之间无显著差异( $P>0.05$ )。pH 为  $7.69\pm 0.23$ 、DO 为  $(8.325\pm 0.385)$  mg/L、 $T$  为  $(21.95\pm 0.55)^\circ\text{C}$ 、 $S$  为  $29.7\pm 0.6$ 。各组各项指标值均处于正常范围内, 满足圆斑星鲃养殖条件。具体指标测定数值见表 2。

表 2 指标测定值

Tab.2 The determined value of each parameter

项目 Items	时间 Time/d											Mean $\pm$ SD
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	
pH	7.7	7.46	7.49	7.62	7.73	7.87	7.92	7.84	7.73	7.67	7.61	7.69 $\pm$ 0.23
溶解氧 DO(mg/L)	8.14	8.71	8.29	8.47	8.38	8.02	7.94	8.32	8.46	8.21	8.37	8.325 $\pm$ 0.385
温度 $T$ ( $^\circ\text{C}$ )	21.5	22.1	22.5	21.5	21.7	21.4	21.7	21.4	21.7	21.5	21.7	21.95 $\pm$ 0.55
盐度 $S$	29.1	29.4	29.6	29.4	29.8	29.6	29.8	30.2	30.3	29.7	29.4	29.7 $\pm$ 0.6

### 2.2 不同组合的氨氮去除效果

随着养殖时间的推移, 各组氨氮浓度呈逐渐升高的趋势。如图 1 所示, 第 5 天第 1 次加菌后, 各加菌组氨氮浓度上升幅度均低于对照组, 并于第 7~9 天, 各实验组氨氮浓度与对照组出现极显著性差异( $P<0.01$ ), 说明第 5 天投加不同组合菌液之后, 氨氮去除效果显著。从第 11 天开始, 实验组中单菌组对氨氮的去除效果开始下降, 但复合组的去除能力持续有效, 其中, W+X+N 组合优势最为明显, 与其他各实验组存在极显著性差异( $P<0.01$ ), 尤其在第 17 天第 3 次加菌后, 氨氮浓度明显下降。到第 21 天时, W+X+N 组、W+X 组、W+N 组、X+N 组、X 组、W 组及 N 组氨氮浓度比对照组分别降低 68.55% ( $P<0.01$ )、54.38% ( $P<0.01$ )、52.61% ( $P<0.01$ )、44.93% ( $P<0.01$ )、40.74% ( $P<0.01$ )、33.48% ( $P<0.01$ ) 和 26.16% ( $P<0.01$ ), 说明异养硝化-好氧反硝化细菌对氨氮有很好的去除效果, 其中, W+X+N 组去除效果最明显, 能将氨氮浓度维持在较低水平。

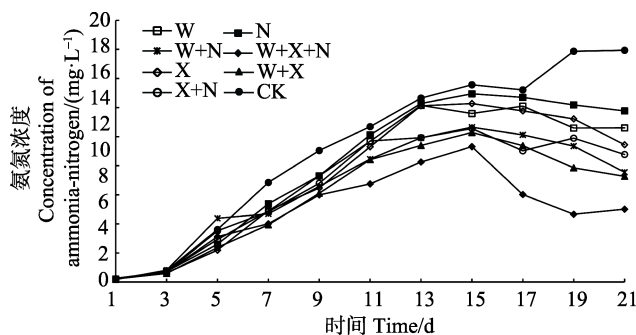


图 1 各组氨氮浓度的变化

Fig.1 The variation of ammonia-nitrogen concentration in different groups

### 2.3 不同组合的亚硝酸氮去除效果

实验期间, 各加菌组与对照组亚硝酸氮浓度 9 d

前均处于较低浓度, 第 11 天开始逐渐积累增加。如图 2 所示, 第 5 天第 1 次加菌后, 加菌组的亚硝酸氮浓度始终低于对照组, 第 7~15 天, 除单菌组(W 组、X 组和 N 组)之外, 复合菌组均与对照组存在显著性差异( $P<0.05$ )。从第 17 天第 3 次加菌后开始, 各加菌组均与对照组产生显著性差异( $P<0.05$ ), 可能是 3 株细菌已经逐步适应养殖环境。到第 19 天时, W+X+N 组、W+X 组、W+N 组、X+N 组、X 组、W 组及 N 组亚硝酸氮浓度与对照组差异达到最大值, 分别比对照组降低 48.36% ( $P<0.01$ )、41.25% ( $P<0.01$ )、35.56% ( $P<0.01$ )、25.42% ( $P<0.01$ )、26.38% ( $P<0.01$ )、29% ( $P<0.01$ ) 和 17.99% ( $P<0.01$ ), 说明复合细菌在去除氨氮的同时, 对亚硝酸氮也有良好的去除效果。

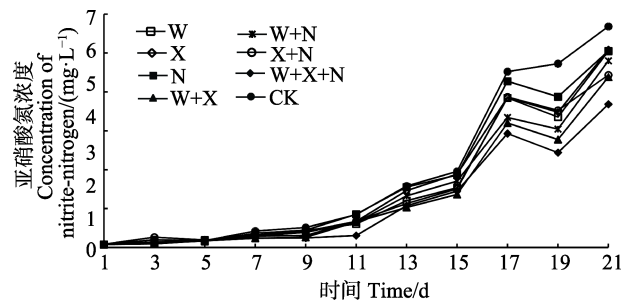


图 2 各组亚硝酸氮浓度的变化

Fig.2 The variation of nitrite-nitrogen concentration in different groups

### 2.4 不同组合的硝酸氮去除效果

整个养殖期间, 各组硝酸氮浓度的变化呈现大致先升高后下降再升高的规律(图 3)。第 5 天第 1 次加菌后, 第 7 天开始, 除 N 组外, 各加菌组硝酸氮浓度均低于对照组, 说明投加的菌液起到反硝化的作用。其中, W+X+N 组反硝化作用最好, 第 1~13 天将水体硝酸氮浓度维持在较低水平, 并于第 13 天达



到最低浓度 0.51 mg/L。到第 21 天时, 对照组的硝酸氮已达到 7.05 mg/L, 各加菌组均与对照组存在显著差异( $P<0.05$ ) (除 N 组外), 但各加菌组间差异不显著( $P>0.05$ )。第 21 天时, W+X+N、W+X、W+N、X+N、X、W 及 N 组的硝酸氮浓度分别比对照组降低 58.38%、31.66%、53.04%、53.20%、50.97%、42.61% 和 14.26%。说明复合细菌对硝酸氮也有良好的去除效果。

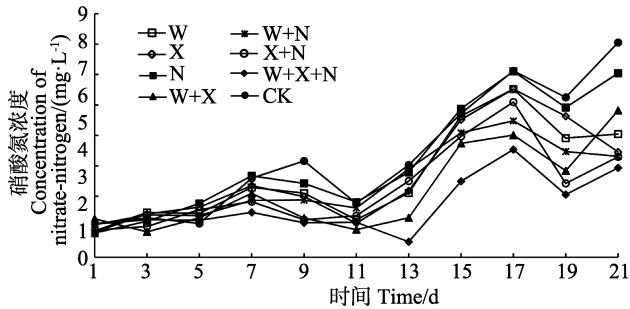


图3 各组硝酸氮浓度的变化

Fig.3 The variation of nitrate-nitrogen concentration in different groups

## 2.5 不同组合的有机物去除效果

如图 4 所示, 第 1~5 天, 对照组与各加菌组之间重合度高, 不存在显著性差异( $P>0.05$ )。第 5 天第 1 次加菌后, 第 7 天开始, 除 N 组外, 各加菌组 COD 浓度始终低于对照组, 且均与对照组存在显著性差异( $P<0.05$ ), 说明投加异养硝化-好氧反硝化细菌对 COD 有一定的降解作用。实验期间, W+X+N 组对 COD 的去除效果最佳, 与对照组存在极显著差异( $P<0.01$ ), W+X 组次之。第 13 天时, W+X+N 组、W+X 组、W+N 组、X+N 组、X 组、W 组及 N 组的 COD 浓度与对照组达到最大差异值, 分别与对照组降低 27.47%、23.08%、14.29%、17.58%、10.99%、8.79% 和 3.30%。说明复合细菌在去除无机氮的同时, 对有机物也有一定去除效果。

## 2.6 不同组合的总氮去除效果

随着实验进行, 各组总氮浓度缓慢上升, 如图 5 所示, 除 N 组外, 其余各加菌组总氮浓度均低于对照组。整个实验期间, W+X+N 组及 W+X 组的总氮浓度均与对照组有极显著差异( $P<0.01$ )。第 15 天, W+X+N、W+X、W+N、X+N、X、W 及 N 组的总氮浓度分别比对照组降低 40.02%、29.61%、18.58%、12.34%、29.45%、11.3% 和 2.65%。结果表明, 3 株细菌可在养殖环境中去除一定的总氮。

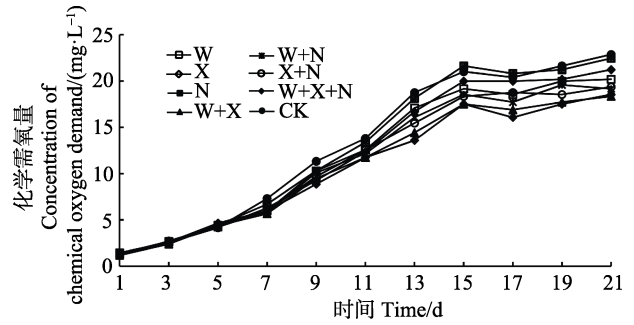


图4 各组化学需氧量的变化

Fig.4 The variation of chemical oxygen demand in different groups

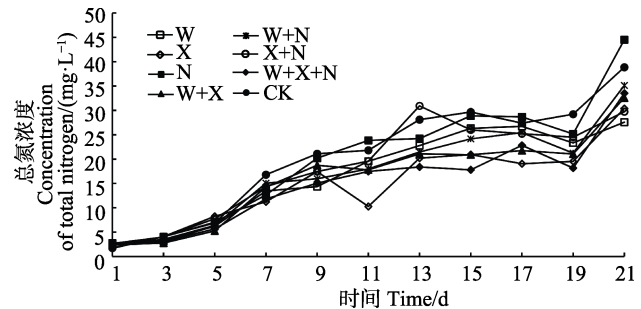


图5 各组总氮浓度的变化

Fig.5 The variation of total nitrogen concentration in different groups

## 2.7 不同实验组中圆斑星鲈的存活情况

实验初始, 各养殖箱中放入圆斑星鲈 10 尾。第 21 天, 对照组出现大量死亡现象。如表 3 所示, 圆斑星鲈存活数量分别为 4、5 和 4 尾, 存活率为 40%、50% 和 40%, 随即停止实验。各加菌组除 W 组、N 组、X+N 组出现少量死亡外, 其余组均无死亡现象。表明添加的 3 株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈无毒害及致病作用, 并通过改善水体环境保证了圆斑星鲈的存活率。

## 3 讨论

研究结果显示, 与未添加异养硝化-好氧反硝化细菌的对照组相比, W+X+N 组合对氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮及化学需氧量的去除效果优于其他组合, 分别低于对照组 68.55%、48.36%、58.38%、40.02% 及 27.47%, 该组合与赵留群等(2014)投加 EM 菌实验结果相比, 对氨氮和亚硝酸氮去除率分别提高了 11.63% 和 166.01%, 与郑佳佳等(2013)复合菌实验结果相比, 硝酸氮的去除率提高了 3.16%。预示这些菌构成的复合异养硝化-好氧反硝化细菌菌剂能有效地降低水体中氮素含量, 改善水质。各种无机氮指标基本可维持在较低水平, 满足养殖的水质要求, 在海水



表3 不同实验组中圆斑星鲈的存活率  
Tab.3 The survival rate of *V. variegatus* in different experimental groups

项目 Items	CK			W			X			N			W+X			W+N			X+N			W+X+N		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
起始总数 Initial number	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
存活个体数 Survival number	4	5	4	10	9	10	10	10	10	8	8	9	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10
存活率 Survival rate(%)	40	50	40	100	90	100	100	100	100	80	80	90	100	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	100

养殖生产上具有很好的应用前景。

3株细菌对化学需氧量有一定的去除作用,虽然最大去除率仅为27.47%,不及马梦雪等(2016)利用硝化细菌和反硝化细菌的复合菌剂处理模拟污水的效果,但优于自养硝化细菌,且3株细菌对COD的去除仅为辅助功能,相对于传统异养反硝化菌而言,但不需添加额外碳源,反而可消除原有的有机物。

花津滩芽孢杆菌(SLWX<sub>2</sub>)和嗜碱盐单胞菌(X<sub>3</sub>)对各项指标的去除效果均优于麦氏交替单胞菌(SLNX<sub>2</sub>),这与3株细菌前期进行的脱氮特性研究所取得的结果一致。同时,相同接种浓度、不同细菌组合对氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮及化学需氧量均有去除作用,但去除效果不一。总体而言,3株菌复合组优于2株菌复合组,并优于单株菌组,说明3株细菌复合之后有很好的协同作用,但协同作用效果不一。

3株细菌对硝酸氮和总氮均有去除效果,3株细菌在实际生产中可起到反硝化作用。为探究脱氮细菌反硝化机制,黄廷林等(2014)利用PCR技术从3株好氧反硝化细菌中均成功检测到周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*),表明其可以利用*napA*还原硝酸氮实现反硝化功能。Li等(2012)利用斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)T13对硝酸盐还原酶进行检测,检测到硝酸盐还原酶占脱氮酶基因的30%以上。目前,被分离筛选出的众多异养硝化-好氧反硝化细菌均能实现生物脱氮功能,但不同种类菌株在脱氮途径和酶学特征上有较大的差异(吴伟等,2013;李嘉伟等,2015;李鹏章等,2015)。此外,本研究3株细菌的脱氮途径和机制尚不清楚,3株细菌组合效果最优的原因可能为3株细菌存在的脱氮酶系不同,具有互补作用,下一步需要通过分子生物学技术,对其相关基因进行深入研究,探究3株细菌的脱氮途径与机制,来加以验证。

#### 4 结论

3株细菌在养殖环境中均具有硝化-反硝化作用,

可实现生物脱氮功能,但对圆斑星鲈养殖水质各项指标的去除效果不一,其中,SLWX<sub>2</sub>单株效果最佳。组合菌效果好于单株菌,其中,SLWX<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>+SLNX<sub>2</sub>组合对圆斑星鲈养殖水质净化效果最佳,可使养殖水体3种无机氮的浓度维持在较低范围,SLWX<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>组合净化效果次之。3株细菌对圆斑星鲈生长无毒害作用,使用安全。

#### 参 考 文 献

- Cheng Y, Li QF, Fei YT, *et al.* Screening and nitrogen removing characteristics of heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria SLWX<sub>2</sub> from sea water. *Environmental Science*, 2016, 37(7): 2681-2688 [成钰, 李秋芬, 费聿涛, 等. 海水异养硝化-好氧反硝化芽孢杆菌 SLWX<sub>2</sub> 的筛选及脱氮特性. *环境科学*, 2016, 37(7): 2681-2688]
- He W, Wang W, Wang J, *et al.* Isolation, identification and its mixed application of a strain of aerobic denitrifying bacteria. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(2): 88-93 [何伟, 王薇, 王洁, 等. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及其混合应用特性研究. *生态与农村环境学报*, 2009, 25(2): 88-93]
- Huang TL, Zhou N, Zhang HH, *et al.* Isolation and identification of three oligotrophic aerobic denitrifying bacteria and denitrification characteristics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(12): 5507-5513 [黄廷林, 周娜, 张海涵, 等. 3株贫营养好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化特性. *环境工程学报*, 2014, 8(12): 5507-5513]
- Jiang L, Xu CB, Ma XP, *et al.* Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier. *Environmental Science & Technology*, 2013, 36(3): 12-15 [姜磊, 徐成斌, 马溪平, 等. 1株好氧反硝化菌的分离鉴定和反硝化特性研究. *环境科学与技术*, 2013, 36(3): 12-15]
- Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiology Aliment Nutrition*, 1986, 4(1): 121-135
- Layva-Diaz JC, Gonzalez-Martinez A, Gonzalez-Lopez J, *et al.* Kinetic modeling and microbiological study of two-step nitrification in a membrane bioreactor and hybrid moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor for wastewater

- treatment. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 259: 692–702
- Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: A controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351–354
- Li A, Gai Z, Cui D, *et al.* Genome sequence of a highly efficient aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* T13. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(20): 5720
- Li JW. SND biological denitrification process N<sub>2</sub>O generation and key enzymes and their activity. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(1): 91–93 [李嘉伟. SND生物脱氮过程N<sub>2</sub>O的产生与关键酶及其活性. *广东化工*, 2015, 42(1): 91–93]
- Li PZ, Wang SY, Liu Y, *et al.* Effect of electron competition on N<sub>2</sub>O production during domestic sewage biological denitrification process. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2015, 23(4): 645–655 [李鹏章, 王淑莹, 刘越, 等. 生活污水生物脱氮反硝化过程中电子竞争对N<sub>2</sub>O产生的影响. *应用基础与工程科学学报*, 2015, 23(4): 645–655]
- Liang X, Ren YX, Yang L, *et al.* Characteristics of nitrogen removal by a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium YL. *Environmental Science*, 2015, 36(5): 1749–1756 [梁贤, 任勇翔, 杨垒, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 YL 的脱氮特性. *环境科学*, 2015, 36(5): 1749–1756]
- Liu DY, Wu W. Research on water pollution and microbial remediation of aquaculture. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2011(17): 253–256 [刘道玉, 吴伟. 水产养殖水体污染及微生物修复的研究. *现代农业科技*, 2011(17): 253–256]
- Lu HS, Zhao XS, Wang YS, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying strain from saline-alkali soil and analysis of its nitrification abilities. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2014, 41(1): 164–168 [陆洪省, 赵晓舒, 王亚舒, 等. 盐碱地中1株硝化细菌的分离、鉴定及其硝化能力的分析. *安徽农业大学学报*, 2014, 41(1): 164–168]
- Luo XX, Gao JZ, Chen ZZ. Research progress on enrichment culture and application of nitrifying bacteria. *Fisheries Science & Technology Information*, 2013, 40(6): 320–323 [罗小溪, 高建忠, 陈再忠. 硝化细菌富集培养及应用研究进展. *水产科技情报*, 2013, 40(6): 320–323]
- Ma MX, Yang XY, Jia RM, *et al.* Research on the complex microbial community for biological denitrification. *Shandong Chemical Industry*, 2016, 45(10): 12–19 [马梦雪, 杨欣玥, 贾茹梦, 等. 生物脱氮复合菌剂研究. *山东化工*, 2016, 45(10): 12–19]
- Myahara M, Kim SW, Zhou S, *et al.* Survival of the aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2 during co-culture with activated sludge under denitrifying conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76(3): 495–500
- Padhi SK, Tripathy S, Sen R, *et al.* Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 78(3): 67–73
- Pan YJ, Liu F, Meng S, *et al.* Isolation and characterization of an aerobic denitrifying-heterotrophic bacterium. *Environmental Engineering*, 2016, 34(1): 41–46 [潘玉瑾, 刘芳, 孟爽, 等. 好氧反硝化菌 *P. chengduensis* ZPQ2 的筛选及其反硝化条件优化. *环境工程*, 2016, 34(1): 41–46]
- Ren YX, Lei Y, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresource Technology*, 2014, 171: 1–9
- Shi XT, Li YQ, Xing GW, *et al.* Screening and primary identification of an aerobic denitrifier isolate with salt tolerance. *Biotechnology Bulletin*, 2013(3): 175–180 [石小彤, 李彦芹, 邢国伟, 等. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离筛选及鉴定. *生物技术通报*, 2013(3): 175–180]
- State Administration of quality supervision, inspection and Quarantine, People's Republic of China. GB17378.4-2007, Marine monitoring standard. Beijing: China Standard Press [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 海洋监测规范, GB17378.4-2007. 北京: 中国标准出版社]
- Sun QH, Yu DS, Zhang PY, *et al.* Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment. *Environmental Science*, 2016, 37(2): 648–654 [孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性. *环境科学*, 2016, 37(2): 648–654]
- Sun XM, Li QF, Zhang Y, *et al.* Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment. *Acta Micro Biologica Sinica*, 2012, 52(6): 687–695 [孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 等. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性. *微生物学报*, 2012, 52(6): 687–695]
- Wang XC, Yu DS, Li J, *et al.* Separation of nitrifying bacterium from anammox reactors with different substrates and characteristics of heterotrophic AOB. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(6): 2617–2625 [汪晓晨, 于德爽, 李津, 等. 不同基质条件下厌氧氨氧化反应器中硝化细菌的分离及选育异养 AOB 菌株的特性. *环境工程学报*, 2014, 8(6): 2617–2625]
- Wu W, Liu DY, Qu JH, *et al.* The changes of nitrate and nitrite reductase activity of *Paracoccus denitrificans* and its inorganic nitrogen removal for aquaculture water. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(6): 1244–1252 [吴伟, 刘道玉, 瞿建宏, 等. 脱氮副球菌硝酸盐/亚硝酸盐还原酶的活性变化及对养殖水体中无机氮素的转化. *农业环境科学学报*, 2013, 32(6): 1244–1252]
- Xin YF, Qu XH, Yuan MD, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(12): 1646–1654 [辛玉峰, 曲晓华, 袁梦冬, 等. 一株异养硝化-反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性. *微生物学报*, 2011, 51(12): 1646–1654]
- Yu RL, Miao L. Character of ammonia removal by heterotrophic nitrifying bacteria *Alcaligenes* sp. S3 and its kinetics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(3): 869–872 [余润兰, 苗雷. 异养硝化细菌 *Alcaligenes* sp. S3

- 除氮特性及动力学. 环境工程学报, 2012, 6(3): 869–872]
- Zhang XL, Zhang X. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Bacillus* sp. H2. Environmental Science & Technology, 2011, 34(10): 53–57 [张小玲, 张霞. 好氧反硝化菌 *Bacillus* sp. H2 脱氮特性研究. 环境科学与技术, 2011, 34(10): 53–57]
- Zhao LQ, Xiao S, Liu T, *et al.* Effect of three probiotics on cultured water quality for sea cucumber *apostichopus japonicus*. Journal of dalian polytechnic university, 2014, 33(6): 391–394 [赵留群, 肖珊, 刘彤, 等. 3 种微生态制剂对幼刺参养殖水体水质的影响. 大连工业大学学报, 2014, 33(6): 391–394]
- Zheng JJ, Peng LS, Zhang XP, *et al.* Effects of complex probiotics on water quality and microbial communities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture, Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 457–464 [郑佳佳, 彭丽莎, 张小平, 等. 复合益生菌对草鱼养殖水体水质和菌群结构的影响. 水产学报, 2013, 37(3): 457–464]

(编辑 冯小花)

## Purifying Effect of Three Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacteria Strains on the Farming Water of *Verasper variegates*

KANG Chuanlei<sup>1,2</sup>, LI Qiufen<sup>1</sup>①, ZHANG Yan<sup>1</sup>, CHEN Shibo<sup>3</sup>, WANG Yue<sup>1,2</sup>

(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. Qingdao Excellence Ocean Group Co., Ltd., Qingdao 266408)

**Abstract** High nitrogen concentration in intensive aquaculture systems has recently become a serious problem to impact the survival of farmed animals and the marine environment. The newly found heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria showed several advantages in removing the nitrogen in the waster waters. To investigate the purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on waste water of *Verasper variegates* farming, 240 *Verasper variegates* (98±6) g were divided into 8 groups randomly. Simultaneously, the various combinations of *Bacillus hwajinpoensis* (SLWX<sub>2</sub>), *Halomonas alkaliphila* (X<sub>3</sub>), and *Alteromonas macleodii* (SLNX<sub>2</sub>) were inoculated into the culture tanks respectively. Different inorganic nitrogen and organic matter of the various combinations were determined. The results showed that the concentrations of ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen, nitrate-nitrogen, total nitrogen, and chemical oxygen demand in the control group during the whole experiment were from 0.21 mg/L to 15.94 mg/L, 0.08 mg/L to 5.68 mg/L, 1.10 mg/L to 7.05 mg/L, 1.74 mg/L to 38.86 mg/L, and 1.19 mg/L to 22.87 mg/L, respectively. The concentrations of the indices in the trial groups were significantly lower than those of the control group. Among the trial groups, the group SLWX<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>+SLNX<sub>2</sub> showed the best purifying effect with the concentrations of ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen, nitrate-nitrogen, total nitrogen and chemical oxygen demand 68.55%, 48.36%, 58.38%, 40.02%, and 27.47% lower than those in the control group, respectively. The group SLWX<sub>2</sub>+X<sub>3</sub> showed the second best purifying effect. All trial groups had significantly lower fish death at the 21st day compared with the control group. The results indicated that these three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains can effectively improve the water quality through nitrification and denitrification without adding carbon sources, and have no toxic or morbidity effect on *Verasper variegatus*.

**Key words** Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains; Purification effect; Bacteria combinations; *Verasper variegates*

① Corresponding author: LI Qiufen, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170508001

http://www.yykxjz.cn/

王若青, 王娜, 王仁凯, 陈松林. 牙鲆 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b 的鉴定及 *tyrpl*a 与 mmu-miR-143-5p\_R+2 的调控关系. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 49–58

Wang RQ, Wang N, Wang RK, Chen SL. The identification of *tyrpl*a and *tyrpl*b in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the regulation study of *tyrpl*a and mmu-miR-143-5p\_R+2. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 49–58

## 牙鲆 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b 的鉴定及 *tyrpl*a 与 mmu-miR-143-5p\_R+2 的调控关系\*



王若青<sup>1,2</sup> 王娜<sup>1,3①</sup> 王仁凯<sup>1,2</sup> 陈松林<sup>1,3</sup>

(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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 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** 为了研究牙鲆白化发生过程中的分子调控机制, 本研究在获得正常和白化牙鲆转录组及 microRNA (miRNA) 深度测序数据的基础上, 对 tyrosinase related protein 1 (*tyrpl*) 和 mmu-miR-143-5p\_R+2 (mmu-143) 进行了表达模式、靶基因预测及验证分析。首先通过 RACE 方法克隆得到白化相关基因 *tyrpl* 的 2 个转录本, 进化树分析表明这 2 个转录本分别是 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b, 利用 RNAhybrid 软件预测到 mmu-143 可能与 *tyrpl*a 基因存在互作关系, 通过双荧光素酶实验初步验证了这一靶向关系。进一步的荧光定量结果显示, *tyrpl*a 基因在正常牙鲆皮肤中的表达量显著高于白化牙鲆皮肤的表达量, 正常牙鲆皮肤中 mmu-143 的表达量显著低于白化牙鲆皮肤中的表达量。本研究发现, 牙鲆 *tyrpl* 存在 2 个转录本, 分别是 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b。双荧光素酶实验和定量 PCR 分析初步证实, *tyrpl*a 是 mmu-143 的靶基因, mmu-143 是通过调控 *tyrpl*a 基因的表达来影响牙鲆白化的。此研究结果为深入揭示牙鲆白化发生的分子机制提供重要的基础资料。

**关键词** 牙鲆; 白化; mmu-miR-143-5p\_R+2; *tyrpl*a; *tyrpl*b

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0049-10

白化是由于黑色素代谢障碍导致眼睛、皮肤、毛发黑色素量减少或缺乏而引起的一种体色异常现象。自然界中, 哺乳类(柯永亮, 2006)、鱼类(李仰真等, 2014)、鸟类(梁伟等, 2000)、爬行类(张秋金等, 2009) 等都存在白化个体。白化个体通常出现一系列病理学上的改变, 且因自身缺乏保护色而易被捕食, 因此, 白化个体的生存能力大大低于正常个体。白化具有广泛的遗传异质性, 是最早被研究的遗传性疾病之一

(Farabee, 1903)。哺乳动物如人和小鼠中白化研究最多, 截止到 2011 年, 在小鼠中已发现的与体色、毛发相关的基因突变多达 378 个(<http://www.espcr.org/micemut/>)。

自然界中生物体有多种多样不同的体色, 这是由于自身色素细胞能产生不同的色素。虽然哺乳动物中白化突变位点众多, 但色素细胞只有一种, 即黑色素细胞。鱼类中已发现的色素细胞共有 6 种: 黑色素细

\* 国家自然科学基金项目(31472273)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31472273), and the Taishan Scholar Climbing Program of Shandong Province]. 王若青, E-mail: wangruoqing515@163.com

① 通讯作者: 王娜, 副研究员, E-mail: wangna@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-05-08, 收修改稿日期: 2017-05-17

胞、红色素细胞、黄色素细胞、虹彩细胞、白色素细胞和蓝色素细胞,暗示其可能的白化机制较哺乳动物更为复杂。白化在鱼类中的研究主要集中于模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和穴居鱼类(Koga *et al.*, 1997),而养殖鱼类中的研究较少。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种冷温性底栖肉食鱼类,最适温度为17℃~20℃,具有很高的营养和经济价值,深受消费者的喜爱,市场十分广阔,为我国重要的海水经济鱼种。牙鲆育苗过程中经常出现苗种高比例体色异常现象,即有眼侧皮肤白化和无眼侧黑化现象,严重影响了商品鱼价值(朱学武等, 2017)。目前,认为牙鲆白化主要与营养(Seikai *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1992)、环境(Takahashi, 1994; Seikai, 2010)和生理因素(Burton *et al.*, 1995; Seikai, 1992; Yoo *et al.*, 2000)等相关,而不管是营养还是生理方面,归根到底都是由于分子水平的变化引起的。

MicroRNA(miRNA)多为21~25 nt高度保守的单链非编码小RNA,能够通过和靶mRNA的3'端非翻译区(UTR)交互而沉默靶mRNA,在转录后调控过程中发挥重要作用。已发现多个miRNA参与调控哺乳动物黑色素细胞发育及相关疾病(Kim *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2012)。牙鲆白化现象中是否涉及miRNA的表达及调控也值得深入研究。我们在前期研究中已经利用高通量测序技术获得了一批在牙鲆正常和白化皮肤中差异表达的基因和miRNA。本研究在此基础上,选取tyrosinase related protein 1(*tyrp1*)和mmu-miR-143-5p\_R+2(mmu-143)开展了不同组织表达模式研究、靶基因预测及验证分析等,将为牙鲆白化发生分子机制的阐明提供重要的基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验用鱼为发育状况良好且无伤病的有眼侧皮肤全为黑色的正常牙鲆和发育状况良好且无伤病的有眼侧皮肤白化牙鲆,由山东省海阳市黄海水产有限公司提供。分别取5月龄正常和白化牙鲆的有眼侧皮肤、无眼侧皮肤、有眼侧肌肉、无眼侧肌肉、性腺、鳃、脑、肠、眼、心脏、肾脏、脾脏、肝脏13个组织样品,立即放入液氮中保存,以备后续提取RNA使用。293T细胞培养于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下的细胞培养箱。

### 1.2 牙鲆各组织 Total RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

采用 TIANGEN miRcute miRNA 提取分离试剂

盒提取牙鲆各组织的 Total RNA,然后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的质量,用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度。RNA 样品于-80℃保存。

各取1 μg的 Total RNA用FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)进行反转录合成 cDNA 第1链,-20℃保存,用于克隆基因中间片段。用SMARTer® RACE 5'/3'Kit (Clontech)合成5'和3' Ready,用于5'和3'RACE的克隆。

### 1.3 *tyrp1* 基因的克隆

利用转录组测序结果鉴定出*tyrp1*的2个转录本:*tyrp1* GS\_012029(*tyrp1*-29)和*tyrp1* GS\_009038(*tyrp1*-38),此处以*tyrp1*-29为例进行基因克隆介绍。以正常牙鲆有眼侧皮肤 cDNA 为模板,以*tyrp1*-29-F1和*tyrp1*-29-R1(表1)为引物进行中间片段的 PCR 扩增,反应体积为50 μl,反应程序:94℃,5 min; 94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 50 s(35个循环);72℃,10 min。将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 进行连接转化反应,挑取3~5个阳性克隆送到瑞博兴科公司测序。利用 Vector NTI Advance 11 软件进行测序结果的对比分析。

利用验证的中间片段设计引物*tyrp1*-29-5'GSP、*tyrp1*-29-5'NGSP、*tyrp1*-29-3'GSP和*tyrp1*-29-3'NGSP(表1),以合成的 Ready 为模板进行*tyrp1*-29 5'和3'RACE的巢式 PCR 扩增。一轮反应结束后,将一轮 PCR 产物稀释50倍作为二轮 PCR 的模板进行二轮 PCR,将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 进行连接转化反应,挑取3~5个阳性克隆送到瑞博兴科公司测序。利用 Vector NTI Advance 11 软件进行测序结果的对比分析。

### 1.4 *tyrp1* 基因序列拼接及蛋白分析

在成功得到*tyrp1*-29和*tyrp1*-38基因的中间片段、5'端及3'端后,用 Vector NTI Advance 11 进行序列拼接,获得完整的*tyrp1*-29和*tyrp1*-38序列,然后进行开放阅读框分析和蛋白质翻译。从NCBI中下载其他不同物种的Tyrp1的氨基酸序列,与得到的牙鲆Tyrp1氨基酸序列进行同源性比对,用MEGA 5.0软件中NJ法(Neighbor-joining Method)构建系统进化树,设置1000次bootstraps进行系统进化评估。

### 1.5 *tyrp1* 基因实时荧光定量 PCR

用SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR,用Primer 6.0设计定量引物*tyrp1a*-qF和*tyrp1a*-qR(表1)进行*tyrp1a*基因的荧光定量检测。以β-actin为内参,以正常和白化牙鲆的13个组织的cDNA为模板,各组织均选取3个平行的实

验个体, 每个实验个体 3 次重复。ABI 7500 Realtime PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)扩增标准程序: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 34 s (40 循环); 95°C 15 s; 60°C 1 min; 95°C 15 s。

### 1.6 *tyrp1a* 与 miRNA 的互作关系预测

利用 RNAhybrid ([https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid\\_view\\_submission](https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission)) 将已克隆得到的 *tyrp1a* 基因 3'UTR 序列与 miRNA 进行靶基因预测, 预测到 *tyrp1a* 与 mmu-143 可能的靶向关系。

### 1.7 miRNA 的提取、反转录及荧光定量

由于 TIANGEN miRcute miRNA 提取分离试剂

盒提取的牙鲈各组织的 Total RNA 中包含 miRNA 等 small RNA, 因此, 可直接用 TIANGEN miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。

得到 miRNA 的 cDNA 后, 用 TM Utility 1.5-iTech 设计 mmu-143 上游定量引物 mmu-143-F(下游由定量试剂盒中提供)进行荧光定量检测。以 5S rRNA(表 1) 为内参, 以正常和白化牙鲈的 13 个组织的 miRNA cDNA 为模板, 各组织均选取 3 个平行的实验个体, 每个实验个体重复 3 次。用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(SYBR Green, TIANGEN)进行定量实验, 反应体系: 10  $\mu$ l 2 $\times$ miRcute Plus miRNA Premix(with SYBR&ROX), mmu-143-F(10  $\mu$ mol/L)和

表 1 本研究所使用的引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
tyrp1-29-F1	TACTACTCCGTCAGCAAGA
tyrp1-29-R1	GTCTCCTCAACCATTTCATCA
PMD18-T-F1	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
PMD18-T-R1	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
UPM	Long Primer: TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT Shot Primer: CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
tyrp1-29-5'GSP	GATTACGCCAAGCTTTGGCAAAGTTCCAGTAGGGCAGGGCGAA
tyrp1-29-5'NGSP	GATTACGCCAAGCTTTGTGCCAAGTGACGAATCCGGGACCCCT
tyrp1-29-3'GSP	GATTACGCCAAGCTTCAGCAGGAAACGTCAACAGGCCGATGGT
tyrp1-29-5'NGSP	GATTACGCCAAGCTTCTGCTCCACACCTACTGACGCCATCT
tyrp1a-qF	ACAACCTGGCACATCTCTTCTCT
tyrp1a-qR	ACTCTGTCTCCTCAACCATTTCATCA
jf_actin-F	AATCGTGCGTGACATTAAGGAG
jf_actin-R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGG
mmu-143-F	GGTGCAGTGCTGCATCTCTG
5S rRNA	GCTTACGGCCATACCACCCT
tyrp1-38-5'GSP	TTCTCGAACTGTGGGCTGTTGCCATCGG
tyrp1-38-5'NGSP	AGCTTGGTCCAGAGCGTTACGAATGCT
tyrp1-38-3'GSP	GCCAGGCGAGCTTTGGAGGTGTAGACTT
tyrp1-38-3'NGSP	ACATGCAGGCGAGAATGCTGGGTGAACC
tyrp1-38-F1	CTGTGGTGAGGAGGAATATC
tyrp1-38-R1	AGAGTTGGTGCTGATGGA
tyrp1a-3'UTR_F	ACGCTCGAGGATGCGTGTGTTGAACACAAG
tyrp1a-3'UTR_R	ACGGCGGCCCAAGTTGTAGGTGTTAATT
tyrp1a-mut_F	TGATGCCAATTCTAGAATGCTGATT
tyrp1a-mut_R	CCTTTAAATTGAAACACATTCTCAA
pGL-3_F	CAAGTGCAGGTGCCAGAACAT
pGL-3_R	CCAACAGTACCGGAATGCCAAG



Reverse Primer (10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$  50 $\times$ ROX Reference Dye, 1.5  $\mu\text{l}$  miRNA 第一链 cDNA, 5.7  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 总体积 20  $\mu\text{l}$ 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  34 s(40 循环); 熔解曲线分析。

### 1.8 双荧光素酶载体 pmiR-RB-REPORT™的构建及转染实验

为了证明 *tyrp1a* 3'UTR 与 miRNA mmu-143 存在靶对应关系, 采用双荧光素酶实验在 293T 细胞中进行验证, 所用的双荧光素酶报告载体 pmiR-RB-REPORT™及 mmu-143 mimic 和 mimic Ncontrol 均为广州市锐博生物科技有限公司设计提供。

用 Primer 6.0 设计分别带有 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点的上下游引物 *tyrp1a*-3' UTR\_F 和 *tyrp1a*-3' UTR\_R(表 1), 以正常牙鲆皮肤的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *tyrp1a* 3' UTR 区片段并插入到 pmiR-RB-REPORT™载体的 hRluc 下游, 构建成载有靶片段的完整载体, 与 mmu-143 mimic 共转染至 293T 细胞中(表 2, A 组)。另外, 将 pmiR-RB-REPORT™上的靶片段用 TaKaRa MutanBEST Kit 进行突变后与 mmu-143 共同转染至 293T 细胞中, 作为一组对照实验(表 2, B 组)。正常和突变的载体分别与 miRNA 的阴性对照 NC 共转染作为 2 组对照(表 2, C 组和 D 组)。

表 2 细胞转染体系成分  
Tab.2 The composition of cell transfection

组别 Groups	$V_{\text{DMEM}}$ ( $\mu\text{l}$ )	Volume of MiRNA/ vector/lip2000
A 组	47	3 $\mu\text{l}$ mmu-143 mimic (5 nmol/L)
	45.5	4.5 $\mu\text{l}$ <i>tyrp1a</i> -WT(800 ng/ $\mu\text{l}$ )
	47	3 $\mu\text{l}$ lipofectamine 2000
B 组	47	3 $\mu\text{l}$ mmu-143 mimic (5 nmol/L)
	47	3 $\mu\text{l}$ <i>tyrp1a</i> -Mut (800 ng/ $\mu\text{l}$ )
	47	3 $\mu\text{l}$ lipofectamine 2000
C 组	47	3 $\mu\text{l}$ miRNA NC (5 nmol/L)
	45.5	4.5 $\mu\text{l}$ <i>tyrp1a</i> -WT (800 ng/ $\mu\text{l}$ )
	47	3 $\mu\text{l}$ lipofectamine 2000
D 组	47	3 $\mu\text{l}$ miRNA NC (5 nmol/L)
	47	3 $\mu\text{l}$ <i>tyrp1a</i> -Mut (800 ng/ $\mu\text{l}$ )
	47	3 $\mu\text{l}$ lipofectamine 2000

### 1.9 双荧光素酶实验

取对数生长期的 293T 细胞以每孔大约  $5 \times 10^4$  细胞接种于 24 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO<sub>2</sub> 的条件下培养过夜后, 采用 lipofectamine 2000 按照表 2 的体系

进行细胞转染, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后, 用碧云天公司提供的双荧光素酶报告基因检测试剂盒来检测并分析 miRNA 与靶片段是否有互作关系。

### 1.10 数据计算方法

定量 PCR 实验中基因或 miRNA 的相对表达水平采用  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$  方法计算, 其数据为平均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)。用 SPSS 17.0 分析软件采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 并进行 Duncan 多重比较, 当  $P < 0.05$  时认为差异显著, 当  $P < 0.01$  认为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 牙鲆 *tyrp1* 基因全长及其蛋白分析

通过 RACE 方法成功克隆了 *tyrp1-29* 和 *tyrp1-28*, *tyrp1-29* 基因 cDNA 全长为 2145 bp, 开放阅读框(ORF)为 1566 bp, 5' UTR 区为 127 bp, 3' UTR 区为 452 bp (图 1)。用 Vector NTI Advance 11 软件查找 ORF 区并翻译成蛋白质, 基因编码区编码 521 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 58.34 kDa。分析蛋白质结构发现, 第 1~17 个氨基酸为信号肽, 第 84~112 个氨基酸为 EGF 区, 第 172~407 个氨基酸为 PFAM 结构域, 469~491 个氨基酸为跨膜区。

*tyrp1-38* 基因 cDNA 全长 1792 bp, 开放阅读框(ORF)为 1602 bp, 5' UTR 区为 49 bp, 3' UTR 区为 141 bp(图 2)。用 Vector NTI Advance 11 软件查找 ORF 区并翻译成蛋白质, 基因编码区编码 533 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 61.10 kDa。分析蛋白质结构发现, 第 27~70 个氨基酸为 NH 区, 第 137~190 个氨基酸为 GLA 区, 第 475~497 个氨基酸为跨膜区。

### 2.2 系统进化树构建

将在 NCBI 和 Ensemble 查找到的 11 种 *Tyrp1* 蛋白序列: 刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*) *Tyrp1a* (ENSG-ACG00000019503)、青鳉 *Tyrp1a* (ENSORLG00000-004326)、河豚(*Fugu rubripes*) *Tyrp1a* (ENSTRUG-00000012615)、斑马鱼 *Tyrp1a* (ENSDARG00000029-204)、刺鱼 *Tyrp1b* (ENSGACG00000015912)、青鳉 *Tyrp1b* (ENSORLG00000004723)、斑马鱼 *Tyrp1b* (NP\_001002749.1)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*) *Tyrp1* (NP\_001016476.1)、鸡(*Gallus gallus*) *Tyrp1* (NP\_990376.2)、小鼠(*Mus musculus*) *Tyrp1* (NP\_112479.1) 及人 (*Homo sapiens*) *Tyrp1* (NP\_000541.1) 与牙鲆的 *Tyrp1-29* 和 *Tyrp1-38* 一起利用 MEGA 5.0 软件构建蛋白序列系统进化树(图 3), 序列号为 NP

```

1      tcacagtagacagaagtgatgcgcgttcattttaacaaagcctgagctgaagtcataaaggcagataaatactctgttgtaaactgtttgcagcgcgtgcgtaaaactccactttt
121    ttggata[ATG]TGGCGAAGTGCCTTTTGGTGCTTGTGGGCGCGGTGGTCTGAGCGCTCAGTTCGCCAGAGAGTGTGTGACACCCGAGGGGCTCAGGAGTGGACAGTGTGCCCGTACC
1      M W R S C V L V L V G A V V V S A Q F P R E C V T P E G L R S G Q C C P S P
241    CACCGGACTCGACAACGACCCGTGTGGCTCCACCCTGCGCGGACAGTGGCTGCCATCAGCGGTGACGCGCGCCGACGGGCCAGTACCCCCACGACGCGCGGATGATCGGGA
39     T G L D N D P C G S T T G R G Q C V S I T A D A R P H G P Q Y P H D G R D D R E
361    GCGTTGGCCATCCGTTACTTCAACCCACTTGTCAAGTAAATGGAACTTACGCGCTTAACTGCGCGCGTGCAGACACGGATGGACTGGAGCGAACTGTGACCAGCGGGTTCTGT
79     R W P I R Y F N R T C Q C N G N F S G F N C G R C R H G W T G A N C D Q R V S V
481    CGTGAGGAGAAAGCTGATGACGCTCAGCGCGGACCAAGCGTGCCTTCTGTAACGCGTGGACACGCGCAAGCGCACTGTGACCCGCGACCTGGTGATCGCCACGCGCGCTACACGGA
119    V R R N V M Q L S A D Q K R A F V N A L D Q A K R T V H P D L V I A T R R Y T E
601    GATCTCGGCCCGACGGGAACACTGTGACGTTGAGAATCACCATCTCACTACTCTGCTGACCCACTACTACTCCGTGAGCAAGACGTTCTGGGCGCGGACAGCGGATTT
159    I L G P D G N T V Q F E N I T I Y N Y F V W T H Y Y S V S K T F L G A G Q A S F
721    CGGGGAGTGGACTTCTCACACGAGGTCGCGGATTCGTCACCTGGCAGGTACCACTGCTGCAGCTGGAGAGGACATGCAGGATATGCTCCAGGACCCCTCTCGCCCTGCCCTA
199    G G V D F S H E G P G F V T W H R Y H L L Q L E R D M Q D M L Q D P S F A L P Y
841    CTGGAACCTTGCATCGGTGAAGCACGTGTGACATCTGCACAGATGACCTGATGGGAGCCAGGAGCAGTTTGTGACATGAATCCCTGAGCCCCAATCCATCTCGCCCACTGGAGGGT
239    W N F A I G G S T C D I C T D D L M G A R S S F D M N S L S P N S I F A Q W R V
961    CATCTGCGAGAGCGTGGAGGACTATGACACACTGGGAACCATGCAACAACACAGAGACATCTCCATCAGAAGGAATCCAGCAGGAAACGTCACAGGCCGATGTCACGCTCTCCC
279    I C E S V E D Y D T L G T I C N N T E T S P I R R N P A G N V N R P M V Q R L P
1081   GGAGCCCCAGGATGAGCGGACTGTCTGCAGGTTAACACTTTCGACACTCCGCCACTACTCTCCACCTCTGAAAGTTTCAGAAACACAGTTGAAGGTTACAGCGCCCCCAGGGGAA
319    E P Q D V A D C L Q V N T F D T P P Y Y S T S S E S F R N T V E G Y S A P Q G N
1201   CTATGACCTGTGGTTCGTAGTCTCCACAACCTGGCACATCTTCTGTAACGCGCAGGGGACAGACCCACTCTCGCCCAACGACCCCGTCTCTGTGCTCCACACTACTGA
359    Y D P V V R S L H N L A H L F L N G T G G Q T H L S P N D P V F V L L H T Y T D
1321   CGCCATCTTTGATGAATGGTTGAGGAGACAGAGTCCAGGTTGAGCAACGATCCTGAGGAAAACGCCCATTTGGTCACAACAGGGGTACAACATGGTGCTTTTGGCCTCCAGTGAC
399    A I F D E W L R R Q S P G S A T Y P E E N A P I G H N R G Y N M V P F W P P V T
1441   GAACGAGAGATGTTGTGATGGCCCTGAAATCTGGGTACTCGTACGAAGCTGAATGGCCAGGTCAACCTTCACTCTGACGAAATCATCACCATGGCAATAGTCGCCGCACTCGT
439    N A E M F V M A P E N L G Y S Y E A E W P G Q P F T L T E I I T M A I V A A L V
1561   GGTGGTTGCGGTCAATTTGCTGCCACCACGTGCGGTGCGAGCCGCTCTACAGGATGGAGGGCCACGACCTCTGCTCAGCGATCAGTACCAGCGCTACGACGATGACAAAAGCCA
479    V V A V I F A A T T C A V R A R S Y R M E G H Q P L L S D Q Y Q R Y D D D K S Q
1681   GTCTGAGT[TA]atgctggtttgaacacaagcttcacctttgtgccttttcttcttacttatgcagtttgtttgttttacctgaatctcaccggagaagtgtgatgttttaaaatc
519    S V V *
1801   ctatttatgctgactaatattttacatcaaaaactgcaatagttcatttttcttttaaaaaaacccagataagagcagatgcaaatattttacttttccatgtgcacaaaagttgtct
1921   cgttgaagttggagattttcgttaagtttgagaatgttttcaatttaaaggtgatcaagtgtaagaatgtgattctgggaagtgtaccacaattttctgtaacttattacttttt
2041   ttttaacactttttacgtaatggaagcttaagttagtggatacactgctgaataataaacacctacaacttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 牙鲆 *tyrp1-29* 基因序列及其开放阅读框(ORF)预测的氨基酸序列  
 Fig.1 ORF sequence and deduced amino acid sequence of *tyrp1-29* in Japanese flounder

小方框内为翻译起始位点和终止位点，下同

The start locus (ATG) and the terminal locus (TGA) are boxed in the short frame, the same as below

开头的来自于 NCBI, 以 ENS 开头的来自于在线软件 Ensembl。结果显示, 热带爪蟾、鸡、小鼠及人的 *tyrp1* 只有一个转录本, 牙鲆 *tyrp1-29* 基因与硬骨鱼类中刺鱼、青鲈、河豚和斑马鱼的 *tyrp1a* 亲缘关系较近, 而牙鲆 *tyrp1-38* 基因与刺鱼、青鲈和斑马鱼的 *tyrp1b* 亲缘关系较近。由此将牙鲆 *tyrp1-29* 和 *tyrp1-38* 分别鉴定为 *tyrp1a* 和 *tyrp1b* 基因, NCBI GenBank 登录号分别为 MF095844 和 MF095845。

2.3 *tyrp1a* 荧光定量结果

由图 4 可以看出, *tyrp1a* 的表达量在正常牙鲆的眼中表达量最高, 皮肤次之, 第三是性腺, 在肝脏、脑和脾中也均有表达, 在腹部皮肤、背部肌肉、腹部肌肉、鳃、肠、肾和心脏中几乎不表达; *tyrp1a* 的表达量在白化牙鲆的眼中表达量最高, 性腺次之, 第三是腹部肌肉, 在皮肤、鳃和脑中也均有表达, 在腹部皮肤、

背部肌肉、肝脏、肠、脾、肾和心脏中几乎不表达。

2.4 靶基因预测

用 Bielefeld BioInformatics Service RNAhybrid 软件进行靶基因预测后, 得出 *tyrp1a* 3'UTR 区的第 119~126 bp 处与 *mmu-143* 可能存在靶对应关系(图 5)。

2.5 *mmu-143* 荧光定量结果

由图 6 可以看出, miRNA *mmu-143* 在正常牙鲆的性腺中表达量最高, 鳃次之, 第三是肠, 除了在肝脏中几乎不表达外, 其他各组均有表达; *mmu-143* 在白化牙鲆的腹部肌肉中表达量最高, 肠次之, 第三是性腺, 在皮肤、腹部皮肤、鳃、脑、背部肌肉、肝脏、肠、脾、肾和心脏中均有表达。将 *mmu-143* 的定量结果与 *tyrp1a* 的定量结果比较发现, *tyrp1a* 在正常皮肤中的表达量明显高于白化皮肤, 而 *mmu-143*

```

1      acatggggactcttggggggatacatttctgcagacggagaggagcagcATGCACAGTCAGAGCATGTGGAGAGCGGGCCTCCTGGTGGTGACCTGTGTGCCGCCAAACGCTGGCCCA
1      M H S Q S M W R A G L L V V T L C A A Q T L A Q
121    GTTCCCCGTGAGTGTGTACCCCGAGGGGCTGCAGAGTGGTCAGTGTGCCGTCCCTACAGGGTGGCTGGGGACGAGTGTGGCTCCAGCACAGGGAGGGGGCAGTGTGTGCCAT
25     F P R E C V T P E G L Q S G Q C C P S P T G V A G D E C G S S T G R G Q C V S I
241    TGCAGCAGACAACCGCGCCACGGACCCAGTATCCTTACGCGGGGCGAGACAGAGGAGAGGTGGCCGCTGAGGTTTTTCAACCCGACCTGCCAGTGAATGAAATTTTGTGGCTA
65     A A D N R R H G P Q Y P Y A G R D D R E R W P L R F F N R T C Q C N G N F S G Y
361    CAACTGCGGGGATGCCGACCGGGCTGTCGGACCGAAGTGTGATCAGAGGATCTCTGTGGTGGAGGAATATCATGCAGATGAGCCGCTCGGAGAAGCAAGCATTGCGTAACGCTCT
105    N C G G C R H G L S G P N C D Q R I S V V R R N I M Q M S A S E K Q A F V N A L
481    GGACCAAGCTAAGAGGACCATCCACCTGACCTGGTCACTGTACTCGACGTTACCAGGAGTGTGGGGCCGATGGCAACAGCCACAGTTCGAGAATCACCATTACAACACTT
145    D Q A K R T I H P D L V I C T R R Y Q E V F G P D G N S P Q F E N I T I Y N Y F
601    TGTGGAGCCACTACTCTGTGCAGAAAACCTACCTGGGGCCAGCCAGCGGAGCTTTGGAGGTGTAGACTTCTCCACAGAGGGCCAGGTTTGTACCTGGCACCGTTTCATCT
185    V W S H Y Y S V S K T Y L G P G Q A S F G G V D F S H E G P G F V T W H R F H L
721    GTTGCAGCTGGAGAGACATGCAGGACATGCTGGTGAACCCACCTTTGCCCTGCCCTACTGGAACCTTGGCCATCGGCGGAGTACTGTGATATGCACGGACGACCTGATGGAGC
225    L Q L E R D M Q D M L G E P T F A L P Y W N F A I G G S D C D I C T D D L M G A
841    CAGGAGTAGCTTTGACATGAACCTCATCAGCACAACCTGTGTCTCCAGTGGAGGTGATCTGCGAGAGTGTGGAGACTACGACTCGCTGGGACCGTGTGCAACAACCTCAGAAAC
265    R S S F D M N S I S T N S V F S Q W R V I C E S V D D Y D S L G T V C N N S E T
961    CAGTCCCATCAGGAGAAACCCCGGGCAACGTGGCAGCGCCATGGTGCAGAGGTGCCAGAGCCCAAGGACGTGTGGACTGTCTGGAGCTCAACACCTTCGACACGCGCCCTACTA
305    S P I R R N P A G N V A R P M V Q R L P E P K D V L D C L E L N T F D T P P Y Y
1081   CTCCAGTCTCCGAGAGCTTACAGAACCATAGAAGGCTACAGCGCCCTCAGGGGATGTACGACCCGGTGGTCCGACGCTCCACAACCTGGCCACCTCTCTCAATGGGACGGG
345    S T S S E S F R N T I E G Y S A P Q G M Y D P V V R S L H N L A H L F L N G T G
1201   CGGCAGACTCACCTCTGCCCAACGATCCCATCTTTGCTCTGTCACACCTTCACCGACGCGCTTTGAAGAGTGGCTGAGCCGCGACGCGCCAGTGAATAGTGTACCCCGAGGA
385    G Q T H L S P N D P I F V L L H T F T D A V F E E W L S R H A P G E I V Y P E E
1321   GAACGCTCTATTGGGCACAACCGAGGTCCAACATGGTTCCCTTTCGGCTCTGTGACCAACGCCGAGATGTTGTCTCTGCCCCAGAAAACCTGGGACTACTACGAGTCCAGTG
425    N A P I G H N R R S N M V P F W P P V T N A E M F V S A P E N L G Y S Y E V Q W
1441   GCCAGCTCGTGTACACCTGTCTGAGATCATCACCATAGTATCGTGGCGGAGTGTGGTAGTGGCGGTGGTGGGCGGCGTATCGCCTGCGCTGTGCGTGGCCGCTCTACCGATC
465    P A R A Y T L S E I I T I A I V A A V L V V A V V G G V I A C A V R A R S Y R S
1561   GGCCGAGGCTTGGAGCCGCTGCTGGGAGAGACTTCCGACGCTACTCTGAGGACGACCGCGCTTTGGACAAATCGCAGTCTGTCGTCTGAaccatgccttttagagaggccttcaca
505    A E A L E P L L G E T F R R Y S E D D R R L D K S Q S V V *
1681   ttgtcatgcatttgtttctttttcttttttttaataacccgacttttttaataaagtgtaactggtgtcagagccaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 2 牙鲆 *tyrp1-38* 基因序列及其开放阅读框(ORF)预测的氨基酸序列  
 Fig.2 ORF sequence and deduced amino acid sequence of *tyrp1-38* in Japanese flounder

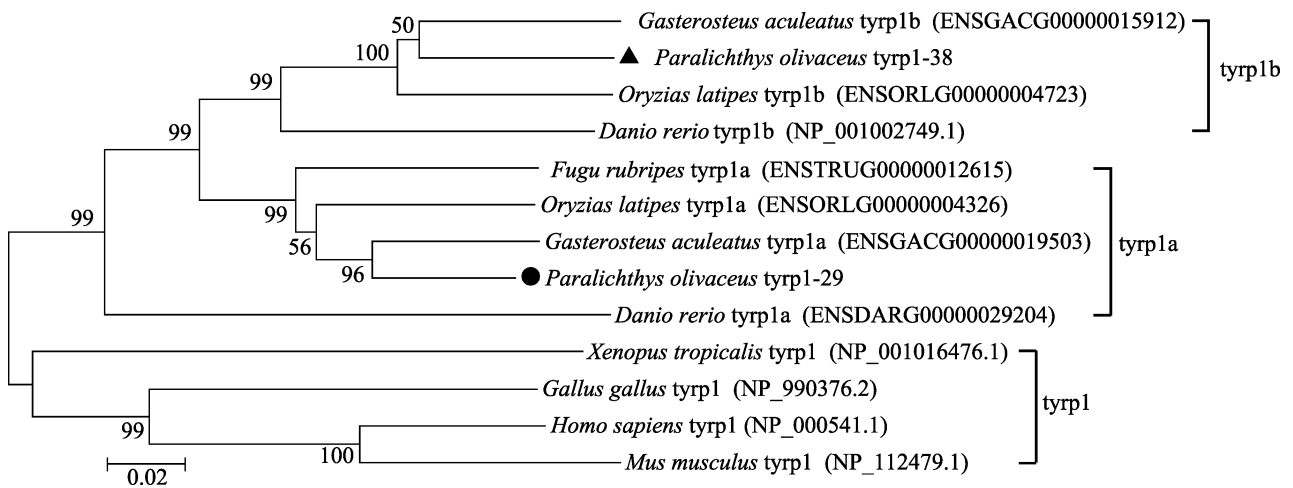


图 3 以 NJ 法建立的系统进化树  
 Fig.3 The phylogenetic tree based on NJ method

括号内为蛋白序列在 GenBank/Ensembl 的登录号(除 *P. olivaceus* 外)  
 GenBank/Ensembl numbers of nucleotide sequences are shown in the brackets (except *P. olivaceus*)

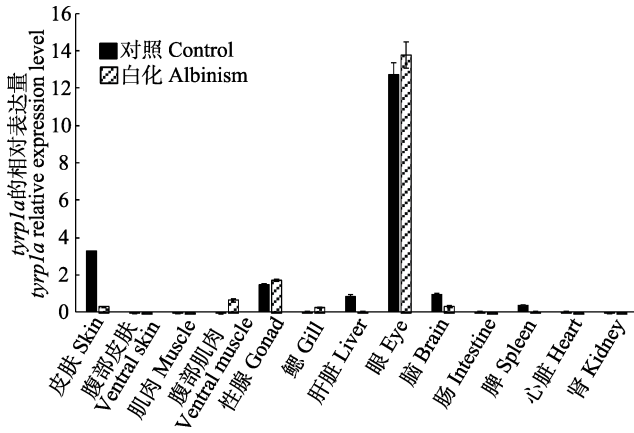


图 4 *tyrp1a* 基因在正常和白化牙鲈不同组织中的表达  
Fig.4 Expression of *tyrp1a* in various tissues of control and albinism of *P. olivaceus*

在白化皮肤中的表达量约为正常皮肤中的 2 倍, 这一结果与之前的高通量测序结果一致。

### 2.6 双荧光素酶实验结果

MiRNA *mmu-143* 与其预测靶基因 *tyrp1a* 的双荧光素酶实验结果如图 7 所示。一般情况下, *mmu-143* mimics 跟阴性对照相比, 报告荧光值下调 30%及以上, 则认为 *mmu-143* mimics 对 *tyrp1a* 基因有调控作用。分析该实验双荧光素酶报告基因结果显示, *mmu-143* mimic 将 *tyrp1a*-WT 的报告荧光下调

38.2%, 对其预测靶位点进行突变后, *tyrp1a*-MU 的报告荧光下调 15.2%。该结果表明, *tyrp1a* 很可能是 *mmu-143* 的靶基因, *mmu-143* 通过调控 *tyrp1a* 基因的表达来影响牙鲈的白化情况。

### 3 讨论

黑色素主要起到吸收光照和色素沉积的作用, 而牙鲈皮肤白化主要是因为缺乏黑色素。黑色素是由酪氨酸酶及相关酶发挥作用合成的, 在脊椎动物中, 酪氨酸酶基因家族主要由三位成员组成: *tyrosinase* (*tyr*)、*tyrp1* 和 *tyrp2*(Nowak *et al*, 1997)。Typr1 被称为酪氨酸酶相关蛋白-1, 定位于小鼠 brown 位点, 该基因在真黑素形成中发挥的关键作用已引起研究者的高度重视(Ito, 2003; Jiménez-Cervantes *et al*, 1994)。研究发现, Typr1 是一种由内质网合成的跨膜蛋白, 通过高尔基体转运到黑色素体内(Ghanem *et al*, 2011), 其编码蛋白与酪氨酸酶(TYR)编码蛋白同源性高达 40%(Jackson *et al*, 1992), 与酪氨酸相关蛋白 2 (Typr2)共同构成酪氨酸家族来调控体内黑色素合成, 并且对黑色素细胞的发育、生存和功能起重要调节作用(Jiménez-Cervantes *et al*, 1994; Del *et al*, 1993; Hearing, 1999)。有实验证明, *tyrp1* 突变或缺失会导致狗(Schmutz *et al*, 2002)、猫(Schmidt-Küntzel *et al*,

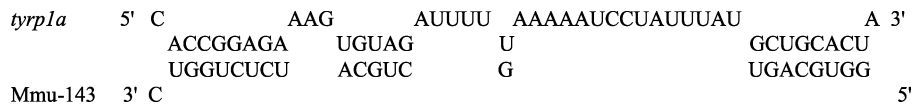


图 5 *mmu-143* 的靶基因预测  
Fig.5 Target prediction of *mmu-143*

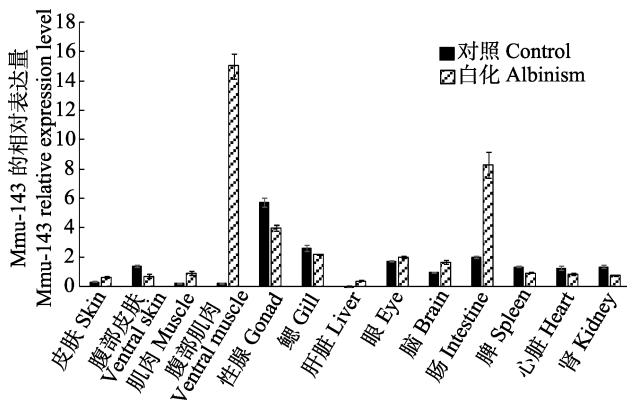


图 6 *mmu-143* 在正常和白化牙鲈不同组织中的表达  
Fig.6 Expressions of *mmu-143* in various tissues of control and albinism of *P. olivaceus*

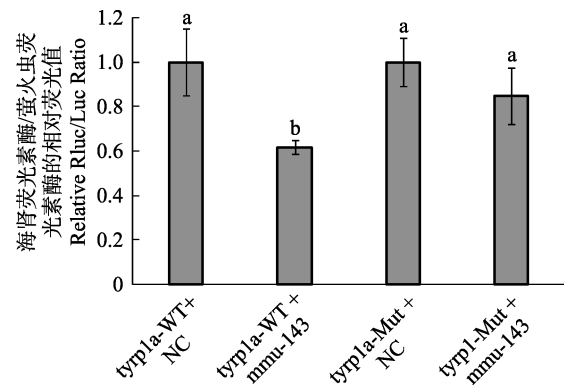


图 7 双荧光素酶实验结果  
Fig.7 The results of dual luciferase experiment

不同的字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )  
Different letters represented significant difference between groups ( $P < 0.05$ )

2005)、牛(Berryere *et al.*, 2003)、羊(Gratten *et al.*, 2007)和日本鹌鹑(Nadeau *et al.*, 2007)的毛色变成灰色。已有报道显示,硬骨鱼类中大多存在 2 种 *tyrp1* 的同源基因,即 *tyrp1a* 和 *tyrp1b*(Braasch *et al.*, 2007、2009)。本研究在牙鲆转录组数据中也发现了 *tyrp1* 的 2 个转录本,分析进一步证实这 2 个转录本 *tyrp1-29* 和 *tyrp1-38* 分别为 *tyrp1a* 和 *tyrp1b* 基因。

*Tyrp1a* 基因在正常和白化牙鲆的有眼侧皮肤、无眼侧皮肤、有眼侧肌肉、无眼侧肌肉、性腺、鳃、脑、肠、眼、心脏、肾脏、脾脏、肝脏这 13 个组织中的表达情况差异明显。正常和白化牙鲆各组织中 *tyrp1a* 表达量最高的是眼组织,且远远高于其他各组织的表达量,这一结果与彩鲤中的表达情况一致(李康乐, 2014),猜测 *tyrp1a* 可能参与牙鲆变态过程中眼睛的偏转及骨骼的重塑。定量结果显示,正常牙鲆皮肤中 *tyrp1a* 基因的表达量应远高于白化皮肤中的表达量,这与 *tyrp1a* 基因能促进黑色素细胞中黑素体的形成相关(崔嘉等, 2009),且与高通量测序结果一致。其次, *tyrp1a* 基因在正常和白化牙鲆的性腺和脑中均有表达,在腹部皮肤、背部肌肉、肠、肾和心脏中几乎不表达。

在哺乳动物和鸟类中已有实验证明,miRNA 能通过调控靶基因来控制黑色素的形成,如 miR508-3p (Zhang *et al.*, 2017)、miR-21a-5p (Wang *et al.*, 2016)、lpa-miR-nov-66 (Yang *et al.*, 2015)、miR-204 (Apopo *et al.*, 2015)等。MicroRNA-203 能与驱动蛋白 5b 相互作用,从而调控黑色素细胞中黑色素转运和酪氨酸酶表达(Noguchi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014)。因此,通过对牙鲆 miRNA 的表达分析,可以帮助我们去探讨 miRNA 在基因表达调控中的功能,更好地解释 miRNA 在牙鲆白化中的分子调控机制。

通过 *tyrp1a* 基因与 mmu-143 的定量结果可以看出,二者在正常和白化牙鲆皮肤、肌肉、性腺、肝、脑和肠中的表达呈一定的反比例关系,例如 *tyrp1a* 在正常牙鲆皮肤中的表达量远高于白化皮肤,而 mmu-143 在白化牙鲆皮肤中的表达量约为正常皮肤中的 2.1 倍。RNAhybrid 软件预测结果显示,可基本确定二者存在靶基因关系,双荧光素酶实验进一步证实了这种负调控关系,说明 mmu-143 是通过调控 *tyrp1a* 基因的表达来影响牙鲆白化发生的。

本研究成功鉴定出牙鲆存在 2 种 *tyrp1* 基因, *tyrp1a* 和 *tyrp1b* 基因,定量结果显示, *tyrp1a* 在正常牙鲆皮肤中的表达量显著高于白化皮肤中的表达量,与 mmu-143 在正常和白化皮肤中的表达量刚好相反,

均与高通量测序结果一致。双荧光素酶实验结果证明 *tyrp1a* 与 mmu-143 存在靶基因互作关系。这一结果丰富了对牙鲆白化分子机制的认识。

## 参 考 文 献

- Apopo S, Liu H, Jing L, *et al.* Identification and profiling of microRNAs associated with white and black plumage pigmentation in the white and black feather bulbs of ducks by RNA sequencing. *Animal Genetics*, 2015, 46(6): 627–635
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, *et al.* TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Animal Genetics*, 2003, 34(3): 169–175
- Braasch I, Liedtke D, Volff JN, *et al.* Pigmentary function and evolution of *tyrp1* gene duplicates in fish. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22(6): 839–850
- Braasch I, Liedtke D, Volff JN, *et al.* Pigmentary function and evolution of *tyrp1* gene duplicates in fish. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22(6): 839–850
- Braasch I, Schartl M, Volff JN. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 74
- Burton D, Vokey J, Mayo D. Adrenoceptors in cryptic patterning of a flatfish, *Pleuronectes americanus*. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 1995, 261(1361): 181–186
- Cui J, Sun SR, Miao LX, *et al.* The research progress of TYRP1 regulate animal pigment formation. *Chinese Veterinary Surgeon*, 2009, 36(9): 94–96 [崔嘉, 孙守荣, 苗鲁旭, 等. TYRP1 基因控制动物色素形成的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(9): 94–96]
- Del MV, Ito S, Jackson I, *et al.* TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Letters*, 1993, 327(3): 307–310
- Dong C, Wang H, Xue L, *et al.* Coat color determination by miR-137 mediated down-regulation of microphthalmia-associated transcription factor in a mouse model. *RNA*, 2012, 18(9): 1679–1686
- Farabee WC. Notes on negro albinism. *Science*, 1903, 17(419): 75
- Ghanem G, Fabrice J. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. *Molecular Oncology*, 2011, 5(2): 150–155
- Gratten J, Slate J. Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 2007, 274(1610): 619–626
- Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 1999, 4(1): 24–28
- Ito S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(3): 230–236
- Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, *et al.* A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *Embo Journal*, 1992, 11(2): 527–535

- Jiménez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, *et al.* A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(27): 17993–18000
- Ke YL. Albino disease in humans and animals. *Science and Culture*, 2006, 11 [柯永亮. 人与动物中的白化病. 科学与文化, 2006, 11]
- Kim KH, Bin BH, Kim J, *et al.* Novel inhibitory function of miR-125b in melanogenesis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014, 27(1): 140–144
- Koga A, Hori H. Albinism due to transposable element insertion in fish. *Pigment Cell Research*, 1997, 10(6): 377–381
- Li KL. Molecular cloning and expression analysis of pigmentation-related genes, Sox10, Agouti, Tyrp1 and Dct, in Oujiang color common carp, *Cyprinus carpio var. Color*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [李康乐. 瓯江彩鲤体色相关基因 Sox10、Agouti、Tyrp1、Dct 的分子克隆与表达分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Li YZ, Chen SL, Xing HF, *et al.* Preliminary study on the albinism of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 76–83 [李仰真, 陈松林, 邢贺飞, 等. 半滑舌鳎白化现象的初步研究. 水产学报, 2014, 38(1): 76–83]
- Liang W, Guo DS, Song J, *et al.* An example of a white silver larynx was found in the Xiaolongmen forest of Beijing. *Chinese Journal of Zoology*, 2000, 35(1): 59 [梁伟, 郭冬生, 宋杰, 等. 北京小龙门林场发现一例白化银喉长尾山雀. 动物学杂志, 2000, 35(1): 59]
- Nadeau NJ, Mundy NI, Gourichon D, *et al.* Association of a single-nucleotide substitution in TYRP1 with rous in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Genetics*, 2007, 38(6): 609–613
- Noguchi S, Kumazaki M, Yasui Y, *et al.* MicroRNA-203 regulates melanosome transport and tyrosinase expression in melanoma cells by targeting kinesin superfamily protein 5b. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(2): 461–469
- Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, *et al.* Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 1997, 388(6638): 167–171
- Schmidt-Küntzel A, Eizirik E, O'Brien SJ, *et al.* Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *Journal of Heredity*, 2005, 96(4): 289–301
- Schmutz SM, Berryere TG, Goldfinch AD. TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mammalian Genome*, 2002, 13(7): 380–387
- Seikai T, Watanabe T, Shimozaki M. Influence of three geographically different strains of *Artemia nauplii* on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1987, 53(2): 195–200
- Seikai T. Influences of fluorescent light irradiation, ocular side pigmentation, and source of fishes on the blind side pigmentation in the young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku*, 2010, 39(1): 21–60
- Seikai T. Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during metamorphosis. *Ichthyological Research*, 1992, 39(1): 85–92
- Takahashi YI. Influence of stocking density and food at late phase of larval period on hypermelanosis on the blind body side in juvenile Japanese flounder. *Nihon-suisan-gakkai-shi*, 1994, 60(5): 593–598
- Wang P, Zhao Y, Fan R, *et al.* MicroRNA-21a-5p functions on the regulation of melanogenesis by targeting Sox5 in mouse skin melanocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 959
- Yamamoto T, Fukusho K, Okauchi M, *et al.* Effect of various foods during metamorphosis on albinism in juvenile of flounder. *Nihon-suisan-gakkai-shi*, 1992, 58(3): 499–508
- Yang S, Fan R, Shi Z, *et al.* Identification of a novel microRNA important for melanogenesis in alpaca (*Vicugna pacos*). *Journal of Animal Science*, 2015, 93(4): 1622–1631
- Yoo JH, Takeuchi T, Tagawa M, *et al.* Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science*, 2000, 17(8): 1101–1106
- Zhang B, Zhang J, Sun L. In-depth profiling and analysis of host and viral microRNAs in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with megalocytivirus reveal involvement of microRNAs in host-virus interaction in teleost fish. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1–15
- Zhang J, Liu Y, Zhu Z, *et al.* Role of microRNA508-3p in melanogenesis by targeting microphthalmia transcription factor in melanocytes of alpaca. *Animal*, 2017, 11(2): 236–243
- Zhang QJ, Chen YL, Xie SH. An example of an albino Wang Jin snake was found in the Shaowu of Fujian. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(2): 47 [张秋金, 陈友铃, 谢少和. 福建邵武发现一例白化王锦蛇. 动物学杂志, 2009, 44(2): 47]
- Zhu XW, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Physiological mechanisms for degeneration of blind-side hypermelanosis in pond-cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 103–110 [朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪机理. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 103–110]
- Zhu Z, He J, Jia X, *et al.* MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in Alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 2010, 38(3): 200–209



## The Identification of *tyrp1a* and *tyrp1b* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the Regulation Study of *tyrp1a* and mmu-miR-143-5p\_R+2

WANG Ruoqing<sup>1,2</sup>, WANG Na<sup>1,3</sup>①, WANG Renkai<sup>1,2</sup>, CHEN Songlin<sup>1,3</sup>

(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 Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** The albinism in Japanese flounder aquaculture has become a common phenomenon and influenced its large-scale farming and market value. Based on the albinism and normal Japanese flounder transcriptome and miRNA sequencing, tyrosinase related protein 1(*tyrp1*) and mmu-miR-143-5p\_R+2 (mmu-143) were chosen for expression pattern, target gene prediction and verification analysis. Firstly, *tyrp1a* and *tyrp1b* were screened and identified by RACE and phylogenetic analysis. Subsequently, RNA hybrid was used for the prediction of the targeting relationship between *tyrp1a* and miRNA mmu-143, which was further verified by dual luciferase experiment. Finally, the results of the quantitative real time-PCR (qRT-PCR) showed that the expression of *tyrp1a* gene in normal skin of Japanese flounder was significantly higher than the albinism skin, and the expression of mmu-143 in normal skin was significantly lower than the albinism skin. The present study identified two transcripts of *tyrp1a* and *tyrp1b* from Japanese flounder. Dual luciferase experiment and qRT-PCR analysis confirmed that *tyrp1a* was the target gene of mmu-143, and mmu-143 affected the albino of Japanese flounder by regulating *tyrp1a*. The results of this study will be helpful to fully understand the molecular mechanism of Japanese flounder albinism.

