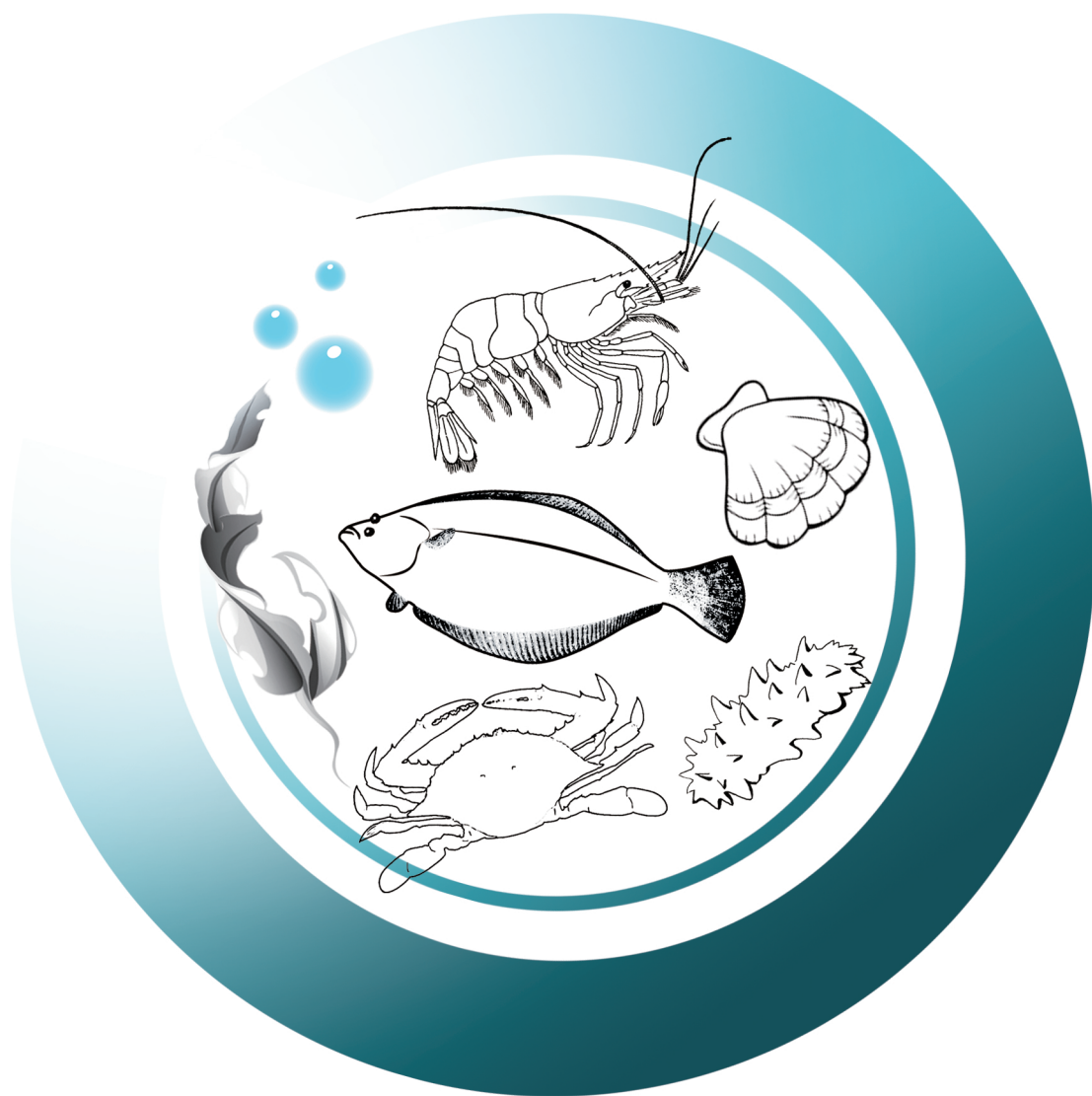


# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第39卷 VOL.39 第4期 NO.4



中国水产科学研究院黄海水产研究所  
中国水产学会

主办



科学出版社  
Science Press

出版

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 39 卷 第 4 期

2018 年 8 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

- 北黄海獐子岛海域浮游植物沉降通量的周年变化 栾青杉 孙坚强 乔 芮 王 俊 臧有才 张 媛 (1)  
渤海浮游植物群落的长期变化(1959~2015) 栾青杉 康元德 王 俊 (9)  
渤海中国对虾生态容量变化研究 林 群 单秀娟 王 俊 李忠义 (19)

### 研究论文

- 大菱鲆受精卵显微注射技术的建立 崔忠凯 王 倩 刘新富 孟 振 陈松林 (30)  
虹鳟免疫诱导型基因 *Cathelicidin2* 启动子功能分析 赵紫霞 许 建 江炎亮 白庆利 蒋立坤 陈葆华 徐 鹏 (37)  
金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式 何暮春 张金勇 刘长琳 项子龙 柳淑芳 庄志猛 薛同明 (46)  
大黄鱼幼鱼饲料中大豆磷脂油与菜籽油的适宜配比 闫春为 陈乃松 李自强 连雪原 王孟乐 (56)  
n-3/n-6 长链多不饱和脂肪酸对大菱鲆幼鱼脂肪沉积、脂肪吸收及代谢相关酶活性和血清生化指标的影响 谭 青 韩秀杰 王际英 李宝山 李学丽 郝甜甜 张利民 (66)  
凡纳滨对虾亲虾繁殖期间适宜投喂频率的研究 汪春玲 梁萌青 徐后国 (74)  
凡纳滨对虾感染肝肠胞虫的群体及组织间差异性分析 程东远 邱 亮 宋增磊 万晓媛 董 宣 谢国驷 黄 捷 (83)  
凡纳滨对虾感染致急性胰腺腺坏死病副溶血弧菌(*Vp<sub>AHPND</sub>*)的定量分析 陈蒙蒙 董 宣 邱 亮 万晓媛 谢国驷 黄 捷 (93)  
脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达 马 骊 葛倩倩 许 杨 彭素晓 李 健 (101)  
脊尾白虾 *E75* 基因克隆及 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 在不同蜕皮分期的表达分析 许 杨 王佳佳 葛倩倩 崔彦婷 马 骊 李 健 (110)  
温度对凸壳肌蛤能量收支的影响 吕旭宁 王晓芹 吴亚林 姜妮妮 房景辉 方建光 王军威 张义涛 蒋增杰 (119)  
瘤背石磺肌球蛋白重链(*MyHC*)基因的克隆与表达分析 顾冰宁 刘 欣 沈和定 王冬凤 杨铁柱 朱 敏 史艳梅 李柏航 (126)  
虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝中的通用性研究 张广明 孙秀俊 吴 彪 杨爱国 刘志鸿 周丽青 刘寒苗 赵 庆 (139)  
魁蚶中国群体与韩国群体杂交子一代养成期生长比较 郑言鑫 蔡忠强 王 鹏 吴 彪 张树宝 赵春暖 于 涛 林建国 孙 超 (147)  
海带 *hsp70* 基因的克隆、分析及转录水平定量研究 袁艳敏 刘福利 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 王飞久 (152)  
3 种氮源加富对半叶马尾藻幼苗生长和生化组成的影响 韩婷婷 齐占会 黄洪辉 梁庆洋 (159)  
微波-干灰化混合消解和原子荧光光度法测定鱼粉中总砷 刘 慧 李应东 张凤枰 刘耀敏 (167)

### 综述

- Kisspeptin 对鱼类生殖轴的调控机制研究 王 滨 柳学周 徐永江 史 宝 刘 权 (173)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.39 No.4 August 2018

Annual Variations in the Phytoplankton Settling Flux in the Northern Yellow Sea off Zhangzi Island .....	(1)
..... LUAN Qingshan, SUN Jianqiang, Qiao Rui, WANG Jun, ZANG Youcai, ZHANG Yuan	
Long-Term Changes in the Phytoplankton Community in the Bohai Sea (1959~2015) .....	(9)
..... LUAN Qingshan, KANG Yuande, WANG Jun	
Changes in Chinese Shrimp ( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ) Carrying Capacity of the Bohai Sea .....	(19)
..... LIN Qun, SHAN Xiujuan, WANG Jun, LI Zhongyi	
Establishment of a Microinjection Technique in Zygote of Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) .....	(30)
..... CUI Zhongkai, WANG Qian, LIU Xinfu, MENG Zhen, CHEN Songlin	
Functional Analysis of the Immune-Induced Promoter of the Rainbow Trout <i>Cathelicidin2</i> Gene .....	(37)
..... ZHAO Zixia, XU Jian, JIANG Yanliang, BAI Qingli, JIANG Likun, CHEN Baohua, XU Peng	
DNA Methylation Level and Pattern in Growing <i>Sepia esculenta</i> Hoyle .....	(46)
..... HE Muchun, ZHANG Jinyong, LIU Changlin, XIANG Zilong, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng, XUE Tongming	
Suitable Ratio of Soybean Phospholipid Oil to Rapeseed Oil in the Diet of Juvenile Large Yellow Croaker ( <i>Larimichthys crocea</i> ) .....	(56)
..... YAN Chunwei, CHEN Naisong, LI Ziqiang, LIAN Xueyuan, WANG Mengle	
Effects of n-3/n-6 LC-PUFA on Fat Deposition, Digestion, and Lipid Metabolism in Juvenile Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) .....	(66)
..... TAN Qing, HAN Xiujie, WANG Jiying, LI Baoshan, LI Xueli, HAO Tiantian, ZHANG Limin	
Optimum Feeding Frequency for <i>Litopenaeus vannamei</i> During the Breeding Period .....	(74)
..... WANG Chunling, LIANG Mengqing, XU Houguo	
Differences Between Populations and Tissues of <i>Litopenaeus vannamei</i> Infected with <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> .....	(83)
..... CHENG Dongyuan, QIU Liang, SONG Zenglei, WAN Xiaoyuan, DONG Xuan, XIE Guosi, HUANG Jie	
Quantitative Analysis of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Causing <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( <i>Vp<sub>AHPND</sub></i> ) in Infected <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	(93)
..... CHEN Mengmeng, DONG Xuan, QIU Liang, WAN Xiaoyuan, XIE Guosi, HUANG Jie	
Cloning of the Translationally Controlled Tumor Protein Gene ( <i>TCTP</i> ) and Expression Analysis of Autophagy Regulatory Related Genes During the Development of Ovary in <i>Exopalaemon carinicauda</i> .....	(101)
..... MA Li, GE Qianqian, XU Yang, PENG Suxiao, LI Jian	
Cloning of <i>E75</i> Gene and Expression Analysis of <i>E75</i> , <i>ECR</i> and <i>RXR</i> During Different Molting Stages of <i>Exopalaemon carinicauda</i> .....	(110)
..... XU Yang, WANG Jiajia, GE Qianqian, CUI Yanting, MA Li, LI Jian	
Effect of Temperature on the Energy Budget of <i>Arcuatula senhousi</i> .....	(119)
..... LÜ Xuning, WANG Xiaoqin, WU Yalin, JIANG Weiwei, FANG Jinghui, FANG Jianguang, WANG Junwei, ZHANG Yitao, JIANG Zengjie	
Molecular Cloning and Analysis of the <i>MyHC</i> Gene in <i>Onchidium struma</i> .....	(126)
..... GU Bingning, LIU Xin, SHEN Heding, WANG Dongfeng, YANG Tiezhu, ZHU Min, SHI Yanmei, LI Bohang	
Transferability of EST-SSR from <i>Patinopecten yessoensis</i> into <i>Chlamys farreri</i> .....	(139)
..... ZHANG Guangming, SUN Xiujun, WU Biao, YANG Aiguo, LIU Zhihong, ZHOU Liqing, LIU Hanmiao, ZHAO Qing	
Growth of a First-Generation Hybrid Between Chinese and Korean Populations of <i>Scapharca broughtonii</i> During the Adult Culture Stage .....	(147)
..... ZHENG Yanxin, CAI Zhongqiang, WANG Peng, WU Biao, ZHANG Shubao, ZHAO Chunnuan, YU Tao, LIN Jianguo, SUN Chao	
Cloning, Bioinformatics and Quantitative Expression Analysis of <i>hsp70</i> in <i>Saccharina japonica</i> .....	(152)
..... YUAN Yanmin, LIU Fuli, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao, WANG Feijiu	
Effects of Enrichment with Three Nitrogen Sources on Growth and Biochemical Composition of <i>Sargassum hemiphyllum</i> Seedlings .....	(159)
..... HAN Tingting, QI Zhanhui, HUANG Honghui, LIANG Qingyang	
Determination of Total Arsenic in Fishmeal Using Microwave-Dry Ashing Mixed Digestion Coupling with Atomic Fluorescence Spectrophotometry .....	(167)
..... LIU Hui, LI Yingdong, ZHANG Fengping, LIU Yaomin	
Regulatory Mechanisms of Kisspeptin on the Reproductive Axis in Fish .....	(173)
..... WANG Bin, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, LIU Quan	

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180317001

http://www.yykxjz.cn/

栾青杉, 孙坚强, 乔芮, 王俊, 臧有才, 张媛. 北黄海獐子岛海域浮游植物沉降通量的周年变化. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 01-08

Luan QS, Sun JQ, Qiao R, Wang J, Zang YC, Zhang Y. Annual variations in the phytoplankton settling flux in the northern Yellow Sea off Zhangzi Island. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 01-08

## 北黄海獐子岛海域浮游植物沉降通量的周年变化\*

栾青杉<sup>1,2</sup> 孙坚强<sup>1</sup> 乔芮<sup>1</sup> 王俊<sup>1,3①</sup> 臧有才<sup>4</sup> 张媛<sup>4</sup>



- (1. 农业农村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试点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. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071; 4. 獐子岛集团股份有限公司 大连 116001)

**摘要** 于 2011 年 9 月至 2012 年 11 月, 在北黄海獐子岛邻近海域, 利用德国 MST24 型沉积物捕集器, 开展了 5 d 期采样频率的浮游植物组成及其沉降通量的周年变化研究。71 份沉降样品共记录浮游植物 51 属 93 种, 其中硅藻 38 属 66 种, 是主要的沉降类群。沉降优势种主要有具槽帕拉藻 (*Paralia sulcata*)、离心列海链藻 (*Thalassiosira excentrica*)、布氏双尾藻 (*Ditylum brightwellii*)、辐射圆筛藻 (*Coscinodiscus radiatus*)、八幅辐环藻 (*Actinocyclus octonarius*) 等硅藻物种, 以及小等刺硅鞭藻 (*Dictyochoa fibula*)、八幅硅鞭藻 (*Octactis octonaria*) 等硅鞭藻物种。浮游植物沉降通量变化在  $(6.1\sim 169)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 平均  $39.4\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 在春、秋季各出现 1 个高通量时段, 春季峰值主要为硅藻贡献, 而秋季峰值则由硅藻和硅鞭藻共同形成。沉降浮游植物作为獐子岛底播虾夷扇贝的重要饵料, 其种类组成及沉降通量的周年变化, 与獐子岛海域虾夷扇贝的底播、生长时节相关, 以具槽帕拉藻、海链藻、圆筛藻等硅藻属种为主的食物来源和结构是扇贝重要的饵料基础。旨在通过浮游植物沉降的时间序列研究, 查明獐子岛底播虾夷扇贝的饵料组成及其通量水平的周年变化特征, 为该水域可持续的底播养殖提供基础资料和参考依据。

**关键词** 浮游植物; 沉降通量; 周年变化; 獐子岛; 虾夷扇贝

**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0001-08

在海洋生态系统中, 浮游植物的初级生产过程通常处于真光层以内, 而通过沉降作用输出真光层的一部分初级生产常被认为是输出生产, 其通量大小、季节变化等特征, 将直接影响到海洋生物地球化学过程, 以及以输出生产为食物源的底栖生物 (Tallberg *et al.*, 1998)。海洋对大气 CO<sub>2</sub> 的调节主要是通过海洋生物泵过程来完成, 而沉降颗粒物是认识和表征这一过程变化的有力证据, 其来源、组成、季节变化和受控因

素的时间序列研究, 对于全球海洋通量以及气候变化的研究有着重要的意义 (陈建芳等, 1996)。

水体产生的颗粒物主要以沉降、平流等输运过程达到海底表面, 而浅海风浪、潮汐以及生物扰动等作用产生的底表沉积物再悬浮过程, 又给底层颗粒物沉降通量和组成带来影响 (张岩松等, 2004)。獐子岛海域位于北黄海, 是我国最大的虾夷扇贝底播养殖基地, 底播双壳贝类能高效地滤食底层浮游植物和悬浮

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (20603022015017-1; 20603022011001) 和“泰山学者”建设工程专项共同资助 [This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes (20603022015017-1; 20603022011001) and the Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province]. 栾青杉, E-mail: luanqs@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王 俊, 研究员, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-17, 收修改稿日期: 2018-05-25

颗粒物, 并通过下行控制作用改变浮游植物的群落结构, 进一步刺激表层浮游植物的生长, 形成很好的渔业碳汇功能(张继红等, 2007; 唐启升, 2011)。獐子岛所处的整个长海县海域, 浮游植物呈现春秋高、夏冬季低的季节变化特征, 优势种以圆筛藻属(*Coscinodiscus*)、角毛藻属(*Chaetoceros*)和海链藻属(*Thalassionema*)等硅藻属种为主(王鉴等, 1995), 此外浮游植物的自然演替为该海域海珍品(如扇贝)的生长与繁殖提供了丰富的天然饵料(徐铭等, 1994)。本研究于 2011~2012 年在獐子岛扇贝底播区中部海域, 通过沉积物捕集器的布放与回收, 对浮游植物沉降进行了时间序列的研究, 旨在查明扇贝饵料来源、组成及其通量水平的周年变化特征, 为该海域虾夷扇贝的底播养殖提供基础资料和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 捕集器布放及样品采集

本研究使用獐子岛集团股份有限公司“科研 19”调查船, 利用德国 Hydro-Bios 公司生产的 MST24 型多通道沉积物捕集器, 在獐子岛虾夷扇贝底播养殖区中部海域进行了采样(图 1), 开展了浮游植物沉降的时间序列研究。布放方式为由重物、锚链、钢缆、捕集器、尼龙绳和浮球组成的固定锚系统, 布放区域为 39.0°N、122.9°E, 水深 42 m, 布放深度 35 m。收集筒开口面积 0.015 m<sup>2</sup>, 250 ml 样品杯 24 个, 采样频率为 5 d/杯, 布放时间段分别为 2011 年 9 月 12 日至 2012 年 1 月 10 日、2012 年 2 月 28 日至 2012 年 6 月 27 日和 2012 年 7 月 12 日至 2012 年 11 月 9 日, 布放前于样品杯中加入 0.2 μm 过滤原位海水, 并分别按照 5% 体积浓度和 0.5% 质量分数添加硼酸-福尔马林缓冲液和 NaCl 进行固定保存, 第一阶段最后一份样品因收集筒脱落未采集到, 返厂维修用时 30 d。3 次布放和回收累计获取 71 份捕集器沉降样品, 秋季(9 月、10 月、11 月)、冬季(12 月、1 月、2 月)、春季(3 月、4 月、5 月)和夏季(6 月、7 月、8 月)分别采集到 30、8、18 和 15 份样品。此外, 在捕集器布放与回收期间, 使用“科研 19”调查船于每月中旬同步进行了水温、浮游植物、叶绿素 *a* 和初级生产力的调查。

### 1.2 样品镜检及数据分析

捕集器样品于实验室内进行分样, 亚样品(sub-samples)使用德国 Hydro-Bios 公司浮游植物计数框, 在光学倒置显微镜(COIC IBE2000)160 倍率下进行沉降浮游植物的物种鉴定和细胞丰度统计。物种分类

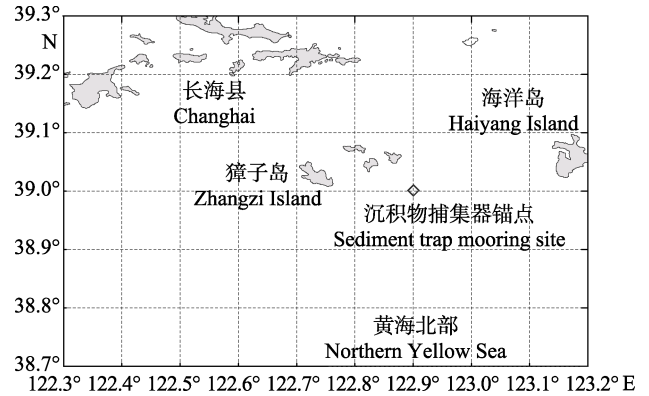


图 1 北黄海獐子岛海域沉积物捕集器布放点

Fig.1 Deployment site of the sediment trap in the Northern Yellow Sea off the Zhangzi Island

主要依据形态学差异, 并参考已有分类标准(金德祥等, 1965; Tomas, 1997)。沉降浮游植物的物种丰富度、多样性、均匀度和优势度, 分别采用 Margalef 指数、Shannon-Weaver 指数、Pielou 指数和 Dufrene-Legendre 指数进行计算, 具体公式参考文献(张雪等, 2016), 本研究选取优势度大于 0.02 的物种为优势种。

## 2 结果

### 2.1 沉降浮游植物物种组成

2011 年 9 月至 2012 年 11 月之间, 捕集器沉降样品共计鉴定浮游植物 51 属 93 种(含变种), 其中硅藻 38 属 66 种, 甲藻 10 属 23 种, 硅鞭藻 2 属 3 种, 针胞藻(*Raphidophyceae*)1 种。硅藻占到了全部样品出现物种数的 70.6%~96.6%(平均 84.6%), 是沉降浮游植物中的主要类群, 角毛藻属、圆筛藻属和海链藻属(*Thalassiosira*)分别出现了 10 种、9 种和 5 种。甲藻平均仅占到了各样品中总物种数的 8.8%, 原甲藻属(*Prorocentrum*)、原多甲藻属(*Protoperidinium*)和角藻属(*Tripos*: *Ceratium* 和 *Neoceratium* 的同属异名)各出现了 4 种、8 种和 3 种。

从沉降浮游植物的优势种组成来看(表 1), 优势种主要由硅藻和硅鞭藻组成, 甲藻全年都未在沉降浮游植物中形成优势。优势度大于 0.02 的物种中, 硅藻有具槽帕拉藻(*Paralia sulcata*)、布氏双尾藻(*Ditylum brightwellii*)、离心列海链藻(*Thalassiosira excentrica*)、八幅辐环藻(*Actinocyclus octonarius*)、六幅辐衲藻(*Actinoptychus senarius*)、琼氏圆拱形藻(*Coscinodiscopsis jonesiana*)、辐射圆筛藻(*Coscinodiscus radiatus*)和印度鼻状藻(*Proboscia indica*), 硅鞭藻有小等刺硅鞭藻(*Dictyocha fibula*)和八幅硅鞭藻(*Octactis octonaria*)。

表 1 北黄海獐子岛海域沉降浮游植物优势种组成  
Tab.1 Dominant taxa composition of settling phytoplankton in the Northern Yellow Sea off the Zhangzi Island

类群 Group	中文名 Chinese name	拉丁文名 Latin name	出现频率(%) Percentage of occurrence (%)	优势度 Dominance
硅藻 Diatom	八幅辐环藻	<i>Actinocyclus octonarius</i> Ehrenberg	100	0.091
	六幅辐环藻	<i>Actinocyclus senarius</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	100	0.059
	琼氏圆拱形藻	<i>Coscinodiscopsis jonesiana</i> (Greville) E.A.Sar & I.Sunesen	100	0.029
	圆筛藻	<i>Coscinodiscus</i> spp.	60.6	0.002
	蛇目圆筛藻	<i>Coscinodiscus argus</i> Ehrenberg	84.5	0.004
	星脐圆筛藻	<i>Coscinodiscus asteromphalus</i> Ehrenberg	100	0.011
	格氏圆筛藻	<i>Coscinodiscus granii</i> L.F.Gough	80.3	0.005
	辐射圆筛藻	<i>Coscinodiscus radiatus</i> Ehrenberg	100	0.026
	细弱圆筛藻	<i>Coscinodiscus subtilis</i> Ehrenberg	76.1	0.003
	威氏圆筛藻	<i>Coscinodiscus wailiesii</i> Gran & Angst	100	0.007
	矮小短棘藻	<i>Detonula pumila</i> (Castracane) Gran	40.8	0.002
	布氏双尾藻	<i>Ditylum brightwellii</i> (T.West) Grunow	97.2	0.111
	斯氏几内亚藻	<i>Guinardia striata</i> (Stolterfoth) Hasle	56.3	0.005
	舟形藻	<i>Navicula</i> spp.	76.1	0.001
	具槽帕拉藻	<i>Paralia sulcata</i> (Ehrenberg) Cleve	100	0.319
	羽纹藻	<i>Pinnularia</i> spp.	93.0	0.003
	斜纹藻	<i>Pleurosigma</i> spp.	100	0.016
	印度鼻状藻	<i>Proboscia indica</i> (H.Peragallo) Hernández-Becerril	84.5	0.025
	海链藻	<i>Thalassiosira</i> spp.	87.3	0.022
	离心列海链藻	<i>Thalassiosira excentrica</i> (Ehrenberg) Cleve	100	0.091
鼓胀海链藻	<i>Thalassiosira gravida</i> Cleve	71.8	0.006	
细海链藻	<i>Thalassiosira leptopus</i> (Grunow) Hasle & G.Fryxell	67.6	0.005	
硅鞭藻 Silicoflagellate	小等刺硅鞭藻	<i>Dictyocha fibula</i> Ehrenberg	100	0.062
	八幅硅鞭藻	<i>Octactis octonaria</i> (Ehrenberg) Hovasse	74.6	0.034

## 2.2 沉降通量的周年变化

研究期间, 浮游植物沉降通量变化在 $(6.1\sim 169)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 平均 $39.4\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 峰值出现在 2012 年秋初 9 月上旬, 其次为春季上中旬。秋季峰值主要由硅藻和硅鞭藻贡献, 而春季峰值则主要为硅藻贡献。硅藻沉降通量变化在 $(5.6\sim 154)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 平均 $34.9\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 周年变化趋势与总通量相一致(图 2), 硅藻通量占到了总通量的 37.5%~99.6% (平均 88.6%), 对沉降浮游植物的贡献最大。甲藻沉降通量及其对总通量的贡献分别为 $0.22\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d 和 0.84%, 周年贡献较小, 春末至秋初甲藻沉降通量相对较高, 甲、硅藻通量比亦出现相同的趋势。硅鞭藻沉降通量变化在 $(0.12\sim 28.5)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 平均 $4.3\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 峰值出现在秋季, 2011 年秋季峰值从 9 月中旬持续到 10 月下旬, 2012 年秋季峰值出现在 9 月上旬, 硅鞭藻在总通量中的比例介于 0.35%~

62.2%之间, 平均为 10.5%, 主要由小等刺硅鞭藻和八幅硅鞭藻贡献。

从优势种沉降通量来看, 具槽帕拉藻通量变化在 $(0.31\sim 88.3)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 平均 $12.6\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 占到总通量的 2.8%~67.8% (平均 29.8%), 为贡献最大的优势种, 其高通量时段从夏季 7 月下旬持续到秋季 9 月下旬(图 3)。海链藻通量变化在 $(1.8\sim 17.3)\times 10^6$  cells m<sup>2</sup>d, 平均 $5.3\times 10^6$  cells m<sup>2</sup>d, 占到总通量的 5.2%~33.8% (平均 14.6%), 对总通量的贡献亦较高, 高通量时段出现在 2012 年秋季上旬和春季 3 月中旬至 4 月上旬。布氏双尾藻在春季对总通量的贡献为全年最高, 其春季通量为 $(0.91\sim 56.3)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 平均占到春季总通量的 32.9%。八幅辐环藻变化在 $(0.4\sim 15.0)\times 10^6$  cells m<sup>2</sup>d, 平均 $3.6\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 对总沉降通量的贡献主要在冬季, 平均高达 24.7%。圆筛藻、六幅辐环藻和琼氏圆拱形藻的周年平均通量分别为 $(2.5、2.3$  和  $1.1)\times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, 其对总通量的贡献周年平均分别为

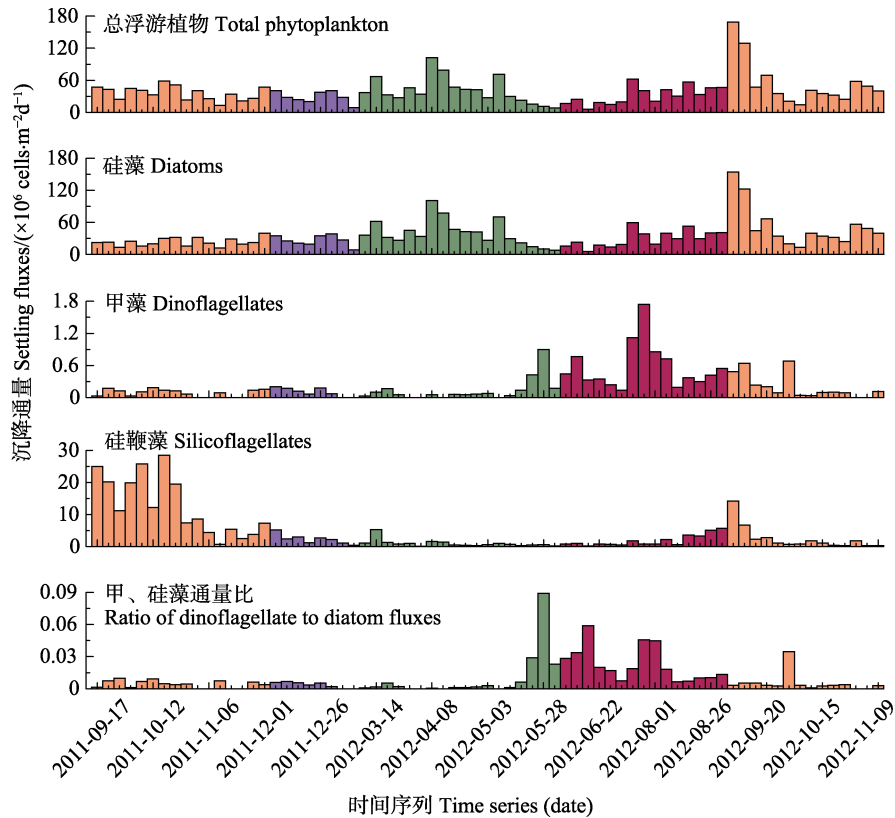


图 2 浮游植物沉降通量的周年变化

Fig.2 Annual variations on the settling fluxes of phytoplankton

7.0%、5.9%和 3.3%。印度鼻状藻的通量高峰时段亦出现在春季,平均达到  $3.6 \times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d,且能平均占到总通量的 9.1%。小等刺硅鞭藻和八幅硅鞭藻的周年平均通量分别为  $(2.4$  和  $1.8) \times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d,其对总通量的贡献周年平均分别为 6.1%和 4.4%。

### 2.3 沉降浮游植物多样性的变化

从沉降浮游植物的多样性水平来看(图 4),物种丰富度 Margalef 指数变动在 1.16~2.35 之间(平均 1.61),丰富度较高的时段出现在 5 月下旬至 7 月下旬,平均高达 2.07。物种多样性 Shannon-Weaver 指数变动在 1.95~4.09 之间(平均 3.08),冬季多样性水平最好,平均高达 3.37,其次为春季的 3.17,夏、秋季分别为 3.13 和 2.91。物种均匀度 Pielou 指数的变化趋势与多样性的变化趋势相一致,变动在 0.43~0.80 之间(平均 0.64),冬季沉降浮游植物的均一性最好(平均 0.71),春、夏、秋三季分别为 0.65、0.63 和 0.61。

### 2.4 捕集器邻近水域同期海表温度和初级生产力

从捕集器布放和回收期间邻近水域海表温度和初级生产力的同期变化来看(图 5),海表温度变化在 1.72℃~25.5℃之间(平均 12.8℃),最高值和最低值分别出现在夏季的 8 月和冬季的 2 月。初级生产力变化

在 96.3~1045 mgC/m<sup>2</sup>d(平均 384.9 mgC/m<sup>2</sup>d),最大值出现在春季的 3 月,进入 4 月、5 月后逐渐递减,整个春季捕集器邻近水域初级生产力水平较高,平均达到 902.1 mgC/m<sup>2</sup>d。

## 3 讨论

### 3.1 獐子岛海域浮游植物周年沉降特征

北黄海自然水体中浮游植物群落常呈现温带海区典型的“双峰型”特征,在上下半年(常为春、秋季)各出现 1 个峰值(俞建鑫等, 1993)。在长海县邻近海域,浮游植物亦出现春、秋季 2 个丰度高值,春季以硅藻物种为主,进入夏季甲藻开始形成优势(董婧等, 1999)。而在高强度养殖水域,丰度高峰仅出现在春季 3 月,夏末秋初浮游植物常由于摄食压力而受到抑制(付成东等, 2012)。本研究从獐子岛海域浮游植物沉降总通量的周年变化趋势来看,与长海县海域和北黄海水体浮游植物丰度的季节变化趋势是一致的,5 d 分辨率的沉降通量显示春季高峰从初春一直持续到春末,而秋季的峰值尽管比春季要高,但是持续时间仅有 10 d 左右,因此整体来看,春季水体浮游植物的持续性旺发对沉降通量的贡献较大,且以硅藻的沉降为主。

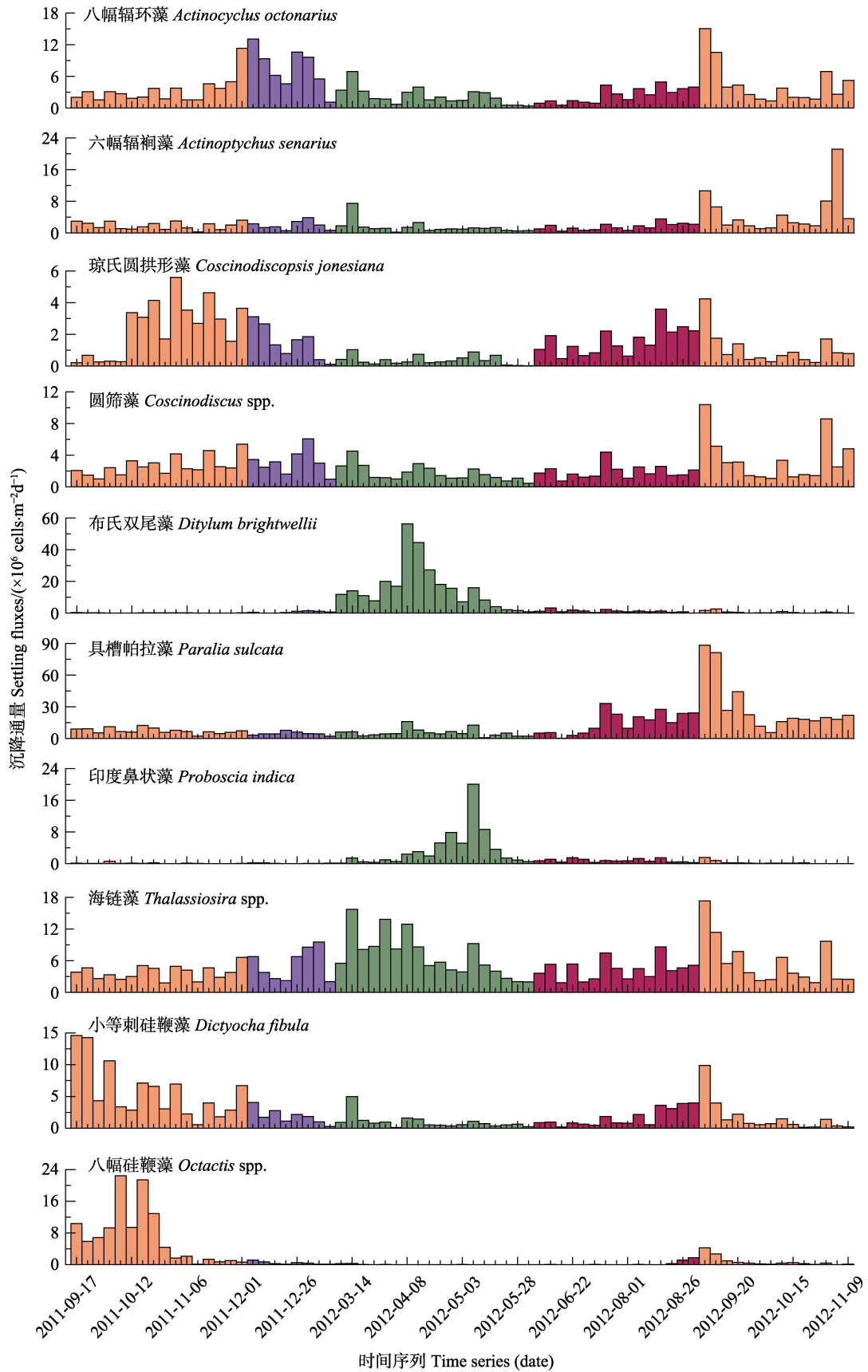


图 3 优势种沉降通量的周年变化

Fig. 3 Annual variations on the settling fluxes of dominant taxa



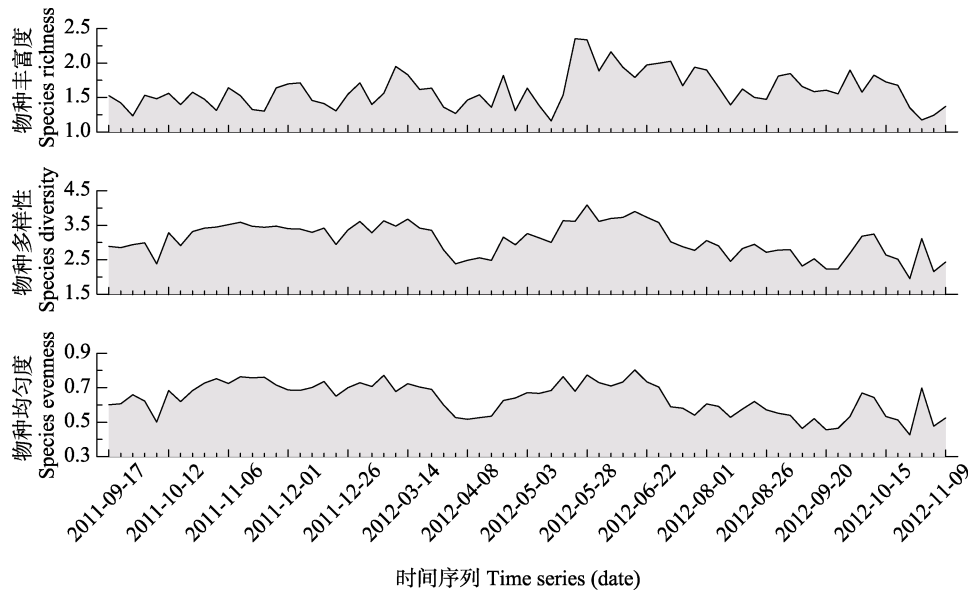


图 4 沉降浮游植物多样性的周年变化

Fig.4 Annual variations on the diversities of settling phytoplankton

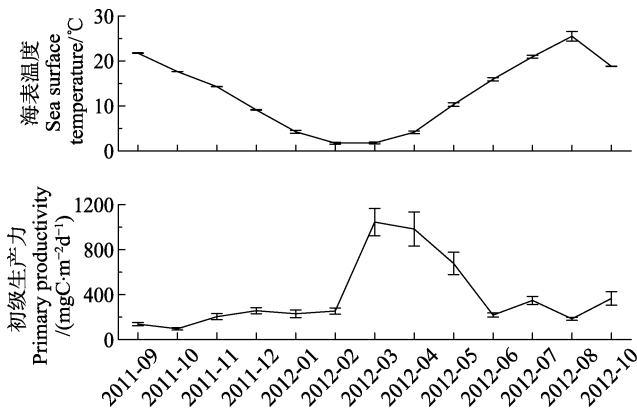


图 5 捕集器邻近水域海表温度和初级生产力的同期变化

Fig. 5 Variations on sea surface temperature and primary productivity in adjoining waters of the sediment trap during the same period with deployment

在深海稳定的水体中,浮游植物深层沉降常被用来表征表层水体的初级生产力变化(Honjo *et al.*, 2008),而在浅海海域,风浪、潮汐、平流和再悬浮等过程皆会影响到浮游植物的沉降过程(张岩松等, 2004)。与捕集器邻近水域海表温度和初级生产力的同期变化进行了比较,发现从海表温度逐渐回升的初春开始持续到春末,水体的初级生产力较高,已有季节资料也印证了獐子岛海域 3 月的初级生产力高峰(张继红等, 2008),这表明春季浮游植物的沉降与水体的初级生产力水平有着密切的关系,很好地反映了其在自然水体中的生产和输出。此外,从沉降浮游植物组成来看,春季的海链藻、布氏双尾藻、鼻状藻(*Proboscia*)等硅藻物种,贡献了大部分的初级生产和沉降通量;秋季主要沉降浮游植物则转换成硅鞭藻、具槽帕拉藻、圆

筛藻等物种,这与张雪等(2016)对秋季獐子岛底播区表层水体浮游植物优势种组成的研究结果相吻合。

### 3.2 浮游植物沉降对底播扇贝的影响

双壳贝类主要滤食水体中的浮游植物和悬浮颗粒物,已有研究表明,长海县邻近水域初级生产力时空分布处于较高的水平,能够为养殖区贝类生长提供充足的饵料(李洪波等, 2011)。扇贝的摄食具有一定的选择性(王芳等, 2000),食物组成以具槽帕拉藻、圆筛藻、海链藻、舟形藻等硅藻为主(郭皓等, 1999),而这些物种也常被作为扇贝养殖区的饵料指示种(张雪等, 2016)。2011 年期间底播扇贝养殖水域集中在 38.83~39.18°N、122.32~123.12°E 区域,2012 年期间底播区域向南部深水区 38.73°N 略有扩大,本研究捕集器 3 次布放和回收位置皆位于底播区域的中心水域,因此其沉降浮游植物的周年变化特征,直接反映了底播虾夷扇贝的食物来源、饵料组成及其通量水平的变动。从优势种来看,具槽帕拉藻和海链藻在全年对沉降通量的贡献都很高,是底播扇贝生长的重要饵料基础。从季节来看,秋季扇贝底播到冬季扇贝越冬时,正是具槽帕拉藻、圆筛藻、琼氏圆拱形藻、八辐辐环藻等饵料种的高通量时段;进入来年春季,海链藻、布氏双尾藻、鼻状藻等链状及细胞个体较大的硅藻物种出现高通量,为扇贝春季生长提供及时的饵料补充,已有研究表明,春季 5 月虾夷扇贝的各项摄食生理指标(滤水率、摄食率、吸收率、吸收效率)皆为全年最高(张继红等, 2007);而从春末到整个夏季期间,尽管甲藻通量水平有一定的提升,但是甲、硅藻

的通量比仍处于很低的水平( $<0.1$ ), 因此不会对扇贝的饵料结构构成影响, 夏季硅藻的通量水平对扇贝的持续生长仍能够提供一定的饵料保障。

综上所述, 獐子岛海域虾夷扇贝底播区的沉降浮游植物, 无论是从饵料种的组成与结构, 还是从沉降通量水平来看, 其在整个周年皆为底播虾夷扇贝的重要饵料基础。但是, 海洋浮游植物对海水理化环境的变化非常敏感(比如冷水团等过程), 局地短期的赤潮、有毒藻水华等现象也会给扇贝养殖带来不利影响, 因此, 对于獐子岛海域水体浮游植物和沉降浮游植物的演替特征及其长周期变化规律, 还需要更多资料的积累和多学科的工作来验证和完善。

## 参 考 文 献

- Chen JF, Zheng LF. Sediment trap and global change study. *Marine Science Bulletin*, 1996, 15(1): 41–47 [陈建芳, 郑连福. 沉积物捕获器与全球变化研究. *海洋通报*, 1996, 15(1): 41–47]
- Dong J, Li PJ, Liu Y, *et al.* Ecological characteristics of phytoplankton community inshore of the Northern Yellow Sea. *Fisheries Science*, 1999, 18(5): 12–15 [董婧, 李培军, 刘悦, 等. 黄海北部近岸浮游植物生态特征分析. *水产科学*, 1999, 18(5): 12–15]
- Fu CD, Li DC, Yu ZA, *et al.* The variation in species composition and density of phytoplankton in the ranched northwest coast in Changhai Country, Liaoning Province, China. *Fisheries Science*, 2012, 31(7): 408–412 [付成东, 李大成, 于佐安, 等. 长海县西北部海域浮游植物种类及密度的变化. *水产科学*, 2012, 31(7): 408–412]
- Guo H, Yan QL, Cao L. The relationship between food structure of raft for cultivated shellfish and phytoplankton in Changjiang'ao, Dalian. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1999, 8(2): 112–118 [郭皓, 闫启仑, 曹丽. 大连常江澳筏养养殖贝类的饵料结构与浮游植物的关系. *上海水产大学学报*, 1999, 8(2): 112–118]
- Honjo S, Manganini SJ, Krishfield RA, *et al.* Particulate organic carbon fluxes to the ocean interior and factors controlling the biological pump: A synthesis of global sediment trap programs since 1983. *Progress in Oceanography*, 2008, 76(3): 217–285
- Jin DX, Chen JH, Huang KG. Planktonic diatoms in China Seas. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1965, 1–230 [金德祥, 陈金环, 黄凯歌. 中国海洋浮游硅藻类. 上海: 上海科学技术出版社, 1965, 1–230]
- Li HB, Liu GZ, Liang YB, *et al.* Distribution of Chl *a* and primary productivity in Changhai waters of Liaoning. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(1): 32–36 [李洪波, 柳圭泽, 梁玉波, 等. 辽宁长海海域叶绿素 *a* 和初级生产力的分布. *海洋环境科学*, 2011, 30(1): 32–36]
- Tallberg P, Heiskanen AS. Species-specific phytoplankton sedimentation in relation to primary production along an inshore-offshore gradient in the Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*, 1998, 20(11): 2053–2070
- Tang QS. Carbon-sink fisheries and the sound and fast development of modern fisheries. *Jiangxi Fishery Science and Technology*, 2011(2): 5–7 [唐启升. 碳汇渔业与又好又快发展现代渔业. *江西水产科技*, 2011(2): 5–7]
- Tomas CR. Identifying marine phytoplankton. San Diego: Academic Press, 1997, 1–858
- Wang F, Dong SL, Zhang S, *et al.* Experimental studies on feeding selectivity and the filter-feeding rate of *Argopecten irradians* and *Crassostrea gigas*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(2): 139–144 [王芳, 董双林, 张硕, 等. 海湾扇贝和太平洋牡蛎的食物选择性及滤除率的实验研究. *海洋与湖沼*, 2000, 31(2): 139–144]
- Wang J, Li GZ, Wang XY. Phytoplankton abundance distribution and seasonal changes in adjoining waters around the Changhai. *Fishery Sciences*, 1995, 14(2): 23–27 [王鉴, 李桂珍, 王秀艳. 长海县水域浮游植物数量分布和季节变化. *水产科学*, 1995, 14(2): 23–27]
- Xu M, Zhu ZX, Xu BF, *et al.* Phytoplankton in the natural reserve waters of choicest seafood around Hedatuozhi, Changhai. *Fishery Sciences*, 1994, 13(3): 10–13 [徐铭, 朱志祥, 徐步峰, 等. 长海县核大砣子海珍品自然保护区海域的浮游植物. *水产科学*, 1994, 13(3): 10–13]
- Yu JL, Li RX. The study on the phytoplankton ecology in the Bohai and Yellow Seas. *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 1993, 11(3): 52–59 [俞建奎, 李瑞香. 渤海、黄海浮游植物生态的研究. *黄渤海海洋*, 1993, 11(3): 52–59]
- Zhang JH, Fang JG, Wang W, *et al.* Feeding physiology of scallop *Patinopecten yessoensis* and population filtering capacity in Zhangzidao Island aquacultural area. *Journal of Jishou University (Natural Science Edition)*, 2007, 28(4): 85–90 [张继红, 方建光, 王巍, 等. 虾夷扇贝的摄食生理及其在獐子岛海域的群体滤水能力. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2007, 28(4): 85–90]
- Zhang JH, Fang JG, Jiang ZJ, *et al.* Seasonal variation of primary production and spatial-temporal distribution of chlorophyll *a* in mariculture area of Zhangzidao Island. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 22–28 [张继红, 方建光, 蒋增杰, 等. 獐子岛养殖水域叶绿素含量时空分布特征及初级生产力季节变化. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 22–28]
- Zhang X, Luan QS, Sun JQ, *et al.* Annual variation in phytoplankton community and its relationship with ambient environmental factors in adjacent waters of Zhangzi Island. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(3): 315–323 [张雪, 栾青杉, 孙坚强, 等. 獐子岛海域浮游植物群落周年变化及其与环境因子的关系. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(3): 315–323]
- Zhang YS, Zhang FJ, Guo XW, *et al.* Vertical flux of the settling particulate matter in the water column of the Yellow Sea in summer. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(3): 230–238 [张岩松, 章飞军, 郭学武, 等. 黄海夏季水域沉降颗粒物垂直通量的研究. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3): 230–238]

## Annual Variations in the Phytoplankton Settling Flux in the Northern Yellow Sea off Zhangzi Island

LUAN Qingshan<sup>1,2</sup>, SUN Jianqiang<sup>1</sup>, Qiao Rui<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1,3①</sup>, ZANG Youcai<sup>4</sup>, ZHANG Yuan<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Zhangzidao Group Co. Ltd., Dalian 116001)

**Abstract** A German-made sediment trap, MST24, was deployed at 5-day intervals in the Northern Yellow Sea off Zhangzi Island from September 2011 to November 2012 for the purpose of revealing the settling phytoplankton composition and estimating the annual variations of fluxes. A total of 51 genera and 93 taxa were recorded, with diatoms (38 genera, 66 taxa) as the dominant sedimentation group. The predominant settling species were diatoms such as *Paralia sulcata*, *Thalassiosira excentric*, *Ditylum brightwellii*, *Coscinodiscus radiatus*, and *Actinocyclus octonarius*, as well as silicoflagellates such as *Dictyocha fibula* and *Octactis octonaria*. Total phytoplankton fluxes varied between  $6.1 \times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d and  $169 \times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d, averaging  $39.4 \times 10^6$  cells/m<sup>2</sup>d. The periods of high fluxes occurred during the spring and autumn seasons, with diatoms contributing more in spring and diatoms and silicoflagellates both contributing the most in autumn. The seeding and growing periods of *Patinopecten yessoensis* in the adjoining waters off Zhangzi Island were synchronized with the annual dynamics of the phytoplankton that comprise its diet and phytoplankton settling fluxes. Diatom taxa such as *Paralia sulcata*, *Thalassiosira* spp., and *Coscinodiscus* spp. are all important food sources and grazing structure for scallops. By studying phytoplankton sedimentation with a high sampling frequency and clarifying the scallop diet taxa with settling fluxes, this research will provide a baseline database and references for sustainable aquaculture in the adjoining waters off Zhangzi Island, China.

**Key words** Phytoplankton; Settling flux; Annual variation; Zhangzi Island; *Patinopecten yessoensis*

① Corresponding author: WANG Jun, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180329001

http://www.yykxjz.cn/

栾青杉, 康元德, 王俊. 渤海浮游植物群落的长期变化(1959~2015). 渔业科学进展, 2018, 39(4): 09-18  
Luan QS, Kang YD, Wang J. Long-term changes on phytoplankton community in the Bohai Sea (1959~2015). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 09-18

# 渤海浮游植物群落的长期变化(1959~2015)\*

栾青杉<sup>1,2</sup> 康元德<sup>1</sup> 王 俊<sup>1,3①</sup>



1. 农业农村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试点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. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 基于渤海 1959~2015 年间的网采浮游植物调查资料,研究了物种组成、丰度、群落结构及多样性的长期变化。50 余年来,共记录浮游植物 77 属 170 种,生态类型主要为温带近岸性种;优势种组成出现明显的格局转换,20 世纪以角毛藻(*Chaetoceros*)和圆筛藻(*Coscinodiscus*)等中心硅藻为主,进入 21 世纪后,具槽帕拉藻(*Paralia sulcata*)、海线藻(*Thalassionema*)以及甲藻中的夜光藻(*Noctiluca scintillans*)和角藻(*Triplos*)开始形成绝对优势;历次调查浮游植物丰度变化在 $(8.33\sim 472) \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ 之间,硅藻占到了 65.3%~99.8%;丰度和多样性水平在 20 世纪逐渐降低,进入 21 世纪分别有 1.5 倍和 15.0%的回升。渤海 N/P 比的长期持续升高,导致群落结构由硅藻主导演替到硅、甲藻共同控制,21 世纪甲、硅藻比的平均水平较 20 世纪升高了 2.82 倍。浮游植物群落结构和饵料基础的年代际变动,影响到关键资源生物的早期补充过程,本研究为探讨渤海主要渔业种群对环境长期变化的适应性响应机制,提供基础资料和参考依据。

**关键词** 浮游植物;群落结构;长期变化;渤海

**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0009-10

近海有着渔业生物的重要栖息地和渔场,支撑着渔业种群的补充和繁衍,但近海又是受人类活动和环境变化压力最为明显的区域,生态系统演变和生物资源的可持续产出严重受损(金显仕等, 2015)。渤海属于北温带半封闭内海,包括辽东湾、渤海湾、莱州湾、黄河口、渤海中部和渤海海峡,黄河、海河和辽河等主要入海河流为近岸输入了大量的泥沙和营养盐,影响到其初级生产和食物网过程。渤海是多种经济渔业生物的产卵场、索饵场和育幼场(万瑞景等, 1998),而围填海、陆源污染物排放、海水养殖等过程的加剧,导致浮游植物赤潮频发、物种多样性降低、饵料基础

及其结构失衡,对渔业种群的早期补充过程构成威胁。

浮游植物作为海洋生态系统的初级生产者,是浮游动物和早期渔业生物的重要饵料基础。渤海浮游植物的生态研究始于 21 世纪 30 年代,早期的研究以物种分类及其生态习性为主(朱树屏等, 1957; 金德祥等, 1965),阶段性渤海综合调查开展以后,关注点也逐渐转向浮游植物与水体富营养化、近海环境变化以及渔业生物之间的关系研究(康元德, 1991; 俞建奎等, 1993; 王俊等, 1998; 孙军等, 2002; 孙雪梅等, 2016)。近年来,渤海产卵场、索饵场和育幼场的自然生境不断退化,洄游通道破坏严重,本研究从浮游植物基础

\* 国家重点基础研究发展计划项目(2015CB453302)和“泰山学者”建设工程专项共同资助[This work was supported by the National Basic Research Program of China (2015CB453302) and Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province]. 栾青杉, E-mail: luanqs@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王 俊, 研究员, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-29, 收修改稿日期: 2018-05-27

饵料的角度出发,通过分析群落结构及其多样性水平的长期变化趋势,探讨浮游植物群落对渤海环境变化的年代际响应特征及其产生的深层原因,旨在为阐明渤海主要渔业种群对环境变化的适应性响应机制提供基础资料和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本研究浮游植物网采样品来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所自 1959 年以来开展的渤海年代际大面综合调查(图 1)。在辽东湾、渤海湾、莱州湾、黄河口以及渤海中部海域,20 个航次的季节性调查共计采集了 1181 网浮游植物样品(表 1)。于各采样点使用浅水 3 型浮游生物网(网口面积  $0.1 \text{ m}^2$ , 筛孔  $77 \mu\text{m}$ )自底至表进行垂直拖网,样品随后转移至 1 L 的塑料广口瓶中,加入甲醛水溶液至样品终浓度为 5%, 常温避光保存。

### 1.2 群落分析

浮游植物群落分析于实验室内进行,网采样品根

据浮游植物的多少进行稀释或浓缩,取 0.5 ml 的亚样品置于朱树屏计数框(类似于 Sedgwick-Rafter),然后在光学显微镜(Leica Biomed)下进行物种鉴定与丰度统计,物种分类主要依据形态学差异,并参考已有分类标准(朱树屏等, 1957; 金德祥等, 1965; Tomas, 1997)。

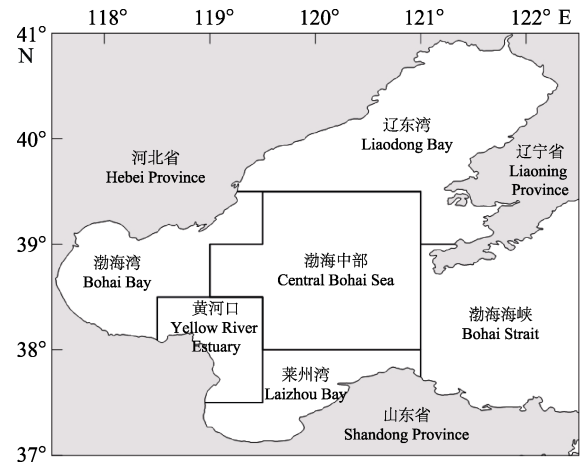


图 1 渤海浮游植物拖网采集区域  
Fig.1 Sampling regions of phytoplankton net-tows in the Bohai Sea

表 1 渤海浮游植物网采样品基本信息  
Tab.1 Baseline information on net-tow samplings of phytoplankton in the Bohai Sea

年代 Period	采集时间(年-月) Sampling time (year-month)	总拖网数 Total tows	渤海中部 Central Bohai Sea	黄河口 Huanghe Estuary	辽东湾 Liaodong Bay	渤海湾 Bohai Bay	莱州湾 Laizhou Bay
1960s	1959-10	126					
	1960-05	99	15	24	18	32	10
	1960-08	108	20	26	18	33	11
	1960-11	93	14	19	22	25	13
1980s	1982-05	67	17	8	11	23	8
	1982-08	78	24	8	13	25	8
	1982-10	77	24	8	13	24	8
	1983-02	32	18	4	6	2	2
1990s	1992-08	54	16	5	18	13	2
	1992-10	35	12		17	5	1
	1993-02	30	14	4	7	3	2
	1993-05	57	16	3	19	13	6
2000s	2000-05	34	2	3	11	12	6
	2000-08	34	2	4	14	12	2
	2000-10	39	4	3	14	13	5
	2000-12	18	6	2	6	3	1
2010s	2014-05	52	20	5	14	8	5
	2014-08	55	21	7	12	8	7
	2014-10	51	21	5	12	8	5
	2015-01	42	16	7	5	8	6

### 1.3 数据处理

浮游植物群落的物种丰富度、多样性、均匀度和优势度, 分别采用 Margalef 指数、Shannon-Weaver 指数、Pielou 指数和 Dufrene-Legendre 指数进行计算, 具体公式参考文献(栾青杉等, 2017)。浮游植物对环境变化的年代际响应特征采用 SIMPER 分析进行, 利用 PAST 软件(3.18 版)实现。

## 2 结果

### 2.1 物种组成及其年代际转换

本研究共记录渤海网采浮游植物 77 属 170 种, 其中硅藻 61 属 133 种, 甲藻 15 属 36 种, 硅鞭藻 1 种, 硅藻占到了物种数的 78.2%, 是渤海浮游植物的主要类群, 物种的生态类型主要为温带近岸性本地种。角毛藻属(*Chaetoceros*)和圆筛藻属(*Coscinodiscus*)出现了 37 种和 12 种, 分别占到总物种数的 21.8%和 7.1%, 是硅藻的主要属种, 此外海链藻属(*Thalassiosira*)和根管藻属(*Rhizosolenia*)亦分别出现了 8 种和 5 种。甲藻中的原多甲藻属(*Protoperdinium*)和角藻属(*Triplos: Ceratium* 和 *Neoceratium* 的同属异名)各出现了 11 种和 7 种, 是渤海常见的甲藻属种。

近 50 多年来, 能够在渤海浮游植物群落中形成优势的物种有 49 种, 其中又以硅藻居多, 达到 45 种(表 2)。从年代际变化来看, 能够在各个时期形成优势的物种有 6 种, 分别为硅藻类群的星脐圆筛藻(*Coscinodiscus asteromphalus*)、布氏双尾藻(*Ditylum brightwellii*)、具槽帕拉藻(*Paralia sulcata*)、尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)和伏氏海线藻(*Thalassionema frauenfeldii*)以及甲藻类群的牟氏角藻(*Triplos muelleri*)。

从优势种年代际演替来看, 浮游植物从在 20 世纪形成绝对优势的柔弱角毛藻(*C. debilis*)、拟垂缘角毛藻(*C. pseudocrinitus*)、琼氏圆拱形藻(*Coscinodiscopsis jonesiana*)、辐射圆筛藻(*C. radiatus*)、萎软几内亚藻(*Guinardia flaccida*)、中国半管藻(*Hemiaulus chinensis*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*), 转换到在 21 世纪形成绝对优势的窄隙角毛藻(*C. affinis*)、旋链角毛藻(*C. curvisetus*)、威氏圆筛藻(*C. wailesii*)、舟形藻(*Navicula*)、具槽帕拉藻、伏氏海线藻、夜光藻(*Noctiluca scintillans*)和梭形角藻(*T. fusus*)。总体来看, 渤海浮游植物群落在 20 世纪以角毛藻和圆筛藻等较大的中心目硅藻为主, 进入 21 世纪后, 海线藻(*Thalassionema*)和舟形藻等羽纹目硅藻逐渐形成优

表 2 渤海浮游植物优势种组成的年代际变化  
Tab.2 Interdecadal changes on dominant phytoplankton composition in the Bohai Sea

生态类型 Ecotype	中文名 Chinese name	拉丁文名 Latin name	年代 Age				
			1960s	1980s	1990s	2000s	2010s
硅藻 Diatom							
广温种 Eurythermal species	八幅辐环藻	<i>Actinocyclus octonarius</i> Ehrenberg					0.01
	冰河拟星杆藻	<i>Asterionellopsis glacialis</i> (Castracane) Round		0.07	0.03		
	加拉星平藻	<i>Asteroplanus karianus</i> (Grunow) C.Gardner & R.M.Crawford		0.03			
	派格棍形藻	<i>Bacillaria paxillifera</i> (O.F.Müller) T.Marsson		0.01	0.03	0.01	
	透明幅杆藻	<i>Bacteriastrum hyalinum</i> Lauder		0.07	0.02		
	异常角毛藻	<i>Chaetoceros abnormis</i> A.I.Proshkina-Lavrenko	0.01				
	窄隙角毛藻	<i>Chaetoceros affinis</i> Lauder	0.02	0.02	0.05		0.10
	卡氏角毛藻	<i>Chaetoceros castracanei</i> Karsten	0.07	0.03	0.02		
	扁面角毛藻	<i>Chaetoceros compressus</i> Lauder	0.02	0.03			
	旋链角毛藻	<i>Chaetoceros curvisetus</i> Cleve		0.01			0.14
	密联角毛藻	<i>Chaetoceros densus</i> (Cleve) Cleve	0.02		0.01		0.06
	双突角毛藻	<i>Chaetoceros didymus</i> Ehrenberg		0.08			
	星脐圆筛藻	<i>Coscinodiscus asteromphalus</i> Ehrenberg	0.02	0.14	0.07	0.35	0.03
	中心圆筛藻	<i>Coscinodiscus centralis</i> Ehrenberg	0.03				
	辐射圆筛藻	<i>Coscinodiscus radiatus</i> Ehrenberg	0.08	0.25	0.03	0.06	
布氏双尾藻	<i>Ditylum brightwellii</i> (T.West) Grunow	0.11	0.07	0.07	0.01	0.02	

续表 2 Continued table 2

生态类型 Ecotype	中文名 Chinese name	拉丁文名 Latin name	年代 Age				
			1960s	1980s	1990s	2000s	2010s
广温种 Eurythermal species	浮动弯角藻	<i>Eucampia zoodiacus</i> Ehrenberg	0.02		0.16	0.03	0.15
	斯氏几内亚藻	<i>Guinardia striata</i> (Stolterfoth) Hasle					0.06
	短纹楔形藻	<i>Licmophora abbreviata</i> C.Agardh				0.02	
	舟形藻	<i>Navicula</i> spp.				0.43	
	具槽帕拉藻	<i>Paralia sulcata</i> (Ehrenberg) Cleve	0.04	0.05	0.08	0.04	0.54
	尖刺拟菱形藻	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> (Grunow ex Cleve) Hasle	0.12	0.08	0.03	0.04	0.06
	刚毛根管藻	<i>Rhizosolenia setigera</i> Brightwell	0.07				
	中肋骨条藻	<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	0.05	0.24	0.03		
	伏氏海线藻	<i>Thalassionema frauenfeldii</i> (Grunow) Tempère & Peragallo	0.04	0.01	0.06	0.29	0.02
		菱形海线藻	<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grunow) Mereschkowsky	0.03			0.07
暖温种 Warm- temperate species	短袍角毛藻	<i>Chaetoceros brevis</i> F.Schütt		0.02			
	并基角毛藻	<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve					0.06
	洛氏角毛藻	<i>Chaetoceros lorenzianus</i> Grunow				0.01	
	窄面角毛藻	<i>Chaetoceros paradoxus</i> Cleve		0.01			
	圆柱角毛藻	<i>Chaetoceros teres</i> Cleve		0.01			
	扭链角毛藻	<i>Chaetoceros tortissimus</i> Gran					0.02
	琼氏圆拱形藻*	<i>Coscinodiscopsis jonesiana</i> (Greville) E.A.Sar & I.Sunesen	0.13				
	威氏圆筛藻	<i>Coscinodiscus wailesii</i> Gran & Angst					0.10
	中国半管藻*	<i>Hemiaulus chinensis</i> Greville		0.17			
	翼鼻状藻	<i>Proboscia alata</i> (Brightwell) Sundström		0.03			
	印度鼻状藻*	<i>Proboscia indica</i> (H.Peragallo) Hernández-Becerril		0.06			
	柔弱拟菱形藻	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (Cleve) Heiden					0.04
	中国三桨座舰藻*	<i>Trieres chinensis</i> (Greville) M.P.Ashworth & E.C.Theriot	0.01			0.03	
温带种 Temperate species	柔弱角毛藻	<i>Chaetoceros debilis</i> Cleve	0.85	0.02	0.02		
	拟垂缘角毛藻	<i>Chaetoceros pseudocrinitus</i> Ostenfeld	0.21				
	萎软几内亚藻	<i>Guinardia flaccida</i> (Castracane) H.Peragallo		0.20			
	诺氏海链藻	<i>Thalassiosira nordenskioeldii</i> Cleve			0.06		
	圆筛藻	<i>Coscinodiscus</i> spp.		0.06	0.03		
	海链藻	<i>Thalassiosira</i> spp.			0.05	0.05	
甲藻 Dinoflagellate							
广温种 Eurythermal species	夜光藻	<i>Noctiluca scintillans</i> (Macartney) Kofoid & Swezy	0.04		0.11	0.17	0.10
	五角原多甲藻	<i>Protoperidinium pentagonum</i> (Gran) Balech					0.01
	梭形角藻*	<i>Triplos fusus</i> (Ehrenberg) F.Gómez		0.01	0.02		0.20
暖温种 Warm- temperate species	牟氏角藻*	<i>Triplos muelleri</i> Bory	0.02	0.01	0.01	0.02	0.07

注：表中所示数值为优势度>0.01 的物种在不同年代各季节优势度之和；\*所示名称为 AlgaeBase 数据库修订后的正确物种名

Note: Values in the table are the sums of species Dominance >0.01 in each season at different ages; \* indicates the correct species name after emendation on AlgaeBase database

势, 底栖性的具槽帕拉藻在 2010 年季节调查中优势度之和高达 0.54, 此外甲藻在 21 世纪亦开始形成优势, 比如夜光藻和角藻。

## 2.2 细胞丰度的年代际变化

近 50 多年来, 渤海浮游植物总丰度变化在  $(8.33 \sim 472) \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> 之间, 平均为  $116 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 最高值和最低值分别出现在 1982 年夏季和 2000 年夏季 (图 2)。年代际均值在 1960s、1980s、1990s、2000s 和 2010s 分别为  $(168、216、101、28.0$  和  $68.7) \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 总丰度在 20 世纪末降低到最低值, 较 1980s 最大降幅 87.0%, 进入 21 世纪后逐步回升, 有 1.5 倍增加。从类群结构来看, 硅藻 50 多年平均丰度为  $111 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 平均占到了浮游植物总丰度的 92.5% (65.3%~99.8%), 冬季硅藻所占丰度比例最高, 达到平均 99.0% 的水平, 2014 年秋季占比最低。甲藻 50 多年来平均丰度只有  $4.84 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 其在渤海的地位明显不如硅藻, 甲藻的丰度高值主要出现在夏、秋季, 比如在 2014 年夏季、1982 年夏季和 1959 年秋季分别达到了  $(20.7、15.8$  和  $10.7) \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> 的丰度水平。

从渤海浮游植物甲硅藻比来看, 在 1960s、1980s、

1990s、2000s 和 2010s 的年代际平均水平分别为 0.34、0.16、0.97、1.52 和 1.24, 21 世纪甲硅藻比的平均水平较 20 世纪有了 2.82 倍的提升。按季节来看, 渤海甲硅藻比在春、夏、秋、冬季分别为 0.88、1.90、0.48 和 0.02, 可见夏季是渤海甲藻旺发的主要时段, 比如 2000 年夏季甲硅藻比为 4.65 (辽东湾高达 10.6), 夜光藻丰度平均为  $1.67 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> (辽东湾高达  $3.93 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>); 2014 年夏季为 2.27 (渤海中部高达 4.98), 牟氏角藻、叉状角藻 [*Triplos furca* (Ehrenberg) F.Gómez)] 和梭形角藻的丰度分别达到了  $(13.3、3.14$  和  $2.40) \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> 的平均水平。

从渤海浮游植物优势种的年代际变动来看 (图 3), 角毛藻丰度 50 多年来平均为  $53.0 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 最高值为 1982 年夏季的  $381 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 且主要为莱州湾高丰度 ( $3301 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>) 所贡献。角毛藻在 1960s、1980s、1990s、2000s 和 2010s 各年代际平均分别为  $(105、108、15.7、1.48$  和  $34.3) \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 其丰度于 20 世纪持续降低, 进入 21 世纪有所回升, 但较 1980s 仍有 68.2% 的下降。圆筛藻各年代际平均  $7.75 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, 最高值  $32.9 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> 出现在 1982 年秋季, 且为黄河口的丰度高值 ( $96.7 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>) 所控制。渤海圆筛藻丰度的高值主要出现在秋季, 平均

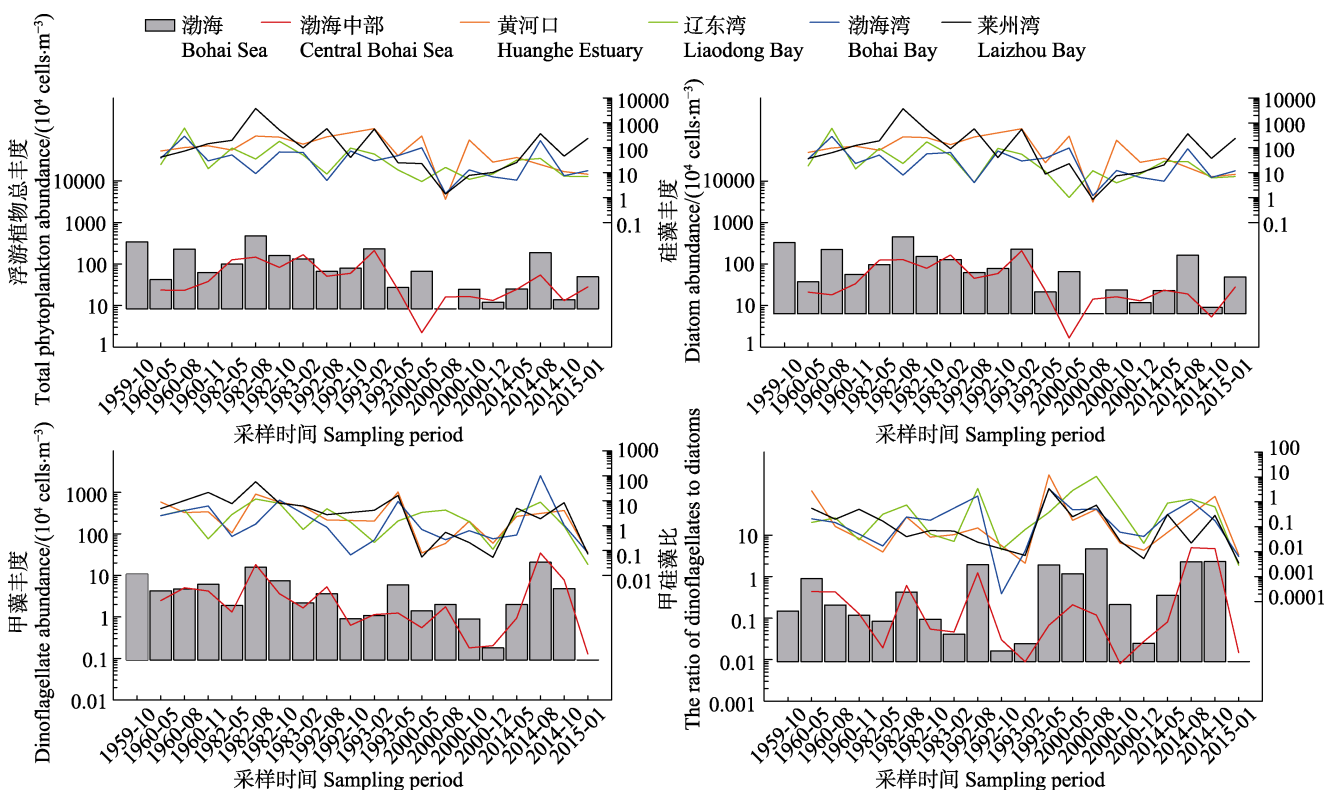


图 2 渤海浮游植物丰度的长期变化

Fig.2 Long-term changes on phytoplankton abundances in the Bohai Sea



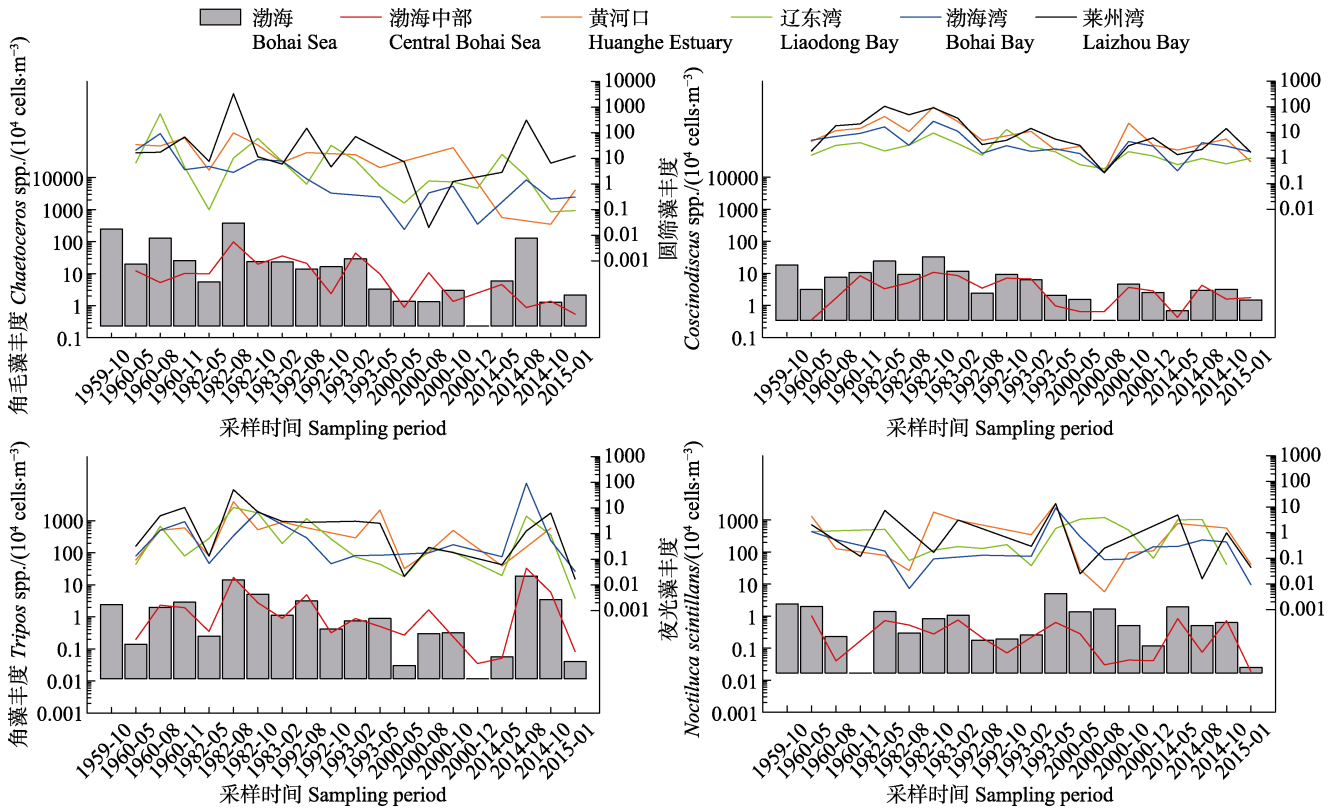


图 3 渤海浮游植物优势种丰度的长期变化

Fig.3 Long-term changes on abundances of dominant phytoplankton in the Bohai Sea

高达  $13.1 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ , 其他三季平均  $5.44 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ 。

角藻是渤海重要的甲藻类群, 50 多年来平均丰度为  $2.84 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ , 高值出现在 2014 年夏季和 1982 年夏季, 平均达到  $18.9 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$  和  $14.4 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ , 分别为渤海湾( $92.5 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ )和莱州湾( $51.8 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ )的丰度高值所控制。渤海夜光藻长期平均丰度为  $1.02 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ , 最大值为  $4.94 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$  出现在 1993 年春季, 且主要为莱州湾的高值(平均  $13.7 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ )贡献。从季节来看, 春季渤海夜光藻平均高达  $2.32 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ , 其余三季平均仅为  $0.57 \times 10^4 \text{ cells/m}^3$ 。

### 2.3 多样性的长期变化

50 多年来, 渤海浮游植物的物种丰富度 Margalef 指数变动在 0.35~1.92 之间, 平均为 1.02, 其在 1960s、1980s、1990s、2000s 和 2010s 各年代际平均分别为 1.22、1.09、0.65、0.66 和 1.48, 长期变化趋势为: 由 20 世纪 60 年代到 21 世纪末逐渐降低, 最大降幅为 46.7%, 进入 21 世纪后开始逐渐回升, 较 1990s 有 1.28 倍的升高(图 4)。物种多样性 Shannon-Weaver 指数在各年代际变化在 1.26~3.20 之间, 平均为 2.31, 其在 1960s、1980s、1990s、2000s 和 2010s 各年代际

平均分别为 2.84、2.60、1.96、1.93 和 2.22, 长期变化趋势与物种丰富度相一致, 20 世纪下降幅度为 32.0%, 21 世纪以来有 15.0%的回升。物种均匀度 Pielou 指数 50 多年来变化在 0.39~0.79 之间, 平均为 0.66, 自 1960s~2000s, 物种均匀度一直保持在  $0.69 \pm$

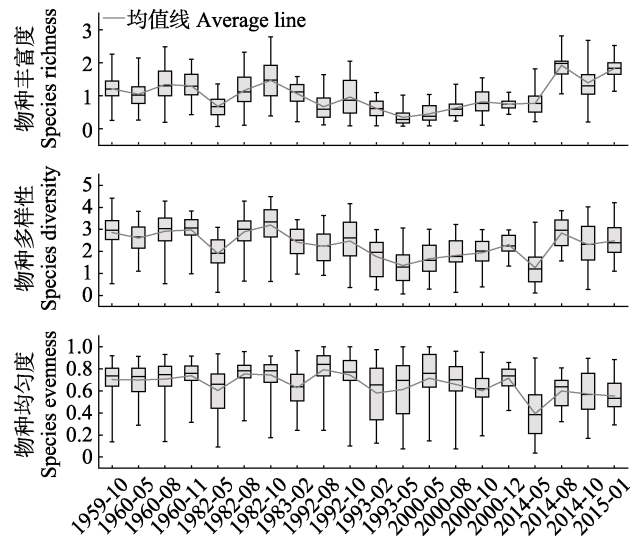


图 4 渤海浮游植物多样性长期变化的 Box-Whisker  
Fig.4 Box-Whisker plots on long-term changes of phytoplankton diversity in the Bohai Sea

0.06 的稳定水平, 但是进入 2010s (平均  $0.53 \pm 0.09$ ) 出现了 23.0% 的下降。

## 2.4 群落结构的差异性分析

为了能更好地认识 50 多年来在渤海环境变化和区域气候变化的共同影响下, 渤海浮游植物各属种出现了哪些变化, 以及在渤海各地理区域的响应程度如何, 对 21 世纪和 20 世纪的浮游植物群落结构进行了 SIMPER 差异性分析(表 3)。研究发现, 在所有 77 属 170 种中, 仅 18 属种的差异贡献率就已经达到了 90%。角毛藻对群落结构差异的贡献最大, 达到了 21.9%, 以莱州湾的变化最为明显(高达 26.9%)。圆筛藻对群落结构的差异贡献率达到了 14.5%, 以渤海湾-黄河口-莱州湾一线的变化最为显著, 平均差异贡献率 18.5%。渤海甲藻中主要是角藻和夜光藻对群落结构的贡献较大, 特别是在渤海中部和辽东湾海域, 差异贡献率分别高达 11.7% 和 9.6%。

## 3 讨论

### 3.1 渤海浮游植物群落及其年代际动态格局

渤海浮游植物已记录了 400 余种, 其中绝大多数

为硅藻物种, 生态类型主要为温带近岸性(孙军等, 2002)。细胞丰度的季节变化具有典型的温带海区双峰型特征, 在上下半年各出现 1 次丰度高值(康元德, 1991; 俞建奎等, 1993)。郭术津等(2014)研究表明, 近年来渤海浮游植物群落出现明显的物种演替现象, 角毛藻在群落中的优势地位下降, 具槽帕拉藻、角藻逐渐兴盛, 群落结构逐渐由硅藻单一控制转向硅、甲藻共同控制。本研究结果也进一步证实了渤海浮游植物的这些新现象, 比如在 2010s 的季节调查中, 具槽帕拉藻优势度之和最高, 且在全年都形成优势; 角藻中仅梭形角藻一种优势度各季之和就已高达 0.20。

莱州湾海域栖息地多样、食物饵料资源丰富, 是渤海最重要的渔业生物产卵场和索饵场(吴强等, 2016)。通过本研究浮游植物各属种对群落结构年代际差异贡献率大小的探讨后发现, 角毛藻在莱州湾的丰度平均水平 21 世纪较 20 世纪下降程度高达 87.2%, 在渤海的平均丰度下降了 76.6%, 已有资料也表明浮游植物丰度在莱州湾呈逐年下降的趋势(王俊, 2000)。渤海湾海域浮游植物群落结构的年代际变化主要由圆筛藻丰度的下降所主导, 其对群落结构的差异贡献高达 19.8%, 尽管渤海圆筛藻平均丰度在 21 世纪降

表 3 渤海浮游植物在 2000s-2015 与 1959-1990s 群落结构组成的差异贡献率  
Tab.3 Percent contribution to dissimilarity in phytoplankton community structure between 2000s~2015 and 1959~1990s in the Bohai Sea

中文名 Chinese name	拉丁文名 Latin name	差异贡献率 Percent contribution on dissimilarity (%)					
		渤海 Bohai Sea	渤海中部 Central Bohai Sea	黄河口 Huanghe Estuary	辽东湾 Liaodong Bay	渤海湾 Bohai Bay	莱州湾 Laizhou Bay
累积贡献率	Cumulative contribution	91.0	90.4	91.6	91.3	90.5	91.2
角毛藻	<i>Chaetoceros</i> spp.	21.9	17.4	19.5	20.0	18.5	26.9
圆筛藻	<i>Coscinodiscus</i> spp.	14.5	8.1	16.3	11.1	19.8	19.3
具槽帕拉藻	<i>Paralia sulcata</i>	10.3	17.0	4.8	14.1	10.3	3.1
角藻	<i>Tripos</i> spp.	6.4	11.7	2.7	7.1	4.5	4.6
海线藻	<i>Thalassionema</i> spp.	4.9	4.2	5.1	4.6	4.1	4.0
夜光藻	<i>Noctiluca scintillans</i>	4.2	1.5	4.6	9.6	3.9	5.0
拟菱形藻	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	3.8	3.3	5.3	2.1	5.2	5.2
双尾藻	<i>Ditylum</i> spp.	3.1	2.4	3.6	2.9	6.0	1.3
几内亚藻	<i>Guinardia</i> spp.	3.0	2.0	5.5	2.2	2.0	5.5
中肋骨条藻	<i>Skeletonema costatum</i>	2.6	3.1	5.0	1.2	2.9	1.1
弯角藻	<i>Eucampia</i> spp.	2.5	1.6	5.1	1.9	0.5	5.2
裸甲藻	<i>Gymnodinium</i> spp.	2.5	1.4	3.6	1.3	1.9	3.7
海链藻	<i>Thalassiosira</i> spp.	2.4	3.1	1.7	1.2	5.4	0.4
半管藻	<i>Hemiaulus</i> spp.	2.2	4.3	0.2	4.2	1.5	0.3
鼻状藻	<i>Proboscica</i> spp.	1.9	3.7	0.9	3.8	1.0	0.4
舟形藻	<i>Navicula</i> spp.	1.7	1.0	4.2	1.0	2.3	0.4
幅杆藻	<i>Bacteriastrum</i> spp.	1.7	1.9	2.5	0.9	0.5	3.2
派格棍形藻	<i>Bacillaria paxillifera</i>	1.6	2.7	0.9	2.1	0.3	1.4

低了 81.2%，其在浮游植物群落中还是能形成一定的优势，比如星脐圆筛藻的优势度在 21 世纪有了 1.48 倍的增加，这与渤海湾浮游植物研究结果一致(张秋丰等, 2007)，并且星脐圆筛藻在渤海全年都能作为优势种出现(杨阳等, 2016)。辽东湾海域甲藻的年代际变化明显，夜光藻丰度平均水平在 21 世纪有了 3.04 倍的增加，这一点也印证了辽东湾是渤海夜光藻赤潮的高发海域(周遵春等, 2002)。渤海中部海域具槽帕拉藻的变化最为明显，对群落结构的差异贡献高达 17.0%，其渤海年代际平均丰度在 2000s 降至最低，进入 2010s 后升至  $5.13 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>，此外在渤海中部甲藻中角藻的年代际变化亦较为显著，其丰度在 21 世纪出现了 75.0% 的增加。黄河口海域的浮游植物长期变动主要集中在角毛藻和圆筛藻 2 个硅藻属种上，其平均丰度在 21 世纪分别下降了 78.1% 和 76.2%，而且已有黄河口海域研究也同样表明角毛藻和圆筛藻在浮游植物群落中的优势地位呈现下降的趋势(栾青杉等, 2017)。

### 3.2 渤海浮游植物长期变化的原因分析

通常来说影响海洋浮游植物分布的因素主要以海水温盐、光照、营养盐等上行控制因素为主，从渤海来看，莱州湾的黄河、渤海湾的海河以及辽东湾的辽河等近岸入海河流，为渤海输入了大量的泥沙和淡水，使得渤海近岸水体光照、盐度、营养盐等理化要素发生改变，进而直接影响到浮游植物的初级生产过程。因此，渤海众多入海河流的陆源排放给浮游植物变动带来的影响是首位的，其次才是渤海热盐环流、层化、混合等过程的影响。当然，人类活动过程，比如大规模的围填海、湿地破坏减少、近岸水产养殖等，也是通过高强度地改变邻近海域的水动力条件等物理过程，对浮游植物变动产生影响。

已有的渤海长期研究表明(Ning *et al.*, 2010)，自 20 世纪 60 年代至 20 世纪末，渤海水温有一定程度的增加，盐度呈现大幅上升的趋势，这与人类活动和气候变化导致的黄河在 1972~1999 年间的长期断流不无关系。温盐的升高有利于适温、盐较高的浮游植物类群在群落中形成优势，比如角藻、圆筛藻等(俞建奎等, 1993)，而这也进一步解释了本研究角藻在渤海增加的原因。20 世纪黄河断流引起的陆源营养盐输入的减少，是造成 20 世纪渤海浮游植物丰度和多样性持续降低的主要原因，但是进入 21 世纪后开展的黄河调水调沙等活动，则显著改善了渤海的浮游植物格局，丰度和物种多样性水平逐步恢复，底栖性的物种如具槽帕拉藻开始形成绝对的优势。

渤海无机氮的上升和磷酸盐的下降直接导致海水 N/P 比在 20 世纪的长期上升趋势，特别是在渤海南部海域，N/P 比已经远高于浮游植物元素吸收的 Redfield 比值(~16)，并导致渤海浮游植物由 N 限制逐渐向 P 限制转变(Ning *et al.*, 2010; 魏皓等, 2003)。进入 21 世纪，渤海的 N/P 比水平仍在持续升高，比如莱州湾海域在 2009 年的 N/P 比高达 199(张锦峰等, 2015)。研究表明 N/P 比的升高会引起浮游植物演替转向甲藻或者非硅藻主导的群落结构，硅藻在高 N/P 比的环境条件中不占优势(Egge, 1998; 郭术津等, 2014)。渤海营养盐结构改变的直接后果，就是引起了浮游植物群落结构的变化，这一点从本研究渤海甲硅藻比的长期变化趋势得到验证，自 20 世纪 90 年代以来，渤海的甲硅藻比升高了 3.97 倍。

### 3.3 渤海浮游植物变动对渔业生物饵料基础的影响

浮游植物的年代际变动决定了渤海初级生产过程和渔业生物饵料基础的格局转换，但是这种丰度和结构的改变给渤海主要渔业种群的补充带来何种影响尚无定论。研究表明，在渤海，毛虾的主要饵料为圆筛藻和具槽帕拉藻，合计占到食物组成的约 80%；对虾幼体主要以原多甲藻为食，仔虾则主要摄食舟形藻、斜纹藻(*Pleurosigma*)和圆筛藻(康元德, 1991)。渤海鲈和斑鲈幼鱼的食物组成以海链藻、圆筛藻、裸甲藻(*Gymnodinium*)和原甲藻(*Prorocentrum*)等饵料为主(吕末晓, 2016)。本研究结果发现，角毛藻在渤海浮游植物群落的长期变化中已不占优势，而圆筛藻物种却能够继续保持其优势地位；特别是近 10 年来，具槽帕拉藻形成了绝对优势，这表明尽管渤海浮游植物丰度存在年代际的波动，但是主要饵料种的优势能够保持且有一定程度的提升。

从群落结构变动来看，不论是本研究还是已有研究(郭术津等, 2014)，渤海甲硅藻比的持续升高已经成为事实，渤海的浮游植物群落也正在由硅藻控制转向硅、甲藻共同控制，但是甲藻丰度的增加对海洋生态系统的影响并不一定是消极的，除局地的有害藻华和赤潮以外(周遵春等, 2002)，部分甲藻物种优势度的提升或许能够对渔业生物的早期补充产生积极的影响。比如，已有研究表明，自然海域斑块分布的甲藻为鳀仔鱼的开口摄食及其早期生活史阶段提供重要的营养支撑(Lasker, 1975)，实验室研究也显示血红阿卡藻(*Akashiwo sanguinea* (K.Hirasaka) G.Hansen & Moestrup)一旦被仔鳀发现就会引起它们的停留摄食(Hunter, 1977)。多种浮游植物投喂仔鳀的实验证据显示(Scura *et al.*, 1977)，绝对大多的仔鳀仅开口摄食甲

藻, 而不摄食硅藻和小的鞭毛藻; 血红阿卡藻是鳀仔鱼孵化后 10 d 内的重要的营养来源, 投喂血红阿卡藻和微型浮游动物的鳀仔鱼, 比仅投喂微型浮游动物的个体生长快; 而投喂多边舌甲藻 [*Lingulodinium polyedra* (F.Stein) J.D.Dodge)] 之后, 比起仅投喂微型浮游动物, 鳀仔鱼的存活率显著提高。

总之, 浮游植物饵料基础的变动与渤海渔业生物的早期摄食、存活和补充之间有着复杂的过程和机制。尽管近年来渤海硅藻饵料种的优势地位能够保持, 甲藻的丰度水平有所提升, 但是, 要搞清关键资源种群补充的动力学及其对近海环境变化的适应性响应, 还需要更多的学科交叉研究和基础调查工作来补充和完善。

**致谢:** 感谢天津渤海水产研究所张雪在 2014 年春季渤海样品分析中的帮助。

## 参 考 文 献

- Egge JK. Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations? *Journal of Marine Systems*, 1998, 16(3-4): 191-198
- Guo SJ, Li YQ, Zhang CX, *et al.* Phytoplankton community in the Bohai Sea and its relationship with environmental factor. *Marine Science Bulletin*, 2014, 33(1): 95-105 [郭术津, 李彦翘, 张翠霞, 等. 渤海浮游植物群落结构及与环境因子的相关性分析. *海洋通报*, 2014, 33(1): 95-105]
- Hunter JR. Behavior and survival of northern anchovy *Engraulis mordax* larvae. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports, 1977, 19: 138-146
- Jin DX, Chen JH, Huang KG. Planktonic diatoms in China Seas. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1965, 1-230 [金德祥, 陈金环, 黄凯歌. 中国海洋浮游硅藻类. 上海: 上海科学技术出版社, 1965, 1-230]
- 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重点问题. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 124-131]
- Kang YD. Distribution and seasonal variations of phytoplankton in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1991(12): 31-54 [康元德. 渤海浮游植物的数量分布和季节变化. *海洋水产研究*, 1991(12): 31-54]
- Lasker R. Field criteria for survival of anchovy larvae: the relationship between inshore chlorophyll maximum layers and successful first feeding. *Fishery Bulletin*, 1975, 73(3): 453-462
- Lü MX. Study on the diet composition of juvenile of *Liza haematocheila* and *Konosirus punctatus* and its relationship with ambient phytoplankton. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 1-52 [吕末晓. 鲮、斑鳍幼鱼食物组成及其与环境浮游植物的关系研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 1-52]
- Luan QS, Kang YD, Wang J. Long-term changes of phytoplankton community and diversity in adjoining waters of the Yellow River estuary (1960-2010). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 913-921 [栾青杉, 康元德, 王俊. 黄河口邻近海域浮游植物群落及其多样性的长期变化(1960-2010). *中国水产科学*, 2017, 24(5): 913-921]
- Ning XR, Lin CL, Su JL, *et al.* Long-term environmental changes and the responses of the ecosystems in the Bohai Sea during 1960-1996. *Deep-Sea Research II*, 2010, 57(11): 1079-1091
- Scura ED, Jerde CW. Various species of phytoplankton as food for larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and relative nutritional value of the dinoflagellates *Gymnodinium splendens* and *Gonyaulax polyedra*. *Fishery Bulletin*, 1977, 75(3): 577-583
- Sun J, Liu DY, Yang SM, *et al.* The preliminary study on phytoplankton community structure in the Central Bohai Sea and the Bohai Strait and its adjacent area. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(5): 461-471 [孙军, 刘东艳, 杨世民, 等. 渤海中部和渤海海峡及邻近海域浮游植物群落结构的初步研究. *海洋与湖沼*, 2002, 33(5): 461-471]
- Sun XM, Xu DH, Xia B, *et al.* Species composition and seasonal variation of netz-phytoplankton in the Central Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 19-27 [孙雪梅, 徐东会, 夏斌, 等. 渤海中部网采浮游植物种类组成和季节变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 19-27]
- Tomas CR. Identifying marine phytoplankton. San Diego: Academic Press, 1997, 1-858
- 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]
- Wang J, Kang YD. Study on population dynamics of phytoplankton in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1998, 19(1): 43-52 [王俊, 康元德. 渤海浮游植物种群动态的研究. *海洋水产研究*, 1998, 19(1): 43-52]
- Wang J. Study on population dynamics of phytoplankton in Laizhou Bay. *Marine Fisheries Research*, 2000, 21(3): 33-38 [王俊. 莱州湾浮游植物种群动态研究. *海洋水产研究*, 2000, 21(3): 33-38]
- Wei H, Zhao L, Yu ZG, *et al.* Variation of the Phytoplankton Biomass in the Bohai Sea. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2003, 33(2): 173-179 [魏皓, 赵亮, 于志刚, 等. 渤海浮游植物生物量时空变化初析. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(2): 173-179]
- Wu Q, Jin XS, Luan QS, *et al.* Analysis on the reproduction of *Fenneropenaeus chinensis* and *Portunus trituberculatus* based on their food sources and predators in the Laizhou Bay of China. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 1-9 [吴强, 金显仕, 栾青杉, 等. 基于饵料及敌害生物的莱州湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)增殖基础分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 1-9]
- Yang Y, Sun J, Guan XY, *et al.* Seasonal variation of netz-phytoplankton community in Bohai Sea. *Marine Science Bulletin*, 2016, 35(2): 121-131 [杨阳, 孙军, 关翔宇, 等. 渤海网采浮游植物群集的季节变化. *海洋通报*, 2016, 35(2): 121-131]
- Yu JL, Li RX. The study on the phytoplankton ecology in the Bohai and Yellow Seas. *Journal of Oceanography of*

- Huanghai & Bohai Seas, 1993, 11(3): 52–59 [俞建鑫, 李瑞香. 渤海、黄海浮游植物生态的研究. 黄渤海海洋, 1993, 11(3): 52–59]
- Zhang JF, Gao XL, Li PM, *et al.* Nutrient distribution characteristics and long-term trends in the southwest of the Laizhou Bay and its adjacent rivers. *Marine Science Bulletin*, 2015, 34(2): 222–232 [张锦峰, 高学鲁, 李培苗, 等. 莱州湾西南部海域及其毗邻河流水体营养盐的分布特征及长期变化趋势. 海洋通报, 2015, 34(2): 222–232]
- Zhang QF, Yin CL, Xu YS, *et al.* The phytoplankton community sampled by nets in the dominant area monitoring red tide in Bohai Bay in summer, 2006. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2007, 22(3): 19–23 [张秋丰, 尹翠玲, 徐玉山, 等. 2006 年夏季渤海湾赤潮重点监控区的网采浮游植物群落. 天津科技大学学报, 2007, 22(3): 19–23]
- Zhou ZC, Ma ZQ, Xue K, *et al.* Study on the red tides caused by *Noctiluca scintillans* and *Ceratium furca* in Liaodong Wan Bay. *Fisheries Science*, 2002, 21(2): 9–12 [周遵春, 马志强, 薛克, 等. 对辽东湾夜光藻赤潮和叉状角藻赤潮成因的初步研究. 水产科学, 2002, 21(2): 9–12]
- Zhu SP, Guo YJ. Studies on the genus *Chaetoceros* Ehrenberg from the fishing ground of the mackerel, *Pneumatophorus japonicus* (Houttuyn), off the Shantung coast from Chefoo to Weihai. Part I. A systematic study. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1957, 1(1): 27–94 [朱树屏, 郭玉洁. 烟台、威海鲈鱼渔场及其附近海区角毛硅藻属的研究 I. 分类的研究. 海洋与湖沼, 1957, 1(1): 27–94]

(编辑 江润林)

## Long-Term Changes in the Phytoplankton Community in the Bohai Sea (1959~2015)

LUAN Qingshan<sup>1,2</sup>, KANG Yuande<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1,3</sup>ⓧ

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao), Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** Based on phytoplankton net samples from the Bohai Sea from 1959 to 2015, the long-term changes in species composition, cell abundance, community structure, and species diversity were analyzed. A total of 77 genera and 170 taxa were recorded, most of which were temperate-coastal ecotype species. The composition pattern of the dominant taxa changed dramatically over the fifty-plus years. Centric diatoms such as *Chaetoceros* spp. and *Coscinodiscus* spp. dominated in the communities of last century, while *Paralia sulcata*, *Thalassionema* spp., and dinoflagellates such as *Noctiluca scintillans* and *Tripes* spp. gradually became predominant in this century. The cruise-averaged cell abundances ranged from  $8.33 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> to  $472 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup>, with diatoms accounting for 65.3%~99.8%. The abundances and species diversities declined to their lowest levels last century, whilst they had 1.5 times and 15.0% respective recoveries in this century. The persistent increase in seawater N : P ratios in the Bohai Sea has led to a phytoplankton transition from diatom-dominated communities to communities co-dominated by diatoms and dinoflagellates, with an increase of 2.82 times in the ratio of diatoms to dinoflagellates in this century from that in the last century. The decadal changes in the phytoplankton community structure and its herbal diet basis in the Bohai Sea affect the recruitment process during the early life stages of the key resource species. This study provides a baseline database and references for discussion on the mechanisms of adaptive responses of fishery populations to the long-term environmental changes in the Bohai Sea.

