

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第39卷 VOL.39 第5期 NO.5



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办  
中国水产学会



科学出版社 出版  
Science Press

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN
























第 39 卷 第 5 期

2018 年 10 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

### 研究论文

- 渔获量不确定性对印度洋大眼金枪鱼资源评估的影响  李亚楠 戴小杰 朱江峰 耿喆 夏萌 何珊 (1)
- 基于模糊综合评价法的人工鱼礁生态系统健康研究  李娇 张艳 袁伟 公丕海 关长涛 (10)
- 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因的克隆及表达分析  白莉 陈亚东 夏永涛 许式见 胡谋 沙珍霞 (20)
- 不同鲟属鱼类 Cyt b 和 D-loop 序列的比较及其判别早期生活史个体的潜力分析  .....孙超 刘洪波 姜涛 轩中亚 杨健 (27)
- 草鱼呼肠孤病毒 AH528 株全基因组特征及进化分析  吴明林 李海洋 江河 何吉祥 侯冠军 蒋阳阳 (36)
- 日本东京湾云纹石斑鱼染色体核型研究  .....钟声平 陈超 庄志猛 (44)
- 不同规格绿鳍马面鲈形态性状对体重影响的通径分析  .....边力 刘刚 张庆文 刘琨 陈四清 李凤辉 孟乾 刘长琳 葛建龙 (50)
- 饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉中氨基酸和脂肪酸组成的影响  .....刘峰 吕小康 刘阳阳 楼宝 陈睿毅 王立改 詹炜 (58)
- 栉江珧染色体制备及核型分析  .....周丽青 王雪梅 吴彪 孙秀俊 陈四清 刘志鸿 杨爱国 张盛农 赵庆 张高伟 (66)
- 基于线粒体基因组 COI 和 12S rRNA 序列的魁蚶中国群体分类学地位研究  .....李瑶瑶 刘云国 刘晓玲 刘凌霄 马超 (73)
- 橡胶籽油替代豆油对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能、消化酶活性及部分生化指标的影响  .....涂佑欢 张曦 陶琳丽 杨秀娟 邓君明 (81)
- pH 胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响  .....韩莎 胡炜 李成林 朱夕波 赵斌 张少春 孙永军 (91)
- 水体中饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率及排氨率的影响  .....刘旭佳 沈夏霜 黄国强 彭银辉 吴黎红 (99)
- $\beta$ -1,3-葡聚糖对副溶血弧菌感染菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的存活及两种免疫基因表达影响  .....孟祥宇 张艳丽 霍忠明 牟政强 王化敏 闫喜武 (106)
- 氨氮对拟穴青蟹的急性毒性及对其血清免疫相关酶活力的影响  .....彭军辉 陈丽英 程长洪 冯娟 马红玲 郭志勋 (114)
- 坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及表达特征  .....林颖辉 王文磊 徐燕 纪德华 陈昌生 谢潮添 (122)
- 基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌三重 PCR 检测方法的建立及应用  .....刘婵 冯娟 谢云丹 胡万涛 王江勇 苏友禄 (130)
- 鳗弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果  .....丁山 李淑芳 李杰 唐磊 王晓冉 莫照兰 李杰 陈娟 (137)
- 响应面分析法优化  $\alpha$ -环糊精的酶转化工艺  .....陈晓彤 黄立萍 孙谧 郝建华 (143)
- 南极磷虾粗酶液中蛋白酶的基础酶学性质研究及抑制剂的开发  .....陈怡炫 陈昕 王芳 惠彦行 盛军 徐海波 徐甲坤 (152)
- 长江流域黄鳝中全氟化合物的残留特征及其来源探讨  .....周殿芳 吕磊 周剑光 甘金华 彭婕 何力 (158)
- 甲磺霉素在鲤鱼中的药代动力学研究  .....潘明轩 李兆新 邢丽红 孙晓杰 彭吉星 董晓 (166)
- 研究综述**
- 发展中国南海热带岛礁海洋牧场——机遇、现状与展望  .....许强 刘维 高菲 王爱民 (173)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.39 No.5 October 2018