**Key words** Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); Albinism; mmu-miR-143-5p\_R+2; *tyrp1a*; *tyrp1b*

① Corresponding author: WANG Na, E-mail: wangna@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20161229001

http://www.yykxjz.cn/

刘玲, 陈超, 李炎璐, 刘莉, 陈建国, 李文升. 马文辉短期温度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 59–66

Liu L, Chen C, Li YL, Liu L, Chen JG, Li WS, Ma WH. Effects of short-term temperature stress on antioxidant and digestive physiology of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 59–66

## 短期温度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂) 杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响\*

刘玲<sup>1,2</sup> 陈超<sup>1,2①</sup> 李炎璐<sup>2</sup> 刘莉<sup>2</sup>  
陈建国<sup>2</sup> 李文升<sup>3</sup> 马文辉<sup>3</sup>



(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 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071;  
3. 莱州明波水产有限公司 莱州 261418)

**摘要** 本研究设置温度突变组(21℃、24℃、28℃、32℃和 35℃)和温度渐变组(每天升温 1℃), 探讨不同程度的温度变化胁迫对驼背鲈(*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀)与鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂)的杂交品种(鼠龙斑)抗氧化及消化生理的影响。结果显示, 温度渐变组的摄食量、消化酶活性等均比温度突变组高。温度突变组: 21℃~32℃的摄食量、消化酶活性均随温度升高而逐渐升高, 但 35℃有下降趋势。血清中超氧化物歧化酶(SOD)均呈显著上升趋势, 35℃组在 7 d 有所降低, 肝脏中 SOD 在 21℃~28℃胁迫前后无显著差异, 32℃与 35℃呈先下降再回升的趋势。血清和肝脏中过氧化氢酶(CAT)在 21~28℃变化趋势一致, 均逐渐增加, 而 32℃与 35℃血清与肝脏中 CAT 的变化趋势完全相反。血清中丙二醛(MDA)在 32℃先上升再下降, 且变化幅度显著大于其他各组, 其他各组均为逐渐降低的状态, 肝脏中的 MDA 均为先升高再降低。温度渐变组: 血清中的 SOD 和 CAT 均为先上升再下降, 肝脏中的 SOD 在 3 d 与胁迫前无明显变化, 在 7 d 时显著上升, 而肝脏中 CAT 在 3 d 和 7 d 均显著下降; 肝脏和血清中的 MDA 都有逐渐下降趋势。温度突变组中胃蛋白酶与肠道中的脂肪酶在 21℃、24℃的变化趋势相似, 呈先下降再回升的趋势, 其他各组胃蛋白酶呈逐渐上升趋势, 脂肪酶先上升再下降, 淀粉酶含量低且变化不明显。温度渐变组的胃蛋白酶和脂肪酶都显著增加, 淀粉酶变化幅度不显著。综上, 温度渐变对鼠龙斑幼鱼摄食和抗氧化性具有促进作用, 温度突变对鼠龙斑幼鱼抗氧化性影响明显, 胁迫时间延长可能对鱼体肝脏抗氧化体系有损害作用, 在实际生产过程中, 应该减少急性温度胁迫对鱼体造成的应激反应, 可以通过渐变温度驯化达到养殖需求条件。

**关键词** 驼背鲈×鞍带石斑鱼杂交子代; 温度胁迫; 抗氧化性; 消化酶

中图分类号 S965 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)02-0059-08

\* 山东省自然科学基金项目(ZR2015PC015)和中国-东盟海上合作基金共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015PC015), and China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project]. 刘玲, E-mail: 474572282@qq.com

① 通讯作者: 陈超, 研究员, E-mail: ysfrichenchao@126.com

收稿日期: 2016-12-29, 收修改稿日期: 2017-02-21

鼠龙斑是驼背鲈(*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀)与鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂)的杂交品种。驼背鲈又称老鼠斑,分布于印太海域印度尼西亚至东澳大利亚海域,幼年时色彩靓丽,可作为观赏鱼,成年后味道鲜美,为高级食用鱼(区又君等, 1999)。鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*), 俗名龙趸、龙胆石斑,是石斑鱼类中体型最大者,故也被称为“斑王”,是一种重要的经济鱼类,具有较高的食用和营养价值。鼠龙斑作为一种人工杂交的石斑鱼,与野生石斑鱼相比,具有生长快、味道鲜美、抗病性强等特点,亦可作为观赏鱼类。作为一种杂交新品种,对环境变化的适应能力及相关生理参数等都有待研究。

温度(Stéphan *et al.*, 1995; Filho *et al.*, 2005)、盐度(Roche *et al.*, 1996)、溶氧(Parihar *et al.*, 1995)、pH 等重要环境因子发生变化时,会直接影响鱼体内活性氧含量及抗氧化酶的活性,使机体的自由基代谢发生紊乱,继而使鱼体产生应激反应以响应环境的改变。若机体无法适应则会长期处于应激状态,造成机体抗氧化性和免疫防御能力受损,影响鱼体代谢、生长(Martínez-Alvarez *et al.*, 2005)。在养殖过程中,温度作为最重要环境因子之一,与鱼体的抗氧化能力以及代谢功能有密切联系(Filho *et al.*, 2005)。温度作为影响鱼类抗氧化酶活性的环境因素之一,主要对鱼类代谢反应速率起控制作用(柳学周等, 2004)。温度的升高会导致机体耗氧量的增加,促进氧自由基的产生,进而促进抗氧化酶活性的升高(Martínez-Álvarez *et al.*, 2004)。鱼体在正常的新陈代谢下,体内自由基通常处于动态平衡,当受到环境胁迫后,自由基就会大量生成,过量的自由基会对机体产生一定的损伤(孙鹏等, 2014)。当鱼体长期处于适温边界则会造成胁迫,降低机体的代谢水平,这种温度胁迫与代谢水平之间具有显著的相关性(Handeland *et al.*, 2008; Jobling *et al.*, 1983)。鱼类在受到环境胁迫后,机体抗氧化酶会被激活应对环境变化,当机体适应环境后,抗氧化酶水平会恢复,如果胁迫超出机体适应能力,抗氧化酶水平将不可恢复。因此,在一定程度上,抗氧化酶活性恢复至正常水平的时间反映了机体对环境的适应能力(胡静等, 2015)。

鱼类抗氧化防御体系中的抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)等,这些酶和其他的非酶类抗氧化物质共同构成了机体内的抗氧化防御体系,共同保护机体免受氧化伤害,并与体内产生的活性氧物质之间达到平衡状态(亢玉静等, 2013)。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,广泛分布于各种生物体内,是生物体内清除自由基的首要物质,把有害的超氧自由基转化为过氧化

氢,然后 CAT 又立即促使过氧化氢分解为分子氧和水,使细胞免于遭受  $H_2O_2$  的毒害,从而达到保护机体作用(张克烽等, 2007)。因此, SOD 和 CAT 相互配合组成了一个抗氧化链条,是存在于生物体内的非常重要的抗氧化防御性功能酶(乔秋实等, 2011)。MDA 是膜脂过氧化重要的产物之一,它的产生还能加剧膜的损伤(王伟等, 2012),MDA 产生数量的多少能够代表膜脂过氧化的程度,也可间接反映组织细胞受自由基攻击的严重程度。因此,MDA 含量常被用来衡量水生动物机体的抗氧化能力(Viña, 2002; 刘小兵等, 2008)。本文研究了急性温度胁迫与渐变升温胁迫下,鼠龙斑肝及血清中抗氧化和消化生理指标的变化,为探讨不同程度的温度变化胁迫对鼠龙斑抗氧化及消化生理的影响,从而深入了解鼠龙斑对环境改变的响应,对人工养殖驯化和生产具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验用鱼鼠龙斑幼鱼于 2016 年 7 月由莱州市明波水产有限公司提供,共 400 尾,平均体重为  $(20.30 \pm 0.38)$  g,平均体长为  $(10.35 \pm 0.43)$  cm,实验前于水温为  $(26.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  (自然海水的温度)的水池中暂养 3 d,每天分别于 08:00 和 16:00 投喂饲料(日本林兼株式会社生产的“鱼宝”牌饲料),按体重的 1%~2% 进行投喂,采用微流水饲养,每天清污换水 1 次。

### 1.2 养 殖 条 件

实验水温通过冷热海水(经过电厂升温的自然海水  $35^\circ\text{C}$  和海边井水  $21^\circ\text{C}$ )勾兑,微流水状态保持水温, pH 为 7.5~8.0,盐度为 25~30,溶氧  $>5$  mg/L (24 h 不间断充氧)。实验在直径为 60 cm、容积为 120 L 的圆形水槽中进行。

### 1.3 实 验 设 计

实验为 5 个温度突变组:  $21^\circ\text{C}$ 、 $24^\circ\text{C}$ 、 $28^\circ\text{C}$ 、 $32^\circ\text{C}$ 、 $35^\circ\text{C}$  和 1 个温度渐变组。每个温度组设 3 个平行,每个平行 20 尾鱼。温度突变组:将暂养 3 d 后的鼠龙斑直接放入已经调好温度的水槽中进行实验;温度渐变组:从  $26^\circ\text{C}$  开始升温,每天升温  $1^\circ\text{C}$ ,连续升温 7 d,达到  $33^\circ\text{C}$ 。实验开始后每天投喂 2 次,每次投喂时记录每组投喂量(以不再抢食、水面飘浮着多余的饲料为饱食状态,停止投喂,投喂前后对装饲料的容器进行称量,其减少量为投喂量),喂食 30 min 后,将残余饵料吸出、晒干(室外晾晒 10~12 h)后称重,计算摄食量。每天清污换水 1 次,换水量为 50%。

参数计算公式:

$$\text{平均日摄食量(g)} = (\sum Q_1 - \sum Q_0) / t * n$$

式中,  $Q_1$  为饲料日平均投喂量,  $Q_0$  为饲料日平均残留量,  $t$  为实验天数(d),  $n$  为鱼个体数。

#### 1.4 取样

在实验的第0、3、7天分别对每组进行取样, 每个平行取3尾鱼, 利用丁香酚(200 mg/L)进行麻醉, 用2 ml的一次性注射器进行尾静脉抽血, 抽血前注射器先抽取少量的抗凝剂, 将抽出血样于3000 r/min离心10 min, 取上清液移于EP管中, 投入液氮罐中保存待测。取血后迅速将鱼置于冰盘上解剖, 取其肝脏、胃和肠, 液氮中保存待测。

#### 1.5 样品处理及指标检测

将血清和样品置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 逐渐解冻, 解冻后的组织与生理盐水按重量(g): 体积(ml)=1:9的比例制备组织匀浆液, 在冰水浴条件下, 利用组织匀浆机, 制备成10%的组织匀浆, 4000 r/min离心10 min, 取上清液, 再用生理盐水稀释成适宜浓度,  $4^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测。

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定血清与肝脏中的SOD活力、CAT活力、MDA含量; 胃中的胃蛋白酶活性, 肠道中的淀粉酶、脂肪酶活性, 测定步骤按试剂盒说明书进行。

#### 1.6 数据处理

采用SPSS 22.0软件进行数据处理和分析, 采用ANOVA对实验结果进行方差分析, 采用Duncan's法进行多重比较。实验数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示,  $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 温度突变与温度渐变对鼠龙斑摄食的影响

各温度组鼠龙斑幼鱼7 d内每天的摄食量变化情况见图1,  $21^{\circ}\text{C}$ 温度突变组的摄食量最低, 与其他组差异显著( $P<0.05$ ), 平均日摄食量在0.4 g/(尾·d)左右, 起伏较小。 $24^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C}$ 和 $32^{\circ}\text{C}$ 温度突变组的平均日摄食量随着实验天数的增加呈现规律上升趋势, 且随着温度的升高, 平均日摄食量也呈升高的趋势, 这3组的变化趋势与温度渐变组的变化趋势也相似, 而温度渐变组的平均日摄食量最高。 $35^{\circ}\text{C}$ 温度突变组的平均日摄食量在实验开始的前2 d变化不大, 但远远高于其他温度组的摄食量( $P<0.05$ ), 实验期间摄食量无规律。第8天, 将所有温度组冷热水关闭, 统一换成自然海水, 温度范围为 $(26.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ , 再暂养3 d, 观

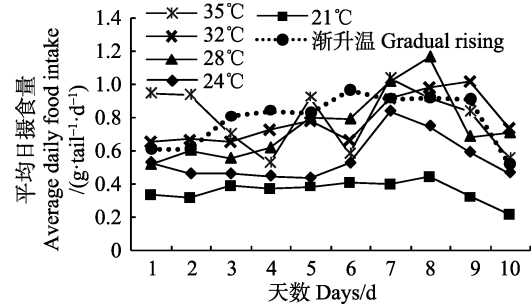


图1 温度突变与温度渐变对鼠龙斑幼鱼平均日摄食量的影响

Fig.1 Effects of temperature acute change and gradual rising on the average daily food intake of juvenile *Mussaurus spot*

察其摄食量的变化, 除 $28^{\circ}\text{C}$ 和 $32^{\circ}\text{C}$ 温度突变组外, 其他各温度组的摄食量均出现显著下降趋势,  $28^{\circ}\text{C}$ 温度突变组在下降以后第3天的摄食量略有回升, 趋于平稳,  $32^{\circ}\text{C}$ 突变温度组在恢复自然海水温度的前2 d摄食量平稳上升, 在第3天时显著下降。

### 2.2 温度对鼠龙斑血清和肝脏中抗氧化指标的影响

**2.2.1 超氧化物歧化酶**  $21^{\circ}\text{C}$ 温度突变组血清中的SOD在3 d和7 d相对稳定, 相比实验开始前显著增加( $P<0.05$ ), 而肝脏中变化不明显( $P>0.05$ ),  $24^{\circ}\text{C}$ 和 $28^{\circ}\text{C}$ 血清中SOD在第3天变化不明显, 在第7天时显著升高且显著高于 $21^{\circ}\text{C}$ 温度组( $P<0.05$ ), 而肝脏中第3天升高后在第7天有所下降,  $32^{\circ}\text{C}$ 和 $35^{\circ}\text{C}$ 血清中SOD在第3天明显升高, 第7天略高于第3天, 肝脏中的SOD在第3天比0 d显著下降, 在第7天有所上升但仍然低于0 d。温度渐变组血清中的SOD先上升后又恢复到原始值, 肝脏中在第3天无显著变化, 在第7天显著上升( $P<0.05$ ) (图2)。

**2.2.2 过氧化氢酶** 温度突变组血清中的CAT总体呈现逐渐上升趋势, 除 $28^{\circ}\text{C}$ 上升趋势较小, 其他各温度突变组均都在第3天和第7天时比0 d显著升高( $P<0.05$ ),  $35^{\circ}\text{C}$ 血清中CAT上升最高, 第3天显著升高达到143.82 U/ml, 第7天持续升高到172.64 U/ml, 显著高于其他各组( $P<0.05$ ); 肝脏中 $24^{\circ}\text{C}$ 和 $28^{\circ}\text{C}$ 的趋势与血清中相似, 呈现显著上升趋势( $P<0.05$ ),  $21^{\circ}\text{C}$ 在第3天显著升高, 第7天又恢复到0 d水平,  $32^{\circ}\text{C}$ 和 $35^{\circ}\text{C}$ 肝脏中的CAT在第3天和第7天呈现显著下降的趋势( $P<0.05$ )。温度渐变组随着温度的升高, 血清中的CAT先是在第3天显著升高后在第7天又显著下降, 而肝脏在第3天和第7天均是显著下降( $P<0.05$ ) (图3)。

**2.2.3 丙二醛**  $21^{\circ}\text{C}$ 和 $24^{\circ}\text{C}$ 温度突变组血清中的MDA在第3天时都显著下降( $P<0.05$ ),  $28^{\circ}\text{C}$ 和 $35^{\circ}\text{C}$ 变化

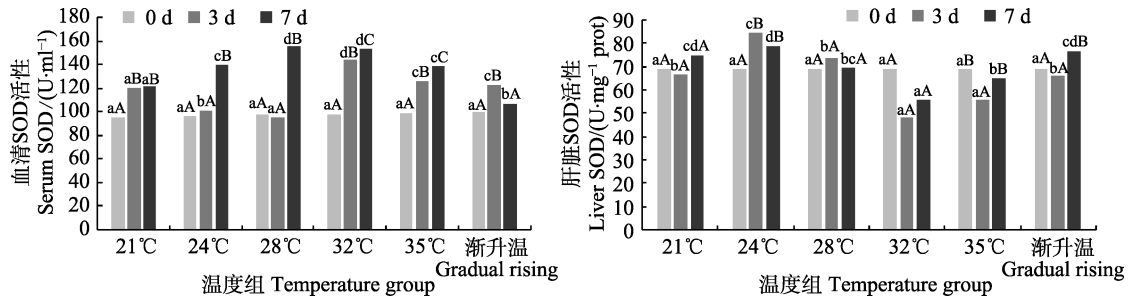


图2 温度突变与温度渐变对鼠龙斑幼鱼血清和肝脏中SOD活性的影响

Fig.2 Effects of temperature acute change and gradual rising on SOD activity in serum and liver of juvenile *Mussaurus spot*

不同小写字母表示不同温度组同一时间存在显著差异( $P<0.05$ );

不同大写字母表示同一温度组不同时间存在显著差异( $P<0.05$ ); 下同

Different lowercase letters indicated significant differences in different temperature groups at same time ( $P<0.05$ ); Different capital letters indicated significant differences in the same temperature group at different time ( $P<0.05$ ). The same as below

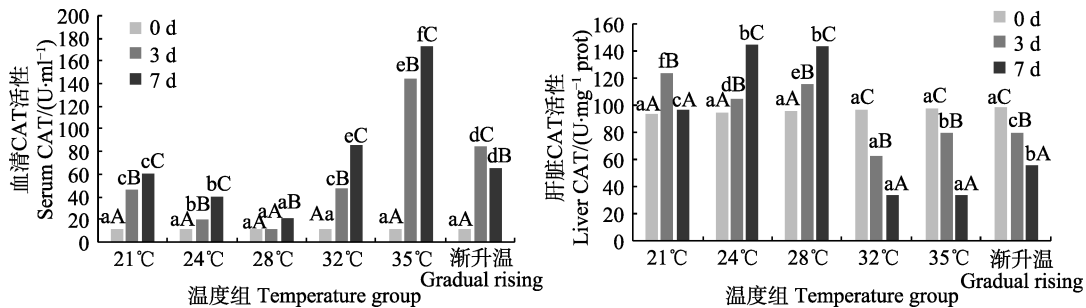


图3 温度突变与温度渐变对鼠龙斑幼鱼血清和肝脏中CAT活性的影响

Fig.3 Effects of temperature acute change and gradual rising on CAT activity in serum and liver of juvenile *Mussaurus spot*

不明显, 32°C呈显著上升在3 d时达到了64.19 nmol/ml, 但在第7天时, 21°C显著上升, 24°C与第3天相比变化不明显, 28°C、32°C和35°C均呈显著下降( $P<0.05$ ); 而肝脏中的MDA在21°C、32°C和35°C均呈现显著上升再下降的趋势, 21°C在第3天上升显著, 大于其他各组, 达到3.74 nmol/mg prot, 24°C第3、7天无显著差异, 28°C的第3天与0 d差异不大, 7 d时略下降。温度渐变组随着温度的升高, 血清和肝脏中MDA变化趋势相似, 均在逐渐下降, 在第3天显著下降( $P<0.05$ ), 在第7天略下降(图4)。

### 2.3 温度对鼠龙斑消化生理指标的影响

**2.3.1 胃蛋白酶** 21°C和24°C温度突变组的胃蛋白酶变化趋势相似, 第3天显著下降( $P<0.05$ ), 第7天时有升高, 但比0 d时低, 其他各温度突变组都逐渐上升, 28°C第3天与0 d相比上升不显著( $P>0.05$ ), 第7天与0 d相比显著上升( $P<0.05$ ), 32°C和35°C第3、7天均显著上升且比其他各组都高, 在第7天分别达到了69.70和70.05 U/mg prot; 温度渐变组, 随着温度的升高, 胃蛋白酶显著升高( $P<0.05$ ), 在第3天, 温度上升到31°C时, 胃蛋白为47.13 U/mg prot,

在第7天, 温度上升到35°C时, 达到88.33 U/mg prot (图5)。

**2.3.2 脂肪酶** 21°C、24°C和28°C温度突变组肠道中的脂肪酶变化不显著, 21°C在第3、7天逐渐降低, 24°C和28°C第0、3天差异不显著( $P>0.05$ ), 而7 d时24°C略有降低, 28°C有所升高, 32°C和35°C变化趋势相似, 均是第3天显著上升( $P<0.05$ ), 第7天显著下降( $P<0.05$ ), 但35°C与32°C上升、下降变化趋势存在显著差异( $P<0.05$ ), 35°C第3天高达159.61 U/g prot, 与其他各温度突变组存在显著差异( $P<0.05$ )。温度渐变组肠道脂肪酶, 随着温度的上升, 第3、7 d均显著上升( $P<0.05$ ), 第3天为182.16 U/g prot, 显著高于0 d ( $P<0.05$ ), 第7天为270.19 U/g prot, 显著高于第3天( $P<0.05$ ) (图6)。

**2.3.3 淀粉酶** 肠道淀粉酶21°C和24°C温度突变组, 第3天比0 d显著下降( $P<0.05$ ), 第7天又显著上升( $P<0.05$ ), 21°C第3、7天与0 d相比, 下降幅度显著( $P<0.05$ ), 24°C在7 d恢复到0 d水平, 28°C和32°C总体变化起伏不大, 35°C第3、7天均显著下降( $P<0.05$ )。温度渐变组随着温度上升第3、7天肠道淀粉酶显著上升( $P<0.05$ ) (图7)。

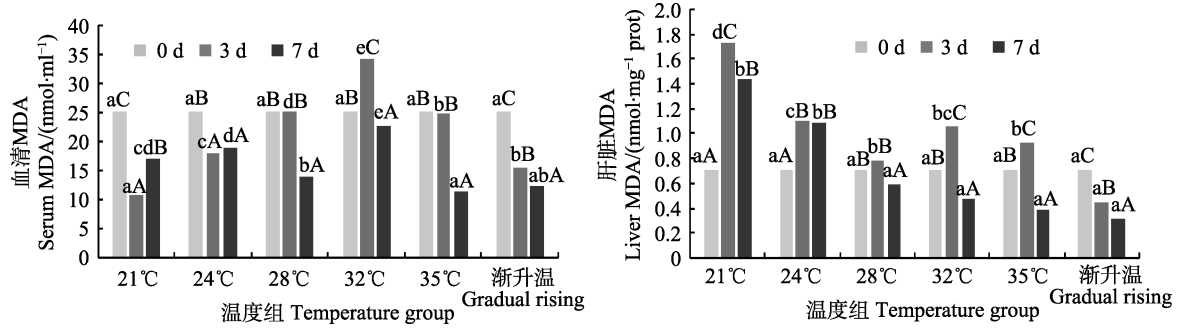


图 4 温度突变与温度渐变对鼠龙斑幼鱼血清和肝脏中 MDA 的影响

Fig.4 Effects of temperature acute change and gradual rising on MDA in serum and liver of juvenile *Mussaurus spot*

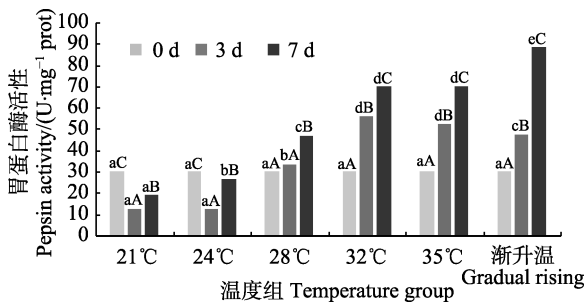


图 5 温度突变与渐升温对鼠龙斑幼鱼胃蛋白酶活性的影响

Fig.5 Effects of temperature acute change and gradual rising on pepsin of juvenile *Mussaurus spot*

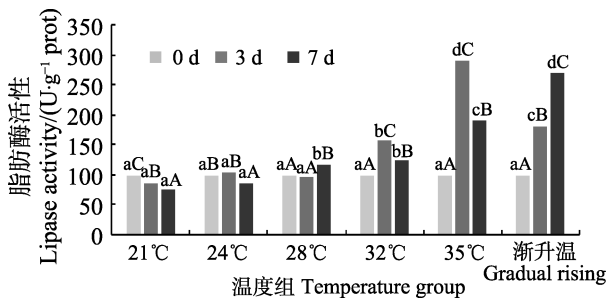


图 6 温度突变与渐升温对鼠龙斑幼鱼肠道脂肪酶活性的影响

Fig.6 Effects of temperature acute change and gradual rising on intestinal lipase of juvenile *Mussaurus spot*

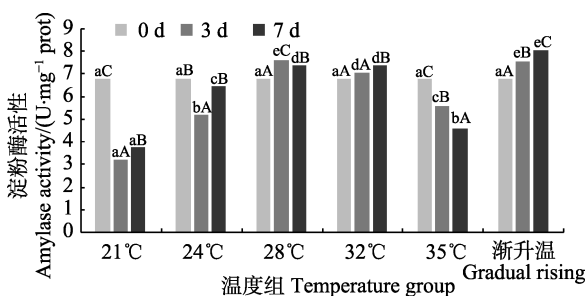


图 7 温度突变与渐升温对鼠龙斑幼鱼肠道淀粉酶活性的影响

Fig.7 Effects of temperature acute change and gradual rising on intestinal amylase of juvenile *Mussaurus spot*

### 3 讨论

#### 3.1 温度突变与温度渐变对鼠龙斑摄食的影响

鱼类属于变温动物, 终生生活在水中, 在适宜的温度范围内, 鱼类可以正常生长和繁殖。相关研究表明, 在适宜的温度范围内, 随着温度的增加, 鱼的生长速度加快, 但超出适宜的温度范围, 温度升高会有相反的影响(Jobling, 1993)。本研究中, 鼠龙斑平均日摄食量随着突变温度的增加而逐渐增加, 突变组 35°C 虽然平均摄食量比其他各组高, 但随着胁迫时间延长, 摄食量不稳定, 结合消化酶变化, 在高温下可能对机体消化作用有一定影响, 32°C 其摄食量与 35°C 无较大差异。温度渐变组的摄食量随着温度的上升而逐渐升高, 且平均摄食量比温度突变组均高 ( $P < 0.05$ ), 从实际生产养殖条件角度出发, 32°C 可作为鼠龙斑生产养殖的最适温度, 且可通过渐变温度对鼠龙斑进行驯化达到最佳养殖温度。实验结束后, 各温度组均出现了摄食量下降的趋势, 这也说明温度波动较大的情况下, 对鱼体影响较大。在养殖过程中, 应及时关注温度变化, 在温度变化较大的情况下, 适当减少投喂量, 避免浪费饲料。

#### 3.2 温度突变与渐变温度对鼠龙斑抗氧化指标的影响

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶, 广泛分布于各种生物体内, 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质, CAT 在抗氧化机制中主要是将 SOD 与自由基反应生成的  $H_2O_2$  转化为水, 因此, CAT 的含量在一定程度上受到 SOD 含量的影响。温度突变组: 肝脏中的 SOD 在 21°C~28°C 胁迫前后差异不显著, 32°C 与 35°C 出现先下降再回升的趋势, 血清中 SOD 随着胁迫时间的延长均呈显著上升趋势, 说明水温变化导致机体中的自由基大量增加, 机体启动肝抗氧化防御系统, 生成大量 SOD, 调节细胞膜通透性使肝脏中的 SOD 大量输送到血液中, 导致血液中的 SOD 大量增



加,随着时间延长,肝中 SOD 逐渐回升,21℃~32℃血清中 SOD 实验第 7 天均显著升高,且随着胁迫温度升高,SOD 也逐渐升高,表明在适温范围内血清中抗氧化酶活力与水温呈正比,与李大鹏等(2008)研究结果相符。然而,在 35℃时有所降低,说明 35℃已经超过适温范围。在 21~28℃温度组,血清和肝脏中 CAT 变化趋势一致,均是逐渐增加,尤其第 7 天显著增加( $P<0.05$ ),说明随着胁迫时间延长,机体通过自身调节清除过量的自由基,而 32℃与 35℃血清与肝脏中 CAT 的变化趋势完全相反,说明肝组织受到一定损伤,使细胞通透性下降,肝脏中 CAT 含量下降而血清中显著升高,这与谢明媚等(2015)研究结果相似。温度渐变组:血清中的 SOD 和 CAT 均是先上升再下降,SOD 在第 7 天时恢复至胁迫前,CAT 在第 7 天显著高于胁迫前,肝脏中的 SOD 第 3 天与胁迫前无明显变化,在第 7 天时显著上升( $P<0.05$ ),而肝脏中 CAT 在第 3、7 天均显著下降,可能与肝脏中 CAT 大量转入血液中有关系,随着温度逐渐增加,高温对机体有一定的损伤。

MDA 是细胞膜脂过氧化作用的产物之一,主要在肝脏分解,所以肝脏中的脂质过氧化产物 MDA 含量会随着胁迫加强而升高(王奇等,2010)。因此,通过 MDA 含量多少来间接判断机体受到自由基损伤的程度,一般结合 SOD、CAT 和 MDA 含量更能说明机体的抗氧化能力。温度突变组肝脏中 MDA 均是先增加再降低,这与潘桂平等(2016)对云纹石斑鱼低温胁迫研究中 MDA 变化趋势相似,说明机体在开始时产生应激反应,随着产生大量 SOD、CAT 清除过量的自由基而逐渐降低,血清中 MDA 都是在第 7 天均有所降低,说明机体通过调节逐渐恢复,且恢复时间可能与应激反应时间有关,21℃、24℃肝脏与血清中 MDA 的变化趋势相反,肝脏中先显著上升再下降,在第 7 天时仍显著高于第 0 天( $P<0.05$ ),说明肝脏受到一定损伤,不能及时恢复,产生的大量 SOD、CAT 清除过量的自由基,自由基的急剧下降导致血清中的 MDA 在第 3 天显著下降,而在第 7 天时有所回升。温度渐变组肝脏和血清中的 MDA 均是逐渐下降,而血清中的 SOD、CAT 均是大量增加,以此来抵抗产生的大量自由基,这与谢明媚等(2015)的研究结果相似,说明机体 SOD、CAT 的抗氧化作用足以抵抗自由基的损害,使自由基处于较低状态,在第 7 天时可能机体肝脏受到一定损伤而不能及时恢复。本实验由于时间较短(7 d),只是探讨短期应激反应对机体的影响,若时间延长,可能会对鼠龙斑造成一定的伤害;温度渐变组中,鼠龙斑通过自身调节适应逐渐升温的

状态,使机体达到新的动态平衡,应激反应与突变组相比较小,在生产过程中利于养殖驯化。

### 3.3 温度突变与温度渐变对鼠龙斑幼鱼消化生理指标的影响

胃蛋白酶与肠道中的脂肪酶在温度突变组 21℃、24℃的变化趋势相似,呈先下降再回升的趋势,但第 7 天还未恢复到胁迫前状态,肠道脂肪酶有所下降,但变化都不显著( $P>0.05$ ),说明温度急性下降对鼠龙斑的消化酶活性有一定的抑制作用,这从平均日摄食量变化也能明显反映出来。28℃温度组的胃蛋白酶和脂肪酶第 3 天变化不明显,在第 7 天有所上升,淀粉酶在第 3 天上升后保持平衡,说明 28℃温度组对鼠龙斑的影响较小。32℃、35℃胃蛋白酶呈逐渐上升趋势,且显著大于胁迫前的含量( $P<0.05$ ),脂肪酶先上升再下降,但胁迫前后差异显著( $P<0.05$ ),淀粉酶 32℃上升趋势不显著,35℃呈下降趋势且与胁迫前存在显著差异( $P<0.05$ ),说明高温胁迫时鼠龙斑的消化酶活性增加,从而使摄食量也增加,这与施兆鸿等(2016)对银鲳(*Pampus argenteus*)的研究结果相似。温度渐变组的胃蛋白酶和脂肪酶都显著增加且脂肪酶的含量显著大于突变温度组,淀粉酶也呈上升趋势,只是变化幅度不显著( $P>0.05$ ),表明温度渐变能够使鼠龙斑的消化酶活性升高且保持较高的活跃状态,增加鱼体的摄食量。

通过对温度突变以及温度渐变胁迫下鼠龙斑的摄食情况、抗氧化指标以及消化生理指标等分析,温度渐变对鼠龙斑幼鱼摄食和抗氧化性具有促进作用,温度突变对鼠龙斑幼鱼抗氧化性影响明显,胁迫时间延长可能对鱼体肝脏抗氧化体系有损害作用。综上,鼠龙斑的适宜生长温度范围为 24℃~32℃,在 21℃~35℃水温中均正常生长,但由于本次实验时间较短且受到实验条件的限制,导致无法测得鼠龙斑的存活温度范围,对其生理生化指标的变化规律研究还有待进一步完善。在实际养殖生产过程中,可通过渐变温度驯化达到养殖可控的温度范围,以减少对鱼体的伤害。

## 参 考 文 献

- Filho DW, Torres MA, Zaniboni-Filho E, *et al.* Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus*, (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 2005, 244(1): 349-357
- Hu J, Wu KC, Ye L, *et al.* Effects of acute salinity stress on catalase in juvenile *Amphiprion clarkii*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(6): 73-78 [胡静, 吴开畅, 叶乐, 等. 急性盐度胁迫对克氏双锯鱼幼鱼过氧化氢酶的影响. 南方

- 水产科学, 2015, 11(6): 73–78]
- Handeland SO, Imstrand AK, Stefansson SO. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture*, 2008, 283(1–4): 36–42
- Jobling M. Influence of body weight and temperature on growth rates of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, (L.). *Journal of Fish Biology*, 1983, 22(4): 471–475
- Jobling M. *Bioenergetics: Feed intake and energy partitioning// Fish Ecophysiology*. Springer Netherlands, 1993, 457–466
- Kang YJ, Lang MY, Zhao W. Antioxidant enzymes and its influencing factors in aquatic organisms research progress. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(3): 75–80 [亢玉静, 郎明远, 赵文. 水生生物体内抗氧化酶及其影响因素研究进展. *微生物学杂志*, 2013, 33(3): 75–80]
- Liu XB, Piao JH. The bioactive substances of antioxidant capacity evaluation methods and its research progress. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2008, 20(5): 440–444 [刘小兵, 朴建华. 生物活性物质的抗氧化能力评价方法及其研究进展. *中国食品卫生杂志*, 2008, 20(5): 440–444]
- Li DP, Liu SY, Xie CX, *et al.* Effects of water temperature on active oxygen content and antioxidant defense system in Chinese sturgeons. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 327–332 [李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响. *水生生物学报*, 2008, 32(3): 327–332]
- Liu SZ, Xu YJ, Ma AJ, *et al.* Effects of temperature, salinity and light on the embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* and the control technology research of hatching conditions. *Progress in Fisheries Science*, 2004, 25(6): 1–6 [柳学周, 徐永江, 马爱军, 等. 温度、盐度、光照对半滑舌鲷胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究. *渔业科学进展*, 2004, 25(6): 1–6]
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in Fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, 2005, 15(1): 75–88
- Ou YJ, Li JE, Chen FH. Morphology and biological character of hunchback perch. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999(1): 24–26 [区又君, 李加儿, 陈福华. 驼背鲈的形态和生物学性状. *中国水产科学*, 1999(1): 24–26]
- Parihar MS, Dubey AK. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 1995, 112(3): 309–313
- Pan GP, Liu BW, Zhou WY. Effects of low temperature stress on antioxidant and immune indexes of juvenile *Epinephelus aureus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(1): 78–85 [潘桂平, 刘本伟, 周文玉. 低温胁迫对云纹石斑鱼幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(1): 78–85]
- Qiao QS, Xu WN, Zhu H, *et al.* Effects of starvation and refeeding on *Megalobrama amblycephala* growth and body composition and digestive enzymes. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(2): 63–68 [乔秋实, 徐维娜, 朱浩, 等. 饥饿再投喂对团头鲂生长、体组成及肠道消化酶的影响. *淡水渔业*, 2011, 41(2): 63–68]
- Roche H, Bogé G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 1996, 41(1): 27–43
- Shi ZH, Xie MM, Peng SM, *et al.* Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30–36 [施兆鸿, 谢明媚, 彭士明, 等. 温度胁迫对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 30–36]
- Sun P, Chai XJ, Yin F, *et al.* Responses of liver antioxidant system of *Nibea japonicus* under transport stress. *Marine Fisheries*, 2014, 36(5): 469–474 [孙鹏, 柴学军, 尹飞, 等. 运输胁迫下日本黄姑鱼肝脏抗氧化系统的响应. *海洋渔业*, 2014, 36(5): 469–474]
- Stéphan G, Guillaume J, Lamour F. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: Effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 1995, 130(2–3): 251–268
- Viña J. Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. *Biochemistry & Molecular Biology Education*, 2002, 30(3): 215–216
- Wang W, Jiang ZQ, Meng FP, *et al.* Effects of acute temperature stress on survival rate, physiological and biochemical indexes of Pacific cod fish and juvenile. *Journal of Fisheries Science*, 2012, 31(8): 463–466 [王伟, 姜志强, 孟凡平, 等. 急性温度胁迫对太平洋鲑仔稚鱼成活率、生理生化指标的影响. *水产科学*, 2012, 31(8): 463–466]
- Wang Q, Fan CP, Chen KC, *et al.* Effects of three kinds of sulfa drugs on the glutathione transferase (GST) and malondialdehyde (MDA) in the liver tissues of tilapia. *Ecological and Environmental Sciences*, 2010, 19(5): 1014–1019 [王奇, 范灿鹏, 陈锬慈, 等. 三种磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中谷胱甘肽转移酶(GST)和丙二醛(MDA)的影响. *生态环境学报*, 2010, 19(5): 1014–1019]
- Xie MM, Peng SM, Zhang CJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on antioxidant and immune indexes of juvenile silver pomfret. *Marine Fisheries*, 2015(6): 541–549 [谢明媚, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *海洋渔业*, 2015(6): 541–549]
- Zhang KF, Zhang ZP, Chen Y, *et al.* Advances in studies on the main antioxidant enzymes gene in antioxidant systems of animals. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(2): 153–160 [张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展. *动物学杂志*, 2007, 42(2): 153–160]

## Effects of Short-Term Temperature Stress on Antioxidant and Digestive Enzymes of Hybrid Progeny (*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)

LIU Ling<sup>1,2</sup>, CHEN Chao<sup>1,2①</sup>, LI Yanlu<sup>2</sup>, LIU Li<sup>2</sup>, CHEN Jianguo<sup>2</sup>, LI Wensheng<sup>3</sup>, MA Wenhui<sup>3</sup>

(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 Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071; 3. Laizhou Mingbo Fisheries Limited Corporation, Laizhou 261418)

**Abstract** The effects of variable temperature acute change (21°C, 24°C, 28°C, 32°C and 35°C) and temperature gradient (rising 1°C every day) on the antioxidant and digestive physiology in hybrid progeny (*Mussaurus spot*) of *Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ were studied. The results showed that feed intake and digestive enzyme activity in gradual rising temperature group were higher than those in temperature acute change groups. The temperature acute change groups: the feed intake and digestive enzyme activity were gradually increased from 21°C to 32°C, but decreased in 35°C group. The serum SOD activities were increased significantly in most temperature mutations groups except 35°C group at the 7th day. The liver SOD activities had no significant difference before and after treatment in 21°C, 24°C and 28°C groups, but decreased in 32°C group and increased in 35°C group. The activities of catalase enzyme (CAT) in serum and liver had increasing trends in 21°C, 24°C and 28°C groups, but had decreasing trends in 32°C and 35°C groups. The serum MDA content increased at first and then decreased in 32°C group and the amplitude of variation was significantly larger than other groups with gradually decreased content of MDA. The liver MDA content increased at first and then decreased in all groups. The gradual rising temperature group: The serum SOD and CAT activities increased at first and then decreased. The liver SOD activity had no significant change at the 3rd day but significantly increased at the 7th day, while the liver CAT activity decreased significantly at both the 3rd and 7th day. The MDA content in both liver and serum were gradually declined. The temperature acute change groups: the intestinal tract pepsin and lipase activities were similar in 21°C and 24°C groups, which decreased at first and then increased. The pepsin activity gradually increased in other groups, while the lipase activity increased at first and then decreased. The amylase activity maintained at a lower level without obvious change. The activity of pepsin and lipase increased significantly in the gradual rising temperature group, while there was no significant change in the amylase activity. In summary, temperature gradual rising can promote the feed intake and antioxidant ability of juvenile *Mussaurus spot*, while the temperature acute change can make significant effect on antioxidant system and may cause liver damage overtime. So temperature acute change should be limited to reduce the adverse stress response during the feeding time, and temperature gradual rising can be used to achieve the required conditions.

**Key words** Hybrid progeny (*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂); Temperature stress; Antioxidation; Digestive enzymes

① Corresponding author: CHEN Chao, E-mail: ysfrichenchao@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171205001

http://www.yykxjz.cn/

成美玲, 田永胜, 吴玉萍, 李振通, 张晶晶, 王林娜, 李文升, 马文辉, 王晓梅, 翟介明, 李波. 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代染色体核型分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 67-75

Cheng ML, Tian YS, Wu YP, Li ZT, Zhang JJ, Wang LN, Li WS, Ma WH, Wang XM, Zhai JM, Li B. Chromosome karyotype analysis of hybrids of *Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 67-75

## 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代 染色体核型分析\*



成美玲<sup>1,3</sup> 田永胜<sup>1,2①</sup> 吴玉萍<sup>1,3</sup> 李振通<sup>1,4</sup> 张晶晶<sup>1,4</sup> 王林娜<sup>1,2</sup>  
李文升<sup>5</sup> 马文辉<sup>5</sup> 王晓梅<sup>5</sup> 翟介明<sup>5</sup> 李波<sup>5</sup>

- (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. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
5. 莱州明波水产有限公司 烟台 261400)

**摘要** 本研究对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)杂交后代利用植物血球凝集素(PHA)及秋水仙素通过活体注射法制作染色体标本。选用头肾和鳃组织制作细胞悬浊液,并对冷滴片和热滴片法进行比较,结合空气干燥法制作染色体分裂相玻片,经吉姆萨染色后,在显微镜下观察筛选清晰完整的分裂相。杂交子代(俗称云龙斑)选取 75 个分裂相,统计染色体数目并进行核型分析。结果显示,云龙斑二倍体染色体数为 48,其中,19 对染色体为端着丝粒染色体,2 对为亚中部着丝粒染色体,3 对为亚端着丝粒染色体,其染色体臂数(NF)为 58,核型公式为  $2n=48, 4sm+6st+38t$ 。杂交后代云龙斑与父母本染色体数目相同,都为  $2n=48$ ,但云龙斑染色体与其父母本组型不同,在遗传过程中发生了复杂的染色体重新配对和变异。本研究为杂交后代“云龙斑”的种质鉴定、亲缘关系分析、杂交育种等提供了重要的科学根据。

**关键词** 云纹石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 云龙斑; 染色体 PHA 注射法; 核型分析

**中图分类号** S603.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0067-09

一位著名的遗传学家曾说过:“地球的历史记载于地壳中,而生物的历史却记载在染色体上”(吴政安, 1985)。随着细胞遗传学和分子生物学取得重大成就,生物学家认识到染色体结构、形态与功能存在着密切的联系,染色体是研究物种演化、分类必不可少的重

要手段。利用染色体组型分析比较,对于探讨种群进化路线和亲缘关系,以及原位杂交、基因定位、杂交育种、多倍体育种等研究都具有重要作用。

石斑鱼已成为重要的海水养殖对象,国内外研究者对其人工繁育(何永亮等, 2008)、养殖和疾病防控

\* 山东省农业良种工程(2016LZGC009)、烟台市科技发展计划(2016JH021)、烟台市“双百计划”人才项目和黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017013)共同资助 [The work was supported by Shandong Province Agricultural Variety Engineering (2016LZGC009), Yantai Science and Technology Development Plan(2016JH021), the Double-Hundred Talent Project of Yantai City, Shandong Province, and Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes (20603022017013)]. 成美玲, E-mail: 362651954@qq.com

① 通讯作者: 田永胜, 研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-05, 收修改稿日期: 2018-01-01

(罗鸣等, 2013)、生长相关基因挖掘(林浩然, 2003)、线粒体基因分析(黄小林等, 2013)等做了大量研究。“云龙斑”(英文名为 Yunlong grouper)是云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)杂交后代。鞍带石斑鱼主要分布在热带海域, 云纹石斑鱼主要分布在温带海域, 2种鱼在分布生态环境、繁殖时间和温度等方面具有较大差异, 存在着明显的生殖隔离, 在自然环境中无法杂交产生后代。田永胜等(2017a)通过建立鞍带石斑鱼的精子冷冻库突破了不同品种、不同地理环境、不同繁殖时间和温度造成的生殖隔离, 实现了鞍带石斑鱼冷冻精子和云纹石斑鱼的杂交育种, 在我国首次培育出了具有生长快、成活率高、适温范围广的杂交种“云龙斑”。

云龙斑作为新杂交种, 养殖历史较短, 近年来主要对其胚胎和变态发育(吴水清等, 2016)、低温胁迫对血清生化指标的影响(邵彦翔等, 2017)、数量遗传性状(田永胜等, 2017b)等进行了研究, 但尚未见关于其染色体核型的研究报道。本研究选择了云龙斑的不同组织, 利用不同梯度的低渗时间、不同的低渗液和冷热2种制片方法, 探索了制备石斑鱼染色体的最适方法, 对云龙斑染色体核型与其父母本及同属间鱼类进行对比分析, 以期鱼类杂交新品种选育和种质鉴定技术提供重要的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用鱼在山东省莱州明波水产有限公司培育, 2017年3~6月利用鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交授精, 培育了30个云龙斑半同胞和全同胞家系。鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼均为雌雄同体, 在发育过程中, 具有“先雌后雄”性逆转的现象, 其杂交后代云龙斑生长到2月龄时, 未能观察到性腺发育, 云龙斑雌雄性腺是否发育还有待进一步观察。随机选取体长为15~20 cm、体重为60~100 g、体态正常、无畸形鱼苗进行实验, 云龙斑的形态见图1。



图1 云龙斑(云纹石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂)

Fig.1 Yonglong grouper (*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)

### 1.2 实验试剂

1 mg/ml的植物血球凝集素(PHA)溶液(溶剂为海水鱼用生理盐水), 海水鱼用生理盐水(氯化钠 8.0 g/L、氯化钾 0.45 g/L、氯化钙 0.2 g/L、碳酸氢钠 0.02 g/L, 用蒸馏水配成 1 L), 1%秋水仙素溶液(秋水仙素 0.1 g, 灭活生理盐水 100 ml 溶解, 避光保存), 8%的柠檬酸溶液, 0.075 mol/L 氯化钾, 固定液(甲醇:冰醋酸=9:1), 卡诺固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)。吉姆萨使用液(原液 1 份, pH=7.4 磷酸缓冲液 9 份稀释), 使用液不宜长期保存, 均为现用现配。

### 1.3 快速制备染色体的方法

**1.3.1 PHA 和秋水仙素处理** 采用李雅娟等(2012)的方法并稍作修改。在幼鱼腹腔注射植物血球凝集素(PHA), 剂量为 6 μg/g(占鱼体重), 实验室暂养; 注射后 18 h, 第 2 次注射 PHA 溶液, 剂量同上。3.5 h 后活体腹腔注射 0.1%秋水仙素溶液, 剂量为 6 μg/g(占鱼体重), 效应时间 3 h, 实验室水族箱暂养。

**1.3.2 取材** 将以上处理的幼鱼利用 MS-222 (180 mg/L)麻醉, 臀鳍后方 3 cm 处斜向上剪一刀放血 5 min; 由泄殖孔处将腹腔剪开, 剪掉两侧多余肌肉, 拨开内脏, 取出头肾, 将头肾放入海水生理盐水中冲洗。剪开鳃盖, 取出鳃丝, 将鳃丝放入海水生理盐水中冲洗。

**1.3.3 低渗** 从海水生理盐水中取头肾和鳃片, 分别放入盛有 2 ml 8%的柠檬酸溶液和 2 ml 0.075 mol/L 的 KCl 的烧杯中进行低渗处理, 并将头肾和鳃片分成 5 份, 分别在室温下低渗 30、35、40、45、50 min, 期间每隔 5 min 利用吸管轻轻吹打 1 次。分别进行冷滴片和热滴片, 观察统计有丝分裂指数; 统计有丝分裂指数=细胞分裂中期相数/细胞总数×100%, 筛选低渗液、处理时间和滴片方法。

**1.3.4 固定** 将低渗液用吸管吸出, 放入固定液(甲醇:冰醋酸=9:1), 固定 7~10 min, 弃去固定液, 加入 100%冰醋酸处理 1~2 min, 弃去 100%冰醋酸; 加入卡诺固定液(甲醇:冰醋酸=3:1), 固定 15 min, 重复 2~3 次, 最后加入新的卡诺固定液, 放入-20℃冰箱冷冻过夜。

**1.3.5 滴片** 分别采用冷滴片法和热滴片法, 将实验材料从冷冻中取出后, 放入小烧杯中, 加入 1~2 滴 50%冰醋酸, 将小烧杯放置在冰上, 将组织块剪碎、研磨成细胞悬液, 加入新的固定液过滤。冷滴片前, 提前 30 min 将载玻片放入盛有乙醇的烧杯中, 放入冰箱。热滴片前, 将载玻片放在干净的大理石板上, 大理石板提前 30 min 在烤炉上烤热。将细胞悬浮液利用



移液枪滴于载玻片上, 高度不低于 30 cm, 在酒精灯上过火看到玻片上燃起蓝色火焰, 然后空气自然干燥。

**1.3.6 吉姆萨染色** 使用吉姆萨染色液, 染色 30 min, 之后用蒸馏水轻轻冲洗, 室温下晾干待观察。

#### 1.4 观察和统计

用 Nikon80i 显微镜进行观察, 先用低倍镜查找分裂相, 之后用油镜观察并拍照。

染色体计数及核型分析: 吉姆萨染色之后, 在显微镜下选取 75 个分散良好、图像清晰的中期分裂相, 统计染色体数目(图 1)。

#### 1.5 核型分析

选取 5 个数目完整、形态清晰、分散效果良好、没有重叠、着丝点清楚、长度适中(正中期)、2 条染色单体适度分开的染色体分裂相。利用 Photoshop 软件处理图片并测量相对长度, 再根据其形态特征和大小, 初步目测配对; 分别测量染色体总长度、长臂和短臂长, 对相同的染色体间配对(着丝点类型相同、相对长度相近), 再将配对好的染色体分类、排列其组型, 采用 Excel 2003 对云纹石斑染色体核型的各参数进行统计整理, 利用函数功能的编辑公式计算出 5 组染色体的相对长度和臂指数:

染色体相对长度=(每条染色体长度/染色体组总长)×100

臂指数=长臂长度/短臂长度

通常着丝点在每条染色体上只有 1 个, 且位置恒定, 常作为描述染色体的标记。根据着丝点的位置, 以 Levan 等(1964)提出的标准划分染色体类型(表 1)。

表 1 Levan 染色体划分标准

Tab.1 Chromosome division criteria proposed by Levan

简称 Abbreviation	着丝点位置 Filament position	臂指数 Arm index	臂数(NF) Arm number
M	正中着丝粒染色体	1 : 1	2
m	中部着丝粒染色体	1.01 : 1.70	2
sm	亚中部着丝粒染色体	1.71 : 3.00	2
st	亚端部着丝粒染色体	3.01 : 7.00	2
t	端部着丝粒染色体	7.01-∞	1

## 2 结果与分析

### 2.1 染色体材料和方法的选择

在染色体制片过程中, 采用鳃丝、头肾 2 种组织进行染色体制作处理, 并对不同低渗时间及不同低渗

液进行筛选, 同时利用冷滴片、热滴片 2 种方法制片。结果显示, 采用石斑鱼鳃丝时, 片中多为破碎的细胞杂质, 分裂相较少。采用石斑鱼头肾时, 可形成较多的染色体分裂相, 分裂相数目完整、清晰; 因此, 取头肾作为实验材料较为理想。分别采用柠檬酸和氯化钾溶液, 低渗 30、35、40、45、50 min, 每组随机选取 10 个分裂相观察。结果显示, 采用柠檬酸低渗 40 min 时, 可形成较多分裂相, 分裂相分散效果好, 形态清晰。采用不同的滴片方式, 随机选取 20 个视野, 统计有丝分裂指数, 冷滴片法为 21.74%, 热滴片法为 8.66%, 冷滴片法更佳。

### 2.2 染色体数目

选取不同个体分散良好、形态清晰、数目完整的 75 个云纹石斑细胞的染色体中期分裂相, 经观察统计, 染色体数目从 45~56 不等, 但 48 条正常二倍体染色体出现的频率最高, 其所占比例为 81.33%(表 2), 占绝对优势, 表明云纹斑二倍体染色体众数是 48, 即  $2n=48$ 。

表 2 云纹石斑鱼的染色体数目统计  
Tab.2 Counts of the chromosomes in cells of Yunlong grouper

染色体数目 Number of chromosome	45	46	47	48	49	50	51	56
分裂相数 Number of metaphasis	1	2	5	61	2	1	2	1
出现频率 Frequency of occurrence(%)	1.33	2.67	6.67	81.33	2.67	1.33	2.67	1.33

### 2.3 染色体组组成

分别对 5 个中期分裂相(图 2)进行镜检和测量, 没有发现随体、次缢痕或者异形染色体存在, 也未发现多倍体的存在, 统计染色体的相对长度、臂比以及染色体类型(表 3)。根据染色体的相对长度、着丝点位置和特征, 48 条染色体中有 2 对亚中部着丝点染色体(sm), 3 对亚端部着丝点染色体(st), 19 对端部着丝点染色体(t), 核型公式为  $2n=48, 4sm+6st+38t, NF=56$ , 其核型各项参数见表 3, 染色体组型见图 3。

### 2.4 石斑鱼属染色体核型比较

通过对石斑鱼属中 27 种石斑鱼染色体核型分析比较, 发现在 27 种石斑鱼中有 13 种染色体核型为  $2n=48t$ , 其染色体仅有 24 对端部着丝点染色体, 另外



14 种石斑鱼染色体核型发生了变异, 出现亚端部着丝粒、亚中部着丝粒和中部着丝粒染色体, 且端部、亚端部着丝粒染色体较多, 中部、亚中部着丝粒染色体较少(表 4)。



图 2 云龙斑头肾细胞染色体中期分裂相  
Fig.2 The chromosomal metaphase of head kidney cell of Yunlong grouper

表 3 云龙斑的染色体相对长度和臂比  
Tab.3 The relative length and ratio of chromosomes of Yunlong grouper

染色体编号 Chromosome No.	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Type
1	4.61±0.10	1.87±0.19	Sm
2	4.39±0.31	2.30±0.20	Sm
3	4.84±0.35	3.12±0.27	St
4	5.07±0.03	3.83±0.31	St
5	4.83±0.04	4.84±0.40	St
6	4.72±0.06	∞	T
7	4.61±0.02	∞	T
8	4.56±0.03	∞	T
9	4.47±0.02	∞	T
10	4.40±0.02	∞	T
11	4.35±0.03	∞	T
12	4.32±0.03	∞	T
13	4.26±0.03	∞	T
14	4.16±0.05	∞	T
15	4.12±0.05	∞	T
16	4.07±0.05	∞	T
17	3.96±0.04	∞	T
18	3.87±0.04	∞	T
19	3.77±0.04	∞	T
20	3.69±0.03	∞	T
21	3.56±0.06	∞	T
22	3.30±0.10	∞	T
23	3.13±0.14	∞	T
24	2.93±0.15	∞	T



图 3 云龙斑染色体组型  
Fig.3 The karyotype of Yunlong grouper

### 3 讨论

#### 3.1 染色体材料和方法的筛选

根据实际研究的条件和目的, 选择合适的鱼类组织和处理方法是实验成功的基本前提。在制备染色体时, 选用生命活动旺盛和分裂增生快的器官组织易于获得更多的分裂相。目前为止, 鱼类染色体制备主要采用的组织有胚胎、鳍条、鳃丝、头肾、脾脏、血液等(毛连菊等, 2002; 王云新等, 2004)。本研究在选取鱼类材料时, 考虑到鱼类的鳃丝和头肾作为主要的代谢器官, 在整个鱼类的生长过程中, 细胞分裂都十分旺盛, 因此, 选取了鳃丝、头肾 2 个组织。

掌握好低渗的处理时间也是一个重要的因素, 低渗液是指渗透压和离子强度均低于正常细胞生理条件的溶液, 例如水、低浓度的柠檬酸钠或 NaCl、甘油磷酸钾(0.65 mol/L)、KCl(0.075 mol/L)等。低渗的效果取决于低渗液的化学组成、低渗的温度和处理时间。低渗处理凭借反渗透作用使细胞膨胀、染色体铺展, 同时可使粘附于染色体的核仁物质散开, 以便能在一个平面上观察所有染色体形态。本研究采用柠檬酸溶液, 低渗时间为 40 min 时, 染色体分散良好、形态清晰、数目最完整。另外, 在低渗过程中要每隔 5 min 用吸管轻轻吹打几下, 这样使组织低渗液混合均匀, 低渗更充分; 另一方面主要使细胞充分分离, 形成细胞悬浊液, 滴片时形成更多的染色体分裂相。

滴片是染色体制备的最后一步, 首先, 载玻片要干净, 提前将其放入 70% 的乙醇溶液中浸泡; 其次, 细胞悬浊液的量、滴加距离都会影响染色体分散的效果, 尤其是制片方式是染色体制备的关键点。取云龙斑头肾的柠檬酸溶液低渗细胞悬浊液, 发现选用冷滴片较热滴片易获得更好的染色体分裂相, 这与王世锋

表 4 27 种石斑鱼的核型特征比较  
Tab.4 Comparison of karyotypes of the related 27 species of groupers

类群 Groups	种名 Species name	核型 Karyotype	染色体臂数 Number of chromosome arms	参考文献 References	
原始类群 Primitive groups	亚历山大石斑鱼 <i>E.alexandrines</i>	2n=48t	48	Alvarez <i>et al</i> , 1983; Martínez-Rodríguez <i>et al</i> , 1989	
	细斑石斑鱼 <i>E.guttatus</i>	2n=48t	48	Ruiz-Carus <i>et al</i> , 2002	
	青石斑鱼 <i>E.owoara</i>	2n=48t	48	洪满贤等, 1988; 王世锋, 2007	
	黄腹石斑鱼 <i>E. guaza</i>	2n=48t	48	Martínez-Rodríguez <i>et al</i> , 1989; Aguilar <i>et al</i> , 1997	
	黑边石斑鱼 <i>E.fasciatus</i>	2n=48t	48	李锡强等, 1994; 郑莲等, 2005	
	犬牙石斑鱼 <i>E. caninus</i>	2n=48t	48	Rodríguez-Daga <i>et al</i> , 1993	
	东大西洋石斑鱼 <i>E. marginatus</i>	2n=48t	48	Sola <i>et al</i> , 2000	
	岩石斑鱼 <i>E. adscensionis</i>	2n=48t	48	Molina <i>et al</i> , 2002	
	拟青石斑鱼 <i>E.fasciatomaculosus</i>	2n=48t 2n=1st+47t	48	郑莲等, 2005; 王世锋, 2007	
	点带石斑鱼 <i>E.malabaricus</i>	2n=48t	48	邹记兴等, 2005; 郑莲等, 2005	
	巨石斑鱼 <i>E. tauvina</i>	2n=48t	48	王小丽等, 2008	
	七带石斑鱼 <i>E.septemfasciatus</i>	2n=48t	48	钟声平等, 2010	
	布氏石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	2n=48t	48	蔡岩等, 2012	
	特化类群 Specialized groups	双棘石斑鱼 <i>E. diacanthus</i>	2n=2sm+46t	50	Natarajan <i>et al</i> , 1974
		六带石斑鱼 <i>E.sex fasciatus</i>	2n=2sm+46t	50	吉华松, 2011
鲑点石斑鱼 <i>E. fario</i>		2n=4m+6sm+4st+30t	62	郑莲等, 2005	
鞍带石斑鱼 <i>E.lanceolatus</i>		2n=4st+44t	50	王德祥等, 2003;	
		2n=2sm+6st+40t	50	舒琥等, 2012	
斜带石斑鱼 <i>E.coioides</i>		2n=2sm+46t	50	王云新等, 2004; 丁少雄等, 2004; 王世锋, 2007; 舒琥等, 2012	
赤点石斑鱼 <i>E.akaara</i>		2n=10st+38t	58	王云新等, 2004;	
		2n=2sm+8st+38t	50	王世锋, 2007	
镶点石斑鱼 <i>E. amblycephalus</i>		2n=2m+46t	50	王世锋, 2007	
蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>		2n=4m+6sm+4st+34t	62	郑莲等, 2005	
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>		2n=2st+46t	50	郭丰等, 2006;	
		2n=4sm+44t	52	郭明兰, 2008	
褐点石斑鱼 <i>E.fuscoguttatus</i>	2n=2sm+46t	50	廖经球等, 2006; 刘莉等, 2016;		
	20=48t	48	舒琥等, 2012		
褐石斑鱼 <i>E.bruneus</i>	2n=2m+4sm+42t	54	王世锋, 2007; 郭明兰, 2008		
野生三斑石斑鱼 <i>E. trimaculatus</i>	2n=2sm+2st+44t	50	蔡岩等, 2011; 舒琥等, 2012		
珍珠龙胆	2n=4st+44t	52	刘莉等, 2016		
<i>E. lanceolatus</i> ♂× <i>E. fuscoguttatus</i> ♀					
云龙斑 <i>E. moara</i> ♀× <i>E. lanceolatus</i> ♂	2n=4sm+6st+38t	52	本研究 This study		

(2007)研究 6 种石斑鱼核型的滴片方法相同。究其原因, 冷滴片时玻片能更好地使染色体附着, 不易在冲洗的时候发生染色体丢失, 而且滴片后有一个过火的过程, 冷热交替, 细胞容易破碎, 使染色体分裂相更多且分散良好。

### 3.2 石斑鱼染色体核型研究概况

目前, 国内外已经报道了 27 种石斑鱼核型(表 4), 染色体数目均为 2n=48, 推测 2n=48 可能是石斑鱼属最基本的核型特征, 是这一分类种群的原始核型类群, 可见石斑鱼进化过程中, 染色体数目具有较高的

保守性。但是,其中有13种石斑鱼染色体核型为 $2n=48t$ ,属于石斑鱼的原始类群;另外14种石斑鱼出现了亚端部(st)、亚中部(sm)染色体核型,2种杂交石斑鱼珍珠龙胆和云龙斑也出现了染色体特化的现象。鱼类染色体核型有随着鱼类进化而特化的趋势,具有非端部着丝粒染色体的鱼类属于比较特化的种类,而端部着丝粒染色体为原始类型。原始的端部着丝粒染色体经过染色体易位、倒位等染色体结构变异进化,使得端部着丝点染色体形成双臂染色体,然后经过多次染色体重组,形成多对双臂染色体(赵金良,2000)。按照这种推论,属于同属的石斑鱼特化类群的形成,是不是经过了近缘种间的杂交形成了新的种群,这一点有待于从石斑鱼种群的遗传演化中深入研究。在我国已研究过的鱼类染色体中,能鉴别出性染色体的鱼类染色体核型并不多,说明大部分鱼类没有进化到具有性染色体机制的程度,即使有些鱼类可能具有性别分化机制,也还没有分化出形态异形的性染色体(楼允东,1997)。许多研究表明,次缢痕是核仁组织区所在区域,但在本研究中没有发现次缢痕和随体的存在,杨坤等(2013)在对麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)的研究中也没有发现染色体上存在次缢痕和随体,推测其染色体上可能已经存在次缢痕的结构,但无法从细胞学基础进行辨别。

### 3.3 云龙斑染色体与其父母本的对比分析

郭丰等(2006)对云纹石斑鱼染色体核型研究,染色体核型为 $2n=48, 2st+46t, NF=50$ ;而郭明兰等(2008)的研究结果为 $2n=48, 4sm+44t, NF=52$ 。王德祥等(2003)对鞍带石斑鱼染色体核型的研究表明, $2n=48, 4st+44t, NF=50$ ;而舒琥等(2012)对鞍带石斑鱼染色体核型的研究结果为 $2n=2sm+6st+40t, NF=50$ 。可能是由于不同种群所表现出的染色体多态性,也可能不同研究者的实验方法不同,配组和测量误差造成的差异,出现同一种鱼类染色体核型不同的结果。鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼杂交后代云龙斑的染色体核型为 $2n=48, 4sm+6st+38t, NF=56$ ,染色体数目与2个亲本相同,但在杂交后代中出现了2对亚中部着丝点染色体(sm),这一点与郭明兰等(2008)研究的云纹石斑鱼染色体核型中亚中部着丝粒染色体数相同。与舒琥等(2012)研究的鞍带石斑鱼染色体核型相似,都有亚中部着丝粒染色体(sm)和亚端部着丝粒染色体(st),其中,亚端部着丝粒染色体(st)数目一致,亚中部着丝粒染色体(sm)比父本鞍带石斑鱼多2对。所以,从核型特征上看,云龙斑染色体核型同时具有母本的亚中部着丝粒染色体和父本的亚端部着丝粒染色体,以及共

有的多数端部着丝粒染色体,体现了杂交后代云龙斑兼具2个亲本的遗传物质。在表型性状上,云龙石斑鱼表型性状如体色、花纹与母本云纹石斑鱼相似度高,而生长速度和体型与父本相似,14个表型数量性状中与母本云纹石斑鱼的相似率达到27.27%,与父本鞍带石斑鱼的相似率达到54.54%(田永胜等,2017b),从染色体核型的分布和表型数量性状上判断,杂交后代云龙斑在遗传上近似于鞍带石斑鱼。但对云龙斑线粒体基因结构的测序及种群遗传距离分析显示,其线粒体遗传特征趋向了母体遗传(Gao *et al.*, 2017),因此,关于杂交后代云龙斑与2个亲本之间的亲缘关系及遗传距离还需要通过其他生物学手段深入研究。

### 3.4 杂交后代染色体核型与杂种优势

理论上杂交后代云龙斑的染色体遗传了父本和母本各1套染色体,从核型公式来看,杂交后代云龙斑染色体数量和父母本保持一致,为杂交二倍体,不是单倍体、雌核发育或雄核发育等,但核型组成并不完全按照染色体重组,杂交后代染色体不能全部在亲本中找到原型,其间发生复杂的染色体变异,可能同时存在罗伯逊易位和臂间倒位现象。刘莉等(2016)发现,珍珠龙胆(棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* ♂)与父本鞍带石斑鱼的染色体数目、核型基本一致,而与母本棕点石斑鱼的核型存在很大差异。杂交后代在进行染色体重组时,可能会使染色体的形态和大小发生变化,其中涉及大量基因的相互作用。王祖雄等(1986)发现,决定鱼类杂交不亲和的主要因素是亲本间核型的差异和核质的不同。杂交后代云龙斑具有生长速度快,适温范围广和肉质鲜美等特点,表现出优于杂交双亲的优势,通过染色体核型分析可为探讨杂交优势的形成以及种质的鉴别提供一定的遗传基础。

## 参 考 文 献

- Aguilar CT, Galetti PM. Chromosomal studies in South Atlantic serranids (Pisces, Perciformes). *Cytobios*, 1997, 89(357): 105-114
- Alvarez MC, Thode G, Cano J. Somatic karyotypes of two Mediterranean teleost species: *Phycis phycis* (Gadidae) and *Epinephelus alexandrines* (Serranidae). *Cytobios*, 1983, 38(150): 91-95
- Cai Y, Zhou YC, Xie RM, *et al.* A study on the karyotype, Ag-NORs and C-banding in *Epinephelus bleekeri*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 647-651 [蔡岩, 周永灿, 谢瑞敏, 等. 布氏石斑鱼的染色体核型、银染和 C-带. 水产学报, 2012, 36(5): 647-651]

- Cai Y, Zhou YC, Zhang B, *et al.* Chromosome karyotype analysis of *E. trimaculatus* Trimaculatus. *Journal of Tropical Organisms*, 2011, 2(2): 97–100 [蔡岩, 周永灿, 张本, 等. 海南野生三斑石斑鱼染色体核型分析. *热带生物学报*, 2011, 2(2): 97–100]
- Ding SX, Wang SF, Wang DX, *et al.* Analysis of the karyotypes of *Epinephelus coioides*. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 43(3): 426–428 [丁少雄, 王世锋, 王德祥, 等. 斜带石斑鱼染色体核型分析. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(3): 426–428]
- Gao FT, Wei M, Zhu Y, *et al.* Characterization of the complete mitochondrial genome of the hybrid *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂, and phylogenetic analysis in subfamily epinephelinae. *Oceanic and Coastal Sea Research*, 2017, 16(3): 555–563
- Guo ML. Comparative Studies of *Epinephelus moara* and *Epinephelus bruneus*. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2008 [郭明兰. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼的比较研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2008]
- Guo F, Wang J, Su YQ, *et al.* Study on the karyotype of *Epinephelus moara*. *Marine Science*, 2006, 30(8): 1–3 [郭丰, 王军, 苏永全, 等. 云纹石斑鱼染色体核型研究. *海洋科学*, 2006, 30(8): 1–3]
- He YL, Ou YJ, Li JE, *et al.* Advance in research on artificial breeding technique of groupers. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(3): 75–79 [何永亮, 区又君, 李加儿, 等. 石斑鱼人工繁育技术研究进展. *南方水产*, 2008, 4(3): 75–79]
- Hong MX, Yang JH. Studies on the karyotype of *Epinephelus awoara*. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1988, 27(6): 714–715 [洪满贤, 杨俊慧. 青石斑鱼染色体组型的研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1988, 27(6): 714–715]
- Huang XL, Lu GM, Liu FYZ, *et al.* Mitochondrial genome characteristics and phylogenetic information of genus *Epinephelus* (Perciformes: Serranidae) fishes. *Journal of Biology*, 2013, 30(3): 9–13 [黄小林, 吕国敏, 刘付永忠, 等. 石斑鱼属鱼类线粒体基因组序列特征及系统发育信息评估. *生物学杂志*, 2013, 30(3): 9–13]
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201–220
- Li XQ, Peng YD. Studies on karyotype of *Epinephelus Fasciatus* and *Epinephelus Fasciatus*. *Journal of Zhanjiang Fisheries College*, 1994, 14(2): 22–26 [李锡强, 彭跃东. 斑带石斑鱼和黑边石斑鱼核型的研究. *湛江水产学院学报*, 1994, 14(2): 22–26]
- Li YJ, Qian C, Yin J, *et al.* The chromosome sets stability of hybrid progeny in different ploidy loach. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(4): 326–332 [李雅娟, 钱聪, 印杰, 等. 不同倍性泥鳅杂交后代染色体数目组成的研究. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(4): 326–332]
- Liao JQ, Yin SW, Chen GH, *et al.* Study on the karyotype of *Epinephelus bruneus*. *Fisheries Science*, 2006, 25(11): 567–569 [廖经球, 尹绍武, 陈国华, 等. 褐点石斑鱼的核型研究. *水产科学*, 2006, 25(11): 567–569]
- Lin HR. Progress in research on genes related to reproductive and growth regulation of grouper. *China Association for Science and Technology 2003 Annual Conference Proceedings*, 2003, 895–896 [林浩然. 石斑鱼生殖和生长调控相关功能基因的研究进展. *中国科协 2003 年学术年会论文集(下)*. 2003, 895–896]
- Liu L, Zhang Y, Chen C, *et al.* Preparation of chromosomes and analysis of karyotypes of hybrid  $F_1$ (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂) groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 33–40 [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)  $F_1$  染色体制备方法及核型分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 33–40]
- Lou XD. Progress of fish karyotype studies in China. *Journal of Fisheries of China*, 1997(S1): 82–96 [楼允东. 中国鱼类染色体组型研究的进展. *水产学报*, 1997(S1): 82–96]
- Luo M, Chen FX, Liu LL, *et al.* Progress in disease research of grouper aquaculture in China. *Fisheries Science*, 2013, 32(9): 549–554 [罗鸣, 陈傅晓, 刘龙龙, 等. 我国石斑鱼养殖疾病的研究进展. *水产科学*, 2013, 32(9): 549–554]
- Ji HS, Zhou YC, Cai Y, *et al.* The karyotype and Ag-NORs of grouper *Epinephelus sexfasciatus*. *Fisheries Science*, 2011, 30(8): 463–466 [吉华松, 周永灿, 蔡岩, 等. 六带石斑鱼染色体核型和银染研究. *水产科学*, 2011, 30(8): 463–466]
- Mao LJ, Li YJ. Karyotype Analyses of five species of marine fishes. *Journal of Dalian Ocean University*, 2002, 17(2): 108–113 [毛连菊, 李雅娟. 5 种海水鱼类染色体的组型分析. *大连水产学院学报*, 2002, 17(2): 108–113]
- Martínez-Rodríguez G, Thode G, Álvarez MDC, *et al.* C-banding and Ag-NOR reveal heterogeneity among karyotypes of Serranids (Perciformes). *Cytobios*, 1989, 58(232): 53–60
- Molina WF, Maia-Lima FA, Affonso PRAM. Divergence between karyotypical pattern and speciation events in Serranidae fish (Perciformes). *Caryologia*, 2002, 55(4): 299–305
- Natarajan R, Subrahmanyam K. A karyotype study of some teleost from Portonovo waters. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Mathematical Science*, 1974, 79(5): 173–196
- Rodríguez-Daga R, Amores A, Thode G. Karyotype and nucleolus organizer regions in *Epinephelus caninus* (Pisces, Serranidae). *Caryologia*, 1993, 46(1): 71–76
- Ruiz-Carus R. Chromosome analysis of the sexual phases of the protogynous hermaphrodites *Epinephelus guttatus* and *Thalassoma bifasciatum* (Serranidae and Labridae; Teleostei). *Caribbean Journal of Science*, 2002, 38(1–2): 44–51
- Shao YX, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of low temperature stress on serum biochemical indices of the juvenile hybrid of *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 70–76 [邵彦翔, 陈超, 李

- 炎璐, 等. 低温胁迫对云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代血清生化指标的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 70–76]
- Shu H, Wei QL, Luo LJ, *et al.* Karyotypes analysis of four grouper fishes from coastal waters of Guangdong. Guangdong Agricultural Science, 2012, 39(8): 124–127 [舒琥, 魏秋兰, 罗丽娟, 等. 广东沿海 4 种石斑鱼的染色体组型分析. 广东农业科学, 2012, 39(8): 124–127]
- Sola L, De Innocentiis S, Gornung E, *et al.* Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence. Marine Biology, 2000, 137(1): 47–51
- Tian YS, Chen ZF, Duan HM, *et al.* The family line establishment of the hybrid *Epinephelus moara*(♀)×*E. lanceolatus*(♂) by using cryopreserved sperm and the related genetic effect analysis. Journal of Fisheries of China, 2017a, 41(10): 1–12 [田永胜, 陈张帆, 段会敏, 等. 鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交家系建立及遗传效应分析. 水产学报, 2017a, 41(10): 1–12]
- Tian YS, Tang J, Duan HM, *et al.* Analysis of phenotypic quantitative traits of kelp grouper, giant grouper and hybrid progeny. Journal of Shanghai Ocean University, 2017b, 26(6): 1–10 [田永胜, 唐江, 段会敏, 等. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及杂交后代的表型数量性状分析. 上海海洋大学学报, 2017b, 26(6): 1–10]
- Wang DX, Su YQ, Wang SF, *et al.* Study on the karyotype of *Promicrops lanceolatus*. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2003, 22(4): 465–468 [王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 宽额鲈染色体核型研究及制作方法的比较. 台湾海峡, 2003, 22(4): 465–468]
- Wang SF. Comparative karyotype characterization and chromosomal evolution of six groupers. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2007 [王世锋. 六种石斑鱼核型特征比较和染色体进化研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2007]
- Wang YX, Wang HD, Zhang HF, *et al.* Karyotypes of *Epinephelus coioides* and *Epinephelus akaara*. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2004, 24(3): 4–8 [王云新, 王宏东, 张海发, 等. 斜带石斑鱼与赤点石斑鱼的核型研究. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 4–8]
- Wang XL, Zheng YS, Dai Y, *et al.* Studies on the karyotype of *Epinephelus tauvina*. Reservoir Fisheries, 2008, 28(3): 62–63 [王小丽, 郑元升, 戴云, 等. 巨石斑鱼染色体核型分析. 水利渔业, 2008, 28(3): 62–63]
- Wang ZX, Zhang JX, Jin GQ. Study on the incompatibility of fish hybridization. Acta Hydrobiologica Sinica, 1986, 10(2): 171–179 [王祖熊, 张锦霞, 靳光琴. 鱼类杂交不亲和性的研究. 水生生物学报, 1986, 10(2): 171–179]
- Wu SQ, Zheng LY, Huang ZC, *et al.* Embryonic and morphological development in larva, juvenile, and young stages of hybrid grouper (*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). Journal of Fisheries Research, 2016, 38(1): 27–35 [吴水清, 郑乐云, 黄种持, 等. 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察. 渔业研究, 2016, 38(1): 27–35]
- Wu ZA. The history of life written on chromosomes. Zoological Journal, 1985(4): 49–52 [吴政安. 写在染色体上的生活史. 动物学杂志, 1985(4): 49–52]
- Yang K, Zhu DM, Wang WM. Studies on fin tissues cultivation, Ag-NORs and C-banding patterns of *Pseudorasbora parva*. South China Fisheries Science, 2013, 9(3): 20–25 [杨坤, 祝东梅, 王卫民. 麦穗鱼鳍条组织培养及染色体 Ag-NORs 和 C-带研究. 南方水产科学, 2013, 9(3): 20–25]
- Zhao JL. A survey of karyotype study of marine and brackish water fish in China. Journal of Shanghai Fisheries University, 2000, 9(4): 344–347 [赵金良. 我国海水鱼和咸淡水鱼染色体组型研究概述. 上海水产大学学报, 2000, 9(4): 344–347]
- Zheng L, Liu CW, Li CL. Studies on the karyotype of 4 groupers. Marine Sciences, 2005, 29(4): 51–55 [郑莲, 刘楚吾, 李长玲. 4 种石斑鱼染色体核型研究. 海洋科学, 2005, 29(4): 51–55]
- Zhong SP, Chen C, Wang J, *et al.* Chromosome karyotype of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 150–155 [钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究. 中国水产科学, 2010, 17(1): 150–155]
- Zou JX, Yu QX, Zhou F. The karyotypes, C-bands patterns and Ag-NORs of *Epinephelus malabaricus*. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 33–37 [邹记兴, 余其兴, 周菲. 点带石斑鱼的核型、C 带、Ag-NORs. 水产学报, 2005, 29(1): 33–37]

(编辑 冯小花)

## Chromosome Karyotype Analysis of Hybrids of *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂

CHENG Meiling<sup>1,3</sup>, TIAN Yongsheng<sup>1,2①</sup>, WU Yuping<sup>1,3</sup>, LI Zhentong<sup>1,4</sup>, ZHANG Jingjing<sup>1,4</sup>,  
WANG Linna<sup>1,2</sup>, LI Wensheng<sup>5</sup>, MA Wenhui<sup>5</sup>, WANG Xiaomei<sup>5</sup>, ZHAI Jieming<sup>5</sup>, LI Bo<sup>5</sup>

(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. National Laboratory of Marine Science and Technology, Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 5. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261400)

**Abstract** In this research, the chromosomal preparation and karyotype of *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂ hybrid progeny (commonly known as Yunlong grouper) were studied. The juvenile fish weighing 60~100 g were injected subcutaneously with 6 μg/g phytohemagglutinin (PHA) and 0.1% colchicine. After 21 h, the head kidney and gill were dissected for cell suspensions, slices of their chromosome split phase were made by cold and hot drop method combing with air-drying. After being stained with 10% Giemsa, a clear and complete split phase was screened under a microscope. Chromosomes in 75 mitotic phases were selected and the karyotype analysis was performed. The results showed that the karyotype formula was determined to be  $2n=48, 4sm+6st+38t, NF=58$  in Yunlong grouper. Hybrids Yunlong grouper had the same chromosome number with their parents ( $2n=48$ ), but their karyotype was different, indicating the complex chromosomal recombination and mutation occurred in the genetic process. This study provided an important scientific basis for the germplasm identification genetic relationship analysis and crossbreeding of Yunlong grouper.