**Key words** Phytoplankton; Community structure; Long-Term changes; Bohai Sea

ⓧ Corresponding author: WANG Jun, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170908001

http://www.yykxjz.cn/

林群, 单秀娟, 王俊, 李忠义. 渤海中国对虾生态容量变化研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 19–29

Lin Q, Shan XJ, Wang J, Li ZY. Changes in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) carrying capacity of the Bohai Sea. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 19–29

# 渤海中国对虾生态容量变化研究\*



林 群<sup>1</sup> 单秀娟<sup>1,2</sup> 王 俊<sup>1①</sup> 李忠义<sup>1</sup>

(1. 农业农村部黄渤海渔业资源环境科学观测实验站 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试点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 1982 年和 2014~2015 年渤海渔业资源与环境调查数据, 采用 Ecopath 模型, 分析了渤海生态系统的营养关系、结构及功能参数, 评估了中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在渤海的生态容量变化。结果显示, 渤海生态系统中底栖甲壳类、软体动物等功能群处于重要的营养位置, 但中国对虾不是渤海生态系统的关键种, 其生物量的增加对口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、多毛类、底栖甲壳类有负影响, 花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、虾虎鱼类等生物量的增加将对中国对虾产生负影响。渤海生态系统 2 个时期均处于发育的不稳定期, 仍有较高的剩余生产量有待利用, 2014~2015 年渤海生态系统成熟度和稳定性较 1982 年有所降低, 系统出现一定程度的退化。中国对虾 1982 年和 2014~2015 年在渤海的生态容量为 0.810 和 0.702 t/km<sup>2</sup>; 与当年依据调查数据评估的生物量相比较, 中国对虾有较大的增殖潜力, 当生物量增长至 71.68 倍和 585 倍时, 仍不会超过生态容量。

**关键词** 渤海; 中国对虾; 营养关系; 生态容量; Ecopath 模型

**中图分类号** S 931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0019-11

渤海是黄渤海多种渔业种类的重要产卵场和栖息地, 由于环境污染和过度捕捞等影响, 目前多数渔业种群衰退、资源补充量下降, 个体大、高营养层次的优势种逐渐被个体小、营养层次低的小型中上层鱼类所替代, 一些优势种的群体组成小型化、低龄化、性成熟提前; 小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、许氏平鲉(*Sebastes schlegel*)等经济鱼类的资源量在 1990 年下降迅速, 直到 2000

年开始有小幅回升, 其他渔业种类的资源量较 1980 年尚未恢复(邓景耀等, 1990; Tang *et al*, 2003; 金显仕, 2004; 郭旭鹏等, 2006; 单秀娟等, 2012; 林群等, 2016; Shan *et al*, 2016)。渔业资源增殖被证明是增加幼体补充量, 改善种群结构, 修复和重建衰退渔业资源的有效手段(Bell *et al*, 2005; 金显仕等, 2014), 但同时也存在一定的生态风险, 过度增殖将对生态系统造成严重后果(Blaxter, 2000; Mcdowell, 2002; Aprahamian

\* 国家重点基础研究发展计划项目(2015CB453303)、公益性行业(农业)科研专项经费(201303050)、中海油公益基金项目渤海对虾容量、山东省泰山学者建设工程专项和青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才”计划共同资助[This work was supported by the National Basic Research Program of China (2015CB453303), the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303050), China National Offshore Oil Corporation Public Welfare Fund Project-Fleshy Prawn Capacity of Bohai Sea, Ministry of Agriculture and the Special Fund of the Taishan Scholar Project and Talent Plan of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology]. 林 群, E-mail: linqun@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王 俊, 研究员, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-09-08, 收修改稿日期: 2018-03-22

et al, 2003)。中国对虾是渤海主要增殖种类之一, 20世纪 80 年代, 中国对虾补充量大幅下降, 渤海开始中国对虾的大规模增殖放流, 至今, 其资源量仍尚未恢复。如何既能保证增殖放流效果, 又能维持生态系统结构和功能的稳定? 这需要掌握生态系统的总体能流特征、营养关系、放流种类的生态容量等(Blankenship, 1995; Lorenzen et al, 2010)。目前, 渤海中国对虾生态容量尚未开展相关系统研究, 生态容量的估算是最优放流数量研究的前提。鉴于此, 本研究依据 1982 年和 2014~2015 年渤海的渔业资源调查数据, 构建了 2 个时期的渤海营养通道模型, 分析了渤海生态系统的营养相互关系、结构和功能特征, 计算了不同时期渤海中国对虾的生态容量, 旨在为开展科学增殖放流提供指导性建议。

## 1 材料与方法

### 1.1 模型原理与研究方法

渤海生态系统营养通道模型(Ecopath 模型)利用建模软件 Ecopath with Ecosim 版本 5.1 和 6.5 (Christensen et al, 2004)构建。Ecopath 模型基于营养动力学原理, 定义生态系统由一系列生态关联、能够基本覆盖生态系统能量流动过程的功能群(Group)组成, 包含生态系统的所有生物组成部分, 从碎屑和浮游植物到顶层捕食者(Polovina 1984; Christensen et al, 1992)。模型要求输入生物量( $B$ )、生产量/生物量( $P/B$ )、消耗量/生物量( $Q/B$ )和生态营养效率(EE) 4 个基本参数中的任意 3 个, 以及食物组成矩阵和捕捞量参数。模型的调试是使生态系统每个功能群的输入和输出保持平衡, 平衡满足的基本条件是:  $0 < EE \leq 1$ 。基本原理及调试方法具体参见林群等(2012)。

Ecopath 模型利用混合营养分析程序(Mixed trophic impact, MTI)分析各功能群间的营养相互关系(Leontief, 1951; Ulanowicz et al, 1990), 基于 MTI 分析, 提供了辨识生态系统关键种的方法(Power et al, 1996; Libralato et al, 2006), 生态网络分析(Network analysis)功能可以评估表征生态系统结构和功能的生态指数、渔业捕捞对生态系统结构影响的相关指数(Odum, 1969; Christensen et al, 2004)。

生态容量定义为特定时期、特定海域所能支持的, 不会导致种类、种群以及生态系统结构和功能发生显著性改变的最大生物量, Ecopath 模型为生态容量的研究提供了理论指导, 基于海域的初级生产量基础, 考虑了放流品种与食物竞争者、捕食者等间的相互作用, 可评估生态容量, 通过不断增加某放流品种

的生物量(捕捞量也相应地成比例增加), 观察系统中饵料生物等其他功能群的变化, 当模型中任意其他功能群的  $EE > 1$  时, 模型将失去平衡而改变当前的状态, 在模型即将不平衡前的放流品种生物量值即为生态容量(Jiang et al, 2005; Byron et al, 2011; 林群等, 2013)。

### 1.2 功能群的划分及数据来源

依据生物种类间的栖息地特征、生态学特征、简化食物网的研究策略(唐启升, 1999)以及评估中国对虾生态容量的研究目的, 将渤海生态系统划分为 19~20 个功能群, 包含重要渔业种群、中国对虾、中国对虾的食物竞争者和敌害生物, 也包括有机碎屑、浮游植物、浮游动物、大型底栖动物、小型底栖动物等(表 1), 基本涵盖了渤海生态系统生物能量流动的组成成分。生物量、生产量和其他能量流动以湿质量( $t/km^2$ )形式表示。

数据取自黄海水产研究所 1982 年 2 月、5 月、8 月、10 月和 2014 年 10 月、2015 年 2 月、5 月、8 月渤海渔业资源与环境调查, 调查网具除网口周长有所不同, 1982 年为 600 目、2014~2015 年为 1740 目, 其他参数相同, 网口高度 6 m、宽 22.6 m、网目 63 mm、囊网网目 20 mm, 拖速大约 3 n mile/h, 所有调查数据均进行了标准化处理。对渔获物进行生物学测定和胃含物分析, 鱼类、大型无脊椎动物的生物量通过扫海面积法(Gulland, 1965)计算得出, 浮游植物生物量由叶绿素  $a$  换算得出(Bundy, 2004; Lü et al, 2009), 浮游动物生物量根据浮游动物大网采集数据, 依据称重法(左涛等, 2003)计算得出。底栖动物利用箱式采泥器采样, 大型底栖动物依据称重法(张志南等, 1990; 张嵩等, 2017)测定生物量, 小型底栖动物依据体积换算法(张青田等, 2011)测定生物量。碎屑量根据碎屑和初级生产碳的经验公式计算(Christensen, 1993)。鱼类  $P/B$  值、 $Q/B$  值利用经验公式计算得出(Pauly, 1980; Palomares et al, 1989), 其他功能群种类的  $P/B$ 、 $Q/B$  值, 以及其他未知参数等主要参考邻近水域模型(林群等, 2009、2012)。食性分析矩阵依据胃含物分析研究结果及已有的参考文献(邓景耀, 1988; 杨纪明, 2001; 张波等, 2004; Zhang et al, 2007)。捕捞量数据参考中国渔业统计年鉴(1982 年, 2014 年, 2015 年), 捕捞信息动态采集网络该研究水域调查的渔捞日志资料(<http://www.eastfish.cn/index.aspx>)以及渔民调研。EE 值是较难获得的参数, 由模型估算得出。

表 1 渤海生态系统模型功能群的定义  
Tab.1 Definition of functional groups in the Ecopath model of Bohai Sea ecosystem

编号 No.	功能群 Functional group	组成 Composition
1	鳀 Anchovy	鳀 <i>Engraulis japonicus</i>
2	黄鲫 Scaly hairfin anchovy	黄鲫 <i>Setipinna taty</i>
3	蓝点马鲛 Japanese spanish mackerel	蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>
4	其他中上层鱼类 Other pelagic fishes	鳀科 Engraulidae、鲱科 Clupeidae、银鲱 <i>Pampus argenteus</i>
5	花鲈 Seabass	花鲈 <i>L. japonicus</i>
6	其他底层鱼类 Other demersal fishes	带鱼科 Trichiuridae、大泷六线鱼 <i>Hexagrammos otakii</i> 、白姑鱼 <i>Argyrosomus argentatus</i> 、鲮 <i>Platycephalus indicus</i> 、鲑科 Tetraodontidae、其他石首鱼科 Sciaenidae、绿鳍马面鲈 <i>Navodon modestus</i> 、小黄鱼 <i>L. polyactis</i> 、鲷科 Sparidae、绵鳚科 Zoarcidae 等
7	虾虎鱼类 Gobiidae	矛尾虾虎鱼 <i>Chaeturichthys stigmatias</i> 、六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i> 、矛尾复虾虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i> 、中华栉孔虾虎鱼 <i>Ctenotrypauchen chinensis</i> 、红狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus rubicundus</i> 等
8	其他底栖鱼类 Other benthic fishes	许氏平鲉 <i>S. schlegel</i> 、细纹狮子鱼 <i>Liparis tanakae</i> 、黄鮫鱈 <i>Lophius litulon</i> 、鲆科 Bothidae、鲽科 Pleuronectidae、舌鳎科 Cynoglossidae 等
9	中国对虾 Chinese shrimp	中国对虾 <i>F. chinensis</i>
10	口虾蛄 Mantis shrimp	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>
11	三疣梭子蟹 Swimming crab	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>
12	头足类 Cephalopods	日本枪乌贼 <i>Loligo japonica</i> 、双喙耳乌贼 <i>Sepiolo birostrat</i> 、长蛸 <i>Octopus variabilis</i> 、短蛸 <i>Octopus ocellatus</i> 等
13	软体动物 Molluscs	双壳类 Bivalvia、腹足类 Gastropoda
14	多毛类 Polychaetes	多毛类 Polychaeta
15	棘皮动物 Echinoderms	棘皮动物 Echinodermata
16	底栖甲壳类 Benthic crustaceans	葛氏长臂虾 <i>Palaemon gravieri</i> 、脊腹褐虾 <i>Crangon affinis</i> 、脊尾白虾 <i>Palaemon carinicauda</i> 、鹰爪虾 <i>Trachypenaeus curvirostris</i> 、日本鼓虾 <i>Alpheus japonicus</i> 、鲜明鼓虾 <i>Alpheus distinguendus</i> 、中国毛虾 <i>Acetes chinensis</i> 、日本螯 <i>Charybdis japonica</i> 、泥脚隆背蟹 <i>Carcinoplax vestita</i> 、日本关公蟹 <i>Dorippe japonica</i> 、双斑螯 <i>Charybdis bimaculata</i> 、短尾类幼体 Brachyura larva、长尾类幼体 Maeruran larva 等
17	小型底栖动物 Meiobenthos	介形类 Ostracoda、涟虫 Cumacea、端足类 Amphipoda、线虫 Nematoda、底栖桡足类 Copepoda、小型多毛类 Polychaeta、小型双壳类 Bivalvia 动物类 Kinorhyncha、涡虫 Turbellaria、异足类 Tanaidacea、等足类 Isopoda 等
18	浮游动物 Zooplankton	真刺唇角水蚤 <i>Labidocera euchaeta</i> 、强壮箭虫 <i>Sagitta crassa</i> 、中华哲水蚤 <i>Calanus sinicus</i> 、墨氏胸刺水蚤 <i>Centropages mcmurrichi</i> 、小拟哲水蚤 <i>Paracalanus parvus</i> 等
19	浮游植物 Phytoplankton	硅藻 Bacillariophyta、甲藻 Pyrrophyta 等
20	碎屑 Detritus	碎屑 Detritus

## 2 结果与分析

### 2.1 模型参数质量与基本输出

Ecopath 模型利用 Pedigree 指数分析数据来源和模型质量, 2 个时期模型的 Pedigree 指数(Christensen

et al, 2004)分别为 0.495、0.507, 均处于较合理范围, 模型可信度较高。在系统的平衡过程中, 微调输入的参数, 同时进行了模型敏感度分析, 2 个模型的敏感度均在 $\pm 20\%$ 范围内, 通过鲁棒性检验。调试平衡的渤海 Ecopath 模型功能群的 EE 值均小于 1, 模型的输入参数和输出结果如表 2 所示, 1982 年和 2014~2015 年,



表2 渤海 Ecopath 模型的基本输入参数和估计参数(黑体)  
Tab.2 Basic input data and estimated parameters (bold) for Bohai Sea Ecopath model

功能群 Functional group	营养级 Trophic level	生物量 Biomass (t/km <sup>2</sup> )	生产量 /生物量 P/B	消耗量 /生物量 Q/B	生态营养 效率 EE
(a) 1982 年					
1 鳀 Anchovy	<b>3.23</b>	0.184	3.004	9.700	<b>0.982</b>
2 黄鲫 Scaly hairfin anchovy	<b>3.18</b>	0.349	1.697	5.500	<b>0.910</b>
3 蓝点马鲛 Japanese spanish mackerel	<b>4.29</b>	0.0815	0.650	5.800	<b>0.961</b>
4 其他中上层鱼类 Other pelagic fishes	<b>3.14</b>	<b>0.651</b>	1.420	6.900	0.950
5 花鲈 Seabass	<b>4.10</b>	0.0443	1.058	5.290	<b>0.64</b>
6 其他底层鱼类 Other demersal fishes	<b>3.64</b>	0.453	1.179	4.950	<b>0.929</b>
7 虾虎鱼类 Gobiidae	<b>3.47</b>	0.0309	1.59	4.700	<b>0.862</b>
8 其他底栖鱼类 Other benthic fishes	<b>3.58</b>	0.185	0.958	4.933	<b>0.854</b>
9 中国对虾 Chinese shrimp	<b>3.11</b>	0.0113	8.50	25.00	<b>0.743</b>
10 口虾蛄 Mantis shrimp	<b>3.15</b>	0.0654	8.00	28.90	<b>0.944</b>
11 三疣梭子蟹 Swimming crab	<b>3.36</b>	0.084	3.50	11.00	<b>0.729</b>
12 头足类 Cephalopods	<b>3.42</b>	0.158	3.70	18.50	<b>0.806</b>
13 软体动物 Molluscs	<b>2.14</b>	13.37	6.00	27.00	<b>0.429</b>
14 多毛类 Polychaetes	<b>2.10</b>	4.290	2.00	27.80	<b>0.366</b>
15 棘皮动物 Echinoderms	<b>2.33</b>	4.470	1.20	3.58	<b>0.250</b>
16 底栖甲壳类 Benthic crustaceans	<b>2.46</b>	4.700	5.65	26.90	<b>0.738</b>
17 小型底栖动物 Meiobenthos	<b>2.00</b>	5.095	9.00	33.00	<b>0.69</b>
18 浮游动物 Zooplankton	<b>2.00</b>	2.805	25.00	125.00	<b>0.58</b>
19 浮游植物 Phytoplankton	<b>1.00</b>	6.676	250.00	—	<b>0.265</b>
20 碎屑 Detritus	<b>1.00</b>	13.00	—	—	<b>0.398</b>
(b) 2014~2015 年					
1 鳀 Anchovy	<b>3.15</b>	0.092	3.004	9.700	<b>0.816</b>
2 黄鲫 Scaly hairfin anchovy	<b>3.23</b>	0.124	1.697	5.500	<b>0.564</b>
3 蓝点马鲛 Japanese spanish mackerel	<b>4.11</b>	0.012	0.650	5.800	<b>0.641</b>
4 其他中上层鱼类 Other pelagic fishes	<b>3.14</b>	<b>0.152</b>	1.420	6.900	0.950
5 底层鱼类 Demersal fishes	<b>3.35</b>	0.0121	1.179	4.950	<b>0.944</b>
6 虾虎鱼类 Gobiidae	<b>3.49</b>	0.0157	1.590	4.700	<b>0.471</b>
7 其他底栖鱼类 Other benthic fishes	<b>3.45</b>	0.0051	0.958	4.933	<b>0.614</b>
8 中国对虾 Chinese shrimp	<b>3.22</b>	0.0012	8.500	25.00	<b>0.898</b>
9 口虾蛄 Mantis shrimp	<b>3.08</b>	0.0295	8.000	28.90	<b>0.865</b>
10 三疣梭子蟹 Swimming crab	<b>3.32</b>	0.004	3.500	11.00	<b>0.73</b>
11 头足类 Cephalopods	<b>3.31</b>	0.0172	3.700	18.50	<b>0.941</b>
12 软体动物 Molluscs	<b>2.33</b>	8.000	6.000	27.00	<b>0.407</b>
13 多毛类 Polychaetes	<b>2.00</b>	4.500	2.000	27.80	<b>0.535</b>
14 棘皮动物 Echinoderms	<b>2.33</b>	2.600	1.200	3.580	<b>0.163</b>
15 底栖甲壳类 Benthic crustaceans	<b>2.29</b>	6.400	5.650	26.90	<b>0.296</b>
16 小型底栖动物 Meiobenthos	<b>2.08</b>	2.070	9.000	33.00	<b>0.257</b>
17 浮游动物 Zooplankton	<b>2.00</b>	4.950	25.00	125.00	<b>0.680</b>
18 浮游植物 Phytoplankton	<b>1.00</b>	19.270	250.00	—	<b>0.113</b>
19 碎屑 Detritus	<b>1.00</b>	45.00	—	—	<b>0.122</b>

注：“—”无对应数值

Note: “—” No corresponding value

中国对虾的营养级分别为 3.11、3.22, 生态营养效率分别为 0.743、0.898。

### 2.2 营养相互关系与关键种分析

MTI 分析是分析生态系统内部不同种群间营养

关系的有效途径, 渤海功能群间的营养相互关系利用 MTI 分析获得, 中国对虾的食物竞争者、主要饵料生物和敌害生物等之间的营养关系在营养关系分析中可直观显示(图 1)。1982 年, 中国对虾生物量的增加将对虾虎鱼类、花鲈产生正影响, 影响值分别为

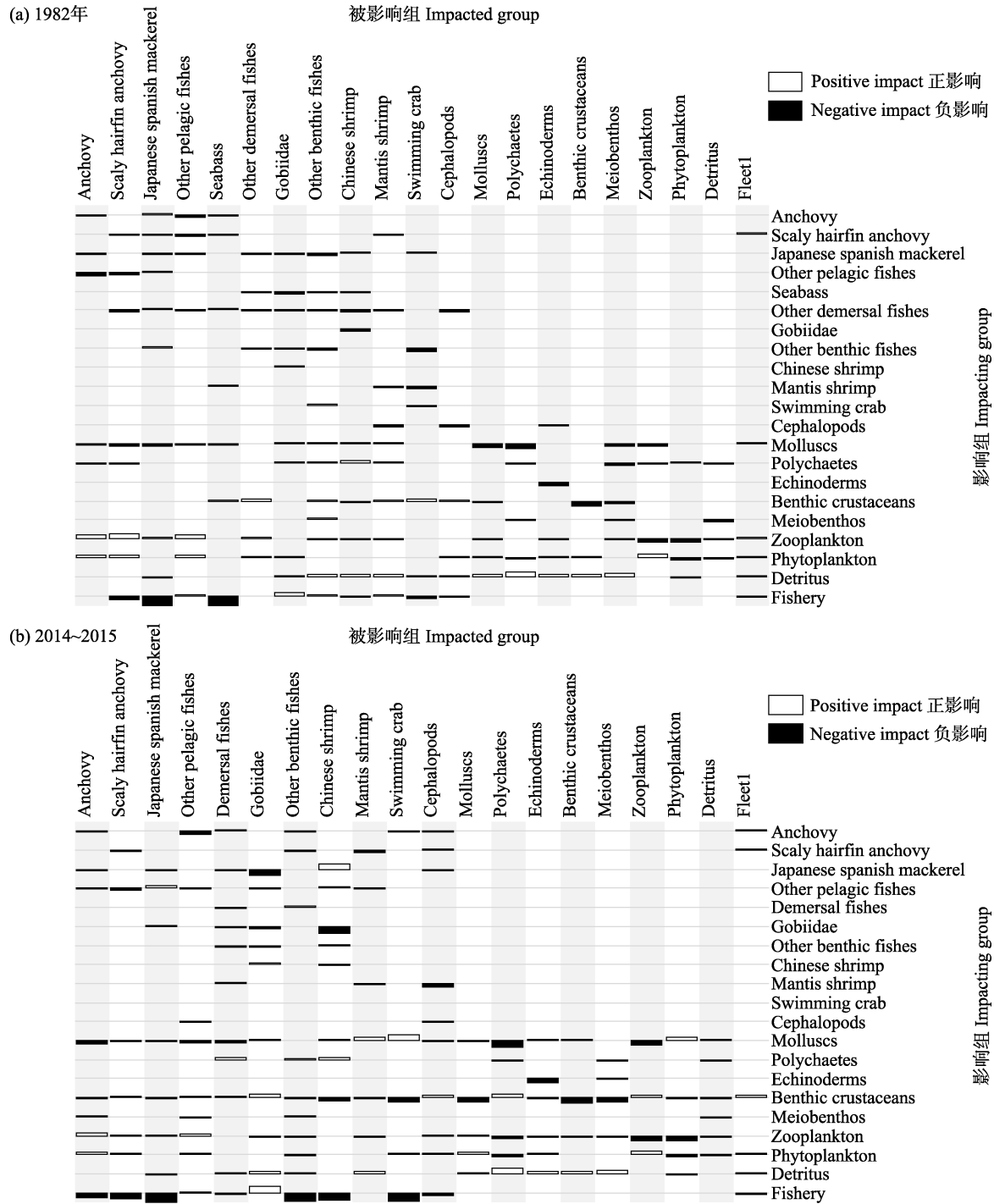


图 1 渤海生态系统功能群间的营养关系  
Fig.1 Trophic relations of functional groups in Bohai Sea ecosystem

渔业; 其他功能群名见表 2  
Fishery; See Tab.2 for other functional groups

0.0742、0.0544, 对多毛类、软体动物和甲壳类产生负影响, 影响值分别为-0.0207、-0.002、-0.0007; 虾虎鱼类、花鲈、三疣梭子蟹、口虾蛄生物量的增加对中国对虾有负影响(-0.197、-0.119、-0.0145、-0.0052)。2014~2015年, 中国对虾生物量的增加将对虾虎鱼类、其他底栖鱼类产生正影响, 影响值分别为 0.085、0.0042, 对口虾蛄、多毛类、三疣梭子蟹和甲壳类产生较小负影响, 分别为-0.002、-0.0012、-0.0005、-0.0005, 虾虎鱼类生物量的增加对中国对虾有较大负影响(-0.673)。由于营养级联效应, 中国对虾与其他的渔业捕捞功能群存在或多或少间接的影响。

渤海生态系统各功能群按关键指数值排列顺序见对应图 2。关键种对应有较高的总体效应、较高

的关键指数(值接近或者大于 0)的功能群。依据关键指数和总体效应值, 1982 年, 浮游动物是渤海生态系统的重要种类, 列入第 1 组; 软体动物、浮游植物列入第 2 组; 底栖甲壳类、其他底层鱼类列入第 3 组。2014~2015 年, 软体动物、底栖甲壳类列入第 1 组; 蓝点马鲛、浮游动物、虾虎鱼类列入第 2 组; 浮游植物列入第 3 组。这几个功能群在渤海海域生态系统中扮演着重要角色。

### 2.3 中国对虾的生态容量估算

在 1982 年和 2014~2015 年 Ecopath 模型基础上, 分别评估了中国对虾的生态容量。1982 年中国对虾现存生物量是 0.0113 t/km<sup>2</sup>, 当年 5 月中国对虾生

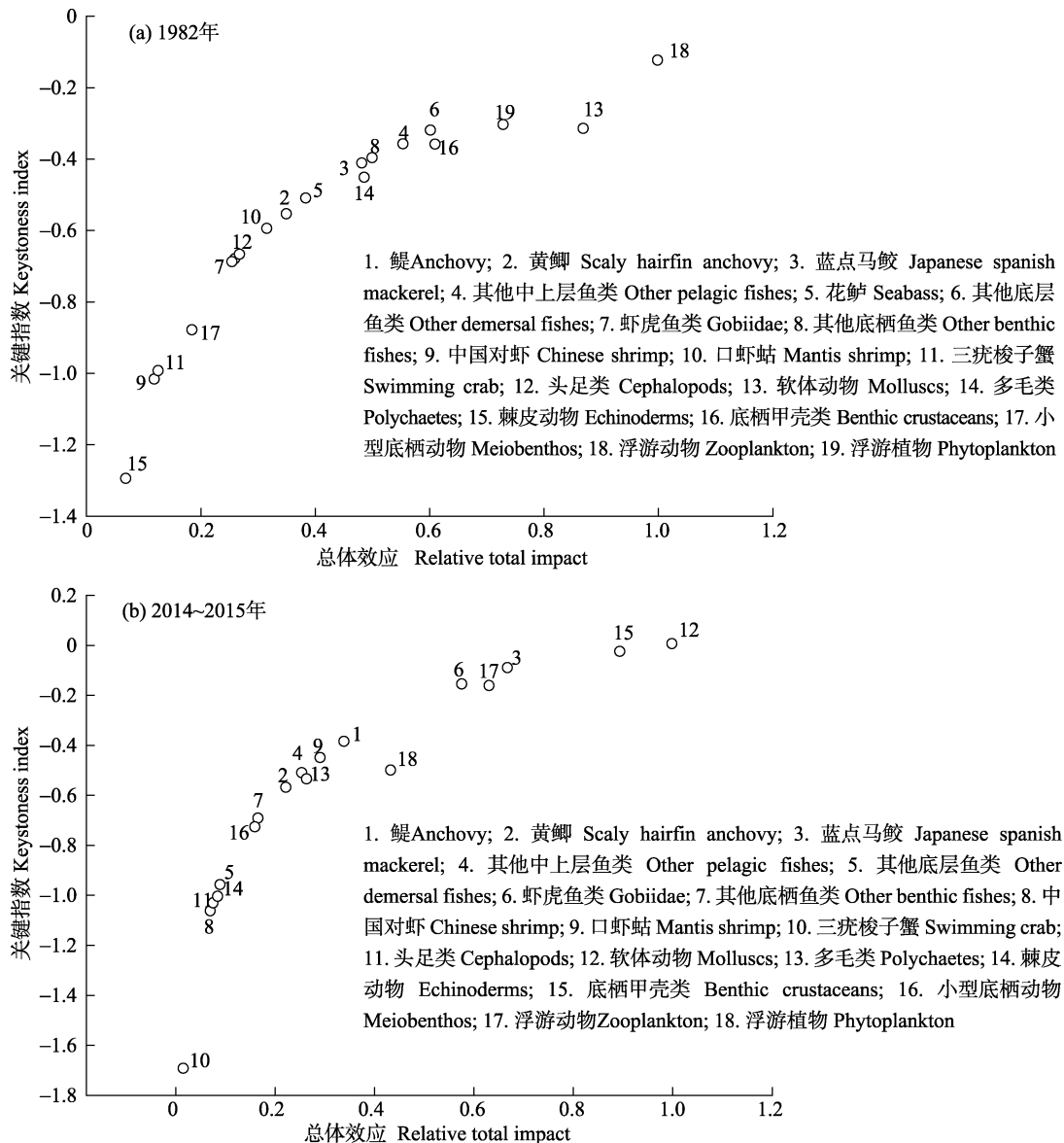


图2 渤海生态系统各功能群间的总体效应与关键指数

Fig.2 Relative overall effect and keystone index values in the functional groups of Bohai Sea

物量是  $0.0017 \text{ t/km}^2$ 。基于 Ecopath 模型估算生态容量的原理, 大量放流中国对虾, 当中国对虾生物量超过  $0.810 \text{ t/km}^2$  时, 首先多毛类功能群  $EE \geq 1$ , 随后底栖甲壳类功能群也将  $EE > 1$  (表 3), 首先加大了对饵料生物的摄食压力, 最终模型失去平衡。对比当前状态与放流中国对虾至  $0.810 \text{ t/km}^2$  时渤海生态系统的总体特征参数(表 4), 系统净生产量由  $882.76 \text{ t/km}^2 \cdot \text{year}$  降低为  $873.67 \text{ t/km}^2 \cdot \text{year}$ ; 总能量转换效率有所增加,

由 8.90% 增加为 9.80%, 有效地提高了该海域基础生产力的利用率; 渔业总捕捞效率有所提高, 由 0.0008 提高到 0.0015, 渔获物的平均营养级由 2.92 增加到 3.00; 总初级生产量前后基本一致, 无变化; 系统其他能流与生态系统指数也基本差别不大, 未改变系统其他组成的生物量与流动, 未影响到水域系统的生态稳定性, 由此确定渤海中国对虾的增殖生态容量为  $0.810 \text{ t/km}^2$ 。

表 3 估计中国对虾增殖生态容量(下划线)过程中模型的变动情况(1982 年和 2014~2015 年)  
Tab.3 Changes in Ecopath model in estimating ecological carrying capacity of Chinese shrimp (underline) in the Bohai Sea ecosystem in 1982 and 2014~2015

倍数 Multiplier	生物量 Biomass ( $\text{t/km}^2$ )	捕捞量 Catch ( $\text{t/km}^2$ )	模型的变动 Mass-balance changes in model	倍数 Multiplier	生物量 Biomass ( $\text{t/km}^2$ )	捕捞量 Catch ( $\text{t/km}^2$ )	模型的变动 Mass-balance changes in model
1(当前 Current)	0.0113	0.015	1982 年	1(当前 Current)	0.0012	0.001	2014~2015 年
2	0.0226	0.03	平衡	2	0.0024	0.002	平衡
10	0.113	0.15	平衡	10	0.012	0.01	平衡
20	0.226	0.3	平衡	20	0.024	0.02	平衡
70	0.791	1.05	平衡	100	0.12	0.1	平衡
71.68	<u>0.810</u>	1.075	平衡	500	0.60	0.5	平衡
71.77	0.811	1.076	多毛类 $EE=1$	585	<u>0.702</u>	0.585	平衡
152.2	1.72	2.283	底栖甲壳类 $EE=1.001$ 多毛类 $EE=1.721$	585.8	0.703	0.586	软体动物 $EE=1.001$
				2300	2.76	2.3	多毛类 $EE=2.362$

表 4 渤海生态系统的总体特征参数  
Tab.4 General characteristic parameters for Bohai Sea ecosystem

参数 Parameters	1982(V1)	1982(V1')	2014~2015(V2)	2014~2015(V2')
总消耗量 Total consumption ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	1159.66	1179.63	1213.72	1231.24
总输出量 Total exports ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	882.77	873.69	3922.88	3914.88
总呼吸量 Total respiratory flows ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	786.25	795.33	894.61	902.62
流入碎屑总量 Total flows into detritus ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	1465.05	1456.18	4467.43	4458.84
系统总流量 Total system throughput (TST) ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	4294.00	4305.00	10499.00	10508.00
总生产量 Total production ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	1912.00	1919.00	5057.00	5063.00
渔获物的平均营养级 Mean trophic level of the catch (TLc)	2.92	3.00	2.68	2.90
总捕捞效率 Gross efficiency (catch/net p.p.)	0.0008	0.0015	0.00018	0.00031
总初级生产量 Total net primary production ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	1669.00	1669.00	4817.50	4817.50
总初级生产量/总呼吸 Total primary production/total respiration (TPP/TR) ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	2.12	2.09	5.38	5.38
净生产量 Net system production	882.76	873.67	3922.88	3914.88
总初级生产量/总生物量 Total primary production/total biomass (TPP/B)	38.19	37.50	99.83	98.41
总生物量(不计碎屑) Total biomass (excluding detritus) ( $\text{t/km}^2 \cdot \text{year}$ )	43.70	44.50	48.25	48.95
连接指数 Connectance index (CI)	0.35	0.35	0.33	0.33
系统杂食系数 System omnivory index (SOI)	0.15	0.15	0.14	0.13
总能量转换效率 Total transfer efficiency (%)	8.90	9.80	5.10	7.60

注: V1, V2: 当前的系统状态; V1', V2': 放流中国对虾达到生态容量时的状态

Note: V1, V2: The current status of the system; V1', V2': The status at ecological carrying capacity of Chinese shrimp

2014~2015 年中国对虾生物量为  $0.0012 \text{ t/km}^2$ ，2015 年 5 月未捕获到中国对虾，大量放流中国对虾，当中国对虾生物量超过  $0.702 \text{ t/km}^2$  时，首先多毛类功能群  $EE \geq 1$ ，随后软体动物功能群也将  $EE > 1$  (表 3)，模型将失去平衡。对比当前状态与放流中国对虾生物量至  $0.702 \text{ t/km}^2$  时渤海生态系统的总体特征参数 (表 4)，系统净生产量由  $3922.88 \text{ t/km}^2 \cdot \text{year}$  降低为  $3914.88 \text{ t/km}^2 \cdot \text{year}$ ；总能量转换效率有所增加，由 5.10% 增加为 7.60%，有效地提高了该海域基础生产力的利用率；渔业总捕捞效率有所提高，由 0.00018 提高到 0.00031，渔获物的平均营养级由 2.68 提高到 2.90；总初级生产量前后基本一致，无变化；系统其他能流与生态系统指数也基本差别不大，未影响到水域系统的生态稳定性，由此确定渤海中国对虾的增殖生态容量为  $0.702 \text{ t/km}^2$ 。

#### 2.4 渤海生态系统结构和功能参数变化

基于生态网络分析，表 4 总结了渤海生态系统的一系列总体特征参数。系统总流量反映了系统规模大小，渤海生态系统的总体规模有所增加，2014~2015 年系统总流量较 1982 年增加了 1.44 倍；流向碎屑总量也有所上升，2014~2015 年的流向碎屑流量是 1982 年的 3 倍多，系统杂食系数稍微地降低，由 0.15 降为 0.14，能量以碎屑形式在系统中的沉积增多。在成熟的生态系统中，系统没有多余的生产量再利用，总初级生产量与总呼吸量的比值 (TPP/TR) 接近 1，总初级生产量与总生物量的比值 (TPP/B) 较低，1982 年渤海生态系统 TPP/TR 为 2.12，较 2014~2015 年的 5.38 低；1982 年 TPP/B 为 38.19，相比 2014~2015 年的 99.83 也较低，1982 年和 2014~2015 年系统净生产量分别为 882.76 和  $3922.88 \text{ t/km}^2 \cdot \text{year}$ 。渔获物的平均营养级 (TLc) 通过计算营养级获得捕捞种类在食物链中所处的相对位置，可以作为评价海洋生态系统渔业资源可持续利用的生态指标，也反映了鱼类、无脊椎动物等可捕种类种群结构的变化，捕捞渔获物的平均营养级从 1982 年的 2.92 下降到 2014~2015 年的 2.68。

### 3 讨论

总体特征参数分析显示，2 个时期渤海生态系统仍有较高的剩余生产量有待利用，系统均处于发育的不稳定期，易受外界干扰；2014~2015 年与 1982 年相比，渤海生态系统浮游植物和碎屑的生物量明显增加，系统规模不断扩大，碎屑流在系统中的重要性逐渐降低，造成大部分剩余的能量在系统中沉积，一定

程度地导致系统总体转换效率有所降低，系统的成熟度和稳定性较 1982 年有所降低。近些年海洋捕捞强度的不断加大、入海河流的陆源污染日趋严重以及栖息环境的变化等，是造成渤海生态系统成熟度和稳定性降低的主要原因。渤海生态系统捕捞渔获物的平均营养级由 1982 年的 2.92 下降到 2014~2015 年的 2.68，主要原因是渔获物中高营养级生物比例下降，而低营养级的小型生物比例有所上升，其他研究文献也证实了此结论。单秀娟等 (2012) 研究发现，目前渤海鱼类群落处于相对不稳定状态，渤海鱼类群落优势种由个体大、营养层次高的优质底层鱼类逐渐被个体小、营养层次低的小型中上层鱼类所替代。许思思等 (2014) 认为渤海生态系统高营养级渔业生物群落逐渐衰退、低营养级渔业生物群落生物量相对增加是造成捕捞渔获物平均营养水平降低的根本原因，环境、上行饵料因素等是渤海捕捞渔获物平均营养级降低的次要因素。另外，渤海总捕捞产量从 20 世纪 80 年代中期开始一直保持上升趋势，渔获物平均营养级的下降和捕捞强度的增加也紧密相关 (林群等, 2016)。

中国对虾未成为渤海生态系统的关键种或者重要的功能群，中国对虾生物量的增加对食物竞争者 (口虾蛄、三疣梭子蟹)、主要饵料生物 (多毛类、软体动物、底栖甲壳类) 有负影响，虾虎鱼类、花鲈幼鱼等均摄食少量中国对虾幼虾 (唐启升等, 1997)，花鲈、虾虎鱼类等生物量的增加将对中国对虾产生负影响。2014~2015 年的软体动物、底栖甲壳类，1982 年的浮游动物分别处于渤海生态系统的营养重要位置，关键作用发生了一定的转变；从营养关系的角度来看，中国对虾的增殖放流需兼顾生态系统间的营养平衡。以 1982 年和 2014~2015 年的 Ecopath 模型为基础，估算的中国对虾的增殖生态容量为  $0.810 \text{ t/km}^2$  和  $0.702 \text{ t/km}^2$ ，与中国对虾现存生物量相比，渤海中国对虾有较大的增殖空间。受渤海生态系统退化的影响，2014~2015 年中国对虾生态容量较 1982 年有所降低。历史上渤海秋汛中国对虾最高产量为 4.1 万 t；按渤海海域面积  $77000 \text{ km}^2$ ，依据现有生物量与捕捞量比例，对虾达到生态容量时，1982 年和 2014~2015 年的捕捞产量分别为  $1.075 \text{ t/km}^2$  或  $82775 \text{ t}$ 、 $0.585 \text{ t/km}^2$  或  $45045 \text{ t}$ ，模型估算的 2 个时期中国对虾生态容量值对应的捕捞产量将超过历史的最高产量。上述方法估算的生态容量是从生态效益的角度考虑，是一个理论上限，依据渔业生产管理中采用的最大可持续产量 (MSY) 理论，最大生态容量值减半时，放流种群将获得较高生长率，因此指导中国对虾的增殖放

流时需同时兼顾生态、经济、社会效益。

增殖放流的中国对虾仔虾主要摄食浮游植物, 生长发育至成体后主要以底栖动物为食(邓景耀等, 1990)。当前, 渤海生态系统浮游植物生物量与初级生产力水平较 20 世纪 80 年代有所增加, 底栖生物较丰富, 从饵料角度考虑, 中国对虾饵料较充足, 放流期间饵料生物等级较高, 有利于放流个体成活率的提高; 敌害生物对中国对虾的危害主要在近岸, 水深 5 m 以下水域受敌害生物的影响较小, 敌害生物资源密度相对较低(单秀娟等, 2012; 吴强等, 2016)。但调查显示, 2015 年春季基本捕捞不到中国对虾, 中国对虾群落结构发生较大变化。邓景耀等(2001)认为, 恢复和增加渤海对虾补充量是重建渤海对虾渔业的有效途径, 20 世纪 80 年代对虾育苗养殖业的兴起造成对虾亲虾的严重不足、对虾栖息环境的破坏、对虾遗传多样性的下降是造成中国对虾补充量下降、锐减的直接原因。因此, 增殖放流的数量控制至关重要, 适度增殖同时保护幼虾放流的水域环境、提高遗传多样性, 进而提高中国对虾的补充量, 实现增殖放流的生态型放流目标。

#### 4 结论

综上所述, 中国对虾未成为渤海生态系统的关键种或者重要的功能群, 以 1982 年和 2014~2015 年的 Ecopath 模型为基础, 估算的中国对虾的增殖生态容量为 0.810 t/km<sup>2</sup> 和 0.702 t/km<sup>2</sup>, 与通过调查评估的中国对虾生物量相比, 渤海中国对虾有较大的增殖空间。2014~2015 年渤海生态系统成熟度和稳定性较 1982 年有所降低, 系统出现一定程度的退化, 2014~2015 年中国对虾生态容量较 1982 年有所降低。建议渤海对虾增殖放流时, 采用中国对虾生物量至最大生态容量值减半, 来指导增殖生产。

#### 参 考 文 献

- Aprahamian MW, Martin SK, McGinnitw P, *et al.* Restocking of salmonids opportunities and limitations. *Fisheries Research*, 2003, 62(2): 211–227
- Blankenship HL, Leber KM. A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium*, 1995, 15: 167–175
- Bundy A. Mass balance models of the eastern Scotian Shelf before and after the cod collapse and other ecosystem changes. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2004, 2520: xii–193
- Byron C, Link J, Costa-Pierce B, *et al.* Calculating ecological carrying capacity of shellfish aquaculture using mass-balance modeling: Narragansett Bay, Rhode Island. *Ecological Modelling*, 2011, 222(10): 1743–1755
- Bell JD, Rothlisberg PC, Munro JL, *et al.* Restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries. *Advances in Marine Biology*, 2005, 49: xi–374
- Blaxter JHS. The enhancement of cod stocks. *Fish & Fisheries*, 2000, 1(2): 173–205
- Christensen V, Pauly D. ECOPATH II-a software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. *Ecological Modelling*, 1992, 61(3–4): 169–185
- Christensen V, Walters CJ, Pauly D. *Ecopath with Ecosim: A user's guide*. Fisheries Centre of University of British Columbia, Vancouver, Canada, 2004. 154 p
- Deng JY, Meng TX, Ren SM. Food web of fishes in Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 151–172 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民. 渤海鱼类的食物关系. *海洋水产研究*, 1988(9): 151–172]
- Deng JY, Ye CC, Liu YC. The Chinese shrimp (*Fenneropenaeus orientalis*) and its resources management in Bohai Sea and the Yellow Sea. Beijing: Ocean Press, 1990 [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 1990]
- Deng JY, Zhuang ZM. The cause of recruitment variation of *Penaeus chinensis* in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Science of China*, 2000, 7(4): 125–128 [邓景耀, 庄志猛. 渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究. *中国水产科学*, 2000, 7(4): 125–128]
- Guo XP, Jin XS, Dai FQ. Growth variations of small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis Bleeker*) in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 243–249 [郭旭鹏, 金显仕, 戴芳群. 渤海小黄鱼生长特征的变化. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 243–249]
- Gulland JA. Manual of methods for fish stock assessment. Part 1. Fish population analysis. *FAO Fisheries Technical Paper*, 1965, (40): 72
- Jiang W, Gibbs MT. Predicting the carrying capacity of bivalve shellfish culture using a steady, linear food web model. *Aquaculture*, 2005, 244(1–4): 171–185
- Jin XS. The dynamics of major fishery resources in the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 7(4): 22–26 [金显仕. 渤海主要渔业生物资源变动的研究. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 22–26]
- Jin XS. Long-term changes in fish community structure in the Bohai Sea, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2004, 59: 163–171
- Jin XS, Qiu SY, Liu XZ, *et al.* The foundation and prospect of stock enhancement of fishery resources in the Bohai Sea and Yellow Sea. Beijing: Science Press, 2014: 395 [金显仕, 邱盛尧, 柳学周, 等. 黄渤海渔业资源增殖基础与前景. 北京: 科学出版社, 2014: 395]
- Leontief WW. The structure of the U. S. economy. New York: Oxford University Press, 1951

- Libralato S, Christensen V, Pauly D. A method for identifying keystone species in food web models. *Ecological Modelling*, 2006, 195(3): 153–171
- Lin Q, Jin XS, Zhang B, *et al.* Comparative study on the changes of the Bohai Sea ecosystem structure based on Ecopath model between ten years. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(7): 3613–3620 [林群, 金显仕, 张波, 等. 基于营养通道模型的渤海生态系统结构十年变化比较研究. *生态学报*, 2009, 29(7): 3613–3620]
- Lin Q. Studies on the ecosystem energy transfer and function in the typical waters of Yellow and Bohai Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012, 1–127 [林群. 黄渤海典型水域生态系统能量传递与功能研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012, 1–127]
- Lin Q, Li XS, Li ZY, *et al.* Ecological carrying capacity of Chinese shrimp stock enhancement in Laizhou Bay of East China based on Ecopath model. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(4): 1131–1140 [林群, 李显森, 李忠义, 等. 基于 Ecopath 模型的莱州湾中国对虾增殖生态容量. *应用生态学报*, 2013, 24(4): 1131–1140]
- Lin Q, Wang J, Yuan W, *et al.* Effects of fishing and environmental change on the ecosystem of the Bohai Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 619–629 [林群, 王俊, 袁伟, 等. 捕捞和环境变化对渤海生态系统的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 619–629]
- Lorenzen K, Leber KM, Blankenship HL. Responsible approach to marine stock enhancement: An update. *Reviews in Fisheries Science*, 2010, 18(2): 189–210
- Lü SG, Wang XC, Han BP. A field study on the conversion ratio of phytoplankton biomass carbon to chlorophyll-a in Jiaozhou Bay, China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(4): 793–805
- Mcdowell N. Stream of escaped farm fish raises fears for wild salmon. *Nature*, 2002, 416(6881): 571
- Odum EP. The strategy of ecosystem development. *Science*, 1969, 164: 262–270
- Palomares MLD, Pauly D. A multiple regression model for predicting the food consumption of marine fish populations. *Marine & Freshwater Resources*, 1989, 40(3): 259–273
- Pauly D. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. *ICES Journal of Marine Science*, 1980, 39(2): 175–192
- Polovina JJ. Model of a coral reef ecosystem I: The ECOPATH model and its application to French Frigate Shoals. *Coral Reefs*, 1984, 3(12): 1–11
- Power ME, Tilman D, Estes JA, *et al.* Challenges in the quest for keystones. *Bioscience*, 1996, 46 (8): 609–620
- Shan XJ, Jin XS. Population dynamics of fish species in a marine ecosystem: A case study in the Bohai Sea, China. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 2016, 8: 100–117
- Shan XJ, Jin XS, Li ZY, *et al.* Fish community structure and stock dynamics of main releasing fish species in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 1–9 [单秀娟, 金显仕, 李忠义, 等. 渤海鱼类群落结构及其主要增殖放流鱼类的资源量变化. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 1–9]
- Tang QS. Strategies of research on marine food web and trophodynamics between high trophic levels. *Marine Fisheries Research*, 1999, 20(2): 1–11 [唐启升. 海洋食物网与高营养层次营养动力学研究策略. *海洋水产研究*, 1999, 20(2): 1–11]
- 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, Wei S, Jiang WM. Predator species of fishery resources enhancement and their predation on enhancement species in Laizhou Bay of Bohai Sea. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1997, 8(2): 199–206 [唐启升, 韦晟, 姜卫民. 渤海莱州湾渔业资源增殖的敌害生物及其对增殖种类的危害. *应用生态学报*, 1997, 8(2): 199–206]
- Ulanowicz RE, Norden JS. Symmetrical overhead in flow networks. *International Journal of Systems Science*, 1990, 21(2): 429–437
- Wu Q, Jin XS, Luan QS, *et al.* Analysis on the reproduction of *Fenneropenaeus chinensis* and *Portunus trituberculatus* based on their food sources and predators in the Laizhou Bay of China. *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(2): 1–9 [吴强, 金显仕, 栾青杉, 等. 基于饵料及敌害生物的莱州湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)增殖基础分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 1–9]
- Xu SS, Song JM, Li XG, *et al.* Variation characteristics of catch structure in the Bohai Sea and its influencing factors. *Journal of Natural Resources*, 2014, 29(3): 500–506 [许思思, 宋金明, 李学刚, 等. 渤海渔获物资源结构的变化特征及其影响因素分析. *自然资源学报*, 2014, 29(3): 500–506]
- Yang JM. A study on food and trophic levels of Bohai Sea invertebrates. *Modern Fisheries Information*, 2001, 16(9): 8–16 [杨纪明. 渤海无脊椎动物的食性研究. *现代渔业信息*, 2001, 16(9): 8–16]
- Zhang B, Tang QS. Study on trophic level of important resources species at high trophic levels in the Bohai Sea, Yellow Sea and East China Sea. *Advances in Marine Science*, 2004, 22(4): 393–404 [张波, 唐启升. 渤、黄、东海高营养层次重要生物资源种类的营养级研究. *海洋科学进展*, 2004, 22(4): 393–404]
- Zhang B, Tang QS, Jin XS. Decadal-scale variations of trophic levels at high trophic levels in the Yellow Sea and the Bohai Sea ecosystem. *Journal of Marine Systems*, 2007, 67: 304–311
- Zhang ZN, Tu LH, Yu ZS. Preliminary study on themacrofauna in the Huanghe River estuary and its adjacent waters (I) the biomass. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1990, 20(1): 37–45 [张志南, 图立红, 于子山. 黄河口及其邻近海域大型底栖动物的初步研究(一)生物量. *青岛海洋大学学报自然科学版*, 1990, 20(1): 37–45]

Zhang S, Zhang CL, Xu BD, *et al.* Ecological status assessment based on macrobenthic community characteristics in Yellow River estuary and its adjacent waters. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(5): 65–71 [张嵩, 张崇良, 徐宾铎, 等. 基于大型底栖动物群落特征的黄河口及邻近水域健康度评价. *中国海洋大学学报自然科学版*, 2017, 47(5): 65–71]

Zhang QT, Hu GK. Review and thinking about the estimation

method of meiofaunal biomass. *Marine Science Bulletin*, 2011, 30(3): 357–360 [张青田, 胡桂坤. 小型底栖动物生物量估算方法回顾与思考. *海洋通报*, 2011, 30(3): 357–360]

Zuo T, Wang R. Measuring methods of marine zooplankton biomass. *Chinese Journal of Ecology*, 2003, 22(3): 79–83 [左涛, 王荣. 海洋浮游动物生物量测定方法概述. *生态学杂志*, 2003, 22(3): 79–83]

(编辑 江润林)

## Changes in Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) Carrying Capacity of the Bohai Sea

LIN Qun<sup>1</sup>, SHAN Xiujuan<sup>1,2</sup>, WANG Jun<sup>1①</sup>, LI Zhongyi<sup>1</sup>

(1. *The Yellow & Bohai Seas Scientific Observation and Experiment Station for Fishery Resources and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 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, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071*)

**Abstract** In this study, data from surveys of fishery resources and environments collected from the Bohai Sea were used to construct an Ecopath model of 1982 and 2014~2015, respectively. Based on the models, we analyzed the trophic impact relationship, structure, and functional parameters of the Bohai Sea ecosystem. Furthermore, we calculated the ecological carrying capacity for Chinese shrimp in the Bohai Sea and compared its changes between the two periods. Trophic impact and keystone index results showed that the Chinese shrimp was not a keystone species or an important functional group of this ecosystem. Benthic crustaceans, mollusks, and other functional groups occupied important trophic positions in the Bohai Sea ecosystem. The increase in Chinese shrimp biomass will have a negative impact on *Oratosquilla oratoria*, *Portunus trituberculatus*, other benthic crustaceans, and polychaetes. The increase in the biomass of functional groups such as *Lateolabrax japonicus* and gobies may have a negative impact on Chinese shrimp. Network analysis showed that this ecosystem was at an unstable developmental stage during these two periods, and the Bohai Sea ecosystem had higher surplus production. A comparison of the 1982 and 2014~2015 models showed that the maturity and stability of the ecosystem decreased, resulting from its degeneration. The carrying capacity of Chinese shrimp was found to be 0.810 and 0.702 t/km<sup>2</sup> in Bohai Sea in 1982 and 2014~2015, respectively. Compared with its current biomass, Chinese shrimp had great potential for continuous enhancement, e.g., by releasing larvae in the Bohai Sea, and the ecological carrying capacity was not exceeded even when the biomass of the Chinese shrimp was increased by 71.68 and 585 fold in 1982 and 2014~2015, respectively. This study provides information for rational implementation of stock enhancement and promotion of sustainable development of fisheries resources in this sea area.

**Key words** Bohai Sea; *Fenneropenaeus chinensis*; Trophic impact relationship; Ecological carrying capacity; Ecopath model

① Corresponding author: WANG Jun, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170601001

http://www.yykxjz.cn/

崔忠凯, 王倩, 刘新富, 孟振, 陈松林. 大菱鲆受精卵显微注射技术的建立. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 30-36  
Cui ZK, Wang Q, Liu XF, Meng Z, Chen SL. Establishment of a microinjection technique in zygote of turbot (*Scophthalmus maximus*).  
Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 30-36

## 大菱鲆受精卵显微注射技术的建立\*

崔忠凯<sup>1,2#</sup> 王倩<sup>1#</sup> 刘新富<sup>1</sup> 孟振<sup>1</sup> 陈松林<sup>1①</sup>



(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室  
农业农村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;)

**摘要** 本研究将 100~300 pg 含有肌肉特异表达启动子和绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因的重组质粒(*smyd1:gfp*)显微注射到大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)受精卵动物极细胞中,通过细心培育,成功孵化出鱼苗约 120 尾。统计分析显示,显微注射后,大菱鲆胚胎存活率为 4.8%。利用荧光显微镜观察大菱鲆胚胎及仔鱼,只在注射 *smyd1:gfp* 质粒的胚胎及仔鱼的肌肉中发现有绿色荧光。通过进一步 PCR 扩增检测,在注射的大菱鲆胚胎及仔鱼 DNA 中扩增出了 GFP 特异片段,大小约为 340 bp。研究表明,本研究成功建立了大菱鲆显微注射技术,可为大菱鲆基因功能研究和遗传育种奠定基础。

**关键词** 大菱鲆; 受精卵; 显微注射; GFP

**中图分类号** S962 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0030-07

近年来,由于育种成本、时间和操作等因素的影响,相比淡水鱼类,海水养殖鱼类遗传改良研究进展缓慢。随着越来越多海水养殖鱼类全基因组测序的完成(Chen *et al*, 2014; Shao *et al*, 2016),许多与重要经济性状相关的基因亟需被发掘、解析甚至改良。目前,通过显微注射介导的转基因和基因组编辑技术已经在淡水养殖鱼类遗传育种和基因功能研究领域被广泛应用(朱作言等, 1999; Dunham, 2009; Li *et al*, 2013; Qin *et al*, 2016)。但海水养殖鱼类相关研究报道却较少,原因是建立海水养殖鱼类相应的显微注射技术难度较大。

显微注射技术是一种通过显微操作仪在解剖镜

或显微镜下将外源物质、细胞核或细胞注入到受体中的生物微操作技术(沙珍霞等, 2005),此技术具有应用广泛、可靠性强、效果较好的特点(Rembold *et al*, 2006; Grabher *et al*, 2008)。显微注射技术在鱼类中的应用相对较早,童第周等(1963)率先建立了鱼类细胞核移植的显微注射技术。20 世纪 80 年代, Zhu 等(1985)通过显微注射技术创制了世界上第 1 尾转基因鱼。目前,显微注射技术广泛应用于淡水鱼类中。由于海水鱼类的受精卵属于浮性卵,卵膜紧贴胚胎,不易剥落(刘洋等, 2004),孵化培育困难等等,因此,建立显微注射技术难度较大。仅见花鲈(*Lateolabrax japonicus*) (刘洋等, 2004)、真鲷(*Pagrus major*) (Kato *et al*, 2007)、

\*中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017003)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by the Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022017003), and Taishan Scholar Climbing Project, Shandong]. 崔忠凯, E-mail: cuizk3@foxmail.com; 王倩, E-mail: wangqian2014@ysfri.ac.cn

# 共同第一作者

① 通讯作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-06-01, 收修改稿日期: 2017-07-10

太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*) (Otani *et al.*, 2008)、箕作黄姑鱼(*Nibea mitsukurii*) (Yoji *et al.*, 2011)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Cui *et al.*, 2017) 等有成功报道。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)属于鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 自 1992 年首次引进以来, 已成为我国北方沿海重要的养殖鱼类之一(雷霖霖等, 2003)。近年来, 大菱鲆养殖面临种质退化和病害频发问题, 其雌性个体比雄性个体大 20%~60%。本研究以 GFP 基因为报告基因, 建立大菱鲆显微注射技术, 不仅为大菱鲆性别决定机制、抗病基因筛选及良种培育等研究奠定了技术基础, 也将丰富海水鱼类基因功能分析和遗传育种研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 受精卵** 大菱鲆亲鱼于 2017 年 4 月 18 日取自山东青岛市通用水产有限公司。选取性腺发育良好的个体作为亲鱼, 亲鱼雌鱼经过强化培育达到性腺隆起明显时, 进行人工催产。将成熟卵子和精子人工挤出, 采用干法授精, 加海水激活后, 挑选质量好的受精卵(近似球状、透明)作为显微注射的实验材料。

**1.1.2 *smyd1 : gfp* 质粒** 中国水产科学研究院黄海水产研究所水产生物技术基因组研究室保存的 *smyd1 : gfp* 质粒是由 5.3 kb 肌肉特异启动子 *smyd1* 与 GFP 基因连接构建的(Du *et al.*, 2006)。将其转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP 10 菌株中扩大培养, 使用质粒提取试剂盒(Omega)提取质粒。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测质粒, 并用 NanoVue plus 超微量紫外-可见分光光度计测定质粒的浓度, 将浓度调整为 50 ng/ $\mu$ l, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.1.3 显微注射针和凹槽板** 参考半滑舌鳎显微注射技术(Cui *et al.*, 2017), 使用 Sutter 公司的水平拉针仪制备注射大菱鲆胚胎用的玻璃微量注射针(图 1)。使用磨针仪打磨注射针的针尖。制备一个带有凹槽(凹槽宽度为 0.95 mm $\pm$ 0.05 mm, 深度为 1.00 mm $\pm$ 0.05 mm)的浓度为 2% 的琼脂糖平板(图 2)。



图 1 大菱鲆和斑马鱼胚胎显微注射玻璃针的比较

Fig.1 Comparison of turbot and zebrafish needles used in microinjection

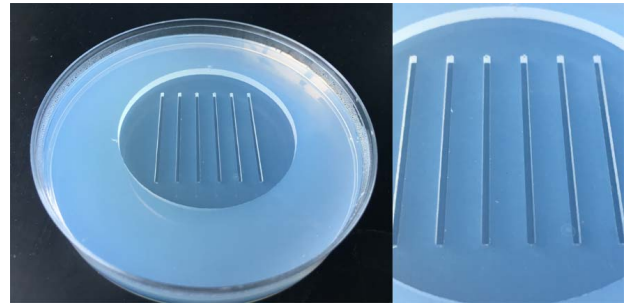


图 2 大菱鲆受精卵显微注射用凝胶凹槽板  
Fig.2 The microinjection plate for turbot zygote

### 1.2 实验方法

**1.2.1 受精卵前期培育** 将大菱鲆受精卵用 13 $^{\circ}$ C~14 $^{\circ}$ C 的海水进行漂洗, 然后放入相同温度的无菌海水中培育约 2 h, 达到 I 细胞期(雷霖霖等, 2003)开始进行显微注射, 直至到 IV 细胞期为止。期间及时清除注射后的死卵。

**1.2.2 显微注射** 取少量受精卵在解剖镜下观察, 至大部分受精卵动物极隆起后, 开始准备进行显微注射, 注射时的室温为 11 $^{\circ}$ C~16 $^{\circ}$ C。将发育正常的 I~IV 细胞期的受精卵用拨卵针整齐排列在琼脂糖胶板的凹槽中, 吸除掉大部分海水, 使胚胎落到凹槽上。用拨卵针将受精卵轻轻压进凹槽里, 旋转受精卵使动物极朝上。凹槽里的受精卵数量不宜过多, 根据操作速度来定, 避免受精卵长时间脱离海水并承受挤压导致破碎。

使用 Eppendorf 的微量上样针将 *smyd1 : gfp* 质粒装入注射针中, 注射针安装到 WPI 公司的 PV820 显微注射仪上, 注射针与凹槽平板呈 45 $^{\circ}$ ; 将 100~300 pg 的 *smyd1 : gfp* 质粒注入受精卵的动物极, 为避免注射过程中细胞质逆流, 设置显微注射仪的保持压为 0.1~3 psi (Pounds per square inch), 注射过的受精卵在凹槽内停留时间不宜超过 4 min, 以防受精卵破裂。及时将受精卵拨离凹槽, 转移到无菌海水中。

**1.2.3 受精卵的孵化** 转入 *smyd1 : gfp* 质粒的受精卵和未注射受精卵各 1000 粒, 分别放入装有 13 $^{\circ}$ C~14 $^{\circ}$ C 的无菌海水的 500 ml 烧杯中进行培养, 注射多余的受精卵放入另 1 个烧杯培养, 烧杯进行水浴, 温度为 13 $^{\circ}$ C。向无菌海水中加入亚甲基蓝溶液, 每 100 ml 无菌海水中加入 2  $\mu$ l 10000 $\times$  的 1% 亚甲基蓝溶液。每隔 3~5 h 换 1 次烧杯中加入亚甲基蓝溶液的无菌海水, 并清除沉到杯底的死卵。在烧杯中培养约 108 h 后, 将胚胎转移到体积为 30~50 L 的玻璃钢水槽中培养, 水槽中海水体积为 20~30 L, 水温为 13 $^{\circ}$ C~14 $^{\circ}$ C。

**1.2.4 存活率** 每 24 h 统计注射胚胎和未注射胚胎存活率。计算公式:

$$\text{存活率(Survival rate, SR, \%)} = \frac{\text{成活胚胎数}}{\text{总受精卵数}} \times 100\%$$

**1.2.5 GFP 表达观察** 从受精后 60 h 开始至胚胎出膜后 24 h 为止, 取样观察。在 Nikon 荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i)下, 使用蓝色滤光片, 观察 GFP 表达情况并拍摄记录。

**1.2.6 胚胎 DNA 的提取** 胚胎发育到肌节期时(受精后约 65 h)取样, 每组取 10 尾, 共 3 组; 出膜 24 h 后, 取 3 尾有 GFP 荧光的仔鱼, 用 95%乙醇固定。用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技)提取基因组 DNA。

**1.2.7 PCR 检测** 根据 *smyd1:gfp* 质粒中 GFP 基因序列设计特异引物。上游引物为 5'-TTAATTTTATT-TGCACTACTGG-3'; 下游引物为 5'-TTCTTTGGTTT-GTCTCCC-3', 预扩增片段为 346 bp。反应体系: 25  $\mu\text{l}$ , 加 1  $\mu\text{l}$  DNA (~50 ng/ $\mu\text{l}$ ) 作为模板, 3  $\mu\text{l}$  10 $\times$  Buffer ( $\text{MgCl}_2^+$ ), 2  $\mu\text{l}$  dNTPs, 0.25  $\mu\text{l}$  Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 引物各 0.75  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 18.25  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。反应程序: 95 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min; 每个循环 95 $^\circ\text{C}$  30 s, 60 $^\circ\text{C}$  30 s, 72 $^\circ\text{C}$  30 s, 共 25 个循环; 72 $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, Gel-100 凝胶成像系统(Bio-rad)检测。切胶后用凝胶回收试剂盒(康为世纪)回收, 然后与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接, 转化到 Top 10 感受态细胞, 涂平板培养挑单克隆后, 送睿博兴科生物技术公司测序, 测序结果与 *smyd1:gfp* 质粒序列用 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 显微注射对胚胎存活率的影响

本研究将 *smyd1:gfp* 质粒显微注射到大菱鲆受精约 2 h 后的 I~IV 细胞的受精卵里。共注射了 2 批, 每批约 1250 粒。将大约 2500 粒显微注射的胚胎和 1000 粒未注射胚胎, 分别放到 13 $^\circ\text{C}$ ~14 $^\circ\text{C}$  的无菌海水中孵化, 每 24 h 统计胚胎存活率(图 3)。从图 3 可以看出, 随着胚胎的发育, 有大量胚胎死亡, 48 h 时死亡率最高, 只有 19.0%左右的注射胚胎存活, 之后存活率缓慢地下降。受精后 120 h 左右, 大菱鲆孵化出膜, 注射组的仔鱼存活率约为 4.8%(约 120 尾)。而对照组的胚胎存活率随着发育的进行也呈现下降的趋势, 鱼苗出膜时统计存活率为 19.0%左右(约 190 尾)。

### 2.2 GFP 表达的检测

受精后约 60 h, 在荧光显微镜下观察到 GFP 在

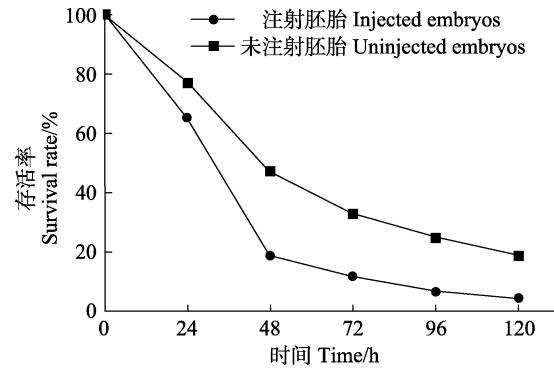


图 3 大菱鲆胚胎和初孵仔鱼的存活曲线  
Fig.3 Survival of turbot embryos and larvae

大菱鲆胚胎中开始表达(图 4A), 随着发育的进行, 表达量逐渐升高(图 4E、图 4G)。由于体色变深的原因, 出膜后 24 h 观察表达量有所减弱(图 4G)。GFP 的表达呈现出嵌合性, 并且只在胚胎的肌肉组织中表达。观察初孵仔鱼时发现, 大约 56%(28/50)的仔鱼在骨骼肌中可观察到 GFP 荧光信号(图 4), 表明 GFP 基因已经在仔鱼肌肉中表达, 从而说明大菱鲆受精卵的显微注射技术已经成功建立。

### 2.3 PCR 产物检测

分别提取胚胎和仔鱼的基因组 DNA, 进行 PCR 扩增。凝胶成像结果显示, 注射 GFP 质粒的实验组都有约 340 bp 的 PCR 特异片段, 而对照组没有相关片段(图 5)。由于 10 粒胚胎中存在没有表达 GFP 的胚胎, 并且胚胎比仔鱼的细胞量少, 所含的 GFP 量少, 所以 PCR 扩增后, 凝胶成像结果中胚胎的 PCR 条带比仔鱼的弱(图 5)。PCR 扩增产物单克隆测序结果显示, PCR 扩增片段确为注射质粒中的 GFP 片段(图 6)。

## 3 讨论

有关大菱鲆显微注射技术的研究迄今为止尚未见报道。尽管斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)及一些淡水鲤科鱼类的受精卵显微注射技术已建立并效果良好(Hwang *et al.*, 2013; Ansai *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013), 并且部分海水鱼类也建立了显微注射技术(刘洋等, 2004; Kato *et al.*, 2007; Otani *et al.*, 2008; Yoji *et al.*, 2011)。对于海水鲆鲽鱼类来说, 受精卵显微注射难度更大。这是因为海水鲆鲽鱼除了具有海水鱼受精卵共有的特点之外, 还具有(1)卵膜很硬, 很难将外源基因 DNA、mRNA 或蛋白质显微注射到受精卵的动物极; (2)仔鱼具有变态的特点, 在变态前后仔鱼死亡率较高, 通常需要有数千尾以上的仔鱼才

能培育长大,即使采用受精卵显微注射技术获得数百个显微注射的胚胎,也很难培育长大为成鱼。因此,有关海水鲆鲽类显微注射技术研究迄今国内外仅见半滑舌鲷(Cui *et al*, 2017),这也成为限制基因组编辑技术在海水鲆鲽类基因功能分析和基因定点突变育种中成功应用的瓶颈因子。因此,要想建立大菱鲆基因组编辑技术,首先要突破大菱鲆受精卵显微注射技术。

约 4.8%的大菱鲆注射胚胎最终孵化出膜,其比例低于未注射胚胎。可能的原因包括注射时,细胞受到机械损伤、外源 DNA 对胚胎的毒性和注射剂量等。合适的显微注射针不仅能够将对胚胎的机械损伤降到最低,而且还能够提高操作效率。本研究中,根据

海水鲆鲽类受精卵的特点,利用 Sutter 公司的水平拉针仪制备玻璃微量注射针,其与注射半滑舌鲷(Cui *et al*, 2017)的相似。注射方式和注射剂量的多少直接影响到胚胎存活率和转基因的成功率(李智等, 1998)。王亚丽等(2017)分析了转基因显微注射的注射剂量对鸡(*Gallus gallus domesticus*)胚胎孵化和转基因效率的影响,研究表明,影响胚胎发育的主要因素是注射剂量的大小。沈延等(2013)对 TALEN 技术的研究表明,mRNA 的注射量越大,TALEN 的作用效率就越高,但斑马鱼胚胎的畸形率也随之上升,而存活率就会下降。本研究根据半滑舌鲷、花鲈、斑马鱼的注射浓度及注射量(Cui *et al*, 2017; 刘洋等, 2004; Du *et al*, 2006)设定大菱鲆显微注射浓度为 50 ng/ $\mu$ l、注射量为 100~300 pg。

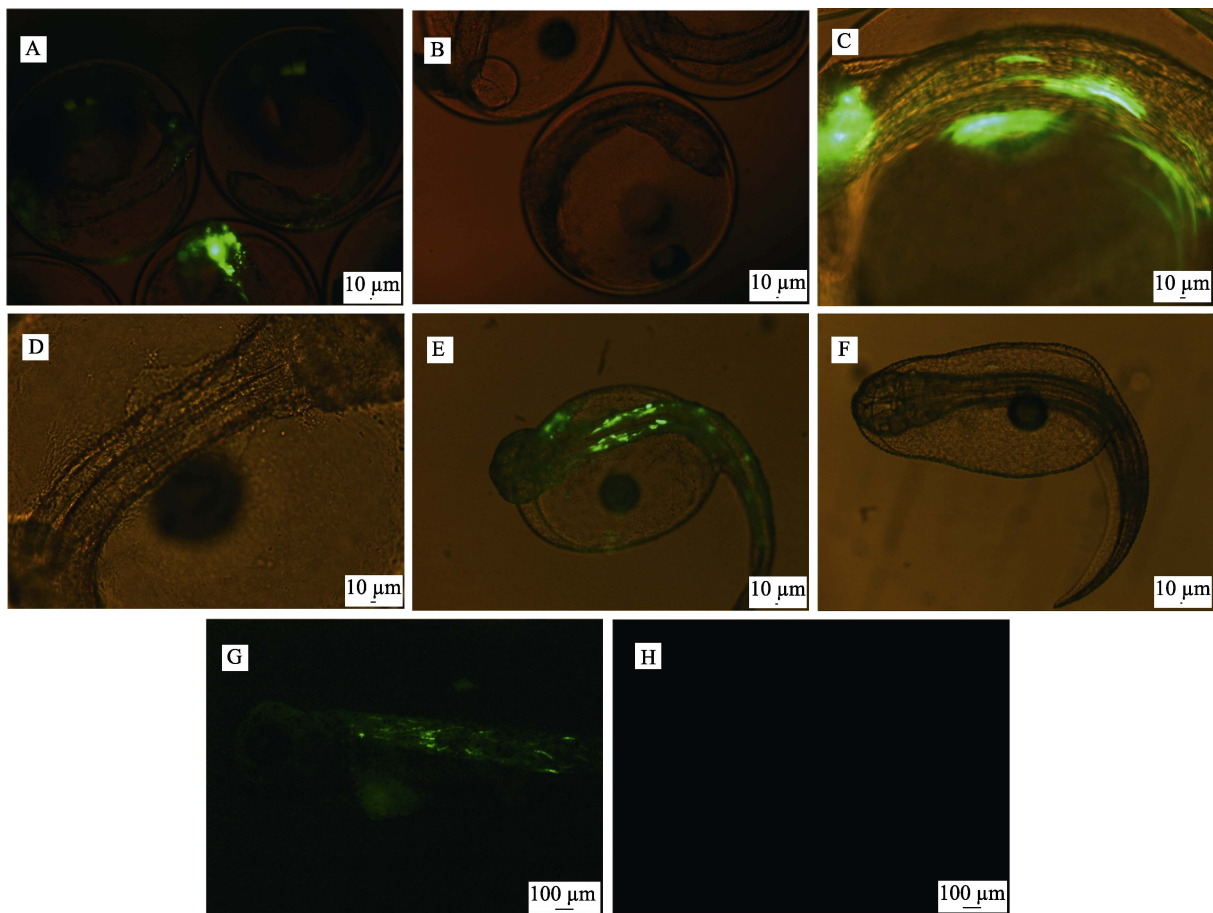


图 4 外源基因 GFP 在大菱鲆转基因胚胎肌肉中的表达

Fig.4 The transient expression of GFP in the muscle of turbot transgenic embryo

A~B: 受精后 61 h 的胚胎; C~D: A~B 胚胎的放大照片; E~F: 初孵仔鱼; G~H: 出膜后 24 h 的仔鱼;

A, C, E: 蓝色滤光片和白光下注射 GFP 的胚胎和仔鱼; B, D, F: 蓝色滤光片和白光下未注射 GFP 的胚胎及仔鱼;

G: 蓝色滤光片下注射 GFP 的仔鱼; H: 蓝色滤光片下未注射 GFP 的仔鱼

A~B: 61 h post-fertilization embryos; C~D: Larger magnification of A and B; E~F: Newly hatched fry;

G~H: 24h post-hatching fry; A, C, E: Embryos and fries injected with GFP in blue filter and white-light;

B, D, F: Embryos and fries uninjected with GFP in blue filter and white-light; G: Fry injected with GFP in blue filter;

H: Fry uninjected with GFP in blue filter

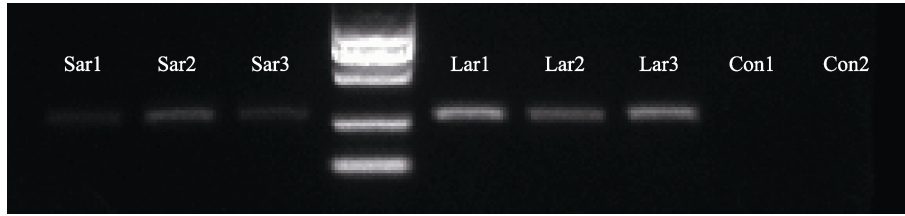


图 5 大菱鲆胚胎和仔鱼基因组 DNA PCR 产物检测  
Fig.5 Electrophoresis of PCR of turbot embryo and larva genome

Sar: 实验组肌节期的胚胎; Lar: 实验组出膜后 24 h 的仔鱼; Con1: 对照组肌节期的胚胎;  
Con2: 对照组出膜后 24 h 的仔鱼; DL2000 Marker: 2 kb 分子量标准

Sar: Somite stage embryos of experimental group; Lar: 24 h post-hatching fries of experimental group; Con1: Somite stage embryos of control group; Con2: 24 h post-hatching fries of control group; DL2000 Marker: 2 kb DNA marker

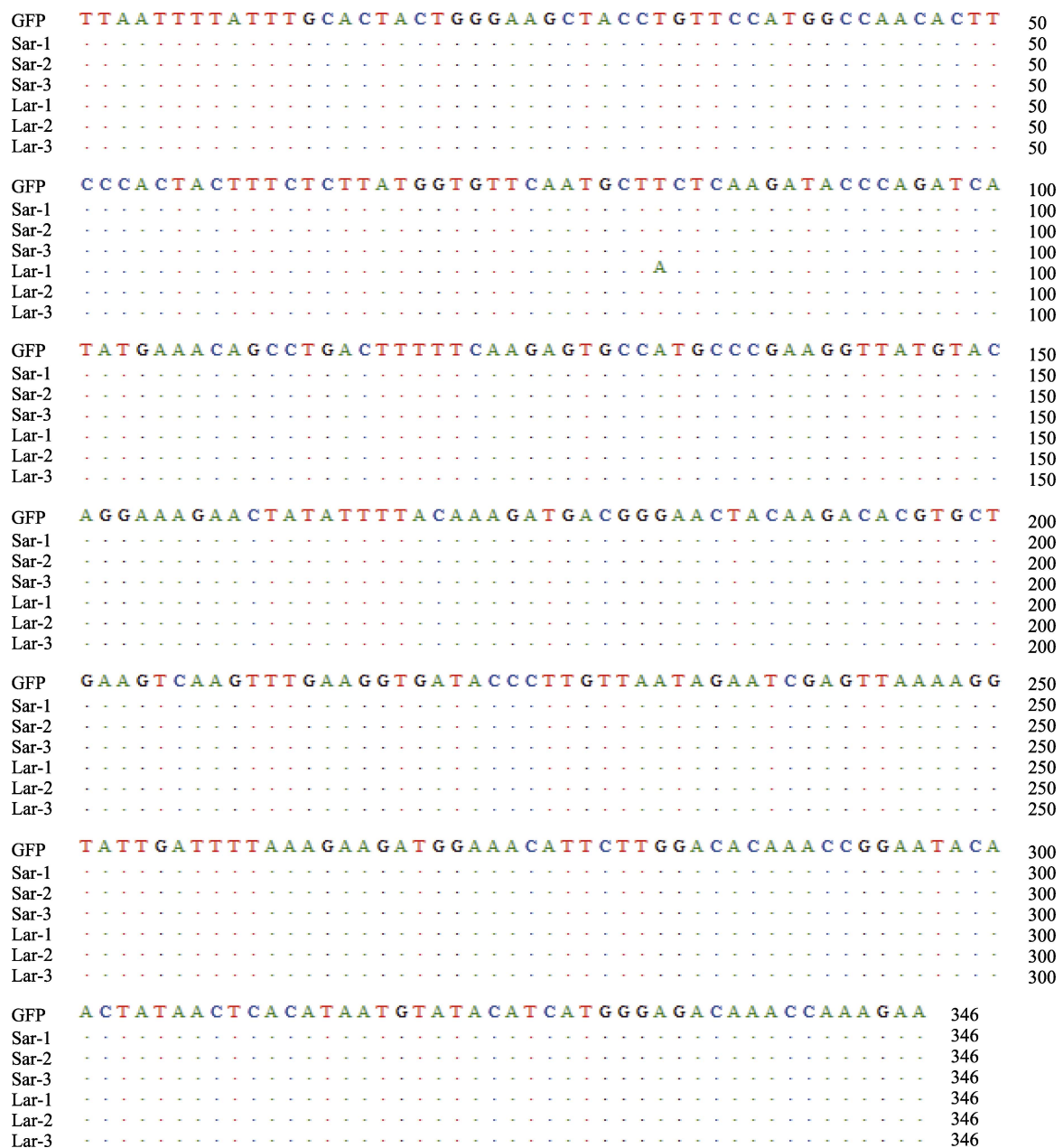


图 6 GFP 片段序列比对  
Fig.6 Sequence alignment of GFP fragment

外源 DNA 在被注射胚胎的发育过程中以多种形式存在, 朱作言等(1989)和刘洋等(2004)研究发现, 外源 DNA 与受体基因组从囊胚期开始整合, 而且能够瞬时表达。本研究注射质粒的启动子为肌肉特异启动子 *smyd1*, 其在肌肉中特异表达质粒(Du *et al.*, 2006), 因此, 在肌节期开始检测荧光表达情况。随着发育的进行, 鱼苗体内的核酸酶能够降解游离的外源 DNA。因此, 出膜后的仔鱼中, 游离的外源 DNA 存在的可能性很小, 以此为模板, PCR 扩增仍能得到特异性的片段, 再者胚胎中的 GFP 表达量随着发育的进行越来越多, 到仔鱼时, 肌肉组织中荧光亮度远大于胚胎, 从而说明外源基因整合到了大菱鲆基因组中。

将外源基因、蛋白质、mRNA 或细胞导入到受体中的方法主要包括显微注射、电脉冲、精子携带、脂质体融合、逆转录病毒转染和激光介导等(朱作言, 1999)。电脉冲转导的方法是直接将受精卵浸泡在溶液中, 通过适合强度电脉冲处理将外源 DNA、RNA 或蛋白转到受精卵动物极中。这个方法操作简单, 可同时处理大量的受精卵, 但是效率很低(朱作言等, 1999; Heather *et al.*, 2003)。精子携带方法对受精卵不会产生机械损伤, 但需要电脉冲处理雄鱼, 对雄鱼造成损伤。并在处理后, 精子的受精能力会减弱, 转移效率也很低(朱作言等, 1999)。显微注射技术可直接在分子和细胞水平上改变研究对象的特征。虽然, 对实验操作者的技术水平和熟练程度有一定的要求, 但该技术目前广泛应用于生命科学各个研究领域。

本研究在海水养殖鱼大菱鲆上建立了显微注射技术, 成功使 *smyd1:gfp* 质粒在大菱鲆鱼苗肌肉组织中表达, 为海水鱼类基因组编辑技术的研究奠定基础, 对大菱鲆基因功能和遗传育种等方面的研究具有重大意义和应用价值。

## 参 考 文 献

- Ansai S, Kinoshita M. Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biology Open*, 2014, 3(5): 362–371
- Chen SL, Zhang G, Shao CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- Cui ZK, Liu Y, Wang WW, *et al.* Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 2017, 7: 42213
- Du SJ, Rotllant J, Tan XG. Muscle-specific expression of the *smyd1* gene is controlled by its 5.3-kb promoter and 5'-flanking sequence in zebrafish embryos. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(12): 3306–3315
- Dunham RA. Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 32(2): 139–161
- Grabher C, Wittbrodt J. Recent advances in meganuclease-and transposon-mediated transgenesis of medaka and zebrafish. *Methods Molecular Biology*, 2008, 461: 521–539
- Heather AH, Stephanie LP, William MM. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Research*, 2003, 12: 413–424
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 227–229
- Kato K, Takagi M, Tamaru Y, *et al.* Construction of an expression vector containing a  $\beta$ -actin promoter region for gene transfer by microinjection in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 2007, 73(2): 440–445
- Lei JL, Ma AJ, Liu XF, *et al.* Study on the development of embryo, larval and juvenile of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, 34(1): 9–18 [雷霖霖, 马爱军, 刘新富, 等. 大菱鲆胚胎及仔稚幼鱼发育研究. *海洋与湖沼*, 2003, 34(1): 9–18]
- Li MH, Yang HH, Li MR, *et al.* Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4814–4825
- Liu Y, Sha ZX, Chen SL, *et al.* Expression of green fluorescent protein gene transferred into newly fertilized sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by microinjection. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(5): 385–390 [刘洋, 沙珍霞, 陈松林, 等. 绿色荧光蛋白基因向花鲈胚胎的转移及其表达. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 385–390]
- Li Z, Yu S, Du TG, *et al.* Effect analysis of transgenic microinjection dose. *Chinese Journal of Laboratory Animal Science*, 1998, 8(2): 65–69 [李智, 俞生, 都同功, 等. 转基因显微注射的剂量控制与效果分析. *中国实验动物学杂志*, 1998, 8(2): 65–69]
- Otani S, Ohara M, Miyashita S, *et al.* A method for the microinjection into naturally spawned eggs of marine fish, especially cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 2008, 74(1): 208–210
- Qin ZK, Li Y, Su BF, *et al.* Editing of the luteinizing hormone gene to sterilize channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using a modified zinc finger nuclease technology with electroporation. *Marine Biotechnology (NY)*, 2016, 18(2): 255–263
- Rembold M, Lahiri K, Foulkes NS, *et al.* Transgenesis in fish: Efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1133–1139
- Sha ZX, Chen SL, Liu Y, *et al.* Progress on the application of microinjection technique in fish cell transplantation and in transgenic marine fish. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(3): 86–90 [沙珍霞, 陈松林, 刘洋, 等. 显微注射技术在制备鱼类嵌合体 and 转基因海水鱼上的应用. *海洋水产*

- 研究, 2005, 26(3): 86–90]
- Shao CW, Bao BL, Xie ZY, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2016, 49(1): 119–124
- Shen Y, Huang P, Zhang B. A protocol for TALEN construction and gene targeting in zebrafish. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(4): 533–544 [沈延, 黄鹏, 张博. TALEN 构建与斑马鱼基因组定点突变的实验方法与流程. *遗传(北京)*, 2013, 35(4): 533–544]
- Tong DZ, Wu SQ, Ye YF, *et al.* Migration of fish nuclei. *Chinese Science Bulletin*, 1963, 13(7): 60–61 [童第周, 吴尚勳, 叶毓芬, 等. 鱼类细胞核的移植. *科学通报*, 1963, 13(7): 60–61]
- Wang YL, Wang SS, Zhang L, *et al.* Effect of microinjection dose of transgene on transgenic efficiency and embryo development of chicken. *China Poultry*, 2017, 39(4): 4–7 [王亚丽, 王赛赛, 张丽, 等. 转基因显微注射剂量对鸡胚转基因效率和胚胎发育的影响. *中国家禽*, 2017, 39(4): 4–7]
- Yoji Y, Naoki K, Yutaka T, *et al.* Establishment of a stable transgenic strain in a pelagic egg spawning marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*. *Aquaculture*, 2011, 313(1–4): 42–49
- Zhu Z, Li G, He L, *et al.* Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 1985, 1(1): 31–34
- Zhu ZY, Wang YP. Transgenic fish. *Bulletin of Biology*, 1999, 34(5): 1–3 [朱作言, 汪亚平. 转基因鱼. *生物学通报*, 1999, 34(5): 1–3]
- Zhu ZY, Xu KS, Xie YF, *et al.* A model of transgenic fish. *Scientia Sinica (Ser B)*. 1989, 19(2): 147–155 [朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因模型鱼的建立. *中国科学 B 辑*, 1989, 19(2): 147–155]

(编辑 陈严)

## Establishment of a Microinjection Technique in Zygote of Turbot (*Scophthalmus maximus*)

CUI Zhongkai<sup>1,2</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, LIU Xinfu<sup>1</sup>, MENG Zhen<sup>1</sup>, CHEN Songlin<sup>1①</sup>

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

**Abstract** Genome editing in fish has many potential applications in aquaculture and is important for gene functional analyses and genetic engineering breeding. Furthermore, genome editing in aquaculture animals is useful for cultivating new varieties and researching disease resistance and aquaculture growth. However, the difficulty of microinjection and cultivation in mariculture fish embryos seriously hampers the application of genome editing technology. Many methods are used to introduce DNA, RNA, and protein to fish genomes, such as pulsed electric, retroviral transfection, and laser-mediated technologies. Microinjection is the most widely used method. Turbot (*Scophthalmus maximus*) is one of the most important mariculture fish in Chinese aquaculture. To our knowledge, there have been no reports on the success of the microinjection technique in turbot. In this study, the *smyd1*:*gfp* plasmid (50 ng/μl) with green fluorescent protein (GFP) expression by a 5.3 kb muscle-specific *smyd1* promoter fragment was successfully microinjected and expressed in the cytoplasm of newly zygote of turbot at the 1~4 cell stage. The effects of microinjection on the survival rate of turbot embryos were studied. The survival rate of microinjected embryos was lower than that of uninjected embryos. Overall, 120 microinjected fishes (4.8%) survived and 190 (19.0%) uninjected survived. The GFP expression in the embryos and larvae was observed using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i). In total, 56% (28/50) of microinjected fishes expressed GFP. A specific GFP-encoding segment (346 bp) was amplified from the DNA of microinjected embryos and larvae by polymerase chain reaction, showing that the GFP gene had been introduced into the turbot embryos and confirming successful microinjection technique of turbot.

**Key words** *Scophthalmus maximus*; Zygote; Microinjection; GFP

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170614001

http://www.yykxjz.cn/

赵紫霞, 许建, 江炎亮, 白庆利, 蒋立坤, 陈葆华, 徐鹏. 虹鳟免疫诱导型基因 *Cathelicidin2* 启动子功能分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 37–45

Zhao ZX, Xu J, Jiang YL, Bai QL, Jiang LK, Chen BH, Xu P. Functional analysis of the immune-induced promoter of the rainbow trout *Cathelicidin2* gene. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 37–45

# 虹鳟免疫诱导型基因 *Cathelicidin2* 启动子功能分析\*



赵紫霞<sup>1①</sup> 许建<sup>1</sup> 江炎亮<sup>1</sup> 白庆利<sup>2</sup>  
蒋立坤<sup>1</sup> 陈葆华<sup>1</sup> 徐鹏<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院 农业农村部水生动物基因组学重点实验室 渔业生物技术北京市重点实验室 北京 100141; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070;  
3. 厦门大学海洋与地球学院 厦门 361102)

**摘要** 本研究通过实时荧光定量 PCR 实验对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)*Cathelicidin2*(*Cath2*)基因的转录模式进行了分析。结果显示,该基因在鳃、头肾等与机体免疫防御功能密切相关的组织内转录,在细菌和病毒感染后,转录水平均显著升高。对基因上游调控序列进行启动子和转录因子结合位点预测,发现该启动子具有真核生物典型的 TATA 盒和 CAAT 盒结构,基因上游直至第一内含子区域内,密集存在多个免疫相关转录因子结合位点,其中,2 个核因子  $\kappa$ B(Nuclear factor kappa B, NF $\kappa$ B)预测结合位点均位于核心启动子正链区域。在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肾组织细胞系内,绿色荧光蛋白和萤火虫荧光素酶基因都能够在该启动子驱动下表达,表明其具有启动子活性,且启动子活性在受到免疫诱导后增强,包括细菌脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)模拟的细菌感染和聚肌胞苷酸(Polyinosinic polycytidylic acid, Poly I:C)模拟的病毒感染。双荧光素酶报告基因检测显示,启动子活性在与 NF $\kappa$ B 转录因子表达时,增强至 4.39 倍,证明 *Cath2* 基因受 NF $\kappa$ B 通路调控。研究表明,虹鳟 *Cath2* 基因能够在多种免疫刺激诱导下表达,其启动子可以应用为免疫诱导型的基因工程元件,驱动外源免疫基因在鱼体内适时表达,抵御外界病原感染,同时,避免非必要条件下的过度表达形成生长负担。

**关键词** 虹鳟; 抗菌肽; *Cathelicidin2*; 启动子; 转录调控

**中图分类号** Q812, S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0037-09

抗菌肽(Antimicrobial peptide, AMP)又称为宿主防御肽(Host defense peptide, HDP),是非特异性免疫系统的关键组分之一,在生物体对抗病原微生物感染中发挥着重要的分子屏障作用。Cathelicidin 是已知最

大的抗菌肽家族之一,在脊椎动物中广泛分布,包括哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物和鱼类中都有报道(Maier *et al*, 2008; Hao *et al*, 2012; Cheng *et al*, 2015),其中,哺乳动物 Cathelicidin 的结构和功能研

\* 国家科技支撑计划项目(2015BAD25B01)和中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2015C007)共同资助 [This work was supported by the National Science and Technology Pillar Program (2015BAD25B01), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2015C007)]

① 通讯作者: 赵紫霞, E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn

收稿日期: 2017-06-14, 收修改稿日期: 2017-07-07



究较为深入(Hilchie *et al*, 2013; 王晨等, 2017)。

第 1 个硬骨鱼类 *Cathelicidin* 基因 *Cath1* 由 Chang 等(2005)在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中发现, 此后, 在大西洋鲑(*Salmo salar*)等多种鲑科(Salmonidae)鱼类(D'Este *et al*, 2016)、大西洋鳕(*Gadus morhua*) (Shewring *et al*, 2011)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (Nsrelden *et al*, 2017)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) (张东玲等, 2015)等物种中陆续发现, 并因其具广谱抗菌能力而吸引了广泛的注意, 但另一些已完成的硬骨鱼类基因组图谱中却无法筛查到该家族基因(Shewring *et al*, 2011), 如斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、河豚(*Takifugu rubripes*)等。因此, *Cathelicidin* 可能为部分硬骨鱼类所特有, 其基因功能和表达调控的研究将有助于加深对鱼类, 特别是对鲑科鱼类非特异性免疫机制的理解, 并促进鱼类抗病育种研究进展。

*Cathelicidin* 成熟肽为带有正电荷的短肽, 主要通过插入并破坏细胞膜结构杀灭病原微生物。体外实验表明, 虹鳟 4 个 *Cath* 基因的各种可变剪切表达产物均能够抑制多种革兰氏阳性和阴性菌的生长(Zhang *et al*, 2015), *Cath2* 基因产物还具有一定的抗真菌效果, 能够延缓水霉(*Saprolegnia parasitica*)孢子形成(de Bruijn *et al*, 2012)。而在大西洋鲑的研究中则发现, *Cath* 基因表达呈现出广泛的免疫应答特征, 不仅能够被细菌所诱导, 也能够被不具有细胞结构的病毒模拟物所诱导(Shewring *et al*, 2011; Broekman *et al*, 2013), 其转录调控机制尚不明确。本研究以虹鳟 *Cath2* 基因为例, 通过实时荧光定量 PCR(Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR)实验验证了该基因的免疫诱导转录模式, 并开展了启动子克隆与功能分析, 对 *Cath2* 基因转录调控机制进行了初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

无特定病原虹鳟 5 尾, 采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站; 自然感染鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)发病的虹鳟 5 尾, 采自山西朔州; 自然感染传染性造血器官坏死病毒(*Infectious hematopoietic necrosis virus*, IHNV)发病的虹鳟 5 尾, 采自北京怀柔。草鱼肾组织细胞系(*Ctenopharyngodon idellus* Kidney, CIK)保藏于国家水产种质资源平台。

### 1.2 基因表达分析

使用 Trizol 试剂(Life technologies)分别提取鳃、头肾组织总 RNA, DNase I(Sigma-Aldrich)处理以避

免基因组 DNA 污染。使用 ReverTra Ace- $\alpha$ -RT-PCR cDNA 第一链合成试剂盒(TOYOBO)进行 mRNA 反转录。使用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒(TOYOBO)在 Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR 系统(Life technologies)上进行 qRT-PCR 实验, 分析各样本内 *Cath2* 基因(NCBI: NM\_001124463.1)的表达量差异。使用  $\beta$ -actin(NCBI: NM\_001124235.1)作为内参基因,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法(Schmittgen *et al*, 2008)计算 *Cath2* 基因相对表达量。*Cath2* 定量引物 *Cath2*-qPCR-F: CAACACCCTCAACACTGACCG; *Cath2*-qPCR-R: GAATCTTTTCTACCCATCTTAGG;  $\beta$ -actin 定量引物 *actin*-F: ACAGGTCATCACCATCGGCA; *actin*-R: GGTCTCGTGGATACCGCAAG。

### 1.3 启动子测序分析

以虹鳟基因组图谱序列(Berthelot *et al*, 2014)为参考, 通过基因组步移法测定 *Cath2* 基因序列, 使用 CLC Genomics Workbench 9.5.4 数据分析平台拼接, 并结合在线分析软件 Neural Network Promoter Prediction (Reese, 2001)([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)), JASPAR2016 (Mathelier *et al*, 2016)(<http://jaspar.genereg.net/>), AliBaba2.1(<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>), PROMO (Messeguer *et al*, 2002)([http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)), 开展启动子位置和转录因子结合位点分析。

### 1.4 载体构建

以虹鳟基因组 DNA 为模板, 使用 *Cath2* 启动子引物 *Cath2*-promoter-F: TCTCACGCGTGGCAGAC-AGGCATGGGAATA; *Cath2*-promoter-R: TCTCAAG-CTTCTGACCTCTGACCAGCAAGC 进行 PCR 扩增。将纯化后的扩增产物进行 Mlu I、Hind III 双酶切处理, 获取带有黏性末端的启动子片段。分别将 pGL3-EGFP 和 pGL3-basic 载体(Promega)进行 Mlu I、Hind III 双酶切处理, 获取带有黏性末端的载体质粒。将纯化后的启动子和载体质粒按照物质的量比例 3:1 混合, T4 DNA 连接酶 16℃处理 12 h, 转化 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细菌, 涂布含有氨苄青霉素的平板, 37℃倒置培养 12 h。挑取单克隆, 碱裂解法提取质粒, 测序鉴定, 获得成功插入虹鳟 *Cath2* 启动子完整序列的 pGL3-EGFP-*Cath2* 和 pGL3-*Cath2* 启动子载体。按照同样步骤构建插入核因子  $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B, NF $\kappa$ B) 编码序列(NCBI: XM\_019064772.1)的 pEGFP-NF $\kappa$ B 表达载体, 酶切位点为 EcoR I 和 BamH I。

### 1.5 细胞转染和免疫刺激

使用含 5% 胎牛血清的杜氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), 初始接种浓度为每孔  $2 \times 10^5$  个细胞, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 25℃ 培养 12 h, 待单层细胞贴壁超过 60% 后, 用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 每孔加入无血清 DMEM 培养基 900  $\mu\text{l}$ , 1 h 后进行转染。

转染实验使用 Lipofectamine<sup>®</sup>2000 (Life technologies) 体系进行脂质体转染, 分为 7 组, 每组 6 孔, 各孔分别加入 (1) 2000 ng pGL3-EGFP 空载体 + 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂 + 994  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基; (2)、(3)、(4) 2000 ng pGL3-EGFP-Cath2 启动子载体 + 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂 + 994  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基; (5) 1200 ng pEGFP 空载体 + 600 ng pGL3-basic 载体 + 60 ng PRL-CMV 海肾荧光素酶内参载体 + 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂 + 994  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基; (6) 1200 ng pEGFP 空载体 + 600 ng pGL3-Cath2 启动子载体 + 60 ng PRL-CMV 海肾荧光素酶内参载体 + 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂 + 998  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基; (7) 1200 ng pEGFP-NF $\kappa$ B 表达载体 + 600 ng pGL3-Cath2 启动子载体 + 60 ng PRL-CMV 海肾荧光素酶内参载体 + 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂 + 994  $\mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基。轻轻摇动平皿混匀, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 25℃ 培养。

转染后 6 h, 换半液, 换液使用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 25℃ 培养。转染后 24 h, 在荧光显微镜下观察各组细胞形态和绿色荧光蛋白荧光信号, 计数并计算转染效率, 转染效率 = 表达绿色荧光蛋白的细胞数 / 活细胞总数。向 (3) 组各孔中加入 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的细菌脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 10  $\mu\text{l}$ , 向 (4) 组各孔中加入 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的聚肌胞苷酸 (Polyinosinic polycytidylic acid, Poly I:C) 10  $\mu\text{l}$ , 轻轻混匀, 继续 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 25℃ 培养 6 h。在荧光显微镜下观察 (1)~(4) 组细胞形态和绿色荧光蛋白荧光信号。

### 1.6 双荧光素酶报告基因检测

使用 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega), 按说明书完成检测步骤。将 (5)~(7) 组各孔内细胞充分裂解后, 分别测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活力。使用海肾荧光素酶活力值作为内参, 使萤火虫荧光素酶活力值正态化, 荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活力 / 海肾荧光素酶活力。再以只转染对照载体和内参载体

的第 (5) 组数值为对照, 将该组荧光素酶活性归一化, 荧光素酶相对活性 = 实验组荧光素酶活性 / 对照组荧光素酶活性 (Pannier *et al.*, 2007)。

## 2 结果

### 2.1 虹鳟 *Cath2* 基因转录模式分析

通过 qRT-PCR 对虹鳟 *Cath2* 基因转录特征进行了研究。结果表明, 该基因转录呈现出显著的免疫应答特征, 细菌和病毒感染均能增强该基因转录。*Cath2* 基因在健康个体的鳃、头肾组织内均有表达, 其中, 头肾表达量较高; 在鳃弧菌感染个体中, *Cath2* 基因表达量显著上调, 上升幅度达到 10.7 倍 (鳃) 和 13.5 倍 (头肾); 在 IHNV 感染个体中, *Cath2* 基因表达量也有明显上调, 但上升幅度小于鳃弧菌感染个体 (图 1), 分别为 6.98 倍 (鳃) 和 6.84 倍 (头肾)。

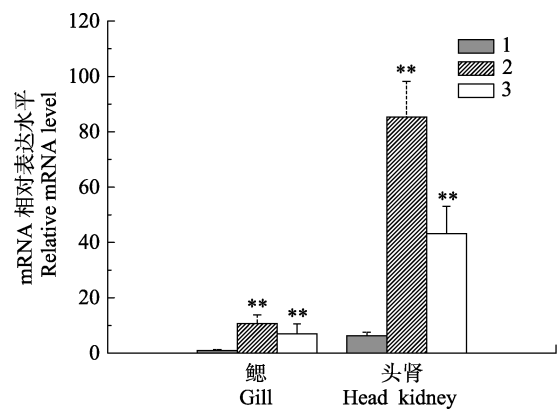


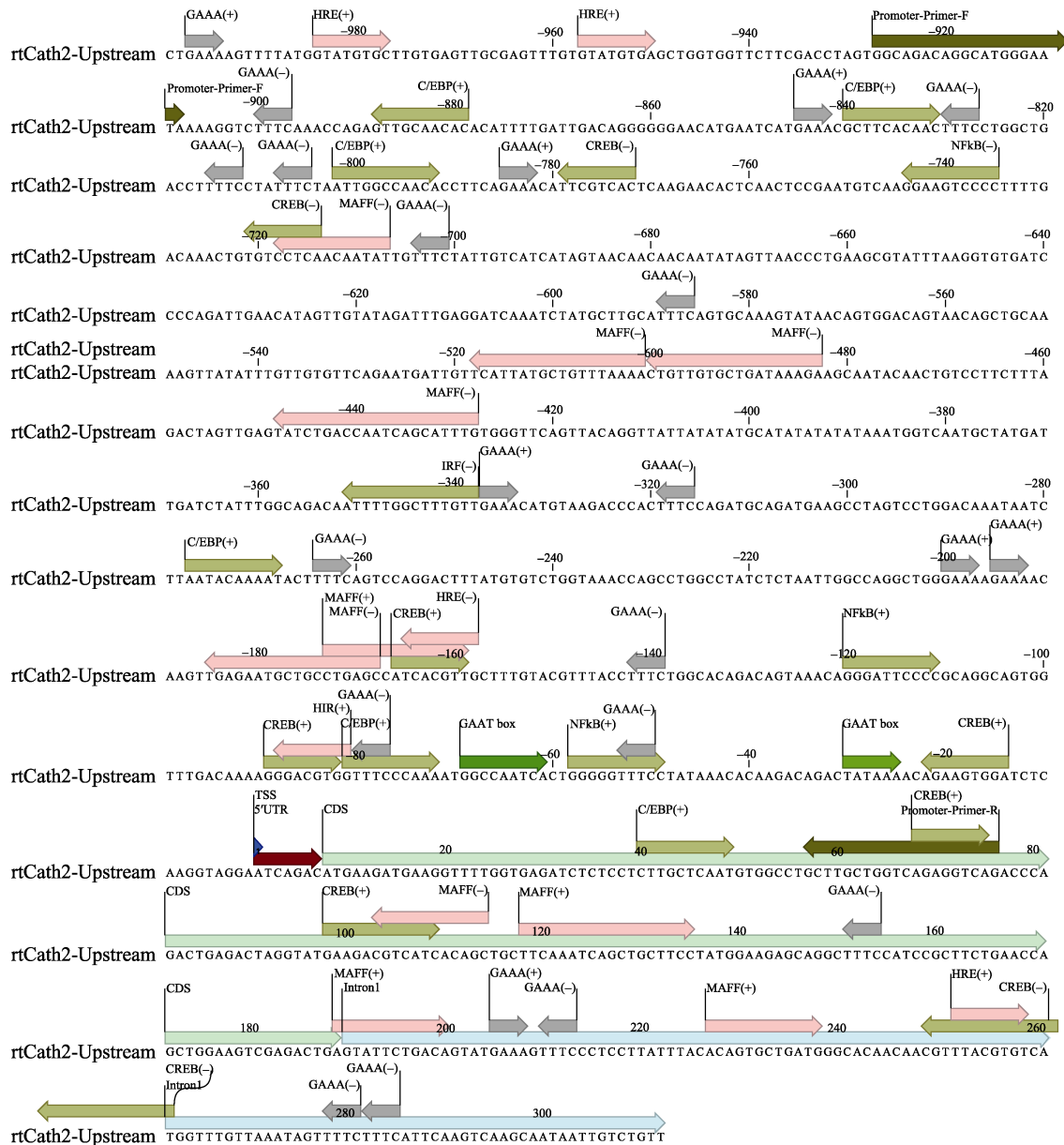
图 1 虹鳟 *Cath2* 基因在感染条件下 mRNA 表达量变化  
Fig.1 Relative mRNA levels of rainbow trout *Cath2* in infected individuals

1: 健康个体; 2: 鳃弧菌感染个体; 3: IHNV 感染个体  
1: Healthy control; 2: *V. anguillarum* infected; 3: IHNV infected  
图中实验组相对表达量以健康对照组鳃组织基因表达量为基准计算, 误差线为相对标准差 ( $n=5$ ), 星号为  $t$  检验显著性水平 (\*\*,  $P < 0.01$ ), 下同

The relative expression level in each group was calculated by comparing with the value in gill of healthy control. Error bars represented standard error of the mean ( $n=5$ ). Statistical differences relative to unaffected tissues were calculated by using Student's  $t$  test (\*\*,  $P < 0.01$ ), the same as below

### 2.2 虹鳟 *Cath2* 基因启动子序列分析

将虹鳟 *Cath2* 基因 (NCBI: NM\_001124463.1) 序列在虹鳟基因组图谱中进行 Blat 比对, 该基因被定位于 ChrUn\_8 重叠群, 使用该区段序列为参考, 通过基因组步移法对 *Cath2* 基因上游调控序列进行 Sanger 测序和拼接, 获得起始密码子前 1000 bp 序列。对该

图 2 虹鳟 *Cath2* 基因上游调控序列功能预测示意Fig.2 Functional annotation by bioinformatics analysis for upstream sequence of rainbow trout *Cath2* gene

区域进行启动子功能分析,推测基因转录起始位点自-7 bp 开始,在-30 bp 位置有 TATA 盒,在-69 bp 位置有 CAAT 盒,具有典型的真核生物启动子结构。

预测该基因核心启动子区为-1~351 bp 区间,为更完整地保留特征性转录调控区域,设计 PCR 引物扩增-927 bp~76 bp 间的 1003 bp 序列,将其克隆进入启动子载体用于转录活性分析实验。

在虹鳟 *Cath2* 基因-1000~312 bp 区间范围内,密集存在着多个顺式作用元件(图 2),其中,既包括免疫应答转录因子结合位点,如核因子  $\kappa$ B(Nuclear factor kappa B, NF $\kappa$ B)、Ccaat 增强子结合蛋白(Ccaat/Enhancer Binding Protein, CEBP)、cAMP 应答元件

结合蛋白(cAMP-responsive element binding proteins, CREBP)、巨噬细胞活化因子相关转录因子(Macrophage activating factor related factor, MAFF)、干扰素调节因子(Interferon regulatory factors, IRF)等,也包括高频出现的干扰素增强子 GAAA 基序以及数个环境压力应答元件,如低氧应答元件(Hypoxia response element, HRE)。

### 2.3 虹鳟 *Cath2* 基因启动子活性及免疫应答

对预测得到的虹鳟 *Cath2* 基因启动子区域进行 PCR 扩增,将该启动子连接进入 pGL3-EGFP 质粒载体,使虹鳟 *Cath2* 启动子驱动绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因表达,构建成功 pGL3-

EGFP-Cath2 质粒载体。

使用 pGL3-EGFP-Cath2 质粒转染 CIK 细胞, 转染后细胞生长状况良好(图 3A), 荧光显微镜下可见 GFP 绿色荧光(图 3B), 表明转入的 DNA 片段能够成功驱动 GFP 基因表达, 具有启动子活性, 转染效率为  $(34.7 \pm 4.6)\%$ 。向细胞培养液中加入免疫刺激剂 LPS (图 3C、图 3D) 或 Poly I:C (图 3E、图 3F), 分别模拟细菌感染和病毒感染, 细胞的荧光强度显著强于无免疫刺激对照组, 表明启动子活性在免疫激活后显著增强, 为免疫诱导型启动子。

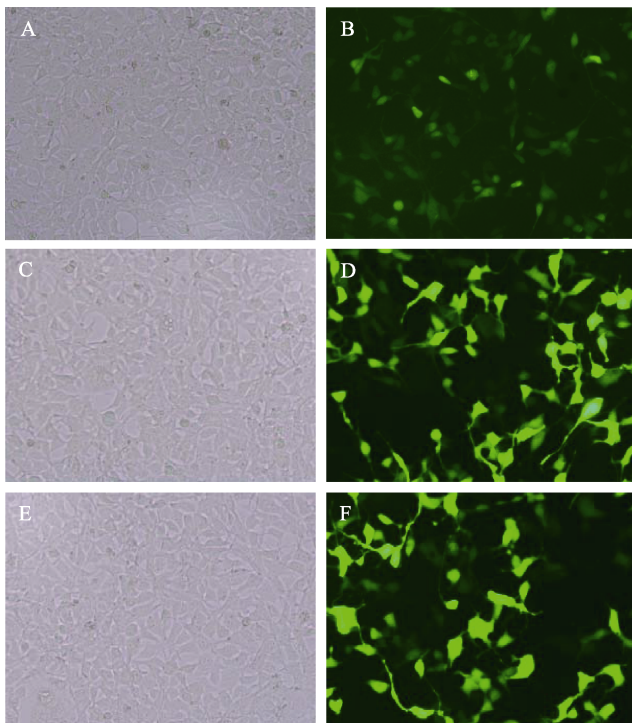


图 3 转染 pGL3-EGFP-Cath2 质粒的 CIK 细胞  
Fig.3 Microscope images of CIK cells transfected by pGL3-EGFP-Cath2 plasmid

A: 无免疫刺激, 明场显微镜照片; B: 无免疫刺激, 荧光显微镜照片; C: LPS 模拟细菌感染, 明场显微镜照片; D: LPS 模拟细菌感染, 荧光显微镜照片; E: Poly I:C 模拟病毒感染, 明场显微镜照片; F: Poly I:C 模拟病毒感染, 荧光显微镜照片

A: Control cells without immune stimulus, by bright field microscope; B: Control cells without immune stimulus, by fluorescence microscope; C: Immune stimulated cells with LPS, by bright field microscope; D: Immune stimulated cells with LPS, by fluorescence microscope; E: Immune stimulated cells with Poly I:C, by bright field microscope; F: Immune stimulated cells with Poly I:C, by fluorescence microscope

#### 2.4 转录因子 NF $\kappa$ B 调控虹鳟 *Cath2* 基因启动子活性

将虹鳟 *Cath2* 基因启动子序列连接进入 pGL3-

basic 质粒载体, 使虹鳟 *Cath2* 启动子驱动萤火虫荧光素酶基因表达, 构建成功 pGL3-Cath2 质粒载体; 将虹鳟 NF $\kappa$ B 基因 cDNA 序列连接进入 pEGFP 载体, 使虹鳟 NF $\kappa$ B 基因与 GFP 基因共表达, 构建成功 pEGFP-NF $\kappa$ B 质粒载体。

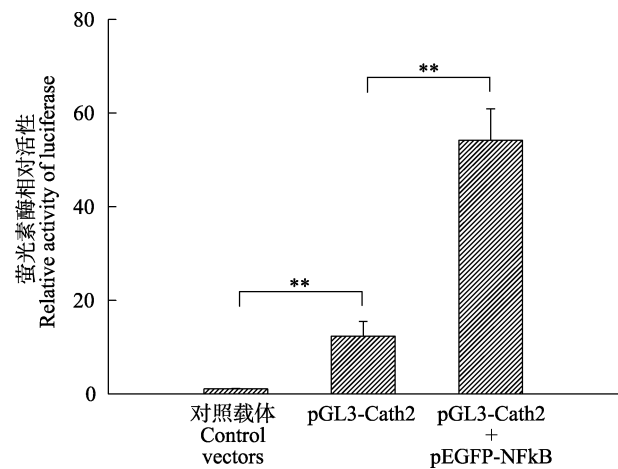


图 4 双荧光素酶报告基因实验测定虹鳟 *Cath2* 基因启动子活性

Fig.4 Promoter activity of rainbow trout *Cath2* gene, determined by dual luciferase reporter gene assay

使用 pGL3-Cath2 启动子载体质粒、pEGFP-NF $\kappa$ B 转录因子表达载体质粒单独或共同转染 CIK 细胞, 所有细胞中均有 PRL-CMV 海肾荧光素酶内参质粒共转染, 使用未负载启动子的 pGL3-basic 空质粒和未负载转录因子的 pEGFP 空质粒作为对照, 使各组转染 DNA 总量均等

CIK cells were transfected by pGL3-Cath2 promoter vector plasmid and pEGFP-NF $\kappa$ B transcription factors expression vector plasmid, independently or simultaneously. All cells were co-transfected by PRL-CMV renilla luciferase plasmids as internal control. Blank vectors, pGL3-basic and pEGFP plasmids were also used for co-transfection, to keep equal quantity of transfected DNA among different groups

使用 pGL3-Cath2 启动子载体、pEGFP-NF $\kappa$ B 表达载体, 与 PRL-CMV 海肾荧光素酶内参载体质粒共转染 CIK 细胞, 转染效率为  $(28.9 \pm 3.5)\%$ 。定量测定启动子活性, 结果见图 4。从图 4 可以看出, 转染 pGL3-Cath2 实验组测定的荧光素酶活性比空载体对照组显著增强, 表明 *Cath2* 基因启动子在该体系中表现出明显的启动子活性; pGL3-Cath2 和 pEGFP-NF $\kappa$ B 共转染实验组测定的荧光素酶活性显著高于单独转染 pGL3-Cath2 实验组, 前者约为后者的 4.39 倍, 表明外源 NF $\kappa$ B 转录因子的增强性表达能够提高启动子活性, 证实了 NF $\kappa$ B 为促进 *Cath2* 基因启动子表达的反式作用因子。

### 3 讨论

#### 3.1 病毒诱导虹鳟 *Cath2* 基因转录

多项不同来源的转录组数据分析表明,虹鳟 *Cath2* 基因转录水平不仅在细菌感染或 LPS 模拟刺激后大幅度上升(MacKenzie *et al.*, 2008; Langevin *et al.*, 2012; Bridle *et al.*, 2012),也在病毒或模拟物刺激后有不同程度的上升,如 IHNV BLK94 和 WA 毒株(Purcell *et al.*, 2011), IHNV 灭活病毒(MacKenzie *et al.*, 2008), 病毒性出血败血症病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)(Aquilino *et al.*, 2014)以及病毒双链 RNA 模拟物 Poly I:C(Pacitti *et al.*, 2016)诱导后的表达谱数据中, *Cath2* 基因均呈现上调表达。

为在实验层面确认以上生物信息学分析数据,本研究通过 qRT-PCR 检测,证实自然感染鳃弧菌或 IHNV 的虹鳟鳃、头肾组织中, *Cath2* 基因转录水平都有显著升高(图 1),进一步的体外转录研究结果(图 3)显示,细菌模拟物 LPS 和病毒模拟物 Poly I:C 都能够诱导 *Cath2* 基因启动子表达增强。*Cath2* 基因表达能够被细菌感染所诱导,与其抗菌生理功能相吻合,而该基因同样参与病毒感染免疫应答,该基因可能不局限于通常所知的生物学功能,即破坏病原生物膜结构,还可能以其他的方式发挥作用,以抵御不具有细胞结构的病毒感染。

D'Este 等(2016)对鲑科鱼类 Cathelicidin 成熟多肽结构进行了分析,并推测其富含丝氨酸和甘氨酸的分子,可通过刺激吞噬细胞的吞噬功能来发挥免疫调节作用,而非直接杀伤病原体。本研究从转录特征方面支持了 Cathelicidin 的非直接杀菌功能,这种受病毒诱导表达的转录模式在鱼类抗菌肽中并非个例,在大西洋鳕中也曾有报道,包括 Hepcidin (Solstad *et al.*, 2008)和 Cathelicidin(Shewring *et al.*, 2011; Broekman *et al.*, 2013),其抗病毒机制仍需进一步研究验证。

#### 3.2 虹鳟 *Cath2* 基因转录调控分析

为解析虹鳟 *Cath2* 基因转录调控机制,本研究对基因上游调控序列进行了测序和分析,成功获得了长度为 351 bp 的核心启动子序列。序列相似性比对结果表明,虹鳟 *Cath2* 基因起始密码子前的上游调控序列与人(*Homo sapiens*)、大西洋鳕 *Cath* 基因以及虹鳟 *Cath1* 基因对应序列的碱基一致性较低,但具有一些共同的结构特征,各 *Cath* 基因启动子均具有真核生物启动子典型的 TATA 盒和 CAAT 盒结构,在基因上游直至第一内含子区域,密集存在多个免疫相关转录因子结合位点(Chang *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*,

2009; Shewring *et al.*, 2011; Dhawan *et al.*, 2015)。

虹鳟 *Cath2* 基因上游调控区共有 3 个 NFκB 预测结合位点,其中,2 个都在核心启动子正链上,分别位于-78 bp 和-180 bp 位置,靠近 CAAT 盒。对已报道的鱼类其他 *Cath* 基因序列进行了 NFκB 结合位点预测,包括虹鳟 *Cath1*、大西洋鳕 *Cath* 研究发现, NFκB 结合特征性序列普遍存在于 *Cath* 基因上游,但此前尚无 NFκB 调控 *Cath* 基因转录的研究结果。本研究通过双荧光素酶报告基因研究,将虹鳟 *Cath2* 启动子连入 pGL3 质粒载体,转染草鱼 CIK 细胞系,萤火虫荧光素酶基因能够在该启动子驱动下表达,当与 NFκB 表达载体共转染时,萤火虫荧光素酶活性显著增强,表明 NFκB 是增强 *Cath2* 基因转录的反式作用因子。

NFκB 是经典的炎症和免疫调控核转录因子,该通路既能被细胞表面病原识别受体直接激活,也能被多种诱导磷酸激酶活化的胞内信号所激活,在接受免疫刺激后,数分钟即可迅速活化,参与包括细菌和病毒在内的多种病原感染应答(Ghosh *et al.*, 1998; Varejckova *et al.*, 2017)。虹鳟 *Cath2* 基因转录受 NFκB 调控,因此,能够在不同病原感染个体中迅速大幅上调表达,呈现出免疫诱导型转录特征。

#### 3.3 免疫诱导型启动子的应用

启动子常根据作用方式及功能分为 3 类:组成型启动子,在全部或多数组织中保持持续的转录活性;特异型启动子,在特定的组织或发育时期具有转录活性;诱导型启动子,受特定物理或化学信号调控(李圣彦等, 2014)。本研究获得的虹鳟 *Cath2* 启动子即为免疫诱导型启动子,在基因工程抗病育种中具有较高的应用价值。

利用基因工程技术,将免疫基因,如免疫球蛋白或抗菌肽等转入养殖鱼类体内,培育疾病抗性品种,是防控养殖病害的有效途径之一(叶鼎等, 2014)。启动子是各种转基因技术方案中必备的转基因元件,转基因载体中负载的外源目的基因必须置于有效的启动子介导之下,才能够在宿主细胞内成功转录表达。

目前,已报道的用作转基因元件的鱼类启动子多为组成型,如鲤(*Cyprinus carpio*)β-肌动蛋白、美洲大绵鳔(*Zoarces americanus*)抗冻蛋白启动子等(叶星等, 2011; Ledford, 2015; 汪亚平等, 2016; 胡炜等, 2016)。但对抗病转基因鱼而言,使用组成型启动子,将使未接触病原的鱼体内长期大量表达外源免疫基因,不仅没有必要,还可能因消耗能量而造成生长负担。如果使用免疫诱导型启动子,则可介导外源基因仅在鱼

体遭受免疫胁迫时出现高表达, 合理利用能量并抵御病害。

目前, 关于免疫诱导型启动子的报道仍较少(杜小溪等, 2013; Fu *et al.*, 2016), 本研究即提供了一种具有快速免疫响应特征鱼类启动子。虹鳟 *Cath2* 基因的表达模式较好地符合了抗病转基因鱼对外源免疫基因转录特征的需求, 将该基因启动子用作抗病转基因载体构建的启动子元件, 可能驱动外源免疫基因保持类似的表达模式。

鳃和头肾组织都在鱼类免疫防御中具有重要地位。鳃是鱼类的呼吸器官, 比表面积大, 表面密布毛细血管, 随时与外界水流接触, 因而易受环境中的病原菌侵袭。头肾是硬骨鱼类特有的淋巴器官, 在鱼体内发挥重要的免疫功能。将虹鳟 *Cath2* 基因启动子用作转基因元件, 可能使转基因鱼在受到免疫刺激时, 鳃和头肾大量表达转入的免疫基因, 及时抵御外界病原感染, 同时, 避免在不必要的组织和健康状态下过多表达外源基因, 在鱼类基因工程抗病育种领域具有广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- Aquilino C, Castro R, Fischer U, *et al.* Transcriptomic responses in rainbow trout gills upon infection with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 12–20
- Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, *et al.* The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communication*, 2014, 5(4): 3657
- Bridle AR, Koop BF, Nowak BF. Identification of surrogates of protection against yersiniosis in immersion vaccinated Atlantic salmon. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40841
- Broekman DC, Guðmundsson GH, Maier VH. Differential regulation of cathelicidin in salmon and cod. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 532–538
- Chakraborty K, Maity PC, Sil AK, *et al.* cAMP stringently regulates human cathelicidin antimicrobial peptide expression in the mucosal epithelial cells by activating cAMP-response element-binding protein, AP-1, and inducible cAMP early repressor. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(33): 21810–21827
- Chang CI, Pleguezuelos O, Zhang YA, *et al.* Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infection and Immunity*, 2005, 73(8): 5053–5064
- Cheng Y, Prickett MD, Gutowska W, *et al.* Evolution of the avian  $\beta$ -defensin and cathelicidin genes. *BMC Evolutionary Biology*, 2015, 15(1): 188
- de Bruijn I, Belmonte R, Anderson VL, *et al.* Immune gene expression in trout cell lines infected with the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 38(1): 44–54
- D'Este F, Benincasa M, Cannone G, *et al.* Antimicrobial and host cell-directed activities of Gly/Ser-rich peptides from salmonid cathelicidins. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016(59): 456–468
- Dhawan P, Wei R, Sun C, *et al.* C/EBP $\alpha$  and the vitamin D receptor cooperate in the regulation of cathelicidin in lung epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 230(2): 464–472
- Du XX, Gao XG, Chen PH, *et al.* Research on gene promoter of fish. *Biotechnology Bulletin*, 2013(8): 12–16 [杜小溪, 高祥刚, 陈潘海, 等. 鱼类基因启动子的研究进展. *生物技术通报*, 2013(8): 12–16]
- Fu XQ, Ding ZJ, Fan J, *et al.* Characterization, promoter analysis and expression of the interleukin-6 gene in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(6): 1527–1540
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 1998, 16(1): 225–260
- Hao X, Yang H, Wei L, *et al.* Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate. *Amino Acids*, 2012, 43(2): 677–685
- Hilchie AL, Wuerth K, Hancock RE. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (Antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12): 761–768
- Hu W, Zhu ZY. Enlightenments for China from the industrialization of the transgenic atlantic salmon in the US. *Engineering Sciences*, 2016, 18(3): 105–109 [胡炜, 朱作言. 美国转基因大西洋鲑产业化对我国的启示. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 105–109]
- Langevin C, Blanco M, Martin SA, *et al.* Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One*, 2012, 7(6): 39126
- Ledford H. Salmon approval heralds rethink of transgenic animals. *Nature*, 2015, 527(7579): 417–418
- Li SY, Lang ZH, Huang DF. Research progress on eukaryotic promoter. *Current Biotechnology*, 2014, 4(3): 158–164 [李圣彦, 郎志宏, 黄大昉. 真核生物启动子研究概述. *生物技术进展*, 2014, 4(3): 158–164]
- MacKenzie S, Balasch JC, Novoa B, *et al.* Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to *in vivo* challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 141
- Maier VH, Dorn KV, Gudmundsdottir BK, *et al.* Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Molecular Immunology*, 2008, 45(14): 3723–3730
- Mathelier A, Fornes O, Arenillas DJ, *et al.* JASPAR 2016: A

- major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): 110–115
- Messeguer X, Escudero R, Farré D, *et al.* PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 2002, 18(2): 333–334
- Nsrelden RM, Horiuchi H, Furusawa S. Expression of ayu antimicrobial peptide genes after LPS stimulation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(6): 1072–1080
- Pacitti D, Lawan MM, Feldmann J, *et al.* Impact of selenium supplementation on fish antiviral responses: A whole transcriptomic analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed supranutritional levels of Sel-Plex®. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 116
- Pannier AK, Ariazi EA, Bellis AD, *et al.* Bioluminescence imaging for assessment and normalization in transfected cell arrays. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(2): 468–497
- Purcell MK, Marjara IS, Batts W, *et al.* Transcriptome analysis of rainbow trout infected with high and low virulence strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 84–93
- Reese MG. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry*, 2001, 26(1): 51–56
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108
- Shewring DM, Zou J, Corripio-Miyar Y, *et al.* Analysis of the cathelicidin 1 gene locus in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Molecular Immunology*, 2011, 48(5): 782–787
- Solstad T, Larsen AN, Seppola M, *et al.* Identification, cloning and expression analysis of a hepcidin cDNA of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 298–310
- Varejckova M, Gallardo-Vara E, Vicen M, *et al.* Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- $\kappa$ B and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sciences*, 2017, 175: 52–60
- Wang C, Feng L, Yu HN, *et al.* Relationship between structure and function of Cathelicidins and their molecular design: A review. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(1): 27–35 [王晨, 冯兰, 于海宁, 等. Cathelicidins 结构与功能的关系及其分子设计研究进展. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 27–35]
- Wang YP, He LB. Retrospect and prospect of transgenic fish breeding in China. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(7): 851–860 [汪亚平, 何利波. 我国转基因鱼研制的历史回顾与展望. *生物工程学报*, 2016, 32(7): 851–860]
- Ye D, Zhu ZY, Sun YH. Fish genome manipulation and directional breeding. *Science China: Life Sciences*, 2014, 44(12): 1253–1261 [叶鼎, 朱作言, 孙永华. 鱼类基因组操作与定向育种. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(12): 1253–1261]
- Ye X, Tian YY, Gao FY. Progress in transgenic fish techniques and application. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(5): 494–503 [叶星, 田园园, 高风英. 转基因鱼的研究进展与商业化前景. *遗传*, 2011, 33(5): 494–503]
- Zhang DL, Yu DH. Cloning and prokaryotic expression of Cathelicidin gene from Japanese Eel I, *Anguilla japonica*. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(7): 124–131 [张东玲, 喻达辉. 日本鳗鲡 I 型 Cathelicidin 基因的克隆与原核表达. *生物技术通报*, 2015, 31(7): 124–131]
- Zhang XJ, Zhang XY, Zhang N, *et al.* Distinctive structural hallmarks and biological activities of the multiple cathelicidin antimicrobial peptides in a primitive teleost fish. *Journal of Immunology*, 2015, 194(10): 4974–4987

(编辑 陈严)

## Functional Analysis of the Immune-Induced Promoter of the Rainbow Trout *Cathelicidin2* Gene

ZHAO Zixia<sup>1</sup>①, XU Jian<sup>1</sup>, JIANG Yanliang<sup>1</sup>, BAI Qingli<sup>2</sup>,  
JIANG Likun<sup>1</sup>, CHEN Baohua<sup>1</sup>, XU Peng<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141;

2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070;

3. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102)

**Abstract** This study aimed to investigate the transcriptional regulation of a teleost antimicrobial peptide. The expression pattern of the rainbow trout *Cathelicidin2* (*Cath2*) gene was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). *Cath2* was expressed in tissues closely related to immune defense, including the gill and head kidney, and expression significantly increased after both bacterial and viral infections. Promoter and transcription factor binding sites were analyzed for the upstream regulatory sequence of *Cath2* gene. The predicted promoter contained characteristic eukaryotic TATA and CAAT boxes, as well as multiple binding sites for immune-related transcription factors, including two candidate binding sites for nuclear factor kappa B (NFκB) on the positive strand of the core promoter. In *Ctenopharyngodon idella* kidney cell lines, transcription of both green fluorescent protein and firefly luciferase genes was initiated by the predicted *Cath2* promoter. Both the bacterial mimetic lipopolysaccharide and the viral mimetic polyinosinic polycytidylic acid up-regulated promoter activity. As shown in the dual luciferase reporter assay, promoter activity was enhanced by co-expression of the transcription factor NFκB, indicating that *Cath2* is regulated by the NFκB pathway. These results suggest that expression of the rainbow trout *Cath2* gene could be induced by different immune stimuli, and its promoter might serve as an immune-inducible transgenic element. The *Cath2* promoter may initiate the transcription of heterologous immune genes against exogenous infection in a proper expression pattern, avoiding excessive transcription under unnecessary conditions; therefore, it has potential for genetic engineering approaches in the breeding of disease-resistant fish.