Impact of Catch Uncertainty on the Stock Assessment of Bigeye Tuna ( <i>Thunnus obesus</i> ) in the Indian Ocean.....	(1)
.....LI Yanan, DAI Xiaojie, ZHU Jiangfeng, GENG Zhe, XIA Meng, HE Shan	
Research on Artificial Reef Ecosystem Health Assessment Based on Fuzzy Synthetic Evaluation.....	(10)
.....LI Jiao, ZHANG Yan, YUAN Wei, GONG Pihai, GUAN Changtao	
Cloning and Expression Analysis of $\beta$ -Defensin Gene from Russian Sturgeon ( <i>Acipenser gueldenstaedti</i> ) .....	(20)
.....BAI Li, CHEN Yadong, XIA Yongtao, XU Shijian, HU Mou, SHA Zhenxia	
Comparison of D-loop and Cytochrome b Sequences Among Different <i>Coilia</i> Species and Their Potential Use in Analysis for the	
Identification of Species at Early Life Stages .....	(27)
.....SUN Chao, LIU Hongbo, JIANG Tao, XUAN Zhongya, YANG Jian	
Genomic Characterization and Phylogenetic Analysis of Grass Carp Reovirus AH528 Strain.....	(36)
.....WU Minglin, LI Haiyang, JIANG He, HE Jixiang, HOU Guanjun, JIANG Yangyang	
Chromosome Karyotype of <i>Epinephelus moara</i> (Temminck & Schlegel 1842) of Tokyo Bay Population.....	(44)
.....ZHONG Shengping, CHEN Chao, ZHUANG Zhimeng	
Path Analysis of the Effects of Morphometric Traits on Body Weight of <i>Thamnaconus septentrionalis</i> at Different Sizes .....	(50)
.....BIAN Li, LIU Gang, ZHANG Qingwen, LIU Kun, CHEN Siqing, LI Fenghui, MENG Qian, LIU Changlin, GE Jianlong	
Effect of Starvation on Amino Acids and Fatty Acids of Juvenile <i>Larimichthys crocea</i> .....	(58)
.....LIU Feng, LÜ Xiaokang, LIU Yangyang, LOU Bao, CHEN Ruiyi, WANG Ligai, ZHAN Wei	
Chromosome Preparation and Karyotypes Analysis of Both Male and Female <i>Atrina pectinata</i> .....	(66)
.....ZHOU Liqing, WANG Xuemei, WU Biao, SUN Xiujun, CHEN Siqing,	
LIU Zhihong, YANG Aiguo, ZHANG Shengnong, ZHAO Qing, ZHANG Gaowei	
The Taxonomic Status of Chinese Population of <i>Scapharca broughtonii</i> Based on Sequences of <i>COI</i> and <i>12S rRNA</i> Genes.....	(73)
.....LI Yaoyao, LIU Yunguo, LIU Xiaoling, LIU Lingxiao, MA Chao	
Effects of Replacing Soybean Oil with Rubber Seed Oil on Growth Performance, Digestive Enzyme Activities, and Partial	
Biochemical Indices of Grass Carp ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ) .....	(81)
.....TU Youhuan, ZHANG Xi, TAO Linli, YANG Xiujian, DENG Junming	
Effects of pH Stress on Survival Rate, Growth and Antioxidant Enzyme Activities of the Sea Cucumber, <i>Apostichopus japonicus</i>	
Selenka.....	(91)
.....HAN Sha, HU Wei, LI Chenglin, ZHU Xibo, ZHAO Bin, ZHANG Shaochun, SUN Yongjun	
Effects of Suspended Feed Amount on Oxygen Consumption Rate and Ammonia Excretion Rate of Different Sized <i>Sipunculus</i>	
<i>nudus</i> Linnaeus .....	(99)
.....LIU Xujia, SHEN Xiashuang, HUANG Guoqiang, PENG Yinhui, WU Lihong	
Effects of $\beta$ -1,3-Glucan on the Survival and Expression of Two Immune Genes in <i>Ruditapes philippinarum</i> Infected with <i>Vibrio</i>	
<i>parahaemolyticus</i> .....	(106)
.....MENG Xiangyu, ZHANG Yanli, HUO Zhongming, MU Zhengqiang, WANG Huamin, YAN Xiwu	
Acute Toxicity of Ammonia Nitrogen to <i>Scylla paramamosain</i> and Its Influence on Immune Factors in Serum.....	(114)
.....PENG Junhui, CHEN Liying, CHENG Changhong, FENG Juan, MA Hongling, GUO Zhixun	
Cloning and Expression Analysis of Serine Hydroxyl Methyltransferase (SHMT) Genes from <i>Pyropia haitanensis</i> .....	(122)
.....LIN Yinghui, WANG Wenlei, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian	
The Application and Detection of <i>Streptococcus agalactiae</i> Isolated from Tilapia with a Triple PCR Based on Virulence Genes	
.....	(130)
.....LIU Chan, FENG Juan, XIE Yundan, HU Wantao, WANG Jiangyong, SU Youlu	
Long-Term Protection Effect of <i>Vibrio anguillarum</i> Trivalent Inactivated Vaccine.....	(137)
.....DING Shan, LI Shufang, LI Jie, TANG Lei, WANG Xiaoran, MO Zhaolan, LI Jie, CHEN Juan	
Optimization of Conversion Process of $\alpha$ -Cyclodextrin with Enzyme Using Response Surface Methodology.....	(143)
.....CHEN Xiaotong, HUANG Liping, SUN Mi, HAO Jianhua	
Study on the Basic Enzymatic Properties of Protease in Crude Enzyme of Antarctic Krill and the Development of Inhibitors.....	(152)
.....CHEN Yixuan, CHEN Xin, WANG Fang, HUI Yanxing, SHENG Jun, XU Haibo, XU Jiakun	
Residual Characteristics and Source of Perfluorinated Compounds in <i>Monopterus albus</i> of the Yangtze River .....	(158)
.....ZHOU Dianfang, LÜ Lei, ZHOU Jianguang, GAN Jinhua, PENG Jie, HE Li	
Drug Pharmacokinetic Study of Thiamphenicol in <i>Cyprinus carpio</i> .....	(166)
.....PAN Mingxuan, LI Zhaoxin, XING Lihong, SUN Xiaojie, PENG Jixing, DONG Xiao	
Development of Marine Ranching at Tropical Island Area in South China Sea-Advantages, Status and Prospects .....	(173)
.....XU Qiang, LIU Wei, GAO Fei, WANG Aimin	