**Key words** *Epinephelus moara*; *Epinephelus lanceolatus*; Yunlong grouper; Chromosome PHA injection method; Karyotype analysis

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170110001

http://www.yykxjz.cn/

董浚键, 孙成飞, 田园园, 曾庆凯, 师红亚, 卢迈新, 叶星. 翘嘴鳊主要形态性状与体重的相关性及其雌雄形态性状差异分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 76-84

Dong JJ, Sun CF, Tian YY, Zeng QK, Shi HY, Ye X. Correlation analysis of the main morphological traits and body weight of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and morphological traits between males and females. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 76-84

## 翘嘴鳊主要形态性状与体重的相关性及其雌雄形态性状差异分析\*



董浚键<sup>1</sup> 孙成飞<sup>1</sup> 田园园<sup>1,2</sup> 曾庆凯<sup>1,2</sup> 师红亚<sup>1,2</sup> 卢迈新<sup>1,2</sup> 叶星<sup>1,2①</sup>

(1. 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510381;  
2. 上海海洋大学 上海 201306)

**摘要** 为了解翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)主要形态性状与体重的相关性,以及雌雄形态性状的差异,本研究测量了同塘养殖的 2837 尾翘嘴鳊的 7 个生长相关性状,包括全长、体高、头长、眼径、尾柄全长和尾柄高与体重。采用相关分析、通径分析和多元线性回归分析方法,分析各形态性状与体重的相关关系,并从中随机取雌雄个体各 150 尾建立多元回归方程,并另随机取 120 尾进行雌雄判别验证。结果显示,在各形态性状中,全长、体高与体重的相关系数最大。通过建立回归方程组并进行偏回归系数检验,发现头长和尾柄高与体重的相关性不显著,故剔除这 2 个性状后作进一步分析。通径分析显示,全长和体高对体重的直接作用最大,且大于间接作用;单性状及两两性状协同对体重的决定系数显示,全长及体高对体重的单独决定程度最高,且二者的协同作用也最大;4 个性状对体重的决定系数总和( $\sum d$ )达 0.896,说明这 4 个性状与体重有较大的相关性,拟合的多元回归方程具有较大的参考意义。建立雌雄鱼判别回归方程并分析验证显示,对于体重小于 200 g 的个体其雌雄性别判别的准确率较高。本研究可为翘嘴鳊生长性状选择评价指标的确定提供参考,将有助于提高选育种效率。

**关键词** 翘嘴鳊; 形态性状; 体重; 相关关系; 多元回归; 通径分析

**中图分类号** S965.199 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0076-09

体重作为重要的生长性状之一,常被作为鱼类选育的重要目标性状(Gae *et al*, 2002; 袁美云等, 2010)。水产动物形态性状与体重性状间存在着相关关系,对重要经济性状的相关及通径分析不仅可以了解各性状与体重的相关程度及形态性状间的关联度,而且可

以为制定实际育种方案提供基础数据。研究形态性状与体重性状间的相关程度主要采用相关分析、多元回归分析、灰色关联分析和通径分析等方法(谭才钢等, 2015; 王新安等, 2013)。采用多元线性回归分析与偏相关分析,由于存在自变量与因变量的偏回归系数数量

\* 广东省海洋渔业科技推广专项(A201601A06)、现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)、广东省科技计划项目(2015A020209034)和广州市科技计划项目(2014132000291)共同资助 [This work was supported by the Ocean Fisheries Science and Technology Promotion Project of Guangdong Province (A201601A06), China Agriculture Research System (CARS-46), the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2015A020209034), and the Science and Technology Planning Project of Guangzhou City (2014132000291)]. 董浚键, E-mail: shantoumaliugan@gmail.com; dongjj@prfri.ac.cn

① 通讯作者: 叶星, 研究员, E-mail: gzyexing@163.com

收稿日期: 2017-01-10, 收修改稿日期: 2017-03-10

纲不同而不利于数据的直接比较。通径分析可以在多元回归分析的基础上扩展,分析自变量间的相互关系及它们对因变量的协同作用关系,并可逐步剔除不显著的自变量,建立准确的多元线性回归方程。在水产动物,如鱼类(严福升等, 2010; 胡玉龙等, 2015; 张永泉等, 2014;)、爬行类(王诚远等, 2013; 马晓等, 2013)、甲壳类(柴展等, 2015; 李洋等, 2012)、贝类(白临建等, 2012; 张嘉丽等, 2014)和头足类(平洪领等, 2015)等都有形态性状与体重性状间相关关系的报道。

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*), 俗称桂花鱼, 是我国重要的优质养殖鱼类之一, 在我国多个省市进行养殖(吴斌等, 2015)。2015年, 我国翘嘴鲌的养殖产量达 29.8 万 t, 广东省约为 10 万 t(袁晓初等, 2016)。随着鲌养殖业的发展, 急需开展翘嘴鲌快长抗逆的优良品种选育研究。目前, 对翘嘴鲌形态特征与生长性状的相关研究尚不多见。张进等(2013a、b)对翘嘴鲌和杂交鲌形态性状进行了通径分析, 证实不同月龄翘嘴鲌和杂交鲌的全长和体高对体重影响最大; 窦亚琪等(2014)对不同月龄性状的主成分进行分析, 证明了体重、体长和体高是翘嘴鲌早期生长阶段最重要的性状指标, 且发现了翘嘴鲌早期生长阶段为等速生长。这些研究所抽取的群体样本数都在 40~70 尾之间, 可满足统计分布的最低样本要求(不少于 30 个), 但统计分析中样本量越大, 越能反应总体特征。当给定置信水平时, 样本量越大, 误差区间越小, 能有效提高判别效果, 能够得到更准确可靠的多元回归方程。本研究采用多元回归和偏回归系数检验, 结合通径分析对达到上市规格的 184 个家系共 2837 尾同塘养殖的翘嘴鲌的全长(TL)、体高(BH)、头长(HL)、眼径(ED)、尾柄全长(CPTL)和尾柄高(CPH)共 6 个性状与体重(BW)的关联度进行分析; 从中随机取雌雄翘嘴鲌各 150 尾

建立多元回归方程, 最后随机抽取 120 尾进行雌雄判别分析验证。本研究结果可为下一步翘嘴鲌的选育提供合理科学的选育评价指标, 以提高选育效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验中翘嘴鲌 3 个亲本群体分别为广东养殖群体(62 尾)、安徽秋浦河养殖群体(37 尾)和湖南洞庭湖野生群体(63 尾), 共计 162 尾。其中, 广东和安徽的 2 个养殖群体均由广东省清远市清新县宇顺农牧渔业科技服务有限公司养殖和保种, 湖南野生群体则于 2015 年采自湖南洞庭湖。以 3 个群体为亲本, 采用完全双分列杂交法配对繁殖, 获得 9 个群体(184 个家系), 共 2837 尾  $F_1$  代个体。幼鱼经电子芯片标记后放养于清远市宇顺农牧渔业科技服务有限公司鲌鱼养殖基地同一口池塘中, 养殖 140 d 后收获、测量。

### 1.2 样本形态性状测定

测量前先用 Tricaine (MS-222) 麻醉实验鱼, 麻醉剂浓度为  $7.5\sim 13.5\text{ g/m}^3$ , 水温为  $20^\circ\text{C}\sim 25^\circ\text{C}$ 。体重性状采用电子天平称量(精确至  $0.01\text{ g}$ ); 全长、体高等形态性状先通过数码相机拍照, 并采用本实验室设计的鱼类外部形态测量软件 V1.0(登记号: 2013SR144497), 对全长、体高、头长、眼径、尾柄全长和尾柄高 6 个形态性状进行测量, 通过与标尺的像素比较, 计算出各性状的实际数值(精确到  $0.001\text{ mm}$ ) (图 1); 性别通过解剖检查其生殖腺进行鉴定。

### 1.3 数据处理

使用 SPSS 18.0 软件对翘嘴鲌全长、体高、头长、

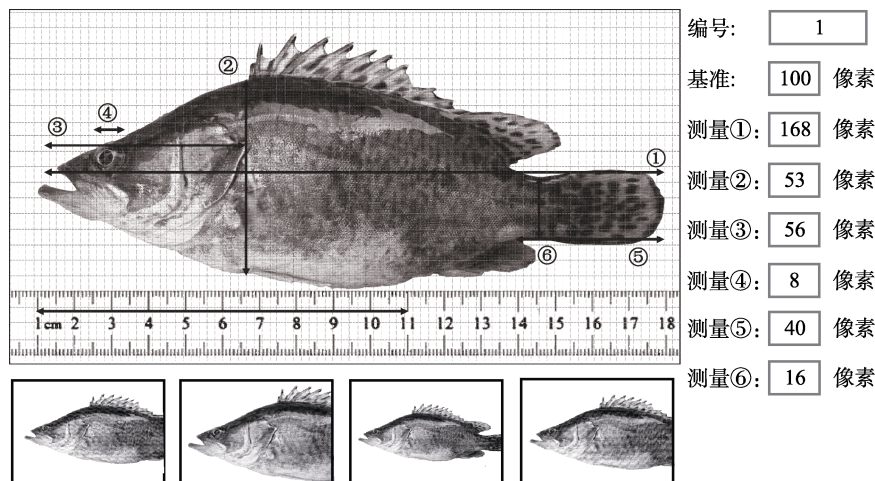


图 1 翘嘴鲌各形态性状的软件测量

Fig.1 The measurement of the morphological traits of *S. chuatsi* by software

眼径、尾柄全长、尾柄高和体重共 7 个性状测定结果进行统计分析(杜家菊等, 2010; 何风华等, 2005), 根据统计量计算平均数( $\bar{x}$ )、标准差( $S$ )和变异系数( $C_v$ ), 进而分析形态性状间的相关系数( $r_{xy}$ )、偏回归系数( $b_i$ )和通径系数(标准偏回归系数  $P_{x_iy}$ , 简称为  $P_i$ ), 并进行偏回归系数检验, 排除不显著相关的形态性状; 通过分析各形态性状对体重的直接作用(通径系数  $P_i$ )和间接作用( $\sum r_{x_i x_j} P_{x_j y}$ , 简称为  $\sum r_{ij} P_j$ ), 结合单个性状对体重的决定系数( $d_{x_i y}$ , 简称为  $d_i$ )、两个性状对体重的共同决定系数( $d_{x_i x_j y}$ , 简称为  $d_{ij}$ )建立回归方程。

平均数( $\bar{x}$ )、标准差( $S$ )、标准误( $\sigma$ )和变异系数( $C_v$ )的计算公式如下(蔡一林等, 2011; 李春喜等, 2013; 王新安等, 2013):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}; S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}};$$

$$\sigma = \frac{S}{\sqrt{n}}; C_v (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%;$$

$n=2837$ ;  $i=1, 2, 3, \dots, n$ ;  $x_i$  表示形态性状数值。性状间的相关系数( $r_{xy}$ )的计算公式:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}};$$

$n=2837$ ;  $i=1, 2, 3, \dots, n$ ;  $x_i$  表示形态性状数值;  $y_i$  表示体重性状数值。

直接作用( $P_i$ )和间接作用( $\sum r_{ij} P_j$ )公式:

$$P_i = b_i \frac{S_{x_i}}{S_y};$$

$$\sum r_{ij} P_j = r_{xy} - P_i;$$

$b_i$  表示偏回归系数;  $S_{x_i}$  和  $S_y$  表示形态性状和体重的标准差;  $r_{xy}$  表示形态性状与体重间的相关系数。形态性状对体重的决定系数( $d_i$  和  $d_{ij}$ )公式:

$$d_i = P_i^2; d_{ij} = 2r_{ij} \times P_i \times P_j;$$

$r_{ij}$  表示形态性状间的相关系数;  $d_i$  表示单个性状对体重的决定系数;  $d_{ij}$  表示 2 个性状对体重的共同决定系数。

复相关指数( $R^2$ )公式:

$$R^2 = \sum r_{x_i y} P_i;$$

$x_i$  表示各个形态性状;  $r_{x_i y}$  表示形态性状与体重间的相关系数;  $P_i$  形态性状对体重的直接作用。

多元线性回归方程模型:

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + \dots + b_i X_i;$$

$X_i$  表示各个形态性状;  $y$  表示体重性状。

## 2 结果

### 2.1 翘嘴鳊各生长性状参数

共测定了 2837 尾翘嘴鳊成鱼的体重、全长、体高、头长、眼径、尾柄全长和尾柄高。在这些性状中, 体重的变异系数最高, 达 44.275%, 眼径的变异系数最低, 为 10.964%, 其余各性状变异系数在 13.884%~16.967%之间(表 1); 各性状标准误均较小, 说明所取样本各参数对总体的估计较接近, 可靠性高。

### 2.2 翘嘴鳊所测各性状的相关性

对翘嘴鳊各形态性状分别进行相关分析, 获得各性状表型值相关系数(表 2)。其中, 全长与体高的相关系数最大, 为 0.974; 体重与其他形态性状的相关系数均呈极显著正相关, 与全长和体高的相关系数最大, 分别为 0.929 和 0.932, 而与眼径的相关系数最小; 各性状两两之间的相关性均达到极显著水平( $P < 0.01$ )。

### 2.3 翘嘴鳊形态性状对体重的决定程度比较分析

由于各性状间可能存在不同程度的多重共线性现象, 需进一步对各性状进行偏回归系数检验和通径分析。通径分析能解析各形态性状间复杂的相互关

表 1 翘嘴鳊各生长性状的参数统计

Tab.1 Statistics of the morphological traits of *S. chuatsi* ( $n=2837$ )

性状 Traits	平均数 Mean	标准差 Standard deviation	标准误 Standard error	变异系数 Variable coefficient(%)
体重 BW (g)	285.096	126.226	2.375	44.275
全长 TL (mm)	24.982	3.674	0.069	14.706
体高 BH (mm)	7.690	1.281	0.024	16.662
头长 HL (mm)	7.509	1.153	0.022	15.352
眼径 ED (mm)	1.150	0.126	0.002	10.964
尾柄全长 CPTL (mm)	6.539	0.908	0.017	13.884
尾柄高 CPH (mm)	2.384	0.404	0.008	16.967

表 2 翘嘴鳊形态性状间的相关系数

Tab.2 The correlation coefficients between the morphological traits of *S. chuatsi* (n=2837)

性状 Traits	体重 BW	全长 TL	体高 BH	头长 HL	眼径 ED	尾柄全长 CPTL	尾柄高 CPH
体重 BW	—						
全长 TL	0.929**	—					
体高 BH	0.932**	0.974**	—				
头长 HL	0.841**	0.901**	0.881**	—			
眼径 ED	0.492**	0.549**	0.530**	0.649**	—		
尾柄全长 CPTL	0.804**	0.899**	0.860**	0.721**	0.437**	—	
尾柄高 CPH	0.855**	0.913**	0.906**	0.793**	0.478**	0.856**	—

注: \*\*表示极显著( $P<0.01$ ), 表 4 同

Note: \*\* indicate extremely significant differences ( $P<0.01$ ), the same in Tab.4

系。建立翘嘴鳊各形态性状对体重的通径系数回归方程组, 显著性检验( $R=0.947$ ,  $F=3490.266$ ,  $P<0.01$ )显示, 鳊形态性状与体重间的复相关关系和多元回归关系真实存在, 可进行通径分析; 但偏回归系数检验头长和尾柄高变量未达到显著水平( $P>0.05$ ) (表 3), 故剔除头长及尾柄高性状后进一步分析。

分析除头长和尾柄高性状外的 4 个形态性状对体重的直接作用和间接作用, 发现全长对体重的直接作用最大(0.633), 而全长通过其他性状对体重的间接作用最小(0.296), 直接作用远大于间接作用; 体高的

直接作用也较高(0.473), 略高于间接作用(0.459) (表 4); 眼径和尾柄全长性状则是间接作用显著大于直接作用, 其中, 尾柄全长对体重的直接作用最小(-0.152), 而间接作用最大(0.980)(表 4)。

#### 2.4 翘嘴鳊形态性状对体重的决定程度分析

计算各形态性状( $d_i$ )及形态性状两两间( $d_{ij}$ )协同对体重的决定系数, 所有决定系数的总和为 0.896, 与复相关系数( $R^2$ )相等, 该结果表明全长、体高、眼径和尾柄全长 4 个形态性状为影响体重的重点性状,

表 3 翘嘴鳊主要形态性状与体重的偏回归系数检验

Tab.3 Partial regression coefficient test of the morphological traits and body weight of *S. chuatsi* (n=2837)

变量 Variables	偏回归系数 Partial regression coefficient	标准化的偏回归系数 Standardized partial regression coefficient	t	P
常量 Constant	-433.401		-51.386	0.000
全长 TL	21.740	0.633	15.253	0.000
体高 BH	46.602	0.473	16.043	0.000
头长 HL	-3.406	-0.031	-1.687	0.092
眼径 ED	-28.001	-0.028	-3.257	0.001
尾柄全长 CPTL	-21.107	-0.152	-8.817	0.000
尾柄高 CPH	5.366	0.017	1.032	0.302

注:  $P<0.05$  表示显著

Note:  $P<0.05$  indicated significant differences

表 4 翘嘴鳊形态性状对体重影响的通径分析

Tab.4 Path analysis of the effects of the morphological traits on the body weight of *S. chuatsi* (n=2837)

性状 Traits	相关系数 Correlation index	直接作用 Direct effect	间接作用 Indirect effect						
			总计 Total	全长 TL	体高 BH	头长 HL	眼径 ED	尾柄全长 CPTL	尾柄高 CPH
全长 TL	0.929**	0.633	0.296	—	0.461	-0.028	-0.015	-0.137	0.016
体高 BH	0.932**	0.473	0.459	0.616	—	-0.027	-0.015	-0.131	0.016
头长 HL	0.841**	-0.031	0.872	0.570	0.417	—	-0.018	-0.110	0.014
眼径 ED	0.492**	-0.028	0.520	0.348	0.251	-0.020	—	-0.066	0.008
尾柄全长 CPTL	0.804**	-0.152	0.980	0.569	0.407	-0.022	0.012	—	0.015
尾柄高 CPH	0.855**	0.017	0.838	0.578	0.428	-0.025	-0.013	-0.130	—

注: \*\*表示极显著( $P<0.01$ )

Note: \*\* indicated extremely significant differences ( $P<0.01$ )

头长和尾柄高性状对体重的影响相对较小;单独性状决定作用中以全长和体高的影响最高,分别为 0.400

和 0.224, 两两共同决定作用中全长和体高的协同作用程度最大(0.583)(表 5), 其余的均较小(<0.05)。

表 5 翘嘴鳊形态性状对体重的决定系数

Tab.5 The determinant coefficients of the morphological traits on the body weight of *S. chuatsi* ( $n=2837$ )

性状 Traits	全长 TL	体高 BH	头长 HL	眼径 ED	尾柄全长 CPTL	尾柄高 CPH
全长 TL	0.400	0.583	<i>x</i>	-0.023	-0.174	<i>x</i>
体高 BH		0.224	<i>x</i>	-0.017	-0.125	<i>x</i>
头长 HL			<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
眼径 ED				0.001	0.003	<i>x</i>
尾柄全长 CPTL					0.023	<i>x</i>
尾柄高 CPH						<i>x</i>

注:表中对角线数值为单个形态性状对体重的决定系数,对角线以上数值为两两性状协同对体重的决定系数

Note: The data on the diagonal line in the table were the determinant coefficient of single morphometric trait on body weight. The data above the diagonal line were determinant coefficients of the pairwise traits on body weight

## 2.5 翘嘴鳊形态性状对体重多元回归方程的建立

根据测定数据进行逐步多元回归分析,由于头长和尾柄高偏回归系数不显著(表 3),因此,剔除头长和尾柄高 2 个自变量,再次进行多元回归分析(表 6),建立以全长、体高、眼径和尾柄全长与鳊体重关联的新回归方程:

$$y = -433.157 + 20.678x_1 + 47.338x_2 - 34.056x_3 - 18.84x_4$$

$y$  为体重(g),  $x_1$  为全长(mm),  $x_2$  为体高(mm),  $x_3$  为眼径(mm),  $x_4$  为尾柄全长(mm)。

多元回归方程的方差分析及相关指数分析结果显示,回归关系极显著( $P < 0.01$ )(表 7),且各形态性状对体重的偏回归系数也极显著( $P < 0.01$ )(表 6);4 个性状对体重的显著性检验  $R=0.947$ ,说明 4 个性状对体重有较大的相关性。

## 2.6 翘嘴鳊雌雄多元回归方程的建立及验证

翘嘴鳊形态性状对体重的决定系数中,全长和体高对体重的决定系数最高(表 5),因此,利用雌雄鱼的全长和体高数据分别进行多元回归分析,建立全长和体高与体重关联的回归方程(表 8):

$$\text{雌鱼: } y = -480.563 + 24.976x_1 + 18.182x_2;$$

$$\text{雄鱼: } y = -436.168 + 13.502x_1 + 49.657x_2$$

式中,  $y$  为体重,  $x_1$  为全长,  $x_2$  为体高。

利用建立的雌雄回归方程,用 120 尾鳊进行验

证,结果显示,总的判别准确率为 61.667%,在体重小于 200 g 的鳊鱼雌雄判别准确率达到 72.131%,但在大于 200 g 的准确率只有 50.847% (表 9)。

## 3 讨论

### 3.1 影响翘嘴鳊体重性状的主要形态性状

体重是鱼类重要的生长性状,且其变异系数较大,被作为大多数鱼类选育的重要指标(袁美云等, 2010)。本研究测量了 2837 尾翘嘴鳊的 7 个生长相关

表 6 翘嘴鳊主要形态性状与体重的偏回归系数检验(剔除头长、尾柄高)

Tab.6 Partial regression coefficient test of the morphological traits and body weight of *S. chuatsi* (HL and CPH were eliminated) ( $n=2837$ )

变量 Variable	偏回归系数 Partial regression coefficient	$t$	$P$
常量 Constant	-433.157	-51.498	0.000
全长 TL	20.678	17.474	0.000
体高 BH	47.338	16.692	0.000
头长 HL	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
眼径 ED	-34.056	-4.320	0.000
尾柄全长 CPTL	-18.840	-8.905	0.000
尾柄高 CPH	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>

表 7 多元回归方程的方差分析

Tab.7 Analysis of variance of multiple regression equations

指数 Index	总平方和 SS	自由度 df	均方 MS	$F$	$P$
回归 Regression	39645930.53	6	6607655.088	3490.266	0.000
残差 Residual error	5333050.77	2817	1893.167		
总计 Total	44978981.30	2823			

表 8 雌雄翘嘴鳊主要形态性状与体重的偏回归系数检验(剔除头长、尾柄高)

Tab.8 Partial regression coefficient test of the morphological traits and body weight of male and female *S. chuatsi* (HL and CPH were eliminated)  $n(\text{female})=150, n(\text{male})=150$ 

性别 Sex	变量 Variable	偏回归系数 Partial regression coefficient	$t$	$P$
雌性 Female	常量 Constant	-480.563	-23.682	0.000
	全长 TL	24.976	7.991	0.000
	体高 BH	18.182	2.050	0.042
雄性 Male	常量 Constant	-436.168	-19.688	0.000
	全长 TL	13.502	4.978	0.000
	体高 BH	49.657	6.502	0.000

表 9 翘嘴鳊雌雄判别验证结果

Tab.9 The results of sexual determination of *S. chuatsi*

体重 Body weight(g)	尾数 Number(ind.)	判别数 Discriminant number (ind.)		准确率 Accuracy rate (%)
		正判 True	误判 False	
<200 g	61	44	17	72.131
>200 g	59	30	29	50.847
全部 All	120	74	46	61.667

性状, 包括全长、体高、头长、眼径、尾柄全长、尾柄高和体重, 发现体重性状变异系数最大, 说明以体重为目标性状进行翘嘴鳊的选择育种是可行的, 也说明所检测的翘嘴鳊群体具有较大的选择育种潜力。

形态性状是生物种质状况和生长特征的综合反映, 也是生物选择育种的重要指标(王新安等, 2012)。在选育过程中, 通过研究性状间的相互关系, 可为间接选育、多性状选育和选择指数提供参考(李思发等, 2006)。利用通径分析, 结合多元线性回归分析与偏相关分析, 可以精确、直观地处理复杂的变量关系(敬艳辉等, 2006)。本研究对翘嘴鳊的体重与各形态性状进行了系统分析, 发现各形态性状测量值间均存在显著差异。进一步建立多元回归方程并通过偏回归系数检验, 发现头长和尾柄高的偏回归系数值不显著, 故剔除这 2 个性状后建立了最终的多元回归方程, 并通过通径分析确定各形态性状对体重性状的直接作用以及每个形态性状通过其他性状对体重的间接作用。翘嘴鳊的全长和体高对体重的单独决定程度最高, 且全长和体高的共同决定系数也显著高于其他两两性状。这与硬头鲮(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)和白斑红点鲑(*Salvelinus leucomaenis*)等鱼类形态性状的研究结果相同, 这些鱼类对体重的决定系数最大的单独性状也均为体高和全长, 两两共同决定系数也主要以全长/体高的协同作用程度最大(佟广香等, 2011; 杨贵强等, 2011; 王新安等, 2013; 袁美云等, 2010; 张永泉等, 2014)。进行决定系数分析时, 当各自变量对依变量的单独决定系数及两两共同

决定系数的总和( $\sum d$ )大于 0.85 时, 表明自变量与依变量的相关性较大(刘小林等, 2004)。本研究中, 全长、体高、眼径和尾柄全长 4 个性状对体重的决定系数总和达 0.896, 表明这 4 个性状是影响体重的重点性状, 其他尚未测定或剔除的性状对体重的影响相对较小。本研究通过分析大样本所建立的回归方程量化了翘嘴鳊体重与全长、体高、眼径和尾柄全长的相关关系, 翘嘴鳊的全长、体高和体重可以作为多性状选育的主要选择参数。

### 3.2 雌雄翘嘴鳊的形态性状判别

在水生动物中, 有些鱼类雌雄个体的生长存在明显差异, 比如大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)和红鳍东方鲀等(谌微等, 2014; 胡玉龙等, 2015; 林植华等, 2004; 岳亮等, 2015); 有些鱼类则不存在明显的生长差异, 如大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)和北部湾口眼镜鱼(*Mene maculate*)等(安丽等, 2011; 杜时强等, 2012; )。翘嘴鳊雌雄个体的生长也存在差异(王晓清等, 2006), 但翘嘴鳊在未达性成熟前或非生殖季节, 从外部形态上难以区别其雌雄个体, 在选育种过程进行后备亲本雌雄个体的选留时难度很大。

本研究分析体重、全长和体高 3 个性状与性别的相关关系, 建立了翘嘴鳊雌雄个体形态参数的回归方程, 进行雌雄判别验证准确率为 61.667%; 而且对小规格(<200 g)的样本判别准确率更高, 可达 72.131% (表 9)。通常达性成熟的个体其雌雄个体的判别可借



助是否能挤出精液进行鉴定,而较小个体通常是无法判断雌雄的。本研究通过形态参数对小规格样本的雌雄鉴别在鳊选育过程中具有实际应用价值。

本研究通过相关分析、通径分析及多元回归分析确定了翘嘴鳊的全长和体高性状对体重性状影响最大,且建立了翘嘴鳊体重的回归方程;同时建立的翘嘴鳊雌雄个体形态参数的回归方程对小规格样本具有较高的鉴别率。本研究结果可为下一步翘嘴鳊的选育提供合理科学的选育评价指标,以提高选育效率。

## 参 考 文 献

- An L, Zhu YA, Wang YX, *et al.* Statistic morphology difference between sexual dimorphism of *Paramisgurnus dabryanus* Sauvage. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 11(1): 289–290 [安丽, 朱永安, 王玉新, 等. 大鳞副泥鳅雌雄个体的形态特征比较. *安徽农业科学*, 2011, 11(1): 289–290]
- Bai LJ, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* Effects of morphometric traits on weight traits of *Atrina pectinata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 87–92 [白临建, 杨爱国, 周丽青, 等. 栉江珧形态性状对重量性状的影响. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 87–92]
- Cai YL, Yue YS. *The aquatic biological statistics*. Beijing: China Agriculture Press, 2001 [蔡一林, 岳永生. *水产生物统计*. 北京: 中国农业出版社, 2001]
- Chai Z, Luan S, Luo K, *et al.* Correlation analysis of fillet yield with phenotypic traits for families from conservation population of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 63–70 [柴展, 栾生, 罗坤, 等. 基于家系水平的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)保种群体出肉率与表型性状的相关性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 63–70]
- Chen W, Wang PP, Xiao SJ, *et al.* Analysis of morphological index system and sexual differences of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2014, 19(6): 401–408 [谌微, 王盼盼, 肖世俊, 等. 大黄鱼形态指标体系及雌雄差异分析. *集美大学学报(自然科学版)*, 2014, 19(6): 401–408]
- Dou YQ, Liang XF, Yi TL, *et al.* Principal component and discriminant analyses of traits of *Siniperca chuatsi* at different ages. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1116–1124 [窦亚琪, 梁旭方, 易提林, 等. 翘嘴鳊不同月龄性状的主成分与判别分析. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1116–1124]
- Du JJ, Chen ZW. Using the SPSS method to realize size analysis of linear regression. *Bulletin of Biology*, 2010, 45(2): 4–6 [杜家菊, 陈志伟. 使用SPSS线性回归实现通径分析的方法. *生物学通报*, 2010, 45(2): 4–6]
- Du SQ, Feng B, Hou G, *et al.* Age and growth of moonfish, *Mene maculate* from mouth of the Beibu Gulf, South China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 576–583 [杜时强, 冯波, 侯刚, 等. 北部湾口眼镜鱼年龄与生长. *水产学报*, 2012, 36(4): 576–583]
- Gae G, Bakar Y. Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: Analysis of breeding-value selection to increase 98-day body weight in tilapia. *Aquaculture*, 2002, 212(1–4): 93–113
- He FH, Li MH. Excel application in path analysis. *Chinese Journal of Health Statistics*, 2005, 22(5): 331–332 [何风华, 李明辉. Excel在通径分析中的应用. *中国卫生统计*, 2005, 22(5): 331–332]
- Hu YL, Wang WJ, Kong J, *et al.* Sex ratio and body weight analysis of four-month Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 50–55 [胡玉龙, 王伟继, 孔杰, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)四月龄幼鱼雌雄性比及体重差异分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 50–55]
- Jing YH, Xing LW. Path analysis and its application. *Statistical Education*, 2006(2): 24–26 [敬艳辉, 邢留伟. 通径分析及其应用. *统计教育*, 2006(2): 24–26]
- Li CX, Jiang LN, Shao Y, *et al.* *Biostatistics*. Beijing: Science Press, 2013 [李春喜, 姜丽娜, 邵云, 等. *生物统计学*. 北京: 科学出版社, 2013]
- Li SF, Wang CH, Liu ZG, *et al.* Analysis of heterosis and genetic corelation of growth traits in three variants of red common carp. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 175–180 [李思发, 王成辉, 刘志国, 等. 三种红鲤生长性状的杂种优势与遗传相关分析. *水产学报*, 2006, 30(2): 175–180]
- Li Y, Liu P, Li J, *et al.* Correlation and path analysis of morphometric traits on body weight for *Exopalamon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 59–65 [李洋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾形态性状对体重的相关性分析及通径分析. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 59–65]
- Lin ZH, Lei HZ. Sexual dimorphism and female reproductive characteristics of *Pseudobagrus fulvidraco*. *Chinese Journal of Zoology*, 2004, 39(6): 13–17 [林植华, 雷焕宗. 黄颡鱼的两性异形和雌性繁殖特征. *动物学杂志*, 2004, 39(6): 13–17]
- Liu XL, Wu CG, Zhang ZH, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight for *Penaeus vannamei*. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 857–862 [刘小林, 吴长功, 张志怀, 等. 凡纳滨对虾形态性状对体重的影响效果分析. *生态学报*, 2004, 24(4): 857–862]
- Ma X, Wang XQ, Du HB, *et al.* Correlation analysis of morphological traits and body weight of Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2013, 39(2): 179–182 [马晓, 王晓清, 杜海波, 等. 中华鳖的体重与形态特征的关联分析. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 39(2): 179–182]

- Ping HL, Wang TM, Lü ZM, *et al.* Effects of morphological traits on the weight of *Sepiella japonica*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(3): 218–220 [平洪领, 王天明, 吕振明, 等. 曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)体型性状对体质量的影响. *江苏农业科学*, 2015, 43(3): 218–220]
- Tan CG, Liu BS, Zhang DL, *et al.* Analysis of grey relationship between morphological traits and body weight of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 35–40 [谭才钢, 刘宝锁, 张东玲, 等. 合浦珠母贝主要形态性状与体质量的灰色关联分析. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 35–40]
- Tong GX, Kuang YY, Xu LX, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometrics attributes on body weight in Taimen *Hucho taimen*. *Chinese Journal Fisheries*, 2011, 24(2): 31–36 [佟广香, 匡友谊, 许凌霄, 等. 哲罗鲑形态性状与体重的相关性分析. *水产学杂志*, 2011, 24(2): 31–36]
- Wang CY, Fei CP, Xiang GS, *et al.* Effect of morphometric traits on body weight for turtle *Chinemys reevesii*. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2013, 37(1): 83–87, 92 [王诚远, 费春平, 项国仕, 等. 乌龟形态性状对体重的影响效果. *南昌大学学报(理科版)*, 2013, 37(1): 83–87, 92]
- Wang XA, Ma AJ, Zhuang ZM, *et al.* Judgment of selection index of morphological traits in *Fugu rubripes*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 10–15 [王新安, 马爱军, 庄志猛, 等. 红鳍东方鲀体型性状选育指标的综合判定. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 10–15]
- Wang XA, Ma AJ, Zhuang ZM, *et al.* Effects of morphometric attributes on body weight of *Takifugu rubripes* (temminck et schlegel). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 135–140 [王新安, 马爱军, 庄志猛, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)形态性状对体重的影响效果. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 135–140]
- Wang XQ, Li CW, Xie ZG, *et al.* Studies on the growth difference of the male and female *Siniperca chuatsi*. *Freshwater Fisheries*, 2006, 36(3): 34–37 [王晓清, 李传武, 谢中国, 等. 鳊雌雄生长差异的研究. *淡水渔业*, 2006, 36(3): 34–37]
- Wu B, Fang CL, Zhang YP, *et al.* The assessment of biological parameters and stock biomass of *Siniperca chuatsi* in the Poyang Lake. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 21–26 [吴斌, 方春林, 张燕萍, 等. 鄱阳湖翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)的生物学参数及资源量的估算. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 21–26]
- Yan FS, Wang ZG, Liu XD, *et al.* Path analysis of the effects of morphometric traits on body weight for 3-month aged *Paralichthys olivaceus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(2): 45–50 [严福升, 王志刚, 刘旭东, 等. 3月龄牙鲮形态性状对体质量的通径分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(2): 45–50]
- Yang GQ, Xu SG, Wang YZ, *et al.* The relationship between partial morphometric and body weight of juvenile steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(1): 16–22 [杨贵强, 徐绍刚, 王跃智, 等. 硬头鳟幼鱼部分形态性状和体重的关系. *动物学杂志*, 2011, 46(1): 16–22]
- Yuan MY, Liu SF, Han ZZ, *et al.* Mathematical analysis of morphometric attribute effects on body weight for three-month-old *Acipenser schrenckii* Brandt. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 507–513 [袁美云, 刘双凤, 韩志忠, 等. 3月龄施氏鲟形态性状对体质量的影响分析. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 507–513]
- Yuan XC, Zhao WW. *China fishery statistical yearbook*. Beijing: China Agriculture Press, 2016 [袁晓初, 赵文武. *中国渔业统计年鉴*. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- Yue L, Wang XA, Ma AJ, *et al.* Comparison of the morphological traits between male and female individuals of *Takifugu rubripes*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 30–35 [岳亮, 王新安, 马爱军, 等. 红鳍东方鲀(*Takifuguru bripes*)雌、雄个体的形态特征比较. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 30–35]
- Zhang J, Liang XF, Guo XZ, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric traits on body weight of *Siniperca chuatsi*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013a, 32(5): 100–105 [张进, 梁旭方, 郭小泽, 等. 翘嘴鳊形态性状对体质量的影响. *华中农业大学学报*, 2013a, 32(5): 100–105]
- Zhang J, Liang XF, Yi TL, *et al.* Diet domestication and morphometry of body weight in hybrid F<sub>1</sub> by *Siniperca scherzeri* (♀) × *S. chuatsi* (♂). *Fisheries Science*, 2013b, 32(1): 1–6 [张进, 梁旭方, 易提林, 等. 翘嘴鳊与斑鳊杂交 F<sub>1</sub> 代食性驯化及主要形态性状的通径分析. *水产科学*, 2013b, 32(1): 1–6]
- Zhang JL, Wang QH, Deng YW, *et al.* Effects of morphological traits on the weight of *Meretrix lamarchii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 110–113 [张嘉丽, 王庆恒, 邓岳文, 等. 斧文蛤(*Meretrix lamarchii*)形态性状对体质量的影响效果分析. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 110–113]
- Zhang YQ, Bai QL, Gu W, *et al.* Effects of morphometric attributes on body weight of *Salvelinus leucomaeni*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 116–122 [张永泉, 白庆利, 谷伟, 等. 白斑红点鲑(*Salvelinus leucomaeni*)形态性状对体质量影响效果. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 116–122]

## Correlation Analysis of the Main Morphological Traits and Body Weight of Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*) and Morphological Traits Between Males and Females

DONG Junjian<sup>1</sup>, SUN Chengfei<sup>1</sup>, TIAN Yuanyuan<sup>1,2</sup>, ZENG Qingkai<sup>1,2</sup>,  
SHI Hongya<sup>1,2</sup>, LU Maixin<sup>1,2</sup>, YE Xing<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resources Utilization & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;  
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** To assess the correlation between the main morphological traits and body weight of *Siniperca chuatsi* as well as the morphological differences between males and females, 2837 *S. chuatsi* individuals from the same farm pond were used to measure seven growth-related morphological traits including total length, body height, head length, eye diameter, caudal peduncle length, caudal peduncle depth, and body weight. Correlation analysis, path analysis, and multivariate linear regression analysis were used to analyze the correlation between morphological traits and body weight. A total of 150 males and 150 females were randomly selected to establish multiple regression equations, and 120 individuals were used for gender verification. The results showed the correlation coefficients of body weight to total length and body height are the highest among all the morphological traits. The established regression equations and partial regression coefficient tests indicated no significant correlation of head length or caudal peduncle depth to body weight, which were excluded for further analysis. Path analysis revealed the largest direct effect of total length and body height upon body weight, which was greater than their indirect effect. The highest determinant coefficients of single and pairwise traits to body weight were total length and body height in both single trait determination and pairwise determination. The determination coefficient ( $\sum d$ ) of the four traits was 0.896, suggesting a greater correlation for the four traits to body weight and a higher reference value for the fitted multiple regression equation. A regression equation for the gender was established. Verification results indicated that higher verification accuracy of gender was obtained for individuals with body weight less than 200 g. This study provides an essential reference for determining the evaluation indices for the morphological growth traits of *S. chuatsi*, and would facilitate the breeding selection.

**Key words** *Siniperca chuatsi*; Morphological traits; Body weight; Correlation coefficient; Multiple regression; Path analysis

① Corresponding author: YE Xing, E-mail: gzyexing@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170111002

http://www.yykxjz.cn/

公绪鹏, 李宝山, 张利民, 张燕, 王际英. 饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长、体组成及消化酶活力的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 85-95

Gong XP, Li BS, Zhang LM, Zhang Y, Wang JY. Effects of dietary protein and energy levels on growth, body composition and digestive enzymes activities of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. moara* ♀. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 85-95

# 饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长、体组成及消化酶活力的影响\*

公绪鹏<sup>1,2</sup> 李宝山<sup>2</sup> 张利民<sup>2</sup> 张 燕<sup>1,2</sup> 王际英<sup>2①</sup>

(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 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)



**摘要** 为探求云纹龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. moara* ♀)幼鱼饲料的最适蛋白质和能量含量,以鱼粉和大豆浓缩蛋白为蛋白源、添加鱼油构建能量梯度,配制粗蛋白含量为 46%、50% 和 54%,能量含量为 20.00、20.50 和 21.00 kJ/g,蛋能比为 22.04~26.87 mg/kJ 的 9 组饲料,编号为 D1~D9 组,投喂初始体重为(46.23±0.51) g 的云纹龙胆石斑鱼幼鱼 56 d。结果显示,蛋白质和能量的交互作用对云纹龙胆石斑鱼幼鱼增重率影响显著( $P<0.05$ ),蛋白质和能量升高显著提高增重率和特定生长率( $P<0.05$ )。蛋白质和能量的交互作用对蛋白质沉积率和肝体比影响显著( $P<0.05$ ),蛋白质升高显著提高能量保留率和肥满度( $P<0.05$ ),蛋白质效率先升后降( $P<0.05$ );能量升高显著提高蛋白质效率和能量保留率( $P<0.05$ );D6 组蛋白质沉积率和蛋白质效率显著高于其他组( $P<0.05$ )。蛋白质和能量的交互作用对全鱼及肌肉水分、粗蛋白、粗灰分均无显著影响( $P>0.05$ ),全鱼及肌肉粗蛋白随饲料粗蛋白升高而升高( $P<0.05$ ),水分随能量升高而降低( $P<0.05$ ),全鱼粗脂肪随蛋能比降低而升高( $P<0.05$ )。蛋白质和能量的交互作用对胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力影响显著( $P<0.05$ ),胃蛋白酶活力随蛋白质含量升高而升高( $P<0.05$ ),能量对其无显著影响( $P>0.05$ );D6 组胰蛋白酶活力最高,其随饲料蛋能比降低呈先升后降的趋势( $P<0.05$ ),能量为 21.00 kJ/g 时,脂肪酶活力显著高于其他组( $P<0.05$ )。综上,在设定的蛋白质和能量范围内云纹龙胆石斑鱼幼鱼饲料以 50%粗蛋白,21.00 kJ/g 能量为宜。

**关键词** 云纹龙胆石斑鱼;蛋白质;能量;蛋能比;体组成;消化酶

**中图分类号** S965.334 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0085-11

鱼类通过调整摄食满足其能量需求(Jobling, 1994),能量含量的适宜与否是评价饲料的重要标准之一。饲料能量是由蛋白质、脂肪、碳水化合物共同

提供的。鱼类对碳水化合物的利用能力有限,机体所需能量主要由蛋白质与脂肪提供(Lee *et al*, 2005)。蛋白质是饲料最重要的组分,但由于资源缺乏及代谢后

\* 国家海洋生物产业水生动物营养与饲料研发创新示范平台(201701001)、山东省重点研发计划(2016GSF115005)和山东省自然科学基金(ZR2015CQ023)共同资助 [This work was supported by Marine Bio-Industry Innovation and Development Regional Demonstration Service Platform (201701001), Shandong Province Key Research and Development Program (2016GSF115005), and Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2015CQ023)]. 公绪鹏, E-mail: sdlygxp@163.com

① 通讯作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com

收稿日期: 2017-01-11, 收修改稿日期: 2017-03-06

对水环境的污染等问题,可通过提高脂肪供能的比例,以达到脂类对蛋白质的节约作用。饲料中适宜的蛋白质和能量含量不仅利于蛋白和非蛋白能源物质的合理利用,促进鱼体生长,提高生产率,而且可以减轻对水体的污染,利于水产养殖产业的健康发展。对翘嘴鲌(*Culter alburnus*)幼鱼(宋林等,2013)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)幼鱼(彭士明等,2005)等的研究表明,脂肪节约蛋白质的效应在鱼类生长摄食、机体营养组成、免疫功能等方面均有显著体现(杨建梅等,2006)。

石斑鱼作为一种较为多样化的肉食性鱼类,广泛分布于热带及温带海洋区域,其营养丰富、肉质细嫩(王际英等,2015)。目前,市场上养殖规模较广的有点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)、青石斑鱼(*E. awoara*)和斜带石斑鱼(*E. coioides*)等。云纹龙胆石斑鱼作为鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*♂)和云纹石斑鱼(*E. moara*♀)的杂交种,具有生长性能好、抗逆性高的优点,现已在福建、山东等地推广养殖。目前,尚未见云纹龙胆石斑鱼饲料蛋白质和能量的研究报道。因此,本研究以云纹龙胆石斑鱼幼鱼为研究对象,探讨饲料中不同蛋白质和能量含量对其生长、体组成及消化酶活力的影响,以期配合饲料的生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料配方

本实验以鱼粉、大豆浓缩蛋白为主要蛋白源,通过添加鱼油构建能量梯度,采用3×3双因子设计,配制成粗蛋白(Crude protein, CP)含量为46%、50%、54%,能量(Gross energy, GE)含量为20.00、20.50、21.00 kJ/g的9组饲料,其蛋能比分别为26.87、26.22、25.52、24.89、24.26、23.61、23.19、22.60和22.04 mg/kJ,编为D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7、D8和D9组。饲料原料经粉碎过80目筛,按配比称重,逐级放大混匀后,加入新鲜鱼油及蒸馏水,经螺旋挤压机加工成直径为4.00 mm的颗粒饲料,阴凉处风干,置于4℃冰箱中保存备用。饲料配方及营养组成见表1。

### 1.2 饲养管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地循环水养殖系统中进行,实验用鱼购自山东莱州明波水产有限公司。正式实验开始前,选取同一批次、大小均匀、健康无害的云纹龙胆石斑鱼幼鱼放养于水深50 cm的蓝色圆柱形养殖桶(Φ90 cm×H80 cm)中,使其适应养殖环境,期间投喂由9种饲料等比混

合而成的饲料。14 d后,选取体重为(46.23±0.51) g的幼鱼810条,随机分为27桶,每桶30尾鱼,每种饲料随机投喂3桶。每天定时饱食投喂2次(08:30和16:30),投喂40 min后,将残饵由系统自带的排水口排出,计数残饵颗粒,计算残饵量。实验周期为56 d。养殖过程中,水温控制在(25±0.5)℃,pH 7.8~8.2,盐度27~29,DO>5 mg/L,氨氮和亚硝酸氮<0.1 mg/L。

### 1.3 样品采集与分析

实验前随机取5尾鱼作为初始样品。养殖实验结束后,禁食24 h,MS-222(100 mg/kg)麻醉后,称取总重并记录鱼体个数,计算增重量、增重率、饲料系数及存活率。每桶随机取12尾鱼,测定其体重及体长,其中5尾作全鱼样品,其余7尾分离内脏、肝脏、肠道及胃并称量,计算肝体比、脏体比及肥满度。采集背肌、胃肠道等样品,-20℃保存备用。

饲料及样品基本营养成分分析参照以下方法:水分测定采用105℃烘干恒重法(GB/T 6435-2006);粗蛋白测定采用杜马斯燃烧定氮法(Leco FP528,美国);粗脂肪测定采用索氏抽提法(GB/T 6433-2006);粗灰分测定采用马弗炉550℃失重法(GB/T6438-2007);能量测定采用燃烧法(PARR 6100,美国)。胃蛋白酶、肠道胰蛋白酶、肠道脂肪酶和肠道淀粉酶活力均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定,具体方法参见试剂盒说明书。

胃蛋白酶活力单位定义:每毫升胃液37℃每分钟分解蛋白生成1 μg氨基酸相当于1个酶活力单位。胰蛋白酶活力单位定义:在pH=8.0、37℃条件下,每毫克蛋白中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化0.003即为1个酶活力单位。脂肪酶活力单位定义:在28℃条件下,每克组织蛋白在本反应体系中与底物反应1 min,每消耗1 μmol底物为1个酶活力单位。淀粉酶活力单位定义:每毫克蛋白在28℃与底物作用30 min,水解10 mg淀粉定义为1个淀粉酶活力单位。

### 1.4 计算公式

增重量(Weight gain, WG/g)= $W_t - W_0$

增重率(Weight gain rate, WGR/%)= $(\bar{W}_t - \bar{W}_0) / \bar{W}_0 \times 100$ ;

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)= $(\ln \bar{W}_t - \ln \bar{W}_0) / d \times 100$ ;

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)= $F / (W_t - W_0)$ ;

蛋白质沉积率(Protein deposition rate, PDR/%)= $(W_t \times CP_t - W_0 \times CP_0) / (W_0 \times CP_0) \times 100$ ;

表 1 饲料配方及营养组成(风干基础)(%)

Tab.1 Formulation and nutrient composition of experimental diets (air-dry basis)(%)

原料 Ingredients	组别 Groups									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	
鱼粉 Fish meal	54.50	54.50	54.50	48.50	48.50	48.50	42.50	42.50	42.50	
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	
乌贼内脏粉 Squid visceral meal powder	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
鱼油 Fish oil	3.30	5.30	7.30	3.90	5.90	7.90	4.50	6.50	8.50	
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
维生素预混料 Vitamins mixture <sup>1</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	
矿物质预混料 Minerals mixture <sup>2</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	
三氧化二钇 Yttrium(III)-oxide	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
抗氧化剂 Antioxidant	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
羧甲基纤维素 CMC	4.10	2.10	0.10	9.50	7.50	5.50	14.90	12.90	10.90	
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
营养成分 Nutrient composition										
粗蛋白 Crude protein (%)	53.56	53.90	53.67	49.73	49.68	49.52	46.22	46.21	46.02	
粗脂肪 Crude fat (%)	7.92	9.52	12.11	8.10	9.99	11.95	7.86	9.99	12.45	
粗灰分 Crude ash (%)	13.12	12.9	13.21	13.46	13.15	12.91	13.11	13.25	12.86	
总能 Gross Energy (kJ/g)	19.93	20.56	21.03	19.98	20.48	20.97	19.93	20.45	20.88	
蛋能比 Protein/Energy ratio (mg/kJ)	26.87	26.22	25.52	24.89	24.26	23.61	23.19	22.60	22.04	

注: 1. 维生素预混料(mg/kg 饲料): 维生素 A, 38.0(IU); 维生素 D3, 13.2(IU);  $\alpha$ -生育酚, 210.0(IU); 硫胺素, 115.0; 核黄素, 380.0; 盐酸吡哆醇, 88.0; 泛酸, 368.0; 烟酸, 1030.0; 生物素, 10.0; 叶酸, 20.0; 维生素 B<sub>12</sub>, 1.3; 肌醇 4000.0; 抗坏血酸, 500.0

2. 矿物质预混料(mg/kg 饲料): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3568.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25568.0; KCl, 3020.5; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 8.3; CoCl<sub>2</sub>, 28.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 353.0; 乳酸钙, 15968.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 9.0; KI, 7.0; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 63.1; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.5; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

Note: 1. Vitamins mixture (mg/kg diet): Retinol acetate, 38.0; Cholecalciferol, 13.2; alpha-Tocopherol, 210.0; Thiamin, 115.0; Riboflavin, 380.0; pyridoxine HCl, 88.0; Pantothenic acid, 368.0; Niacin acid, 1030.0; Biotin, 10.0; Folic acid, 20.0; Vitamin B<sub>12</sub>, 1.3; Inositol, 4000.0; Ascorbic acid, 500.0

2. Minerals mixture (mg/kg diet): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3568.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25568.0; KCl, 3020.5; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 8.3; CoCl<sub>2</sub>, 28.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 353.0; Ca-lactate, 15968.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 9.0; KI, 7.0; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 63.1; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.5; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER/%)=( $W_t - W_0$ )/( $F \times CP_f$ ) $\times 100$ ;

能量保留率(Energy retention rate, ERR/%)=( $W_t - W_0 \times E_0$ )/( $F \times E_f$ ) $\times 100$ ;

肝体比(Hepatosomatic index, HSI/%)=肝脏重/体重 $\times 100$ ;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI/%)=内脏重/体重 $\times 100$ ;

肥满度(Condition factor, CF)=体重/体长<sup>3</sup> $\times 100$

式中,  $\bar{W}_0$  为实验初鱼体均重(g);  $\bar{W}_t$  为实验终鱼体均重(g);  $W_0$  为实验初鱼体总重(g);  $W_t$  为实验终鱼体总重(g);  $CP_0$  为实验初鱼体粗蛋白含量(%);  $CP_t$

为实验终鱼体粗蛋白含量(%);  $CP_f$  为饲料粗蛋白含量(%);  $E_0$  为实验初鱼体总能(kJ/g);  $E_t$  为实验终鱼体总能(kJ/g);  $E_f$  为单位饲料总能(kJ/g);  $F$  为鱼摄食饲料干重(g);  $d$  为养殖天数。

## 1.5 数据分析

实验数据采用 SPSS 19.0 软件分析, 以饲料蛋白质和能量含量为影响因素, 进行双因素方差分析(Two-way ANOVA), 交互作用不显著时, 分析蛋白质和能量的主效应。将蛋白质及能量视为一个因素, 对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 差异显著时, 采用 Duncan's 多重比较, 显著水平设定为  $P <$



0.05)。实验结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长性能的影响

由表2可知,蛋白质和能量只在增重中表现出显著的交互作用( $P<0.05$ ),在能量含量为21.00 kJ/g、粗蛋白含量为50%和54%时,云纹龙胆石斑鱼幼鱼增重量最高。由主效应分析可知,提高饲料粗蛋白含量能显著提高云纹龙胆石斑鱼幼鱼的增重率和特定生长率( $P<0.05$ ),并显著降低饲料系数( $P<0.05$ );提高饲料能量含量可显著提高增重率和特定生长率( $P<0.05$ ),对饲料系数无显著影响( $P>0.05$ )。单因素方差分析表明,D6组实验鱼增重率、特定生长率显著高于其他各组

( $P<0.05$ ),而饲料系数显著低于其他各组( $P<0.05$ );D7、D8和D9组各生长指标显著低于其他各组( $P<0.05$ )。

### 2.2 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼蛋白质利用、能量保留率及形体指标的影响

如表3、表4所示,蛋白质和能量只在蛋白质沉积率和肝体比中表现出显著的交互作用( $P<0.05$ ),在饲料粗蛋白含量为50%、能量含量为20.50 kJ/g和21.00 kJ/g时,蛋白质沉积率高于其他组;在饲料粗蛋白含量为46%、能量含量为21.00 kJ/g时,肝体比最高。由主效应分析可知,饲料粗蛋白含量升高时,蛋白质效率先升后降( $P<0.05$ ),能量保留率和肥满度均显著升高( $P<0.05$ ),脏体比显著降低( $P<0.05$ );能量含量升高时,蛋白质效率和能量保留率显著升高( $P<0.05$ ),而脏体比和肥满度无显著变化( $P>0.05$ )。

表2 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长性能的影响

Tab.2 Effects of different protein and energy levels on the growth performance of *E. lanceolatus*♂×*E. moara*♀

项目 Items	粗蛋白 CP(%)	总能量 GE(kJ/g)	初体均重 IBW(g)	终体均重 FBW(g)	存活率 SR(%)	增重量 WG(g)	增重率 WGR(%)	饲料系数 FCR
D1	54	20.0	47.07±0.43	138.24±0.59	100±0.00	2735.33±28.45 <sup>b</sup>	193.74±3.70 <sup>b</sup>	0.77±0.02 <sup>b</sup>
D2	54	20.5	46.92±0.13	138.83±1.72	100±0.00	2757.33±52.77 <sup>b</sup>	195.88±3.94 <sup>b</sup>	0.75±0.04 <sup>b</sup>
D3	54	21.0	47.22±0.44	144.16±3.00	100±0.00	2907.97±101.79 <sup>a</sup>	205.31±9.00 <sup>ab</sup>	0.78±0.04 <sup>b</sup>
D4	50	20.0	46.97±0.09	138.65±2.20	100±0.00	2750.30±63.94 <sup>b</sup>	195.16±4.27 <sup>b</sup>	0.77±0.01 <sup>b</sup>
D5	50	20.5	46.63±0.46	141.66±1.60	100±0.00	2850.93±59.01 <sup>b</sup>	203.84±5.98 <sup>ab</sup>	0.78±0.02 <sup>b</sup>
D6	50	21.0	47.06±0.06	146.14±1.29	100±0.00	2972.63±39.08 <sup>a</sup>	210.58±2.86 <sup>a</sup>	0.74±0.00 <sup>c</sup>
D7	46	20.0	47.22±0.39	133.35±3.36	100±0.00	2583.77±91.68 <sup>c</sup>	182.37±5.40 <sup>c</sup>	0.87±0.03 <sup>a</sup>
D8	46	20.5	47.16±0.41	130.67±2.48	100±0.00	2505.47±80.87 <sup>c</sup>	177.12±6.75 <sup>c</sup>	0.88±0.02 <sup>a</sup>
D9	46	21.0	46.77±0.12	131.29±3.50	100±0.00	2535.50±106.47 <sup>c</sup>	180.70±7.78 <sup>a</sup>	0.88±0.04 <sup>c</sup>
主效应 Main effects								
粗蛋白 CP(%)								
	54					2800.21 <sup>A</sup>	198.31 <sup>A</sup>	0.76 <sup>B</sup>
	50					2857.96 <sup>A</sup>	203.19 <sup>A</sup>	0.77 <sup>B</sup>
	46					2541.58 <sup>B</sup>	180.06 <sup>B</sup>	0.87 <sup>A</sup>
总能量 GE(kJ/g)								
	20.0					2689.80 <sup>B</sup>	190.43 <sup>B</sup>	0.81
	20.5					2704.58 <sup>B</sup>	192.28 <sup>B</sup>	0.80
	21.0					2805.37 <sup>A</sup>	198.86 <sup>A</sup>	0.79
方差分析 ANOVA (P-value)								
	粗蛋白 CP(%)					0	0	0
	总能量 GE(kJ/g)					0.008	0.017	0.112
	交互作用 Interaction					0.047	0.136	0.504

注:同列数值后不同上标小写、大写英文字母表示差异显著( $P<0.05$ ),同列未标注字母表示无显著差异( $P>0.05$ );下同

Note: Values with different superscripts lowercase letters, capital letters in the same column are significantly different ( $P<0.05$ ), values with no letter or the same letter superscripts are not significantly different ( $P>0.05$ ), the same applies below

表 3 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼蛋白质利用、能量保留率的影响

Tab.3 Effects of different protein and energy levels on protein utilization, energy retention rate of *E. lanceolatus*♂×*E. moara*♀

项目 Items	粗蛋白 CP(%)	总能 GE(kJ/g)	蛋白质沉积率 PDR(%)	蛋白质效率 PER(%)	能量保留率 ERR(%)
D1	54	20.0	19.59±0.48 <sup>b</sup>	229.42±5.97 <sup>c</sup>	15.54±0.19 <sup>c</sup>
D2	54	20.5	19.92±0.62 <sup>b</sup>	231.42±3.19 <sup>c</sup>	17.50±0.45 <sup>ab</sup>
D3	54	21.0	19.89±1.58 <sup>b</sup>	257.90±17.68 <sup>ab</sup>	18.46±1.07 <sup>a</sup>
D4	50	20.0	19.84±0.45 <sup>b</sup>	248.22±5.20 <sup>bc</sup>	16.55±0.59 <sup>bc</sup>
D5	50	20.5	21.92±0.57 <sup>a</sup>	259.22±10.42 <sup>ab</sup>	17.92±0.50 <sup>a</sup>
D6	50	21.0	22.02±0.46 <sup>a</sup>	274.11±12.84 <sup>a</sup>	18.21±0.98 <sup>a</sup>
D7	46	20.0	20.15±0.38 <sup>a</sup>	252.94±8.75 <sup>b</sup>	16.03±0.58 <sup>c</sup>
D8	46	20.5	20.30±0.72 <sup>b</sup>	243.66±8.35 <sup>bc</sup>	15.89±0.40 <sup>c</sup>
D9	46	21.0	20.74±1.14 <sup>b</sup>	251.05±12.73 <sup>b</sup>	16.75±0.49 <sup>bc</sup>
主效应 Main effects					
粗蛋白 CP(%)					
54			19.80 <sup>B</sup>	239.58 <sup>B</sup>	17.50 <sup>A</sup>
50			21.26 <sup>A</sup>	260.52 <sup>A</sup>	17.23 <sup>A</sup>
46			20.40 <sup>B</sup>	249.22 <sup>B</sup>	16.23 <sup>B</sup>
总能 GE(kJ/g)					
20.0			19.86 <sup>B</sup>	243.53 <sup>B</sup>	16.04 <sup>B</sup>
20.5			20.72 <sup>A</sup>	244.77 <sup>B</sup>	17.20 <sup>A</sup>
21.0			20.89 <sup>A</sup>	261.02 <sup>A</sup>	17.71 <sup>A</sup>
方差分析 ANOVA (P)					
粗蛋白 CP(%)			0.001	0.002	0.004
总能 GE(kJ/g)			0	0.003	0.031
交互作用 Interaction			0.018	0.106	0.191

表 4 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼形体指标的影响

Tab.4 Effects of different protein and energy levels on the body index of *E. lanceolatus*♂×*E. moara*♀

项目 Items	粗蛋白 CP(%)	总能 GE(kJ/g)	肝体比 HSI(%)	脏体比 VSI(%)	肥满度 CF
D1	54	20.0	2.54±0.39 <sup>b</sup>	8.20±0.65 <sup>ab</sup>	3.54±1.20 <sup>a</sup>
D2	54	20.5	2.39±0.31 <sup>bc</sup>	7.76±0.51 <sup>bc</sup>	3.34±0.35 <sup>ab</sup>
D3	54	21.0	2.47±0.28 <sup>bc</sup>	7.71±1.43 <sup>bc</sup>	3.27±0.24 <sup>ab</sup>
D4	50	20.0	2.24±0.27 <sup>bc</sup>	7.64±0.59 <sup>bc</sup>	3.12±0.85 <sup>ab</sup>
D5	50	20.5	2.17±0.29 <sup>c</sup>	7.60±0.87 <sup>bc</sup>	3.40±0.41 <sup>ab</sup>
D6	50	21.0	2.23±0.33 <sup>bc</sup>	6.87±0.94 <sup>c</sup>	3.31±0.32 <sup>ab</sup>
D7	46	20.0	2.46±0.28 <sup>bc</sup>	8.01±1.47 <sup>abc</sup>	2.84±0.26 <sup>b</sup>
D8	46	20.5	2.51±0.20 <sup>bc</sup>	8.24±1.26 <sup>ab</sup>	2.96±0.26 <sup>ab</sup>
D9	46	21.0	2.98±0.41 <sup>a</sup>	8.91±1.36 <sup>a</sup>	3.00±0.30 <sup>ab</sup>
主效应 Main effects					
粗蛋白 CP(%)					
54			2.47 <sup>B</sup>	7.89 <sup>AB</sup>	3.39 <sup>A</sup>
50			2.21 <sup>C</sup>	7.37 <sup>B</sup>	3.28 <sup>A</sup>
46			2.65 <sup>A</sup>	8.38 <sup>A</sup>	2.93 <sup>B</sup>
总能 GE(kJ/g)					
20.0			2.41	7.95	3.17
20.5			2.36	7.87	3.24
21.0			2.56	7.83	3.19
方差分析 ANOVA (P)					
粗蛋白 CP(%)			0	0.004	0.011
总能 GE(kJ/g)			0.054	0.914	0.906
交互作用 Interaction			0.04	0.133	0.641

单因素方差分析表明, D6 组蛋白质沉积率和蛋白质效率显著高于其他组( $P<0.05$ ); D9 组肝体比、脏体比显著高于其他组( $P<0.05$ )。

### 2.3 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼全鱼和肌肉成分的影响

由表 5 可知, 蛋白质和能量在云纹龙胆石斑鱼幼鱼全鱼粗脂肪中表现出显著的交互作用( $P<0.05$ )。由主效应分析可知, 当饲料粗蛋白含量升高时, 全鱼粗蛋白含量显著升高( $P<0.05$ ), 水分和粗灰分含量无显著变化( $P>0.05$ ); 饲料能量含量升高时, 水分含量显著降低( $P<0.05$ ), 粗蛋白和粗灰分含量无显著变化( $P>0.05$ )。单因素方差分析表明, D7、D8 和 D9 组粗蛋白含量显著低于其他组( $P<0.05$ ); D1、D2 和 D3 粗脂肪含量显著低于其他组( $P<0.05$ )。粗脂肪含量随饲料蛋白能比的降低呈显著升高趋势( $P<0.05$ )。

由表 6 可知, 蛋白质和能量在云纹龙胆石斑鱼幼鱼的肌肉成分中均无显著交互作用( $P>0.05$ )。由主效

应分析可知, 当饲料粗蛋白含量升高时, 肌肉水分和粗灰分含量显著降低( $P<0.05$ ), 粗蛋白含量显著升高( $P<0.05$ ), 粗脂肪含量先升后降( $P<0.05$ ); 饲料能量含量升高时, 水分和粗灰分含量显著降低( $P<0.05$ ), 粗蛋白含量无显著变化( $P>0.05$ ), 粗脂肪含量显著升高( $P<0.05$ )。

### 2.4 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼消化酶活力的影响

如表 7 所示, 蛋白质和能量在云纹龙胆石斑鱼幼鱼肠道胰蛋白酶、肠道脂肪酶和肠道淀粉酶活力中均表现出显著的交互作用( $P<0.05$ ), 饲料粗蛋白含量为 50%、能量含量为 21.00 kJ/g 时, 胰蛋白酶活力最高; 在能量含量为 21.00 kJ/g 下的所有蛋白质组, 其脂肪酶活力显著高于其他组( $P<0.05$ ); 淀粉酶活力无显著规律。由主效应分析可知, 饲料粗蛋白含量升高时胃蛋白酶活力显著升高( $P<0.05$ ); 能量变化对其无显著影响( $P>0.05$ )。单因素方差分析表明, D6 组胰蛋白酶

表 5 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼全鱼成分的影响

Tab.5 Effects of different protein and energy levels on the whole fish composition of *E. lanceolatus*♂×*E. moara*♀

项目 Items	粗蛋白 CP (%)	总能 GE (kJ/g)	水分 Moisture(%)	粗蛋白 Crude protein(%)	粗脂肪 Crude lipid(%)	粗灰分 Crude ash(%)
D1	54	20.0	71.21±3.15 <sup>a</sup>	62.43±0.42 <sup>b</sup>	21.14±0.64 <sup>c</sup>	14.85±0.56
D2	54	20.5	70.87±0.34 <sup>ab</sup>	62.88±0.43 <sup>ab</sup>	21.77±0.38 <sup>c</sup>	15.14±0.62
D3	54	21.0	71.41±0.40 <sup>ab</sup>	63.70±0.18 <sup>a</sup>	21.47±0.33 <sup>c</sup>	15.52±0.86
D4	50	20.0	69.59±0.56 <sup>a</sup>	61.91±0.91 <sup>b</sup>	22.77±0.28 <sup>b</sup>	15.03±0.54
D5	50	20.5	69.85±1.16 <sup>ab</sup>	62.17±1.03 <sup>b</sup>	22.42±0.69 <sup>b</sup>	15.54±0.59
D6	50	21.0	69.41±0.95 <sup>b</sup>	61.71±0.20 <sup>b</sup>	22.74±0.62 <sup>ab</sup>	15.27±0.21
D7	46	20.0	69.35±1.11 <sup>a</sup>	59.89±0.64 <sup>c</sup>	23.09±0.55 <sup>ab</sup>	15.35±0.57
D8	46	20.5	68.32±0.45 <sup>ab</sup>	59.59±0.90 <sup>c</sup>	24.76±0.61 <sup>a</sup>	15.48±0.73
D9	46	21.0	69.28±0.36 <sup>ab</sup>	60.32±0.90 <sup>c</sup>	23.54±0.60 <sup>a</sup>	14.88±0.50
主效应 Main effects						
粗蛋白 CP(%)						
	54		70.05	63.00 <sup>A</sup>	21.46 <sup>C</sup>	15.14
	50		69.68	61.93 <sup>B</sup>	22.64 <sup>B</sup>	15.28
	46		70.03	59.93 <sup>C</sup>	23.80 <sup>A</sup>	15.24
总能 GE(kJ/g)						
	20.0		71.16 <sup>A</sup>	61.41	22.33	15.08
	20.5		69.62 <sup>B</sup>	61.55	22.58	15.39
	21.0		68.99 <sup>B</sup>	61.91	22.98	15.23
方差分析 ANOVA (P)						
	粗蛋白 CP(%)		0.782	0	0	0.067
	总能 GE(kJ/g)		0.005	0.308	0.311	0.503
	交互作用 Interaction		0.874	0.325	0	0.308

表 6 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼肌肉成分的影响

Tab.6 Effects of different protein and energy levels on the muscle composition of *E. lanceolatus*♂×*E. moara*♀

项目 Items	粗蛋白 CP(%)	总能 GE(kJ/g)	水分 Moisture (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	粗脂肪 Crude lipid (%)	粗灰分 Crude ash (%)
D1	54	20.0	76.32±0.20	84.91±0.36	6.30±0.48	5.63±0.11
D2	54	20.5	76.61±0.37	85.24±0.28	6.88±0.24	5.44±0.23
D3	54	21.0	77.11±0.24	85.50±0.57	6.24±0.63	5.46±0.54
D4	50	20.0	75.69±0.20	84.60±0.30	7.66±0.43	5.28±0.11
D5	50	20.5	76.41±0.13	85.44±0.39	7.83±0.47	5.38±0.10
D6	50	21.0	76.78±0.36	85.86±0.39	6.92±0.32	5.54±0.29
D7	46	20.0	75.60±0.31	85.51±0.47	8.43±0.17	5.21±0.11
D8	46	20.5	75.99±0.29	85.07±0.12	9.02±0.31	5.40±0.13
D9	46	21.0	76.34±0.23	84.76±0.57	7.65±0.40	5.43±0.13
主效应 Main effects						
粗蛋白 CP(%)						
54			75.87 <sup>C</sup>	86.78 <sup>A</sup>	7.46 <sup>B</sup>	5.38 <sup>B</sup>
50			76.34 <sup>B</sup>	86.26 <sup>A</sup>	7.91 <sup>A</sup>	5.41 <sup>B</sup>
46			76.74 <sup>A</sup>	84.92 <sup>B</sup>	6.94 <sup>C</sup>	5.56 <sup>A</sup>
总能 GE(kJ/g)						
20.0			76.68 <sup>A</sup>	86.75	6.47 <sup>C</sup>	5.59 <sup>A</sup>
20.5			76.29 <sup>B</sup>	85.12	7.47 <sup>B</sup>	5.39 <sup>B</sup>
21.0			75.98 <sup>C</sup>	86.09	8.37 <sup>A</sup>	5.37 <sup>B</sup>
方差分析 ANOVA (P)						
粗蛋白 CP(%)			0	0.025	0	0.001
总能 GE(kJ/g)			0	0.06	0	0
交互作用 Interaction			0.644	0.435	0.09	0.06

表 7 不同蛋白质和能量含量饲料对云纹龙胆石斑鱼幼鱼消化酶活力的影响

Tab.7 Effects of dietary protein and energy levels on the activity of digestive enzymes of *E. lanceolatus*♂×*E. moara*♀

项目 Items	粗蛋白 CP(%)	总能 GE (kJ/g)	胃蛋白酶 Pepsin (U/mg prot)	胰蛋白酶 Trypsin (U/mg prot)	脂肪酶 Lipase (U/mg prot)	淀粉酶 Amylase (U/mg prot)
D1	54	20.0	213.90±16.21 <sup>a</sup>	4025.67±410.60 <sup>c</sup>	132.82±6.34 <sup>c</sup>	0.65±0.07 <sup>a</sup>
D2	54	20.5	198.67±15.89 <sup>a</sup>	4068.12±49.63 <sup>c</sup>	128.38±8.45 <sup>c</sup>	0.63±0.11 <sup>a</sup>
D3	54	21.0	196.08±3.50 <sup>a</sup>	4060.66±61.28 <sup>c</sup>	222.68±10.63 <sup>a</sup>	0.44±0.00 <sup>b</sup>
D4	50	20.0	209.10±12.91 <sup>a</sup>	4197.31±170.94 <sup>c</sup>	105.72±12.96 <sup>c</sup>	0.67±0.05 <sup>a</sup>
D5	50	20.5	213.33±11.55 <sup>a</sup>	4621.34±132.08 <sup>c</sup>	173.46±11.83 <sup>b</sup>	0.47±0.02 <sup>b</sup>
D6	50	21.0	209.10±4.37 <sup>a</sup>	6038.60±321.80 <sup>a</sup>	226.88±15.08 <sup>a</sup>	0.51±0.02 <sup>b</sup>
D7	46	20.0	174.43±9.20 <sup>b</sup>	3605.64±150.17 <sup>b</sup>	119.48±16.97 <sup>c</sup>	0.57±0.02 <sup>ab</sup>
D8	46	20.5	167.00±8.19 <sup>b</sup>	3242.02±74.93 <sup>b</sup>	160.80±27.24 <sup>b</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>
D9	46	21.0	195.26±15.87 <sup>a</sup>	3026.21±138.48 <sup>b</sup>	199.72±19.54 <sup>a</sup>	0.57±0.02 <sup>ab</sup>
主效应 Main effects						
粗蛋白 CP(%)						
54			202.88 <sup>A</sup>	4051.48 <sup>B</sup>	161.29	0.56
50			210.51 <sup>A</sup>	4689.53 <sup>A</sup>	168.69	0.54
46			178.90 <sup>B</sup>	3256.07 <sup>C</sup>	160.00	0.53
总能 GE(kJ/g)						
20.0			199.14	3834.84 <sup>B</sup>	119.34 <sup>C</sup>	0.62 <sup>A</sup>
20.5			193.00	3854.94 <sup>B</sup>	154.21 <sup>B</sup>	0.51 <sup>B</sup>
21.0			200.15	4307.31 <sup>A</sup>	216.43 <sup>A</sup>	0.50 <sup>B</sup>
方差分析 ANOVA (P)						
粗蛋白 CP(%)			0	0	0.093	0.183
总能 GE(kJ/g)			0.398	0	0	0
交互作用 Interaction			0.052	0	0	0

活力显著高于其他组( $P<0.05$ ); D3、D6 和 D9 组脂肪酶活力显著高于其他组( $P<0.05$ )。胰蛋白酶活力随饲料蛋白能比的降低呈现先升后降的趋势( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长的影响

本研究通过对一定生长阶段云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长、体组成及消化酶活力等的研究,获得了其饲料中的适宜蛋白质和能量含量,确定了设定范围内(22.04~26.87 mg/kJ)云纹龙胆石斑鱼幼鱼的适宜蛋能比。由实验结果可知,增重量受蛋白质和能量交互影响显著,本质上是蛋能比对其生长产生的影响。蛋能比作为影响鱼类摄食效率的重要因素之一,适宜程度受鱼体种类、大小及生长阶段的影响(蒋湘辉等, 2010),蛋能比过高,容易造成蛋白质能源的浪费,鱼体摄入能量不足,影响其新陈代谢,生长减缓;蛋能比过低,基础代谢水平降低,生长所需物质来源不足,生长减缓。在 Rahimnejad 等(2015)的研究结果中,珍珠龙石斑鱼(*E. lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)幼鱼适宜蛋能比为 23.90 mg/kJ。在宋林等(2013)的研究结果中,翘嘴鲌幼鱼适宜蛋能比为 27.15 mg/kJ。

本研究中,随着饲料粗蛋白含量的升高(46%升至 50%),实验鱼增重量、增重率、特定生长率均有显著提高,饲料系数显著降低( $P<0.05$ ),而继续提高饲料中蛋白质含量(50%升至 54%),鱼体生长和饲料系数则不再有显著变化,这与 Deng 等(2011)、丁立云等(2010)、向泉等(2012)及张静等(2016)的研究结果相似。蛋白质作为机体重要组成成分,其含量水平往往对鱼体生长产生重要影响(Tuan *et al.*, 2007),石斑鱼对蛋白质的需求为 40%~55%(Luo *et al.*, 2004; Shapawi *et al.*, 2014; 林建斌等, 2008; 邱金海, 2009)。饲料中添加适宜蛋白质有利于鱼体消化吸收,而蛋白质含量不足或过高都将影响鱼体对其的正常利用(Shiau *et al.*, 1996; Teng *et al.*, 1978; 蒋湘辉等, 2016)。本研究中,蛋白质效率、蛋白质沉积率随饲料蛋白质含量的升高(46%升至 54%)呈先升后降的趋势,原因可能是当蛋白质含量不足时,鱼体摄入蛋白将首先用于维持体重,使得增重量相对减少;蛋白质含量过多,饲料中非蛋白能量来源不足,部分饲料蛋白质将转化为能量供鱼体利用。由本研究结果可知,当饲料粗蛋白含量为 50%时,云纹龙胆石斑鱼幼鱼的蛋白质利用程度最高,这与先前所报道的斜带石斑鱼(Luo *et al.*, 2004)、点带石斑鱼(Chen *et al.*, 1994)和褐点石斑鱼

(*E. fuscoguttatus*) (Shapawi *et al.*, 2014)研究结果类似,但低于驼背鲈(*Chromileptes altivelis*)(Usman *et al.*, 2005)和拿骚石斑鱼(*E. striatus*) (Ellis *et al.*, 1996)的研究结果,原因可能是由于实验鱼体种类、大小、实验设计及养殖环境不同等造成的。

能量是维持一切生命活动的源泉(崔奕波, 1989)。鱼类从饲料中摄取能量,经体内消化吸收等一系列代谢活动后,大部分能量将首先用于维持正常的生命体征,只有 30%左右的能量用于生长(余连渭, 2003)。由表 2 可知,当饲料能量含量逐渐上升时,其增重量、增重率和特定生长率均稳定提升,而饲料系数逐渐下降,说明本研究所设计能量含量(20.00~21.00 kJ/g)在云纹龙胆石斑鱼幼鱼耐受范围之内。研究表明,适宜能量范围内,鱼类的生长速度和饲料能量存在正相关性(Ali *et al.*, 2005; Shiau *et al.*, 2001)。蛋白质效率、蛋白质沉积率随饲料能量含量的升高有一定升高趋势,这表明适当提高饲料中能量含量,不仅不会影响云纹龙胆石斑鱼幼鱼的生长速度,同时还可以提高其对蛋白质的利用率和保留率,起到了能量对蛋白质的节约效应(彭士明等, 2005)。能量保留率随饲料能量含量升高而升高,说明鱼体内非蛋白物质能量供应充足,这有利于减少鱼体对蛋白质分解供能的需求,同样的结果在陈佳毅等(2008)对梭鲈鱼(*Lucioperca lucioperca*)的研究中亦有发现。当饲料能量逐渐上升时,肝体比略有增加,而脏体比差异不显著,说明本实验所设计能量梯度对脏器相对质量影响较小。实验结果显示,当饲料中能量含量为 21.00 kJ/g 时,云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长较好,与 Rahimnejad 等(2015)对珍珠龙胆石斑鱼最适能量需求量的结果(20.90 kJ/g)类似,高于刘永坚等(2002)红姑鱼(*Sciaenops ocellatus*)的结果(14.79 kJ/g),原因可能是由于实验鱼体种类、摄食习惯及养殖环境等不同造成的。

#### 3.2 饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼体成分的影响

由研究结果可知,全鱼粗脂肪含量受蛋白质和能量的交互作用影响显著,其含量随饲料蛋能比的降低而升高,这表明饲料中过量的能量被鱼体转化为脂肪并沉积。蛋白质和脂肪在鱼体内互相转化,鱼体摄入适量脂肪,保证其对能量的需求,避免或减少蛋白质作为供能物质的分解,有利于机体的氮平衡和增加氮的储留量。当蛋白质和能量含量升高时,全鱼粗蛋白和粗脂肪含量升高,这在 Jiang 等(2015)对珍珠龙胆石斑鱼的研究结果中亦有发现。

饲料中适宜蛋白质含量利于肌肉成分的改善,当

蛋白质含量为50%时,粗脂肪含量较高,水分含量较低,这对肉质评价将起到一定积极作用。摄食水平的合理性可影响鱼体组成,饲料中脂肪被鱼体吸收后会在肠、肠系膜等处沉积,经消化系统的作用可影响肝脏中的脂肪含量(周兴华等,2007),而肝脏作为鱼体内重要的消化器官,其功能的正常与否往往决定着鱼体的健康程度,因此,保持适宜的摄食水平将有利于鱼体更好生长(黄庆达等,2013)。饲料能量含量对鱼体水分影响较大(Du *et al.*, 2005),提高饲料中能量含量,帮助鱼体减缓对脂肪分解供能的需求,使得肌肉中保持一定的脂肪贮存量,一定程度上可提高鱼体对环境的耐受力(成永旭等,1995)。

### 3.3 饲料蛋白质和能量含量对云石斑鱼消化酶活力的影响

本研究中蛋白质和能量在胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力中均表现出显著的交互作用,且胰蛋白酶活力随饲料蛋能比降低表现出先升后降趋势,说明饲料中适宜的蛋能比可在一定程度上刺激消化酶的分泌,提高鱼体对各营养成分的分解利用率,促进鱼体消化吸收。

蛋白酶复杂的调节机制可限制饲料中高蛋白的分解效率,当饲料中蛋白质含量逐渐上升时,云纹龙胆石斑鱼幼鱼胃蛋白酶和胰蛋白酶活力显著增强,这可能是由于饲料中蛋白质含量增加时,底物水平升高,进而促进了酶的活力(Giri *et al.*, 2003),类似结果见于李贵锋等(2012)对建鲤幼鱼(*Cyprinus carpio* Jian)的研究;当蛋白质含量继续升高时,胃蛋白酶活力有所下降但不显著,胰蛋白酶活力显著降低,表明饲料中蛋白质含量一旦超出某种界限,云纹龙胆石斑鱼幼鱼对蛋白质的消化能力不仅不会增强,还有可能减弱。胰蛋白酶活力随饲料能量含量升高而显著升高,当饲料粗蛋白含量为50%,能量含量为21.00 kJ/g,蛋能比为23.61 mg/kJ时,其活力最强,原因可能是饲料的成分能够显著影响鱼体内环境,适宜摄食水平可显著改善鱼体生长状况,胰蛋白酶作为特异性最强的蛋白酶对内环境变化较为敏感(张美红等,2006),可对摄食体系的变化作出有效应答。胰蛋白酶活力较胃蛋白酶活力高数倍,类似结果见于陈壮等(2014)对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)的研究,原因可能是本实验中胰蛋白酶测定样品取自肠道前中部,胃蛋白酶测定样品取自胃部,而肠道作为鱼体消化主要场所,其功能结构更易于酶的催化作用,因而2种蛋白酶活力差距较大。

饲料蛋白质含量对鱼体脂肪酶影响较小,但当能

量含量逐渐升高时,脂肪酶活力显著增强,原因可能是本研究通过调节鱼油构建能量梯度,其成分中大量的脂肪使得底物面积改变,进而对脂肪酶活力产生一定影响。

本研究中淀粉酶活力较低,说明云纹龙胆石斑鱼幼鱼对碳水化合物的消化和代谢能力较差,这在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的研究成果中亦有发现(余连渭,2003)。

## 4 结论

饲料适宜蛋白质和能量含量不仅可以显著改善鱼体生长状况,而且可以起到节约蛋白质、提高生产率的作用,云纹龙胆石斑鱼幼鱼配合饲料中最佳蛋白质含量为50%,能量含量为21.00 kJ/g,蛋能比为23.61 mg/kJ。

## 参 考 文 献

- Ali MZ, Jauncey K. Approaches to optimizing dietary protein to energy ratio for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture Nutrition*, 2005, 11(2): 95–101
- Chen HY, Tsai JC. Optimal dietary protein level for the growth of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed semipurified diets. *Aquaculture*, 1994, 119(2–3): 265–271
- Chen Z, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* Impact of dietary protein level on growth performance, body composition and protease activity of juvenile *Lateolabrax japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 51–59 [陈壮, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 饲料蛋白水平对鲈鱼生长、体组成及蛋白酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 51–59]
- Cheng YX, Wang LH, Chen JM. Effects of different adipose sources in feed on growth and muscle and liver fat content of grass carp. *Fisheries Science & Technology Information*, 1995(4): 171–172 [成永旭, 王联合, 陈居明. 饲料中不同脂肪源对草鱼生长及其肌肉和肝脏脂肪含量的影响. *水产科技情报*, 1995(4): 171–172]
- Cui YB. Bioenergetics of fishes: Theory and methods. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1989, 13(4): 369–383 [崔奕波. 鱼类生物能量学的理论与方法. *水生生物学报*, 1989, 13(4): 369–383]
- Deng DF, Ju ZY, Dominy W, *et al.* Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture*, 2011, 316(1): 25–30
- Ding LY, Zhang LM, Wang JY, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, body composition and plasma biochemistry indices of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1285–1292 [丁立云, 张利民, 王际英, 等. 饲料蛋白水平对星斑川鲈幼鱼生长、体组成及血浆生化指标的影响. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1285–1292]
- Du ZY, Liu YJ, Tian LX, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 2005, 11(2): 139–146



- Ellis S, Viala G, Watanabe WO. Growth and feed utilization of hatchery-reared juvenile Nassau grouper fed four practical diets. *Progressive Fish-Culturist*, 1996, 58(3): 167–172
- Giri SS, Sahoo SK, Sahu AK, *et al.* Effect of dietary protein level on growth, survival, feed utilization and body composition of hybrid *Clarias catfish* (*Clarias batrachus*×*Clarias gariepinus*). *Animal Feed Science & Technology*, 2003, 104(1–4): 169–178
- Huang QD, Zhang YR, Wang W, *et al.* Chemical composition in juvenile *Ctenopharyngodon idellus* at different body length. *Journal of Southwest University (Natural Science)*, 2013, 35(2): 41–45 [黄庆达, 张玉蓉, 王文, 等. 不同体长草鱼幼鱼鱼体化学组成的研究. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(2): 41–45]
- Jiang ST, Wu XY, Li WF, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization, body and plasma biochemical compositions of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂×*Epinephelus fuscoguttatus*♀) juveniles. *Aquaculture*, 2015, 446: 148–155
- Jiang XH, Liu G, Jin GH, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of *Ctenopharyngodon idellus*. *Chinese Journal Fisheries*, 2010, 23(1): 24–27 [蒋湘辉, 刘刚, 金广海, 等. 饲料蛋白质和能量水平对草鱼生长和鱼体组成的影响. *水产学杂志*, 2010, 23(1): 24–27]
- Jiang XH, Luo XN, Jin GH, *et al.* Effects of different protein and lipid level diets on growth, body composition and immunity of juvenile *Phoxinus lagowskii*. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2016, 28(3): 864–871 [蒋湘辉, 骆小年, 金广海, 等. 不同蛋白质和脂肪水平饲料对拉氏幼鱼生长、体成分和免疫力的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(3): 864–871]
- Jobling M. *Fish bioenergetics*. Great Britain: Edmundsbury Press, 1994
- Lee SM, Kim KD. Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 2005, 11(6): 435–442
- Li GF, Jiang GZ, Liu WB, *et al.* Effects of dietary protein and energy levels on growth performance, body composition and digestive enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(2): 225–232 [李贵锋, 蒋广震, 刘文斌, 等. 不同蛋白质和能量水平对建鲤幼鱼生长性能、体组成和消化酶活性的影响. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(2): 225–232]
- Lin JB, Li JQ, Zhu QG. Effects of different protein levels and different energy-protein ratios in the diet on growth of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2008, 17(1): 88–92 [林建斌, 李金秋, 朱庆国. 不同蛋白水平和不同能量蛋白比饲料对点带石斑鱼生长的影响. *上海海洋大学学报*, 2008, 17(1): 88–92]
- Liu YJ, Liu DH, Tian LX, *et al.* Effect of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of juvenile *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(3): 242–246 [刘永坚, 刘栋辉, 田丽霞, 等. 饲料蛋白质和能量水平对红姑鱼生长和鱼体组成的影响. *水产学报*, 2002, 26(3): 242–246]
- Luo Z, Liu YJ, Mai KS, *et al.* Optimal dietary protein requirement of grouper *Epinephelus coioides* juveniles fed isoenergetic diets in floating net cages. *Aquaculture Nutrition*, 2004, 10(4): 247–252
- Peng SM, Chen LQ, Ye JY, *et al.* Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile black seabream, *Sparus macrocephalus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(4): 465–470 [彭士明, 陈立侨, 叶金云, 等. 饵料蛋白能量比对黑鲷幼鱼生长和体成分的影响. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 465–470]
- Qiu JH. Effects of the dietary protein level and energy-protein ratio on the growth of the juvenile *Centropristis striata*. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2009, 44(4): 50–57 [邱金海. 饲料蛋白水平和能蛋白比对美洲黑石斑幼鱼生长的影响. *甘肃农业大学学报*, 2009, 44(4): 50–57]
- Rahimnejad S, Bang IC, Park JY, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*×*E. lanceolatus*. *Aquaculture*, 2015, 446: 283–289
- Shapawi R, Ebi I, Yong A, *et al.* Optimizing the growth performance of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk.) by varying the proportion of dietary protein and lipid levels. *Animal Feed Science & Technology*, 2014, 191(5): 98–105
- Shiau SY, Lan CW. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture*, 1996, 145(1–4): 259–266
- Shiau SY, Lin YH. Carbohydrate utilization and its protein-sparing effect in diets for grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Animal Science (Penicuik, Scotland)*, 2001, 73(2): 299–304
- Song L, Fan QX, Hu PR, *et al.* Effects of dietary protein to energy ratio on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile topmouth culter, *Culter alburnus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(7): 1480–1487 [宋林, 樊启学, 胡培培, 等. 饲料蛋白比对翘嘴鲈幼鱼生长性能、肠道和肝胰脏消化酶活性的影响. *动物营养学报*, 2013, 25(7): 1480–1487]
- Teng SK, Chua TE, Lim PE. Preliminary observation on the dietary protein requirement of estuary grouper, *Epinephelus salmoides*, Maxwell, cultured in floating net-cages. *Aquaculture*, 1978, 15(3): 257–271
- Tuan LA, Williams KC. Optimum dietary protein and lipid specifications for juvenile malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture*, 2007, 267(1–4): 129–138
- Usman, Rachmansyah, Laining A, *et al.* Optimum dietary protein and lipid specifications for grow-out of humpback grouper *Cromileptes altivelis* (Valenciennes). *Aquaculture Research*, 2005, 36(13): 1285–1292
- Wang JY, Zhang DR, Ma JJ, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation of *Epinephelus fuscoguttatus*×*E. lanceolatus* muscles. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(4): 61–69 [王际英, 张德瑞, 马晶晶, 等. 珍珠龙胆石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. *海洋湖沼通报*, 2015(4): 61–69]
- Xiang X, Zhou XH, Chen J, *et al.* Effects of dietary protein and animal protein levels on growth, body composition and digestive enzyme activities of juvenile prenan's schizothoracin (*Schizothorax prenanti*). *Journal of The Chinese Cereals and Oils Association*, 2012, 27(5): 74–80 [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料蛋白水平及鱼粉蛋白含量对齐口裂腹鱼生长、体组成及消化酶活性的影响. *中国粮油学报*, 2012, 27(5):

- 74–80]
- Yang JM, Wang AL, Huo X, *et al.* Advances in research on utilization of fat-saving proteins in fish. *Journal of Aquatic Ecology*, 2006, 26(1): 74–76 [杨建梅, 王安利, 霍湘, 等. 鱼类利用脂肪节约蛋白的研究进展. *水生态学杂志*, 2006, 26(1): 74–76]
- Zhang J, Gao TT, Li Y, *et al.* Effects of the protein level on the growth, ammonia-nitrogen excretion, and amino acid accumulation in the muscle of industrially-cultured juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 34–41 [张静, 高婷婷, 李勇, 等. 蛋白营养对工业养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的效应. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 34–41]
- Zhang MH, Hu CJ, Li YW. Research progress of fish trypsin in China and abroad. *Feed Industry*, 2006(2): 29–30 [张美红, 胡重江, 李英文. 国内外关于鱼类胰蛋白酶的研究进展. *饲料工业*, 2006(2): 29–30]
- Zhou XH, Zheng SG, Wu Q, *et al.* The optimum nutrient requirements and energy-protein ratio in formulated feed in juvenile *Schizothorax prenanti*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, 22(1): 37–41 [周兴华, 郑曙明, 吴青, 等. 齐口裂腹鱼幼鱼饲料中营养素适宜含量和最适能量蛋白比的研究. *大连海洋大学学报*, 2007, 22(1): 37–41]

(编辑 冯小花)

## Effects of Dietary Protein and Energy Levels on Growth, Body Composition and Digestive Enzymes Activities of Juvenile Hybrid Grouper, *Epinephelus lanceolatus*♂×*E. moara*♀

GONG Xupeng<sup>1,2</sup>, LI Baoshan<sup>2</sup>, ZHANG Limin<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, WANG Jiying<sup>2①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006)

**Abstract** In order to investigate the optimal dietary protein and energy levels of a new juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. moara*♀), nine diets were formulated containing three dietary protein levels (46%, 50% and 54% crude protein) and three dietary energy levels (20.00 kJ/g, 20.50 kJ/g and 21.00 kJ/g gross energy), the dietary protein-energy ratio was in the range of 22.04 to 26.87 mg/kJ. Juvenile grouper averaging (46.23±0.51) g were fed the test diets for 56 days. The results indicated that the interaction between protein and energy had a significant effect on the weight gain (WG) of grouper ( $P<0.05$ ), the weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) increased with increasing of dietary protein and energy levels ( $P<0.05$ ). Protein deposition rate (PDR) and hepatosomatic index (HSI) were significantly affected by the interaction between protein and energy ( $P<0.05$ ). The energy retention rate (ERR) and condition factor (CF) increased with increasing of dietary protein levels ( $P<0.05$ ), while the protein efficiency ratio (PER) increased first and decreased afterwards ( $P<0.05$ ). The PER and ERR increased with increasing of dietary energy levels ( $P<0.05$ ). PDR and PER of D6 group were significantly higher than other groups ( $P<0.05$ ). The interaction of protein and energy had no significant effects on moisture, crude protein and crude ash of whole fish and muscle ( $P>0.05$ ). The crude protein of whole fish and muscle increased with increasing of dietary protein levels ( $P>0.05$ ). Moisture decreased with increasing of dietary energy levels ( $P<0.05$ ). Crude fat of whole fish increased with decreasing of dietary protein-energy ratio ( $P<0.05$ ). The interaction of protein and energy had significant effect on the activities of trypsin, lipase and amylase ( $P<0.05$ ). The pepsin activity increased with increasing of dietary protein levels ( $P<0.05$ ), and dietary energy levels had no significant effect on it ( $P>0.05$ ). The trypsin activity of D6 group was significantly higher than other groups ( $P<0.05$ ), which increased first and then decreased with decreasing of dietary protein-energy ratio ( $P<0.05$ ). The lipase activity of fish fed diets containing 21.00 kJ/g energy was significantly higher than other groups ( $P<0.05$ ). According to these results, a diet containing 50% protein and 21.00 kJ/g energy was recommended for efficient growth of juvenile hybrid grouper.