**Key words** Rainbow trout; Antimicrobial peptide; *Cathelicidin2*; Promoter; Transcription regulation

① Corresponding author: ZHAO Zixia. E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180323001

http://www.yykxjz.cn/

何暮春, 张金勇, 刘长琳, 项子龙, 柳淑芳, 庄志猛, 薛同明. 金乌贼生长期DNA甲基化水平和模式. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 46-55

He MC, Zhang JY, Liu CL, Xiang ZL, Liu SF, Zhuang ZM, Xue TM. DNA methylation level and pattern in growing *Sepia esculenta* Hoyle. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 46-55

## 金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式\*



何暮春<sup>1,2,3</sup> 张金勇<sup>2,3,4</sup> 刘长琳<sup>2</sup> 项子龙<sup>2,3,5</sup>  
柳淑芳<sup>2,3①</sup> 庄志猛<sup>2</sup> 薛同明<sup>6</sup>

(1. 浙江海洋大学水产学院 舟山 316003; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点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; 4. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 5. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 6. 青岛金沙滩水产开发有限公司 青岛 266000)

**摘要** DNA 甲基化在基因表达、细胞衰老、性状分化中发挥重要调控作用, 为探讨生长期金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle)不同性别、不同组织 DNA 甲基化水平和模式的差异, 本研究采用荧光标记的甲基化敏感扩增多态性(Fluorescence-labeled Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, F-MSAP)技术, 选取 12 对特异性引物, 检测分析了雌、雄金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺 4 种组织的基因组 DNA 甲基化。结果显示, 生长期金乌贼基因组 DNA 总甲基化水平为 23.97%~39.70%, 在水产无脊椎动物中处于较高水平; 金乌贼 4 种组织中, 肌肉的总甲基化水平最高, 这可能与金乌贼存在异速生长现象且在生长期运动器官优先发育有关; 金乌贼甲基化水平和模式存在性别差异, 雌性金乌贼肌肉组织 DNA 总甲基化水平显著低于雄性, 心脏和胰脏组织 DNA 总甲基化水平却显著高于雄性; 此外, 雌性金乌贼肌肉组织全甲基化水平对总甲基化水平贡献最大, 与之不同的是, 雌性其他组织、雄性金乌贼各组织中半甲基化水平和全甲基化水平差异不大, 说明金乌贼 DNA 甲基化的水平和模式具有性别和组织差异。上述结果可为深入研究金乌贼生长发育、组织分化和衰老死亡等生命过程的表现遗传学调控提供基础数据。

**关键词** 金乌贼; 生长期; DNA 甲基化; F-MSAP; 组织差异性; 性别差异性

**中图分类号** Q959.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0046-10

DNA 甲基化为表观遗传学的重要组成部分, DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达。脊椎动物 DNA 甲基化最常见的是 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的甲基化修饰, 即由 S-腺苷甲硫氨

酸提供甲基, 在 DNA 甲基转移酶的催化下, 将甲基基团以共价键形式结合到基因组 CpG 岛的二核苷酸胞嘧啶 5'碳位上, 并可在细胞分裂过程中传递给子细胞的表现遗传现象; 植物和真菌的甲基化还会发生在非 CpG 岛区域, 如 CG、CHH、CHG 位点(H 为除 G

\* 国家自然科学基金项目(31672645)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项(20603022016001)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672645), Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016001), and Taishan Scholar Project, Shandong Province]. 何暮春, E-mail: hmc20160105@126.com

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

收稿日期: 2018-03-23, 收修改稿日期: 2018-04-10

外的其他碱基)(李艳等, 2017; 王玉龙, 2016)。这种在不改变基因序列条件下产生可遗传的基因表达, 已成为当前的研究热点。诸多研究表明, DNA 甲基化与基因表达调控(De *et al*, 2015; Rhee *et al*, 2002)、基因组印迹(Hata *et al*, 2002)、X 染色体失活(Zhang *et al*, 2010; Mohandas *et al*, 1981; Bird *et al*, 2002)、细胞功能丧失(Golbus *et al*, 1990)、细胞衰老(Berdyshev *et al*, 1967)、肿瘤发生(魏绍峰等, 2016)等有着密不可分的关系。

近年来, 水产动物的 DNA 甲基化研究也不断深入。左之良等(2016)研究发现, 刺参(*Apostichopus japonicus*)的自然群体与白化群体相同组织间甲基化水平和模式存在差异, 同一群体不同组织间的 DNA 甲基化水平和模式也不同; 杜盈等(2013)对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的自然群体和人工选育品种“黄海 1 号”不同组织基因组 DNA 甲基化的研究表明, DNA 甲基化水平和模式因群体和组织的不同而存在差异; 李思平等(2015)发现, 在面对相同的胁迫环境, 雌、雄半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)的不同组织 DNA 甲基化水平变化并不完全相同。DNA 甲基化具组织差异性已在多个物种中证实, 但关于头足类 DNA 甲基化组织差异性研究鲜见报道。

金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle, 1885)是我国沿海重要的经济头足类品种, 属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、鞘亚纲(Coleoidea)、乌贼目(Sepiida)、乌贼科(Sepiidae)、乌贼属(*Sepia*), 具有生命周期短、世代更新快、生长迅速、食性广、肉质鲜美、蛋白质含量高、综合利用范围广等优点, 曾是我国海洋渔业重要的捕捞对象(董正之等, 1991; 郝振林等, 2007)。但自 20 世纪 80 年代以来, 由于过度捕捞和海洋环境的破坏等, 其资源量明显衰退, 产量急剧下降, 目前, 金乌贼在许多海域已绝迹。近年来, 为了恢复和开发利用金乌贼资源, 金乌贼资源增殖等研究工作已引起科研工作者的的高度重视, 陆续从遗传育种学、胚胎发育学、生理学等多方面展开相关研究(刘长琳等, 2009、2016)。为探讨生长期金乌贼不同性别、不同组织 DNA 甲基化水平和模式的差异, 本研究利用荧光标记的甲基化敏感扩增多态性(Fluorescence-labeled Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, F-MSAP)技术对生长期金乌贼雌雄个体肌肉、心脏、胰脏和性腺组织基因组 DNA 甲基化水平和模式进行检测, 在分子水平上探讨金乌贼不同组织间 DNA 甲基化水平差异, 认识处于快速生长阶段的金乌贼基因组 DNA 甲基化水平和模式, 分析生长发育、组织分化与 DNA 甲基化之间的关系, 以

期为深入研究金乌贼衰老死亡等提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2015年9月在山东青岛近海捕捞金乌贼野生幼体, 经过1年人工培育, 于2016年8月性成熟并自然交配获得受精卵。受精卵经30 d 孵化后得到初孵仔鱼, 随机采集生长期(约90日龄)健康个体3雌3雄, 体重为181.02~231.40 g, 胴背长为105.67~124.51 mm。分别保存6个个体的外套膜肌肉、心脏、胰脏和性腺4种组织共24份样品, 液氮速冻后, 转至-80℃冰箱备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 取各组织样品 50~100 mg, 用液氮研磨至粉末, 采用传统的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 是否降解, 并且使用 NanoDrop2000(Thermo)检测 DNA 的浓度和纯度, 选择条带清晰且纯度高的样品稀释至 100 ng/μl, -20℃中保存备用。

**1.2.2 F-MSAP 原理** F-MSAP 是无参考基因组物种 DNA 甲基化检测的常用技术。该技术是在 MSAP 技术(Xiong *et al*, 1999)上发展起来的, 与后者相比, 其结合荧光标记引物的可显性和 DNA 测序仪的自动化、分辨率、准确性、安全性和检测通量均得到提升(杨春等, 2016)。F-MSAP 的工作原理: 使用 1 对甲基化敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I, 识别基因组 CpG 岛的 CCGG 位点, 但 2 种酶对不同 DNA 甲基化模式的敏感程度不同, 酶切产生的条带不同。*Hpa* II 可以对非甲基化和半甲基化序列进行酶切, 而对胞嘧啶的全甲基化序列无酶切活性; *Msp* I 则可以对非甲基化和内侧胞嘧啶全甲基化序列进行酶切, 而对半甲基化和外侧胞嘧啶全甲基化序列无酶切活性。

**1.2.3 酶切和连接体系** 将限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 分别与 *Eco*R I 组合成双酶切反应体系: *Eco*R I +*Hpa* II 和 *Eco*R I +*Msp* I。酶切反应体系 20 μl, 包括 2 μl DNA (100 ng/μl), 2 U 的 FastDigest *Eco*R I 和 FastDigest *Hpa* II /*Msp* I, 4 μl 10×Buffer (Thermo), 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μl。酶切体系 37℃水浴 0.5 h。

连接反应: 根据 Xu 等(2000)的方法进行接头引物设计(表 1), 将 *Eco*R I 对应的 E-A<sub>1,2</sub> 单链接头分别稀释为 10 pmol/L, *Hpa* II /*Msp* I 对应的 HM-A<sub>1,2</sub> 单链接头分别稀释为 100 pmol/L, 各取等体积的单链接头引物混合后, 94℃变性 5 min, 缓慢冷却到室温形成双接头 E 和 HM。连接反应体系 20 μl, 包括 10 μl

酶切产物, 50 pmol 双接头 E 和 HM, 1U T4 DNA Ligase, 2  $\mu$ l 10 $\times$ Buffer(TaKaRa), 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ l。连接体系 16 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物用 TE 缓冲液(Solarbio)稀释 10 倍后用于预扩增反应体系。

**1.2.4 预扩增反应体系** 预扩增反应体系 20  $\mu$ l, 包括 2  $\mu$ l 稀释后连接产物, 1 U *EasyTaq* DNA Polymerase, 2  $\mu$ l 10 $\times$ Buffer(TransGen), 1  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L) (TransGen), 5 pmol HM<sub>0</sub> Primer, 5 pmol E<sub>0</sub> Primer(表 1), 补灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。预扩增产物用 TE 溶液稀释 20 倍后用于选择性扩增反应体系。

**1.2.5 选择性扩增反应体系** 参考太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (姜群, 2015; 张鑫等, 2017) 和大珠

母贝 (*Pinctada fucata*) (Yao *et al*, 2015) DNA 甲基化检测的选择性扩增引物, 筛选出 4 条 *Hpa* II / *Msp* I 选择性扩增引物 HM<sub>(1-4)</sub> 和 7 条 FAM 荧光标记的 *Eco*R I 选择性扩增引物 E<sub>(1-7)</sub>, 从这 28 对引物组合中筛选出 12 对扩增条带清晰且效率高的选择性扩增引物(表 1)。选择性扩增反应体系 20  $\mu$ l, 包括 2  $\mu$ l 稀释后预扩增产物, 1 U *EasyTaq* DNA Polymerase, 2  $\mu$ l 10 $\times$ buffer, 1  $\mu$ l dNTP(2.5 mmol/L), 5 pmol *Hpa* II / *Msp* I 选择性扩增引物, 5 pmol *Eco*R I 选择性扩增引物, 补灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ l。PCR 反应条件: 第一阶段为 13 个 Touch down 循环, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火(每个循环递减 0.7 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第二阶段为 27 个普通 PCR 循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 金乌贼 F-MSAP 甲基化分析所用接头和引物序列

Tab.1 Sequence of adapters and primers used for F-MSAP analysis of *S. esculenta*

接头/引物 Adapter/Primer	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (5'~3')	<i>Eco</i> R I (5'~3')
接头 Adapters	HM-A <sub>1</sub> : GACGATGAGTCTAGAA	E-A <sub>1</sub> : CTCGTAGACTGCGTACC
	HM-A <sub>2</sub> : CGTTCTAGACTCATC	E-A <sub>2</sub> : AATTGGTACGCAGTCTAC
预扩增引物 Preamplification primers	HM <sub>0</sub> : GATGAGTCTAGAACGGT	E <sub>0</sub> : GACTGCGTACCAATTC
选择性扩增引物 Selective amplification primers	HM <sub>1</sub> : HM <sub>0</sub> +AG	E <sub>1</sub> : E <sub>0</sub> +ACA
		E <sub>2</sub> : E <sub>0</sub> +AAC
		E <sub>3</sub> : E <sub>0</sub> +AAA
		E <sub>4</sub> : E <sub>0</sub> +AGA
		E <sub>6</sub> : E <sub>0</sub> +ACT
	HM <sub>2</sub> : HM <sub>0</sub> +AC	E <sub>1</sub> : E <sub>0</sub> +ACA
		E <sub>3</sub> : E <sub>0</sub> +AAA
		E <sub>4</sub> : E <sub>0</sub> +AGA
		E <sub>5</sub> : E <sub>0</sub> +ACG
		E <sub>6</sub> : E <sub>0</sub> +ACT
	HM <sub>3</sub> : HM <sub>0</sub> +GC	E <sub>4</sub> : E <sub>0</sub> +AGA
	HM <sub>4</sub> : HM <sub>0</sub> +GG	E <sub>5</sub> : E <sub>0</sub> +ACG

**1.2.6 数据分析** 使用 ABI 3130 Genetic Analyzer 检测选择性扩增产物的甲基化多态性, 获得峰值图, 使用 Gene Mapper V4.0 对所得峰值图进行扫描。同一 DNA 不同酶切组合的相同引物扩增互为一组, 分别记为 EH、EM(图 1)。根据上述酶切原则, 所得数值可分为 3 种条带形式, 分别代表 DNA 甲基化的 3 种模式(图 1): I 半甲基化位点, 甲基化修饰仅在 DNA 一条链, 经 EH 和 EM 分别处理后, EH 酶切有带而 EM 无带; II 全甲基化位点, DNA 双链发生甲基化修饰, EH 酶切无带而 EM 有带; III 非甲基化位点, EH 和 EM 酶切均出现条带。

整合统计数据(表 2), 采用 SPSS 16.0 软件单因素方差分析法(One-way ANOVA)对雌雄金乌贼的 4 种组织基因组 DNA 总甲基化水平、半甲基化水平和全甲基化水平进行显著性分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准误 (Mean $\pm$ SE)在 GraphPad Prism 5 中绘制(图 4~图 8)。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取质量和酶切结果检测

基因组 DNA 提取与酶切反应是 F-MSAP 技术成功的关键, 提取的基因组 DNA 完整无断裂决定检测

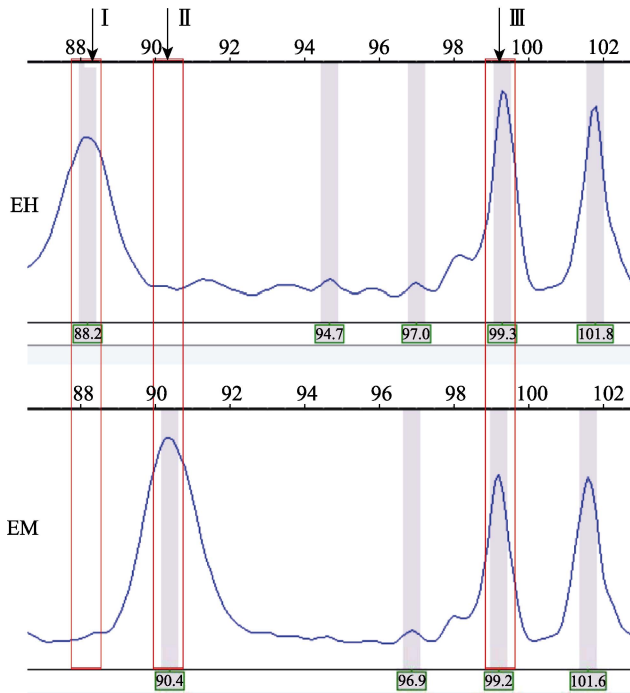


图 1 金乌贼的 3 种 DNA 甲基化模式

Fig.1 Three DNA methylation types of *S. esculenta*

EH 为 *EcoR* I + *Hpa* II 酶切; EM 为 *EcoR* I + *Msp* I 酶切;

I 表示半甲基化位点, II 表示全甲基化位点,

III 表示非甲基化位点

EH: Digested by *EcoR* I / *Hpa* II ;

EM: Digested by *EcoR* I / *Msp* I ;

I : Hemi-methylated sites; II : Fully-methylated sites;

III : Non-methylated sites

结果是否可靠; 酶切是否完全直接决定能否完全检测 DNA 胞嘧啶甲基化位点。来自金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺的 4 种组织基因组 DNA(图 2), DNA 带型整齐, 泳带无拖尾, 说明所提取的金乌贼基因组 DNA 质量好, 可用于后续酶切反应。对 4 种组织基因组 DNA, 采用快速酶切体系, 经 *EcoR* I + *Hpa* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 两组双酶切反应后, 酶切反应产物经琼脂糖凝胶电泳, 呈弥散状, 无明显条带, 表明酶切反应比较充分(图 3)。

### 2.1 金乌贼甲基化水平和模式的性别差异

根据 DNA 甲基化模式的分类原则(图 1), 整合 24 个样品与 12 对引物组合的分析结果, 统计金乌贼生长期不同组织的基因组 DNA 甲基化各模式比例(表 2), 可见生长期金乌贼的非甲基化水平显著高于总甲基化水平( $P < 0.05$ ), 表明金乌贼基因组 DNA 序列的 CCGG 位点虽发生了甲基化修饰, 仍以非甲基化位点居多。

在总甲基化水平上, 相同组织间的性别差异表现为雌性金乌贼心脏和胰脏的总甲基化水平显著高于雄性( $P < 0.05$ ); 但雌性肌肉的总甲基化水平却显著低于雄性( $P < 0.05$ ); 性腺的总甲基化水平不同性别差异不显著(图 4)。在半甲基化水平上, 相同组织间的性别差异与总甲基化水平的趋势基本一致(图 5)。在全甲基化水平上, 比较相同组织的性别差异, 仅有雌性金乌贼心脏的全甲基化水平显著高于雄性( $P < 0.05$ ), 其他组织差异均不显著(图 6)。

表 2 金乌贼雌雄不同组织基因组 DNA 甲基化的检测结果

Tab.2 Methylation detection on various tissues of female and male *S. esculenta* (% , Mean±SE)

雌/雄 Female/male	组织 Tissue	DNA 甲基化水平 DNA methylation level			
		非甲基化水平 Non-methylation level	半甲基化水平 Hemi-methylation level	全甲基化水平 Fully methylation level	总甲基化水平 Total methylation level
雌 Female	肌肉 Muscle	65.03±1.91	14.99±1.26	19.99±1.52	34.97±1.90
	心脏 Heart	67.10±1.88	15.33±1.21	17.57±1.57	32.90±1.88
	胰脏 Pancreas	68.27±1.62	15.85±1.22	15.88±1.10	31.73±1.62
	卵巢 Ovary	70.98±1.23	13.96±0.88	15.06±0.76	29.02±1.23
雄 Male	肌肉 Muscle	60.30±2.11	19.89±0.99	19.80±1.55	39.70±2.11
	心脏 Heart	74.52±1.29	15.69±2.97	12.08±0.62	25.50±1.29
	胰脏 Pancreas	76.03±1.16	15.02±2.18	12.43±0.70	23.97±1.16
	精巢 Spermmary	72.81±1.26	14.23±0.90	13.07±0.61	27.19±1.26

注: 非甲基化水平、半甲基化水平和全甲基化水平是由脚本对经 Gene Mapper V4.0 处理后所得数值表进行计算机运算所得; 总甲基化水平=半甲基化水平 + 全甲基化水平

Note: Non-methylation level, hemi-methylation level and fully methylation level were obtained by a script, the numerical table of which derived from Gene Mapper V4.0; The total methylation level is equal to the sum of hemi-methylation and fully methylation level

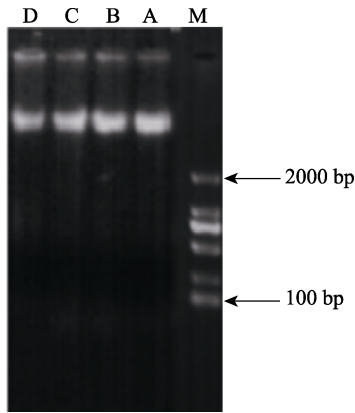


图 2 金乌贼基因组 DNA 电泳

Fig.2 Electropherograms of genomic DNA in *S. esculenta*

A: 肌肉; B: 心脏; C: 胰脏; D: 性腺;  
M: DL2000 DNA marker  
A: Muscle; B: Heart; C: Pancreas; D: Gonad

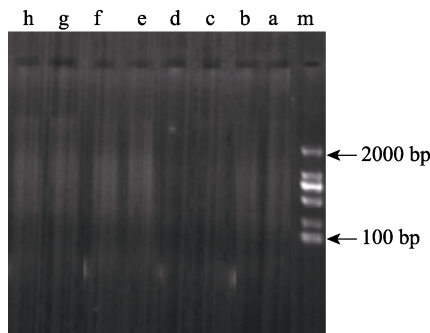


图 3 金乌贼基因组 DNA 酶切反应电泳

Fig.3 Electropherograms of enzyme cleavage in genomic DNA of *S. esculenta*

a, c, e, g 分别代表金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺组织的 *EcoR* I + *Hpa* II 酶切条带;  
b, d, f, h 分别代表金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺组织的 *EcoR* I + *Msp* I 酶切条带  
m: DL2000 DNA marker; a, c, e, g represent the *EcoR* I + *Hpa* II digestion of four tissues of *S. esculenta*;  
b, d, f, h represent the *EcoR* I + *Msp* I digestion of four tissues of *S. esculenta*

### 2.3 金乌贼甲基化水平和甲基化模式的组织差异

#### 2.3.1 雌性金乌贼不同组织间的 DNA 甲基化比较

雌性金乌贼生长期阶段不同组织基因组 DNA 甲基化程度不完全相同。各组织的总甲基化水平从高到低依次为肌肉>心脏>胰脏>卵巢(表 2 和图 7), 仅有肌肉与性腺组织存在显著差异( $P<0.05$ ); 在半甲基化水平上, 各组织间差异均不显著( $P>0.05$ ); 在全甲基化水平上, 肌肉与胰脏、肌肉与性腺均存在显著性差异( $P<0.05$ )。可见, 金乌贼基因组 DNA 的 CCGG 位点

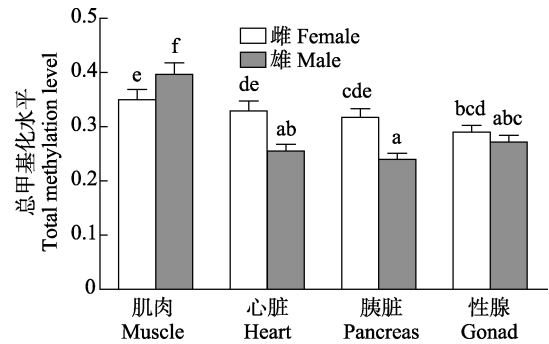


图 4 雌雄金乌贼不同组织基因组 DNA 总甲基化水平比较

Fig.4 Comparison of total methylation level of genomic DNA of female and male *S. esculenta*

柱上不同字母表示不同组织间差异显著( $P<0.05$ ), 下同  
Columns with different letters were significantly different ( $P<0.05$ ). The same as below

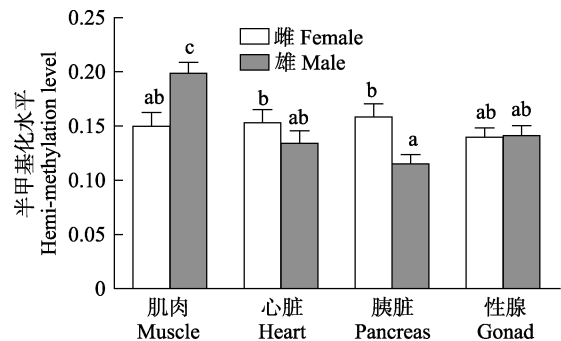


图 5 雌雄金乌贼不同组织基因组 DNA 半甲基化水平比较

Fig.5 Comparison of hemi-methylation level of genomic DNA of female and male *S. esculenta*

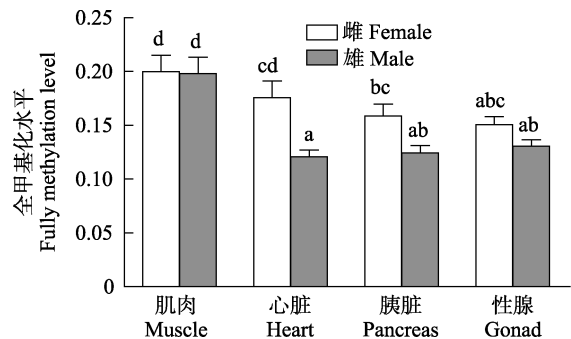


图 6 雌雄金乌贼不同组织基因组 DNA 全甲基化水平比较

Fig.6 Comparison of fully methylation level of genomic DNA of female and male *S. esculenta*

上全甲基化水平在不同组织中的高低趋势与总甲基化水平接近。通过比较分析还发现, 各组织的全甲基化水平均高于半甲基化水平, 但仅有肌肉组织的全甲基化与半甲基化水平差异显著( $P<0.05$ )。再次说明, 雌性金乌贼基因组 DNA 的全甲基化水平更能代表总甲基化水平, 且肌肉组织的甲基化程度更高。

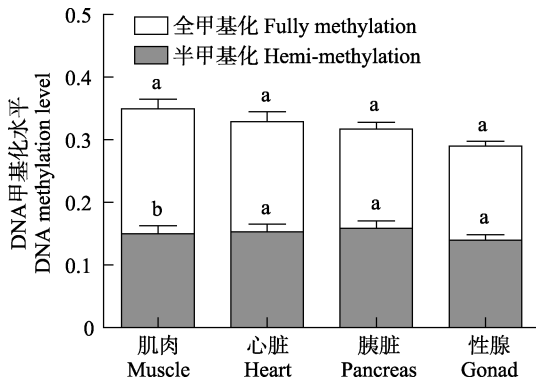


图 7 雌性金乌贼不同组织基因组 DNA 总甲基化、半甲基化、全甲基化水平对比

Fig.7 Comparison of total/hemi-/fully methylation level of genomic DNA of female *S. esculenta*

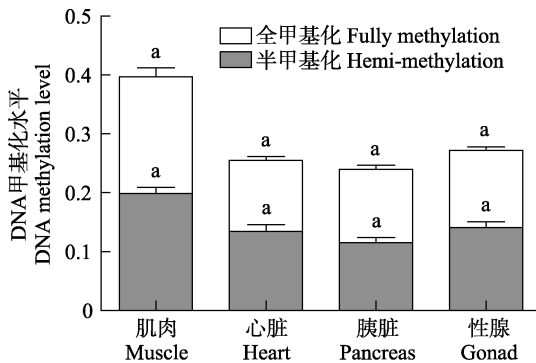


图 8 雄性金乌贼不同组织基因组 DNA 总甲基化、半甲基化、全甲基化水平对比

Fig.8 Comparison of total/hemi-/fully methylation level of genomic DNA of male *S. esculenta*

### 2.3.2 雄性金乌贼不同组织间的 DNA 甲基化比较

雄性金乌贼生长期的基因组 DNA 甲基化水平同样存在组织差异,但各组织的总甲基化水平高低顺序却不同于雌性金乌贼,其顺序依次为肌肉>精巢>心脏>胰脏(表 2 和图 8),且肌肉组织与其他各组织间均存在显著差异( $P<0.05$ )。雄性金乌贼半甲基化水平和全甲基化水平在组织间的差异性规律与总甲基化水平基本一致,但各组织的半甲基化和全甲基化水平间差异不显著( $P>0.05$ ),且半甲基化和全甲基化水平均不能代表雄性总甲基化水平。上述结果表明,金乌贼基因组 DNA 半甲基化和全甲基化的发生,在不同性别和组织间均存在差异。

## 3 讨论

### 3.1 金乌贼基因组 DNA 甲基化水平和模式与其他物种的比较

DNA 甲基化作为表观遗传修饰的重要方式,对

生长发育、环境适应具有重要意义。与脊椎动物相比,对无脊椎动物 DNA 甲基化发生和作用机制了解甚少,可能与无脊椎模式生物秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 DNA 甲基化缺失及果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 DNA 甲基化水平过低(0.1%~0.6%)有关(Yi *et al.*, 2009; Urieli-Shoval *et al.*, 1982)。统计已有研究报道发现,水产无脊椎动物的总甲基化水平变化范围(15%~40%)小于水产脊椎动物(20%~65%)(表 3)。本研究监测到金乌贼总甲基化水平为 23.97%~39.70%,在水产无脊椎动物中处于较高水平。此外,对比相同组织的总甲基化水平后发现,头足类(金乌贼、真蛸 *Octopus vulgaris*)的外套膜肌肉组织总 DNA 甲基化水平(34.97%和 66%),远高于双壳贝类(大珠母贝和马氏珠母贝 *Pinctada martensii*)的外套膜组织(15.48%~19.61%),金乌贼和真蛸 DNA 总甲基化水平如此之高可能与头足类动物属于软体动物门中发育最完善、最高级的一大类群密切相关。在检测 DNA 总甲基化水平时,不同物种的生长环境、生活方式以及发育阶段等的差别也会造成一定的影响。

DNA 的甲基化状态与生长发育调控密切相关,不同物种的全甲基化和半甲基化所发挥作用的大小不同。亲代母本橙色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、父本荷那龙罗非鱼(*Oreochromis hornorum*)以及子代荷那龙罗非鱼及其杂交种(尚慧文等, 2017)、太平洋牡蛎(姜群等, 2014)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) (吴彪等, 2015)等动物中半甲基化水平低于全甲基化水平;虾夷扇贝选育群体—玉贝(吴彪等, 2015)半甲基化和总甲基化水平相当;家禽动物中,鸡(*Gallina*)和鸭(*Anatinae*)(唐韶青等, 2006)则表现出半甲基化水平高于全甲基化水平。本研究结果显示,金乌贼基因组 DNA 半甲基化和全甲基化在不同性别和组织间均存在差异。其中,雌性金乌贼基因组 DNA 的全甲基化水平更能代表总甲基化水平,且肌肉组织的甲基化程度更高;雄性金乌贼半甲基化和全甲基化的组织间差异规律与总甲基化水平基本一致,但各组织的半甲基化和全甲基化间差异不显著( $P>0.05$ )。

### 3.2 性别间的甲基化差异分析

性别对 DNA 甲基化水平有影响,同时 DNA 甲基化在调控性别分化中起重要作用。Nugent(2015)研究表明,小鼠雌性全甲基化水平显著高于雄性,通过高 DNA 甲基化水平可维持脑部女性化,当 DNA Methyltransferase 活性降低,视前区和性行为男性化。林蛙(*Rana chensinensis*)显现出因组织差异而造成雌

表 3 主要经济水产动物基因组 DNA 总甲基化水平比较

Tab.3 Comparison of total methylation level of genomic DNA from major economic aquatic animals

分类 Type	种名 Species	组织 Tissue	总甲基化水平 Total methylation level(%)	参考文献 Reference
无脊椎动物 Invertebrate	大珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	外套膜 Mantle	12.98	Yao <i>et al</i> , 2015
	马氏珠母贝 <i>Pinctada martensii</i>	外套膜边缘 Mantle pallial	15.48	罗少杰等, 2016
		外套膜中央 Mantle central	19.61	
	太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	闭壳肌 Adductor muscle	26.40	Jiang <i>et al</i> , 2013
	海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	闭壳肌 Adductor muscle	25.99	吕佳等, 2013
	栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>		32.08	
	虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yesoensis</i>		32.88	
	“海大”金贝		34.97	
	背角无齿蚌 <i>Anodonta woodiana</i>	唇瓣 Labellum	35.50	曹哲明等, 2009
		斧足 Foot	56.00	
	刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	体壁 Body wall	18.60	高杉等, 2017
		肠 Intestines	28.00	
		呼吸树 Respiratory tree	35.77	郭婷婷等, 2013
	中国明对虾	血液 Blood	19.70	杜盈等, 2013
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	肌肉 Muscle	23.10	
	真蛸 <i>Octopus vulgaris</i>	0 d 幼体 Larva	73.88	Pablo <i>et al</i> , 2017
		28 d 幼体 Larva	62.07	
		外套膜肌 Mantle	66.00	Eva <i>et al</i> , 2014
脊椎动物 Vertebrate	橙色莫桑比克罗非鱼	皮肤 Skin	30.63	尚慧文等, 2017
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	肝 Liver	35.04	
	半滑舌鳎	鳃 Gill	34.96	李思平等, 2015
	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	性腺 Gonad	47.32	
	黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	肌肉 Muscle	36.77	魏国华等, 2015
		肾 Kidney	64.93	

雄总甲基化水平高低的差异, 雄性林蛙肝脏和脑中 DNA 总甲基化水平高于雌性, 肌肉和皮肤雄性低于雌性(李雅芳等, 2014); 莆田黑猪的公猪心脏、肝脏、脂肪、耳和尾 DNA 甲基化水平高于母猪, 而肌肉低于母猪(张金耀, 2016); 但在荣昌仔猪耳组织中显示, 公猪总甲基化水平比母猪高, 但差异不显著(白小青等, 2010); 人类男性甲基化水平显著高于女性(Fuke *et al*, 2004)。本研究也发现, 金乌贼甲基化水平和模式的性别差异, 雌性金乌贼肌肉组织 DNA 总甲基化水平显著低于雄性, 心脏和胰脏组织 DNA 总甲基化水平却显著高于雄性。推测金乌贼的 DNA 甲基化水平可能受发育阶段、取样部位等多种因素共同作用, 从而造成不同组织的总甲基化水平在雌雄中的高低不相同。

### 3.3 组织间的甲基化差异分析

同一个体不同组织间存在基因组甲基化水平的

差异是生物界普遍存在的现象, 且组织 DNA 的甲基化程度与基因的功能关系密切。李金龙等(2014)对北京油鸡的研究显示, 肌肉甲基化程度与体重呈显著负相关, 体重越高, 肌肉组织的甲基化程度越低, 其推测可能与 DNA 甲基化参与体重相关基因的表达和物种特异性有关。本研究显示, 金乌贼不同组织间总甲基化水平变化差异达 15.73%, 且雌雄个体总甲基化水平最高的组织均是肌肉。生长期肌肉的主要功能是增加体重和增强运动, 肌肉组织中的基因组 DNA 甲基化水平较高, 则会导致相关基因的表达量较低。生长期金乌贼各组织的 DNA 甲基化水平与该阶段相应组织的生理功能是否存在相关性? 这一问题还有待于进一步研究探讨。

在总甲基化水平上, 除肌肉与性腺组织外, 金乌贼其他组织间差异均不显著( $P>0.05$ )。表明基因表达调控、性状分化等过程不仅有 DNA 甲基化参与, 这些过程还受多种其他调控机制的作用, 如 RNA 干扰、

组蛋白修饰等。并非全部组织特异性表达的基因都与甲基化有关(Song *et al.*, 2005; 姜群等, 2014)。

## 参 考 文 献

- Bai XQ, Wang JY, Chen Y, *et al.* Study on the difference of DNA methylation levels in Rongchang piglets. *Chinese Journal of Animal Science*, 2010, 46(13): 12–13 [白小青, 王金勇, 陈英, 等. 荣昌猪仔猪性别间 DNA 甲基化水平的差异研究. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(13): 12–13]
- Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, *et al.* Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning. *Biokhimiia*, 1967, 32(5): 988–993
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 2002, 16(1): 6–21
- Cao ZM, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(6): 2011–2016 [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2011–2016]
- De BL, Riedel L, Schmitt I, *et al.* DNA methylation levels of  $\alpha$ -synuclein intron 1 in the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 2015, 36(12): 3334.e7
- Dong ZZ. The biology of world ocean economic cephalopod. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1991, 197–207 [董正之. 世界大洋经济头足类生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 197–207]
- Du Y, He YY, Li J, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of wild and “Huanghai No.1” *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 536–543 [杜盈, 何玉英, 李健, 等. 野生和“黄海1号”中国明对虾不同组织基因组 DNA 的 MSAP 分析. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 536–543]
- Eva DF, Camino G, Sheila CM, *et al.* The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 62
- Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, *et al.* Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: An HPLC-based study. *Annals of Human Genetics*, 2004, 68(3): 196–204
- Gao S, Yang AF, Dong Y, *et al.* Analysis of DNA methylation in the body wall of sea cucumber *Apostichopus japonicus* with skin ulceration by the methylation-sensitive amplified polymorphism MSAP. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 637–642 [高杉, 杨爱馥, 董颖, 等. 仿刺参“化皮病”体壁组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 637–642]
- Golbus J, Palella TD, Richardson BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *European Journal of Immunology*, 1990, 20(8): 1869–1872
- Guo TT, Sun GH, Yang JM, *et al.* MSAP analysis of genome DNA methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 77–82 [郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 77–82]
- Hao ZL, Zhang XM, Zhang PD. Biological characteristics and multiplication techniques of *Sepia esculenta*. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(4): 601–606 [郝振林, 张秀梅, 张沛东. 金乌贼的生物学特性及增殖技术. *生物学杂志*, 2007, 26(4): 601–606]
- Hata K, Okano M, Lei H, *et al.* Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 2002, 129(8): 1983–1993
- Jiang Q, Li Q, Yu H, *et al.* Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes & Genomics*, 2013, 35(5): 641–647
- Jiang Q, Yu H, Kong LF, *et al.* Analysis of DNA methylation in different tissues of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with the fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 676–683 [姜群, 于红, 孔令锋, 等. 太平洋牡蛎不同组织 DNA 甲基化的 F-MSAP 分析. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 676–683]
- Jiang Q. DNA methylation studies on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [姜群. 长牡蛎 DNA 甲基化研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- Li JL, Tang SQ, Zhao M, *et al.* Detection of DNA methylation in whole genomes of muscle and ovary tissues of Beijing You chicken. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(11): 1784–1792 [李金龙, 唐韶青, 赵萌, 等. 北京油鸡肌肉和卵巢组织基因组 DNA 甲基化状态检测与分析. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(11): 1784–1792]
- Li SP, He F, Wen HS, *et al.* Analysis of DNA methylation levels by methylation-sensitive amplification polymorphism in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* subjected to salinity stress. *Annual Meeting of Chinese Society of Fisheries*, 2015 [李思平, 何峰, 温海深, 等. 低盐胁迫下半滑舌鳎不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. 中国水产学会学术年会, 2015]
- Li Y, Qian WQ. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29(3): 302–309 [李艳, 钱伟强. 植物中 DNA 甲基化及去甲基化研究进展. *生命科学*, 2017, 29(3): 302–309]
- Li YF, Wang N, Bai JW, *et al.* In vivo DNA methylation levels of *Rana chensinensis* in gold mining area. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(5): 956–963 [李雅芳, 王宁, 柏建雯, 等. 金矿区中国林蛙体内 DNA 甲基化水平. *生态毒理学报*, 2014, 9(5): 956–963]
- Liu CL, Ruan FT, Qin B, *et al.* Analysis and evaluation of



- nutritive composition of the muscle of wild adult *Sepia esculenta*. Marine Sciences, 2016, 40(8): 42–48 [刘长琳, 阮飞腾, 秦搏, 等. 野生金乌贼成体肌肉的营养成分分析及评价. 海洋科学, 2016, 40(8): 42–48]
- Liu CL, Zhuang ZM, Chen SQ, *et al.* Study on the brood stock domestication and propagation characteristics of *Sepia esculenta* Hoyle. Fishery Modernization, 2009, 36(2): 34–37 [刘长琳, 庄志猛, 陈四清, 等. 金乌贼亲体驯养与繁殖特性研究. 渔业现代化, 2009, 36(2): 34–37]
- Luo SJ, Deng YW, Zheng ZH, *et al.* Analysis of genomic DNA methylation on different regions of mantle tissue from *Pinctada martensii* by methylation-sensitive amplification polymorphism. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1227–1235 [罗少杰, 邓文, 郑哲, 等. 马氏珠母贝外套膜不同区域基因组 DNA 甲基化 MSAP 分析. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1227–1235]
- Lv J, Hou R, Li N, *et al.* Application of MSAP technique for investigation of genome-wide DNA methylation level in scallops. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2013, 43(10): 48–53 [吕佳, 侯睿, 李宁, 等. 应用 MSAP 技术研究扇贝全基因组 DNA 甲基化水平. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(10): 48–53]
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: Evidence for X inactivation by DNA methylation. Science, 1981, 211(4480): 393–396
- Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, *et al.* Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. Nature Neuroscience, 2015, 18(5): 690–697
- Pablo GF, Danie GS, Eduardo A, *et al.* Epigenetic DNA methylation mediating *Octopus vulgaris* early development: Effect of essential fatty acids enriched diet. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 292
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. Nature, 2002, 416(6880): 552–556
- Shang HW, Liu ZG, Zhu HP, *et al.* Analysis of DNA methylation difference between “Mohe” hybrid tilapia and its parents. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(11): 1699–1709 [尚慧文, 刘志刚, 朱华平, 等. 莫荷罗非鱼“广福 1 号”与其亲本间 DNA 甲基化的差异分析. 水产学报, 2017, 41(11): 1699–1709]
- Song F, Smith JF, Kimura MT, *et al.* Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2005, 102(9): 3336–3341
- Tang SQ, Zhang Y, Xu Q, *et al.* Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4): 507–510 [唐绍青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 507–510]
- Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J, *et al.* The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. FEBS Letters, 1982, 146(1): 148–152
- Wang YL. DNA methylation in the sexual stage of *Cordyceps militaris* and functions of DNA methyltransferases in *Metarhizium robertsii*. Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2016 [王玉龙. 蛹虫草有性阶段 DNA 甲基化及绿僵菌 DNA 甲基转移酶功能研究. 安徽农业大学博士研究生学位论文, 2016]
- Wei GH, Cao ZM, Ding WD, *et al.* Effects of light application time on genomic DNA methylation of different tissues in rice field eel (*Monopterus albus*) by MSAP analysis. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(6): 101–107 [魏国华, 曹哲明, 丁炜东, 等. 不同光照周期下黄鳝不同组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 华中农业大学学报, 2015, 34(6): 101–107]
- Wei SF, Zhang AH. Research progress on DNA hypomethylation and its relationship with tumor. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2016, 28(3): 243–245 [魏绍峰, 张爱华. DNA 低甲基化及其与肿瘤关系的研究进展. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(3): 243–245]
- Wu B, Yang AG, Dong YH, *et al.* MSAP analysis on genome-wide DNA methylation in selected and wild Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 976–982 [吴彪, 杨爱国, 董迎辉, 等. 虾夷扇贝选育群体与野生群体基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 976–982]
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Molecular & General Genetics Mgg, 1999, 261(3): 439–446
- Xu M, Li X, Korban SS. AFLP-based detection of DNA methylation. Plant Molecular Biology Report, 2000, 18(4): 361–368
- Yang C, Chu WH, Lu X, *et al.* Comparison the methods using to detect genome-wide DNA methylation of Antler stem cell. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(1): 97–101 [杨春, 褚文辉, 路晓, 等. 鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化的检测方法. 吉林农业大学学报, 2016, 38(1): 97–101]
- Yao GL, Yun YG, Qin L, *et al.* Analysis of DNA methylation in tissues and development stages of pearl oyster *Pinctada fucata*. Genes & Genomics, 2015, 37: 263–270
- Yi SV, Goodisman MAD. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. Epigenetics, 2009, 4(8): 551–556
- Zhang H, Zhang X, Clark E, *et al.* TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. Cell Research, 2010, 20(12): 1390–1393
- Zhang JY. Study of the difference on DNA methylation of Putian black pig. Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 [张金耀. 莆田黑猪 DNA 甲基化

差异研究. 福建农林大学硕士研究生学位论文, 2016]  
Zhang X, Li Q, Yu H, *et al.* Effects of air exposure on genomic DNA methylation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 690–697 [张鑫, 李琪, 于红, 等. 干露胁迫对长牡蛎基因组 DNA 甲基化的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 690–697]

Zuo ZL, Tan J, Wu B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of *Apostichopus japonicus* and white *A. japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 93–100 [左之良, 谭杰, 吴彪, 等. 普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 93–100]

(编辑 冯小花)

## DNA Methylation Level and Pattern in Growing *Sepia esculenta* Hoyle

HE Muchun<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jinyong<sup>2,3,4</sup>, LIU Changlin<sup>2</sup>, XIANG Zilong<sup>2,3,5</sup>,  
LIU Shufang<sup>2,3①</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>2</sup>, XUE Tongming<sup>6</sup>

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316003; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 5. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 6. Qingdao Jinshatan Aquatic Product Development Co., Ltd., Qingdao 266000)

**Abstract** DNA methylation plays an important role in regulating gene expression, cell aging and trait differentiation. In order to investigate the differences of DNA methylation level and pattern in different genders and tissues of *Sepia esculenta* Hoyle, we applied Fluorescence-labeled Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (F-MSAP) technology and analyzed the level and pattern of methylation of genomic DNA in the muscle, the heart, the pancreas and the gonad of female and male *S. esculenta*. The total methylation rate of *S. esculenta* in the growing stage was 23.97%~39.70%, which was at a high level in aquatic invertebrates. Among the female and male's four tissues, the total methylation level in muscle was the highest, which may be related to the phenomenon of allometric growth and the preferential development of the muscle during the growing state. Moreover, both the methylation levels and patterns of *S. esculenta* were different in gender, the total methylation level of DNA in the muscle tissue of the female *S. esculenta* was significantly lower than that of the male, but that in the heart and pancreas tissue was significantly higher than that in the male. In addition, we also found that the fully methylation level in the muscle of female *S. esculenta* was the largest contributor to the total methylation level and was consistent with the level of total methylation in the other tissues of female *S. esculenta* and in the four tissues of male *S. esculenta*. The results showed that the level and pattern of DNA methylation of *S. esculenta* had gender and tissue differences. This study can provide basic data for epigenetic regulation of the life processes such as the growth, differentiation, and death of *S. esculenta*.

**Key words** *Sepia esculenta* Hoyle; Growing stage; DNA methylation; F-MSAP; Tissue differences; Gender differences

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170529001

http://www.yykxjz.cn/

闫春为, 陈乃松, 李自强, 连雪原, 王孟乐. 大黄鱼幼鱼饲料中大豆磷脂油与菜籽油的适宜配比. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 56-65

Yan CW, Chen NS, Li ZQ, Lian XY, Wang ML. Suitable ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil in the diet of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 56-65

# 大黄鱼幼鱼饲料中大豆磷脂油 与菜籽油的适宜配比\*



闫春为<sup>1</sup> 陈乃松<sup>1,2,3①</sup> 李自强<sup>1</sup> 连雪原<sup>1</sup> 王孟乐<sup>1</sup>

(1. 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 上海 201306; 2. 水产科学国家级  
实验教学示范中心 上海 201306; 3. 上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306)

**摘要** 配制浓缩大豆磷脂油与精制菜籽油的添加比例分别为 0:6、2:4、4:2 和 6:0 的 4 种等氮、等能和等脂的饲料(P0R6、P2R4、P4R2 和 P6R0), 在海水浮式网箱中, 养殖初始体重为(20.84±0.05) g 的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)幼鱼 51 d, 每个处理组设 3 个重复, 每个重复 40 尾鱼。通过评定 2 种油脂的不同配比对大黄鱼幼鱼的生长、体组成和脂肪酸组成的影响, 以得出大黄鱼幼鱼饲料中大豆磷脂油与菜籽油的适宜配比。结果显示, 各组实验鱼的存活率均高于 91%, 且无显著差异( $P>0.05$ )。P2R4 组实验鱼的特定生长率显著高于 P4R2 和 P6R0 组( $P<0.05$ )。P2R4 组实验鱼的蛋白质沉积率和脂肪沉积率显著高于 P0R6 和 P6R0 组( $P<0.05$ )。P0R6 和 P2R4 组全鱼的粗脂肪含量显著高于 P4R2 和 P6R0 组( $P<0.05$ )。全鱼和肌肉的脂肪酸组成受实验鱼所摄食饲料的脂肪酸组成的影响。P6R0 饲料显著降低了实验鱼的肝脏脂肪含量和肥满度( $P<0.05$ )。研究表明, 大黄鱼幼鱼饲料中浓缩大豆磷脂油与精制菜籽油的适宜配比为 2:4。

**关键词** 大豆磷脂; 菜籽油; 大黄鱼; 生长; 体组成; 脂肪酸组成

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)04-0056-10

磷脂是所有含磷脂质的总称, 不仅可以为机体提供能量和必需脂肪酸, 还具有特殊的营养生理作用(Tocher *et al*, 2008)。Coutteau 等(1997)研究表明, 适量的磷脂用于水产饲料可以促进稚鱼和早期幼鱼的生长, 并提高其存活率和抗应激能力。饲料中添加适量的磷脂可以促进真鲷(*Pagrosomus major*)和斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)仔鱼以及香鱼(*Plecoglossus altivelis*)幼鱼的生长(Kanazawa *et al*, 1983、1981)。然而, 鱼类对磷脂的需求量具有阶段特异性。一般来说, 稚鱼对磷脂的需求量高达 8%~12%, 幼鱼对磷脂的需

求量为 2%~4%, 成鱼饲料中则不需要额外添加磷脂(Tocher *et al*, 2008)。菜籽油具有产量大、价格低、不饱和脂肪酸含量较其他植物油脂高的特点, 从而可作为替代水产饲料中鱼油的潜在脂肪源。研究表明, 以适量的菜籽油替代鱼油对某些海水鱼的特定生长率和饲料效率均无显著影响(Bell *et al*, 2001; Pettersson *et al*, 2009a,b), 且菜籽油 100%替代饲料中的鱼油对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼的脂肪表现消化率无显著影响(彭墨等, 2015)。但过量替代会显著影响鱼体的脂肪酸组成(易新文等, 2013), 降低鱼肉质

\* 上海市科技兴农重点攻关项目(G20130508)资助 [This work was supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program, China (G20130508)]. 闫春为, E-mail: chunweiyang@163.com

① 通讯作者: 陈乃松, 教授, E-mail: nschen@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-05-29, 收修改稿日期: 2017-06-07

质和营养价值,甚至引起肝脏组织病变(Caballero *et al.*, 2002)和生长性能下降(王骥腾等, 2007)。因此,在鱼类饲料中采用适量的大豆磷脂油和菜籽油相结合,既可以发挥磷脂的营养生理作用,还可以发挥菜籽油替代鱼油的价格优势。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*),俗称黄花鱼,是我国特有的海水养殖经济鱼类。但是,高效生态的大黄鱼专用人工配合饲料尚未开发成功,养殖生产中主要以冰鲜杂鱼为饵料,既浪费资源,又污染环境。因此,进一步开展大黄鱼营养研究对于其配合饲料的研发具有重要意义。目前,磷脂或植物油在大黄鱼饲料中应用的研究还处于起步阶段(Zhao *et al.*, 2013; 易新文等, 2013; 董小敬等, 2015; 李桑等, 2015)。本研究通过生长实验,评估饲料中不同配比的浓缩大豆磷脂油和精制菜籽油对大黄鱼幼鱼生长、体组成和脂肪酸

组成的影响,以期得出大黄鱼幼鱼饲料中大豆磷脂油和菜籽油的适宜配比,从而为经济和高效的大黄鱼人工配合饲料的配制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

实验饲料以鱼粉、虾粉、发酵豆粕和大米蛋白为主要蛋白源,以鱼油和4种混合植物油(配比分别为0:6、2:4、4:2和6:0的浓缩大豆磷脂油和精制菜籽油)为主要脂肪源, $\alpha$ -淀粉为主要糖源配制成粗蛋白水平为51.66%,粗脂肪水平为14.30%的4种等氮、等能和等脂的饲料,命名为P0R6、P2R4、P4R2和P6R0。饲料配方和组分分析见表1。饲料脂肪酸组成见表2。

表1 实验饲料配方及组分分析(干饲料)  
Tab.1 Formulation and proximate analysis of trial diets (Dry diet)

原料 Ingredient	饲料 Diets			
	P0R6	P2R4	P4R2	P6R0
鱼油 Fish oil (%)	3.00	3.00	3.00	3.00
其他固定成分 <sup>1</sup> The other constant ingredient (%)	91.00	91.00	91.00	91.00
浓缩大豆磷脂油 <sup>2</sup> Concentrated soybean phospholipid oil (%)	0	2.00	4.00	6.00
精制菜籽油 <sup>3</sup> Refined rapeseed oil (%)	6.00	4.00	2.00	0
组分分析 Proximate analysis				
粗蛋白质 Crude protein (%)	51.93	51.94	51.33	51.42
粗脂肪 Crude lipid (%)	14.35	14.41	14.20	14.25
总能 Gross energy (MJ/kg)	20.26	20.18	19.57	19.70

注: 1: 其他固定成分(%干饲料): 红鱼粉, 35.00; 白鱼粉, 10.00; 虾粉, 3.00; 发酵豆粕, 9.00; 大米蛋白, 9.00; 谷朊粉, 3.00; 血粉, 3.00; 鱿鱼膏, 2.00;  $\alpha$ -淀粉, 7.50; 牛磺酸, 0.30; 酵母粉, 3.00; 酵母提取物, 0.50;  $\text{CaH}_2\text{PO}_4$ , 3.00; 沸石粉, 0.50; 蛋氨酸, 0.20; 多维多矿\*, 2.00

2: 浓缩大豆磷脂油(丙酮不溶物为60%, 食品级)购于安庆市中创磷脂工程技术有限公司

3: 精制菜籽油购于超市

\*多维多矿(IU或mg/kg干饲料): 维生素A, 16000 IU; 维生素D<sub>3</sub>, 8000 IU; 维生素K<sub>3</sub>, 14.70; 维生素B<sub>1</sub>, 17.80; 维生素B<sub>2</sub>, 48.00; 维生素B<sub>6</sub>, 29.52; 维生素B<sub>12</sub>, 0.24; 维生素E, 160.00; 维生素C, 800; 烟酰胺, 79.20; 泛酸钙, 73.60; 叶酸, 6.40; 生物素, 0.64; 肌醇, 320.00; 氯化胆碱, 1500.00; L-肉碱, 100.00; 铜( $\text{CuSO}_4$ ), 2.00; 锌( $\text{ZnSO}_4$ ), 34.40; 锰( $\text{MnSO}_4$ ), 6.20; 铁( $\text{FeSO}_4$ ), 21.10; 碘[ $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$ ], 1.63; 硒( $\text{NaSeO}_3$ ), 0.18; 钴( $\text{CoC}_{12}$ ), 0.24; 镁( $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 52.70

Note: 1: The other constant ingredient (% dry diet): Brown fish meal, 35.00; White fish meal, 10.00; Shrimp meal, 3.00; Fermented soybean meal, 9.00; Rice protein concentrate, 9.00; Wheat gluten meal, 3.00; Spray-dried blood cell meal, 3.00; Squid viscera meal, 2.00;  $\alpha$ -starch, 7.50; Taurine, 0.30; Brewer's yeast meal, 3.00; Yeast extract, 0.50; Calcium biphosphate, 3.00; Zeolite powder, 0.50; Met., 0.20; Vitamin premix and mineral premix\*, 2.00

2: Concentrated soybean phospholipid oil (60% acetone insolubility contained, food grade), purchased from Anqing Zhongchuang Lecithin Engineering Co., Ltd

3: Refined rapeseed oil was purchased from supermarket

\* Vitamin premix and mineral premix (IU or mg/kg dry diet): Vitamin A, 16000 IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 8000 IU; Vitamin K<sub>3</sub>, 14.70; Vitamin B<sub>1</sub>, 17.80; Vitamin B<sub>2</sub>, 48.00; Vitamin B<sub>6</sub>, 29.52; Vitamin B<sub>12</sub>, 0.24; Vitamin E, 160.00; Vitamin C, 800; Niacinamide, 79.20; Calcium-pantothenate, 73.60; Folic acid, 6.40; Biotin, 0.64; Inositol, 320.00; Choline chloride, 1500.00; L-carnitine, 100.00; Cu ( $\text{CuSO}_4$ ), 2.00; Zn ( $\text{ZnSO}_4$ ), 34.40; Mn ( $\text{MnSO}_4$ ), 6.20; Fe ( $\text{FeSO}_4$ ), 21.10; I [ $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$ ], 1.63; Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), 0.18; Co ( $\text{CoC}_{12}$ ), 0.24; Mg ( $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 52.70

表2 大黄鱼幼鱼饲料脂肪酸组成(%总脂肪酸)

Tab.2 Fatty acid composition of the diets for juvenile large yellow croaker (% total fatty acids)

脂肪酸组成 Fatty acid composition	饲料 Diets			
	P0R6	P2R4	P4R2	P6R0
C14:0	2.86	3.22	3.61	4.01
C16:0	14.02	14.74	15.44	16.07
C18:0	4.27	4.95	5.59	6.19
SFAs	21.16	22.90	24.64	26.27
C16:1	5.41	6.07	6.60	7.21
C18:1	36.85	32.70	29.48	26.43
C20:1	1.63	1.65	1.68	1.75
MUFAs	43.89	40.43	37.76	35.40
18:2n-6(LA)	13.30	15.01	16.83	17.50
20:4n-6(ARA)	0.88	0.84	0.80	0.77
n-6PUFAs	14.18	15.85	17.63	18.27
18:3n-3(LNA)	4.33	4.11	3.91	3.70
20:5n-3(EPA)	5.03	4.95	5.06	4.95
22:6n-3(DHA)	6.90	6.87	6.97	7.01
n-3PUFAs	16.27	15.93	15.94	15.66
n-3/n-6PUFAs	1.15	1.01	0.90	0.85
LNA/LA	0.33	0.27	0.23	0.21

注: 含量较小的脂肪酸, 如 C14:0, C15:0, 16:2n6, C17:00, 17:1n7, 22:5n3 和 22:1n9, 未列入表中。SFAs(饱和脂肪酸)包含 C14:0, C16:0 和 C18:0; MUFAs(总单不饱和脂肪)包含 C16:1, C18:1 和 C20:1; n-6PUFAs(总 n-6 多不饱和脂肪酸)包含 18:2-6 和 20:4-6; n-3PUFAs(总 n-3 多不饱和脂肪酸)包含 18:3-3, 20:5-3 和 22:6-3; LA: 亚油酸; ARA: 花生四烯酸; LNA 亚麻酸; EPA: 二十碳五烯酸; DHA: 二十二碳六烯酸

Note: Some fatty acids, of which the contents were minor, trace amount or not detected, such as C14:0, C15:0, 16:2n6, C17:00, 17:1n7, 22:5n3 and 22:1n9, were not listed in the table. SFAs (total saturated fatty acids) contain C14:0, C16:0 and C18:0; MUFAs (total monounsaturated fatty acid) contain C16:1, C18:1 and C20:1; n-6PUFAs (total n-6 polyunsaturated fatty acids) contain 18:2-6 and 20:4-6; n-3PUFAs (total n-3 polyunsaturated fatty acids) contain 18:3-3, 20:5-3 and 22:6-3; LA: Linoleic acid; ARA: Arachidonic acid; LNA: Linolenic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid

实验饲料的制作: 原料经粉碎机粉碎后, 过 80 目标准筛充分混匀, 加入鱼油和混合植物油再次混匀, 最后加入适量水混匀后, 用制粒机制成直径为 2 mm, 长约 5 mm 的颗粒; 颗粒饲料置于 105℃烘箱中熟化 15 min 后, 55℃烘干, -20℃密封保存备用。

## 1.2 实验鱼与养殖管理

实验鱼于 2015 年 8 月购自上海农好饲料有限公司宁德大黄鱼养殖合作社, 为当年春季繁殖的同一批鱼苗。在正式养殖实验前, 将鱼苗置于网箱中暂养 7 d, 期间用上海农好饲料有限公司生产的大黄鱼专用商业饲料(粗蛋白含量为 47%, 粗脂肪含量为 9.5%)驯化。

养殖实验在福建省宁德市城澳村近海养殖区的海水浮式网箱(为上海农好养殖合作社所有)中进行。暂养后的大黄鱼幼鱼, 经 24 h 禁食, 从中挑选体格健壮, 规格一致的个体进行分组和称重。按 4 种饲料处

理, 每个处理组设 3 个重复, 随机放入 12 个实验网箱(长、宽和深为 1.0 m × 0.8 m × 1.5 m), 每个网箱放养 40 尾初始体重为(20.84±0.05) g 的实验鱼。实验期间, 采取表观饱食投喂, 每天投喂 2 次(05:30, 16:00)。每天巡视实验网箱, 发现死亡幼鱼及时捞出, 称重并记录。实验期间, 海区的水温为 23.0℃~26.8℃, 盐度为 29~31。养殖实验持续了 51 d。

## 1.3 样品的采集及生化指标测定

**1.3.1 样品采集** 养殖实验开始时, 随机取 10 尾鱼于-20℃保存, 用于初始样本的体组成分析。养殖实验结束时, 实验鱼经 24 h 的饥饿, 采用丁香酚麻醉后, 统计各网箱中鱼尾数及总质量。从中随机抽取 15 尾鱼, 其中, 5 尾置于-80℃保存, 用于体组成的分析, 其余 10 尾被用作测定体型, 解剖。解剖的内脏和肝脏, 称重后于-80℃保存, 用于内脏组成分析。

另取侧线上方背部肌肉于-80℃保存,用于肌肉体组成分析。

**1.3.2 饲料与鱼体组成的分析** 饲料、全鱼、肌肉和内脏的分析方法:水分采用105℃恒温烘干失重法;粗灰分采用马弗炉(上海实验仪器公司)于550℃下灼烧法测定;粗蛋白质采用凯氏定氮仪(Kjeltec 2200, FOSS, 丹麦)测定;粗脂肪采用氯仿-甲醇法(Lee *et al.*, 1996)测定;饲料总能采用氧弹仪(6200, Parr, 美国)测定。

**1.3.3 脂肪酸测定** 饲料、全鱼、肌肉和肝脏的脂肪酸组成分析采用Wen等(2013)的三氟化硼甲酯酯化法,样品经气相色谱仪(Agilent-7890A型,美国)联合质谱仪(Agilent-5975C, 美国)分析处理。根据37种脂肪酸甲酯混标(Sigma, 47885-U)的分析图谱和保留时间,对样品的每1个色谱峰的质谱图进行标准质谱库(NIST 11版)检索,对样品中的脂肪酸进行定性,按峰面积计算出各脂肪酸相对含量。

#### 1.4 计算及统计分析方法

存活率(Survival rate, SR, %) =  $100 \times \frac{\text{初始尾数}}{\text{终末尾数}}$

特定增长率(Specific growth rate, SGR, %/d) =  $100 \times \frac{\ln(\text{终末体重}) - \ln(\text{初始体重})}{\text{实验天数}}$

增重率(Weight gain rate, WGR, %) =  $100 \times \frac{\text{终末体重} - \text{初始体重}}{\text{初始体重}}$

摄食量(Feed intake, FI, g/fish/d) =  $\frac{\text{总干物质摄食量}}{[\text{实验天数} \times (\text{初始尾数} + \text{终末尾数})/2]}$

饲料效率(Feed efficiency ratio, FER) =  $\frac{\text{鱼体增重(湿重)}}{\text{总干物质摄食量}}$

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER) =  $\frac{\text{终末体重} - \text{初始体重}}{\text{蛋白质摄入量}}$

蛋白质沉积率(Protein deposition rate, PDR, %) =  $100 \times \frac{\text{鱼体蛋白质贮存量}}{\text{蛋白质摄入量}}$

脂肪沉积率(Lipid deposition rate, LDR, %) =  $100 \times \frac{\text{鱼体脂肪贮存量}}{\text{脂肪摄入量}}$

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %) =  $100 \times \frac{\text{肝脏重}}{\text{鱼体重}}$

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %) =  $100 \times \frac{\text{内脏重}}{\text{鱼体重}}$

肥满度(Condition factor, CF) =  $100 \times \frac{\text{鱼体重(g)}}{\text{鱼体长(cm)}^3}$

实验数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用SPSS17.0软件对各组数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),用Duncan法进行多重差异显著

性比较, $P < 0.05$ 为显著水平。采用Excel 2010绘制数据图像。

## 2 结果

### 2.1 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼的生长和营养素利用的影响

从表3可以看出,随着饲料中磷脂油和菜籽油配比的升高,大黄鱼幼鱼的SR呈升高趋势,但各组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。P2R4组的生长状况最佳,其SGR和WGR分别达到1.69%和142.00%,显著高于P4R2和P6R0组( $P < 0.05$ )。P6R0组的实验鱼在FI和FER中最低( $P < 0.05$ )。P2R4饲料显著提高了实验鱼的PER和LDR( $P < 0.05$ )。

### 2.2 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼体组成和脂肪酸组成的影响

从图1A可以看出,饲料中大豆磷脂油和菜籽油的配比对全鱼和肌肉中的粗蛋白含量无显著影响( $P > 0.05$ ),但P0R6组饲料显著增加了实验鱼内脏的粗蛋白含量( $P < 0.05$ )。从图1B可以看出,饲料中大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼粗脂肪含量有显著影响( $P < 0.05$ ),高配比的磷脂油和菜籽油(P4R2和P6R0组)显著降低了全鱼和肌肉的粗脂肪含量( $P < 0.05$ );P6R0组内脏中粗脂肪的含量显著低于其他各组( $P < 0.05$ )。从图1C可以看出,随着饲料中磷脂油和菜籽油配比的升高,全鱼中的水分含量无显著差异( $P > 0.05$ ),肌肉和内脏的水分含量显著升高( $P < 0.05$ )。饲料中磷脂油和菜籽油的配比对全鱼、肌肉和内脏中的灰分含量无显著影响( $P > 0.05$ ) (图1D)。

从表4可以看出,随着饲料中磷脂油和菜籽油配比的升高,全鱼和肌肉的脂肪酸组成中SFA和n-6PUFAs的比例显著升高( $P < 0.05$ ),MUFA和n-3PUFAs的比例显著降低( $P < 0.05$ )。全鱼和肌肉中的EPA和DHA的比例随着饲料中磷脂油和菜籽油配比的升高而下降( $P < 0.05$ )。

### 2.3 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼的HSI、VSI、肝脏脂肪含量和CF的影响

从图2可以看出,随着饲料中磷脂油和菜籽油配比的升高,实验鱼的HSI、VSI、肝脏脂肪含量和CF均由升高转为降低趋势。实验鱼的HSI和VSI受饲料中磷脂油和菜籽油配比影响不显著( $P > 0.05$ ) (图2A、图2B)。P6R0饲料显著降低了实验鱼的肝脏脂肪含量和CF( $P < 0.05$ ) (图2C、图2D)。

表3 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼的生长和营养素利用的影响

Tab.3 Effects of the ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil on growth performance and nutrient utilization of test fish

指标 Indies	饲料 Diets			
	P0R6	P2R4	P4R2	P6R0
初始体重 Initial body weight (g)	20.88±0.31	20.83±0.22	20.71±0.56	20.92±0.38
终末体重 Final body weight (g)	45.07±0.85 <sup>ab</sup>	50.33±3.14 <sup>a</sup>	42.93±2.29 <sup>b</sup>	41.30±1.29 <sup>b</sup>
存活率 Survival rate (%)	91.67±3.63	94.17±2.21	93.33±3.00	95.83±0.84
特定增长率 Specific growth rate (%/d)	1.48±0.03 <sup>ab</sup>	1.69±0.22 <sup>a</sup>	1.40±0.05 <sup>b</sup>	1.31±0.34 <sup>b</sup>
增重率 Weight gain rate (%)	116.00±2.88 <sup>ab</sup>	142.00±16.50 <sup>a</sup>	107.33±3.83 <sup>b</sup>	97.67±3.83 <sup>b</sup>
摄食量 Feed intake (g/fish/d)	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.50±0.02 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>ab</sup>	0.44±0.01 <sup>b</sup>
饲料效率 Feed efficiency ratio	0.96±0.07 <sup>ab</sup>	1.13±0.09 <sup>a</sup>	0.95±0.04 <sup>ab</sup>	0.88±0.03 <sup>b</sup>
蛋白质效率 Protein efficiency ratio	1.65±0.02	2.02±0.20	1.68±0.12	1.63±0.06
蛋白质沉积率 Protein deposition rate (%)	26.56±1.05 <sup>b</sup>	32.59±2.67 <sup>a</sup>	27.41±1.65 <sup>ab</sup>	26.34±0.59 <sup>b</sup>
脂肪沉积率 Lipid deposition rate (%)	50.48±3.12 <sup>b</sup>	74.47±6.21 <sup>a</sup>	49.29±5.09 <sup>b</sup>	50.48±3.12 <sup>b</sup>

注：同行数值带有不同上标字母表示差异显著( $P<0.05$ )，下同

Notes: Horizontal column values with different below superscripts indicate significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

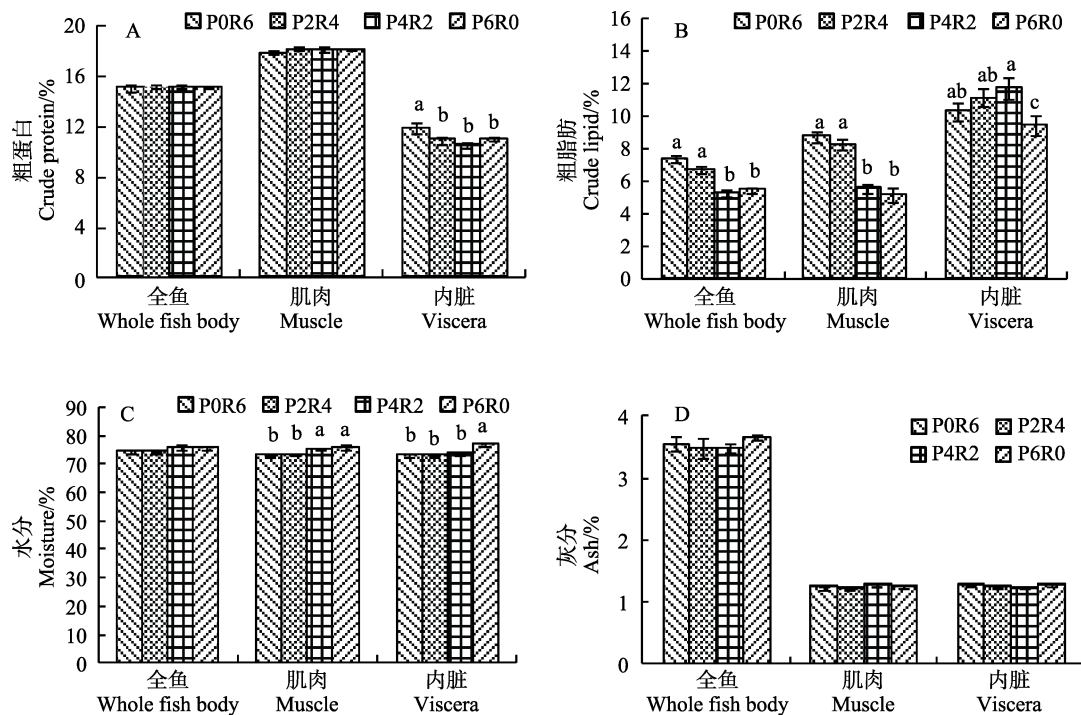


图1 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼的体组成的影响

Fig.1 Effects of the ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil on body composition of test fish

### 3 讨论

#### 3.1 饲料中大豆磷脂油和菜籽油的配比对生长和饲料利用的影响

本研究显示，各处理组间的SR无显著性差异，但当浓缩大豆磷脂油和菜籽油的配比高于2:4时，实验鱼的WGR、SGR和FER显著降低。根据WGR、SGR和FER得出，大黄鱼幼鱼饲料中浓缩大豆磷脂

油和菜籽油的适宜配比为2:4。Carmona-Antoñanzas等(2015)研究表明，稚鱼肠道细胞合成的内源性磷脂不足，饲料中须添加适量的磷脂以维持稚鱼的正常生长发育。随着鱼的生长发育，其合成的内源性磷脂逐渐满足自身需求，而对饲料中磷脂的需求量逐渐降低。冯硕恒等(2014)研究表明，随着饲料中大豆磷脂的添加量由0上升到12.00%，大黄鱼稚鱼(初始体重为3.86 mg)的SGR显著升高；对于初始体重为7.36 g的大黄鱼幼鱼，随着饲料中大豆磷脂的添加量由0升

表 4 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼全鱼和肌肉脂肪酸组成的影响(%总脂肪酸)

Tab. 4 Effects of the ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil on fatty acid composition of whole body and muscle of test fish (% total fatty acids)

脂肪酸组成 Fatty acid composition	全鱼 Whole fish body				肌肉 Muscle			
	P0R6	P2R4	P4R2	P6R0	P0R6	P2R4	P4R2	P6R0
C14 : 0	2.77±0.01 <sup>c</sup>	2.76±0.05 <sup>c</sup>	2.95±0.04 <sup>a</sup>	3.13±0.05 <sup>a</sup>	2.67±0.05 <sup>b</sup>	2.75±0.06 <sup>b</sup>	3.01±0.02 <sup>a</sup>	3.15±0.09 <sup>a</sup>
C16 : 0	14.99±0.20 <sup>c</sup>	16.21±0.39 <sup>b</sup>	17.34±0.11 <sup>a</sup>	17.21±0.07 <sup>a</sup>	14.67±1.10 <sup>b</sup>	15.13±0.84 <sup>b</sup>	16.19±0.19 <sup>a</sup>	17.01±0.45 <sup>a</sup>
C18 : 0	5.76±0.30 <sup>b</sup>	6.28±0.29 <sup>ab</sup>	6.80±0.27 <sup>a</sup>	7.05±0.42 <sup>a</sup>	5.75±0.18 <sup>b</sup>	6.27±0.32 <sup>ab</sup>	6.10±0.09 <sup>ab</sup>	6.62±0.28 <sup>a</sup>
ΣSFA	23.52±0.10 <sup>c</sup>	25.26±0.33 <sup>b</sup>	27.09±0.19 <sup>a</sup>	27.39±0.31 <sup>a</sup>	23.08±0.92 <sup>b</sup>	24.15±0.66 <sup>b</sup>	25.30±0.26 <sup>a</sup>	26.79±0.08 <sup>a</sup>
C16 : 1	7.54±0.16 <sup>b</sup>	7.40±0.10 <sup>b</sup>	8.05±0.12 <sup>a</sup>	8.39±0.14 <sup>a</sup>	7.60±0.16	7.61±0.16	7.93±0.18	8.20±0.29
C18 : 1	31.70±0.19 <sup>a</sup>	31.09±0.57 <sup>a</sup>	28.86±0.09 <sup>b</sup>	25.13±0.14 <sup>c</sup>	32.81±0.17 <sup>a</sup>	30.86±0.31 <sup>b</sup>	29.42±0.18 <sup>c</sup>	25.36±0.08 <sup>d</sup>
C20 : 1	1.90±0.04 <sup>a</sup>	1.69±0.05 <sup>b</sup>	1.50±0.02 <sup>c</sup>	1.50±0.06 <sup>c</sup>	2.20±0.09 <sup>a</sup>	2.13±0.03 <sup>a</sup>	2.09±0.03 <sup>a</sup>	1.92±0.01 <sup>b</sup>
ΣMUFA	41.14±0.11 <sup>a</sup>	40.18±0.46 <sup>b</sup>	38.40±0.16 <sup>b</sup>	35.02±0.25 <sup>c</sup>	42.62±0.32 <sup>a</sup>	40.60±0.32 <sup>b</sup>	39.44±0.10 <sup>c</sup>	35.48±0.39 <sup>d</sup>
18 : 2n-6(LA)	12.43±0.14 <sup>d</sup>	14.14±0.22 <sup>c</sup>	16.01±0.25 <sup>b</sup>	17.78±0.09 <sup>a</sup>	12.59±0.13 <sup>d</sup>	14.21±0.17 <sup>c</sup>	16.36±0.21 <sup>b</sup>	18.48±0.57 <sup>a</sup>
20 : 4n-6(ARA)	1.04±0.01 <sup>a</sup>	0.93±0.03 <sup>b</sup>	0.84±0.01 <sup>c</sup>	0.90±0.03 <sup>bc</sup>	0.93±0.02 <sup>a</sup>	0.91±0.02 <sup>a</sup>	0.81±0.02 <sup>b</sup>	0.83±0.01 <sup>b</sup>
Σn-6 PUFA	13.47±0.13 <sup>d</sup>	15.08±0.21 <sup>c</sup>	16.86±0.26 <sup>b</sup>	18.68±0.11 <sup>a</sup>	13.52±0.15 <sup>d</sup>	15.12±0.17 <sup>c</sup>	17.17±0.19 <sup>b</sup>	19.31±0.58 <sup>a</sup>
18 : 3n-3(LNA)	4.35±0.09 <sup>a</sup>	3.89±0.10 <sup>b</sup>	2.97±0.02 <sup>c</sup>	3.18±0.04 <sup>c</sup>	3.47±0.07 <sup>a</sup>	3.39±0.07 <sup>a</sup>	2.56±0.01 <sup>b</sup>	2.60±0.03 <sup>b</sup>
20 : 5n-3(EPA)	4.60±0.09 <sup>a</sup>	4.01±0.20 <sup>ab</sup>	3.91±0.05 <sup>b</sup>	4.05±0.10 <sup>ab</sup>	4.02±0.11 <sup>a</sup>	3.83±0.09 <sup>a</sup>	3.65±0.14 <sup>b</sup>	3.72±0.03 <sup>ab</sup>
22 : 6n-3(DHA)	6.94±0.07 <sup>a</sup>	5.92±0.24 <sup>ab</sup>	5.37±0.07 <sup>b</sup>	5.74±0.14 <sup>ab</sup>	7.53±0.14 <sup>a</sup>	7.12±0.12 <sup>a</sup>	6.64±0.23 <sup>b</sup>	6.93±0.04 <sup>ab</sup>
Σn-3 PUFA	15.89±0.15 <sup>a</sup>	13.84±0.55 <sup>ab</sup>	12.25±0.11 <sup>b</sup>	12.97±0.27 <sup>b</sup>	15.03±0.30 <sup>a</sup>	14.34±0.27 <sup>a</sup>	12.86±0.36 <sup>b</sup>	13.26±0.04 <sup>ab</sup>

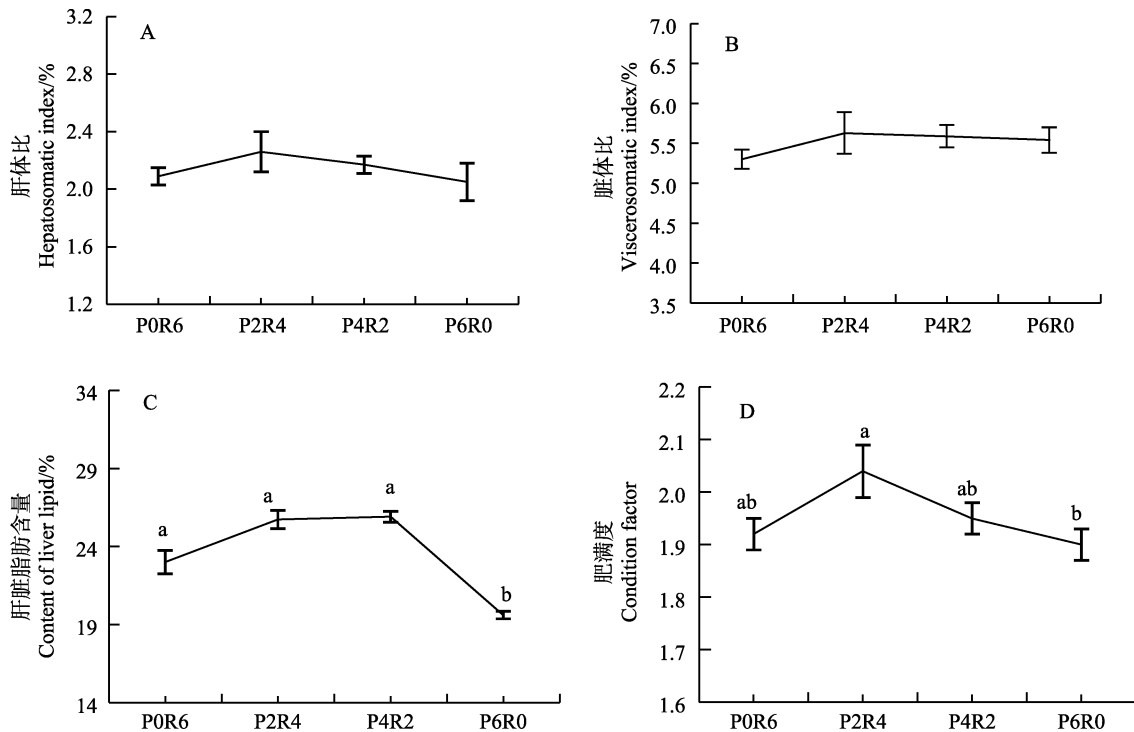


图 2 大豆磷脂油和菜籽油的配比对实验鱼的肝体比、脏体比、肝脏脂肪含量和肥满度的影响

Fig. 2 Effects of the ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil on hepatosomatic index, viscerosomatic index, liver lipid content and condition factor of test fish

高到 8.00%，幼鱼的终末体重和 SGR 差异不显著。本研究中，饲料中浓缩大豆磷脂油的添加量为 4.00%和 6.00%时，实验鱼的生长受到抑制，即饲料中过量的大

豆磷脂油对实验鱼产生了一定的负面影响。这种因饲料中过量的大豆磷脂所产生的负面影响在其他研究中也体现。何流健(2013)根据二次曲线模型得出，斜带



石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (初始体重为 12.96 g)饲料中大豆磷脂油的最适添加量为 2.11%, 而随着饲料中大豆磷脂油的添加量由 2.50%升高至 7.50%, 实验鱼的 WGR、SGR 和 FER 均显著下降。随着饲料中大豆磷脂油的添加量由 1.50%升高至 3.00%, 军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (周萌等, 2007) (初始体重为 22.45 g)的 WGR 呈降低趋势。饲料中过量的大豆卵磷脂还降低了花尾胡椒鲷(*Plectorhinchus cinctus*) (黄周英等, 2005; 陈彦等, 2002)的 SR 及其体内  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶(与鱼体骨骼发育相关)和  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶(与海水鱼调节机体渗透压相关)的活性。目前, 关于磷脂对鱼类生长影响的研究结果不尽一致, 这除了与鱼种类和生长阶段有关外, 还与研究中使用磷脂的种类(组成)和来源有关(艾庆辉等, 2014)。如磷脂酰胆碱在促进鱼类生长方面发挥了主要作用, 磷脂酰肌醇则主要在提高鱼类 SR 和维持机体正常发育方面发挥主要作用(Geurden *et al.*, 1998); 蛋黄卵磷脂促进鱼类生长的效果优于大豆卵磷脂(Azarm *et al.*, 2013)。今后可深入研究不同种类和来源的磷脂对大黄鱼的影响, 以更好地指导磷脂在大黄鱼饲料生产中的应用。

饲料的脂肪酸组成随大豆磷脂油和菜籽油配比的改变而改变, 这是影响实验鱼生长的一个重要因素。左然涛等(2012)研究表明, 在满足大黄鱼幼鱼对 DHA 和 EPA 需求的前提下, 随着饲料中 LNA/LA 由 0.90 降低至 0.05, 大黄鱼幼鱼的生长受到显著抑制。大豆磷脂油富含 LA, 而菜籽油富含 LNA。本研究中, 大豆磷脂油和菜籽油配比的升高导致饲料中 LNA/LA 降低(表 2), 从而对实验鱼的生长产生了不利影响。

此外, Geurden 等(2005)在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究发现, 菜籽油的适口性优于大豆油(大豆磷脂油的主要成分之一)。本研究中, P6R0 组摄食量降低, 生长缓慢, 可能与 P6R0 饲料的适口性较差有一定关系。目前, 关于饲料中不同脂肪源在大黄鱼上的适口性研究还很缺乏, 需进一步的研究。

### 3.2 饲料中大豆磷脂油和菜籽油的配比对鱼体脂肪含量和脂肪酸组成的影响

饲料的脂肪源是影响鱼体生化组成的重要因素。本研究中, 全鱼和肌肉中粗脂肪的含量随饲料中大豆磷脂油和菜籽油配比的升高而显著降低。此结果的产生有两方面的原因。一方面, 饲料中的大豆磷脂油可减少脂肪在鱼体中沉积。冯硕恒(2013)研究表明, 随着饲料中磷脂含量由 1.30%升高至 4.80%, 大黄鱼幼鱼(初始体重为 7.36 g)体内微粒体甘油三酯转运蛋白的表达量显著升高, 肌肉中粗脂肪的含量显著降低。

类似的研究结果在斜带石斑鱼(初始体重为 12.96 g 和 106.52 g)和巴丁鱼(*Pangasias sutchi*) (麻艳群等, 2011) (初始体重为 1.30 g)中也有发现; 另一方面, 饲料中的菜籽油可增加脂肪在鱼体中的沉积。现有研究表明, 菜籽油适量替代饲料中的鱼油可提高大黄鱼全鱼中粗脂肪的含量(易新文等, 2013; 李桑等, 2015)。本研究虽未使用混合植物油替代饲料中的部分鱼油, 但在 4 种饲料中, 鱼油添加量一致的前提下, 高菜籽油组(P0R6 和 P2R4 组)全鱼和肌肉中粗脂肪的含量显著高于低菜籽油组(P4R2 和 P6R0 组), 与已有的研究结果有一定的相似性。

肝脏是脂肪代谢的主要器官, 影响鱼类肝脏中脂肪含量的因素具有多样性和复杂性(杜震宇, 2014)。大豆磷脂对鱼类肝脏脂肪含量的影响, 不同的学者有不同的见解。Kenari 等(2011)认为, 褐鳟(*Salmo trutta*)肝脏中的脂肪含量随饲料中大豆卵磷脂含量的升高而升高。麻艳群等(2011)研究发现, 饲料中适量的大豆磷脂可显著降低巴丁鱼肝脏中脂肪的含量。因此, 饲料中大豆磷脂对鱼类脂肪代谢以及肝脏中脂肪含量的影响也因鱼种类和生长阶段而异。饲料中添加一定量菜籽油, 可以显著增加鱼类肝脏中粗脂肪的含量, 这一结论在大菱鲆(彭墨等, 2015)、北极嘉鱼(*Salvelinus alpinus*) (Pettersson *et al.*, 2009b)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*) (Bell *et al.*, 2001)和金头鲷(*Sparus aurata*) (Fountoulaki *et al.*, 2009b)中均得到证实。本研究结果显示, P0R6、P2R4 和 P4R2 组肝脏中的粗脂肪含量均显著高于 P6R0 组(图 2C), 即饲料中的菜籽油显著增加了大黄鱼幼鱼肝脏中粗脂肪的含量。此外, 这种结果的产生还可能与 P6R0 组的摄食量较低有关(Du *et al.*, 2006)。

已有研究表明, 鱼体的脂肪酸组成可反映饲料的脂肪酸组成(何流健, 2013; 季文娟, 1999)。本研究结果也有类似发现, 鱼体和肌肉中的 SFAs、MUFAs、n-6PUFAs 和 n-3PUFAs 含量的变化趋势与饲料的脂肪酸组成变化趋势相同(表 2 和表 4), 饲料中的植物油对大黄鱼 EPA 和 DHA 合成能力的影响需要进一步的研究。

## 4 结论

通过对大黄鱼生长、饲料效率、体组成和脂肪酸组成进行评估得出, 大黄鱼幼鱼饲料中, 浓缩大豆磷脂油和菜籽油的适宜配比为 2:4(饲料的粗脂肪含量为 14.41%)。研究结果可为配制高效生态的大黄鱼人工配合饲料提供参考。

## 参 考 文 献

- Ai QH, Han B, Mai KS. Advances on phospholipid nutrition of fish. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 129–134 [艾庆辉, 韩冰, 麦康森. 鱼类磷脂营养生理研究进展. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 129–134]
- Azarm HM, Kenari AA, Hedayati M. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture Research*, 2013, 44(4): 634–644
- Bell J, Mcevoy J, Tocher DR, *et al.* Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 2001, 131(5): 1535–1543
- Caballero MJ, Obach A, Rosenlund G, *et al.* Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2002, 214(1–4): 253–271
- Carmona-Antoñanzas G, Taylor JF, Martinezrubio L, *et al.* Molecular mechanism of dietary phospholipid requirement of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1851(11): 1428–1441
- Chen Y, Wang CG, Chen PJ, *et al.* Effect of lecithin on the  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activities of juvenile *Plectorhynchus cinctus*. *Marine Sciences*, 2002, 26(8): 54–57 [陈彦, 王重刚, 陈品健, 等. 卵磷脂对花尾胡椒鲷幼鱼  $Ca^{2+}$ -ATP 酶和  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP 酶活性的影响. *海洋科学*, 2002, 26(8): 54–57]
- Coutteau P, Geurden I, Camara MR. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 1997, 155(1): 149–164
- Dong XJ, Tan P, Mai KS, *et al.* Effects of replacement of fish oil by vegetable oil on hepatic and intestinal histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*) and yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1380–1385 [董小敬, 谭朋, 麦康森, 等. 植物油替代鱼油对虹鳟、花鲈和大黄鱼组织结构的影响. *水产学报*, 2015, 39(9): 1380–1385]
- Du ZY. Causes of fatty liver farmed fish: A review and new perspectives. *Journal of Fish of China*, 2014, 38(9): 1628–1638 [杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考. *水产学报*, 2014, 38(9): 1628–1638]
- Du ZY, Liu YJ, Tian LX, *et al.* The influence of feeding rate on growth, feed efficiency and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture International*, 2006, 14(3): 247–257
- Feng SH. Effects of dietary phospholipids on growth performance and phospholipids metabolism of larval and juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2014, 24–25 [冯硕恒. 大豆磷脂对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)稚鱼和幼鱼生长和磷脂代谢的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 24–25]
- Fountoulaki E, Vasilaki A, Hurtado R, *et al.* Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile: Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating. *Aquaculture*, 2009, 289(3–4): 317–326
- Geurden I, Cuvier A, Gondouin E, *et al.* Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology and Behavior*, 2005, 85(2): 107–114
- Geurden I, Marion D, Charlon N, *et al.* Comparison of different soybean phospholipidic fractions as dietary supplements for common carp, *Cyprinus carpio*, larvae. *Aquaculture*, 1998, 161(1–4): 225–235
- He LJ. Requirement of n-3 highly unsaturated fatty acids and lecithin of different specification of grouper (*Epinephelus coioides*). Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2013, 16 [何流健. 两种规格斜带石斑鱼 n-3 高度不饱和脂肪酸和卵磷脂需要量的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 16]
- Huang ZY, Chen Y, Xie YJ, *et al.* Effects of soy lecithin in diet on growth in young *Plectorhynchus cinctus*. *Journal of Quanzhou Normal College*, 2005, 23(4): 89–93 [黄周英, 陈彦, 谢仰杰, 等. 饲料卵磷脂对花尾胡椒鲷幼鱼生长的影响. *泉州师范学院学报*, 2005, 23(4): 89–93]
- Ji WJ. The influence of different fat sources in feed on the growth rate of juvenile and fatty acid composition of body fat of black sea bream (*Sparus macrocephalus*). *Marine Fisheries Research*, 1999, 20(1): 69–74 [季文娟. 饲料中不同脂肪源对黑鲷幼鱼生长和鱼体脂肪酸组成的影响. *海洋水产研究*, 1999, 20(1): 69–74]
- Kanazawa A, Teshima SI, Inamori S, *et al.* Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 1983, 32: 109–114
- Kanazawa A, Teshima SI, Inamori S, *et al.* Effects of phospholipids on growth, survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 1981, 30: 301–309
- Kenari AA, Sotoudeh E, Rezaei MH. Dietary soybean phosphatidylcholine affects growth performance and lipolytic enzyme activity in Caspian brown trout (*Salmo trutta* Caspius) alevin. *Aquaculture Research*, 2011, 42(5): 655–663
- Lee CM, Trevino B, Chaiyawat M. A simple and rapid solvent extraction method for determining total lipids in fish tissue. *Journal of Aoac International*, 1996, 79(2): 487–492
- Li S, Chen CY, Huang XX, *et al.* Effect of partial replacement of fish oil with vegetable oil on muscle and liver total lipid and fatty acid of larvae *Larimichthys crocea*. *Journal of Shanghai*

- Ocean University, 2015, 24(5): 726–736 [李桑, 陈春燕, 黄旭雄, 等. 植物油部分替代饲料中鱼油对大黄鱼脂肪及脂肪酸的影响. 上海海洋大学学报, 2015, 24(5): 726–736]
- Ma YQ, Huang K, Xiao X, *et al.* Effect of dietary phospholipid level on growth of catfish (*Pangasius sutchi*). *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 383–386 [麻艳群, 黄凯, 肖新, 等. 饲料磷脂水平对巴丁鱼生长的影响. 水产科学, 2011, 30(7): 383–386]
- Peng M, Xu W, Mai KS, *et al.* Growth, fatty acid composition and lipid deposition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed diets with fish oil replacement by rapeseed oil. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 756–765 [彭墨, 徐玮, 麦康森, 等. 菜籽油替代鱼油对大菱鲆幼鱼生长、脂肪酸组成及脂肪沉积的影响. 动物营养学报, 2015, 27(3): 756–765]
- Pettersson A, Johnsson L, Brännäs E, *et al.* Effects of rapeseed oil replacement in fish feed on lipid composition and self-selection by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 2009a, 15(6): 577–586
- Pettersson A, Pickova J, Brännäs E. Effects of crude rapeseed oil on lipid composition in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 2009b, 75(6): 1446–1458
- Tocher DR, Bendiksen EA, Campbell PJ, *et al.* The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 2008, 280(1–4): 21–34
- Wang JT, Han T, Tian LX, *et al.* Impact of three vegetable oil sources on growth, body composition and tissue fatty acid composition of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2007, 26(3): 237–245 [王骥腾, 韩涛, 田丽霞, 等. 3种植物油源对军曹鱼生长、体组成和脂肪酸组成的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2007, 26(3): 237–245]
- Wen W, Huang XX, Chen QK, *et al.* Temperature effects on early development and biochemical dynamics of a marine fish, *Inimicus japonicus*. *Journal of Experimental Marine and Biology Ecology*, 2013, 442: 22–29
- Yi XW, Zhang WB, Mai KS, *et al.* Effects of dietary fish oil replaced with rapeseed oil on the growth, fatty acid composition and skin color of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 751–760 [易新文, 张文兵, 麦康森, 等. 饲料中菜籽油替代鱼油对大黄鱼生长、肌肉脂肪酸组成和体色的影响. 水产学报, 2013, 37(5): 751–760]
- Zhao JZ, Ai QH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary phospholipids on survival, growth, digestive enzymes and stress resistance of large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, larvae. *Aquaculture*, 2013, 410–411(11): 122–128
- Zhou M, Cao JM, Ma L, *et al.* Effect of supplementation of phospholipid oil, choline and L-carnitine in diet on growth and lipid content in tissue of cobia, *Rachycentron canadum*. *Feed Industry*, 2007, 28(10): 23–25 [周萌, 曹俊明, 马利, 等. 饲料中添加磷脂油、胆碱、L-肉碱对军曹鱼生长及组织脂肪含量的影响. 饲料工业, 2007, 28(10): 23–25]
- Zuo RT, Ai QH, Mai KS, *et al.* Dietary ratio of alfa-linolenic to linoleic acid (ALA/LA) affects growth, nonspecific immunity, antioxidant capacity and relate gene expression of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *The National PhD Student Academic Forum*, 2012 [左然涛, 艾庆辉, 麦康森, 等. 饲料亚麻酸与亚油酸比例影响了大黄鱼生长、非特异性免疫、抗氧化能力和相关基因表达. 全国博士研究生学术论坛, 2012]

(编辑 陈严)

## Suitable Ratio of Soybean Phospholipid Oil to Rapeseed Oil in the Diet of Juvenile Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)

YAN Chunwei<sup>1</sup>, CHEN Naisong<sup>1,2,3</sup>①, LI Ziqiang<sup>1</sup>, LIAN Xueyuan<sup>1</sup>, WANG Mengle<sup>1</sup>

(1. Research Center of the Agriculture and Rural Affairs Ministry on Fish Nutrition and Environmental Ecology at Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Demonstration Center on Experiment Teaching of Fisheries Science at Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306)

**Abstract** Four isonitrogenous, isoenergetic, and isolipidic diets with varying ratios (0 : 6, 2 : 4, 4 : 2, and 6 : 0) of concentrated soybean phospholipid oil (P) to refined rapeseed oil (R) (P0R6, P2R4, P4R2, and P6R0) were formulated to determine the suitable ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil in the diet of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Each diet was randomly assigned to triplicate sea floating cages of 40 fish [initial body weight (20.84±0.05) g]. Fish were fed to apparent satiation twice daily (5:30 and 16:00) over 51 d. The results suggested that the survival rates of tested fish were higher than 91%, with no significant differences among treatments ( $P>0.05$ ). The special growth rate was significantly higher with fish fed P2R4, compared with those fed P4R2 and P6R0 ( $P<0.05$ ). Higher lipid and protein deposition rates were found in P2R4-fed fish compared with those fed the other treatments ( $P<0.05$ ). Contents of crude protein in whole body and muscle were not significantly affected by the ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil in diets ( $P>0.05$ ), but were significantly higher in the viscera of P0R6-fed fish compared with the other treatments ( $P<0.05$ ). Concentrations of crude lipid in the whole body of P0R6- and P2R4-fed fish were significantly higher than those in P4R2- and P6R0-fed fish ( $P<0.05$ ). The fatty acid profile of the whole body and muscle was similar to that of the fed diet. The ratio of soybean phospholipid oil to rapeseed oil in diets had no significant effect on hepatosomatic index and viscerosomatic index ( $P>0.05$ ). The P6R0 diet significantly reduced the liver lipid content and condition factor of test fish ( $P<0.05$ ). Under the conditions of this study, the suitable ratio of concentrated soybean phospholipid oil to refined rapeseed oil in the diets of juvenile large yellow croaker was 2 : 4, based on growth performance, body composition, and fatty acid composition.