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170627001

http://www.yykyjz.cn/

李亚楠, 戴小杰, 朱江峰, 耿喆, 夏萌, 何珊. 渔获量不确定性对印度洋大眼金枪鱼资源评估的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 01-09

Li YN, Dai XJ, Zhu JF, Geng Z, Xia M, He S. Impact of catch uncertainty on the stock assessment of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 01-09

# 渔获量不确定性对印度洋大眼金枪鱼 资源评估的影响\*



李亚楠<sup>1</sup> 戴小杰<sup>1,2,3①</sup> 朱江峰<sup>1,2,3</sup> 耿喆<sup>1</sup> 夏萌<sup>1</sup> 何珊<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 上海 201306;  
3. 农业农村部大洋渔业开发重点实验室 上海 201306)

**摘要** 大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)是最具经济价值的热带金枪鱼类,其资源状况一直是区域性金枪鱼渔业管理组织关注的重点。由于多种渔业作业、捕捞舰队构成复杂,印度洋大眼金枪鱼的历史渔获量统计存在一定的偏差(Bias),但国际上近些年开展资源评估时都忽略了这一偏差。本研究根据 1979~2015 年的年渔获量、年龄结构渔获量及相对丰度指数数据,运用年龄结构资源评估模型(ASAP)对印度洋大眼金枪鱼资源进行评估,重点考查渔获量的不确定性(观测误差和统计偏差)对资源评估结果的影响。结果显示,印度洋大眼金枪鱼当前资源总体没有过度捕捞,但 2015 年初显示轻微的过度捕捞,通过对比基础模型与 8 个灵敏度分析模型的评估结果发现,渔获量观测误差(CV)的预设对资源开发状态的判断有一定的影响。当渔获量统计偏差调整量为 15%时(即历史渔获量被低估了),评估结果与基础模型基本一致;统计偏差调整量为 20%时,评估结果有过度捕捞的趋势。本研究结果表明,资源评估模型中渔获量观测误差的设定和历史渔获量统计偏差均会对评估结果产生影响,后者更为明显,因此,二者均不能忽略。