**Key words** *Epinephelus lanceolatus*♂×*E. moara*♀; Protein; Energy; Protein-energy ratio; Body composition; Digestive enzyme

① Corresponding author: WANG Jiying, E-mail: ytwjy@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170101001

http://www.yykxjz.cn/

王贞杰, 叶保民, 常青, 陈四清, 刘长琳, 胡建成, 王志军. 维生素 C 对圆斑星鲈早期发育的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 96-103

Wang ZJ, Ye BM, Chang Q, Chen SQ, Liu CL, Hu JC, Wang ZJ. Effects of vitamin C on early development of spotted halibut (*Verasper variegatus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 96-103

## 维生素 C 对圆斑星鲈早期发育的影响\*



王贞杰<sup>1,2</sup> 叶保民<sup>3</sup> 常 青<sup>1</sup> 陈四清<sup>1①</sup> 刘长琳<sup>1</sup> 胡建成<sup>1</sup> 王志军<sup>4</sup>

(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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 辽宁省海洋与渔业厅 沈阳 110000;

4. 山东科合海洋高技术有限公司 威海 264500)

**摘要** 本研究旨在探究维生素 C(V<sub>C</sub>)对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)早期发育中孵化率、出膜率和成活率的影响,对其消化酶和脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)及肝脂酶(Hepatic Lipase, HL)的影响。实验用圆斑星鲈为人工受精卵,分为 5 组,孵化水体 V<sub>C</sub> 浓度分别为 0、20、25、30 和 35 mg/L,分别在成熟卵、受精卵、原肠中期、晶体出现期、内源营养期(2 日龄)、混合营养期(6 日龄)及外源营养期(9 日龄)取样。记录圆斑星鲈的出膜时间、出膜率和成活率,测定对照组和生长指标优越组的消化酶活性和 2 种酯酶的活性。结果显示,25 mg/L 的 V<sub>C</sub> 能显著提高圆斑星鲈的出膜率和成活率,并缩短出膜时间( $P < 0.05$ )。V<sub>C</sub> 能促进圆斑星鲈早期发育过程中蛋白质的沉积。外源营养期后,胃蛋白酶活性显著提高( $P < 0.05$ ),淀粉酶活性在混合营养期显著提高( $P < 0.05$ ),脂肪酶和胰蛋白酶活性在内源营养期就显著提高( $P < 0.05$ )。25 mg/L V<sub>C</sub> 溶液浸泡使圆斑星鲈胚胎发育过程中的 LPL 和 HL 比活力显著升高( $P < 0.05$ )。合子中的 LPL 和 HL 基因可能在原肠期开始表达,合成脂质水解酶分解脂质,为胚胎发育供能。研究表明,圆斑星鲈成熟卵受精后脂肪酶和胰蛋白酶酶优先发挥作用,分解卵黄中的碳水化合物为胚胎发育迅速提供能量。25 mg/L 的 V<sub>C</sub> 能显著提高消化酶活性,并促进蛋白质的沉积,有利于孵化成活的 V<sub>C</sub> 浓度可以显著促进圆斑星鲈早期发育的脂质代谢。

**关键词** 圆斑星鲈; 早期发育; 维生素 C; 消化酶; 脂酶

**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0096-08

维生素 C(Vitamin C)俗称抗坏血酸,是动物生长、生产及维持正常的生理机能所必需的微量营养素,具有广泛的生理和免疫调节作用,对动物快速生长起促进作用(颀志刚等, 2003)。目前,针对鱼类生长补充维生素的方法有 2 种,对于胚胎期和卵黄囊期的仔稚鱼补充维生素等营养物质的途径为水体浸泡(季延滨等, 2007); 对于已经开口摄食的鱼类,可以在饲料中

添加 Vc。目前,关于 Vc 对鱼类的生长和生理影响的研究报道均在成鱼(谢全森等, 2008),而研究在孵化水体添加 Vc 对胚胎和卵黄囊仔鱼的影响的报道较少。已有研究表明,适宜的 Vc 为受精卵提供营养补偿,对鱼类的早期发育有促进作用,可以显著提高受精卵孵化率和仔稚鱼的成活率(李俊霞, 2007)。季延斌等(2007)研究表明,刚出膜的六须鲶(*Silurus glanis*)仔鱼

\* 山东省自主创新成果转化专项(2013ZHXX2A0803)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-03)共同资助[This work was supported by Shandong Special Independent Innovation Achievements (2013ZHXX2A0803), and Aoshan Science and Technology Innovation Plan (2015ASKJ02-03)]. 王贞杰, E-mail: 1218370725@qq.com

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-01, 收修改稿日期: 2017-02-28

浸泡在添加 40 mg/L 的 Vc 孵化水体中, 可以使仔鱼开口摄食的时间提前 8 h, 其成活率也由自然孵化条件下的 5%~20% 提高至 70%; 薛凌展(2008)研究也表明, 水体中添加 0.09 g/L 的 Vc 可使栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的孵化率显著提高。可见, 胚胎及仔鱼可以吸收孵化水体中的 Vc, Vc 可为鱼类胚胎生长发育提供营养需求, 促进早期发育。熊铎龙等(2014)研究表明, 30 mg/L 的 Vc 可显著提高晋安银鲫(*Carassius auratus*)的孵化率、成活率及卵黄囊仔稚鱼的生长速度。

圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)主要分布在我国黄渤海, 韩国和日本的北部沿海。圆斑星鲈肉质细嫩、味道鲜美, 耐低温, 具有较强抗病力, 生长速度快, 是重要的经济养殖鱼种。由于人工饲养下的圆斑星鲈排卵周期不稳定, 受精率比其他鱼种较低, 对于提高孵化阶段的孵化率和卵黄囊期的成活率有待提高。本研究将 Vc 添加到圆斑星鲈的孵化水体中, 旨在探究 Vc 对圆斑星鲈早期发育的影响, 为提高该鱼的孵化率、成活率和营养消化能力提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验于 2016 年 5 月在山东科合海洋高技术有限公司进行。选用全长为 30~50 cm、体重为 1.2~3.0 kg 的 4 龄圆斑星鲈亲鱼。挑选可挤出乳白色精液的雄性亲鱼, 用吸管取其精液, 用 0.9% 生理盐水稀释; 挑选腹部膨大、肛门突出的雌性亲鱼, 挤出成熟卵。挤出的卵立即滴入数滴稀释精液, 轻轻搅拌, 使精卵均匀混合, 2~3 min 后洗净, 将受精卵置于 2 L 烧杯中孵化。孵化水温为 (11.5±0.5) °C, 出膜后水温升高至 (14.5±0.5) °C。每 8 h 全部换同一温度的新水。实验 Vc 质量浓度为 0、20、25、30 和 35 mg/L, 每组分别设 3 个重复。水体中受精卵的平均密度为 1000 粒/L, 开口后投喂轮虫。受精卵发育过程使用显微镜 4 倍下进行连续观察, 并记录发育的时间和时期。实验的取样点标准为 50% 的仔鱼发育至某个时期。实验仔鱼的内源营养期为 1~5 日龄仔鱼, 混合营养期为 5~8 日龄仔鱼, 外源营养期为 9 日龄仔鱼。因此, 在成熟卵、受精卵、原肠中期、晶体出现期、内源营养期(2 日龄)、混合营养期(6 日龄)及外源营养期(9 日龄) 7 个时期分别取样。将样品置于 1.5 ml 的 Eppendoff 管中, 于 -80 °C 冰箱保存。

### 1.2 样品制备

选取最优仔稚鱼出膜时间、出膜率和成活率的

Vc 浓度 25 mg/L 组和对照组的样品进行指标测定。取不同胚胎时期的样品加入 10 倍体积(*W/V*) 预冷双蒸水, 冰浴匀浆, 4000 r/min、4 °C 离心 20 min 后取上清液, 置于 4 °C 冰箱中保存备用, 24 h 内测定完毕。

### 1.3 酶活测定

酶液蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定。脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)、胃蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性均采用南京建成生物技术有限公司试剂盒测定。总脂酶活性(GE)=脂蛋白脂酶活性+肝脂酶活性。

### 1.4 体重和全长的测定方法

用电子天平称量体重, 每次称量 100 尾, 取平均值。显微镜下通过目微尺测定全长, 每次测量 50 尾, 取平均值。体重和全长均测定 3 次。

### 1.5 数据分析

实验结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因子方差分析(One-way ANOVA),  $P < 0.05$  为差异显著, 采用 Duncan 氏多重比较检验。

## 2 结果

### 2.1 Vc 对圆斑星鲈出膜时间、孵化率和仔鱼成活率的影响

随着孵化水体中 Vc 浓度的增加, 圆斑星鲈仔鱼的出膜时间缩短, 孵化率和成活率得到提高(表 1)。Vc 浓度在 30 mg/L 时, 仔鱼出膜时间最短, 比对照组缩短了 5.5 h; Vc 浓度在 20 mg/L 时, 孵化率显著高于其他各组( $P < 0.05$ ); Vc 浓度在 25~30 mg/L 时, 成活率显著高于其他各组( $P < 0.05$ ); 当 Vc 浓度大于 30 mg/L 时, 高浓度 Vc 对圆斑星鲈胚胎及仔鱼孵化率和成活率表现出抑制。

### 2.2 Vc 对圆斑星鲈仔稚鱼全长和体重的影响

Vc 对圆斑星鲈仔稚鱼全长的影响显著(表 2)。同一发育时期, 随 Vc 浓度增加仔稚鱼全长增加, Vc 浓度高于 30 mg/L 时, 全长增长速度表现出抑制。Vc 浓度在 25 mg/L 时, 仔稚鱼各时期全长最长, 并显著高于对照组( $P < 0.05$ )。随着 Vc 浓度增加, 不同发育时期的全长增长幅度比对照组显著增大( $P < 0.05$ ), 外源营养期的仔稚鱼在 25 mg/L 时, 全长增长幅度最大。Vc 浓度高于 30 mg/L 时, 增长幅度与对照组无显著

表1 Vc对圆斑星鲈出膜时间、孵化率和成活率的影响

Tab.1 The effect of vitamin C on the hatching time, hatching ratio and survival rate of *V. variegatus* larvae (n=3)

项目 Items	Vc 浓度 Vc concentration (mg/L)				
	0	20	25	30	35
出膜时间 Hatching time (h)	163.66±1.52 <sup>a</sup>	159.00±1.00 <sup>c</sup>	153.00±1.00 <sup>b</sup>	152.43±0.57 <sup>b</sup>	162.00±1.73 <sup>a</sup>
孵化率 Hatching rate (%)	34.03±2.43 <sup>a</sup>	46.63±1.04 <sup>b</sup>	44.36±0.81 <sup>bc</sup>	43.93±1.43 <sup>c</sup>	29.80±0.55 <sup>d</sup>
成活率 Survival rate (%)	71.30±1.05 <sup>a</sup>	70.93±0.55 <sup>a</sup>	81.95±1.22 <sup>b</sup>	81.96±2.15 <sup>b</sup>	67.83±1.26 <sup>c</sup>

注：同行上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )，相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ )；下同

Note: Values within the same line with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ), while the same letters indicate no significant difference ( $P>0.05$ ); the same in the following

差异( $P>0.05$ )。由表3可知，随着Vc浓度的增加，体重呈上升趋势。当Vc浓度高于30 mg/L时，体重增加受到抑制。对于外源营养期的仔稚鱼，体重在Vc浓度25 mg/L时最大并显著高于对照组( $P<0.05$ )。

### 2.3 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中总蛋白的影响

浸泡水体Vc浓度为30 mg/L时(表4)，在圆斑星鲈仔稚鱼早期发育过程中，对照组的总蛋白含量呈下降趋势，成熟卵总蛋白量为(0.775±0.012) mg/ml，发育到外源营养期时，总蛋白含量下降至(0.131±0.011) mg/ml。Vc组总蛋白含量也呈下降趋势，但下降幅度显著低于对照组。发育到外源营养期时，总蛋白含量下降至(0.225±0.005) mg/ml，显著高于对照组( $P<0.05$ )。

### 2.4 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中消化酶的影响

浸泡水体Vc浓度在30 mg/L时圆斑星鲈早期发育过程中消化酶活性的变化见表5。从表5可以看出胃蛋白酶活性在外源营养期出现，Vc组显著高于对

照组( $P<0.05$ )。淀粉酶活性在混合营养期出现，并呈显著上升趋势，混合营养期和外源营养期间差异显著( $P<0.05$ )。在混合营养期和外源营养期，Vc组均显著高于对照组( $P<0.05$ ) (表6)，Vc可显著提高淀粉酶活性。在发育的各个时期，脂肪酶活性均呈显著上升趋势，Vc组脂肪酶活性均显著高于对照组( $P<0.05$ )。胰蛋白酶在内源营养期有较高活性，混合营养期活性下降，外源营养期有所升高。在混合营养期，胰蛋白酶活性Vc组和对照组差异不显著( $P>0.05$ )；在混合营养期和外源营养期，Vc组均显著高于对照组( $P<0.05$ )。

### 2.5 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中2种酯酶的影响

圆斑星鲈发育的各个时期，LPL活性Vc组均高于对照组。成熟卵、受精卵和混合营养期2组差异不显著( $P>0.05$ )，原肠中期、晶体期和外源营养期Vc组显著高于对照组( $P<0.05$ )。圆斑星鲈胚胎发育和卵黄囊仔稚鱼HL活性均呈上升趋势，且Vc组显著高于对照组( $P<0.05$ ) (表6)。

表2 Vc对圆斑星鲈仔稚鱼全长的影响

Tab.2 The effects of vitamin C on the full-length of *Verasper variegatus* larvae (n=3, mm)

时期 Stages	Vc 浓度 Vc concentration (mg/L)				
	0	20	25	30	35
内源营养期 Endogenous nutrition stage	4.91±0.06 <sup>a</sup>	4.98±0.02 <sup>b</sup>	5.14±0.03 <sup>c</sup>	5.13±0.02 <sup>c</sup>	4.92±0.03 <sup>ab</sup>
混合营养期 Mixed nutrition stage	6.15±0.03 <sup>a</sup>	6.21±0.03 <sup>b</sup>	6.31±0.02 <sup>c</sup>	6.29±0.02 <sup>c</sup>	6.13±0.04 <sup>a</sup>
外源营养期 Exogenous nutrition stage	6.25±0.02 <sup>a</sup>	6.33±0.02 <sup>b</sup>	6.46±0.04 <sup>c</sup>	6.45±0.02 <sup>c</sup>	6.26±0.02 <sup>a</sup>

表3 Vc对圆斑星鲈仔稚鱼体重的影响

Tab.3 The effects of vitamin C on the body weight of *V. variegatus* larvae (n=3, mg)

时期 Stages	Vc 浓度 Vc Concentration (mg/L)				
	0	20	25	30	35
内源营养期 Endogenous nutrition stage	1.66±0.02 <sup>a</sup>	1.74±0.02 <sup>a</sup>	1.98±0.08 <sup>b</sup>	2.07±0.02 <sup>b</sup>	1.68±0.01 <sup>a</sup>
混合营养期 Mixed nutrition stage	2.62±0.01 <sup>a</sup>	2.78±0.02 <sup>b</sup>	2.95±0.01 <sup>c</sup>	2.95±0.02 <sup>c</sup>	2.60±0.03 <sup>a</sup>
外源营养期 Exogenous nutrition stage	3.36±0.04 <sup>a</sup>	3.42±0.02 <sup>b</sup>	3.66±0.04 <sup>c</sup>	3.64±0.02 <sup>c</sup>	3.31±0.02 <sup>a</sup>

表 4 圆斑星鲈早期发育过程中总蛋白含量变化

Tab.4 The total protein content of *V. variegatus* during early development (mg/ml)

时期 Stages	对照组 Control	Vc 组 Vc group
成熟卵 Mature eggs	0.775±0.012	0.786±0.012
受精卵 Fertilized eggs	0.743±0.058	0.705±0.004
原肠中期 Mid-gastrula stage	0.659±0.004	0.688±0.001
晶体出现期 Crystal appearing stage	0.492±0.004	0.581±0.006
混合营养期 Mixed nutrition stage	0.193±0.004	0.311±0.003
外源营养期 Exogenous nutrition stage	0.130±0.011	0.225±0.005

表 5 圆斑星鲈早期发育过程中消化酶活性变化

Tab.5 The digestive enzyme activities of *V. variegatus* during early development (U/mg prot)

项目 Items	胃蛋白酶 Pepsin	淀粉酶 Amylase	脂肪酶 Lipase	胰蛋白酶 Trypsin
内源营养期 对照组 Control	—	—	0.201±0.147 <sup>Aa</sup>	1.564±0.045 <sup>Aa</sup>
Endogenous nutrition stage Vc 组 Vc group	—	—	0.299±0.086 <sup>Ab</sup>	1.953±0.020 <sup>Ab</sup>
混合营养期 对照组 Control	—	1.041±0.014 <sup>Aa</sup>	0.605±0.044 <sup>Ba</sup>	0.603±0.083 <sup>Ba</sup>
Mixed nutrition stage Vc 组 Vc group	—	1.392±0.020 <sup>Ab</sup>	0.691±0.032 <sup>Bb</sup>	0.711±0.075 <sup>Ba</sup>
外源营养期 对照组 Control	0.463±0.034 <sup>a</sup>	1.374±0.033 <sup>Ba</sup>	0.684±0.011 <sup>Ca</sup>	0.671±0.058 <sup>Ca</sup>
Exogenous nutrition stage Vc 组 Vc group	0.623±0.001 <sup>b</sup>	1.468±0.006 <sup>Bb</sup>	0.770±0.041 <sup>Cb</sup>	1.003±0.111 <sup>Cb</sup>

注: 同组、同列数据肩标不同大写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 相同或无大写字母表示差异不显著( $P>0.05$ ); 同一发育时期、同列数据肩标不同小写字母表示组间同一发育时期有显著差异( $P<0.05$ ), 相同小写字母表示无显著差异( $P>0.05$ ), 下同

Note: Values in the same row with different capital letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with the same or no capital letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ); Values in the same column with different small letter superscripts in the same row mean significant difference between groups of same period ( $P>0.05$ ), the same small letter superscripts mean no significant difference between groups of same period ( $P>0.05$ ), the same in the following

表 6 圆斑星鲈早期发育过程中脂蛋白脂酶(LPL)和肝脂酶(HL)活性变化

Tab.6 The specific activity and total activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase of *V. variegatus* during early development (U/mg prot)

项目 Items	脂蛋白脂酶 Lipoprotein lipase	肝脂酶 Hepatic lipase
成熟卵 Mature eggs	对照组 Control	0.283±0.003 <sup>Aa</sup>
	Vc 组 Vc group	0.294±0.014 <sup>Aa</sup>
受精卵 Fertilized eggs	对照组 Control	0.306±0.002 <sup>Aa</sup>
	Vc 组 Vc group	0.314±0.004 <sup>Aa</sup>
原肠中期 Mid-gastrula stage	对照组 Control	0.403±0.024 <sup>Ba</sup>
	Vc 组 Vc group	0.513±0.016 <sup>Bb</sup>
晶体出现期 Crystal appear stage	对照组 Control	0.441±0.013 <sup>Ca</sup>
	Vc 组 Vc group	0.673±0.036 <sup>Cb</sup>
混合营养期 Mixed nutrition stage	对照组 Control	0.283±0.003 <sup>Aa</sup>
	Vc 组 Vc group	0.294±0.014 <sup>Aa</sup>
外源营养期 Exogenous nutrition stage	对照组 Control	0.507±0.025 <sup>Da</sup>
	Vc 组 Vc group	0.674±0.012 <sup>Db</sup>

### 3 讨论

#### 3.1 Vc 对圆斑星鲈早期胚胎发育的影响

本研究显示, 不同浓度 Vc 均可以缩短圆斑星鲈

的出膜时间。在 Vc 浓度为 25~30 mg/L 时, 出膜时间比对照组提前 10 h, 表明 Vc 浸泡对圆斑星鲈的胚胎发育有促进作用。Vc 是鱼类的必需营养元素, 为机体细胞提供营养, 有研究报道, 一定量的 Vc 不仅可



以保护卵子避免氧化损伤,还能对早期发育中的卵内物质和能量代谢起到调控作用,进而促进胚胎发育(Terova *et al.*, 2008)。另外,不同浓度 Vc 也可对圆斑星鲈的孵化率和仔鱼的成活率造成不同的影响,在 V<sub>C</sub> 为 25 mg/L 时,孵化率、出膜率和成活率最高,孵化率和成活率比对照组分别高 29.4% 和 14.8%,仔鱼的全长和体重增重量最显著,熊铎龙等(2014)研究发现,30 mg/L 的 Vc 可显著提高晋安银鲫的孵化率、成活率及卵黄囊仔稚鱼的生长速度,与本实验结果相吻合。不同的物种对同一营养物质的利用率和机制也不同。V<sub>C</sub> 对圆斑星鲈早期发育的影响至今还未见报道,本研究为 V<sub>C</sub> 在圆斑星鲈孵化上的运用提供了理论依据。Vc 除了作为营养物质为机体提供营养,还是鱼体内的抗氧化剂,具有清除有害自由基的作用,使胚胎免受氧化损伤,保护卵膜(Brown *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2006)。体外实验表明, Vc 具有提高机体免疫力的作用(李桂峰等, 2005)。水体中的 Vc 进入机体,提高胚胎及仔鱼的免疫力,减少病害的发生,从而提高圆斑星鲈仔鱼的出膜率和成活率。

当 Vc 浓度高于 30 mg/L 时,圆斑星鲈仔鱼的出膜时间、孵化率和成活率均受到抑制,原因可能是 Vc 水溶液呈酸性,当 Vc 浓度过高时,水体的 pH 降低,不适宜胚胎的正常发育。因此,低于 30 mg/L 的 Vc 浸泡可促进圆斑星鲈的早期发育。

Vc 组仔鱼的全长和体重显著高于对照组,其原因一方面 Vc 作为营养物质促进了其生长发育,另一方面 Vc 起抗氧化作用,使机体损伤率降低,发育过程中的正常代谢得到保障。

### 3.2 Vc 对圆斑星鲈早期发育过程中总蛋白的影响

在圆斑星鲈胚胎期和卵黄囊期,卵黄物质分解代谢,为胚胎提供能量,同时,也为机体组织、器官的形成提供原料。在圆斑星鲈胚胎及早期发育过程中,总蛋白含量整体呈下降趋势。受精后至原肠中期下降的幅度较小,因为受精卵发育至原肠中期胚胎主要进行细胞分裂和迁移,不需要消耗大量能量。从晶体期至出膜期,细胞大量增殖分化,胚胎组织逐渐形成,出膜时脱落的卵膜带走部分蛋白质(Selman *et al.*, 2000),因此,晶体期至出膜期总蛋白含量下降幅度增大。出膜后仔鱼体内尚未摄入食物,会大量分解蛋白质以维持正常生命活动,所以总蛋白含量持续下降。混合营养期,仔鱼虽然开口摄食,但摄食量很少,总蛋白含量仍下降。

本研究用 25 mg/L 的 Vc 浸泡圆斑星鲈胚胎及卵黄囊仔鱼表明,总蛋白含量呈下降趋势且下降幅度显

著小于对照组,表明 Vc 对机体发育起到积极的促进作用。王文辉等(2006)在饲料中添加 Vc 饲喂黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),发现 Vc 可提高黄颡鱼血浆总蛋白含量。本研究对圆斑星鲈胚胎及卵黄囊仔鱼进行 Vc 浸泡,在混合营养期和外源营养期,25 mg/L 的 Vc 使圆斑星鲈仔鱼蛋白含量分别高于对照组 61.14% 和 68.14%,说明对于开口摄食的仔鱼 Vc 能促进其摄食,加速蛋白质的沉积,但机体具体的工作机制还有待进一步研究。

### 3.3 Vc 对圆斑星鲈早期发育过程中消化酶的影响

仔稚鱼消化酶活性变化有两个重要时期,一是未开口向开口摄食的转变,二是开口后混合营养期向外源营养期的转变(Cousin *et al.*, 1987)。在圆斑星鲈胚胎发育过程中,在内源营养期和混合营养期均没有检测到胃蛋白酶活性,在外源营养期开始检测到微弱胃蛋白酶活性。初孵仔鱼中胰蛋白酶活性最高,混合营养期降低。鱼类在孵化 6 d 后胃区才稍膨大发育(王思锋等, 2006),胃蛋白酶属于酸性蛋白酶,在仔鱼发育期形成较晚,而碱性蛋白酶如胰蛋白酶在仔鱼发育早期阶段就具有较高的活性。因此,在仔鱼发育早期,胰蛋白酶可以补偿酸性蛋白酶缺乏的影响,这一结论已在无胃鱼类和金头鲷(*Sparus aurata*) (Moyano *et al.*, 1996)中验证。在开口摄食前,圆斑星鲈碱性蛋白酶如胰蛋白酶的活性较高,这与对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)仔鱼的结果一致(常青等, 2005)。在仔鱼的胃腺未形成时,对摄入食物的消化吸收主要依赖胰蛋白酶类,因此,在仔鱼早期发育过程中,胰蛋白酶对营养物质的消化吸收起到重要作用(Suzuki *et al.*, 2002)。在混合营养期出现淀粉酶活性并在外源营养期升高,表明圆斑星鲈的仔鱼在由混合性营养向外源性营养转变时,已具备消化多糖类食物的能力。在胚胎发育过程中,卵黄中的营养物质被分解用于维持代谢和提供能量,首先分解代谢的是蛋白质,其次是脂质(Gunasekerar *et al.*, 1999)。在圆斑星鲈初孵仔鱼中,检测到脂肪酶活性呈上升状态,说明从内源营养期仔鱼生长发育加快,需要分解大量脂质维持生命活动。初孵仔鱼开口摄食前机体处于饥饿状态,此时,脂质被大量分解提供能量以维持其基础代谢。对于混合营养期和外源营养期的卵黄囊仔鱼,脂肪酶活性仍呈上升趋势,说明仔鱼出膜后发育代谢所需能源主要由脂类提供,这与在单斑重牙鲷(*Diplodus sargus kotschy*) (Cejas *et al.*, 2004)仔鱼发育过程一致。

胚胎发育是生命过程中最脆弱的环节,发育质量好坏决定个体能否存活。生理代谢旺盛的胚胎期易产

生大量氧化自由基, 造成胚胎氧化损伤。Vc 可有效清除自由基使胚胎免受氧化损伤, 尤其是保护卵膜完整, 提高卵的质量(Bromage *et al.*, 1992)。在鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)和鲷鱼(*Pagrosomus major*)的成熟卵中 Vc 积累较多后, 能有效促进鱼的早期发育(Terova *et al.*, 1998)。当 Vc 在受精卵中积累到一定量时, 就可以对卵内物质与能量代谢起调控作用。六须鲈鱼(*Silurus glanis*)卵黄囊仔鱼进行水体添加 Vc 浸泡, Vc 可有效促进卵黄物质被机体分解吸收, 使仔鱼开口时间提前(季延滨等, 2007), 说明 Vc 在六须鲈鱼胚胎发育期进入卵黄囊仔鱼机体, 诱导激活参与代谢卵黄物质的消化酶加速分解卵黄物质, 同时, 对鱼类其他调节酶的合成与分泌起调节作用使机体达到新的代谢模式, 从而适应变化的营养环境(王文辉等, 2006)。本研究采用 25 mg/L 的 Vc 对圆斑星鲈卵黄囊仔鱼进行浸泡, 结果显示, 同一发育时期的蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶活性相比对照组均显著提高, 说明在卵黄囊仔鱼期 Vc 能有效提高消化酶活性促进卵黄物质的分解, 从而为圆斑星鲈早期发育提供能源。

### 3.4 圆斑星鲈早期发育过程中 LPL 和 HL 活性变化特点

脂质不仅是鱼类的能量来源, 也是必需的营养物质。对于仔稚鱼, 脂肪的代谢直接关系到其能否存活(Keembiyehetty *et al.*, 1998)。LPL 和 HL(合称总脂酶)均是参与脂质降解的关键酶, LPL 是甘油三酯水解的限速酶, HL 是血液循环内源性甘油三酯代谢的关键酶。姚俊杰(2006)对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究表明, 胚胎发育过程中原肠期机体调控机制由母型调控转变为合子型调控, 同时, 这一时期自身的 mRNA 也开始合成。本研究显示, 在圆斑星鲈的成熟卵可以检测到脂酶活力, 说明脂酶合成源于母体, 成熟卵中的脂酶为最初胚胎发育提供了营养物质保障。在胚胎发育过程中, LPL 活性呈上升趋势, 在原肠期其活性显著提高, 说明原肠期合子基因开始表达合成水解酶。这与内源营养期器官形成分化、仔鱼破膜孵出、细胞增殖组织构建大量耗能有关(Selman *et al.*, 2000)。这一现象与淡水鱼类相一致(Cejas *et al.*, 2004)。在混合营养期, LPL 活性下降。原因可能与混合营养期的仔鱼摄食及消化器官发育均不完善, 摄食和消化能力较弱有关(姚俊杰等, 2013; 蒋左玉等, 2015), 此时, LPL 缺乏底物, 饥饿状态的仔鱼使 LPL mRNA 下调, 导致 LPL 活力降低。这与朱俊华等(2014)对瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)的研究相一致。外源营养期后, 摄食及消化能力加强, 说明食物

可诱导 LPL mRNA 表达, 使 LPL 活性升高。

HL 活性在圆斑星鲈早期发育中呈上升趋势, 在外源营养期活性最高。可能与外源营养期仔鱼的器官及血液循环系统趋于完善, 外界摄入的食物为 HL 提供底物有关(梁正其等, 2013)。其具体作用机制还需进一步研究。

本研究使用 25 mg/L 的 Vc 浸泡圆斑星鲈胚胎, 测得胚胎的 LPL 和 HL 比活力变化趋势与对照组一致, 但其活性均显著高于对照组。结果表明, 适宜水平的 Vc 浸泡可以促进鱼体内脂质的代谢。可能原因有两个: 一是 Vc 在脂质代谢中起到了抗氧化作用, 使 V<sub>E</sub> 和  $\beta$ -胡萝卜素水平较高, 从而使脂肪的氧化链被阻断, 避免脂肪酸过氧化细胞膜受损, 使机体免疫功能提高(Chien *et al.*, 2001)。同时, 机体中高水平的 Vc 可提供自由电子使谷胱甘肽由氧化型转变为还原型, 使酶系统的活性巯基得到保护, 从而超氧化物歧化酶活性提高(Luo *et al.*, 2003), 使脂质膜避免过氧化。二是 Vc 与圆斑星鲈卵黄囊仔鱼体内肉碱合成有关, 间接加速了脂质代谢(颀志刚等, 2003), 进而诱导 LPL 和 HL 的合成分泌, 保证仔鱼对脂质的分解利用顺利进行。表明适宜水平的 Vc 可促进脂质代谢。

## 4 结论

低于 30 mg/L 的 Vc 浸泡可促进圆斑星鲈的早期发育, 25 mg/L 的 Vc 浸泡下, 圆斑星鲈的孵化率、出膜率和成活率最高, 仔鱼的全长和体重增加最显著。25 mg/L 的 Vc 能显著提高圆斑星鲈仔鱼胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性, 并可以促进蛋白质在鱼体内的沉积。适宜水平的 Vc 对圆斑星鲈早期体内脂质的维持和代谢平衡具有重要作用。

## 参 考 文 献

- Bromage N, Jones J, Randall C, *et al.* Broodstock management, fecundity egg quality and timing of egg production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1992, 100(1-3): 141-166
- Brown M, Lavens P. Critical review of the concentration, interactions with other nutrients, and transfer of ascorbic acid in algae, crustaceans and fish. BocaRaton: CRC Press, 2001: 167-189
- Cejas JR, Almansa E, Jerez S, *et al.* Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 139(2): 209-216
- Chang Q, Zhang XM, Chen SQ, *et al.* Variations in digestive

- enzymes activities in tongue fish *Cynoglossus semilaevis* larvae and juveniles. *Advance in Marine Science*, 2005, 23(4): 472–476 [常青, 张秀梅, 陈四清, 等. 半滑舌鳎仔稚鱼消化酶活性的变化. *海洋科学进展*, 2005, 23(4): 472–476]
- Chien LT, Hwang DF. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Teraponjarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 128(1): 91–97
- Cousin JCB, Baudin-Laurencin F, Gabaudan J. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology*, 1987, 30(1): 15–33
- Gunasekerar M, Desilva S, Ingram BA. Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the Percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and *Murraycod*, *M. peeliipeelii*. *Aquatic Living Resources*, 1999, 12(3): 219–227
- Ji YB, Chen CX, Wang X, *et al.* The application of vitamins in improving the seedling survival rate of *Silurus glanis* Linnaeus. *China Fisheries*, 2007, 384(11): 60–61 [季延滨, 陈成勋, 王祥, 等. 维生素在提高六须鲶育苗成活率中的应用. *中国水产*, 2007, 384(11): 60–61]
- Jiang ZY, Yao JJ, Xiong HL, *et al.* The effects of glucose and vitamin C on the gene expression of lipoprotein lipase and hepatic lipase during the development of the yolk-sac larva of *Carassius auratus gibelio*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 43–48 [蒋左玉, 姚俊杰, 熊铎龙, 等. 普安银鲫(*Carassius auratus gibelio*)卵黄囊期脂蛋白脂酶和肝脂酶基因的表达及葡萄糖、维生素 C 对其的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 43–48]
- Jie ZG, Niu CJ. The study of important and application of vitamin C in fish nutrition and feed. *Feed China*, 2003, 13(2): 29–32 [颀志刚, 牛翠娟. 维生素 C 在鱼类营养与饲料研究中的重要作用及应用. *饲料广角*, 2003, 13(2): 29–32]
- Keembiyehetty CN, Wilson RP. Effect of water temperature on growth and nutrient utilization of sunshine bass (*Morone chrysops*♀×*Morone saxatilis*♂) fed diets containing different energy/protein ratios. *Aquaculture*, 1998, 166(1): 151–162
- Li GF, Qian PF, Sun JJ, *et al.* Effect of vitamin C on cellular activities and serum factors of *Claris fuscus*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(5): 75–83 [李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶细胞活性和血清因子的影响. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(5): 75–83]
- Li JX. Effect of glucose, sucrose and NaCl to embryo development of zebrafish. Jinan: Shandong Normal University, 2007 [李俊霞. 葡萄糖、蔗糖、氯化钠对斑马鱼胚胎发育的影响. 济南: 山东师范大学, 2007]
- Liang ZQ, Yao JJ, Xiong HL, *et al.* Growth and development of larvae and juveniles in Puan silver crucian carp *Carassius auratus* Linnaeus. *Fisheries Science*, 2013, 32(7): 380–384 [梁正其, 姚俊杰, 熊铎龙, 等. 普安银鲫仔稚鱼的发育及生长研究. *水产科学*, 2013, 32(7): 380–384]
- Luo X, Liu Z, Sun Y, *et al.* Lipophilic enhance of vitamin C protective activity against free-radical-induced damage *in vivo*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2003, 19(4): 428–431
- Menezes GC, Travares Dias M, Ono EA, *et al.* The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of Pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A: Physiology*, 2006, 145(2): 274–279
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ, *et al.* Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, 15(2): 121–130
- Selman C, McLaren JS, Himanka MJ, *et al.* Effect of long term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(8): 1279–1285
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, *et al.* A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genetics*, 2002, 31(6): 141–149
- Terova G, Saroglia M, Papp ZG, *et al.* Ascorbate dynamics in embryos and larvae of seabass and seabream, originating from brood stocks fed supplements of ascorbic acid. *Aquaculture Internet*, 1998, 6(5): 357–367
- Terova G, Saroglia M, Papp ZG, *et al.* Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), originated from brood stocks fed with different vitamin C content in the diet. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A: Physiology*, 1998, 121(2): 111–118
- Wang SF, Zhang ZF, Zhang QQ, *et al.* Morphological and histological studies on development of digestive system in *Verasper variegatus* Temminck et Schlegel larvae prior to metamorphosis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(1): 1–7 [王思锋, 张志峰, 张全启, 等. 圆斑星鲃仔鱼变态前消化系统发生的形态学和组织学研究. *中国水产科学*, 2006, 13(1): 1–7]
- Wang WH, Wang JQ, Cheng X, *et al.* Effects of dietary vitamin C levels and sources on growth and immunity of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*(Richardson). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 951–958 [王文辉, 王吉桥, 程鑫, 等. 不同剂型维生素 C 对黄颡鱼生长和几种免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 951–958]
- Xie QS, Li JW, Yang ZC. Japanese flounder fish vitamins and trace elements in the nutritional needs of progress. *Modern Agricultural Sciences*, 2008, 15(12): 5–7 [谢全森, 李俊伟, 杨振才. 鲆鲽鱼类维生素及微量元素营养需求研究进展. *现代农业科学*, 2008, 15(12): 5–7]
- Xiong HL, Yao JJ, An M, *et al.* Effects of glucose and vitamin C on early development of Puan silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *South China Fisheries Science*, 2014, 10(6): 88–92 [熊铎龙, 姚俊杰, 安苗, 等. 葡萄糖、维生素 C 对

- 普安银鲫早期发育的影响. 南方水产科学, 2014, 10(6): 88–92]
- Xue LZ. Effect of the change of environmental factors and nutritious factors on embryo and early larvae of tetraploid *Chlamys ferrerii*. Master's Thesis of Fujian Normal University, 2008 [薛凌展. 环境和营养因子对四倍体栉孔扇贝胚胎及早期幼虫的影响. 福建师范大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Yao JJ, Liang ZQ, Feng YN, *et al.* Histological studies on post-embryonic development for digestive system of *Carassius auratus*. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(11): 152–155 [姚俊杰, 梁正其, 冯亚楠, 等. 普安银鲫消化系统胚胎发育的组织学观察. 贵州农业科学, 2013, 41(11): 152–155]
- Yao JJ. Correlation between embryonic nutrition and morphogenesis of *Macrobrachium rosenbergii*. Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2006 [姚俊杰. 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)胚胎营养与形态发生相关性的研究. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2006]
- Zhu JH, Yao JJ, Feng YN, *et al.* Activities of two lipases and effects of *m*-cresol on them during early development of *Cyprinus carpio* var. color. Freshwater Fisheries, 2014, 44(1): 32–35 [朱俊华, 姚俊杰, 冯亚楠, 等. 瓯江彩鲤早期发育中两种脂酶活性及间甲酚对其活性的影响. 淡水渔业, 2014, 44(1): 32–35]

(编辑 冯小花)

## Effects of Vitamin C on Early Development of Spotted Halibut (*Verasper variegatus*)

WANG Zhenjie<sup>1,2</sup>, YE Baomin<sup>3</sup>, CHANG Qing<sup>1</sup>, CHEN Siqing<sup>1</sup>⊙,  
LIU Changlin<sup>1</sup>, HU Jiancheng<sup>1</sup>, WANG Zhijun<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory for 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. Administration of Ocean and Fisheries of Liaoning Province, Shenyang 110000; 4. Kehe Ocean High Technologies Company of Shandong, Weihai 264500)

**Abstract** This study investigated effects of exogenous Vitamin C ( $V_C$ ) on the membrane time, hatching ratio, survival rate, growth characteristics, digestive enzyme activities and Lipases enzyme activities of spotted halibut (*Verasper variegatus*) during early development using mature eggs by the method of artificial fertilization. The eggs were divided into five groups with five different  $V_C$  concentration of 0, 20, 25, 30, and 35 mg/L, respectively. Samples were collected at mature eggs, fertilized eggs, mid-gastrula, crystal appear, mixed nutrition and exogenous nutrition stages. The results showed that 25 mg/L  $V_C$  significantly improved the hatching ratio, survival rate and growth characteristics and shorten the membrane time, and that  $V_C$  contributed to the deposition of protein in spotted halibut during early development, and significantly enhanced the activity of pepsin after exogenous nutrition stage ( $P < 0.05$ ). After mixed nutrition stage,  $V_C$  significantly increased the activity of amylase ( $P < 0.05$ ). After endogenous nutrition stage,  $V_C$  significantly induced the activity of lipase and trypsin ( $P < 0.05$ ).  $V_C$  at 25 mg/L increased the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase enzyme during embryo development ( $P < 0.05$ ). The findings indicated that lipoprotein lipase and hepatic lipase genes in zygotes may play functions at gastrula stage when lipid hydrolytic enzymes express to release energy for embryonic development. The results demonstrate that lipase and trypsin priority digest carbohydrates in yolk of mature eggs from spotted halibut to provide energy for embryonic development right after fertilization. The study revealed that appropriate level of  $V_C$  could improve lipid metabolism during embryo development of spotted halibut.

**Key words** *Verasper variegatus*; Early development; Vitamin C; Digestive enzyme; Lipase

⊙ Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170227001

http://www.yykxjz.cn/

王军, 王清印, 孔杰, 孟宪红, 曹家旺, 王明珠, 冯亚萍, 吕丁. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 104-111

Wang J, Wang QY, Kong J, Meng XH, Cao JW, Wang MZ, Feng YP, Lü D. SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 104-111

# 中国明对虾人工选育群体与野生群体 遗传多样性的 SSR 分析\*



王 军<sup>1,4</sup> 王清印<sup>1,2①</sup> 孔 杰<sup>1,2</sup> 孟宪红<sup>1,2</sup>  
曹家旺<sup>1,4</sup> 王明珠<sup>1,4</sup> 冯亚萍<sup>1,4</sup> 吕 丁<sup>3</sup>

(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. 南京农业大学 南京 210095; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 利用微卫星标记技术分析了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)野生群体(Wild Population, WP)和“黄海 2 号”第 10 代选育群体(Breeding Population, BP)的遗传多样性,以检测累代人工选育对中国明对虾群体遗传结构的影响。结果显示,15 个微卫星位点共检测到 462 个等位基因,微卫星位点等位基因数( $N_a$ )和有效等位基因数( $N_e$ )分别为 3~44 个和 2~29 个,多态信息含量(PIC)为 0.518~0.964。野生群体和选育群体的平均观测杂合度分别为 0.852 和 0.810,15 个微卫星位点的等位基因频率在 2 个群体发生了显著的变化。通过计算  $P$  值确定位点 Hardy-Weinberg 平衡偏离情况, $F_{is}$  结果显示,共有 11 个群体位点表现为杂合子过剩,Shannon 指数( $H$ )分别为 2.786 和 2.399。2 个群体的 Nei's 无偏遗传距离( $uD$ )和无偏遗传相似度( $uI$ )分别为 0.177 和 0.838,遗传分化指数为 0.017( $P=0.001$ ),表明群体发生了弱遗传分化。遗传变异来源分析显示,只有 7.50% 的变异来自于群体间,其余遗传变异均来自于个体间。结果表明,人工选育的中国明对虾“黄海 2 号”第 10 代群体具有较高的遗传多样性,仍具有很大的选育潜力,可以继续作为选育材料。

**关键词** 中国明对虾“黄海 2 号”;野生群体;微卫星;遗传多样性

**中图分类号** S937.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0104-08

中国明对虾亦称中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*),主要分布在太平洋西北海岸的黄海和渤海海区的山东、河北、辽宁、天津及江苏近海(王清印,2014)。20 世纪 80 年代,中国对虾养殖技术得到突破,中国对虾的养殖产量迅速增加,到 1991 年年产量达

到 20 万 t,成为我国最重要的对虾养殖品种(李健等,2015)。然而,高速发展的中国对虾养殖业遇到诸多问题的挑战,尤其是 1993 年白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)的出现,使中国对虾的养殖业迅速衰退。新品种的培育为中国对虾养殖业走

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项国际合作项目(2016GH06)、国家自然科学基金面上项目(41676148)、山东省农业良种工程项目“多性状新品种的选育与产业化”和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2016GH06), the National Natural Science Foundation of China (41676148), the Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System (CARS-48)]. 王 军, E-mail: 1290702603@qq.com

① 通讯作者:王清印,研究员, E-mail: wangqy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-27, 收修改稿日期: 2017-03-15

出困境提供了希望(Wang *et al*, 2003)。中国对虾“黄海 2 号”在连续多代的选育过程中, 为了保持选育群体的遗传多样性水平, 近交一直被控制在小于 1% 的水平(罗坤等, 2014)。但累代人工选育是否会降低中国对虾的遗传多样性, 影响中国对虾的选育效果, 尚缺少实际检测数据的支撑。

微卫星又称简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR), 具有反应快速、技术简单、多态性高、共显性且符合孟德尔遗传等特点, 现广泛应用于水生生物的遗传多样性分析。刘连为等(2014)利用筛选的 8 个微卫星位点对北太平洋柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)6 个群体的遗传多样性及遗传结构进行分析, 显示具有较高的遗传多样性水平; Wang 等(2016)利用 8 个微卫星位点分析了中国对虾亲本和回捕群体的遗传多样性, 显示 2 个群体均具有较高的遗传多样性; 毛守康等(2016)利用 14 个微卫星位点分析了梭鱼(*Liza haematocheila*)4 个野生地理群体的遗传多样性。

为进一步做好中国对虾的选育工作, 本研究利用

筛选的 15 对微卫星引物对韩国西海岸捕获的中国对虾野生群体和“黄海 2 号”人工选育第 10 代群体进行遗传多样性分析, 以期深入了解累代人工选育条件下中国对虾遗传多样性水平和群体遗传结构的变化, 为后续的人工选育、遗传改良和种质资源保护提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国对虾野生群体是 2013 年从韩国西海岸(34°30'N, 127°30'E)捕获。人工选育群体为中国对虾“黄海 2 号”连续选育第 10 代群体。野生群体和人工选育群体各随机取 40 尾, 取肌肉组织于-80℃保存, 用于 DNA 的提取。

微卫星引物: 利用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术筛选多态性高的 SSR 引物, 共获得 15 对多态性高、反应好的中国对虾 SSR 引物。对正向引物的 5'端进行荧光标记, 荧光标记种类为 FAM、HEX、TAMRA

表 1 中国对虾 15 个微卫星位点的引物序列及其特征

Tab.1 Primers and characteristics of 15 microsatellites of *F. chinensis*

位点 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	荧光标记 Marker
RS1101	AY132811	F: CGAGTGGCAGCGAGTCCT R: TATTCCACGCTCTTGTC	52	FAM
EN0033	AY132813	F: CCTTGACACGGCATTGATTGG R: TACGTTGTGCAAACGCCAAGC	64	HEX
BX06-2	/	F: CCTTCGTCGTCCTCTTACTA R: TGGAAGAAACTAAGAGAGCA	55	FAM
BX0130	AY132826	F: CTTTATCTACACACAAACCGC R: TGATACCAAAGGCTGTAGAGG	55	TAMRA
IOPC14	/	F: CGACCATTTTCGGTGTTC R: GCTGCGATAATTGAGACG	55	HEX
Hrd4292	EF580117	F: AAGGGATGACAGGACATTTGC R: GACGCCATTTCTTCTCTTTCTG	58	HEX
FCKR013	JQ650353	F: GCACATATAAGCACAAACGCTC R: CTCTCTCGCAATCTCTCCAAC	55	ROX
SX201	AF525779	F: TATCGTTGAGGTTTCGTCAATGC R: TCGCACTTCGTGTCAAGTGTACC	60	FAM
RS0683	AY132823	F: ACACTCACTTATGTCACACTGC R: TACACACCAACTCAATCTCC	64	ROX
RS062	AY132778	F: TGCTGAAGCTACACTACCTTCG R: TGATGAAACGCAAGCAAAGGC	63	FAM
BM29561	BM295611	F: AACAGACCACATACGGGAC R: TTTTCGGAAGTAACATCACA	53	HEX
BX916	/	F: AAGTGCTGATAGTGGAAAGG R: TCTGGACAGATGTGTTTGACGC	58	TAMRA
Hrd4353	EF580118	F: AGACTGTGAGGCAAATCCCCG R: AGGCACTTCATTTTCGCTTACAG	57	TAMRA
FCKR002	JQ650349	F: CTCAACCCTCACCTCAGGAACA R: AATTGTGGAGGCGACTAAGTTC	60	ROX
113(B)	AY132816	F: TGTC AAGAGAGCGAGAGGGAGG R: ATGCTGTGACTTAGTGTAGGC	66	ROX



## 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 采用醋酸铵法提取中国对虾尾节肌肉全基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后 (GeneFinder 染色), 凝胶成像系统显示 DNA 无降解, 利用 Biodropsis2000 超微量紫外分光光度计定量, 用灭菌水将 DNA 浓度稀释到 50 ng/μl, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

**1.2.2 PCR 扩增和基因测序** PCR 反应体系总体积为 25 μl: 模板 DNA 2.0 μl (100 ng), 2×TSINGKE™ Master Mix 12.5 μl (北京擎科新业生物技术有限公司), 正向和反向引物各 0.5 μl, 灭菌超纯水 9.5 μl。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 每个循环包括 94℃ 30 s, 退火 30 s (各引物的退火温度见表 1), 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 4℃ 保存。PCR 产物的基因测序工作在生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

## 2 数据分析

利用 Cervus 3.0.7 软件计算 15 个微卫星位点的等位基因数 ( $N_a$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ ) 和多态信息含量 (PIC)。利用 GenALEx 6.502 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验、Shannon 指数 ( $H$ ) 分析并计算群体  $F$  统计值、Nei's 无偏遗传距离 ( $uD$ )、无偏遗传相似度 ( $uI$ ) 及基因流 ( $N_m$ )。

$$\text{有效等位基因 } N_e = 1 / \sum p_i^2$$

式中,  $p_i$  为位点第  $i$  个等位基因的频率,  $i$  为等位基因的个数。

$$\text{Shannon 指数 } H = -1 \times \sum (p_i \ln p_i)$$

式中,  $p_i$  为第  $i$  个等位基因在群体中出现的频率,  $i$  为等位基因的个数。

$$\text{群体遗传多样性 } H_{sp} = -1 \times \sum [p_i M \ln(p_i M)]$$

式中,  $p_i M$  为位点在  $n$  个群体中的综合表型频率,  $n$  为研究群体的数量。

$$\text{群体内的遗传多样性 } H_{pop} = \sum H / n$$

式中,  $H$  为位点在某个群体中的 Shannon 指数,  $n$  为研究群体的数量。

群体内遗传多样性所占的比例为  $H_{pop} / H_{sp}$ , 群体间遗传多样性所占的比例为  $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 微卫星多态性

15 个微卫星位点在 2 个群体共检测到 462 个等位基因, 位点等位基因数 ( $N_a$ ) 为 3~44, 有效等位基因

数 ( $N_e$ ) 为 2~29, 观测杂合度 ( $H_o$ ) 和期望观测杂合度 ( $H_e$ ) 分别为 0.385~1.000 和 0.518~0.977, 多态信息含量 (PIC) 为 0.611~0.964。对野生群体和选育群体的各项参数进行分析, 可以看出野生群体的等位基因各参数都在一定程度上高于选育群体 (WP:  $N_a=26$ ,  $N_e=15$ ,  $H_o=0.852$ ,  $H_e=0.909$ , PIC=0.886; BP:  $N_a=18$ ,  $N_e=9$ ,  $H_o=0.810$ ,  $H_e=0.875$ , PIC=0.848), 说明野生群体的遗传多样性水平高于选育群体。Hardy-Weinberg 平衡检验显示, 野生群体有 4 个位点未偏离, 其余位点均在一定程度上偏离; 而选育群体大部分 (11 个) 位点未偏离平衡, 只有少数位点偏离。15 个微卫星位点的遗传多态性见表 2。

### 3.2 野生群体和选育群体中等位基因的数量及频率变化

以微卫星位点 RS1101 和 IOPC14 为例, 其在野生和选育群体中的等位基因频率如表 3 所示。

位点 RS1101 在野生和选育群体中的主要等位基因均为 414、447 和 455, 但这 3 个等位基因在野生和选育群体中的比例分别为 29%、19%、16% 和 36%、29%、24%。位点 RS1101 在野生和选育群体中的等位基因数 ( $N_a$ ) 分别为 19 和 8。位点 IOPC14 的等位基因 209 和 235 在野生群体中的比例分别为 11% 和 14%, 但在选育群体中的比例全部为 0; 相反, 等位基因 211 和 229, 选育群体所占的比例分别为 14% 和 16%, 而在野生群体中所占的比例分别为 4% 和 5%, 说明连续 10 代的人工选育导致了基因数量和比例的变化, 其他微卫星位点在 2 个群体中也有类似特点。

### 3.3 遗传多样性分析

观测杂合度 ( $H_o$ ) 和 Shannon 指数 ( $H$ ) 是判定群体遗传多样性水平的重要指标。利用 Cervus 3.0.7 和 GenALEx 6.502 对中国对虾野生群体和选育群体各 40 尾样品的分析结果显示, 野生群体的平均观测杂合度为 0.852, 略高于选育群体的平均观测杂合度 0.810 (表 2), 二者之间无显著性差异 ( $P=0.556$ )。野生群体和选育群体的 Shannon 指数 ( $H$ ) 分别为 2.786 和 2.399 (表 4), 也无显著性差异 ( $P=0.088$ )。说明选育采用的技术策略并未导致选育群体的遗传多样性发生显著变化。

### 3.4 遗传变异和分化

基因流 ( $N_m$ ) 是基因从一个种群到另一个种群的转移。  $N_m < 1$ , 表明由于遗传漂变发生了分化;  $N_m > 1$ , 表明遗传分化较小;  $N_m > 4$ , 表明种群间的基因交流更充分, 遗传分化更小。本研究获得的中国对虾野生



群体与第 10 代选育群体间的基因流( $N_m$ )为 17.997, 说明这 2 个群体间的遗传分化还相当小。 $F$  统计显示, 群体间遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.017( $P=0.001$ )。根据对  $F_{st}$  的划分( $0 < F_{st} < 0.05$ , 遗传分化较弱;  $0.05 < F_{st} < 0.15$ , 遗传分化中等;  $0.15 < F_{st} < 0.25$ , 遗传分化较大;  $F_{st} > 0.25$ , 遗传分化极大), 表明野生群体和选育群体之间发生了弱遗传分化。遗传变异来源分析的结果显示, 只有 7.50% 的遗传变异来源于群体之间, 而 92.50% 的遗传变异来源于个体之间。 $Nei's$  无偏遗传距离和遗传相似度分别为 0.177 和 0.838。 $F_{is} < 0$ , 表明存在杂合子过剩现象, 选育群体有 4 个位点显示杂合子过剩, 而野生群体有 7 个位点显示杂合子过剩。野生群体和选育群体在位点 FCKR002、IOPC14、HRD4292 以及 SX201 都出现杂合子过剩现象。中国对虾 15 个微卫星位点的  $F$  统计分析以及野生和选育群体的遗传多样性分布见表 4。

## 4 讨论

### 4.1 SSR 在中国对虾野生和选育群体中的多态性

利用微卫星等分子生物学手段对中国对虾野生群体和选育群体的遗传背景进行研究, 分析累代人工选育对群体遗传多样性及遗传结构的影响, 不仅有利于进一步的人工选育, 更有利于对中国对虾基因库的长期利用和保护。本研究利用 15 对微卫星引物共筛选到 462 个等位基因, 每个位点的等位基因数为 3~44 不等, 平均每个位点检测到 31 个等位基因。根据 Barker(1994)对微卫星选择的标准, 至少有 4 个等位基因的微卫星方能较好地用于遗传多样性分析。本研究显示, 野生和选育群体在 15 个微卫星位点几乎都存在大量的无效等位基因( $N_e < N_a$ ), 最主要的原因可能是微卫星位点的侧翼序列发生突变, 导致基因无法合成(Lehmann *et al.*, 1996), 而大片段等位基因的丢失也会造成无效等位基因的存在(Wattier *et al.*, 1998)。针对无效等位基因, 可以通过重新设计引物, 从而避开发生变异的侧翼序列或者估计无效等位基因频率进行研究(刘连为等, 2014)。韩国西海岸的中国对虾野生群体有 11 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 而选育群体仅有 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 大部分位点都在 Hardy-Weinberg 平衡中。可能的原因是人工放流在一定程度上打破了野生群体的 Hardy-Weinberg 平衡, 而人工选育群体大部分位点处在 Hardy-Weinberg 平衡中, 可能与中国对虾的累代选育有很大关系。中国对虾育苗期间都会保留数量较大的群体作为种虾, 虽然

在人工受精时按照计划定向交配, 但庞大的亲本群体会减小定向交配带来的影响。

### 4.2 等位基因在 2 个群体中的变化

和野生群体相比, 中国对虾“黄海 2 号”第 10 代选育群体各位点等位基因发生了变化。结果显示, 选育群体的主要等位基因发生了富集现象, 而其他等位基因在不同程度上发生了缩减。缩减的原因一方面可能是无效等位基因的存在, 也可能是由于样本数量较少, 稀有等位基因无法检测到。选择育种本身不能产生新的基因, 但可以通过选育提高目标性状基因或有利基因的频率, 降低非目标性状基因或不利基因的频率, 通过不断积累有利基因, 以达到提高选育目标性状的目的。中国对虾“黄海 2 号”在选育过程中针对生长和抗病性状采用了定向选择育种的方式, 在每代的选育过程中, 选择生长快、抗病力强的家系和个体作为亲本繁育下一代, 使生长和抗病相关基因不断积累强化, 从而实现了提高养殖产量和成活率的目的。

### 4.3 遗传多样性与遗传分化

中国对虾“黄海 2 号”选育群体的观测杂合度( $H_o=0.810$ )和 Shannon 指数( $H=2.399$ )与韩国西海岸野生群体的参数相近( $H_o=0.852$ ,  $H=2.786$ ), 二者均没有显著差异, 表明中国对虾“黄海 2 号”人工选育群体在连续选育 10 代后遗传多样性并没有显著性降低。张天时等(2005)利用微卫星技术分析了中国对虾人工选育群体第 1 代和第 6 代的遗传多样性, 结果显示, 两代之间没有显著性差异( $H_{o1}=0.6400$ ,  $H_1=1.7382$ ;  $H_{o6}=0.6300$ ,  $H_6=1.6830$ )。张辉等(2010)分析了中国对虾养殖群体与野生群体 mtDNA 控制区序列, 结果显示野生群体的基因多样性为 0.9672, 略高于养殖群体的 0.9380。本研究数据是 PCR 产物经 ABI3730 测序后获得, 同样的微卫星位点会获得更多的等位基因, 因此, 微卫星杂合度和 Shannon 指数偏大。

中国对虾“黄海 2 号”选育 10 代后仍具有较高的遗传多样性, 这与选育采用的技术路线有很大关系。每代选育严格控制近交水平, 且每代留作繁育的对虾亲本数量大, 这些措施在一定程度上保证了中国对虾选育群体的遗传稳定性, 使得中国对虾在繁育多代后仍保持较高的遗传多样性。遗传多样性是生物适应环境和遗传变异的关键, 高遗传多样性的群体也是进行遗传育种的基础。本研究的“黄海 2 号”第 10 代选育群体遗传多样性高, 在继续纯化现有品种的同时, 可以继续对潜在基因进行挖掘和利用, 从而为更

表 4 中国对虾 15 个微卫星位点的 F-分析及野生和选育群体的遗传多样性分布

Tab.4 F-statistics and partitioning of genetic diversity of wild and breeding populations in *F. chinensis* at 15 microsatellite loci

位点 Locus	$F_{is}$		$F_{it}$	$F_{st}$	$H$		$H_{sp}$	$H_{pop}$	$H_{pop}/H_{sp}$	$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$
	野生 WP	选育 BP			野生 WP	选育 BP				
RS1101	0.119	0.287	0.179	0.010	2.241	1.485	1.974	1.863	0.943	0.056
EN0033	0.098	0.113	0.113	0.021	3.413	2.734	3.429	3.074	0.897	0.104
RS062	0.116	0.080	0.100	0.014	3.136	2.718	3.217	2.927	0.910	0.090
RS0683	-0.050	0.065	0.014	0.020	2.897	2.589	2.992	2.743	0.917	0.083
FCKR002	-0.072	-0.076	-0.081	0.008	2.636	2.623	2.722	2.630	0.966	0.034
FCKR013	0.018	0.122	0.070	0.014	3.254	2.867	3.269	3.061	0.936	0.064
BX06-2	0.553	0.558	0.569	0.042	2.422	2.224	2.604	2.323	0.892	0.108
BX0130	0.046	0.001	0.029	0.018	3.331	2.656	3.295	2.993	0.908	0.092
IOPC14	-0.058	-0.086	-0.065	0.019	2.957	2.623	3.019	2.790	0.924	0.076
HRD4353	-0.008	0.029	0.012	0.017	3.226	2.755	3.337	2.990	0.896	0.104
HRD4292	-0.041	-0.110	-0.082	0.006	2.926	2.434	2.783	2.680	0.963	0.037
113B	0.121	0.146	0.136	0.014	1.935	2.016	2.060	1.976	0.959	0.041
SX201	-0.024	-0.007	-0.016	0.012	3.571	2.848	3.514	3.209	0.913	0.087
BM295611	-0.012	0.003	0.005	0.022	2.857	2.339	2.874	2.598	0.904	0.096
BX916	0.257	0.056	0.155	0.015	0.990	1.068	1.088	1.029	0.946	0.054
Mean	0.071	0.079	0.076	0.017	2.786	2.399	2.811	2.592	0.925	0.075

多新品种的培育提供可能。韩国西海岸中国对虾野生群体和“黄海 2 号”选育群体的遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.017 ( $P=0.001$ ), 为弱的遗传分化。该结果与王伟继等(2005)利用 AFLP 技术分析中国对虾韩国南海群体与养殖群体遗传差异的结果相近(Nei's 遗传距离为 0.9899, 遗传相似度为 0.0102, 表明群体间无显著的遗传分化), 但小于安丽等(2008)利用 AFLP 估计野生群体和中国对虾“黄海 1 号”选育 10 代的群体的遗传变异系数(0.070), 也与张辉等(2010)基于 K-2P 模型计算得到中国对虾野生群体和养殖群体间的  $F_{st}$  (0.0698,  $P=0.00$ )有一定差别。这可能与使用的分子标记和研究的对虾群体不同有关。在其他物种的遗传结构分析中也有类似的结论, 肖炜等(2015)利用 mtDNA D-loop 序列差异分析技术, 对埃及品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的 3 个选育世代群体共 80 尾开展世代间遗传结构变异分析, 结果显示, 在目前选育方式下埃及品系尼罗罗非鱼世代间遗传信息较为稳定, 选育并没有对罗非鱼选育群体的遗传结构造成大的影响。关建义等(2010)利用 8 个 ISSR 分子标记对 4 个黄河鲤(*Cyprinus carpio*)群体(2 个野生群体和 2 个选育群体)的 120 尾个体的遗传多样性进行了分析, 结果显示, 这些群体间发生了较弱的遗传分化, 表明人工选育群体的遗传结构尚未发生明显变化。

本研究获得的 Nei's 无偏遗传距离和遗传相似度分别为 0.838 和 0.177, 2 个群体遗传变异只有 7.50%

来自于群体之间, 其余都来自于个体之间。李朝霞等(2006)利用 AFLP 分析了连续选育 5 代的中国对虾群体的遗传变异, 显示有 92.89% 的变异是来源于群体内, 只有 7.11% 是来源于群体间。表明中国对虾“黄海 2 号”第 10 代选育群体与韩国西海岸野生群体之间并未发生显著的遗传分化。研究发现, 十足目甲壳动物遗传变异型较低(李思发, 1988)。原因一方面可能是中国对虾生命周期较短, 发生变异的机率较小; 另一方面, 中国对虾“黄海 2 号”在累代繁育过程中会引进野生群体, 使繁育群体与野生群体间存在基因交流, 这在很大程度上降低了选育群体与野生群体在遗传上的差异。

## 参 考 文 献

- An L, Liu P, Li J, et al. AFLP analysis on selected populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* named “Yellow Sea No.1”. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2008, 38(6): 921-926 [安丽, 刘萍, 李健, 等. “黄海 1 号”中国对虾不同时代间的 AFLP 分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(6): 921-926]
- Barker JSF. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breed: Proceedings of the 5th World Congress on genetics applied to livestock production, Canada: University of Guelph, 1994, 21: 501-508
- Guan JY, Zhang Q, Qu CY, et al. Genetic diversity of wild and artificial selecting *Cyprinus carpio haematopterus* by

- ISSR analysis. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2010, 38(4): 128–131 [关建义, 张芹, 屈长义, 等. 野生和人工选育黄河鲤遗传多样性的 ISSR 分析. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(4): 128–131]
- Lehmann T, Hawley WA, Collins FH. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*, 1996, 144(3): 1155–1163
- Li J, He Y, Wang QY, *et al.* Selective breeding of fast-growing and ammonia toxicity-resistant Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 61–66 [李健, 何玉英, 王清印, 等. 中国对虾“黄海 3 号”新品种的培育. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 61–66]
- Li SF. Conservation of the genetic performance of fish breeding population. *Journal of Fisheries of China*, 1988, 12(3): 283–290 [李思发. 鱼类繁育群体遗传性能的保护. *水产学报*, 1988, 12(3): 283–290]
- Li ZX, Li J, He YY, *et al.* AFLP analysis on selected fast growth populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese High Technology Letters*, 2006, 16(4): 435–440 [李朝霞, 李健, 何玉英, 等. 中国对虾人工选育快速生长群体不同世代间的 AFLP 分析. *高技术通讯*, 2006, 16(4): 435–440]
- Liu LW, Chen XJ, Xu QH, *et al.* Isolation and genetic diversity of microsatellite DNA of *Ommastrephes bartramii* in the North Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(32): 6848–6854 [刘连为, 陈新军, 许强华, 等. 北太平洋柔鱼微卫星标记的筛选及遗传多样性. *生态学报*, 2014, 34(32): 6848–6854]
- Luo K, Kong J, Luan S, *et al.* Comparison of growth and survival between selected population and inbreeding population at different growing stage in *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2014, 44(7): 51–57 [罗坤, 孔杰, 孛生, 等. 中国对虾选育群体与近交群体不同生长时期的生长性状和存活率的比较. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(7): 51–57]
- Mao SK, Ma AJ, Ding FH, *et al.* Analysis of genetic structures of four wild geographic populations of mullet *Liza haematocheila* by using microsatellite marker technique. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 68–75 [毛守康, 马爱军, 丁福红, 等. 梭鱼(*Liza haematocheila*)4 个野生地理群体遗传多样性的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 68–75]
- Wang MS, Wang WJ, Xiao GX, *et al.* Genetic diversity analysis of spawner and recaptured populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) during stock enhancement in the Bohai Bay based on an SSR marker. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(8): 51–56
- Wang QY, Li J, Kong J, *et al.* Seeking better growth and disease resistance for Chinese shrimp. *Asian Aquaculture Magazine*, 2003, 19–21
- Wang QY. From wild to domestication: The development of Chinese shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* farming industry in China. *Progress of Shrimp and Prawn Aquaculture in China*, 2014, 149–180 [王清印. 从野生到家养—中国对虾养殖发展评述. *《中国海水养殖科技进展》*, 2014, 149–180]
- Wang WJ, Gao H, Kong J, *et al.* Genetic variation between Chinese shrimp populations from Korean South Sea and from Chinese cultured detected by AFLP markers. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(9): 81–86 [王伟继, 高焕, 孔杰, 等. 利用 AFLP 技术分析中国明对虾的韩国南海种群和养殖群体的遗传差异. *高技术通讯*, 2005, 15(9): 81–86]
- Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, *et al.* Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: Experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 1998, 7(11): 1569–1573
- Xiao W, Wang T, Li DY, *et al.* Genetic variation of mitochondrial DNA D-loop region in different generations of Egyptian strain of *Oreochromis niloticus*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(3): 29–34 [肖炜, 王腾, 李大宇, 等. 埃及品系尼罗罗非鱼不同选育世代 mtDNA D-loop 区遗传多样性分析. *南方水产科学*, 2015, 11(3): 29–34]
- Zhang H, Gao TX, Zhuang ZM, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 38(8): 1150–1155 [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较. *水产学报*, 2010, 38(8): 1150–1155]
- Zhang TS, Liu P, Li J, *et al.* Genetic diversity of cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp using microsatellites. *Journal of Fisheries of China*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 7–12 [张天时, 刘萍, 李健, 等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究. *水产学报*, 2005, 29(1): 7–12]

## SSR Analysis on Genetic Diversity in Breeding and Wild Populations of *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Jun<sup>1,4</sup>, WANG Qingyin<sup>1,2①</sup>, KONG Jie<sup>1,2</sup>, MENG Xianhong<sup>1,2</sup>,  
CAO Jiawang<sup>1,4</sup>, WANG Mingzhu<sup>1,4</sup>, FENG Yaping<sup>1,4</sup>, LÜ Ding<sup>3</sup>

(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 and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Studies were conducted for further understanding the level of genetic diversity and population genetic structure of *Fenneropenaeus chinensis* under artificial breeding conditions. Fifteen fluorescence labeled microsatellite primers were used to analyze the genetic diversity and genetic differentiation in wild population (WP) and breeding population (BP) of *F. chinensis*. The wild population was collected from the western coast of Korean Peninsula (34°30'N, 127°30'E), and the breeding population was obtained after selection for successive ten generations. In each population, 40 samples were used for DNA extraction according to the protocol provided by the manufacturer. PCR was performed in a 25  $\mu$ l reaction and the PCR products were sequenced by Sangon Biotech(Shanghai) Co., Ltd. Allele data was analyzed by Cervus 3.0.7 and GenALEx 6.502.