**Key words** Soybean phospholipid; Rapeseed oil; Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*); Growth; Body composition; Fatty acid composition

① Corresponding author: CHEN Naisong, E-mail: nschen@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170417001

http://www.yykxjz.cn/

谭青, 韩秀杰, 王际英, 李宝山, 李学丽, 郝甜甜, 张利民. n-3/n-6长链多不饱和脂肪酸对大菱鲆幼鱼脂肪沉积、脂肪吸收及代谢相关酶活性和血清生化指标的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 66-73

Tan Q, Han XJ, Wang JY, Li BS, Li XL, Hao TT, Zhang LM. Effects of n-3/n-6 n-3/ n-6 LC-PUFA on fat deposition, digestion, and lipid metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 66-73

# n-3/n-6 长链多不饱和脂肪酸对大菱鲆幼鱼脂肪沉积、脂肪吸收及代谢相关酶活性和血清生化指标的影响\*



谭青<sup>1,2</sup> 韩秀杰<sup>1,2</sup> 王际英<sup>1</sup> 李宝山<sup>1</sup>  
李学丽<sup>1,2</sup> 郝甜甜<sup>1</sup> 张利民<sup>1①</sup>

(1. 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;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 为探讨饲料中不同 n-3/n-6 长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼生长性能及饲料利用、体组成和消化酶的影响,配制了 6 种不同 n-3/n-6 LC-PUFA 比值(29.54, D1 组; 23.04, D2 组; 18.97, D3 组; 9.06, D4 组; 6.86, D5 组; 3.87, D6 组)的实验饲料。以大菱鲆幼鱼[(12.18±0.01)g]为研究对象,在循环水养殖系统中开展了为期 56 d 的养殖实验。结果显示, n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼的成活率(SR)无显著影响( $P>0.05$ ); 增重率(WGR)随着 n-3/n-6 LC-PUFA 的降低呈先上升后下降趋势, D6 组显著低于其他各组( $P<0.05$ ); 脂肪沉积率随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的降低呈下降趋势,且 D6 组达到最小值,为 14.80,显著低于其他各组( $P<0.05$ )。随着饲料中的变化,胰蛋白酶的活性呈先增强后减弱的趋势,且在 D4 组时达到最大值; 脂肪酶活性呈上升趋势。随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化,脂肪酸合成酶活性呈先上升后下降的趋势,最高值为 D4 组,显著高于其他各组( $P<0.05$ ); 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活呈先上升后下降的趋势, D3 组为最大值,显著高于其他各组( $P<0.05$ )。随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的降低,谷草转氨酶呈先上升后下降的趋势; 总蛋白、白蛋白和高密度脂蛋白胆固醇均随着饲料 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化呈先上升后下降的趋势,均在 D5 组时达到最大值。研究表明,饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的比例降低会导致大菱鲆幼鱼的脂肪沉积率降低。

**关键词** 大菱鲆; n-3/n-6 LC-PUFA; 脂肪沉积; 消化酶; 血清生化指标

**中图分类号** S963.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0066-08

饲料脂肪不仅是养殖动物重要的能量来源,还能 为机体提供必需脂肪酸(Essential fatty acid, EFAs)、磷

\* 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(201701002)、山东省重点研发计划(2016GSF115005)和山东省自然科学基金(ZR2015CQ023; 201701002)共同资助[This work was supported by the Marine Bio-Industry Innovation and Development Regional Demonstration Service Platform(201701002), Shandong Province Key Research and Development Program of China (2016GSF115005), and Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (ZR2015CQ023; 201701002)].  
谭青, E-mail: 1242192819@qq.com

① 通讯作者: 张利民, 研究员, E-mail: zhanglimin@126.com

收稿日期: 2017-04-17, 收修改稿日期: 2017-05-27

脂、固醇类和脂溶性维生素以维持生物膜结构和生理功能(Watanabe *et al*, 1982; Sargent *et al*, 2002)。

动物机体内脂肪来源主要有体内合成和饲料摄入。猪体内脂肪主要来源于脂肪酸的合成并且脂肪组织是合成的主要部位;家禽类中鸡脂肪合成主要部位为肝脏,而鸭为脂肪组织(周长海等, 2006);鱼类脂肪合成的主要场所为肝脏,饲料中脂肪直接吸收、肝脏中糖类转化合成以及饲料中过量的蛋白质是鱼类脂肪的主要来源(王爱民, 2011)。葡萄糖代谢会产生甘油和脂肪酸,并通过一系列酶促反应合成甘油三酯(TG),所有能够影响酶的活性或含量等酶促反应的因素都会影响脂肪的生物合成(马晶晶, 2008)。脂肪的分解代谢通常是在激素敏感脂酶的作用下,将脂肪分解成甘油和脂肪酸,之后释放入血液,供组织氧化利用。肌肉与肝脏组织可以吸收和代谢游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA),产生能量供机体利用, TG 也能被肝脏转化成为脂肪酸,并沉积在脂肪组织中(王镜岩等, 2002)。

在水产品养殖过程中,饲料中脂类是能量的主要来源,对机体的脂肪沉积、代谢及消化都有很大的影响作用。而脂类中脂肪酸含量的不同会对脂肪的代谢及消化产生一定的影响,尤其是在海水鱼的养殖过程中,长链不饱和脂肪酸(LC-PUFA)的含量变化也会造成一定的影响。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是典型的底栖性冷水鱼类,原产于欧洲的大西洋北部海域。1992年从英国引进,成为我国海水养殖中的一个重要经济养殖种类。目前,尚无 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆脂肪代谢及脂肪沉积的影响。本研究配制不同比例 n-3/n-6 LC-PUFA 饲料,探究其对大菱鲆脂肪代谢及脂肪沉积的影响,为饲料中适宜的 n-3/n-6 LC-PUFA 提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计与饲料制作

以鱼粉、大豆浓缩蛋白为主要蛋白源,鱼油为主要脂肪源配制基础饲料,在基础饲料中分别添加质量分数为 0、0.5、1.5、4.5、6.5、12.5 g/kg 的花生四烯酸油脂,配成 n-3/n-6 LC-PUFA 为 29.54(D1组)、23.04(D2组)、18.97(D3组)、9.06(D4组)、6.86(D5组)、3.87(D6组)6种等氮等能实验饲料。饲料配方、营养成分组成见表1,鱼油脂肪酸的组成见表2。

鱼粉等饲料原料粉碎过 80 目筛,按配方从小到大逐级定量均匀混合,将鱼油和花生四烯酸油脂用超

声波震荡仪充分混匀后加入提前混匀的粉料,加适量水混匀。经螺旋挤压机加工成直径为 3 mm 左右的饲料颗粒,60℃烘干后,-20℃冰箱保存备用。

### 1.2 饲养管理及样品采集

大菱鲆幼鱼于 2015 年 11 月购自山东蓬莱市宗哲养殖有限公司,实验地点为山东省海洋资源与环境研究院循环水养殖实验室,实验周期为 56 d。实验开始前,大菱鲆幼鱼投喂商品饲料,暂养 14 d 并进行分组,每组随机挑选体质健壮、体格大小一致的大菱鲆幼鱼 35 尾养殖于高为 80 cm、直径为 70 cm、水深为 50 cm 的圆柱塑料养殖桶内,共 18 组,每 3 组使用同一种饲料。每天定时进行饱食投喂 2 次,投喂后 0.5 h 清理残饵并记录残饵量。实验期间,水中溶解氧>5 mg/L,水温为(17±1)℃,盐度为 28~32, pH 为 7.6~8.2,氨氮和亚硝酸≤0.1 mg/L。

实验结束后,停食 24 h。记录每桶鱼的数量并称重,计算成活率、增重率,随机选取 5 尾实验鱼用于全鱼体组成常规分析。剩下 10 尾进行尾静脉取血,4℃离心分离(4000 r/m, 10 min),取上清液,保存于-80℃冰箱中,用于测定血清生理生化指标;取血后的实验鱼分离肝脏和肠道,用于脂肪酶、胰蛋白酶、脂肪酸合成酶及酰基辅酶 A 氧化酶的测定。

### 1.3 样品分析

实验饲料常规成分分析均参照 AOAC(2002)方法进行。

谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、总蛋白(Total protein, TP)、白蛋白(Albumin, ALB)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphate, ALP)、总胆固醇(Cholesterol, TCHO)、甘油三酯(Triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)含量的测定均采用日立自动生化分析仪(7020型, Hitachi, 日本);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose 6-phosphatedehydrogenase, G6PD)、脂肪酸合成酶(Fatty acid synthetase, FAS)、酰基辅酶 A 氧化酶(Acyl-CoA oxidase, ACO)购自上海江莱生物科技有限公司;胰蛋白酶(Trypsin)和脂肪酶(Lipase)均购自南京建成生物工程研究所。

### 1.4 测定指标

成活率(Survival rate, SR, %) =  $S_t / S_0 \times 100$ ;

增重率(Weight gain rate, WGR, %) =  $(W_t - W_0) / W_0 \times 100$ ;

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

原料 Ingredients	组别 Diets					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
鱼油 Fish oil(%)	10.00	9.95	9.85	9.55	9.35	8.75
花生四烯酸油脂 Arachidonic acid oil <sup>a</sup> (%)	0.00	0.05	0.15	0.45	0.65	1.25
维生素预混料 Vitamins premix <sup>b</sup> (%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 Minerals premix <sup>c</sup> (%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
其他 Others <sup>d</sup> (%)	88.00	88.00	88.00	88.00	88.00	88.00
合计 Total(%)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养组成 Proximate analysis						
粗蛋白 Crude protein(%)	48.35	48.49	48.16	47.97	47.89	48.00
粗脂肪 Crude lipid(%)	12.57	12.86	13.18	13.35	12.80	13.04
粗灰分 Crude ash(%)	16.11	15.45	15.32	15.30	15.00	15.11
总能 Gross energy(kJ/g)	19.59	19.86	20.10	20.12	19.96	20.03

a: 花生四烯酸油脂购自嘉必优生物工程(武汉)有限公司, 成分为 51.69% ARA; 6.56% C16:0; 5.59% C18:0; 5.62% C18:1n-9; 9.50% C18:2n-6; 8.02% C24:0

b: 维生素预混料(mg/kg 饲料): 维生素 A 38.0 mg; 维生素 D<sub>3</sub> 13.2 mg; 维生素 K<sub>3</sub> 10.0 mg; 硫胺素 115.0 mg; 核黄素 380.0 mg; 盐酸吡哆醇 88.0 mg; 泛酸 368.0 mg; 烟酸 1030.0 mg; 生物素 10.0 mg; 叶酸 20.0 mg; 维生素 B<sub>12</sub> 1.3 mg; 肌醇 4000.0 mg; 抗坏血酸 500.0 mg

c: 矿物质预混料(mg/kg 饲料): NaCl 100.0 mg; KCl 3020.5 mg; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 11.3 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 363.0 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 8.0 mg; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3568.0 mg; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 65.1 mg; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 2.3 mg; CoCl<sub>2</sub> 28.0 mg; KI 7.5 mg; NaF 4.0 mg; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 25558.0 mg; Ca-lactate 15978.0 mg; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O 1523.0 mg

d: 其他: 鱼粉 45%; 大豆浓缩蛋白 25%; α-淀粉 12%; 磷酸二氢钙 0.5%; 抗氧化剂 0.05%; 氯化胆碱 0.5%; 羧甲基纤维素钠 4.95%

a: Arachidonic acid oil were purchased from CABIO Bioengineering (Wuhan) Co.,Ltd, the concentration of 51.69 % ARA, 6.56 % C16:0, 5.59 % C18:0, 5.62 % C18:1n-9,9.50 % C18:2n-6, 8.02 % C24:0

b: Vitamin mixture (mg/kg diet): Retinol acetate 38.0 mg; Cholecalciferol 13.2 mg; Vitamin K<sub>3</sub> 10.0 mg; Thiamin 115.0 mg; Riboflavin 380.0 mg; Pyridoxine HCl 88.0 mg; Pantothenic acid 368.0 mg; Niacin acid 1030.0 mg; Biotin 10.0 mg; Folic acid 20.0 mg; Vitamin B<sub>12</sub> 1.3 mg; Inositol 4000.0 mg; Ascorbic acid 500.0 mg

c: Mineral mixture (mg/kg diet): NaCl 100.0 mg; KCl, 3020.5 mg; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 11.3 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 363.0 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 8.0 mg; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3568.0 mg; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 65.1 mg; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 2.3 mg; CoCl<sub>2</sub> 28.0 mg; KI 7.5mg; NaF, 4.0 mg; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25558.0 mg; Ca-lactate,15978.0 mg; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1523.0 mg

d: Others: Fish meal 45%; Soy protein concentrate 25%; α-starch 12%, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5%; Antioxidant 0.05%; Choline chloride 0.5%; CMC 4.95%

表2 鱼油脂肪酸的组成(总脂肪酸)  
Tab.2 Fatty acid composition of fish oil (Total fatty acid) (%)

脂肪酸 Fatty acid	含量 Content	脂肪酸 Fatty acid	含量 Content	脂肪酸 Fatty acid	含量 Content
C14:0	7.5867	C18:1n-7	3.0029	C20:2n-6	3.0379
C16:0	19.9735	C20:1n-9	2.8905	花生四烯酸 ARA	1.0259
C18:0	3.2642	C22:1n-9	3.7231	二十碳五烯酸 EPA	9.7591
ΣSFA	30.8244	ΣMUFA	26.7566	二十二碳六烯酸 DHA	13.7841
C16:1n-7	6.9309	C18:2n-6	2.1236	ΣPUFA	31.4129
C18:1n-9	10.2092	C18:3n-3	1.6823		

脂肪沉积效率(Lipid deposition rate, LR, %) =  $(W_t \times L_t - W_0 \times L_0) / L_f$   
式中,  $S_0$  为养殖实验开始前实验鱼数量,  $S_t$  为养

殖实验结束后实验鱼数量,  $W_0$  为实验初始鱼体重(g),  $W_t$  为实验结束时鱼体重(g),  $L_f$  为实验饲料中粗脂肪的含量,  $L_0$  为实验开始前鱼体中粗脂肪的含量,  $L_t$

为实验结束后鱼体中粗脂肪的含量。

### 1.5 数据统计分析

采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 差异显著时( $P < 0.05$ )采用 Duncan's 检验进行多重比较分析。统计结果以平均值 $\pm$ 标准误(Mean  $\pm$  SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼成活率、增重率、脂肪沉积效率影响

n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼生长性能及脂肪沉积率见表 3。从表 3 可以看出, n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼的 SR 无显著影响( $P > 0.05$ ); WGR 随着 n-3/n-6 LC-PUFA 的降低呈先上升后下降趋势, D6 组显著低于其他各组( $P < 0.05$ ); LR 随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化呈下降趋势, 且 D6 组达到最小值, 为 14.80, 显著低于其他各组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼脂肪代谢酶的影响

不同 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼脂肪代谢酶的影响见表 4。从表 4 可以看出, 脂肪酸合成酶活性随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化呈先上升后下降的趋势, D4 组达到最大值, 显著高于其他各组( $P < 0.05$ ), 而 D1、D2、D3 组无显著差异( $P > 0.05$ ), D6 组显著低于其他各组( $P < 0.05$ )。随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活性呈

先上升后下降的趋势, 在 D3 组达到最大值, 显著高于其他各组( $P < 0.05$ ), 在 D1、D2 组之间及 D5、D6 组之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化, 酰基辅酶 A 氧化酶呈先增加后下降的趋势, 且在 D5 组达到最大值, 显著高于其他各组( $P < 0.05$ )。

### 2.3 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼消化酶的影响

不同 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼消化酶的影响见表 5。从表 5 可以看出, 随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化, 胰蛋白酶的活性呈先增强后减弱的趋势, 在 D4 组时达最大值, 与 D5 组无显著差异( $P > 0.05$ ), D6 组为最小值, 与 D2 组无显著差异( $P > 0.05$ ), 与其他各组之间均呈显著性差异( $P < 0.05$ )。随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化, 脂肪酶活性呈上升趋势, D1 和 D2 组之间无显著差异( $P > 0.05$ ), 其他各组之间均呈显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 2.4 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼血清生化指标的影响

不同 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼血清生化指标的影响见表 6。从表 6 可以看出, 随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化, 谷草转氨酶呈先上升后下降的趋势, D5 组达到最大值, 为 301.67, 与 D4 组无显著差异( $P > 0.05$ ), 显著高于其他各组( $P < 0.05$ ), D1 组为最小值, 与 D2 组无显著差异( $P > 0.05$ )。总蛋白、白蛋白和高密度脂蛋白胆固醇均随着饲料的变化呈先上升后下降的趋势, 均在 D5 组时达到最大值。

表 3 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼生长性能及脂肪沉积效率的影响

Tab.3 Effects of dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios on growth performance and lipid deposition rate of juvenile turbot

项目 Items	组别 Diets					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
初重 IBM(g)	12.23 $\pm$ 0.06	12.19 $\pm$ 0.06	12.14 $\pm$ 0.04	12.18 $\pm$ 0.03	12.18 $\pm$ 0.03	12.21 $\pm$ 0.03
末重 FBW(g)	29.85 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	30.00 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	29.60 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	29.57 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	28.83 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	27.65 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
增重率 WGR(%)	144.17 $\pm$ 1.06 <sup>c</sup>	146.16 $\pm$ 1.98 <sup>c</sup>	143.85 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>	142.77 $\pm$ 1.76 <sup>c</sup>	136.66 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	126.40 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
成活率 SR(%)	100.00 $\pm$ 0	100.00 $\pm$ 0	100.00 $\pm$ 0	99.05 $\pm$ 0.95	100.00 $\pm$ 0	100.00 $\pm$ 0
脂肪沉积效率 LR(%)	30.05 $\pm$ 0.93 <sup>d</sup>	29.63 $\pm$ 2.42 <sup>d</sup>	24.12 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	20.20 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>	19.69 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	14.80 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>

注: 同行数值上标英文字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

Note: Values in the same row with different superscripts show significant difference ( $P < 0.05$ ), the same as below

表 4 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼脂肪代谢酶的影响

Tab.4 Effects of dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios on fat metabolic enzymes of whole fish in juvenile turbot

项目 Items	组别 Diets					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
脂肪酸合成酶 FAS( $\mu$ mol/ml)	8.90 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	8.99 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	9.03 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	9.39 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	8.50 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	8.24 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G6PD(U/ml)	148.93 $\pm$ 10.86 <sup>c</sup>	161.99 $\pm$ 8.03 <sup>c</sup>	182.51 $\pm$ 4.66 <sup>d</sup>	98.25 $\pm$ 5.93 <sup>b</sup>	77.04 $\pm$ 2.91 <sup>a</sup>	61.22 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup>
酰基辅酶 A 氧化酶 ACO(ng/L)	484.16 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	497.16 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup>	534.52 $\pm$ 5.75 <sup>c</sup>	569.91 $\pm$ 5.15 <sup>d</sup>	612.73 $\pm$ 6.44 <sup>c</sup>	446.6 $\pm$ 2.24 <sup>a</sup>



表5 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼消化酶的影响  
Tab.5 Effects of dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios on digestive enzyme of juvenile turbot

项目 Items	组别 Diets					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
脂肪酶 Lipase (U/g prot)	85.54±1.81 <sup>a</sup>	89.25±3.83 <sup>a</sup>	103.29±0.61 <sup>b</sup>	115.06±3.97 <sup>c</sup>	148.19±1.95 <sup>d</sup>	175.87±1.73 <sup>e</sup>
胰蛋白酶 Trypsin (U/mg prot)	7805.34±157.92 <sup>b</sup>	7621.91±343.71 <sup>ab</sup>	8136.66±144.74 <sup>b</sup>	9453.28±243.60 <sup>c</sup>	8930.95±86.70 <sup>c</sup>	7001.83±159.34 <sup>a</sup>

表6 n-3/n-6 LC-PUFA 对大菱鲆幼鱼血清生化指标的影响  
Tab.6 Effects of dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios on serum biochemical indices of juvenile turbot

项目 Items	组别 diets					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
谷草转氨酶 AST(U/L)	68.33±4.41 <sup>a</sup>	86.67±1.67 <sup>a</sup>	185.00±10.00 <sup>b</sup>	288.33±6.01 <sup>c</sup>	301.67±11.67 <sup>c</sup>	163.33±19.22 <sup>b</sup>
总蛋白 TP(g/L)	19.83±1.36 <sup>a</sup>	23.17±0.88 <sup>abc</sup>	23.17±1.76 <sup>abc</sup>	25.00±1.04 <sup>bc</sup>	27.17±1.48 <sup>c</sup>	20.67±1.33 <sup>ab</sup>
白蛋白 ALB(g/L)	8.50±0.50 <sup>a</sup>	9.00±0.29 <sup>a</sup>	9.83±0.60 <sup>ab</sup>	10.00±0.29 <sup>ab</sup>	10.83±0.60 <sup>b</sup>	8.33±0.73 <sup>a</sup>
甘油三酯 TG (mmol/L)	1.45±0.12	1.55±0.06	1.75±0.09	1.78±0.16	1.68±0.13	1.45±0.10
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C (mmol/L)	0.78±0.03 <sup>a</sup>	0.83±0.07 <sup>a</sup>	0.95±0.10 <sup>ab</sup>	1.00±0.06 <sup>ab</sup>	1.12±0.03 <sup>b</sup>	0.83±0.07 <sup>a</sup>
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C (mmol/L)	0.20±0	0.22±0.02	0.22±0.02	0.22±0.02	0.22±0.01	0.18±0.02
总胆固醇 TCHO(mmol/L)	2.22±0.10 <sup>ab</sup>	2.28±0.10 <sup>ab</sup>	2.28±0.03 <sup>ab</sup>	2.47±0.09 <sup>b</sup>	2.47±0.02 <sup>b</sup>	2.08±0.06 <sup>a</sup>

其中, D5 组的总蛋白显著高于 D1、D6 组( $P<0.05$ ), 白蛋白和高密度脂蛋白胆固醇 D5 组显著高于 D1、D2 和 D6 组( $P<0.05$ )。总胆固醇随着饲料的变化呈先上升后下降的趋势, 在 D4 和 D5 组时达到最大值, 显著高于 D1 和 D6 组( $P<0.05$ )。甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇各组之间均无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

李思萌等(2015)研究表明, 饲料中不同脂肪源不影响大菱鲆幼鱼的成活率。本研究结果显示, 大菱鲆幼鱼的生长随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 变化呈剂量效应反应, 与徐后国(2013)在鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*) 中的研究结果一致。鱼类的脂类一般以脂肪的形式累积于腹腔、头盖腔、皮下、腹侧等脂肪组织(Toussaint *et al*, 2005), 也可存在于肝脏等其他器官。鱼体组织中脂肪的过量沉积可能会影响鱼肉的品质及经济价值。鱼体过度的脂肪沉积, 严重时甚至会导致大量脂肪在肝细胞内堆积(张春暖等, 2013), 引起肝细胞变性、坏死, 导致肝功能下降, 甚至造成衰竭。实际生产过程中, 在一定范围内提高饲料的脂肪水平有利于增加鱼类对饲料的利用效果(Hansen *et al*, 2008), 而饲料中过高的脂肪含量会引起鱼体过量的脂肪沉积。LC-PUFA 能抑制脂类合成, 促进脂类分解, 降低肝脂和血脂(马晶晶等, 2014)。其中, ARA 及其代谢物前列腺素(PGE), 特别是 PGE<sub>2</sub> 可通过活化脂肪细胞

促进脂肪代谢进而降低机体体脂水平(Duplus *et al*, 2002), 还能抑制 FAS 基因表达(蔡双莲等, 2003)。这可能是本研究中大菱鲆幼鱼脂肪沉积率随着饲料的变化下降的原因, 具体的机理有待进一步探究。

脂肪酸合成酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和酰基辅酶 A 氧化酶等都是肝脏脂质代谢酶, 其活性高低直接影响脂肪的合成与分解。脂肪酸合成酶在动物体脂生成、沉积中发挥重要作用, 而不同动物的器官和组织中 FAS 的活性、反应时间和作用机理并不一样(韩光明, 2009)。本研究发现, 脂肪酸合成酶活性的变化随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化呈先上升后下降的趋势, D4 组为最大值, 最能促进脂肪合成酶的活性。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是戊糖磷酸途径的关键酶, 为脂肪的合成提供 NADPH(赵红霞等, 2008)。本研究中, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化, 在 D3 组时达到最大值, 显著高于其他各组, 低于 18.97 (D2 组)时, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性迅速下降, 说明过量的 ARA 对其有抑制作用。研究表明, 酰基辅酶 A 氧化酶活性降低导致肝细胞的严重脂肪变性, 因此, 本研究饲料中, n-3/n-6LC-PUFA 为 D5 组时达到最大值, 说明肝细胞的脂肪发生变性, 影响正常生长。胃和肠道是动物机体消化吸收食物的场所(麦康森, 2011), 主要依赖消化酶消化分解饲料中的能量物质, 进而有效地吸收(Furné *et al*, 2005)。因此, 消化酶活性在一定程度上可以作为鱼类对营养物质

消化分解能力的指标。消化酶的活性不仅与动物自身生理状态有关,还与其食性及所采食的饲料成分、含量等多因素相关(戚常乐, 2016)。胰蛋白酶是动物体内主要的蛋白水解酶之一,它不仅可以分解食物中的蛋白质,而且迅速激活胰腺分泌的其他酶原促进机体的消化功能。本研究中,大菱鲂幼鱼肠道中胰蛋白酶的活性随着饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化,呈先增强后减弱的趋势,在 n-3/n-6 LC-PUFA 为 9.06 (D4 组)时,胰蛋白酶活性最强,说明此时肠道对蛋白质的消化吸收能力最好;但是, n-3/n-6 LC-PUFA 为 9.06 时(D4 组),大菱鲂幼鱼 WGR 的 D1、D2 和 D3 组无显著差异而显著高于 D5、D6 组。其可能的原因是过量的 ARA 会对鱼体产生一定的炎症反应(左然涛等, 2015),从而导致以下原因:首先是通过改变膜脂成分影响了酶活性表达(许友卿等, 2010a);其次是因为当饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 为 9.06 (D3 组)时,ARA 对大菱鲂幼鱼造成的炎症反应已经超出其对免疫调节的范围,造成机体对蛋白质的消化吸收能力下降。

脂肪酶活性的变化可显示出鱼体对脂肪的利用能力(曲木等, 2016)。戚常乐(2016)在关于卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)ARA 的最适研究中发现,ARA 显著影响了卵形鲳鲹脂肪酶活性,0.51%组和 0.96%组的脂肪酶活显著高于 0.15%组和 0.36%组,与本研究结果不一致。本研究发现,饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化使大菱鲂幼鱼肠道中脂肪酶的活性呈上升趋势。目前,尚无较多关于 ARA 影响脂肪酶活性的报道,推测可能是因为 ARA 及其代谢物前列腺素(PGE),特别是 PGE<sub>2</sub> 可与脂肪细胞转录因子(PPAR $\alpha$ )迅速反应并激活它,从而活化脂肪细胞,促进其代谢使机体体脂水平下降(Duplus *et al.*, 2002),也可能是因为本研究所设计配方 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化增加了 PUFAs 的含量,而 PUFAs 促进脂类在消化道中的乳化而增加与消化酶的接触面积,促进脂肪酶消化的缘故(许友卿等, 2010b)。具体原因需要进一步的验证。

血清中的蛋白质具有重要的生理作用,直接关系到鱼体代谢及抗病能力,是鱼类机体健康状况的重要指标之一(强俊等, 2012)。白蛋白的生理作用主要体现在维持鱼体血量和渗透压方面。正常生理状况下,摄食情况会影响机体血清蛋白含量(蒋明等, 2015)。叶剑雄(2016)研究表明,血清中蛋白质含量受环境和饲料的种类及含量影响。本研究表明,饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化对血清中蛋白质有显著影响,总蛋白和白蛋白在 n-3/n-6 LC-PUFA 为 6.86 (D5 组)时均为最大值,且在 D6 组有下降趋势,说明饲料中 n-3/n-6

LC-PUFA 对饲料的机体健康产生重要的作用,在一定的范围内起到促进作用。AST 是动物细胞线粒体中的重要氨基转移酶,对机体蛋白质代谢具有重要作用,AST 的活性变化是肝细胞损伤的敏感指标(王香丽等, 2015)。当机体在正常情况下,血清中 AST 活性较低。组织病变会造成细胞膜通透性增强,血浆中的 AST 活性升高。本研究中,AST 呈先上升后下降的趋势,说明饲料中 ARA 增强细胞膜通透性,另外,谷草转氨酶在 D6 组时呈下降趋势,综合在 WGR 等方面的结果来看, D6 组大菱鲂幼鱼处于不健康的状态,AST 活性下降。高密度脂蛋白胆固醇主要由肝脏合成,有利于预防心血管疾病,过量的低密度脂蛋白易引发动脉硬化(李新等, 2016),韩宏毅等(2010)研究认为,不饱和脂肪酸能够降低 LDL-C 含量并升高 HDL-C 含量。而本研究中,饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 的变化对低密度脂蛋白胆固醇各组之间无显著影响,说明本研究中 ARA 对大菱鲂幼鱼的低密度脂蛋白胆固醇无降低作用。高密度脂蛋白胆固醇均随着饲料的变化呈先上升后下降的趋势,说明本研究中 ARA 对大菱鲂幼鱼的高密度脂蛋白胆固醇有升高作用。

在本研究条件下,饲料中 n-3/n-6 LC-PUFA 比值在适宜范围(18.97~23.04)能促进大菱鲂幼鱼的生长,同时,饲料中 ARA 对消化呈先上升后降低的趋势,在 n-3/n-6 LC-PUFA 为 9.06 (D4 组)时,胰蛋白酶活达到最大值。n-3/n-6 LC-PUFA 的比例过低会对大菱鲂幼鱼存在降脂作用,具体机理需要进一步验证。

## 参 考 文 献

- AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International (17th ed). Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities, 2002
- Cai SL, Li M. Advances in polyunsaturated fatty acids. Life Science Research, 2003, 7(4): 289-292, 304 [蔡双莲, 李敏. 多不饱和脂肪酸的研究进展. 生命科学研究, 2003, 7(4): 289-292, 304]
- Duplus E, Forest C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? Biochemical Pharmacology, 2002, 64(5-6): 893-901
- Furné M, Hidalgo MC, López A, *et al.* Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture, 2005, 250(1-2): 391-398
- Han GM. Effects of dietary lipid levels on growth, fat deposition, fatty acid profiles and fatty acid synthase of GIFT strain Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Master's Thesis of Nanjing University, 2009, 6 [韩光明. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长、体脂沉积、脂肪酸组成及脂肪酸合成酶的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2009, 6]
- Han HY, Wang J. Polyunsaturated fatty acids and their

- physiological functions. Chinese Journal of Clinical Research, 2010(6): 523–525 [韩宏毅, 王剑. 多不饱和脂肪酸及其生理功能. 中国临床研究, 2010(6): 523–525]
- Hansen JØ, Berge GM, Hillestad M, *et al.* Apparent digestion and apparent retention of lipid and fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed increasing dietary lipid levels. Aquaculture, 2008, 284(1–4): 159–166
- Jiang M, Huang F, Wen H, *et al.* Effects of dietary zinc on growth, serum biochemical indices, and antioxidant responses in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1167–1176 [蒋明, 黄凤, 文华, 等. 饲料锌对团头鲂幼鱼生长性能、血清生化指标和抗氧化功能的影响. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1167–1176]
- Li SM, Wu LX, Jiang ZQ, *et al.* Effects of dietary lipid source on growth performance and muscle fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(5): 1421–1430 [李思萌, 吴立新, 姜志强, 等. 饲料脂肪源对大菱鲆幼鱼生长性能和肌肉脂肪酸组成的影响. 动物营养学报, 2015, 27(5): 1421–1430]
- Li X, Yang RB, Qian XQ, *et al.* Effect of dietary vegetable oils when fed to genetically improved farmed tilapia strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Acta Hydrobiological Sinica, 2016, 40(4): 672–680 [李新, 杨瑞斌, 钱雪桥, 等. 不同植物脂肪源对吉富罗非鱼生长性能、肌肉脂肪酸和生理生化指标的影响. 水生生物学报, 2016, 40(4): 672–680]
- Ma JJ, Wang JY, Sun JZ, *et al.* Effect of dietary DHA to EPA ratios on growth performance, body composition and serum physiological parameters in juvenile *Platichthys stellatus*. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(2): 244–256 [马晶晶, 王际英, 孙建珍, 等. 饲料中 DHA/EPA 值对星斑川鲷幼鱼生长、体组成及血清生理指标的影响. 水产学报, 2014, 38(2): 244–256]
- Ma JJ. Effect of dietary n-3 HUFA on growth performance and lipid metabolism in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. Master's Thesis of Zhejiang University, 2008, 9 [马晶晶. n-3 高不饱和脂肪酸对黑鲷幼鱼生长及脂肪代谢的影响. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2008, 9]
- Mai KS. Aquatic animal nutrition and feedstuffs. II Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2011 [麦康森. 水产动物营养与饲料学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2011]
- Qi CL. Effects of LNA, ARA, DHA and EPA on the growth and immunity of juvenile pomfret. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 28 [戚常乐. LNA、ARA、DHA 和 EPA 对卵形鲳鲹幼鱼生长及免疫影响的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 28]
- Qiang J, Yang H, Wang H, *et al.* Studies on blood biochemical indices and expression of hepatic HSP70 mRNA of different tilapia strains artificially challenged with *Sreptococcus iniae*. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 958–968 [强俊, 杨弘, 王辉, 等. 海豚链球菌感染对不同品系罗非鱼血液生化指标和肝脏 HSP70mRNA 表达的影响. 水产学报, 2012, 36(6): 958–968]
- Qu M, Li CE, Liu HC, *et al.* Effects of different dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, body composition and digestive enzyme activities of Common carp (*Cyprinus carpio*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 28(7): 2069–2078 [曲木, 李长娥, 刘宏超, 等. 饲料不同糖脂比对鲤鱼生长、体成分及消化酶活性的影响. 动物营养学报, 2016, 28(7): 2069–2078]
- Sargent JR, Henderson JR, Tocher DR, *et al.* The lipids. Elsevier, 2002, 2(3), 181–257
- Toussaint C, Fauconneau B, Médale F, *et al.* Description of the heterogeneity of lipid distribution in the flesh of brown trout (*Salmo trutta*) by MR imaging. Aquaculture, 2005, 243(1–4): 255–267
- Wang AM. Effects of dietary lipid levels on growth and fat metabolism of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Doctoral Dissertation of Nanjing University, 2011, 9 [王爱民. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长及脂肪代谢调节的研究. 南京农业大学博士研究生学位论文, 2011, 9]
- Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry (Third Edition). Beijing: Higher Education Press, 2002 [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(第三版). 北京: 高等教育出版社, 2002]
- Wang XL, Mai KS, Xu W, *et al.* Influence of dietary methionine on the activity of liver and plasma Glutamic-Pyruvic and glutamic oxalacetic transaminases of juvenile darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*). Periodical of Ocean University of China(Natural Science), 2015, 46(9): 49–53 [王香丽, 麦康森, 徐玮, 等. 蛋氨酸对瓦氏黄颡鱼幼鱼肝脏及血浆中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 46(9): 49–53]
- Watanabe YG. An organ culture study on the site of determination of ACTH and LH cells in the rat adenohypophysis. Cell and Tissue Research, 1982, 227(2): 267–275
- Xu HG. Effects of dietary fatty acids on growth performance, health and accumulation of lipids and fatty acids in juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013, 65 [徐后国. 饲料脂肪酸对鲈鱼幼鱼生长、健康及脂肪和脂肪酸累积的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013, 65]
- Xu YQ, Zhong M, Ding ZK. Influence and mechanism of poly unsaturated fatty acids on fish feed conversion ratio. Feed Industry, 2010a, 31(8): 46–50 [许友卿, 钟鸣, 丁兆坤. 多不饱和脂肪酸对鱼饲料转化率的影响及其机理. 饲料工业, 2010a, 31(8): 46–50]
- Xu YQ, Zhuang L, Ding ZK. Effects and their mechanisms of poly unsaturated fatty acids on the growth and development of seawater fish larva. Feed Industry, 2010b, 31(14): 13–18 [许友卿, 庄丽, 丁兆坤. 多不饱和脂肪酸对海水仔稚鱼生长发育的影响及机理. 饲料工业, 2010b, 31(14): 13–18]
- Ye JX. The effects of soluble substance of crude oil on development, antioxidant and biochemical indicators of carp. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 35 [叶剑雄. 原油水溶物对鲫发育、组织抗氧化和血清生化指标的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 35]
- Zhang CN, Wang AM, Liu WB, *et al.* Effects of dietary lipid levels on fat deposition, lipid metabolize enzyme and antioxidant activities of *Chelon haematocheilus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 108–115 [张春暖,

- 王爱民, 刘文斌, 等. 饲料脂肪水平对梭鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶及抗氧化酶活性的影响. 中国水产科学, 2013, 20(1): 108–115]
- Zhao HX, Cao JM, Zhu X, *et al.* Effects of dietary glutathione on growth performance, serum biochemical indices and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2008, 20(5): 540–546 [赵红霞, 曹俊明, 朱选, 等. 日粮添加谷胱甘肽对草鱼生长性能、血清生化指标和体组成的影响. 动物营养学报, 2008, 20(5): 540–546]
- Zhou CH, Wang SJ, Tanaka KI, *et al.* The comparative research on the fatty acid and lipid synthesis ability between the meat-type ducks and the meat-type chicken. Acta Nutritional Sinica, 2006, 28(1): 87–88 [周长海, 王淑杰, 田中桂一, 等. 肉鸭和肉鸡脂肪酸及脂类合成能的对比研究. 营养学报, 2006, 28(1): 87–88]
- Zuo RT, Mai KS, Xu W, *et al.* Advance of studies on the effects of fatty acids on immune responses and nutritional regulation mechanism in fish species. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(7): 1079–1088 [左然涛, 麦康森, 徐玮, 等. 脂肪酸对鱼类免疫系统的影响及调控机制研究进展. 水产学报, 2015, 39(7): 1079–1088]

(编辑 陈严)

## Effects of n-3/ n-6 LC-PUFA on Fat Deposition, Digestion, and Lipid Metabolism in Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*)

TAN Qing<sup>1,2</sup>, HAN Xiujie<sup>1,2</sup>, WANG Jiyong<sup>1</sup>, LI Baoshan<sup>1</sup>,  
LI Xueli<sup>1,2</sup>, HAO Tiantian<sup>1</sup>, ZHANG Limin<sup>1①</sup>

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

**Abstract** An 8-week feeding trial was conducted in a recirculated system to study the effect of dietary n-3/n-6 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) ratios (29.54, D1; 23.04, D2; 18.97, D3; 9.06, D4; 6.86, D5; 3.87, D6) on growth performance, whole-body fatty acid composition, and serum biochemical indices in turbot (*Scophthalmus maximus*). Six diets were formulated to feed six groups of juvenile turbot [mean initial weight (12.18±0.01) g]. Each diet was randomly fed to triplicate groups of 35 fish per tank. There were no significant differences in the survival rate (SR) of turbot ( $P>0.05$ ). With decreasing dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios, the weight gain rate (WGR) first increased and then decreased. The WGR of the D6 group was significantly lower than that of the other groups ( $P<0.05$ ). The lipid deposition rate (LR) reduced with decreasing dietary n-3/n-6 fatty acid ratios, and the D6 group achieved 14.80, which was significant lower than that of the other group ( $P<0.05$ ). The trypsin content increased as the dietary n-3/n-6 LC-PUFA level decreased from 29.54 to 9.06, and then decreased. Lipase increased with decreasing n-3/n-6 LC-PUFA. As the dietary n-3/n-6 LC-PUFA level decreased, fatty acid synthetase and glucose-6-phosphate dehydrogenase first increased and then decreased. When the dietary n-3/n-6 LC-PUFA level was 9.06, fatty acid synthetase levels were significantly higher than those in the other groups ( $P<0.05$ ). Additionally, glucose-6-phosphate dehydrogenase levels were significantly higher than those in the other groups ( $P<0.05$ ) when the dietary n-3/n-6 LC-PUFA level was 18.97. Aspartate aminotransferase, total protein, albumin, and high-density lipoprotein cholesterol first increased and then decreased with increasing dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios. These results indicate that, with decreasing dietary n-3/n-6 LC-PUFA ratios, resulting in reduced lipid deposition rate of juvenile turbot.

**Key words** *Scophthalmus maximus*; n-3/n-6 LC-PUFA; Fat deposition; Digestive enzyme; Serum biochemical indices

① Corresponding author: ZHANG Limin, E-mail: zhanglimin@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170609001

http://www.yykxjz.cn/

汪春玲, 梁萌青, 徐后国. 凡纳滨对虾亲虾繁殖期间适宜投喂频率的研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 74–82

Wang CL, Liang MQ, Xu HG. Optimum feeding frequency for *Litopenaeus vannamei* during the breeding period. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 74–82

# 凡纳滨对虾亲虾繁殖期间适宜投喂频率的研究\*

汪春玲<sup>1,3</sup> 梁萌青<sup>2,3</sup>① 徐后国<sup>2,3</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试点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. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 在饱食投喂条件下, 选用鲜活饵料沙蚕(*Nereis succinea*)对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)亲虾进行营养强化培育 60 d, 通过比较不同的投喂频率 2 次/d(F2 组)、3 次/d(F3 组)、4 次/d(F4 组)对亲虾摄食、生长、繁殖性能、虾体组成和肝胰腺的消化酶活力的影响, 旨在探究亲虾繁殖期间营养强化的最适投喂频率。结果显示, 随着投喂频率的增加, 亲虾的日摄食量逐渐增大, F2 组显著低于 F4 组( $P < 0.05$ ), 但与 F3 组差异不显著( $P > 0.05$ ); 亲虾的增重率和体长增长率呈先升高后降低的趋势, 但无显著性差异( $P > 0.05$ )。不同的投喂频率对各组亲虾的单次产卵量、相对产卵量、无节幼体 I 期个体数、无节幼体孵化率、蚤状幼体 I 期个体数、无节幼体变态率、性腺指数、初产时间和产卵间期均无显著影响( $P > 0.05$ )。亲虾全虾主要体组成成分水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分含量也不受投喂频率增加的影响( $P > 0.05$ ); F2 组的胰蛋白酶和脂肪酶活力显著低于 F3、F4 组( $P < 0.05$ ), 而不同实验组的胃蛋白酶和淀粉酶活力无显著性差异( $P > 0.05$ )。结合本研究的结果和生产实际情况, 建议在饱食投喂条件下, 凡纳滨对虾亲虾繁殖期间营养强化的适宜投喂频率为 2 次/d。

**关键词** 投喂频率; 生长; 繁殖性能; 消化酶活力; 凡纳滨对虾亲虾

**中图分类号** S396 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0074-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有生长快、抗应激能力强、肉味鲜美、易进行集约化养殖等优点, 是目前国际水产品市场和世界虾类养殖业者深受欢迎的品种。经过十几年的发展, 凡纳滨对虾已经成为我国最主要的对虾养殖品种(叶乐等, 2005)。但是, 制约对虾养殖产业持续稳定发展最大的难题是苗种生产(陈泳先, 2012)。

饲料营养和投饲策略是决定养殖企业生产效益的关键因素(纪文秀等, 2011)。确定适宜的饲料和投饲方法不仅有助于提高亲虾的摄食率、饲料利用率和苗种质量, 还能避免饵料的浪费, 从而减少对养殖环境

的污染(Burford *et al.*, 2001)。陈泳先(2012)研究表明, 亲虾在性腺发育和繁殖过程中, 需要消耗大量物质和能量, 并需要合成、积累大量卵黄物质供胚胎发育。因此, 提供合适的饵料才能保证亲虾正常繁殖的营养需求。目前, 沙蚕(*Nereis succinea*)是亲虾繁殖培育过程中最为常用的生物饵料, 日投喂量很大, 一般为亲虾体重的 20%~30%(张玉玲等, 2017)。在生产上一般投喂 4 次鲜活饵料, 由于其投喂量大, 不仅容易破坏水质、传染病原, 而且增加了工人的工作量。因此, 投喂频率成为关系到亲虾正常的生长繁育和苗种生产企业经济效益一项越来越重要的因素。如果投喂频

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD0401)资助 [This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences(2016HY-ZD0401)]. 汪春玲, E-mail: 917438579@qq.com

① 通讯作者: 梁萌青, 研究员, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-06-09, 收修改稿日期: 2017-07-17

率过低,可能就不能满足亲虾繁殖期间的营养需求,亲虾的性腺成熟和正常的繁殖活动将受到严重阻碍,从而造成幼体质量下降,最终使得苗种生产难以继续;投喂频率过高则往往导致饵料系数上升、养殖成本增加以及养殖环境的恶化(Gershanovich *et al.*, 1992)。目前,国内外关于投喂频率已有不少报道,但主要集中在鱼、虾的生长阶段,如草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲇鱼(*Silurus meridionalis*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)、鳊鱼(*Elopichthys bambusa*)等(潘庆等, 1998; 何丽君等, 2003; 楼宝等, 2007; 宋大焯等, 2009; 孙丽慧等, 2010; 孙存军, 2011)。然而,投喂频率对亲虾繁殖阶段的影响尚未见详细的报道。为此,本研究比较分析了不同投喂频率对凡纳滨对虾亲虾的摄食、生长、繁殖性能、体组成和消化酶活力的影响,为苗种生产确定亲虾最佳投喂频率提供理论依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验亲虾

本研究于2016年6月5日~8月5日在河北黄骅市鑫海生物技术有限公司进行。实验选取420 d、大小均匀、体质健壮、卵巢未发育成熟的凡纳滨对虾亲虾。雌虾初始体重为(41.78±0.62) g,体长为(15.80±0.34) cm。雌虾暂养7 d,待其摄食正常、活力恢复后进行实验分组。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验设计** 实验开始前,对每尾亲虾的单侧眼柄套上眼标作为个体标记,并测定每尾雌虾的初始体长、体重。随机将亲虾分于3个养殖池内,每池40尾虾。实验设3种投喂频率进行人工投喂,即2、3、4次/d,分别以F2、F3和F4组表示。具体投喂频率及时间见表1。实验饵料为沙蚕(投喂前用高锰酸钾浸泡3 min后,清水洗净沥干),采取饱食投喂,

2 h后收集残饵并计算日摄食量。饲喂30 d后,测定未剪眼柄的亲虾的终末体长、体重。

**1.2.2 养殖管理** 养殖场利用海水循环系统进行水温控制和水体净化,控制养殖系统水温为(27±2)℃,盐度为30±2, pH为7.8~8.0,溶解氧≥5 mg/L,氨氮≤0.6 mg/L,亚硝酸盐≤0.1 mg/L,水深为35~40 cm,室内自然光照周期12 h。养殖池为室内圆形水泥池(容水量为3 m<sup>3</sup>,直径为2 m)。每天09:00换水1次,及时捞出残饵、粪便和蜕皮。

**1.2.3 亲虾的促熟和交配管理** 实验采用生产上常用的镊烫法摘除雌虾的单侧眼柄进行促熟。除眼柄是刺激虾蟹类性腺成熟和排卵的常用方法,普遍认为这是去除眼柄中的性腺抑制激素(王晓伟等, 2013)。雌虾在摘除单侧眼柄后,继续投饵培育3~5 d,就会出现性腺发育成熟个体。之后每天上午换水时,检查雌虾池中是否有性腺发育成熟即将产卵的个体,然后将性腺变成橘红色的雌虾选入到同一个雄虾池中进行交配。交配池为圆形跑道池,面积为20 m<sup>2</sup>左右,水深为0.4~0.5 m。性腺发育良好的雄虾约有100尾,有活力,反应灵敏,精荚呈白色且饱满凸出。

**1.2.4 幼体的孵化和培育** 每天提前12 h准备200 L的产卵孵化桶,每桶加入100 L经消毒过滤没有余氯的新鲜海水,同时,加入6×10<sup>-6</sup>的EDTA-2Na络合水中的重金属离子,并保持24 h不间断地微充气。交配一般在15:00~23:00进行。交配后,及时将带有雄虾精荚的雌虾捞出,放在产卵孵化桶中,做好标记待其产卵。动作尽量轻捷,避免因雌虾弹跳而使精荚弹出。22:00左右,不管雌虾是否已经成功交配,均捞出放在产卵孵化桶中。亲虾产卵结束后,及时捞出并在2 h内完成计数。雌虾所产的卵继续留在孵化桶内,每隔1 h翻动1次,直至次日16:00孵化出无节幼体并计数。孵化桶内存活下来的无节幼体在次日18:00左右变态成为蚤状幼体后计数统计(陈泳先, 2012)。

### 1.3 繁殖性能指标的测定

**1.3.1 卵和幼体的计数** 计数前,用手轻轻搅动水体使卵子或幼体均匀地分散在水中。用100 ml的烧杯从桶内5个固定位点打取水样,5次计数的平均值乘以1000,将其作为亲虾单次的产卵量和相应幼体的产量。同时,记下雌虾的组别、编号、日期以便进行统计,并计算相对产卵量、孵化率和变态率。

**1.3.2 性腺指数和产卵情况的计算** 实验末期,适时地选取性腺成橘红色的、即将产卵的雌虾进行解剖,取性腺称重,计算性腺指数。根据记录的每天产卵孵化雌虾的编号、数目和日期,计算每个实验组的

表1 投喂频率及投喂时间

Tab.1 Feeding frequency and feeding time

组别 Groups	投喂频率(次/d) Feeding frequency (times/day)	投喂时间 Feeding time			
F2	2	06:00	—	18:00	—
F3	3	06:00	—	18:00	22:00
F4	4	06:00	12:00	18:00	22:00

初产时间、产卵间期。

#### 1.4 样品采集和分析方法

实验结束后, 每组各随机取 6 尾亲虾, 用于全虾主要营养成分分析; 投喂 2 h 后, 每个实验组取 9 尾亲虾, 置于冰盘上, 剥离出肝胰腺, 保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 用于测定消化酶活性。

水分含量用 $(105 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  常温干燥法; 粗灰分含量用马弗炉  $550^{\circ}\text{C}$  高温灼烧法; 粗脂肪含量用索氏抽提法测定(Foss Tecator, Hoganas, 瑞典); 粗蛋白的含量用凯氏定氮仪测定(VELP, UDK142 automatic distillation unit, VELP, Usmate, MB, 意大利)。

亲虾肝胰腺的胰蛋白酶、胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活力均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定, 实验步骤按照说明书进行操作。胰蛋白酶活性采用紫外分光光度计测定, 而胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活力均用酶标仪测定。胰蛋白酶活性单位定义: 在 pH、 $37^{\circ}\text{C}$  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。胃蛋白酶活性单位定义: 每毫克组织蛋白质在  $37^{\circ}\text{C}$  下每分钟分解蛋白质生成  $1 \mu\text{g}$  氨基酸为 1 个酶活力单位。淀粉酶(AMS)活力单位定义: 每毫克蛋白在  $37^{\circ}\text{C}$  与底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉为 1 个淀粉酶活力单位。脂肪酶活性单位定义: 在  $37^{\circ}\text{C}$  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  $1 \mu\text{mol}$  底物为 1 个酶活力单位。

#### 1.5 实验数据的统计分析

有关指标计算公式如下:

日摄食量(Daily feeding amount, DFA, g) = (投喂量 - 残饵量) / 亲虾个体数

增重率(Weight gain rate WGR, %) = (终末体重 - 初始体重)  $\times$  100 / 初始体重

体长增长率(Growth length rate, GLR, %) = (终末体长 - 初始体长)  $\times$  100 / 初始体长

相对产卵量(Relative fecundity,  $10^3/\text{g}$ ) = 总产卵量 /

亲虾体重

孵化率(Hatching rate, %) = 各组无节幼体的计数平均数  $\times$  100 / 各组同一亲虾个体产卵量的计数平均数

无节幼体变态率(Metamorphosis rate, %) = 各组蚤状幼体的计数平均数  $\times$  100 / 各组相应的无节幼体的计数平均数

性腺指数(Gonadosamic index, GSI, %) = 性腺重  $\times$  100 / 亲虾体重

初产时间(First spawning time, h) = 亲虾初次产卵的时刻 - 亲虾摘除单侧眼柄的时刻

产卵间期(Spawning interval, h) = 各组中同一亲虾个体连续两次成熟产卵的时间差

采用 SPSS 17.0 统计分析软件对所有数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。当达到显著差异水平( $P < 0.05$ ), 则进行 Tukey 多重比较。所有数据均表示为平均值  $\pm$  标准误(Mean  $\pm$  SE)。

## 2 结果

### 2.1 不同的投喂频率对亲虾摄食和生长的影响

不同实验组亲虾的 DFA、初始体重、终末体重、WGR、初始体长、终末体长和 GLR 见表 2。从表 2 可以看出, F4 组的 DFA 最高, 之后依次是 F3 和 F2 组。方差分析表明, F2 组的 DFA 显著低于 F4 组 ( $P < 0.05$ ), 但与 F3 组差异不显著 ( $P > 0.05$ ); WGR 最高的是 F3 组, 达 17.56%, F4 组次之, F2 组最低, 分别为 15.74% 和 15.17%。单因素方差分析表明, 3 组之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ ); 亲虾体长 GLR 与 WGR 有相似的变化趋势, 3 组之间也没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 不同的投喂频率对亲虾繁殖性能的影响

2.2.1 单次产卵量、相对产卵量、无节幼体 I 期个体数、孵化率 不同实验组亲虾的单次产卵量、相对产卵量、无节幼体 I 期个体数和孵化率见表 3。从表 3 可以看出, 随着投喂频率的增加, 亲虾的单次产卵量呈先上升后下降的趋势。其中, 最高的是 F3 组, 为

表 2 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾摄食和生长的影响  
Tab.2 Effects of different feeding frequencies on the ingestion and growth of broodstock *L. vannamei*

组别 Groups	日摄食量 DFA(g)	初始体重 IBW(g)	终末体重 FBW(g)	增重率 WGR(%)	初始体长 IBL(cm)	终末体长 FBL(cm)	体长增长率 GLR(%)
F2	9.33 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	41.60 $\pm$ 0.57	47.91 $\pm$ 0.99	15.17 $\pm$ 2.46	15.96 $\pm$ 0.31	16.61 $\pm$ 0.29	4.13 $\pm$ 1.62
F3	10.58 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	41.78 $\pm$ 0.67	49.09 $\pm$ 0.99	17.56 $\pm$ 1.92	15.80 $\pm$ 0.28	16.43 $\pm$ 0.50	4.28 $\pm$ 0.50
F4	11.83 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	41.97 $\pm$ 0.61	48.58 $\pm$ 1.00	15.74 $\pm$ 3.08	15.63 $\pm$ 0.42	16.25 $\pm$ 0.19	4.25 $\pm$ 1.77

注: 同一列数值中右上角不同小写字母表示组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同

Note: Data within the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ), the same as below

表 3 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾单次产卵量、相对产卵量、无节幼体 I 期个体数和孵化率的影响  
Tab.3 Effects of different feeding frequencies on the single fecundity, the relative fecundity, the number of nauplius stage I and hatching rate of broodstock *L. vannamei*

组别 Groups	单次产卵量 Single fecundity( $\times 10^4$ )	相对产卵量 Relative fecundity( $10^3/g$ )	无节幼体 I 期个体数 Number of nauplius stage I( $\times 10^4$ )	孵化率 Hatching rate (%)
F2	12.42 $\pm$ 0.37	2.64 $\pm$ 0.34	8.61 $\pm$ 0.39	69.50 $\pm$ 2.38
F3	13.04 $\pm$ 0.30	2.66 $\pm$ 0.29	9.89 $\pm$ 0.46	74.81 $\pm$ 1.57
F4	12.93 $\pm$ 0.70	2.69 $\pm$ 0.58	9.43 $\pm$ 0.35	69.80 $\pm$ 4.36

13.04 $\times 10^4$ , F4 组次之, F2 组最低, 但 3 组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 相对产卵量逐渐增大, 但各组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 各组的无节幼体 I 期个体数与产卵量呈现相似的变化趋势, 3 组之间也无显著差异( $P>0.05$ ); 同样, 孵化率 F3 组最高, 为 74.81%, 高于 F4 组的 69.80%和 F2 组的 69.50%, 但 3 组之间无显著差异( $P>0.05$ )。

**2.2.2 蚤状幼体 I 期个体数和变态率** 不同实验组亲虾的蚤状幼体 I 期个体数和 N1~Z1(无节幼体 I 期到蚤状幼体 I 期)的变态率见表 4。从表 4 可以看出, 蚤状幼体 I 期个体数随着投喂频率的增加呈先增加后减小趋势, 即 F3 组的蚤状幼体 I 期个体数最高, 为 8.52 $\times 10^4$ , F4 组次之, F2 组最低, 分别为 7.85 $\times 10^4$ 和 6.65 $\times 10^4$ , 但 3 组之间没有显著性差异( $P>0.05$ ); N1~Z1 的变态率最高的也是 F3 组, F2 组次之, F4 组最低, 但 3 组之间没有显著性差异( $P>0.05$ )。

**2.2.3 性腺指数、初产时间、产卵间期** 不同实验组亲虾的性腺指数、初产时间和产卵间期见表 5。从表 5 可以看出, 各组亲虾的性腺指数随着投喂频率的增加而增大, F2、F3 和 F4 组的性腺指数分别为 6.31%、6.74%和 7.44%, 但 3 组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 初产时间也随着投喂频率的增加而减少, 即 F4 组的初产时间最短, 为 128.60 h, F3 组次之, F2 组最长, 但 3 组之间没有显著差异( $P>0.05$ ); 产卵间期 F3 组的最短, 为 72.00 h, F4 组次之, F2 组最低, 分别为 80.00 h 和 88.00 h, 但 3 组之间没有显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾全虾体组成的影响

不同的投喂频率对亲虾全虾体组成的影响见表 6。从表 6 可以看出, 亲虾全虾水分含量 F3 组最高, F4 组和 F2 组的水分含量非常接近, 单因素方差

表 4 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾蚤状幼体 I 期个体数和变态率的影响

Tab.4 Effects of different feeding frequencies on the number of zoea stage I and metamorphosis rate(N1~Z1)in broodstock *L. vannamei*

组别 Groups	无节幼体 I 期个体数 Number of nauplius stage I( $\times 10^4$ )	蚤状幼体 I 期个体数 Number of zoea stage I( $\times 10^4$ )	变态率 Metamorphosis rate(N1~Z1) (%)
F2	8.61 $\pm$ 0.39	6.65 $\pm$ 0.56	78.86 $\pm$ 2.92
F3	9.89 $\pm$ 0.46	8.52 $\pm$ 0.51	85.43 $\pm$ 1.98
F4	9.43 $\pm$ 0.35	7.85 $\pm$ 0.79	76.79 $\pm$ 2.07

表 5 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾性腺指数、初产时间和产卵间期的影响

Tab.5 Effects of different feeding frequencies on the GSI, first spawning time and spawning interval in broodstock *L. vannamei*

组别 Groups	性腺指数 GSI(%)	初产时间 First spawning time(h)	产卵间期 Spawning interval(h)
F2	6.31 $\pm$ 0.71	184.14 $\pm$ 16.39	88.00 $\pm$ 16.00
F3	6.74 $\pm$ 1.31	168.71 $\pm$ 19.88	72.00 $\pm$ 21.16
F4	7.44 $\pm$ 0.96	128.60 $\pm$ 18.31	80.00 $\pm$ 13.86

表 6 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾体组成的影响

Tab.6 Effects of feeding frequencies on the body composition of broodstock *L. vannamei*

组别 Groups	水分 Moisture (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	粗脂肪 Crude lipid (%)	灰分 Ash (%)
F2	74.26 $\pm$ 0.38	72.73 $\pm$ 1.04	3.46 $\pm$ 0.03	11.94 $\pm$ 0.21
F3	75.37 $\pm$ 1.08	74.95 $\pm$ 0.11	3.66 $\pm$ 0.05	12.41 $\pm$ 0.79
F4	74.29 $\pm$ 1.02	74.38 $\pm$ 0.59	3.55 $\pm$ 0.04	12.40 $\pm$ 0.44



分析表明, 3 组之间没有显著差异( $P>0.05$ ); 全虾粗蛋白含量与水分含量有相似的结果; 粗脂肪含量也呈现相同的变化趋势, 即 3 组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 全虾灰分含量在 3 组之间也无显著差异( $P>0.05$ )。

#### 2.4 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾消化酶活力的影响

不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾肝胰腺消化酶活力的影响见表 7。从表 7 可以看出, 胰蛋白酶活力随着投喂频率的增加而增大, F2、F3 和 F4 组的胰蛋白酶

活力分别为 543.32、958.27 和 983.46 U/mg·prot。单因素方差分析表明, F2 组的胰蛋白酶活力与 F3、F4 组差异显著( $P<0.05$ ), 而 F3 和 F4 组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 脂肪酶活力也呈现相似的变化趋势, F2 组的 19.94 U/g·prot 显著低于 F3 组的 25.53 U/g·prot 和 F4 组的 26.54 U/g·prot( $P<0.05$ ), 但 F3 和 F4 组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 不同实验组的胃蛋白酶活力随着投喂频率的增加呈增长趋势, 但各组之间无显著性差异( $P>0.05$ ); 淀粉酶活力随着投喂频率的增加呈先增大后减少的趋势, 但各组之间无显著差异( $P>0.05$ )。

表 7 不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾肝胰腺消化酶活力的影响

Tab.7 Effects of feeding frequencies on the digestive enzyme activities in hepatopancreas of broodstock *L. vannamei*

组别 Groups	胰蛋白酶 Trypsin (U/mg·prot)	胃蛋白酶 Pepsin (U/mg·prot)	脂肪酶 Lipase (U/g·prot)	淀粉酶 Amylase (U/mg·prot)
F2	543.32±17.21 <sup>a</sup>	26.08±1.32	19.94±0.96 <sup>a</sup>	0.38±0.02
F3	958.27±21.38 <sup>b</sup>	26.24±1.20	25.53±0.88 <sup>b</sup>	0.41±0.02
F4	983.46±8.74 <sup>b</sup>	27.79±0.84	26.54±0.68 <sup>b</sup>	0.39±0.02

### 3 讨论

#### 3.1 不同投喂频率对亲虾摄食和生长的影响

亲虾繁殖前需要积累大量营养物质以满足亲虾性腺发育、繁殖、产卵以及幼体正常发育和变态的需要(刘立鹤, 2005)。在苗种生产中, 一般会在亲虾剪眼柄前进行营养强化培育, 用以保证亲虾正常的繁殖活动。经过营养强化培育的亲虾, 由于机体的摄食、消化吸收等机能得到强化, 体内的营养物质得到了较充分的积累, 因此, 体长或体重会有所增加(陈永先, 2012)。营养强化期间, 投喂方法一般分为 2 种, 一种是固定日投饲率法, 另一种是饱食投喂法。当采用固定日投饲率法时, 适当地增加投饲频率可以促进鱼体的生长, 澳大利亚金赤鲷(*Pagrus auratus*)稚鱼和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)稚鱼的 WGR 随着投喂频率的增加而不断增加(Tucker *et al*, 2006; Biswas *et al*, 2010); 但是, 在日投喂量不能满足鱼类生长的营养和能量需求时, 投饲频率的增加反而会抑制生长。这是由于养殖动物的摄食活动会消耗能量, 过高的投喂频率会消耗更多的能量, 从而降低生长速度(王华, 2009)。当采用饱食投喂时, 适当地增加投喂频率能够显著影响水产动物的生长。军曹鱼(*Raehycentron canadum*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的研究表明, 增加投喂频率显著提高了饲料效率, 从而促进鱼体的生长; 在南方鲇(*Silurus meridionalis*)、刺参(*Apostichopus japonicus*)、杂交太阳鱼(*Lepomis gibbosus*)和北极红点鲑(*Salvelinus*

*alpinus*)的研究表明, 增加投喂频率显著提高鱼的摄食率(何利军等, 2013; 王艺超等, 2016; 刘康等, 2010; Omar *et al*, 1987; 何利君等, 2003; Wang *et al*, 1998; Jobling, 1983)。

本研究采用饱食投喂法, 在亲虾繁殖前 30 d 的营养强化培育中, 随着投喂频率的增加, 亲虾的 DFA 逐渐增大, 其中, F2 与 F3 组差异不显著, 但显著低于 F4 组。而亲虾的生长呈先上升后下降的趋势, 但各实验组之间无显著性差异。冒树泉等(2014)研究表明, 在饱食投喂条件下, 许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)幼鱼获得的高生长速度是以较高的摄食量与较低的饲料转化率得来的。本研究不同处理组的 WGR 并没有因为摄食量的逐渐增加而呈显著上升的趋势, 这说明 2 次/d 的摄食量已经满足了亲虾的生长需求, 而且, 投饲频率过高反而使得亲虾忙于摄食和消化, 这样会使得其体内的能量消耗过快, 生长速度就会降低。

#### 3.2 不同投喂频率对亲虾繁殖性能的影响

亲虾的繁殖性能与繁殖期间亲虾体内营养积累以及持续供给的饲料有很大关系(刘立鹤, 2005)。当食物的数量和质量不能很好地满足亲虾性腺发育时, 会极大地影响亲虾的产卵量、胚胎发育和幼体的成活率。目前, 鲜活或冰冻的天然饵料[沙蚕、鱿鱼(*Todarodes pacificus*)、牡蛎(*Ostrea gigas*)、双壳贝类等]一直是亲虾的首选饵料, 其中, 沙蚕是最常用的(Lytle *et al*, 1990; Wouters *et al*, 1999)。纪丽丽等(2008)分析沙蚕

的营养成分表明,其蛋白质含量极高,达到58.65%;体内不饱和脂肪酸质量分数高达62.21%,且EPA和ARA质量分数也较高。这不仅为凡纳滨对虾的生长繁殖提供丰富的营养物质,而且提高了对虾的免疫力和存活率。同时,特殊的呈味氨基酸(天冬氨酸 Asp、精氨酸 Arg、谷氨酸 Glu、甘氨酸 Gly 和丙氨酸 Ala)促进了亲虾的摄食。李爱杰等(1999)研究表明,人工饲养亲虾时,饲料充足则性腺发育较快,不足则发育慢,甚至可能导致发育不良。本研究选用沙蚕为投喂饵料,亲虾的单次产卵量、相对产卵量、无节幼体 I 期个体数、无节幼体孵化率、蚤状幼体 I 期个体数、无节幼体变态率、性腺指数、初产时间和产卵间期在各组之间均无显著差异,这可能是由于研究周期内不论是投喂 2 次/d,还是投喂 3 次/d 及 4 次/d,在一定程度上满足了亲虾繁殖的营养需求。其中,2 次/d 的投喂频率不仅减少了养殖人员的劳动量,降低了养殖成本,而且对亲虾的繁殖性能并没有显著影响。

### 3.3 不同投喂频率对亲虾体组成的影响

本研究结果显示,不同投喂频率对亲虾体组成无显著性影响,表明 2、3、4 次/d 的投喂量适合亲虾的生长,提高投喂频率并不改变虾体的主要营养组成。这与周歧存等(2003)对南美白对虾幼虾的研究结果和宋大焯等(2009)对日本沼虾研究结果一致。投喂频率对鱼类体组成的影响在国内外已有较多研究。杜海明(2007)研究发现,投喂频率显著影响鳃鱼幼鱼的体组成,其蛋白质含量随投喂频率的增加呈先升高后下降的趋势,脂肪含量则逐渐上升,而水分和灰分含量逐渐下降。骆季安等(2007)研究发现,日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)的水分含量随饲喂频率的增高而降低,蛋白质含量随饲喂频率的增加呈先显著增高后下降的趋势,而脂肪含量显著升高。孙晓峰等(2011)对吉富罗非鱼幼鱼(*Oreochromis niloticus*)研究发现,随着投喂频率升高,脂肪和蛋白质含量逐步升高,鱼体水分含量逐渐降低。Baloi 等(2016)研究表明,投喂频率显著影响巴西沙丁鱼(*Sardinella brasiliensis*)脂肪含量,而蛋白和灰分含量无显著差异。Yu 等(2013)对胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)研究表明,随着投喂频率的增加,粗脂肪含量显著增加,而必需氨基酸含量无显著差异。Wu 等(2015)研究表明,随着投喂频率的增加,金鲳鱼(*Trachinotus ovatus*)的粗脂肪含量显著增加,而水分和灰分含量下降。可见,不同的投喂频率对鱼类的营养组成影响较大,对虾的体组成没有显著影响。这可能由于当沙蚕投饲量较适合亲虾生长时,即使提高投喂频率,也不会改变虾体的主要营养组成。

### 3.4 不同投喂频率对亲虾肝胰腺消化酶的影响

本研究表明,不同的投喂频率对凡纳滨对虾亲虾肝胰腺的胃蛋白酶和淀粉酶活力无显著影响,而 3、4 次/d 的胰蛋白酶、脂肪酶活力显著高于 2 次/d。这与在俄罗斯鲟幼鱼(*Acipenser gueldenstaedtii*)、条斑星鲈(*Verasper moseri*)、凡纳滨对虾幼虾阶段上的研究结果相一致,这可能因为投喂频率较高组通过减少单次摄食量达到一定的限食作用,而亲虾在限食条件下食欲会增加,从而提高了消化酶活力(崔超等, 2014; Amiya *et al*, 2012; 陈文霞等, 2013)。而强俊等(2009)等对奥尼罗非鱼仔稚鱼(*Oreochromis niloticus*×*O.aureus*)的研究发现,胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力随投喂频率的升高而显著下降,胰蛋白酶活力无显著差异,许氏平鲷幼鱼(*Sebastes schlegeli*)研究表明,1 次/d 组的胃蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性显著高于 2、3、4 次/d 的实验组(冒树泉等, 2014)。王武等(2007)研究发现,瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)投喂频率较高组虽然日摄食率高,但每次摄食率明显低于投喂频率较低组,因此,其胃和肠蛋白酶活力均较低。不同的投喂频率对消化酶活力的影响还有待进一步的研究。

## 4 结论

综上所述,2、3、4 次/d 这 3 个投喂频率对亲虾的生长、繁殖性能和体组成无显著影响;F2 组的摄食量显著低于 F4 组,但与 F3 组差异不显著。2 次/d 的实验组的胰蛋白酶和脂肪酶活力显著低于 3、4 次/d 的实验组,而不同实验组的胃蛋白酶和淀粉酶活力无显著差异。建议在饱食投喂条件下,凡纳滨对虾亲虾繁殖期间营养强化的适宜投喂频率为 2 次/d。

## 参 考 文 献

- Amiya N, Mizusawa K, Kobayashi Y, *et al*. Food deprivation increases the expression of the prepro-orexin gene in the hypothalamus of the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Zoologicalence*, 2012, 29(1): 43–48
- Baloi M, Carvalho CVA, Sterzelecki FC, *et al*. Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). *Aquaculture Research*, 2016, 47(2): 554–560
- Biswas G, Thirunavukkarasu AR, Sundaray JK, *et al*. Optimization of feeding frequency of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fry reared in net cages under brackishwater environment. *Aquaculture*, 2010, 305(1): 26–31

- Burford MA, Williams KC. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture*, 2001, 198(1–2): 79–93
- Chen YX. The effect of several diets on *Litopenaeus vannamei* broodstock reproductive performance. Master's Thesis of Guangxi University, 2012 [陈泳先. 几种饵料对凡纳滨对虾亲虾繁殖性能的影响. 广西大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Chen WX, Shen YC, Li ZL, *et al.* The effect of feeding frequency on growth, digestive enzymes, immune enzyme and N budget of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Science*, 2013, 37(9): 49–53 [陈文霞, 申玉春, 李再亮, 等. 投喂频率对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫酶活力以及氮收支的影响. *海洋科学*, 2013, 37(9): 49–53]
- Cui C, Yu N, Long LN, *et al.* Effects of feeding frequency on growth, digestive enzymes activities and ammonia excretion of juvenile Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. *Marine Fisheries*, 2014, 36(1): 35–43 [崔超, 禹娜, 龙丽娜, 等. 投喂频率对俄罗斯鲟幼鱼生长、消化酶活力和氨氮排泄的影响. *海洋渔业*, 2014, 36(1): 35–43]
- Du HM. Effect of feeding strategy on feeding growth and biochemical composition of *Elopichthys bahbusa* Richardson juveniles. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 [杜海明. 投喂策略对鳊幼鱼摄食、生长及体成分的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Gershanovich AD, Taufik LR. Feeding dynamics of sturgeon fingerlings (*Acipenseridae*) depending on food concentration and stocking density. *Journal of Fish Biology*, 1992, 41(3): 425–434
- He LJ, Xie XJ, Ai QH. Effects of feeding frequency on feeding rate, growth and feed conversion efficiency for southern catfish, *Silurus meridionalis*. *Acta Hydrobiology Sinica*, 2003, 27(4): 434–436 [何利君, 谢小军, 艾庆辉. 投喂频率对南方鲇的摄食率、生长和饲料转化效率的影响. *水生生物学报*, 2003, 27(4): 434–436]
- Ji LL, Huang XH, Li H, *et al.* Nutrition analysis of nereis in *Penaus vannamei* feed. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2008, 30(4): 63–65 [纪丽丽, 黄翔鹤, 李活, 等. 南美白对虾饲料中沙蚕的营养成分分析. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(4): 63–65]
- Ji WX, Wang Y, Li BY. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus waste output of malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, reared in net pens. *Journal of Zhejiang University (Agricultural and Life Sciences)*, 2011, 37(4): 432–438 [纪文秀, 王岩, 厉珀余. 不同投喂频率对网箱养殖点带石斑鱼生长、食物利用及氮磷排放的影响. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2011, 37(4): 432–438]
- Jobling M. Effect of feeding frequency on food intake and growth of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *Journal of Fish Biology*, 1983, 23(2): 177–185
- Liu K, Wang XJ, Ai QH. Effect of feed frequency on growth, feeding rate and feed conversion rate of *Raehycentron canadum*. *Feed Industry*, 2010, 31(12): 1–3 [刘康, 王小洁, 艾庆辉. 饲料频率对军曹鱼生长、摄食率和饲料转化率的影响. *饲料工业*, 2010, 31(12): 1–3]
- Liu LH. Lipid nutrition and regulation of reproduction of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*, female. Master's Thesis of East China Normal University, 2005 [刘立鹤. 中华绒螯蟹雌体脂质营养及生殖调控研究. 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2005]
- Luo JA, Lou B, Shi HL, *et al.* Effects of feeding frequency on growth and body biochemical composition of *Nibea japonica*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2007, 26(1): 37–40 [骆季安, 楼宝, 史会来, 等. 投喂频率对日本黄姑鱼生长及鱼体生化成分的影响. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2007, 26(1): 37–40]
- Lou B, Shi HL, Mao GH, *et al.* Effects of feeding frequency on growth and body biochemical composition of *Lateolabrax japonicus*. *Journal of Ningbo University (Technical Edition)*, 2007, 20(4): 455–458 [楼宝, 史会来, 毛国民, 等. 投喂频率对鲈鱼生长及体生化成分的影响. *宁波大学学报(理工版)*, 2007, 20(4): 455–458]
- Lytle JS, Lytle TF, Ogle JT. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaus vannamei*. *Aquaculture*, 1990, 89(3–4): 287–299
- Mao SQ, Zou MY, Wang CS, *et al.* Optimal feeding frequency for *Sebastes schlegeli* juveniles. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 2379–2385 [冒树泉, 邹明好, 王春生, 等. 许氏平鲈幼鱼适宜投喂频率的研究. *动物营养学报*, 2014, 26(8): 2379–2385]
- Omar LA, Gunther KD. Studies on feeding of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) in intensive aquaculture. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1987, 57(1): 80–172
- Pan Q, Liu S, Liang GY, *et al.* Effects of feeding frequencies on growth, body composition and nutrient composition of *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 1998, 7(S1): 186–190 [潘庆, 刘胜, 梁桂英, 等. 投喂频率对草鱼鱼种的生长、鱼体和组织营养成分组成的影响. *上海海洋大学学报*, 1998, 7(S1): 186–190]
- Qiang J, Wang H, Li RW, *et al.* Effects of feeding frequencies on the growth, body biochemical composition and digestive enzyme of larvae and juvenile of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2009, 29(4): 79–83 [强俊, 王辉, 李瑞伟, 等. 投喂频率对奥尼罗非鱼仔稚鱼生长、体成分和消化酶活力的影响. *广东海洋大学学报*, 2009, 29(4): 79–83]
- Song DY, Zhang YX, Zhao WH, *et al.* A preliminary study on the effect of different feeding frequencies on *Macrobrachium nipponense*. *Agriculture and Science Technology of Shanghai*, 2009(5): 78–80 [宋大焯, 张余霞, 赵卫红, 等. 不同投喂频率对日本沼虾影响的初步研究. *上海农业科技*, 2009(5): 78–80]
- Sun CJ. Effect of different diets and feeding frequency on the

- feeding, growth, muscle composition and digestive enzyme activities of juvenile *Elopichthys bambusa*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 [孙存军. 饵料类型和投喂频率对鳊幼鱼摄食、生长、肌肉成分和消化酶活力的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Sun LH, Wang JY, Ding LY, *et al.* Effects of feeding frequency on growth and body composition of juvenile *Platichthys stellatus*. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(2): 190–195 [孙丽慧, 王际英, 丁立云, 等. 投喂频率对星斑川鲷幼鱼生长和体组成影响的初步研究. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 190–195]
- Sun XF, Feng J, Chen JH, *et al.* Effects of feeding frequency on gastric evacuation, growth benefit and body composition of juvenile genetic improved farmed tilapia strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1667–1773 [孙晓峰, 冯健, 陈江虹, 等. 投喂频率对尼罗罗非鱼幼鱼胃排空生长性能及体组成的影响. 水产学报, 2011, 35(11): 1167–1673]
- Tucker BJ, Booth MA, Allan GL, *et al.* Effects of photoperiod and feeding frequency on performance of newly weaned Australian snapper *Pagrus auratus*. Aquaculture, 2006, 258(1): 514–520
- Tycjer BJ, Booth MA, Allan GL, *et al.* Effects of photoperiod and feeding frequency on performance of newly weaned Australian snapper *Pagrus auratus*. Aquaculture, 2006, 258(1): 514–520
- Wang H. The effect of feeding regime on *Cynoglossus semilaevis* Günther and the building of feeding mathematical model. Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences University (Institute of Oceanology), 2009 [王华. 投喂策略对工厂化养殖半滑舌鳎的效应特征与投喂模型构建. 中国科学院研究生院 (海洋研究所) 硕士研究生学位论文, 2009]
- Wang N, Hayward RS, Noltie DB. Effect of feeding frequency on food consumption, growth, size variation, and feeding pattern of age-0 hybrid sunfish. Aquaculture, 1998, 165(3): 261–267
- Wang W, Zhou XX, Ma XZ, *et al.* Effect of feeding frequency on the growth and protease activities of *Pelteobagrus vachelli*. Journal of Shanghai Ocean University, 2007, 16(3): 224–229 [王武, 周锡勋, 马旭洲, 等. 投喂频率对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长及蛋白酶活力的影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(3): 224–229]
- Wang XW, Zhang ZP, Wang YL, *et al.* Research progress on regulation mechanism of ovary development in shrimps and crabs. Biotechnology Bulletin, 2013(7): 29–35 [王晓伟, 张子平, 王艺磊, 等. 虾蟹类卵巢发育调节机制研究进展. 生物技术通报, 2013(7): 29–35]
- Wang YC, Liang MQ, Zheng KK. Effects of different ration levels on growth, activities of digestive enzymes and immunity-related enzymes in *Apostichopus japonicus* Selenka. Progress of Fishery Science, 2016, 37(1): 87–92 [王艺超, 梁萌青, 郑珂珂. 不同投喂水平对刺参 (*Apostichopus japonicus* Selenka) 生长、消化酶及免疫相关酶活性的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 87–92]
- Wouters R, Gomez L, Lavens P, *et al.* Feeding enriched Artemia biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: Its effect on reproductive performance and larval quality. Journal of Shellfish Research, 1999, 18(2): 651–656.
- Wu YB, Han H, Qin JG, *et al.* Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, body composition and waste output of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) reared in net pens. Aquaculture Research, 2015, 46(6): 1436–1443
- Ye L, Lin HZ, Li ZJ, *et al.* The effect of feeding frequency on growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and water quality. South China Fisheries Science, 2005, 1(4): 55–59 [叶乐, 林黑着, 李卓佳, 等. 投喂频率对凡纳滨对虾生长和水质的影响. 南方水产, 2005, 1(4): 55–59]
- Yu DH, Gong SY, Yuan YC, *et al.* Effect of partial replacement of fish meal with soybean meal and feeding frequency on growth, feed utilization and body composition of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus* (Bleeker). Aquaculture Research, 2013, 44(3): 388–394
- Zhou QC, Zheng SX, Gao L, *et al.* Preliminary study on the effects of feeding frequency on growth, feed utilization and body composition of *Penaeus vannamei* Boone. Transactions of Oceanology and Limnology, 2003(2): 64–68 [周歧存, 郑石轩, 高雷, 等. 投喂频率对南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 生长、饲料利用及虾体组成影响的初步研究. 海洋湖沼通报, 2003(2): 64–68]
- Zhang YL, Luo K, Kong J, *et al.* A comparative study on growth and gonadal development of *Litopenaeus vannamei* broodstock fed different formulated feeds. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 306–316 [张玉玲, 罗坤, 孔杰, 等. 饲料中添加南极磷虾粉对凡纳滨对虾亲虾生长、性腺发育及脂肪酸积累的影响. 中国水产科学, 2017, 24(2): 306–316]

## Optimum Feeding Frequency for *Litopenaeus vannamei* During the Breeding Period

WANG Chunling<sup>1,3</sup>, LIANG Mengqing<sup>2,3</sup><sup>①</sup>, XU Houguo<sup>2,3</sup>

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

**Abstract** A study was conducted to investigate the effect of feeding frequency on growth, reproductive performance, body composition and digestive enzyme of broodstock *Litopenaeus vannamei*. Experimental broodstock were fed with *Nereis succinea* for 60 days. Before the start of the experiment, the unilateral eye socket of each broodstock was placed on the eye as an individual marker and the initial body length and weight of each female were determined. The average initial body weight was 41.78 g and the average initial body length was 15.80 cm. The broodstock were randomly divided into three round pools, each with 40 shrimps. Three groups of broodstock were fed to satiation in two times per day, three times per day and four times per day, which were represented by F2, F3 and F4 groups, respectively. Results showed that the feeding amount of broodstock increased gradually with the increase of feeding frequency, and the F2 group was significantly lower than that in group F4 ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference between the F3 group and the F2 group ( $P>0.05$ ). The weight gain and body length growth of broodstock increased first and then decreased with the increase of feeding frequency, but there was no significant differences among treatments ( $P>0.05$ ). Reproductive performances of *Litopenaeus vannamei* were not affected by different feeding frequency in current study ( $P>0.05$ ). There were no significant differences in single fecundity, relative fecundity, the number of nauplius stage I, hatching rate, the number of zoea stage metamorphosis rate (N1-Z1), gonadosomatic index(GSI), first spawning time and the spawning intervals ( $P>0.05$ ). The body composition of *Litopenaeus vannamei* including moisture, crude protein, crude Lipid and ash were not affected by feeding frequency ( $P>0.05$ ). The results showed that the activity of trypsin and lipase of hepatopancreas in the F2 group was significantly lower than that in the F3 and F4 groups ( $P<0.05$ ), but there was no significant differences among the activity of pepsin and amylase in different experimental groups ( $P>0.05$ ). Based on the results of this experiment and the actual production conditions, the optimum feeding frequency of nutrient fortification in *Litopenaeus vannamei* broodstock is suggested to be 2 times per day.

**Key words** Feeding frequency; Growth; Reproductive performance; Digestive enzyme activity; Broodstock *Litopenaeus vannamei*

① Corresponding author: LIANG Mengqing, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20170426001

http://www.yyxxjz.cn/

程东远, 邱亮, 宋增磊, 万晓媛, 董宣, 谢国驹, 黄捷. 凡纳滨对虾感染虾肝肠胞虫的群体及组织间差异性分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 83-92

Cheng DY, Qiu L, Song ZL, Wan XY, Dong X, Xie GS, Huang J. Differences between populations and tissues of *Litopenaeus vannamei* infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 83-92

# 凡纳滨对虾感染虾肝肠胞虫的群体 及组织间差异性分析\*



程东远<sup>1,2</sup> 邱亮<sup>1,2</sup> 宋增磊<sup>1,2</sup> 万晓媛<sup>1</sup>  
董宣<sup>1</sup> 谢国驹<sup>1</sup> 黄捷<sup>1,2①</sup>

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 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** 对来自河北黄骅(HH)、山东平度(PD)、江苏吴江(WJ)和山东日照(RZ)的 4 个凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 群体进行了对虾生长参数测量, 用 TaqMan qPCR 检测了凡纳滨对虾各群体的肝胰腺组织中和 RZ 群体多种组织中的虾肝肠胞虫数量(Amount of *Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)。结果显示, 在主要生长相关参数中, RZ 群体最优, 该群体 EHP 载量也最低。不同群体的样本数 EHP 对数直方图的模式存在差异, HH 和 PD 群体的 EHP 对数呈双峰分布, 而 WJ 和 RZ 群体的 EHP 对数呈单峰分布, 代表 EHP 在不同群体中可能存在不同的传播模式。EHP 对数呈单峰分布的群体或从多峰分布的群体中分离出的高 EHP 对数子群体的对虾体长或体重与 EHP 对数呈显著的负相关。RZ 群体中, 各个体不同组织中 EHP 从高到低的顺序依次是肝胰腺>中肠>血淋巴>鳃>肌肉。肝胰腺、中肠和鳃 3 个组织中 EHP 对数相互间的相关性为 99.9%的极显著水平( $P<0.001$ ); 除了中肠与血淋巴和肝胰腺与血淋巴以外, 其余组织间 EHP 对数的相关性也达到极显著( $P<0.01$ )或显著( $P<0.05$ )水平。用 DIG 标记的 EHP 探针对于肝胰腺、肌肉、鳃、肠道组织的原位杂交显示, 肝胰腺是主要的 EHP 感染组织, 其他组织中杂交信号较弱, 但各组织中有少数细胞的 EHP 易感。

**关键词** 凡纳滨对虾; 虾肝肠胞虫; 生长参数; 原位杂交

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0083-10

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 菌界(Fungi)、微孢子虫门(Microsporidia)、单倍期纲是泰国 Tourtip 等(2009)描述的微孢子虫新种, 属于真 (Haplophasea)、壶孢目(Chytridiopsida)、肠胞虫科

\* 中国东盟海上合作基金项目(2016-2018)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山科技创新项目(2015ASKJ02)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、948 计划(2016-X56)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016-2018), Project of the Aoshan Science and Technology Innovation Program of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), China Agriculture Research System (CARS-47), 948 Program (2016-X56), and the Construction Programme for Distinguished Taishan Scholars of Shandong Province of China]. 程东远: E-mail: cheng\_dong\_yuan@163.com

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

收稿日期: 2017-04-26, 收修改稿日期: 2017-06-01

(Enterocytozoonidae)、肠胞虫属 (*Enterocytozoon*) (鲁兴萌等, 1999; Samtom, 2001; Tang *et al.*, 2015), 严格细胞内寄生(Lom *et al.*, 2002; Phelps *et al.*, 2007)。自 2003 年以来, 泰国养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*) 出现生长缓慢综合征(MSGS), 造成了严重的经济损失(Chayaburakul *et al.*, 2004)。Tourtip 等(2009)在生长缓慢的斑节对虾肝胰腺中检测到 EHP, 但感染 EHP 在组织病理学上难以诊断, 重度感染的对虾肝胰腺在常规的苏木精-伊红染色下, 很难观察到特征性的病理变化, 而通过原位杂交则能显示凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)感染 EHP 后, 其肝胰腺小管上皮细胞中存在明显杂交信号(Tang *et al.*, 2015)。感染 EHP 的凡纳滨对虾肝胰腺、粪便及养殖对虾水体能经 PCR 检测检出 EHP 阳性(Han *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016; Rajendran *et al.*, 2016), 其肝胰腺、鳃、血淋巴、肠、心脏、肌肉组织也均可检测到 EHP 阳性(Han *et al.*, 2016; Santhoshkumar *et al.*, 2016; 骆云慧等, 2016), 但不同组织中 EHP 载量的差异及相互关系还不明确。

中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室检测发现, 在我国养殖凡纳滨对虾中, 自 2013 年起有很高的 EHP 阳性率, 刘珍等(2016)建立了 EHP 的 SYBR Green I 实时荧光定量检测方法。对 3 批凡纳滨对虾样品检测表明, EHP 与对虾生长率呈一定的负相关关系, 肝胰腺中 EHP 在  $10^3$  copies/ng DNA 以上可能代表较高的风险。而 EHP 载量较低时, 则 EHP 感染与对虾生长的相关性尚不明确。目前, 对 EHP 的检测多以肝胰腺为目标组织, 其他组织 EHP 检测有效性不明。因此, 本研究对不同自然感染的凡纳滨对虾群体的 EHP 与生长相关性开展进一步研究, 并对不同组织 EHP 载量的差异进行定量检测和原位杂交验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物来源

于 2016 年 6 月 26 日、7 月 20 日、9 月 14 日和 9 月 20 日自河北黄骅(HH)、山东平度(PD)、江苏吴江(WJ)和山东日照(RZ) 4 个凡纳滨对虾养殖场分别

采集放苗养殖 40~80 d 的凡纳滨对虾样品共 274 尾(表 1)。其中, HH 群体养殖时间为 54 d, PD 群体养殖时间为 60 d, WJ 群体养殖时间为 40 d, 3 个群体均表现为生长缓慢, 个体差异较大; RZ 群体养殖时间为 80 d, 在 4 个群体中养殖期最长, 生长接近正常。

上述 HH、PD 和 WJ 群体样品为现场取样, 保存于 3 倍体积的 95%乙醇中, 带回实验室进行体长( $L$ )和体重( $W$ )测量。RZ 群体凡纳滨对虾装于塑料袋中, 充纯氧后运送至实验室, 经暂养后, 抽取对虾血淋巴至 1.5 ml 离心管中, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。将对虾沿中线剖为两半, 一半用置于 Davideson's AFA 固定液(Bell *et al.*, 1998)中固定 24 h, 再保存于 70%乙醇中; 另一半分别取凡纳滨对虾的整个肝胰腺、中肠、第 1 腹节肌肉、鳃丝, 置于 1.5 ml 离心管中, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.2 群体生长相关参数计算方法

为了对不同放苗时间的各群体进行生长比较, 根据各群体放苗后的养殖天数( $T$ ), 假定放苗时平均体长( $L_0$ )为 1 cm, 并用体重指数  $P_i=W \times L^{-3}$  的关系估计放苗时平均体重( $W_0$ ), 推算各群体的体长日增长率(Daily growth rate of length, DGL, %/d)和体重的日增长率(Daily growth rate of weight, DGW, %/d)。公式如下:

$$\text{DGL} = (L - L_0) / (L_0 \times T) \times 100\%$$

$$\text{DGW} = (W - W_0) / (W_0 \times T) \times 100\%$$

### 1.3 样品核酸提取

将乙醇保存的样品倒去乙醇, 用无 RNase 水冲洗后充分研磨;  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存的样品置于冰上融化后充分研磨。取 30 mg 研磨匀浆液, 用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取 DNA。用核酸分析仪(Nanodrop 2000c, Thermo Scientific)进行浓度测定, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.4 EHP 定量标准制备

取实验室制备的 EHP 标准重组质粒菌株(Liu *et al.*, 2017), 接种到 1 ml LB 液体培养基中(含氨苄青霉素  $100 \mu\text{g/ml}$ ),  $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 4~5 h, 再按 1% 的量接种到 5 ml LB 培养基。置于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养

表 1 对虾群体样品采集信息

Tab.1 The sampling information of shrimp populations

项目 Items	对虾群体 Shrimp populations			
	河北黄骅(HH) Huanghua, Hebei	山东平度(PD) Pingdu, Shandong	江苏吴江(WJ) Wujiang, Jiangsu	山东日照(RZ) Rizhao, Shandong
养殖时间 Cultivated time (d)	54	60	40	80
样本数量 Shrimp number (ind.)	54	42	132	48

箱中, 200 r/min 摇瓶培养约 12 h。取 4 ml 培养液, 用 Mini BEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0(TaKaRa, 大连)质粒小提试剂盒按说明书方法提取质粒, 所提取质粒溶解在 50  $\mu$ l Elution Buffer 中。用核酸分析仪 (Nanodrop 2000c, Thermo)测定提取质粒样品的核酸浓度, 计算质粒拷贝数。按 10 倍梯度稀释成  $10^8 \sim 10^0$  copies/ $\mu$ l 的梯度作为 TaqMan qPCR 标准品。

### 1.5 EHP 的 TaqMan qPCR 检测

采用 Liu 等(2017)建立的 TaqMan 实时荧光定量检测方法进行 EHP 定量检测。定量所用引物和探针序列分别为 F168 (5'-AGT AAA CTA TGC CGA CAA-3')、R168 (5'-GCG TTG AGT TAA ATT AAG C-3')和 TaqMan 探针(5'-FAM-TCC TGG TAG TGT CCT TCC GT-TAMRA-3')。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 实时荧光定量反应体系为 20  $\mu$ l 包含 10  $\mu$ l 2 $\times$  Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Probe qPCR 体系 (TaKaRa, 大连), 0.8  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 引物 F186, 0.8  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 引物 R186, 0.4  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L TaqMan 探针, 7  $\mu$ l 无 RNase 水, 1  $\mu$ l 模板 DNA。扩增反应在实时荧光定量 PCR 仪(CFX96, BIO-Rad)中进行, 反应扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性后, 95 $^{\circ}$ C 5 s 和 60 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 40 个循环后终止反应。

### 1.6 EHP 原位杂交用 DIG 探针制备

根据 GenBank 中的 EHP SSU rDNA (KF362129) 序列, 用 Primer Premier 5.0 设计了原位杂交探针合成引物, Probe-F (5'-AGC CAT TGA GTT TGT TGA-3') 和 Probe-R (5'-TTT CGC CTC CGT TG-3'), 引物序列送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增产物为 144 bp。在 50  $\mu$ l 反应体系中, 包含 0.25  $\mu$ l Ex Taq version 2.0 (TaKaRa, 大连), 5  $\mu$ l 10 $\times$ Buffer (TaKaRa, 大连), 3  $\mu$ l 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ l DIG-dNTP Mix (Roche, 上海), 2  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 引物 Probe-F, 2  $\mu$ l

10  $\mu$ mol/L 引物 Probe-R, 31.75  $\mu$ l 无 RNase 水, 1  $\mu$ l DNA 模板。反应在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 于 94 $^{\circ}$ C 30 s, 47 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 2 min 延伸。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.7 原位杂交

原位杂交基本按照 Bruce 等(1993)的方法进行。Davidson's AFA 固定后的组织样品经脱水、透明和石蜡包埋, 制备 4  $\mu$ m 石蜡切片, 于 65 $^{\circ}$ C 烘片 4 h, 切片复水处理, 经 10  $\mu$ g/ml 蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min, 再经 0.4%预冷的甲醛固定 5 min。于 42 $^{\circ}$ C 进行预杂交 30 min, 与 DIG 标记探针于 42 $^{\circ}$ C 杂交 12 h, 经漂洗和封闭后, 用 1:1000 碱性磷酸酶偶联的抗 DIG 抗体(Roche, 上海)于 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 再经漂洗后, 用 NBT/BCIP 避光显色 2~3 h, 终止后用 0.5% Bismarck Brown Y 复染, 经脱水、透明和封片, 在显微镜下观察。

### 1.8 数据分析

相关性分析采用 Microsoft Excel 的数据分析加载项计算数据间相关系数( $R$ ), 根据不同样本数和不同显著性水平的相关系数临界值, 判断相关性的显著性水平。未特别注明的, 以  $P < 0.05$  为显著差异水平, 以  $P < 0.01$  为差异极显著水平。

## 2 结果

### 2.1 凡纳滨对虾群体生长特征

对各群体进行体长和体重测量(表 2)。4 个群体体长差异从大到小依次为 PD>HH>RZ>WJ, 体长日增长率从小到依次依次为 WJ<HH<PD~RZ, 其中, WJ, HH 和 PD 群体差异显著( $P < 0.05$ ), PD 和 RZ 群体无显著差异( $P > 0.05$ )。从体重测量数据来看, 4 个群体体重差异从大到小依次为 RZ>PD>HH>WJ, 体重日

表 2 对虾群体样品生物学信息

Tab.2 The biological information of samples from shrimp populations

项目 Items	对虾群体 Shrimp populations			
	黄骅群体 HH	平度群体 PD	吴江群体 WJ	日照群体 RZ
体长 Body length (cm)	4.59 $\pm$ 0.93	5.90 $\pm$ 1.05	2.35 $\pm$ 0.46	7.95 $\pm$ 0.88
体长日增长率 Length daily growth rate (%/d)	6.60 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	8.20 $\pm$ 1.80 <sup>b</sup>	3.40 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup>	8.70 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>
体重 Body weight (g)	1.06 $\pm$ 0.71	2.09 $\pm$ 1.09	0.20 $\pm$ 0.10	5.29 $\pm$ 1.63
体重日增长率 Weight daily growth rate (%/d)	2.00 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	3.60 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	6.40 $\pm$ 2.00 <sup>d</sup>
体重指数 Ponderal index ( $\times 10^{-3}$ g/cm <sup>3</sup> )	9.67 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	9.67 $\pm$ 2.30 <sup>ac</sup>	14.72 $\pm$ 3.64 <sup>b</sup>	10.26 $\pm$ 0.84 <sup>c</sup>

注: 标注不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ )

Note: Data in the same line marked with different lowercases means significant difference ( $P < 0.05$ )



增长率从小到大依次为 WJ<HH<PD<RZ。从体重指数来看, 体重指数差异从大到小依次是 WJ>PD>HH>RZ。

2.2 不同群体中 EHP 的 TaqMan qPCR 检测

对 4 个凡纳滨对虾群体样品进行实时荧光定量检测。结果显示, 4 个凡纳滨对虾群体样品肝胰腺中 EHP 载量和阳性率各不相同(表 3)。HH 群体阳性检出率为 77.8%, 考虑到 qPCR 的灵敏度, 将阴性样品的 EHP

对数值归零, 得 4 个群体中阳性率从高到低顺序分别为 WJ>RZ>PD>HH, 总平均 EHP 对数从高到低的顺序是 PD~WJ>HH~RZ, 其中, PD 与 WJ 无显著差异, HH 和 RZ 无显著差异, PD、WJ 群体与 HH、RZ 群间差异显著。

2.3 各群体 EHP 的分布特征

对 4 个群体 EHP 对数的分布进行分析(图 1)。结果显示, HH 群体的 EHP 对数分布为 0.11~3.42, 呈

表 3 4 个养殖凡纳滨对虾群体中肝胰腺 EHP 检出情况  
Tab.3 EHP detection in hepatopancreas from 4 populations of farmed *L. vannamei*

项目 Items	对虾群体 Shrimp populations			
	黄骅群体 HH	平度群体 PD	吴江群体 WJ	日照群体 RZ
EHP 范围 Range of EHP (copies/ng DNA)	10 <sup>0.11</sup> ~10 <sup>3.42</sup>	10 <sup>0.88</sup> ~10 <sup>5.88</sup>	10 <sup>0.52</sup> ~10 <sup>4.40</sup>	10 <sup>0.19</sup> ~10 <sup>2.62</sup>
EHP 对数 Log(EHP)	1.40±1.11 <sup>a</sup>	2.95±1.81 <sup>b</sup>	2.84±0.63 <sup>b</sup>	1.18±0.76 <sup>a</sup>
阳性率 Positive percentage (%)	77.8	88.1	98.5	95.8

EHP 指每 ng 组织总 DNA 中 EHP SSU rDNA 拷贝数, 下表同  
EHP means copies of EHP SSU rDNA per ng tissue total DNA, the same as below

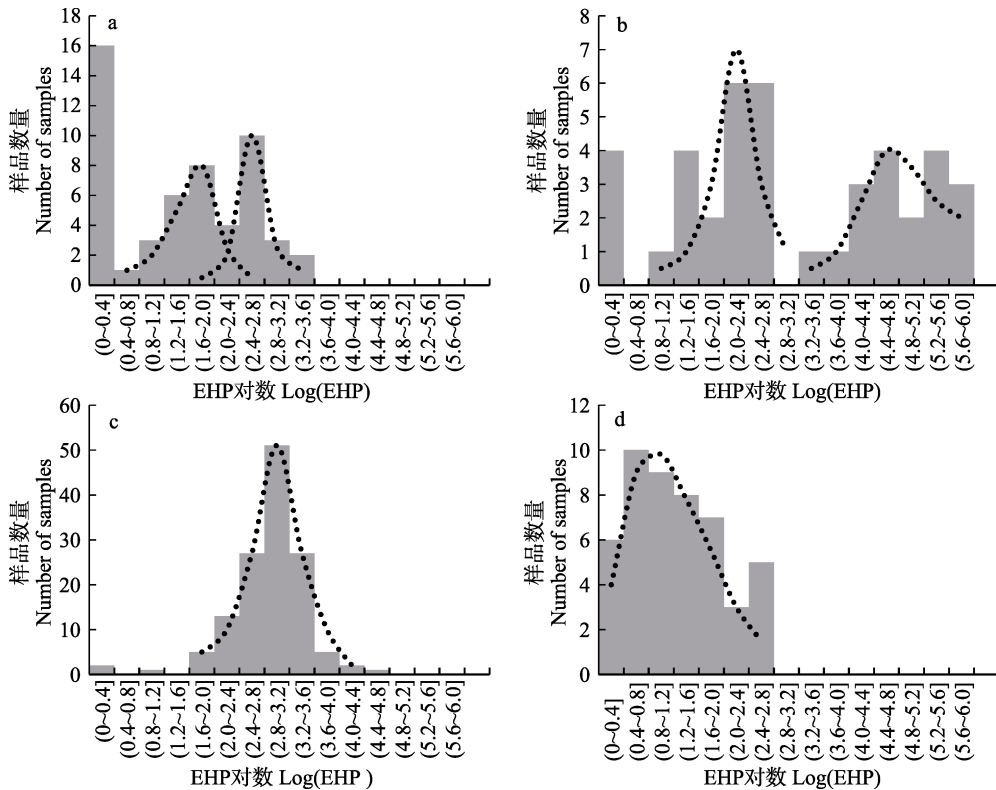


图 1 各群体感染 EHP 水平的分布  
Fig.1 Distribution of quantity of EHP infection in different populations

a: 黄骅群体; b: 平度群体; c: 吴江群体; d: 日照群体。

EHP 指每 ng 组织总 DNA 中 EHP SSU rDNA 拷贝数。灰色方块为实际样本数统计, 黑色虚线为分布趋势  
a: HH; b: PD; c: WJ; d: RZ.

EHP means copies of EHP SSU rDNA per ng tissue total DNA, the same as below. Gray blocks are based on actual statistics, while dotted black lines show distribution trends

近正态分布,但在分布中的值为 2.0~2.4 范围内的数量降低,其分布呈 2 个有所重叠的双峰状态(图 1a); PD 群体的阳性样本的 EHP 对数分布为 0.88~5.88,但分布峰值为 0.8~2.8 和 3.2~6.0 2 个完全分离的区域(图 1b); WJ 群体的阳性样本的 EHP 对数分布在 0.52~4.40 范围,为标准的正态分布,在 2.8~3.2 位置呈单峰值(图 1c); RZ 群体阳性样本的 EHP 对数分布为 0.19~2.62,呈类泊松分布,峰值位于 0.4~0.8 位置(图 1d)。从主要样本的 EHP 分布范围的宽度来看,PD>HH>RZ>WJ, WJ 和 RZ 群体中,各个体的 EHP 感染水平较为接近,而 PD 和 HH 群体中,各个体的 EHP 感染水平差异大。

#### 2.4 不同群体 EHP 与生长参数的相关性

分别对 4 个群体凡纳滨对虾肝胰腺 EHP 对数与对虾的体长、体重和体重指数等生长参数进行线性相关性分析(表 4)。

HH 群体样品数量  $n=54$ ,显著相关  $R_{0.05}=\pm 0.268$ , EHP 对数与体长、体重和体重指数的相关性均无 95% 的显著性意义,其中, EHP 对数与体重指数  $R=0.2155$ ,介于  $R_{0.2}=0.177$  和  $R_{0.1}=0.226$  之间,达到 80% 显著性水平。根据该群体 EHP 双峰分布,将其分为 EHP 低的子群 HH1 ( $n=32$ ) 和 EHP 高的子群 HH2 ( $n=22$ ), HH2 的 EHP 对数与体长和体重的相关系数分别为  $-0.452$  和  $-0.517$ ,均达到了显著相关水平( $R_{0.05}=0.423, P<0.05$ ) (图 2a 和图 2b)。

PD 群体样品数量  $n=42$ ,显著相关  $R_{0.05}=\pm 0.304$ , EHP 对数与体长、体重和体重指数均无显著相关,其中, EHP 对数与体长和体重相关系数分别为  $-0.2174$  和  $-0.2280$ ,介于  $R_{0.1}=-0.257$  和  $R_{0.2}=-0.202$  之间,负相关性具有 80% 显著性水平( $P<0.01$ )。根据该群体 EHP 双峰分布,将该群体分为 EHP 低的子群 PD1 ( $n=22$ ) 和 EHP 高的子群 PD2 ( $n=20$ ), PD2 的 EHP 对数与体

长和体重的相关系数分别为  $-0.377$  和  $-0.467$ ,体重相关性达到  $R_{0.05}=-0.444$  的 95% 显著性水平( $P<0.05$ ),体长相关性接近 90% 显著性水平(图 2c 和图 2d)。

WJ 群体样品数量  $n=132$ ,显著相关  $R_{0.05}=\pm 0.171$ , EHP 对数与 3 个生长指数的相关系数均未达到 95% 的显著性水平( $P>0.05$ ),其中, EHP 对数与体重的相关系数  $R=-0.1635<R_{0.1}=-0.144$ ,具有 90% 的显著性水平( $P<0.01$ ) (图 2e 和图 2f)。

RZ 群体样品数量  $n=48$ ,显著相关  $R_{0.05}=\pm 0.285$ ,其中, EHP 对数与对虾体长  $R=-0.2949$ ,表明该群体的 EHP 与体长存在显著负相关性( $P<0.05$ ), EHP 与体重的相关系数为  $R=-0.2782<R_{0.1}=-0.240$ ,负相关性具有 90% 的显著性水平( $P<0.01$ ), EHP 与体重指数的系数  $R=-0.1909<R_{0.2}=-0.188$ ,负相关性具有 80% 的显著性水平( $P<0.2$ ) (图 2g 和图 2h)。

#### 2.5 不同组织中 EHP 的 TaqMan qPCR 检测

分别对 RZ 群体样品的肝胰腺、肠道、肌肉、血淋巴和鳃 5 种组织进行实时荧光定量检测,检测结果显示,该群体 5 种组织中 EHP 载量各不相同,且 5 种组织中 EHP 阳性率也有差异(表 5)。其中,肝胰腺的 EHP 最高,阳性率也最高;其次是中肠, EHP 对数是肝胰腺的 84.1%;再次是血淋巴, EHP 对数是肝胰腺的 76.2%;鳃 EHP 对数是肝胰腺的 62.7%,其阳性率最低;肌肉的 EHP 对数是肝胰腺的 15.1%。

#### 2.6 不同组织间 EHP 载量的关系

对 RZ 群体各个体的 5 种组织中的 EHP 对数进行组织间的相关性分析(表 6)。根据 RZ 群体的 48 个样品,确定 95.0%、99.0%、99.5% 和 99.9% 的显著性水平的相关系数  $R_{0.05}$  分别为 0.285、0.368、0.399 和 0.460。相关性分析表明,不同组织之间的 EHP 均有正相关趋势,从  $R$  值大小来判断,肝胰腺、中肠和鳃

表 4 4 个养殖凡纳滨对虾群体中肝胰腺 EHP 与生长指标的相关性分析

Tab.4 Correlation analysis between EHP in hepatopancreas and growth indexes of 4 populations of farmed *L. vannamei*

相关系数 Correlation index		EHP 对数 Log(EHP)							
		HH ( $n=54$ )	HH1 ( $n=32$ )	HH2 ( $n=22$ )	PD ( $n=42$ )	PD1 ( $n=22$ )	PD2 ( $n=20$ )	WJ ( $n=132$ )	RZ ( $n=48$ )
体长	Body length (cm)	0.146	-0.073	-0.452 <sup>0.05</sup>	-0.217	-0.208	-0.377 <sup>0.1</sup>	-0.083	-0.295 <sup>0.05</sup>
体重	Weight (g)	0.074	-0.151	-0.517 <sup>0.02</sup>	-0.228	-0.223	-0.467 <sup>0.05</sup>	-0.164 <sup>0.1</sup>	-0.278 <sup>0.1</sup>
体重指数	Ponderal index (g)	0.216	0.109	-0.126	0.054	0.175	0.152	-0.047	0.191

注:标注 0.02 的数据表示有 98% 的显著相关性( $P<0.02$ ),标注 0.05 的数据表示有 95% 的显著相关性( $P<0.05$ ),标注 0.1 的数据表示相关的显著性水平达到 90% ( $P<0.1$ ),未标注数据表示无显著性差异( $P>0.1$ )

Note: Data marked with 0.02 means 98% significant relationship ( $P>0.02$ ); data marked with 0.05 means 95% significant relationship ( $P>0.05$ ); data marked with 0.1 means 90% significant relationship ( $P<0.1$ ); data without superscript means no significant relationship ( $P>0.1$ )

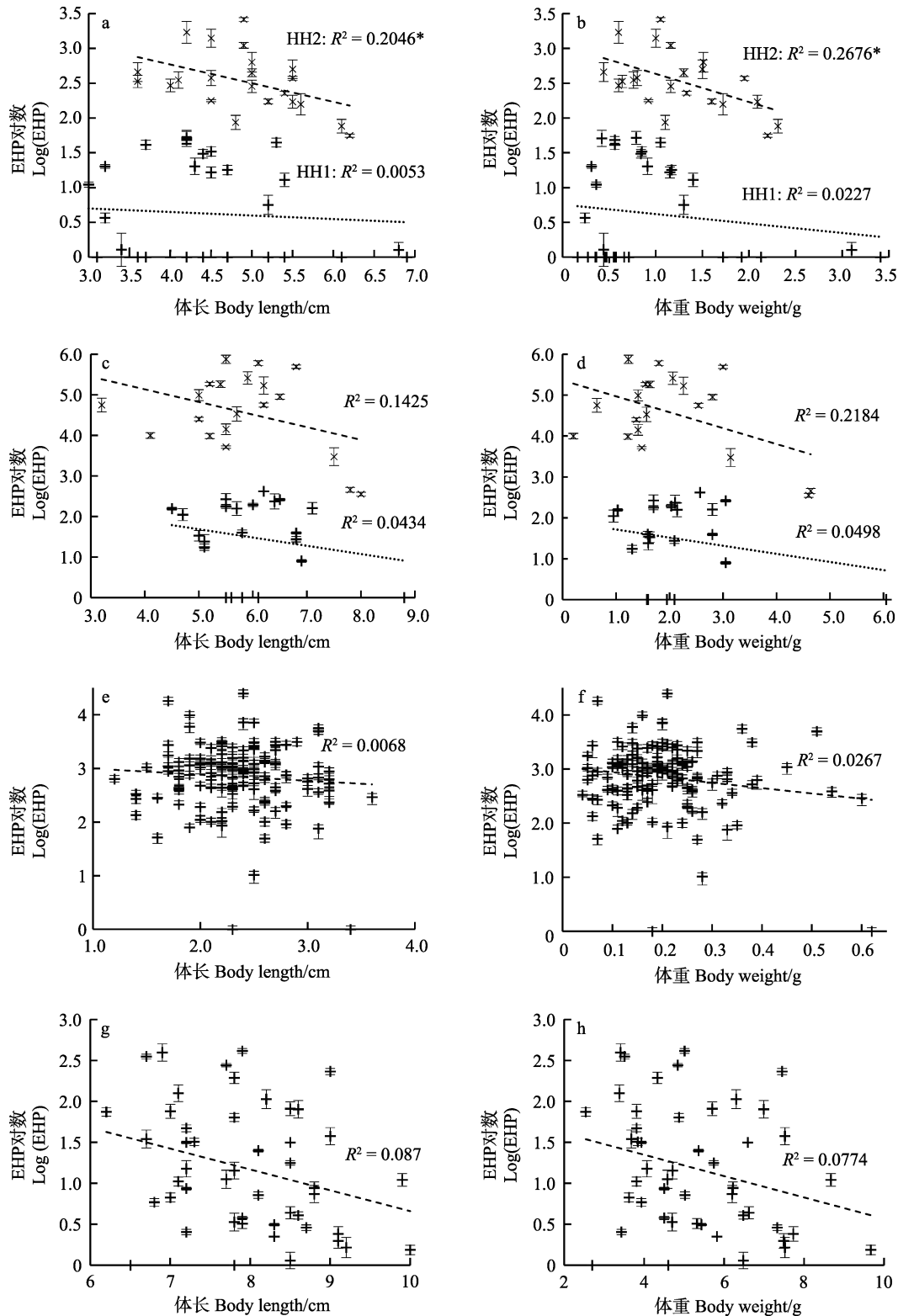


图 2 4 个养殖凡纳滨对虾群体中肝胰腺 EHP 与体长和体重的相关性

Fig. 2 Correlation of logarithmic EHP in hepatopancreas to body length and body weight of 4 populations of farmed *L. vannamei*

a, b: HH 群体; c, d: PD 群体; e, f: WJ 群体; g, h: RZ 群体; 标注\*为 95%显著相关性( $P < 0.05$ )

a, b: Population HH; c, d: Population PD; e, f: Population WJ; g, h: Population RZ;

Data marked with \* means 95% significant correlation ( $P < 0.05$ )

表 5 RZ 群体凡纳滨对虾各组织中 EHP 载量和阳性率  
Tab.5 The detection of EHP from the tissue of RZ population of *L. vannamei*

组织 Tissues	肝胰腺 Hepatopancreas	中肠 Midgut	肌肉 Muscle	血淋巴 Emolymph	鳃 Gills
EHP 对数 Log(EHP)	1.26±0.72	1.06±0.65	0.19±0.16	0.96±0.50	0.79±0.47
阳性率 Positive percentage(%)	95.00	79.00	40.00	67.00	38.00

表 6 不同组织 EHP 对数间的相关性  
Tab.6 Relationship of logarithmic EHP between different tissues

组织间 Tissues	肝胰腺 Hepatopancreas	中肠 Midgut	肌肉 Muscle	血淋巴 Hemolymph	鳃 Gills
肝胰腺 Hepatopancreas	1	0.4702 <sup>0.001</sup>	0.3872 <sup>0.05</sup>	0.2401	0.6735 <sup>0.001</sup>
中肠 Midgut		1	0.4301 <sup>0.005</sup>	0.3041 <sup>0.05</sup>	0.5169 <sup>0.001</sup>
肌肉 Muscle			1	0.3041 <sup>0.05</sup>	0.3927 <sup>0.01</sup>
血淋巴 Hemolymph				1	0.1329
鳃 Gills					1

注: 标注 0.001 的数据表示有 99.9% 的极显著相关性 ( $P < 0.001$ ), 标注 0.005 的数据表示有 99.5% 的极显著相关性 ( $P < 0.005$ ), 标注 0.01 的数据表示有 99.0% 的极显著相关性 ( $P < 0.01$ ), 标注 0.05 的数据表示有 95.0% 的显著相关性 ( $P < 0.05$ )

Note: Data marked with 0.001 means 99.9% highly significant relationship ( $P < 0.001$ ); data marked with 0.005 means 99.5% highly significant relationship ( $P < 0.005$ ); data marked with 0.01 means 99.0% highly significant relationship ( $P < 0.01$ ); data marked with 0.05 means 95.0% significant relationship ( $P < 0.05$ )

3 种组织相互之间的 EHP 对数相关性最强, 超过 99.9% 的显著性水平, 其他依次为肠道与肌肉、鳃与肌肉、肝胰腺与肌肉、肌肉与血淋巴、肠道与血淋巴等组织之间的 EHP 对数, 这些均有极显著相关性; 肝胰腺与血淋巴和鳃与血淋巴的 EHP 对数的相关性没有达到 95.0% 的显著性水平。

## 2.7 不同组织中 EHP 的感染情况

取 RZ 群体不同组织进行原位杂交。结果显示, EHP 阴性样品没有杂交信号, EHP 阳性样品表现出杂交信号, 对照样品没有出现任何杂交信号, 表明所用的 EHP 探针杂交特异性良好。肝胰腺、肌肉、鳃、中肠中均可观察到杂交信号, 在这些组织中, 肝胰腺组织切片杂交信号最多且较强, 视野中大约 5%~10% 的细胞呈现阳性; 肌肉和鳃组织中杂交信号较少且较弱; 肠道中仅在中肠部位观察到杂交信号, 中肠内容物的杂交信号强, 中肠上皮细胞内的杂交信号弱 (图 3)。

## 3 讨论

本实验室前期对虾肝肠胞虫与凡纳滨对虾生长的相关性已经有相关研究。结果显示, EHP 在  $10^3$  copies/ng HP DNA 以上时, 表现出较高的风险水平, 且与对虾的生物学生长呈现一定的负相关性, 但在较低差异范围内, EHP 与凡纳滨对虾生长的相关性不显著。本研究分别从河北黄骅、山东平度、江苏吴江和山东日照采集到 4 个凡纳滨对虾群体, 其中, 在生

长相关各参数上 RZ 群体最优。qPCR 测定表明, RZ 群体肝胰腺 EHP 也是最低的。对 EHP 对数的分布进行统计表明, WJ、RZ 群体的 EHP 对数分布为单峰, 各个体的 EHP 载量接近; 而 HH、PD 群体分布为双峰, 各个体的 EHP 载量差异大。这种分布可能提示 WJ、RZ 群体主要是单一感染, 而 HH、PD 群体可能存在群体内 2 次或多次传播。对群内 EHP 与凡纳滨对虾生长参数的相关性分析表明, RZ 群体的肝胰腺 EHP 对数与对虾体长呈现显著的负相关性 ( $P < 0.05$ ), 与对虾体重也呈较显著的负相关性 ( $P < 0.1$ ), WJ 群体的 EHP 对数与体重呈现较显著的负相关性 ( $P < 0.1$ ), 而 HH 和 PD 群体整体上 EHP 对数与对虾生长参数的相关性均未达到显著水平; 但根据 EHP 对数的分布将 HH 和 PD 群体各分为 EHP 低和高的 2 个子群后, EHP 高的子群中与对虾体长或体重间出现了显著或较显著的相关性。上述结果说明, EHP 对数与对虾生长参数的相关性与 EHP 感染的时间点有重要关系, 这可以解释前期研究中某些群体的 EHP 与对虾生长参数呈现显著负相关性, 但另一些群体中没有明显相关性的现象 (刘珍等, 2016; 刘亚梅等, 2017; 刘宝彬等, 2017), EHP 感染主要发生在较相近的时间点时, 这种负相关性才能较明显; 群体中存在 2 次传播或感染在不同时间点时, 后续感染可能就扰乱了这种相关性。

本研究对凡纳滨对虾不同组织进行 EHP 检测, RZ 群体是 4 个群体中 EHP 载量最低, 但阳性率较高的群体, 个体间肝胰腺 EHP 载量比较接近, 这可能

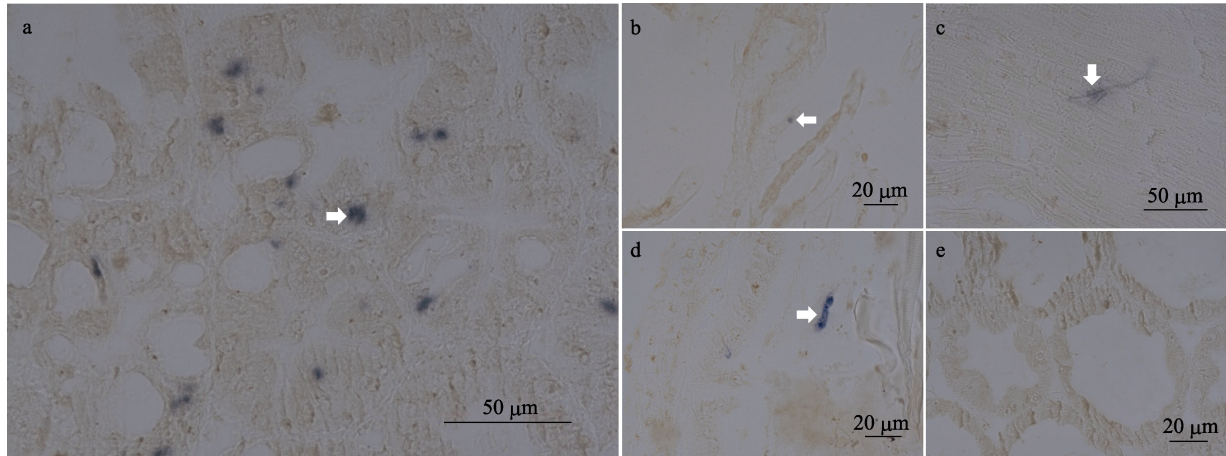


图3 感染虾肝肠胞虫凡纳滨对虾不同组织的原位杂交

Fig.3 *In situ* hybridization of different tissues of *L. vannamei* infected with EHP

a: 肝胰腺; b: 鳃; c: 肌肉; d: 中肠; e: 肝胰腺阴性对照

a: Hepatopancreas; b: Gills; c: Muscle; d: Midgut; e: Negative control of hepatopancreas

是由于该群体受到较低水平 EHP 传染源的感染所致,如经水体传播的 EHP 孢子的感染,该群体有利于对不同组织间的 EHP 进行分析。qPCR 检测结果表明, EHP 从高到低的顺序依次是肝胰腺>中肠>血淋巴>鳃>肌肉;而检出率高低顺序在肌肉和鳃略有差异。经相关性分析表明,各组织 EHP 对数总体上有正相关性,肝胰腺、肠道和鳃三者之间的相关性达到 99.9%的极显著水平( $P<0.001$ ),肌肉-鳃、肝胰腺-肌肉、肌肉-血淋巴、肠道-血淋巴等组织间也呈极显著相关性( $P<0.01$ )。这显示 EHP 主要感染的组织可能是肝胰腺和肠道,用血淋巴、鳃或肌肉进行定量或定性检测,能一定程度地反映肝胰腺中的 EHP 感染情况,但在感染水平较低时,可能存在较多的假阳性比率。Santhoshkumar 等(2016)、Salachan 等(2017)研究表明,用常规 PCR 在对虾肝胰腺、鳃、血淋巴、肠、心脏、肌肉组织均可检测到 EHP 阳性,但这些研究未揭示不同组织间 EHP 载量的关系及阳性率的高低。