**关键词** 印度洋; 大眼金枪鱼; 资源评估; 渔获量; 误差

**中图分类号** S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0001-09

大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)是经济价值最高的热带金枪鱼种类,分布于大西洋、印度洋和太平洋的热带和温带水域(曹晓怡等, 2008)。在印度洋海域,大眼金枪鱼主要分布在南赤道海流及其以北海域、非洲东岸和马达加斯加群岛,常见于印度-澳大利亚群岛海域(苗振清等, 2003),在印度洋海域属单一随机交配种群(Chiang *et al*, 2008)。大眼金枪鱼主要由大型

延绳钓(占 2012~2015 年渔获量的 57%)和围网(占 2012~2015 年渔获量的 27%)渔业捕捞(IOTC, 2016),该鱼种也是我国在印度洋金枪鱼渔业中的主要捕捞对象。印度洋金枪鱼类资源评估与管理由印度洋金枪鱼委员会(Indian Ocean Tuna Commission, IOTC)组织实施,根据 IOTC 最近研究,2015 年该鱼种的年渔获量为  $9.27 \times 10^4$  t,最大可持续产量为  $8.26 \times 10^4 \sim 10.97 \times$

\* 国家自然科学基金项目(NSFC41306127)、农业农村部国家远洋渔业观察员项目(08-25)和农业农村部物种资源保护鲨鱼项目(17162130135252086)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (NSFC41306127), Ministry of Agriculture and Rural Affairs National Oceanic Fishery Observer Program(08-25), and Ministry of Agriculture and Rural Affairs Species Conservation Shark Program (17162130135252086)]. 李亚楠, E-mail: liyananxiada@yeah.net

① 通讯作者: 戴小杰, 教授, E-mail: xjdai@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-06-27, 收修改稿日期: 2017-07-12

$10^4$  t (Zhu, 2016)。

2012年, IOTC 热带金枪鱼工作组(Working Party on Tropical Tunas, WPTT)提出将大眼金枪鱼资源评估列为今后的优先评估对象(IOTC, 2012)。近5年来, 国际上对其评估采用的模型包括 SS 模型(Stock Synthesis 3) (Shono *et al*, 2009; Kolody *et al*, 2010; Langley *et al*, 2013)、ASPM 模型(Age Structured Production Model) (Nishida *et al*, 2011)及 ASAP 模型(Age Structured Assessment Program) (Zhu *et al*, 2013; Zhu, 2016), 其中, ASAP 模型是目前应用的主要模型之一。对于印度洋大眼金枪鱼渔业, 虽然 IOTC 秘书处已制定了较为系统的渔业数据统计框架, 掌握了资源的基础生物学数据, 并已开展了大量资源评估方面的工作, 而且, 早在 2000 年前后就有研究者对印度洋大眼金枪鱼进行了资源评估(Nakatani *et al*, 2001; Motomura *et al*, 2003), 但以往的评估都忽略了渔获量的不确定性对资源评估的影响。

通过对近年 ASAP 模型的评估结果进行比较分析发现, 由于多种渔业作业、捕捞船队构成复杂, 印度洋大眼金枪鱼的历史渔获量统计存在一定的偏差(Bias), 特别是印度洋沿海发展中国家的渔获量统计质量较差, 相当一部分历史渔获量是由 IOTC 秘书处估计的, 其统计偏差(指高估或低估)可能达 15% (IOTC, 2012)。但国际上近些年对其的资源评估都忽略这一偏差。此外, 目前主流的综合评估方法参数估算过程中, 均需对渔获量观测误差(指随机误差)的大小进行假设, 而这一假设的影响研究, 也并未引起 WPTT 的重视。因此, 本研究运用年龄结构资源评估模型 ASAP(NOAA Fisheries Toolbox 2014)对印度洋大眼金枪鱼资源进行评估, 重点考查渔获量的不确定性(观测误差和统计偏差)对资源评估结果的影响, 为提高以渔获量为基础数据的资源评估的可靠性提供参考, 进一步提高印度洋大眼金枪鱼的资源评估质量。