The results showed that a total of 462 alleles were identified at 15 microsatellite loci, the numbers of alleles ( $N_a$ ) and effective alleles ( $N_e$ ) were 3~44 and 2~29 in WP and BP, respectively. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.518 to 0.964, and the observed heterozygosity ( $H_o$ ) values of WP and BP were 0.518 and 0.964, respectively.  $P$ -values were calculated to confirm whether the 15 loci deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium or not. Of the 30 population loci, there were 11 population loci was heterozygote excess. The Shannon genetic diversity index ( $H$ ) in WP and BP were 2.786 and 2.399, respectively. The Nei's unbiased genetic Distance ( $uD$ ), as well as unbiased genetic Identity ( $uI$ ) was 0.17 and 0.838, respectively. The Gene Flow ( $N_m$ ) and  $F_{st}$  value of the two populations were 17.997 and 0.017 ( $P=0.001$ ), respectively, indicating that there was a low genetic differentiation. Partitioning of the genetic variation revealed that only 7.50% of the genetic variation was among the populations, and the other genetic variation was within the populations. This study showed that the 'Huanghai No.2' still has high genetic diversity after selection for successive ten generations, and it also has potential value for further breeding materials.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis* "Huanghai No.2"; Wild population; Microsatellite; Genetic diversity

① Corresponding author: WANG Qingyin, E-mail: wangqy@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170220001

http://www.yykxjz.cn/

史晓丽, 孟宪红, 孔杰, 栾生, 罗坤, 曹宝祥, 曹家旺, 陈宝龙. 中国明对虾 *FBA* 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 112–119

Shi XL, Meng XH, Kong J, Luan S, Luo K, Cao BX, Cao JW, Chen BL. cDNA cloning of the *FBA* gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression and functional analysis after WSSV infection. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 112–119

# 中国明对虾 *FBA* 基因克隆及其在白斑综合征 病毒感染中的表达及功能分析\*

史晓丽<sup>1,2</sup> 孟宪红<sup>1,2①</sup> 孔杰<sup>1,2</sup> 栾生<sup>1,2</sup> 罗坤<sup>1,2</sup>  
曹宝祥<sup>1,2</sup> 曹家旺<sup>1,2</sup> 陈宝龙<sup>1,2</sup>

(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)

**摘要** 醛缩酶(*FBA*)是糖酵解和糖异生中的关键酶,参与多种生物过程。本研究采用 RACE 技术,克隆获得中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)*FBA* 基因(*FcFBA*)的全长 cDNA 序列,并对其进行生物信息学分析。结果显示,中国明对虾 *FcFBA* 基因的 cDNA 全长为 2496 bp,其中,ORF 长 1098 bp,5' UTR 长 79 bp,3' UTR 长 1319 bp。完整的阅读框编码 365 个氨基酸,分子量为 39.8 kDa,预测的理论等电点为 6.6。同源性及系统进化分析表明,*FcFBA* 与节肢动物的 *FBA* 聚为一类,与卤虫(*Artemia franciscana*)、家蚕(*Bombyx mori*)、沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)的相似度分别是 86%、79% 和 78%。荧光定量 PCR 结果显示,*FcFBA* 在肌肉中的相对表达量最高,肝胰腺中最低。WSSV 感染后,该基因在鳃、肝胰腺和肌肉中呈现出不同的时空表达特点。dsRNA 干扰 24 h 以后,抑制效率达到最大。与 PBS 对照组相比,*FcFBA* 干扰组(dsRNA 组)加快了对虾染病后的死亡速度。本研究表明,*FcFBA* 基因可能参与了中国明对虾生物胁迫的应答反应。

**关键词** 中国明对虾; *FBA* 基因; 基因克隆; 组织表达; 基因干扰

**中图分类号** Q785; S966.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0112-08

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的土著海水养殖种类之一,近十几年来,其养殖产业饱受病害困扰。在诸多病原中,白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是对对虾养殖生产毒害最大的病毒之一(Lightner, 1996),它所造成的疾病传播快、破坏性强且防治困难,已经给我国乃至全

球的对虾养殖业造成了极大危害,严重制约了对虾养殖业的健康发展。国内外学者展开了大量的研究工作,如消除传染源、切断传播途径、控制水质量、提高对虾抵抗力等,以降低其危害,但效果不显著(Yang *et al*, 2001; He *et al*, 2012; Yang *et al*, 2012; 曹家旺等, 2017)。研究对虾对病原感染的免疫应答机制,可以

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017001)、国家自然科学基金(41676148)、泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS(20603022017001), National Natural Science Foundation of China (41676148), Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System(CARS-48)]. 史晓丽, E-mail: shixiaoli209@163.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-20, 收修改稿日期: 2017-03-21

为有效地进行对虾的病害防治提供重要的理论指导。

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA)(EC 4.1.2.13)是糖酵解和糖异生过程中的一种关键酶,它普遍存在于动植物及微生物体内。到目前为止,醛缩酶已在多个物种,尤其是细菌和脊椎动物中得到了广泛研究,研究重点在其结构、动力学参数、酶活特性和治疗中的潜在功能(Giegé *et al.*, 2003; Lorentzen *et al.*, 2004; Rodaki *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2013)。哺乳动物醛缩酶通过与控制肌动蛋白聚合的 WASP/Arp2/3 复合物相互作用,从而在细胞内吞中起作用,最终影响了细胞增殖(Lew *et al.*, 2012、2013)。尤其引人注意的是,醛缩酶基因的干扰可以抑制细胞增殖,单核酸突变也可以降低酶活并抑制脊椎动物的生长(Van den Berghe, 1994; Haake *et al.*, 1999)。最新研究表明,醛缩酶还在控制 RNA 聚合酶 III 转录中起作用(Cieśla *et al.*, 2014)。而在水产动物中,该基因相关的研究报道则较少,仅在电鳗(*Electrophorus electricus*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、红耳龟(*Trachemys scripta*)等少数物种中,有部分酶活分析和 SNP 研究(De-Simone *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; 曹婷婷等, 2012; 李玺洋等, 2012; Dawson *et al.*, 2013)。

在中国明对虾感染 WSSV 后的表达谱芯片研究中,我们发现醛缩酶基因出现了显著差异表达。此外,该基因内部出现了与抗病性状呈显著关联的 SNP 位点。因此,本研究采用 RACE 技术克隆中国明对虾的醛缩酶基因(以下称 *FcFBA* 基因),研究其在感染 WSSV 后的时空表达特点,并进一步利用基因干扰技术初步分析其在对虾染病后的表达特点,以期为中国明对虾抗 WSSV 育种提供理论依据和实践材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国明对虾实验群体取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心,对虾大小均匀,体重为(1.01±0.21) g。实验前,暂养 1 周。实验用水为砂滤后海水,养殖期间的水温为 24.8℃~25.4℃,盐度为 28,持续充氧,每天换水,并投喂配合饲料。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 Trizol 法提取中国明对虾肝胰腺组织的总 RNA,具体操作方法参照说明书(Invitrogen, 美国)。采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳,检测所提取 RNA 的质量及完整性。利用 SMART™ RACE Amplification Kit(Clontech, 美国)反转录合成 cDNA 第一条链。

### 1.3 *FcFBA* 基因全长 cDNA 的克隆及测序

根据本实验室的中国明对虾 454 转录组测序获得的醛缩酶基因的部分 EST 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 5' RACE 和 3' RACE 引物(表 1),利用 AD 酶,分别进行 RACE 扩增。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,利用胶回收试剂盒回收目的片段,连接到 pMD18-T simple 载体上,转化入 Top 10 感受态细胞。使用 M13 引物(表 1)对克隆进行菌落 PCR 鉴定,阳性克隆经确定后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.4 基因生物信息学分析

通过 NCBI 网站上的 BLASTX 对测序结果进行序列同源性比对分析,利用 DNASTAR 软件进行全长

表 1 引物序列及信息  
Tab.1 Primer sequences in RACE, qRT-PCR and RNAi

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
5' outer primer	AGAGAGGAAGGTCACGCCAG	RACE
5' inner primer	CGGGAAAGAGCAACCACTGT	RACE
3' outer primer	ACCCTCCTCAAGCCCAACAT	RACE
3' inner primer	TCAGTCCTGCCCAAGAAAT	RACE
RT-F	ACCCTCCTCAAGCCCAACAT	qRT-PCR
RT-R	AGAGAGGAAGGTCACGCCAG	qRT-PCR
18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	qRT-PCR
18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	qRT-PCR
RNAi F	TAATACGACTCACTATAGGGGCCAGAAGGCCGATGATGGAA	RNAi
RNAi R	TAATACGACTCACTATAGGGTTAGCAACCTCCTGGGGAGT	RNAi
M13-F	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	菌落鉴定 Colony PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	菌落鉴定 Colony PCR

序列拼接, 在线生物学软件 ExPASy 对全长序列编码的氨基酸序列进行生物信息学分析, 使用 MEGA 5.0 软件的邻接法(NJ)构建系统进化树。

### 1.5 人工 WSSV 感染实验

实验前随机挑选暂养的健康中国明对虾 180 尾, 平均分为 2 组(WSSV 感染组和对照组), 每组 3 个平行。WSSV 感染组, 从第 5 腹节处注射病毒含量为  $10^3$  copies/ $\mu$ l 的病毒悬液 10  $\mu$ l, 各组分别在实验开始后的 0、6、12、24、48 h, 取鳃、肝胰腺和肌肉组织, 每个时间点各取 3 尾存于液氮中, 用于后续 RNA 的提取及荧光定量验证。

### 1.6 *FcFBA* dsRNA 的合成

以中国明对虾肝胰腺 cDNA 为模板, 用正向引物 RNAi F 和反向引物 RNAi R, PCR 扩增 *FcFBA* 基因的 cDNA 片段。采用 *rTaq* 酶进行扩增, PCR 扩增体系为 20  $\mu$ l, 包括模板 2  $\mu$ l, 正反向引物(10  $\mu$ mol/L 各 1  $\mu$ l, PCR Buffer 2  $\mu$ l, dNTP (2.5 mmol/L each) 1.6  $\mu$ l。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1 个循环。PCR 结束后, 采用胶回收试剂盒进行纯化。由此, 获得 *FcFBA* dsRNA 的体外转录模板。采用 *in vitro* Transcription T7 Kit 进行体外转录, 实验方法参见(for siRNA Synthesis)说明书 (TaKaRa, 日本)。

### 1.7 dsRNA 干扰

设置 dsRNA 实验组和 PBS 对照组, 每组 30 尾对虾, 2 个平行。注射前, 取 3 尾虾作为空白对照。对照组每尾对虾从第 5 腹节处注射 10  $\mu$ l 的 PBS, 实验组每尾对虾从第 5 腹节处注射 10  $\mu$ l 的 dsRNA (100 ng/ $\mu$ l), 注射后的 6、12、24、48 和 72 h 分别取肝胰腺组织用于 RNA 提取, 以进行后续的基因表达分析。在干扰后的 24 h, 2 组分别再注射 10  $\mu$ l  $10^3$  copies/ $\mu$ l 的 WSSV 病毒悬液, 统计 2 组的死亡率。

### 1.8 基因的时空表达分析

以 18S rRNA 作为 real-time PCR 反应的内参基因, 采用 TaKaRa 的荧光定量 PCR 试剂盒对基因进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测。所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪, 各个基因引物序列见表 1。20  $\mu$ l 反应体系包含: 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ l, 正向和反向引物各 1  $\mu$ l (2  $\mu$ mol/L), 稀释后的 cDNA 模板 1  $\mu$ l (1:10 稀释), 循环参数参照说明书。实验重复 3 次, 以平均值进行后续数据分析。根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

方法计算出每个基因的相对表达量, 所得数据用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 比较均值的差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FcFBA* 基因 cDNA 全长序列的克隆

根据实验室前期获得的醛缩酶基因部分 EST 序列设计 RACE 引物, 获得 5'RACE 片段和 3'RACE 片段, 长度分别为 594 bp 和 1366 bp, 拼接后得到全长 cDNA 序列。*FcFBA* cDNA 序列全长为 2496 bp, 其中, ORF 为 1098 bp, 编码 365 个氨基酸(GenBank No. KJ686589), 含有 5 个保守的氨基酸位点, 包括 Lys<sub>231</sub>。该蛋白预测的理论等电点为 6.6, 分子量为 39.8 kDa。序列中的 5' UTR 长 79 bp, 3' UTR 长 1319 bp, 终止密码子为 TAA(图 1)。

### 2.2 *FcFBA* 蛋白系统进化分析

氨基酸序列比对表明, *FcFBA* 的蛋白序列与节肢动物的相似度最高, 如与卤虫(*Artemia franciscana*)、家蚕(*Bombyx mori*)、沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)的相似度分别是 86%、79%和 78%, 而与小鼠(*Mus musculus*)醛缩酶的 A 型、C 型、B 型的相似度分别是 68%、66%和 62%。系统进化分析表明, 包括中国明对虾在内的节肢动物的醛缩酶自成一类, 然后再和高等动物的聚为一类(图 2)。

### 2.3 *FcFBA* 基因的组织表达分析

*FcFBA* 基因在中国明对虾各组织中的相对表达量分析结果显示, 该基因在鳃、肝胰腺、肌肉中均有表达。其中, 肌肉中的表达量最高, 鳃中次之, 肝胰腺中的表达量最少(图 3A)。

*FcFBA* 基因在感染 WSSV 的对虾不同组织中的相对表达量变化结果显示(图 3), 与对照组相比, *FcFBA* 基因在肝胰腺中, 表现为先上调后下降再上调的趋势, 在 6 h 和 48 h 显著上调, 分别是对照组的 20.7 和 14.7 倍( $P < 0.05$ ); 鳃中, 表现为先下调后上升的趋势, 在 6 h 达到最低, 为对照组的 0.31 倍, 在 12 h 达到最高, 为对照组的 2.15 倍, 但差异均不显著; 肌肉中, 表现为先上调后再下降的趋势, 6 h 达到最高, 为对照组的 2.88 倍( $P < 0.05$ ), 12 h 和 24 h 均高于对照组, 但无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 2.4 *FcFBA* 基因在 RNAi 后的表达变化

对虾肝胰腺 *FcFBA* 基因在干扰后的相对表达量结果显示, 与对照组相比, 干扰组 *FcFBA* 基因的

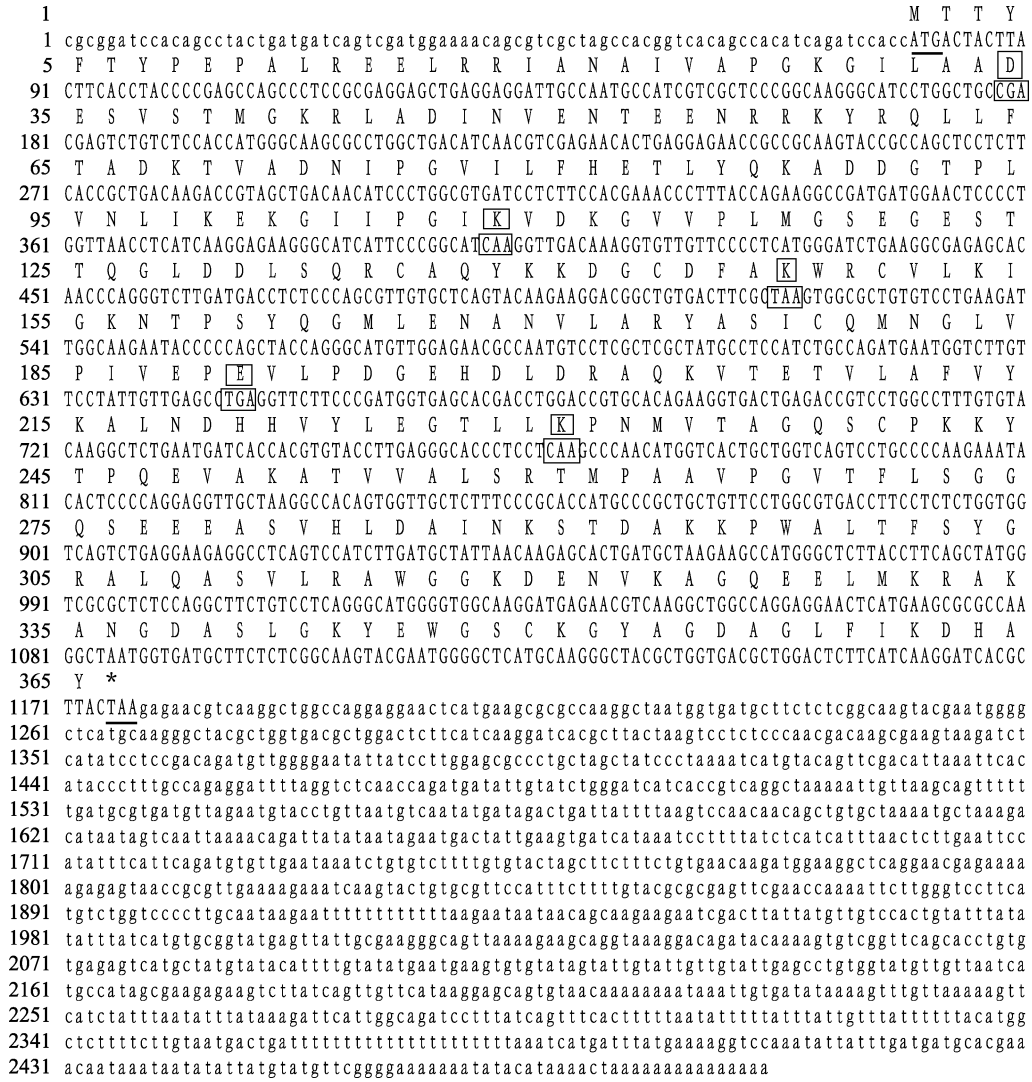


图 1 *FcFBA* cDNA 全长序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the *FcFBA* gene

起始密码子和终止密码子用下划线表示, 保守位点用框表示

The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are underlined. The conserved active sites and their codons are boxed

表达量表现出先上调再下调的趋势, 感染后 6 h 干扰组 *FcFBA* 表达为对照组 1.8 倍( $P>0.05$ ), 24 h 干扰组的表达量达到最低, 为对照组的 0.28 倍( $P<0.05$ ) (图 4A)。

### 2.5 干扰后对虾感染 WSSV 的死亡率

dsRNA 干扰组和 PBS 对照组在干扰以后 24 h 再进行 WSSV 病毒感染实验, 共持续 9 d。感染后的死亡结果显示, 各组累计死亡率均为 100% (图 4B)。对照组中, 在感染后 48 h 开始出现死亡个体。干扰组中, 感染后 24 h 出现 1 尾死亡对虾, 但没有表现出白斑症状, 推测原因是注射后由于对虾自身的抵抗力弱而导致的死亡。从感染后 42 h 开始, 2 组出现的死亡个体都具有明显的白斑症状。

### 3 讨论

本研究是醛缩酶在对虾中的首次系统研究, 克隆的 *FcFBA* 基因 ORF 全长为 1098 bp, 编码 365 个氨基酸。序列分析表明, 其含有醛缩酶的保守功能位点, 包含 I 型醛缩酶的功能位点 Lys<sub>231</sub>。氨基酸的进化分析表明, 该醛缩酶基因与其他节肢动物的醛缩酶基因明显聚为一类。ORF 序列分析、蛋白保守位点分析及蛋白的系统进化分析均表明, *FcFBA* 基因与其他物种的醛缩酶具有较高的相似性, 因此, 确定本研究克隆的 *FcFBA* 基因为中国明对虾的醛缩酶基因。

自然界中存在 2 种不同机制的醛缩酶: I 型和 II 型, 前者存在于高等真核生物尤其是动物和高等植物中, 它们能在底物的羰基和自身活性部位的赖氨酸之

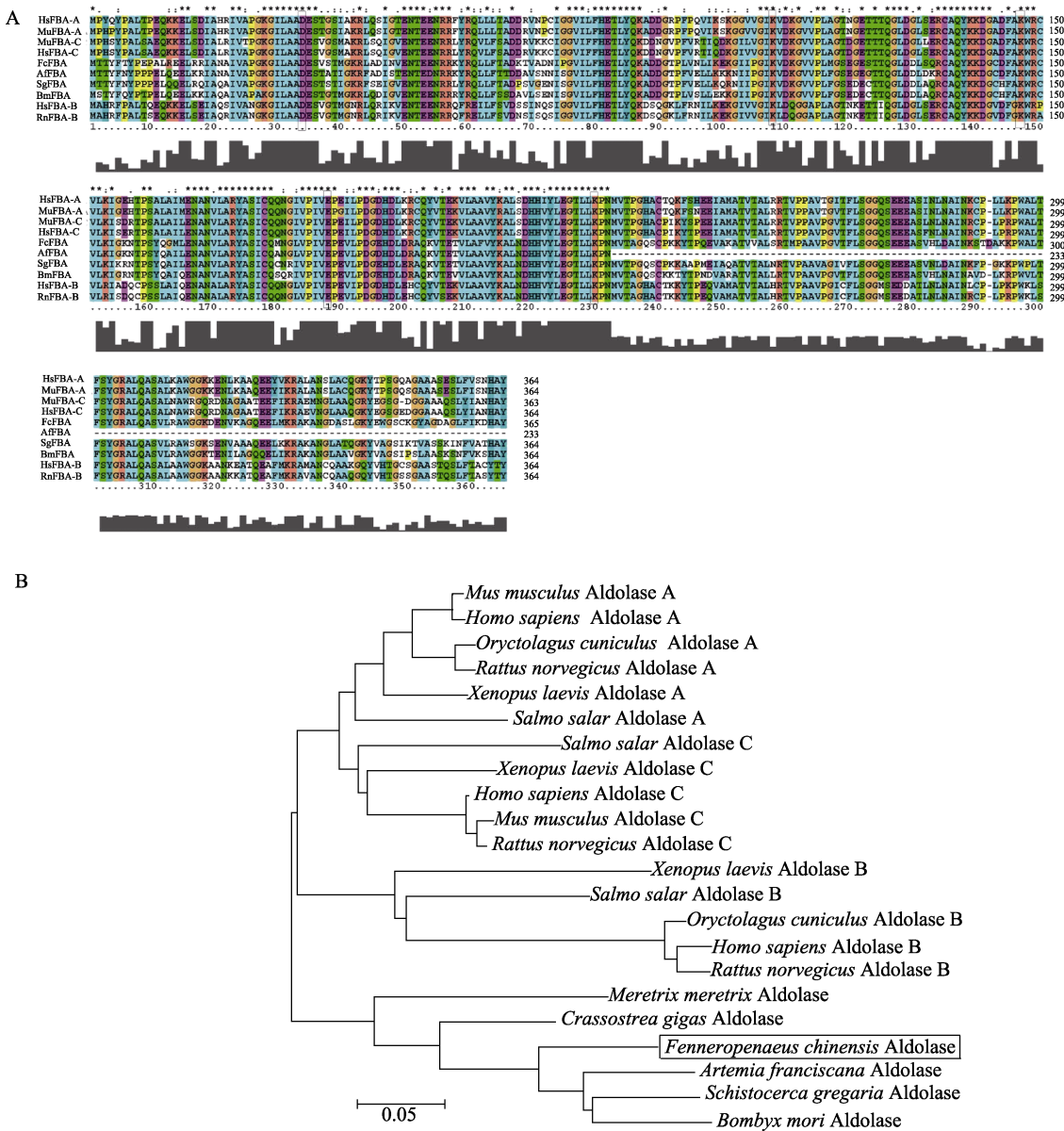


图 2 FcFBA 的氨基酸序列比对(A)及系统进化分析(B)

Fig.2 The analysis of amino acid sequence (A) and phylogenetic tree analysis (B) of FcFBA from various species

A: 氨基酸序列比对, 序列如下: 人的 A 型醛缩酶(HsFBA-A, AAH16800), 小鼠的 A 型(MuFBA-A, AAH89495), 人的 C 型(HsFBA-C, AAC09348), 小鼠 C 型(MuFBA-C, NP\_033787), 人的 B 型(HsFBA-B, BAA00125), 大鼠 B 型(RnFBA-B, CAA26156), 中国明对虾(FcFBA, KJ686589), 家蚕(BmFBA, NP\_001091766), 沙漠蝗(SgFBA, AEV89754), 卤虫(AfFBA, ACH81781)

A: The amino acid sequence: *Homo sapiens* aldolase A (HsFBA-A, AAH16800), *M. musculus* aldolase A (MuFBA-A, AAH89495), *H. sapiens* aldolase C (HsFBA-C, AAC09348), *M. musculus* aldolase C (MuFBA-C, NP\_033787), *H. sapiens* aldolase B (HsFBA-B, BAA00125), *Rattus norvegicus* aldolase B (RnFBA-B, CAA26156), *F. chinensis* aldolase (FcFBA, KJ686589), *B. mori* aldolase (BmFBA, NP\_001091766), *S. gregaria* aldolase (SgFBA, AEV89754), and *A. franciscana* aldolase (AfFBA, ACH81781)

间形成一个西弗碱中间物(Schnarrenberger, 1990); 后者则存在于真核绿藻、真菌以及原核细菌中, 催化裂合反应的时候需要一个二价的过渡态金属离子如  $Zn^{2+}$ (Rutter, 1964)。脊椎动物中, I 型醛缩酶分为 3 种组织特异性的同工酶: A 型、B 型和 C 型。A 型

在肌肉中表达, B 型在肝脏、肾脏、胃及肠道中表达, 而 C 型则在脑、心脏及卵巢中表达(余南等, 2005)。这些同工酶有不同的催化功能: 3 种同工酶都参与糖酵解, B 型相对于 A 型和 C 型来说, 又参与糖异生。在本研究中, *FcFBA* 基因在肌肉中的表达量最高, 暗



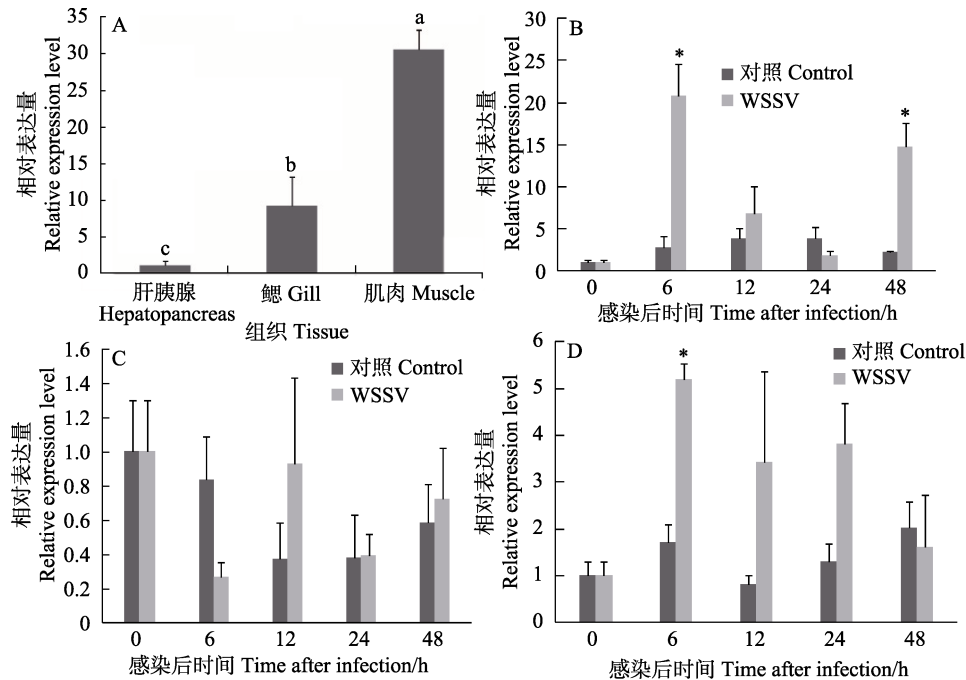


图 3 *FcFBA* mRNA 的组织表达

Fig.3 The expression profiles of *FcFBA* mRNA in hepatopancreas, gill and muscle

A: 正常组织; B: 感染后肝胰腺; C: 感染后鳃; D: 感染后肌肉  
 A: Control shrimp, B: Hepatopancreas post WSSV challenge; C: Gill post WSSV challenge;  
 D: Muscle post WSSV challenge

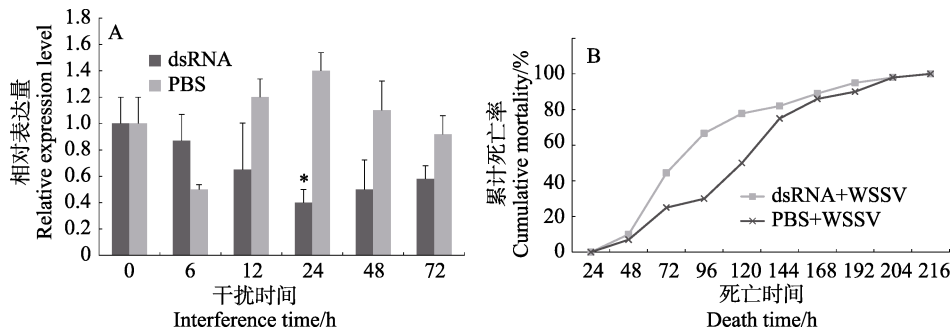


图 4 dsRNA 注射后的死亡率及干扰后 *FcFBA* 基因的表达

Fig.4 The mortality of shrimp after dsRNA injection and the *FcFBA* expression after RNAi

A: 干扰后的基因表达变化; B: 累计死亡率  
 \*表示实验组和对照组之间差异显著( $P < 0.05$ )

A: Expression profile after RNAi; B: Mortality of shrimp

\* indicated the difference between experiment and control group was statistically significant ( $P < 0.05$ )

示中国明对虾的醛缩酶是 A 型醛缩酶。

本研究还分析了对虾在感染 WSSV 后该基因的表达趋势。结果显示,肝胰腺和肌肉中该基因出现了明显的上调表达,其中,肝胰腺对 WSSV 感染最敏感,说明 WSSV 对该基因是一个明显的刺激,这和已有的研究报道结果一致。有学者在中国明对虾感染 WSSV 后获得的差异表达基因中,发现了醛缩酶基因的表达量在感染后的 6 h 提高了 100 多倍(Wang *et al*,

2006),凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在感染 WSSV 后,醛缩酶基因的表达在 6 h 和 36 h 显著上调,在感染后 12 h 则下调(Wang *et al*, 2007)。以上结果表明,该基因与对虾抗 WSSV 有关,在对虾抗病中起作用,为对虾抗病相关基因。

已有研究显示,利用 dsRNA 干扰对任何一个基因产生的敲降作用为正常基因表达水平的 10%~40% (Collins *et al*, 2005)。据报道,目的基因 dsRNA 的注



射量在一定范围内与干扰效率呈正相关,一旦超出这一范围,干扰效果将不再增加,可能原因是目标基因 mRNA 结合的 siRNA 已达到饱和。Robalino 等(2004)将体外转录获得的 WSSV 的外壳蛋白 VP19 的编码基因的 dsRNA 导入凡纳滨对虾体内,发现不同剂量的 dsRNA 抑制病毒的效率有很大的差别。注射 10  $\mu\text{g}$  特异 dsRNA 时,对虾的保护率是 81%;注射 1  $\mu\text{g}$  时,保护率是 72%,而注射 0.1  $\mu\text{g}$  保护率仅为 29%。此外,不同物种 dsRNA 的有效注射量是不同的,如蜜蜂中 dsRNA 的注射量为每克软体重 50  $\mu\text{g}$ ,对虾的注射量为 15  $\mu\text{g}$  (Robalino *et al.*, 2004);太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)以每克软体重注射 20  $\mu\text{g}$  dsRNA 时,产生的干扰效率为 80%,而当每克软体重注射量为 4~5  $\mu\text{g}$  时,干扰效率为 14%(Fabioux *et al.*, 2009)。在对虾基因干扰的研究中,很多学者采用 1  $\mu\text{g/g}$  的剂量进行注射,取得了较好的结果。本研究通过前期对不同干扰计量的摸索发现,注射 dsRNA 的浓度为 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  时(按照体重估算是 1  $\mu\text{g/g}$ ),干扰效果最好(未发表数据)。研究人员发现,长 dsRNA 引起靶基因的沉默效率要高于短 dsRNA,一般情况下,体外合成 dsRNA 的长度不小于 300 bp (Robalino *et al.*, 2004),无脊椎动物对长 dsRNA 的吸收率高于短 dsRNA,因此,本研究设计的 dsRNA 为 600 bp 左右,符合基因干扰实验对长度的要求。与 PBS 对照组相比,醛缩酶基因在干扰以后表达量随时间下降,尤其是在干扰后 24 h, dsRNA 注射组的基因表达量显著低于对照组,说明干扰成功。同时,通过干扰后对虾的死亡率比较,发现干扰对虾在 WSSV 感染后,明显提高了死亡速度。

本研究首次在中国明对虾中获得了醛缩酶基因的全长 cDNA 序列,分析了 WSSV 感染后,该基因在不同组织中的表达特征,并进一步通过基因干扰结果分析,推断该基因可能在对虾抗病中起作用,但其在病毒感染后的作用机制仍需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- 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]
- Cao TT, Bai JJ, Yu LY, *et al.* Polymorphisms of SNPs in ALDO B gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 481–488 [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 多态性及其与生长性状的关联分析. *水产学报*, 2012, 36(4): 481–488]
- Cieřla M, Mierzejewska J, Adamczyk M, *et al.* Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843(6): 1103–1110
- Collins RE, Cheng XD. Structural domains in RNAi. *FEBS Letters*, 2005, 579(26): 5841–5849
- Dawson NJ, Biggar KK, Storey KB. Characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase during anoxia in the tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*: An assessment of enzyme activity, expression and structure. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68830
- De-Simone SG, de Salles CM, Batista e Silva CM, *et al.* Purification and amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the electric organ of *Electrophorus electricus* (L.). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2006, 61(11–12): 884–888
- Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, *et al.* *In vivo* RNA interference in oyster-*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 2009, 276(9): 2566–2573
- Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, *et al.* Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 2140–2151
- Haake V, Geiger M, Walch-Liu P, *et al.* Changes in aldolase activity in wild-type potato plants are important for acclimation to growth irradiance and carbon dioxide concentration, because plastid aldolase exerts control over the ambient rate of photosynthesis across a range of growth conditions. *Plant Journal*, 1999, 17(5): 479–489
- He YD, Zhang XB. Comprehensive characterization of viral miRNAs involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *RNA Biology*, 2012, 9(7): 1019–1029
- Lew CR, Tolan DR. Aldolase sequesters WASP and affects WASP/Arp2/3-stimulated actin dynamics. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2013, 114(8): 1928–1939
- Lew CR, Tolan DR. Targeting of several glycolytic enzymes using RNA interference reveals aldolase affects cancer cell proliferation through a non-glycolytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(51): 42554–42563
- Li XY, Bai JJ, Yu LY, *et al.* Association analysis between mutation of aldolase A 3'-UTR and growth traits in *Ctenopharyngodon idella*. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 13–16 [李玺洋, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼醛缩酶 A3'-UTR 突变与生长性状相关研究. *淡水渔业*, 2012, 42(5): 13–16]
- Lightner DV. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique*, 1996, 15(2): 579–601
- Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, *et al.* Structure, function and evolution of the Archaeal class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32(2): 259–263
- Robalino J, Browdy CL, Prior S, *et al.* Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology*, 2004, 78(19): 10442–10448
- Rodaki A, Young T, Brown AJP. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: Implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(8): 1371–1377
- Rutter WJ. Evolution of aldolase. *Federation Proceedings*, 1964, 23: 1248–1257
- Schnarrenberger C. Characterization and compartmentation, in

- green leaves, of hexokinases with different specificities for glucose, fructose, and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta*, 1990, 181(2): 249–255
- Van den Berghe G. Inborn errors of fructose metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 1994, 14: 41–58
- Wang B, Li FH, Dong B, *et al.* Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(5): 491–500
- Wang C, Wang HX, Li Y, *et al.* Identification of a fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene and association of the single nucleotide polymorphisms with growth traits in the clam *Meretrix meretrix*. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 5017–5024
- Wang HC, Wang HC, Leu JH, *et al.* Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(7): 672–686
- Yang F, He J, Lin XH, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811–11820
- Yang JY, Chang CI, Liu KF, *et al.* Viral resistance and immune responses of the shrimp *Litopenaeus vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins. *Immunology Letters*, 2012, 148(1): 41–48
- Yu N, He A, Li ZY, *et al.* Characterization and analysis of *Toxoplasma gondii* aldolase gene and intron. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2005, 21(7): 580–583 [余南, 何蔼, 李卓雅, 等. 刚地弓形虫醛缩酶基因及其内含子的分析. *中国人兽共患病杂志*, 2005, 21(7): 580–583]

(编辑 马璀璨)

## cDNA Cloning of the *FBA* Gene in *Fenneropenaeus chinensis* and Its Expression and Functional Analysis After WSSV Infection

SHI Xiaoli<sup>1,2</sup>, MENG Xianhong<sup>1,2</sup>✉, KONG Jie<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>1,2</sup>, LUO Kun<sup>1,2</sup>,  
CAO Baoxiang<sup>1,2</sup>, CAO Jiawang<sup>1,2</sup>, CHEN Baolong<sup>1,2</sup>

(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)

**Abstract** Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) is a key glycolytic enzyme involved in both the glycolytic and gluconeogenic pathways. In the present study, fructose-1,6-bisphosphate aldolase from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* (*FcFBA*) was cloned and sequenced. The full-length complementary DNA (cDNA) sequence of *FcFBA* is 2496 bp long, which contains a 79-bp 5'-untranslated region (UTR), 1319-bp 3'-UTR, and 1098-bp open reading frame, encoding a polypeptide of 365 amino acids with a molecular mass of 39.8 kDa and a theoretical isoelectric point of 6.6. Multiple sequence alignments showed the high similarity of *FcFBA* with the aldolases of other arthropods. Phylogenetic analysis showed that *FcFBA* of shrimp belonged to the same class as that of other arthropod aldolases. The transcript of *FcFBA* showed the highest expression in the muscle and lowest expression in the hepatopancreas, which indicates that *FcFBA* is similar to the muscle type (type A) aldolase that acts in the glycolytic pathway. The expression profile of *FcFBA* in the hepatopancreas, gills, and muscle was modulated when the shrimp were stimulated by white spot syndrome virus (WSSV), which resulted in differential expression of *FcFBA*. Further, RNA interference (RNAi) was used to analyze the role of *FcFBA*. After RNAi, the mortality of shrimp after WSSV infection was altered compared with that after phosphate-buffered saline injection. Within 24 h of RNAi, the expression level of *FcFBA* was significantly down regulated. These results show that *FcFBA* is inducible and might be involved in the immune response of shrimp.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene; Cloning; Expression; RNA interference

✉ Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170216001

http://www.yykxjz.cn/

冯亚萍, 孔杰, 罗坤, 栾生, 李旭鹏, 史晓丽, 曹家旺, 王明珠, 王军, 董丽君, 孟宪红. 不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑综合征病毒(WSSV)耐受性比较. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 120–127

Feng YP, Kong J, Luo K, Luan S, Li XP, Shi XL, Cao JW, Wang MZ, Wang J, Dong LJ, Meng XH. The difference of tolerance to white spot syndrome virus between *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* at different temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 120–127

## 不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑 综合征病毒(WSSV)耐受性比较\*



冯亚萍<sup>1,2,3</sup> 孔 杰<sup>1,2</sup> 罗 坤<sup>1,2</sup> 栾 生<sup>1,2</sup> 李旭鹏<sup>1,2</sup> 史晓丽<sup>1,2</sup>  
曹家旺<sup>1,2,3</sup> 王明珠<sup>1,2,3</sup> 王 军<sup>1,2,3</sup> 董丽君<sup>1,2,3</sup> 孟宪红<sup>1,2</sup>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)

**摘要** 本研究分别对凡纳滨对虾“壬海 1 号”(*Litopenaeus vannamei* “Renhai No.1”)和中国明对虾“黄海 2 号”(*Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”)在 3 种温度条件下(24℃、28℃和 32℃), 采用单尾定量口饲感染白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的方法进行感染实验, 比较 2 种对虾在不同温度情况下对 WSSV 的耐受性差异(L 代表凡纳滨对虾, F 代表中国明对虾)。结果显示, L-24℃和 F-24℃组的平均存活时间分为(184.05±69.56) h 和(101.68±38.45) h; L-28℃和 F-28℃组的平均存活时间分别为(100.25±26.79) h 和(73.38±22.22) h, 相同温度组内均存在显著性差异( $P<0.05$ ); 截至第 15 天, L-32℃和 F-32℃组的存活率分别为 45.74%和 23.47%。3 个温度组对虾在 50%的死亡率时的存活时间分别为 178 h 和 98 h、98 h 和 74 h、292 h 和 78 h; 死亡高峰时间分别为第 5 天和第 4 天、第 5 天和第 4 天、第 10 天和第 4 天。另外, 分别在感染后的 12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、15 d 共 9 个时间点对每组对虾进行活体取样, 利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对其进行病毒载量检测, 从对虾体内肌肉组织病毒载量的角度探寻不同对虾抗病性能的差异。6 d 时, L-24℃和 F-24℃组对虾肌肉内病毒载量分别达到(2.97×10<sup>6</sup>±7.44×10<sup>6</sup>)和(8.08×10<sup>6</sup>±3.22×10<sup>6</sup>) copies/ng DNA, 差异极显著( $P<0.01$ ), L-28℃和 F-28℃组分别达到(6.73×10<sup>6</sup>±1.49×10<sup>6</sup>)和(1.20×10<sup>7</sup>±6.15×10<sup>5</sup>) copies/ng DNA, 差异极显著( $P<0.01$ ); 15 d, L-32℃和 F-32℃组分别达到(5.18×10<sup>3</sup>±4.32×10<sup>3</sup>)和(3.78×10<sup>4</sup>±8.97×10<sup>3</sup>) copies/ng DNA, 差异显著( $P<0.05$ )。研究表明, 2 种对虾在 3 种温度环境下感染 WSSV 后, 凡纳滨对虾耐受 WSSV 能力要高于中国明对虾; 不同温度下同

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017001)、国家自然科学基金(41676148)、泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS(20603022017001), National Natural Science Foundation of China (41676148), Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System (CARS-48)]. 冯亚萍, E-mail: 505390349@qq.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-16, 收修改稿日期: 2017-03-10

种对虾肌肉体内 WSSV 的增殖能力从强到弱依次为 28℃组、24℃组和 32℃组。

**关键词** 凡纳滨对虾; 中国明对虾; 不同温度; 白斑综合征病毒(WSSV); 耐受性

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0120-08

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是迄今对虾养殖业危害最大的一种病毒。其具有很强的感染力, 被感染对虾在 3~10 d 内的死亡率高达 100%, 致使全球对虾养殖业遭受了巨大的经济损失(薛晖等, 2010; Cavalli *et al.*, 2008)。为了解和控制疾病的发生, 减少经济损失, 诸多学者投身于对虾 WSSV 的研究中, 探究 WSSV 的防治措施(闫冬春, 2006)。然而, 这些方法都不能有效控制 WSSV 的大规模暴发(Verbruggen *et al.*, 2016)。病毒的大量增殖以及疫情大规模暴发受许多因素的影响, 包括传播媒介、宿主种类以及外界环境等, 其中, 温度与白斑综合征发生密切相关(李侃等, 2013)。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)在人工注射感染 WSSV 后, 其病毒复制的时间和抵抗力存在明显差异(孙成波等, 2006)。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)人工感染 WSSV 后, 日本囊对虾的存活时间长于中国明对虾(Jiang *et al.*, 2006)。盖春雷等(2013)研究发现, 在人工投喂感染 WSSV 后, 中国明对虾比日本囊对虾的发病时间早并且发病率高。本文研究凡纳滨对虾与中国明对虾在不同温度条件下人工感染 WSSV 后的存活时间、累积死亡率以及对虾肌肉内的病毒载量变化情况, 以期阐明不同温度条件下这 2 种对虾抗 WSSV 性能的差异, 可为实践中优化养殖条件和选育策略, 以及为减少和控制对虾疾病的暴发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验在中国水产科学研究院黄海水产研究所对虾性状测试车间进行。实验所用凡纳滨对虾群体来自河北海壬水产种业科技有限公司, 为凡纳滨对虾新品种“壬海 1 号”; 中国明对虾群体来自青岛海水养殖引种育种中心的“黄海 2 号”。选取凡纳滨对虾平均体长和体重约为 48.99 mm 和 1.34 g, 中国明对虾平均体长和体重约为 38.82 g 和 0.41 g, 数量均为 1200 尾。实验用水为经砂滤的自然海水, 海水盐度为 30±1。养殖水箱体积为 130 L, 保证 24 h 充气。实验前暂养 8 d, 每日投喂 3 次(06:00、14:00、22:00)配合饲料(日投饵量占对虾总体重 3%~5%), 吸污 1 次, 换水 1 次

(约为 50%)。实验前 2 种对虾各随机抽取 3 尾对虾经绝对实时荧光定量 RT-PCR 检测其体内 WSSV 病毒载量, 结果均为阴性。文中 L 代表凡纳滨对虾, F 代表中国明对虾。

### 1.2 WSSV 毒饵的制备

取甲壳有明显白斑、发病濒死的对虾肌肉组织, 并加入可食用红色素, 在充分预冷的组织匀浆机中搅拌, 制成混合均匀、颜色醒目的毒饵。其制备过程须在低温环境中快速进行, -80℃冰箱保存。经实时荧光定量 PCR 检测毒饵 WSSV 拷贝数, 毒饵病毒载量为  $1 \times 10^6$  copies/mg。

### 1.3 分组及管理

凡纳滨对虾与中国明对虾各设置 3 个温度环境(24℃、28℃和 32℃), 每个温度各设置 3 个平行实验组和 1 个空白对照组, 每组各 100 尾。实验前暂养期间, 海水自然温度为 24℃, 28℃和 32℃组均用加热棒进行升温, 每天升温 0.5℃, 直至各组水温均达到实验所需温度, 并且每日均用相应温度的海水分别进行换水处理。

### 1.4 人工饲喂感染

饲喂毒饵前, 对虾饥饿处理 6 h, 保证其胃肠排空, 用 WSSV 毒饵进行人工口饲感染。分别将不同实验组的虾捞出放入单独容器中, 将新鲜制备的毒饵置于冰上, 用镊子夹取毒饵(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, 将其放回养殖水箱; 对照组饲喂经检验为 WSSV 阴性的健康对虾肌肉。饲喂完毕后, 正常投饵、换水, 观察对虾死亡情况。

### 1.5 样品采集及处理

实验开始分别在 12、24、48、72、96、120、144、168 h 共 8 个时间点活体取样, 每组各取 3 尾对虾肌肉组织用于检测其病毒载量。第 15 天, 在 32℃组再各取 3 尾对虾肌肉组织(24℃和 28℃两组对虾已全部死亡), 并置于-80℃保存, 实验共进行 15 d。

### 1.6 WSSV 载量检测方法

取 8 个时间点的各组对虾肌肉组织按照王伟继

(2008)的方法进行 DNA 提取。DNA 经 1%的琼脂糖凝胶电泳, 利用凝胶成像系统(BioImaging Systems)检测其完整性, 使用超微量紫外分光光度计(Biodropsis BD-2000)测定 DNA 质量及浓度, 并将其稀释至 40 ng/ $\mu$ l。WSSV 载量测定采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法(Durand *et al.*, 2002), 目标片段长度为 69 bp, 引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。荧光定量 PCR 反应体系(20  $\mu$ l): 1 $\times$ Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Probe qPCR)、正反向引物各 0.25  $\mu$ mol/L(表 1)、ROX Reference Dye II 0.25  $\mu$ mol/L、探针 0.125  $\mu$ mol/L、病毒 DNA 模板 2  $\mu$ l, 灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 34 s; 共 40 个 PCR 循环。以本实验室自行制备含有目的片段的重组质粒 pUCm-T/WSSV69 为标准品, 将 WSSV 标准品进行 10 倍系列梯度稀释, 共 7 个梯度, 分别为(1.02 $\times$ 10<sup>3</sup>)~(1.02 $\times$ 10<sup>8</sup>) copies/ $\mu$ l, 无菌双蒸水作为阴性对照, 每个稀释度设置 3 个平行, 用作阳性对照及标准曲线的构建。每个 DNA 样品平行检测 3 次, 取其平均值作为该样品的 WSSV 载量。

表 1 实验所用引物

Tab.1 PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
WSS probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA
WSS1011F	TGGTCCCGTCCTCATCTCAG
WSS1079R	GCTGCCTTGCCGGAAATTA

### 1.7 数据统计及分析

从实验出现第 1 尾对虾死亡开始, 每隔 1 h 进行观察, 捞出死亡对虾并记录其死亡时间、组别、体长和体重, 装入取样管并放置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中, 直至实验结束。统计感染 WSSV 后每组对虾的平均存活时间, 结果表示为平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)。采用 SPSS

19.0 软件和 Origin 9.0 进行数据统计分析, 并用单因素方差(One-way ANOVA)分析对虾平均存活时间和体内肌肉组织病毒载量的差异。

## 2 结果

### 2.1 WSSV 感染后对虾各性状描述性统计

经 WSSV 感染后, 2 种对虾 24 $^{\circ}$ C 组和 28 $^{\circ}$ C 组死亡率均为 100%。L-24 $^{\circ}$ C 组和 F-24 $^{\circ}$ C 最大存活时间分别为 324 h 和 214 h, L-28 $^{\circ}$ C 和 F-28 $^{\circ}$ C 最大存活时间分别为 198 h 和 130 h, 2 种对虾 28 $^{\circ}$ C 组最大存活时间均小于 24 $^{\circ}$ C 组; 而 L-32 $^{\circ}$ C 和 F-32 $^{\circ}$ C 截至实验结束, 均有存活对虾, 存活率分别为 45.74%和 23.47%。24 $^{\circ}$ C 组和 28 $^{\circ}$ C 组中凡纳滨对虾最大存活时间均长于中国明对虾; 在 32 $^{\circ}$ C 组中, 凡纳滨对虾存活率大于中国明对虾(表 2)。

### 2.2 WSSV 感染后各组对虾到达不同死亡率的时间

L-24 $^{\circ}$ C 和 F-24 $^{\circ}$ C、L-28 $^{\circ}$ C 和 F-28 $^{\circ}$ C 和 L-32 $^{\circ}$ C 和 F-32 $^{\circ}$ C 各组到达死亡率为 10%的时间分别为 108 h 和 48 h、68 h 和 38 h、128 h 和 38 h; 到达死亡率为 50%的时间分别为 178 h 和 98 h、98 h 和 74 h、292 h 和 78 h。在相同温度、相同死亡率时, 凡纳滨对虾的存活时间均大于中国明对虾。

凡纳滨对虾和中国明对虾到达相同死亡率时的时间, 28 $^{\circ}$ C 组均小于 24 $^{\circ}$ C 组和 32 $^{\circ}$ C 组。中国明对虾 32 $^{\circ}$ C 组到达不同死亡率时的时间均小于 24 $^{\circ}$ C 组(图 1)。

### 2.3 WSSV 感染后各组对虾不同时间段死亡尾数

在 24 $^{\circ}$ C 组中, L-24 $^{\circ}$ C 组和 F-24 $^{\circ}$ C 组第 2 天死亡尾数分别为 4 尾和 23 尾; F-24 $^{\circ}$ C 组第 3 天死亡尾数较高, 第 4 天达到死亡高峰, 为 56 尾; L-24 $^{\circ}$ C 组前 4 d 死亡尾数一直较少, 到第 5 天出现死亡高峰, 为

表 2 凡纳滨对虾和中国明对虾经 WSSV 感染后各性状描述性统计

Tab.2 The characteristics of *L. vannamei* and *F. chinensis* after WSSV infection

项目 Items	24 $^{\circ}$ C		28 $^{\circ}$ C		32 $^{\circ}$ C	
	L	F	L	F	L	F
平均体长 Mean length (mm)	50.49	39.16	49.91	38.81	46.57	38.49
平均体重 Mean weight (g)	1.49	0.47	1.36	0.37	1.16	0.39
最大存活时间 Max survival time (h)	324	214	198	130	/	/
最小存活时间 Min survival time (h)	24	28	24	28	32	28
平均存活时间 Mean survival time (h)	184.05 $\pm$ 69.56	101.68 $\pm$ 38.45 <sup>b</sup>	100.25 $\pm$ 26.79 <sup>b</sup>	73.38 $\pm$ 22.22 <sup>a</sup>	/	/
存活率 Survival rate (15 d) (%)	0	0	0	0	45.74	23.47

注: 不同的字母表示组间显著性差异( $P < 0.05$ )

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

33 尾; F-24℃组从第 5~8 天死亡数量持续下降, 至第 9 天全部死亡; L-24℃组第 6~9 天死亡数量持续保持较高的水平(平均值约为 25 尾), 第 10 天迅速下降, 到第 15 天全部死亡(图 2 上)。

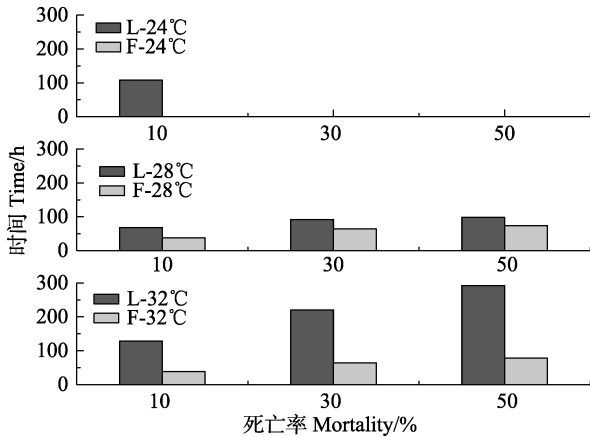


图 1 不同温度下 2 种对虾 WSSV 感染后到达不同累积死亡率的时间

Fig.1 The time vs mortality of two shrimps after the WSSV infection at different temperature

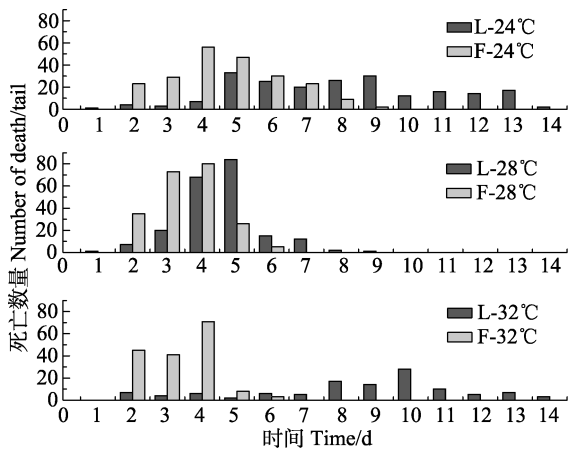


图 2 WSSV 感染后不同时间段对虾死亡数量

Fig.2 The time point vs death of shrimps after the WSSV infection

在 28℃组中, L-28℃组和 F-28℃组第 2 天死亡尾数分别为 7 尾和 35 尾; F-28℃组第 3 天死亡尾数急剧上升, 到第 4 天达到死亡高峰, 为 80 尾; L-28℃组第 3 天死亡尾数急剧上升, 到第 5 天达到死亡高峰, 为 84 尾; 第 6 天 2 组死亡尾数均迅速下降, L-28℃组到第 7 天全部死亡, F-28℃组到第 10 天全部死亡(图 2 中)。

在 32℃组中, L-32℃组从第 1~7 天的死亡尾数保持较低水平, 第 8 天开始上升, 到第 10 天达到死亡高峰, 为 28 尾; F-32℃组死亡尾数从第 2 天迅速

上升, 到第 4 天达到死亡高峰, 为 71 尾, 第 7 天后无死亡对虾(图 2 下)。

### 2.4 WSSV 感染后各组对虾累积死亡率

在 24℃组中, L-24℃组和 F-24℃组在 3 d 时累积死亡率分别为 3.81%和 24.06%;8 d 时分别达到 56.57%和 99.00%; 2 组分别在 14 d 和 9 d 累积死亡率达到 100%。在 28℃组中, L-28℃组和 F-28℃组在 3 d 时累积死亡率分别为 13.36%和 49.32%; 5 d 时分别达到 85.74%和 97.54%; 2 组分别在 9 d 和 6 d 累积死亡率达到 100%。在 32℃组中, L-32℃组和 F-32℃组在 3 d 时累积死亡率分别为 5.21%和 39.23%; 4 d 分别达到 8.07%和 71.51%; 到 14 d 时, 2 组累积死亡率分别为 54.26%和 76.53%(图 3)。

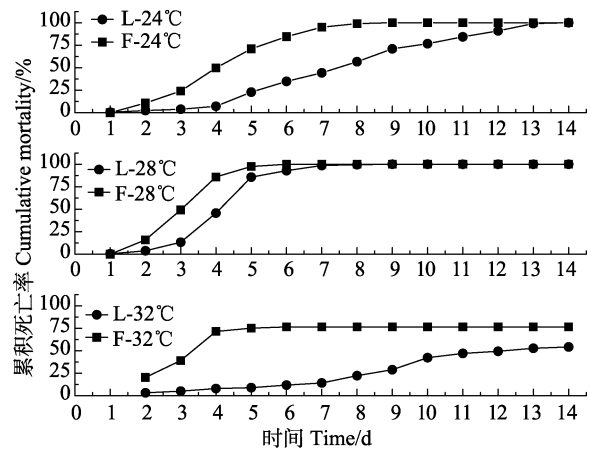


图 3 WSSV 感染后对虾累积死亡率

Fig.3 The cumulative mortality of shrimps after the WSSV infection

### 2.5 WSSV 感染后各组对虾肌肉组织内病毒载量

在 24℃组中, L-24℃组和 F-24℃组在 24 h 之前对虾肌肉组织病毒载量分别为  $(8.61 \times 10^2 \pm 1.08 \times 10^3)$  和  $(9.74 \times 10^1 \pm 6.70 \times 10^1)$  copies/ng DNA; 2 d 时, L-24℃组为  $(8.12 \times 10^2 \pm 1.01 \times 10^3)$  copies/ng DNA, F-24℃组已达到  $(2.45 \times 10^6 \pm 2.92 \times 10^6)$  copies/ng DNA, 2 组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 至 6 d, 2 组分别达到  $(2.97 \times 10^6 \pm 7.44 \times 10^6)$  和  $(8.08 \times 10^6 \pm 3.22 \times 10^6)$  copies/ng DNA, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

在 28℃组中, L-28℃组和 F-28℃组在 24 h 对虾肌肉组织病毒载量分别为  $(1.65 \times 10^2 \pm 1.92 \times 10^2)$  和  $(1.23 \times 10^3 \pm 1.73 \times 10^3)$  copies/ng DNA, 2 组差异不显著 ( $P > 0.05$ ); F-28℃组在 2 d 首先达到  $(1.51 \times 10^6 \pm 2.49 \times 10^6)$  copies/ng DNA, L-28℃组在 4 d 达到  $(4.40 \times 10^6 \pm 2.31 \times 10^6)$  copies/ng DNA; 至 6 d, L-28℃组和 F-28℃



组分别达到 $(6.73 \times 10^6 \pm 1.49 \times 10^6)$ 和 $(1.20 \times 10^7 \pm 6.15 \times 10^5)$  copies/ng DNA, 2组差异极显著( $P < 0.01$ )。

在32℃组中, L-32℃组和F-32℃组在前48 h对虾肌肉组织病毒载量较低; F-32℃组在3 d首先达到 $(5.53 \times 10^4 \pm 4.78 \times 10^4)$  copies/ng DNA; L-32℃组5 d达到 $(1.04 \times 10^4 \pm 1.12 \times 10^4)$  copies/ng DNA; 至15 d, L-32℃组和F-32℃组分别为 $(5.18 \times 10^3 \pm 4.32 \times 10^3)$ 和 $(3.78 \times 10^4 \pm 8.97 \times 10^3)$  copies/ng DNA, 2组差异显著( $P < 0.05$ )(图4)。

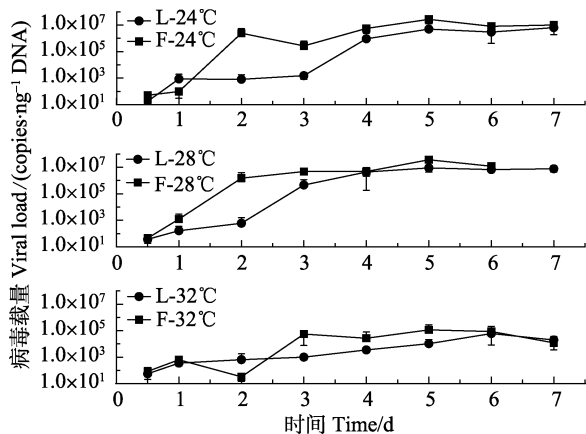


图4 WSSV感染后对虾肌肉组织病毒载量变化  
Fig.4 The change of viral load in muscle tissue of shrimps after WSSV infection

### 3 讨论

在感染对虾的众多病原中, WSSV的危害最为严重(Escobedo-Bonilla *et al*, 2007)。研究不同种类对虾对WSSV的敏感性, 对于虾的遗传选育有重要意义(刘庆慧等, 2005)。现已有中国明对虾和日本囊对虾(盖春蕾等, 2013)、凡纳滨对虾和斑节对虾(Wongtavatchai *et al*, 2010)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)、凡纳滨对虾(戚兰等, 2003)、中国明对虾和凡纳滨对虾(冯亚萍等, 2017)以及不同家系的中国明对虾(董世瑞等, 2015)对疾病的敏感性差异研究。

#### 3.1 对虾自身特点

宿主对WSSV的敏感性和抵抗力因种而异, 如WSSV引起印度对虾(*Penaeus indicus*)、斑节对虾、巨掌沼虾(*Macrobrachium superbum*)100%死亡率的时间分别为感染后的72 h、48 h、5 d和8 d, 而罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在注射感染WSSV 15 d后没有死亡(Sahul Hameed *et al*, 2000)。吴仲庆等(2003)研究表明, 日本囊对虾和凡纳滨对虾在感染WSSV后20 d的累积死亡率分别是100.00%和

83.33%, 存在统计学差异。Syed等(2006)研究表明, 通过对波纹龙虾(*Panulirus homarus*)和锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)肌肉注射相同剂量的WSSV病毒粒子, 其达到100%累积死亡率的时间分别是168 h和120 h。李素红等(2007)研究表明, 即使同一种属不同家系之间的中国明对虾, 对WSSV的敏感性也存在较大差异。黄永春等(2013)对凡纳滨对虾进行WSSV感染实验, 发现不同家系的对虾对WSSV的抗性不同。本研究中, 凡纳滨对虾和中国明对虾对WSSV的耐受性存在差异, 其在平均存活时间、累积死亡率和对虾体内病毒载量均存在显著差异。

#### 3.2 选育效果

90年代以前, 我国北方对虾养殖品种主要是中国明对虾。2001年后, 由于凡纳滨对虾性状优良, 在我国沿海养殖规模迅速扩大, 成为我国对虾养殖的绝对优势种(黄永春等, 2013)。本研究所用凡纳滨对虾是中国水产科学研究院黄海水产研究所与青岛海壬水产种业科技有限公司合作, 培育出生长优势显著、存活率高的凡纳滨对虾"壬海1号"。其平均存活时间长, 各时间点累积死亡率低, 并且随着实验时间的延长其肌肉内病毒载量增殖速度慢。而中国明对虾是采用群体、家系与多性状复合育种技术, 培育出中国明对虾养殖新品种(品种登记号: GS01-002-2008)。其表现出明显的抗病性, 能有效阻止WSSV的感染规模以及感染进程(逢锦菲等, 2013)。作者曾就中国明对虾抗病新品种"黄海2号"与中国明对虾野生群体进行抗WSSV性能实验, "黄海2号"与之相比表现出了明显的抗病优势, 在一定程度上说明中国明对虾的选育工作取得了一定的进步和成果。通过抗病良种选育, 可提高对虾的免疫机能和抗病能力, 是有效预防对虾白斑病的重要措施之一(纪荣兴等, 2008)。

#### 3.3 不同温度环境对WSSV增殖以及对对虾耐受性的影响

对虾白斑综合征的暴发与水温密切相关(Withyachumnarnkul *et al*, 2003)。Rahman等(2007)研究水温变化(27℃、33℃)对斑节对虾幼体感染WSSV的影响, 发现33℃组死亡率很低。You等(2010)分析了高温(31℃)对感染WSSV的日本对虾幼体和成体的死亡率、免疫反应和病毒复制的影响, 发现31℃能大幅度降低死亡率(与27℃相比), 高温组对虾成体的PO活性、血细胞总数与未感染对虾无显著差异( $P > 0.05$ ), 证实高温抑制病毒复制, 而不是提高对虾免疫反应。吴晓果等(2012)研究表明, 高水温( $\geq 32^\circ\text{C}$ )

能不同程度地降低和减缓对虾白斑综合征引起的死亡。李侃等(2013)通过研究环境温度与病毒增殖速度的相关性, 得出高温(33℃)对病毒的增殖具有一定的抑制作用, 并且明显改变了病毒基因的转录。

本研究中, 凡纳滨对虾 24℃组和 28℃组最大存活时间分别为 324 h 和 214 h, 中国明对虾分别为 198 h 和 130 h, 28℃组最大存活时间均小于 24℃组(表 2)。3 个温度组中, 2 种对虾 28℃组死亡高峰时的尾数均大于 24℃和 32℃, 并且均最先达到 100%的累积死亡率(图 2 和图 3)。至第 15 天时, 2 种对虾 24℃组和 28℃组累积死亡率均为 100%, 而 32℃组依然有 45.74% 和 23.47%的对虾存活。从对虾肌肉内病毒载量的增殖情况来看, 凡纳滨对虾 24℃组和 28℃组病毒载量最大值为  $6.40 \times 10^6$  和  $8.94 \times 10^6$  copies/ng DNA, 32℃组为  $6.04 \times 10^4$  copies/ng DNA; 中国明对虾 24℃组和 28℃组病毒载量最大值为  $2.71 \times 10^7$  和  $3.67 \times 10^7$  copies/ng DNA, 32℃组为  $1.15 \times 10^5$  copies/ng DNA(图 4)。综上所述, 3 组温度相比较, 28℃组最大存活时间最短、病毒复制速度最快; 32℃组 15 d 后依然有存活对虾, 且病毒复制水平低, 表现出对 WSSV 增殖速度的抑制, 减缓了白斑综合征引起的死亡。

### 3.4 体型规格对对虾抗病性的影响

本研究所使用的 2 种对虾由于其对生长季节的要求不同等原因, 致使相同时间段凡纳滨对虾与中国明对虾相比规格较大, 其平均体长相差约 1.02 cm。黄旭雄等(2006)研究不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平, 表明实验用中国明对虾的免疫水平与体长或体重基本无关。董世瑞等(2015)研究不同家系中国对虾形态性状与抗病力的关系, 表明体长、全长和体重均不是影响各家系对虾感染 WSSV 存活时间的主要相关性状。而李优等(2016)对 3 种规格凡纳滨对虾抗 WSSV 进行了初步研究, 表明其具有规格越大抗 WSSV 性能越弱的趋势。凡纳滨对虾规格相对较大, 而表现出的抗 WSSV 性能与中国明对虾相比较强, 推断 2 种对虾完全相同规格的情况下, 凡纳滨对虾对 WSSV 的耐受性更强。

### 3.5 对虾的争胜行为

通过观察实验, 发现中国明对虾的争胜行为要强于凡纳滨对虾, 并且温度越高, 对虾间相互啃食现象越严重。张沛东等(2008)通过研究中国明对虾和凡纳滨对虾仔虾的行为, 发现中国明对虾仔虾自残行为高发, 攻击频率高; 凡纳滨对虾仔虾自残现象少, 攻击频率低。李玉全(2014)研究发现, 日本囊对虾的争斗

性行为发生的概率随着温度的升高而增加。赵玉超等(2016)研究发现, 凡纳滨对虾个体在密度越高的环境下争斗次数越高。本研究中, 中国明对虾 32℃组前期残食现象严重, 死亡数量较多; 随着密度的减小, 死亡数量逐渐减少。

本研究中, 2 种对虾在 3 种温度条件下感染 WSSV 后, 凡纳滨对虾耐受 WSSV 能力要高于中国明对虾, 凡纳滨对虾选育群体“壬海 1 号”在人工感染 WSSV 条件下表现出了较好的抗病性能, 为我国对虾抗病良种选育工作提供有价值的参考。

## 参 考 文 献

- Cavalli LS, Marins LF, Netto S, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, southern Brazil. *Atlantica, Rio Grande*, 2008, 30(1): 45–52
- Dong SR, Lü YF. Path analysis of effects of morphometric traits on resistance to WSSV among different families in *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2015, 5(2): 15–21 [董世瑞, 吕瑜峰. 不同家系中国对虾形态性状与抗病力的关系. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(2): 15–21]
- Durand SV, Lightner DV. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381–389
- Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, *et al.* A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 31(1): 1–18
- Feng YP, Kong J, Luo K, *et al.* The comparison of the sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 78–84 [中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)对白斑综合征病毒的敏感性比较. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 78–84]
- Gai CL, Xu L, Ye HB, *et al.* The difference of sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Penaeus japonicas*. *Fisheries Science & Technology Information*, 2013, 40(4): 207–209 [盖春蕾, 许拉, 叶海斌, 等. 中国对虾和日本对虾对白斑综合征病毒(WSSV)敏感性的比较. *水产科技情报*, 2013, 40(4): 207–209]
- Huang XX, Zhou HQ. The innate immune activity of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* with different sizes. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 7–11 [黄旭雄, 周洪琪. 不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 7–11]
- Huang YC, Ai HS, Pan ZC, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for

- resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 359–366 [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性. 水产学报, 2013, 37(3): 359–366]
- Ji RX, Zou WZ, Yan QP, *et al.* Immunogenicity and WSSV resistance of anti-WSSV *Penaeus japonicus* F<sub>3</sub>. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1): 98–104 [纪荣兴, 邹文政, 鄢庆彬, 等. 日本对虾抗白斑病子三代的抗白斑综合征病毒感染能力及免疫特性. 水产学报, 2008, 32(1): 98–104]
- Jiang G, Yu R, Zhou M. Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection. Nitric Oxide, 2006, 14(3): 219–277
- Li K, Luo SY, Xu LM, *et al.* A study on the mechanism of temperature impact on the proliferation of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Applied Oceanography, 2013, 32(1): 61–66 [李侃, 罗淑娅, 徐丽美, 等. 温度影响对虾白斑综合征病毒增殖机制的研究. 应用海洋学学报, 2013, 32(1): 61–66]
- Li SH, Zhang TS, Meng XH, *et al.* Analysis of the resistance of heterosis in *Fenneropenaeus chinensis* to natural infection with white spot syndrome virus. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 68–75 [李素红, 张天时, 孟宪红, 等. 中国对虾杂交优势对自然感染白斑综合征病毒的抗病力分析. 水产学报, 2007, 31(1): 68–75]
- Li Y, Chen LZ, Yu XY, *et al.* Preliminary study on resistance to WSSV of three species of *Litopenaeus vannamei*. Shandong Fisheries, 2016(8): 1–4 [李优, 陈禄芝, 余霞艳, 等. 三种规格凡纳滨对虾抗 WSSV 性能的初步研究. 齐鲁渔业, 2016(8): 1–4]
- Li YQ. The relationship with *Penaeus japonicus* winning behavior and temperature. Journal of Jiangsu Agricultural Sciences, 2014(8): 231–232 [李玉全. 日本囊对虾的争胜行为及其与温度的关系. 江苏农业科学, 2014(8): 231–232]
- Liu QH, Huang J, Yang B, *et al.* Changes of immune and biochemical factors in two selected populations of prawn (*Fenneropenaeus chinensis*) infected by white spot syndrome virus. Marine Fisheries Research, 2005, 26(6): 22–27 [刘庆慧, 黄捷, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22–27]
- Pang JF, Kong J, Meng XH, *et al.* Real-time assay for quantifying WSSV load in *Fenneropenaeus chinensis* “Huang hai No.2”. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(3): 782–787 [逢锦菲, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 2 号”人工感染 WSSV 的荧光定量分析. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 782–787]
- Qi L, Ke HF, Zheng CY, *et al.* Studies on immunological factors of *Macrobrachium nipponense* and *Penaeus vannamei*. Journal of Shaoxing University, 2003, 23(10): 65–67 [戚兰, 柯慧芬, 郑春燕, 等. 日本沼虾和南美白对虾免疫因子的比较研究. 绍兴文理学院学报, 2003, 23(10): 65–67]
- Rahman MM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, *et al.* Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 2007, 269(1–4): 107–113
- Sahul Hameed AS, Charles MX, Anilkumar M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. Aquaculture, 2000, 183(3–4): 207–213
- Sun CB, He JG, Li ZL, *et al.* Sensitivity Difference to WSSV of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2006, 26(3): 17–20 [孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较. 广东海洋大学学报, 2006, 26(3): 17–20]
- Syed MS, Sudhakaran R, Balasubramanian G, *et al.* Experimental transmission and tissue tropism of white spot syndrome virus (WSSV) in two species of lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*. Journal of Invertebrate Pathology, 2006, 93(2): 75–80
- Verbruggen B, Bickley L, van Aerle R, *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. Viruses, 2016, 8(1): 23
- Wang WJ. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008, 66–73 [王伟继. 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. 中国海洋大学博士学位论文, 2008, 66–73]
- Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Chomsoong R, *et al.* Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53(2): 167–171
- Wongtavatchai J, Lópezdóriga MV, Francis MJ. Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 2010, 308(3–4): 75–81
- Wu XG, Xiong HT, Du HH, *et al.* Advances on possible mechanism of hyperthermia inhibition of white spot syndrome in shrimp. Fisheries Science, 2012, 31(9): 568–572 [吴晓果, 熊海涛, 杜华华, 等. 高温抑制对虾白斑综合征的机理研究进展. 水产科学, 2012, 31(9): 568–572]
- Wu ZQ, Lin XG, Miu S, *et al.* The study of sensitivity to the white spot syndrome virus between *Penaeus japonicus* and *Litopenaeus vannamei*. China Fisheries Society National Conference on Seawater Cultured Facilities, 2003 [吴仲庆, 林学国, 缪嵩, 等. 日本囊对虾和凡纳滨对虾对白斑易感程度的比较研究. 中国水产学会全国海水设施养殖学术研讨会, 2003]

- Xue H, Ding ZF, Zhou G, *et al.* Survey and research of the white spot syndrome virus (WSSV) infection in several kinds of economic types of freshwater crustaceans. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010(3): 294–297 [薛晖, 丁正峰, 周刚, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)在几种经济类淡水甲壳动物中的感染与流行调查研究. *江苏农业科学*, 2010(3): 294–297]
- Yan DC. Prevention and cure of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 25(4): 202–204 [闫冬春. 防治对虾白斑综合征病毒(WSSV)的主要措施. *水产科学*, 2006, 25(4): 202–204]
- You XX, Su YQ, Mao Y, *et al.* Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture*, 2010, 305(1): 133–137
- Zhang PD, Zhang XM, Li J, *et al.* Observation of behavior in *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 223–228 [张沛东, 张秀梅, 李健, 等. 中国明对虾、凡纳滨对虾仔虾的行为观察. *水产学报*, 2008, 32(2): 223–228]
- Zhao YC, Qin H, Li YQ, *et al.* Effects of stocking density and food types on growth and agonistic behavior in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(3): 44–48 [赵玉超, 秦浩, 李玉全, 等. 密度和饲料种类对凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 争胜行为和生长的影响. *水产学杂志*, 2016, 29(3): 44–48]

(编辑 冯小花)

## The Difference of Tolerance to White Spot Syndrome Virus Between *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* at Different Temperatures

FENG Yaping<sup>1,2,3</sup>, KONG Jie<sup>1,2</sup>, LUO Kun<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>1,2</sup>, LI Xupeng<sup>1,2</sup>, SHI Xiaoli<sup>1,2</sup>, CAO Jiawang<sup>1,2,3</sup>, WANG Mingzhu<sup>1,2,3</sup>, WANG Jun<sup>1,2,3</sup>, DONG Lijun<sup>1,2,3</sup>, MENG Xianhong<sup>1,2</sup>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 present study evaluated the effects of white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Litopenaeus vannamei* ‘Renhai No.1’ and *Fenneropenaeus chinensis* ‘Huanghai No.2’ at various temperatures (24°C, 28°C, and 32°C) using quantitative feeding method (L represents *L. vannamei*, and F represents *F. chinensis*). The results showed that the average survival time of group L-24°C, F-24°C, L-28°C, and F-28°C was (184.05±69.56) h, (101.68±38.45) h, (100.25±26.79) h, and (73.38±22.22) h, respectively. The survival time between two kinds of shrimps at same temperature was significantly different ( $P<0.05$ ). At the 15th d, the survival rate of group L-32°C and F-32°C was 45.74% and 23.47%, respectively. The time of 50% mortality rate of two shrimps at three temperatures was 178 h and 98 h, 98 h and 74 h, 292 h and 78 h, respectively. The time of death peak of two shrimps among three temperatures was 5 d and 4 d, 5 d and 4 d, 10 d and 4 d, respectively. The virus loads in muscle of L-24°C and F-24°C at 144 h was ( $2.97\times 10^6\pm 7.44\times 10^6$ ) and ( $8.08\times 10^6\pm 3.22\times 10^6$ ) copies/ng DNA with the highly significant difference ( $P<0.01$ ). The virus loads in muscle of L-28°C and F-28°C at 144 h was ( $6.73\times 10^6\pm 1.49\times 10^6$ ) and ( $1.20\times 10^7\pm 6.15\times 10^5$ ) copies/ng DNA with highly significant difference ( $P<0.01$ ). The virus loads of muscle of L-32°C and F-32°C at the 15th d was ( $5.18\times 10^3\pm 4.32\times 10^3$ ) and ( $3.78\times 10^4\pm 8.97\times 10^3$ ) copies/ng DNA with a significant difference ( $P<0.05$ ). These results indicates that *L. vannamei* are more tolerant to WSSV infection than *F. chinensis*, and the ability of multiplication of WSSV in muscle at different temperatures was 28°C>24°C>32°C.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; *Fenneropenaeus chinensis*; Different temperatures; White spot syndrome virus (WSSV); Tolerance

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170108001

http://www.yykxjz.cn/

秦梦雪, 孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 黄健. 2015年中国典型对虾养殖区WSSV流行株高变异区序列的分析比较. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 128-137  
Qin MX, Sun XY, Wan XY, Liu QH, Huang J. Variable sequence comparison of WSSV regions from different parts of China in 2015. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 128-137

## 2015 年中国典型对虾养殖区 WSSV 流行株高变异区序列的分析比较\*



秦梦雪<sup>1,2</sup> 孙新颖<sup>1</sup> 万晓媛<sup>1</sup> 刘庆慧<sup>1①</sup> 黄健<sup>1</sup>

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 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 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)

**摘要** 为了解我国白斑综合征病毒(WSSV)流行变异特征,本研究对 2015 年 4~10 月期间在山东、江苏、天津、浙江、海南和广东 6 省市采集到的 57 份 WSSV 阳性的样本,通过特异性的扩增目的片段,根据测序结果分析比较不同地区、不同分离株之间在 ORF14/15、ORF23/24 上的缺失变异情况,以及 ORF75、ORF94 和 ORF125 上的重复单元(Repeat unit, RU)数目差异。结果显示,在 ORF14/15 扩增中,分别有 6530、5908 和 5725 bp 的片段缺失,而在 ORF23/24 扩增中均有 12070 bp 大片段的缺失,ORF75 的 45 bp 的 RU 数目分别为 1、2 和 3,102 bp 的 RU 数目均为 1,而 ORF94 的 RU 数目分别为 4、5、10 和 12 不等,ORF125 的 RU 数目为 3、5 和 6。结果表明,WSSV 在部分开放型阅读框上表现出明显的变异差异,而在某些开放型阅读框上的缺失情况则有显著的稳定性。

**关键词** WSSV; ORF; 缺失; 变异

中图分类号 S945 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)02-0128-10

水产养殖行业发展迅猛,而养殖中出现的病害却十分严峻(Nakano *et al*, 1994; Wongteerasupaya *et al*, 1995; Karunasagar *et al*, 1997)。其中,作为危害最为严重之一的白斑病,自 20 世纪 90 年代被发现后,给全球各地的水产养殖行业造成了难以估量的损失。白斑病由对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)引起。WSSV 基因组约为 300 kb,为环状、双链 DNA 病毒,能够感染数 10 种甲壳纲动物和水生浮游动物(Mayo, 2002; Hossain *et al*, 2001),可使

被感染动物在 3~10 d 内死亡(Lightner, 1996)。

有大约 99%的核苷酸会在不同毒株的基因组序列之间表现出一致性,而导致差异存在的主要原因一般为大序列的缺失或者插入、易于发生基因重组的可变区、开放型阅读框(Open reading frames, ORFs)内重复单元差异(Variable number tandem repeat, VNTR)、单核苷酸突变等(童桂香等, 2004; Marks *et al*, 2004)。有 4 种毒株已经在 GenBank 上公布了基因组的全序列,分别是中国台湾株(TW, AF440570) (307287 bp)、

\* 农业部 948 计划(2016-X56)、国家自然科学基金(31672679)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017017)共同资助 [This work was supported by the 948 Programme of Ministry of Agriculture (2016-X56), the Project of the National Science Foundation of China (31672679), and the Project of YSFRI of Chinese Academy of Fisheries Science(20603022017017)]. 秦梦雪, E-mail: 861258856@qq.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-08, 收修改稿日期: 2017-02-27

泰国株 (TH, AF369029)(292967 bp)、中国株 (CN, AF332093)(305107 bp) 和韩国株 (KR, JX515788)。具有最大基因组的 WSSV 毒株 TH-96-II (AY864666, 312 kb) 被视为祖先株 (Balakrishnan *et al.*, 2008)。

同已知毒株基因组序列的比较, 可以研究某些基因片段 (ORF14/15、ORF23/24、ORF75、ORF94 和 ORF125) 的缺失情况以及 VNTR 数目和单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs), 这些方面均已被应用到分子流行病学研究 (Gudkovs *et al.*, 2014; Dieu *et al.*, 2004; Musthaq *et al.*, 2006)。在 ORF75 上有 2 种重复单元 (Repeat units, RUs), 分别为 45 bp 和 102 bp; ORF94 上有 1 种 RU, 大小为 54 bp; 而存在于 ORF125 的 1 种 RU 有 69 bp。根据之前报道的大多数流行病学研究, 从这些 RUs 的数量上的差异 (Dieu *et al.*, 2004、2010; Pradeep *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011; Shekar *et al.*, 2012), 可以更好地解释分子流行病学的调查结果。

本研究应用 2015 年 4~10 月期间在山东、江苏、天津、浙江、海南、广东 6 省市采集到的 57 份 WSSV

阳性的样本, 通过特异性扩增目的片段, 比较不同地区、不同分离株之间在 ORF14/15、ORF23/24 上的缺失变异情况, 以及 ORF75、ORF94 和 ORF125 上的 RU 数目差异, 以此了解我国 WSSV 在 2015 年的分子流行变异情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验样本主要涉及中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和日本对虾 (*Penaeus japonicus*) (表 1), 所有样本采集后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 WSSV 核酸提取** 从样本中取鳃组织约 30 mg, 提取 DNA [海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)], 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.2.2 PCR 检测** 按照 GB/T 28630.2-2012 白斑综

表 1 WSSV 样本采集信息及 ORF75、ORF94 和 ORF125RU 数目  
Tab.1 WSSV samples and repeat units (RUs) of ORF75, ORF94 and ORF125

序号 No.	样品编号 Sample No.	来源 Source	品种 Species	RU 数目 Repeat unit number			
				ORF75 45 bp	ORF75 102 bp	ORF94 54 bp	ORF125 69 bp
1	jc150803001	山东利津 Shandong Lijin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	4	—
2	jc150803002	山东利津 Shandong Lijin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	—
3	jc150803003	山东利津 Shandong Lijin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	4	3
4	jc151014001	江苏赣榆 Jiangsu Ganyu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	2	1	—	3
5	jc151014002	江苏赣榆 Jiangsu Ganyu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	3
6	jc151014003	江苏赣榆 Jiangsu Ganyu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	3
7	jc150820001	山东即墨 Shandong Jimo	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	—	—	10	3
8	jc150820002	山东即墨 Shandong Jimo	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	—	—	10	3
9	jc150820003	山东即墨 Shandong Jimo	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	1	1	10	3
10	jc150821001	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	10	3
11	jc150821002	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	10	3
12	jc150821003	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	10	3
13	jc150713001	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	3
14	jc150713002	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	6
15	jc150713003	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	6
16	jc150713004	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	6
17	jc150713005	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	3
18	jc150713006	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	3
19	jc150519001	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	5	—
20	jc150519002	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	5	—
21	jc150519003	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	—
22	jc150519004	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	5
23	jc150519005	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	12	—



续表 1

序号 No.	样品编号 Sample No.	来源 Source	品种 Species	RU 数目 Repeat unit number			
				ORF75 45 bp	ORF75 102 bp	ORF94 54 bp	ORF125 69 bp
24	jc150519006	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
25	jc150519007	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
26	jc150519008	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
27	jc150519009	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
28	jc150519010	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
29	jc150519011	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
30	jc150519012	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
31	jc150404019	天津汉沽 Tianjin Hangu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
32	jc150606029	浙江舟山 Zhejiang Zhoushan	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	12	5
33	jc150606030	浙江舟山 Zhejiang Zhoushan	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	12	5
34	jc150519001	山东寿光 Shandong Shouguang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	12	6
35	jc150705001	山东威海 Shandong Weihai	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
36	jc150705002	山东威海 Shandong Weihai	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
37	jc150705003	山东威海 Shandong Weihai	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
38	jc150804001	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
39	jc150804002	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	10	5
40	jc150804003	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
41	jc150804004	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
42	jc150811001	天津汉沽 Tianjin Hangu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
43	jc150811002	天津汉沽 Tianjin Hangu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
44	jc150709035	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
45	jc150709036	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	-	5
46	jc150709037	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	5	5
47	jc150709038	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	2	1	10	6
48	jc150709039	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	2	1	10	6
49	jc150720001	广东广州 Guangdong Guangzhou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	6
50	jc150710001	天津宝坻 Tianjin Baodi	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	6
51	jc150820001	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
52	jc150820003	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
53	jc150820004	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
54	jc150820005	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
55	jc150820006	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	6
56	jc150820007	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
57	jc150820008	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	3	1	12	6

注：“-”表示未扩增出

Note:“-” represents not amplified

合征(WSD)诊断规程第 2 部分套式 PCR 检测法进行 DNA 样本检测, 然后用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.3 PCR 扩增** 将检测呈阳性的 DNA 样本通过特定的引物进行扩增, 体系配置见表 2, 实验过程中引物及反应条件见表 3(于洪涛, 2008; Dieu *et al.*, 2004, 2010; Marks *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2013; Wongteerasupaya *et al.*, 2003)。

**1.2.4 基因克隆及片段分析** PCR 产物胶回收后用 NanoDrop 2000 检测 DNA 浓度, 通过 pMD<sup>®</sup>18-T 连接转化, 将连接成功菌液测序。ORF14/15 和 ORF23/24 片段分别与 TH-96- II 株和中国台湾株(TW) 比对(Dieu *et al.*, 2004; Zwart *et al.*, 2010), 分析序列缺失情况。ORF75、ORF94 和 ORF125 测序结果分别与其相应的 RU 序列比对(Gudkovs *et al.*, 2014)。