前人在组织病理学观察及原位杂交的研究表明,肝胰腺和肠道中能观察到 EHP 的感染(Tang *et al.*, 2015; Rajendran *et al.*, 2016; Santhoshkumar *et al.*, 2016),但在其他组织上未观察到感染的证据。为了说明 EHP 在不同组织中的检出是属于污染还是组织内的感染,作者对 RZ 群体的不同组织进行了原位杂交检测,结果显示, RZ 群体中较低的 EHP 感染水平下,对虾肝胰腺中的杂交信号比以往报道中所看到的(Tang *et al.*, 2015, Salachan *et al.*, 2007)数量要少得多,大约 5%~10%的细胞显示为阳性,但在所检测的几种组织中是最多的;中肠的原位杂交结果则显示,肠腔内容物中出现出较强的杂交信号,中肠上皮细胞中也

出现较弱的杂交信号;此外,在鳃和肌肉细胞中也观察到少量杂交信号,但信号强度相对较弱。这说明 EHP 可能造成肝胰腺以外的组织感染,但细胞感染率和感染强度低。

本研究通过 qPCR 获得了 EHP 在凡纳滨对虾不同群体和不同组织中感染量的准确数据。群体内 EHP 载量的分布特点表示, EHP 在群体内可能存在 2 次或多次传播,群体中 EHP 感染发生在较相近的时间点时,其量与凡纳滨对虾的生长参数呈显著的负相关性。EHP 能在多组织中检出,各组织 EHP 载量有显著相关性,其中,肝胰腺和中肠中分布最多,肝胰腺是 EHP 检测的最灵敏组织;原位杂交显示, EHP 在其他组织中的存在是因为在其他组织中存在一定水平的感染,中肠内容物中存在原位杂交信号,表明 EHP 可能通过粪便进行传播,粪便也可作为检测的样品。EHP 在对虾群体和体内的感染和分布情况能为该病的诊断和预防研究提供基础数据。

## 参 考 文 献

- Bell TA, Lightner DV. A Handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1988
- Bruce LD, Redman RM, Lightner DV, *et al.* Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1993, 17(3): 215-221
- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89-96

- Han JE, Tang KFJ, Pantoja CR, *et al.* Detection of a new microsporidium *Perezia* sp. in shrimps *Penaeus monodon* and *P. indicus* by histopathology, *in situ* hybridization and PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(2): 165–171
- Liu BB, Yang B, Lv XW, *et al.* Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by real-time PCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 158–166 [刘宝彬, 杨冰, 吕秀旺, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧光定量PCR检测. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 158–166]
- Liu YM, Qiu L, Sheng AZ, *et al.* Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using *Taqman* probe real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 151: 191–196
- Liu YM, Qiu L, Chen DY, *et al.* The relationship between body length and weight in *Enterocytozoon hepatopenaei* detected *Litopenaeus vannamei* populations. *Progress of Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 96–103 [刘雅梅, 邱亮, 程东远, 等. 检出虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体的体长和体重关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 96–103]
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量PCR检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Lom J, Dyková I. Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n. sp. (*Microsporidia*), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*. *European Journal of Protistology*, 2002, 38(1): 19–27
- Lu XM, Jin W. Recent advances in taxonomy of phylum Microspora. *Bulletin of Science and Technology*, 1999, 15(2): 119–125 [鲁兴萌, 金伟. 微孢子虫分类学研究进展. *科技通报*, 1999, 15(2): 119–125]
- Luo YH, Shi J, Fang L, *et al.*, Qian D. Development and application of a *TaqMan* real-time PCR assay for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Veterinary Science in China*, 2016, 46(7): 847–852 [骆云慧, 石坚, 方磊, 等. 虾肝肠胞虫 *TaqMan* 实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用. *中国兽医科学*, 2016, 46(7): 847–852]
- Phelps NB, Goodwin AE. Validation of a quantitative PCR diagnostic method for detection of the microsporidian *Ovipleistophora ovariae* in the cyprinid fish *Notemigonus crysoleucas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 76(3): 215–221
- Rajendran KV, Shivam S, Praveena PE, *et al.* Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, 2016, 454: 272–280
- Salachan PV, Jaroenlak P, Thitamadee S, *et al.* Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *BMC Veterinary Research*, 2017, 13(1): 1–7
- Santin M. *Enterocytozoon bieneusi*. Springer Berlin Heidelberg, 2001, 218–220
- Santhoshkumar S, Sivakumar S, Vimal S, *et al.* Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 40(4): 529–539
- Tang KFJ, Han JE, Aranguren LF, *et al.* Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 140: 1–7
- Tang KFJ, Pantojaa CR, Redmana RM, *et al.* Development of *in situ* hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *Journal Invertebrate Pathology*, 2015, 130: 37–41
- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (*Microsporida: Enterocytozoonidae*), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (*Decapoda: Penaeidae*): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29

## Differences Between Populations and Tissues of *Litopenaeus vannamei* Infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*

CHENG Dongyuan<sup>1,2</sup>, QIU Liang<sup>1,2</sup>, SONG Zenglei<sup>1,2</sup>, WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>,  
DONG Xuan<sup>1</sup>, XIE Guosi<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Growth-related parameters of individuals from four populations of *Litopenaeus vannamei* from Huanghua of Heibei Province (HH), Pingdu of Shandong Province (PD), Wujiang of Jiangsu Province (WJ), and Rizhao of Shandong Province (RZ) were assessed. Amount of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in the hepatopancreas of individuals from all populations and EHP in multiple tissues of shrimp from the RZ population were assessed with *TaqMan*-based quantitative PCR. The results showed that the RZ population possessed optimal growth-related parameters and the lowest EHP among the four populations. The histograms of case-logarithmic EHPs of the four populations presented different modes. The case distribution of logarithmic EHPs from the HH and PD populations showed double peaks, while those of the WJ and RZ populations showed a single peak. The different distribution modes may indicate a different EHP spread in the four populations. The population with a single peak mode or the higher logarithmic EHP subpopulation isolated from the population with a multiple peak mode showed a significant negative correlation with shrimp body length or body weight to logarithmic EHP. The EHP detected in different tissues of the RZ population followed the order (from highest to lowest), EHP in hepatopancreas > EHP in midgut > EHP in hemolymph > EHP in gills > EHP in muscle. The logarithmic EHP in the hepatopancreas–midgut, hepatopancreas–gills, and midgut–gills had a significant correlation level above 99.9% ( $P < 0.001$ ), while the logarithmic EHP of the other two tissues had a significant correlation level above 99.0% ( $P < 0.01$ ) or above 99.5% ( $P < 0.05$ ), except for midgut–hemolymph and hepatopancreas–hemolymph. *In-situ* hybridization of a DIG-labeled EHP probe in the hepatopancreas, muscle, gills, and midgut showed that the hepatopancreas is the major target tissue of EHP infection in shrimp. Minor and weak hybridization signals were also observed in other tissues, which indicated that a few cells in those tissues were also susceptible to EHP infection in *L. vannamei*.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; *Enterocytozoon hepatopenaei*; Growth parameters; *in-situ* hybridization

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170414001

http://www.yykxjz.cn/

陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 万晓媛, 谢国骊, 黄捷. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp<sub>AHPND</sub>*)的定量分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 93-100  
Chen MM, Dong X, Qiu L, Wan XY, Xie GS, Huang J. Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp<sub>AHPND</sub>*) in infected *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 93-100

# 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病 副溶血弧菌(*Vp<sub>AHPND</sub>*)的定量分析\*



陈蒙蒙<sup>1,2</sup> 董 宣<sup>1</sup> 邱 亮<sup>1,2</sup> 万晓媛<sup>1</sup> 谢国骊<sup>1</sup> 黄 捷<sup>1,2①</sup>

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室  
农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室  
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** 对虾急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是由致 AHPND 副溶血弧菌(AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*, *Vp<sub>AHPND</sub>*)携带的 pVA1-like 质粒所表达的 PirA<sup>Vp</sup> 和 PirB<sup>Vp</sup> 毒力蛋白对对虾肝胰腺的急性毒性所致。本研究用  $2.19 \times 10^5$  CFU/ml *Vp<sub>AHPND</sub>* 分离株 20130629002S01 对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)进行浸泡感染,于感染后 2~9 d 采集对虾的肝胰腺、鳃、肠道、肌肉组织,采用实时荧光定量 PCR 方法,检测各组织中的 *pirA<sup>Vp</sup>* 拷贝数。结果显示,感染后凡纳滨对虾各组织均能检测到 *pirA<sup>Vp</sup>*,其中,肝胰腺在感染后第 4 天达到峰值,为  $8.71 \times 10^4$  copies/mg,而鳃、肌肉、肠道分别在第 3、4、5 天达到峰值,分别为  $9.08 \times 10^3$ 、 $2.59 \times 10^4$ 、 $5.76 \times 10^4$  copies/mg。早期感染鳃组织中先出现 *Vp<sub>AHPND</sub>* 的富集,在高死亡发生期,*Vp<sub>AHPND</sub>* 数量在肝胰腺和肠道出现高峰,在死亡数量逐渐下降的后期,各组织的 *Vp<sub>AHPND</sub>* 均快速下降,肠道、肝胰腺和肌肉中的 *Vp<sub>AHPND</sub>* 水平趋于接近。对虾肝胰腺组织病理切片显示,同一时间有临床症状的病虾和濒死对虾相比,濒死对虾表现出更严重的 AHPND 病理特征,且二者的组织病理特征均随着感染时间的延长变得更为严重,但检测到的 *Vp<sub>AHPND</sub>* 数量呈下降趋势。研究表明,在 *Vp<sub>AHPND</sub>* 感染过程中,组织中的 *pirA<sup>Vp</sup>* 基因数量不能代表对虾的发病程度,发病程度及组织病理严重的 AHPND 样品中 *Vp<sub>AHPND</sub>* 的数量不一定处于高水平状态。

**关键词** 致急性肝胰腺坏死病; 副溶血弧菌; 浸浴感染; 凡纳滨对虾; qPCR; 时间进程  
**中图分类号** S941.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0093-08

2010 年 6 月我国南方突发凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)大量死亡的情况,在放苗后 7~31 d 出现肝胰腺萎缩、发黄,死亡率达 90% (张宝存等, 2012), 同

时,越南也出现了类似病害(Tran *et al.*, 2013), 在 2010~2014 年期间, 该病扩散到了东南亚的马来西亚、泰国以及美洲的墨西哥(Nunan *et al.*, 2014; Sotorodriguez

\* 中国东盟海上合作基金项目(2016-2018)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室主任基金(QNLM201706)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017HY-ZD10)、中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022016012)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助[This work was supported by China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016-2018), Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (QNLM201706), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD10), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016012), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 陈蒙蒙, E-mail: mmchen0104@163.com

① 通讯作者: 黄 捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-14, 收修改稿日期: 2017-06-11



et al, 2014; Joshi et al, 2014)。该疫病早先被称为早期死亡综合征(Early mortality syndrome, EMS), 对虾发病后的典型症状主要包括肝胰腺颜色变浅、萎缩、空肠空胃、甲壳变软、失去活力等(FAO, 2013; Han et al, 2015a; la Peña et al, 2015), 对感染地区的对虾养殖业造成了严重的经济损失(Flegel et al, 2012; Lightner et al, 2012)。张宝存等(2012)最早报道从发病对虾中分离到 1 株高毒力及耐药的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), Tran 等(2013)研究表明, 导致该病的病原是副溶血弧菌, 因病原和病理的明确, 该病被重新命名为急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) (FAO, 2013), 导致 AHPND 的副溶血弧菌 (AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*,  $Vp_{AHPND}$ ) 携带含毒力基因  $pirA^{Vp}$  和  $pirB^{Vp}$  的 pVA1-like 质粒 (Han et al, 2015b; Lee et al, 2015; Yang et al, 2013), 该质粒大小为 70 kbp, 可表达毒力蛋白 PirAB<sup>Vp</sup> (PirA<sup>Vp</sup> 和 PirB<sup>Vp</sup>), 该蛋白是 AHPND 的致病因子(Lee et al, 2015)。

目前, 多数国内外研究者普遍采用 Tran 等(2013)建立的人工感染方法, 使用高浓度 ( $10^8$  CFU/ml) 的  $Vp_{AHPND}$  浸泡幼虾 15 min, 然后持续在含低浓度 ( $10^6$  CFU/ml) 的  $Vp_{AHPND}$  水体中养殖和观察, 成功感染的对虾可能在 24~72 h 内接近 100% 的死亡, 并出现典型的 AHPND 症状, 包括肝胰腺色浅、空肠空胃等, 病理变化主要表现为肝胰腺小管上皮细胞变薄、脱落。在养殖过程中, 水体中的病原达到如此高的浓度实现直接感染比较困难, 绝大多数情况为中低浓度的感染, 感染过程中, 对虾的临床症状逐渐发生变化。基于这样的研究背景, 本研究围绕凡纳滨对虾  $Vp_{AHPND}$  病原感染-病理变化-临床表征的相关性这一关键科学问题, 通过对健康凡纳滨对虾进行低浓度的浸泡感染实验, 采取组织病理学和荧光定量 PCR 等技术手段确定被感染凡纳滨对虾临床表征、病理变化与  $Vp_{AHPND}$  在体内的组织分布与载量的相关性, 为 AHPND 的诊断、防控和生物安保体系提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

副溶血弧菌菌株 20130629002S01 为中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室保存菌株, 于 2013 年 6 月分离自广西北海发病凡纳滨对虾幼虾, 经鉴定带有毒力基因  $pirA^{Vp}$  和  $pirB^{Vp}$ , 确定为致 AHPND 副溶血弧菌 ( $Vp_{AHPND}$ ), 且完成了全基因组序列测定。

### 1.2 对虾

体重为 1 g 左右的健康凡纳滨对虾购自山东东营对虾工厂化养殖场, 将对虾分装到 50 L 水族箱中, 保持水温恒定为  $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 每天投喂饲料 1 次, 换水 1 次, 每次换水量约为 20%, 在进行感染实验前于本实验室暂养约 7 d。

### 1.3 病原检测

随机采集 128 尾对虾, 参照 OIE (2017)水生动物疾病诊断手册及已发表文献中的 PCR 方法进行病原检测, 包括白斑综合征病毒(WSSV)、黄头病毒(YHV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)、传染性肌坏死病毒(IMNV)、桃拉综合征病毒(TSV)、偷死病野田村病毒(CMNV) (Zhang et al, 2014)、虾肝肠胞虫(EHP) (Tang et al, 2015)和致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌( $Vp_{AHPND}$ ) (Sirikharin et al, 2014)。

### 1.4 qPCR 质粒构建及标准曲线制作

用引物扩增长度为 135 bp 的  $pirA^{Vp}$  基因片段(表 1), 连接到 pGEM-T 载体上构建重组质粒 pVpPirA-1 (Han et al, 2015b), 转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)后扩大培养提取质粒, Nanodrop 2000 准确测定浓度, 然后进行 10 倍梯度稀释, 进行荧光定量 PCR, 制作标准曲线。

### 1.5 菌株 20130629002S01 对凡纳滨对虾的毒力检测

取 150 尾凡纳滨对虾, 随机分成 5 组, 1~4 组为实验组, 5 组为对照组, 每组设 3 个重复, 每个重复 20 尾, 早晚各投喂 1 次, 每天换水 1 次。将菌株 20130629002S01 接种于含 2% NaCl 的 TSB (TSB+) 液体培养基中, 摇床 155 r/min、 $28^\circ\text{C}$  培养 12 h, 8000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 用灭菌海水重悬, 测定浓度为  $10^9$  CFU/ml。将细菌悬液加到水体中, 使其浓度依次为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$  和  $10^5$  CFU/ml, 每天换水后补加菌液, 整个感染实验中维持水体中菌的浓度不变; 对照组添加等量海水。实验观察 6 d, 每日定时投喂并换水, 记录死亡对虾尾数, 计算 20130629002S01 对凡纳滨对虾的半致死量(LD<sub>50</sub>), 用无菌牙签沾取肝胰腺部位接种到灭菌 2216E 培养基中, 进行  $Vp_{AHPND}$  菌株 20130629002S01 重新分离鉴定。

### 1.6 人工感染实验

设置实验组和对照组, 每个组设 3 个平行, 每个平行 20 尾凡纳滨对虾, 置于 50 L 水族箱中, 保持水温恒定为  $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 早晚各投喂 1 次。实验组采用菌

表 1 *Vp<sub>AHPND</sub>* *pirA<sup>Vp</sup>* 基因实时荧光定量 PCR 方法的引物和探针序列  
Tab.1 The primers and probe sequence of the qPCR method for *pirA<sup>Vp</sup>* gene of *Vp<sub>AHPND</sub>*

序列名称 Sequence code	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	产物 Amplicon (bp)	参考文献 Reference
F	TTGGACTGTCTGAACCAAACG	135	Hant 等(2015b)
R	GACCCCATTTGGTATTGAATG		
Probe	AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGAA		

液浸泡感染, 根据 *Vp<sub>AHPND</sub>* 菌株 20130629002S01 对凡纳滨对虾的毒力检测结果, 水体中加入的菌液浓度约为  $2.19 \times 10^5$  CFU/ml, 每天换水后补加菌液, 整个感染实验中维持水体中菌的浓度不变; 对照组添加等量海水。

### 1.7 组织病理学观察

人工感染后, 对照组随机选取凡纳滨对虾实验组分别于 24、48、72 h 选取出现肝胰腺发白、萎缩, 疑似感染 *Vp<sub>AHPND</sub>* 对虾和已失去活力的濒死对虾, 将对虾肝胰腺从头胸甲中线切开, 一半采用 Davidson's AFA 固定液固定(Bell *et al*, 1988), 另一半肝胰腺提取 DNA 用于 qPCR 检测; Davidson's AFA 固定液固定的头胸甲组织, 经过梯度脱水、透蜡、切片后进行 HE 染色, 中性树脂封片后进行组织病理学观察。

### 1.8 样本采集和 qPCR 检测

浸泡感染 2~9 d, 对照组每天随机选取对虾、实验组每天对濒死凡纳滨对虾肝胰腺、鳃、中后肠道、尾节肌肉进行取样, 每个组分别采 3 尾, 每个平行 1 尾, 将组织样品装入 1.5 ml 空无菌离心管并称重。依据海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技公司, 北京)说明书进行对虾样品 DNA 的提取, 加入 50  $\mu$ l 无 RNase 水溶解, 并用核酸蛋白测定仪测定其准确浓度和纯度, 实时荧光定量 PCR 方法检测各组组织中 *Vp<sub>AHPND</sub>* 数量。

## 2 结果

### 2.1 实验虾的检测

对随机取样的 128 尾实验用虾, 采用 OIE(2017) 标准和文献报道的方法对其进行病原检测, 检测结果表明, WSSV、YHV、IHHNV、IMNV、TSV、CMNV、EHP 和 *Vp<sub>AHPND</sub>* 均为阴性。

### 2.2 qPCR 标准曲线

提取重组质粒 pVpPirA-1, 调整其浓度为  $1.0 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l DNA, 对已知浓度的 pVpPirA-1 进行梯度稀释, 以稀释的梯度溶液为模板进行 qPCR 扩增,

确定其标准曲线灵敏度为 10 copies/ $\mu$ l DNA, 标准曲线的  $R^2=0.993$ , 回归方程为:

$$Ct = -3.235 \times \lg(N) + 37.555$$

式中,  $N$  为拷贝数,  $Ct$  为循环数。与 Han 等(2015b) 的结果一致。

### 2.3 *Vp<sub>AHPND</sub>* 菌株 20130629002S01 对凡纳滨对虾的毒力检测

实验组 1~4 组分别用浓度为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$  和  $10^5$  CFU/ml 的菌株 20130629002S01 对凡纳滨对虾进行浸泡感染, 记录实验组 6 d 内对虾死亡情况(表 2), 由 Reed-Muench 法(Brown, 1964) 计算出 20130629002S01 对凡纳滨对虾的  $LD_{50}$  为  $6.52 \times 10^5$  CFU/ml; 凡纳滨对虾肝胰腺中的细菌通过重新分离、鉴定, 确定可分离出带有毒力基因 *pirA<sup>Vp</sup>* 可致 AHPND 的 *Vp<sub>AHPND</sub>*。

表 2 不同浓度 *Vp<sub>AHPND</sub>* 菌株 20130629002S01 浸泡感染凡纳滨对虾死亡率

Tab.2 Mortality of *L. vannamei* challenged with different dose of *Vp<sub>AHPND</sub>* strain 20130629002S01 by immersion

组别 Groups	实验对虾数 Number of challenged shrimps	感染剂量 Challenge dose (CFU/ml)	死亡对虾数 Number of lethal shrimp(ind.)	死亡率 Mortality (%)
1	20	$10^8$	20	100
2	20	$10^7$	18	90
3	20	$10^6$	12	60
4	20	$10^5$	5	25
5	20	0	0	0

### 2.4 感染实验中对虾死亡率

用  $2.19 \times 10^5$  CFU/ml (即  $0.34 LD_{50}$ ) 的菌株 20130629002S01 浸泡感染凡纳滨对虾, 整个感染实验为 11 d。实验期间, 对照组虾肝胰腺正常, 切面深棕色, 腹节肌肉透明, 对虾正常摄食, 胃肠道充满食物(图 1a 和图 1b)。实验组凡纳滨对虾在感染第 2 天开始出现虾体颜色变浅、肝胰腺外观颜色变浅甚至发白、萎缩变小; 肝胰腺切面色浅, 变淡黄色, 呈糜烂状; 腹节肌肉透明度下降, 变得略微浑浊; 对虾停止摄食, 出现空肠空胃现象(图 1c 和图 1d), 有症状个体会逐渐加重, 并在随后几天内死亡。感染第 2

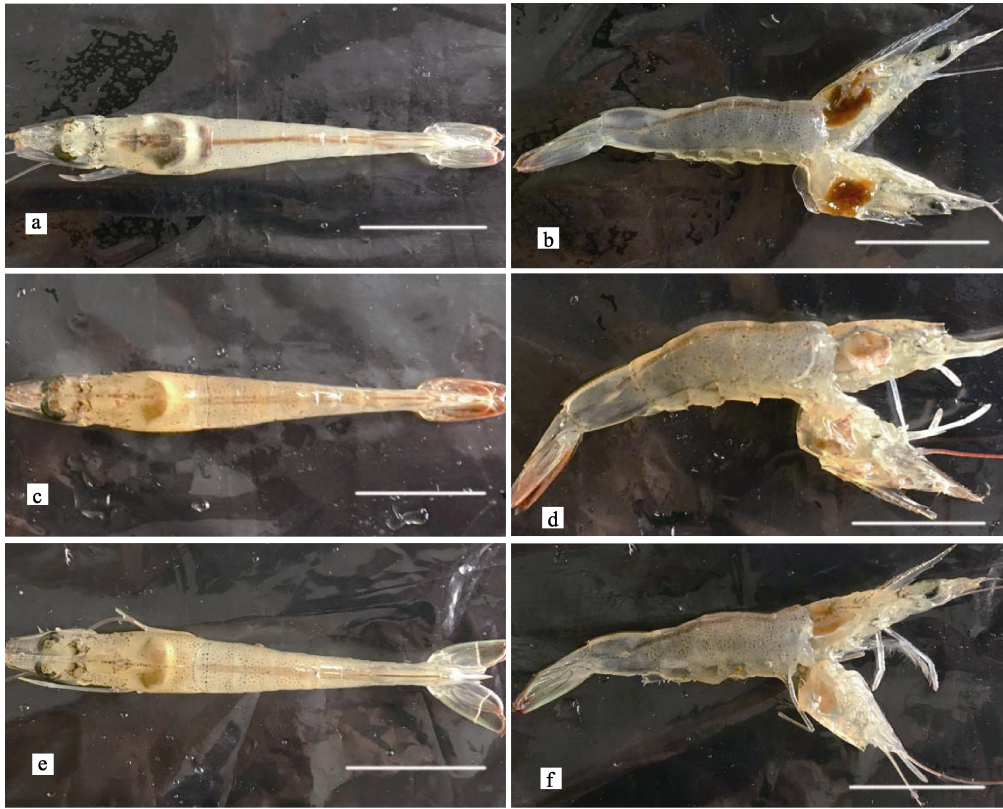


图1 对照组凡纳滨对虾和浸浴感染  $Vp_{AHPND}$  后幸存的凡纳滨对虾外观  
Fig.1 The appearance of *L. vannamei* in the control group and survivals of *L. vannamei* challenged with  $Vp_{AHPND}$  via immersion

a、b: 未感染的对照组对虾(9 d后); c、d:  $Vp_{AHPND}$  感染 2 d 的患病存活对虾;  
e、f:  $Vp_{AHPND}$  感染 9 d 后的患病存活对虾; 标尺均为 1 cm

a, b: *L. vannamei* without challenge in the control group after day 9; c, d: Morbid *L. vannamei* survival challenged with  $Vp_{AHPND}$  on day 2; e, f: Morbid *L. vannamei* survival challenged with  $Vp_{AHPND}$  after day 9; Scale bars=1 cm

天即出现有发病死亡的对虾, 随后死亡对虾数量陆续增加, 9 d 的累积死亡率为 33%; 在感染 9 d 后, 几乎所有存活的对虾都出现虾体颜色变浅、肝胰腺色浅或发白, 肝胰腺切面色浅, 糜烂明显等症状(图 1e 和图 1f)。感染组 2~9 d, 每天早上统计死亡数并采集对虾肝胰腺、鳃、中后肠道、尾节肌肉样品, 选取肝胰腺发白、萎缩且活力明显下降的濒死对虾, 根据 SigmaPlot 12 回归分析, 感染所致的  $LT_{50}$  为  $(3.55 \pm 0.12)$  d(图 2); 对照组除在第 3 天和第 4 天分别意外死亡 1 尾外, 其余时间未出现死亡。阳性组与阴性组差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.5 组织病理观察

浸浴感染凡纳滨对虾过程中, 取样对虾肝胰腺经石蜡切片和 HE 染色制片, 进行光镜下病理观察。结果显示, 对照组对虾肝胰腺小管上皮细胞层饱满, 可清晰分辨出 B、R、F 等各种功能细胞, R 细胞内脂肪泡丰富, 细胞核大小正常, 小管间血窦中血细胞数

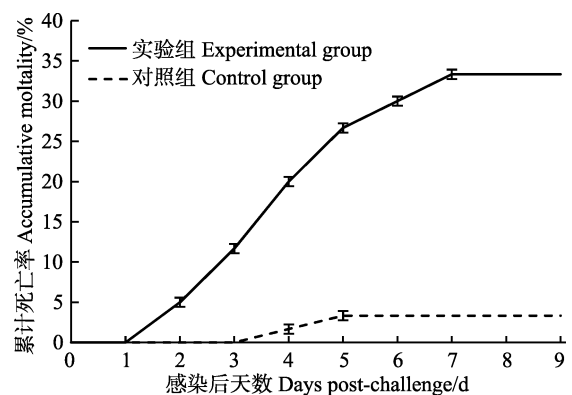


图2  $2.19 \times 10^5$  CFU/ml 的  $Vp_{AHPND}$  20130629002S01 浸浴感染对虾累积死亡率

Fig.2 Accumulative mortality of *L. vannamei* challenged with  $2.19 \times 10^5$  CFU/ml of  $Vp_{AHPND}$  strain 20130629002S01 by immersion

量不多(图 3g)。实验组对虾感染后 24 h, 出现肝胰腺发白、变浅明显症状的对虾肝胰腺脂肪细胞明显减少, 肝胰腺小管上皮细胞偶见脱落现象, 部分肝胰腺

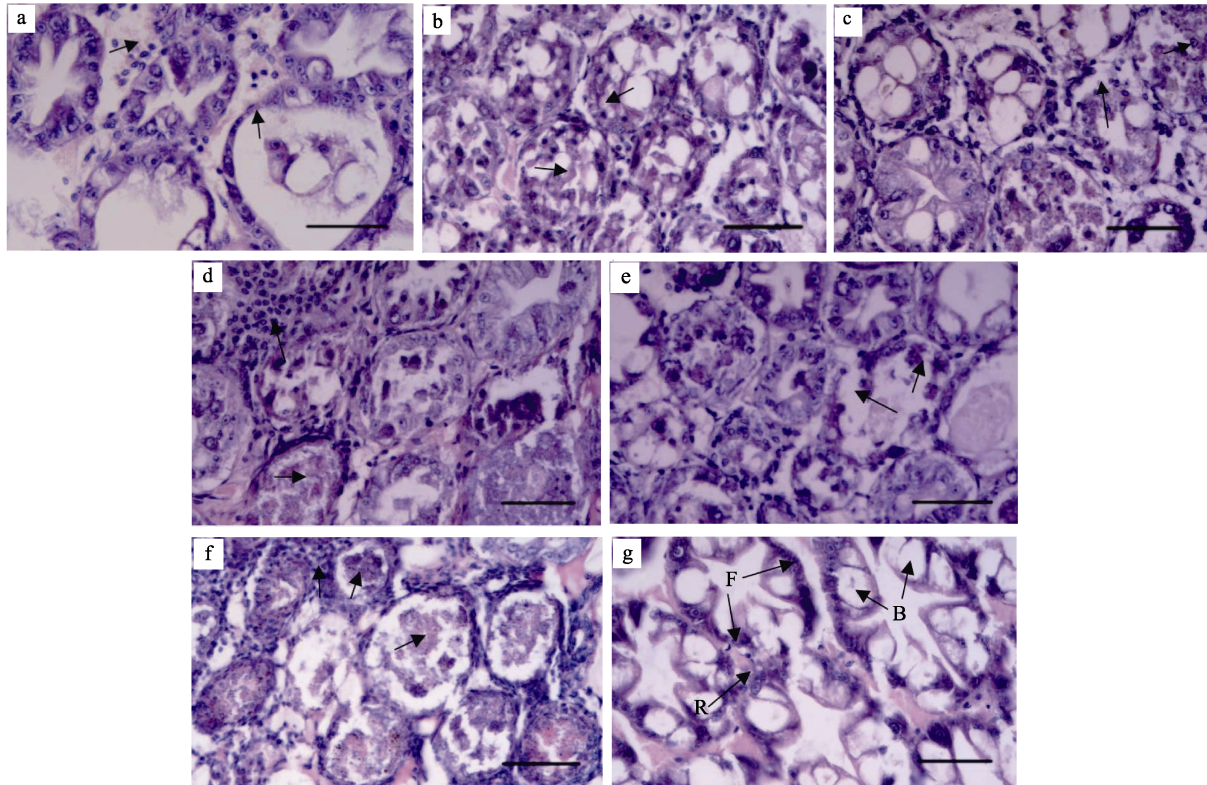


图 3 浸浴感染 *Vp<sub>AHPND</sub>* 后不同时间幸存的有症状对虾和濒死对虾肝胰腺组织病理变化  
 Fig.3 The histopathological changes in hepatopancreas of *L. vannamei* survivals with clinical signs and moribund shrimp which were challenged with *Vp<sub>AHPND</sub>* via immersion

a, c, e: 分别为感染 24、48、72 h 时明显症状的幸存对虾肝胰腺组织; b, d, f: 分别为感染 24、48、72 h 濒死对虾肝胰腺组织; g: 对照组对虾肝胰腺; 箭头所指处为文中描述的细胞或组织病变处; 标尺均为 50  $\mu\text{m}$   
 a, c, e: Hepatopancreas of *L. vannamei* with typical clinical signs in experimental group at 24, 48, and 72 h post-challenge respectively; b, d, f: Hepatopancreas of moribund *L. vannamei* with typical clinical signs in experimental group at 24, 48, and 72 h post-challenged respectively; g: Hepatopancreas of normal *L. vannamei* in control group; the arrow refers to the cell or tissue lesions described in the paper; Scale bars=50  $\mu\text{m}$

小管上皮层变薄, 血窦中血细胞增多(图 3a); 对同时期的濒死对虾取样的病理切片的肝胰腺则出现更多肝胰腺小管上皮细胞脱落的现象, 此时, 部分细胞仍然可以看到还有脂肪滴和分泌泡(图 3b)。感染后 48 h, 出现肝胰腺发白、萎缩、空肠空胃明显症状的对虾肝胰腺出现肝胰腺小管上皮细胞脱落以及细胞核肿大现象(图 3c); 同时期取样的濒死对虾肝胰腺更是出现了大量血细胞浸润的现象, 部分小管出现了大量细菌的二次感染(图 3d)。感染后 72 h, 出现虾体发白、肝胰腺发白、萎缩、空肠空胃明显症状的对虾肝胰腺小管功能细胞缺失, 部分小管上皮细胞明显脱落(图 3e); 同时期取样的濒死对虾肝胰腺小管细胞全面坏死, 肝胰腺小管间呈现大量血细胞浸润的炎症反应, 多数小管内可见严重的二次感染, 出现大量的细菌, 部分小管结构完全坏死并被血淋巴细胞围绕形成结节(图 3f)。

## 2.6 感染进程中 *Vp<sub>AHPND</sub> 20130629002S01* 在凡纳滨对虾不同组织中的分布

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 在各取样时间段, 实验组凡纳滨对虾各组织均能检测到 *pirA<sup>Vp</sup>*, 对照组未检测出; 各组织中 *pirA<sup>Vp</sup>* 基因的拷贝数大致分布在  $10^1 \sim 10^5$  copies/mg; 组织内的菌量随时间大体呈先上升后下降的趋势(图 4)。在感染后的 2 d 内, 各组织中 *pirA<sup>Vp</sup>* 的拷贝数都处于较低的水平, 肝胰腺、鳃、肠道和肌肉分别为  $2.67 \times 10^2$ 、 $3.49 \times 10^1$ 、 $2.09 \times 10^1$  和  $5.09 \times 10^1$  copies/mg; 随后, *pirA<sup>Vp</sup>* 拷贝数最早的高峰出现在 3 d 的鳃中, 达到  $9.08 \times 10^3$  copies/mg, 且高于此时同一尾虾的肝胰腺 14.3 倍、肠道 6.63 倍和肌肉 1.56 倍; 随后到达高峰的是 4 d 的肝胰腺和肌肉, 其中, 肝胰腺内的 *pirA<sup>Vp</sup>* 拷贝数达到  $8.71 \times 10^4$  copies/mg, 分别是同一尾虾肌肉的 3.36 倍、肠道的 6.75 倍和鳃的 18.7 倍; 最后达到高峰的组织是感染后 5 d 的肠道, 为

$5.76 \times 10^4$  copies/mg, 此时, 是同一尾虾的肌肉的 5.79 倍, 肝胰腺的 6.44 倍, 鳃的 16.3 倍。每毫克组织中 *pirA*<sup>Vp</sup> 拷贝数对数的所有时段平均值由高到低依次是肝胰腺(3.40±0.80)、肠道(3.30±1.07)、肌肉(3.24±0.88)和鳃(2.71±0.94)。

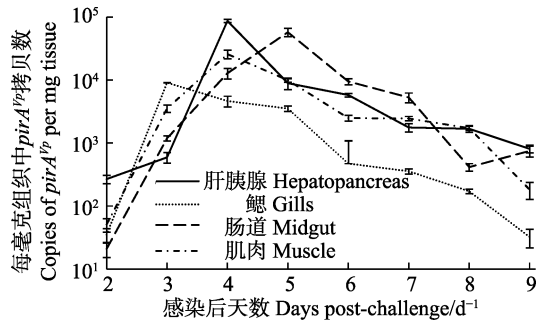


图4 2.19×10<sup>5</sup> CFU/ml *Vp*<sub>AHPND</sub> 20130629002S01 浸浴感染后凡纳滨对虾不同组织 *pirA* 拷贝数随时间变化  
Fig.4 The copies of *pirA*<sup>Vp</sup> in different tissues of *L. vannamei* challenged with 2.19×10<sup>5</sup> CFU/ml of *Vp*<sub>AHPND</sub> strain 20130629002S01 via immersion

### 3 讨论

致 AHPND 副溶血弧菌感染凡纳滨对虾、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) (Han *et al.*, 2015a) 等水产动物后, 可导致对虾肝胰腺小管细胞脱落, 发生急性坏死, 短期内即可导致对虾大规模死亡。AHPND 作为近年来一种危害较大的对虾新发疫病, 病原菌的感染机制以及准确的诊断方法受到广泛关注。AHPND 的常规 PCR 检测方法 (Sirikharin *et al.*, 2014; Otta *et al.*, 2014) 以及实时荧光 qPCR 方法 (Han *et al.*, 2015b) 都已经建立。前者以检测 *pirA*<sup>Vp</sup> 或 *pirB*<sup>Vp</sup> 毒力基因来定性检测 *Vp*<sub>AHPND</sub>; 后者通过检测 *PirA* 毒力基因拷贝数实现对 *Vp*<sub>AHPND</sub> 的定量检测, 从而可定量地分析病原菌的侵染途径。本研究采用实时荧光 qPCR 方法, 灵敏度可以达到 10 copies/mg 组织 (Han *et al.*, 2015b), 且具有很强的特异性, 在探讨 *Vp*<sub>AHPND</sub> 对凡纳滨对虾的感染途径上是行之有效的办法。

在水环境中, 鳃和消化道是对虾与外界接触的重要器官, 病原菌可以通过鳃或消化道进入对虾体内, 增加了对虾组织受病原菌感染的可能性。Tran 等 (2013) 采用非创伤的感染方法, 是将 10<sup>8</sup> CFU/ml 的高浓度菌液浸浴对虾 15 min, 然后再维持 10<sup>6</sup> CFU/ml 的菌量持续浸浴, 这种感染方式除非对虾摄食病虾或高浓度病原菌污染的饲料, 否则养殖水体中很难达到这么高的菌浓度。在本研究测试浸浴条件下 *Vp*<sub>AHPND</sub>

20130629002S01 的 LD<sub>50</sub>, 表明该菌株在 2.58×10<sup>5</sup> CFU/ml 持续浸浴就能导致半数死亡, 该浓度是普通养殖条件下很容易达到的浓度, 说明 *Vp*<sub>AHPND</sub> 20130629002S01 菌株能在普通养殖条件下经水体导致对虾感染, 这是养殖条件下 *Vp*<sub>AHPND</sub> 经水体感染的直接证明。

由于对虾的鳃比表面积大, 且与外界水体直接接触, 因此, 在浸浴感染中, 与肝胰腺、中肠和尾节肌肉相比, 鳃组织中 *Vp*<sub>AHPND</sub> 的量最先达到较小的峰值, 但这种峰值可能是因为鳃外部富集的病原菌所致, 而且, 其峰值并没有维持下去, 随后肝胰腺及中肠的 *Vp*<sub>AHPND</sub> 量迅速并远远地超过了鳃的水平, 因此, 鳃的小高峰尚不能表明, 鳃是病原菌侵入的通道, 对虾的口器与鳃部靠近, 并直通虾胃及肝胰腺, 更可能成为病原菌直接入侵的通道。

对虾肝胰腺小管上皮细胞脱落是 AHPND 的典型症状 (Tran *et al.*, 2013), 肝胰腺是 *Vp*<sub>AHPND</sub> 主要靶器官。本研究实验组肝胰腺中 *pirA*<sup>Vp</sup> 所代表的 *Vp*<sub>AHPND</sub> 量在感染后的第 3 天后迅速上升, 在第 4 天时达到高峰, 且高于所有其他组织出现的最大值, 这时正是半数死亡时间, 即死亡发生最多的时候, 表明对虾的死亡的确是由 *Vp*<sub>AHPND</sub> 对肝胰腺的侵染造成的。值得注意的是, 病理切片显示, 感染时间越长的濒死个体, 组织病理切片中见到肝胰腺中的细菌越多, 但超过死亡高峰后, 肝胰腺 *Vp*<sub>AHPND</sub> 的量却大大下降, 说明此时主要由细菌二次感染所致。随着感染持续, *Vp*<sub>AHPND</sub> 从肝胰腺小管中进入肠道, 第 5 天时, *Vp*<sub>AHPND</sub> 的量在中肠中出现峰值。

由于组织病理分析或分子检测都是需要将患病对虾致死进行取样, 所以, 不同时间点的样品来源不可能是同一尾对虾。本研究采用不同时间点每个实验组各取 3 尾的方式进行分析, 结果表明, 感染后的组织中 *pirA*<sup>Vp</sup> 拷贝数相同时, 濒死对虾比呈现 AHPND 典型症状的对虾肝胰腺组织病理变化更重, 而感染第 4 天后, 濒死对虾即使肝胰腺病变更重, *pirA*<sup>Vp</sup> 的拷贝数却不升反降, 这为采样和检测以及对定性或定量的分子检测的解释提供了参考。养殖场采样时, 不可能知道每一尾对虾确切的感染时间, 有时对虾濒死状态的症状典型, 但 *pirA*<sup>Vp</sup> 的分子检测结果阳性强度不高或者定量值很低, 并不能以此为依据判断对虾的致病不是 AHPND 所致。最新发布 OIE (2017) 水生动物手册的 AHPND 诊断章节指出, 最好的采样部位是肠道关联的器官, 包括肝胰腺、胃、中肠、后肠和粪便。本研究表明, 在经水传播 AHPND 的过程中, 发病之前, 鳃可能有更灵敏的病原菌检出, 而发病高死亡率期间, 肝胰腺是最灵敏的可检测组织, 而在发病后期,

除了肝胰腺和肠道以外, 也可选择肌肉。

## 参 考 文 献

- Bell TA, Lightner DV. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1988
- Brown WF. Variance estimation in Reed-Muench fifty percent end-point determination. American Journal of Epidemiology, 1964, 79(1): 37–46
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China fishery statistics yearbook. Beijing: China Agricultural Press, 2016 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- FAO. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304) Hanoi, Viet Nam, 25–27 June, 2013, FAO Fisheries and Aquaculture Report, 1053
- Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(2): 166–173
- Han JE, Tang KFJ, Tran LH, *et al.* *Photobacterium* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 2015a, 113(1): 33–40
- Han JE, Tang KFJ, Pantoja CR, *et al.* qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture, 2015b, 442: 12–15
- Joshi J, Srisala J, Truong VH, *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus*, isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture, 2014, 428–429: 297–302
- la Peña LD, Cabillon NA, Catedral DD, *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms, 2015, 116(3): 251–254
- Lee CT, Chen IT, Yang YT, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(34): 10798–10803
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquaculture Advocate, 2012, (Jan/Feb): 40. <https://www.aquaculturealliance.org/pdf/GAA-Lightner-Jan12.pdf>
- Nunan L, Lightner DV, Pantoja C, *et al.* Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. Diseases Aquatic Organisms, 2014, 111(1): 81–86
- OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organisation of Animal Health. 2017, <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>
- Otta SK, Praveena P, Bhuvaneshwari T, *et al.* Protocols for detection of shrimp EMS/AHPND. Training Manual on Health Management Practices for Finfish and Shellfish of Brackish Water Environment 115. Aquaculture Animal Health and Environment Division, Central Institute of Brackishwater Aquaculture, Puran, Chennai, 2014, 98–100
- Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sritunyalucksana K, *et al.* A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. <https://enaca.org/?id=96&title=new-pcr-detection-method-for-ahpnd>, 2014
- Sotorodriguez SA, Gomezgil B, Lozanoolvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 81(5): 1689–1699
- Tang KFJ, Pantoja CR, Redman RM, *et al.* Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 130: 37–41
- Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(1): 45–55
- Yang YT, Chen IT, Lee CT, *et al.* Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. Genome Announcements, 2013, 2(5): 814–830
- Zhang BC, Liu F, Bian HH, *et al.* Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(2): 56–62 [张宝存, 刘飞, 边慧慧, 等. 一株凡纳滨对虾病原菌的分离、鉴定及其致病力分析. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 56–62]
- Zhang QL, Liu Q, Liu S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. Journal of General Virology, 2014, 95(12): 2700–2709

## Quantitative Analysis of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Causing *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{\text{AHPND}}$ ) in Infected *Litopenaeus vannamei*

CHEN Mengmeng<sup>1,2</sup>, DONG Xuan<sup>1</sup>, QIU Liang<sup>1,2</sup>, WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>, XIE Guosi<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1,2</sup>①

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) results from acute toxicity in the hepatopancreas of infected shrimp caused by the toxic proteins PirA<sup>Vp</sup> and PirB<sup>Vp</sup>, which are expressed by the pVA1 plasmid carried by AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{\text{AHPND}}$ ). In this study, *Litopenaeus vannamei* were exposed to  $2.19 \times 10^5$  CFU/ml  $Vp_{\text{AHPND}}$  strain 20130629002S01 by immersion to explore the dynamic changes of  $Vp_{\text{AHPND}}$  in the tissues of shrimp. The hepatopancreas, gills, midgut, and muscle of infected shrimp were collected 2~9 days after immersion infection, and the quantity of *pirA*<sup>Vp</sup> was measured by qPCR. The results showed that  $Vp_{\text{AHPND}}$  could be detected in all sampled tissues of infected shrimp. The amount of  $Vp_{\text{AHPND}}$  in the hepatopancreas reached a peak on day 4 post-infection at  $8.71 \times 10^4$  copies/mg, while the gills, muscle, and midgut reached peaks on day 3, 4, and 5 post-infection at  $9.08 \times 10^3$ 、 $2.59 \times 10^4$ 、 $5.76 \times 10^4$  copies/mg, respectively. The highest amount of  $Vp_{\text{AHPND}}$  was detected in the gills during the early stage of infection, followed by the hepatopancreas and midgut in sequence during heavy disease, with frequent deaths. Subsequently, the amount of  $Vp_{\text{AHPND}}$  declined rapidly in all tissues, with similar levels in the midgut, hepatopancreas, and muscle. Histopathology revealed that AHPND lesions were denser in hepatopancreas samples from moribund shrimp compared with those from morbid shrimp, when taken at the same time from infection. Furthermore, the histopathologic symptoms of both became more severe along the infection process, but with decreasing levels of  $Vp_{\text{AHPND}}$ . The results showed that the copy number of *pirA*<sup>Vp</sup> in tissues of  $Vp_{\text{AHPND}}$ -infected shrimp does not represent the real-time condition of diseased shrimp and the quantity of  $Vp_{\text{AHPND}}$  may not be high in a severe AHPND sample.

**Key words** Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND); *Vibrio parahaemolyticus*; Immersing infection; *Litopenaeus vannamei*; qPCR; Time courses

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170328003

http://www.yykxjz.cn/

马骊, 葛倩倩, 许杨, 彭素晓, 李健. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 101-109

Ma L, Ge QQ, Xu Y, Peng SX, Li J. Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (*TCTP*) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 101-109

## 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达\*

马 骊<sup>1,2</sup> 葛倩倩<sup>2</sup> 许 杨<sup>1,2</sup> 彭素晓<sup>1,2</sup> 李 健<sup>2,3</sup>①

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点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** 为深入了解脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)卵巢发育和卵黄蛋白原发生的分子机制,本研究克隆得到脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP*,并结合自噬调控基因 *TCTP*、*Hif-1α*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 在卵巢发育期的表达水平,阐释脊尾白虾卵黄蛋白原合成过程中的分子调控特征。研究显示,脊尾白虾 *TCTP* 基因 cDNA 全长为 732 bp,编码 168 个氨基酸,具有典型的 TCTP1 和 TCTP2 功能域以及 PKC 和 TK II 等 mTOR 信号通路相关的磷酸化位点。同时发现,甲壳动物 *TCTP* 普遍缺乏在其他动植物中高度保守的 C 末端的 cys 残基。进化分析显示,脊尾白虾 *TCTP* 与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)亲缘关系最近。4 种自噬调控基因在脊尾白虾卵巢发育期的表达结果显示,肝胰腺 *TCTP* 基因从增殖期到产后恢复期呈递减趋势;肝胰腺 *Hif-1α*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 基因表达趋势相似,即从增殖期到小生长期高表达,大生长期极显著下降,表达量最低( $P<0.01$ ),这与外源性卵黄蛋白原的合成趋势大致相反。这些自噬调控基因可能通过自噬作用共同调节外源性卵黄蛋白原的合成。卵巢 *TCTP* 基因在小生长期表达量最高;卵巢 *Hif-1α* 基因从增殖期到产后恢复期持续升高,这与内源性卵黄蛋白原表达趋势相似;卵巢 *Beclin1* 基因在大生长期表达量最高,与脊尾白虾卵巢 *EcR* 表达趋势相似,与卵巢 *Bcl-2* 基因表达趋势相反,这些自噬调控基因可能通过自噬作用共同促进内源性卵黄蛋白的合成。本研究表明,自噬调控基因 *TCTP*、*Hif-1α*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 在脊尾白虾卵巢发育时期相互协调共同作用,可能通过自噬作用调节脊尾白虾卵黄蛋白原的合成和卵巢发育。

**关键词** 脊尾白虾; *TCTP*; 细胞自噬; 卵黄蛋白; 表达分析

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-00101-09

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)因繁殖周期长、卵巢可连续多次发育并抱卵繁殖而为人们所关

\* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)、泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016009)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助[This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016009), and the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology].马 骊, E-mail: malidj093@qq.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-03-28, 收修改稿日期: 2017-04-20



注,是研究十足目真虾繁殖机制的潜在模式生物。卵黄蛋白原作为卵巢成熟和胚胎发育的营养物质,在卵黄合成期表达并积累,与脊尾白虾的繁殖力紧密相关(栗治国等,2014)。研究表明,脊尾白虾卵黄蛋白原(Vg)的合成受温度、激素等调控,主要在胰腺腺内合成(张美,2015;李志敏等,2016;梁俊平等,2015),这与日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等相似,而与日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、短沟对虾(*Penaeus vannamei*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等卵黄蛋白原主要在卵巢内合成具有较大区别(Yano *et al.*, 1987; Fainzilber *et al.*, 1992)。组织学观察发现,甲壳动物卵母细胞的成熟伴随着细胞自噬的发生:卵黄发生过程中,卵母细胞内囊泡结构增加,溶酶体通过吞噬线粒体、内质网等细胞器,形成自噬溶酶体并产生卵黄颗粒(王玉凤等,1999;赵梦然等,2009)。Suwansa-ard 等(2016)研究发现,甲壳动物自噬标记蛋白含有其他动物自噬蛋白的保守基序,免疫组化分析显示,罗氏沼虾自噬标记蛋白 Beclin1、LC3 等在卵黄发生的卵母细胞质(阶段 3 和 4)检测呈阳性,而在卵原细胞中不明显。这说明自噬与甲壳动物卵黄发生关系密切,但自噬在甲壳动物卵巢发育中的分子调控尚不清楚。

细胞自噬在哺乳动物中的研究比较深入,可由氧气缺乏、营养缺乏及其他应激所引起,由溶酶体等细胞器介导,在维持细胞内环境稳定、组织发育、肿瘤发生、免疫调节等方面发挥重要作用。缺氧诱导因子(Hif-1)是含有  $\alpha$  和  $\beta$  两种亚基的转录因子,可由缺氧环境诱导并激活上百个有利于细胞在低氧环境中生存的基因参与细胞自噬调控。翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)可与 Hif-1 $\alpha$  竞争结合于 VHL 的  $\beta$  结构域,保护 Hif-1 $\alpha$  不被降解,从而促进自噬发生(Chen *et al.*, 2013)。Beclin1 是哺乳动物自噬体的诱导和成核过程的关键靶位点,可与 VPS34、VPS15 等形成 PI3K III 复合物正调控细胞自噬,是自噬形成的关键(Funderburk *et al.*, 2010)。凋亡蛋白 Bcl-2 可以与 Beclin1 结合抑制 PI3K III 复合物形成,从而负调控自噬的发生(He *et al.*, 2010)。

翻译控制肿瘤蛋白(Translationally controlled tumor protein, TCTP)是一种在真核细胞中广泛表达的高保守多功能蛋白,因在大多数癌症细胞中高表达而闻名,以促增殖、促发育和参与免疫调节等功能而为人们所熟知(Batisti *et al.*, 2012)。哺乳动物 TCTP 的多功能性早已得到证实,调节机制的研究也较多。TCTP 的 Ser46 残基磷酸化可调节细胞骨架稳定性(Yarm, 2002)。TCTP 通过与 Oct4 启动子的 SF1 位点结合调

节细胞分化(Cheng *et al.*, 2012)。TCTP 可通过与 mTOR 信号通路成员的相互作用来调节细胞的增殖、凋亡等(Bommer *et al.*, 2015; Chuang *et al.*, 2016)。另外,Chen 等(2013、2014)研究发现, TCTP 还在哺乳动物细胞自噬中具有重要的调节作用,通过 AMPK-ULK1 通路激活了 mTOR 下游表达起始细胞自噬,同时它还可通过 HIF-1 $\alpha$  调节自噬活性。随着 Bangrak 等(2004)发现, TCTP 在对虾抗病毒中具有重要作用, TCTP 在甲壳动物中的免疫作用成为研究热点。Leu 等(2013)进一步研究证实,对虾 Pm-fortilin(TCTP 同源类似物)可被 WSSV 诱导表达,通过 Bax 抑制线粒体触发的细胞凋亡。近年来,越来越多的研究发现,许多甲壳动物 TCTP 在其卵巢成熟的早期阶段呈显著性高表达,普遍认为这与卵母细胞组装细胞骨架相关。Loongyai(2007)等还发现, TCTP 可与 EF-1 $\alpha$  形成聚合物,通过细胞增殖促进卵巢发育。Makkapan 等(2011)研究表明,5-羟色胺可通过促进 TCTP 在墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)卵巢中的表达促进卵巢发育,同时上调的还有甲基法尼脂。

本研究通过克隆脊尾白虾 TCTP 基因,并研究自噬调控基因 TCTP、Hif-1 $\alpha$ 、Beclin1 和 Bcl-2 等在脊尾白虾卵巢发育期胰腺腺和卵巢中的表达,阐释自噬在脊尾白虾卵巢发育中的作用,为理解脊尾白虾卵黄蛋白原合成的分子调控过程、提高脊尾白虾繁殖力提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验用脊尾白虾购自山东日照海辰水产有限公司。

### 1.2 实验试剂

Trizol 试剂购自美国 Ambion 公司;反转录试剂盒 Primescript RT Reagent Kit with gDNA Eraser、Smart<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit、PMD18-T 载体、大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 和 dNTP 购自大连 TaKaRa 公司;HiFi Taq 酶购自 TransGen Biotech 公司;DL2000 Marker 购自天根生物有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自康为世纪有限公司;其他试剂为国产分析纯。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 脊尾白虾 TCTP 基因克隆** 取健康活泼个体的组织,按照 Trizol 试剂说明书提取脊尾白虾总 RNA,检测其完整性及含量。按照 Primescript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 说明书合成 cDNA 第一

链。按照 Smart<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 RACE-Ready-cDNA。

参照脊尾白虾转录组和 NCBI 上 Blast 的比对结果, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 对中间片段进行克隆, 以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 5  $\mu$ l; 正反向引物各 0.4  $\mu$ l; 模板 0.5  $\mu$ l; 灭菌双蒸水 3.7  $\mu$ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 35 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物电泳检测, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 与转录组序列比对验证。

3'/5'RACE 以扩增出来的中间片段为参考, 设计 3'RACE 引物和 5'RACE 引物。以 RACE-Ready-cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为模板 0.5  $\mu$ l, dNTP 0.8  $\mu$ l, UPM 引物 2.5  $\mu$ l, 3'/5'RACE 引物 0.5  $\mu$ l, HiFi Buffer(10 $\times$ )1  $\mu$ l, HiFi Taq 酶 0.1  $\mu$ l, 灭菌双蒸水 4.5  $\mu$ l。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 每循环降落 0.5 $^{\circ}$ C, 共 11 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 24 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 根据胶回收试剂盒说明书对电泳的目的条带进行切胶回收。回收的 DNA 溶液与 pMD18-T 载体连接, 用热激法转入大肠杆菌感受态细胞, 用氨苄青霉素培养基筛选, 挑取阳性克隆单一菌落, 菌落 PCR 验证并测序。

将 3'/5'RACE 以及中间片段的测序结果利用 DNASTar 软件拼接, 获得脊尾白虾 *TCTP* cDNA 全长

并找到 ORF, 翻译为氨基酸序列, 将该序列与 NCBI 数据库中的同源序列进行比对验证。

**1.3.2 脊尾白虾 *TCTP* 同源序列的多重比对和进化树分析** 在 NCBI 数据库中查找不同物种 *TCTP* 的同源序列, 运用软件 ClustalX 2.0.11 和 DNAMAN 对不同动物 *TCTP* 的氨基酸序列进行多重比对分析。再根据比对信息, 利用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

**1.3.3 脊尾白虾 *TCTP* 蛋白的生物信息学分析** 脊尾白虾 *TCTP* 蛋白理化性质分析, 用 ProtParam 软件预测脊尾白虾 *TCTP* 蛋白的氨基酸组成、等电点、分子量、分子式、脂溶指数和不稳定指数等; 通过 PredictProtein 软件从 PROSITE 数据库搜索模体, 预测该蛋白的潜在功能域等; 运用 NCBI 的 Conserved domain search 功能预测该蛋白的保守结构域。

**1.3.4 脊尾白虾 *TCTP* 基因的 Real-time PCR 定量检测** 根据栗治国等(2014)对卵巢发育的分期, 对健康脊尾白虾的肝胰腺和卵巢组织取样, 并进行荧光定量分析。参照脊尾白虾转录组, 通过在 NCBI 数据库比对, 找到自噬调控基因(*Beclin1*、*TCTP*、*Hif-1 $\alpha$*  和 *Bcl-2*)的部分序列, 并利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量引物(表 1)。以 18S 为内参, 按照荧光定量试剂盒的说明书加样, 使用 ABI 7500 Fast Real-time 仪器测定结果, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算脊尾白虾自噬调控基因在卵巢发育过程中的相对表达量, 用 SPSS17.0 软件进行显著性分析。

表 1 本研究所用引物序列  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'~3')	用途 Purpose
TCTP-F	TTCACCGACACCTACAAGCAT	中间片段的克隆 Cloning the internal fragments
TCTP-R	CAAGACACCAATAACGAAGGCTAA	
TCTP5-1	CCTGCTATCCAGAAACCT	5'和 3'末端的克隆 Cloning the 5' and the 3' end
TCTP3-1	TTCCGATGTTAATGGATGAC	
TCTP-realF	GCTTTGGCAGCAAGAAAGAC	荧光定量 PCR Real-time PCR
TCTP-realR	TTCGGCTAGAGGTTTCTGGA	
Beclin1-realF	AGCCTGAAGAACCAGCTGAA	荧光定量 PCR Real-time PCR
Beclin1-realR	GTTGTTGATCGTCCCGAAGT	
Alph-realF	AAGACCCCTCCTCCTTGT	荧光定量 PCR Real-time PCR
Alph-realR	ATTGGCAGGAGCATTGACTT	
Bcl2-realF	ATGTGGCCGGACTTATTGAC	荧光定量 PCR Real-time PCR
Bcl2-realR	TGATCTGCTTCTGGTGCTTG	
Actin-F	CCGAGACATCAAGGAGAAGC	荧光定量 PCR Real-time PCR
Actin-R	ATACCGCAAGATTCCATACCC	