表 2 反应体系及用量  
Tab.2 Reaction system and amount

反应体系 Reaction system	用量 Dosage(μl)
10×PCR 反应缓冲液(含 Mg <sup>2+</sup> ) 10×Buffer solution	2.5
双蒸水 ddH <sub>2</sub> O	17.3
脱氧核苷酸混合物 dNTP	2
正向和反向引物 Primer	1
Ex Taq DNA 聚合酶 Ex Taq DNA polymerase	0.2
待测核酸 Nucleic Acid	1

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 检测结果

样本核酸提取后, 通过套式 PCR 检测, 除 10 份样本在第二轮中呈现阳性目的条带, 47 份样本均在第一轮中出现阳性目的条带。

### 2.2 扩增结果

通过特定引物扩增, 在 ORF14/15 中, 除 1#、2#、3#、5#、6#、7#、8#、12#、21#、23#、25#、26#、

27#、28#、29#、30#、31#、40#、52#、53#、54#和 55#外, 其余 35 份样本均有目的条带出现, 检出率为 61.40%。13#、14#、15#、16#、17#、35#、36#和 37# 样本的条带较之其他条带略大, 其中, 山东利津 3 个样本均未检出条带(图 1)。在 ORF23/24 扩增中, 共有 14 份样本(9#、24#、32#、33#、34#、39#、40#、45#、46#、47#、48#、51#、56#和 57#)出现目的条带(图 2), 检出率为 24.56%。目的条带之间的大小基本没有差别。山东利津、昌邑、威海、江苏赣榆、天津汉沽、宝坻和广东广州没有目的条带出现。而在 ORF75 中, 共有 10 份样本(4#、9#、32#、33#、34#、45#、46#、47#、48#和 57#)检出(图 3), 检出率为 17.54%, 山东利津、昌邑威海、潍坊、天津汉沽、宝坻、海南海口和广东广州无样本检出。其中, 57#山东潍坊的样本在所有目的条带中, 片段最大。在 ORF94 中, 共有 40 份样本检出, 检出率为 70.18%, 其中, 1#和 3#的目的片段最小(图 4)。江苏赣榆、天津宝坻和广东广州无目的条带出现。在 ORF125, 共有 44 份样本检出, 检出率为 77.19%, 在所有地区的样本中均有发现。仅有 1#、2#、19#、20#、21#、23#、24#、25#、27#、28#、29#、30#和 31#样本无相应目的条带出现(图 5)。

表 3 PCR 扩增引物以及反应条件  
Tab.3 PCR primers and reaction conditions

引物 Primer	序列 Sequence(5'~3')	预变性 Initial denaturation	变性 Denaturation	延伸 Extension
ORF-14/15F ORF-14/15R	AATATGGAACGACGGGTG GACCAGCGCCTCTTCAG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min	72℃ 7 min
ORF-23/24F ORF-23/24R	GTAGTGCATGTTTCTCTAAC GTAAGTTTATTGCTGAGAAG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	72℃ 7 min
ORF-75F ORF-75R	CTTTCACCGCTCTCA GGGTTACCAGAGACAGG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 2 min	72℃ 7 min
ORF-94S ORF-94A	CTGGGTGGCATCGGTTAG CGTCACTTTCGTGCGTAGT	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	72℃ 7 min
ORF-125F ORF-125R	CGAAATCTTGATATGTTGTGC CCATATCCATTGCCCTTCTC	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min	72℃ 7 min

### 2.3 序列比对

在 ORF14/15 扩增中, 共扩增 3 种不同的片段, 分别为 1270 bp(山东即墨)、1892 bp(山东即墨、潍坊、寿光、浙江舟山、江苏赣榆、天津汉沽、北辰、宝坻、海南海口和广东广州)、2075 bp(山东威海、昌邑), 通过与 TH-96-II 比对, 发现分别缺失 6530、5908、5725 bp(图 6)。而在 ORF23/24 中, 所有样本片段大小均为 1140 bp, 与台湾株相比, 缺失 12070 bp(图 7)。

在 ORF75 扩增中, 有 3 种片段大小出现, 分别为 1246 bp(江苏赣榆、天津北辰)、985 bp(山东即墨、寿光、天津北辰和浙江舟山)和 1738 bp(山东潍坊), 通过与重复片段比对, 45 bp 的重复片段数目分别为

2、1、3, 而 102 bp 的重复片段均为 1(表 1)。在 ORF94 扩增中, 共有 5 种大小不一的片段出现, 分别为 523 bp(山东利津)、742 bp(山东即墨、威海)、769 bp(海南海口)、1024 bp(山东即墨、天津北辰)和 1135 bp(山东潍坊、即墨、寿光、天津汉沽、浙江舟山), 经比对, 重复片段数目分别为 4、5、5、10、12(表 1)。在 ORF125 扩增中, 出现 5 种不同的片段, 分别为 491 bp(山东利津、昌邑、浙江舟山)、518 bp(山东即墨)、703 bp(山东威海、海南海口、天津汉沽、北辰)、722 bp(山东即墨、浙江舟山)、746 bp(山东昌邑、寿光、潍坊、天津北辰、宝坻、广东广州), 经过比对, 其重复片段的数目分别为 3、3、5、5、6(表 1)。

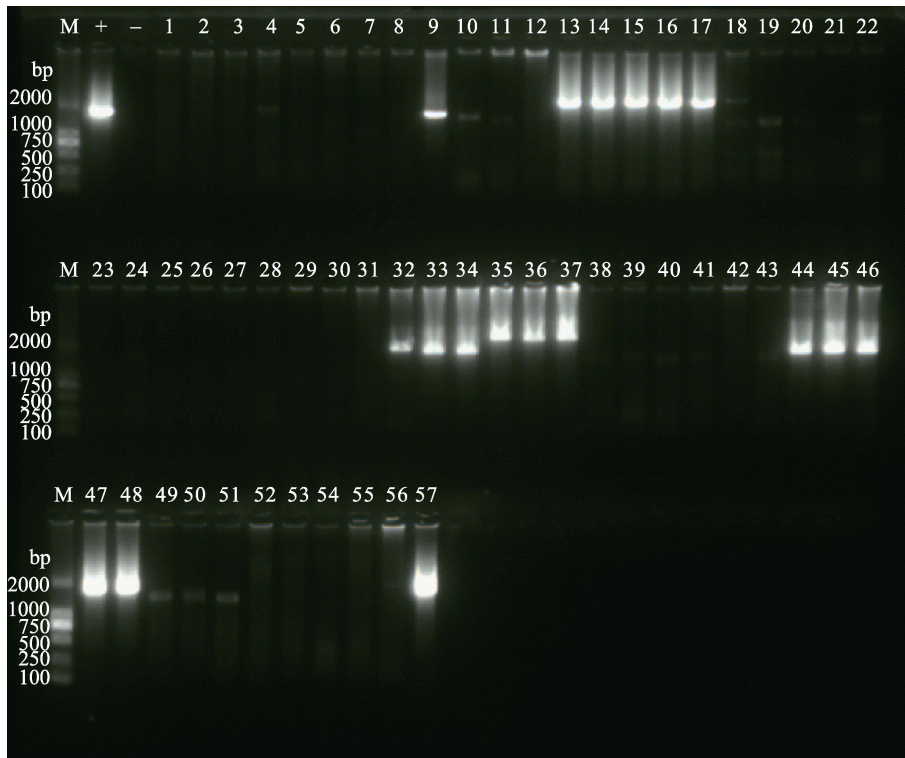


图 1 引物 ORF14/15 的扩增结果

Fig.1 Amplification of primer ORF14/15

M: DNA Marker DL 2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1~57: 样本编号。下图同

M: DNA Marker DL 2000; +: Positive control; -: Negative control; 1~57: Sample number. The same as below

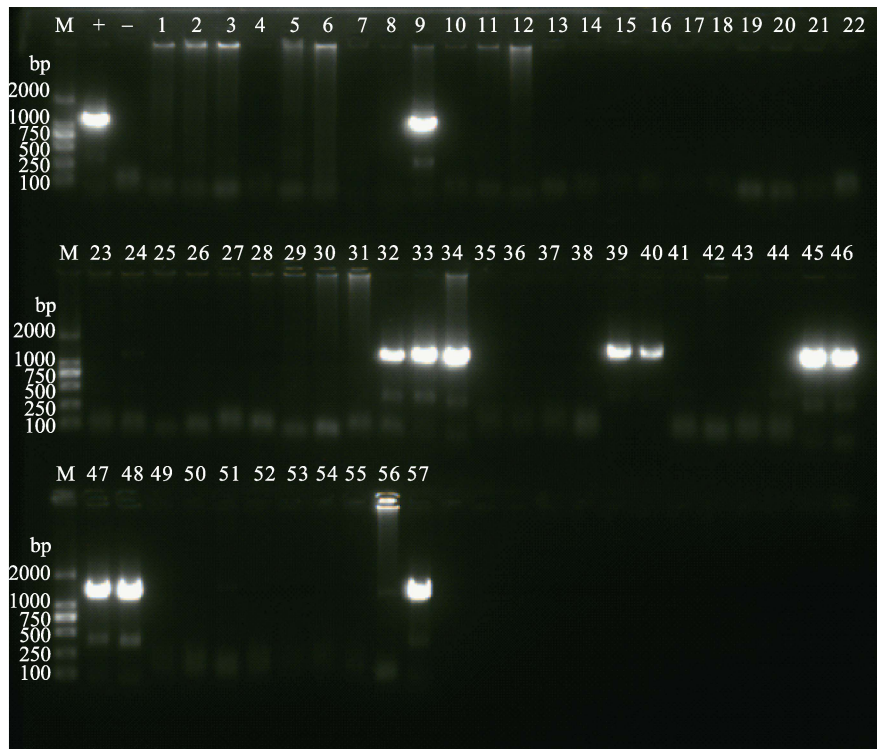


图 2 引物 ORF23/24 的扩增结果

Fig.2 Amplification of primer ORF23/24

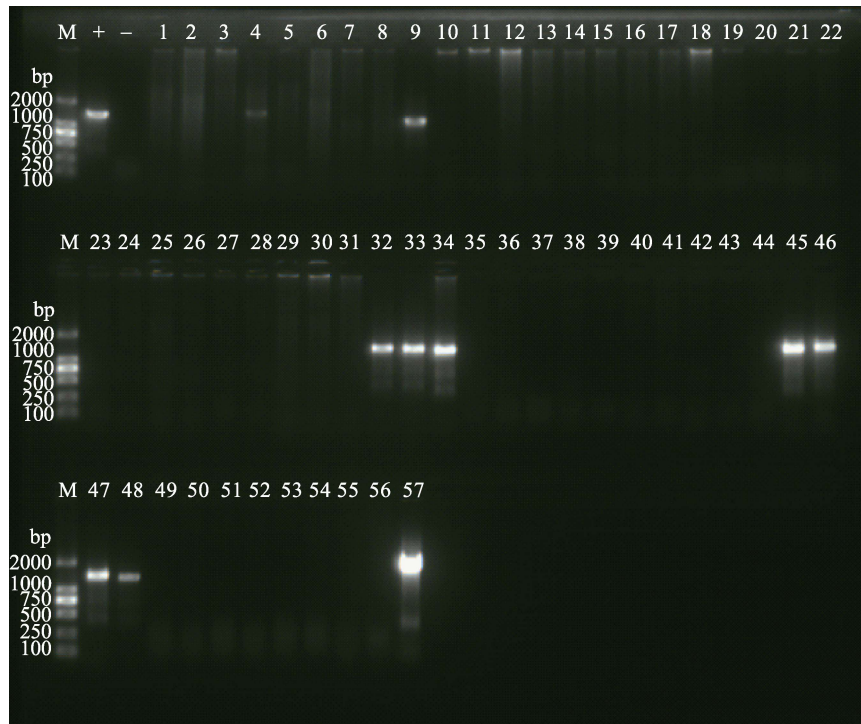


图 3 引物 ORF75 的扩增结果  
Fig.3 Amplification of primer ORF75

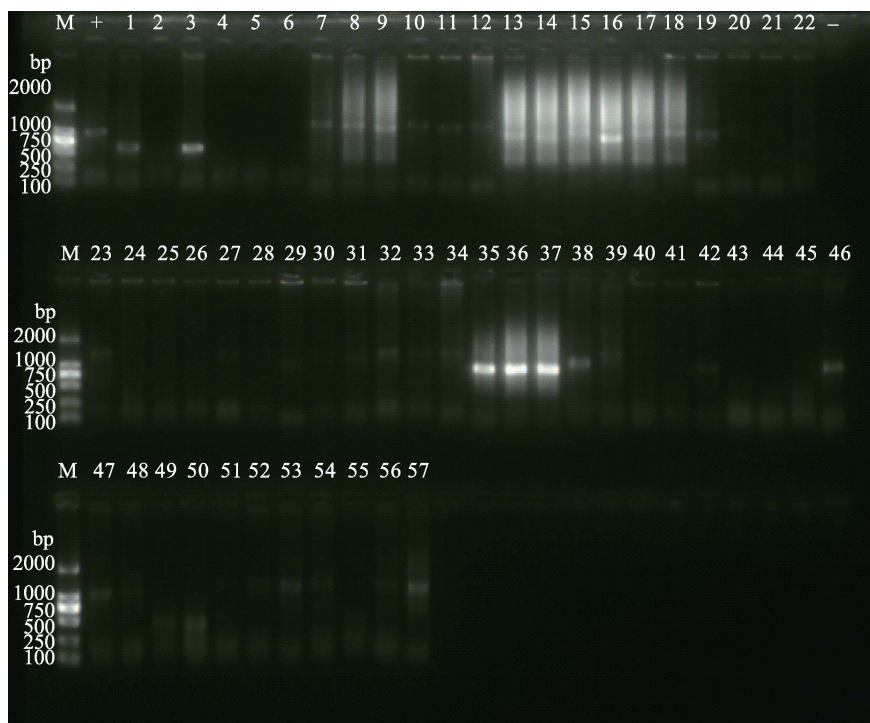


图 4 引物 ORF94 的扩增  
Fig.4 Amplification of primer ORF94

### 3 讨论

本研究所用样本来自于山东利津、即墨、昌邑、寿光、威海、潍坊、江苏赣榆、天津汉沽、北辰、宝

坻、浙江舟山、海南海口和广东广州, 采集时间分布于 2015 年 4~10 月 WSSV 病害暴发期间。ORF14/15 和 ORF23/24 的检出率分别为 61.40%和 24.56%, 大部分扩增 ORF23/24 成功的样本在 ORF14/15 中



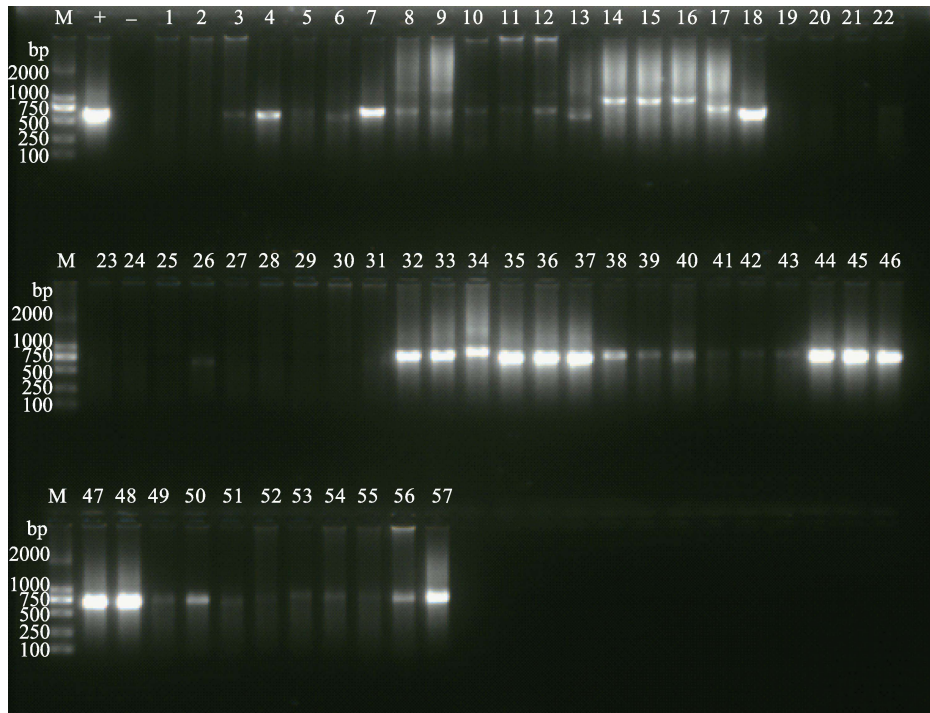


图 5 ORF125 扩增

Fig.5 Amplification of primer ORF125

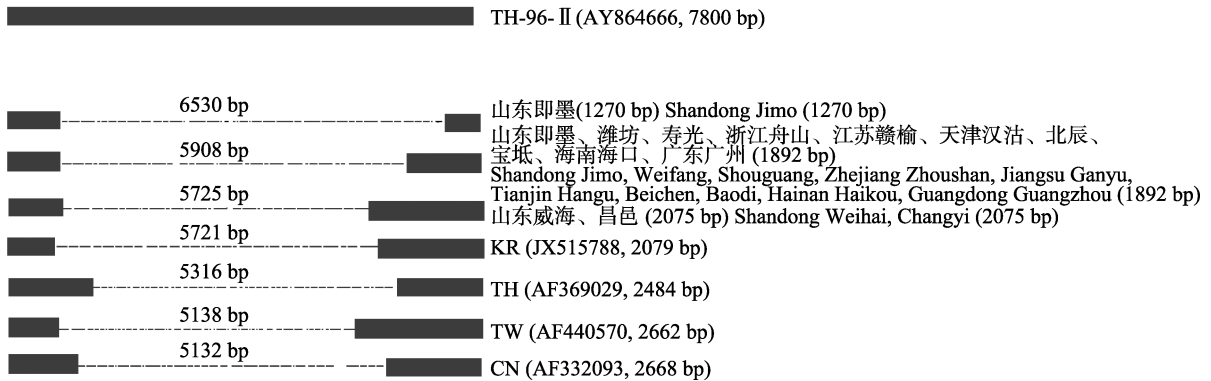


图 6 WSSV 不同毒株 ORF14/15 区域的序列比对

Fig.6 Scheme of deletion region of ORF14/15 in different WSSV strains

左右两边的矩形表示用引物 ORF14/15 扩增出的序列，中间的虚线表示与 TH-96- 毒株进行序列比对缺失的部分  
 Rectangles mean sequences amplified by ORF14/15. The imaginary lines in the middle mean sequences deletion compared to TH-96- strain

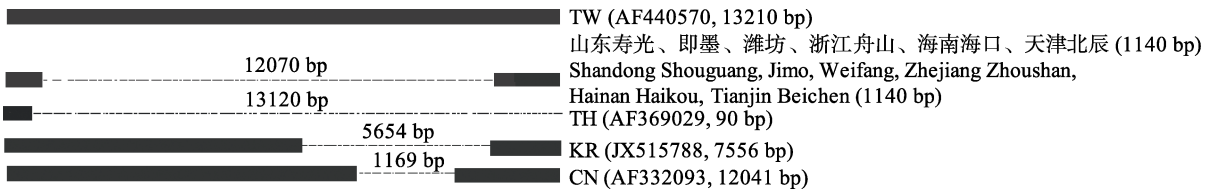


图 7 WSSV 不同毒株 ORF23/24 区域的序列比对

Fig.7 Scheme of deletion region of ORF23/24 in different WSSV strains

左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列，中间的虚线表示与 TW 毒株进行序列比对缺失的部分  
 The right and left rectangles mean sequences which can be amplified. The imaginary line in the middle means sequence deletion compared to TW strain

均有目的条带出现, 但除去 40#样本(海南海口), 其仅在 ORF23/24 扩增中出现。ORF75、ORF94 和 ORF125 的检出率分别为 17.54%、70.18%和 77.19%, 其中, 2#(山东利津)、21#(山东即墨)、24#(山东即墨)和 25#(山东即墨)样本在 3 种扩增中均无条带出现, 而 9#(山东即墨)、32#(浙江舟山)、33#(浙江舟山)、34#(山东寿光)、46#(天津北辰)、47#(天津北辰)、48#(天津北辰)和 57#(山东潍坊)样本却在 3 种扩增中均有条带出现。在 5 次 PCR 扩增中, 9#(山东即墨)、32#(浙江舟山)、33#(浙江舟山)、34#(山东寿光)、46#(天津北辰)、47#(天津北辰)、48#(天津北辰)和 57#(山东潍坊)样本都出现目的条带, 而 2#(山东利津)、21#(山东即墨)和 25#(山东即墨)样本则在 5 次扩增中均无扩增出目的片段。

对于 ORF14/15, TH-96-Ⅱ最为完整, 为 7800 bp。与 TH-96-Ⅱ相比较, 韩国株有 5721 bp 的缺失, 泰国株缺失 5316 bp, 台湾株缺失 5138 bp, 而中国株缺失 5132 bp。本研究中出现 3 种缺失程度不一样的片段, 且相互之间差别较大, 即其中 2075 bp 的片段与韩国株 KR 的缺失程度相近。6530 bp 和 5908 bp 的 2 种缺失情况也出现在之前的研究中, 而与 6530 bp 相近的 6533 bp 和 6540 bp 的缺失情况分别在 2013 年和 2014 年的研究中出现(孙新颖等, 2016a、2016b)。在 Tang 等(2013)研究中也出现相近程度的情况, 即缺失 5950 bp, 而印度的 1 株和墨西哥地区的 3 株 WSSV 毒株有更接近的缺失程度, 4 株分离株均缺失 5892 bp。从现有研究发现, WSSV 在 ORF14/15 上的缺失均在 5000 bp 以上, 相较于完整的 7800 bp, 缺失程度较大, 可能越短 DNA 片段在复制中占据更多优势。

报道中的中国株 ORF23/24 片段缺失最小, 仅为 1169 bp; 泰国株的缺失程度最大, 为 13120 bp; 而韩国株的缺失程度为中等, 为 5654 bp。Lan 等(2002)发现, 在中国厦门发现 3 种不同宿主感染的 WSSV, 相对中国株的 ORF23/24 序列分别缺失 5717、5926 和 9319 bp。而 Dieu 等(2004)发现, 在越南中部和南部采集的 3 种不同的 WSSV 分离株, 相较于台湾株分别缺少 8539、11450 和 12166 bp。相较于其他地区或大或小的缺失情况, 本研究中所有样本在 ORF23/24 上缺失程度一致, 均缺失 12070 bp, 属于是大片段的缺失, 这与 2013 年样本研究中的缺失情况一致, 而 2014 年样本有 2 种缺失, 即 12064 bp 和 12070 bp, 二者仅是在中间位置相差 6 个碱基(孙新颖等, 2016a、2016b)。ORF23/24 的这种大片段缺失在普遍范围上比较稳定, 结合 ORF14/15 较大的缺失情

况, 推测 WSSV 的进化可能通过逐渐稳定的缺失和更小的基因组来完成, 使得基因组更适合复制, 以适应环境且 WSSV 自身具有更强的毒性。

除了 ORF75 之外, ORF94 和 ORF125 的检出率都比较高。在是否检出方面, 不同地区样本之间的 RU 数目差异比较大, 即使是出自于同一地区的样本之间也依然有差异, 如山东即墨的样本。ORF75 中的 45 bp 的 RUs 数目为 3 以及 102 bp 的 RUs 数目为 1 的情况在之前 2014 年样本研究中有出现, 新出现了 45 bp RU 为 1 和 2 两种类型; ORF94 中 RUs 为 4 的情况在 2013 年和 2014 年样本中均存在, 而 RUs 为 12 只出现在 2013 年样本中, 且样本中的 RUs 或为小数目重复, 或为大数目重复, RUs 为 5 和 10 两种属于新类型; ORF125 的 RUs 数目与 2014 年样本检测中的数据部分一致(孙新颖等, 2016a、c)。Tang 等(2013)研究中仅有 1 种 ORF75 的 VNTR 情况: 共 3 个 RU, 2 个 45 bp RU 和 1 个 102 bp RU; Durán-Avelar 等(2015)发现, ORF75 总 RU 有 5~20 之间共 12 种情况, 而 ORF94 包含有 13 种数目不同的 RU, ORF125 则只有 1 种总 RU 数目为 8 的情况; 此外, Sindhupriya 等(2014)的实验中, ORF94 上有 4、6、7、8 和 11 五种不同的 VNTR, 而 ORF125 上有 3 种(4、5 和 6)不同的 VNTR, 部分 VNTR 情况在不同研究中存在交叉情况。相较于 ORF14/15 和 ORF23/24, ORF75、ORF94 和 ORF125 VNTR 的研究更多应用于 WSSV 类型的归划(Durán-Avelar *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2013), 从而确定 WSSV 的地理归属, 揭示 WSSV 分子流行情况。

2015 年样本在重复片段数目上的差异依然很大, ORF14/15 上的缺失出现了新的片段, 与韩国株极其相近, 在 ORF23/24 上, 虽然出现大片段缺失, 却表现出了缺失的稳定性。而各个样本在 ORF75、ORF94 和 ORF125 上的 RU 数目则出现差异性和部分稳定性。因此, 推测不同地区 WSSV 毒株为了更好地复制遗传以适应环境, 出现了适应性的变异, 同时本实验也为系统的分子流行病的研究提供了数据基础。

## 参 考 文 献

- Balakrishnan P, Malathi S, Iddya K, *et al.* Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus. *Virology*, 2008, 376(1): 24-30
- Dieu BTM, Marks H, Siebenga JJ, *et al.* Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *Journal of General Virology*, 2004, 85(12): 3607-3618
- Dieu BTM, Marks H, Zwart MP, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of



- virus spread at intermediate spatiotemporal scales. *Journal of General Virology*, 2010, 91(5): 1164–1172
- Durán-Avelar MDJ, Pérez-Enríquez R, Zambrano-Zaragoza JF, *et al.* Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010–2012. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 114(1): 11–20
- Gudkovs N, Murwantoko, Walker PJ. Stability of the WSSV ORF94 VNTR genotype maker during passage in marine shrimp, freshwater crayfish and freshwater prawns. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(3): 249–257
- Hossain MS, Chakraborty A, Joseph B, *et al.* Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 2001, 198(1–2): 1–11
- Karunasagar I, Ota SK, Karunasagar I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*, 1997, 153(1–2): 9–13
- Lan Y, Lu W, Xu X. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Research*, 2002, 90(1–2): 269–274
- Lightner DV. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society. LA, Baton Rouge, 1996, 305
- Marks H, Goldbach RW, Vlcek JM, *et al.* Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Archives of Virology*, 2004, 149(4): 674–697
- Marks H, van Duijse JJA, Zuidema D, *et al.* Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Research*, 2005, 110(1–2): 9–20
- Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 2002, 147(8): 1655–1663
- Musthaq SS, Sudhakaran R, Ahmed VPI, *et al.* Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 34–41
- Nakano H, Koube H, Umezawa S, *et al.* Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology*, 1994, 29(2): 135–139
- Pradeep B, Shekar M, Gudkovs N, *et al.* Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 78(3): 189–198
- Shekar M, Pradeep B, Karunasagar I. White spot syndrome virus: Genotype, epidemiology and evolutionary studies. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(2): 175–183
- Sindhupriya M, Saravanan P, Ota SK, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(1): 23–29
- Sun XY, Wan XY, Liu QH, *et al.* Deletion and variation sequence comparison of prawns WSSV from different parts of China in 2013. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016a, 23(3): 693–703 [孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 等. 2013年中国典型对虾养殖区白斑综合征病毒流行株高变异区序列的分析比较. *中国水产科学*, 2016a, 23(3): 693–703]
- Sun XY, Liu QH, Wan XY, *et al.* Comparison of the missing sequences of ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV from different regions of China in 2014. *Progress in Fishery Sciences*, 2016b, 37(4): 140–146 [孙新颖, 刘庆慧, 万晓媛, 等. 2014年中国不同地区对虾白斑综合征病毒 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失区序列比较. *渔业科学进展*, 2016b, 37(4): 140–146]
- Sun XY, Wan XY, Liu QH, *et al.* Sequence comparison of WSSV variable regions from different parts of China in 2014. *Progress in Fishery Sciences*, 2016c, 37(2): 127–133 [孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 等. 白斑综合征病毒 2014年中国毒株变异区的序列比较. *渔业科学进展*, 2016c, 37(2): 127–133]
- Tan YW, Shi ZL. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998–1999. *Virologica Sinica*, 2011, 26(2): 123–130
- Tang KFJ, Groumellec ML, Lightner DV. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 106(1): 1–6
- Tong GX, Li XZ, Wei XX, *et al.* Comparative analysis of deletion region of white spot syndrome virus genome among isolates in Guangxi. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2004, 23(1): 8–13 [童桂香, 黎小正, 韦信贤, 等. 白斑综合征病毒广西株缺失区基因的比较分析. *上海海洋大学学报*, 2004, 23(1): 8–13]
- Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, *et al.* High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 54(3): 253–257
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, *et al.* A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 21(1): 69–77
- Yu HT. Analysis of sequence variability among white spot syndrome virus (WSSV) isolates within China. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008, 32–63 [于洪涛. 中国境内白斑综合征病毒(WSSV)分离株的序列差异分析. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2008, 32–63]
- Zwart MP, Dieu BTM, Hemerik L, *et al.* Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13400

## Variable Sequence Comparison of WSSV Regions from Different Parts of China in 2015

QIN Mengxue<sup>1,2</sup>, SUN Xinying<sup>1</sup>, WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>, LIU Qinghui<sup>1①</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

(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, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In recent years, the fast development of aquaculture has been followed with the increased diseases such as the white spot disease to cause a great loss for the global aquaculture industry. To understand the variations in WSSV ORF14/15 and ORF23/24 and the VNTR in different regions of China in 2015, we investigated 57 samples WSSV-positive on PCR, collected in a disease outbreak area between April and October 2015. The tested samples were from Shandong, Guangdong, Hainan, Zhejiang, Tianjin and Jiangsu. Using specific primers, WSSV-positive samples were genotyped and the amplified fragments were ligated to a T-vector and transformed in Top10 cells. The positive clones were selected and sequenced. After sequencing, the fragments deleted from ORF14/15 and ORF23/24 in different samples were compared with the sequences of Th-96- and TW respectively, and three WSSV VNTR regions in ORF75, ORF94, and ORF125 from different samples were analyzed with the DNAMAN software. The results showed that 35 samples had the products of ORF14/15 amplification, and 14 sample had the products of ORF23/24 amplification. The lengths of the amplified fragments of ORF14/15 were 1270 bp, 1892 bp and 2075 bp, corresponding to deletions of 6530 bp, 5908 bp and 5725 bp, respectively, compared with Th-96-. One type of ORF23/24 was confirmed, and the amplified fragment was 1140 bp, corresponding to a deletion of 12070 bp compared with the TW isolate. Ten fragments were amplified from ORF75, including 1, 2, 3 repeat units with 45 bp, and 1 with 102 bp. Four different ORF94 VNTRs, including 4, 5, 10, or 12 repeat units, were identified. The ORF125 VNTR including 3, 5 or 6 repeat units was identified. The results showed that WSSV exhibited a significant difference in some open reading frames, but a significant stability in others.

**Key words** WSSV; ORF; Deletion; Variation

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170222002

http://www.yykxjz.cn/

王中一, 刘庆慧, 黄捷. 凡纳滨对虾网格重链蛋白与WSSV结构蛋白在体外的相互作用. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 138–145  
Wang ZY, Liu QH, Huang J. *In vitro* interaction between domain of clathrin heavy chain in *Litopenaeus vannamei* and WSSV structural proteins. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 138–145

# 凡纳滨对虾网格重链蛋白 与 WSSV 结构蛋白在体外的相互作用\*



王中一<sup>1,2</sup> 刘庆慧<sup>1,2</sup>① 黄 捷<sup>1,2</sup>

- (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 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 根据凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)网格重链蛋白(CHC)的 2 个功能结构域 Clathrin Propel Repeat (LvCHC1)和 Clathrin Heavy Chain Repeat Homology (LvCHC2), 分别设计 2 对特异性引物, 扩增目的片段, 并克隆至 pBAD/gIIIa 载体上, 以 *E.coli* Top10 为宿主菌, 在阿拉伯糖的诱导下获得 LvCHC1 和 LvCHC2 重组蛋白。以  $\text{Co}^{2+}$ 亲和层析方法, 获得纯化的 LvCHC1 和 LvCHC2 蛋白, 并经质谱分析验证。采用 Far-Western 方法分析 LvCHC1 和 LvCHC2 蛋白与白斑综合征病毒(WSSV)结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37 的作用, 结果显示, LvCHC1 和 LvCHC2 与 VP28N 没有结合作用, 但都能与 VP26 和 VP37 结合, 其中与 VP26 的结合作用较强。表明网格蛋白介导的内吞途径在 WSSV 侵染过程中起到了一定的作用。本研究可为深入研究 WSSV 入侵机制提供依据。

**关键词** 凡纳滨对虾; 网格重链蛋白; WSSV; 体外作用

中图分类号 S945 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)02-0138-08

白斑综合征病毒(WSSV)是水产养殖业中主要的病原之一, 不仅侵染各种野生及养殖对虾, 而且侵染其他水生甲壳类如蟹类、螯虾和龙虾等。该病一旦流行, 对虾在 3–7 d 内的死亡率可达 100%, 不仅给对虾养殖造成严重的损失, 也给海洋生态平衡带来一定的威胁(马晓燕等, 2012)。由于 WSSV 基因的复杂性, 针对 WSSV 的致病机理及 WSSV 侵染宿主细胞的途径尚未得到深入阐释。

网格重链蛋白(Clathrin Heavy Chain, CHC)是网格蛋白的主要成分之一, 是进化上保守的大分子蛋

白, 迄今只在真核生物中发现, 包括近端区、连接区、脚踝区、膝弯曲区、腿远端区、腿近端区和铰链区。网格重链蛋白 N 端有一个衔接蛋白结合结构域(TD), 通过结合衔接蛋白连接要运输的物质(Ter *et al*, 1998; Pearse *et al*, 2000; Zhu, 2015)。网格蛋白具有介导膜蛋白、生长因子、受体、病原体、突触等物质进行内吞的作用(Von *et al*, 2011)。Royle 等(2005)研究表明, 在有丝分裂过程中, 网格蛋白可与纺锤体结合, 提高纺锤体的稳定性, 促进染色体的联会。另外, 网格蛋白可与微管或者微管相关蛋白直接结合来稳定着丝

\* 国家自然科学基金(31672679)、国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)和泰山学者“建设工程专项经费”共同资助 [This work was supported by National Science Foundation of China (31672679), National Key Basic Research Development Plan (2012CB114401), and Taishan Scholar “Special Funds to Construction Projects”]. 王中一, E-mail: liangwang06@163.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-22, 收修改稿日期: 2017-03-20

粒。这些研究表明, 网格蛋白参与多种细胞生物学过程, 对细胞生长发育、分化和环境响应具有重要的生物学功能(Royle *et al.*, 2012)。然而, 网格蛋白介导的内吞途径是 G 蛋白偶联受体介导的最主要的经典内吞途径, 同时也是病毒侵染细胞的主要途径之一(Li *et al.*, 2016)。Posiri 等(2015)研究表明, 在敲除斑节对虾(*Penaeus monodon*)的网格重链蛋白基因后, 延迟了感染黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)的斑节对虾的死亡。黄家骏等(2015)也证明, WSSV 是通过网格蛋白介导的内吞途径进入造血组织细胞的。王修芳(2016)首次克隆凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)网格重链蛋白基因, 全长 5052 bp, 编码 1684 个氨基酸, 含有 clathrin propel repeat、clathrin heavy-chain linker、clathrin-H-link、clathrin heavy chain repeat homology 四个结构域, 并利用 RNA 干扰技术可抑制 *CHC* 基因的表达, 感染 WSSV 凡纳滨对虾的死亡率明显降低。

本研究针对凡纳滨对虾网格重链蛋白的 2 个功能基因, 进行重组表达并获得纯化重组蛋白, 利用 Far-Western 技术筛选出能与这 2 个功能蛋白相互作用的 WSSV 蛋白, 为探讨网格蛋白介导 WSSV 的侵染提供理论依据, 同时也为更加深入全面探索 WSSV 感染机制和防治措施奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

WSSV 结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37, 表达载体 pBAD/gIII A 和凡纳滨对虾网格重链蛋白重组质粒由本实验室保存; *E. coli* Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司; *Taq* 酶及 DNA 标准(DNA Marker DL 2000)购自 TaKaRa 公司; T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Nco* I、*Xba* I 及蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; 地高辛(DIG)购自 Roche 公司; 氨苄青霉素(Amp<sup>+</sup>)、L-阿拉伯糖(L-Arab)、质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; 胶回收试剂盒购自 ZYMO 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 凡纳滨对虾功能基因 *LvCHC1* 和 *LvCHC2* 的克隆** 根据 *LvCHC* 的 2 个功能结构域 clathrin propel

repeat(600~1350 bp、200~450 aa)和 clathrin heavy chain repeat homology(1650~2340 bp、550~780 aa), 分别命名为 *LvCHC1* 和 *LvCHC2*(图 1), 设计 2 对引物(CIH1s、CIH1a; CIH2s、CIH2a)(表 1)。将 *LvCHC* 重组载体保种液取出, 在 LB(Amp<sup>+</sup>, 100 μg/ml)固体培养基中划线, 37℃ 倒置过夜培养。PCR 扩增 *LvCHC1* 基因和 *LvCHC2* 基因, 扩增程序: 25 μl 体系, 94℃, 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 分别胶回收, 胶回收的方法按照 ZYMO 公司胶回收试剂盒进行, 并用 NanoDrop 2000c 检测目的基因 *LvCHC1* 和 *LvCHC2* 的浓度。

**1.2.2 表达载体的构建** 将 pBAD/gIII A 质粒和胶回收的 2 个片段 *LvCHC1*、*LvCHC2* 分别进行 *Nco* I、*Xba* I 双酶切。酶切效果用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察, 将电泳条带切胶回收, 并测定核酸浓度。用 T4 DNA ligase 将目的片段与 pBAD/gIII A 载体连接; 取连接产物 5 μl 加入到 50 μl TOP 10 感受态细胞中, 冰浴 30 min; 42℃ 热激 60 s, 将重组质粒转化入感受态细胞中; 加入 890 μl LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养 1 h, 使质粒恢复抗性; 取 100 μl 恢复抗性的菌液涂布在 LB 固体培养基(Amp<sup>+</sup>, 100 μg/ml)中, 37℃ 倒置培养 14 h。挑取单菌落加入 LB 液体培养基 900 μl 中(Amp<sup>+</sup>, 100 μg/ml), 培养 5 h 后, 以菌液为模板, 用 pBAD/g III A 载体通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 将电泳结果正确的阳性菌液测序。

**1.2.3 *LvCHC1* 蛋白和 *LvCHC2* 蛋白的表达** 将测序正确的菌液分别按照 1% 的比例加入新鲜的 LB 液体培养基中(Amp<sup>+</sup>, 100 μg/ml), 过夜培养。然后按照 1% 的比例将菌液分别加入 LB 液体培养基(Amp<sup>+</sup>, 100 μg/ml)中扩大培养, 培养 5 h 后, 加入 L-阿拉伯糖(终浓度为 0.2 g/L)诱导蛋白表达, 对照组不加 L-阿拉伯糖, 4 h 后, 菌液以 10000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 缓冲液重悬沉淀, 超声破碎仪超声破碎, 将诱导和未诱导菌液分别取适量的上清液和沉淀于 EP 管中, 沉淀用 PBS 缓冲液重悬, SDS-PAGE 检测分析。

**1.2.4 钴离子柱亲和层析纯化蛋白** 破碎液经 10000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀用 A 液(含

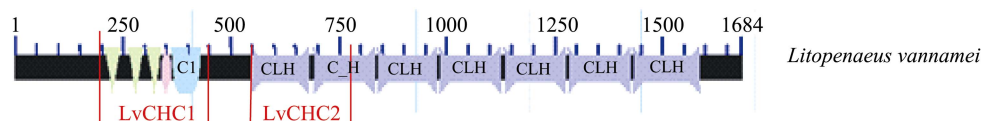


图 1 凡纳滨对虾网格重链蛋白氨基酸序列(摘自王修芳, 2016)

Fig.1 Amino acid sequence of *LvCHC* (By Wang, 2016)

表 1 引物序列  
Tab.1 Sequence of primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
CIH1s	TACCATGGAGATTGAAGGTCATGCT
CIH1a	ACTCTAGATGCCCTGAGCTAAGAC
CIH2s	TACCATGGCTGCTGATGTTAACCAG
CIH2a	CATCTAGAGCCTGTCCCCTCTTGCA

6 mol/L 盐酸胍)溶解后, 于 4℃ 条件下, 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并分别经 0.8 μm 和 0.45 μm 滤膜过滤。将树脂装入层析柱中, 先用 PBS 平衡洗柱, 用 A 液将紫外吸收峰洗至 0, 加入蛋白上清液, 混匀后冰浴 2 h, 再用 A 液将峰值洗脱至 0, 然后用 150 mmol/L 咪唑洗脱, 收集重组蛋白, 在尿素梯度复性液中复性透析, 之后用超滤管进行浓缩, 用 SDS-PAGE 检验蛋白纯化效果。

### 1.2.5 DIG 标记 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白

用枪头取少量 DIG 粉末溶于 DMSO 中, 分别加入纯化的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白, 旋转混合仪中混匀 2 h, 4℃ PBS 溶液中过夜透析, 去除过量的 DIG。

### 1.2.6 Far-Western 检测与 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白相互作用的 WSSV 蛋白

将表达纯化的 WSSV 重组蛋白 VP26、VP28N、VP37 进行 15% SDS-PAGE 后, 转印至 PVDF 膜上, 4℃ 在 5% BSA 中封闭过夜, PBS-T 清洗后分别加入 DIG 标记的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白, 室温避光孵育 2 h, PBS-T 清洗 3 遍后加入 Anti-DIG-AP (1 : 3000), 室温避光孵育 2 h, PBS-T 清洗 3 遍后用 BCIP/NBT 显色液避光显色。将显色结果扫描分析。

## 2 结果

### 2.1 LvCHC1 基因与 LvCHC2 基因的克隆

利用设计的 CIH1s、CIH1a 和 CIH2s、CIH2a 两对特异性引物分别扩增 LvCHC1 基因和 LvCHC2 基因, 电泳结果见图 2。前面条带出现在 750 bp 左右, 与 LvCHC1 基因 750 bp 基本相符。后面条带出现在 500 bp 和 750 bp 之间, 与 LvCHC2 基因 590 bp 基本相符。

### 2.2 pBAD/gIII A-LvCHC1 和 pBAD/gIII A-LvCHC2 重组质粒的鉴定

用 T4 DNA Ligase 将双酶切后的片段与具有相同粘性末端的 pBAD/gIII A 表达载体连接, 将构建好的表达载体转化到 Top 10 大肠杆菌感受态细胞中, 经

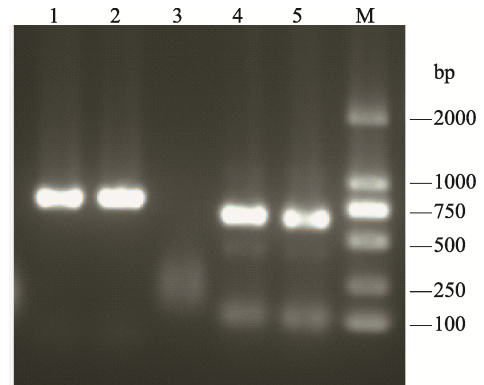


图 2 LvCHC1 和 LvCHC2 基因的克隆  
Fig.2 Cloning of LvCHC1 and LvCHC2

M: DNA 标准品 DL2000; 1~2: LvCHC1 基因;  
3: 阴性对照; 4~5: LvCHC2 基因  
M: DNA Marker DL2000; 1~2: LvCHC1 gene;  
3: Negative control; 4~5: LvCHC2 gene

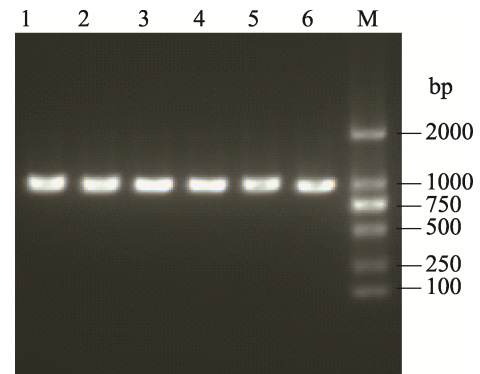


图 3 重组质粒菌液 PCR  
Fig.3 PCR identification of the recombinant vector

M: DNA 标准品 DL2000;  
1~6: pBAD/gIII A-LvCHC1 重组质粒  
M: DNA Marker DL2000; 1~6: Recombinant vector of pBAD/gIII A-LvCHC1

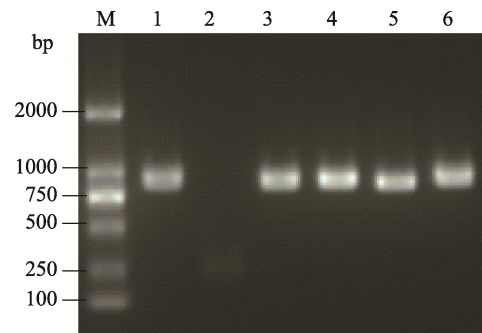


图 4 重组载体菌液 PCR  
Fig.4 PCR identification of the recombinant vector

M: DNA 标准品 DL2000;  
2: 阴性对照; 1~6: pBAD/gIII A-LvCHC2 重组质粒;  
M: DNA Marker DL2000; 2: Negative control  
1~6: recombinant vector of pBAD/gIII A-LvCHC2



Amp<sup>+</sup>抗性筛选后, 挑取单克隆, 37℃培养 5 h 后, 进行菌液 PCR 鉴定, PCR 产物电泳结果见图 3 和图 4, 条带大小在 1000 bp 左右, 初步断定为阳性克隆。取阳性克隆菌液测序, 经过 DNAMAN 软件分析, 证明重组表达载体序列完全正确, 无移码错配。

### 2.3 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白的检测

将重组表达载体正确的菌液进行扩大培养, 经 L-阿拉伯糖诱导后, 将诱导和未诱导的上清液和沉淀分别进行蛋白质凝胶电泳(图 5 和图 6)。分析图 5 发现, 诱导上清液和未诱导的上清液蛋白条带一致, 没有诱导条带; 而诱导沉淀在 25~35 kDa 之间比未诱导的沉淀多 1 条蛋白带(图中红色箭头所指), 其条带大小与 LvCHC1 理论蛋白分子质量 26.19 kDa 相符, 说明该条带有可能是 LvCHC1 蛋白。分析图 6 发现, 诱导上清液和未诱导的上清液蛋白一致, 没有出现

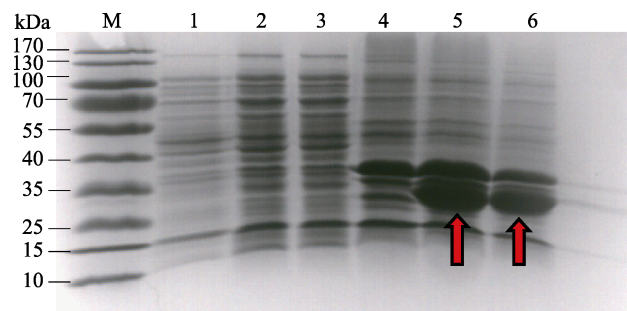


图 5 LvCHC1 蛋白的表达  
Fig.5 The expression of LvCHC1 protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导上清液;  
2~3: 诱导上清液; 4: 未诱导沉淀; 5~6: 诱导沉淀  
M: Protein marker; 1: Supernatant protein of non-induced LvCHC1; 2~3: Supernatant protein of induced LvCHC1;  
4: Pellet protein of non-induced LvCHC1;  
5~6: Pellet protein of induced LvCHC1

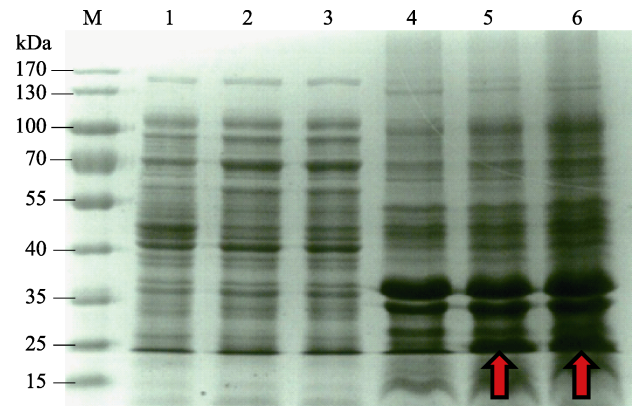


图 6 LvCHC2 蛋白的表达  
Fig.6 The expression of LvCHC2 protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导上清液;  
2~3: 诱导上清液; 4: 未诱导沉淀; 5~6: 诱导沉淀  
M: Protein marker; 1: Supernatant protein of non-induced LvCHC2; 2~3: Supernatant protein of induced LvCHC2;  
4: Pellet protein of non-induced LvCHC2;  
5~6: Pellet protein of induced LvCHC2

诱导条带; 而诱导沉淀在 25 kDa 左右比未诱导的明显多 1 条蛋白带(图中红色箭头所指), 其条带大小与 LvCHC2 理论蛋白分子质量 17.49 kDa 相符, 说明该条带有可能是 LvCHC2 蛋白。将符合目的蛋白的条带进行蛋白质谱分析, 经验证发现, LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白表达正确(表 2 和表 3)。2 个功能蛋白都出现在诱导的沉淀中, 说明 2 个蛋白为包涵体。

### 2.4 纯化蛋白检测

表达载体 pBAD/gIIIa 上带有 6×His 标签, 可利用 Co<sup>2+</sup>亲和层析法对其进行纯化, 洗脱液经尿素梯度复性后得到正确折叠的蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 检测分析, 结果显示, 经纯化的蛋白纯度较高, 可用于进一步实验(图 7)。

表 2 LvCHC1 质谱分析结果  
Tab.2 MS analysis of LvCHC1 protein

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start	End	Peptide
734.446	733.439	733.376	120	125	K.WISSNK.L
768.391	767.383	767.400	1163	1168	R.YLVMAR.K + Oxidation (M)
841.418	840.411	840.475	1517	1523	R.IAAYLYK.G
905.448	904.440	904.480	676	683	K.AMLTANLR.Q+Oxidation (M)
913.384	912.376	912.438	1047	1053	R.VMDYITR.L+Oxidation (M)
1012.490	1011.482	1011.517	618	626	R.AHIAQLCEK.A
1382.653	1381.645	1381.706	579	590	K.NNRPTEGPLQTR.L
1514.630	1513.623	1513.676	633	6440	R.ALEHYTDMYDIK.R+Oxidation (M)
2168.954	2167.946	2168.079	696	713	K.YHEQLTTNALIDLFESFK.S
2821.281	2820.274	2820.380	714	737	K.SFEGLFYFLGSIVNFSQEPEVHFK.Y
3126.336	3125.329	3125.462	591	617	R.LLEMNLM SAPQVADAILGNQMFTHYDR.A+3 Oxidation (M)



表 3 LvCHC2 质谱分析结果  
Tab.3 MS analysis of LvCHC2 protein

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start	End	Peptide
734.446	733.439	733.376	120	125	K.WISSNK.L
768.390	767.383	767.400	1163	1168	R.YLVMAR.K+Oxidation (M)
841.418	840.410	840.475	1517	1523	R.IAAVLYK.G
905.448	904.440	904.480	676	683	K.AMLTANLR.Q+Oxidation (M)
913.384	912.376	912.438	1047	1053	R.VMDYITR.L+Oxidation (M)
1382.653	1381.645	1381.706	579	590	K.NNRPTEGPLQTR.L
1514.630	1513.623	1513.676	633	644	R.ALEHYTDMYDIK.R+Oxidation (M)
2168.954	2167.946	2168.079	696	713	K.YHEQLTTNALIDLFESFK.S
2821.281	2820.274	2820.380	714	737	K.SFEGLFYFLGSIVNFSQEPEVHFK.Y
3126.336	3125.329	3125.462	591	617	R.LLEMNLMSAPQVADAILGNQMFTHYDR.A+3 Oxidation (M)

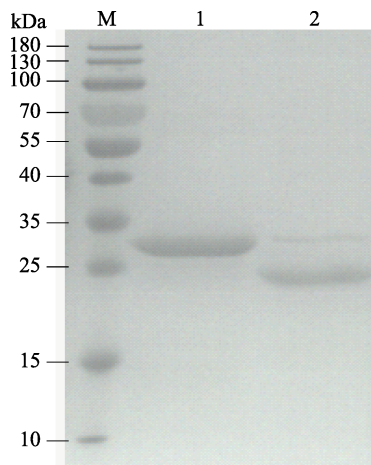


图 7 SDS-PAGE 分析纯化的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白

Fig.7 SDS-PAGE analysis of purified protein LvCHC1 and LvCHC2

M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化后的 LvCHC1;  
2: 纯化后的 LvCHC2

M: Protein Marker; 1: Purified LvCHC1; 2: Purified LvCHC2

## 2.5 Far-Western 分析

将 VP26、VP28N、VP37 和蛋白 Marker 对称点样, 转印于 PVDF 膜上, 与 DIG 标记的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白作用, 图 8 显示, LvCHC1 蛋白与 VP37 和 VP26 有结合活性, 但与 VP26 相比, VP37 处的条带结合较弱。图 9 显示, LvCHC2 蛋白与 VP37 和 VP26 都有结合活性, 但与 VP26 相比, VP37 处的条带也较微弱。

## 3 讨论

网格蛋白是由三个网格重链蛋白和三个网格轻链蛋白构成的, 每一个网格重链蛋白结合一个轻链蛋

白为基本单位组装成三脚蛋白复合体。本研究根据凡纳滨对虾网格重链蛋白基因, 分别设计 2 对特异性的引物, 并克隆它的 2 个功能基因 LvCHC1 和 LvCHC2, 经过 *Nco* I、*Xba* I 双酶切后连接到 pBAD/gIII A 载体并转入到 TOP10 感受态细胞中, 选择阳性克隆的菌落通过原核表达获得 2 个功能蛋白即 LvCHC1 和 LvCHC2, 2 个蛋白分别经过钴离子柱纯化得到纯化的目的蛋白, 之后应用 Far-Western 研究它们分别与 WSSV 病毒结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37 的相互作用。

蛋白检测表明 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白均出现在诱导的沉淀中, 属于包涵体蛋白。Far-Western 结果表明, LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白与 VP28N 都没有相互结合的能力, 但都能与 VP26 和 VP37 相互作用, 而且 2 个蛋白与 VP26 的结合力强于与 VP37 的结合能力。VP26 是 WSSV 中含量较高的被膜蛋白 (Tsai *et al*, 2006), 可以与囊膜蛋白 VP28、核衣壳蛋白 VP51 结合, 起到连接作用 (Chang *et al*, 2008; Wan *et al*, 2008), 重组表达的 VP26 与中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和螯虾血细胞都具有结合作用, 经质谱分析, 与 VP26 有结合作用的是  $\beta$ -肌动蛋白 (Liu *et al*, 2011; Xie *et al*, 2005), 而  $\beta$ -肌动蛋白在细胞内物质和器官运输过程中起重要作用, 并被报道参与到一些病毒的入侵、细胞内转运和释放等过程中, 推测其主要在病毒粒子的组装中发挥作用, 以及病毒进胞后促进其沿着微丝进行迁移 (Gouin *et al*, 2005)。而 VP37 是 WSSV 病毒的一个重要囊膜蛋白, 它含有一个 RGD 位点, 推测其在 WSSV 感染机制中发挥重要作用, 研究表明, VP37 与虾血细胞和鳃细胞膜蛋白结合的蛋白为 ATP 合酶  $\beta$  亚基, 推测其可能为 VP37 在宿主细胞的受体蛋白 (Huang *et al*, 2002;

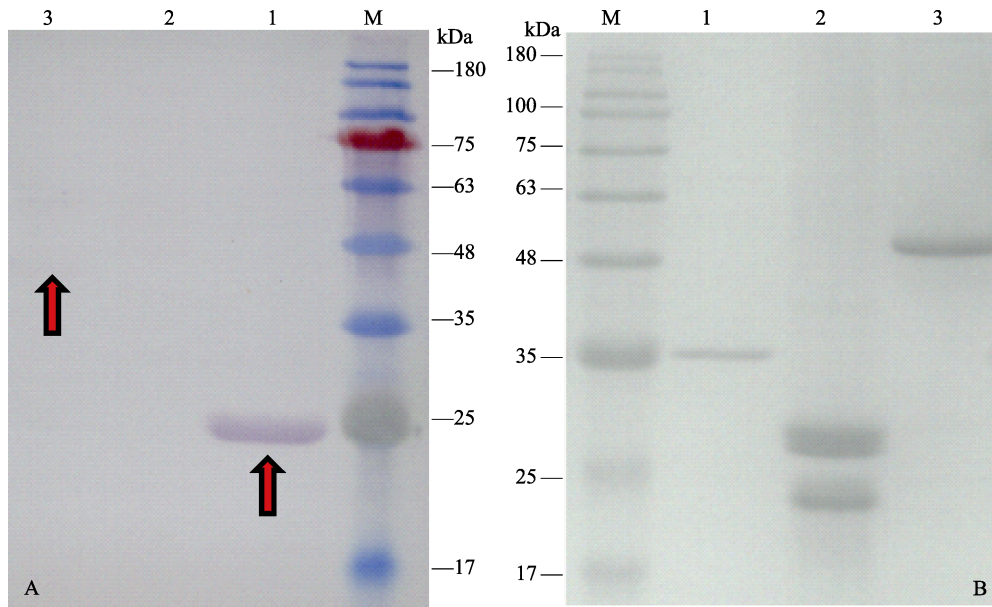


图 8 Far-Western-blot 分析 LvCHC1 与 VP26, VP28N 及 VP37 的相互作用  
Fig.8 Far-Western-blot analysis of LvCHC1 interaction with VP26, VP28N and VP37

A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: 蛋白分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37  
A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: Protein marker; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37

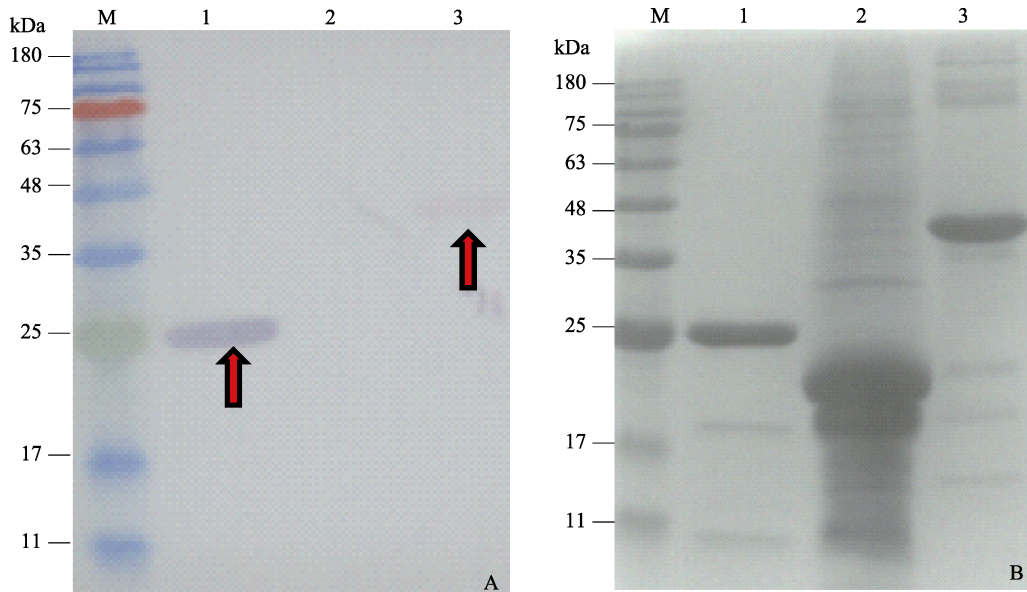


图 9 Far-Western-blot 分析 LvCHC2 与 VP26, VP28N 及 VP37 相互作用  
Fig.9 Far-Western-blot detection of LvCHC2 interaction with VP26, VP28N and VP37

A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: 蛋白分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37  
A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: Protein marker; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37

Liang *et al.*, 2005)。根据实验结果可初步推断 WSSV 在入侵凡纳滨对虾的细胞时, VP26 和 VP37 通过与网格重链蛋白作用, 介导 WSSV 进入宿主细胞内, 从而加快了 WSSV 病毒在宿主体内的传播。

虽然本研究得出网格重链蛋白能与 WSSV 病毒的 VP26 和 VP37 相互作用, 但关于网格重链蛋白是

如何调控 WSSV 入侵凡纳滨对虾等分子机制还没有阐明, 仍需要进一步的研究。

### 参 考 文 献

Chang YS, Liu WJ, Chou TL, *et al.* Characterization of white spot syndrome virus envelope protein VP51A and its

- interaction with protein VP26. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12555–12564
- Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(1): 35–45
- Huang C, Zhang X, Lin Q, *et al.* Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology*, 2002, 83(10): 2385–2392
- Huang JJ, Li F, Yang F. Cloning of clathrin light chain of crayfish, *Cherax quadricarinatus*, and immunological specificity of antibodies. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 35(2): 205–210 [黄家骏, 李钊, 杨丰. 红螯螯虾网格蛋白轻链的克隆及制备抗体的检测. *应用海洋学学报*, 2015, 35(2): 205–210]
- Li S, Bai B, Chen J. Regulatory mechanisms of G protein coupled receptor about desensitization, and resensitization. *Journal of Jining Medical College*, 2016, 39(2): 123–127 [李胜, 白波, 陈京. G 蛋白偶联受体脱敏内吞和复敏调控机制进展. *济宁医学院学报*, 2016, 39(2): 123–127]
- Liang Y, Huang J, Song XL, *et al.* Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(1): 81–85
- Liu B, Tang X, Zhan W. Interaction between white spot syndrome virus VP26 and hemocyte membrane of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2011, 314(1–4): 13–17
- Ma XY, Li P, Yan J, *et al.* The summary of WSSV. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2012(4): 90–100 [马晓燕, 李鹏, 严洁, 等. 对虾白斑综合症病毒的概述. *南京师范大学报(自然科学版)*, 2012(4): 90–100]
- Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ. Clathrin coat construction in endocytosis. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10(2): 220–228
- Posiri P, Kondo H, Hirono I, *et al.* Successful yellow head virus infection of *Penaeus monodon* requires clathrin heavy chain. *Aquaculture*, 2015, 435: 480–487
- Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature*, 2005, 434(7037): 1152–1157
- Royle SJ. The role of clathrin in mitotic spindle organization. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(1): 19–28
- Ter EH, Musacchio A, Harrison SC, *et al.* Atomic structure of clathrin: A beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell*, 1998, 95(4): 563–573
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al.* Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology*, 2006, 80(6): 3021–3029
- Von KL, Stahlschmidt W, Bulut H, *et al.* Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, 2011, 146(3): 471–484
- Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 598–601
- Wang XF. Cloning and expression of prawn coat-ε, clathrin coat AP17 and clathrin heavy chain and its role in WSSV infection. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 [王修芳. 对虾 Coat-ε、CCAP17 和 CHC 的克隆、表达及其在 WSSV 感染中的作用. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Xie X, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 2005, 336(1): 93–99
- Zhu MS. Molecular mechanisms of CHC2 in symbiotic signaling pathway in *Lotus japonicas*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2015 [祝茂生. 网格重链蛋白 CHC2 在百脉根结瘤信号途径中功能及作用机制的研究] 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2015]

(编辑 冯小花)

## ***In vitro* Interaction Between Domain of Clathrin Heavy Chain in *Litopenaeus vannamei* and WSSV Structural Proteins**

WANG Zhongyi<sup>1,2</sup>, LIU Qinghui<sup>1,2</sup>①, HUANG Jie<sup>1,2</sup>

(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, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Clathrin heavy chain protein (CHC), a conserved protein only found in eukaryotes, is one of the essential components of clathrin. White spot syndrome virus (WSSV) infection is one of the main diseases in aquaculture. It belongs to the *Whispovirus* genus of the Nimaviridae family. WSSV, a rod-shaped, non-occluded baculovirus with large doubled-stranded DNA, can infect shrimps such as penaeid shrimp and crayfish. WSSV has a wide range of hosts in crustacean with high infection and mortality rate, and it causes up to 100% mortality within 3~7 days, which causes great economic loss in aquaculture industry. Recent research showed that the clathrin mediated endocytosis path regulates WSSV infection in the *Cherax quadricarinatus* hematopoietic cells. However, whether the clathrin heavy chain protein plays an important way in the clathrin mediated endocytosis pathway is unclear. To address this, two primers were designed to clone the LvCHC1 and LvCHC2 according to the two structural domains: clathrin propel repeat (LvCHC1) and clathrin heavy chain repeat homology (LvCHC2) of *Litopenaeus vannamei* CHC. LvCHC1 and LvCHC2 were cloned into prokaryotic expression vector pBAD/gIII A and transformed into *E. coli* TOP 10. The recombinant LvCHC1 and LvCHC2 were successfully obtained by inducing with L-arabinose. The pure LvCHC1 and LvCHC2 were acquired using Co<sup>2+</sup> affinity chromatography purification. Mass spectrometry analysis showed the correctness of the recombinant LvCHC1 and LvCHC2. Far-Western blot results indicated that LvCHC1 and LvCHC2 interacted with VP26 and VP37 with higher banding activity with VP26, and that LvCHC1 and LvCHC2 did not bind to VP28N. Taken together, the results indicated that clathrin heavy chain-mediated endocytosis is required for WSSV infection.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Clathrin heavy chain protein; White Spot Syndrome Virus; Interaction *in vitro*

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170307001

http://www.yykxjz.cn/

张杰, 吕建建, 刘萍, 李健, 王竹青, 张小辉. 三疣梭子蟹 *Toll4* 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 146–155

Zhang J, Lü JJ, Liu P, Li J, Wang ZQ, Zhang XH. Cloning of *Toll4* in *Portunus trituberculatus* and its expression in responding to pathogenic infection and low salinity stress. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 146–155

## 三疣梭子蟹 *Toll4* 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析\*



张 杰<sup>1,2</sup> 吕建建<sup>2,3</sup> 刘 萍<sup>2,3①</sup> 李 健<sup>2,3</sup> 王竹青<sup>1,2</sup> 张小辉<sup>1,2</sup>

(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** 采用 RACE 技术克隆得到三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)TLRs 家族的一个新基因, 将其命名为 *PtToll4*。该基因 cDNA 全长为 4276 bp, 5'和 3'非编码区分别为 339 bp 和 1252 bp, 编码一个含有 895 个氨基酸、分子量为 102.5 kDa、理论等电点为 6.03 的蛋白质。*PtToll4* 蛋白是一个跨膜蛋白, 存在胞外区 LRR、LRRCT 结构域及保守的胞内区 TIR 结构域。同源性及系统进化分析显示, *PtToll4* 氨基酸序列与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) *EsToll2* 的同源性最高, 为 61%。实时荧光定量 PCR 结果显示, *PtToll4* 基因在血细胞中的表达量最高, 在肝胰腺中的表达量最低。利用副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和对虾白斑综合征病毒(WSSV)对三疣梭子蟹进行注射感染, 结果显示, 经 WSSV 感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中的表达量显著提高, 在 6 h 时出现峰值, 为对照组的 5.03 倍( $P < 0.01$ )。经副溶血弧菌感染后, *PtToll4* 基因仅在 48 h 略微出现上调, 其余时间点与对照组无显著差异。由此推测, *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹应答 WSSV 的免疫过程中发挥了重要功能。此外发现, 低盐胁迫显著抑制了 *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹血细胞中的表达, 这可能是导致低盐环境下三疣梭子蟹等甲壳类动物免疫力下降的原因之一。由此推测, *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹先天免疫过程中发挥了重要功能, 本研究为深入开展三疣梭子蟹和其他甲壳动物的免疫调控机理研究提供了数据支持。

**关键词** 三疣梭子蟹; *PtToll4*; 基因克隆; 先天免疫; 表达分析

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0146-10

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是一种重要的海洋经济动物, 在中国、朝鲜、日本等海域均有分布, 在我国黄渤海及东海分布尤为广泛(薛俊增等,

1997)。由于养殖规模的不断扩大、水体环境污染加重、累代养殖造成的种质退化, 三疣梭子蟹的病害也日趋严重, 给养殖业带来了巨大的经济损失(高保全

\* 国家自然科学基金面上项目(41576147; 41306177)、国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)和泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 41576147 and 41306177), the National shrimp and crab industry technology system (CARS-48), and Project of Taishan Scholars Leading Talent (LJNY2015002)]. 张 杰, E-mail: wfire1991@163.com

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

收稿日期: 2017-03-07, 收修改稿日期: 2017-03-21



等, 2015)。研究表明, 对虾白斑综合征病毒(WSSV)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)均会造成三疣梭子蟹组织病变乃至死亡(王忠发等, 2008; 阎斌伦等, 2010)。此外, 盐度作为一种重要的水体环境因子, 也对三疣梭子蟹的免疫功能产生较大影响。三疣梭子蟹等甲壳动物在水体盐度发生急剧变化时, 可能会产生应激反应和生理代谢紊乱, 导致其免疫力下降, 从而促使病害暴发并造成大量死亡(王林等, 2016; 付萍等, 2016)。然而, 三疣梭子蟹等无脊椎动物没有类似于哺乳动物的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 因此, 其不具有获得性免疫系统(Uematsus *et al*, 2008), 但可以依赖独特的先天性免疫系统通过免疫信号通路级联反应清除入侵机体的病原微生物。

三疣梭子蟹等甲壳动物的先天免疫是由 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 等模式识别受体 (Pathogen recognize receptors, PRRs) 所介导(Carty *et al*, 2010), 通过识别保守的病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 启动先天性免疫应答(Aderem *et al*, 2000)。Toll 受体蛋白于 1980 年首次在果蝇(*Drosophila*)中发现, 参与果蝇背腹侧轴形成, 缺失 Toll 受体蛋白会引起果蝇成体不对称(Nusslein-Volhard *et al*, 1980)。Hoffmann 等(1996)发现并证实 Toll 受体蛋白在先天免疫中起到了重要作用。各物种的 Toll 样受体都具有多名成员, 目前, 已在果蝇中发现了 9 种类型的 Toll 受体蛋白, 而在哺乳动物中也有 13 种 Toll 样受体被陆续发现(Iwasaki *et al*, 2004; Bilak *et al*, 2003)。

目前, TLRs 家族基因在哺乳动物和果蝇中已有较为深入的研究, 但在甲壳动物中, TLRs 家族基因的研究还处于起步阶段。Yang 等(2007)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中发现了一个 Toll 样受体, 命名为 *LvToll*, 这是在甲壳动物中发现的首个 TLRs 家族基因。目前, 在三疣梭子蟹中仅发现了 3 种 Toll 样受体(Zhou *et al*, 2015)。

为进一步完善 TLRs 基因家族在三疣梭子蟹先天

免疫中发挥的功能, 本研究利用 RACE 技术克隆了一个新的三疣梭子蟹 TLRs 家族基因, 命名为 *PtToll4*, 并对其序列进行分析, 阐明了其系统进化关系。利用实时荧光定量 PCR 检测了经副溶血弧菌和 WSSV 感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中的表达变化。此外, 初步探究了低盐胁迫对 *PtToll4* 基因表达量的影响。旨在为进一步研究 *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹先天免疫中发挥的功能提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

本实验所用三疣梭子蟹取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司, 体重为(35±5) g, 置于整理箱(560 mm×360 mm×280 mm)中暂养 7 d, 暂养期间保持水温为(20±2)°C, 盐度为 31, pH=8.2。期间持续充氧, 定时换水清污, 换水量为原水量的 1/3, 定时投喂饵料并对暂养个体进行筛选, 保留活力形态均较好的个体。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 RNA 的提取及 RACE 第一链合成** 用 TRIzol 法分别提取三疣梭子蟹各组织总 RNA, 利用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)与琼脂糖凝胶电泳等方法, 检测所提总 RNA 的质量和完整性。按照 SMART™ RACE Amplification Kit(Clontech)说明书, 取等量所取各组织总 RNA 混匀, 用来合成 3'和 5'RACE 第一链, 用于后续实验。

**1.2.2 *PtToll4* 基因 cDNA 序列全长的克隆** 根据本实验室三疣梭子蟹转录组库中所得到的 *PtToll4* 基因 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 3'和 5'末端特异性引物(表 1), 由擎科梓熙生物技术有限公司合成。参照 SMART RACE 说明书, 利用 Advantage 2 PCR Kit(Clontech)使 UPM 与相应的特异性引物分别结合, 进行 *PtToll4* 基因 cDNA 3'和 5'

表 1 *PtToll4* 克隆和 mRNA 表达分析所用引物序列

Tab.1 Primers used for *PtToll4* cloning and mRNA expression analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
<i>PtToll4</i> -3'	TTGATGGGAGGATAGTCATTGATTGC
<i>PtToll4</i> -5'	TGAGTAGTCAGCCTCTGTGGA
<i>PtToll4</i> -F	ATGGGTTGTGGGATGTGTG
<i>PtToll4</i> -R	AGTCAGCCTCTGTGGAGTGC
$\beta$ -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
$\beta$ -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC



末端扩增。PCR 程序: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环。扩增产物使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up 试剂盒(TaKaRa)切胶回收得到目的片段。将目的片段和 pMD19-T 进行载体连接, 16℃ 反应 3 h, 将连接产物转入到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 37℃ 平板培养 12 h。挑取阳性菌落在 LB 液体培养基(含 AMP)中培养 5 h, 随后进行菌液 PCR 检测, 由擎科梓熙生物技术有限公司完成测序。

**1.2.3 *PtToll4* 基因的生物学分析** 利用 Contig Express Project 软件去除载体序列, 并保留目的片段, 将所得到的目的片段序列与 *PtToll4* 基因 EST 序列进行比对, 通过拼接得到 *PtToll4* 基因 cDNA 序列全长。将得到的 *PtToll4* 基因的 cDNA 序列利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对。利用 EditSeq 和 Gene Tool 预测开放阅读框(ORF) 并翻译得到其氨基酸序列。氨基酸序列分子量及等电点使用在线 ExPASy 进行预测, 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进行蛋白质功能结构域预测与分析。利用 DNAMAN 将 *PtToll4* 氨基酸序列和其他物种相应氨基酸序列进行多重序列比对, 使用 MEGA 5.0 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树, 对 *PtToll4* 基因的亲缘关系分析。

**1.2.4 病原感染实验** 将实验所用三疣梭子蟹暂养 7 d 后分为 2 个实验组和 1 个对照组, 即副溶血弧菌感染组、WSSV 感染组、PBS 对照组, 每组 80 只。通过预实验, 三疣梭子蟹注射感染副溶血弧菌和 WSSV 后, 72 h 三疣梭子蟹的半致死浓度分别为  $2.6 \times 10^7$  CFU/ml、 $3.2 \times 10^7$  拷贝/ml, 分别以此浓度进行感染实验。将 3 组三疣梭子蟹分别注射 100  $\mu$ l 副溶血弧菌、WSSV 和 PBS, 实验期间的饲养与管理与暂养期保持一致。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 进行取样, 每个时间点各取 3 只三疣梭子蟹, 取其血淋巴, 4000 r/min 离心 15 min, 弃血清, 保留血细胞并立即加入 300 ml TRIzol, 置于液氮中保存。

**1.2.5 低盐胁迫实验** 选取暂养后的三疣梭子蟹 120 只, 均分为 2 组, 即盐度胁迫组和正常对照组。通过预实验, 得到三疣梭子蟹低盐胁迫 72 h 半致死盐度为 11, 以此盐度进行低盐胁迫实验。实验水体由自然海水和自来水调配所得并充分曝气, 正常对照组所用实验水体为正常海水(盐度为 31)。实验期间的饲养与管理与暂养期保持一致。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 取样, 每个时间点各取 3 只, 取其血淋巴, 4000 r/min 离心 15 min, 弃血清, 保留血细胞并立即加入 300 ml TRIzol, 置于液氮中保存, 以用于后续实验。

**1.2.6 *PtToll4* 基因的定量表达分析** 将经过暂养的正常状态下的三疣梭子蟹的血细胞、肝胰腺、鳃、肌肉、心脏、眼柄、表皮、胃和肠等组织以及不同实验组所取组织分别提取 RNA, 用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 确保 RNA 质量与完整性均好, 随后用 PrimeScript RT reagent kit 进行反转录合成 cDNA, 具体方法按照说明书进行。

根据本实验中已经得到的 *PtToll4* 基因的开放阅读框 cDNA 序列, 设计合成一对正反向特异荧光定量引物, 并且以内参基因  $\beta$ -actin 作为对照( $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R; *PtToll4*-F 和 *PtToll4*-R)(表 1)。参照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 说明书, 利用 Applied Biosystems 7500 Real Time PCR 仪分析所提三疣梭子蟹各组织中 *PtToll4* 基因的相对表达量。反应体系 10  $\mu$ l: 5  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II, 0.4  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 的正反向引物, 0.2  $\mu$ l ROX Reference Dye II, 1.0  $\mu$ l cDNA, 3.0  $\mu$ l 灭菌双蒸水。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。各样本均设 3 个重复, 实验结果采用相对标准曲线法  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.*, 2001) 进行相对定量计算, 并利用 SPSS 19.0 软件对结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 并对其显著性进行检验。

## 2 结果

### 2.1 *PtToll4* 基因 cDNA 的克隆及其序列分析

将提取得到的三疣梭子蟹各组织总 RNA 用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳对其质量和完整性进行检测, 结果显示, 其 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 均在 1.9~2.0 之间, 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰, 表明所提总 RNA 质量较好, 可用于合成 RACE 模板。利用合成的 cDNA 第一链作为模板, 进行 5'和 3'末端 RACE 扩增。PCR 产物经公司测序后与已知的 EST 序列分析比较测序结果, 拼接得到 *PtToll4* 基因 cDNA 全长序列。利用 EditSeq 软件以及 BLAST 对序列分析, 发现已知序列包含完整的开放阅读框(ORF), 表明所得到的基因序列完整可靠。*PtToll4* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号: KY432366)全长 4276 个核苷酸, 包含 2685 bp 的开放阅读框(ORF)、339 bp 的 5'端非编码区(UTR)和 1252 bp 的 3'端非编码区(UTR), 3'末端具有由 28 个腺嘌呤核苷酸组成的 poly(A)尾(图 1)。

### 2.2 *PtToll4* 基因序列的生物信息学分析

使用 EditSeq 软件以及 ExPASy 预测得到 *PtToll4* 基因 cDNA 序列开放阅读框(ORF)的长度为 2685 bp,

```
1 AACGCAACGAAAGTGAAGTGGTGGTCTGGCTCACTACCTCCCATTTACTTTGTGTGTGCTGCGGGAACAGAAAGTGCATCGTTGTGTTTTAGTAGAGTGTGACAACCGGA 120
121 CTGTGAGAAGGAGGAGGAGAAAGAACTGCGTTGGAATGGAGGCATAGAGTGAAGGCTGCTCCTTGTGGTCCAAAGACTGAGGATTCCCTGCTACTCTGCTCAACTGCTCCTCCCAAGTAG 240
241 TTCCCTGGCCACTCACAGGAGTCTGGATGATGGAAGTACTGAGGCGCACTAACTGAAGCAGCATATCTTTGTGGCCACC ATG TTG CAG GAG ATA TTC TAT TTC ACA 349
M L Q Q I F Y F T
350 GTC CTG GCG TGG ATG TGG ATT GCT GTT GAG GCA ATG GGT TGT GGG ATG TGT GAA GAG ACT GTT CAG AAT TCT ATG ACT TGC TCC AGT ACA 439
V L A W M W I A V E A M G C G M C E E T V Q N S M T C S S T
440 GCA GAC CAA AAA GTA AAA TTT TCT GTG GAT GTG TCC TTG AAG GGA AAG ATT CGC TTG CAG TGT TTG CAC TCC ACA GAG GGT GAG TAC TAG TCA 529
A D Q K V K F S V D V S L K G K I R L Q C L H S T E A D Y S
530 CTT ATG GAA GGT TGT GAC TTC TCT TCA GTT ACT CAT GCA GAA TTT CTT GGA TGT GCT CTT CCT AAT GTT TCA TAT AAG GAA GTC CTT TAC 619
L M E G C D F A S S V T H A E F L G C A L P N V S Y K E V L Y
620 AAA ATT GGT GTG AAT CCA AAA AGT GTT AGG TCC TTG GCT TTT TTG AAT GTG AGC AAG AAT GGC ACA TTG TTG CAG CAG CAT CTG GAA GGA 709
K I G V N P E S V R S L A F L N V S K N G T L L Q Q H L E G
710 CTG AAT GAT TTA AAG ATG TTG CAG GTG ACG GGC ATA CAT TCT GTA GCA AGT GAT GTA TTT AGA AGC ACA CTT ATG CTG GAG GCT ATA GAA 799
L N D L K M L Q V T G I H S V A S D V F R S T L M L E A I E
800 ATT TCT GAT AGC ACA ATG AAT CAA CTT GGT GCA GAC CTT TTC CAT AAC ATT ACA AAG CTT CAG ATA GTA ATG CTG GAA CAT AAG CTG CTA 889
I S D S T M N Q L G A D L F H N M T K L Q I V M L Q H N M L
890 GAA GAG CTT CCA GAT AAG CTT TTC TCT GGC ACT CCC AGT ATT CGT ACT ATT CAA CTC CAT AAC AAT CAA ATC AGA ACC CTC CAG GAC AGT 979
E E L P D K L F S G N L I S E I H T G T F T N L Q K L Q D S
980 CTG TTC AAG GAC TTG AAA TTT CTT ACT ACC TTG AAT GTT AGC AAG AAC AAA TTG GAA AAA TTA TGT GGT GAT GTG TTT TCT GAA AAC CAT 1069
L F K D L K F L T T L N V S K N K L E K L S G D V F S E N H
1070 ATA ATG GAA TAC ATA GAT ATG AGT GAA AAT CTT ATA TCA GAG ATA CAT ACT GGA ACT TTC ACA AAT CTG CAG AAA CTG AAG GTG CTC AAC 1159
I M E N L I S E I H T G T F T N L Q K L Q D S
1160 TTA GGC CAC AAC AGA CTG AAG ACA TTG CCT TGG GGT ACA CTG AAA GAA TGT CTG GAT CTG CAA AAA CTT TGG CTC AAC AAC AAC TTT CTG 1249
L G H N R L K T L P W G T L K E C L D L Q K L W L N N F L
1250 ACC CAT CGT GGC ATC AGA AAT GGC TTC CCA CGC ATG TCT TCA CTA AGA TAC TTG GAC CTC GGT TAC AAT AAT ATC AGC ATA CCG AGC ATG 1339
T H R G I R N A F P R M S S L R Y L D L G Y N N I S I R S M
1340 AGT AAC TTT GCA CTG CAT AAC CAA ACT AAG CTG CAG TAT CTC TTC TTG AAT AAT AAT AAT ATA AGT ATA ATA CCA GAC AGT TTG AAT AAT 1429
S N F G A L C H N Q T K L Q Y L F L N N N N I S I I P D A S L N N
1430 GTC TAT GTG GAC CTC GTG AGA GTT GAC TTC TGA TGG AAT TCA TTT GAG GTT TTA AAT TAT ACT TCC CTT ATG TTT CAA TCA AAT GTG GTG 1519
V Y V D L V R V D F S W N S F E V L N Y T S L I F Q S N V V
1520 GAA TTA GAT TTC AAG TTT AAT AAT ATA GAG ACT GTT GAT TTT ACT TTT AGT TTT TCA TTG CAT AAA AAG AAA ACA ATG ACC CTA GCC TTG 1609
E L D F K D I E T V D F T F S F S L H K K K T M T A L
1610 GAA GGA AAC CCA TTA TTG TGT CAT TGC CGC ACT TAT GGC TTC CTG AGG ATG TTG CAA GGT TTG CCA TTT GTG AGA GTA AAC AAT ACA ATG 1699
E G N P L L C H C R T Y G F L R M L Q G L P F V R V N N T M
1700 GAA ATC ACT GTA AAA GAC ATT GAA GAA GCA TTC TGT CAA TTG CCC AGT GGT GAG CTT GTG AAC TTG ATG GAG ATG CAG ACA GAA ACC ATC 1789
E I T V K D I E E A F C Q L F S G E L V N L M E M Q T E T I
1790 ACA TGT CCG TTA ACT GCT GAT GAT GTT TGT TCC TAT GAT TTT AGA CTC TTT GAT GGG AGG ATA GTC ATT GAT TGC TCC TAT CAG AAC CTT 1879
T C R L T A D D V C S Y D F R L F D G R I V I D C S Y Q C N L
1880 AAG TCA ATA GGG TTC CAC AAT CTT TCC AAG TGA ATA GAG TTT CTT AAT TTT CCA AAT AAC AAT AAA CCT AAC TAC ACT GTG ATC 1969
K S I G F L N L S K S I E F L N L S K Y N N N K P N Y T L I
1970 CTG GCA AAC AAC AGA CTT ACA AGC CTC GCT GGC TTG CAG ATC TAT ACC AAT TTG CTC AAC CTT GTA GTG CCA TAT AAC GAA CTA TCC AGC 2059
L A N N R L L T S L A G L Q I Y T N L L N L V V P Y N E L S S
2060 ATC AAT ACG TCT CAT CTT CCA CCC AAC TTG AAG GCC CTG GAT GTG CGA GTT AAT AAT CTC ACT AAC TTG TCA CCA GGC ATC CTC GAG TAT 2149
I N T S H L P P N L K A L D V R G N N L T N L S P A I L D Y
2150 CTA AAT GCA ACT GAC ATG AGC CTC AAG CTG GGA AGT AAT CCA TGG CAC TGC AGC TGT GAC ATG CTA GAT CTG TTT CAA TTC CTC CAC GTC 2239
L N A T D M S L K L G S N P W H C S C D M L D L F L H V
2240 CCA TCT CGT AAG GTG AAT GAC TTG ACG GAA CTG CAG TGT GAG AGC GGA GAG CTG GTG ATG GAC CTG AGC GAA GAT GAC CTT TGC CCG TTC 2329
P S R K V N D F T E L Q C E S G E L V M D L S E H D L C P F
2330 TTC ATG CAG CCA ATG GTC ATT GTC ACC ATA GTG GTC ATC CTC ATC CTT CTC ACC ATC TTC AGT ATT CTT GGG ACT GTG AGC TTC TAC AAG 2419
F M Q P M V I V T I V V I L L T I F S I L G T V S F Y K
2420 TAC AAG CAA GGC ATA AAG GTT TGG TTG TAT GGC CAC CAG ATG TGT CTC TGT GCC ATC ACT GAA GAT GAA CTG GAT GCA GAC AAG AAG TAT 2509
Y K Q G I K V W L Y A H H M C L C A I T E E D E L D A D K K Y
2510 GAT GCA TTC ATC AGT TAC TCT CAC ATG GAT GAG GAG TTT GTC ATG AAG GAG CTG GTG CTT GGC CTG GAG TGC GGG GAG COT AAG TAC CAG 2599
D A F I S Y S H M D E E F V M K E L V P G L E C G E P K Y R
2600 GTG TGC CTC CAC TAC CCG GAC TGG GTG CCC GGG GAG TAC ATC CAG AAC CAG ATC ATG CAA AGT GTG GAG GCA AGC CCG GCG ACC ATT GTG 2689
V G L H Y R D W V P G E Y I Q N Q I M Q S V E A S R R C T I V
2690 GTC CTT TCA TCA AGC TTT ATT GAG AGT GTT TGG GGG CAA CTG GAG TTC CGT GCA GCT CAC TCC CAG GCC CTG CAG GAC CGC ACC AAT AGG 2779
V L S S S F I E S V W G Q L E F R A A H S Q A L Q D R T N R
2780 CTC ATC ATC ATT GTC TAT GGC AAG ATC CCA GCA GAG TCT GAG CTG GAA AAG TTG AAG TTG TAC ATC ACC ACA AAG ACT TAT GTG CCG 2869
L I I I V Y G K I P A E S E L D E K L K L Y I T T K T Y V R
2870 TGG GGT GAT AGC AAG TTT TGG GAT AAA CTT AGG TAC ATG ATG CCC CAT CCA CCA GAT CTT GTG CAG AAA AAA CGT AAC AAG AAT ATC GAT 2959
W G D S K F W D K L R Y I M P H P P D L V Q K K R N K N I D
2960 AAT AAA CTA GAA CTT AGT AAA TCA CCC CCA AAG CAG AGC ATG TGT TGA GAAAAGTGGTTTTGACAAAGTATAAATAATTAATGCAAAATTTTGGCCAAATTTGA 3063
N K L E L S K S P P K Q S M C *
3064 TCACTCATAAGTTCATGATGCAACAAACCGTTAGCTGGAATTGAACCAAGACTTGAAGTCAAGCAGGTTTTGCTCTTTGAAAAAGGGGTTTTGCACTCTGCTGGTGAACCTCCCAACTTTT 3183
3184 TGTTCAAGCAGAGTCAGCTGGAAGCTCACTTTGGTCTGCTGGTACATGTATTAACCAACCCAGATGATTCATATATGATGAGACAGCAGGCCCTTAATATCAGATAGTAAACATGGA 3303
3304 TGTCAGTAATATTGTTGTCATAATGTCTAATTTGATTCATCTCTATTAGAATTTGCTCAGTAATCATGATTATGATAAGAATTTACTATTTGCTCAGTAATCATGATTATCATACT 3423
3424 CTTAAGATGTTTATGCTAAGATAGTGAAGCTGAATATGGATATGGTGTTTTAAAGCCAGAGACTGTGATGGCGATGGAGCTGAATATGGATATGGTGTTTTAAAGCCAGAGACTGT 3543
3544 GCTGCCATCAGCTCTTCAATGTTGACCATGTTGGACAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3609
```

图 1 *PtToll4* 基因序列全长及编码的氨基酸序列

Fig.1 *PtToll4* nucleotide sequence and deduced amino acids sequence

单下划线和双下划线分别代表信号肽和跨膜区; 方框表示潜在的糖基化位点;

阴影部分代表 TIR 结构域; 起始密码子(ATG)、终止密码子(TAG)用黑体表示

The single and double underlined letters represent the signal peptide and the TM region, respectively.

The potential N-linked glycosylation sites are boxed. The TIR domain is shaded, the letters of the start codon (ATG) and the stop codon (TGA) are bolded

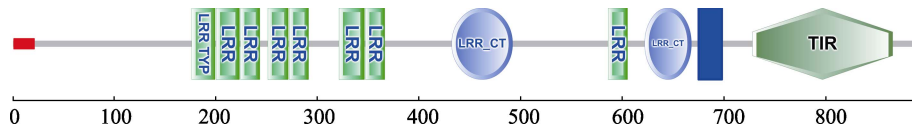


图 2 利用 SMART 在线软件预测的 *PtToll4* 的蛋白结构

Fig.2 The predicted domain architecture of *PtToll4* by SMART

信号肽用红色框表示, 跨膜区用深蓝色框表示, 其他的结构域, 包括 LRR 结构域和 TIR 结构域则分别用相应的框架加上符号表示(图中所用颜色和符号均参考网络版显示格式)

Signal peptides are shown in red, TM domains in dark blue. Other domains, including LRR domains and TIR domains, are labeled accordingly (For the interpretation of the color and symbols in this figure refer to the web version of the article)

编码一个由 895 个氨基酸组成的分子量为 102.5 kDa、理论等电点为 6.03 的蛋白。利用 SMART 和 InterproScan 对 *PtToll4* 基因编码的氨基酸序列进行在线蛋白质功能结构域分析, 结果表明, *PtToll4* 推导的氨基酸序列主要包括一个由 21 个氨基酸组成的信号肽 (Signal peptide)、8 个 LRR 或 LRR-TYP 结构域、2 个 LRRCT 结构域 (C-端 LRR)、1 个跨膜结构域 (TM) 以及 1 个 TIR 结构域组成 (图 2)。

### 2.3 *PtToll4* 基因序列同源性分析及系统进化树分析

通过 BLAST 同源性比对分析发现, *PtToll4* 氨基酸序列与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) *EsToll2*、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) *FcToll*、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) *PmToll*、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) *MjToll2*、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) *LvToll*、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) *PcToll2* 等具有较高的同源性, 同源性为 41%~61%, 其中, 与中华绒螯蟹 *EsToll2* 同源性最高, 为 61% (图 3)。

利用 MEGA 5.0 软件对 *PtToll4* 基因进行系统进化分析, 结果显示, *PtToll4* 首先与亲缘关系最近的中华绒螯蟹 *EsToll2* 聚为一支, 其次与中国明对虾 *FcToll*、凡纳滨对虾 *LvToll*、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) *SpToll* 等亲缘关系较近的甲壳动物聚为一支, 然后与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) *DmToll* 等无脊椎动物聚为一支 (图 4)。

### 2.4 *PtToll4* 基因的组织表达分布

对 *PtToll4* 基因在不同组织的表达差异情况进行分析, 结果显示, *PtToll4* 基因在各组织中均有一定表达, 在血细胞中的表达量最高, 在表皮和胃中也有较高表达量, 而在胰腺腺中的表达量最低 (图 5)。

### 2.5 不同病原感染对三疣梭子蟹血细胞 *PtToll4* 基因 mRNA 表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 分别分析副溶血弧菌和 WSSV 感染后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h

三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因 mRNA 表达量的变化, 经分析发现: 与 PBS 对照组相比, 经副溶血弧菌感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中仅在 48 h 出现显著上调 ( $P < 0.05$ ), 为对照组的 1.41 倍, 在其他时间点无显著变化 (图 6)。然而, 经 WSSV 感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中均出现了显著上调 ( $P < 0.05$ ) 并且在 6 h 达到了表达量的峰值, 为对照组的 5.03 倍 ( $P < 0.01$ )。经 WSSV 感染后, 三疣梭子蟹血细胞中的 *PtToll4* 基因被诱导表达更为显著 (图 7)。

### 2.6 低盐胁迫对三疣梭子蟹血细胞 *PtToll4* 基因 mRNA 表达的影响

经盐度为 11 的水体环境对三疣梭子蟹进行低盐胁迫后, 对三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因表达情况进行分析表明, 与正常对照组相比, 在 0~72 h 均出现了显著下调 ( $P < 0.01$ ), 其中, 在 48 h 下调达到最低值, 为正常对照组的 0.1 倍, 在 72 h 表达量有所回升, 为正常对照组的 0.5 倍 ( $P < 0.01$ ) (图 8)。

## 3 讨论

三疣梭子蟹等无脊椎动物由于不具有获得性免疫, 因此, 先天免疫是其抵抗外界病原入侵的重要防御机制 (Liu *et al.*, 2014)。先天免疫主要是由胚系基因所编码的模式识别受体所介导, Toll 样受体便是一种重要的模式识别受体 (Carty *et al.*, 2010)。本研究通过 RACE 技术获得 *PtToll4* 基因 cDNA 序列全长 (GenBank 登录号: KY432366)。通过与其他无脊椎动物进行同源性比对发现, *PtToll4* 的蛋白序列与中华绒螯蟹 *EsToll2* 的蛋白序列相似度最高, 为 61% (Yu *et al.*, 2013), 与其他甲壳类动物如克氏原螯虾 *PcToll2*、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) *MrToll*、斑节对虾 *PmToll* 也具有较高的同源性 (Lan *et al.*, 2016; Srisuk *et al.*, 2014; Assavalapsakul *et al.*, 2012)。

根据 SMART 预测得到的结构域可知, *PtToll4* 具有 TLRs 家族的典型特征, 归属 I 型跨膜蛋白, 胞



内有保守的 TIR 结构域, 胞外含有多个亮氨酸重复 (LRRs)。TIR 结构域是一种进化十分保守的蛋白互作结构域, 对于诱导 Toll 信号通路下游信号级联反应具有重要作用。TLRs 家族基因胞外区的进化速度比胞

内区要快, 正是基于胞外结构的多样性, 使得 TLRs 家族基因具有特异性识别病原相关分子模式的功能 (Johnson *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2011)。比如在哺乳动物中, TLR1、TLR2 和 TLR6 能够直接与脂肽结合

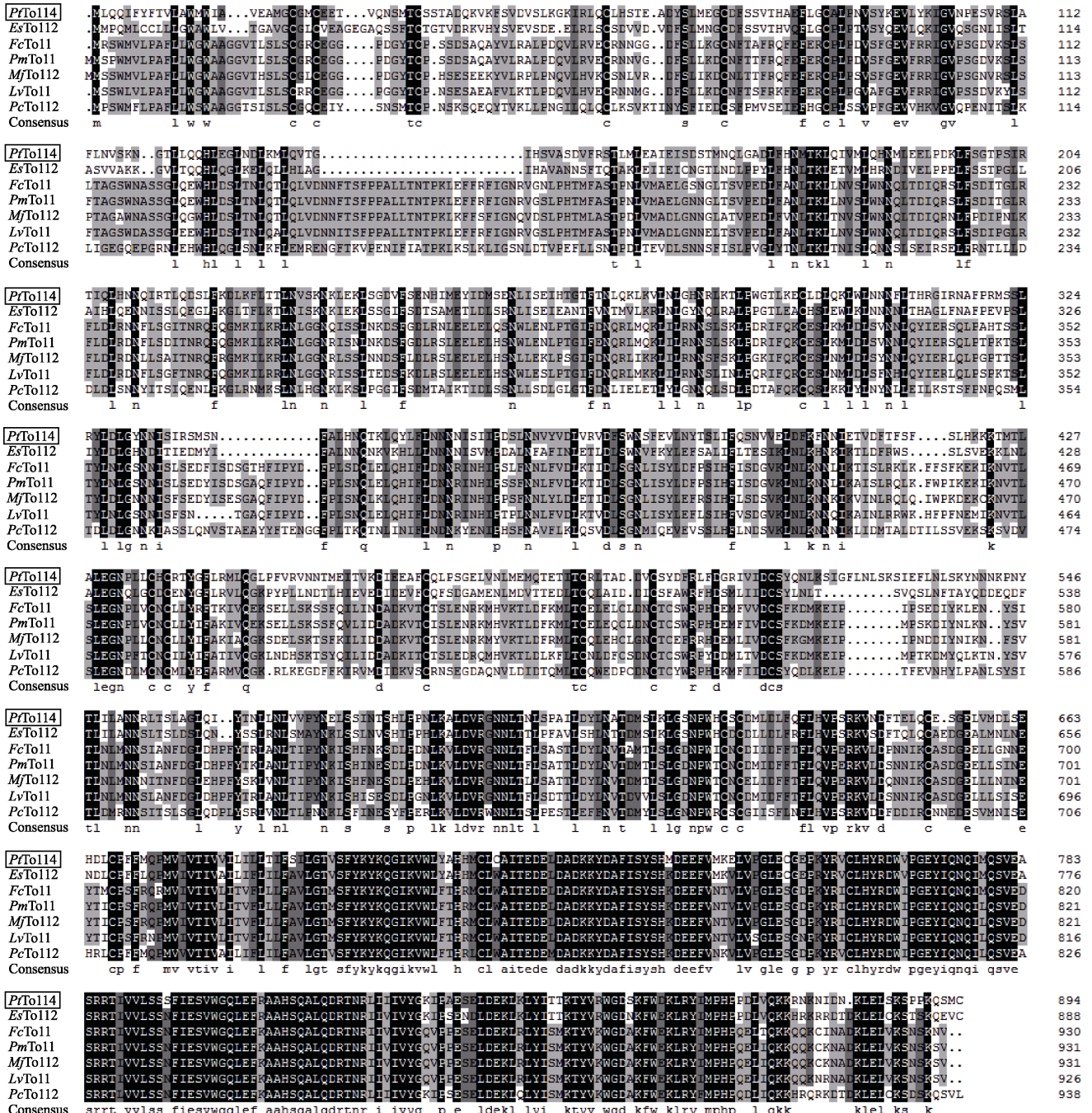


图 3 *PtToll4* 基因编码的氨基酸序列与其他无脊椎动物 Tolls 氨基酸序列比对  
Fig. 3 Multiple amino acid sequence alignment of *PtToll4* with other invertebrate Tolls

各物种 GenBank 登录号: 三疣梭子蟹 *Toll4*(KY432366)、中华绒螯蟹 *Toll2*(AGT21374.1)、中国明对虾 *Toll* (ACC68670.1)、斑节对虾 *Toll*(ABO38434.1)、日本囊对虾 *Toll2*(BAG68890.1)、凡纳滨对虾 *Toll*(ABK58729.1)、克氏原螯虾 *Toll2*(AOP12928.1)  
GenBank accession number of different species: *PtToll4*, *P. trituberculatus* *Toll4* (KY432366); *EsToll2*, *E. sinensis* *Toll2* (AGT21374.1); *FcToll*, *F. chinensis* *Toll* (ACC68670.1); *PmToll*, *P. monodon* *Toll* (ABO38434.1); *MjToll2*, *M. japonicas* *Toll2* (BAG68890.1); *LvToll*, *L. vannamei* *Toll* (ABK58729.1); *PcToll2* *P. clarkia* *Toll2* (AOP12928.1)

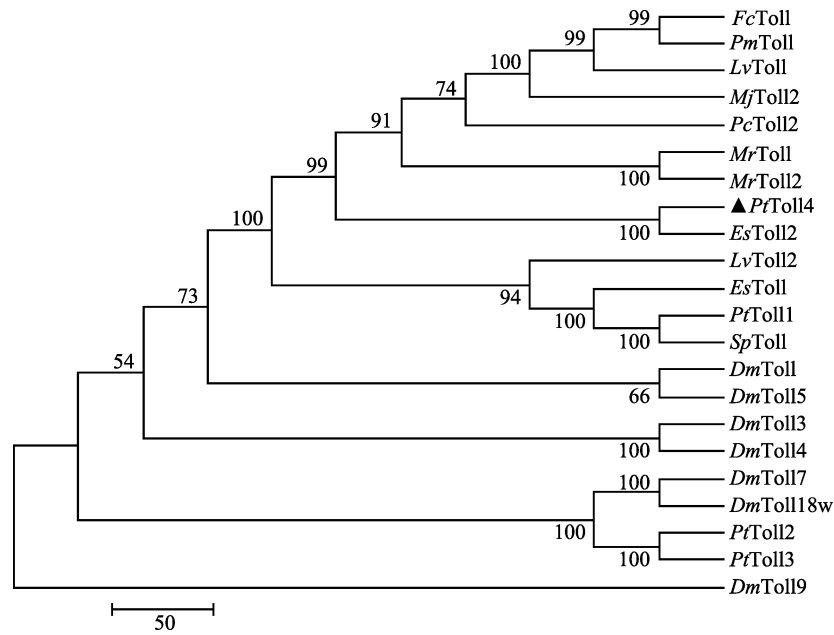


图 4 基于 Toll4 氨基酸序列构建的 NJ 进化树

Fig.4 NJ tree based on Toll4 amino acids

各物种基因 GenBank 登录号：三疣梭子蟹 Toll4 (KY432366)、中华绒螯蟹 Toll (AGK90305.1)、中华绒螯蟹 Toll2 (AGT21374.1)、中国明对虾 Toll (ACC68670.1)、斑节对虾 Toll (ABO38434.1)、日本囊对虾 Toll2 (BAG68890.1)、凡纳滨对虾 Toll (ABK58729.1)、凡纳滨对虾 Toll2 (AEK86516.1)、克氏原螯虾 Toll2 (AOP12928.1)、罗氏沼虾 Toll (AEI25533.1)、罗氏沼虾 Toll2 (AHL39101.1)、拟穴青蟹 Toll (AEX20238.1)、三疣梭子蟹 Toll1 (AIZ66853.1)、三疣梭子蟹 Toll2 (AKV62616.1)、三疣梭子蟹 Toll3 (AKV62617.1)、果蝇 Toll (AAQ64936.1)、果蝇 Toll18w (AAF57509.1)、果蝇 Toll3 (AAF86229.1)、果蝇 Toll4 (AAF52747.3)、果蝇 Toll5 (AAF86227.1)、果蝇 Toll7 (AAF86225.1)、果蝇 Toll9 (AAF51581.1)

GenBank accession number of different species: *PtToll4*, *P. trituberculatus* Toll4 (KY432366); *EsToll2*, *E. sinensis* Toll (AGK90305.1); *EsToll2*, *E. sinensis* Toll2 (AGT21374.1); *FcToll*, *F. chinensis* (ACC68670.1); *PmToll*, *P. monodon* (ABO38434.1); *MjToll2*, *M. japonicas* (BAG68890.1); *LvToll*, *L. vannamei* (ABK58729.1); *LvToll2*, *L. vannamei* (ABK58729.1); *PcToll2*, *P. clarkia* (AOP12928.1); *MrToll*, *M. rosenbergii* Toll (AEI25533.1); *MrToll2*, *M. rosenbergii* Toll2 (AHL39101.1); *SpToll* *S. paramamosain* (AEX20238.1); *PtToll1*, *P. trituberculatus* Toll1 (AIZ66853.1); *PtToll2*, *P. trituberculatus* Toll2 (AKV62616.1); *PtToll3*, *P. trituberculatus* Toll3 (AKV62617.1); *DmToll*, *D. melanogaster* Toll (AAQ64936.1); *DmToll18*, *D. melanogaster* Toll18 (AAF57509.1); *DmToll3*, *D. melanogaster* Toll (AAF86229.1); *DmToll4*, *D. melanogaster* Toll4 (AAF52747.3); *DmToll5*, *D. melanogaster* Toll5 (AAF86227.1); *DmToll7*, *D. melanogaster* Toll7 (AAF86225.1); *DmToll9*, *D. melanogaster* Toll9 (AAF51581.1)

(Schneider *et al.*, 2011), TLR2 能够直接识别脂蛋白和肽聚糖(Takeuchi *et al.*, 1999), TLR5 可直接识别细菌鞭毛(Ramos *et al.*, 2004), TLR9 可直接与未甲基化的细菌 CpG DNA 结合(Hemmi *et al.*, 2000)。 *PtToll4* 的 LRR 结构域含有 8 个 LRR 基序以及 2 个 LRRCT 帽子结构, 这种结构有利于包埋暴露的疏水性氨基酸残基, 从而使胞外结构更为稳定(Gay *et al.*, 2006; Bell *et al.*, 2005), 在分子相互作用中具有重要作用(Leulier *et al.*, 2008)。此外, *PtToll4* 的胞外区有 13 个潜在的糖基化位点, 这些位点在 TLRs 家族基因识别、结合病原相关分子模式中也起着重要作用(Zhang *et al.*, 2011)。

组织表达分布结果显示, *PtToll4* 基因在三疣梭子蟹各组织中均有不同程度的表达, 其中, 在血细胞中的表达量最高, 而血细胞在甲壳动物的免疫系统中具有重要作用(姚翠鸾等, 2006)。在本研究中, 选取

了副溶血弧菌和 WSSV 两种病原对三疣梭子蟹分别进行感染, 在感染的过程中发现, 伴随着感染时间的延长, 三疣梭子蟹出现了行动迟缓、不进食等现象。定量结果表明, 经副溶血弧菌感染后, *PtToll4* 基因在血细胞中表达上调并不显著, 而经 WSSV 感染后, *PtToll4* 在血细胞中被显著诱导表达, 其中, 在 6 h 的表达量最高, 约为对照组的 5 倍。而 Arts 等(2007)发现, 经 WSSV 感染后, 斑节对虾 *PmToll* 基因在组织中的表达量并无变化, 这也说明 TLRs 家族不同成员可能具有受体识别特异性。由此, 推断 *PtToll4* 基因作为模式识别受体可能参与了 WSSV 的特异识别。

已有研究表明, 盐度的变化可以影响甲壳动物的免疫能力, 如郑萍萍等(2010)发现, 盐度的变化会造成三疣梭子蟹中免疫因子的活性发生变化; Joseph 等(2007)发现, 低盐胁迫会使斑节对虾更容易被 WSSV

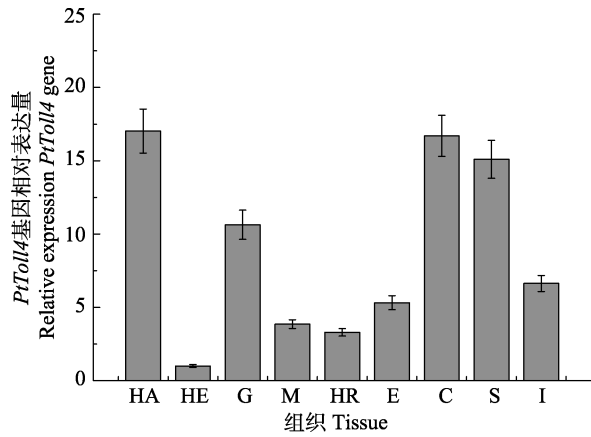


图 5 三疣梭子蟹 *PtToll4* 基因在不同组织中的表达分布  
Fig.5 The expression of *PtToll4* in different tissues of *P. trituberculatus*

HA: 血细胞; HE: 肝胰腺; G: 鳃; M: 肌肉;  
HR: 心脏; E: 眼柄; C: 表皮; S: 胃; I: 肠  
HA: Haemocytes; HE: Hepatopancreas; G: Gill; M: Muscle;  
HR: Heart; E: Eyestalk; C: Cuticle; S: Stomach; I: Intestines

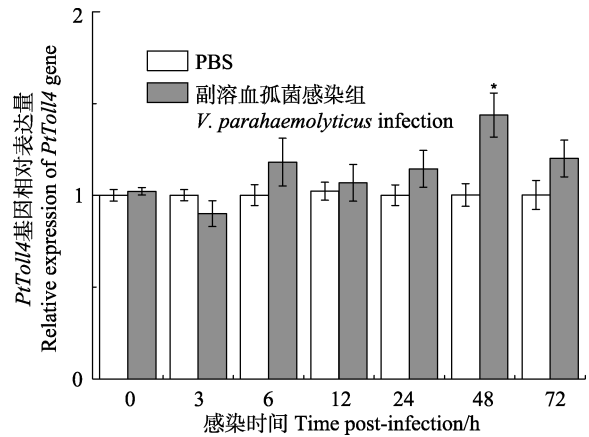


图 6 副溶血弧菌感染后三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因的表达  
Fig.6 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes after *V. parahaemolyticus* infection

\*代表  $P < 0.05$ , \*\*代表  $P < 0.01$ ; 下同  
\* at  $P < 0.05$ , and \*\* at  $P < 0.01$ ; the same applies below

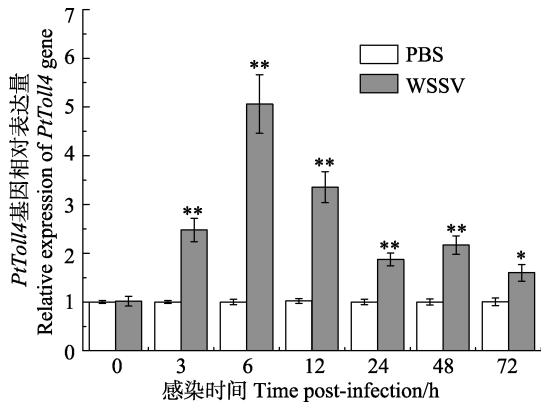


图 7 WSSV 感染后三疣梭子蟹血细胞中 *PtToll4* 基因的表达  
Fig.7 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes after WSSV infection

Fig.7 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes after WSSV infection

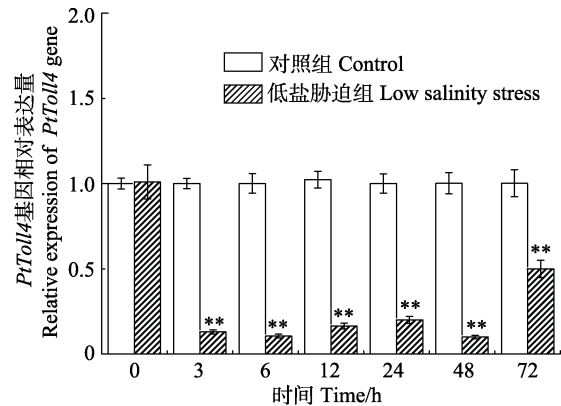


图 8 低盐胁迫后三疣梭子蟹 *PtToll4* 基因在血细胞中的表达  
Fig.8 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes under low salinity stress

Fig.8 The expression of *PtToll4* in *P. trituberculatus* hemocytes under low salinity stress

感染。为了探究低盐环境对 *PtToll4* 基因表达的影响, 本研究选择盐度为 11 的水体环境对三疣梭子蟹进行低盐胁迫。定量结果显示, 整个低盐胁迫的过程中, *PtToll4* 在血细胞中的表达量均为显著下降( $P < 0.01$ ), 但在 72 h 出现了较为明显的回升, 但仍显著低于对照组。在低盐状态下, 推测三疣梭子蟹 TLRs 等免疫相关基因的表达可能也会受到抑制, 从而影响识别外来病原的能力, 使得自身免疫能力下降, 导致死亡率增加。

综上所述, 可以确定 *PtToll4* 基因是三疣梭子蟹 TLRs 基因家族中的一位新成员。*PtToll4* 在三疣梭子蟹的各个组织中均能被检测到且在血细胞中的表达量最高。通过不同病原刺激后发现, *PtToll4* 可被 WSSV 显著诱导表达, 从而在宿主抵抗 WSSV 入侵感染的

过程中发挥一定的功能。此外, 低盐胁迫状态下, *PtToll4* 基因的表达受到了显著抑制, 可能间接影响了三疣梭子蟹的机体免疫能力, 这或许是低盐环境导致三疣梭子蟹等甲壳动物死亡率升高的一个重要因素。*PtToll4* 基因在抵御不同病原入侵时出现的表达量的差异还需要进一步的研究, 这些结果为进一步探究三疣梭子蟹 TLRs 家族基因对其先天免疫的影响提供了数据支持。

### 参 考 文 献

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, 406(6797): 782-787



- Arts JA, Cornelissen FH, Cijssouw T, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 504–513
- Assavalapsakul W, Panyim S. Molecular cloning and tissue distribution of the Toll receptor in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Genetics & Molecular Research*, 2012, 11(1): 484–493
- Bell JK, Botos I, Hall PR, *et al.* The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102(31): 181–200
- Bilak H, Tauszig-Delamasure S, Imler JL. Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31(3): 648–651
- Carty M, Bowie AG. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 2010, 161(3): 397–406
- Fu P, Lü JJ, Liu P, *et al.* Effects of different salinities on the free amino acids composition in the gill of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 122–126 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃中游离氨基酸含量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 122–126]
- Gao BQ, Liu P, Li J. Analysis of the growth and breeding value of *Portunus trituberculatus* ‘Huangxuan No.1’. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(1): 44–50 [高保全, 刘萍, 李健. 三疣梭子蟹‘黄选 1 号’生长和育种性能分析. *中国水产科学*, 2015, 22(1): 44–50]
- Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 76(1): 141–165
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408(6813): 740–745
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway Jr CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1997(284): 1313–1318
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 987–995
- Johnson GB, Brunn GJ. Evolutionary clues to the function of the toll-like family as surveillance receptors. *Trends in Immunology*, 2003, 24(1): 19–24
- Joseph A, Philip R. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*, 2007, 272(1–4): 87–97
- Lan JF, Zhao LJ, Wei S, *et al.* *PcToll2* positively regulates the expression of antimicrobial peptides by promoting *PcATF4* translocation into the nucleus. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 59–66
- Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors: Taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(3): 165–178
- Liu Y, Shi G, Cui Z, *et al.* *PtSerpin* from the swimming crab *Portunus trituberculatus*, a putative regulator of prophenoloxidase activation with antibacterial activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 365–371
- 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
- Ng A, Xavier RJ. Leucine-rich repeat (LRR) proteins: Integrators of pattern recognition and signaling in immunity. *Autophagy*, 2011, 7(9): 1082–1084
- Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, *et al.* A dorsal-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*, 1980(283): 474–476
- Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(11): 509–517
- Schneider DS, Hudson KL, Lin TY, *et al.* Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development*, 1991, 5(5): 797–807
- Srisuk C, Longyant S, Senapin S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a Toll receptor gene from *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(2): 552–562
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999, 11(4): 443–451
- Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008, 183(183): 1–20
- Wang L, Pan LQ. A study on penetration physiological adaptation of *P. trituberculatus* under low salinity. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(3): 106–112 [王林, 潘鲁青. 三疣梭子蟹在低盐胁迫下渗透生理适应性的研究. *海洋湖沼通报*, 2016(3): 106–112]
- Wang ZF, Wang ZZ, Xu WJ, *et al.* Quantitative study of lethal effect of WSSV on *Portunus trituberculatus* from mixture culture ponds of prawns and crabs. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2008, 39(2): 184–189 [王忠发, 王志铮, 许文军, 等. 虾蟹混养塘中 WSSV 对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)致死效应的定量研究. *海洋与湖沼*, 2008, 39(2): 184–189]
- Xue JZ, Du NS, Lai W, *et al.* A review of studies on *Portunus trituberculatus* in China. *Donghai Marine Science*, 1997, 15(4): 60–65 [薛俊增, 堵南山, 赖伟, 等. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究. *东海海洋*, 1997, 15(4): 60–65]
- Yan BL, Qing GM, Bao ZH, *et al.* Isolation and identification of

- Vibrio parahaemolyticus* from diseased *Portunus trituberculatus* L. Marine Science Bulletin, 2010, 29(5): 560–566 [阎斌伦, 秦国民, 暴增海, 等. 三疣梭子蟹病原副溶血弧菌的分离与鉴定. 海洋通报, 2010, 29(5): 560–566]
- Yang LS, Yin ZX, Liao JX, *et al.* A Toll receptor in shrimp. Molecular Immunology, 2007, 44(8): 1999–2008
- Yao CL, Wang ZY, Xiang JH. Crustacean haemocytes and their function in immune responses. Zoological Research, 2006, 27(5): 549–557 [姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能. 动物学研究, 2006, 27(5): 549–557]
- Yu AQ, Jin XK, Guo XN, *et al.* Two novel Toll genes (*EsToll1* and *EsToll2*) from *Eriocheir sinensis* are differentially induced by lipopolysaccharide, peptidoglycan and zymosan. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(4): 1282–1292
- Zhang L, Li L, Zhang G. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 653–660
- Zheng PP, Wang CL, Song WW, *et al.* Effect of salinity stress on serum nonspecific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fisheries Science, 2010, 29(11): 634–638 [郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响. 水产科学, 2010, 29(11): 634–638]
- Zhou SM, Yuan XM, Liu S, *et al.* Three novel Toll genes (*PtToll1-3*) identified from a marine crab, *Portunus trituberculatus*: Different tissue expression and response to pathogens. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 737–744

(编辑 冯小花)

## Cloning of *Toll4* in *Portunus trituberculatus* and Its Expression in Responding to Pathogenic Infection and Low Salinity Stress

ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, LÜ Jianjian<sup>2,3</sup>, LIU Ping<sup>2,3</sup>①, LI Jian<sup>2,3</sup>, WANG Zhuqing<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaohui<sup>1,2</sup>

(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** *Portunus trituberculatus*, an economically important food species in China, lacks adaptive immunity and can induce effective immune responses to resist pathogen via innate immunity. Toll-like receptors as pattern recognition receptors (PRRs) play crucial role in innate immune responses. The current study found a novel Toll gene named as *PtToll4* from *P. trituberculatus* by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The full-length cDNA of *PtToll4* was 4276 bp, which contains an open reading frame (ORF) of 2685 bp, a 3' untranslated region (UTR) of 1252 bp, and a 5' UTR of 339 bp. The ORF encoded a polypeptide of 895 amino acids with a predicted molecular weight of 102.5 kDa. *PtToll4* is a transmembrane protein that contains several common structural domains of TLRs, such as LRR, LRRCT motif in the extracellular domain and a TIR domain in the intracellular region. The BLAST analysis showed that *PtToll4* shared the highest homology with *Eriocheir sinensis* Toll2. *PtToll4* was widely expressed in hemocyte, heart, gill, hepatopancreas, stomach, intestine, muscle, cuticle, and eyestalk, and mainly distributed in the hemocyte and cuticle. A weak expression level was detected in the hepatopancreas. WSSV infection significantly induced *PtToll4* expression in hemocyte at 6 h, and *V. parahemolyticus* infection had a little effect on it only at 48 h. Low salinity reduced *PtToll4* expression. Our results suggested that *PtToll4* may play an important role in innate immune of *P. trituberculatus* and would provide useful information for the research of immunity regulation in crustaceans.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; *PtToll4*; Gene cloning; Innate immune; Expression analysis

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170201001

http://www.ykxjz.cn/

赵莲, 李志辉, 张培, 薛蓓, 赖晓芳, 张庆起, 高焕, 阎斌伦. 三疣梭子蟹线粒体基因组 SNP 在增殖放流家系识别中的应用. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 156-163

Zhao L, Li ZH, Zhang P, Xue B, Lai XF, Zhang QQ, Gao H, Yan BL. Identification on stock enhancement pedigrees of the swimming blue crab *Portunus trituberculatus* using mtDNA SNPs. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 156-163

## 三疣梭子蟹线粒体基因组 SNP 在增殖放流家系识别中的应用\*



赵 莲<sup>1,2,3</sup> 李志辉<sup>1,2,3</sup> 张 培<sup>1,2,3</sup> 薛 蓓<sup>1,2,3</sup> 赖晓芳<sup>1,2,3</sup>  
张庆起<sup>4</sup> 高 焕<sup>1,2,3</sup> 阎斌伦<sup>1,2,3①</sup>

- (1. 淮海工学院海洋生命与水产业学院 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005;  
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台南京 210014;  
4. 连云港赣榆佳信水产开发有限公司 连云港 222005)

**摘要** 为开发三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)增殖放流分子标志技术, 本研究在前期获得三疣梭子蟹线粒体基因组 24 个 SNP 位点的基础上, 采用高分辨率溶解曲线(HRM)检测技术对 4 个用于增殖放流的家系(A、B、C 和 D) (代表约 80~120 万个放流个体)进行了鉴别工作。结果显示, 含有 SNP 位点的 22 条 PCR 扩增序列中, 有 9 条 SNP 位点扩增产物在亲代(母本)及其子代的 28 个个体之间具有基本一致的溶解峰, 且子代个体间  $T_m$  的均一性较好, 无明显差异; 进一步以序列已知的野生型及其突变体作为同一 SNP 引物扩增片段, 在各家系间分析 HRM 标准曲线, 这 9 个 SNP 可以成功用于三疣梭子蟹 4 个放流家系的鉴别。在这 9 个 SNP 位点中, 可鉴定 C 家系的有 5 个, 可鉴定 B 家系的有 2 个, 可鉴定 A、D 家系的各 1 个。该研究结果为三疣梭子蟹种质资源的鉴定及标志放流工作的开展提供了技术支持。

**关键词** 三疣梭子蟹; 增殖放流; 分子标志; SNP; HRM

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0156-08

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的海捕经济蟹类, 但随着过度捕捞, 野生海捕资源迅速下降, 年产量已经由 1996 年的 5.9 万 t 迅速下降至 2001 年的 1.1 万 t (Yang *et al.*, 2005)。为了恢复野生海捕资源, 我国近年来展开了大量的增殖放流活动, 2004~2006 年先后在长江口、杭州湾海域共计人工增殖放流三疣梭子蟹苗种 1576 亿只(沈新强等, 2007);

截至 2013 年, 山东省累计放流二期幼蟹 18.85 亿只(庞景贵等, 2009; Zhang *et al.*, 2009; 杨爽等, 2014), 有效缓解了三疣梭子蟹种质资源的衰退。随着放流活动的持续开展及不断扩大, 如何评估放流效果的问题也摆在了我们面前。作为甲壳类生物, 三疣梭子蟹的一生需要多次蜕壳, 这就大大限制了很多外部和内部物理形态标记的应用, 因此, 需要探索新型放流标志

\* 国家自然科学基金(31472282)、江苏省高校自然科学研究重大项目(13KJA240001)和江苏省“六大人才高峰”创新团队项目(2016-HYGC-CXTD-004)共同资助 [This work was supported by the National Science Foundation (31472282), Key University Science Research Project of Jiangsu Province (13KJA240001), and Projects of “Six-Talent Summit” Innovative Talent Team of Jiangsu (2016-HYGC-CXTD-004)]. 赵 莲, E-mail: zhaolialice@163.com

① 通讯作者: 阎斌伦, 教授, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

收稿日期: 2017-02-01, 收修改稿日期: 2017-02-27

技术。同时,在放流过程中,放流个体对野生资源的种质有何影响,即对自然状态下三疣梭子蟹的遗传多样性和群体遗传结构有何影响,也亟待解答。而解决以上这些问题的最佳途径是开发三疣梭子蟹增殖放流效果评估的分子标志技术。

随着三疣梭子蟹线粒体全基因组的公布(Yamauchi *et al.*, 2003),基于线粒体 DNA 的标记技术已广泛用于三疣梭子蟹群体的遗传多样性及遗传结构分析(蔡珊珊, 2015; 王景等, 2015; 杨爽等, 2014)。与核 DNA 相比, mtDNA 具有分子小、结构简单、进化速度快、不同区域进化速度存在差异等特点,是一个相对独立的复制单位(李喜莲, 2007)。借助线粒体 DNA 具有母性遗传的特点,通过此标记很容易追踪同一母本所产生子代个体的去向,因此,非常适合作为增殖放流标志。这些优点决定了线粒体序列多态性标记技术是最适合三疣梭子蟹增殖放流效果评估的分子标志技术。

作为第三代分子标记的典型代表,单核苷酸多态性标记(Single nucleotide polymorphism, SNP)不仅具有微卫星标记易于分型的优势,而且更容易实现高通量分型,大大提高了分型效率(Beacham *et al.*, 2009)。目前,基于核基因组的 SNP 标记已被广泛应用,如遗传图谱的构建(张建勇, 2011)、种质资源遗传分析(Zhang *et al.*, 2011; Batta-Lona *et al.*, 2011)以及分子标记辅助育种(Feng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013; Blanck *et al.*, 2013)等,而在线粒体基因组中 SNP 的开发及其应用研究上还相对较少。本研究通过 HRM 检测技术对三疣梭子蟹线粒体 DNA 上的 SNP 进行分型,以达到快速、准确鉴别不同放流家系的目的,为三疣梭子蟹种质资源的鉴定及标志放流工作的开展提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 家系材料及 DNA 提取

本实验所用家系材料取自江苏连云港赣榆佳信水产开发有限公司,为 2016 年用于江苏省连云港海州湾增殖放流活动的 4 个家系,代表 80~120 万只放流三疣梭子蟹个体。每个家系获得母本个体各 1 只,子代个体分别取 28 只,4 个家系的亲本来源于海州湾海捕群体,为野生抱卵亲蟹,亲蟹繁育分别在 4 个繁育池中进行,子代个体之间无混杂。4 个家系编号分别为 A、B、C 和 D。

分别选取上述亲本和相应子代个体的肌肉组织,用液氮进行研磨,使用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取

三疣梭子蟹总基因组 DNA(其中包含线粒体基因组 DNA),经 Gene Quant Pro 核酸定量仪(通用公司,美国)测定基因组 DNA 浓度,并均一化为 20 ng/ $\mu$ l,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 标准品的制备

针对前期已发现的 SNPs(表 1),同一对 SNP 引物在不同野生个体间进行扩增,并将扩增序列送去测序比对分析,确认个体间所对应的同一片段是否发生突变与未突变情况,进而将同一 SNP 扩增引物对应的未突变与突变体,在 HRM 中进行 SNP 的分型验证,为已获得的 SNP 标记在后续应用于 4 个家系群体的鉴定作标准参照。

### 1.3 SNP 在家系间的 HRM 分型

利用已获得的标准品(野生/突变体) HRM 分型结果,将对应 SNP 引物在每个家系的 28 只三疣梭子蟹子代个体中进行 PCR 反应,扩增体系为 35  $\mu$ l: 25.3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 3.5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2.0  $\mu$ l 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.6  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L dNTPs, 0.6  $\mu$ l 5 U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶,各 1.2  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 上下游引物, 0.6  $\mu$ l 20 ng/ $\mu$ l DNA 单个体模板。采用温度梯度 PCR 程序进行引物的扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s,  $T_m$  45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  45 s, 循环 34 次; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

反应结束后,向 35  $\mu$ l PCR 产物中加入高低温内标各 3.5  $\mu$ l,随后按照“95 $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min, 25 $^{\circ}\text{C}$  复性 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存”的程序在 PCR 仪上进行变性反应。变性结束后,取扩增样 10  $\mu$ l 加入 96 孔反应板中,同时加入 1  $\mu$ l LC Green 荧光染料,并以 15~20  $\mu$ l 矿物油进行封闭。每个扩增样品设置 3 个重复。在 Light Scanner 96 系统上进行 HRM 分析,反应结束后对熔解曲线进行分析并记录  $T_m$ 。

## 2 结果

### 2.1 标准品的分型情况

通过 HRM 技术对野生个体及突变个体在 22 条含有 24 个 SNP 位点的同一 SNP 引物进行扩增,并进行分型分析。结果显示,每一对标准品(野生体/突变体)在同一 SNP 引物扩增序列中具有明显的差异峰,即  $T_m$  值差异明显,详见表 1 及图 1a, b~图 4a, b。

### 2.2 SNP 位点在同一家系中的分型情况

从三疣梭子蟹线粒体基因组共得到 24 个具有 SNP 的位点(表 1)。利用 HRM 技术,对这些 SNP 位点在各个家系中的分型情况进行了研究,结果显示,

表 1 SNPs 引物扩增序列在 HRM 分析中的信息  
Tab.1 Ampliconic sequences of SNPs used in HRM

引物 编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence	产物长度 Product size (bp)	突变类型 Mutation type	$T_m$ (°C)				
				标准品 (野生/突变) Standard substance (wild/mutant)	A	B	C	D
3	ATAAGAATAGACCAAATACCACT AGTAATAGCTCCTGCCAGAAC	96	C/G	78.84/78.50	79.02	78.87	78.44	79.16
9	ATTTTATCTACAGAGCGTTTG GTAGCTGTAATCACTATAATCGT	112	A/G	75.98/76.42	75.84	75.92	76.57	75.88
11	ATTATCACCATTGGAACA GTTTACAAGACCAAAGTTTT	87	T/C	77.60/77.82	75.11	77.85	75.10	75.08
12	CCGCTCATATTCAGCCAGA CGGAAGCAACAAGAGCAAT	99	G/A	79.94/79.73	79.89	79.68	79.74	79.80
13	ATTCTACATGGCCTTCTTC GAGTGGAGGATTTGCTTT	102	C/T	75.40/75.05	76.58	75.02	76.30	75.20
15	GGCAACACTCCGAAGTCT TTGTTTGGGAATGGGAGT	91	T/A	76.87/76.83	76.90	76.48	76.25	76.82
16	CCATTCCCAACAACAGA ACTTAGGTTATTCTTATCTTTGC	107	A/G	77.70/78.02	78.04	77.52	77.48	77.61
20	CTTTTTAGTGACCTTTCCAAT GCTCCAAATCAAGAAGTCG	96	C/T	77.68/77.20	76.22	78.29	77.24	77.90
21	TTAATCATATCCGCCTCAAT GGGCGAGCACCTAGTTTT	92	G/A	79.04/78.54	79.02	79.18	78.34	79.10

9 个 SNP 位点在亲代(母本)及其子代的 28 个个体之间具有基本一致的熔解峰,且子代个体间  $T_m$  的均一性较好,无明显差异,详见表 1。

### 2.3 SNP 在 4 个家系中的 HRM 分型结果

以序列已知的野生型及其突变体作为同一 SNP 引物扩增片段在各家系间分析 HRM 的标准品,通过对含有 SNP 位点引物的扩增产物进行 HRM 分析,结果发现,在已知的线粒体基因组 24 个 SNP 位点中(22 对引物),有 9 个 SNPs 可以用于三疣梭子蟹 4 个放流家系的鉴别。对相同序列的同一家系的 28 个个体扩增片段的熔解峰所对应  $T_m$  值取平均值,得出不同变异类型的位点相应扩增产物的  $T_m$  值(表 1),与标准品中的突变体  $T_m$  相比较,各家系都有较为稳定且明显的分型效果。

通过比较各引物所对应的标准品及与家系分型后的  $T_m$  差异,均可用于三疣梭子蟹种质鉴定。其中,引物 3、9、12、20、21,这 5 对引物可用于鉴别 C 家系(以引物 9 的 SNP 分型结果为例,见图 1);引物 11 和 13 可用于鉴别 B 家系(以引物 13 的 SNP 分型结果为例,见图 2);引物 15 分别可用于鉴别 D (以引物

15 的 SNP 分型结果为例,见图 3)、A 家系(以引物 16 的 SNP 分型结果为例,见图 4)。

图 1 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异( $T_m > 0.3^\circ\text{C}$ );经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中 C 家系的 HRM 峰型与突变型(G)的峰型重叠,而其他 3 个家系(A、B 和 D)的熔解曲线峰与野生型(A)的峰型重叠,表明针对引物 9 扩增的 SNP 序列在 C 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有明显的不同,进而可用于 C 家系的鉴别。

图 2 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异( $T_m > 0.3^\circ\text{C}$ );经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中, B 家系的 HRM 峰型与突变型(T)的峰型重叠,而其他 3 个家系(A、C 和 D)的熔解曲线峰与野生型(C)的峰型重叠,表明针对引物 13 扩增的 SNP 序列在 B 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有着明显的不同,进而可用于 B 家系的鉴别。

图 3 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异( $T_m > 0.3^\circ\text{C}$ );经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中,

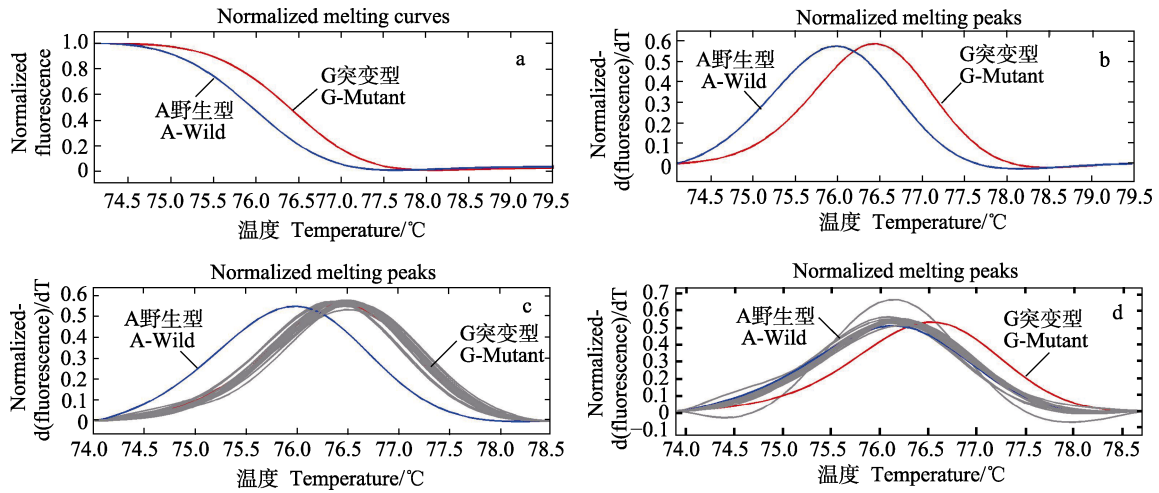


图 1 引物 9 扩增序列在 C 家系(A/G 突变型)中的 SNP 分型结果

Fig.1 SNP typing in the pedigree C for the 9th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰, 其中, 红色曲线代表突变型(G), 蓝色曲线代表野生型(A), 灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (G) was denoted by red, wild type (A) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

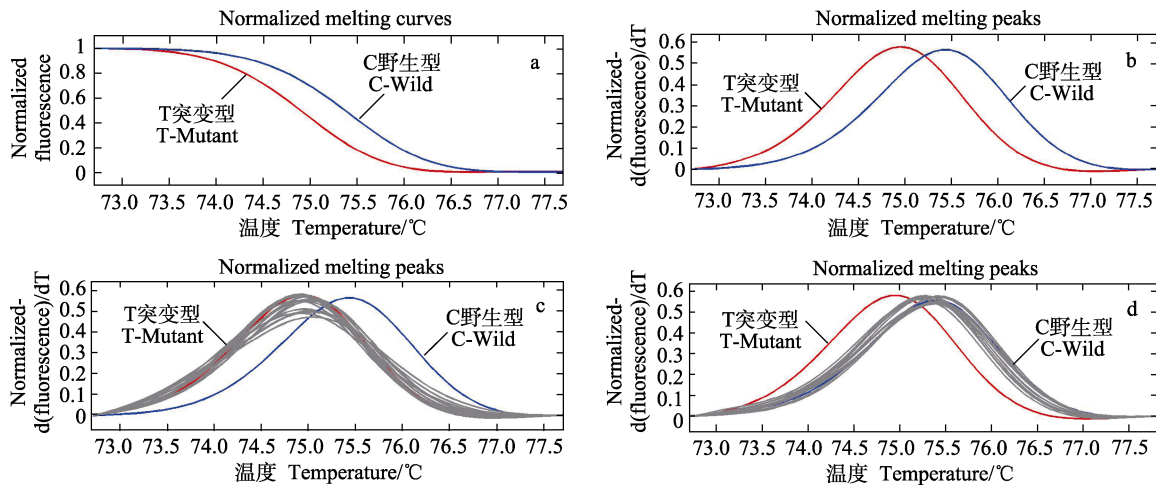


图 2 引物 13 扩增序列在 B 家系(C/T 突变型)中的 SNP 分型结果

Fig.2 SNP typing in the pedigree B for the 13th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰, 其中, 红色曲线代表突变型(T), 蓝色曲线代表野生型(C), 灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (T) was denoted by red, wild type (C) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

D 家系的 HRM 峰型与突变型(A)的峰型重叠, 而其他 3 个家系(A、B 和 C)的熔解曲线峰与野生型(T)的峰型重叠, 表明针对引物 15 扩增的 SNP 序列在 D 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有着明显的不同, 进而可用于 D 家系的鉴别。

图 4 显示, 野生型与突变型的熔解曲线有明显差异( $T_m > 0.3^\circ\text{C}$ ); 经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d), 其中,

A 家系的 HRM 峰型与突变型(G)的峰型重叠, 而其他 3 个家系(B、C 和 D)的熔解曲线峰与野生型(A)的峰型重叠, 表明针对引物 16 扩增的 SNP 序列在 D 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有着明显的不同, 进而可用于 A 家系的鉴别。

### 3 讨论

日本学者在 2004 年就针对三疣梭子蟹的增殖放



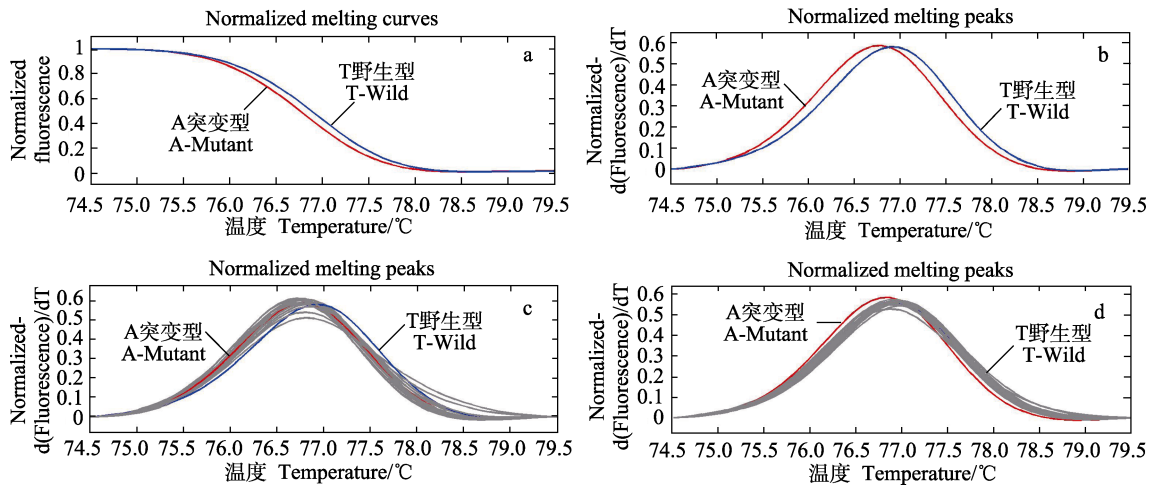


图 3 引物 15 扩增序列在 D 家系(T/A 突变型)中的 SNP 分型结果

Fig.3 SNP typing in the pedigree D for the 15th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰，其中。红色曲线代表突变型(A)，蓝色曲线代表野生型(T)，灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (A) was denoted by red, wild type (T) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

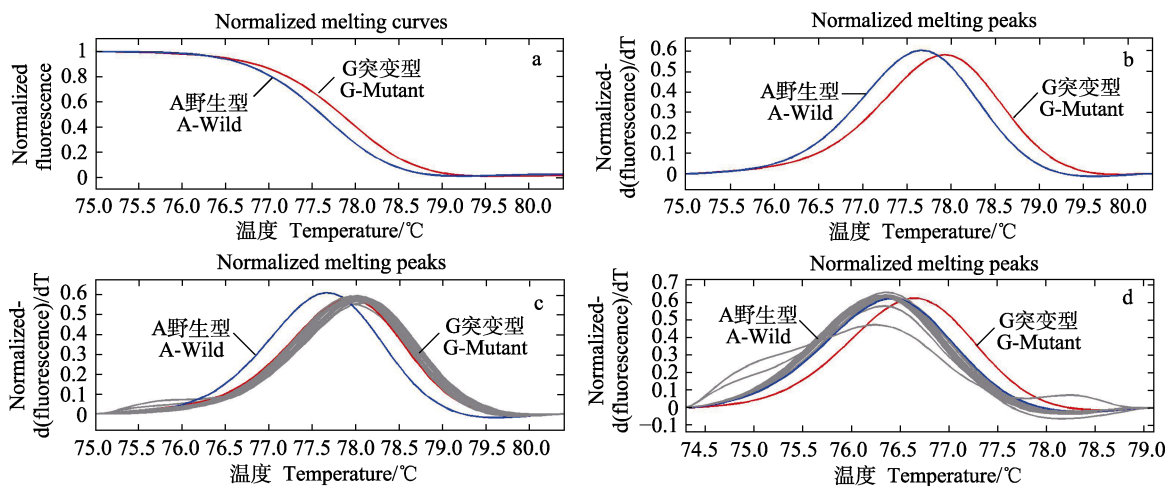


图 4 引物 16 扩增序列在 A 家系(A/G 突变型)中的 SNP 分型结果

Fig.4 SNP typing in the pedigree A for the 16th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰，其中，红色曲线代表突变型(G)，蓝色曲线代表野生型(A)，灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (G) was denoted by red, wild type (A) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

流标记技术进行了研究，所使用的技术为金属线码外部标记(Okamoto, 2004); 后续又有学者比较分析 3 种外部标记(体外绑定标记、身体锚定标记及体内植入金属针绑定标记)技术在龙虾(*Jasus verreauxi*)的标志放流中的应用(Montgomery *et al*, 2006), 但这些技术应用在三疣梭子蟹这一类甲壳动物身上的效果并不理想, 其原因在于: 一方面三疣梭子蟹在生长发育过程中需要经历多次蜕壳, 影响了外部标记的准确性;

另一方面外部标记对被标记对象的身体存在一定的损伤, 不仅影响其后续的生长发育, 也会降低其在放流过程中的存活率。为此, 我们进行了无任何损失的分子标志放流技术研究, 而理论上三疣梭子蟹也是非常适合作为研究分子标志放流技术的对象: 三疣梭子蟹具有产卵量大的优点, 一只母蟹可产 20~30 万只幼蟹, 因此, 若知道母本的分子标志特征, 则易获得子代个体的遗传特征, 这就大大缩减了在大量亲蟹间或

群体间寻找特异分子标记的工作量。以海州湾三疣梭子蟹增殖放流活动为例,每年在海州湾区域放流三疣梭子蟹的数量约为 600 万只(董志国等, 2013), 这只相当于 20~30 个家系(20~30 个亲本)所产生的子代个体数量。本研究获得的在 4 个家系中存在差异的 9 个 SNP 标记中,实际只需要其中的 4 个就可以把 4 个放流家系进行准确鉴别,由此初步推断,鉴别 20~30 个家系所需 SNP 标记的数量也只需要 20~30 个,甚至更少。张超(2014)利用 HRM 技术开发出的 7 个 SNP 位点,成功用于中华鳖(*Trionyx sinensis*)不同品系的鉴别;Zhang 等(2009)甚至利用 SNPs 中的 2 个突变位点就可将中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)与合浦绒螯蟹(*Eriocheir hepensis*)鉴别开来。此外,由于线粒体基因组是单倍型,其上的 SNP 标记对鉴别增殖放流个体要比以往利用核基因组中的微卫星和 SNP 标记的研究(刘海映等, 2016; 李喜莲等, 2016)更有效率。因此,本研究利用线粒体基因组 SNP 标记作为增殖放流的分子标志技术是可行的,简单、高效,如配以 HRM 技术,则更具有高通量分析的特点。

高分辨率熔解曲线(HRM)分型技术具有高通量、高灵敏度以及特异性强等优点。目前已被成功用于水产生物的多态性检测(吴莹莹, 2013)、种质资源的鉴定(张超, 2014)等方面。因此,根据以上 HRM SNP 分型技术在种质资源鉴定的基础上,为了增加其分型技术的可信度,本研究利用测序已知分型样品(野生型/突变型)作为标准品,与每个放流家系群体进行 HRM 比较分析,结果显示,每对 SNP 引物的扩增样品所对应的标准品与家系个体间的 PCR 产物熔解峰相重叠(图 1~图 4),且各家系内的  $T_m$  均一性也显示良好,表明此方法提高了 SNP 分型的准确性,可用于三疣梭子蟹种质资源鉴定方面的研究。

从实验材料的选取上可以看出,本研究并未选取父本材料,这是因为本研究的目的之一就是希望忽略父本遗传材料的背景下,可以对放流群体进行鉴定。其主要原因在于:一方面实际放流过程中三疣梭子蟹是由各个企业自主繁育蟹苗进行放流的,亲本往往来源于野生抱卵蟹,无法准确获得父本信息;另一方面本研究采用的线粒体基因标记在解决增殖放流标记上也不需要父本的遗传信息,这是由线粒体 DNA 母系遗传的特点决定的。线粒体 DNA 属于细胞核外遗传物质,线粒体 DNA 只通过母亲遗传给子代个体(Spuhle, 1988),因此,该标记非常适用于包括三疣梭子蟹在内的各种生物的增殖放流分子标志研究,只要找出不同家系母本间线粒体 DNA 上的特异性 SNP 标记,即可对不同家系群体进行鉴定,而不需要父本材

料的相关信息。与核 DNA 相比,线粒体 DNA 无重组杂合的现象,不会出现因杂合产生的熔解曲线的双峰(李纪勤等, 2013),因此,较核基因 SNP 分型相比,线粒体 SNP 的 HRM 分型结果更直观明了。

总之,本研究所建立的不同放流家系三疣梭子蟹的线粒体特异性 SNP HRM 分型方法可有效鉴别用于增殖放流的不同家系群体,此方法弥补了形态、生化等传统标记方法鉴别的不准确性,并为后续的放流标志工作的展开提供技术支持。

## 参 考 文 献

- Blanck DV, Valenti WC, Freitas PDD, *et al.* Isolation and characterization of SNPs within HSC70 gene in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(3): 631–633
- Batta-Lona PG, Bucklin A, Wiebe PH, *et al.* Population genetic variation of the Southern Ocean krill, *Euphausia superba*, in the Western Antarctic Peninsula region based on mitochondrial single nucleotide polymorphisms (SNPs). Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2011, 58(13): 1652–1661
- Beacham TD, Jonsen K, Wallace C. A comparison of stock and individual identification for *Chinook salmon* in British Columbia provided by microsatellites and single-nucleotide polymorphisms. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 2009, 67(1): 1274–1290
- Cai SS. Evaluation of stock enhancement in *Portunus trituberculatus* and *Fenneropenaeus chinensis* based on molecular markers. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [蔡珊珊. 基于分子标记的三疣梭子蟹和中国对虾增殖放流效果研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Dong ZG, Li XY, Zhang QI, *et al.* Genetic impact of swimming crab *Portunus trituberculatus* farming on wild genetic resources in Haizhou Bay. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(23): 7332–7339 [董志国, 李晓英, 张庆起, 等. 三疣梭子蟹增养殖过程对野生种群的遗传影响——以海州湾为例. 生态学报, 2013, 33(23): 7332–7339]
- Feng N, Ma H, Ma C, *et al.* Characterization of 40 single nucleotide polymorphism (SNP) via Tm-shift assay in the mud crab (*Scylla paramamosain*). Molecular Biology Reports, 2014, 41(8): 5467–5471
- Li JQ, Bao ZM, Li L, *et al.* The development and polymorphism analysis of EST-SNP in *Chlamys (Azumapecten) farreri*. Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition), 2013, 43(1): 56–63 [李纪勤, 包振民, 李玲, 等. 栉孔扇贝 EST-SNP 标记开发及多态性分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(1): 56–63]
- Liu HY, Lü HB, Cui F, *et al.* Parental contribution and genetic

- diversity between broodstock and offsprings in *Portunus trituberculatus* releasing into natural waters. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 35(6): 614–619 [刘海映, 吕海波, 崔帆, 等. 放流三疣梭子蟹遗传多样性和贡献率初步研究. *水产科学*, 2016, 35(6): 614–619]
- Li XL. The polymorphism of mitochondrial DNA of *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Northwest A&F University, 2007 [李喜莲. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 多态性研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Li XL, Yang YJ, Li F, *et al.* Development of single nucleotide polymorphism markers for *Macrobrachium nipponensis* using expressed sequence tags. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(2): 67–73 [李喜莲, 杨元杰, 李飞, 等. 日本沼虾 EST-SNP 的筛选及多态性检测. *东北农业大学学报*, 2016, 47(2): 67–73]
- Montgomery SS, Brett PA. Tagging eastern rock lobsters *Jasus verreauxi*: Effectiveness of several types of tag. *Fisheries Research*, 2006, 27(4): 141–152
- Okamoto K. Juvenile release and market size recapture of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Miers) marked with coded wire tags. In: Leber KM, Kitada S, Blankenship HL, Svasand T (eds). *Stock enhancement and sea ranching: Development, pitfalls and opportunities (Second Edition)*. Blackwell, Oxford, 2004, 181–186
- Pang JG, Guo JL. Significant enhancement effect on fishing of the Huanghai and Bohai Seas. *Hebei Fisheries*, 2009(1): 34–35 [庞景贵, 郭金龙. 黄渤海放流增殖恢复捕捞渔业效果显著. *河北渔业*, 2009(1): 34–35]
- Spuhle JN. Evolution of mitochondrial DNA in monkeys, apes, and humans. *American Journal of Physical Anthropology*, 1988, 31(Suppl): 15–48
- Shen XQ, Zhou YD. Enhancement releasing and evolution of fishery resources in the Yangtze estuary and Hangzhou Bay sea area. *Fishery Modernization*, 2007, 34(4): 54–57 [沈新强, 周永东. 长江口、杭州湾域渔业资源增殖放流与效果评估. *渔业现代化*, 2007, 34(4): 54–57]
- Wang J, Zhang FY, Jang KJ, *et al.* Genetic diversity of *Portunus trituberculatus* based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence from the East China Sea. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 114–121 [王景, 张凤英, 蒋科技, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的三疣梭子蟹东海区群体遗传多样性分析. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 114–121]
- Wu YY, Meng XH, Kong J, *et al.* Application of unlabeled probe by HRM in development of EST-SNPs in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 111–118 [吴莹莹, 孟宪红, 孔杰, 等. 非标记探针 HRM 法在中国对虾 EST-SNP 筛选中的应用. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 111–118]
- Yang F, Xu HT, Dai ZM, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2005, 142(4): 456–464
- Yamauchi MM, Miya MU, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene*, 2003, 311: 129–135
- Yang S, Song N, Zhang XM, *et al.* Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four broodstock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1089–1096 [杨爽, 宋娜, 张秀梅, 等. 基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性研究. *水产学报*, 2014, 38(8): 1089–1096]
- Yang Y, Ye H, Huang H, *et al.* Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18(4): 475–482
- Zhang C, Zhang HQ, Xu XJ, *et al.* Identification of different strains of *Pelodiscus sinensys* by using high resolution melting(HRM) analysis of SNPs in mitochondrial DNA. *Oceanological et Limnological Sinica*, 2014, 45(2): 376–381 [张超, 张海琪, 许晓军, 等. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同品系线粒体 SNP 的分型与鉴定. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 376–381]
- Zhang D, Tang B, Ding G, *et al.* Molecular authentication of the fashionable dainty *Eriocheir japonica sinensis* based on mitochondrial DNA bar coding. *European Food Research and Technology*, 2009, 230(1): 173–178
- Zhang JY. Development and application of SNP markers in genome of *Fenneropenaeus chinensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [张建勇. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组 SNP 标记的开发与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]

(编辑 冯小花)

## Identification on Stock Enhancement Pedigrees of the Swimming Blue Crab *Portunus trituberculatus* Using mtDNA SNPs

ZHAO Lian<sup>1,2,3</sup>, LI ZhiHui<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Pei<sup>1,2,3</sup>, XUE Bei<sup>1,2,3</sup>, LAI Xiaofang<sup>1,2,3</sup>,  
ZHANG Qingqi<sup>4</sup>, GAO Huan<sup>1,2,3</sup>, YAN Binlun<sup>1,2,3</sup>①

(1. College of Fisheries and Life Science, Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang 222005; 3. Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014; 4. Lianyungang Ganyu Jiaxin Aquaculture Exploitation Ltd, Lianyungang 222005)

**Abstract** The wild population of *Portunus trituberculatus*, an important economical species in China, has been dramatically decreased in past decades due to over capturing. To recover wild germplasm resources of *P. trituberculatus*, the activities of stock enhancement were performed, and the released individuals were about six millions each year in Haizhou Bay of Jiangsu Province. To evaluate the effects of stock enhancement, we utilized molecular markers (mtDNA SNPs) to track the released pedigrees of *P. trituberculatus*. Previous studies identified 22 SNPs of mtDNA from *P. trituberculatus*, which were used to trace four released families (on behalf of 0.8~1.2 million released individuals) (A, B, C and D) by HRM (High resolution melt) technology. Nine of 22 SNPs were usable, which resolution melt curve were coincident between female parentages and their offspring. Furthermore, the nine SNPs could be used to distinguish the four families, in which the parentage C, B, A and D could be differentiated by 5, 2, 1 and 1 SNPs, respectively. Our results indicate that the mtDNA SNPs, combined HRM technology, is a wonderful technology to evaluate the effects of stock enhancement of *P. trituberculatus*.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; Stock enhancement; Molecular marker; SNP; HRM

① Corresponding author: YAN Binlun, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170103002

http://www.yykxjz.cn/

瞿俊跃, 李建华, 陈芑, 陈新军, 靳楠. 西非沿岸乌贼角质颚形态及生长特征. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 164–170  
Qu JY, LI JH, Chen P, Chen XJ, Jin N. The morphology and growth characteristics of beaks of European common cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the coast of West Africa. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 164–170

## 西非沿岸乌贼角质颚形态及生长特征\*



瞿俊跃<sup>1</sup> 李建华<sup>1,2,3①</sup> 陈 芑<sup>1</sup> 陈新军<sup>1,2,3</sup> 靳 楠<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 国家远洋渔业工程技术研究中心 上海 201306;  
3. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 上海 201306)

**摘要** 乌贼(*Sepia officinalis*)是生活在大西洋西岸的重要头足类之一,研究乌贼角质颚形态及生长特征有利于对其的开发利用。本研究根据 2015 年在毛里塔尼亚附近海域生产期间所获得的乌贼渔获样本,对乌贼角质颚的各项形态参数进行描述,探究不同胴长和不同性腺成熟阶段角质颚生长情况的差异,并估算乌贼个体的大小。通过对乌贼上、下颚各长度指标的比值比较发现,乌贼角质颚下颚的长度比值波动较大,较不稳定。 $t$  检验表明,将各项形态参数除以胴长消除样本规格影响差异后,乌贼雌性个体在角质颚的各项形态参数上均极显著大于雄性( $P<0.01$ );方差分析及多重比较(LSD 法)表明,随着胴长的增加,乌贼的各个角质颚的形态参数也极显著增加( $P<0.01$ )。在性腺成熟期 II~IV 中,乌贼角质颚的形态参数随着性腺成熟度的增加而显著增加( $P<0.05$ ),但性腺成熟度为 V 期的个体的角质颚形态参数却显著小于前面几期( $P<0.05$ )。主成分分析显示,第一主成分的负载绝对值最高的指标为上头盖长(Upper hood length, UHL)和下脊突长(Lower crest length, LCL);第二主成分下喙长(Lower rostrum length, LRL)和下喙宽(Lower rostrum width, LRW),利用主成分分析得到的前 2 个主成分可以对乌贼的胴长进行估算。研究表明,同一种类不同性别的乌贼个体角质颚形态参数及其比值存在特异性,研究结果为西非沿岸乌贼类分类及生态研究提供基础资料。

**关键词** 乌贼; 角质颚; 形态参数; 生长特征

中图分类号 S977 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)02-0164-07

乌贼(*Sepia officinalis* Linnaeus, 1758)是一种季节洄游性的浅海性底栖种,主要栖息在东大西洋波罗的海到南非沿岸 200 m 水深的砂质和烂泥质底层区域,而 100 m 以上的深度区域群体较为密集,大个体则分布在更深的水层(Bakhayokho *et al*, 1982)。乌贼是大西洋最重要的商业性捕捞种类之一,同时也是我国西非过洋性渔业的重要捕捞对象。联合国粮农组织的捕捞统计数据显示,2004~2012 年乌贼的产量不断增加,

在 2012 年达到 29589 t,近几年其产量虽有回落,但也保持在 20000 t 左右。

角质颚作为头足类的摄食器官,蕴含着许多生物学信息(刘必林等, 2010; 陈芑等, 2015),被认为是用来鉴定头足类尤其是蛸类年龄最可靠的硬组织之一;且角质颚比耳石大,具有容易提取、研磨方便等优点,在年龄与生长的研究中得到广泛的应用(方舟等, 2014b)。角质颚有耐腐蚀的特点,因此,在摄食生态

\* 国家自然科学基金(NSFC41476129;NSFC41276156)和上海市科技创新行动计划(14DZ1205000)共同资助 [This work was supported by the National Science Foundation of China (NSFC41476129, NSFC41276156), and the Innovation Program of Shanghai Municipal Science Commission (14DZ1205000)]. 瞿俊跃, E-mail: 953770708@qq.com

① 通讯作者: 李建华, E-mail: jhli@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-01-03, 收修改稿日期: 2017-03-09



学中也有应用,例如,残留在大型海洋生物体内大量的角质颚可以用来分析头足类在食物网中的地位(Olson *et al.*, 2007)。此外,对角质颚的形态特征、色素沉着、稳定同位素和微量元素变化的分析有助于对头足类群体划分和资源动态等的理解(方舟等, 2014b)。然而,国内对于角质颚的研究主要集中在柔鱼类,如柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)(方舟等, 2014a; 陈芃等, 2015)、茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)(胡贯宇等, 2015、2016)、太平洋褶柔鱼(*Todarodes pacificu*)(杨林林等, 2012)等。对乌贼目种类的角质颚研究还十分匮乏。为此,本研究根据 2015 年在西非毛里塔尼亚附近海域所获得的渔获样本,对乌贼角质颚样本进行分析,并通过角质颚的各项形态参数及其比值对乌贼的角质颚进行形态描述,探究不同胴长和不同性腺成熟阶段角质颚生长情况的差异,并利用角质颚的形态参数对个体大小进行估算,以期为东大西洋乌贼的形态学和生态学研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 采集时间和地点

乌贼样本来源于 2015 年中国水产总公司渔船在西非毛里塔尼亚专属经济区海域底拖网作业获得的渔获,随机采集 983 尾。所获得的样本经冷冻保藏运回实验室。

### 1.2 角质颚采集

从乌贼头部口器中提取角质颚(图 1),得到完整角质颚样本 898 对。将取出的角质颚进行编号并存放于装有 75%乙醇溶液的 50 ml 离心管中。

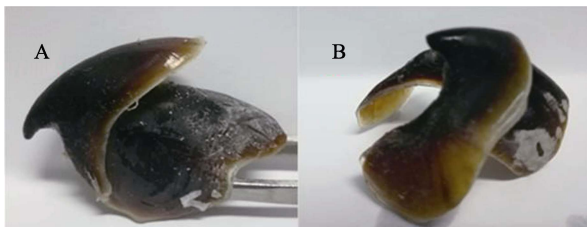


图 1 乌贼角质颚形态  
Fig.1 Common cuttlefish beaks

A: 上颚; B: 下颚      A: Upper beak; B: Lower beak

### 1.3 研究方法

**1.3.1 基础生物学测量** 将实验室中冷冻的样品取出并解冻后,对乌贼进行生物学测定,包括胴长

(Mantel length, ML)、性别和性腺成熟度。测量胴长用皮尺进行,测定精确至 1 mm。根据 Lipinski 等(1995)的分类方法,将性成熟度划分 I、II、III、IV、V 共 5 期,本研究中, I、II 期个体为性未成熟的个体, III、IV 期为性成熟个体, V 期为繁殖后(雄性为交配后,雌性为产卵后)的个体。

**1.3.2 角质颚形态测量** 将角质颚从离心管中取出,将其外部清洗干净后,使用数显游标卡尺对角质颚的上头盖长等 12 项形态参数进行测量(图 2),测量结果精确至 0.01 mm。

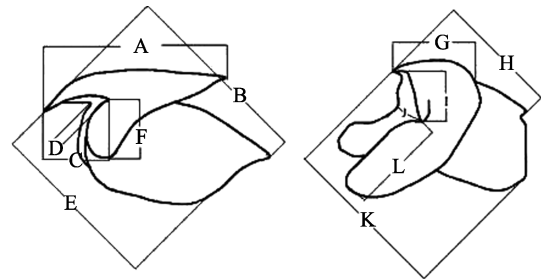


图 2 角质颚外部形态测量示意(Fang *et al.*, 2014)  
Fig.2 Scheme of morphometric measurement for beak

A: 上头盖长 UHL; B: 上脊突长 UCL; C: 上喙长 URL; D: 上喙宽 URW; E: 上侧壁长 ULWL; F: 上翼长 UWL; G: 下头盖长 LHL; H: 下脊突长 LCL; I: 下喙长 LRL; J: 下喙宽 LRW; K: 下侧壁长 LLWL; L: 下翼长 LWL