## 2 结果与分析

### 2.1 脊尾白虾 *TCTP* 基因克隆及分析

本研究克隆得到脊尾白虾 *TCTP* 基因 cDNA 序列, 命名为 *EcTCTP*, 该基因全长为 732 bp (GenBank No. KY411921), 包括 5'非编码区 76 bp、3'非编码区 149 bp 以及开放阅读框 507 bp, 共编码 168 个氨基酸, 理论等电点为 4.48, 分子量约为 18.769 kDa (图 1)。具有 TCTP1 和 TCTP2 两个保守结构域。

```

1 CCTTCCCTGGTCGCCCTCAGTCCGGAGAGCAAGAACCAATCTAGGCCAAATTTTTACCGT
61 CAATCATCCATCCATCATGAAGGTCTTCAAGGATCTTATCAGTGGTGATGAAATGTTTAC
1 M K V F K D L I S G D E M F T
121 CGACACCTACAAGCATGAGATTGTTGATGACGCTTTTTATATGGTGGTTGGAAAGAACAC
16 D T Y K H E I V D D A F Y M V V G K N T
181 CACTGTAACCTGAGGGCGATATCCAGCTTGATGGTGCCAATCCTTCTGCGGAAGAAGCAGA
36 T V T E G D I Q L D G A N P S A E E A D
241 TGAAGGTAAGTGAAGCAGCGCTGTATCCGGTATTGATGTCGTCTTGTATTATGCGCCTCCA
56 E G T E S S A V S G I D V V L F M R L Q
301 GGAAACTGGCTTTGGCAGCAAGAAAGACTACCTTACCTACATGAAGGAGTATATTAAGAG
76 E T G F G S K K D Y L T Y M K E Y I K S
361 TTTGAAGAGCAAGCTAGAGGGAACCCAGCAGCTGAAAAGCTTCTGCTATCCAGAAACC
96 L K S K L E G T P A A E K L P A I Q K P
421 TCTAGCCGAATTGCTTAAGAAGTTCAAGGACCTTCAATTCTTACCAGGTGAATCCATGAA
116 L A E L L K K F K D L Q F F T G E S M N
481 CCCTGATGGTATGGTTGTAATTGGCGATTATAAGGAGGTTGATGGTGAAGAAAGACCAGT
136 P D G M V V I G D Y K E V D G E E R P V
541 ACTCTATTTCCCTCTGTTAGGTCTAGAGAGGAAAAACTTTAGACAGCAATGTAACCTAA
156 L Y F P L L G L E E E K L *
601 GATCCAGTATTCCAGTCATCCATTAACATCGGAACATCAATCTCATGTTGAATTAGCCTT
661 CGTTATTGGTGTCTTGTTTTAAATTTAATAAAAATTCATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
721 AAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 脊尾白虾 *TCTP* 基因序列和氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *EcTCTP*

ATG 为起始密码子, TAG 为终止密码子, 下划线为蛋白激酶 C 磷酸化位点, 椭圆为酪氨酸激酶 II 磷酸化位点  
ATG is the start codon, TAG is the stop codon, protein kinase C phosphorylation sites is underlined,  
casein kinase II phosphorylation sites is indicated by ellipse

构建进化树如图 3, 哺乳动物聚为一支, 甲壳动物聚为一支; 甲壳动物中脊尾白虾与同为抱卵亚目的中华绒螯蟹进化关系最近, 置信度为 82; 产卵亚目的中国明对虾、印度明对虾、凡纳滨对虾和日本对虾聚为一支。

### 2.3 自噬调控基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达

#### 2.3.1 *TCTP* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达

*TCTP* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的组织表达见图 4。如图 4 所示, 肝胰腺中的 *TCTP* 基因在卵巢发育增殖期表达量最高并显著高于其他时期 ( $P < 0.05$ ), 然后持续下降, 在产后恢复期达到最低值。

### 2.2 *EcTCTP* 同源氨基酸序列多重比对和生物进化树分析

不同物种 *TCTP* 氨基酸序列进行多重比对结果见图 2。从图 2 可以看出, 不同物种 *TCTP* 既有高保守序列也有一定的差异序列。脊尾白虾 *TCTP* 与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 序列一致性最高, 各种属之间的 *TCTP* 序列保守性较好, 但不同种属(如甲壳动物和哺乳动物)之间却有明显差异, 比如: 甲壳动物 *TCTP* 不含半胱氨酸残基(Cys)。

卵巢中 *TCTP* 基因在增殖期表达量最低, 在小生长期表达量达到最高值并显著高于成熟期和产后恢复期 ( $P < 0.05$ ), 从小生长期到产后恢复期表达量持续下降。肝胰腺中 *TCTP* 的表达总量是卵巢中 *TCTP* 表达总量的 60 倍左右。

#### 2.3.2 *Hif-1 $\alpha$* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达

*Hif-1 $\alpha$*  基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的组织表达见图 5。如图 5 所示, 肝胰腺中的 *Hif-1 $\alpha$*  在卵巢发育增殖期和小生长期表达量最高, 且无显著性差异, 在大生长期急剧下降到最低值并极显著低于前 2 期 ( $P < 0.01$ ), 大生长期与成熟期无显著差异, 但显著低于产后恢复期 ( $P < 0.05$ )。卵巢中的 *Hif-1 $\alpha$*  基因在卵巢发育的增殖期表达量最低, 显著低于小生长期 ( $P < 0.05$ ),

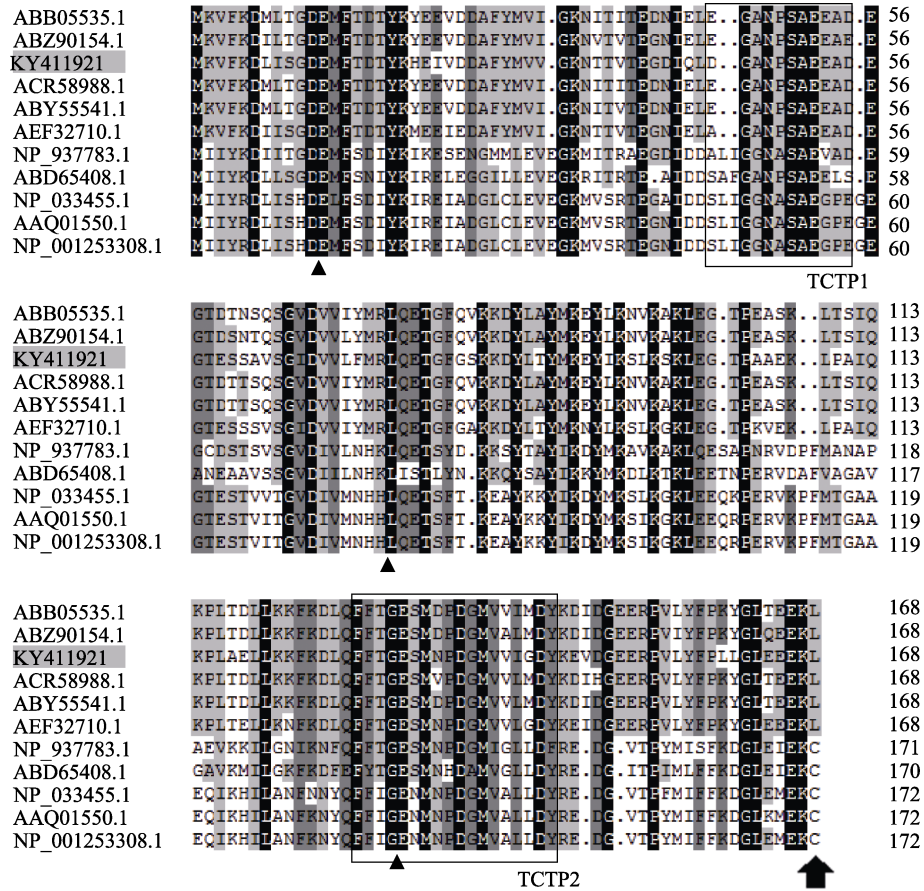


图 2 脊尾白虾 TCTP 与其他物种 TCTP 氨基酸序列多重比对  
Fig.2 Multiple alignment of TCTP amino acids of *E. carinicauda* and other animals

ABB05535.1: 中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis*; ABZ90154.1: 日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus*; KY411921: 脊尾白虾 *Exopalaemon carinicauda*; ACR58988.1: 印度明对虾 *Fenneropenaeus indicus*; ABY55541.1: 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*; AEF32710.1: 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*; NP\_937783.1: 斑马鱼 *Danio rerio*; ABD65408.1: 大菱鲆 *Scophthalmus maximus*; NP\_033455.1: 小家鼠 *Mus musculus*; AAQ01550.1: 智人 *Homo sapiens*; NP\_001253308.1: 猕猴 *Macaca mulatta*; ▲: GTPase 结合槽 GTPase binding groove; □: TCTP1 和 TCTP2 功能域 TCTP1 and TCTP2 functional domain; ⬆: 甲壳动物 C 末端的亮氨酸(Leu)和其他物种 C 末端的半胱氨酸(Cys) Leucine at the end of C in crustacean and Cysteine at the end of C in other animals

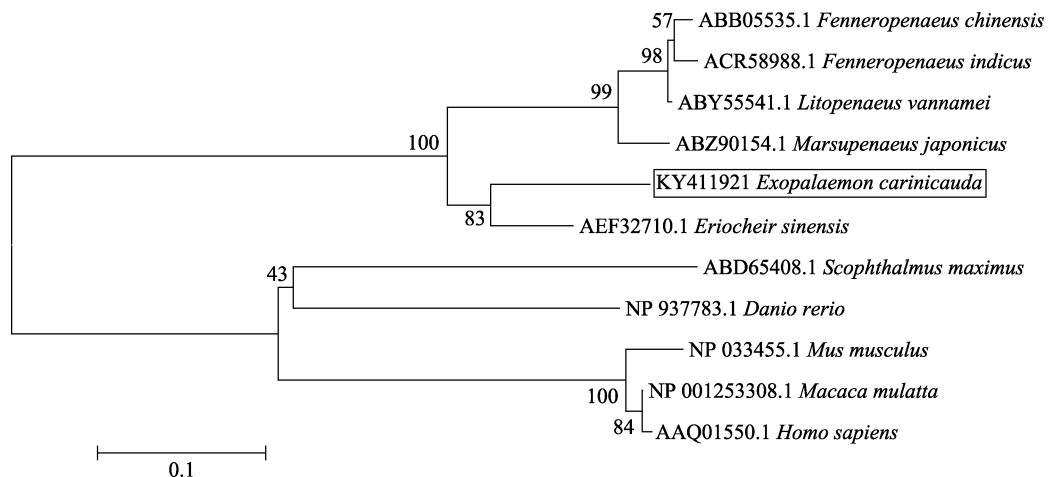


图 3 不同物种 TCTP 氨基酸序列进化树  
Fig.3 Phylogenetic tree analysis of TCTP amino acid sequences

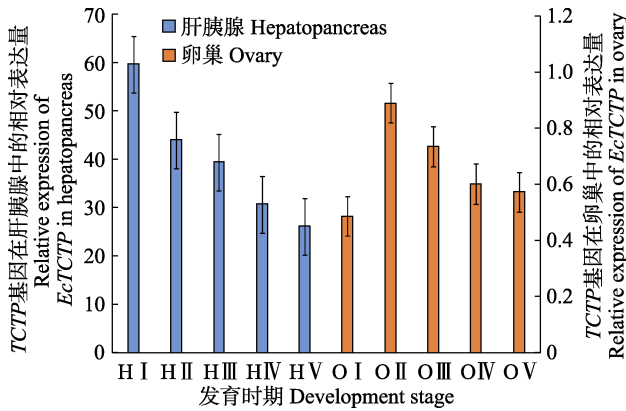


图4 *EcTCTP* 在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达  
Fig.4 Relative expression of *EcTCTP* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

H: 肝胰腺; O: 卵巢; I: 增殖期; II: 小生长期; III: 大生长期; IV: 成熟期; V: 产后恢复期。下同  
H: Hepatopancreas; O: Ovary; I: Proliferative phase; II: Niche long term; III: Long term; IV: Maturity; V: Postpartum recovery period. The same as below

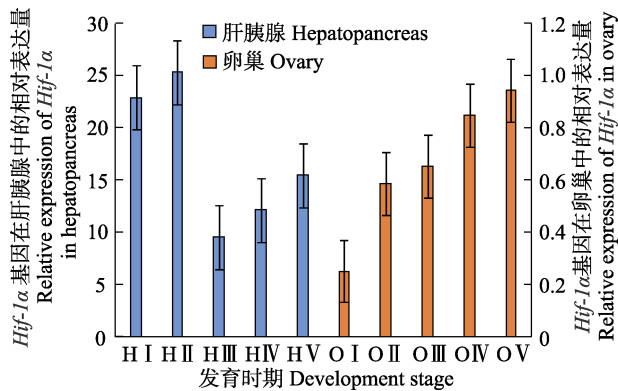


图5 *Hif-1α* 基因在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达  
Fig.5 Relative expression of *Hif-1α* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

从小生长期到产后恢复期持续升高,并在产后恢复期表达量达到最高,其中,小生长期和大生长期表达量无显著性差异。肝胰腺中 *Hif-1α* 的整体表达量约为卵巢中表达量的26倍。

**2.3.3 *Ec-Beclin1* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达** 脊尾白虾 *Beclin1* 基因(*Ec-Beclin1*) 在卵巢发育过程中的组织表达如图6所示,肝胰腺中的 *Ec-Beclin1* 从增殖期到小生长期表达量上升,大生长期表达量极显著下降( $P<0.01$ )并达到最低,从大生长期到产后恢复期表达量回升( $P<0.05$ )。卵巢中的 *Ec-Beclin1* 从增殖期到小生长期表达量上升,大生长期表达量极显著上升并达到最高( $P<0.01$ ),成熟期和产后恢复期的表达量极显著下降( $P<0.01$ )。

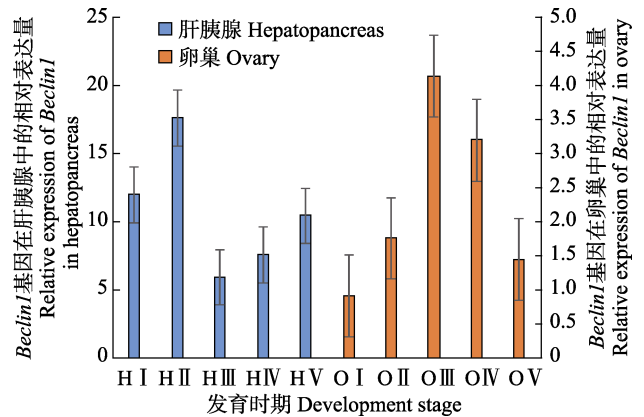


图6 *Ec-Beclin1* 在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达  
Fig.6 Relative expression of *Ec-Beclin1* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

**2.3.4 *Bcl-2* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达** *Bcl-2* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达量如图7所示:肝胰腺中 *Bcl-2* 基因从增殖期到小生长期表达极显著上调( $P<0.01$ ),大生长期极显著下降并达到最低值( $P<0.01$ ),成熟期和产后恢复期表达量逐渐升高但差异不显著。卵巢中 *Bcl-2* 基因从增殖期到小生长期表达量上升,但差异不显著,大生长期表达极显著下降( $P<0.01$ )并达到最低,成熟期和产后恢复期表达量均发生极显著上升( $P<0.01$ ),在大生长期表达量最低,产后恢复期表达量最高。

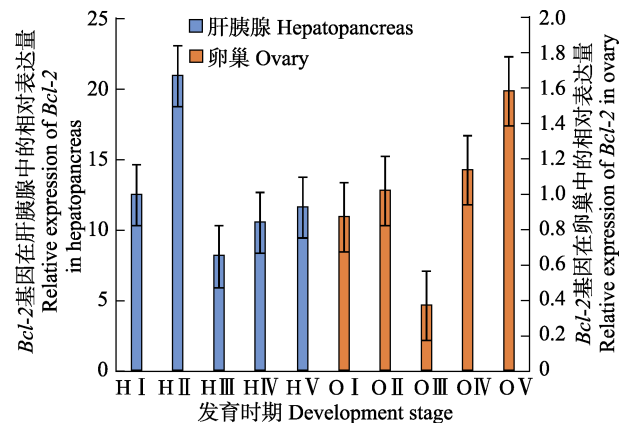


图7 *Bcl-2* 基因在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达  
Fig.7 Relative expression of *Bcl-2* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

### 3 讨论

通过序列多重比对发现,不同物种 TCTP 都具有保守功能域 TCTP1 和 TCTP2,而且发现 Glu12、Leu74、Glu132 等位点的保守性极高。Dong 等(2009)研究表明, Glu12 等构成了人类 TCTP 的 GTPase 结

合槽,可通过与 Rheb 的 Lys45 形成盐桥,交换鸟嘌呤激活 Rheb 的 GTPase 活性,从而调控 mTOR 信号通路。功能域预测发现,脊尾白虾 *TCTP* 蛋白含有蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点和酪氨酸激酶 II(KT II)磷酸化位点等,而 PKC 和 KT II 都是 mTOR 信号通路成员,可以通过该通路调节细胞的生长增殖和存活(Guertin *et al*, 2006)。所以,脊尾白虾 *TCTP* 可能通过与免疫生长相关的 mTOR 信号通路参与生命活动的调节。

在卵巢各发育时期,自噬相关基因在脊尾白虾卵黄蛋白原合成器官中发挥着不同的调控作用。卵巢发育期,脊尾白虾肝胰腺 *TCTP* 基因在增殖期表达量最高,之后表达量持续下降,这与脊尾白虾肝胰腺甲基法尼脂转移酶的表达趋势具有相似性(李志敏等, 2016),且与墨吉对虾 *TCTP* 基因在卵巢中的表达趋势具有一致性(Loongyai *et al*, 2007)。脊尾白虾 *TCTP* 在卵巢发育的小生长期表达量最高,这与栗治国等(2014)发现的脊尾白虾卵巢小生长期开始出现内源性卵黄合成期卵母细胞相符。Makkapan 等(2011)用 5-羟色胺(5-HT)处理刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)卵巢,发现 5-HT 可促进甲基法尼脂(MF)释放入血淋巴,并促进卵巢发育至卵黄成熟期,还可使卵巢外植体中的 *TCTP* 基因表达上调。

脊尾白虾 *Hif-1a* 基因在肝胰腺中的表达量远高于卵巢,肝胰腺 *Hif-1a* 的表达趋势与外源性卵黄蛋白原的表达趋势大致相反,即在外源性卵黄蛋白原表达量低的时期(增殖期和小生长期),肝胰腺 *Hif-1a* 表达量高,在外源性卵黄蛋白原表达量高的时期(大生长期和成熟期),肝胰腺 *Hif-1a* 表达量低;卵巢 *Hif-1a* 的表达趋势与内源性卵黄蛋白原的表达趋势基本一致,均是从增殖期到产后恢复期持续增高(梁俊平等, 2015)。这说明,适当的缺氧微环境可能是脊尾白虾卵巢发育所必需的。栗治国等(2014)发现,脊尾白虾卵巢无隔室,无血管和血窦,并猜测这与脊尾白虾卵巢体积小、氧气便于运输相关,本研究从一定程度上验证了该猜测。

脊尾白虾肝胰腺中的 *Beclin1* 基因与 *Hif-1a* 基因的表达趋势相一致。唐中园等(2015)研究上皮性卵巢癌时发现,低氧下敲除 *Hif-1a* 后, *Beclin1* 表达下降,并认为低氧可诱导 *Hif-1a* 表达,促进卵巢自噬的发生。*Beclin1* 基因可介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体,是自噬发生的关键靶点(段振玲等, 2007)。因此,脊尾白虾肝胰腺 *Beclin1* 基因可能在 *Hif-1a* 的调节下参与自噬的发生,并与外源性卵黄蛋白原合成相关。卵

巢中 *Beclin1* 基因的表达从增殖期到大生长期表达量不断升高,并在大生长期达到最高,在成熟期和产后恢复期 *Beclin1* 基因的表达量又下降,这与脊尾白虾蜕皮激素受体(*EcR*)在卵巢中的表达趋势相似(梁俊平等, 2015),可能与蜕皮激素受体的表达具有相关性。梁俊平等(2015)认为,脊尾白虾卵巢和肝胰腺中 *EcR* 均参与了卵黄蛋白原合成,且可能对卵巢的多次成熟具有调节作用。因此,脊尾白虾自噬相关基因 *Beclin1* 可能在肝胰腺和卵巢合成卵黄蛋白原的过程中发挥调节作用。

脊尾白虾肝胰腺 *Bcl-2* 基因小生长期表达量最高,整个表达趋势与 *Beclin1* 基因一致。研究表明,凋亡蛋白 *Bcl-2* 可通过 BH3 结构域与 *Beclin1* 蛋白相结合,从而抑制细胞自噬作用,可能对细胞最终走向自噬凋亡起着关键作用(Pattingre *et al*, 2005; He *et al*, 2010; 叶挺等, 2013)。这说明脊尾白虾肝胰腺 *Bcl-2* 可能通过与 *Beclin1* 结合抑制发育早期自噬的发生并促进大生长期和成熟期发生自噬。研究表明,大生长期和成熟期是肝胰腺外源性卵黄蛋白原合成旺盛期(梁俊平等, 2015),这说明肝胰腺 *Bcl-2* 可能通过对自噬的调节促进外源性卵黄蛋白原的合成。脊尾白虾卵巢 *Bcl-2* 基因在卵巢发育大生长期表达量最低,整体表达趋势与脊尾白虾卵巢 *Beclin1* 基因的表达趋势相反。*Bcl-2* 蛋白可以通过抑制 *Beclin1* 与 VPS34 共结合发挥抑制自噬的作用,说明脊尾白虾卵巢 *Bcl-2* 基因与 *Beclin1* 基因协同作用,共同促进大生长期发生自噬,而抑制其他时期的自噬。又由于小生长期和大生长期是内源性卵黄蛋白合成期卵母细胞主要存在的时期(栗治国等, 2014),因此, *Bcl-2* 和 *Beclin1* 基因在卵巢中的表达共同促进自噬的发生可能与参与内源性卵黄蛋白原的合成相关。

综上所述,卵巢发育时期脊尾白虾自噬调控基因 *TCTP*、*Hif-1a*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 相互协调,可能通过自噬作用参与脊尾白虾卵黄蛋白原的调节促进卵巢发育。

#### 4 小结

本研究克隆得到了脊尾白虾 *TCTP* 基因全长并对该蛋白的结构和功能进行了预测。另外,通过研究卵巢发育期自噬相关基因在脊尾白虾肝胰腺和卵巢中的表达,阐述了卵黄蛋白原合成过程中 4 种自噬相关基因的调控趋势。为阐明脊尾白虾卵黄蛋白原合成的分子调控过程、提高脊尾白虾繁殖力提供了理论基础,也为环境测评和毒理学研究提供了基础数据。

## 参 考 文 献

- Bangrak P, Graidist P, Chotigeat W, *et al.* Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(3): 219–226
- Batisti C, Ambrosio MR, Rocca BJ, *et al.* Translationally controlled tumour protein (TCTP) is present in human cornea and increases in herpetic keratitis. *Diagnostic Pathology*, 2012(7): 90
- Bommer UA, Iadevaia V, Chen JZ, *et al.* Growth-factor dependent expression of the translationally controlled tumour protein TCTP is regulated through the PI3-K/AKT/mTORC1 signalling pathway. *Cellular Signalling*, 2015, 27(8): 1557–1568
- Chen K, Chen SL, Huang CH, *et al.* TCTP increases stability of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by interaction with and degradation of the tumour suppressor VHL. *Biology of the Cell*, 2013, 105(5): 208–218
- Chen K, Huang CH, Yuan J, *et al.* Long-term artificial selection reveals a role of TCTP in autophagy in mammalian cells. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(8): 2194–2211
- Cheng X, Li JH, Deng J, *et al.* Translationally controlled tumor protein (TCTP) downregulates Oct4 expression in mouse pluripotent cells. *BMB Reports*, 2012, 45(1): 20–25
- Chuang WL, Lin PY, Lin HC, *et al.* The apoptotic effect of ursolic acid on SK-Hep-1 cells is regulated by the PI3K/Akt, p38 and JNK MAPK signaling pathways. *Molecules*, 2016, 21(4): 460
- Dong XC, Yang B, Li YJ, *et al.* Molecular basis of the acceleration of the GDP-GTP exchange of human Ras homolog enriched in brain by human translationally controlled tumor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(35): 23754–23764
- Duan ZL, Peng ZL, Wang ZH. Expression and involved signal transduction pathway of autophagy gene beclin 1 in epithelial ovarian cancer. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 2007, 38(2): 239–242 [段振玲, 彭芝兰, 王赞宏. 上皮性卵巢癌中自噬基因 Beclin 1 的表达及其调控相关信号传导途径的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2007, 38(2): 239–242]
- Fainzilber M, Tom M, Shafir S, *et al.* Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? *Biological Bulletin*, 1992, 183(2): 233–241
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue ZY, *et al.* The beclin 1-VPS34 complex-at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology*, 2010, 20(6): 355–362
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC alpha but not S6K1. *Developmental Cell*, 2006, 11(6): 859–871
- He C, Levine B. The beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(2): 140–149
- Leu JH, Lin SJ, Huang JY, *et al.* A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 1011–1017
- Li ZG, Zhang CS, Li FH, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Exopalaemon carinicaudal* (Holthuis, 1950). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 362–370 [栗治国, 张成松, 李富花, 等. 脊尾白虾的性腺发育及组织结构观察. *水产学报*, 2014, 38(3): 362–370]
- Li ZM, Li J, Li JT, *et al.* The expression analysis of farnesoic acid O-methyl transferase (*FAMeT*) gene during the ovarian development cycles of *Exopalaemon carinicaudal*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 46–51 [李志敏, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicaudal*) *FAMeT* 基因在卵巢发育周期中的表达分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 46–51]
- Liang JP, Wang Y, Duan YF, *et al.* Molecular cloning of ecdysteroid receptor and its expression during the ovarian development and embryogenesis of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 942–952 [梁俊平, 王芸, 段亚飞, 等. 脊尾白虾 *EcR* 基因的克隆及其在卵巢和胚胎发育过程中的表达分析. *水产学报*, 2015, 39(7): 942–952]
- Loongyai W, Phongdara A, Chotigeat W, *et al.* Cloning and expression of a TCTP homolog from the ovaries of banana prawn. *Marine Biology*, 2007, 150(3): 455–462
- Makkapan W, Maikaeo L, Miyazaki T, *et al.* Molecular mechanism of serotonin via methyl farnesoate in ovarian development of white shrimp: *Fenneropenaeus merguensis* de Man. *Aquaculture*, 2011, 321(1–2): 101–107
- Pattingre S, Tassa A, Qu XP, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122(6): 927–939
- Suwansa-ard S, Kankuan W, Thongbuakaew T, *et al.* Transcriptomic analysis of the autophagy machinery in crustaceans. *BMC Genomics*, 2016, 17: 587
- Tang ZY, Zhang N, Di W, *et al.* Regulation of hypoxia-induced autophagy by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2015, 35(12): 1804–1808 [唐中园, 张宁, 狄文, 等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  对低氧诱导自噬的调控作用. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(12): 1804–1808]
- Wang YF, Du NS, Lai W. Studies on the relationship of organelles in oocyte with vitellogenesis of *Macrobrachium rosenbergii*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(1): 24–28 [王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾卵母细胞细胞器与卵黄发生的关系. *水生生物学报*, 1999, 23(1): 24–28]
- Yano I, Chinzei Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1987, 86(2): 213–218
- Yarm FR. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(17): 6209–6221
- Ye T, Shao ZW. The function of Bcl-2/Beclin-1 complex in autophagy regulation. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29(6): 513–519 [叶挺, 邵增务. Bcl-2/Beclin-1 复合体在自噬中的调节作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(6): 513–519]
- Zhang M. Cloning and expression analysis of hyperglycemic

hormone family gene from *Exopalaemon carinicauda* after function research. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2015 [张美. 脊尾白虾高血糖激素家族基因的克隆、表达及功能研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]  
Zhao MR, Kang XJ, Mu SM, *et al.* Ultrastructure of the

vitellogenesis in the oocytes of *Neocaridina denticulata sinensis*. Journal of Hebei University(Natural Science Edition), 2009, 29(3): 318–323, 328 [赵梦然, 康现江, 穆淑梅, 等. 中华锯齿米虾卵母细胞卵黄发生的超微结构. 河北大学学报(自然科学版), 2009, 29(3): 318–323, 328]

(编辑 马瑾艳)

## Cloning of the Translationally Controlled Tumor Protein Gene (*TCTP*) and Expression Analysis of Autophagy Regulatory Related Genes During the Development of Ovary in *Exopalaemon carinicauda*

MA Li<sup>1,2</sup>, GE Qianqian<sup>2</sup>, XU Yang<sup>1,2</sup>, PENG Suxiao<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2,3①</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 and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** In order to understand the regulatory mechanism of ovarian development in *Exopalaemon carinicauda*, we used RACE (Rapid amplification of cDNA ends) technology to clone the translationally controlled tumor protein (*TCTP*) gene. The full-length cDNA of *TCTP* gene in *E. carinicauda* (*EcTCTP*) is 732 bp long with an intact open reading frame of 507 bp encoding a polypeptide of 168 amino acids. Six kinds of functional sites were identified in *EcTCTP*, including one N-glycosylation site, three protein kinase C phosphorylation sites, six casein kinase II phosphorylation sites, three N-myristoylation sites, *TCTP* domain signature 1, and *TCTP* domain signature 2. Multiple alignment analysis and phylogenetic tree revealed that *EcTCTP* has the highest similarity to *TCTP* from *Eriocheir sinensis*. The results demonstrated that the cysteine (Cys) residue at the C terminal is highly conserved in all the animals, except the crustaceans. The lack of Cys residue might affect the oxidation resistance and the formation of *TCTP* dimers in crustaceans. The expression profile of 4 kinds of autophagy-related genes during the ovarian development period showed that: (1) *EcTCTP* gene in the hepatopancreas from proliferative stage to postpartum recovery period decreased. (2) Expression of *EcTCTP* gene in the ovary was the highest during the minor growth phase. Furthermore, the expression profile of *Hif-1 $\alpha$* , *Beclin1*, and *Bcl-2* in hepatopancreas showed a similar trend, that is, high expression from proliferative period to minor growth phase, the lowest expression during the major growth phase with an increase during the mature period. The expression level of the gene *Hif-1* in the ovary was similar to that of the gene vitellogenin in the ovary, which increased from the proliferative phase to the postpartum recovery period. The expression level of the gene *Beclin1* in the ovarian cells increased from the proliferative stage to the major growth phase, and reached the highest level during the major growth phase, which was consistent with the synthesis of endogenous vitellogenin during the late development stage in prawn. The expression of the gene *Bcl-2* in the ovary was the lowest during the major growth phase. The results illustrated that the autophagy-related genes might function together in the ovarian development of *E. carinicauda* by regulating autophagy during the synthesis of vitellogenin.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; *TCTP*; Autophagy; Vitellogenin; Expression analysis

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170328001

http://www.yykxjz.cn/

许杨, 王佳佳, 葛倩倩, 崔彦婷, 马骊, 李健. 脊尾白虾 *E75* 基因克隆及 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 在不同蜕皮分期的表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 110–118

Xu Y, Wang JJ, Ge QQ, Cui YT, Ma L, Li J. Cloning of *E75* gene and expression analysis of *E75*, *ECR* and *RXR* during different molting stages of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 110–118

## 脊尾白虾 *E75* 基因克隆及 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 在不同蜕皮分期的表达分析\*



许 杨<sup>1</sup> 王佳佳<sup>1</sup> 葛倩倩<sup>1</sup> 崔彦婷<sup>1</sup> 马 骊<sup>1</sup> 李 健<sup>1,2①</sup>

1. 农业农村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试点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** 本研究在克隆脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) *E75* 基因 (*EcE75*, GenBank No. KY471317) 的基础上, 探讨了其在蜕皮过程中的作用, 同时也探讨了克隆脊尾白虾的蜕皮激素受体基因 (*EcECR*) 和维甲酸 X 受体基因 (*EcRXR*) 在不同蜕皮分期的表达特征。克隆的 *EcE75* 基因全长为 3944 bp, 包括 2520 bp 的开放阅读框 (ORF)。该开放阅读框编码一个由 839 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 92.307 kDa, 理论等电点为 7.48。EcE75 蛋白包含 1 个 C4 锌指结构, 1 个配体结合结构域, 并且有 1 个明显的跨膜螺旋。*EcE75* 基因在进化上具有一定的保守性, 与甲壳动物聚为一支, 与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、黑背地蟹 (*Gecarcinus lateralis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 等亲缘关系最近。*EcE75* 基因在脊尾白虾的各组织中均有表达, 其中, 眼柄中的表达量最高, 卵巢次之。在不同蜕皮分期中, *EcRXR* 与 *EcECR*、*EcE75* 的表达规律基本一致, 生殖蜕皮前期和后期表达量都比生长蜕皮高。生长蜕皮和生殖蜕皮因为卵巢发育而存在明显不同, 蜕皮激素对卵巢发育的刺激作用, 通过 *EcECR*、*EcRXR* 和 *EcE75* 基因的表达上调可以体现出来。对 *EcECR*、*EcRXR* 和 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的表达研究, 为了解虾蟹类蜕皮机制提供了参考信息。

**关键词** 脊尾白虾; *EcECR*; *EcRXR*; *EcE75*; 蜕皮期

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0110-09

蜕皮贯穿甲壳动物的整个生活史, 与其生长、发育和繁殖息息相关。蜕皮主要受互为拮抗的 Y-器官分泌蜕皮激素 (MH, 蜕皮甾类) 和眼柄内 X-器官窦腺复合体分泌蜕皮抑制激素 (MIH) 影响。蜕皮激素是调控甲壳动物蜕皮及变态发育的重要激素, 它的活性形

式是 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E)。在昆虫体内, 蜕皮激素受体 (Ecdysteroid receptor, ECR) 与超气门蛋白 (Ultraspiracle, USP) 形成异源二聚体, 在甲壳动物体内, ECR 与维甲酸 X 受体 (Retinoid X receptor, RXR) 形成异源二聚体 (Yao *et al*, 1994;

\* 现代农业产业技术体系专项 (CARS-48)、泰山产业领军人才工程项目 (LJNY2015002) 和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目 (2015ASKJ02) 共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), and Science and Technology Innovation Project of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 许 杨, E-mail: aspenxy@163.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-03-28, 收修改稿日期: 2017-04-28

Verhaegen *et al.*, 2011)。这些二聚体与 20E 结合后形成的受体复合物直接激活 *E75* 等蜕皮激素早期应答因子, 形成初级应答反应(Riddiford *et al.*, 2003; Thummel *et al.*, 2002)。早期应答因子诱导表达的蜕皮激素次级应答基因级联放大蜕皮激素信号, 对蜕皮、变态、生殖等生理过程起调控作用(Dubrovsky *et al.*, 2005)。在昆虫中, *E75* 基因首先在果蝇(*Drosophilidae*)中分离得到, Crossgrove 等(2008)研究表明, *E75* 对果蝇的蜕皮、变态及成虫雌蝇的卵室发育有重要作用。果蝇存在 *E75A*、*E75B* 和 *E75C* 三种亚型, *E75A* 突变使幼体发育过程中蜕皮激素水平降低, 导致发育迟缓、蜕皮缺陷等现象(Bialecki *et al.*, 2002)。*E75B* 突变对生长发育和繁殖无明显影响, *E75C* 突变导致果蝇在成虫期死亡。在甲壳动物中, *E75* 首先在刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)中分离鉴定, 而后又在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、黑背陆地蟹(*Gecarcinus lateralis*)和大型蚤(*Daphnia magna*)等物种中被分离鉴定(Chan, 1998; Priya *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2005; Hannas *et al.*, 2010; Litoff *et al.*, 2014)。对 *E75* 在甲壳动物蜕皮激素信号转导中的作用研究较少。

学者们对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的蜕皮相关基因进行了研究, 梁俊平等(2015)克隆了 *ECR* 基因, 并分析其在卵巢和胚胎发育过程中的表达情况。柳飞等(2016)克隆了 *RXR* 基因, 并分析其在温度、盐度胁迫和蜕皮周期中的表达情况。张美等(2016)克隆了 *MIH* 基因, 并分析其在 pH 和氨氮胁迫中的表达规律。而关于脊尾白虾的 *E75* 基因的研究至今尚未见报道。因此, 本研究结合脊尾白虾转录组数据库, 运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆 *EcE75* 基因 cDNA 全长, 通过荧光定量 PCR 分析了该基因在脊尾白虾的组织表达分布及在不同蜕皮分期 *EcRXR*、*EcECR* 和 *EcE75* 的表达规律, 以比较生长蜕皮和生殖蜕皮的不同, 为了解虾蟹类蜕皮机制提供参考信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

脊尾白虾取自山东省日照海辰水产有限公司, 均为活力好、大小均匀的健康个体, 体长为(5.42±0.34) cm, 体重为(1.58±0.22) g。将实验用虾暂养于 200 L 的 PVC 桶中, 每桶 50 尾, 暂养海水盐度为 31, pH 为 8.2, 水温为 24℃, 24 h 持续通气充氧。每天早晚 2 次饲喂蛤蜊肉, 吸污换水 1/3, 连续养殖 7 d

后开始实验。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 2 种蜕皮的区分及样品处理** 未性成熟的脊尾白虾处于生长期, 该组实验虾的蜕皮为生长蜕皮。性成熟的实验虾分为卵巢发育虾和抱卵虾, 其中, 卵巢发育且带有腹蓝者的蜕皮为生殖蜕皮。根据中华锯齿米虾(*Neocaridina denticulata sinensis*)(王战芳, 2014)和凡纳滨对虾(Gao *et al.*, 2015)的方法进行蜕皮分期, 分为蜕皮间期(C 期)、蜕皮后期(软皮期, AB 期)、蜕皮前期(D 期, 取自特征明显的 D2 亚期)。实验用虾暂养 1 周后, 挑选活力好、无残缺的个体, 用解剖剪剪取尾节末端, 置于倒置显微镜, 观察分期并拍照。将确定分期的脊尾白虾每尾虾取 0.1 ml 血与 0.1 ml 预冷的抗凝剂混合, 于 4℃ 下 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后加入 1 ml Trizol, 然后, 再采集肝胰腺、鳃、肌肉、肠、胃、眼柄、大颚器、表皮、外壳、腹神经节、卵巢和心共 12 种组织。液氮研磨后, 称取 50 mg 样品, 置于无 RNA 酶离心管中, 并加入 1 ml Trizol, 震荡混匀后, 置于-80℃ 冰箱保存。每个平行取 3 尾, 每个蜕皮分期共 3 个平行。

**1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成** 采用 Trizol 试剂法提取各组织的总 RNA, 核酸定量仪(NanoDrop 2000, Thermo)测定纯度, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测浓度及完整性。利用 SMART™ RACE Amplification Kit (Clontech)合成 cDNA 模板。

**1.2.3 *EcE75* 基因 cDNA 全长的克隆** 根据实验室脊尾白虾转录组数据和 NCBI 上 Blast 的比对结果, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 *E75-F* 和 *E75-R*(表 1), 以 1.2.2 中合成的 cDNA 为模板, 使用 HiFi 酶进行 *EcE75* 基因中间片段的扩增。扩增体系: cDNA 模板 1 μl, HiFi Buffer 2 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μl, 引物(上、下游)各 1 μl, HiFi 酶 (5 U/ml) 0.2 μl, 灭菌水补至 20 μl。

PCR 反应程序: 95℃ 5 min; 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保温。PCR 产物经 1.0% 的 TAE 琼脂糖凝胶电泳初步检测后, 使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (TaKaRa)切胶回收, 并纯化检测。切胶回收产物与 pEASY-T1 载体连接后, 将 5 μl 连接产物转化到 50 μl Trans1-T1 感受态细胞中。在含 AMP、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基中, 37℃ 培养过夜, 挑取单一白斑菌落继续培养 6 h。菌落 PCR 鉴定后, 将含有目的条带的菌液送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果经 NCBI 比对, 此序列片段与其他物

种的 *E75* 基因同源性较高, 确定为脊尾白虾的 *E75* 基因序列片段。

根据上述扩增得到的中间片段利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5'RACE 引物 *E75* 3'RACE 和 *E75* 5'RACE(表 1), 用于 RACE 扩增 *E75* 基因 cDNA 全长序列。使用 Smart Race 试剂盒(TaKaRa)进行 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增, 扩增体系为 3'/5'RACE cDNA 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$ Advantage 2 PCR Buffer 2.0  $\mu$ l, dNTP(10 mmol/L) 0.2  $\mu$ l, 3'/5'引物 0.2  $\mu$ l, 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase 0.2  $\mu$ l, UPM(10 $\times$ ) 1  $\mu$ l, PCR 级 H<sub>2</sub>O 6.9  $\mu$ l。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 10 个循环, 每个循环退火温度降 0.5 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与基因中间片段的克隆方法相同。

### 1.3 *EcE75* 基因的生物信息学分析

使用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序将测序所得的中间片段和 3'、5'末端序列进行拼接, 得到 *EcE75* 基因全长。利用 ExPASy(<http://www.expasy.ch/tools/>) 和 Gene Tool 软件预测开放阅读框(ORF)和蛋白质序列。使用 Predict Protein 和 SMART 服务器进行蛋白质理化性质预测和功能结构域分析。使用 Tmpred 进行跨膜结构域预测。使用 ClustalX 和 DNAMAN 软件对脊尾白虾和其他物种的 *E75* 氨基酸序列进行比对分析, 并用 MEGA 6.07 软件以邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树, 1000 次 Bootstrap 重复检验进化树的置信度。

### 1.4 *EcE75* 基因组织表达分析

根据已获得的基因序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异引物 *E75RT-F* 和 *E75RT-R*, 并以脊尾白虾 18S rRNA 为内参基因设计引物 18sF 与 18sR(表 1)。利用 Real-time PCR 检测脊尾白虾不同组织 *E75* 基因的相对表达量。反应体系和程序参考 FS Universal SYBR Green Master(ROX)说明书, 采用 10  $\mu$ l 反应体系。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s。实验中每 3 尾混合作为 1 个样品, 每个样品进行 3 次重复, 数据为 3 个重复的平均值 $\pm$ 标准差, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算脊尾白虾 *E75* 基因在各组织中的相对表达量。

### 1.5 *EcRXR*、*EcECR* 和 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的组织表达分析

根据 GenBank 的基因序列 *EcRXR* (GenBank No.

表 1 研究所用的引物序列

Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence
<i>E75-F</i>	GTGACAGAATTTGATGGGACT
<i>E75-R</i>	GGTTGATGCGAAGAATAGAAC
<i>E75 5'RACE</i>	ATCGGTTGCGGTTGATGCGAAGAATAGA
<i>E75 3'RACE</i>	ATCCAGCAGAAGATTCAGTATCGCCCC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
18sF	TATACGCTAGTGAGCTGGAA
18sR	GGGAGGTAGTGACGAAAAAT
<i>RXRRT-F</i>	GGAACGCCAACGAACGAAAG
<i>RXRRT-R</i>	CCTTTCGTTTCGTTGGCGTTC
<i>EcRRT-F</i>	GTCGTCTCTCAACGGCTACAG
<i>EcRRT-R</i>	TCTCCACACACCAGGCATAAT
<i>E75RT-F</i>	CGACAAAGCATCTGGTTTCC
<i>E75RT-R</i>	ACTGCTGGTCTTGGTGACAG

KU647675), *EcECR* (GenBank No. KC506600), *EcE75* (GenBank No. KY471317), 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计特异引物 *RXRRT-F*、*RXRRT-R*;*EcRRT-F*、*EcRRT-R*;*E75RT-F*、*E75RT-R*, 并以脊尾白虾 18S rRNA 为内参基因设计引物 18sF 与 18sR, 对生长蜕皮和生殖蜕皮不同分期眼柄中基因的表达进行检测。

### 1.6 数据处理

实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), Duncan 多重比较进行差异显著性检验,  $P < 0.05$  认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *EcE75* 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

通过 RACE 技术成功获得 *EcE75* 基因 cDNA 序列全长。该基因全长为 3944 bp, 包括 2520 bp 的开放阅读框(ORF), 450 bp 的 5'非编码区(5'UTR)和 974 bp 的 3'非编码区(3'UTR)。经 PredictProtein 软件预测, *EcE75* 基因编码一个由 839 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 92.307 kDa, 理论等电点为 7.48, 脂溶系数为 77.07, 亲水指数(GRAVY)为 -0.417。经 SMART 服务器预测, *EcE75* 蛋白包含 1 个 C4 锌指结构(位于第 32~104 个氨基酸之间)、1 个配体结合结构域(位于第 207~366 个氨基酸之间)及 6 个低组分复杂区域(分别位于第 396~408 个氨基酸、第 419~443 个氨基酸之间、第 499~514 个氨基酸之间、第 574~627 个氨基酸之间、第 685~691 个氨基酸之间以及第

716~736 个氨基酸之间), 具体位置见图 1。经 TMpred 软件预测, *EcE75* 基因有 1 个明显的跨膜螺旋, 跨膜

方向为由内向外, 由第 297~313 个氨基酸构成, 得分为 580, 预测结果见图 2。

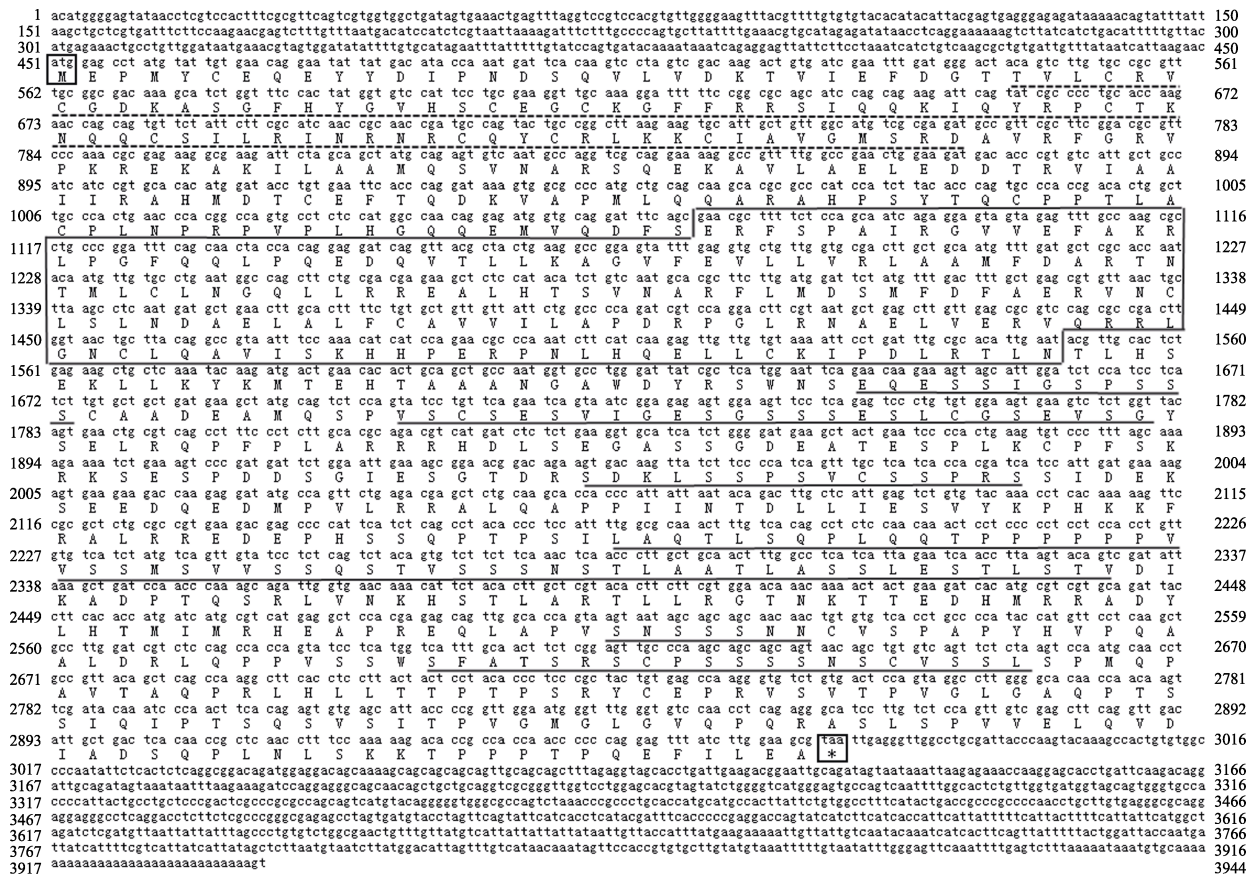


图 1 *EcE75* 的 cDNA 核苷酸序列及其预测的氨基酸序列  
Fig.1 Prediction of amino acid sequence based on the cDNA sequence of *EcE75*

虚线下划线表示 C4 锌指结构区域, 方框表示配体结合结构域, 小方框(ATG)表示起始密码子, 小方框\*表示终止密码子, 其他下划线表示 6 个低组分复杂区域  
The dotted line represents the C4 zinc finger structure, the box represents the ligand binding domain, the small box (ATG) represents the start codon, the small box \* indicates the stop codon, and the underlines represent the 6 low component complex regions

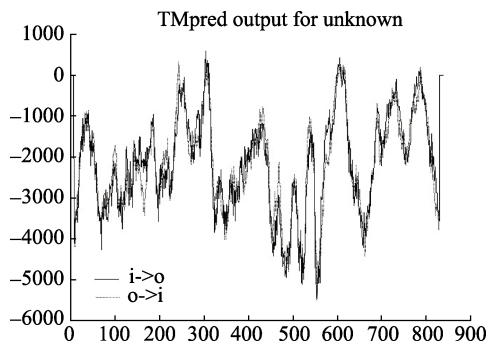


图 2 *EcE75* 跨膜螺旋预测  
Fig.2 The prediction of transmembrane helice of *EcE75*

### 2.2 *EcE75* 蛋白同源性及系统进化树分析

经过多序列比对发现, *EcE75* 蛋白与三疣梭子

蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾、黑背陆地蟹、刀额新对虾同源性较高, 可以证明此序列就是脊尾白虾的 *E75* 蛋白(图 3)。系统进化树分析表明, *EcE75* 蛋白在进化上具有一定的保守性, 与甲壳动物聚为一支, 与三疣梭子蟹、黑背陆地蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾等亲缘关系最近, 相似性分别为 79%、79%、78% 和 78%(图 4)。

### 2.3 *EcE75* 基因组织表达分析

采用 RT-PCR 方法检测脊尾白虾肝胰腺、鳃、肌肉、肠、血、胃、心、表皮、壳、卵巢、眼柄、大颚器和腹神经节共 13 种组织中 *EcE75* 基因的表达情况。结果显示, *EcE75* 基因在 13 种组织中均有表达, 眼

<i>Expalaeon carinicauda</i>	EXPALAEONCARINICAUDAMEPVYQCEQVYDITENDS... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	100 99 96 95 93 99
<i>Expalaeon carinicauda</i>	LRINRNRCQYCRLLKCTAVGMSRDVAVRGRVPEKREKAKIL... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	200 199 196 195 193 199
<i>Expalaeon carinicauda</i>	PPYLACPLNPRPVPLVQCCQEVQDFSERFSPAIRGVVEFAKRL... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	300 299 296 295 293 299
<i>Expalaeon carinicauda</i>	RFTLDSMDFAEERWVNSISDAELALFCAVVILADPRGLRNA... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	400 399 396 395 393 399
<i>Expalaeon carinicauda</i>	HTAANGAWLYR...SANSSESSVSGSPSSCADEAMSPVSCSES... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	497 498 496 494 492 499
<i>Expalaeon carinicauda</i>	PFSKRKSPDSDSGIESGTDSDKLSPPVCSPPRSSIDEKSEED... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	593 596 593 592 592 596
<i>Expalaeon carinicauda</i>	LAQTHSQPLQPTPPPPVSSVSSVSSQTVSSSSNTLAATLASS... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	693 666 658 662 622 661
<i>Expalaeon carinicauda</i>	HEAPREQLAPVSSSSNVCSPAPYHVQCAALDRLOPPVSSWS... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	790 758 746 752 622 746
<i>Expalaeon carinicauda</i>	LGAQPTSSIQIPTS...QSVSITPVGMGLGVQF... ...FENNEROPENAEUSCHINENSISVYQDQDMYIEPADS... ...GECARCINUSLATERALISVYQCEQVYDITENDS... ...LITOPENAEUSVANNAMEI... ...METAPENAEUS... ...PORTUNUS TRITUBERCULATUS... Consensus	858 819 816 813 622 816

图 3 EcE75 与其他物种的氨基酸序列对比

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of EcE75 with other species

*Expalaeon carinicauda* KY471317; *Fenneropenaeus chinensis* ACF36863.1; *Gecarcinus lateralis* AAY89587.2; *Litopenaeus vannamei* AGS94407.1; *Metapenaeus ensis* O77245.1; *Portunus trituberculatus* AJT60335.1

柄表达量最高, 卵巢次之, 肌肉和血细胞表达量较低, 肝胰腺中最低(图 5)。

2.4 EcRXR 基因在不同蜕皮分期的表达分析

EcRXR 基因在不同蜕皮分期的脊尾白虾眼柄中的表达情况如图 6 所示。生长蜕皮时, EcRXR 的表达量呈逐渐降低的趋势, 蜕皮间期显著高于蜕皮前期和后期(P<0.05), 蜕皮前期和后期差异不显著; 生殖蜕

皮时, EcRXR 的表达量呈逐渐升高的趋势, 蜕皮间期显著低于蜕皮前期和后期(P<0.05), 蜕皮前期和后期差异不显著; 蜕皮间期时, 生长蜕皮显著高于生殖蜕皮(P<0.05); 蜕皮前期和后期时, 生长蜕皮显著低于生殖蜕皮(P<0.05)。

2.5 EcECR 基因在不同蜕皮分期的表达分析

EcECR 基因在不同蜕皮分期的脊尾白虾眼柄中

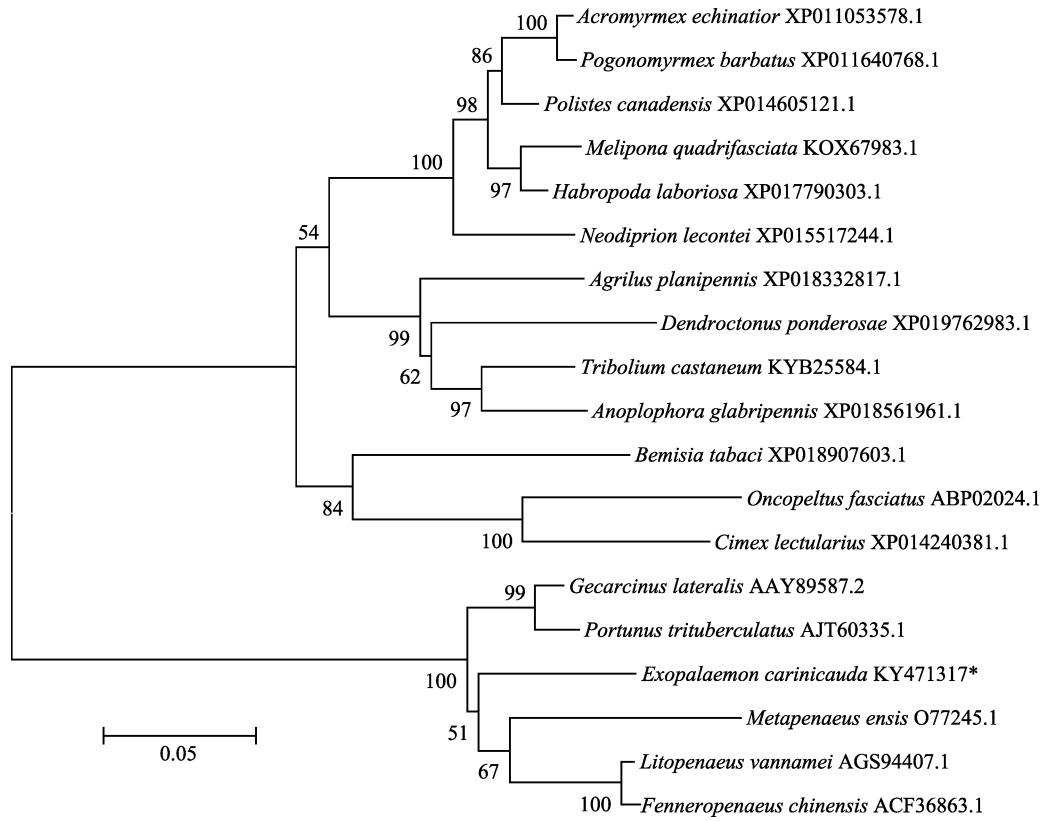


图 4 脊尾白虾与其他物种的 E75 蛋白系统进化树

Fig.4 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of EcE75 and other species

标尺长度表明每个位点发生 0.05 次置换

The length of the ruler indicates 0.05 replacements at each site

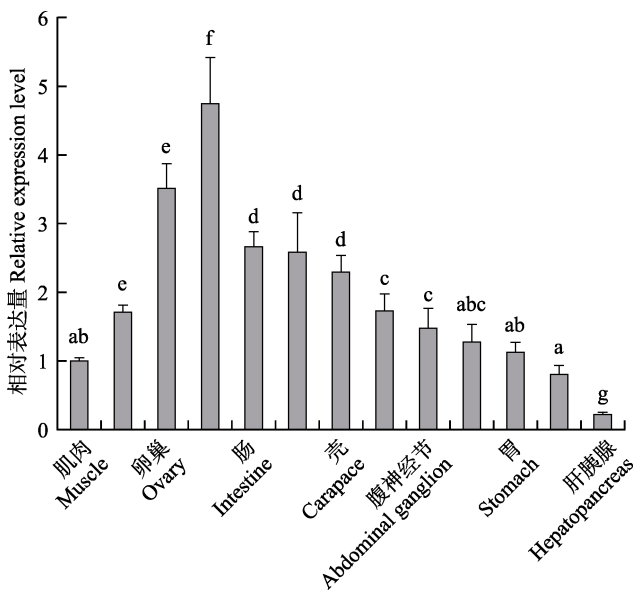


图 5 *EcE75* 基因在不同组织中的表达

Fig.5 Relative expression level of *EcE75* in different tissues

不同字母代表组织间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Different letters mean significant difference among tissues at 0.05 level

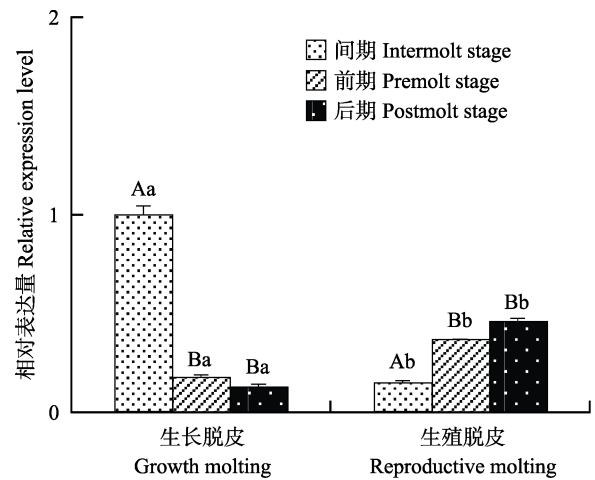


图 6 *EcRXR* 基因在不同蜕皮分期的表达

Fig.6 Relative expression level of *EcRXR* in different molting stages

同种蜕皮的不同分期用大写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同种蜕皮的同一分期用小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同 Capital letters indicate significant difference among different stages of the same type of molting, while lower case letters indicate significant difference between different types of molting in the same stages. The same as below

的表达情况如图7所示,生长蜕皮时,*EcECR*的表达量呈逐渐降低的趋势,蜕皮间期显著高于蜕皮前期( $P<0.05$ ),蜕皮前期显著高于蜕皮后期( $P<0.05$ );生殖蜕皮时,蜕皮前期显著高于蜕皮间期和后期( $P<0.05$ ),蜕皮间期与后期差异不显著;间期时,生长蜕皮显著高于生殖蜕皮( $P<0.05$ );前期和后期时,生长蜕皮显著低于生殖蜕皮( $P<0.05$ )。

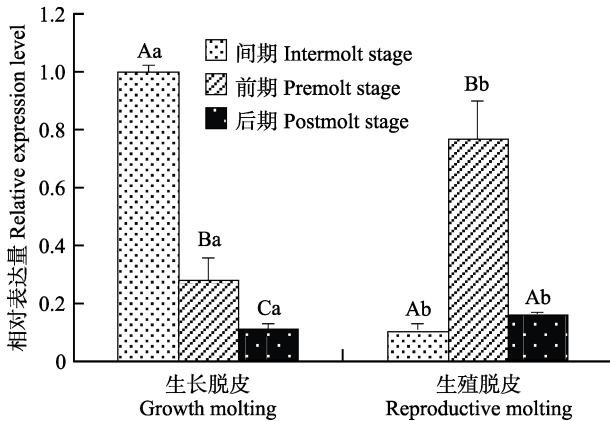


图7 *EcECR* 基因在不同蜕皮分期的表达  
Fig.7 Relative expression level of *EcECR* in different molting stages

## 2.6 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的表达分析

*EcE75* 基因在不同蜕皮分期的脊尾白虾眼柄中的表达情况如图8所示。*EcE75* 的表达量在生长蜕皮时,蜕皮后期显著低于蜕皮间期和前期( $P<0.05$ ),蜕皮间期和前期差异不显著;生殖蜕皮时,蜕皮前期显著高于蜕皮间期和后期( $P<0.05$ ),蜕皮间期与后期差异不显著;蜕皮间期和后期时,生长蜕皮显著高于生殖蜕皮( $P<0.05$ ),前期时,生长蜕皮显著低于生殖蜕皮( $P<0.05$ )。

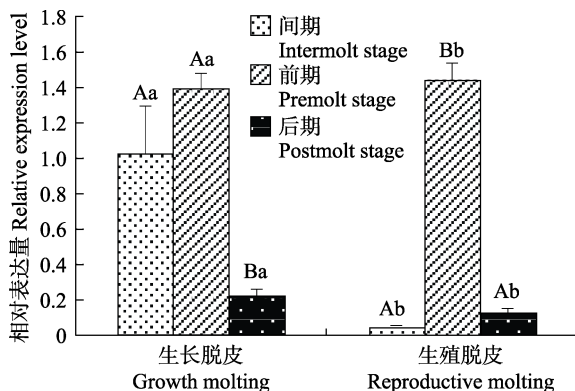


图8 *EcE75* 基因在不同蜕皮分期的表达  
Fig.8 Relative expression level of *EcE75* in different molting stages

## 3 讨论

本研究首次克隆得到脊尾白虾的 *E75* 基因,该基因全长为 3944 bp,包括 2520 bp 的开放阅读框(ORF),该开放阅读框编码 839 个氨基酸。*EcE75* 基因编码的蛋白包含 1 个 C4 锌指结构、1 个配体结合结构域及 6 个低组分复杂区域。氨基酸序列比对结果显示,克隆得到的 *EcE75* 基因具有 *E75* 基因典型的结构域。系统进化树分析表明,脊尾白虾 *E75* 在进化上具有一定的保守性,与甲壳动物聚为一支,与三疣梭子蟹、黑背地蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾等亲缘关系最近,表明本研究克隆得到的 *E75* 基因确定为脊尾白虾 *E75* 基因。*EcE75* 基因在脊尾白虾的 13 种组织中均有表达,其中,眼柄的表达量最高,卵巢次之。不同物种的组织表达量有差异,如凡纳滨对虾肌肉中表达量最高,眼柄次之(钱昭英, 2014);三疣梭子蟹眼柄中表达量最高,表皮次之(Xi *et al*, 2016)。而脊尾白虾 *E75* 基因在眼柄和卵巢中的高表达,暗示其可能与蜕皮及卵巢发育相关,需要进一步进行功能验证。

眼柄对于甲壳动物蜕皮调控具有重要作用,且 *ECR*、*RXR* 和 *E75* 基因在眼柄中都具有高的表达量,因此,本研究检测了不同蜕皮分期 *EcRXR*、*EcECR* 和 *EcE75* 的表达规律。结果显示, *EcRXR* 与 *EcECR* 的表达规律基本一致,生殖蜕皮的蜕皮前期和后期表达量都比生长蜕皮高。Lachaise 等(1981)和 Chan(1995)研究表明,在卵巢的发育过程中,随着卵巢的逐渐成熟,蜕皮激素的浓度随之增加,在产卵前下降,而蜕皮激素的活性形式 20E 需要结合 *ECR* 和 *RXR* 形成的二聚体,从而导致 *ECR* 和 *RXR* 表达量升高。*EcRXR* 在生殖蜕皮的蜕皮后期表达量高于蜕皮前期,这与 Durica 等(1996)的研究结果相似,推测可能与卵巢发育有关。*EcE75* 基因在生殖蜕皮的表达规律与 *EcECR* 一致,而生长蜕皮前期,表达量与蜕皮间期表达量差异不显著,与 *EcECR* 和 *EcRXR* 的表达规律不一致,原因有待进一步研究。生长蜕皮与生殖蜕皮的主要区别在于生殖蜕皮伴随卵巢发育,而本研究中,相较于生长蜕皮, *EcECR*、*EcRXR* 和 *EcE75* 在生殖蜕皮的高表达,说明其可能与脊尾白虾的卵巢发育有关。通过对脊尾白虾 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 基因在不同蜕皮分期的表达研究,为虾蟹类蜕皮机制及苗种育成提供了参考信息。

## 参 考 文 献

Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, *et al*. Loss of the ecdysteroid-inducible *E75A* orphan nuclear receptor

- uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 2002, 3(2): 209–220
- Chan SM. Cloning of a shrimp (*Metapenaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: An insect homologue of *E75* gene. *FEBS Letters*, 1998, 436(3): 395–400
- Chan SM. Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei*, (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1995, 112(1): 51–59
- Crossgrove K, Maina CV, Robinsonrechavi M, *et al.* Orthologues of the *Drosophila melanogaster* *E75* molting control gene in the filarial parasites *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008, 157(1): 92–97
- Dubrovsky EB. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2005, 16(1): 6–11
- Durica DS, Hopkins PM. Expression of the genes encoding the ecdysteroid and retinoid receptors in regenerating limb tissues from the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Gene*, 1996, 171(2): 237–241
- Gao Y, Zhang X, Wei J, *et al.* Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144350
- Hannas BR, LeBlanc GA. Expression and ecdysteroid responsiveness of the nuclear receptors HR3 and *E75* in the crustacean *Daphnia magna*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 315(2): 208–218
- Kim HW, Lee SG, Mykles DL. Ecdysteroid-responsive genes, *RXR* and *E75*, in the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Differential tissue expression of multiple *RXR* isoforms generated at three alternative splicing sites in the hinge and ligand-binding domains. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, 242(1–2): 80–95
- Lachaise F, Goudeau M, Hetru C, *et al.* Ecdysteroids and ovarian development in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 1981, 362(5): 521–529
- Liang JP, Wang Y, Duan YF, *et al.* Molecular cloning of ecdysteroid receptor and its expression during the ovarian development and embryogenesis of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 942–952 [梁俊平, 王芸, 段亚飞, 等. 脊尾白虾 *EcR* 基因的克隆及其在卵巢和胚胎发育过程中的表达分析. 水产学报, 2015, 39(7): 942–952]
- Litoff EJ, Garriott TE, Ginjupalli GK, *et al.* Annotation of the *Daphnia magna* nuclear receptors: Comparison to *Daphnia pulex*. *Gene*, 2014, 552(1): 116–125
- Liu F, Li J, Li JT, *et al.* Cloning and expression of retinoid X receptor under temperature and salinity stresses and molting cycles in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(4): 828–837 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)维甲酸 X 受体基因克隆及其在温盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析. 海洋与湖沼, 2016, 47(4): 828–837]
- Priya TAJ, Li FH, Zhang JQ, *et al.* Molecular characterization of an ecdysone inducible gene *E75* of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and elucidation of its role in molting by RNA interference. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 156(3): 149–157
- Qian Z, He S, Liu T, *et al.* Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2014, 172(6): 10–30
- Qian ZY. Isolation, identification, expression and function studies of growth performance candidate genes in *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of North West Agriculture and Forestry University, 2014 [钱昭英. 凡纳滨对虾生长性能相关候选基因的分选鉴定、表达规律及调控功能研究. 西北农林科技大学博士研究生学位论文, 2014]
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, *et al.* Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta*, and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(12): 1327–1338
- Thummel CS, Chory J. Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. *Genes and Development*, 2002, 16(24): 3113
- Verhaegen Y, Parmentier K, Swevers L, *et al.* The heterodimeric ecdysteroid receptor complex in the brown shrimp *Crangon crangon*: *EcR* and *RXR* isoform characteristics and sensitivity towards the marine pollutant tributyltin. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(1): 158–169
- Wang ZF. Study on the characteristics of reproduction and molting in *Neocaridina denticulata sinensis*. Master's Thesis of Hebei University, 2014, 22–27 [王战芳. 中华锯齿米虾繁殖及蜕皮特征的研究. 河北大学硕士研究生学位论文, 2014, 22–27]
- Xi X, Zhou Y, Liu M, *et al.* The nuclear receptor *E75* from the swimming crab, *Portunus trituberculatus*: cDNA cloning, transcriptional analysis, and putative roles on expression of ecdysteroid-related genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 200: 69–77
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, *et al.* Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *ultraspiracle* genes. *Nature*, 1994, 366(6454): 476–479
- Zhang M, Liu P, Li JT, *et al.* Cloning and expression of molt-inhibiting hormone gene from *Exopalaemon carinicauda* under environmental stresses. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 764–775 [张美, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾蜕皮抑制激素基因全长 cDNA 的克隆及其对环境胁迫的响应. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 764–775]



## Cloning of *E75* Gene and Expression Analysis of *E75*, *ECR* and *RXR* During Different Molting Stages of *Exopalaemon carinicauda*

XU Yang<sup>1</sup>, WANG Jiajia<sup>1</sup>, GE Qianqian<sup>1</sup>, CUI Yanting<sup>1</sup>, MA Li<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1,2①</sup>

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

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** Based on the cloning of *Exopalaemon carinicauda* *E75* (*EcE75*, GenBank accession number: KY471317), we studied its role in molting and the expression pattern of *EcECR* and *EcRXR* during different stages of molting. The full-length cDNA of *EcE75* is 3944 bp long, which contains an open reading frame (ORF) of 2520 bp. The protein encoded by *EcE75* is composed of 839 amino acids. The estimated mass of the deduced amino acid sequence of *EcE75* is 92.307 kDa, and the calculated theoretical isoelectric point (pI) is 7.48. The ZnF\_C4 and the HOLI domains were detected in *EcE75*, and one distinct transmembrane helix was identified. The gene *EcE75* is conserved during evolution. The phylogenetic tree constructed based on *E75* sequences showed that *EcE75* was clustered with that of the same clade of crustaceans. *E. carinicauda* has the highest homology with *Fenneropenaeus chinensis*, *Portunus trituberculatus*, *Litopenaeus vannamei*, and *Gecarcinus lateralis*. The tissue distribution analysis showed that *EcE75* transcript could be detected in all tested tissues of *E. carinicauda*, and relatively abundant in eyestalk and ovary. The expression pattern of the genes *EcRXR*, *EcECR*, and *EcE75* was consistent during different stages of molting. At the premoult and postmoult stages, the expression of genes of reproductive molting was significantly higher than that of growth molting. The results showed that there was significant difference between the growth and reproductive molting because of the ovary development. Furthermore, it revealed the effect of ecdysone stimulation on ovarian development through the upregulation of expression of the genes *EcRXR*, *EcECR*, and *EcE75*. The present study on the expression of the genes *EcRXR*, *EcECR*, and *EcE75* at different stages of molting provides a theoretical basis and a scientific ground for further research on the mechanism of molting.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; *EcECR*; *EcRXR*; *EcE75*; Molting stage

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170420002

http://www.yykxjz.cn/

吕旭宁, 王晓芹, 吴亚林, 姜妮妮, 房景辉, 方建光, 王军威, 张义涛, 蒋增杰. 温度对凸壳肌蛤能量收支的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 119-125

Lü XN, Wang XQ, Wu YL, Jiang WW, Fang JH, Fang JG, Wang JW, Zhang YT, Jiang ZJ. Effect of temperature on the energy budget of *Arcuatula senhoussei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 119-125

## 温度对凸壳肌蛤能量收支的影响\*



吕旭宁<sup>1,2</sup> 王晓芹<sup>1,2</sup> 吴亚林<sup>1,2</sup> 姜妮妮<sup>4</sup> 房景辉<sup>2</sup>  
方建光<sup>2,3</sup> 王军威<sup>5</sup> 张义涛<sup>5</sup> 蒋增杰<sup>2,3①</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛市海洋科学与技术试点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; 4. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 5. 楮岛水产有限公司 荣成 264300)

**摘要** 凸壳肌蛤(*Arcuatula senhoussei*)是虾蟹等养殖品种的优质饵料生物,也是极具养殖潜力的贝类品种。为了深入了解其生理代谢,利用室内静水法对不同温度(7℃、15℃、23℃、31℃)凸壳肌蛤的摄食率、排粪率、耗氧率、排氮率等生理指标进行了研究,并建立了能量收支方程。结果显示,23℃时的滤水率、摄食率、耗氧率、同化效率均显著高于其他温度梯度( $P < 0.05$ ),分别达到了 1.09 L/(g·h)、24.46 mg/(g·h)、3.50 mg/(g·h)和 62.93%; 7℃时的滤水率、摄食率、耗氧率、排粪率、排氮率均低于其他温度梯度,分别为 0.24 L/(g·h)、6.04 mg/(g·h)、1.02 mg/(g·h)、4.20 mg/(g·h)、2.33 μmol/(g·h)。且滤水率、摄食率、耗氧率、同化效率随着温度升高都呈先升高后下降的趋势,在 23℃时均达到最高值。不同温度下的能量收支方程为:  $100C = 58.12F + 46.74R + 2.54U - 7.40P$  (7℃);  $100C = 44.28F + 29.14R + 1.85U + 24.73P$  (15℃);  $100C = 17.18F + 41.81R + 6.64U + 34.37P$  (23℃);  $100C = 53.35F + 28.26R + 14.66U + 3.73P$  (31℃)。能量收支研究表明,生长能( $P$ )、呼吸能( $R$ )、排泄能( $U$ )和粪便能( $F$ )占摄食能( $C$ )的比例分别为-7.4%~34.37%、28.26%~46.74%、1.85%~14.66%、17.18%~58.12%,23℃时生长能占摄食能的比例显著高于其他温度梯度( $P < 0.05$ ),达到了 34.37%; 7℃时最低,为-7.40%。研究结果为深入了解凸壳肌蛤的生理能量学提供了数据支撑。

**关键词** 凸壳肌蛤; 温度; 同化效率; 氧氮比; 能量收支

**中图分类号** S965.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0119-07

凸壳肌蛤(*Arcuatula senhoussei*)亦称寻氏肌蛤,俗称‘薄壳’、‘乌鲰’、‘海葡萄’等,属于广温性贝类,适宜生长盐度范围为 11.2~28.8,水温为 18~28℃(蔡英亚, 1975)。沿太平洋西岸自我国南海、东海、黄渤海至北海道以南、日本海、鄂霍茨克海均有分布(关福田等,

1989)。其肉质鲜美,营养丰富,蛋白质含量高达 10.48%,比有‘海洋牛奶’之称的牡蛎(*Crassostrea gigas*)还高出近 1 倍(孔美兰等, 2013),是一种沿海居民热衷食用的小型贝类。凸壳肌蛤是一种较为理想的优质低值活体饵料,体内含有的 n-3 和 n-6 型多不饱和

\* 政府间国际科技创新合作重点专项(2016YFE0112600)、国家自然科学基金(41676147;41761134052)和国家贝类产业技术体系(CARS-49)共同资助[This work was supported by International Science and Technology Cooperation Program of China (2016YFE0112600), the National Natural Science Foundation of China Under Contract (41676147; 41761134052), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 吕旭宁, E-mail: lvxuning1226@foxmail.com

① 通讯作者: 蒋增杰, 研究员, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-20, 收修改稿日期: 2017-05-06

脂肪酸(PUFA)占总脂肪酸的 35.57%, DHA 和 EPA 占比高达 16.44%, 在对虾养殖过程中的高温季节投喂, 水质不易变质。但凸壳肌蛤仅在广东和福建的部分地区有养殖利用(关福田等, 1989; 余纲哲等, 1996), 关于其他地区的养殖情况鲜有报道。本研究于 2015 年 6 月在山东桑沟湾开展大面积调查时发现, 部分区域有野生凸壳肌蛤分布, 密度最高可达  $200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  (湿重)。凸壳肌蛤喜泥砂底, 个体之间通过足丝相互缠绕, 常黏连在一起营固着生活, 通过滤水、摄食、排泄等生理活动, 发挥底栖生物的生物扰动作用, 促进沉积物中的矿化速率以及营养盐、有机质、重金属等在沉积物-水界面的转化与迁移过程(Glud, 2008), 显著改变养殖区的底质状况(Vanni, 2002)。同时, 凸壳肌蛤具有分布范围广、繁殖能力强、养殖方法简易、生产周期短的优点, 可见其具有显著的经济效益和生态效益, 是一种值得深入研究和推广的养殖品种。通过对贝类生理能量学的研究, 能够充分了解贝类在养殖过程中的生理生态变化, 为养殖容量的确定提供大量科学依据, 从而可以合理规划养殖规模, 避免高密度养殖所带来的风险或养殖密度过低造成的资源浪费。

目前, 国内外学者开展了大量关于贻贝(*Mytilus edulis*)、牡蛎、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)生理能量学的研究(Widdows *et al.*, 1988; Ren *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2006; 林小涛等, 2002; 姜祖辉等, 1999a,b; 范德朋等, 2002; 冯建彬等, 2004; 匡世煊等, 1996; 柴学良等, 2006), 研究结果对于养殖容量的确定具有重要参考意义, 还可以为构建 DEB 模型(Dynamic energy budget)提供基础数据。但目前有关不同温度下凸壳肌蛤能量收支的研究未见报道, 因此, 对其进行相关的能量学研究十分必要。

## 1 材料及方法

### 1.1 样品采集与实验地点

实验所用凸壳肌蛤样品从山东桑沟湾栉岛海域网箱养殖区( $37^{\circ}02.509' \text{ N}$ ,  $122^{\circ}30.260' \text{ E}$ )采集, 该区域水深约为 8 m, 于 2015 年 7 月 18 日利用抓斗式采泥器(型号为 DP-201, 开口面积为  $40 \text{ cm}^2$ )挖取深度约为 5 cm 的沉积物, 30 min 内带回实验室(位于桑沟湾湾口的栉岛码头), 从沉积物筛选规格相近[壳长为( $17.14 \pm 0.72$ ) mm]、进出水口活动正常的健康凸壳肌蛤。在玻璃缸流水槽(长 $\times$ 宽 $\times$ 高为  $9.00 \text{ cm} \times 23.50 \text{ cm} \times 29.00 \text{ cm}$ )

中暂养 7 d 后开始实验, 暂养期间, 水槽水位保持在距底部 24 cm 处。沿岸的自然海水经砂滤后作为实验用水, 实验水温由冷水机(HXLS 1000, 大连)控制。实验期间, 海水盐度为  $30.90 \pm 1.10$ , pH 为  $8.10 \pm 0.70$ , 溶氧为  $6.00 \text{ mg/L}$  以上。

### 1.2 实验设计

实验温度共设  $7^{\circ}\text{C}$ 、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $23^{\circ}\text{C}$ 、 $31^{\circ}\text{C}$ , 4 个梯度。每个梯度均设 3 个重复和 3 个空白对照。凸壳肌蛤暂养 7 d 后, 开始实验。摄食、排粪实验中, 每个平行选取 5 个实验用贝, 放入已洗刷干净的 1 L 玻璃烧杯中进行实验, 水量为 500 ml, 饵料为硅藻(*Nitzschia closterium*)。实验过程中, 为防止饵料沉降, 在不影响实验用贝正常摄食的前提下保持微充气, 使硅藻在水体中均匀分布, 尽量避免产生实验误差, 实验持续 2 h。实验结束后, 将贝放入经  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤的海水中, 收集实验后 24 h 内的粪便, 并测定其颗粒有机物(POM)和总颗粒物(TPM)。实验过程中均未产生假粪。选用容积为 0.53 L 的聚乙烯实验瓶测定耗氧率和排氨率, 实验组每个瓶中放 3 个凸壳肌蛤。观察实验贝开始正常滤水后, 即用保鲜膜密封瓶口, 开始实验。对照瓶不放贝, 进行同样操作。实验过程中, 全程水浴, 保持各处理组的温度一致, 实验持续 2 h, 实验结束后, 虹吸法取水样进行耗氧率和排氨率的测定。

### 1.3 测定方法

**1.3.1 摄食率测定** 摄食率[Ingestion rate, IR,  $\text{mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ]以实验前后水体中饵料浓度的变化来表示, 以颗粒有机物 POM 的浓度为测定指标。

$$\text{POM} = W_{65} - W_{450}$$

式中,  $W_{65}$  为饵料样品经 GF/C 玻璃纤维滤纸(Whatman)(预先在马福炉中经  $450^{\circ}\text{C}$  灼烧 8 h 处理)过滤后在  $65^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘至恒重, 用天平(精密度为  $0.01 \text{ mg}$ )称重所得,  $W_{450}$  为  $W_{65}$  样品滤纸在马福炉中经  $450^{\circ}\text{C}$  灼烧处理并冷却后的重量。

IR 的计算公式:

$$\text{IR} = (C_0 - C_t) \times V / (W \times t) \text{ (Griffiths, 1980)}$$

式中,  $C_0$  和  $C_t$  分别为实验结束时空白组和实验组水中的饵料浓度( $\text{mg/L}$ ),  $V$  为实验水体的体积(L);  $W$  为实验用贝软体干重(g),  $t$  为实验持续的时间(h)。

**1.3.2 排粪率和同化效率测定** 运用摄食率和同化效率(Assimilation efficiency, AE, %)计算排粪率[Fecal pellet production rate, FR,  $\text{mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ], 粪便中 POM 的计算同上。

$$E' = W_1 / W_2; W_1 = W_{65} - W_{450}; W_2 = W_{65} - W_0$$

式中,  $W_0$  为 GF/C 滤膜初始重量,  $F'$  与  $E'$  的计算方法一致。

AE 的计算公式:

$$AE = (F' - E') / [(1 - E') \times F'] \times 100 \text{ (Conover, 1966)}$$

式中,  $F'$  为饵料中无灰分干重的比例(%),  $E'$  为粪便中无灰分干重的比例(%)。

FR 的计算公式:

$$FR = IR \times (1 - AE)$$

式中, IR 为摄食率[mg/(g·h)]; AE 为同化效率(%)。

**1.3.3 耗氧率和排氮率测定** 溶解氧(DO)的测定采用(Winkler)碘量法(国家海洋局, 2007), 根据实验前后溶解氧的浓度变化计算单位软体干重的耗氧率[Oxygen consumption rate, OR, mg/(g·h)]。

OR 的计算公式如下:

$$OR = [(DO_0 - DO_t) \times V] / (W \times t)$$

式中,  $DO_0$  和  $DO_t$  分别为实验开始和结束时实验水中溶解氧含量(mg/L),  $V$  为实验用水的体积(L),  $W$  为实验用贝软体干重(g),  $t$  为实验持续时间(h)。

氨氮( $NH_4^+$ -N)采用次溴酸钠氧化法(国家海洋局, 2007)测定, 根据实验前后氨氮浓度变化计算单位软体干重的排氮率[Ammonia excretion rate, NR,  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ]。

NR 的计算公式:

$$NR = [(N_t - N_0) \times V] / (W \times t)$$

式中,  $N_0$  和  $N_t$  分别为实验开始和结束时实验水中氨氮浓度( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),  $V$  为实验用水的体积(L),  $W$  为实验用贝软体干重(g),  $t$  为实验持续时间(h)。

**1.3.4 滤水率测定** 滤水率[Filtration rate, FR, L/(g·h)]的计算公式:

$$FR = [V \times \ln(C_0 / C_t)] / (W \times t) \text{ (Griffiths, 1980)}$$

式中,  $V$  为实验水的体积(L),  $C_0$  和  $C_t$  分别为实验开始和结束时水中的饵料浓度(mg/L),  $W$  为实验用贝软体干重(g),  $t$  为实验持续的时间(h)。

**1.3.5 氧氮比的计算方法** 氧氮比(O/N)的计算公式如下:

$$O/N = (\text{mg } O_2 / \text{h} / 16) / (\text{mg } NH_4^+ - N / \text{h} / 14) \text{ (Widdows et al, 1988)}$$

**1.3.6 能量收支的计算方法** 摄食能(Ingestion energy,  $C$ , J): 根据摄食率和有机物-能量转换系数,  $1 \text{ mg POM} = 20.78 \text{ J}$  (Crisp, 1984);

排粪能(Feces energy,  $F$ , J): 据排粪率和有机物-能量转换系数,  $1 \text{ mg POM} = 20.78 \text{ J}$  (Crisp, 1984);

呼吸能(Respiration energy,  $R$ , J): 根据耗氧率和耗氧量-能量转换系数,  $1 \text{ mg } O_2 = 14.23 \text{ J}$  (Crisp, 1984);

排泄能(Excretion energy,  $U$ , J): 根据排氮率和排氮量-能量转换系数,  $1 \mu\text{mol } NH_4^+ - N = 0.34 \text{ J}$  (Bayne et al, 1987);

生长能(Growth energy,  $P$ , J):  $P = C - R - U - F$  能量收支的计算公式如下:

$$C = F + R + U + P = F + A \text{ (Carfoot, 1987)}$$

式中,  $C$  为摄食能,  $F$  为粪便能,  $R$  为呼吸能;  $U$  为排泄能,  $P$  为生长能,  $A$  为吸收能。

## 1.4 数据统计与处理

数据处理采用 Excel 2013, 统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 对所得数据用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 多重比较进行分析, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。

## 2 结果

### 2.1 温度对凸壳肌蛤滤水率和摄食率的影响

从图 1 和图 2 可以看出, 随温度的升高, 滤水率和摄食率均呈先升高后降低的趋势, 在  $23^\circ\text{C}$  时达到最大值, 分别为  $1.09 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 、 $24.46 \text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ , 在  $7^\circ\text{C}$  时为最小值, 分别为  $0.24 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 、 $6.04 \text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ , 且不同温度之间两两差异显著( $P < 0.05$ )。

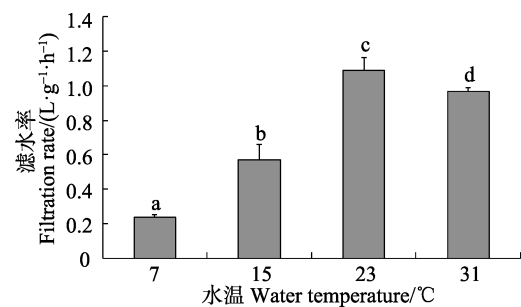


图 1 凸壳肌蛤不同温度下的滤水率  
Fig.1 Filtration rate of *A. senhousi* at different temperature

注: 不同字母表示差异显示( $P < 0.05$ ), 下同  
Note: Different letters represent significant difference ( $P < 0.05$ ), the same as below

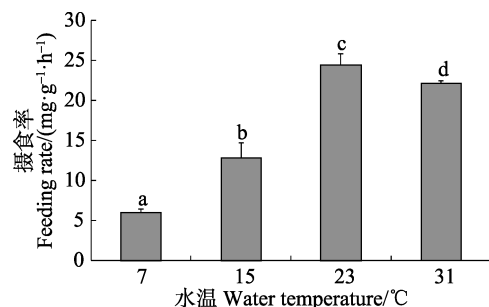


图 2 凸壳肌蛤不同温度下的摄食率  
Fig.2 Ingestion rate of *A. senhousi* at different temperature

## 2.2 温度对凸壳肌蛤代谢生理的影响

### 2.2.1 温度对凸壳肌蛤耗氧率、排氨率、氧氮比的影响

从图3可以看出,随着温度的升高,耗氧率先升高后降低的趋势,23℃时达到最大值,为3.50 mg/(g·h),7℃时为最小值,为1.02 mg/(g·h),且23℃时与其他温度梯度之间差异显著( $P<0.05$ )。从图4和图5可以看出,排氨率随温度的升高而升高,氧氮比随温度的升高而降低。7℃时,排氨率达最小值,为2.33  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ,氧氮比达最大值,为27.45,31℃时排氨率达最大值,为50.44  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ,氧氮比最小值为2.89。且三者7℃和15℃时均无显著性差异( $P>0.05$ ),但与其他2个温度梯度之间差异显著( $P<0.05$ )。

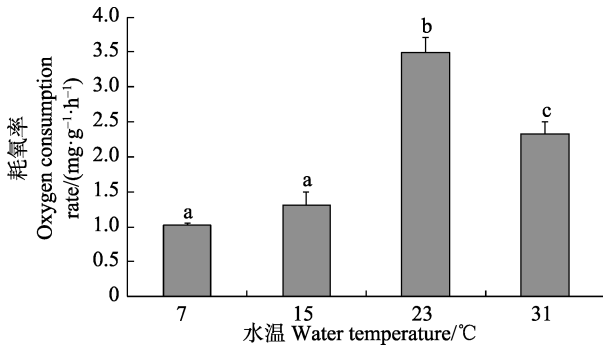


图3 凸壳肌蛤不同温度下的耗氧率

Fig.3 Oxygen consumption rate of *A. senhousi* at different temperature

### 2.2.2 温度对凸壳肌蛤排粪率和同化效率的影响

从图6可以看出,排粪率随温度的升高而升高,31℃时达到最大值,为15.76 mg/(g·h),7℃时达最小值,为4.20 mg/(g·h),且排粪率在不同温度时两两差异显著( $P<0.05$ )。从图7可以看出,随着温度的升高,同化效率呈先升高后降低的趋势,23℃时达到最大值,为62.93%,31℃时达最小值,为28.90%,且23℃时,与其他温度梯度之间差异显著( $P<0.05$ )。

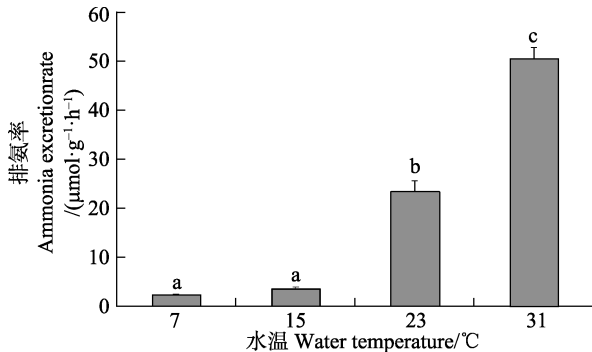


图4 凸壳肌蛤不同温度下的排氨率

Fig.4 Ammonia excretion rate of *A. senhousi* at different temperature

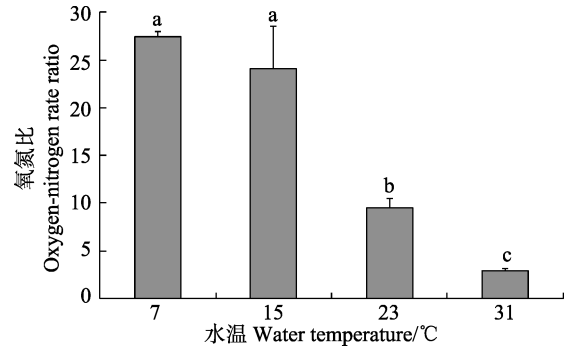


图5 凸壳肌蛤不同温度下的氧氮比

Fig.5 Oxygen-nitrogen ratio of *A. senhousi* at different temperature

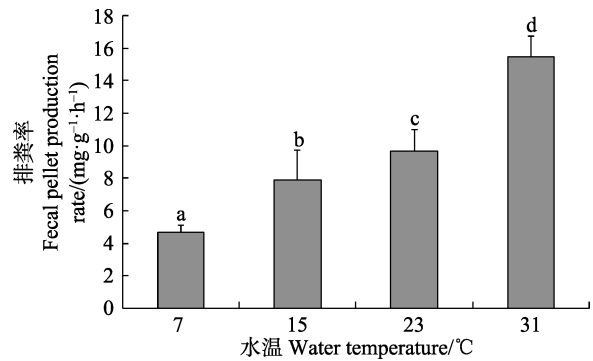


图6 凸壳肌蛤不同温度下的排粪率

Fig.6 Fecal pellet production rate of *A. senhousi* at different temperature

## 2.3 温度对凸壳肌蛤能量收支的影响

从表1可以看出,23℃时,凸壳肌蛤生长能占摄食能的比例最高,而排粪能比例最低;7℃时正好相反;排粪能的占比随水温的升高呈先下降后上升趋势,拐点位于23℃;呼吸能占比始终较高,均大于28%;排泄能的占比始终处于较低水平,且31℃时,排泄能占比显著高于其他温度梯度( $P<0.05$ )。

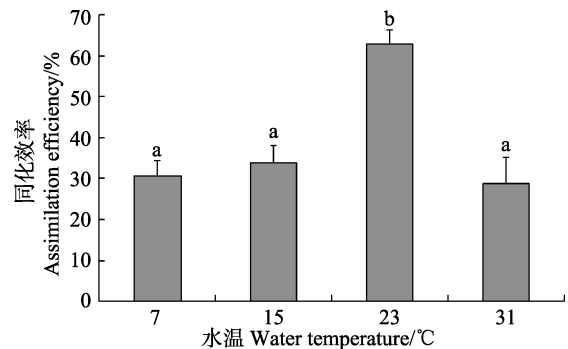


图7 凸壳肌蛤不同温度下的同化效率

Fig.7 Assimilation efficiency of *A. senhousi* at different temperature

表1 凸壳肌蛤不同温度下的能量收支  
Tab.1 Energy budget of *A. senhousiei* at different temperature

温度 Temperature (°C)	能量收支方程 Energy budget
7	$100C=58.12F+46.74R+2.54U-7.40P$
15	$100C=44.28F+29.14R+1.85U+24.73P$
23	$100C=17.18F+41.81R+6.64U+34.37P$
31	$100C=53.35F+28.26R+14.66U+3.73P$

### 3 讨论

温度变化会影响滤食性贝类的滤水速度, 改变鳃上纤毛的运动速率(Shumway, 1982), 进而直接影响贝类的新陈代谢和生长发育, 也可以通过改变水体中的浮游生物量, 间接对贝类生理产生影响。通常在适温范围内, 贝类的代谢速率随温度的升高而加速, 但超出这一范围时, 各项生理活动的频率均会出现不同程度的降低(杨红生等, 1998; 范德朋等, 2002; 董志国等, 2004), 生物通过不断地调整自身的生理代谢以适应环境。本研究中, 凸壳肌蛤的耗氧率、摄食率、滤水率和同化效率均随温度的升高而升高, 在 23°C 达到最高, 并且在 31°C 时显著下降。Newell 等(1997)研究表明, 双壳贝类的摄食率会随着温度的升高而升高, 当温度超过最适温度时, 摄食率会急剧降低, 这与本研究结果类似。Jansen 等(2007)研究发现, 在环境温度超过 24°C 时, 贻贝(*Mytilus* spp.)呼吸系统的振幅相应下降; Hiebenthal 等(2013)研究发现, 在温度过高的情况下, 北极蛤(*Arctica islandica*)和紫贻贝(*Mytilus edulis*)的生理应激增加, 表现为死亡率升高和脂褐素积累, 壳破断力和壳增长降低等。考虑到取样海域全年最高温度为 25°C 左右, 因此, 31°C 可能已经超过了凸壳肌蛤的耐受限度, 生理代谢已经发生了紊乱, 其生长发育在一定程度上受到了影响。

诸多研究表明, 氧氮比与生物受到的环境胁迫紧密相关, 其可作为判断生物是否能够适应某些环境的一项重要指标(Dall *et al.*, 1986)。Conover 等(1968)研究表明, 主要由碳水化合物或脂肪供能, 氧氮比接近无穷大; Mayzaud (1976)研究表明, 全部由蛋白质供能, 氧氮比约为 7。本研究中, 7°C 和 15°C 的氧氮比分别为  $27.45 \pm 0.48$ 、 $24.10 \pm 4.45$ , 因此, 在这 2 个温度梯度下, 凸壳肌蛤以碳水化合物、脂肪和蛋白质混合供能, 在 23°C 和 31°C 时的氧氮比分别为  $9.46 \pm 1.06$ 、 $2.89 \pm 0.28$ , 表明其主要由蛋白质供能, 凸壳肌蛤通过代谢调节来满足自身的营养需求进而适应环境。钱佳慧等(2015)对栉孔扇贝的研究发现, 超氧化物歧化酶、

过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性会随着温度的变化而变化, 且均在 26.4°C 达到最大值, 这说明贝类的代谢活动与温度联系密切。

由能量收支方程可以看出, 在温度为 23°C 时, 凸壳肌蛤生长能占摄食能的比例显著大于其他 3 个温度梯度( $P < 0.05$ ), 这与蔡英亚(1975)的研究结果相似, 同时, 在 23°C 时, 同化效率和滤水率也达到了最高, 进一步说明了该温度梯度适宜其生长发育。从凸壳肌蛤的能量收支方程来看, 排粪能占比最大(17.18%~58.12%), 呼吸能(28.26%~46.74%)次之, 其次是生长能(-7.4%~34.37%), 排泄能最小(<14.66%)。与栉孔扇贝的能量分配策略(王俊等, 1999)[呼吸能(44.29%~51.70%), 排粪能(31.40%~36.80%), 生长能(12.72%~21.68%), 排泄能(<1.71%)]不同, 但与近江牡蛎(*Ostrea rivularis*)类似[排粪能(33.22%~64.22%), 生长能(27.75%~58.93%), 呼吸能(6.62%~16.46%), 排泄能(<1.24%)], 排粪能的占比最大。同化效率在 0.29~0.63 之间, 不同温度梯度差别较大, 对比其他滤食性贝类的同化效率, 如翡翠贻贝(*Perna viridis*)测得的同化率在 0.66~0.94 之间(颀晓勇, 2001), 栉孔扇贝的同化率在 0.63~0.69 之间(王俊等, 1999); 牡蛎同化率的平均值在 0.73 左右(Valenti *et al.*, 1981), 海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和栉孔扇贝对金藻(*Chrysophyta* sp.)、海带(*Laminaria japonica*)底泥的同化效率分别为 0.95、0.62、0.29 和 0.92, 0.45、0.43 (毛兴华等, 1997), 可以看出在不同条件下, 不同贝类在对于饵料的同化率也有所不同。

### 参 考 文 献

- Bayne BL, Hawkins AJS, Navarro E. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1987, 111(1): 1-22
- Cai YY. Aquaculture and utilization of *Museulus senhousia*. *Fisheries and Education*, 1975(1): 87-90 [蔡英亚. 寻氏肌蛤的养殖和利用. 水产与教育, 1975(1): 87-90]
- Carfoot TH. *Animal energetics*. New York: Academic Press, 1987, 407-515
- Chai XL, Zhang JM, Fang J, *et al.* Study on carbon budget of main bivalves in Yueqing Bay and Sanmeng Bay. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 52-58 [柴雪良, 张炯明, 方军, 等. 乐清湾, 三门湾主要滤食性养殖贝类碳收支的研究. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 52-58]
- Conover RJ. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 1966, 11(3): 338-345
- Conover RJ, Corner EDS. Respiration and nitrogen excretion by

- some marine zooplankton in relation to their life cycles. *Journal of Marine Biological Association of the UK*, 1968, 48(1): 49–75
- Crisp DJ. Energy flow measurements. *Methods for the Study of Marine Benthos*, 1984, 284–372
- Dall W, Smith DM. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*, 1986, 55(1): 23–33
- Dong ZG, Li JL, Wang MZ, *et al.* The influence of body size and temperature on oxygen consumption rate of *Hyriopsis cummingii*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(1): 47–51 [董志国, 李家乐, 王美珍, 等. 规格和温度对三角帆蚌耗氧率的影响. *上海水产大学学报*, 2004, 13 (1): 47–51]
- Fan DP, Pan LQ, Ma S, *et al.* Effects of temperature on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Sinonovacula constricta*. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2002, 32(1): 56–62 [范德朋, 潘鲁青, 马姓, 等. 温度对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)耗氧率和排氨率的影响. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32(1): 56–62]
- Feng JB, Wang MZ, Chen HC, *et al.* Effects of temperature and body size on oxygen consumption rate of *Meretrix meretrix*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(2): 126–129 [冯建彬, 王美珍, 陈汉春, 等. 温度和规格对文蛤耗氧率的影响. *上海水产大学学报*, 2004, 13(2): 126–129]
- Glud RN. Oxygen dynamics of marine sediments. *Marine Biology Research*, 2008, 4(4): 243–289
- Griffiths RJ. Filtration, respiration and assimilation in the black mussel *Choromytilus meridionalis*. *Marine Ecology Progress Series*, 1980, 3(1): 63–70
- Guan FT, Han YP, Qu WG. On the habitat and growth of *Museulus senhousi* (Benson). *Journal of Fisheries of China*, 1989, 13(3): 181–188 [关福田, 韩一萍, 曲维功. 寻氏肌蛤生境及生长的初步研究. *水产学报*, 1989, 13(3): 181–188]
- Hiebenthal C, Philipp EER, Eisenhauer A, *et al.* Effects of seawater pCO<sub>2</sub> and temperature on shell growth, shell stability, condition and cellular stress of western Baltic Sea *Mytilus edulis* (L.) and *Arctica islandica* (L.). *Marine Biology*, 2013, 160(8): 2073–2087
- Jansen JM, Pronker AE, Kube S, *et al.* Geographic and seasonal patterns and limits on the adaptive response to temperature of European *Mytilus* spp. and *Macoma balthica* populations. *Oecologia*, 2007, 154(1): 23–24
- Jiang ZH, Wang J. Effects of temperature and body size on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Arca subcrenata*. *Journal of Qingdao University*, 1999a, 12(1): 77–81 [姜祖辉, 王俊. 温度和规格对毛蚶耗氧率和排氨率的影响. *青岛大学学报*, 1999a, 12(1): 77–81]
- Jiang ZH, Wang J, Tang QS. Studies on physiological ecology of short-necked clam (*ruditapes philippinarum*) I. effects of temperature, body weight and feeding state on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate. *Marine Fisheries Research*, 1999b, 20(1): 40–44 [姜祖辉, 王俊, 唐启升. 菲律宾蛤仔生理生态学研究 I. 温度、体重及摄食状态对耗氧率及排氨率的影响. *海洋水产研究*, 1999b, 20(1): 40–44]
- Kong ML, Chen BY, Liu MQ, *et al.* Study on peptided-zinc chelate of hydrolyzed protein from *Arcuatula senhousi*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(27): 11145–11149 [孔美兰, 陈碧云, 刘谋泉, 等. 寻氏肌蛤蛋白水解液制备锌蛋白盐的研究. *安徽农业科学*, 2013, 41(27): 11145–11149]
- Kuang SH, Fang JG, Sun HL, *et al.* Seasonal variation of filtration rate and assimilation efficiency of scallop *Chlamys farreri* in Sanggou Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1996, 27(2): 194–199 [匡世焕, 方建光, 孙慧玲, 等. 桑沟湾栉孔扇贝不同季节滤水率和同化率的比较. *海洋与湖沼*, 1996, 27(2): 194–199]
- Lin XT, Zhong JX, Xie XY, *et al.* The effect of temperature on the energy budget of *Perna viridis*. *Marine Sciences*, 2002, 26(4): 13–16 [林小涛, 钟金香, 颌晓勇, 等. 温度对翡翠贻贝能量收支的影响. *海洋科学*, 2002, 26(4): 13–16]
- Mao YZ, Zhou Y, Yang HS, *et al.* Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture*, 2006, 253(1): 322–333
- Mao XH, Hao YW, Yang XL. Carbon metabolism and energy metabolism of *Argopecten irradians* and *Chlamys farreri*. *Acta Oceanologica Sinica*, 1997, 19(4): 132–137 [毛兴华, 郝亚威, 杨小龙. 海湾扇贝和栉孔扇贝的碳代谢及能量代谢. *海洋学报*, 1997, 19(4): 132–137]
- Mayzaud P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. IV. The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. *Marine Biology*, 1976, 37(1): 47–58
- Newell RC, Johnson LG, Kofoed LH. Adjustment of the components of energy balance in response to temperature change in *Ostrea edulis*. *Oecologia*, 1977, 30(2): 97–110
- Qian JH, Li ZM, Shen YC, *et al.* Synergistic effect of temperature and salinity on antioxidant enzymes activities of *Chlamys nobilis*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(6): 49–57 [钱佳慧, 栗志民, 申玉春, 等. 温度和盐度对华贵栉孔扇贝抗氧化酶活性的联合效应研究. *南方水产科学*, 2015, 11(6): 49–57]
- Ren JS, Ross AH. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecological Modelling*, 2001, 142(1): 105–120
- Shumway SE. Oxygen consumption in oysters: An overview. *Marine Biology Letters*, 1982, 3(1): 1–23
- Valenti CC, Epifanio CE. The use of a biodeposition collector for estimation of assimilation efficiency in oysters. *Aquaculture*, 1981, 25(1): 89–94
- Vanni MJ. Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems.

- Annual Review of Ecology and Systematics, 2002, 33(1): 341–370
- Wang J, Jiang ZH, Zhang B, *et al.* Study on energy budget of farrerid scallop (*Chlamys farreri*). Marine Fisheries Research, 1999, 20(2): 71–75 [王俊, 姜祖辉, 张波, 等. 栉孔扇贝能量收支的研究. 海洋水产研究, 1999, 20(2): 71–75]
- Widdows J, Johnson D. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for growth. Marine Ecology Progress Series, 1988, 46(1): 113–121
- Xie XY. Study on energy budgets and carrying capacity of *Perna viridis* (Linnaeus). Master's Thesis of Jinan University, 2001, 13–14 [颀晓勇. 翡翠贻贝能量收支及养殖容量的研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2001, 13–14]
- Yang HS, Zhang T, Wang P, *et al.* Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia-N excretion of the Southern Bay scallop *Argopecten irradians concentricus*. Acta Oceanologica Sinica, 1998, 20(4): 91–96 [杨红生, 张涛, 王萍, 等. 温度对墨西哥湾扇贝耗氧率及排泄率的影响. 海洋学报, 1998, 20(4): 91–96]

(编辑 陈严)

## Effect of Temperature on the Energy Budget of *Arcuatula senhousiei*

LÜ Xuning<sup>1,2</sup>, WANG Xiaoqin<sup>1,2</sup>, WU Yalin<sup>1,2</sup>, JIANG Weiwei<sup>4</sup>, FANG Jinghui<sup>2</sup>,  
FANG Jianguang<sup>2,3</sup>, WANG Junwei<sup>5</sup>, ZHANG Yitao<sup>5</sup>, JIANG Zengjie<sup>2,3①</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 of Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences (Qingdao), Qingdao 266071; 5. Chudao Fishing Limited Company, Rongcheng 264300)

**Abstract** *Arcuatula senhousia* is a high-quality food for shrimps, crabs, and other aquaculture species and is a type of shellfish with a high breed latent capacity. The effects of temperature (7°C, 15°C, 23°C, 31°C) on the physiological metabolism of *A. senhousia* were studied using the stagnant water method under controlled laboratory conditions in October 2015, to obtain a deeper understanding of its physiological metabolism and to establish its energy budget. The results showed that the filtration rate, feeding rate, oxygen consumption rate, and assimilation efficiency of *A. senhousia* at 23°C were significantly higher than those at other temperatures ( $P < 0.05$ ), by up to 1.09 L/(g·h), 24.46 mg/(g·h), 3.50 mg/(g·h), and 62.93%, respectively. The filtration rate, feeding rate, oxygen consumption rate, fecal pellet production rate, and ammonia excretion rate of *A. senhousia* at 7°C were significantly lower than those at other temperatures ( $P < 0.05$ ), as low as 0.24 L/(g·h), 6.04 mg/(g·h), 1.02 mg/(g·h), 4.20 mg/(g·h), and 2.33 μmol/(g·h), respectively. With increased temperature, the filtration rate, feeding rate, oxygen consumption rate, and assimilation efficiency of *A. senhousia* increased and then decreased, reaching the highest value at 23°C. The energy budget equations at different temperatures are as follows:  $100C = 58.12F + 46.74R + 2.54U - 7.40P$  (7°C);  $100C = 44.28F + 29.14R + 1.85U + 24.73P$  (15°C);  $100C = 17.18F + 41.81R + 6.64U + 34.37P$  (23°C);  $100C = 53.35F + 28.26R + 14.66U + 3.73P$  (31°C); The energy budget equations show that the energy required for growth ( $P$ ), respiration ( $R$ ), excretion ( $U$ ), and feces ( $F$ ) accounts for -7.4% to 34.37%, 28.26% to 46.74%, 1.85% to 14.66%, and 17.18% to 58.12% of the feeding energy ( $C$ ), respectively. The proportion of growth energy to feeding energy varies greatly at different temperatures. Growth energy accounts for the highest percentage (34.37%) at 23°C ( $P < 0.05$ ) and the lowest percentage (-7.40%) at 7°C. The results of this study provide theoretical guidance for a deeper understanding of the physiological energetics of *A. senhousia*.

**Key words** *Arcuatula senhousia*; Temperature; Assimilation efficiency; Oxygen-nitrogen ratio; Energy budget

① Corresponding author: JIANG Zengjie, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180130001

http://www.yykxjz.cn/

顾冰宁, 刘欣, 沈和定, 王冬凤, 杨铁柱, 朱敏, 史艳梅, 李柏航. 瘤背石磺肌球蛋白重链(*MyHC*)基因的克隆与表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 126-138

Gu BN, Liu X, Shen HD, Wang DF, Yang TZ, Zhu M, Shi YM, Li BH. Molecular cloning and analysis of the *MyHC* gene in *Onchidium struma*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 126-138

# 瘤背石磺肌球蛋白重链(*MyHC*)基因的 克隆与表达分析\*



顾冰宁<sup>#</sup> 刘欣<sup>#</sup> 沈和定<sup>①</sup> 王冬凤 杨铁柱  
朱敏 史艳梅 李柏航

(上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 水产科学国家级实验教学示范中心  
海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室 上海 201306)

**摘要** 肌球蛋白是动物体内重要的功能性马达蛋白, 调控机体的信号传导、肌肉收缩和细胞器运动, 为探究肌肉在瘤背石磺(*Onchidium struma*)由海洋向陆地进化过程中发挥作用的分子机制, 实验以石磺科 4 种贝类转录组数据为基础, 采用 RACE 方法从瘤背石磺肌肉中首次克隆到肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, *MyHC*)基因 cDNA 的全长并进行组织表达分析。研究结果显示, 瘤背石磺 *MyHC* 基因 cDNA 全长为 7566 bp, 包括 5895 bp 的开放阅读框, 228 bp 的 5'端非翻译区, 1443 bp 的 3'端非翻译区, 共编码 1964 个氨基酸。预测该基因编码的蛋白质由 31713 个原子组成, 分子式为 C<sub>9765</sub>H<sub>15897</sub>N<sub>2849</sub>O<sub>3150</sub>S<sub>52</sub>, 分子量约为 225.28 kDa, 理论等电点为 5.56, N 端信号肽具有 29 个氨基酸长度。瘤背石磺 *MyHC* 具有 2 个保守结构域 MYSc\_class\_II 和 Myosin\_tail\_1, 且亲水性氨基酸集中在 Myosin\_tail\_1 区。系统进化树分析显示, 瘤背石磺 *MyHC* 与光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*) *MyHC* 的亲缘关系最近。RT-PCR 结果显示, *MyHC* 基因在各个组织中均有表达, 腹足和背部皮肤表达量最高, 腹部皮肤、口球、肺囊中高表达, 肝胰腺、蛋白腺、两性腺中微量表达( $P < 0.05$ )。 *MyHC* 基因在瘤背石磺的主要运动器官腹足中高表达, 说明肌肉运动对瘤背石磺湿地环境的两栖适应性具有至关重要的作用。实验结果为今后进一步研究瘤背石磺肌球蛋白重链基因进行原核表达及多克隆抗体的制备奠定了良好基础, 更为深入探讨海洋无脊椎动物从海洋向陆地进化的研究提供有参考意义的分子依据。

**关键词** 瘤背石磺; *MyHC*; 基因克隆; 组织表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)04-0126-13

瘤背石磺(*Onchidium struma*)是生活在潮间带高潮区滩涂的一种肺螺类, 隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、肺螺亚纲(Pulmonata)、

石磺科(Onchidioidea), 是一种具有重要营养价值和药用价值的两栖性贝类, 广泛分布于赤道两侧的热带和亚热带海区(吴旭峰等, 2010), 国内主要分布在江苏

\* 国家自然科学基金项目(41276157)和上海高校水产学一流学科建设项目共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41276157), and Shanghai University Fisheries First-Rate Discipline Construction Projects]. #: 共同第一作者。顾冰宁, E-mail: 604923111@qq.com; 刘欣, E-mail: dxliu2090@163.com

① 通讯作者: 沈和定, 教授, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

收稿日期: 2018-01-30, 收修改稿日期: 2018-03-28

以南沿海地区。石磺科贝类呈现从海洋向陆地扩展的梯度分布状态(Dayrat, 2009), 深入研究其辐射过程会更好地了解海洋无脊椎动物由海栖向陆栖的宏观进化模式(Bouchet *et al*, 2005)。近年来, 其线粒体基因组(Sun *et al*, 2014; 王冬凤等, 2015)、群体多样性分析(姚理想等, 2015)以及分子标记开发(王成暖等, 2014)的研究较多, 但与性状相关功能基因的研究报道较少。石磺的真皮含有大量纵横排列的肌纤维, 能显著增强皮肤的弹性和韧性(Liu *et al*, 2014)。作为两栖性最为明显(不能长时间淹没在水中, 也不能长期在干燥环境中生活)的瘤背石磺, 腹足中含有的大量肌纤维, 在其及时快速躲避海水淹没等运动过程中起着非常重要的作用。

肌球蛋白(Myosin)是骨骼肌纤维粗肌丝的基本组成单位, 约占肌原纤维蛋白的二分之一以上, 具有结构蛋白和功能蛋白的双重性质, 是动物体内重要的功能性马达蛋白(Knight *et al*, 2000), 在机体的信号传导、肌肉收缩、细胞器运动等方面起着重要的调控作用(Hooper *et al*, 2005)。肌球蛋白分子为“Y”形不对称六聚体结构, 由 2 条重链亚基和 4 条轻链亚基组成, 重链亚基由位于氨基端球状结构的肌球蛋白头部和位于羧基端具有  $\alpha$ -螺旋结构的轻酶解肌球蛋白构成, 分子量约为 200 kDa, 肌球蛋白头部含有 1 个 ATP 和肌动蛋白(actin)结合位点(Craig *et al*, 2006), 轻链亚基具有使肌球蛋白在生理条件下形成丝状的能力(Pett *et al*, 2000), 分子量约为 16~20 kDa。单个肌球蛋白分子没有功能, 不能参与细胞生理过程, 必须聚合成排列有序的粗肌纤维才能完成一个完整生命活动。

近年来, 随着生命科学技术的发展, 生物学界对各类物种的相关结构基因, 特别是肌球蛋白重链(MyHC)基因的研究也越来越多。目前, 在对肌球蛋白基因的研究中, 大多数的研究对象是脊椎动物, 而有关无脊椎动物的研究报道甚少。目前, 已经对多个物种的肌球蛋白重链基因进行了克隆及表达, 包括人(*Homo sapiens*) (Jaenicke *et al*, 1990)、大鼠(*Rattus norvegicus*) (Strehler *et al*, 1986)、鸡(*Gallus gallus*) (Molina *et al*, 1987)、鹅(*Anser anser*) (李艳艳等, 2015)以及鱼类中的大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*) (Iwami *et al*, 2002)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Muramatsu *et al*, 2005)、翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*) (陈之航等, 2017)等, 与这些物种 MyHC 基因相对应的核酸分子杂交探针也陆续制备出来, 已达到对 MyHC 进一步深入细致研究的效果(Lied *et al*, 1985)。

本研究是在实验室团队对石磺肌肉理化性质研究的基础上, 选择在我国分布广泛、产量大、两栖性

最为明显的瘤背石磺作为实验对象, 以石磺科贝类转录组数据库为基础, 差异分析后筛选、克隆了瘤背石磺 MyHC 基因的 cDNA 全长, 对其序列进行同源性分析, 并测定分析其在不同组织中的表达状态, 为研制 MyHC 基因核酸杂交探针提供了基础资料, 也为进一步分析石磺科贝类的肌肉生长规律、探究无脊椎动物从海生到陆生的适应性进化过程及分子机制作有益尝试。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验所用瘤背石磺采自上海市崇明岛, 采回样品放置于北向实验室暂养箱中进行暂养, 定时向暂养箱中投放玉米粉, 清理排泄物, 增添清水, 并及时清除死亡个体。实验进行前体重为(10.68±0.11) g, 肌肉舒展状态下体长为(5.82±0.12) cm。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成** 取瘤背石磺的背部皮肤、腹部皮肤、口球、腹足、肝胰腺、蛋白腺、两性腺、肺囊部位, 采用 Trizol(TaKaRa, 大连)试剂提取总 RNA, 提取方法参照使用说明书, 用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测提取的 RNA 浓度, 并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。以瘤背石磺腹足总 RNA 为模板, 用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, 日本)按照操作指南合成 RACE cDNA 第一条链。

**1.2.2 MyHC 基因克隆** 根据已有的瘤背石磺转录组数据, 通过基因差异表达分析、GO 功能显著性富集分析和 KEGG pathway 显著性分析, 从转录组数据库中筛选出一条与肌肉生长相关的关键序列(S\_Unigene106\_c0\_seq1), 在 NCBI 进行 BLAST 比对, 结果为 MyHC 基因。利用 Primer Premier5.0 软件设计引物 MyHC-F1、MyHC-R1(表 1), 扩增目的基因片段, 25  $\mu$ l 体系: 10×PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 0.5  $\mu$ l, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l, Taq (5 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 18.7  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用胶回收试剂盒(天根, 北京)割胶回收目的条带, 并与 pGEM-T Easy (Promega, 美国)载体连接构建重组质粒, 热转化感受态 DH5 $\alpha$  大肠杆菌后涂布于含氨苄的选择性培养基, 37℃ 过夜培养, 经蓝白斑筛选和菌液 PCR 检测后将

表 1 本研究用到的引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
MyHC-F1	TGCGTGGCTATCAACCCC	片段验证 Fragment verification
MyHC-R1	GCCCTCAAGCACACCGTT	片段验证 Fragment verification
MyHC-F2	AGACTGTGTCCCCTTGC	片段验证 Fragment verification
MyHC-R2	TGAGCGGACGGATGAGAT	片段验证 Fragment verification
MyHC-F3	GTCAAGAAATACCAGCAG	片段验证 Fragment verification
MyHC-R3	TAGTGATGATGATGGTGG	片段验证 Fragment verification
MyHC-3' RACE Outer	GCGGCACACCAAGTTGACCACAT	3' RACE
MyHC-3' RACE Inner	AACGAGGGTGAATCCGGACTATA	3' RACE
MyHC-5' RACE Outer	GTAGGCATTGTCAGAGAT	5' RACE
MyHC-5' RACE Inner	AGGGGTTGATAGCCACGC	5' RACE
MyHC-RT-F	GCCTCCTCATTTGTTCTCCA	目的基因定量 Target gene quantification
MyHC-RT-R	ATCTTCTTCTCGGCTCCCTC	目的基因定量 Target gene quantification
18s-RT-F	TGCTCCTGCCCTACCTGTT	内参基因定量 Reference gene quantification
18s-RT-R	ATTCCATGCGCAATTATTC	内参基因定量 Reference gene quantification

阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据获得的 *MyHC* 基因序列, 分别设计 3' 和 5' RACE 特异性引物(表 1), 按照 Clontech RACE 说明书分别进行 3' RACE 和 5' RACE 扩增, PCR 反应产物经电泳、胶回收、连接和转化后, 通过菌落 PCR, 挑选阳性克隆样品送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将所获序列和已知序列进行拼接, 获得 *MyHC* 基因的全长, 并通过重测序消除不确定碱基。

**1.2.3 序列分析** 利用在线工具 ProtParam、NetPhos 2.0 Server、ORF Finder、Signal 4.1 等分别对蛋白质理化性质进行预测分析; 用 Phyre2 程序预测蛋白质的二级结构和三级结构; 以日本三角涡虫 (*Dugesia japonica*) 为外群采用 MrBayes-3.2.6 和 MEGA 6.0 软件用邻位法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 1000 次 bootstraps, 其他参数均使用默认值。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR** 实验前随机挑选 9 个目测健康、大小均一的瘤背石磺, 分别取其背部皮肤、腹部皮肤、口球、腹足、肝胰腺、蛋白腺、两性腺和肺囊 8 个组织, 将每 3 个个体的相同器官或组织等量混合作为一个样品, 共制成 3 个样品组, 提取总 RNA 并将其反转录为 cDNA, -20℃ 保存备用。

根据已获得的 *MyHC* 基因序列, 设计荧光定量引物 MyHC-RT-F 和 MyHC-RT-R(表 1), 以 18S rRNA 为内参。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa, 大连)在 CFX-96(Bio-Rad, 美国)实时荧光定量 PCR 仪上进行。采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法(Livak *et al.*, 2001)计算目的基因的相对表达量。基因的表达量用平均值±标准误(Mean±SE)表示,

使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA),  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MyHC* cDNA 的全长序列

瘤背石磺 *MyHC* 的 cDNA(GenBank 登录号: KU550708)全长为 7566 bp, 包括 5895 bp 的开放阅读框, 228 bp 的 5'端非翻译区(UTR), 1443 bp 的 3'端非翻译区(UTR)。3'UTR 区含有典型的多聚核苷酸加尾信号序列 AATAAA 和 Poly(A)尾巴(图 1)。NCBI 进行 Blast 比对, 显示该序列与光滑双棘螺(*Biomphalaria glabrata*)相似性为 92%, 与加州海兔(*Aplysia californica*)相似性为 89%, 与二者的相似性均较高。

### 2.2 *MyHC* 的结构特征

推导该序列共编码 1964 个氨基酸, 分子量约为 225.28 kDa, 理论等电点为 5.56。谷氨酸(Glu)、亮氨酸(Leu)和赖氨酸(Lys)含量最高, 分别为 13.2%、10.5%和 10.1%; 色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)和组氨酸(His)含量最少, 分别为 0.5%、0.6%和 1.4%(表 2)。带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)366 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)324 个。原子总量 31713, 分子式为  $C_{9765}H_{15897}N_{2849}O_{3150}S_{52}$ 。不稳定指数为 47.48。

信号肽的预测结果显示, 信号肽切割位点存在于第 29 和 30 个氨基酸残基之间, 表明 N-端具有一个由 29 个氨基酸组成的信号肽。磷酸化位点预测结果显示有 74 个 Ser、41 个 Thr、9 个 Tyr, 可能是磷酸

```
1 aaaccttccccccgtcaccacccctgataggtaaaacagagcgattgctctgtgcatgtg
61 gatctatTTTTtagcctctgaggggtgagcagttgtgactttggctgccaagagctccagtc
121 cgcaaggctgttctgaagtaggtccttgaacttgccttagacacagacttccctggcgagc
181 gtctctttgcttttgaaccacgtttgcacatctctagagactttgcctgaagggcgagca
1 M S G L
241 gatattgtttccgctcccagagccgctccccccacaaaactaaccaaccATGTCAGGACTC
5 D V N D P D F Q Y L V V D R K K M M K E
301 GACGTTAACGATCCCAGACTTCCAGTACTTGGTCGTGGATCGCAAGAAGATGATGAAGGAG
25 Q T Q S F D G K K A C W V P D P K E G F
361 CAGACCCAGAGCTTTCGATGGCAAAAAGGCTTGCTGGGTCCCCGACCCAAAGAGGGATTC
45 L A A E I Q S T K G E E I T V K I D K N
421 TTGGCTGTGAGATCCAGAGCACCAAGGGTGAAGAAATCACCGTCAAAATTGATAAGAAC
65 N E T R T L K K D D I Q Q M N P P K F E
481 AACGAGACTAGAACCCTCAAGAAAGATGACATCCAACAGATGAACCCACCCAAGTTCGAG
85 K I D D M A N M T Y L N E A S V L H N S L
541 AAAATCGACGACATGGCCAACATGACCTACCTGAACGAGGCTCTGTCTTGACAACTTG
105 K S R Y S S G L I Y T Y S G L F C V A I
601 AAGAGCCGTACAGCAGTGGCTTGATCTACACCTACTCCGCGCTGTTTGGCTGGCTATC
125 N P Y R R L P I Y T Q K I I N C Y R G K
661 AACCCCTACCGTCCGCTGCCATCTACACCCAGAAGATCATCAACTGCTACAGGGGCAAG
145 R R A E M P P H L F S I S D N A Y Q N M
721 AGGAGGGCTGAGATGCCTCCTCATTTGTCTCCATCTCTGACAATGCCTACAGAACATG
165 L Q D R E N Q S M L I T G E S G A G K T
781 TTGCAAGATCGTGAGAACCAGTCCATGTTGATCACTGGTGGTCCGGAGCCGGAAAGACC
185 E N T K K V I M Y F A N V A A G Q Q K K
841 GAGAACACGAAGAAAGTAATCATGTACTTTGCCAATGTGGCCCGGACAGCAGAAAAAA
205 E E A A E G A E K K I G N L E D Q I I Q
901 GAGGAGGCCGAGAGGGAGCCGAGAAGAAGATTGGCAACCTTGAGGACCAAATTATCCAG
225 A N P V L E A F G N A K T I R N N N S L
961 GCCAATCCAGTACTGGAGGCTTTGGCAACGCCAAGACCATTGTAATAACAACCTTCTCT
245 R F G K F I R I H F G T Q G K I A G A D
1021 CGATTCCGTAATTCATCCGTATTCACCTCGGTACCCAAGGCAAGATCGCTGGTCCGAT
265 I E T Y L L E K S R V T F Q Q P A E R N
1081 ATTGAGACATACCTGCTGGAGAAGTCCCGTGTGACCTTCCAACAGCCCGCTGAGAGAAC
285 Y H I F Y Q L L S P A L P F L H E K L L
1141 TACCACATTTTCTACCAGCTGCTCTCACCGGCCCTGCCCTTTTGGCAGGAAACTCCTGTG
305 V S P D P A L Y A F I N Q G S L V V D G
1201 GTCAGCCCCGACCCCGCCCTTTATGCCTTCATCAACCAGGGCTCCTTGGTGGTTCGATGGA
325 I D D T E E M K I T D E A F D V L G F S
1261 ATTGACGACACTGAGGAAATGAAATCACAGATGAAGCCTTCGATGTGCTGGGCTTCTCT
345 A E E K T S L Y R C T A A I M H F G E M
1321 GCTGAAGAAAAGACCTCCCTGTACAGATGTACCGCCCATCATGCACTTCGGTGAATG
365 K F K Q R P R E E Q A E A D G T A E A E
1381 AAATCAAGCAAAGGCCCGCGAGGAGCAGGCCGAGGCTGACGGCACAGCTGAGGCTGAG
385 K V A F L L G I N A G D L L K G L L K P
1441 AAGTTCGCTTCTCTTGGGCATCAACGCTGGTACCTCCTGAAGGCTCCTGAAACCC
405 K I K V G N E F V T Q G R N L N Q V L Y
1501 AAGATCAAGGTCGGCAACGAGTTCGTACCCAAGGACGTAACCTGAACCAGGTGCTGTAC
425 S V A A L A K S L Y N R M F D W L V K R
1561 TCCGTGGCTGCTCTGGCCAAGTCTCTGTACAACCGTATGTTGACTGGCTGCAAGCGT
445 V N K T L D T K N K R Q F F I G V L D I
1621 GTCACAAGACCCTGGACACCAAAAACAAGAGGCGATTCTTTCATTGGTGTACTGGATATT
465 A G F E I F D F N S F E Q L C I N Y A T N
1681 GCCGGCTTTGAGATCTTCGACTTCAACAGCTTCGAGCAGCTGTGTATCAACTACACCAAC
485 E R L Q Q F F N H H M F I L E Q E E Y K
1741 GAGCGCTTGCGAGCTTCTTCAACCATCACATGTTTTCATTCTGGAGCAGGAGGAATACAD
505 K E G I D W E F I D F G M D L Q A A I D
1801 AAAGAGGCATTGACTGGGAGTTCATTGACTTCGGTATGGACTTGCAGGCCGCCATTGAT
525 L I E K P M G G I L S I L E E E C M F P K
1861 CTGATTGAAAAGCCCATGGGATCCTGTCCATCCTTGAGGAAGAGTGCATGTTCCCAAG
545 A S D K T F L D K L N G N H L G K S K N
1921 GCCAGCGACAAGACCTTCTGGACAAGCTGAACGGCAACCACTTGGGCAAGTCCAAGAAC
565 Y G K A G K P K K A G Q V E A H F E L H
1981 TACGGCAAGGCCGCAAGCCCAAGAAAGCCGGACAAGTGGAGGCTCACTTCGAGCTGAT
585 H Y A G S V P Y N I T G W L E K N K D P
2041 CACTACGCTGGCAGTGTGCCCTACAACATCACAGGCTGGCTGGAGAGAACAAGGATCCA
605 L N E T V V E L L S H S K E T L V A Y L
2101 CTGAACGAGACCGTTGTTGAGCTGCTTAGCCACTCCAAGGAAACCCCTGGTGGCTACCTG
625 F S P P E G A E E T S A K T A Q R K K G
2161 TTCTCCCCACCTGAGGGCGCTGAGGAAACGTCAGCCAAGACCCGCCAGAGGAAGAAAGGA
645 G S F Q T V S H L H K E S L N K L M K I N
2221 GGAAGTTTCCAGACTGTGTCCCACTTGACAAAGGAGTCCCTGAACAAGCTGATGAAGAAC
665 L Y S T H P H F V R C I I P N E F K Q P
2281 TTGTACAGCACTCATCTCACTTCGTGCGCTGCATCATCCCAACGAGTTCAGCAGCCA
685 G E I D S Y L V L H Q L Q C N G V L E G
2341 GGTGAGATCGACTCTACTTGGTGTGACCAGCTGCAATGTAACGGTGTGCTTGAGGGC
705 I R I C R K G F P N R I I Y S E F K Q R
2401 ATCCGTATTTCCCGTAAGGGATTCCCAACAGAATCATCTACTCTGAGTTCAGCAGCGA
725 Y S I L A P N A I P Q G F V D G K K V T
```

2461 TACTCCATCCTGGCCCCAACGCCATCCCCAGGGATTGCGTTGATGGCAAGAAAGTCACT  
745 E N I L L A L Q L D T A E Y R L G T T K  
2521 GAGAACATCCTGCTGGCCCTGCAACTGGACACCGCTGAGTACCGTCTGGGTACCACCAAG  
765 V F F K A G V L G T L E D M R D E R K W L  
2581 GTGTTCTTCAAGGCCGGTGTGCTGGGTACCCCTGAGGACATGCGTGACGAGCGTCTGTCT  
785 K I I S M F Q A H I R G Y L M R K S Y K  
2641 AAGATCATCTCCATGTTCCAGGCTCACATCAGAGGTTACCTCATGCGCAAATCCTACAAG  
805 K L Q D Q R V G L S V I Q R N I R K W L  
2701 AAAGTGCAGGACCAGAGAGTGGGCTGAGCGTCATCCAGCGTAACATCCGTAAATGGCTG  
825 G L K N W L W W R L Y V K V K P L L N I  
2761 GGAAGTGAAGAACTGGCTGTGGTGGAGACTGTACGTCAAGGTCAGCCCTCCTCAACATC  
845 A R A E D D M K K K E E E L A K T K T E  
2821 GCCCGTGTGAGGATGACATGAAGAAGAAGGAGAGGAGTGGCCAAGACCAAGACCCGAG  
865 L E K T E K L R K E L E E Q N V G L L Q  
2881 CTGGAGAAGACAGAGAACTGCGCAAGGAGCTGGAGGAACAGAAGCTCGGTCTGCTCCAG  
885 A K N D L Y I Q L Q A E Q D N L I D A E  
2941 GCCAAGAAGGACTTGTACATCCAAGTGAAGCCGAGCAAGACAACCTGATCGATGCGCGAG  
905 E K I E K L I S Q K A E Y E S Q I K E M  
3001 GAGAAGATCGAGAAGCTCATCTCCCAGAAGGCCGAGTACGAGTCCCAGATCAAGGAGATG  
925 E E R L L D E E D A A A E L E E K K K K  
3061 GAAGAGAGACTGCTGGATGAGGAGGACGCCGCTGCCGAGCTGGAGGAGAAGAAGAAGAA  
945 M E A E N K A L K E D I E D L E N S L A  
3121 ATGGAAGCCGAGAACAAGCCCTCAAGGAAGACATCGAGGATCTGGAGAACTCTCTGGCC  
965 K A E Q E K Q T K D N Q I K T L Q D E M  
3181 AAGCCGAACAAGAGAACAACAAGACAACCAGATCAAGCCCTGCAGGACGAGATG  
985 A A Q D E Q L A K V N K E K K N L E E Q  
3241 GCCGCCAGGACGAACAGCTGGCCAAAGGTCAACAAAGAGAAGAAGAACTGGAAGAGCAA  
1005 Q K K T L E D L Q A E E D K V N H L N K  
3301 CAGAAGAAGACCCCTGGAAGACCTCCAGGCCGAGGAGGACAAAGTCAACCCTCAACCAA  
1025 L K T K L E Q T L D E L E D N L E R E K  
3361 CTCAAGACCAAGTTGGAACAGACTCTTGACGAGTTGGAAGACAACCTGGAGAGAGAGAAG  
1045 K V R G D V E K A K R K L E Q D L K S T  
3421 AAGGTGCGTGGAGATGTTGAAAAGGCAAAGAGGAAGTTGGAGCAGGACCTGAAGAGCACA  
1065 Q E T V E D L E R S K R E L E E N V R R  
3481 CAAGAGACAGTGAAGATCTGGAGAGATCCAAGAGGGAGCTGGAAGAGAATGTCCGCGAGG  
1085 K D L E I N N L N S K L E D E Q S L A  
3541 AAGGACTTGAAATCAACAACCTCAACTCCAAACTCGAAGACGAACAGAGCTTAGTTGCT  
1105 Q L Q R K I K E L Q A R I E E L E E E L  
3601 CAGTCCAGAGAAAGATCAAAGAACTCCAGGCTCGCATTGAGGAGCTCGAGGAGGAATG  
1125 E A E R Q S R A K V E K Q R S E L S R E  
3661 GAAGCTGAACGCCAGTCCAGAGCTAAGGTTGAGAAACAGAGAAGCGAAGTGTCTCGTGAG  
1145 L E E L S E R L D E A G G A T A A Q V E  
3721 TTGGAAGAGCTGAGCGAGCCTTGGACGAGGCGGTTGGCCACCGCCGCTCAGGTGCGAG  
1165 L N K K R E Q E L L K L R R D L E E S A  
3781 CTCAACAAGAAGCGGAGCAGGAAGTGTCAAAGTGGCCGCTGACCTGGAGGAGAGCGCC  
1185 L Q H E A Q I S A I R K K Q Q D A A N E  
3841 CTGCAGCAGGAGCCAGATCTCTGCCATCAGGAAGAAGCAGCAGGATGCCGCCAACGAG  
1205 M A D Q I D Q L Q K V K N K V E K E K A  
3901 ATGGCTGACCAGATCGACCAGCTCCAGAAGGTCAAGAACAAGGTTGAGAAAGAAAAGGCC  
1225 Q L K S E V G D L Q A Q I E H A G K N K  
3961 CAACTGAAATCTGAGGTTGGAGATCTCCAGGCCAGATCGAGCACGCCGAAAGAACAAG  
1245 G M S E K M T K Q V E A Q I S E L N A K  
4021 GGTATGTCGAGAAGATGACCAACAGGTGGAGGCTCAGATCTCCGAGCTGAACGCAAG  
1265 L D A A N R Q I Q E L Q G Q K A R S A Q  
4081 TTGGACGCCGCAACCGCCAGATCCAGGAGCTGCAAGGCCAGAAGGCTCGCTCTGCCAG  
1285 E N A D L T R Q L E E A E H R V G A L T  
4141 GAGAACGCTGACCTGACCCGCAACTGGAGGAGGCCGAGCACCCGCTGGGAGCTGAC  
1305 K E K N A L A A A L E E A K R A L E D E  
4201 AAGGAGAAGAAGCCCTGGCCGCGCCCTGGAGGAGGCCAAGAGAGCCCTGGAGGATGAG  
1325 T R A R Q K L A S E V R N L T S D L D A  
4261 ACCCGCGCCGCAAGTGGCCTCTGAAGTCCGCAACCTGACCTCTGACCTGGATGCT  
1345 L R E Q L E E E Q E G R S D L Q R Q L S  
4321 CTGCGGAGCAGCTGGAGGAGGAACAGGAGGACGCTCTGACCTCCAGAGACAGCTCAGC  
1365 K A N S E V Q V W R S K F E S E G T Q R  
4381 AAGGCTAACTCTGAGGTTCCAGGTATGGCGATCCAAATTCGAATCCGAGGGCACCCAGAGA  
1385 A E E L E E G R R K L Q A K L S D A E Q  
4441 GCTGAGGAGCTCGAGGAGGCGGTAAGCTGCAGGCCAAACTGAGTGACGCCGAGCAG  
1405 A A E A A N L K V Q A L E K A K S R L Q  
4501 GCCGCCAGGCTGCCAACCTCAAAGTCCAGGCCCTGGAGAAGGCTAAGAGCAGACTGCAA  
1425 G E L E D L M I D V E R S N A N A S N L  
4561 GGTGAAGTGAAGATCTTATGATTGACGTTGAGCGCTCAACGCAATGCCAGCAACTTG  
1445 E K K Q R A F D K T I A E W Q A K C N D  
4621 GAGAAGAAGCAGCGCTTTGACAAGACCATGCTGAATGGCAGGCCAAGTGAATGAC  
1465 L Q A E L E N A Q K E A R G Y S A E L F  
4681 CTCCAGGCTGAAGTGGAGAAGCCGCAAGGAGCCAGAGGATATTCAGCAGAACTCTTC  
1485 R V K A Q I E E A N D S V E A L R R E N  
4741 CGCGTCAAGGCTCAGATTGAGGAAGCCAACGACAGCGTGGAGGCTCTTCGCTGAGAAC  
1505 K N L A D E I H D L T D Q L G E G G R S  
4801 AAGAAGTGGCTGATGAAATCCACGATCTGACTGACCAGTTGGGAGAGGGAGGCCGAGC

```

1525 T H E L E K A R K R L E M E K E E L Q A
4861 ACACACGAGCTGGAGAAGGCTCGCAAGAGGCTGGAGATGGAGAAGGAGGAAGTTCAGGCC
1545 A L E E A E S A L E Q E E A K V M R A Q
4921 GCTCTGGAAGAGGCCGAGTCTGCCCTGGAACAGGAGGAGGCCAAGGTCATGCCGCTCAG
1565 L E I S S V R S E I D R R I Q D K E E E
4981 CTGGAGATCTCATCCGTCGCTCAGAGATCGACCGCCGATCCAGGATAAGGAAGAGGAG
1585 F E N T R R N H Q R A M D S M Q A S L E
5041 TTTGAGAACACACGCCGCAACCACCAGAGAGCCATGGACTCCATGCAGGCCAGTCTGGAG
1605 A E A K G K A E A L R I K K K L E Q D I
5101 GCTGAAGCCAAGGCAAGGCCGAGGCCCTGCGCATCAAGAAGAACTGGAACAGGACATC
1625 N E L E V A L D Q A N R G K A E F E K N
5161 AACGAGCTGGAGGTGGCTCTGGACCAGGCAAACAGAGGCAAAGCCGAGTTTGAAGAAGAC
1645 V K K Y Q Q T I K E M Q T Q I E D E Q R
5221 GTCAAGAAATACCAGCAGACAATCAAGGAAATGCAGACACAGATCGAGGATGAGCAGAGA
1665 Q R E E A R E S Y N M A E R R C T I L L Q
5281 CAACGAGAGGAGGCCCGTGAATCATAACAATGGCCGAGCGCCGCTGCACAATCCTGCAG
1685 A E I D E L R A A L E Q A E R A R K G A
5341 GCTGAGATTGATGAGCTTAGAGTCTTGAACAGGCTGAGAGAGCCCGCAAGGACCT
1705 E N E L N D A N D R V N E L S A Q N S S
5401 GAGAACGAGCTGAACGATGCCAATGACCGCGTCAACGAACTGTCCGCCCAGAACAGCTCC
1725 I Q G Q K R K L E G D V Q A M Q T D L D
5461 ATTCAAGGACAGAAGAGGAAGTTGGAGGGTGTGTACAGCCATGCAGACTGACCTGGAGC
1745 E M S N E L R A S E E R S K K A M A D A
5521 GAGATGAGCAACGAACTGAGAGCCTCCGAGGAGAGATCCAAGAAGGCTATGGCTGATGCC
1765 A R L A D E L R Q E Q E H S L Q V E K L
5581 GCCCGTCTGGCTGATGAATGCGCCAGGAACAGGAACACAGCTTGCAGGTAGAGAAGTTG
1785 R K G L E G A L K D T Q V R L E E A E A
5641 AGGAAGGACTGGAAGGTGCCCTCAAGGACACCCAGGTCCGCTTGGAGGAGGCTGAGGCC
1805 Q A L K G G K K M I Q K L E Q R V R L Q
5701 CAGGCACCTCAAGGGAGGCAAGAAGATGATCCAGAACTGGAACAGAGAGTCAGGGAAGTGC
1825 E T E L D N E Q R R H A E T Q K N M R K
5761 GAGACAGAAGTGGACAACGAGCAGCGCCCATGCGGAGACCCAGAAGAACATGCCAAG
1845 A D R R L K E L A F Q A D E D R K N Q
5821 GCTGACCGCAGACTCAAGGAGTTGGCCTTCCAGGCTGACGAGGACCGCAAGAACCAGGAA
1865 R L Q D L V D K L Q N K I K T Y K R Q V
5881 CGTCTCCAGGATCTGGTGGACAAATGCAAAAACAAGATCAAGACCTACAAGAGACAAAGTT
1885 E E A E E I A A I N L A K Y R K V Q N E
5941 GAAGAGGCCGAGGAGATTGCCGCCATCAATCTGGCCAAGTACCGCAAGGTGCAGAACGAG
1905 L E D A E E R A D T A E G S L S K L R A
6001 CTGGAAGATGCCGAGGAGCGCGCTGACACCGCCGAGGGCTCTCTCTCCAAGCTGAGAGC
1925 K N R S S V S V S R T S A S P S F P G P
6061 AAGAACAGGAGCTCCGTGTCCGTGTACGCACTAGTGTTCACCCAGCTTCCCAGGCCCC
1945 S S V S A S R A S V D R S A R A P S Q S
6121 AGTTCGGTGTCTGCCAGCCGAGCCAGCGTGGACAGATCAGCACGCCCGTCCCAATCA
1965 *
6181 TAAactctgatgccacttttttagttctatgtcaatgatttggcagctcttcagctttcttc
6241 aatgtacgcgccacaccaagtttgaccacatccttccgcttcggccactccgtctaatgag
6301 gcatcgtaccgggtccgcaggagttgaagtgaccaccggcggggtagatgacgtcactc
6361 catcgtaatctaccaggcccgacacctcaactcggcctcctgcaggcccaggtcgaccact
6421 gcaaccaccaccgctacaaccaccactaccactactaccaccaccatcatcactagt
6481 ggcattacctagaattctgacaacgaggggtggaatccggactatacttattattagagct
6541 aactttttttgtgtgttcccaactgagatgtgaccggttacggaatgaaagaaaacaa
6601 gtacaacaacgacaacaacggcaacagcaacagcaagatcaacaacaacaacaacaaca
6661 caacaacaacgacacatctctctagaaaactgtatttgctgctgtttactgactcgtgt
6721 agtgtgctcgggttttttcatgtgtgacaaaataatacatgtccactggtctatatgcc
6781 atccgagatgtgtttccataggtcagttaatgttggtttgtttttttgtgttttat
6841 aaagtctgtagacatcttcaacctacgtgttcaacctcctcctgataagtactagtct
6901 cacacaaaagctgtaccgctgcttcttaagcctgcccgcgcccacaaatgggtacacac
6961 tcgacagtgcagtgactcgggtaactatcacgacaacacgcccagagtttcccatcctct
7021 gcatgcacacgagaccgatcagaacttacagaacaccagactgtaggtcattatcata
7081 agatcaagtttagcttaatgaataaaaacttaactcggacggtgaaagatgtgctcaagact
7141 agcaaacatcattgattgccaacctgaagacgcaagagtaggtggctctagaacgac
7201 aacaagaacaataatgataatgataataataataataatacaacaggggaagtaaccaagtt
7261 actcgaaggtgcattgattgctggagggtgtgcttgctaattgtacgcgcgcaacag
7321 agaattcatcctttttgtacaaaagattagaagtatttttaattaattttttttctgtgtt
7381 attttctttgttctgtggaatcccgtttatgagcaaaatagattatcacctttattta
7441 taacaaggtttttctgtattcgttattttatgaataaacacatgaatgcatcttgccca
7501 ggcttttgggacttgatgtgtttgtctgtatgttctgtctgcttctgttcgctgcaaaaaa
7561 aaaaaa

```

图 1 瘤背石磺 *MyHC* cDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O. struma MyHC*

基因序列编码区用大写字母表示, 非编码区用小写字母表示。下划线表示 Poly(A)尾巴, 双下划线表示 Myosin\_tail\_1 结构域, 阴影部分为 AATAAA 加尾信号

The UTR and ORF regions are shown in lowercase and uppercase letters, respectively; underline is the polyadenylation signal; Myosin\_tail\_1 domain is double underlined; the shadow is the putative eukaryotic polyadenylation signal (AATAAA)



<i>O. struma</i>	264	ELEELSERLDEAGGATAAQVELNKKREQELLKLRRLDEESALQHEAQISALRKKKQDAAN
<i>B. glabrata</i>	299	ELEELGERLDEAGGATAAQVELNKKREQELLKLRRLDEESALQHEAQISLRLRKKKQDAAN
<i>A. californica</i>	300	ELEDLGERLDEAGGATAAQVELNKKREQELLKLRRLDEESALQHEAQISSLRKKKHQDAAN
<i>O. bimaculoides</i>	299	ELEEVGERLDEAGGATAAQVELNKKREQELLRLRRLDEESSMQHEAQIATLRKKNTQATN
<i>H. bleekeri</i>	299	ELEELGERLDEAGGATAAQVELNKKREQELLRLRRLDEESNMQHEBSQIATLRKKNQEATN
<i>S. esculenta</i>	299	ELEELGERLDEAGGATAAQVELNKKREQELLRLRRLDEEGTMQHEBSQIATLRKKNQEATN
Consensus	301	***. . . *****. *****. *****. . . ***. ** . . ***. . . *
<i>O. struma</i>	324	EMADQIDQLQKVKNKVEKEKAQLKSEVGDQLAQLEHAGKNKGMSEKMTKQVEAQISELNA
<i>B. glabrata</i>	359	ELADQIDQLQKVKTKIEKEKSQKSEADDLRAQLEHGSKNKGMSEKMTKQVEAQISELNS
<i>A. californica</i>	360	EMADQVDQLQKVKSRLDKEKNQLKGEVDDLQAQLEHSSKNKGMSEKMSKQVEAQISELNA
<i>O. bimaculoides</i>	359	ELSDQIDQLQKVKSRLEKEKSQLRGEVDDLQGGQLEHVGNKRGCSDKMSKQVEAQISELNG
<i>H. bleekeri</i>	359	ELGDQIDQLQKVKSRLEKEKTLRAEIDVQSQLEHAGKNKRGSEKMSKQVEAQISELNA
<i>S. esculenta</i>	359	ELGDQIDQLQKVKSRLEKEKSQLRGEIDDLQSQLEHAGKNKRGSEKMSKQVEAQISELNG
Consensus	361	*. *. *****. . . ***. *. . . *. . . *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *
<i>O. struma</i>	384	KLDAANRQIQELGGQKARSAQENADLTRQLEEAHVRVGLTKKKNALAAALEEAKR
<i>B. glabrata</i>	419	KLDAANRQIQELGGQKNRAAQENADLTRQLEEAHVKVGLTKKRTALATQLEETKR
<i>A. californica</i>	420	KLDAAREIQELGGQKNRGSQESADLTRQLEEAHVRVGLTKKKTSLASQLEEAKR
<i>O. bimaculoides</i>	419	KIDEQARSVSELTSQKSRLQGENADLTRQLEEAHNVGQLTKLKNLNHQLLEEAKR
<i>H. bleekeri</i>	419	KIDDDARSVSELTSQKSRLQTEAADLTRQLEEAHNVGQLTKLKSMMGANLEDAKR
<i>S. esculenta</i>	419	KIDDDRSRISSELSSQKSRLQTEAADLTRQLEEAHNVGQLSKLKSLSLNNLEDAKR
Consensus	421	*. *. . . *. *. *. . . *. *****. *. *. * . . . . . *. *. *

图 2 瘤背石磺 MyHC 和其他物种 MyHC Myosin\_tail\_1 结构域氨基酸序列的多重比对

Fig.2 Alignment of the deduced amino acid sequences of *O.struma* and other reported MyHC Myosin\_tail\_1 domain sequences

“\*”表示保守的氨基酸残基,“.”表示相似性氨基酸

“\*” indicates highly conserved amino acid residue; “.” represents similar amino acid

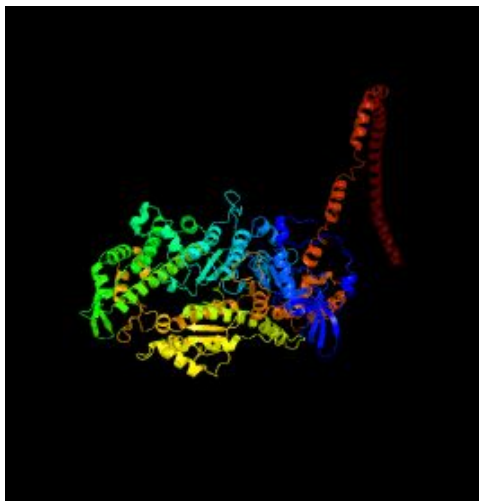


图 3 预测的瘤背石磺 MyHC 三级结构

Fig.3 The predicted tertiary structures of *O.struma* MyHC

为 MrBayes 分析结果,后者为 MEGA 分析结果)构建了包括瘤背石磺在内的 19 个物种 MyHC 序列(表 3)的系统进化树。系统进化树结果显示,无脊椎动物和脊椎动物分为两支,瘤背石磺和光滑双脐螺的 MyHC 聚类成一个分支,然后与加州海兔聚在一起,海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)聚在一起,日本矛鱿鱼(*Heterololigo bleekeri*)、金乌贼(*Sepia esculenta*)和章鱼(*Octopus bimaculoides*)聚在一起,脊椎动物方面按照形态学分类地位聚类(图 4)。

表 3 其他物种 MyHC 的 NCBI 登录号

Tab.3 Accession numbers of MyHC from other species

蛋白 Protein	登录号 Accession No.
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_005963
黑猩猩 <i>Pan troglodyte</i>	XM_003953128.2
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	NM_001195293
猪 <i>Sus scrofa</i>	NM_001104951.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_030679
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NM_001135158.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NM_001127883
翘嘴鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	HQ829291
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	P02564
日本矛鱿鱼 <i>Heterololigo bleekeri</i>	ACD68201.1
金乌贼 <i>Sepia esculenta</i>	ACD68202.1
章鱼 <i>Octopus bimaculoides</i>	CDG41623.1
光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i>	XP_013068756.1
加州海兔 <i>Aplysia californica</i>	XP_012941300.1
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	XP_011442517.1
欧洲大扇贝 <i>Pecten maximus</i>	AAD5284.1
海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	AAC46490.1
日本三角涡虫 <i>Dugesia japonica</i>	CAB64662.1

## 2.4 不同组织的表达差异分析

以 18S rRNA 为内参基因,荧光定量 PCR 检测瘤背石磺 MyHC 基因在背部皮肤、腹部皮肤、口球、腹足、肺囊、肝胰腺、蛋白腺和两性腺 8 个组织中的表达,结果显示,MyHC 基因在各个组织中均有表达;



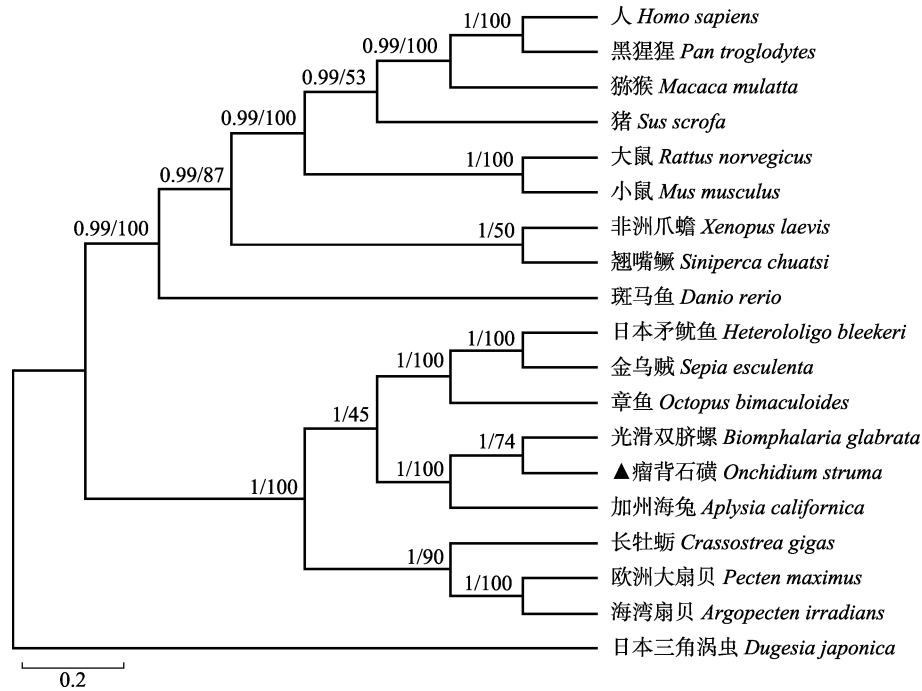


图 4 基于 MyHC 氨基酸序列构建的系统树

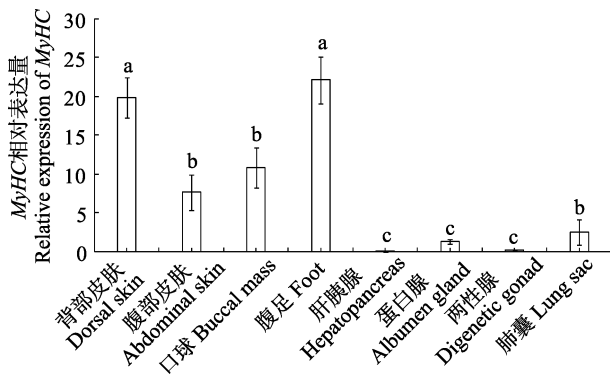
Fig.4 Phylogenetic analysis of *O.struma* MyHC and other reported MyHC sequences

图 5 MyHC 在瘤背石磺不同组织的表达

Fig.5 qRT-PCR analysis of the expression profiles of MyHC in different tissues of *O.struma*

相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),  
不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Same letters above the bars indicate no significant difference ( $P>0.05$ ), statistical significance is presented by different letters ( $P<0.05$ )

腹足和背部皮肤表达量最高,腹部皮肤、口球和肺囊中高表达,肝胰腺、蛋白腺和两性腺中微量表达且表达差异显著( $P<0.05$ ) (图 5)。

### 3 讨论

#### 3.1 瘤背石磺 MyHC 基因的存在形式

系统进化树显示,瘤背石磺的 MyHC 与光滑双脐

螺的 MyHC 聚成一个分支,其次是加州海兔,这与它们的形态学分类结果一致,而且从系统进化树也能看出各物种从低等到高等、从水生到陆生的进化规律,表明肌球蛋白重链是研究生物进化良好的备选基因。

同时有研究显示,脊椎动物中大部分都含有多种肌球蛋白重链基因和亚型,在禽类中至少有 9 种 MyHC 基因被鉴定(Kropp *et al*, 1987; Bandman *et al*, 2000),在哺乳动物中至少也有 13 种,其中,8 种来自于横纹肌,5 种来自于光滑肌和非肌肉组织(Weiss *et al*, 1999; Flück *et al*, 2003)。在鱼类肌球蛋白重链多基因家族研究中,分别从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的红肌、白肌和胸肌中获得 3 种不同的 MyHC cDNA 片段(Weaver *et al*, 2001);从翘嘴鲈中克隆得到红肌肌球蛋白重链 cDNA 片段(易潭等, 2014)。Nakaya 等(1995)发现肌球蛋白分子  $\alpha$ -螺旋结构会因基因亚型的差异出现显著的不同,Imai 等(1997)和 Huriaux 等(1991)发现了在不同温度下的不同类型的 MyHC cDNA。斑马鱼(*Danio rerio*)的骨骼肌纤维也存在 3 种不同的类型,应存在不同的 MyHC 基因的亚型,而不同的 MyHC 基因的亚型在不同的肌纤维中的表达也存在较大的差异。瘤背石磺中是否存在 MyHC 基因亚型,以及存在哪几种 MyHC 基因亚型还有待进一步研究判断。

#### 3.2 瘤背石磺 MyHC 基因蛋白结构分析

本研究克隆获得瘤背石磺 MyHC 具有典型的保

守结构组件, 4个ATP结合位点, 1个SH1螺旋, 3个Loop环, 2个转换区域, 2个转换子区域, 这些氨基酸残基组成了瘤背石磺 MyHC 两个保守结构域 MYSc\_class\_II 和 Myosin\_tail\_1 的特性。其中, MYSc\_class\_II 位于第33~256位氨基酸, Myosin\_tail\_1 位于第881~1925位氨基酸, 位于蛋白尾部, 由卷曲的肌球蛋白重链尾部区域构成, 为粗肌丝提供了结构支撑。已知 MyHC 家族蛋白的典型结构主要是由 N 端球状盘绕的头部和 C 端  $\alpha$ -螺旋型的尾部组成, 头部有 ATP 结合位点、Loop1 和 Loop2 环区, 是 MyHC 家族中的保守区, 同时也是肌球蛋白动力产生的主要区域, Loop1 表面环状结构决定肌纤维收缩速率以及持续的动力, 而 Loop2 表面环状结构则影响 MyHC 上游肌动蛋白激活的 ATP 酶水解活性(Holmes *et al.*, 2002)。另外, 在 MyHC 中还发现了 SH1 螺旋。SH1 修饰肌球蛋白亚片段能大大提高其热稳定性, SH1 可以大大减少整个肌球蛋白亚片段的改变(Lubov *et al.*, 2007), 其对肌纤维运动等功能有待进一步研究验证。本研究获得的瘤背石磺 MyHC 的蛋白理化性质的预测结果发现, 瘤背石磺 MyHC 蛋白 MYSc\_class\_II 结构域疏水性氨基酸所占的比例较大。目前, 刘希良等(2012)根据已经克隆的鳊鱼 MyHC 序列制备出原核表达载体和多克隆抗体。瘤背石磺肌球蛋白重链 Myosin\_tail\_1 保守区域中亲水性氨基酸较多, 属于亲水性氨基酸密集区域, 该实验结果对深入研究石磺肌球蛋白重链基因的原位杂交实验、Western blot 检测奠定了基础。

在对目前哺乳动物骨骼肌中 MyHC 基因进行研究时, 已经发现有多种途径可以调控该基因的同型异构体表达, 其中有两条途径研究较多, 分别是通过肌源调节因子(Myogenic regulatory factor, MRF)和活化 T 细胞核因子(Nuclear factor of activated T cells, NFAT)(Devoto *et al.*, 1996)。前者由 MyoD、myogenin、myf5 和 MRF4 这 4 个蛋白组成, 后者调控途径的主要方式是通过调节  $Ca^{2+}$  的浓度的变化。研究表明, 当肌肉收缩时, 释放  $Ca^{2+}$  数量增多, 相应的细胞浆内  $Ca^{2+}$  浓度就会上升, 而升高的  $Ca^{2+}$  浓度会通过一系列的化学反应来激活下游相应的蛋白, 由此使得细胞质中某些蛋白质进行脱磷酸化, 随后进入细胞核中, 与一个保守的 DNA 结合位点相结合, 以此来调节相应转录水平的变化(Tao *et al.*, 2004)。Kubis 等(1997)在对兔培养的肌细胞进行研究时, 将  $Ca^{2+}$  载体加入培养基中, 使肌浆中  $Ca^{2+}$  浓度缓慢升高, 发现此时肌细胞中慢型肌球蛋白重链和轻链的比例较高。在对石磺

MyHC 基因构成的蛋白质进行结构分析时, 发现钙调素结合区段以及许多磷酸化位点, 例如蛋白激酶 C 的活性必须依赖  $Ca^{2+}$  的存在。虽然现在没有确切的证据表明石磺内有相似的调控机制来控制 MyHC 基因的特异性表达, 但可以为今后探究石磺的肌球蛋白的调控机制提供基础依据。

### 3.3 MyHC 基因的表达与环境适应性分析

研究证实, MyHC 基因的表达量会显示出对于周围环境变化的适应和调节, Altringham 等(1985)发现鲤鱼会通过 MyHC 基因的表达量的不同来调节 ATP 酶的活性以适应温度的变化。Nihei 等(2006)通过对鲤鱼胚胎和肌肉组织中的 MyHC 基因表达量的研究发现, 鲤鱼 MyHC 基因不仅在不同发育阶段、不同肌肉类型表现出表达量的差异, 而且在不同温度下也会存在这种差异。此外, 在其他鱼类品种中, Weaver 等(2001)利用 RT-PCR 检测幼鱼阶段虹鳟的平滑肌、骨骼肌和心肌中 MyHC 基因表达, 显示平滑肌表达 MyHC 基因的表达略高于骨骼肌和心肌, 在进一步对鱼苗期和幼鱼期的平滑肌中 MyHC 基因表达量进行比较时发现, 幼鱼期 MyHC 基因表达量高于鱼苗期。本研究中, MyHC 在腹足部位高表达, 同时在其他各个组织中都进行表达, 充分证明肌球蛋白既是一种不可缺少的结构蛋白, 同时又能作为功能蛋白发挥作用; 腹足作为瘤背石磺的运动器官, MyHC 在该器官中表达量最高, 增强了瘤背石磺的运动能力, 为瘤背石磺逐渐适应陆生环境提供了有力的条件。

## 4 结论

本研究从瘤背石磺转录组差异表达基因中筛选到 MyHC Unigenes, 进行了 cDNA 序列克隆、结构分析、进化分析以及 qRT-PCR 表达水平分析。结果表明, 瘤背石磺 MyHC 基因的结构特征主要有: 存在多个 N-糖基化位点, MYSc\_class\_II 和 Myosin\_tail\_1 两个保守结构域, N 末端具有多个 ATP 结合位点等特异性功能区域。系统进化树显示, 瘤背石磺 MyHC 基因与光滑双脐螺聚成一支, 其符合形态学分类且物种等级相近; 表达水平分析显示, 瘤背石磺 MyHC 基因具有不同的组织分布, 在组织运动最发达的腹足有高水平的表达。通过对瘤背石磺 MyHC 基因结构、功能预测、组织表达以及分子进化的分析, 为进一步探究石磺肌球蛋白的调控机制提供基础依据; 为探究肌肉运动对瘤背石磺湿地环境两栖适应性的相关联系; 对研究瘤背石磺肌球蛋白重链基因进行原核表达及

多克隆抗体的制备提供基础资料,更为深入探讨海洋无脊椎动物从海洋向陆地进化的研究提供有参考意义的分子依据。

### 参 考 文 献

- Altringham JD, Johnston IA. Changes in tension generation and ATPase activity in skinned muscle fibres of the carp following temperature acclimation. *Pflügers Archiv- European Journal of Physiology*, 1985, 403(4): 449–451
- Bandman E, Rosser BWC. Evolutionary significance of myosin heavy chain heterogeneity in birds. *Microscopy Research and Technique*, 2000, 50(6): 473–491
- Bouchet P, Rocroi JP. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia: International Journal of Malacology* (Hackenheim, Germany: ConchBooks), 2005, 47(1): 1–397
- Chen ZH, Dong JJ, Sun CF, *et al.* cDNA cloning and analyses of two myosin heavy chain isoforms of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on transcriptome sequencing. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 51–61 [陈之航, 董浚键, 孙成飞, 等. 基于转录组测序对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)2种肌球蛋白重链基因的克隆与分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 51–61]
- Craig R, Woodhead JL. Structure and function of myosin filaments. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006, 16(2): 204–212
- Dayrat B. Review of the current knowledge of the systematics of Onchidiidae (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) with a checklist of nominal species. *Zootaxa*, 2009, 2068(2068): 1–26
- Devoto SH, Melancon E, Eisen JS, *et al.* Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 1996, 122(11): 3371–3380
- Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity—from gene to form and function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2003, 146(1): 159–216
- Holmes JM, Whiteley NM, Magnay JL, *et al.* Comparison of the variable loop regions of myosin heavy chain genes from Antarctic and temperate isopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(3): 349–359
- Hooper SL, Thuma JB. Invertebrate muscles: Muscle specific genes and proteins. *Physiological Reviews*, 2005, 85(3): 1001–1060
- Huriaux F, Vandcalle P, Focant B. Myosin heavy chain isoforms in white, red and ventricle muscles of barbel (*Barbus barbus* L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1991, 100(2): 309–312
- Imai J, Hirayama Y, Kikuchi K, *et al.* cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 1997, 200(1): 27–34
- Iwami Y, Ojima T, Jnoe A, *et al.* Primary structure of myosin heavy chain from fast skeletal muscle of Chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2002, 133(2): 257–267
- Jaenicke T, Diederich KW, Haas W, *et al.* The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product. *Genomics*, 1990, 8(2): 194–206
- Knight AE, Molloy JE. Muscle, myosin and single molecules. *Essays in Biochemistry*, 2000, 35(35): 43–59
- Kropp KE, Gulick J, Robbins J. Structural and transcriptional analysis of a chicken myosin heavy chain gene subset. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(34): 16536–16545
- Kubis HP, Haller EA, Wetzel P, *et al.* Adult fast myosin pattern and Ca<sup>2+</sup> induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(8): 4205–4210
- Li YY, Shao F, Wu XJ, *et al.* Molecular cloning, sequence and expression characterization of myosin heavy chain 1 gene (*MyHCl*) in goose (*Anser anser*) at embryonic period. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(3): 359–368 [李艳艳, 邵芳, 吴小娟, 等. 鹅肌球蛋白重链1基因 *MyHCl* 全长 cDNA 克隆、序列及胚胎期表达特征分析. *农业生物技术学报*, 2015, 23(3): 359–368]
- Lied E, von der Decken A. Purification of fish muscle myosin heavy chain and quantification of the specific polyribosome-bound polypeptide. *Biochemical Journal*, 1985, 232(2): 467–470
- Liu C, Wei LL, Shen HD, *et al.* Complete mitochondrial genome of *Peronia verruculata* (Gastropoda: Pulmonata: Systellomatophora: Onchidiidae). *Mitochondrial DNA*, 2014, 27(2): 918–920
- Liu XL, Wang KZ, Cheng J, *et al.* Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of myosin heavy chain genes in *Siniperca chuatsi*. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2012, 35(6): 67–73 [刘希良, 王开卓, 成嘉, 等. 鳊鱼肌球蛋白重链基因的原核表达及多克隆抗体的制备. *湖南师范大学自然科学学报*, 2012, 35(6): 67–73]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Lubov S, Valeria M, Elena S, *et al.* Nucleotide-induced and actin-induced structural changes in SH1-SH2-modified myosin subfragment 1. *Journal of Muscle Research and Cell*

- Motility, 2007, 28(1): 67–78
- Molina MI, Kropp KE, Gulick J, *et al.* The sequence of an embryonic heavy chain gene and isolation of its corresponding cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(14): 6478–6488
- Muramatsu UM, Kikuchi KH, Ikeda D, *et al.* The complete genomic sequence of the carp fast skeletal myosin heavy chain gene. *Gene*, 2005, 349(2): 143–151
- Nakaya M, Watabe S, Ooi T. Differences in the thermal stability of acclimation temperature-associated types of carp myosin and its rod on differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 1995, 34(9): 3114–3120
- Nihei Y, Kobiyama A, Ikeda D, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression analysis of carp embryonic, slow and cardiac myosin heavy chain isoforms. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(1): 188–198
- Pette D, Staron RS. Myosin isoform, muscle fiber types and transitions. *Microscopy Research & Technique*, 2000, 50(6): 500–509
- Strehler EE, Strehler-Page MA, Perriard JC, *et al.* Complete nucleotide and encoded amino acid sequence of a mammalian myosin heavy chain gene. Evidence against intron-dependent evolution of the rod. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 190(3): 291–317
- Sun BN, Chen C, Shen HD, *et al.* Species diversity of Onchidiidae (Eupulmonata: Heterobranchia) on the mainland of China based on molecular data. *Molluscan Research*, 2014, 34(1): 62–70
- Tao Y, Kobayashi M, Liang CS, *et al.* Temperature-dependent expression patterns of grass carp fast skeletal myosin heavy chain genes. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 139(4): 649–656
- Wang CN, Shen HD, Zheng P. Evaluation of genetic diversity in the *Onchidium struma* from different geographical populations in China by inter simple sequence repeat (ISSR). *Biotechnology Bulletin*, 2014(9): 208–212 [王成暖, 沈和定, 郑培. 中国沿海瘤背石磺不同地理群体遗传多样性的 ISSR 标记研究. *生物技术通报*, 2014(9): 208–212]
- Wang DF, Shen HD, Wu X. Comparative histology of the skin from three species of Onchidiidae. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(3): 437–444 [王冬凤, 沈和定, 吴欣. 石磺科 3 种贝类皮肤显微结构比较. *动物学杂志*, 2015, 50(3): 437–444]
- Weaver FE, Stauffer KA, Coughlin DJ. Myosin heavy chain expression in the red, white, and ventricular muscle of juvenile stages of rainbow trout. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 290(7): 751–758
- Weiss A, McDonough D, Wertman B, *et al.* Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(6): 2958–2963
- Wu XF, Shen HD, Wu WJ, *et al.* Comparison on morphology of Onchidiidae in eastern coast of China. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(6): 92–100 [吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海 4 种石磺形态学比较. *动物学杂志*, 2010, 45(6): 92–100]
- Yao LX, Zhou N, Shen HD, *et al.* Genetic diversity and differentiation of *Platevindex mortoni* from the coastal area of China based on mitochondrial COI gene. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 729–739 [姚理想, 周娜, 沈和定, 等. 中国沿海平疣桑椹石磺 COI 基因的遗传多样性与遗传分化. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 729–739]
- Yi T, Liu XL, Bin SY, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of slow myosin heavy chain 1(*sMyHCl*) gene cDNA in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Journal of Guangxi Normal University*, 2014, 32(2): 175–180 [易潭, 刘希良, 宾石玉, 等. 鳊鱼 *Siniperca chuatsi* 红肌 *sMyHCl* 基因 cDNA 的克隆及其表达分析. *广西师范大学学报*, 2014, 32(2): 175–180]

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning and Analysis of the *MyHC* Gene in *Onchidium struma*

GU Bingning, LIU Xin, SHEN Heding<sup>①</sup>, WANG Dongfeng, YANG Tiezhu,  
ZHU Min, SHI Yanmei, LI Bohang

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education;  
National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education; Shanghai Universities Key  
Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** *Onchidium struma* belongs to Mollusca, Pulmonata, and was regarded as the transitional taxa from water to land because of its amphibious characteristics. Having similar characters to amphibians, *O. struma* is a good subject for the study of marine invertebrates extending landward. As the basic component of muscle units, myosin directly influences the muscle growth and meat quality *via* its molecular diversity and composition. It is a ubiquitous eukaryotic motor protein that interacts with actin to generate the force for cellular movements, ranging from cytokinesis to muscle contraction. In this study, we used rapid amplification cDNA ends (RACE) methods to obtain the full-length cDNA of the myosin heavy chain (*MyHC*) gene in *O. struma*. We performed bioinformatic and expression pattern analysis of *MyHC* mRNA in different tissues detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The full length of the *MyHC* cDNA sequence consists of 7566 base pairs (bp) comprising a 228 bp 5' untranslated region (UTR), a 1443 bp 3' UTR, and a 5895 bp open reading frame (ORF) which encodes 1964 amino acids. *MyHC* gene was expressed in various tissues; its highest expression was found in the foot and its lowest in the hepatopancreas ( $P < 0.05$ ). Moreover, the *MSTN* protein was predicted to be composed of 31,713 atoms and its formula is  $C_{9765}H_{15897}N_{2849}O_{3150}S_{52}$ , with a calculated relative molecular weight of 225.28 kDa and a *pI* of 5.56. The result of signal peptide prediction shows that the N-terminal has a signal peptide of 29 amino acids in length. Additionally, common features were found in the *MyHC* of *O. struma*, including MYSc class II and myosin tail I domain. Molecular phylogenetic analysis shows that *O. struma* is closely related to *Biomphalaria glabrata*. This study provided a novel myosin heavy chain gene sequence in *O. struma* and the results indicate that the *MyHC* gene is important for the growth and development of this animal, as well as its muscle characterization. Furthermore, the results revealed that *MyHC* is not only an essential structural protein, but also a functional protein in *O. struma*. Conclusively, *MyHC* is an excellent candidate gene for studying biological evolution.

**Key words** *Onchidium struma*; *MyHC*; Gene cloning; Tissue expression

① Corresponding author: SHEN Heding, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170503002

http://www.yyqxjz.cn/

张广明, 孙秀俊, 吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 周丽青, 刘寒苗, 赵庆. 虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝中的通用性研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 139-146

Zhang GM, Sun XJ, Wu B, Yang AG, Liu ZH, Zhou LQ, Liu HM, Zhao Q. Transferability of EST-SSR from *Patinopecten yessoensis* into *Chlamys farreri*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 139-146

# 虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝 中的通用性研究\*



张广明<sup>1,2,3</sup> 孙秀俊<sup>1,2</sup> 吴 彪<sup>1,2</sup> 杨爱国<sup>1,2①</sup>  
刘志鸿<sup>1,2</sup> 周丽青<sup>1,2</sup> 刘寒苗<sup>1,2,3</sup> 赵 庆<sup>1,2,3</sup>

1. 农业农村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试点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** 为研究虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的群体遗传多样性并分析其亲缘关系,对在虾夷扇贝中开发的 60 个 EST-SSR 位点在栉孔扇贝中的通用性进行了研究。结果显示,21 个位点可在栉孔扇贝中扩增出特异性条带,通用性比例达 35.00%,其中,17 个位点具有多态性,多态性比例达 28.33%。在虾夷扇贝和栉孔扇贝群体中,平均等位基因数( $N_a$ )分别为 2.7647 和 2.3529;平均有效等位基因数( $N_e$ )分别为 1.9487 和 1.6350;平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.6314 和 0.3333;平均期望杂合度( $H_e$ )为 0.4569 和 0.3139;平均多态信息含量(PIC)为 0.3726 和 0.2597;Nei's (1973)基因多样性指数( $I$ )分别为 0.4493 和 0.3087;Shannon 信息指数分别为 0.7176 和 0.5041;固定指数( $F_{is}$ )检测发现,7 个位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡;遗传分化系数( $F_{st}$ )为 0.2398。本研究开发的 21 对通用性 EST-SSR 标记,为进一步开展虾夷扇贝和栉孔扇贝遗传多样性分析、分子辅助育种、基因发掘和种质资源评价奠定了基础。

**关键词** 虾夷扇贝;栉孔扇贝;EST-SSRs;微卫星;多态性;通用性

**中图分类号** S968.31 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0139-08

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)主要分布于我国北方近海、日本、韩国和俄罗斯等沿海。随着养殖规模的扩大,出现了养殖产量下降和病害频发等问题(王如才等, 2004)。而虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)属冷水

性双壳贝类,原产于日本北海道及本洲北部、俄罗斯千岛群岛的南部海域及朝鲜附近(常亚青等, 2008;杨爱国等, 2004)。近年来,随着养殖规模的扩大,虾夷扇贝养殖群体出现了苗种成活率低、成体小型化、

\* 国家自然科学基金(31602153)、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开放基金(2016LMFS-B02)、海水养殖教育部重点实验室开放基金(KLM2018004)和山东省自然科学基金(ZR2016CQ32)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31602153), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, P. R. China (2016LMFS-B02), the Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China (KLM2018004), and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CQ32)]. 张广明, E-mail: zgm985623@163.com

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-05-03, 收修改稿日期: 2017-05-16

高死亡率和病害频发等问题(张明明等, 2008; 杨培民等, 2007; 李云峰等, 2011)。虾夷扇贝和栉孔扇贝在育苗和养殖上均遇到了瓶颈和无法单独解决的难题, 而应用遗传学手段进行良种培育, 选育抗病、抗逆和生长快的新品种(品系)是实现扇贝养殖业可持续发展的有效途径(Li *et al.*, 2005)。

EST-SSR 侧翼序列在物种之间高度保守, 因此, EST-SSR 引物可在物种之间通用。种间通用性分子标记作为重要的遗传学研究工具, 对种间进化关系研究、种间比较作图、通用性遗传图谱构建等具有重要的意义(王晓润, 2012)。虾夷扇贝和栉孔扇贝标记开发及应用的工作已有大量研究, 现已有 ISSR 技术(吕振明, 2006; 何斌等, 2007)、RAPD 技术(滕丽莉等, 2005)、SRAP 技术(程宁宁等, 2009)和 AFLP 技术(于涛等, 2011)研究了虾夷扇贝、栉孔扇贝的遗传特性, 但由于操作复杂或准确率低等缺点限制了分子标记的进一步发展, 而基因组 EST(表达序列标签, Expressed Sequence Tags, ESTs)兼具基因组微卫星标记的孟德尔遗传共显性的遗传特征和直接标记功能基因的优点, 同时, 相比其他分子标记, 可靠性更高, 且扩增的目标序列在基因的编码区开发成本较低, 遗传信息含量丰富等优点(刘芳, 2006)。因此, 本研究对 60 对虾夷扇贝 EST 引物在栉孔扇贝基因组中的通用性进行了分析, 对栉孔扇贝和虾夷扇贝的群体遗传多样性和群体遗传结构进行了分析, 以期为进一步的分子辅助育种提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

虾夷扇贝(壳长为 10~12 cm)和栉孔扇贝(壳长为 7~8 cm)均于 2015 年 6 月取自山东烟台长岛养殖区, 从 2 个群体中分别随机选取 30 个个体作为研究材料, 活体运回实验室, -80℃ 保存备用。

### 1.2 引物的设计与合成

从已发表的文献(Zhang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016)中选择多态性高且扩增效果好的 60 对虾夷扇贝微卫星引物, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

### 1.3 模板 DNA 的制备

模板 DNA 提取自扇贝的闭壳肌。取其闭壳肌组织 100 mg 剪碎, 加入 500 μl 匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0), 混匀后加入终浓度为 0.5% 的 SDS 和 50 μg/ml 的蛋白酶 K, 55℃ 消化 3 h, 然后分别用等体积的酚: 氯仿(1:1),

氯仿: 异戊醇(24:1)抽提, 2 倍体积乙醇沉淀, ddH<sub>2</sub>O 溶解。基因组 DNA 浓度由 GENEQUANTpro (Eppendorf) RNA/DNA 分析定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测其质量。模板 DNA 用灭菌的超纯水稀释成 50 ng/μl, -20℃ 保存备用。

### 1.4 PCR 扩增与电泳检验

PCR 反应体系总体积为 10 μl, 包括 10×Buffer 1 μl、Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)0.6 μl、dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μl、上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl、模板 DNA 1 μl、Taq DNA 聚合酶(Promega) 0.5 U, 加超纯水补足 10 μl。反应在 Eppendorf 扩增仪上进行。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 2 min, 然后 95℃ 45 s, 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳进行预检测, 然后在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 电泳结果银染显色。待凝胶干燥后使用扫描仪记录电泳图谱。

### 1.5 数据统计与分析

根据每个个体产生的条带位置确定其基因型, 利用 Cervus 3.0 软件计算多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)、观测杂合度(Observed heterozygosity,  $H_o$ )、期望杂合度(Expected heterozygosity,  $H_e$ )、等位基因数(Number of allele,  $N_a$ )、有效等位基因数(Effective number of allele,  $N_e$ )、Nei 群体间的相似性系数和群体间遗传距离以及  $F$ -统计量进行遗传多样性的分析, 统计显著性水平用 Bonferroni 校正。

有效等位基因数:

$$N_e = 1 / \sum p_i^2$$

式中,  $p_i$  为第  $i$  个等位基因的频率。

多态信息含量的计算方法:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i p_j^2 = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

式中,  $k$  为等位基因数目,  $p_i$  和  $p_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因的频率。

平均杂合度观测值:  $H_o =$  观察到的杂合个体数/观察到的个体总数;

期望杂合度:  $H_e = 1 - \sum p_i^2$

固定指数( $F_{is}$ ):  $F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$

$F$ -统计量( $F_{st}$ ):  $F_{st} = \sigma^2 P / (P(1 - P))$

式中,  $P$  为某等位基因在整个群体中的平均频率;  $\sigma^2 P$  为该等位基因在分群体之间的方差。

Nei 群体间的相似性系数:

$$I = \sum(X_i Y_i) / [\sum(X_i)^2 \sum(Y_i)^2]^{1/2}$$

式中,  $X_i$ 、 $Y_i$  分别为  $X$  和  $Y$  群体第  $i$  个位点的等位基因频率。

Nei 群体间遗传距离:

$$D_A = -\ln I$$

加上偏差校正后为:

$$I = (2n-1) \sum(X_i Y_i) / \{\sum[2n(X_i)^2 - 1] \sum[2n(Y_i)^2 - 1]\}^{1/2}$$

式中,  $X_i$ 、 $Y_i$  分别为  $X$  和  $Y$  群体第  $i$  个位点的等

位基因频率。

## 2 结果

### 2.1 扇贝属间通用性引物的筛选

将 60 对虾夷扇贝微卫星引物在虾夷扇贝和栉孔扇贝基因组 DNA 中进行 PCR 扩增。根据电泳条带优化反应条件, 调整退火温度及时间, 最终有 21 对引物可稳定扩增, 条带之间较为清晰, 引物通用性比例达 35.00%, 其中, 17 对引物的扩增产物具有多态性, 占总数的 28.33%(表 1)。

表 1 在虾夷扇贝和栉孔扇贝基因组中扩增出多态性条带的 17 对 EST-SSRs

Tab.1 Seventeen polymorphic EST-SSRs were amplified from the genomes of the scallops *P. yessoensis* and *C. farreri*.

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'-3')	大小 Size (bp)	重复 Repeat sequence	退火温度 $T_m$	登录号 GenBank
comp92213_c0 <sup>F</sup>	TGGATGTCCAGAATGTTTGCT TGGCTTTTCAAACCTTGACCCT	240	(AT) <sub>10</sub>	57.841	KU891218
comp91359_c0 <sup>F</sup>	TTGCGACCAGAGACGTATCG AGCACGATCACACGGCATAT	187	(ACGA) <sub>5</sub>	59.895	KU891211
comp87586_c0 <sup>F</sup>	GCCATGCAGACGTACAGAGA CGGAATGTTGCTGAAATGGACA	204	(AT) <sub>10</sub>	59.771	KU891224
comp100440_c1 <sup>F</sup>	TCCCGGAGCTCATGGTCTTA CAGCACTGGTACTTCTTGTT	257	(TGTT) <sub>5</sub>	59.928	KU891210
comp98790_c0 <sup>F</sup>	TGTACACATGCACATCTACTACGA GGTCCATCAGCTTCACCCAA	262	(ATA) <sub>7</sub>	59.603	KU891209
comp88965_c0 <sup>F</sup>	CCGGTCTGAACTCGACCAA GGCCTCCAGGATTCTGTGTC	218	(ACC) <sub>7</sub>	59.967	KU891204
comp91909_c0 <sup>F</sup>	TGTGAACCGCTTTGAGACGA CAACGTTACACGATGGCCAC	246	(ATT) <sub>7</sub>	59.835	KU891207
contig_1217920 <sup>F</sup>	CACCATGAAAACCTGACACG CGGAGTACCCAGAGAAAAACA	140	(AC) <sub>11</sub>	59.225	KU999346
contig_1391603 <sup>F</sup>	GCAAGCGTTTATAAAATCACGA AAAGAATTCCTCGGAGCGTA	117	(AC) <sub>11</sub>	58.928	KU999357
contig_1443641 <sup>F</sup>	CCCTGATGTGAAGTTGAATGTT CCGATTTGGTCATGTAAATAGC	124	(CA) <sub>8</sub>	58.521	KU999349
contig_1451159 <sup>F</sup>	ACCTGATTTGGATGCCATTA GCTGTGGTGTGCTTGCTGT	114	(CA) <sub>9</sub>	57.887	KU999344
contig_293601 <sup>F</sup>	CTGTTGCGAACCGAGTTTGT CGAAATACTCATAATTTGTCCCG	126	(TA) <sub>10</sub>	59.755	KU999369
contig_963940 <sup>F</sup>	TATACGGTGCTTTTCCCGAC ACCTCGGGCATTGTTACAG	120	(TG) <sub>8</sub>	59.96	KU999370
contig_915269 <sup>F</sup>	GGCAGGGTCAGTGTGTATAGC ACAAGGCTGTGAGAAACGCT	111	(TA) <sub>8</sub>	59.636	KU999362
contig_763705 <sup>F</sup>	TGAGCACTAACAAGGCTGACTC ACTGTGCAACGCTTGATTTG	131	(AT) <sub>8</sub>	59.685	KU999378
contig_490627 <sup>F</sup>	TGTAGCCCTCTTGTATCGTT ACCTTCCCAGCCTTTCTCTC	120	(TA) <sub>9</sub>	58.947	KU999351
contig_988858 <sup>F</sup>	TCACATTACCCACGTGCTTG AACTAGTTGTGATAAAGCGGT	149	(AAT) <sub>7</sub>	57.046	KU999350



## 2.2 群体遗传结构

17对EST引物在虾夷扇贝、栉孔扇贝群体中均能检测到较高的多态性,但多态性水平有所不同(表2)。虾夷扇贝、栉孔扇贝群体等位基因数变化范围都为

2.00~4.00,平均等位基因数( $N_a$ )分别为2.7647和2.3529;平均有效等位基因数( $N_e$ )分别为1.9487和1.6350;观测杂合度( $H_o$ )范围为0.0667~0.9667和0~0.9667,平均为0.6314和0.3333;期望杂合度( $H_e$ )范围为0.1588~0.6576和0.0333~0.6672,平均为0.4569和0.3139;多

表2 17个EST-SSR位点在虾夷扇贝、栉孔扇贝各30个个体中的遗传特征  
Tab.2 Characterization of 17 EST-SSRs in 30 scallops *P. yessoensis* and *C. farreri*

位点 Locus	群体 Populations	等位基因 $N_a$	有效等位基因 $N_e$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	多态信息含量 PIC	哈温伯格平衡 HW
comp92213_c0	F1	2	1.9802	0.8333	0.5034	0.3725	0**
	F2	2	1.0689	0.0667	0.0655	0.0623	0.8946
comp91359_c0	F1	2	1.4274	0.3667	0.3045	0.2546	0.5528
	F2	3	2.7397	0.6333	0.6458	0.5615	0.6349
comp87586_c0	F1	4	1.9868	0.7000	0.5051	0.4029	0.0324
	F2	2	1.0689	0.0667	0.0655	0.0623	0.8946
comp100440_c1	F1	2	1.2596	0.1667	0.2096	0.1849	0.3238
	F2	2	1.9802	0.9000	0.5034	0.3725	0**
comp98790_c0	F1	2	1.8000	0.6667	0.4520	0.3457	0.0108
	F2	3	2.0619	0.7333	0.5237	0.4244	0.0469
comp88965_c0	F1	2	1.9802	0.9000	0.5034	0.3725	0**
	F2	2	1.9978	0.9667	0.5079	0.3747	0**
comp91909_c0	F1	3	2.1127	0.8667	0.5356	0.4189	0**
	F2	2	1.8672	0.4000	0.4723	0.3566	0.3924
contig_1217920	F1	4	2.4691	0.8667	0.6051	0.5152	0.0655
	F2	4	2.1765	0.3333	0.5497	0.4927	0**
contig_1391603	F1	3	2.8302	0.8000	0.6576	0.5724	0.3070
	F2	2	1.0339	0.0333	0.0333	0.0323	1.0000
contig_1443641	F1	2	1.9978	0.9667	0.5079	0.3747	0**
	F2	2	1.6000	0.2333	0.3814	0.3047	0.0287
contig_1451159	F1	3	2.4862	0.9333	0.6079	0.5169	0**
	F2	3	2.9079	0.7667	0.6672	0.5814	0.0413
contig_293601	F1	3	1.1850	0.1667	0.1588	0.1500	0.9783
	F2	2	1.1421	0	0.1266	0.1168	0**
contig_963940	F1	2	1.8967	0.2333	0.4808	0.3610	0.0041
	F2	2	1.7630	0.3667	0.4401	0.3391	0.3499
contig_915269	F1	2	1.4706	0.3333	0.3254	0.2688	0.8901
	F2	2	1.1050	0.0333	0.0966	0.0905	0**
contig_763705	F1	3	2.5825	0.9000	0.6232	0.5421	0.0039
	F2	2	1.1421	0	0.1266	0.1168	0**
contig_490627	F1	4	2.4357	0.9667	0.5994	0.5036	0**
	F2	2	1.0339	0.0333	0.0333	0.0323	1.0000
contig_988858	F1	4	1.2270	0.0667	0.1881	0.1769	0**
	F2	3	1.1063	0.1000	0.0977	0.0936	0.9967

F1: 虾夷扇贝群体; F2: 栉孔扇贝群体。统计显著性水平用 Bonferroni 校正(Rice, 1989;  $k=17$ ), \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$

F1: *P. yessoensis*; F2: *C. farreri*. Table-wide significance levels were applied, using the sequential Bonferroni technique (Rice, 1989;  $k=17$ ), \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$

态信息含量(PIC)范围为 0.1500~0.5724 和 0.0323~0.5814, 平均为 0.3726 和 0.2597。

### 2.3 扇贝群体遗传变异性分析

虾夷扇贝和栉孔扇贝群体遗传结构变化和 21 对 EST 引物在 2 个群体内偏离 Hardy-Weinberg 平衡程度见表 2。从表 2 可以看出, 从  $F_{is}$  参数看, 2 个群体中 7 对引物偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中, 位点 comp88965\_c0 在 2 个群体中均偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。从  $F$ -检验的数据来看(表 3), 配对比较  $F_{st}$  值 ( $F_{st}<0.05$ )。通过 17 对微卫星位点计算总的遗传分化系数( $F_{st}$ )为 0.2398, 表明有 23.98% 的遗传变异来自于群体之间, 76.02% 来自个体之间。此外, 对  $F_{is}$  值的计算表明, 除了 comp100440\_c1、contig\_963940 和 contig\_988858 的  $F_{is}>0$ , 其他 14 个位点  $F_{is}<0$ , 呈现杂合子过剩状态。2 个扇贝群体在 comp91359\_c0、comp100440\_c1、comp91909\_c0、contig\_1217920、contig\_1443641、contig\_293601、contig\_963940、contig\_915269、contig\_763705、contig\_988858 10 个引物呈现一定程度的杂合子缺失。

表 3 扇贝 2 个群体 17 个微卫星位点的  $F$ -检验分析  
Tab.3  $F$ -statistics for two scallop populations at seventeen microsatellite loci

位点 Locus	固定指数 $F_{is}$		遗传分化系数 $F_{st}$
	虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	
comp92213_c0	-0.6835	-0.0345	0.3230
comp91359_c0	-0.2245	0.0026	0.1070
comp87586_c0	-0.4094	-0.0345	0.5489
comp100440_c1	0.1914	-0.8182	0.2113
comp98790_c0	-0.5000	-0.4239	0.2198
comp88965_c0	-0.8182	-0.9355	0.0044
comp91909_c0	-0.6456	0.1388	0.0078
contig_1217920	-0.4566	0.3834	0.1894
contig_1391603	-0.2371	-0.0169	0.2531
contig_1443641	-0.9355	0.3778	0.0752
contig_1451159	-0.5613	-0.1685	0.0315
contig_293601	-0.0676	1.0000	0.7283
contig_963940	0.5065	0.1528	0.0049
contig_915269	-0.0417	0.6491	0.0514
contig_763705	-0.4687	1.0000	0.1556
contig_490627	-0.6400	-0.0169	0.2692
contig_988858	0.6396	-0.0405	0.7352
平均 Mean	-0.4052	-0.0798	0.2398

## 3 讨论

### 3.1 虾夷扇贝 EST-SSR 位点的通用性研究

EST-SSR 标记来源于基因的编码区, 具有开发成本低、信息含量丰富、扩增效率高等优点(Wang *et al.*, 2009; 李云峰等, 2011)。本研究从虾夷扇贝的 EST 文库中分离和筛选了 60 对多态性位点, 多态性比例达 40.0%, 这与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)EST-SSR 的多态性比例相似(王艳红等, 2007)。而刘博等(2011)研究表明, 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)EST-SSR 的多态性比例达 35.0%, 与本研究结果基本一致。由于微卫星侧翼序列在种间或属间有高度保守性, 因此, 开发通用性位点应用于近源物种成为可能。有学者研究表明, 文蛤(*Meretrix meretrix*)微卫星引物在彩虹明樱蛤(*Moerella iridescens*)和青蛤(*Cyclina sinensis*)的引物通用性分别为 10.3%和 6.9%(李晓英等, 2010), 美洲紫海胆(*S.purpuratus*)EST-SSR 在光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)中的引物通用性为 22.50%(李晶晶, 2008)。而本研究中, 虾夷扇贝 EST-SSR 在栉孔扇贝中的引物通用性比例达 35.00%, 这与杨璞等(2008)和李晓英等(2010)的研究结果相一致, 但低于栉孔扇贝 cSNP 引物在虾夷扇贝中 52.27% 的通用性比例(李晶晶, 2008), 原因可能是 SNP 标记相比 SSR 重复序列具有更高的遗传稳定性, 且更容易对数据进行自动化和规模化分析, 王晓润等(2012)的研究结果与本研究结果相一致。

### 3.2 虾夷扇贝 EST-SSR 位点的开发及群体遗传多样性分析

本研究中 2 个扇贝群体中的  $F_{is}$  大部分为负值, 表明这些基因座存在远交或杂交现象, 2 个种群均处于杂合度过剩状态, 这可能是纯合致死或是群体内自然选择引起的(张海滨, 2005; 王宇等, 2012)。Hardy-Weinberg 平衡和多态性信息含量是经常用来衡量群体遗传结构变异程度高低的重要参数。本研究发现, 有 7 个位点偏离了平衡, 可能是人为因素的干扰, 导致种群内基因缺失造成杂合子缺失。其中, 6 个位点为高度多态性基因座( $PIC>0.5$ ), 占总位点数的 35.29%; 11 个位点为中度多态性基因座( $0.25<PIC<0.5$ ), 占总数的 64.71%。说明本研究所开发的微卫星位点在扇贝遗传多样性研究中可提供有效的遗传信息, 这与齐晓艳等(2013)得出相同的结论。17 对 EST 引物在虾夷扇贝群体中的  $H_e$  和  $H_o$  分别为 0.6314 和 0.4569, 高于在栉孔扇贝群体中的  $H_e$ (0.3333)和  $H_o$ (0.3139),

由此可知, 虾夷扇贝群体的遗传多样性略高于栉孔扇贝群体。同时, 这组数据高于利用 AFLP 研究不同地理群体虾夷扇贝遗传多样性的平均杂合度, 可能是 SSR 比 AFLP 技术更加灵敏导致, 刘芳(2006)、薛明等(2006)的研究也说明这一点。

## 参 考 文 献

- Chang YQ, Chen XX, Ding J, *et al.* Genetic diversity in five scallop populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1145–1152 [常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 5 个群体的遗传多样性. *生态学报*, 2007, 27(3): 1145–1152]
- Chang YQ, Zhang CS, Cao XB, *et al.* Effect of morphometrical traits on weight traits in one-year old Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(5): 330–334 [常亚青, 张存善, 曹学彬, 等. 1 龄虾夷扇贝形态性状对重量性状的影响效果分析. *大连海洋大学学报*, 2008, 23(5): 330–334]
- Cheng NN, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Analysis on heterosis of *Chlamys farreri* × *Patinopecten yessoensis* by SRAP marker. *Marine Sciences*, 2009, 33(10): 107–111 [程宁宇, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝 (♀) × 虾夷扇贝 (♂) 子一代杂种优势的 SRAP 分析. *海洋科学*, 2009, 33(10): 107–111]
- He B, Yang AG, Wang QY, *et al.* ISSR analysis of the F<sub>1</sub> hybrids of scallop *Chlamys farreri* ♀ × *Patinopecten yessoensis* ♂. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, 22(4): 273–277 [何斌, 杨爱国, 王清印, 等. 栉孔扇贝 ♀ × 虾夷扇贝 ♂ 单对杂交子一代的 ISSR 分析. *大连海洋大学学报*, 2007, 22(4): 273–277]
- Li JJ. Isolation and characterization of microsatellite markers in two species of bivalve and sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 [李晶晶. 两种双壳贝类和光棘球海胆微卫星标记的分离及特性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008]
- Li L, Xiang JH, Liu X, *et al.* Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture*, 2005, 245(1–4): 63–73
- Li XY, Dong ZG, Yan BL *et al.* A Study on the universality of partial shellfish microsatellites in GenBank in *Cyclina sinensis* and *Moerella iridescens*. First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering, 2010 [李晓英, 董志国, 阎斌伦, 等. GenBank 中部分贝类微卫星标记在青蛤和彩虹明樱蛤的通用性研究. 第 I 届细胞生物学, 分子生物学, 生物物理与生物工程国际会议, 2010]
- Li YF, Liu WD, Gao XG, *et al.* Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis. Academic Annual Meeting of China Fisheries Society, 2011, 578–585 [李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. 中国水产学会学术年会, 2011, 578–585]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. China Zoological Society, Shellfish China Institute of Oceanology and Limnology Society of the Ninth Congress and the Fifteenth National Symposium on Shellfish Abstract Set, 2011 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏 EST-SSR 分布特征及引物开发利用. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会第九次会员代表大会暨第十五次学术讨论会会议摘要集, 2011]
- Liu F. Genetic diversity of different populations of *Patinopecten yessoensis* using AFLP and SSR molecular markers. Master's Thesis of Liaoning Normal University, 2006 [刘芳. 利用 AFLP 和 SSR 分子标记研究不同地理虾夷扇贝群体的遗传多样性. 辽宁师范大学硕士研究生学位论文, 2006]
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* Analysis of effects of shell size characters on live weight in Chinese scallop *Chlamys farreri*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(6): 673–678 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝壳尺寸性状对活体重的影响效果分析. *海洋与湖沼*, 2002, 33(6): 673–678]
- Lv ZM. Cytogenetic and molecular analysis of hybridization between *Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2006 [吕振明. 栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交过程中的细胞与分子遗传学分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006]
- Qi XY, Dong YH, Yao HH, *et al.* Identification of 30 microsatellite markers in *Meretrix meretrix* and their transferability in *Meretrix lamarckii* and *Meretrix lyrat*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1147–1154 [齐晓艳, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 文蛤 30 个微卫星标记的开发及在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测. *水产学报*, 2013, 37(8): 1147–1154]
- Sun XJ, Zhang GM, Zhou LQ, *et al.* Development of genome-wide microsatellite genetic resources by using RAD tag sequencing in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Conservation Genetic Resource*, 2016, 8(2): 192–194
- Teng LL, Yang AG, Zhao F, *et al.* Analysis on heterosis of *Chlamys farreri* × *Patinopecten yessoensis* by RAPD marker. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(6): 97–101 [滕丽莉, 杨爱国, 赵峰, 等. 栉孔扇贝 × 虾夷扇贝子一代杂

- 种优势的 RAPD 分析. 高技术通讯, 2005, 15(6): 97-101]
- Wang RC, Zheng XD. Progress of marine shellfishes culture in China and its prospect. Periodical of Ocean University of China(Natural Science), 2004, 34(5): 775-780 [王如才, 郑小东. 我国海产贝类养殖进展及发展前景. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, 34(5): 775-780]
- Wang XL, Song B, Qiu XM, *et al.* Development of EST-SSRs in scallop (*Patinopecten yessoensis*) from sequence database. Conservation Genetics, 2009, 10(4): 1129-1131
- Wang XJ. Development of cSNP markers in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their cross-species applications. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012[王晓澗. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)cSNP 标记的开发及其种间通用性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Wang Y, Li L, Zhang SD, *et al.* Microsatellite segregation distortion analysis of the out bred, inbred and selfed families of the Bay scallop(*Argopecten irradians*). Marine Sciences, 2012, 36(8): 109-115 [王宇, 李莉, 张守都, 等. 海湾扇贝杂交、近交和自交家系的微卫星标记偏分离分析. 海洋科学, 2012, 36(8): 109-115]
- Wang YH, Ren R, Yu ZN. Exploitation of EST-SSR markers for *Crassostrea gigas*. China Zoological Society, Shellfish China Institute of Oceanology and Limnology society of the Eighth Congress and the Thirteenth National Symposium on Shellfish Abstract Set, 2007 [王艳红, 任睿, 喻子牛. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 EST-SSR 标记开发. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会第八次会员代表大会暨第十三次全国贝类学术讨论会论文摘要集, 2007]
- Xue M, Du XD, Huang RL, *et al.* Biochemical genetic variation within three wild populations of *Meretrix meretrix*. Marine Science Bulletin, 2006, 25(1): 38-43 [薛明, 杜晓东, 黄荣莲, 等. 文蛤三个野生种群的生化遗传变异. 海洋通报, 2006, 25(1): 38-43]
- Yang AG, Wang QY, Liu ZH, *et al.* The hybrid between the scallops *Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis* and the inheritance characteristics of its first filial generation. Marine Fisheries Research, 2004, 25(5): 1-5 [杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状. 渔业科学进展, 2004, 25(5): 1-5]
- Yang P, Yang AG, Liu ZH, *et al.* The selection of universal microsatellite primers between *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri* and its application in hybrid identification. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(19): 8287-8289 [杨璞, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝和虾夷扇贝通用微卫星引物的筛选及其在杂种鉴定中的应用. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 8287-8289]
- Yang PM, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Cryopreservation of *Patinopecten yessoensis* sperm and its application to hybridization. Journal of Shanghai Ocean University, 2007, 16(4): 351-356 [杨培民, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 虾夷扇贝精子的冷冻保存及其杂交试验应用研究. 上海海洋大学学报, 2007, 16(4): 351-356]
- Yu T, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* Genetic variation of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their hybrids. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 574-580 [于涛, 杨爱国, 周丽青, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的群体遗传多样性分析. 中国水产科学, 2011, 18(3): 574-580]
- Zhang GM, Sun XJ, Zhou LQ, *et al.* Isolation and characterization of 44 microsatellite markers in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* by transcriptome mining. Conservation Genetic Resource, 2016, 8(2): 186-188
- Zhang HB. Inbreeding effect and genetic improvement of Bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2005 [张海滨. 海湾扇贝近交生物学效应和遗传改良研究. 中国科学院大学研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2005]
- Zhang MM, Zhao W. Causes of death of *Patinopecten yessoensis* in China and control measures. China Fisheries, 2008(2): 65-66 [张明明, 赵文. 我国虾夷扇贝死亡原因的探讨及控制对策. 中国水产, 2008(2): 65-66]

(编辑 陈严)

## Transferability of EST-SSR from *Patinopecten yessoensis* into *Chlamys farreri*

ZHANG Guangming<sup>1,2,3</sup>, SUN Xiujun<sup>1,2</sup>, WU Biao<sup>1,2</sup>, YANG Aiguo<sup>1,2①</sup>,  
LIU Zhihong<sup>1,2</sup>, ZHOU Liqing<sup>1,2</sup>, LIU Hanmiao<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Qing<sup>1,2,3</sup>

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

**Abstract** In this study, expressed sequence tag (EST)-SSR markers were developed to investigate the genetic relationship between two commercially important scallop species, Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* and Zhikong scallop *Chlamys farreri*. A total of 60 EST-SSRs previously developed from *P. yessoensis* were selected, and their cross-species amplification in *C. farreri* was analyzed. As a result, 21 pairs of EST-SSR primers showed unique PCR products. The interspecies transferability was calculated to be 35.00%. Among the 21 EST-SSR primers, 17 were polymorphic in the studied populations, which resulted in 28.33% transferability. In the two populations of *P. yessoensis* and *C. farreri*, the number of alleles ranged from 2.00 to 4.00, with mean allele numbers of 2.7647 and 2.3529, respectively. The mean effective number of alleles was estimated to be 1.9487 and 1.6350, while the mean observed heterozygosity was 0.6314 and 0.3333, respectively. Similar to the observed heterozygosity, the mean expected heterozygosity was higher in *P. yessoensis* (0.4569) than in *C. farreri* (0.3139). For the two populations, the diversity index was consistently higher in *P. yessoensis* than in *C. farreri*. The mean polymorphism information content was estimated to be 0.3726 and 0.2597, and Nei's (1973) gene diversity index was calculated to be 0.4493 and 0.3087, respectively. Furthermore, Shannon's information index in the two populations was 0.7176 and 0.5041, respectively. The genetic identity between the two species was calculated to be 0.619, with a high genetic divergence between them (0.480). Among the polymorphic markers, seven loci significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium according to the average fixation index ( $F_{is}$ ). The genetic differentiation index ( $F_{st}$ ) between the two populations was estimated to be 0.2398. The EST-SSR markers developed for cross-species amplification of *P. yessoensis* and *C. farreri* are important resources for the study of genetic diversity, marker-assisted breeding, gene discovery, and genetic evaluation of germplasm resources.

**Key words** *Patinopecten yessoensis*; *Chlamys farreri*; EST-SSRs; Microsatellites; Polymorphism; Transferability

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170423001

http://www.yykxjz.cn/

郑言鑫, 蔡忠强, 王鹏, 吴彪, 张树宝, 赵春暖, 于涛, 林建国, 孙超. 魁蚶中国群体与韩国群体杂交子一代养成期生长比较. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 147-151

Zheng YX, Cai ZQ, Wang P, Wu B, Zhang SB, Zhao CN, Yu T, Lin JG, Sun C. Growth of a first-generation hybrid between Chinese and Korean populations of *Scapharca broughtonii* during the adult culture stage. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 147-151

## 魁蚶中国群体与韩国群体杂交 子一代养成期生长比较\*



郑言鑫<sup>1</sup> 蔡忠强<sup>1</sup> 王 鹏<sup>1</sup> 吴 彪<sup>2</sup> 张树宝<sup>3</sup>  
赵春暖<sup>1</sup> 于 涛<sup>1①</sup> 林建国<sup>1</sup> 孙 超<sup>4</sup>

(1. 中国水产科学院长岛增殖实验站 烟台 265800; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 龙口市水产技术推广站 烟台 265800;  
4. 烟台市水产研究所 烟台 265800)

**摘要** 以魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中国群体(C)和韩国群体(K)为材料,进行了4个组合的杂交和自交实验,测定了各实验组魁蚶在养成期(10~15月龄)的壳长、湿重,并计算了杂交组合的杂种优势。结果显示,养成期杂交 KC 组壳长显著高于自交 CC 组、KK 组和杂交 CK 组,CK 组壳长杂种优势率在-2.03%~5.44%之间,KC 组壳长杂种优势率在 4.40%~14.74%之间,且 KC 组壳长杂种优势率始终高于 CK 组;养成期杂交 KC 组湿重始终显著高于自交 CC、KK 组和杂交 CK 组,而杂交 CK 组仅在 14、15 月龄显著高于自交 CC 和 KK 组,2 个杂交组合湿重的杂种优势率始终为正值,CK 组湿重杂种优势率在 1.41%~7.71%之间,KC 组壳长杂种优势率在 5.32%~23.71%之间,且 KC 组湿重的杂种优势率始终高于 CK 组,在湿重性状方面杂种优势更明显。综合分析表明,杂交 KC 组的杂交子一代在壳长和湿重方面的杂种优势更加明显,是理想的育种材料。

**关键词** 魁蚶; 杂交; 养成期; 壳长; 湿重; 杂种优势

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0147-05

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)俗称赤贝、大毛蛤、血贝,是一种大型冷水性蚶类,在我国主要分布在黄渤海地区(刘世禄等,2005),其肉味鲜美、营养丰富,深受消费者欢迎(王如才等,2008),在我国的山东、河北、辽宁等海域广泛养殖。由于国内外市场对魁蚶的大量需求,人们对其野生资源捕捞强度过大,导致我国魁蚶野生资源量大幅减少,种质质量严重下降。

杂交是进行动植物种质改良的重要有效手段之

一,主要是通过杂交使后代获得杂种优势,杂种优势是指杂种子一代在生长力、繁殖力、产量、品质等性状上优于双亲的一种复杂的生物学现象,且双亲的差异越大,往往杂种优势越强,反之,越弱(吴仲庆,2000;范兆廷,2005)。目前,杂交在水生生物的品种改良和生产中发挥了重大作用,有关海洋贝类杂交的相关研究已有很多报道,如虾夷扇贝(*Patinopecten yesoensis*) (于涛,2011)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (常亚青等,

\* 国家贝类产业技术体系建设专项资金(CARS-48)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017GH07)共同资助[This work was supported by the China Agriculture Research System(CARS-48), and the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2017GH07)]. 郑言鑫, E-mail: zhengyanxin1989@163.com

① 通讯作者: 于 涛, 工程师, E-mail: cdyutao@126.com

收稿日期: 2017-04-23, 收修改稿日期: 2017-05-17

2002、2006; 刘小林等, 2003a,b、2005)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians irradians*)(郑怀平等, 2004)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)(孔令锋等, 2013)、皱纹盘鲍 (*Haliotis diversicolor*) 和杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) (张国范等, 2002; 蔡明夷等, 2007) 等, 结果表明, 多数贝类的杂交子代在生长、存活及生产性能等方面优于其亲本的自繁群体。

不同性状在不同种群间存在差异, 其中, 生长速度是衡量某一种群的重要性状, 而壳长和湿重是判断其生长速度性状的重要指标。本研究以壳长和湿重为测量指标, 在魁蚶中国群体(C)和韩国群体(K)杂交子一代早期(幼虫期和稚贝期)生长比较研究的基础上(蔡忠强等, 2016), 比较不同杂交组与对照组在养成期(10~15月龄)的壳长和湿重, 为魁蚶养殖生产中杂种优势的利用提供实践基础, 进而为魁蚶的杂交育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

魁蚶中国群体为山东省长岛县采集的野生群体, 韩国群体为韩国仁川海区野生群体。为保证研究的可靠性与可行性, 实验与车间生产同步进行, 采用大水体育苗, 每个群体采集 1000 个野生个体作为亲贝。

### 1.2 实验设计

实验设立 4 个组合, 分别为韩国群体♀×中国群体♂(KC)、韩国群体♀×韩国群体♂(KK)、中国群体♀×韩国群体♂(CK)、中国群体♀×中国群体♂(CC)。实验设 2 个重复。

### 1.3 性状分析、取样及测量

在魁蚶养成期的 10~15 月龄, 每 30 d 取样 1 次, 各实验组取样 50 个, 用游标卡尺(精度 0.02 mm)测定样品的壳长, 用分析天平(精度 0.001g)测量样品的湿重。

### 1.4 数据分析

用 Excel 对各实验数据进行整理, 采用 SPSS19.0 统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Duncan 多重比较, 结果用平均值±标准差(Mean ± SD)形式表示。

参照孔令锋等(2013)的计算方法, 计算杂交子代各性状的杂种优势率(Heterosis,  $H$ , %), 公式为:

$$H(\%) = (F_1 - P) / P \times 100$$

式中,  $F_1$  为杂交子代性状的平均值,  $P$  为 2 个自

交组性状的平均值。

## 2 结果

### 2.1 养成期壳长的比较

养成期各实验组壳长见表 1。从表 1 可以看出, 杂交 KC 组壳长始终显著高于自交 CC、KK 组和杂交 CK 组; 杂交 CK 组壳长除 15 月龄外与自交 CC 和 KK 组无显著差异, 在 12 月龄与 KK 组无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但显著高于 CC 组壳长 ( $P < 0.05$ ); 自交 KK 组在 12 月龄壳长显著高于自交 CC 组, 其他时间与 CC 组无显著差异。

表 1 养成期各实验组魁蚶的壳长  
Tab.1 Shell length of *S.broughtonii* in the four groups at six adult culture stages (cm)

月龄 Months of age	群体 Populations			
	CC	KK	CK	KC
10	1.49±0.08 <sup>b</sup>	1.55±0.07 <sup>b</sup>	1.50±0.07 <sup>b</sup>	1.65±0.07 <sup>a</sup>
11	1.87±0.10 <sup>b</sup>	1.91±0.13 <sup>ab</sup>	1.85±0.14 <sup>b</sup>	1.97±0.14 <sup>a</sup>
12	2.32±0.10 <sup>c</sup>	2.39±0.08 <sup>b</sup>	2.42±0.08 <sup>b</sup>	2.44±0.13 <sup>a</sup>
13	3.04±0.19 <sup>b</sup>	3.13±0.15 <sup>b</sup>	3.15±0.20 <sup>b</sup>	3.31±0.13 <sup>a</sup>
14	3.56±0.17 <sup>c</sup>	3.63±0.12 <sup>bc</sup>	3.72±0.11 <sup>b</sup>	3.92±0.20 <sup>a</sup>
15	4.27±0.17 <sup>c</sup>	4.28±0.16 <sup>c</sup>	4.51±0.20 <sup>b</sup>	4.90±0.32 <sup>a</sup>

注: 不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下表同  
Note: Different letters showed significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), the same as below

养成期杂交组壳长的杂种优势率见表 2。从表 2 可以看出, CK 组壳长杂种优势率范围为 -2.03%~5.44%, KC 组壳长杂种优势率范围为 4.40%~14.74%, KC 组壳长杂种优势率始终为正值, 且较 CK 组杂种优势率值高, 杂种优势高于 CK 组; 在 10、11 月龄, 杂交 CK 组的杂种优势率为负值, 12 月龄以后为正值, 但杂种优势率较低。

表 2 养成期杂交组壳长的杂种优势率  
Tab.2 Heterosis in shell length of the two reciprocal hybrid crosses during adult culture stage (%)

组别 Groups	月龄 Months of age					
	10	11	12	13	14	15
CK	-1.58	-2.03	2.78	1.97	3.54	5.44
KC	8.82	4.40	10.26	7.12	9.01	14.74

### 2.2 养成期湿重的比较

养成期各实验组湿重变化见表 3。从表 3 可以看出, 杂交 KC 组湿重始终显著高于自交 CC、KK 组和

杂交 CK 组; 杂交 CK 组在 14、15 月龄显著高于自交 CC 和 KK 组, 10~13 月龄湿重差异不显著; 自交组 CC 组和 KK 组湿重差异不显著。

表 3 养成期各实验组魁蚶的湿重  
Tab.3 Wet weight of *S.broughtonii* in the four groups at six adult culture stages(g)

月龄 Months of age	群体 Populations			
	CC	KK	CK	KC
10	1.16±0.12 <sup>b</sup>	1.16±0.15 <sup>b</sup>	1.19±0.11 <sup>b</sup>	1.29±0.10 <sup>a</sup>
11	2.70±0.09 <sup>c</sup>	2.71±0.10 <sup>c</sup>	2.86±0.12 <sup>b</sup>	3.04±0.13 <sup>a</sup>
12	3.84±0.12 <sup>b</sup>	3.93±0.11 <sup>b</sup>	4.03±0.15 <sup>a</sup>	4.09±0.12 <sup>a</sup>
13	7.10±0.20 <sup>b</sup>	7.04±0.30 <sup>b</sup>	7.17±0.20 <sup>b</sup>	7.47±0.24 <sup>a</sup>
14	10.05±0.96 <sup>c</sup>	10.08±0.89 <sup>c</sup>	11.27±1.02 <sup>b</sup>	11.83±1.27 <sup>a</sup>
15	23.43±4.10 <sup>c</sup>	23.65±2.56 <sup>c</sup>	25.36±2.13 <sup>b</sup>	29.12±1.74 <sup>a</sup>

养成期杂交组湿重的杂种优势率见表 4。从表 4 可以看出, CK 组湿重的杂种优势率变化范围为 1.41%~12.01%, 而 KC 组湿重的杂种优势率变化范围为 5.32%~23.71%, 杂交组湿重的杂种优势率始终为正值, 杂种优势率最高的为 15 月龄 KC 组 23.71%, 最低的为 13 月龄 CK 组 1.41%, 且杂种优势率不随魁蚶的生长而出现规律性变化。KC 组湿重的杂种优势率较 CK 组高, 在湿重性状方面杂种优势明显。

表 4 养成期杂交组湿重的杂种优势率  
Tab.4 Heterosis in wet weight of the two reciprocal hybrid crosses during adult culture stage (%)

组别 Groups	月龄 Months of age(m)					
	10	11	12	13	14	15
CK	2.73	5.85	3.81	1.41	12.01	7.71
KC	11.23	12.29	5.32	5.64	17.57	23.71

### 3 讨论

生长速度是衡量魁蚶养殖效果的重要指标之一。韩国魁蚶相对中国魁蚶有 2 个明显的特点: 一是其贝壳较薄, 出肉率更高; 二是其贝肉更加细腻鲜美, 且在生长速度上有一定的优势。本研究在魁蚶中国群体和韩国群体杂交子一代早期(幼虫期和稚贝期)生长比较的基础上(蔡忠强等, 2016), 探究养成期各实验组魁蚶壳长和湿重的差异性, 分析养成期各实验组魁蚶壳长。结果表明, 杂交 KC 组表现出一定的杂种优势, 壳长始终显著高于自交组, 杂种优势率始终表现为正值; 而杂交 CK 组杂种优势不明显, 在 12、15 月龄与自交 KK 组无显著差异( $P>0.05$ ), 且杂种优势率较

低, 前期表现为负值。分析养成期各实验组魁蚶湿重, 结果表明, 杂交 KC 组在湿重方面有明显的杂种优势, 湿重始终显著高于自交 CC、KK 组和杂交 CK 组, 且 KC 组湿重的杂种优势率一直维持在相对较高的水平; 杂交 CK 组在湿重方面也表现出一定的杂种优势, 在 14 月龄以后湿重显著高于自交组, 且杂种优势率始终为正值, 但是, 其杂种优势相对 KC 组较低。研究期间, 魁蚶杂交组合壳长的杂种优势率较低, 在壳长方面没有表现出明显的杂种优势; 杂交组合湿重杂种优势率不随魁蚶的生长而出现规律性变化, 杂交 KC 组在 12、13 月龄杂种优势率较其他月龄低, 主要是因为 12、13 月龄时为 7~9 月, 此时, 海区环境较为适宜, 水温适宜、饵料丰富, 各实验组魁蚶生长迅速, 即使 KC 组的遗传特性与其他各组存在差异, 但是由于环境因素影响, 使得 KC 组魁蚶湿重的杂种优势率变化不规律。

许多学者通过研究不同种群的栉孔扇贝杂交发现, 杂交后代在养殖中期也表现出了不同的杂种优势。刘小林等(2003a)研究栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交子一代的中期生长发育, 并进行了各种群的中期(11~18 月龄)生长发育比较, 结果显示, 正反 2 个杂交组合的杂种群体中期生长阶段在壳长、壳高、壳宽和体重 4 个生长发育指标均高于亲本种群, 表现出不同程度的杂种优势, 其范围在 5%~50%之间, 壳长的杂种优势率在 5.18%~19.46%之间, 体重的杂种优势率在 20.08%~50.80%之间。刘小林等(2003b)研究栉孔扇贝中国种群和俄罗斯种群杂交, 比较各组合后代在中期(6~12 月龄)的生长性能, 结果表明, 杂交组合的杂种群体各个性状的中期生长性能均高于亲本种群, 都表现出不同程度的杂种优势, 其范围在 3%~52%之间, 壳长的杂种优势率在 3.45%~16.40%之间, 体重的杂种优势率在 11.76%~44.35%之间(刘小林等, 2005)。常亚青等(2006)研究栉孔扇贝中国种群和俄罗斯种群杂交, 比较各组合后代在 1~2 龄(14~24 月龄)的生长性能, 结果表明, 2 个杂交组合的杂种群体各个性状的后期生长性能均高于亲本种群, 杂种优势均较大, 其范围在 3.00%~40.00%之间, 壳长的杂种优势率在 3.96%~9.88%之间, 体重的杂种优势率在 7.61%~37.18%之间。不同种群栉孔扇贝杂交, 在养殖中期, 杂交后代壳长和体重方面都表现出了一定的杂种优势, 但是, 壳长的杂种优势较低。本研究表明, 不同种群魁蚶杂交后代在壳长和体重方面也表现出了一定的杂种优势, 但是杂种优势率比栉孔扇贝低, 且魁蚶杂交后代壳长杂种优势率还出现负值, 这可能与不同贝类的生长特性有关。



通过杂交使后代获得杂种优势,从而使杂交后代在生长性能等方面优于亲本,广泛应用于水产动物的遗传育种。如长牡蛎不同地理群体间杂交后代在生长性状表现出一定的杂种优势(孔令锋等, 2013); 不同群体海湾扇贝[墨西哥海湾扇贝(*Argopecten irradians concentricus* Say)和海湾扇贝]进行杂交。结果显示, 杂交后代在生长速度上表现出明显的杂种优势(Zhang *et al.*, 2007); 不同地理种群海胆杂交, 杂交后代在 12 月龄的平均体重表现出明显的杂种优势(Rahman *et al.*, 2000)。此外, 通过杂交还可以培育新品种, 2017 年 4 月农业部公布的 14 个水产新品种中有 5 个是通过杂交选育获得, 分别为合方鲫[日本白鲫(*Carassius auratus cuvieri*, ♀)×红鲫(*Carassius auratus red var.*, ♂)]、杂交鲟“鲟龙 1 号”[达氏鳇(*Huso dauricus*, ♀)×施氏鲟(*Acipenser schrenckii*, ♂)]、长珠杂交鳊[翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*, ♀)×斑鳊(*Siniperca scherzeri*, ♂)]、虎龙杂交斑[棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*, ♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*, ♂)]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)‘鲆优 2 号’[中国的牙鲆抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)病群体与日本的牙鲆群体杂交后代(♀)×中国的牙鲆抗鳃弧菌病群体与韩国的牙鲆群体杂交后代(♂)]。通过杂交不仅可以利用后代的杂种优势选育新品种, 还可以应用到在三倍体、四倍体、雌核发育及雄核发育等方面。吴清江等(1999)、李炎璐等(2012)通过鱼类的远缘杂交, 在三倍体、四倍体、雌核发育及雄核发育等方面取得了显著成果。

本研究在对魁蚶早期(幼虫期和稚贝期)生长性状的基础上, 进一步探究杂交组壳长和湿重在养成期的杂种优势。研究表明, 2 个杂交组合都表现出一定的杂种优势, 且魁蚶韩国群体(♀)×中国群体(♂)的杂交子代在壳长和湿重方面的杂种优势更加明显。研究结果为 2 个群体杂交选育提供了实验依据, 也为魁蚶种质的改良和新品种培育奠定了重要基础。

## 参 考 文 献

- Cai MY, Ke CH, You WW, *et al.* Cytological studies on the fertilization of the cross between *Haliotis diversicolor* ♀ and *H. discus discus* ♂. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, 46(2): 239–244 [蔡明夷, 柯才焕, 游伟伟, 等. 杂色鲍♀×盘鲍♂杂交受精的细胞学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(2): 239–244]
- Cai ZQ, Zheng YX, Ren LQ, *et al.* Growth and survival of the first hybrid generation of Chinese and Korean populations of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 81–86 [蔡忠强, 郑言鑫, 任利群, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中国群体与韩国群体杂交子一代的生长和存活比较. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 81–86]
- Chang YQ, Liu XL, Xiang JH, *et al.* The juvenile growth and survival of hybrid between Chinese population and Japanese population of *Chlamys farreri*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(5): 385–390 [常亚青, 刘小林, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的早期生长发育. 水产学报, 2002, 26(5): 385–390]
- Chang YQ, Liu XL, Xiang JH, *et al.* Hybridization effects of the different geographic population of *Chlamys farreri* III. The yearlong (1~2 years old) growth and development of Chinese population and Russian population and their reciprocal crosses. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 28 (2): 114–120 [常亚青, 刘小林, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果. III: 中国种群与俄罗斯种群及其杂种 1~2 龄的生长发育. 海洋学报, 2006, 28(2): 114–120]
- Fan ZT. *Breeding of aquatic animal*. Beijing: China Agriculture Press, 2005, 87–88 [范兆廷. 水产动物育种学. 北京: 中国农业出版社, 2005, 87–88]
- Kong LF, Teng SS, Li Q. Growth and survival of the first generation of hybrid between Chinese and Japanese populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Sciences*, 2013, 37(8): 78–84 [孔令锋, 滕爽爽, 李琪. 长牡蛎中国群体与日本群体杂交子一代的生长和存活比较. 海洋科学, 2013, 37(8): 78–84]
- Li YL, Chen C, Zhai JM, *et al.* Fish hybridization and its application in grouper. *Marine Fisheries*, 2012, 34(1) : 102–109 [李炎璐, 陈超, 翟介明, 等. 鱼类杂交育种技术及其在石斑鱼类中的应用. 海洋渔业, 2012, 34(1): 102–109]
- Liu SL, Yang AG. *Healthy culture techniques of main marine shellfish in China*. Beijing: Ocean Press, 2005, 176 [刘世禄, 杨爱国. 中国主要海产贝类健康养殖技术. 北京: 海洋出版社, 2005, 176]
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* The medium-term growth and development of hybrid between Chinese population and Japanese population of *Chlamys farreri*. *Journal of Fisheries of China*, 2003a, 27 (3): 193–199 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的中期生长发育. 水产学报, 2003a, 27(3): 193–199]
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* Studies on hybridization of the different geographic variety populations of *Chlamys farreri*. I. Hybridization between Chinese population and Russian population of *Chlamys farreri*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003b, 25(1): 93–99 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的初步研究. I. 中国种群与俄罗斯种群的杂交. 海洋学报, 2003b, 25(1): 93–99]
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* Studies on hybridization effects of the different geographic populations of *Chlamys farreri*. II. The medium-term growth and development of Chinese population and Russian population and their reciprocal crosses. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(2): 135–140 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的研究. II. 中国种群和俄罗斯种群及其杂种 F<sub>1</sub> 中期生长发育. 海洋学报, 2005, 27(2): 135–140]
- Rahman MA, Uehara T, Aslan LM. Comparative viability and growth of hybrids between two sympatric species of sea urchins (*Genus echinometra*) in Okinawa. *Aquaculture*, 2000, 183(1–2): 45–56
- Wang RC, Wang ZP. *Science of marine shellfish culture*. Qingdao: China Ocean University Press, 2008, 362 [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008, 362]
- Wu QJ, Gui JF. *Fish genetics and breeding engineering*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers,

- 1999, 73–94 [吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学技术出版社, 1999, 73–94]
- Wu ZQ. Genetics and Breeding in aquaculture (Third Edition). Xiamen: Xiamen University Press, 2000 [吴仲庆. 水产生物遗传育种学(第三版). 厦门: 厦门大学出版社, 2000]
- Yu T. Studies on the heterosis mechanism of scallop *Chlamys farreri* (♀) × *Patinopecten yesoensis* (♂). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011 [于涛. 栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)杂种优势遗传机理的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Zhang GF, Wang JH, Zhao HE, et al. The RAPD marker of self-bred and hybrid progeny Chinese and Japanese populations of *Haliotis discus hannai* Ino. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(5): 484–491 [张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F<sub>1</sub> 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 484–491]
- Zhang HB, Liu X, Zhang GF, et al. Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. *Aquaculture*, 2007, 272(S1): 88–93
- Zheng HP, Zhang GF, Liu X, et al. Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians*. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28 (3): 267–272 [郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活比较. 水产学报, 2004, 28(3): 267–272]

(编辑 陈严)

## Growth of a First-Generation Hybrid Between Chinese and Korean Populations of *Scapharca broughtonii* During the Adult Culture Stage

ZHENG Yanxin<sup>1</sup>, CAI Zhongqiang<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>, WU Biao<sup>2</sup>, ZHANG Shubao<sup>3</sup>,  
ZHAO Chunnuan<sup>1</sup>, YU Tao<sup>1①</sup>, LIN Jianguo<sup>1</sup>, SUN Chao<sup>4</sup>

(1. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai 265800;  
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Longkou Fisheries Technology Extension Station, Yantai 265800; 4. Yantai Fisheries Research Institute, Yantai 265800)

**Abstract** *Scapharca broughtonii* (Mollusca, Bivalve, Arcoida), one of the most important commercial marine bivalve species, is mainly distributed on the coasts of the Bohai Sea, and north of the Yellow Sea, China. With the deterioration of marine ecological environments resulting from the extended farming scale and frequency of human activities in coastal waters, and over-fishing, wild resources have decreased. Mass mortality has become a major constraint for the development of *S. broughtonii* culture. The hybridization of different populations has proven to be a good breeding method. Intraspecific hybridization was investigated using two stocks of *S. broughtonii*; the China population (C) and the Korea population (K). The shell length and wet weight were compared between two reciprocal hybrid crosses (C♀ × K♂, CK and K♀ × C♂, KC) and two parental groups (C♀ × C♂, CC and K♀ × K♂, KK) during the adult culture stage. The results showed that the shell length and wet weight of the KC group were significantly higher than those of the other three groups. The heterosis rates of the CK group for shell length was between -2.03% and 5.44%, and the KC group was between 4.40% and 14.74%. The heterosis rates of the CK group for wet weight was between 1.41% and 7.71%, and the KC group was between 5.32% and 23.71%. The heterosis rates of the KC group for shell length and wet weight was higher than those of CK group. The wet weight of the CK group was significantly higher than that of the CC and KK groups at 14 and 15 months, respectively. Additionally, the heterosis rate of the two reciprocal hybrid crosses for wet weight was positive and high. In summary, the heterosis rates of the KC group for shell length and wet weight were markedly higher than those of other three groups, thus, the KC hybrid group could be selected as an ideal breeding material.

**Key words** *Scapharca broughtonii*; Hybridization; Adult culture stage; Shell length; Wet weight; Heterosis

① Corresponding author: YU Tao, E-mail: cdyutao@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170407001

http://www.yykxjz.cn/

袁艳敏, 刘福利, 梁洲瑞, 汪文俊, 孙修涛, 王飞久. 海带 *hsp70* 基因的克隆、分析及转录水平定量研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 152–158

Yuan YM, Liu FL, Liang ZR, Wang WJ, Sun XT, Wang FJ. Cloning, bioinformatics and quantitative expression analysis of *hsp70* in *Saccharina japonica*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 152–158

# 海带 *hsp70* 基因的克隆、分析及转录水平定量研究



袁艳敏<sup>1,2</sup> 刘福利<sup>2,3①</sup> 梁洲瑞<sup>2</sup> 汪文俊<sup>2</sup> 孙修涛<sup>2</sup> 王飞久<sup>2</sup>

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

**摘要** 本研究以海带(*Saccharina japonica*) ‘海天 1 号’为材料, 通过 RACE-PCR 方法获得海带 *hsp70*(*Sjhsp70*)基因全长 cDNA 序列。序列分析表明, 全长 cDNA 长度为 3778 bp, 含有 1 个 2892 bp 的开放阅读框, 5'和 3'非编码区的长度分别为 101、785 bp。蛋白质氨基酸含量和理化性质分析显示, 该蛋白为稳定蛋白。应用 BLASTP 程序对不同物种 HSP70 蛋白比较分析表明, 海带与长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)的 HSP70 蛋白具有较高的同源性, 用 HSP70 蛋白构建的进化树显示, 海带与长囊水云聚为一类。二级结构预测该蛋白由 963 个氨基酸组成, 包含 35 个  $\alpha$  螺旋和 25 个  $\beta$  折叠。以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)HSP110 蛋白三维结构 3C7N 为模板, 在 I-TASSER 软件上预测海带 HSP70 蛋白的三维结构, 预测的蛋白结构与 3C7N 的 A 链在折叠和二级结构方面非常类似。对 *Sjhsp70* 基因在温度胁迫下表达变化分析表明, 高温对 *Sjhsp70* 的表达量具有显著影响, *Sjhsp70* 在 25℃、24 h 胁迫条件时, 表达量达到最大值。本研究为阐明海带 HSP70 蛋白特性及其应对环境胁迫的机理提供理论依据。

**关键词** 海带 ‘海天 1 号’; HSP70; RACE; 生物信息学分析; 荧光定量 PCR  
**中图分类号** Q75; S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0152-07

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是由暴露于应激条件下的细胞产生的, 结构上高度保守, 在原核和真核细胞中广泛存在的一类蛋白。HSPs 首次应用于描述果蝇(*Drosophila melanogaster*)的热休克反应, 从此, HSPs 开始受到广泛的关注和研究(Wang *et al*, 2004; 栗振义等, 2016)。HSP 在正常和应激情况下均发

挥重要的生理功能, 但在胁迫条件包括热激、物理、化学和生物等胁迫因子下表达量显著增加(齐妍等, 2013)。按照分子量的不同, HSPs 分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 以及小分子热休克蛋白(Waters *et al*, 1996)。其中, HSP70 是研究较多、较深入的蛋白, 在逆境环境下, 该蛋白具有分子伴侣的功能, 参与新生

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016PT03)、现代农业产业技术体系藻类体系离岸式养殖岗位专项(CARS-50)和青岛市民生科技计划项目(17-3-3-65-nsh)共同资助[This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2016PT03), China Agricultural Research System-Algae Offshore Aquaculture (CARS-50), and Qingdao City Science and Technology Project (17-3-3-65-nsh)]. 袁艳敏, E-mail: yuanym2991@163.com

① 通讯作者: 刘福利, 副研究员, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-07, 收修改稿日期: 2017-05-08

肽的成熟及蛋白质变性后的复性、降解, 维持细胞内环境的稳定, 进而对细胞具有保护作用(刘伟等, 2012)。近年来, 已从多种藻类中克隆获得了 *hsp70* 序列, 对多种藻类 *hsp70* 基因的结构和功能、调控机理等进行了研究, Muller 等(1992)在研究单细胞藻类茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) *hsp70* 基因的结构时发现, 其不同于高等植物 *hsp70* 基因的结构, 说明在不同的生物体中, *hsp70* 基因具有序列的多样性。

海带 (*Saccharina japonica*) 是一种冷温性海藻, 是海洋生态系统中的重要组成成分, 也是我国最早开展全人工养殖和育苗的经济海藻, 为我国水产养殖发挥重要贡献(王飞久等, 2008)。海带‘海天1号’是南方耐高温品系与北方高产品系经过杂交后, 再通过连续自交几代后, 选育获得的海带新品系, 其具有产量高、耐高温、成熟稍早等特点(姚海芹等, 2016)。本研究以海带‘海天1号’为材料, 通过 RACE 方法获得 *Sjhsp70* 全长 cDNA 序列, 根据序列信息研究其蛋白质结构和性质, 并通过荧光定量 PCR 分析温度对 *hsp70* 基因表达量的影响, 以期对海带耐高温的分子机制研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料处理

2015年11月12日, 海带‘海天1号’采自山东荣成青鱼滩养殖海域, 挑选大小均匀、健康无损伤的个体, 长度约为 5~6 cm。将取回的海带幼苗在温度为 13℃、光强为 30~50  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周

期为 12L : 12D 条件下, 培养 1 d, 培养液为含有  $\text{NaNO}_3$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液的灭菌海水, N 浓度为 3 mg/L, N : P = 10 : 1, 充气悬浮培养。在高温(25℃)分别处理 0、3、6、12、18、24、30、36 h, 以 0 为参考, 比较 *Sjhsp70* 基因在高温胁迫不同时间的表达情况。在不同温度(2℃, 6℃, 10℃, 14℃, 18℃, 22℃, 25℃)时, 处理 3 h, 以 10℃为参考, 比较 *Sjhsp70* 基因在不同温度的表达情况。

### 1.2 总 RNA 提取

采用 RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)进行海带总 RNA 的制备和提取, 方法参照试剂盒说明书。制备后的 RNA 经过琼脂糖(1.2%)凝胶电泳检测, 检查其完整性, 并在  $A_{260} : A_{280}$  条件下, 检测总 RNA 的纯度。

### 1.3 RACE 法克隆 *Sjhsp70* cDNA 全长序列

5'-RACE 和 3'-RACE 模板采用 Gene Racer™ Kit (Invitrogen)进行合成。根据本实验室转录组测序数据库中的海带 *hsp70* 基因序列, 采用 Primer Premier 6.0 软件分别设计 5'-RACE 引物 HSP70-R1、HSP70-R2 和 3'-RACE 引物 HSP70-F1、HSP70-F2(表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。所用的其他引物序列见表 1。根据 RACE 试剂盒说明, 分别使用 PCR 扩增得到 5'末端和 3'末端, 采用琼脂糖凝胶(1.5%)电泳对 PCR 产物进行分析。确定目的条带后切胶回收, 连接于 pUCm 载体, 进行转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆, 送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 根据测序序列拼接获得全长 cDNA。

表 1 引物名称及序列  
Tab. 1 Primer name and sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
5' GeneRacer outer primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
5' GeneRacer Inner primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
HSP70-R1	CGTGATCTTGGTGAAGGTCTGCTTGGGTT
HSP70-R2	CGTGTTTCGTACAATCTCCAACGGCTT
3' GeneRacer outer primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
3' GeneRacer Inner primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
HSP70-F1	CCCCTGAAGAAGACCCTGAGCATCACC
HSP70-F2	GGCGTTGTCGCCTTCGCCAAGAAA

### 1.4 生物信息分析

开放阅读框(ORF)识别: 利用 NCBI 中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找基因序列完整的 ORF。

蛋白质组分分析: 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线工具分析 HSP70 蛋白性质的基本参数。用 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线工具预测蛋白磷酸化位点。

多序列比对和进化树构建: 用 BLASTP 程序寻找

海带 *hsp70* 基因的同源序列,再用 CLC Genomics Workbench 8 软件对获得的同源序列进行多序列比对。根据多序列比对结果,用 MEGA5.2 软件中的 Neighbor-Joining 法进行进化树构建。

蛋白质二级结构预测:利用 CLC Genomics Workbench 8 软件进行蛋白质二级结构分析来预测其二级结构及序列中含有的蛋白激酶 C 磷酸化位点、N 端糖基化位点,并在二级结构图中标注。

蛋白三维结构的预测:目标蛋白三维结构基于同源建模的 I-TASSER 在线软件(<http://zhanglab.ccmb.m ed.umich.edu/I-TASSER/>)进行预测。

### 1.5 定量 PCR 分析

采用 qPCR 技术,分析 *Sjhs70* 在不同温度及不同高温诱导下 mRNA 的转录差异,选择  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -Tubulin)为内参基因,*Sjhs70* 与内参基因参照引物序列见表 2。荧光 qPCR 反应体系为 2 × SYBR Green Mix, 25  $\mu$ l; PCR 正向引物, 1  $\mu$ l; PCR 反向引物, 1  $\mu$ l; 模板 cDNA, 5  $\mu$ l; ddH<sub>2</sub>O, 18  $\mu$ l, 总反应体系为 50  $\mu$ l。针对每个模板的每对引物设置 3 个重复以及 1 个阴性对照。荧光定量 PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10 min 后, 按照 95℃, 30 s; 53℃, 30 s; 72℃, 1 min 的反应程序进行 40 个循环。融解曲线反应程序: 由 60℃ 递进升温到 95℃ 步进 0.5℃, 恒温 10 s。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *Sjhs70* 的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Sjhs70* 全长 cDNA 克隆及分析

利用 RNeasy Plant Mini Kit 提取海带总 RNA, A<sub>260</sub>:A<sub>280</sub> 比值为 1.92, 表明所制备的海带 RNA 纯度较高。琼脂糖凝胶电泳检测 28 s 和 18 s 2 条主要条带清晰明显, 表明获得的海带总 RNA 完整性较好(图 1A)。用特异性引物与 Gene Racer 引物分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测表明, 5'-RACE PCR 特异性条带大小为 250 bp 左右(图 1B), 3'-RACE PCR 特异性条带大小为 2000 bp 左右(图 1C),

分别测序并拼接后获得 *Sjhs70* 全长 cDNA 序列, *Sjhs70* 含有一个 2892 bp 长的开放阅读框, 5'和 3'非编码区的长度分别为 101、785 bp, Poly A 尾巴信号肽区域位于 3765~3770 bp 处。将 *Sjhs70* 序列提交至 NCBI 数据库, 序列号为 KY986415。

### 2.2 SjHSP70 理化性质分析

使用 ProtParam 对 *Sjhs70* 编码的 SjHSP70 蛋白进行分析, SjHSP70 含有 963 个氨基酸, 其分子量为 103290.11 Da, 理论等电点为 4.83。该蛋白含有 163 个带负电荷的氨基酸残基和 118 个带正电荷的氨基酸残基, 它的 N 端以甲硫氨酸起始。该蛋白脂脂族指数为 79.00, 疏水性指数为 -0.369, 不稳定性指数为 33.12, 可归类为稳定性蛋白。

### 2.3 SjHSP70 序列分析

对 SjHSP70 的氨基酸序列进行 BLAST 分析。结果显示, SjHSP70 与其他物种的 HSP 蛋白具有较高的同源性。其中, 与长囊水云的 HSP70 蛋白的相似度达到了 76.69%, 与单胞藻(*Aureococcus anophagefferens*)的 HSP70 蛋白相似度为 44%, 说明本研究获得的基因序列确为热休克蛋白家族的编码基因。对 SjHSP70 序列进一步分析发现, SjHSP70 包括 N 末端核酸结合区、底物结合区和 C 末端, N 末端核酸结合区位于第 31~418 个氨基酸之间, 底物结合区位于第 426~598 个氨基酸之间。HSP70 蛋白 N 末端氨基酸序列高度保守, 具有结合并水解 ATP 的活性中心。应用 SignalP 4.1 软件分析发现, SjHSP70 的 N 端具有一段 28 个氨基酸的信号肽, 且 SjHSP70 的 C 末端氨基酸序列为 EDEL, 据此判断 SjHSP70 可能位于内质网内。

本研究得到的 SjHSP70 与之前报道的海带 HSP70 (Fu *et al*, 2009)相似度约为 30%, 其中, 2 个蛋白的前 600 个氨基酸序列相似度约为 40%, 说明海带中 HSP70 的 N 端的保守性更强。为了比较 SjHSP70 与其他在大型海藻中报道的 HSP70, 从 NCBI 数据库中下载了裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)、坛紫菜 (*Porphyra haihanensis*)、浒苔 (*Enteromorpha sp.*) 等 12 种海藻的

表 2 *Sjhs70* 定量 PCR 引物与内参基因引物序列  
Tab. 2 *Sjhs70* quantitative PCR primer and reference gene primer sequences

基因 ID Gene ID	引物 ID Primer ID	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物长度 Length of product (bp)
<i>Sjhs70</i>	sjHSP70-1-f50	AGACAAACAAGAGCGAACCAA	100
	sjHSP70-1-r149	ATCCTGCCAGAAGCCCACC	
$\alpha$ -Tubulin	TUA-F	CACCACTACCTGCCACCACA	119
	TUA-R	CAGACCGCAACATTTCAACC	

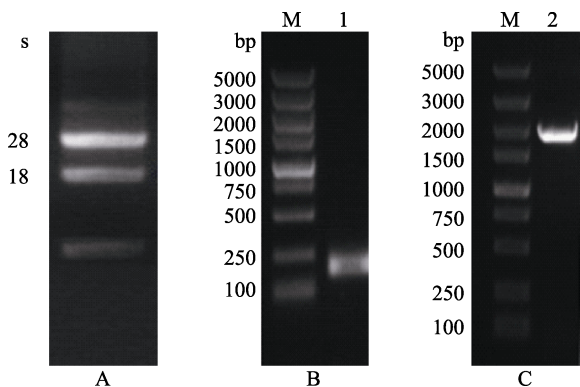


图 1 *Sjhsp70* 总 RNA 和 RACE 电泳

Fig.1 Total RNA and RACE electrophoresis patterns

A: 海带总 RNA 电泳; B: 5'-RACE PCR 电泳;  
 C: 3'-RACE PCR 电泳; M: DNA 分子量标准; 泳道 1: 5'-RACE  
 PCR 电泳结果; 泳道 2: 3'-RACE PCR 电泳结果  
 A: Total RNA electrophoresis patterns; B: 5'-RACE PCR  
 electrophoresis patterns; C: 3'-RACE PCR electrophoresis  
 patterns; Lane M: DL5000 Marker; Lane 1: *hsp70* 5'-RACE  
 PCR results; Lane 2: *hsp70* 3'-RACE PCR results

HSP70 序列(图 2), 对其进行多序列比对分析发现,  
*SjHSP70* 与长囊水云的 HSP70 蛋白的相似度达到了  
 76.69%, 与其他大型海藻的 HSP70 相似度在 30%~40%  
 之间, 进化树显示, *SjHSP70* 与长囊水云 HSP70 聚为  
 单独的一枝, 与其他海藻中的 HSP70 的距离较远。

**2.4 SjHSP70 蛋白结构分析**

应用 CLC Genomics Workbench 软件进行 *SjHSP70*  
 蛋白的二级结构预测, 该蛋白由 963 个氨基酸组成,  
 包含 35 个  $\alpha$  螺旋和 25 个  $\beta$  折叠。氨基酸序列中的蛋白  
 激酶 C 磷酸化位点和糖基化位点见图 3。从图 3 可以看  
 出, 应用 NetPhos 工具预测蛋白质中丝氨酸、苏氨

酸和络氨酸的磷酸化位点, 在 HSP70 蛋白质中共预  
 测出 23 个丝氨酸磷酸化位点, 12 个苏氨酸磷酸化位  
 点和 8 个络氨酸磷酸化位点。

海带 *SjHSP70* 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)  
*HSP110* 分别有 963 和 650 个氨基酸, 酿酒酵母 HSP110  
 蛋白在 PDB 数据库里的 ID 为 3C7N。海带 *SjHSP70*  
 的三维结构(图 4)是以 3C7N 为模板在 I-TASSER 软件  
 上预测的, 该蛋白从红色的碳端到蓝色的氮端, 蛋白  
 结构 C 值为-2.28, 表示其与 3C7N 的 A 链在折叠和  
 二级结构方面非常类似。目标蛋白 *SjHSP70* 和模板蛋  
 白酿酒酵母 HSP110 结构相似性的 TM 值和 RMSD 分  
 别为 0.662 和 0.96Å。

**2.5 温度诱导下 *Sjhsp70* 基因的转录分析**

用荧光定量 PCR 对 *Sjhsp70* 基因受高温(25°C)胁迫  
 在不同时间和不同温度时, 处理 3 h 的转录水平进行  
 分析, 结果见图 5 和图 6。从图 5 可以看出, 高温(25°C)  
 胁迫时, 24 h 内随着胁迫时间的延长, *Sjhsp70* 的表  
 达量逐渐提高, 在 24 h 时达到表达量的最大值, 12 h  
 前增加速度较快, 12~24 h 间增加速度缓慢, 24 h 后  
 表达量逐渐降低, 原因可能是 *Sjhsp70* 的表达具有时  
 效性, 在温度胁迫短时间内大量表达, 长时间胁迫会  
 超出海带自身的调控能力, 从而导致表达量降低。

从图 6 可以看出, 不同温度处理海带幼孢子体,  
*Sjhsp70* 转录受到明显的影响, 以海带生长的适宜温  
 度 10°C 为参考, 温度小于 10°C 和大于 10°C 都会使得  
*Sjhsp70* 转录上调, 小于 10°C 时, 上调不显著, 大于  
 10°C 时, 温度越高表达量越高, 25°C 时表达量最高,  
 高温胁迫比低温胁迫对 *Sjhsp70* 表达的影响更显著。

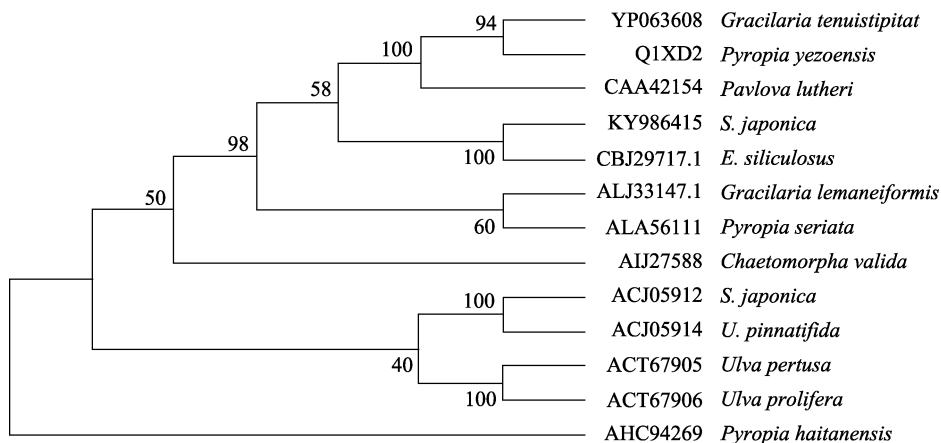


图 2 基于 HSP70 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed with HSP70 sequences from different species

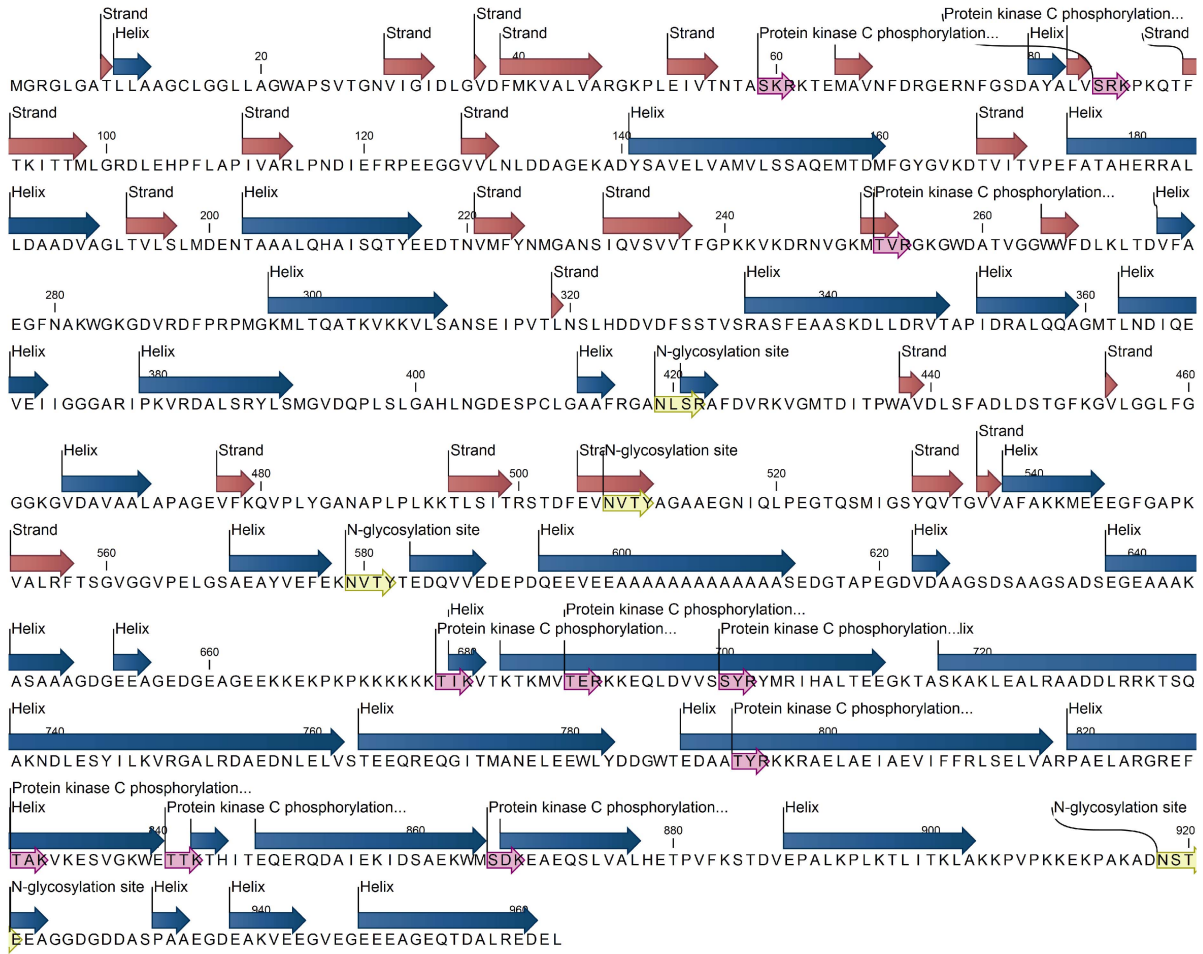


图 3 SjHSP70 蛋白质二级结构预测及功能位点注释

Fig.3 The predicted secondary structure and annotated function sites of the SjHSP70

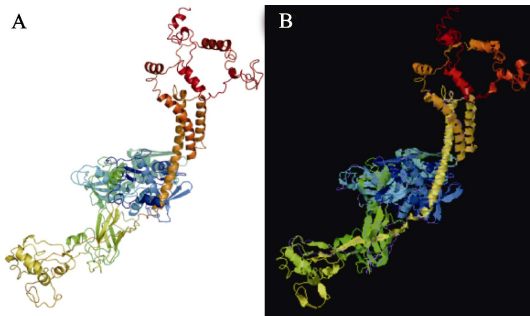


图 4 SjHSP70 蛋白的预测三维结构图及其与模板碳主链的重叠

Fig. 4 Predicted 3D structure model and the main chain interface structure of SjHSP70

A: SjHSP70 的三维结构; B: SjHSP70 结构和酿酒酵母 HSP110 蛋白碳主链的重叠。彩色结构的是海带 HSP70; 紫色线是酿酒酵母 HSP110 碳主链

A: Predicted 3D structure model of SjHSP70;

B: Superimposed prediction model and native cartoon structures of SjHSP70 and HSP110 of *S. cerevisiae*. Rainbow structure was represented of the SjHSP70. Purple line is displayed using the alpha carbon backbone trace of *S. cerevisiae* HSP110

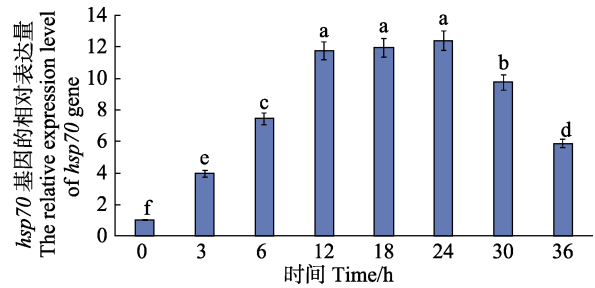


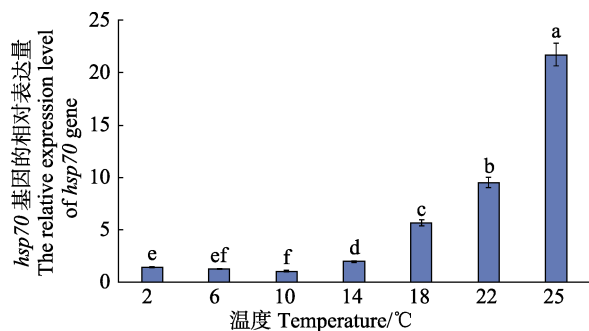
图 5 *Sjhs70* 在高温(25°C)诱导下的转录水平变化  
Fig.5 Variation of transcriptions of *Sjhs70* under high temperature of 25°C

注: 不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different letters represent significant difference ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

大量研究表明, *hsp70* 基因在调控植物抗逆过程中发挥重要作用, 植物在受到不利条件, 如高温逆境胁迫时, 会上调 *hsp70* 的表达量, 增强对高温胁迫的抵抗力, 其机制可能是 HSP70 蛋白可以参与新生蛋

图 6 *Sjhsp70* 在不同温度下的转录水平Fig.6 Transcriptions of *Sjhsp70* at different temperatures

白折叠、稳定蛋白正常构象以及协助变性蛋白降解等 (Wang *et al.*, 2004; 王明强等, 2015)。Fu 等(2009)研究表明, 海带中 *hsp70* 基因表达受温度调控。本实验室在之前的海带转录谱研究发现, 多个 *hsp70* 基因在高温胁迫下表达上调(Liu *et al.*, 2014)。本研究克隆了其中的 1 个 *Sjhsp70* 基因, 该基因编码的 SjhSP70 蛋白含有 963 个氨基酸。与之前报道的海带中 HSP70 蛋白(Fu *et al.*, 2009)相比, 多出 306 个氨基酸。二者都具有 HSP70 蛋白特有的核酸结合区、铰链区、底物结合区以及 C 末端区, 其中, 在 N 端尤其是 ATP 结合位点区, 二者相似度高, 在铰链区、底物结合区和 C 末端, 二者的相似度较低。本研究获得 SjhSP70 初步判定位于内质网内, 而之前报道的海带 HSP70 (Fu *et al.*, 2009)是胞质蛋白, 二者可能具有不同的生理功能, 作用的底物可能不同, 故二者底物结合区的相似性较低。

根据 HSP70 的表达类型, 可分为组成型 HSP70 和诱导型 HSP70, 前者在正常条件下就有本底表达, 以维持细胞正常生命活动的需要, 而后者在受环境因素胁迫时诱导表达(Swindell *et al.*, 2007)。本研究发现, *Sjhsp70* 基因在正常生长条件下有微量表达, 受到高温和低温诱导时, 都会表达上调, 尤其是受到高温胁迫时, 表达量会大幅增加, 25°C 时的表达量是 10°C 的 21 倍之多。*Sjhsp70* 在受到高温胁迫(25°C)时, 24 h 后表达量达到顶峰, 超过 24 h 后, 表达量又开始降低。之前报道青岛养殖的海带受到热激处理时, 其 *hsp70* 在 25°C 处理 7 h 后, 表达量即可达到最大值(Fu *et al.*, 2009)。二者差异的原因, 可能是‘海天 1 号’的高温耐受性比青岛地区养殖海带的高温耐受性强, 可以在高温胁迫下, 持续高表达热休克蛋白, 以提高自身的耐受性。

本研究克隆获得了 1 个海带 *hsp70* 基因, 定量了该基因在海带高温胁迫时的表达特征, 并探讨了其对调控海带高温耐受性的作用。下一步工作将继续研究 *Sjhsp70* 在具有不同高温耐受性海带材料中的序列多

样性, 同时, 分析序列多样性与高温耐受性之间的相关性, 相关结果将为海带耐高温机制的研究提供重要的理论依据, 也为海带耐高温新品种的培育打下基础。

## 参 考 文 献

- Fu WD, Yao JT, Wang XL, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from *Laminaria japonica* (Laminariaceae, Phaeophyta). *Marine Biotechnology*, 2009, 11 (6): 738–747
- Li ZY, Long RC, Zhang TJ, *et al.* Research progress on plant heat shock protein. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32 (2): 7–13 [栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 等. 植物热激蛋白研究进展. 生物技术通报, 2016, 32 (2): 7–13]
- Liu FL, Wang WJ, Sun XT, *et al.* RNA-Seq revealed complex response to heat stress on transcriptomic level in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(3): 1585–1596
- Liu W, Yang R, Xu LN, *et al.* Cloning and expression of *Hsp70* for *Porphyra haitanensis*. *Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2012, 25(2): 17–25 [刘伟, 杨锐, 徐丽宁, 等. 坛紫菜 *Hsp70* 基因克隆与表达. 宁波大学学报(理工版), 2012, 25 (2): 17–25]
- Muller FW, Igloi GL, Beck CF. Structure of a gene encoding heat-shock protein Hsp70 from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 1992, 111 (2): 165–173
- Qi Y, Xu ZS, Li PS, *et al.* Research progress on molecular mechanism and application of Hsp70 in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 (3): 507–511 [齐妍, 徐兆师, 李盼松, 等. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14 (3): 507–511]
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 2007, 8 (1): 125
- Wang FJ, Sun XT, Gao CR. Cultivation of *Saccharina japonica* cultivars and non-polluted culture: One. *Scientific Fish Farming*, 2008, 85 (7): 14–16 [王飞久, 孙修涛, 高淳仁. 海带苗种培育及无公害养殖技术(一). 科学养鱼, 2008, 85 (7): 14–16]
- Wang MQ, Zhang DY. Research advance of heat shock protein 70 gene family and its biological functions in plant. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34 (2): 421–428 [王明强, 张道远. 植物热激蛋白 70 基因家族及其生物学功能研究进展. 基因组学与应用生物学, 2015, 34 (2): 421–428]
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(5): 244–252



Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47 (3): 325–338

Yao HQ, Liang ZR, Liu FL, *et al.* Preliminary studies on the photosynthetic and respiration rate of young sporophyte of a

new *Saccharina* variety “Haitian No. 1” using liquid-phase oxygen measurement system. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37 (1): 140–147 [姚海芹, 梁洲瑞, 刘福利, 等. 利用液相氧电极技术研究“海天 1 号” 海带幼孢子体光合及呼吸速率. *渔业科学进展*, 2016, 37 (1): 140–147]

(编辑 陈严)

## Cloning, Bioinformatics and Quantitative Expression Analysis of *hsp70* in *Saccharina japonica*

YUAN Yanmin<sup>1,2</sup>, LIU Fuli<sup>2,3①</sup>, LIANG Zhouhui<sup>2</sup>, WANG Wenjun<sup>2</sup>, SUN Xiutao<sup>2</sup>, WANG Feijiu<sup>2</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 and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** HSP70s are heat shock proteins that exist widely in prokaryotes and eukaryotes, and play important roles in biological resistance. The full cDNA sequence of a *hsp70* gene in *Saccharina japonica* (*Sjhsp70*) of 3778 bp was obtained by RACE technology. *Sjhsp70* consisted of an open reading frame (ORF) of 2892 bp, a 5′ untranslated region (UTR) of 101 bp, and a 3′ UTR of 785 bp. Analysis of amino acid content and physicochemical properties showed that SjhSP70 is a stable protein. Comparison between the amino acid sequences of SjhSP70 and the well-characterized orthologous HSP70 proteins from various species indicated that SjhSP70 shares the highest similarity with the orthologous protein from *Ectocarpus siliculosus*. The phylogenetic tree of the examined proteins indicated that SjhSP70 formed a group with a HSP70 from *E. siliculosus*. Secondary structure analysis of SjhSP70 showed that it is composed of 35  $\alpha$ -helices and 25  $\beta$ -strands. Three-dimensional homology structure modeling of SjhSP70 was predicted by the I-TASSER server according to the 3C7N template. Overall, the folding and secondary structures of SjhSP70 were highly similar to those of 3C7N. To study the correlation between SjhSP70 and the resistance to high-temperature stress in *S. japonica*, real-time variation in the expression of *Sjhsp70* under different temperatures and different stress times was determined. The results showed that high temperature had a significant effect on the expression of *Sjhsp70*. The expression of *Sjhsp70* continued to increase with increase in temperature, with the maximum *Sjhsp70* expression at 25°C after 24 h of high-temperature stress. This result indicates that *Sjhsp70* is probably related to high-temperature resistance in *S. japonica*. This study provides a foundation for the characterization of SjhSP70 and for the study of SjhSP70 function in the high-temperature stress response in *S. japonica*.

**Key words** *Saccharina japonica* ‘Haitian No.1’; HSP70; RACE; Bioinformatics analysis; Quantitative real-time PCR

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170430001

http://www.yykxjz.cn/

韩婷婷, 齐占会, 黄洪辉, 梁庆洋. 3种氮源加富对半叶马尾藻幼苗生长和生化组成的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 159-166

Han TT, Qi ZH, Huang HH, Liang QY. Effects of enrichment with three nitrogen sources on growth and biochemical composition of *Sargassum hemiphyllum* seedlings. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 159-166

## 3 种氮源加富对半叶马尾藻幼苗生长 和生化组成的影响\*



韩婷婷 齐占会 黄洪辉<sup>①</sup> 梁庆洋

(农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广东省渔业生态环境重点实验室  
中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

**摘要** 为了探讨硝氮( $\text{NO}_3^-$ -N)、氨氮( $\text{NH}_4^+$ -N)和尿素氮(Urea) 3种氮(N)源对半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)幼苗生理特性的影响,在实验室条件下,把幼苗分别置于不同N源浓度中培养24 d,而后测定藻体的生长和生化组成含量。结果显示,不同N源和N浓度对幼苗的生长和部分生化组成有显著影响。3种N源加富均能促进幼苗的生长和组织N的增加,相对生长速率随着N浓度的升高而增加,在浓度为25~150  $\mu\text{mol/L}$ 组中,幼苗的组织N增加量接近或超过每天以最大速率生长的N需求(0.032%/d);在浓度为50  $\mu\text{mol/L}$ 时,相对生长速率达到最大值,Urea组的最大相对生长速率显著低于 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NH}_4^+$ -N组;在浓度为10、25  $\mu\text{mol/L}$ 时, $\text{NH}_4^+$ -N组幼苗的相对生长率显著高于相同浓度下的 $\text{NO}_3^-$ -N组,而在浓度为50~150  $\mu\text{mol/L}$ 时则相反。除了最高浓度组(150  $\mu\text{mol/L}$ ),随着N浓度的升高,幼苗光合色素、可溶性蛋白和组织N含量逐渐增加,而可溶性糖含量逐渐降低;在相同N浓度下, $\text{NO}_3^-$ -N加富幼苗的可溶性糖、叶绿素a和叶绿素c含量最高, $\text{NH}_4^+$ -N加富时,可溶性蛋白和组织N含量最高,而Urea加富下墨角藻黄素含量最高。当 $\text{NH}_4^+$ -N浓度增加至150  $\mu\text{mol/L}$ 时,幼苗的生长和可溶性蛋白含量下降幅度最大。研究表明,将培养水体中 $\text{NO}_3^-$ -N加富至50~150  $\mu\text{mol/L}$ 或 $\text{NH}_4^+$ -N加富至25~100  $\mu\text{mol/L}$ 时,可有效促进半叶马尾藻幼苗的生长、光合作用和物质积累,为室内幼苗顺利度夏培育提供保障。

**关键词** 半叶马尾藻; N源; 加富; 生长; 生化组成

**中图分类号** S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0159-08

近年来,随着环境污染以及人地关系紧张等现象的不断出现,近海岩礁岸线的生态环境遭到极大的破坏,导致岩相潮间带马尾藻(*Sargassum* sp.)资源严重衰竭(Yu *et al.*, 2012),这将直接影响马尾藻场在生境