A: Upper hood length; B: Upper crest length; C: Upper rostrum length; D: Upper rostrum width; E: Upper lateral wall length; F: Upper wing length; G: Lower hood length; H: Lower crest length; I: Lower rostrum length; J: Lower rostrum width; K: Lower lateral wall length; L: Lower wing length

**1.3.3 数据处理** 角质颚形态描述按照 Clarke (1962、1986)的研究方法,分别计算上下角质颚喙长与头盖长(RL/HL)、喙长与脊突长(RL/CL)、头盖长与脊突长(HL/CL)、翼长与脊突长(WL/CL)、翼长与头盖长(WL/HL)和翼长与喙长(WL/RL)的比值,对角质颚的形态特征进行描述。

按照性别分别计算各角质颚形态参数的平均值和标准差,并利用 *t* 检验(李春喜等, 2008)检验不同性别各角质颚形态参数的差异。为校正样品规格差异对形态参数值的影响, *t* 检验时,将其形态参数均除以胴长,即对 UHL/ML、UCL/ML、URL/ML、URW/ML、ULWL/ML、UWL/ML、LHL/ML、LCL/ML、LRL/ML、LRW/ML、LLWL/ML 和 LWL/ML 这 12 个指标进行分析。

按胴长将乌贼分为 100~150、150~200、200~250 和 250~300 mm 4 个胴长组,利用方差分析(ANOVA)



(Gueorguieva *et al.*, 2004)及多重比较(LSD法)(王斌会等, 2010)对不同胴长组及不同性成熟度间角质颚各项形态参数值的差异进行检验,以分析不同因子对角质颚生长的影响。

首先利用主成分分析(Tang *et al.*, 2007),对乌贼角质颚的12个比例形态指标进行分析,得到累计方差贡献率达到70%的主成分(陈芄等, 2015),并计算各个样本的各主成分得分。其次,利用线性回归法拟合胴长与各主成分之间的关系式作为利用角质颚估算乌贼个体大小的方程式。上述分析均采用SPSS 19.0软件进行。

## 2 结果

### 2.1 角质颚外部形态特征

上颚特征:角质颚上颚的HL较长,长度为CL的77.11%,上喙较平缓,下喙连接翼部。喙较弯曲,RL分别达到HL和CL的23.76%和18.29%。侧壁较宽大,其后端边缘和脊突弯曲,均呈一定的弧度。翼部连接到侧壁前端的底部,WL大于RL,为RL的194.28%,但相对于HL和CL仍旧较小,分别为HL和CL的45.39%和34.95%(表1)。

下颚特征:角质颚下颚HL的长度为CL的46.04%,喙较长,RL分别达到HL和CL的49.97%和26.63%。喙与翼部的夹角较上颚大,侧壁较上颚小,其后端边缘和脊突均比较平直。翼部较长,约为侧壁的2倍,WL显著大于HL和RL,分别为HL的228.01%,RL的476.34%,WL和CL相当,为CL的103.21%(表1)。

表1 乌贼角质上、下颚各长度指标的比值

Tab.1 Relative ratios of the upper and lower beaks of common cuttlefish

比值 Ratio	上颚 Upper beak	下颚 Lower beak
喙长与头盖长 RL/HL	0.24±0.03	0.50±0.20
喙长与脊突长 RL/CL	0.18±0.06	0.23±0.08
头盖长与脊突长 HL/CL	0.77±0.22	0.46±0.06
翼长与脊突长 WL/CL	0.35±0.12	1.03±0.12
翼长与头盖长 WL/HL	0.45±0.06	2.28±0.53
翼长与喙长 WL/RL	1.94±0.36	4.76±0.96

### 2.2 不同性别乌贼个体角质颚形态特征比较

不同性别乌贼个体角质颚形态存在差异(表2),除上喙宽、下喙长、下喙宽外,雄性个体的角质颚形态参数的平均值均大于雌性(表1)。但*t*检验表明,

将各项形态参数均除以胴长消除了样品规格差异的影响后,发现雄性个体在角质颚的各项形态参数上均极显著小于雌性( $P<0.01$ )。

表2 不同性别乌贼个体角质颚形态参数均值

Tab.2 Average values of morphological parameters of common cuttlefish beak in both genders

形态指标 Morphological index	雌性 Female (mm)	雄性 Male (mm)
上头盖长 UHL	19.57±3.01	20.82±4.76
上脊突长 UCL	25.79±3.93	27.08±5.52
上喙长 URL	4.71±0.90	4.84±1.11
上喙宽 URW	4.51±0.75	4.47±1.03
上侧壁长 ULWL	18.50±2.82	19.31±4.93
上翼长 UWL	9.05±1.70	9.21±2.16
下头盖长 LHL	7.24±1.20	7.78±1.96
下脊突长 LCL	15.89±2.26	16.78±3.59
下喙长 LRL	3.73±0.80	3.61±0.82
下喙宽 LRW	4.40±1.00	4.26±1.08
下侧壁长 LLWL	19.96±2.83	20.92±4.85
下翼长 LWL	16.59±2.67	17.09±3.66

### 2.3 胴长和性腺成熟度与乌贼角质颚形态参数的关系

样本在100~150、150~200、200~250和250~300 mm胴长组的比例分别为0.3%、5.76%、46.01%、26.1%和16.89%。ANOVA分析表明,乌贼群体不同胴长组和角质颚各项指标均存在显著差异( $P<0.01$ )。LSD分析显示,随着胴长的增加,乌贼的各个角质颚的形态参数也极显著增加(图3),所以,可以根据角质颚的长度对乌贼的胴长及生长情况进行判定。

乌贼群体雌性样本的性腺成熟度在II~V期之间,所占比重分别为1.93%、12.08%、85.51%和0.48%。乌贼群体雄性的性成熟度在II~IV期之间,所占比重分别为13.39%、57.82%和28.79%。ANOVA分析表明,乌贼个体角质颚各项形态参数在不同性腺成熟度均存在显著差异( $P<0.01$ )。LSD分析显示,角质颚形态参数在性成熟度II~IV期显著增加( $P<0.05$ ),而性成熟度V期时角质颚形态参数显著小于性成熟度II~IV期( $P<0.05$ )。

### 2.4 角质颚形态参数主成分分析及其与大小的关系

对乌贼12个角质颚形态参数指标进行主成分分析,结果显示(表3):前2个主成分的累计方差贡献率已达到76.5%,其中第一主成分负载绝对值最高的前2个指标为UHL和LCL;第二主成分负载绝对值最高的前2个指标为LRL和LRW。

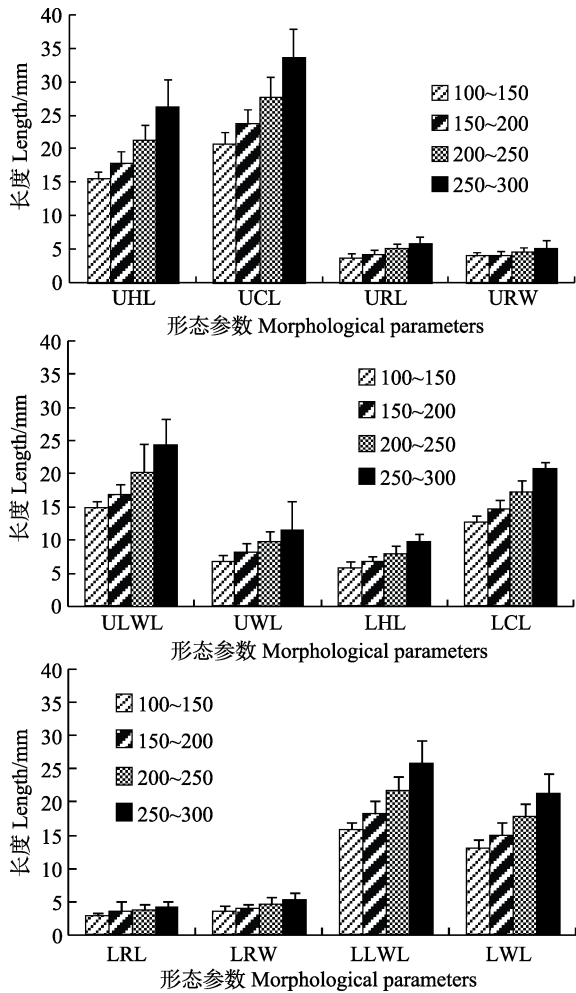


图 3 胴长与乌贼角质颚形态参数的关系

Fig.3 The relationship between mantle length and beak shape parameters of common cuttlefish

根据主成分分析的结果，选取前 2 个主成分，并利用各个角质颚的形态参数计算各主成分的得分，以此拟合乌贼胴长和各主成分得分的关系式，结果如下(表 3)：

$$ML=1.56 \times C_1 - 1.3 \times C_2 - 21.4 (R^2=0.78)$$

式中，ML 为胴长， $C_1$  为第一主成分得分， $C_2$  为第二主成分得分。方差分析显示，胴长与这 2 个主成分得分间呈极显著的线性关系( $F=1468.13$ ,  $df_1=2$ ,  $df_2=896$ ,  $P<0.01$ )。验证结果表明(表 4, 图 5)，该方程式可作为利用角质颚估算乌贼个体大小的关系式。

### 3 讨论

#### 3.1 角质颚的形态

本研究显示，乌贼角质颚下颚的长度比值波动较大，比较不稳定。除了 HL/CL 外，其余的角质颚长度比值标准差均大于上颚(表 1)。这可能是与上颚肌

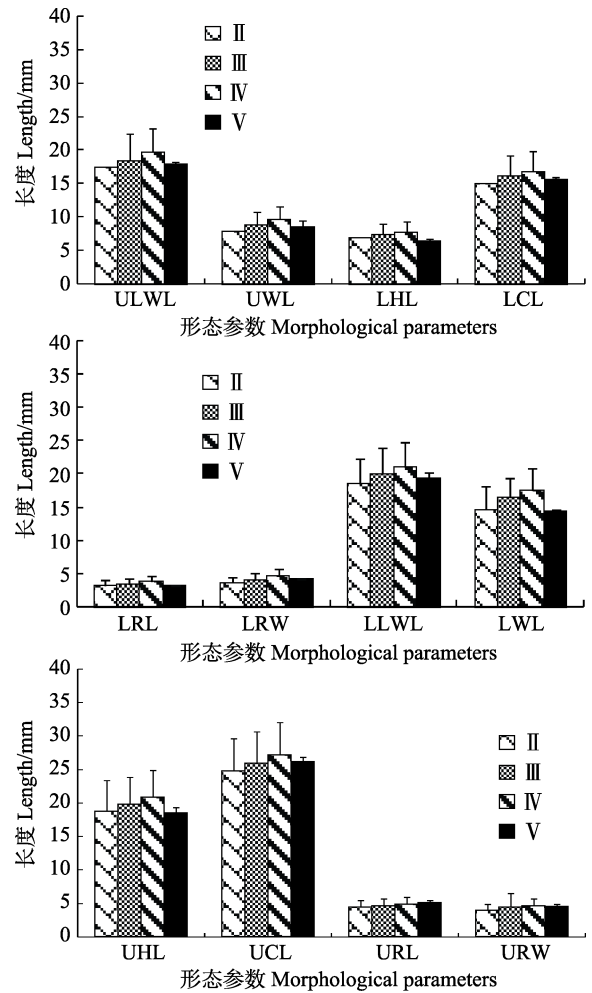


图 4 性腺成熟度与乌贼角质颚形态参数的关系

Fig.4 The relationship between morphological parameters and maturity stage in common cuttlefish beak

相较于侧肌和下颚肌较发达有关(Kear, 1994)。同时也表明，上颚相对于下颚可更好地作为种类划分的指标。上、下颚中，WW/RL 比值的标准差远大于其他各项长度比值，可能是由于翼部与喙部相连且有一定的弯曲，导致测量喙长及翼长较困难，造成结果出现了一定的误差，造成比值波动较大。Arimoto 等(1998)发现头足类角质颚的结构相对稳定，存在明显的特征，在种群鉴定上比其他的软体部位更为有效。而不同种类角质颚在长度比值上可能存在特异性，可以作为种类判别的指标。根据对其他乌贼类的报道，发现角质颚长度比值的稳定特性甚至可以用来判别不同的种类。例如，日本无针乌贼(*Sepiella japonica*)下颚 WL/HL 为  $1.67 \pm 0.28$  (刘本伟等, 2016)，该值小于毛里塔尼亚附近海域乌贼的  $2.28 \pm 0.53$  (表 1)，虽然置信区间略有重叠，但可以作为判别这 2 种种类的佐证。

同样，不同种类的个体以及同一种类不同性别的个体角质颚形态参数存在特异性。主成分分析中，

表3 乌贼角质颚形态参数指标的主成分分析结果  
Tab.3 Results of principal analysis of morphological index of common cuttlefish beak

形态参数指标 Morphological index	主成分 Principal component		
	1	2	3
上头盖长 UHL	0.96	-0.12	-0.04
上脊突长 UCL	0.93	-0.21	-0.02
上喙长 URL	0.82	-0.02	-0.03
上喙宽 URW	0.53	0.28	0.75
上侧壁长 ULWL	0.86	-0.09	-0.02
上翼长 UWL	0.85	0.01	-0.07
下头盖长 LHL	0.86	-0.13	-0.08
下脊突长 LCL	0.94	-0.10	-0.06
下喙长 LRL	0.41	0.80	-0.39
下喙宽 LRW	0.70	0.35	0.19
下侧壁长 LLWL	0.94	-0.09	-0.07
下翼长 LWL	0.93	-0.03	-0.02
方差贡献率 Variance contribution (%)	68.62	7.87	6.52
累计方差贡献率 Cumulative variance contribution (%)	68.62	76.5	83.02

表4 回归分析及其检验结果  
Tab.4 Results of regression analysis

项目 Items	系数 Coefficients	P	下限 Lower 95%	上限 Upper 95%
截距 Intercept	-21.40	<0.01	-29.49	-13.32
第一主成分 First principle	1.56	<0.01	1.48	1.65
第二主成分 Second principle	-1.30	<0.01	-2.17	-0.44

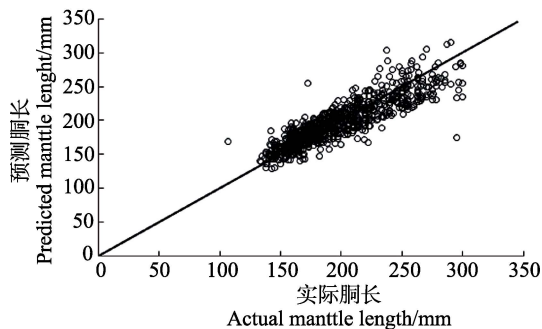


图5 利用角质颚预测乌贼胴长与实际胴长比较

Fig.5 The comparison between actual and predicted mantle length based on the beak

UHL 和 LCL 在第一主成分中的绝对值最大, 而第二主成分中, 绝对值最大的是 LRL 和 LRW(表 3)。这与对前人对柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)(陈芄等,

2015; 方舟等, 2014a)、阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)的研究结果(方舟等, 2012)不尽相同, 例如方舟等(2014a)通过主成分分析结果发现, 柔鱼角质颚脊突、侧壁和喙长的快速生长为其摄食提供便利, 这与乌贼的角质颚较为相似, 但与柔鱼相比, 上头盖长也可以作为代表乌贼角质颚的指标, 可能是由于种类不同、物种摄食情况不同和栖息环境不同(乌贼为底栖种类, 而柔鱼为中上层种类)导致的, 这有待于今一步分析。不同性别上角质颚形态参数同样存在特异性。除以胴长后, 雌性个体在角质颚的各项形态参数上均极显著大于雄性(表 2)。这可能由于同一种群的雌性个体生长快于雄性, 需求的食物量较大, 造成角质颚形态参数的差异。

### 3.2 角质颚的生长

研究显示, 乌贼上、下颚各形态参数随着胴长组的增加而极显著增加, 同时, 利用主成分分析可以从 12 项形态参数中提取出形态差异(即前面角质颚个体大小与角质颚长度关系显著)的主要信息, 因此, 可以利用角质颚形态参数估算乌贼个体的大小(图 5)。在性腺成熟度与乌贼角质颚关系的比较中发现, 乌贼角质颚的形态参数随着性腺成熟度 II~IV 期(即性未成熟到性成熟)增加而显著增加(图 3), 但是, 性腺成熟度为 V 期的个体的角质颚形态参数却显著小于前面几期, 一种解释为, 可能在毛里塔尼亚附近存在着乌贼的不同群体, V 期的个体所代表的群体, 普遍个体较小且产卵早。这个假设有待于今后进一步验证。

### 3.3 角质颚形态特征的应用

目前, 渔业资源学的研究重点主要集中在年龄生长、资源评估和食性分析上(Hernández-López *et al*, 2001)。角质颚因其自身的相对稳定的结构从而在这些方面具有较好的应用前景(Smith *et al*, 2000)。但对乌贼的生活史还无充分了解, 作为硬组织的角质颚保存着大量信息, 还可以通过其他方法, 如角质颚研磨获得日龄情况(Hernández-López *et al*, 2001; Raya *et al*, 1998)、氨基酸(Miserez *et al*, 2007)及色素成分组成分析(García, 2003)等来发现并判断其中信息所包含的意义。

本研究阐述了乌贼角质颚的形态参数特征。通过对角质颚与胴长及性腺成熟度关系的分析, 一定程度上可推断出个体的生长发育情况。并利用角质颚的形态参数建立了乌贼个体大小估算方程式。但是, 本研究所得到的捕捞的样本在 I 期和 V 期的个体数量较少, 可能会对研究结果带来误差, 还需要后续的研究和补充。

## 参 考 文 献

- Arimoto Y, Kawamura A. Characteristics of the fish prey of neon flying squid, *Ommastrephes bartramii*, in the central North Pacific. *Heisei*, 1998, 8: 70–80
- Bakhaykho M, Drammeh O. Elements de biologie et d'identite des populations de seiches (*Sepia officinalis hierredda*) des cotes sene-gambiennes. Special Working Group on Cephalopod Stocks in the Northern Region of CECAF. Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands (Spain). 27 Jan 1982
- Chen P, Fang Z, Chen XJ. Population identification of *Ommastrephes bartramii* based on beak's external morphological characters. *Marine Fisheries*, 2015, 35(1): 1–9 [陈芑, 方舟, 陈新军. 基于角质颚外部形态学的柔鱼种群判别. *海洋渔业*, 2015, 35(1): 1–9]
- Clarke MR. The identification of cephalopod “beaks” and the relationship between size and total body weight. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, 1962, 8: 419–480
- Clarke MR. A handbook for identification of cephalopod beaks. Clarendon, Oxford, 1986, 273
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Organization of the United Nations' fisheries database-Global capture production from 1950 to 2014. <http://www.fao.org/fishery/species/2711/en> [联合国粮农组织. 联合国粮农组织渔业统计数据——1950–2014 年全球捕捞产量. <http://www.fao.org/fishery/species/2711/en>]
- Fang Z, Chen XJ, Lu HJ, *et al.* Morphological differences in statolith and beak between two spawning stocks for *Illex argentinus*. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(19): 5986–5997 [方舟, 陈新军, 陆化杰, 等. 阿根廷滑柔鱼两个群体间耳石和角质颚的形态差异. *生态学报*, 2012, 32(19): 5986–5997]
- Fang Z, Chen XJ, Lu HJ, *et al.* Morphology and growth of beaks in two cohorts for neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the North Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 2014a, 34(19): 5405–5415 [方舟, 陈新军, 陆化杰, 等. 北太平洋两个柔鱼群体角质颚形态及生长特征. *生态学报*, 2014a, 34(19): 5405–5415]
- Fang Z, Chen XJ, Lu HJ, *et al.* Progress of beak in cephalopod I: Morphogenesis, biochemistry and growth. *Marine Fisheries*, 2014b, 36(1): 78–89 [方舟, 陈新军, 陆化杰, 等. 头足类角质颚研究进展 I——形态、结构与生长. *海洋渔业*, 2014b, 36(1): 78–89]
- Fang Z, Liu B, Li J, *et al.* Stock identification of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the North Pacific Ocean on the basis of beak and statolith morphology. *Scientia Marina*, 2014, 78(2): 239–248
- García VH. Growth and pigmentation process of the beaks of *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Berliner Palaobiol Abh*, Berlin, 2003, 3: 131–140
- Georguieva R, Krystal JH. Move over anova: Progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the archives of general psychiatry. *Archives of General Psychiatry*, 2004, 61(3): 310–317
- Hernández-López JL, Castro-Hernández JJ, Hernandez-García V. Age determined from the daily deposition of concentric rings on common octopus (*Octopus vulgaris*) beaks. *Fishery Bulletin-National Oceanic and Atmospheric Administration*, 2001, 99(4): 679–684
- Hu GY, Chen XJ, Fang Z. Effect of individual growth on beak morphometry of jumbo flying squid, *Dosidicus gigas* off the Peruvian Exclusive Economic Zone. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(1): 36–44 [胡贯宇, 陈新军, 方舟. 个体生长对秘鲁外海茎柔鱼角质颚形态变化的影响. *水产学报*, 2016, 40(1): 36–44]
- Hu GY, Chen XJ, Liu BL, *et al.* Microstructure of statolith and beak for *Dosidicus gigas* and its determination of growth increments. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 361–370 [胡贯宇, 陈新军, 刘必林, 等. 茎柔鱼耳石和角质颚微结构及轮纹判读. *水产学报*, 2015, 39(3): 361–370]
- Kear AJ. Morphology and function of the mandibular muscles in some coleoid cephalopods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1994, 74(4): 801–822
- Li CX, Shao Y, Jiang LN. Biostatistics. Beijing: Science Press, 2008, 85–110 [李春喜, 邵云, 姜丽娜. 生物统计学. 北京: 科学出版社, 2008, 85–110]
- Lipiński MR, Underhill LG. Sexual maturation in squid: Quantum or continuum. *South African Journal of Marine Science*, 1995, 15(1): 207–223
- Liu BL, Chen XJ, Zhang CZ. Grey relationship analysis for the environmental factors affecting the *Noctiluca scintillans* density in Qinhuangdao coastal area. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 8–14 [刘必林, 陈新军, 张长征. 印度洋西北海域鸢乌贼角质颚长度分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 8–14]
- Liu BW, Pan GP, Zhou WY, *et al.* Cultured *Sepiella japonica* beak morphology study. *Fisheries Science and Technology Information*, 2016, 43 (4): 190–194 [刘本伟, 潘桂平, 周文玉, 等. 养殖日本无针乌贼角质颚形态研究. *水产科技情报*, 2016, 43(4): 190–194]
- Miserez A, Li Y, Waite JH, *et al.* Jumbo squid beaks: Inspiration for design of robust organic composites. *Acta Biomaterialia*, 2007, 3(1): 139–149
- Olson RJ, Young JW. The role of squid in open ocean ecosystems. Report of a GLOBEC-CLIoTOP/PFRP workshop, 16–17 November 2006, Honolulu, Hawaii, USA. *GLOBEC Report*, 2007, 24: 1–94
- Raya CP, Hernández-González CL. Growth lines within the beak microstructure of the octopus *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *South African Journal of Marine Science*, 1998, 20(1): 135–142
- Smith SC, Whitehead H. The diet of Galapagos sperm whales *Physeter macrocephalus* as indicated by fecal sample analysis. *Marine Mammal Science*, 2000, 16(2): 315–325

- Tang QY, Feng MG. DPS data processing system: Experimental design, statistical analysis and data mining. Science, Beijing, 2007
- Wang BH. Multivariate statistical analysis and R language modeling. Guangzhou: Jinan University Press, 2010, 157–158 [王斌会. 多元统计分析及R语言建模. 广州: 暨南大学出版社, 2010, 157–158]
- Yang LL, Jiang YZ, Liu ZL, *et al.* Variation analysis on partial morphometric measurements of beak of *Todarodes pacificus* inhabiting East China Sea. Periodical of Ocean University of China(Natural Science), 2012, 42(10): 51–57 [杨林林, 姜亚洲, 刘尊雷, 等. 东海太平洋褶柔鱼角质颚的形态学分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(10): 51–57]
- Yang Y, Pan BH, Sun XF. Function of *Lactobacillus planetarium* and its application in animal production. Feed Research, 2013(2): 36–37 [杨艳, 潘宝海, 孙笑非. 植物乳杆菌的功能及其在动物生产中的应用. 饲料研究, 2013(2): 36–37]

(编辑 冯小花)

## The Morphology and Growth Characteristics of Beaks of European Common Cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the Coast of West Africa

QU Junyue<sup>1</sup>, LI Jianhua<sup>1,2,3</sup>①, CHEN Peng<sup>1</sup>, CHEN Xinjun<sup>1,2,3</sup>, JIN Nan

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306)

**Abstract** Common cuttlefish (*Sepia officinalis*) is one of the most important economic and ecological species in the West African coastal waters. Studying the morphology and growth characteristics of its beak is beneficial for common cuttlefish's development and utilization. This study analyzed beak morphological parameters and their ratios based on the samples collected by the Chinese trawlers in 2015 in coastal waters of West African Mauritania, and studied the beak growth variations in different mantle length groups and different gonadal maturity stages. Morphological parameters of beaks were used to estimate the size of the cuttlefish. The results showed the length ratio indices of the lower beak were not stable, and that the beak morphological parameters of female were significantly higher than the male after eliminating the effect of the sample size differences by dividing the mantle length ( $P < 0.01$ ). The ANOVA and the Least Significant Difference (LSD) analysis showed that morphological parameters of the common cuttlefish beaks significantly increased with the growth of mantle length ( $P < 0.01$ ) and gonad maturity stage II~IV ( $P < 0.01$ ). However, beaks in the gonad maturity stage V were significantly smaller than those in the previous periods (II~IV,  $P < 0.05$ ). Principal component analysis showed that upper hood length (UHL) and lower crest length (LCL) had the highest loading coefficient in the first principal component, and that lower rostrum length (LRL) and lower rostrum width (LRW) had the highest loading coefficient in the second principal component, which can be used for the mantle length estimation. This study provides basic biology information for the classification and ecological research about common cuttlefish in the coast of West Africa.

**Key words** Common cuttlefish (*Sepia officinalis*); Beak; Morphological parameter; Growth characteristics

① Corresponding author: LI Jianhua, E-mail: jhli@shou.edu.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170112002

http://www.yykxjz.cn/

刘小芳, 蒋永毅, 侯钦帅, 苗钧魁, 冷凯良. 反相高效液相色谱法测定褐藻中岩藻黄素的含量. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 171-176

Liu XF, Jiang YY, Hou QS, Yuan C, Miao JK, Leng KL. Determination of fucoxanthin in brown seaweed samples by reversed phase-high performance liquid chromatography. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 171-176

## 反相高效液相色谱法测定褐藻中岩藻黄素的含量\*

刘小芳<sup>1</sup> 蒋永毅<sup>2</sup> 侯钦帅<sup>1,3</sup> 苗钧魁<sup>1</sup> 冷凯良<sup>1①</sup>



(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 山东信诺检测技术有限公司 青岛 266101; 3. 青岛大学药学院 青岛 266021)

**摘要** 建立一种反相高效液相色谱法用于海藻中岩藻黄素的定量分析,并测定新鲜及干制褐藻中岩藻黄素含量,探究不同干制方式对褐藻岩藻黄素的影响。样品经甲醇提取、C18柱固相萃取净化后,采用 ZORBAX SB-C18 色谱柱,流动相采用水与甲醇梯度洗脱,流速 0.7 ml/min、进样量 10 μl、柱温 35℃、检测波长 450 nm 进行液相色谱分析。在该条件下,岩藻黄素在 0.11~50 mg/L 范围内有良好的线性关系( $Y=38.46X+0.8899$ ,  $R^2=0.9999$ ),检测限为 0.03 mg/L,回收率为 92.66%~109.06%,相对标准偏差(RSD)为 3.46~4.61%。采用该方法,岩藻黄素提取净化完全,杂质干扰小,回收率高,能够对海藻及其制品中岩藻黄素进行准确定量。采用该方法测得新鲜海带和马尾藻的岩藻黄素含量(干基)分别为 559.2 和 680.4 mg/kg,而干制褐藻样品中岩藻黄素的含量明显低于新鲜褐藻。不同干制方式造成的岩藻黄素损失程度为真空冷冻干燥<45℃烘干≈自然晾干。因此,在规模化分离制备海藻岩藻黄素时,宜采用新鲜或冻干海藻作为原料,从而保证岩藻黄素的得率。

**关键词** 高效液相色谱法; 海带; 马尾藻; 岩藻黄素; 干制方式

中图分类号 TS254.7 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)02-0171-06

岩藻黄素(Fucoxanthin)亦称岩藻黄质、褐藻素,化学名为 3-(乙酰氧基)-6',7'-二脱氢-5,6-环氧-5,5',6,6',7,8-六氢-3,5'-二氢基-8-氧代-β,β-胡萝卜素,分子式为 C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>,分子量为 658.91,结构式如图 1 所示。岩藻黄素是褐藻、硅藻等海洋藻类和无脊椎动物所含有的一种重要的类胡萝卜素,是使褐藻类呈现出褐色的物质,也是硅藻类植物的指标性色素(Yao *et al.*, 2006)。褐藻中岩藻黄素的含量达到自然界中类胡萝卜素总量的 10%以上。世界海洋中,每年海藻岩藻黄素的产量可达 6.8×10<sup>6</sup> t,资源量十分丰富(严小军等, 2001; 汪曙晖等, 2010)。

岩藻黄素具有良好的抑制肥胖(Maeda *et al.*, 2005; Miyashita *et al.*, 2011)、调节糖代谢(Maeda *et al.*, 2007)、抗肿瘤(张文源等, 2015; Wang *et al.*, 2012)、抑制血管新生、抑制炎症(Shiratori *et al.*, 2005)的作用,在海藻保健食品及医药制品开发领域展现出良好的

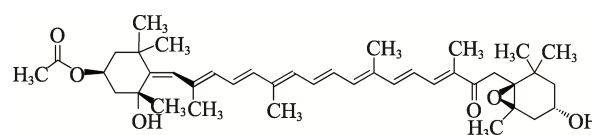


图 1 岩藻黄素的化学结构式

Fig.1 The chemical structure of fucoxanthin

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助(20603022016016)资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016016)]. 刘小芳, E-mail: liuxiaofang@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 冷凯良, 研究员, E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-12, 收修改稿日期: 2017-03-06



应用前景。受加工技术限制,国内应用岩藻黄素的产品极少,而以其为功能因子的膳食补充剂在美国、韩国和日本等国早已上市。寻找最佳的岩藻黄素来源、加快相关产品的开发成为目前国内海藻加工行业关注的热点。建立快速、准确的海藻岩藻黄素色谱分析方法,对于保证行业健康发展、实现市场有效监管和维护消费者合法权益十分重要。

岩藻黄素属丙二烯型类胡萝卜素,含有 5,6-单环氧基、9 个共轭双键,还有羰基和羟基(张文源等, 2015; Wang *et al*, 2014)。这些特征性结构的存在导致岩藻黄素极不稳定,在强光或高温条件下易被氧化和异构化,从而发生降解(张文源等, 2015; Zhao *et al*, 2014)。干制过程是海藻初级加工品及海藻化工生产过程中的关键环节,不同干制过程对岩藻黄素的影响不同。确定加工生产过程中应选取的最佳干制方式,对于最大限度地获取海藻岩藻黄素资源具有指导意义。因此,本研究建立了基于 C18 柱固相萃取前处理、RP-HPLC-DAD 检测的海藻中岩藻黄素定量分析方法,并采用该方法对新鲜及不同干制方式预处理的代表性褐藻中岩藻黄素含量进行了检测,以期对海藻岩藻黄素资源的合理开发利用提供理论指导和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜海带 (*Saccharina japonica*) 及马尾藻 (*Sargassum sp.*) 由山东寻山集团提供,采集于 2016 年 6 月,运至实验室后贮藏于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用;岩藻黄素标准品购于 Sigma 公司; C18 固相萃取柱购于天津博纳艾杰尔科技有限公司; 色谱纯甲醇购于 Burdick & Jackson 公司; 分析纯甲醇购于国药集团化学试剂有限公司; 实验用水为自制超纯水。

### 1.2 仪器设备

1260 Infinity II 型液相色谱系统(二极管阵列检测器)(美国 Agilent 公司); ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6×150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )(美国 Agilent 公司); UV1102 II 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); BAS224S-CW 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); SB-4200DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器、SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂); ZMQS50001 型 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 不同干制方式褐藻样品的制备

称取 1.00 kg

新鲜褐藻样品,粉碎,混合均匀后分成 4 等份: 1 份作为新鲜褐藻样品; 另 3 份分别采用自然晾干、烘干( $45\pm 3^{\circ}\text{C}$ )、真空冷冻干燥 3 种方式进行处理,待干燥至恒重后分别加入研磨机中粉碎,制备得到晾干褐藻、烘干褐藻、冻干褐藻样品。

**1.3.2 样品前处理** 称取 2.00 g 样品于棕色具塞三角瓶中,加入 10 ml 甲醇,超声提取 30 min,静置后移取 5 ml 提取液,补加 3 ml 甲醇、2 ml 水至提取液中(甲醇与水的体积比为 4:1),得到 10 ml 样品液。C18 固相萃取柱经 10 ml 甲醇、10 ml 水活化处理后,将上述 10 ml 样品液移至萃取柱进行吸附,而后采用 10 ml 80% 甲醇溶液淋洗,弃淋洗液,最后采用 20 ml 90% 甲醇溶液进行洗脱,收集洗脱液至 25 ml 棕色容量瓶,定容,混匀,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜后供色谱分析用。

**1.3.3 色谱条件** 色谱柱: ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6×150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为水; 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序见表 1; 流速为 0.7 ml/min, 进样量为 10  $\mu\text{l}$ , 柱温为  $35^{\circ}\text{C}$ , 检测波长为 450 nm; 外标法定量。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

Tab.1 The gradient elution program of HPLC

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0	80	20
3.0	70	30
4.0	50	50
6.0	5	95
10.0	5	95
12.0	70	30
15.0	80	20

### 1.4 数据处理

实验结果采用 Excel 2013 进行处理,以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理方法的选择

本研究采用 C18 柱固相萃取法进行褐藻及其干制品中岩藻黄素的分离净化,优化了样品提取效果,有效去除了其他脂质成分对色谱检测的影响。以岩藻黄素回收率为评价指标,对洗脱溶剂中甲醇比例、洗脱液体积(图 2)进行了选择。结果显示,洗脱液中甲醇浓度为 60%~80% 时,不能实现对吸附在 C18 柱上岩藻黄素的完全洗脱,当甲醇浓度增加至 90% 时,岩藻黄素的洗脱回收率达到 99.3%,因此,确定洗脱液

选用 90% 甲醇溶液。由图 2 可知, 随着洗脱液用量的增大, 岩藻黄素回收率逐渐提高, 当洗脱体积达到 20 ml 时, 岩藻黄素回收率达到 99.3%, 继续增大洗脱剂用量, 岩藻黄素回收率不再有明显上升, 说明采用 20 ml 以上体积洗脱液可以实现岩藻黄素的理想回收。因此, 最终确定采用 20 ml 90% 甲醇溶液进行 C18 柱固相萃取洗脱。

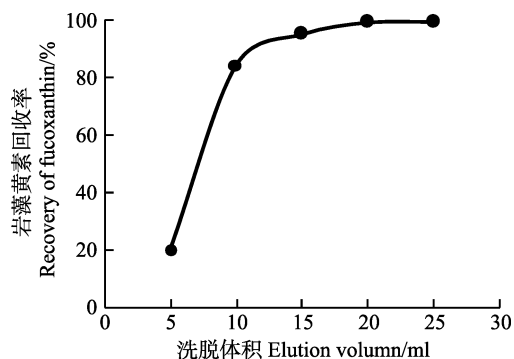


图 2 C18 柱固相萃取岩藻黄素洗脱曲线

Fig. 2 C18-SPE elution curve of fucoxanthin

## 2.2 检测波长的选择

对岩藻黄素标准品在 200~600 nm 波长范围内进行全波长扫描, 吸收光谱如图 3 所示。结果显示, 岩藻黄素在 450 nm 波长处具有最大吸收, 因此, 确定色谱检测波长为 450 nm。

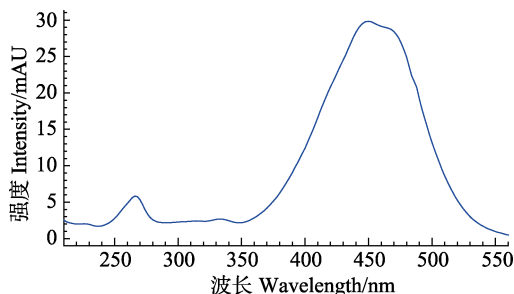


图 3 岩藻黄素紫外-可见全波长扫描吸收光谱

Fig. 3 The UV-Vis wavelength scanning absorption spectra of fucoxanthin standard

## 2.3 方法检测限及线性范围的确定

按仪器信噪比(S/N)为 3 测定得到方法检出限为 0.03 mg/L。

分别以岩藻黄素的质量浓度(X)为横坐标、以对应的峰面积(Y)为纵坐标绘制岩藻黄素的标准曲线, 得到线性回归方程:  $Y=38.46X+0.8899$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性区间为 0.11~50 mg/L。在实验质量浓度范围内, 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 可以通过外标法实现准确定量。

## 2.4 加标回收实验

为验证方法的准确度, 测定了加标回收率, 结果见表 2。在 100~600 mg/kg 加标浓度范围内, 岩藻黄素的加标回收率为 92.66%~109.06%, 相对标准偏差(RSD)为 3.46%~4.61%。本色谱方法的加标回收效果好, 准确度高, 可用于褐藻样品中岩藻黄素含量的测定。

表 2 回收率实验结果  
Tab.2 The spike recoveries of fucoxanthin

样品含量 Sample content (mg/kg)	加标量 Added amount (mg/kg)	检测值 Detection value (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Recovery Mean (%)	RSD (%)
	100	101.47	101.47	96.69	4.61
		95.94	95.94		
		92.66	92.66		
163.3	200	204.05	102.03	105.02	3.46
		218.11	109.06		
		207.95	103.98		
	600	616.73	102.79	103.02	3.57
		596.78	99.46		
		640.82	106.80		

## 2.5 新鲜及干制褐藻样品中岩藻黄素含量的测定

对新鲜及不同干制方式处理的海带和马尾藻样品中岩藻黄素的含量进行了测定, 结果见图 4、表 3。经 C18 柱固相萃取洗脱净化后, 在确定的色谱条件下, 岩藻黄素标准品出峰时间为 10.223 min, 海带和马尾藻样品检测基本无干扰, 杂质峰较少, 可实现准确定量(图 4)。由表 3 可知, 新鲜海带中岩藻黄素含量(干基)为 559.2 mg/kg, 自然晾干、烘干和冻干海带中岩藻黄素含量(干基)分别为 204.5、205.9 和 322.4 mg/kg; 新鲜马尾藻中岩藻黄素含量(干基)为 680.4 mg/kg, 自然晾干、烘干和冻干马尾藻中岩藻黄素含量(干基)分别为 220.4、225.9 和 458.8 mg/kg。不同干制方式褐藻中岩藻黄素的含量明显低于新鲜褐藻, 其中, 经真空冷冻干燥处理后, 褐藻岩藻黄素的保留率最高, 自然晾干与烘干处理造成的岩藻黄素损失程度基本相同。

## 3 讨论

目前, 关于海藻样品中岩藻黄素的含量研究已有报道, 但大部分仍局限于采用分光光度法进行测定(任丹丹等, 2011; 詹冬梅等, 2016; 秦云等, 2013), 采用色谱方法进行岩藻黄素定量分析的报道相对较少。宫平等(2012)采用乙醇抽提-高效液相色谱法检测海带

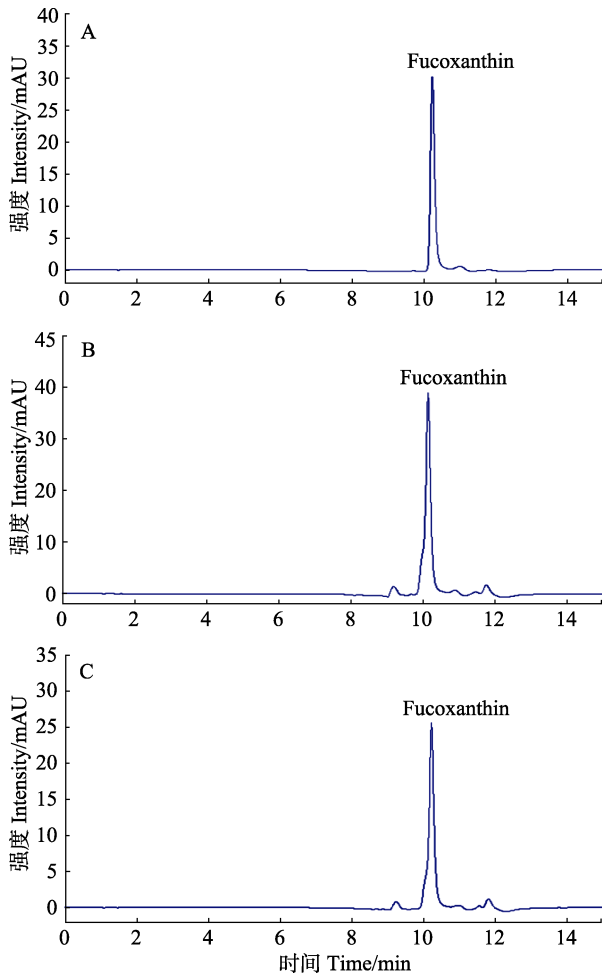


图4 岩藻黄素标准品(A)、鲜海带(B)和鲜马尾藻(C)反相高效液相分离图谱

Fig.4 The RP-HPLC spectrum of fucoxanthin standard (A), fresh kelp (B) and fresh sargassum (C)

中岩藻黄素的含量,方法线性范围为0.3125~10 mg/L,检测限为0.01 mg/L。汪曙晖(2010)采用丙酮抽提-高

效液相色谱法检测硅藻中岩藻黄素的含量,方法线性范围为7.2~144 mg/L,检测限为0.72 mg/L。本实验方法采用甲醇抽提-C18柱固相萃取-高效液相色谱法检测褐藻中岩藻黄素的含量,方法线性范围为0.11~50 mg/L,检测限为0.03 mg/L。对比可知,本检测方法定量限更低,灵敏度更高,适合于海藻及其相关制品中低含量岩藻黄素的定量分析。本检测方法改善了样品的前处理方式,采用C18柱固相萃取法完成样品岩藻黄素粗提物的净化,液相色谱图显示该前处理方法明显优化了提取效果,有效去除了其他杂质成分对岩藻黄素检测的影响。经C18柱固相萃取净化后,采用甲醇与水作为流动相进行梯度洗脱即可实现岩藻黄素与其他杂质成分的分,免除了缓冲盐溶液、乙腈及其他有机试剂等的使用,简化了色谱流动相的组成,减少了检测过程中有毒试剂的使用。同时,本实验确定的C18柱固相萃取洗脱条件也为后期海藻岩藻黄素的规模化分离制备提供了参考。

采用建立的反相高效液相色谱法测定得到新鲜海带和马尾藻中岩藻黄素含量(干基)为559.2 mg/kg和680.4 mg/kg,与他人的研究结果基本一致(任丹丹等,2011;詹冬梅等,2016;宫平等,2012)。经不同干燥方式处理后,2种褐藻中岩藻黄素均出现不同程度的损失:采用真空冷冻干燥法作为褐藻的干制方式,可以保留原料中约55%~65%的岩藻黄素;而采用自然晾干法或烘干法作为褐藻的干制方式,仅能保留原料中约35%的岩藻黄素,这与岩藻黄素在强光或高温条件下易被氧化和异构化,从而发生降解有关(张文源等,2015; Zhao *et al.*, 2014)。因此,在开发海藻岩藻黄素资源时,宜采用新鲜或冻干海藻作为原料,以提高岩藻黄素的得率。

表3 新鲜及干制褐藻样品中岩藻黄素含量测定结果

Tab.3 The fucoxanthin contents of the fresh and dried brown seaweed samples

样品 Sample	干制方式 Drying method	岩藻黄素含量 Fucoxanthin content (mg/kg)	水分含量 Moisture content (%)	岩藻黄素含量 Fucoxanthin content (DM, mg/kg)	岩藻黄素保留率 Fucoxanthin retained ratio (%)
海带 Kelp	新鲜 Fresh	163.3 ± 3.85	70.8 ± 2.31	559.2	
	晾干 Natural drying	182.2 ± 1.90	10.9 ± 0.57	204.5	36.6
	烘干 45°C drying	190.1 ± 4.26	7.67 ± 0.22	205.9	36.8
	冻干 Freeze drying	302.0 ± 6.08	6.32 ± 0.38	322.4	57.6
马尾藻 Sargassum	新鲜 Fresh	128.6 ± 2.73	81.1 ± 1.33	680.4	
	晾干 Natural drying	192.6 ± 3.11	12.6 ± 0.96	220.4	32.4
	烘干 45°C drying	208.8 ± 5.20	7.56 ± 0.31	225.9	33.2
	冻干 Freeze drying	428.5 ± 7.69	6.61 ± 0.24	458.8	67.4

## 4 结论

本研究确定了一种新的可用于海藻中岩藻黄素定性定量分析的反相高效液相色谱法。与现有的检测方法相比, 该方法采用 C18 柱固相萃取法进行样品岩藻黄素粗提物的净化, 明显优化了提取效果, 色谱检测梯度洗脱流动相也得到简化; 同时该方法还具有检测限低、线性范围宽、杂质干扰小、回收率高等特点。

干制褐藻样品中岩藻黄素的含量明显低于新鲜褐藻, 经真空冷冻干燥处理后, 褐藻岩藻黄素的保留率最高, 自然晾干与烘干处理造成的岩藻黄素损失程度基本相同。在开发海藻岩藻黄素资源时, 宜采用新鲜或冻干海藻作为原料, 从而保证岩藻黄素的得率。本研究为后期海藻岩藻黄素资源的规模化开发提供了理论指导和技术支持。

## 参 考 文 献

- Gong P, Chen F, Hui BD. Determination of fucoxanthin from *Laminaria japonica* by C18-HPLC-PDA. *Science and Technology of Food Industry*, 2012(1): 342-343 [宫平, 陈菲, 惠伯隼. 海带中岩藻黄质的 C18-HPLC-PDA 检测. *食品工业科技*, 2012(1): 342-343]
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, *et al.* Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332(2): 392-397
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, *et al.* Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55(19): 7701-7706
- Miyashita K, Nishikawa S, Beppu F, *et al.* The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *Journal of Science and Food Agriculture*, 2011, 91(7): 1166-1174
- Qin Y, Meng LY, Wang FW. Extraction and antioxidant activity of fucoxanthin from *Laminaria japonica*. *Food Science*, 2013, 34(16): 279-283 [秦云, 孟丽媛, 王凤舞. 复合酶法提取海带岩藻黄素及其抗氧化活性分析. *食品科学*, 2013, 34(16): 279-283]
- Ren DD, Chen Q, Qin ZZ, *et al.* Effects of different treatments on carotenoid levels in kelp *Laminaria japonica*. *Fisheries Science*, 2011, 30(11): 673-676 [任丹丹, 陈倩, 秦振中, 等. 不同处理方式对海带类胡萝卜素含量的影响. *水产科学*, 2011, 30(11): 673-676]
- Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, *et al.* Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Eye Research*, 2005, 81(4): 422-428
- Wang J, Chen S, Xu S, *et al.* *In vivo* induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid, associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice. *Marine Drugs*, 2012, 10(9): 2055-2068
- Wang SH. Studies on the isolation, identification, and antitumor bioactivities of fucoxanthin in algae. Master's Thesis of Ocean University of China, 2010, 39-49 [汪曙晖. 海藻中岩藻黄素的分离鉴定及抗肿瘤活性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 39-49]
- Wang SH, Xue CH. Chemical structure, properties and bioactivities of fucoxanthin. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(6): 408-410 [汪曙晖, 薛长湖. 岩藻黄素的化学结构、性质和功能. *食品工业科技*, 2010, 31(6): 408-410]
- Wang SK, Li Y, White WL, *et al.* Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* containing fucoxanthin as potential functional biomaterials against cancer *in vitro*. *Journal of Functional Biomaterials*, 2014, 5(2): 29-42
- Yan XJ, Fan X, Lou QX, *et al.* Isolation and quantification of carotenoids from marine algae. *Studia Marine Sinica*, 2001(1): 108-114 [严小军, 范晓, 姜清香, 等. 海藻中类胡萝卜素的提取及含量测定. *海洋科学集刊*, 2001(1): 108-114]
- Yao P, Yu ZG, Deng CM. Pigment signatures of some diatoms isolated from China seas. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 25(1): 108-118
- Zhan DM, Wang XY, Xin ML, *et al.* Nutritional constituents of three kinds of Sargassum. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2016, 32(3): 221-225 [詹冬梅, 王翔宇, 辛美丽, 等. 三种马尾藻的营养组成分析. *广西科学院学报*, 2016, 32(3): 221-225]
- Zhang WY, Gao BY, Lei XQ, *et al.* Progress on physicochemical and biological properties, preparation techniques and physiological activities of fucoxanthin. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2015, 34(3): 81-95 [张文源, 高保燕, 雷学青, 等. 岩藻黄素的理化与生物学特性、制备技术及其生理活性研究进展. *中国海洋药物*, 2015, 34(3): 81-95]
- Zhao D, Kim SM, Pan CH, *et al.* Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food Chemistry*, 2014, 145: 505-513

## Determination of Fucoxanthin in Brown Seaweed Samples by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography

LIU Xiaofang<sup>1</sup>, JIANG Yongyi<sup>2</sup>, HOU Qinshuai<sup>1,3</sup>, MIAO Junkui<sup>1</sup>, LENG Kailiang<sup>1①</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Shandong Cigna Detection Technology Co., Ltd, Qingdao 266101;

3. College of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266021)

**Abstract** To investigate the influences of different drying methods on the levels of fucoxanthin, a new RP-HPLC method was established to determine the fucoxanthin content in the fresh or dried kelp and sargassum samples. The samples were extracted by methanol and then treated by C18 column solid-phase extraction to remove the other liposoluble components. The separation column was ZORBAX SB-C18(4.6×150 mm, 5 μm), which was held at 35°C. The mobile phase was composed of the gradient changes of methanol and ultrapure water at a flow rate of 0.7 ml/min. The sample loading volume was 10 μl. UV detection was performed at 450 nm. The method showed a good linear relationship between peak area and concentration over the range from 0.11 to 50 mg/L ( $R^2=0.9999$ ). The recoveries of fucoxanthin in three replicates ranged from 92.66% to 109.06%. The limit of detection was 0.03 mg/L. The RSD of precision was 3.46% to 4.61%. This method is simple, high sensitive and accurate. The levels of fucoxanthin in the fresh kelp and sargassum samples were 559.2 mg/kg (dry weight) and 680.4 mg/kg (dry weight), respectively. The fucoxanthin levels of the dried brown seaweed samples were significantly lower than those of fresh samples. All drying methods destroyed fucoxanthin in the seaweed samples, while freeze drying method was found superior to the low-temperature drying (45°C) method and natural drying method. Therefore, the fresh and freeze-drying seaweeds should be ensured to achieve high yield during the large-scale preparation of fucoxanthin. This research would provide the theoretical guidance and technical support for the development and utilization of seaweed fucoxanthin resource in the future.

**Key words** Reversed phase-high performance liquid chromatography; Kelp; Sargassum; Fucoxanthin; Drying methods

① Corresponding author: LENG Kailiang, E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170111001

http://www.yykxjz.cn/

刘芬, 孙晓杰, 朱文嘉, 郭莹莹, 何柳, 杨祯祯, 王媛媛, 文艺晓, 王联珠. 海参中单糖检测方法的建立及含量测定. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 177-182

Liu F, Sun XJ, Zhu WJ, Guo YY, He L, Yang ZZ, Wang YY, Wen YX, Wang LZ. Establishment and determination of monosaccharide in sea cucumber. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 177-182

## 海参中单糖检测方法的建立及含量测定\*

刘芬<sup>1,2</sup> 孙晓杰<sup>1</sup> 朱文嘉<sup>1</sup> 郭莹莹<sup>1</sup> 何柳<sup>1,3</sup>  
杨祯祯<sup>1,2</sup> 王媛媛<sup>1,2</sup> 文艺晓<sup>1,2</sup> 王联珠<sup>1①</sup>

(1. 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. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003)

**摘要** 本研究建立了高效阴离子交换-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)分析海参(*Apostichopus japonicus*)多糖的单糖组成及含量测定。通过比较 3 种蛋白去除法对海参多糖含量的影响,优化海参多糖纯化方法;比较淋洗液浓度对单糖分离效果的影响,优化海参中单糖分离的色谱条件。结果显示,Sevag 法去蛋白的效果最好,在淋洗液为 20 mmol/L NaOH 的条件下分离岩藻糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖和乳糖;在淋洗液为 160 mmol/L NaOH 和 200 mmol/L NaAC 的条件下分离葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸。各单糖标准曲线的线性相关系数不低于 0.998,检出限为 2.5~50  $\mu\text{g/L}$ ,加标回收率在 83.6%~113.1%之间。该方法可测定海参多糖的中性糖、氨基糖和糖醛酸,可作为海参及其制品中的单糖分析及定量方法,为相关标准的制定提供参考。

**关键词** 高效阴离子交换-脉冲安培检测法; 海参多糖; 单糖测定

**中图分类号** TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0177-06

海参(*Apostichopus japonicus*)是我国传统的名贵海珍品,营养丰富,蛋白质含量高,脂肪含量低,不含胆固醇,富含多种微量营养成分(Shi *et al.*, 2016)。此外,海参还具有较高的药用价值,对治疗肺结核、再生障碍性贫血、糖尿病等有一定疗效(林威威等, 2011)。海参多糖是海参体壁重要的活性成分之一,其化学组成能直接反映海参的品质(姜健等, 2004)。目前,在海参体壁中发现的多糖分为两大类:海参糖胺聚糖和海参岩藻多糖。海参糖胺聚糖是由 D-N-乙酰氨基半乳糖、D-葡萄糖醛酸、L-岩藻糖和硫酸酯基组成的分支杂多糖,相对分子量为 4~5 万道尔顿;海参岩藻多糖是由 L-岩藻糖构成的支链匀多糖,相对

分子量为 8~10 万道尔顿(樊绘曾, 2001)。海参多糖含量可占干参总有机物的 6%以上(刘琪等, 2015),具有抗肿瘤(Song *et al.*, 2013)、抗凝血(Pomin, 2012)、抗氧化(Liu *et al.*, 2012)、抗高血脂(Olivera-Castillo *et al.*, 2013)、抗高血糖(Hu *et al.*, 2013)等多种生物学功能。

高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)近年来发展迅速,在糖和糖醇等的应用已较为成熟(刘婷, 2009),比如食用菌和植物多糖的单糖分析等,在动物多糖单糖分析上的相关报道较少,海参中仅用于硫酸基含量的测定(尹利昂, 2009)。和植物多糖不同,海参多糖不能采用水提等非降解法,需要采用酶解的方式提取后再水解成单糖,增加了前处理

\* 农业行业标准制定与修订(农产品质量安全)项目(2130109201515026-15)资助 [This work was supported by Agricultural Industry Standard Setting and Revision Program (Quality and Safety of Agricultural Products) (2130109201515026-15)]. 刘芬, E-mail: liufeniran@sina.com

① 通讯作者: 王联珠, 研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-11, 收修改稿日期: 2017-03-01



的难度。海参多糖含有中性糖、氨基糖和糖醛酸,优化淋洗液浓度和梯度以确保每种单糖都能出峰。本研究采用 HPAEC-PAD 方法首次建立了以 CarboPac PA10 糖分析柱、NaOH 溶液和 NaAC 溶液梯度淋洗,分析海参中的 10 种单糖,包括中性糖、氨基糖和糖醛酸,为海参及其制品中单糖含量的检测方法及标准的制定提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

**1.1.1 实验材料** 实验用活刺参样品均于 2016 年 6 月购于山东省青岛市新贵都水产批发市场,重量为(200±10) g/只,淡干刺参即鲜活刺参经去内脏清洗后煮制 40 min 后烘干制成;冻干刺参即鲜活刺参经去内脏清洗后放入冷冻干燥机中冻干制成;盐干刺参即鲜活刺参经去内脏清洗后盐渍再烘干制成。

**1.1.2 主要试剂** 10 种单糖标准物质: L-岩藻糖(L-Fucose)、D-半乳糖(D-Galactosamine)、D-甘露糖(D-Mannose)、D-阿拉伯糖(D-Arabinose)、D-葡萄糖(D-Glucose)、D-乳糖(D-Lactose)、D-氨基葡萄糖(D-Glucosamine)、D-氨基半乳糖(D-Galactosamine)、D-半乳糖醛酸(D-Galacturonic acid)、D-葡萄糖醛酸(D-Glucuronic acid),纯度均≥98%,购于美国 Sigma 公司。

无水乙醇、苯酚、浓硫酸、丙酮、三氯甲烷、正丁醇、乙酸钠、EDTA、L-半胱氨酸、50%氢氧化钠溶液(色谱纯,购于美国麦克林公司)、木瓜蛋白酶(分析纯,美国 Sigma 公司),其余试剂为国产分析纯。

**1.1.3 仪器与设备** ICS-3000 离子色谱仪(配备电化学检测器),CarboPac PA10 糖保护柱(美国戴安);CarboPac PA10 糖分析柱(0.4 mm×250 mm,美国戴安);V1800 型可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);高速离心机(赛默飞世尔);DFY-300 型摇摆式高速万能粉碎机(温岭市林大机械);SP-7417 电动研磨搅拌机(德清拜杰电器);ZRD-A7080 全自动新型鼓风干燥箱(上海智试分析仪器)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 蛋白去除方法的优化** 酶解法是动物多糖提取常用的方法,但经酶解法提取的海参多糖保留长度不一的肽链,为了进一步纯化海参多糖及减少对离子色谱柱的影响,海参多糖中残留的多肽还要通过其他方式去除。比较三氯乙酸法、Sevag 法、乙酸锌和亚铁氰化钾法 3 种方法去蛋白的效果,进一步提高海

参多糖得率。

**三氯乙酸法:**向海参多糖水溶液中加入 30%的三氯乙酸溶液缓慢搅拌至不再出现浑浊,静置、离心后去沉淀。

**乙酸锌和亚铁氰化钾法:**向海参多糖水溶液中加入乙酸锌和亚铁氰化钾溶液,混匀后静置离心。

**Sevag 法:**Sevag 试剂是将氯仿和正丁醇以 5:1 的比例混匀。向海参多糖水溶液中加入 1/4 体积的 Sevag 试剂,混匀后取出上层水溶液,重复操作 3 次。

**1.2.2 色谱条件的优化** 淋洗液为 NaOH 溶液,分别采用 400、120、80、20 mmol/L NaOH 溶液,通过分析单糖的分离效果,选择中性糖和氨基糖的最佳淋洗液浓度。采用 200 mmol/L NaOH 和 1 mol/L NaAC 混合淋洗液,设置不同浓度梯度分离糖醛酸,选择糖醛酸分离的最佳淋洗液梯度。

**1.2.3 方法重复性和加标回收实验** 将 5 μg/ml 的单糖标准混合液进样 6 次,计算相对标准偏差。对于海参样品中不含有的单糖及含量低的单糖按照 1.0、2.0 和 5.0 mg/g 的添加量进行加标回收实验;对于样品中含量高的单糖按照含量的 0.5 倍、1 倍和 2 倍的添加量进行加标回收实验。平行测定 6 份,计算平均回收率和相对标准偏差。

**1.2.4 单糖含量的测定** 称取 2 g(精确到 0.001 g)海参样品,分别加入 30 ml 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲溶液、100 mg 木瓜蛋白酶、10 ml EDTA 溶液和 10 ml 半胱氨酸溶液,置于 60℃下振荡反应 24 h 之后,反应混合物离心。向上清液中加入 2 倍体积 95%乙醇,4℃静置过夜,离心弃上清液。沉淀经无水乙醇、丙酮洗涤后重新溶解并定容至 100 ml,取 4 ml 多糖水溶液采用 Sevag 法去蛋白。取 2 ml 海参多糖水溶液加入 1 ml 2 mol/L 三氟乙酸溶液,充氮封管,120℃水解 2 h(GB/T 33108-2016),中和后定容至 10 ml。取多糖水解液过 0.45 μm 水系滤膜,采用 HPAEC-PAD 进行单糖分析及含量测定。前处理方法参考盛文静等(2007),并在原来的基础上稍加改进。

**1.2.5 数据分析** 实验重复 3 次,每组实验设 3 组平行,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 SPSS 18.0 统计软件单因素分析(One-way ANOVA)对不同处理的差异进行统计分析,统计差异显著性水平为  $P<0.05$ ,比较采用 Duncan 法分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 海参多糖最佳去蛋白方法

分别采用三氯乙酸法、乙酸锌和亚铁氰化钾法及

Sevag 法去除海参多糖中的蛋白质, 结果见表 1。结果显示, 3 种去蛋白的方法差异性显著( $P<0.05$ ), 其中乙酸锌和亚铁氰化钾去除蛋白的方法得到的海参多糖含量最低, 表明多糖有损失, 效率低, 同时该法也引入了杂质离子, 因此, 不适用于离子交换色谱法。虽然三氯乙酸法得到的海参多糖含量最高, 但三氯乙酸引起多糖不必要的水解, 不利于海参多糖的纯化。Sevag 法去蛋白后和不去蛋白得到的海参多糖含量差异不显著, 表明 Sevag 法对蛋白去除的效果明显, 不会引起多糖的损失, 同时能够去除小分子多肽对离子色谱柱和离子色谱仪的影响。

表 1 不同蛋白沉淀剂对海参多糖纯化的影响

Tab.1 The effect of protein precipitants on the polysaccharide purification of sea cucumber

蛋白沉淀剂 Protein precipitant	海参多糖含量(以岩藻糖计) Content of sea cucumber polysaccharide (Count on fucose, %)
不加沉淀剂 Non-precipitant	6.46±0.23 <sup>b</sup>
三氯乙酸 TCA	11.46±0.39 <sup>a</sup>
乙酸锌和亚铁氰化钾 Zinc acetate & Potassium Ferrocyanide	4.30±0.31 <sup>c</sup>
Sevag 法	7.14±0.31 <sup>b</sup>

注: 同一列中不同上标字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Data within the same column with different letters were significantly different ( $P<0.05$ )

## 2.2 单糖分离的最佳淋洗液梯度

结果显示, 当浓度为 400 mmol/L NaOH 溶液时, 各单糖的色谱峰几乎不能分开, 表明淋洗液强度太大, 单糖在色谱柱上保留变弱, 导致保留时间太短, 不能实现单糖的有效分离, 因此, 需要降低 NaOH 的浓度(李静等, 2012)。由图 1 可见, 随着淋洗液浓度的降低, 单糖与离子基团交换时间长, 各单糖标准品逐渐分离, 当 NaOH 溶液浓度为 20 mmol/L 时, 单糖实现了有效分离。在该条件下, 8 种中性糖和氨基糖(Fuc、Glc、Lac、Gal、Man、Ara、GlcN 和 GalN)实现了较好分离。

采用 160 mmol/L NaOH-200 mmol/L NaAC 混合淋洗液分离 2 种更难洗脱的糖醛酸, 葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸混合标准溶液的色谱图见图 2。

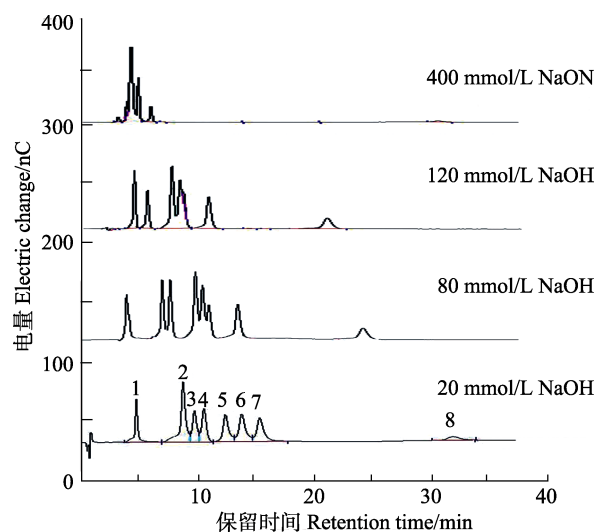
## 2.3 方法线性关系和回收率

HPAEC-PAD 的色谱条件经优化后, 各单糖标准线性方程的相关系数均大于 99.8%, 线性良好, 线性范围在 0.25~50  $\mu\text{g/ml}$  之间。将 5  $\mu\text{g/ml}$  的单糖标准混

合液进样 6 次, 相对标准偏差在 0.81%~3.81%之间。加标回收率在 83.6%~113.1%之间, 结果见表 2。

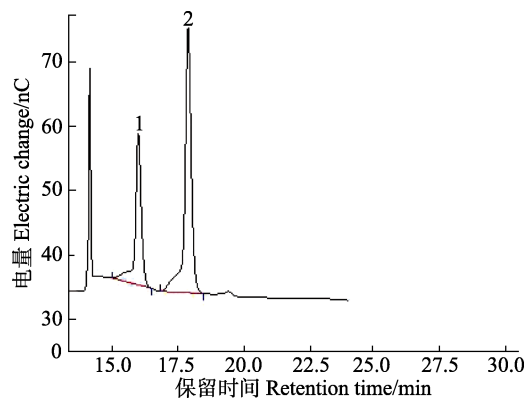
## 2.4 单糖含量的测定结果

将刺参多糖的单糖水解液进行 HPAEC-PAD 测定, 将刺参样品的色谱图与单糖标准品色谱图进行对比分析, 根据保留时间定性, 峰面积定量, 计算各海参中单糖的含量, 结果见表 3。刺参多糖含有岩藻糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸, 加工方式的不同影响海参中单糖的组成比例。



1: 岩藻糖; 2: 氨基半乳糖; 3: 阿拉伯糖; 4: 氨基葡萄糖;  
5: 半乳糖; 6: 甘露糖; 7: 葡萄糖; 8: 乳糖  
1: Fucose; 2: Galactosamine; 3: Arabinose; 4: Glucosamine;  
5: Galactose; 6: Mannose; 7: Glucose; 8: Lactose

图 1 淋洗液浓度对单糖分离的影响  
Fig.1 The effect of eluent concentration on the monosaccharide separation



1: 葡萄糖醛酸; 2: 半乳糖醛酸  
1: Glucuronic acid; 2: Galacturonic acid

图 2 5  $\mu\text{g/ml}$  2 种糖醛酸混合标准溶液的离子色谱  
Fig.2 HPAEC-PAD chromatogram of two mixed uronic acid standards (5  $\mu\text{g/ml}$ )

表2 淡干刺参中10种单糖的加标回收率

Tab.2 The recovery rate of ten monosaccharides in dried sea cucumber ( $n=6$ )

单糖 Monosaccharide	本底均值 Mean (mg/g)	加标回收率 Recovery rate (%)	相对标准偏差 RSD (%)
岩藻糖 Fuc	16.0±0.36	88.6~101.3	3.00
氨基半乳糖 GalN	0.10±0.05	83.6~99.2	0.81
阿拉伯糖 Ara	1.85±0.47	87.0~113.1	2.91
氨基葡萄糖 GlcN	3.28±0.16	93.3~102.7	2.64
半乳糖 Gal	10.1±0.51	85.9~99.9	2.50
葡萄糖 Glc	0.00±0.00	85.5~90.1	3.25
甘露糖 Man	4.37±0.56	92.3~96.1	3.81
乳糖 Lac	0.00±0.00	89.9~99.5	2.94
半乳糖醛酸 GalUA	6.05±0.15	98.9~96.7	1.46
葡萄糖醛酸 GlcUA	1.15±0.01	96.4~104.6	1.86

表3 海参多糖单糖组成测定结果

Tab.3 The composition of monosaccharide in sea cucumber polysaccharide

样品名称 Sample name	单糖含量 Content of Monosaccharide (mg/g)							
	岩藻糖 Fuc	氨基半乳糖 GalN	阿拉伯糖 Ara	氨基葡萄糖 GlcN	半乳糖 Gal	甘露糖 Man	半乳糖醛酸 GalUA	葡萄糖醛酸 GlcUA
鲜刺参 Fresh sea cucumber	1.79±0.32	0.45±0.18	0.95±0.01	0.08±0.02	5.61±0.02	2.74±0.01	0.68±0.02	0.57±0.21
干刺参 Dried sea cucumber <sup>1</sup>	16.0±0.36	0.10±0.05	1.85±0.47	3.28±0.16	10.1±0.51	4.37±0.56	6.05±0.15	1.15±0.01
盐干刺参 Salty-dried sea cucumber	11.25±1.76	0.11±0.01	0.65±0.03	2.20±0.09	7.02±0.52	2.22±0.10	0.59±0.23	0.85±0.49
冻干刺参 Frozen-dried sea cucumber	8.63±0.22	0.00±0.00	0.13±0.02	3.23±0.55	2.00±0.05	2.52±0.10	5.63±0.10	0.15±0.03
淡干刺参 Dried sea cucumber	11.35±0.59	0.45±0.18	0.28±0.02	1.21±0.04	6.26±0.17	2.46±0.13	9.32±0.04	2.47±0.19

1. 干刺参是鲜活刺参未经煮制直接烘干所得

1. Dried sea cucumber was dried directly from fresh sea cucumbers without cooking

### 3 讨论

#### 3.1 蛋白去除对海参多糖含量的影响

海参多糖提取的同时,与糖连接的蛋白也同时被提取(王远红等,2005),残留的蛋白会堵塞分析柱,且会影响离子色谱仪的稳定性,因此,蛋白去除是海参多糖进一步纯化和分级的前提(殷涌光等,2006),张红静(2006)比较不同蛋白去除方法发现,Sevag法去蛋白的效率最高,可用于动物多糖的纯化。李莘莘等(2006)研究紫贻贝(*Mytilus edulis*)多糖蛋白质脱除方法,发现酶法与Sevag法结合能有效去除紫贻贝多糖中的蛋白质,蛋白脱除率为78.5%。因此,Sevag法能够有效去除海参多糖中的小分子肽,同时不会引起多糖的损失,是动物多糖蛋白去除最常用的方法。

#### 3.2 淋洗液浓度对单糖分离效果的影响

HPAEC-PAD是利用糖分子在pH>10的淋洗液中带负电的形式,能够结合在阴离子交换柱上并被分

离,因此,调节分离效率和选择性的重要参数是氢氧化物浓度(曹莉,2012)。

在淋洗液浓度为20 mmol/L的条件下,葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸没有分离,原因可能是NaOH的浓度太低,不能将糖醛酸解析出来,因此,需要更高浓度的淋洗液。在研究中发现,当单独采用NaOH溶液并不能分离糖醛酸,需加入洗脱能力更强的NaAC溶液作为淋洗液(吴胜芳等,2005;彭云云等,2009;戴军等,2006)。但在研究中发现,如果淋洗液的浓度过高会造成基线不稳,同时会影响中性糖和氨基糖的分离。因此,可采用2种不同的色谱条件分别分离海参多糖中的单糖,即采用低淋洗液浓度条件分离海参多糖中的中性糖和氨基糖,采用高淋洗液浓度条件分离海参多糖中的糖醛酸。

#### 3.3 单糖含量测定结果的比较

海参多糖由不同类型的单糖组成,且单糖存在互变异构、差向异构以及各单糖具有相似结构等特征,

所以海参多糖的单糖组成分析是进行海参多糖质量控制和获取多糖基本信息的重要环节(Fonseca *et al.*, 2009)。HPAEC-PAD 分析单糖组成具有简单、精密度高、无需衍生等优点, 在植物多糖和真菌多糖的应用广泛, 本研究首次将 HPAEC-PAD 应用于动物多糖的单糖分析。将本研究结果和 PMP-HPLC 分析海参多糖的单糖组成结果(田鑫等, 2014)相比, 就单糖种类来看, 发现 PMP-HPLC 的测定结果缺少 Ara 和 GalUA 这 2 种单糖, HPAEC-PAD 测得的海参中单糖的种类更全面, 这可能和海参多糖的提取方法有关。

### 3.4 加工工艺对海参中单糖含量的影响

传统淡干海参的加工工艺都要经过煮制和烘干, 煮制的过程会丢失部分海参单糖, 会对海参的营养价值有影响。冻干海参一定程度上保留了海参多糖, 但盐干海参和盐渍后再脱水而成的淡干海参单糖的含量明显降低, 单糖的种类明显减少。没有经过煮制而直接烘干的海参, 其单糖的含量明显高于其他加工方式的海参, 表明海参的加工还需要新的科技条件的支撑, 最大限度地保留海参单糖。

## 4 结论

本研究采用 HPAEC-PAD 对海参多糖水解得到的单糖进行分析, 使用 CarboPac PA10 糖分析柱, 以一定浓度 NaOH 溶液和 NaAC 溶液为淋洗液进行梯度淋洗。该方法可测定海参中的中性糖、氨基糖和糖醛酸, 分离效果好, 操作简单, 无需衍生, 精密度高, 可为海参中单糖检测标准的制定提供参考。

## 参 考 文 献

- Cao L. Separation and detection of monosaccharide by ion chromatography. *Chinese Journal of Medical Guide*, 2012(10): 1839-1840, 1838 [曹莉. 单糖的离子色谱法分离及检测. *中国医药导刊*, 2012(10): 1839-1840, 1838]
- Dai J, Liang LN, Yin HP, *et al.* Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides from *D. salina* by high-performance anion-exchange chromatography. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(11): 131-135 [戴军, 梁立娜, 尹鸿萍, 等. 高效阴离子交换色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成. *食品与发酵工业*, 2006, 32(11): 131-135]
- Fan HZ. Study on development of sea cucumber and its components in health care. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2001, 82(4): 37-44 [樊绘曾. 海参: 海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发. *中国海洋药物*, 2001, 82(4): 37-44]
- Fonseca R, Sabtos G, Mouro P. Effects of polysaccharides enriched in 2, 4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding: Practical and conceptual implications. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009, 102(5): 829-836
- GB/T33108-2016, determination of saponins in sea cucumbers and their products by high performance liquid chromatography [GB/T33108-2016, 海参及其制品中海参皂苷的测定 高效液相色谱法]
- Hu S, Chang Y, Wang J, *et al.* Fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber in combination with rosiglitazone improved glucose metabolism in the liver of the insulin-resistant mice. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2013, 77(11): 2263-2268
- Jiang J, Yang BL, Tai Y. Studies on resources and bioactive substances of sea cucumber. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(5): 537-540 [姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究. *生物技术通讯*, 2004, 15(5): 537-540]
- Li J, Li RY, Liang LN. Determination of monosaccharide constituents in *Lycium barbarum* polysaccharide using capillary ion chromatography with pulsed amperometric detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(9): 1415-1420 [李静, 李仁勇, 梁立娜. 毛细管型离子色谱-脉冲安培法检测枸杞多糖的单糖组成. *分析化学*, 2012, 40(9): 1415-1420]
- Li PP, Ding XL. Study on method of protein removal from crude *Mytilus edulis* Linnaeus polysaccharides. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(3): 3328-3332 [李莘莘, 丁霄霖. 紫贻贝多糖脱除蛋白质方法的研究. *上海水产大学学报*, 2006, 15(3): 3328-3332]
- Lin WW, Zhang J, Wang MJ. Purification and physico-chemical analysis of polysaccharides from sea cucumber. *Shandong Fishery*, 2011, 28(3): 40-43 [林威威, 张健, 王茂剑. 海参多糖的纯化及理化分析研究进展. *齐鲁渔业*, 2011, 28(3): 40-43]
- Liu Q, Dai QC. Study on the activity of polysaccharides in sea cucumber. *Heilongjiang Science and Technology Information*, 2015(9): 54 [刘琪, 代岐昌. 海参多糖活性研究进展. *黑龙江科技信息*, 2015(9): 54]
- Liu T. Studies of detecting polysaccharides with IC. Master's Thesis of Southwest University, 2009, 11-16 [刘婷. 多糖类物质的离子色谱检测技术研究. *西南大学硕士研究生学位论文*, 2009, 11-16]
- Liu X, Sun Z, Zhang M, *et al.* Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicas*. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(4): 1664-1670
- Olivera-Castillo L, Davalos A, Grant G, *et al.* Diets containing sea cucumber (*Isostichopus badionotus*) meals are hypocholesterolemic in young rats. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79446
- Peng YY, Wu SB, Cheng JN, *et al.* Determination of monosaccharide and uronic acid in bagasse hemicellulose by ion chromatography. *Science and Technology of Papermaking*, 2009, 28(5): 10-12, 86 [彭云云, 武书彬, 程江娜, 等. 离子色谱法测定蔗渣半纤维素中的单糖及糖醛酸含量. *造纸科学与技术*, 2009, 28(5): 10-12, 86]
- Pomin VH. Fucanomics and galactanomics: Marine distribution, medicinal impact, conceptions, and challenges. *Marine Drugs*, 2012, 10(4): 793-811
- Sheng WJ, Xue CH, Zhao QX, *et al.* Chemical component analysis of polysaccharides from different sea cucumbers. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2007, 26(1): 44-49 [盛文

- 静, 薛长湖, 赵庆喜, 等. 不同海参多糖的化学组成分析比较. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 44–49]
- Shi SJ, Feng WJ, Hu S. Bioactive compounds of sea cucumbers and their therapeutic effects. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(3): 549–558
- Song Y, Jin SJ, Cui LH, *et al.* Immunomodulatory effect of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular carcinoma in rats. Molecules, 2013, 18(6): 7179–7193
- Tian X, Sheng WJ, Zhao YY, *et al.* Simultaneous determination of uronic acids, amino sugars and neutral sugars in polysaccharide from sea cucumber. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 85–89, 94 [田鑫, 盛文静, 赵园园, 等. 刺参多糖中糖醛酸、氨基糖和中性单糖的同步测定方法研究. 食品工业科技, 2014, 35(15): 85–89, 94]
- Wang YH, Lü ZH, Jiang TF, *et al.* Extraction and determination of polysaccharides in the Holothuria. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2005, 35(6): 109–112 [王远红, 吕志华, 姜廷福, 等. 梅花参中多糖提取工艺及含量测定的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(6): 109–112]
- Wu SF, Wang SY, Tao GJ, *et al.* Determination of galacturonic acid and glucuronic acid in the hydrolyzed polysaccharide solution by ion chromatography. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(4): 86–88 [吴胜芳, 王树英, 陶冠军, 等. 离子色谱法测定多糖水解液中的半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 86–88]
- Yin LA. Isolation, purification and characterization of different kinds of sea cucumber polysaccharides. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009, 37–40 [尹利昂. 不同海参多糖的分离纯化及生化性质分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009, 37–40]
- Yin YG, Han YZ, Ding HW. Progress in research on animal polysaccharides. Food Science, 2006, 27(3): 256–263 [殷涌光, 韩玉珠, 丁宏伟. 动物多糖的研究进展. 食品科学, 2006, 27(3): 256–263]
- Zhang HJ. Polysaccharide fractionation by ultrafiltration—a novel method for isolation and purification of lentinan from *Lentinus edodes*. Master's Thesis of Tianjin University, 2006 [张红静. 超滤法提取与纯化香菇多糖. 天津大学硕士研究生学位论文, 2006]

(编辑 冯小花)

## Establishment and Determination of Monosaccharide in Sea Cucumber

LIU Fen<sup>1,2</sup>, SUN Xiaojie<sup>1</sup>, ZHU Wenjia<sup>1</sup>, GUO Yingying<sup>1</sup>, HE Liu<sup>1,3</sup>, YANG Zhenzhen<sup>1,2</sup>,  
WANG Yuanyuan<sup>1,2</sup>, WEN Yixiao<sup>1,2</sup>, WANG Lianzhu<sup>1①</sup>

(1. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) was widely used to analyze monosaccharide in botanical and fungal polysaccharides, but lightly used in marine animal polysaccharides. A method has been developed for determining monosaccharide composition and content in sea cucumber polysaccharide by HPAEC-PAD. Purifying sea cucumber polysaccharide were optimized by comparing three deproteinization methods. Optimum chromatographic conditions for the separation of monosaccharide were optimized by comparing eluent concentration on the separation of monosaccharide. The results indicated that the reagent of Sevag removed micro-molecule polypeptide more effectively than others from sea cucumber polysaccharides. The concentration of eluent had significant effect on separating monosaccharide. Eight monosaccharide, such as Fuc, Gal, Ara, GalN, GlcN, Man, Glc, and Lac, were separated using 20 mmol/L NaOH as eluent. GlcUA and GalUA were separated by 160 mmol/L NaOH and 200 mmol/L NaAC as eluent. The linear coefficients of monosaccharide standard were above 0.998. The detection limit of each monosaccharide was between 2.5 and 50  $\mu\text{g/L}$ , and the recovery rates ranged from 83.6% to 113.1%. The method determining neutral sugar, amino sugar and uronic acid in sea cucumber polysaccharides could be used as analysis and quantitative method of monosaccharide in sea cucumber and its products. The composition and content of monosaccharide were significant indices for determining the biological activity of sea cucumber. The established method could provide basic monosaccharide information and promote the polysaccharides research progress in sea cucumber. It could provide references for the establishment of sea cucumber standards, and expand the application of active substances in medicine and other fields.

**Key words** HPAEC-PAD; Sea cucumber polysaccharide; Monosaccharide determination

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglzl@ysfri.ac.cn

# 《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
张士瓘 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2期 2018年4月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.39 No.2 Apr. 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  
国内外公开发行人

定价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986187