营造、资源养护、饵料形成、水质净化和碳汇功能等方面的重要作用。为了防止潮间带‘荒漠化’,恢复海区生物多样性和海洋生态服务功能,人工重建马尾藻场已成为国家和社会共同关注的问题。目前,人工

\* 广东省自然科学基金(2014A030310331)和国家自然科学基金(31602183)共同资助[This work was supported by Guangdong Natural Science Foundation (2014A030310331), and National Natural Science Foundation of China (31602183)].  
韩婷婷, E-mail: hantingting99@sina.com.

<sup>①</sup> 通讯作者: 黄洪辉, 研究员, E-mail: huanghh@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-30, 收修改稿日期: 2017-05-30

育苗增移植是重建马尾藻场的真正有效方式(Yu *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2014), 而马尾藻幼苗移植海区的时间选择至关重要。以广东大亚湾为例, 马尾藻的成熟繁殖季节在 4、5 月, 当人工繁育的马尾藻幼苗移至潮间带培育时, 6~10 月的高温季节不利于幼苗的存活和生长, 再加上无脊椎动物附着和杂藻丛生, 致使幼苗脱落死亡严重, 限制了其规模化增殖。而室内温度相对较低, 培育条件易于控制, 将马尾藻幼苗的室内培育期延长至 11 月后再移植海区, 可避免夏季海区高温、敌害生物等不利环境。因此, 马尾藻幼苗在室内能否顺利度夏将直接关系到马尾藻场重建成败的一个重要环节。

海藻生长需要大量的营养物质和能量进行组织构建, 尤其是氮(N)营养盐。N 是藻细胞蛋白质、磷脂和叶绿素等的基本元素, 也是藻体组织和器官的重要组分, N 缺乏可严重抑制藻细胞的正常生长(Dawes *et al.*, 1990)。许多学者对马尾藻吸收水体营养盐、修复海区富营养化已展开了研究(Alquezar *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2004; 姜宏波等, 2007; 徐智广等, 2013), 而关于 N 营养盐对马尾藻幼苗培育阶段生理特性的影响研究较少。

本研究以半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)为研究对象, 其隶属于褐藻门(Phaeophyta), 马尾藻科(Sargassaceae), 马尾藻属(*Sargassum*), 是中国东海和南海沿岸常见种和优势种。同时, 该藻藻体较大, 生长较快, 是进行人工海藻场重建的优良物种。为此, 通过室内模拟不同 N 营养条件研究半叶马尾藻幼苗的相对生长速率、藻体内可溶性蛋白质、可溶性糖、光合色素及组织 N 含量等生理生化指标的变化, 探索适合半叶马尾藻幼苗生长的营养环境, 以期开展马尾藻场重建工作提供理论基础和技术指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2014 年 4 月, 从广东深圳市南澳镇杨梅坑海域采集具有受精卵挂托的半叶马尾藻, 并迅速运至中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地育苗车间。选择健康完整的种藻, 除去藻体表面附着物, 经消毒海水冲洗后放入水槽(60 cm × 50 cm × 40 cm)中充气、培养, 翻动种藻使受精卵脱落, 采用孔径为 200 目的筛绢过滤收集受精卵, 播种于底部铺有水泥砖块的水体中。水体保持静止 24 h, 以便受精卵附着在砖块表面。育苗用海水为经暗处理 7 d 的砂滤海水, 每 7 d 更换 1 次。培养 120 d 后, 采集附着基上健康

完整的幼苗, 平均株高为 2.0 cm 左右, 在经高压灭菌的 N 限制海水[预先用石莼(*Ulva lactuca*)吸收 4 d, N 浓度 < 1 μmol/L, 其余营养组分参照 f/2 培养液添加]中培养 14 d 后用于实验。暂养条件: 温度为 23℃, 光强为 80 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s), 光照周期 L : D=12 h : 12 h, 充气泵 24 h 充空气。

### 1.2 不同氮营养条件的设置

实验材料在装有 1 L 高压灭菌 N 限制海水的球形培养瓶中培养, 24 h 充气, 可在培养瓶内形成水流使藻体转动。培养过程中, 硝氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)、氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)和尿素氮(Urea)分别作为唯一 N 源, 设置 5 个 N 浓度梯度, 分别为 10、25、50、100、150 μmol/L, N 限制海水(N 浓度 < 1 μmol/L)为对照组, 各设 3 个重复。实验在 GXZ 智能型光照培养箱(宁波江南制造厂)中进行, 藻体培养密度为 2 g/L, 培养条件与暂养期间一致, 每 2 d 更换 1 次培养液, 共培养 24 d。

### 1.3 相对生长速率的测定

实验前和实验后, 用滤纸吸干藻体表面的多余水分, 称量藻体鲜重, 计算相对生长速率(μ), 利用公式求得:

$$\mu (\%/d) = 100 \times \ln(W_t/W_0)/t$$

式中,  $W_0$  为实验初始藻体鲜重(g),  $W_t$  为实验结束时藻体鲜重(g),  $t$  为实验培养时间(d)。

### 1.4 光合色素含量的测定

参照 Seely 等(1972)的方法, 取 1.0 g 藻体, 用去离子水快速冲洗藻体, 吸干表面多余水分并剪碎, 加入 4 ml 的二甲基亚砜(DMSO)第 1 次萃取, 提取 5 min 后, 收集黄褐色的提取液(X<sub>1</sub>); 接着对藻体进行第 2 次萃取, 加入 4 ml 的丙酮反应 5 min 后, 收集深绿色的提取液(X<sub>2</sub>); 取 3 ml 丙酮提取液, 加入 1 ml 的正己烷和 0.75 ml 蒸馏水, 萃取分离, 正己烷相(X<sub>2A</sub>)用 0.5 ml 的 100%甲醇和 0.13 ml 蒸馏水连续提取 2 次, 并收集水性丙酮-甲醇相(X<sub>2B</sub>); DMSO 相(X<sub>1</sub>), DMSO : 蒸馏水按照 4 : 1 比例稀释, 测定其在波长为 665、631、582、480 nm 处的吸光值, 正己烷相(X<sub>2A</sub>), 正己烷 : 丙酮按照 1 : 10 比例稀释, 测定其在波长为 480、661 nm 处的吸光值, 水性丙酮-甲醇相(X<sub>2B</sub>), 丙酮 : 甲醇 : 蒸馏水按照 3 : 1 : 1 比例稀释, 测定其在波长为 664、631、581、479 nm 处的吸光值, 根据以下公式计算叶绿素 a(Chl-a)、叶绿素 c(Chl-c)和墨角藻黄素(Fx)含量:

$$\text{Chl-a}(\text{mg/g}) = (A_{665}/72.8) \times V_1 / (I/W) + 4/3 \times$$

$$\begin{aligned} & (A_{661}/83.3) \times V_2/(I/W) + 4/3 \times (A_{664}/73.6) \times V_3/(I/W), \\ \text{Chl-c}(\text{mg/g}) &= (A_{631} + A_{582} - 0.297A_{665})/61.8 \times V_1/(I/W) + \\ & 4/3 \times (A_{631} + A_{581} - 0.300A_{664})/62.2 \times V_3/(I/W), \\ \text{Fx}(\text{mg/g}) &= [A_{480} - 0.722(A_{631} + A_{582} - 0.297A_{665}) - \\ & 0.049A_{665}]/130/(I/W) + 4/3 \times [A_{470} - 1.239(A_{631} + \\ & A_{581} - 0.300A_{664}) - 0.0275A_{664}]/141 \times V_3/(I/W) \end{aligned}$$

式中,  $A$  为吸光值,  $V_1$  为提取液  $X_1$  的体积(4 ml+1 ml=5 ml),  $V_2$  为提取液  $X_2A$  的体积(1 ml+10 ml=11 ml),  $V_3$  为提取液  $X_2B$  的体积(3 ml+1 ml+1 ml=5 ml),  $I$  为比色皿的光径(1 cm),  $W$  为藻体鲜重(g)。

### 1.5 可溶性蛋白(SP)含量测定

可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 染料结合法测定(Kochert, 1978)。取 0.2 g 藻体用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH = 6.8)研磨, 定容, 离心, 取 0.5 ml 上清液, 加 5 ml 考马斯亮蓝 G-250, 混匀后 595 nm 测定其吸光度。其计算公式为:

$$\text{SP}(\text{mg/g}) = C \times V_i / (V_l \times W \times 1000)$$

式中,  $C$  为查得的牛血清标准曲线值( $\mu\text{g}$ );  $V_i$  为提取液总体积(ml),  $W$  为样品鲜重(g),  $V_l$  为测定时的加样量(ml)。

### 1.6 可溶性糖(SS)含量测定

可溶性糖含量采用苯酚-硫酸法测定(Kochert, 1978)。称取 0.2 g 的藻体, 蒸馏水研磨后定容至 25 ml, 70℃ 水浴提取 30 min。待提取液冷却后过滤, 取 2 ml 待测液加入 6% 苯酚试剂 1 ml 和浓硫酸 5 ml, 冷却后 485 nm 波长测定吸光度, 对照标准曲线计算可溶性糖含量。标准曲线以葡萄糖为标准绘制。其计算公式为:

$$\text{SS}(\text{mg/g}) = C \times V_l / (W \times V_i)$$

式中,  $C$  为葡萄糖标准曲线中查得的值(mg),  $V$  为样品提取液体积(ml),  $V_l$  为显色时取样品液量(ml),  $W$  为样品湿重(g)。

### 1.7 组织氮含量的测定

参照 Abreu 等(2011)的方法, 将剩余的藻体于 60℃ 下烘干 48 h 后, 称量其干重, 烘干的样品用研磨器磨成粉末状, 过 80 目的样品筛后, 利用 VARIO EL III 元素分析仪测量组织 N 含量(%)。

### 1.8 数据处理与分析

相对生长速率与组织 N 含量的关系可由 Droop (1983) 方程拟合, 得出公式:

$$\begin{aligned} \mu &= \mu_{\max} (1 - N_Q/N) \\ N_{\text{req}} &= \mu_{\max} \times N_C \end{aligned}$$

式中,  $\mu_{\max}$ (%/d) 为最大相对生长率,  $N_Q$ (%) 为藻

类维持生存的最低组织 N 含量,  $N(\%)$  为藻类实际组织 N 含量,  $N_C(\%)$  为藻类维持最大生长速率所必需 N 的临界值,  $N_{\text{req}}(\%/d)$  为维持藻类以最大速率生长的 N 需求(Pedersen *et al.*, 1997)。

采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析, 所有测定结果均表示为平均值  $\pm$  标准差(Mean $\pm$ SD)( $n \geq 3$ ), 采用双因子方差分析(Two-way ANOVA)和单因子方差分析(One-way ANOVA)检验差异的显著水平, 设显著水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 生长

双因子方差分析表明, 半叶马尾藻幼苗的相对生长速率受培养水体中 N 源、N 浓度以及二者的交互作用影响显著( $P < 0.05$ )。在 3 种 N 源加富培养下, 幼苗相对生长速率均随着 N 浓度的增加呈先上升后下降的变化趋势, 在浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大值, Urea 组的最大相对生长速率显著低于  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 组( $P < 0.05$ )。在浓度为 10、25  $\mu\text{mol/L}$  时,  $\text{NH}_4^+$ -N 组幼苗的相对生长率显著高于相同浓度下的  $\text{NO}_3^-$ -N 组( $P < 0.05$ ), 而在浓度为 50~150  $\mu\text{mol/L}$  时则相反。在浓度为 150  $\mu\text{mol/L}$  时,  $\text{NH}_4^+$ -N 组中幼苗相对生长速率降低至对照组水平(图 1)。

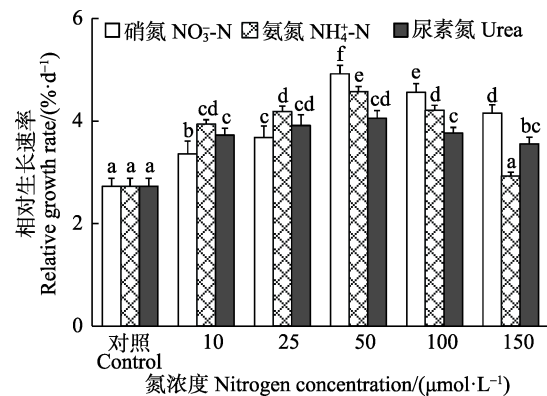


图 1 不同氮条件下半叶马尾藻幼苗的相对生长速率  
Fig.1 Relative growth rate of *S. hemiphyllum* seedling cultured under different nitrogen conditions

注: 不同的小写字母表示在  $P < 0.05$  水平具有显著性差异, 下同

Note: Lowercase letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  among the treatments, the same as below

### 2.2 光合色素含量

双因子方差分析表明, 半叶马尾藻幼苗的 3 种光合色素含量均受培养水体中 N 源和 N 浓度的影响显

著( $P<0.05$ ),而N源和N浓度无显著交互作用( $P>0.05$ )。在相同N源下,藻体各光合色素基本上随着N浓度的升高而增大,并逐渐趋于稳定,在浓度为100、150  $\mu\text{mol/L}$ 组之间无显著差异( $P>0.05$ )。在10~50  $\mu\text{mol/L}$ 内,相同浓度下3种N源间的光合色素无显著差异( $P>0.05$ ),而在浓度为100、150  $\mu\text{mol/L}$ 时, $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NH}_4^+$ -N组的幼苗Chl-*a*含量显著高于Urea组( $P<0.05$ ),而对于Fx含量来说,则是Urea加富组显著高于 $\text{NH}_4^+$ -N和 $\text{NO}_3^-$ -N加富组( $P<0.05$ )(图2)。

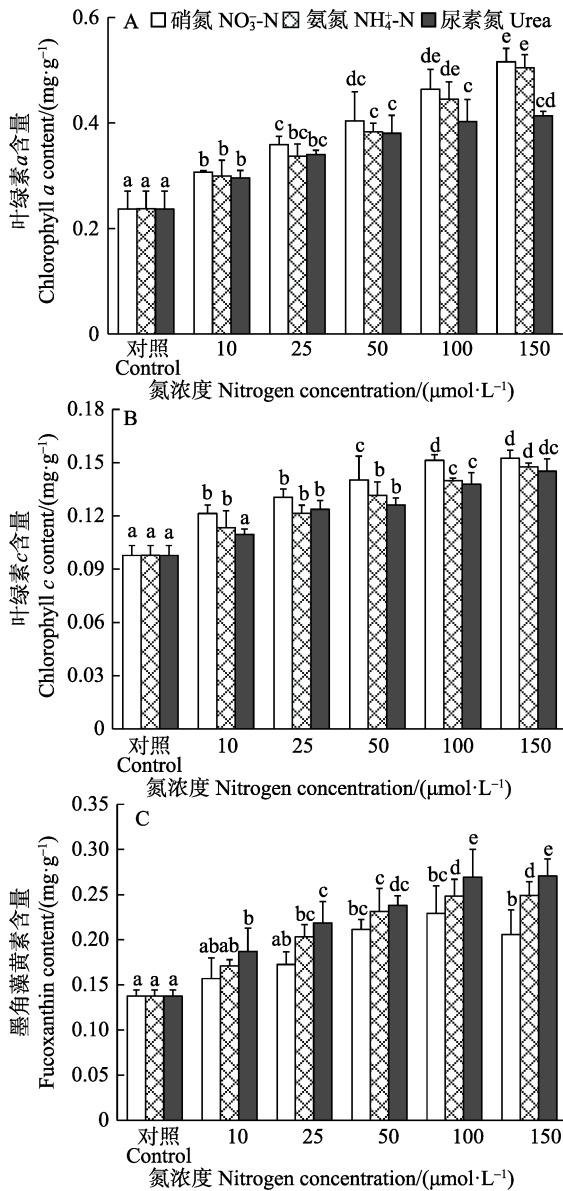


图2 不同氮条件下半叶马尾藻幼苗的光合色素含量  
Fig.2 Photosynthetic pigment contents of *S. hemiphyllum* seedlings cultured under different nitrogen conditions

### 2.3 可溶性蛋白(SP)和可溶性糖(SS)含量

双因子方差分析表明,半叶马尾藻幼苗SP含量

仅受培养水体中N浓度影响显著( $P<0.05$ ),而SS含量不受N源、N浓度和二者交互作用的显著影响( $P>0.05$ )。在相同N源下,随着N浓度的升高,SP含量逐渐增大,在浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ 组中达到最大值,而当 $\text{NH}_4^+$ -N浓度增至150  $\mu\text{mol/L}$ 时,SP含量显著下降( $P<0.05$ )(图3A)。对于加富组的SS来说,随着N浓度的升高,SS含量逐渐降低,除了浓度为10、25  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NO}_3^-$ -N组高于对照组外,其余均低于对照组,但与对照组间无显著差异( $P>0.05$ )(图3B)。

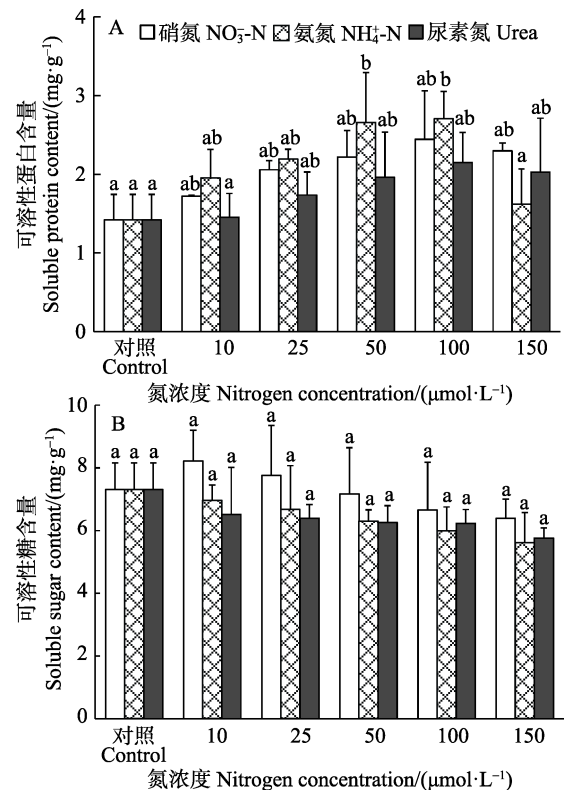


图3 不同氮条件下半叶马尾藻幼苗的可溶性蛋白和可溶性糖含量

Fig.3 Soluble protein and soluble sugar contents of *S. hemiphyllum* seedlings cultured under different nitrogen conditions

### 2.4 组织氮含量

双因子方差分析表明,半叶马尾藻幼苗的组织N含量受培养水体中N源、N浓度和二者交互作用影响显著( $P<0.05$ )。在相同N源条件下,组织N含量随着N浓度的升高显著增加( $P<0.05$ ),在浓度为150  $\mu\text{mol/L}$ 时,达到最大值。在浓度为10、25  $\mu\text{mol/L}$ 时,N源种类对组织N含量的影响不显著( $P>0.05$ ),而在浓度为50~150  $\mu\text{mol/L}$ 范围内,Urea组的组织N含量显著低于 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NH}_4^+$ -N组( $P<0.05$ ),除了150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NH}_4^+$ -N中的组织N含量显著高于 $\text{NO}_3^-$ -N组外

( $P < 0.05$ ),  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  加富组间的组织 N 含量无显著差异( $P > 0.05$ )(图 4)。

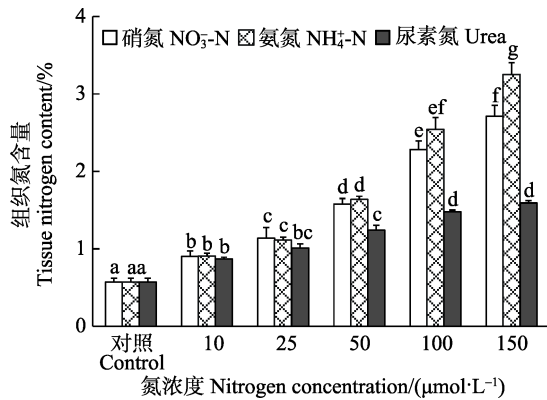


图 4 不同氮条件下半叶马尾藻幼苗的组织氮含量

Fig.4 Tissue nitrogen content of *S. hemiphyllum* seedlings cultured under different nitrogen conditions

从藻体相对生长率与组织 N 含量的关系中可以看出(图 5), 除了浓度为  $150 \mu\text{mol/L}$   $\text{NH}_4^+\text{-N}$  组, 半叶马尾藻幼苗的相对生长速率总体上随组织 N 含量的增加逐渐增大并趋于稳定。利用非线性回归得到, 半叶马尾藻幼苗的最大生长速率为  $4.85 \%/d$ ,  $N_Q$  为  $0.22\%$ ,  $N_C$  为  $0.67\%$ ,  $N_{\text{req}}$  为  $0.032\%/d$ 。同时, 从图 6 可以看出, 除了对照组的组织 N 含量小于  $0.67\%$  外, 加富组的组织 N 含量均高于 N 的临界值, 但仅在浓度为  $25\sim 150 \mu\text{mol/L}$   $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  组以及浓度为  $50\sim 150 \mu\text{mol/L}$  Urea 组中, 幼苗每天增长的 N 含量接近或高于  $0.032\%$ 。

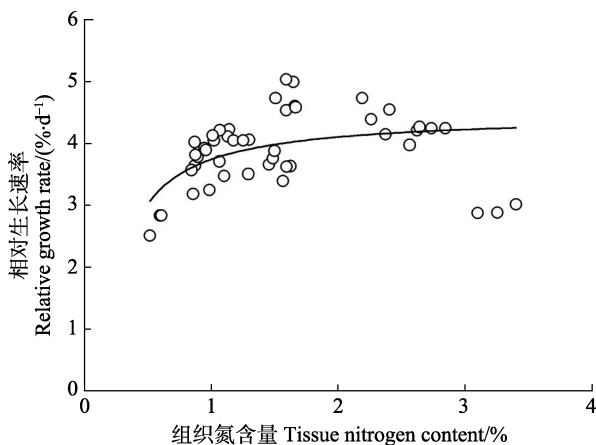


图 5 半叶马尾藻幼苗的相对生长速率与组织氮含量的关系

Fig.5 Relationship between relative growth rate and tissue nitrogen content of *S. hemiphyllum* seedlings

### 3 讨论

N 是维持植物正常生长所必需的营养元素, 适宜

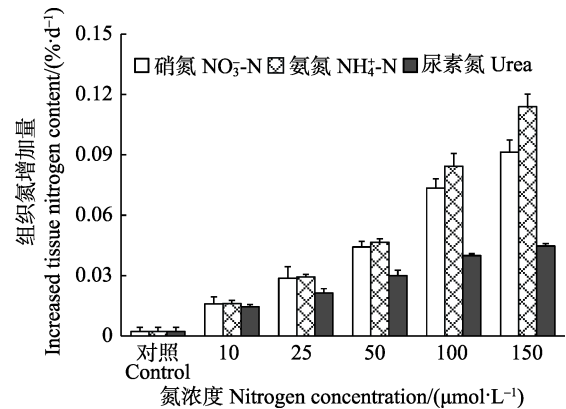


图 6 不同氮条件下半叶马尾藻幼苗组织氮的增加量

Fig.6 Increased tissue nitrogen content of *S. hemiphyllum* seedlings cultured under different nitrogen conditions

的 N 加富可使海藻吸收利用 N 营养盐的底物浓度升高, 在一定范围内促进其快速生长, 而过低或者过高的 N 浓度则会限制海藻的生长(黄中坚等, 2014; 徐智广等, 2016)。大量研究表明, 大型海藻的组织 N 含量与水体 N 浓度呈正相关(Hwang *et al*, 2004; Gómez *et al*, 1998), 这与本研究结果正好吻合, 半叶马尾藻幼苗的组织 N 含量随着 N 浓度的升高而增加。本研究结果表明, 加富组的组织 N 含量高于 N 的临界值, 说明加富组的 N 营养水平可保证半叶马尾藻幼苗的正常生长, 但仅在浓度为  $25\sim 150 \mu\text{mol/L}$   $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (或  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )和浓度为  $50\sim 150 \mu\text{mol/L}$  Urea 组中的组织 N 含量满足幼苗最大速率生长的 N 需求( $0.032\%/d$ ), 当海藻吸收的 N 营养盐超过了 N 需求, N 只会储存在体内, 不会继续促进藻体的增长, 甚至会起到抑制作用(Hanisak, 1990)。因此, 3 种 N 源加富均能提高半叶马尾藻幼苗的生长, 在 N 浓度为  $50 \mu\text{mol/L}$  时, 获得最大生长速率。

海藻对不同形态 N 源吸收和同化的能量学可影响藻体对代谢产物的积累与调节分配(Hurd *et al*, 2014)。在藻体吸收不同 N 营养盐后,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  可以直接与氨基酸结合, 有机 N 源 Urea 可以不经过消耗能量的过程而直接释放出  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  进入同化过程, 而  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  必须通过能量消耗还原成  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  后才能进行同化(Tamminen *et al*, 1996), 因而,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  吸收在能量利用方面是最不经济的。在浓度为  $10, 25 \mu\text{mol/L}$  时,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  组幼苗生长速率最低, 而在浓度为  $50\sim 150 \mu\text{mol/L}$  时,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  组的生长速率显著高于同浓度的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 Urea 组。这与海藻对  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  具有更强的储存能力有关, 海藻细胞能够将吸收后未被还原利用的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  全部储存在液泡中, 可使胞内外  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度比高达  $1000:1$ (Gordillo *et al*, 2002), 从而保证了海藻在光合作用时所需的大量 N 源(徐智广等, 2016)。

因此,高浓度的  $\text{NO}_3\text{-N}$  比  $\text{NH}_4\text{-N}$  和 Urea 更有利于海藻的营养代谢和能量合成,对海藻生长具有更显著的促进作用。

藻类的生长是在光合作用合成物质的基础上进行的,藻体内各光合色素的含量随着外界环境因子的变化而变化,当它们满足藻体光合作用的需求时,将会促进藻体的生长(陈伟洲等,2014)。 $\text{Chl-}a$  是海藻最重要的光合色素, $\text{Fx}$  是一种特殊的类胡萝卜素, $\text{Chl-}c$  是光系统 II 的辅助色素。海水中主要是蓝光和绿光, $\text{Fx}$  能吸收光谱中绿色部分(500~560 nm)的光,在 550 nm 处有 80% 的光被  $\text{Fx}$  所吸收,吸收的光能可以直接或通过  $\text{Chl-}c$  高效传至  $\text{Chl-}a$ ,而叶绿素对这种光的吸收很少(张栩等,2004)。本研究中, $\text{NH}_4\text{-N}$  加富可以促进藻体内光合色素增加直至相对稳定,但这与  $\text{NH}_4\text{-N}$  加富对半叶马尾藻幼苗生长先促进后抑制的影响趋势不同,原因可能是当过量的  $\text{NH}_4\text{-N}$  积累在藻体中时,藻体可通过补偿性合成体内光合色素水平来提高对光能的有效利用率(芦薇薇等,2016),促进  $\text{NH}_4\text{-N}$  同化过程,降低  $\text{NH}_4\text{-N}$  对藻体的胁迫伤害,但是,由于补偿性的能量消耗高于能量积累,不足以维持藻类的快速生长。同时,在高 N 浓度下, $\text{NO}_3\text{-N}$  和  $\text{NH}_4\text{-N}$  组幼苗的  $\text{Chl-}a$  含量显著高于 Urea 组,而 Urea 组幼苗的  $\text{Fx}$  含量显著高于  $\text{NO}_3\text{-N}$  和  $\text{NH}_4\text{-N}$  组。Urea 在海水总氮中所占的百分含量不高,海藻从自然海水中主要吸收  $\text{NO}_3\text{-N}$  和  $\text{NH}_4\text{-N}$  形式营养盐(徐智广等,2016)。从环境适应性上分析,由于底物浓度低,海藻在单位面积内接触 Urea 机会少,大型海藻对 Urea 的有效吸收利用能力低于  $\text{NO}_3\text{-N}$  和  $\text{NH}_4\text{-N}$ (Phillips *et al.*, 2004),导致 Urea 组幼苗的组织 N 含量显著低于  $\text{NO}_3\text{-N}$  和  $\text{NH}_4\text{-N}$  组。由于  $\text{Chl-}a$  是富含氮素的化合物,是藻类的主要光合作用中心,在 N 缺乏的情况下,叶绿素合成减少,细胞内多余的 C、H 转向合成非 N 色素,导致  $\text{Fx}$  含量升高(汪亚俊等,2014)。

N 加富可在一定程度上增强以 N 为底物的 N 代谢作用,促进可溶性蛋白的大量合成,从而提高其在藻体内的含量,为藻体储存多余的 N 源(Martínez *et al.*, 2008)。而最高  $\text{NH}_4\text{-N}$  浓度(150  $\mu\text{mol/L}$ )使可溶性蛋白含量大幅度下降,其原因可能是过量的  $\text{NH}_4\text{-N}$  会破坏藻体中的 pH 平衡,阻碍  $\text{H}^+$  的传送,进而影响海藻的光学反应,造成  $\text{NH}_4\text{-N}$  在藻体中累积,叶绿体中的  $\text{NH}_4\text{-N}$  转化为  $\text{NH}_3$  进入线粒体等组织,使叶绿体中 N 含量减少,藻体对  $\text{NH}_4\text{-N}$  同化代谢能力降低(秦梅,2014),可溶性蛋白的合成随之减少。可溶性糖含量的变化与光合产物合成速率及光合产物消耗速率有关。N 浓度的升高可增加藻体的 N 同化作用,加快利

用碳骨架合成一些含 N 化合物,导致可溶性糖含量逐渐降低(黄晓航等,1989)。同时, $\text{NO}_3\text{-N}$  加富组幼苗的可溶性糖含量高于  $\text{NH}_4\text{-N}$  和 Urea 加富组,这除了与  $\text{NO}_3$  具有在细胞内较强的储存能力有关外(Gordillo *et al.*, 2002), $\text{NO}_3\text{-N}$  还能够激活细胞内的氧化磷酸化过程,合成更多的 ATP,增强卡尔文循环,促进可溶性糖的积累(Huppe *et al.*, 1992; 徐智广等,2016)。

综上所述,在半叶马尾藻幼苗室内培育阶段通过向水体中提供氮营养盐,使  $\text{NO}_3\text{-N}$  加富至 50~150  $\mu\text{mol/L}$  或  $\text{NH}_4\text{-N}$  加富至 25~100  $\mu\text{mol/L}$ ,可有效提高半叶马尾藻幼苗对 N 营养盐的吸收利用能力,实现其最大生长速率,为马尾藻幼苗室内成功度夏培育提供了保障。

## 参 考 文 献

- Abreu MH, Pereira R, Buschmann AH, *et al.* Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 407(2): 190-199
- Alquezar R, Glendenning L, Costanzo S. The use of the brown macroalgae, *Sargassum flavicans*, as a potential bioindicator of industrial nutrient enrichment. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 77(1-2): 140-146
- Chen WZ, Zhong ZH, Jin YL, *et al.* Effects of light intensity, temperature and salinity on growth and biochemical constituents of *Hypnea cervicornis*. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(2): 48-53 [陈伟洲, 钟志海, 金玉林, 等. 光照强度、温度和盐度对鹿角沙菜生长及生化组分的影响. *南方水产科学*, 2014, 10(2): 48-53]
- Dawes CJ, Koch EW. Physiological responses of the red algae *Gracilaria verrucosa* and *G. tikvahiae* before and after nutrient enrichment. *Bulletin of Marine Science*, 1990, 46(2): 335-344
- Droop MR. 25 years of algal growth kinetics a personal view. *Botanica Marina*, 1983, 26(3): 99-112
- Gómez I, Wiencke C. Seasonal changes in C, N and major organic compounds and their significance to morpho-functional processes in the endemic Antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis*. *Polar Biology*, 1998, 19(2): 115-124
- Gordillo FJL, Dring M, Savidge G. Nitrate and phosphate uptake characteristics of three species of brown algae cultured at low salinity. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 234(1): 111-118
- Hanisak MD. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. *Hydrobiologia*, 1990, 204-

- 205(1): 79–87
- Huang XH, Wen ZC, Wu CY. Effect of ammonium-nitrogen on growth and chemical composition of *Gracilaria sjoestedtii* Kylin. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1989, 20(6): 493–501 [黄晓航, 温宗存, 吴超元. 铵氮对龙须菜含氮化合物和碳水化合物组成的影响. *海洋与湖沼*, 1989, 20(6): 493–501]
- Huang ZJ, Zhong ZH, Song ZM, *et al.* Effects of different nutrient salts on growth and chemical constituents of *Gracilaria blodgettii*. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(5): 30–38 [黄中坚, 钟志海, 宋志民, 等. 不同营养盐水平对芋根江蓠的生长及生化组分的影响. *南方水产科学*, 2014, 10(5): 30–38]
- Huppe HC, Vanlerberghe GC, Turpin DH. Evidence for activation of the oxidative pentose phosphate pathway during photosynthetic assimilation of but not by a green alga. *Plant Physiology*, 1992, 100(4): 2096–2099
- Hurd CL, Harrison PJ, Bischof K, *et al.* *Seaweed ecology and physiology*. New York: Cambridge University Press, 2014, 255–282
- Hwang RL, Tsai CC, Lee TM. Assessment of temperature and nutrient limitation on seasonal dynamics among species of *Sargassum* from a coral reef in southern Taiwan. *Journal of Phycology*, 2004, 40: 463–473
- Jiang HB, Tian XL, Dong SL, *et al.* Effects of nutrient factors on the uptake of nitrogen and phosphorus by *Sargassum thunbergii*. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(S1): 175–180 [姜宏波, 田相利, 董双林, 等. 不同营养盐因子对鼠尾藻氮、磷吸收速率的影响. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(S1): 175–180]
- Kochert G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. London, New York, Melbourne: Cambridge University Press, 1978, 95–97
- Kochert G. Protein determination by dye binding. *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. London, New York, Melbourne: Cambridge University Press, 1978, 92–93
- Lu WW, Wang QH, Gong QL. Effects of light and temperature on growth and biochemical composition of a marine macroalga (*Macrocystis pyrifera*) young sporophyte. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2016, 46(1): 40–48 [芦薇薇, 王巧晗, 宫庆礼. 光照强度和温度对巨藻孢子体的生长和生化组成的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(1): 40–48]
- Martínez B, Rico JM. Changes in nutrient content of *Palmaria palmate* in response to variable light and upwelling in northern Spain. *Journal of Phycology*, 2008, 44(1): 50–59
- Pedersen MF, Borum J. Nutrient control of estuarine macroalgae: Growth strategy and the balance between nitrogen requirements and uptake. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 161(8): 155–163
- Phillips JC, Hurd CL. Kinetics of nitrate, ammonium, and urea uptake by four intertidal seaweeds from New Zealand. *Journal of Phycology*, 2004, 40(3): 534–545
- Qin M. Responses of physiological function to increased  $\text{NH}_4^+$  concentrations of seawater under different environmental conditions in marine macroalgae. Master's Thesis of the South China University of Technology, 2014, 10–20 [秦梅. 不同环境条件下大型海藻生理功能对海水中  $\text{NH}_4^+$  增高的响应. 华南理工大学硕士研究生学位论文, 2014, 10–20]
- Seely GR, Duncan MJ, Vidaver WE. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Marine Biology*, 1972, 12: 184–188
- Tamminen T, Irmisch A. Urea uptake kinetics of a midsummer planktonic community on the SW coast of Finland. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 130: 201–211
- Wang YJ, Sun MZ, Li AF, *et al.* Effects of nitrogen concentration on the growth and photosynthetic physiology of *Scenedesmus acuminatus*. *China Biotechnology*, 2014, 34(12): 51–58 [汪亚俊, 孙明哲, 李爱芬, 等. 不同氮素水平对产油尖状栅藻生长及光合生理的影响. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(12): 51–58]
- Xie EY, Liu DC, Jia C, *et al.* Artificial seed production and cultivation of the edible brown alga *Sargassum naozhouense* Tseng et Lu. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(2): 513–522
- Xu ZG, Li MZ, Sun FX, *et al.* Effects of temperature, irradiance level and nutritional history on the uptake of inorganic phosphorus in *Hizikia fusiforme*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 8–13 [徐智广, 李美真, 孙福新, 等. 温度、光强和营养史对羊栖菜无机磷吸收的影响. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 8–13]
- Xu ZG, Wu HY, Sun FX, *et al.* Effects of enrichment with different nitrogen sources on growth, photosynthetic carbon fixation and nitrogen uptake of *Saccharina japonica*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 577–584 [徐智广, 吴海一, 孙福新, 等. 不同氮源加富对海带生长、光合固碳和氮吸收特性的影响. *水产学报*, 2016, 40(4): 577–584]
- Yoon JT, Sun SM, Chung G. *Sargassum* bed restoration by transplantation of germlings grown under protective mesh cage. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 505–509
- Yu YQ, Zhang QS, Tang YZ, *et al.* Establishment of intertidal seaweed beds of *Sargassum thunbergii* through habit creation and gerling seeding. *Ecological Engineering*, 2012, 44(7): 10–17
- Zhang X, Li DP, Shi DJ, *et al.* Photosynthesis properties of gametophytes and juvenile sporophytes of algae, *Undaria pinnatifida*. *Marine Sciences*, 2004, 28(11): 20–27 [张栩, 李大鹏, 施定基, 等. 裙带菜配子体和孢子体的光合作用特性. *海洋科学*, 2004, 28(11): 20–27]



## Effects of Enrichment with Three Nitrogen Sources on Growth and Biochemical Composition of *Sargassum hemiphyllum* Seedlings

HAN Tingting, QI Zhanhui, HUANG Honghui<sup>①</sup>, LIANG Qingyang

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Development and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

**Abstract** To investigate the effect of nitrogen sources ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N, and Urea) on the physiological characteristics of *Sargassum hemiphyllum* seedlings, the seedlings were cultured for 24 days in different concentrations of each nitrogen (N) source, and the growth rate and biochemical composition were determined. The results showed that the N source and N concentration had significant effects on the growth rate and biochemical composition of the seedlings. With increasing N concentrations, the relative growth rates and tissue N contents of the seedlings increased, and when tissue N contents approached or reached N requirement (0.032%/d) for the maximum growth rate in 25~150  $\mu\text{mol/L}$ , the relative growth rates reached the maximum at 50  $\mu\text{mol/L}$ . The maximum relative growth rate under Urea enrichment was significantly lower than that under  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N enrichments. The relative growth rate of the seedlings in 10 and 25  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NH}_4^+$ -N was significantly higher than that in the same concentration of  $\text{NO}_3^-$ -N, but the relative growth rate in 50~150  $\mu\text{mol/L}$  showed an opposite change. Except for the highest N concentration (150  $\mu\text{mol/L}$ ), the photosynthetic pigments, soluble protein, and tissue nitrogen contents gradually increased, while the soluble sugar content gradually reduced as N concentration increased. At the same N concentration, the contents of soluble sugars, chlorophyll *a*, and chlorophyll *c* of seedlings were the highest under  $\text{NO}_3^-$ -N enrichment, the contents of the soluble protein content and tissue N content were the highest under  $\text{NH}_4^+$ -N, and the fucoxanthin content was the highest in Urea-enriched culture medium. When the  $\text{NH}_4^+$ -N concentration reached 150  $\mu\text{mol/L}$ , a significant decrease in growth and soluble protein content was observed, indicating the presence of a stressful condition. In conclusion, culture medium enriched in  $\text{NO}_3^-$ -N (50~150  $\mu\text{mol/L}$ ) or  $\text{NH}_4^+$ -N (25~100  $\mu\text{mol/L}$ ) promoted the growth, photosynthesis, and dry-matter accumulation of *S. hemiphyllum* seedlings, suggesting that the seedlings may be successfully cultured indoors during summer.

**Key words** *Sargassum hemiphyllum*; Nitrogen source; Enrichment; Growth; Biochemical composition

<sup>①</sup> Corresponding author: HUANG Honghui, E-mail: huanghh@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170516001

http://www.yykxjz.cn/

刘慧, 李应东, 张凤枰, 刘耀敏. 微波-干灰化混合消解和原子荧光光度法测定鱼粉中总砷. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 167-172

Liu H, Li YD, Zhang FP, Liu YM. Determination of total arsenic in fishmeal using Microwave-Dry ashing mixed digestion coupling with atomic fluorescence spectrophotometry. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 167-172

# 微波-干灰化混合消解和原子荧光光度法 测定鱼粉中总砷\*



刘 慧<sup>1,2</sup> 李应东<sup>3</sup> 张凤枰<sup>1,2①</sup> 刘耀敏<sup>1,2</sup>

(1. 四川威尔检测技术股份有限公司 成都 610041; 2. 通威股份有限公司 水产畜禽营养与健康养殖  
农业农村部重点实验室 成都 610041; 3. 通威股份有限公司昆明分公司 昆明 650217)

**摘要** 采用微波-干灰化混合消解法进行前处理, 原子荧光光度法测定鱼粉中的总砷含量。结果显示, 样品经微波消解、干灰化、原子荧光分光光度法分析, 加标回收率为 96.8%~103.6%, 相对标准偏差为 2.4%, 检出限为 0.1 μg/L; 采用 CNAS 能力验证鱼粉样品, 微波-干灰化混合消解法总砷测定结果与中位值一致。研究表明, 微波-干灰化混合消解法能减少前处理过程中砷(As)因高温或消解不完全导致的损失, 使鱼粉中的各种形态的 As 完全转化为无机砷离子, 方法重现性好、准确可靠, 是测定鱼粉中的总砷含量理想的前处理方法, 也可以用于砷形态比较复杂的食品、饲料等样品中总砷的测定。

**关键词** 微波-干灰化混合消解; 原子荧光光度法; 总砷; 鱼粉

**中图分类号** O655.9; TS201.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0167-06

鱼粉含有大量的蛋白质和钙(Ca)、磷(P)等矿物质, 能促进动物生长发育, 是最好的动物饲料原料(王丹红等, 2004)。砷(As)是动物生长的必需元素之一, 当缺乏 As 元素时, 可导致动物心肌和骨骼肌纤维萎缩、生长滞缓、怀孕率低、自发流产较多、死亡率较高等(贾涛, 2013; 唐志华, 2003)。但 As 也是一种蓄积性有害元素, 当其在体内蓄积量超过一定限量, 就会产生毒性作用, 会对动物的心肌、呼吸、生殖和免疫系统造成损伤(康家琦等, 2004), 甚至会造成基因突变、DNA 甲基化改变、诱发癌症等(Hughes *et al.*, 2002)。人类社会生产活动产生的工业废水、生活污

水, 风化和生物活动等自然过程使环境中 As 含量升高(杨婉玲等, 2013; 朱参胜等, 2009), 鱼类体中的 As 含量也随之升高(Tisler *et al.*, 2002), 造成鱼粉原料中 As 超标, 直接导致饲料 As 超标, 给人类食品安全带来不利影响, 从而威胁人类健康(康家琦等, 2004; 朱参胜等, 2009; 白爱梅等, 2007)。因此, 对鱼粉中 As 含量的准确测定是非常重要的。样品中总砷含量的检测结果准确与否, 取决于前处理过程能否将样品中不同形态的 As 完全转化为砷离子, 且前处理过程中 As 的损失量较少。目前, 测定总砷的前处理方法主要有干灰化法、微波消解法和湿法消解法(宋洪强等,

\* 四川省科技支撑计划(2016NZ0068)和四川省青年科技创新研究团队专项计划(2015TD0024)共同资助 [This work was supported by the Technology Research and Development Program of the Department of Science and Technology of Sichuan (2016NZ0068), and Youth Science and Technology Innovation Team Program of Department of Science and Technology of Sichuan(2015TD0024)]. 刘 慧, E-mail: liuh@willtest.cn

① 通讯作者: 张凤枰, 高级工程师, E-mail: fengpingzhang@163.com

收稿日期: 2017-05-16, 收修改稿日期: 2017-06-11

2010; 安建博等, 2015; 王锬等, 2010; Nishimura *et al.*, 2010)。干灰化法碳化阶段样品易起泡、飞溅, 灰化过程中, As 易因高温损失, 导致检测结果偏低(宋洪强等, 2010); 微波消解法受到酸种类、酸用量和最高温度的限制, 对 As 形态较为复杂的样品, 不能将样品中不同形态的 As 完全转化为砷离子, 造成结果偏低(宋洪强等, 2010; 傅余强等, 2010); 湿法消解法一般采用硝酸-高氯酸-硫酸体系, 若消解温度低于 300℃, 无法将样品中的 As 完全消解转化为砷离子, 这种方法通常需要放置过夜, 耗费时间较长, 且该方法酸用量大, 耗费试剂多, 危险性较大, 并在消解时需随时观察试剂的量值和避免碳化(宋洪强等, 2010)。本研究采用微波消解和干灰化法联用, 即微波-干灰化混合消解法(以下简称混合消解法), 旨在克服干灰化法、微波消解法和湿法消解法 3 种前处理方法的缺点, 研究建立适合鱼粉总砷含量测定的前处理方法, 为鱼粉的质量控制提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

**1.1.1 仪器** AFS-9130 原子荧光光度计, AFS-9x (Version6.20) 数据处理软件(北京吉天仪器有限公司); 砷空心阴极灯(北京有色金属研究总院); ETHOS I 微波消解仪(意大利 Milestone 公司); CP224S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); 恒温水浴锅, 万用电炉(北京中兴伟业仪器有限公司); 箱式电阻炉(沈阳市节能电炉厂)。

所有玻璃器皿均在 20% 的稀硝酸中浸泡 24 h 后使用。

**1.1.2 试剂** 砷单元素溶液标准物质, 1000 mg/L, 编号为 GBW08611(中国计量科学研究院); 盐酸, 原子荧光纯(成都科龙化工试剂厂); 30% 过氧化氢, 优级纯(成都科龙化工试剂厂); 硝酸, 优级纯(国药集团化学试剂有限公司); 硝酸镁、硼氢化钾、氢氧化钾和硫脲, 均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 水为 Milli-Q Gradient 去离子水(电阻超过 18 MΩ); 高纯氩气(纯度大于 99.99%)。

**1.1.3 样品** 1、2、3 号国产鱼粉样品于当地市场购买; CNAS T0508 鱼粉和 T0744 鱼粉能力验证样品(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品前处理

**1.2.1.1 干灰化** 称取试样 2~3 g 于 50 ml 瓷坩埚

中, 加入 5 ml 150 g/L  $Mg(NO_3)_2$ , 混匀, 于低温蒸干, 碳化至无烟后, 转入高温炉 550℃, 恒温灰化 3.5 h, 取出冷却, 缓慢加入 10 ml 6 mol/L HCl 溶液, 待激烈反应后, 煮沸并转移至 50 ml 容量瓶中, 向容量瓶中加入 2.5 ml 50 g/L 硫脲溶液, 用去离子水洗涤坩埚 3~5 次, 洗液一并转入容量瓶中, 用去离子水定容, 摇匀, 待测(国家质量监督检验检疫总局等, 2006)。同时, 做试剂空白。

**1.2.1.2 微波消解** 称取试样 0.3~0.5 g 于消解罐中, 加入 6 ml  $HNO_3$ , 2 ml 30%  $H_2O_2$ , 盖好消解罐的安全阀, 并放入微波炉消解系统中, 设定升温程序, 20 min 升温至 180℃, 保温 20 min, 冷却至室温, 取出于电热板上赶酸, 冷却后转移至容量瓶, 向容量瓶中加入 2.5 ml 50 g/L 硫脲溶液, 定容, 摇匀, 待测(王锬等, 2010)。同时, 做试剂空白。

**1.2.1.3 微波-干灰化混合消解** 称取试样 0.3~0.5 g 于消解罐中, 步骤同 1.2.1.2, 消解程序完成后, 冷却至常温, 用去离子水转移至 25 ml 容量瓶中, 定容, 混匀备用。准确移取 10 ml 消解液于 50 ml 瓷坩埚中, 加入 5 ml 150 g/L  $Mg(NO_3)_2$ , 混匀, 于沸水浴中蒸干, 低温碳化至无烟, 然后转入高温炉 550℃, 恒温灰化 3.5 h。取出冷却后, 步骤同 1.2.1.1。同时, 做试剂空白。

**1.2.2 仪器工作条件** AFS-9130 原子荧光光度计测定 As 的仪器工作条件: 负高压 207 V, 灯电流 65 mA, 原子化器温度 200℃, 原子化器高度 8 mm, 载气流量 400 ml/min, 屏蔽气流量 800 ml/min, 读数时间 7 s, 延迟时间 1.5 s。

**1.2.3 校正曲线及样品分析** 用 5% HCl 配制最高浓度为 50.00  $\mu\text{g/L}$  的标准溶液, 测量时, 仪器自动配制 5.00、10.00、20.00、30.00、50.00  $\mu\text{g/L}$  As 标准系列, 标准曲线相关系数  $R$  为 0.9995 以上。在相同条件下测定样品, 从校正曲线上求得样品中总砷的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 3 种前处理方法比较

3 个国产鱼粉样品分别用干灰化法、微波消解法、混合消解法处理, 氢化物-原子荧光分光光度法测定其总砷含量, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 与混合消解法相比, 干灰化法处理的鱼粉中总砷的检测结果偏低 50% 左右, 微波消解法偏低 90% 以上。这可能是由于干灰化法的碳化阶段样品起泡、飞溅, 液态  $Mg(NO_3)_2$  与固态样品不能充分反应, 未能与样品中的 As 完全反应, 生成不挥发的焦磷酸镁, 从而使

表1 干灰化法、微波消解法和混合消解鱼粉总砷测定结果  
Tab.1 The amount of total arsenic in fishmeal determined by dry-ashing, microwave digestion and microwave-dry ashing mixed digestion (mg/kg)

样品 Samples	干灰化 Dry-ashing		微波消解 Microwave digestion		混合消解 Mixed digestion	
	测定结果 Result	平均值 Average value	测定结果 Result	平均值 Average value	测定结果 Result	平均值 Average value
1	1.54	1.50	0.20	0.21	2.81	2.98
	1.45		0.22		2.95	
2	3.82	3.86	0.31	0.32	7.46	7.42
	3.91		0.33		7.37	
3	5.04	5.08	0.67	0.68	9.23	9.29
	5.12		0.70		9.35	

大量的 As 在 550℃ 的高温灰化阶段挥发损失, 导致结果偏低。微波消解法的温度较低, 不超过 200℃, 这仅将样品消解为溶液状态, 不能将鱼粉中的有机砷如二甲基砷、三甲基砷、砷糖等消解为砷离子(李朝霞等, 2011; 刘敏敏等, 2013; 戚平等, 2011), 且在硝酸氧化体系中, 消解温度须达 300℃ 才能将有机砷完全转为五价砷离子(宋洪强等, 2010), 因此, 微波消解法不适合 As 形态比较复杂样品中总砷的测定。而混合消解法很好地克服前 2 种方法的缺点, 鱼粉经微波消解后呈液态, 再加入  $Mg(NO_3)_2$  溶液, 液-液反应更完全, 在灰化阶段  $Mg(NO_3)_2$  能与 As 完全反应生成焦砷酸镁而被固定住, 大大减少了 As 的挥发, 降低了 As 的损失。

## 2.2 精密度实验

对 3 个国产鱼粉进行了混合消解法精密度研究, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 3 个国产鱼粉样品中总砷的检测结果相对标准偏差(RSD)均小于 2%, 说明该方法重现性好。

## 2.3 回收率实验

对 CNAS T0508 鱼粉和 T0744 鱼粉进行加标, 采用混合消解法进行消解, 以能力验证鱼粉样品总砷含量中位值计算方法回收率, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 采用微波-干灰化混合消解法处理鱼粉样品, 总砷回收率为 96.8%~103.6%, 平均回收率为 99.8%, 相对标准偏差为 2.4%, 由此可见, 该方法能较准确

表2 精密度实验结果  
Tab.2 The results for the method precision

样品 Samples	测定结果 Result (mg/kg)						平均值 Average (mg/kg)	相对标准偏差 RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
1	2.84	2.87	2.92	2.84	2.95	2.81	2.87	1.86
2	7.47	7.45	7.37	7.42	7.39	7.46	7.43	0.54
3	9.25	9.29	9.23	9.28	9.31	9.35	9.28	0.46

表3 回收率实验结果  
Tab.3 The results for recovery

样品 Samples	添加量 Spiked (mg/kg)	本底值 Original (mg/kg)	测定值 Result (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
T0508	10	7.18	17.27	100.90	99.8	2.4
			17.06	98.80		
			16.99	98.10		
T0744	5	2.94	7.78	96.80		
			7.96	100.40		
			8.12	103.60		

测定鱼粉中的总砷含量。

## 2.4 验证结果

对 CNAS T0508 鱼粉和 T0744 鱼粉采用混合消解法处理, 总砷检测结果见表 4。从表 4 可以看出, 混合消解法测定的总砷含量与能力验证报告中中位值基本一致, 相对偏差小于 1%, 而干灰化和微波消解的鱼粉总砷含量与中位值的相对偏差约达 45%和 95%。

因此, 混合消解法较干灰化和微波消解法而言, 能更准确地测出鱼粉中总砷的含量。

## 2.5 检出限

在线性范围 0~50  $\mu\text{g/L}$  内, As 的相关系数良好,  $R^2=0.9996$ , 对样品空白溶液连续进行 11 次荧光强度测定, 以 3 倍空白的标准偏差除以标准曲线的斜率求出检出限为 0.1  $\mu\text{g/L}$ 。

表 4 CNAS T0508 和 T0744 鱼粉样品干灰化、微波消解和混合消解法测定结果

Tab.4 The determination result of CNAS T0508 and T0744 fishmeal by dry-ashing, microwave digestion and mixed digestion

样品 Samples	前处理方法 Method	测定值 Result (mg/kg)	平均值 Average value (mg/kg)	参考值 Standard value (mg/kg)	相对偏差 Relative deviation (%)
T0508	干灰化法 Dry-ashing	3.98 3.71	3.84		46.51
	微波消解法 Microwave digestion	0.25 0.26	0.25	7.18	96.52
	混合消解法 Mixed digestion	7.26 7.05	7.16		0.32
T0744	干灰化法 Dry-ashing	1.68 1.67	1.67		43.20
	微波消解法 Microwave digestion	0.20 0.20	0.20	2.94	93.20
	混合消解法 Mixed digestion	2.86 2.98	2.92		0.83

## 3 结论

分别采用干灰化、微波消解和微波-干灰化混合消解法对 3 个国产鱼粉样品、2 个 CNAS 能力验证鱼粉样品进行前处理, 利用氢化物-原子荧光分光光度法测定总砷含量, 微波-干灰化消解法克服了干灰化易损失、微波消解不能使有机砷转化为砷离子的缺点, 能减少前处理过程中 As 因高温或消解不完全导致的损失, 使鱼粉中各种形态的 As 完全转化为无机砷离子。该方法灵敏、准确、重现性好, 与常用的微波消解、干灰化消解和湿法消解 3 种消解方式相比较, 不仅能将鱼粉中的 As 完全转化为无机砷离子, 而且比湿法消解节省了约 20 ml 浓酸的用量, 避免了消解过夜, 节省至少约 5 h 的前处理时间, 更加环保、安全, 是测定鱼粉中的总砷含量理想的前处理方法, 也可以用于 As 形态比较复杂的样品中总砷的测定。

## 参 考 文 献

An JB, Shen NM, Zhang YW, *et al.* The comparison of 3

pretreatment methods for total arsenic determination by with atomic fluorescence spectrometry in food. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(5): 520-524 [安建博, 沈讷敏, 张玮玮, 等. 原子荧光法测定食品中总砷的 3 种前处理方法比较. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 520-524]

Bai AM, Li Y, Fan ZX. The hazardous effects of arsenic on human health. Studies of Trace Elements and Health, 2007, 24(1): 61-62 [白爱梅, 李跃, 范中学. 砷对人体健康的危害. 微量元素与健康研究, 2007, 24(1): 61-62]

Fu YQ, Wang YT, Xu Q, *et al.* The effect of conditions of wet digestion of shrimp meal on determination of total arsenic content. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2010, 29(S1): 435-437 [傅余强, 王妍婷, 徐琴, 等. 湿法消解虾粉的条件对总砷含量测定的影响. 分析实验室, 2010, 29(S1): 435-437]

General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of total arsenic in feed(GB/T 13079-2006), 2006 [国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 饲料中总砷的测定(GB/T 13079-2006), 2006]

- Jia T. Determination of arsenic in fish meal by atomic fluorescence spectrometry. *Feed and Husbandry*, 2013(3): 36-38[贾涛. 原子荧光法检测鱼粉中砷的含量. *饲料与畜牧*, 2013(3): 36-38]
- Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 2002, 133(1): 1-16
- Kang JQ, Jin YL. Study progress of adverse effects of arsenic on health. *Journal of Hygiene Research*, 2004, 33(3): 372-375[康家琦, 金银龙. 砷对健康危害的研究进展. *卫生研究*, 2004, 33(3): 372-375]
- Li ZX, Cai HM, Sun WH, *et al.* Optimization of digestion method of arsenic in fish meal. *Feed Research*, 2011(12): 39-42[李朝霞, 才洪美, 孙卫华, 等. 鱼粉中砷消解方法的优化. *饲料研究*, 2011(12): 39-42]
- Liu MM, Chen Q. Effects of different digestion methods on determination of total arsenic in fish meal by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 23(4): 1041-1042[刘敏敏, 陈俏. 不同消化方法对氢化物发生-原子荧光法测定鱼粉中总砷的影响. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(4): 1041-1042]
- Nishimura T, Hamanonagaoka M, Sakakibara N, *et al.* Determination method for total arsenic and partial-digestion method with nitric acid for inorganic arsenic speciation in several varieties of rice. *Journal of Food Hygiene Safety Sciences*, 2010, 51(4): 178-181
- Qi P, Zeng T. Affection of digestion methods on the determination of As in shrimp by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Studies of Trace Elements and Health*, 2011, 28(6): 30-32[戚平, 曾涛. 消解方式对氢化物原子荧光法测定虾粉中总砷的影响. *微量元素与健康研究*, 2011, 28(6): 30-32]
- Song HQ, Hao YB, Wu YC, *et al.* Comparison of wet, microwave digestion and dry ash pretreatment methods for the determination of total arsenic in seafood by atomic fluorescence spectrometer. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2010, 29(4): 367-372 [宋洪强, 郝云彬, 吴益春, 等. 原子荧光光度法中湿法消解、微波消解、干灰化前处理法测定水产品中总砷含量的比较. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2010, 29(4): 367-372]
- Tang ZH. Trace element arsenic and health. *Guangdong Trace Elements Science*, 2003, 10(3): 10-13[唐志华. 微量元素砷与人体健康. *广东微量元素科学*, 2003, 10(3): 10-13]
- Tisler T, Zagorc-Koncan J. Acute and chronic toxicity of arsenic to some aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 69(3): 421-429
- Wang DH, Cai CP, Wu W, *et al.* Monitoring and risk of heavy metals in imported fish meal. *Inspection and Quarantine Science*, 2004, 14(6): 32-33 [王丹红, 蔡春平, 吴文, 等. 进口鱼粉中重金属的监测与风险分析. *检验检疫科学*, 2004, 14(6): 32-33]
- Wang K, Wei XH, Wang KY, *et al.* Research on the determination of total arsenic content in shrimp power. *Chemical Analysis and Meterage*, 2010, 19(2): 42-44[王锬, 卫晓红, 王开宇, 等. 虾粉中总砷测定方法的探讨. *化学分析计量*, 2010, 19(2): 42-44]
- Yang WL, Pang SX, Wang C, *et al.* Arsenic concentrations in water, sediment, and aquatic animals from the Pearl River estuaries and its distribution characteristics and ecological risk evaluation. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(4): 650-656 [杨婉玲, 庞世勋, 王超, 等. 珠江口水、沉积物及生物体 As 含量分布特征及生态风险评价. *生态环境学报*, 2013, 22(4): 650-656]
- Zhu CS, Liang XZ. Arsenic toxicology and its effects on human Health. *Journal of Environment Health*, 2009, 26(6): 562-563[朱参胜, 梁晓聪. 砷的毒理及其对人体健康的影响. *环境与健康杂志*, 2009, 26(6): 562-563]

## Determination of Total Arsenic in Fishmeal Using Microwave-Dry Ashing Mixed Digestion Coupling with Atomic Fluorescence Spectrophotometry

LIU Hui<sup>1,2</sup>, LI Yingdong<sup>3</sup>, ZHANG Fengping<sup>1,2①</sup>, LIU Yaomin<sup>1,2</sup>

(1. Sichuan Willtest Technology Co. Ltd., Chengdu 610041; 2. Key Laboratory of Aquatic, Livestock, Poultry Nutrition and Healthy Culturing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tongwei Co. Ltd., Chengdu 610041; 3. Kunming Tongwei Feed Stuff Co. Ltd, Kunming 650217)

**Abstract** Fishmeal is an important animal protein feed that is rich in protein and vitamins and is a major raw material of animal feed. Arsenic is an essential element for animal growth but is also a cumulative toxic element. Arsenic poses a great threat to animals when its concentration exceeds a certain limit. Serious environmental pollution has caused an increase in the level of arsenic in the environment, and thus, the content of arsenic has increased in fish. This can directly affect the quality of fishmeal, with unfavorable effects on food safety. Therefore, it is crucial to accurately determine the content of total arsenic in feed stuffs. The accurate determination of total arsenic in samples depends on pre-treatment methods. At present, the major pre-treatment methods for arsenic include dry-ashing, wet digestion, and microwave digestion, but none of these methods can completely convert the speciation of arsenic to arsenic ion. Dry-ashing leads to the loss of arsenic due to high temperature and spatter. Wet digestion and microwave digestion do not convert complex forms of arsenic to arsenic ion because of temperature, acid type, and dosage. A novel method was established for the quantitative determination of total arsenic in fishmeal by atomic fluorescence spectrophotometry after microwave dry-ashing mixed digestion. Fishmeal was digested in a microwave, ashed, and the arsenic content was detected by atomic fluorescence spectrophotometry. Recovery was in the range 96.8%~103.6%, the relative standard deviation was 2.4%, and the detection limit was 0.1 µg/L. Results of China National Accreditation Service for Conformity Assessment proficiency testing were in accordance with the median. The results indicated that microwave dry-ashing mixed digestion can reduce the loss associated with the high-temperature of ashing and incomplete microwave digestion, and convert different forms arsenic into arsenic ion. This effective, sensitive, and reproducible method can be used to determine total arsenic levels in fishmeal and other complex samples containing arsenic forms.

**Key words** Microwave-dry ashing mixed digestion; Atomic fluorescence spectrophotometry; Total arsenic; Fishmeal

① Corresponding author: ZHANG Fengping, E-mail: fengpingzhang@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170424001

http://www.yykxjz.cn/

王滨, 柳学周, 徐永江, 史宝, 刘权. Kisspeptin 对鱼类生殖轴的调控机制研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 173–184  
Wang B, Liu XZ, Xu YJ, Shi B, Liu Q. Regulatory mechanisms of Kisspeptin on the reproductive axis in fish. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 173–184

# Kisspeptin 对鱼类生殖轴的调控机制研究\*

王 滨<sup>1,2,#</sup> 柳学周<sup>1,2,①#</sup> 徐永江<sup>1,2</sup> 史 宝<sup>1,2</sup> 刘 权<sup>1,3</sup>

1. 农业农村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试点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** Kisspeptin (简称 Kiss 或者 Kp)是由 *KISS1/Kiss1* 基因编码的一种下丘脑神经肽, 通过其受体 KissR(也称作 GPR54)的介导参与了多种生理过程, 如抑制肿瘤转移和参与生殖调控。目前, 尽管在鲤形目(Cypriniformes)、鲈形目(Perciformes)、鲷形目(Pleuronectiformes)、鲑形目(Tetraodontiformes)、颌针目(Beloniformes)、鲉形目(Scorpaeniformes)、鲑形目(Salmoniformes)及鳕形目(Gadiformes)等多种鱼类中均鉴定出了 *kiss/kissr* 基因, 但 Kiss/KissR 系统在鱼类生殖调控中的精确作用及其分子机制尚未完全阐明。尤其是在鱼类中存在 2 种 *kiss* 及 3 种 *kissr* 基因, Kiss/KissR 系统对鱼类生殖调控的作用方式更加复杂。本文简要总结鱼类 Kiss 及其受体的研究进展, 并对 Kiss 的生理学功能、信号转导机制以及 *kiss/kissr* 表达调控研究进行概括讨论, 旨在加深对鱼类 Kiss/KissR 系统的认识和了解, 为后续研究指明方向。

**关键词** 鱼类; Kisspeptin; kisspeptin receptor; 生殖; 信号转导; 基因表达调控

**中图分类号** S917; Q575; Q492 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0173-12

下丘脑神经肽 kisspeptin 及其受体 KissR 在哺乳动物生殖调控及青春期启动中发挥了重要作用(Roa *et al*, 2011; Tena-Sempere, 2010)。迄今, 除鸟类外, 在其他脊椎动物中均鉴定出了 *kiss* 基因。除鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*)外, 哺乳类只存在 *Kiss1* 基因; 两栖类存在 *kiss1a*、*kiss1b* 及 *kiss2* 三种基因; 爬行类只存在 *kiss2* 基因; 斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、金鱼 (*Carassius auratus*)、欧洲海鲈

(*Dicentrarchus labrax*)、条纹鲈 (*Morone saxatilis*)及鲈鱼 (*Scomber japonicus*)中存在 *kiss1* 和 *kiss2* 两种基因。相反, 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*)、半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*)以及星点东方鲀 (*Takifugu niphobles*)中只鉴定出了 *kiss2* 基因 (Pasquier *et al*, 2014; Um *et al*, 2010; Wang *et al*, 2017b)。目前, 已在多种鱼类中鉴定出了 Kiss 系统,

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-XKQ01; 2017GH05; 2018GH17)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016018)、国家自然科学基金(31602133; 31502145)、山东省自然科学基金(ZR2016CB02)和国家海水鱼类产业技术体系(CARS-47)共同资助[This work was supported by Grants from the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-XKQ01; 2017GH05; 2018GH17), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016018), the National Natural Science Foundation of China (31602133; 31502145), the National Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB02), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 王 滨, E-mail: wangbin@ysfri.ac.cn; 柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

# 共同第一作者

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-24, 收修改稿日期: 2017-05-18



其在鱼类生殖调控中的生理功能研究也日益完善(Akazome *et al*, 2010; Mechaly *et al*, 2013; Tena-Sempere *et al*, 2012)。本文简要总结鱼类 Kiss 及其受体的研究进展, 并对 Kiss 的生理学功能、信号转导机制以及 *kiss/kissr* 表达调控研究进行概括讨论, 旨在加深对鱼类 Kiss/KissR 系统的认识和了解, 为后续研究奠定基础。

## 1 Kisspeptin 的发现及与生殖的关系

*KISS1* 基因最初是从人(*Homo sapiens*)黑色素瘤和乳腺癌细胞中分离得到的, 因其具有抑制肿瘤生长和转移的功能, Kiss 最初被命名为转移抑制素(Metastin) (Lee *et al*, 1996、1997)。Lee 等(1999)从大鼠(*Rattus norvegicus*)脑中鉴定出了 1 种新型 G 蛋白偶联受体, 命名为 GPR54。2 年后, Kiss 被认为是孤儿受体 GPR54 的内源性配体(Kotani *et al*, 2001; Muir *et al*, 2001; Ohtaki *et al*, 2001)。2003 年, 2 个独立研究组发现, 突变 *GPR54* 导致人特发性性腺功能减退(de Roux *et al*, 2003; Seminara *et al*, 2003)。随后研究发现, 基因敲除 *KISS1* 或者 *GPR54* 均影响性腺发育及生殖功能(d'Anglemont de Tassigny *et al*, 2007; Seminara *et al*, 2003), 说明 Kiss/GPR54 系统在哺乳类生殖调控中发挥了关键作用。

近几年, kisspeptin 在鱼类生殖调控中的作用也有较多研究。如 Kiss1 直接促进了金鱼垂体细胞黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)分泌(Chang *et al*, 2012; Yang *et al*, 2010)。Kiss2 也促进了欧洲海鲈(Espigares *et al*, 2015b)和条纹鲈(Zmora *et al*, 2015)垂体细胞 LH 及卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)分泌。此外, Kiss1 增加了金鱼垂体细胞 *lhβ* 的表达水平(Yang *et al*, 2010)。然而, Kiss1 特异性地降低了欧洲鳗鲡垂体细胞 *lhβ* 的表达水平 (Pasquier *et al*, 2011)。腹腔注射 Kiss2 促进了斑马鱼垂体 *lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平(Kitahashi *et al*, 2009), 而 Kiss2 特异性地促进了斜带石斑鱼垂体 *fshβ* 的表达量, 对 *lhβ* 的表达水平无影响(Shi *et al*, 2010)。综上所述, kisspeptin 参与了鱼类生殖调控, 但具体作用机制因物种而异。

## 2 鱼类 *kiss* 基因类型、结构及时空表达特性

由于 *KISS1/Kiss1* 基因不是很保守, 直到 2008 年才在非哺乳类中鉴定出了其同源基因。van Aerle 等(2008)利用全基因组序列及比较共线性方法, 首次在斑马鱼和青鳉等 5 种鱼类中鉴定出了 *kiss1* 基因。随后, Biran 等(2008)和 Kanda 等(2008)也通过类似方法, 分别在斑马鱼和青鳉中获得了 *kiss1* 基因。2009 年,

*kiss2* 基因首次在斑马鱼、青鳉和欧洲海鲈中被鉴定出来(Felip *et al*, 2009; Kitahashi *et al*, 2009)。斑马鱼 *kiss1* 基因编码 116 个氨基酸的前体多肽, 其 C 末端核心十肽为 YNLNSFGLRY (Y-Y 形式) (Biran *et al*, 2008; van Aerle *et al*, 2008); 斑马鱼 *kiss2* 基因编码 125 个氨基酸的前体多肽, 其 C 末端核心十肽为 FNYNPFGRLR (F-F 形式) (Kitahashi *et al*, 2009)。与之类似, 其他鱼类 C 末端十肽序列与斑马鱼高度保守, 该十肽也是发挥其功能所需的最短序列(Akazome *et al*, 2010; Pasquier *et al*, 2014)。在哺乳类中, *KISS1/Kiss1* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 其中, 外显子 1 只编码一部分 5'UTR, 外显子 2 编码另一部分 5'UTR 及一部分 CDS, 剩余另一部分 CDS 及 3'UTR 由外显子 3 编码(Pasquier *et al*, 2014)。同样, 斑马鱼 *kiss1* 基因也是由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 而 *kiss2* 基因由 2 个外显子和 1 个内含子组成(Kitahashi *et al*, 2009)。塞内加尔鳎 *kiss2* 基因也是由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 但是, 其存在 2 种剪接变体: 较短亚型 *kiss2\_v1* 编码正常 Kiss2 前体多肽; 较长亚型 *kiss2\_v1* 编码一种缩短形式的无功能多肽(Mechaly *et al*, 2011)。

鱼类 *kiss1* 及 *kiss2* 的组织分布因物种而异, 即使同一物种不同脑区表达也有所差异。斑马鱼 *kiss1* 主要在间脑和中脑中表达, 其次为后脑, 在端脑和垂体中表达量较低(Biran *et al*, 2008); 在外周组织中, 斑马鱼 *kiss1* 在胰腺和前肠中表达量较高, 其次为性腺(Biran *et al*, 2008)。与之类似, 青鳉(Felip *et al*, 2009; Kitahashi *et al*, 2009)、欧洲海鲈(Felip *et al*, 2009)、金鱼(Li *et al*, 2009; Yang *et al*, 2010)、鲈鱼(Shahjahan *et al*, 2010)等脑和性腺中 *kiss1* 表达量也较高。*kiss2* 也主要在脑和性腺中高表达, 如斑马鱼(Kitahashi *et al*, 2009)、青鳉(Kitahashi *et al*, 2009)、金鱼(Li *et al*, 2009)、欧洲海鲈(Felip *et al*, 2009)、塞内加尔鳎(Mechaly *et al*, 2011)及南亚黑鲷(*Labeo rohita*) (Saha *et al*, 2016)等。此外, *kiss2* 也在肠、肾脏、心脏等其他外周组织有所表达, 具体表达模式具有物种特异性。

鱼类 *kiss* 基因在不同发育阶段/生殖周期的表达模式也在斑马鱼等几种鱼类中有所报道。雌性斑马鱼脑 *kiss1* 表达量在孵化后逐渐升高, 84 d 时达到峰值; 而雄性斑马鱼脑 *kiss1* 表达量在孵化后 6 周达到峰值, 12 周时有所下降(Biran *et al*, 2008)。此外, 斑马鱼 *kiss2* 表达量在孵化后 30 d 达到峰值(Kitahashi *et al*, 2009)。上述结果显示, *kiss* 可能参与了斑马鱼青春启动。鲈鱼脑 *kiss* 在不同生殖周期的表达模式具有性别二态性, 雄性脑 *kiss1* 表达量随精巢发育逐渐降低, 而雌性脑 *kiss1* 表达量在卵巢发育过程中保持不变; 除

了分别在卵黄生成早期和精子生成晚期略微增加外,雌雄脑 *kiss2* 表达量随性腺发育逐渐降低,均在产卵/排精后达到最小值(Selvaraj *et al*, 2010)。然而,精巢 *kiss1* 表达水平随性腺发育逐渐升高,在精子成熟时期达到峰值;卵巢 *kiss1* 表达水平也随性腺发育逐渐升高,在卵黄生成后期达到峰值(Selvaraj *et al*, 2010)。以上结果表明, *kiss* 可能参与了鲈鱼季节性性腺发育。其他鱼类 *kiss* 表达水平也随性腺发育而发生波动(Alvarado *et al*, 2013; Migaud *et al*, 2012; Park *et al*, 2016; Saha *et al*, 2016; Shahi *et al*, 2017)。

### 3 鱼类 *kissr* 基因类型、结构及时空表达特性

Parhar 等(2004)首次在罗非鱼中鉴定出了 *GPR54* 的同源基因(*kiss2r*),随后在鲮鱼(*Mugil cephalus*) (Nocillado *et al*, 2007)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (Mohamed *et al*, 2007)、斑马鱼(Biran *et al*, 2008; van Aerle *et al*, 2008)、黑头呆鱼(*Pimephales promelas*) (Filby *et al*, 2008)、塞内加尔鳎(Mechaly *et al*, 2009)、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*) (Mechaly *et al*, 2010)、斜带石斑鱼(Shi *et al*, 2010)及星点东方鲀(Shahjahan *et al*, 2010)中也鉴定出了 *kiss2r* 基因。另外, *kiss1r* 基因也在斑马鱼(Biran *et al*, 2008)、青鳉(Lee *et al*, 2009)及金鱼(Li *et al*, 2009)中被鉴定出来。同 *kiss2* 基因类似,迄今在所有研究的鱼类中都存在 *kiss2r* 基因,表明 *kiss2/kiss2r* 系统在进化过程中高度保守。欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)是目前唯一拥有3种 *kissr* 基因的硬骨鱼类(Pasquier *et al*, 2012)。在哺乳类中, *Kiss1R* 基因由5个外显子和4个内含子组成,而青鳉和欧洲海鲈 *kiss1r* 基因均由6个外显子和5个内含子组成(Tena-Sempere *et al*, 2012)。塞内加尔鳎 *kiss2r* 基因由5个外显子和4个内含子组成(Mechaly *et al*, 2009)。有些鱼类 *kissr* 有多种剪接异构体,如塞内加尔鳎(2种 *kiss2r* 亚型) (Mechaly *et al*, 2009)、黄条鲮(*Seriola lalandi*) (5种 *kiss2r* 亚型) (Nocillado *et al*, 2012)、蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*) (2种 *kiss2r* 亚型) (Nocillado *et al*, 2012)、斑马鱼(5种 *kiss1r* 亚型) (Onuma *et al*, 2012)及欧洲鳗鲡(3种 *kiss1r* 亚型) (Pasquier *et al*, 2012)。鱼类 *KissR* 属于 G 蛋白偶联受体,由3个胞外环、3个胞内环、胞外 N 端区以及胞内 C 端区组成。在鲮鱼(Nocillado *et al*, 2007)、大西洋庸鲽(Mechaly *et al*, 2010)、星点东方鲀(Shahjahan *et al*, 2010)、蓝鳍金枪鱼(Nocillado *et al*, 2012)、黄条鲮(Nocillado *et al*, 2012)及半滑舌鳎(Wang *et al*, 2017a)的 *Kiss2R* 中均存在3个糖基化位点和多个磷酸化位点。

在鱼类中, *kiss1r* 及 *kiss2r* 的组织分布因物种而

异。斑马鱼 *kiss1r* 主要在脑和垂体中表达,在肠、肾脏、胰腺及脂肪组织中也有所表达(Biran *et al*, 2008)。鲈鱼 *kiss1r* 的表达模式具有性别二态性,雄性 *kiss1r* 的表达量在脑中最高,其次为脾脏、性腺及心脏,但在垂体中不表达;雌性 *kiss1r* 主要在脑中表达,在鳃、心脏、胰腺及脾脏等组织中表达量较低,在垂体中不表达(Ohga *et al*, 2013)。金鱼 *kiss2r* 主要在脑中表达,在性腺和脂肪组织中也有表达(Li *et al*, 2009);欧洲鳗鲡 *kiss2r* 主要在脑和垂体中表达,但在肝脏和脂肪组织中不表达(Pasquier *et al*, 2011)。然而, *kiss2r* 只在裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)脑中表达(Fairgrieve *et al*, 2016)。总体来说, *kiss2r* 在黑头呆鱼(Filby *et al*, 2008)、斑马鱼(Biran *et al*, 2008; van Aerle *et al*, 2008)、塞内加尔鳎(Mechaly *et al*, 2009)、星点东方鲀(Shahjahan *et al*, 2010)、蓝鳍金枪鱼(Nocillado *et al*, 2012)、黄条鲮(Nocillado *et al*, 2012)、鲈鱼(Ohga *et al*, 2013)及半滑舌鳎(Wang *et al*, 2017a)的脑中高度表达。此外, *kiss2r* 也在垂体、卵巢、精巢、心脏及其他外周组织有所表达,具体表达模式因物种而异。

通常,哺乳类下丘脑 *Kiss1R* 的表达水平在青春期显著性增加(Dungan *et al*, 2006)。鱼类 *kissr* 的表达模式也与生殖周期有关。鲮鱼脑 *kiss2r* 的表达水平随性腺发育而降低,在青春期前期表达量最高(Nocillado *et al*, 2007)。与之类似,军曹鱼、黑头呆鱼及大西洋庸鲽脑 *kiss2r* 的表达量也均在青春期达到峰值(Filby *et al*, 2008; Mechaly *et al*, 2010; Mohamed *et al*, 2007)。斑马鱼脑 *kiss2r* 的表达量在孵化后8周时显著性增加,随后回到本底水平;而 *kiss1r* 的表达量在孵化后6周时显著增加,随后一直保持到12周(Biran *et al*, 2008)。鲈鱼脑 *kissr* 在不同生殖周期的表达模式具有性别二态性,雄鱼脑 *kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平不随精巢发育过程而变化;而雌鱼脑 *kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平均在卵黄生成早期显著增加并达到峰值,继而随卵巢发育过程又回到本底水平(Ohga *et al*, 2013)。精巢 *kiss1r* 表达水平随性腺发育逐渐升高,在精子成熟时期达到峰值;而精巢 *kiss2r* 表达水平不随性腺发育过程而变化(Ohga *et al*, 2013)。综上所述, *kissr* 可能参与了鱼类青春期启动及季节性性腺发育。

## 4 Kisspeptin 对鱼类生殖调控作用研究

### 4.1 Kisspeptin 对下丘脑促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元活性以及表达调控的影响

GnRH 是垂体促性腺激素合成与分泌的主要促进因子,在每种硬骨鱼类中存在至少2种 GnRH 多肽

(Zohar *et al*, 2010; 王滨等, 2017)。Parhar 等(2004)首次在罗非鱼中鉴定出了 *kiss2r* 基因, 并进一步证实 *kiss2r* 在 GnRH1、GnRH2 及 GnRH3 神经元中表达, 这表明 Kiss2 能够直接作用于 GnRH 神经元, 进而影响其活性及表达调控。在青鳉中, 通过电生理学研究表明, Kiss1 能够促进 GnRH3 神经元的电活动(Electrical activity), 而河豚毒素或者阻断突触传递均降低了 Kiss1 诱导的 GnRH3 神经元的电活动, 这表明 Kiss1 以间接方式通过突触调控进而激活 GnRH3 神经元的电活动(Zhao *et al*, 2012)。

由于鱼类存在多种 *kiss* 及 *gnrh* 基因, 导致 Kiss 多肽对 *gnrh* 的表达调控更具复杂性。腹腔/肌肉注射 Kiss1 和 Kiss2 均不影响斑马鱼和杂交条纹鲈(*M. saxatilis* × *M. chrysops*) 脑 *gnrh2* 以及 *gnrh3* 的表达水平(Kitahashi *et al*, 2009; Zmora *et al*, 2012)。同样, Kiss2 也不影响半滑舌鳎离体孵育下丘脑中 *gnrh2* 以及 *gnrh3* 的表达水平(Wang *et al*, 2017a)。腹腔注射 Kiss1 不影响黑头呆鱼脑 *gnrh2* 的表达水平, 却促进了 *gnrh3* 的表达水平(Filby *et al*, 2008)。而腹腔注射 Kiss2 不影响斜带石斑鱼下丘脑 *gnrh3* 的表达水平, 却促进了 *gnrh1* 的表达水平(Shi *et al*, 2010)。同样, 腹腔注射 Kiss2 也促进了尼罗罗非鱼脑 *gnrh1* 的表达水平(Park *et al*, 2016)。相反, 侧脑室注射 Kiss1 和 Kiss2 均降低了欧洲海鲈前中脑 *gnrh1* 和 *gnrh2* 的表达水平, 对前中脑 *gnrh3* 及下丘脑 *gnrh1* 的表达水平无影响(Espigares *et al*, 2015a)。埋植 Kiss1 和 Kiss2 均不影响黄条鲮脑 *gnrh1* 的表达水平(Nocillado *et al*, 2013), 却降低了条纹鲈脑 *gnrh1*、*gnrh2* 及 *gnrh3* 的表达水平(Zmora *et al*, 2014)。特别是 Kiss 对鲈鱼脑 *gnrh1* 的表达调控具有性别二态性, 并且取决于注射途径。皮下埋植 Kiss1 和 Kiss2 均不影响雄性脑 *gnrh1* 的表达水平, 而 Kiss2 促进了雌性脑 *gnrh1* 的表达水平(Selvaraj *et al*, 2013a)。侧脑室注射 Kiss1 和 Kiss2 均不影响雄性脑 *gnrh1* 的表达水平, 而 Kiss2 抑制了雌性脑 *gnrh1* 的表达水平(Ohga *et al*, 2014)。此外, Kiss 对杂交条纹鲈脑 *gnrh1* 的表达调控与生殖周期有关。在青春前期, 肌肉注射 Kiss1 和 Kiss2 均上调了 *gnrh1* 的表达水平; 在性腺复苏期, Kiss1 不影响 *gnrh1* 的表达水平, 然而, Kiss2 显著性抑制了 *gnrh1* 的表达水平(Zmora *et al*, 2012)。综上所述, Kiss 对下丘脑 *gnrh* 亚型的表达调控具有物种特异性和性别二态性, 也与生殖周期和注射途径有关。此外, Kiss1 和 Kiss2 在不同物种间参与生殖调控的作用方式可能有所差异。

#### 4.2 Kisspeptin 对垂体激素合成与分泌的影响

腹腔注射 Kiss1 不影响斑马鱼垂体生长激素(Growth

hormone) *gh*、*lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平(Kitahashi *et al*, 2009)。皮下及侧脑室注射 Kiss1 也均不影响鲈鱼垂体 *lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平(Ohga *et al*, 2014; Selvaraj *et al*, 2013b)。Kiss1 特异性地降低了欧洲鳗鲡垂体细胞 *lhβ* 的表达水平, 对 *gh*、*gtha*、*fshβ* 及 *tshβ* 的表达量无影响(Pasquier *et al*, 2011)。相反, Kiss1 增加了金鱼垂体细胞 *gh*、*lhβ* 及 *prl* 的表达水平(Yang *et al*, 2010)。长期埋植 Kiss1, 只促进了非生殖季黄条鲮垂体 *lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平(Nocillado *et al*, 2013)。腹腔注射 Kiss2 不影响斑马鱼垂体 *gh* 的表达水平, 却促进了 *lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平(Kitahashi *et al*, 2009)。相反, Kiss2 不影响黄条鲮(Nocillado *et al*, 2013)、条纹鲈(Zmora *et al*, 2014)及欧洲海鲈(Espigares *et al*, 2015b)垂体 *lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平。Kiss2 特异性地促进了斜带石斑鱼垂体 *fshβ* 的表达量, 对 *lhβ* 的表达水平无影响(Shi *et al*, 2010)。皮下注射 Kiss2 不影响鲈鱼垂体 *lhβ* 及 *fshβ* 的表达水平(Selvaraj *et al*, 2013b), 而侧脑室注射 Kiss2 却促进了二者的表达水平(Ohga *et al*, 2014)。综上所述, Kiss 对垂体激素基因的表达调控作用具有物种特异性, 也与注射途径和生殖周期有关。

由于鱼类中存在 2 种 Kiss 多肽, Kiss 对鱼类垂体激素分泌的影响更加复杂。肌肉注射 Kiss1 和 Kiss2 均提高了青春期前的欧洲海鲈血清 LH 水平(Felip *et al*, 2009); 腹腔注射 Kiss1 而非 Kiss2 也提高了性成熟雌性金鱼血清 LH 水平 (Li *et al*, 2009)。但 Kiss1 和 Kiss2 均不影响金鱼垂体细胞 LH 分泌(Li *et al*, 2009)。相反, 另有研究表明, Kiss1 直接促进了金鱼垂体细胞 LH 分泌(Chang *et al*, 2012; Yang *et al*, 2010)。最近研究报道, Kiss2 而非 Kiss1 促进了欧洲海鲈(Espigares *et al*, 2015b)和条纹鲈(Zmora *et al*, 2015)垂体细胞 LH 分泌。Kiss1 和 Kiss2 对杂交条纹鲈 LH 分泌的调控作用与生殖周期相关。在青春前期, 肌肉注射 Kiss2 而非 Kiss1 增加了血清中 LH 水平; 在性腺复苏期, Kiss1 和 Kiss2 均增加了血清中 LH 水平(Zmora *et al*, 2012)。关于 FSH 分泌调控, 肌肉注射 Kiss2 提高了青春期前的欧洲海鲈血清 FSH 水平, 但是, Kiss1 无影响(Felip *et al*, 2009)。同样, Kiss2 而非 Kiss1 促进了欧洲海鲈垂体细胞 FSH 分泌(Espigares *et al*, 2015b)。此外, Kiss1 和 Kiss2 均促进了条纹鲈垂体细胞 FSH 分泌(Zmora *et al*, 2015)。而长期埋植 Kiss2 显著性地降低了条纹鲈血清 FSH 水平(Zmora *et al*, 2014)。在鱼类中, 关于 Kiss 对 GH 分泌的影响仅见于金鱼, Kiss1 促进了金鱼垂体细胞 GH 分泌(Chang *et al*, 2012; Yang *et al*, 2010)。综上所述, Kiss 对垂体激素分泌的调控作用因物种、生殖周期和注射途径而异, 甚至在同一物种的不同生殖周期

Kiss1 和 Kiss2 可能发挥了不同的作用。

### 4.3 Kisspeptin 对性腺发育及类固醇激素分泌的影响

除了作用于下丘脑和垂体外, Kiss 也能够直接作用于性腺, 从而影响其发育及类固醇激素的分泌, 进而影响生殖调控。最初, Elizur 等(2011)通过长期埋植研究表明, Kiss1 和 Kiss2 均能促进青春前期的黄条鲮精巢发育。随后在白鲈(*Morone chrysops*)中研究发现, 长期注射 Kiss1 和 Kiss2 也均不同程度地促进了雌雄性腺发育(Beck *et al.*, 2012)。皮下埋植 Kiss1 也诱导了鲑鱼雌雄性腺发育, 但 Kiss2 无影响(Selvaraj *et al.*, 2013a)。然而, 腹腔注射 Kiss2 促进了罗非鱼雌雄性腺发育(Park *et al.*, 2016)。Kiss1 也促进了小丑鱼(*Amphiprion melanopus*; 雌雄同体, 先雄后雌)性逆转过程(Kim *et al.*, 2015)。相反, Tang 等(2015)通过 TALENs 研究表明, 敲除 *kiss/kissr* 系统并不影响斑马鱼性腺发育。

众所周知, E2(17 $\beta$ -estradiol)和 11-KT(11-ketotestosterone)分别是参与卵巢和精巢发育的雌雄类固醇激素, 其分泌主要受到垂体 LH 及 FSH 调控。在鱼类中研究表明, Kiss 通过影响性类固醇激素分泌进而影响性腺发育。皮下埋植 Kiss1 分别增加了雌雄鲑鱼血清 E2 及 11-KT 的水平(Selvaraj *et al.*, 2013a)。腹腔注射 Kiss2 也分别增加了雌雄罗非鱼血清 E2 及 11-KT 的水平(Park *et al.*, 2016)。然而, 埋植 Kiss1 和 Kiss2 均不影响黄条鲮血清 11-KT 水平(Nocillado *et al.*, 2013)。综上所述, Kiss 对鱼类性腺发育及类固醇激素分泌的调控作用具有物种特异性, 需要进一步深入研究。

## 5 鱼类 kisspeptin 的信号转导机制

在哺乳类中, Kiss 能够激活多种细胞内信号通路, 例如 PLC/IP3/PKC、MAPK 以及 Ca<sup>2+</sup>通路等(Castano *et al.*, 2009; Pasquier *et al.*, 2014), 而非哺乳类中有关 Kiss 信号转导机制的研究相对较少。在两栖类中, Moon 等(2009)通过 CRE-luc(对应 AC/PKA 通路)和 SRE-luc(对应 PLC/PKC 通路)报告系统表明, Kiss 能够激活转染了牛蛙(*Rana catesbeiana*) Kiss2R 的非洲绿猴肾纤维细胞系(CV-1 cells)中 SRE-luc 的活性, 但对 CRE-luc 活性无影响。此外, PKC 抑制剂 GF109203X 预处理 CV-1 细胞系显著性地降低了 Kiss 诱导的 SRE-luc 的活性, 而 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 预处理 CV-1 细胞系部分阻断了 Kiss 诱导的 SRE-luc 的活性, 上述结果显示, 牛蛙 Kiss2R 可能主要与 PKC 通路偶联, 部分与 Rho 激酶通路偶联(Moon *et al.*, 2009)。同样, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) 3 种 KissR 也都与 PKC 通路偶联(Lee *et al.*, 2009)。

在鱼类中, 由于存在 2 种 Kiss 及 3 种 KissR, 且不同配体与受体之间能够互作, 导致其信号转导机制更加复杂。斜带石斑鱼中只存在 Kiss2/Kiss2R 系统, Kiss2 能够激活转染了石斑鱼 Kiss2R 的 COS-7 细胞系中 SRE-luc 的活性, 但是, 对 CRE-luc 活性无影响(Shi *et al.*, 2010)。同样, 斑马鱼 Kiss2R 也只与 PKC 通路偶联, 而 Kiss1R 均与 PKC 和 PKA 通路偶联(Biran *et al.*, 2008)。相反, 鲑鱼 Kiss1R 只与 PKC 通路偶联, 而 Kiss2R 均与 PKC 和 PKA 通路偶联(Ohga *et al.*, 2013)。尽管蓝鳍金枪鱼、黄条鲮和半滑舌鲷 Kiss2R 均与 PKC 和 PKA 通路偶联, 但其功能主要由 PKC 通路介导(Nocillado *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017c)。此外, 在金鱼和欧洲海鲈中存在 2 种 Kiss 和 KissR, 每种配体均能激活 2 种受体, 但表现出不同的配体选择性。欧洲海鲈 Kiss1 与 Kiss1R 亲和性较高, 而 Kiss2 与 Kiss2R 亲和性较高, 配体受体结合后, 均能激活 PKA 和 PKC 通路(Felip *et al.*, 2015)。相反, 金鱼 Kiss1 与 Kiss2R 亲和性较高, 而 Kiss2 与 Kiss1R 亲和性也较高, 二者结合后, 也均能激活 PKA 和 PKC 通路(Li *et al.*, 2009)。此外, Ca<sup>2+</sup>通路参与了 Kiss1 诱导的金鱼垂体细胞 LH 及 GH 分泌(Chang *et al.*, 2012)。综上所述, 多种信号通路介导了鱼类 Kiss/KissR 系统的功能, 然而 Kiss 参与鱼类生殖调控的作用机制网络尚不完善, 需要进一步深入研究。

## 6 鱼类 kiss/kissr 系统的表达调控研究

### 6.1 性类固醇激素及甲状腺激素对 *kiss/kissr* 系统的调控作用

性类固醇激素是影响 *kiss* 基因表达的主要调控因子之一, 其对 *kiss* 基因的不同调控(上调/下调)完美解释了性类固醇激素对生殖调控的正负反馈机制, 这也是生殖神经内分泌领域研究的一大进展(Kitahashi *et al.*, 2013)。在青鳉中, 卵巢切除后, 导致其下丘脑核腹侧结节(Nucleus ventral tuberis, NVT)中 Kiss1 神经元的数量显著性降低, 而 E2 处理后, NVT 中 Kiss1 神经元的数量又回到本底水平, 这表明 NVT 中 Kiss1 神经元可能参与了生殖轴的正反馈调控(Kanda *et al.*, 2008)。进一步研究表明, 青鳉 Kiss1 神经元中表达 E2 受体, 然而 Kiss2 神经元中不表达 E2 受体, 且卵巢切除后不影响 Kiss2 神经元的数量, 这表明 Kiss1 而非 Kiss2 直接参与了青鳉生殖调控(Mitani *et al.*, 2010)。相反, 卵巢切除后, 只降低了金鱼下丘脑视前区(Preoptic area, POA)中 Kiss2 神经元的数量, 而 E2 处理后 POA 中, Kiss2 神经元的数量又回到本底水平, 并且, 只有

Kiss2 神经元中表达 E2 受体, 这表明 Kiss2 而非 Kiss1, 直接参与了金鱼生殖调控(Kanda *et al*, 2012)。E2 促进了斑马鱼脑 *kiss2*、*kiss2r* 及 *kiss1* 的表达水平, 对 *kiss1r* 的表达水平无影响(Servili *et al*, 2011)。与之类似, E2 也促进了蓝刻齿雀鲷(*Chrysiptera cyanea*)脑和欧洲海鲈垂体细胞 *kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平(Espigares *et al*, 2015b; Imamura *et al*, 2016)。然而, 用 E2 处理卵巢切除后的欧洲海鲈, 却不影响其下丘脑中 *kiss1*、*kiss2*、*kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平(Alvarado *et al*, 2016)。同样, E2 也不影响半滑舌鳎下丘脑中 *kiss2* 及 *kiss2r* 的表达水平(Wang *et al*, 2017b)。根据浓度及处理时间的不同, EE2(17 $\alpha$ -ethinylestradiol)促进或者抑制了稀有鮑鲫(*Gobiocypris rarus*)脑 *kiss1*、*kiss2*、*kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平(Yang *et al*, 2016)。

Kiss/KissR 系统也介导了睾酮(Testosterone, T)对生殖轴的反馈调控。一方面, 用睾酮处理卵巢切除后的雌性条纹鲈, 降低了其脑中 *kiss1*、*kiss2* 及 *kiss2r* 的表达水平(Klenke *et al*, 2011)。另一方面, 用睾酮处理精巢切除后的雄性欧洲海鲈, 降低了其下丘脑中 *kiss2* 的表达水平, 却不影响 *kiss1*、*kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平(Alvarado *et al*, 2016)。然而, 睾酮促进了雄性欧洲海鲈垂体细胞 *kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平, 对 *kiss2* 的表达水平无影响(Espigares *et al*, 2015b)。此外, 睾酮也不影响半滑舌鳎下丘脑中 *kiss2* 及 *kiss2r* 的表达水平(Wang *et al*, 2017b)。目前, 关于甲状腺激素(Thyroid hormone)对鱼类 *kiss/kissr* 系统的调控作用仅见于罗非鱼。腹腔注射甲状腺激素, 显著地增加了罗非鱼脑 *kiss2* 的表达水平, 但由于甲状腺激素受体不在 Kiss2 神经元中表达, 这表明甲状腺激素是以间接的方式影响 *kiss2* 的表达(Ogawa *et al*, 2013)。综上所述, 性类固醇激素及甲状腺激素通过影响 *kiss/kissr* 系统的表达水平进而影响鱼类生殖调控。

## 6.2 Kisspeptin 等神经肽对 *kiss/kissr* 系统的调控作用

在鱼类中, Kiss 对 *kiss/kissr* 系统的自分泌调控也进行了研究。颅腔注射 Kiss1 抑制了斑马鱼松果体中 *kiss1* 的表达水平(Ogawa *et al*, 2012), 而 Kiss2 促进了半滑舌鳎下丘脑中 *kiss2* 的表达水平(Wang *et al*, 2017a)。腹腔注射 Kiss1 促进了黑头呆鱼脑 *kiss2r* 的表达水平(Filby *et al*, 2008)。然而, 埋植 Kiss1 和 Kiss2 均不影响黄条鲮脑 *kiss2r* 的表达水平(Nocillado *et al*, 2013)。同样, 侧脑室注射 Kiss1 和 Kiss2 也不影响欧洲海鲈下丘脑 *kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平, 却促进了前中脑 *kiss2r* 的表达水平(Espigares *et al*, 2015a)。而 Kiss2 却抑制了半滑舌鳎下丘脑中 *kiss2r* 的表达水平

(Wang *et al*, 2017a)。特别是 Kiss 对杂交条纹鲈脑 *kiss2r* 的表达调控与生殖周期有关。在青春前期, 肌肉注射 Kiss1 不影响 *kiss2r* 的表达水平, 而 Kiss2 上调了 *kiss2r* 的表达水平; 在性腺复苏期, Kiss1 和 Kiss2 均显著地抑制了 *kiss2r* 的表达水平(Zmora *et al*, 2012)。综上所述, Kiss 对 *kiss/kissr* 系统的表达调控因物种、生殖周期和注射途径而异, 甚至在同一物种的不同生殖周期, Kiss1 和 Kiss2 可能发挥了不同的作用。

促性腺激素抑制激素(Gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH)是迄今为止在脊椎动物中鉴定出的唯一具有抑制生殖功能的下丘脑神经肽, 通过其受体 GnIHR (之前被称作 GPR147)介导作用于脑-垂体-性腺轴进而影响动物生殖调控(Tsutsui *et al*, 2010; Ubuka *et al*, 2016; Wang *et al*, 2018)。目前, 从鱼类到哺乳类都鉴定出了 *gnih/gnihr* 的同源基因, 并且每种鱼类 *gnih* 基因编码有 2 种或者 3 种成熟多肽, 即 GnIH-1、GnIH-2 及 GnIH-3 (Ogawa *et al*, 2014; Tsutsui *et al*, 2010; Ubuka *et al*, 2016; 王滨等, 2016)。GnIH 对 *kiss/kissr* 的表达调控也有少数报道。在半滑舌鳎中, GnIH-1 和 GnIH-2 均不影响下丘脑中 *kiss2* 的表达水平(刘权等, 2017)。腹腔注射斜带石斑鱼 3 种 GnIH 多肽也不影响其下丘脑 *kiss2* 的表达水平(Wang *et al*, 2015)。此外, 哺乳类 GnIH 同源多肽 RFRP3 也不影响大鼠 *kiss1* 表达水平(Johnson *et al*, 2008)。尽管侧脑室注射欧洲海鲈 GnIH-1 不影响其脑 *kiss1*、*kiss2*、*kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平, 但是, GnIH-2 均降低了 *kiss1*、*kiss2* 及 *kiss1r* 的表达水平, 这说明在欧洲海鲈中, GnIH-2 主要发挥了生殖调控的抑制作用(Paullada-Salmeron *et al*, 2016)。

尽管 Kiss 能够通过直接作用于 GnRH 神经元, 促进 GnRH 分泌进而上调生殖轴, GnRH 也能够反作用于 *kiss/kissr* 系统, 进而影响其表达调控。GnRH 类似物(D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>Net)-mGnRH<sub>a</sub> 促进了欧洲海鲈垂体细胞 *kiss2* 的表达水平, 对 *kiss1r* 及 *kiss2r* 表达水平无影响(Espigares *et al*, 2015b)。同样, GnRH 类似物不影响黄条鲮和半滑舌鳎 *kiss2r* 的表达水平(Nocillado *et al*, 2013; Wang *et al*, 2017a), 也不影响半滑舌鳎 *kiss2* 的表达水平(Wang *et al*, 2017a)。总之, 关于 GnRH 对 *kiss/kissr* 系统的表达调控作用研究较少, 需要进一步深入研究。

## 6.3 光照对 *kiss/kissr* 系统的调控作用

光照是影响鱼类及其他脊椎动物生殖调控的一个重要环境因子, 其作用主要由松果体夜间分泌的褪黑激素介导(Kitahashi *et al*, 2013)。目前, 关于光照对

鱼类 *kiss/kissr* 系统的表达调控研究相对较少且存在争议。如持续性光照降低了罗非鱼脑 *kiss2r* 的表达水平,表明光照能够以直接或者间接的方式影响 *kiss2r* 的表达(Martinez-Chavez *et al*, 2008)。同样,持续性光照导致欧洲海鲈前中脑 *kiss1* 及 *kiss1r* 的表达量不再随季节变化而变化(Espigares *et al*, 2017)。长光照(繁殖状态)条件下,青鳉下丘脑核腹侧结节中 *Kiss1* 神经元的数量显著性高于短光照(非繁殖状态)(Kanda *et al*, 2008)。而在模拟自然光照(促进生殖)条件和持续性光照(抑制生殖)条件下,大西洋鳕(*Gadus morhua*)脑 *kiss2* 及 *kiss2r* 的表达量无显著性差异,这说明光照不影响大西洋鳕 *kiss2/kiss2r* 基因表达(Cowan *et al*, 2012)。特别是褪黑激素促进了斑马鱼脑 *kiss1* 及 *kiss2* 的表达水平(Carnevali *et al*, 2011),却抑制了欧洲海鲈脑 *kiss1* 及 *kiss2* 的表达水平(Alvarado *et al*, 2015)。综上所述,*Kiss/KissR* 系统可能介导了光照(及褪黑激素)对鱼类生殖调控过程,然而具体作用机制因种而异,需要进一步深入研究。

#### 6.4 温度对 *kiss/kissr* 系统的调控作用

对变温动物而言,温度是影响其生殖调控的一个重要环境因子。水温升高或者降低均能抑制鱼类生殖,但其分子机制仍不清楚。*Kiss* 作为鱼类生殖调控的一个重要因子,温度对 *kiss/kissr* 基因的表达调控作用也有了初步研究。斑马鱼最适繁殖温度为 26℃~28℃,低于 20℃或者高于 30℃均能降低其繁殖能力(Shahjahan *et al*, 2013)。将斑马鱼置于低温(15℃)、正常温度(27℃)和高温(35℃) 7 d 后研究发现,低温组斑马鱼全脑 *kiss1* 的表达量显著性增加,高温组 *kiss1* 的表达量与正常组相比无显著性差异;而低温组和高温组斑马鱼全脑 *kiss2* 的表达量较正常组均显著性降低(Shahjahan *et al*, 2013)。此外,低温也增加了斑马鱼松果体等部分脑区 *kiss1r* 的表达量,然而,低温和高温均降低了斑马鱼下丘脑等部分脑区 *kiss2r* 的表达量(Shahjahan *et al*, 2013)。上述结果表明,温度调控斑马鱼 *kiss1/kiss1r* 及 *kiss2/kiss2r* 表达的作用机制是不同的,低温激活了 *kiss1/kiss1r* 系统,而低温和高温均抑制了 *kiss2/kiss2r* 系统,说明 *kiss1/kiss1r* 和 *kiss2/kiss2r* 系统可能参与了斑马鱼不同的生理功能(Shahjahan *et al*, 2013)。

同样,将星点东方鲀置于低温(14℃)、正常温度(21℃)和高温(28℃) 7 d 后研究发现,低温组和高温组性腺指数 GSI 显著性降低;低温组和高温组脑 *kiss2/kiss2r* 表达量也显著性降低;与此同时,低温和高温组均抑制了脑 *gnrh1*、垂体 *fshβ* 及 *lhβ* 的表达水平(Shahjahan

*et al*, 2016)。上述结果表明,低温和高温组通过抑制 *kiss/gnrh1/gth* 系统,进而阻断星点东方鲀生殖。银汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)的性别决定、分化与温度紧密相关,低温(17℃~19℃)导致 100%全雌,高温(29℃)导致 100%全雄,而 24℃~25℃导致雌雄比例各半(Tovar Bohorquez *et al*, 2017)。在高温条件下,银汉仔鱼整个脑部 *kiss2* 的表达量在孵化后 4 周显著性增加;而在低温条件下,脑部 *kiss2* 的表达量在孵化后 8 周内保持不变,这表明 *Kiss2* 可能在雄性发育过程中性别决定阶段发挥了重要作用(Tovar Bohorquez *et al*, 2017)。

#### 6.5 饥饿对 *kiss/kissr* 系统的调控作用

营养状况也会影响动物生殖活动。目前,关于 *Kiss* 介导的能量平衡与生殖之间关系的研究较少。在哺乳类中,饥饿导致小鼠(*Mus musculus*)下丘脑 *kiss1* 及 *kiss1r* 表达量降低(Luque *et al*, 2007)。同样,饥饿也降低了大鼠下丘脑 *kiss1* 的表达量,却增加了 *kiss1r* 的表达量(Castellano *et al*, 2005)。在鱼类中,饥饿 15 d 导致塞内加尔鲷体重减少,却增加了下丘脑 *kiss2* 及 *kiss2r* 的表达水平,但对胃中 *kiss2* 及 *kiss2r* 的表达水平无影响(Mechaly *et al*, 2011)。同样,饥饿也增加了欧洲海鲈下丘脑 *kiss1*、*kiss2*、*kiss1r* 及 *kiss2r* 的表达水平(Escobar *et al*, 2016)。综上所述,饥饿对哺乳类和鱼类 *kiss/kissr* 系统的不同调控作用表明,该系统可能在哺乳类和鱼类能量平衡过程中起着相反的作用。此外,*Kiss/KissR* 系统是否参与了鱼类摄食调控仍不得而知,需要进一步深入研究。

## 7 小结

*Kiss* 是一种多功能的神经肽,它在下丘脑-垂体-性腺轴多个水平参与了哺乳动物生殖调控。目前,尽管已在多种鱼类中鉴定出了 *Kiss/KissR* 系统,但其在鱼类生殖调控中的精确作用需要进一步研究;*Kiss* 调控垂体激素分泌及其基因表达的信号转导机制网络需要进一步完善;*Kiss* 是否参与鱼类摄食调控及其作用机制尚未阐明;*Kiss* 与其他因子(例如 *GnIH*、*GnRH* 等)之间如何互动,在生殖轴各个水平将多种信号整合进而调控生殖等生理过程仍不清楚,只有阐明上述机制才能更好地了解 *Kiss* 参与鱼类生殖、生长及代谢的协调过程。该综述总结了鱼类 *Kiss* 及其受体的研究进展,并对 *Kiss* 的生理学功能、信号转导机制以及 *kiss/kissr* 表达调控研究进行概括讨论,增加了人们对 *Kiss/KissR* 系统参与鱼类生殖调控机制的认识,为后续研究提供参考。

## 参 考 文 献

- Akazome Y, Kanda S, Okubo K, *et al.* Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(1): 161–182
- Alvarado MV, Carrillo M, Felip A. Expression of kisspeptins and their receptors, *gnrh-1/gnrhr-II-1a* and gonadotropin genes in the brain of adult male and female European sea bass during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 187: 104–116
- Alvarado MV, Carrillo M, Felip A. Melatonin-induced changes in kiss/*gnrh* gene expression patterns in the brain of male sea bass during spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 185: 69–79
- Alvarado MV, Servili A, Moles G, *et al.* Actions of sex steroids on kisspeptin expression and other reproduction-related genes in the brain of the teleost fish European sea bass. *Journal of Experimental Biology*, 2016, 219: 3353–3365
- Beck BH, Fuller SA, Peatman E, *et al.* Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus *Morone*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2012, 162(3): 265–273
- Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biology of Reproduction*, 2008, 79(4): 776–786
- Carnevali O, Gioacchini F, Maradonna F, *et al.* Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *PLoS One*, 2011, 6: e19978
- Castano JP, Martinez-Fuentes AJ, Gutierrez-Pascual E, *et al.* Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*, 2009, 30(1): 10–15
- Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 2005, 146(9): 3917–3925
- Chang JP, Mar A, Wlasichuk M, *et al.* Kisspeptin-1 directly stimulates LH and GH secretion from goldfish pituitary cells in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 179(1): 38–46
- Cowan M, Davie A, Migaud H. Photoperiod effects on the expression of kisspeptin and gonadotropin genes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, during first maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2012, 163(1): 82–94
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(25): 10714–10719
- de Roux N, Genin E, Carel JC, *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(19): 10972–10976
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 2006, 147(3): 1154–1158
- Elizur A, Nocillado J, Biran J, *et al.* Advancement of the onset of puberty in *Seriola lalandi* by chronic treatment with kiss peptides. *Indian Journal Science Technology*, 2011, 4: 274–275
- Escobar S, Felip A, Zanuy S, *et al.* Is the kisspeptin system involved in responses to food restriction in order to preserve reproduction in pubertal male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2016, 199: 38–46
- Espigares F, Carrillo M, Gomez A, *et al.* The forebrain-midbrain acts as functional endocrine signaling pathway of Kiss2/*Gnrh1* system controlling the gonadotroph activity in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 2015a, 92(3): 70
- Espigares F, Rocha A, Gomez A, *et al.* Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of *kiss1* and *gnrh2* neuronal expression. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 240: 35–45
- Espigares F, Zanuy S, Gomez A. Kiss2 as a regulator of Lh and Fsh secretion via Paracrine/Autocrine signaling in the teleost fish European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 2015b, 93(5): 114
- Fairgrieve MR, Shibata Y, Smith EK, *et al.* Molecular characterization of the gonadal kisspeptin system: Cloning, tissue distribution, gene expression analysis and localization in sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 225: 212–223
- Felip A, Espigares F, Zanuy S, *et al.* Differential activation of kiss receptors by Kiss1 and Kiss2 peptides in the sea bass. *Reproduction*, 2015, 150(3): 227–243
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, *et al.* Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 312(1–2): 61–71
- Filby AL, van Aerle R, Duitman J, *et al.* The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(2): 278–289
- Imamura S, Hur SP, Takeuchi Y, *et al.* Molecular cloning of kisspeptin receptor genes (*gpr54-1* and *gpr54-2*) and their expression profiles in the brain of a tropical damselfish during different gonadal stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*,

- 2016, 203: 9–16
- Johnson MA, Fraley GS. Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology*, 2008, 88(4): 305–315
- Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, *et al.* Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*, 2008, 149(5): 2467–2476
- Kanda S, Karigo T, Oka Y. Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, 2012, 24(6): 897–906
- Kim NN, Choi YU, Park HS, *et al.* Kisspeptin regulates the somatic growth-related factors of the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 179: 17–24
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology*, 2009, 150(2): 821–831
- Kitahashi T, Parhar IS. Comparative aspects of kisspeptin gene regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 181(1): 197–202
- Klenke U, Zmora N, Stubblefield J, *et al.* Expression patterns of the kisspeptin system and GnRH1 correlate in their response to gonadal feedback in female striped bass. *Indian Journal of Science Technology*, 2011, 4(S8): 33–34
- Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34631–34636
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*, 1999, 446(1): 103–107
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, 88(23): 1731–1737
- Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Research*, 1997, 57(12): 2384–2387
- Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, *et al.* Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2837–2846
- Li S, Zhang Y, Liu Y, *et al.* Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Endocrinology*, 2009, 201(3): 407–418
- Liu Q, Wang B, Liu XZ, *et al.* Effects of gonadotropin-inhibitory hormone peptides on the reproduction-related gene expression in the hypothalamus of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 56–62 [刘权, 王滨, 柳学周, 等. GnIH 多肽对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)下丘脑生殖相关基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 56–62]
- Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology*, 2007, 148(10): 4601–4611
- Martinez-Chavez CC, Minghetti M, Migaud H. GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in *Nile tilapia*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(2): 224–233
- Mechaly AS, Vinas J, Murphy C, *et al.* Gene structure of the Kiss1 receptor-2 (Kiss1r-2) in the Atlantic halibut: Insights into the evolution and regulation of Kiss1r genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 317(1–2): 78–89
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F. Gene structure analysis of kisspeptin-2 (Kiss2) in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2011, 339(1–2): 14–24
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F. Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Biology of Reproduction*, 2009, 80(1): 60–69
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188(1): 258–268
- Migaud H, Ismail R, Cowan M, *et al.* Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 179(3): 384–399
- Mitani Y, Kanda S, Akazome Y, *et al.* Hypothalamic Kiss1 but not Kiss2 neurons are involved in estrogen feedback in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*, 2010, 151(4): 1751–1759
- Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, *et al.* Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2007, 38(1–2): 235–244
- Moon JS, Lee YR, Oh DY, *et al.* Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin. *Peptides*, 2009, 30(1): 171–179
- Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, *et al.* AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(31): 28969–28975
- Nocillado JN, Biran J, Lee YY, *et al.* The Kiss2 receptor (Kiss2r) gene in Southern Bluefin Tuna, *Thunnus maccoyii* and in Yellowtail Kingfish, *Seriola lalandi*-functional analysis and isolation of transcript variants. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 362(1–2): 211–220



- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, *et al.* Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(2): 278–287
- Nocillado JN, Zohar Y, Biran J, *et al.* Chronic kisspeptin administration stimulated gonadal development in pre-pubertal male yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*; Perciformes) during the breeding and non-breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 191(9): 168–176
- Ogawa S, Ng KW, Ramadasan PN, *et al.* Habenular Kiss1 neurons modulate the serotonergic system in the brain of zebrafish. *Endocrinology*, 2012, 153(5): 2398–2407
- Ogawa S, Ng KW, Xue X, *et al.* Thyroid hormone upregulates hypothalamic kiss2 Gene in the male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 184
- Ogawa S, Parhar IS. Structural and functional divergence of gonadotropin-inhibitory hormone from jawless fish to mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5 (5): 177
- Ohga H, Fujinaga Y, Selvaraj S, *et al.* Identification, characterization, and expression profiles of two subtypes of kisspeptin receptors in a scombroid fish (Chub mackerel). *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 193: 130–140
- Ohga H, Selvaraj S, Adachi H, *et al.* Functional analysis of kisspeptin peptides in adult immature chub mackerel (*Scomber japonicus*) using an intracerebroventricular administration method. *Neuroscience Letters*, 2014, 561: 203–207
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001, 411(6837): 613–617
- Onuma TA, Duan C. Duplicated Kiss1 receptor genes in zebrafish: Distinct gene expression patterns, different ligand selectivity, and a novel nuclear isoform with transactivating activity. *FASEB Journal*, 2012, 26(7): 2941–2950
- Parhar I S, Ogawa S, Sakuma Y. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, 2004, 145(8): 3613–3618
- Park JW, Jin YH, Oh SY, *et al.* Kisspeptin2 stimulates the HPG axis in immature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 202: 31–38
- Pasquier J, Kamech N, Lafont AG, *et al.* Molecular evolution of GPCRs: Kisspeptin/kisspeptin receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2014, 52(3): 101–117
- Pasquier J, Lafont AG, Jeng SR, *et al.* Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48931
- Pasquier J, Lafont AG, Leprince J, *et al.* First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(1): 216–225
- Paullada-Salmeron JA, Cowan M, Aliaga-Guerrero M, *et al.* Gonadotropin inhibitory hormone down-regulates the brain-Pituitary reproductive axis of male European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 2016, 94(6): 121
- Roa J, Navarro VM, Tena-Sempere M. Kisspeptins in reproductive biology: Consensus knowledge and recent developments. *Biology of Reproduction*, 2011, 85(4): 650–660
- Saha A, Pradhan A, Sengupta S, *et al.* Molecular characterization of two kiss genes and their expression in rohu (*Labeo rohita*) during annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 191: 135–145
- Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, *et al.* Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 169(1): 28–38
- Selvaraj S, Ohga H, Kitano H, *et al.* Peripheral administration of Kiss1 pentadecapeptide induces gonadal development in sexually immature adult scombroid fish. *Zoology Science*, 2013a, 30(6): 446–454
- Selvaraj S, Ohga H, Nyuji M, *et al.* Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2013b, 166(2): 228–236
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*, 2003, 349(17): 1614–1627
- Servili A, Le Page Y, Leprince J, *et al.* Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1527–1540
- Shahi N, Singh AK, Sahoo M, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression profile of kisspeptin1 and kisspeptin1 receptor at brain-pituitary-gonad (BPG) axis of golden mahseer, *Tor putitora* (Hamilton, 1822) during gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 205: 13–29
- Shahjahan M, Kitahashi T, Ando H. Temperature affects sexual maturation through the control of kisspeptin, kisspeptin receptor, GnRH and GTH subunit gene expression in the grass puffer during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 243: 138–145
- Shahjahan M, Kitahashi T, Ogawa S, *et al.* Temperature differentially regulates the two kisspeptin systems in the brain of zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 2013,

- 193(4): 79–85
- Shahjahan M, Motohashi E, Doi H, *et al.* Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 169(1): 48–57
- Shi Y, Zhang Y, Li S, *et al.* Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17 $\alpha$ -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Biology of Reproduction*, 2010, 83(1): 63–74
- Tang H, Liu Y, Luo D, *et al.* The kiss/kissr systems are dispensable for zebrafish reproduction: Evidence from gene knockout studies. *Endocrinology*, 2015, 156(2): 589–599
- Tena-Sempere M. Roles of kisspeptins in the control of hypothalamic-gonadotropic function: Focus on sexual differentiation and puberty onset. *Endocrine Development*, 2010, 17: 52–62
- Tena-Sempere M, Felip A, Gomez A, *et al.* Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: Lessons from non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(2): 234–243
- Tovar Bohorquez MO, Mechaly AS, Hughes LC, *et al.* Kisspeptin system in pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). Characterization and gene expression pattern during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2017, 204: 146–156
- Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, *et al.* Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *Journal of Neuroendocrinology*, 2010, 22(7): 716–727
- Ubuka T, Son YL, Tsutsui K. Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 27–50
- Um HN, Han JM, Hwang JI, *et al.* Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1200(1): 67–74
- van Aerle R, Kille P, Lange A, *et al.* Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides*, 2008, 29(1): 57–64
- Wang B, Liu Q, Liu XZ, *et al.* Molecular characterization of Kiss2 receptor and *in vitro* effects of Kiss2 on reproduction-related gene expression in the hypothalamus of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *General and Comparative Endocrinology*, 2017a, 249, 55–63
- Wang B, Liu Q, Liu XZ, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of LPXRFa at the brain-pituitary-gonad axis of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) during ovarian maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 216, 59–68
- Wang B, Liu Q, Liu XZ, *et al.* Molecular characterization of *kiss2* and differential regulation of reproduction-related genes by sex steroids in the hypothalamus of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2017b, 213, 46–55
- Wang B, Liu XZ, Liu Q, *et al.* Molecular cloning, localization, and expression analysis of *gnrh2* in different tissues of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) during ovarian maturation. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 63–72 [王滨, 柳学周, 刘权, 等. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) *gnrh2* 基因克隆、组织分布及卵巢成熟过程中表达分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 63–72]
- Wang B, Yang G, Liu Q, *et al.* Inhibitory action of tongue sole LPXRFa, the piscine ortholog of gonadotropin-inhibitory hormone, on the signaling pathway induced by tongue sole kisspeptin in COS-7 cells transfected with their cognate receptors. *Peptides*, 2017c, 95, 62–67
- Wang B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Progress of research on gonadotropin-inhibitory hormone and its receptors in fish. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(2): 278–287 [王滨, 柳学周, 徐永江, 等. 鱼类促性腺激素抑制激素及其受体的研究进展. *水产学报*, 2016, 40(2): 278–287]
- Wang Q, Qi X, Guo Y, *et al.* Molecular identification of GnIH/GnIHR signal and its reproductive function in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 216: 9–23
- Yang B, Jiang Q, Chan T, *et al.* Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(1): 60–71
- Yang Y, Gao J, Yuan C, *et al.* Molecular identification of Kiss/GPR54 and function analysis with mRNA expression profiles exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Molecular Biology Reports*, 2016, 43(7): 739–749
- Zhao Y, Wayne NL. Effects of kisspeptin1 on electrical activity of an extrahypothalamic population of gonadotropin-releasing hormone neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *PLoS One*, 2012, 7(5): e37909
- Zmora N, Stubblefield J, Golan M, *et al.* The medio-basal hypothalamus as a dynamic and plastic reproduction-related kisspeptin-gnrh-pituitary center in fish. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1874–1886
- Zmora N, Stubblefield J, Zulperi Z, *et al.* Differential and gonad stage-dependent roles of kisspeptin1 and kisspeptin2 in reproduction in the modern teleosts, morone species. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(6): 177
- Zmora N, Stubblefield JD, Wong TT, *et al.* Kisspeptin

antagonists reveal kisspeptin 1 and kisspeptin 2 differential regulation of reproduction in the teleost, *Morone saxatilis*. *Biology of Reproduction*, 2015, 93(3): 76

Zohar Y, Munoz-Cueto JA, Elizur A, *et al.* Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 438–455

(编辑 陈严)

## Regulatory Mechanisms of Kisspeptin on the Reproductive Axis in Fish

WANG Bin<sup>1,2</sup>, LIU Xuezhou<sup>1,2①</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2</sup>, SHI Bao<sup>1,2</sup>, LIU Quan<sup>1,3</sup>

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

**Abstract** Kisspeptin (Kiss or Kp), a novel physiologically active peptide encoded by the *KISS1/Kiss1* gene, activates its cognate receptor KissR (also known as GPR54) in various target tissues to exert disparate functions, including inhibition of tumor metastasis and control of reproductive function. The *KISS1* gene was originally isolated from human melanoma and breast cancer cells, and kisspeptin was initially called metastin in consideration of its suppressive effects on tumor growth and metastasis. With the exception of the platypus, a mammalian monotreme, which has two forms of kisspeptin genes (*Kiss1* and *Kiss2*), there is only one ligand, *Kiss1*, and its receptor, *Kiss1R* in placental mammals. However, this situation is different and even complex in non-mammalian species. Three *kiss/kissr* genes were described in amphibians, while searches in the chicken genome databases failed to identify these paralogous genes. To date, multiple forms of *kiss/kissr* genes have been identified in many teleosts, including Cypriniformes, Perciformes, Pleuronectiformes, Tetraodontiformes, Beloniformes, Scorpaeniformes, Salmoniformes and Gadiformes. A dual kisspeptin system, *kiss1/kiss1r* and *kiss2/kiss2r*, have been detected in medaka, zebrafish, goldfish, chub mackerel, striped bass, and European sea bass, while only *kiss2/kiss2r* was identified in orange-spotted grouper, grass puffer, *Nile tilapia*, *Atlantic halibut*, *Senegalese sole*, and half-smooth tongue sole. In addition, the physiological relevance and functions of the Kiss/KissR system for the neuroendocrine regulation of reproduction remains to be established in fish. It should be noted that the mechanisms underlying the actions of Kiss on the hypothalamo-pituitary-gonadal (HPG) axis are still far from being fully understood. Given the multiple forms of *kiss* and *kissr* genes obtained in teleosts, the regulation of fish reproduction by the Kiss system is even complex. This review briefly summarized the progress of research on Kiss and its receptors, with special emphasis on the physiological functions of Kiss in fish, the signaling transduction pathways as well as the regulation of *kiss/kissr* gene expression. We hope that this review will contribute to future studies.

**Key words** Fish; Kisspeptin; kisspeptin receptor; Reproduction; Signal transduction; Regulation of gene expression

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@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
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈 勇(美国)CHEN Yong
林 洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦 松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐 跑 XU Pao
徐 皓 XU Hao	黄 健 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4期 2018年8月

## PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.39 No.4 Aug. 2018

主管单位 中华人民共和国农业部

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

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛国彩印刷有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

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

Administrated

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed

Subscription

Overseas Distributed

by Ministry of Agriculture, P.R.China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences  
China Society of Fisheries

by Science Press

Address: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences

Address: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Tang Qisheng

by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

by China Post Group Corporation Shandong Branch

Post Offices All Over China

by China International Book Trading  
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986187