## 1 材料与方法

### 1.1 渔业类型和数据

资源评估时首先需要划分渔业类型, 划分应以选择性和可捕性不随时间变化(或变化很小)、可获得的渔业数据为依据。根据 IOTC 对大眼金枪鱼的渔业数据分类, 本次评估划分为 7 种渔业, 即超低温延绳钓渔业(渔业 1, LL)、自由鱼群围网渔业(渔业 2, PSFS)、人工集鱼围网渔业(渔业 3, PSLS)、小型围网渔业(渔业 4, BB)、常温延绳钓渔业(渔业 5, FL)、手钓渔业(渔业 6, LINE)和其他渔业(渔业 7, OTHER)。

年龄结构模型所需的基本渔业数据主要包括年渔获量数据(Annual catch)、年龄结构渔获量数据(Catch-at-age, CAA)和相对资源丰度指数数据, 以上数据来源于 IOTC 秘书处, 时间跨度为 1979 年 1 月~2015 年 12 月。丰度指数数据采用主要延绳钓船队的联合标准化 CPUE (Joint CPUE, 尾/1000 钩) (Hoyle *et al*, 2016), 包含印度洋西北海域和东北海域 2 个时间序列(图 1)。

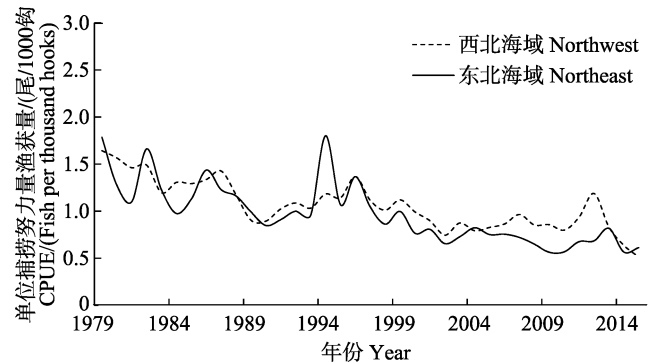


图 1 1979~2015 年印度洋大眼金枪鱼标准化 CPUE

Fig.1 Standardized CPUEs of bigeye tuna in the Indian Ocean (1979~2015)

### 1.2 生物学参数与假设

三大洋大眼金枪鱼种群结构清晰, 在印度洋存在单一的种群(Appleyard *et al*, 2002; Chiang *et al*, 2008), 本研究也假设大眼金枪鱼为单一资源种群。生长采用传统的 Von Bertalanfy 生长方程(Laslett *et al*, 2008), 体重  $W$  与叉长  $L$  的关系为:  $W = 3.661 \times 10^{-5} L^{2.901}$ , 不考虑生长误差。自然死亡系  $M$  假设 0.4/年(Zhu, 2016), 不考虑性别、年龄和时间上的变化。B-H 亲体-补充量关系模型陡度参数  $h=0.8$ 。

### 1.3 评估模型及参数估计

ASAP 是基于统计误差分布的渔获量年龄结构模型(Statistical age-structured catch-at-age analysis) (NOAA Fisheries Toolbox 2014)(NOAA Fisheries Toolbox <http://nft.nefsc.noaa.gov>)。目前, ASAP 模型已在多个渔业资源评估中广泛使用, 如在太平洋沙丁鱼(*Sardinops sagax*)、缅甸湾鲱鱼、大西洋鲱(*Clupea harengus*)、佛罗里达龙虾等资源的评估中, ASAP 模型也是目前美国对其东部近海渔业资源进行评估所用的主要模型之一。同时, 该模型引入时间段(Time block)概念和随机漫步模型(Random walk model)以允许部分参数如捕捞系数、渔具选择系数等具有时变特性。

ASAP 模型通过预设初始年份资源量、补充量等参数, 采用顺推方式演绎种群动态过程, 将渔获量、

资源量指数等数据作为具有观测误差的观测变量, 并通过模型预测值建立目标函数, 利用最大似然法估计模型参数。似然函数的误差分布有 2 种: 多项式分布和对数正态分布。多项式分布用于渔获年龄组成误差, 其主要影响因子是年龄组成的有效样本量(Effective sample size, ESS)。渔获量、资源量指数为对数正态分布, 其主要影响因子是对数转换后的标准差, 在 ASAP 模型里, 采用 CV 代替标准差。CV 需要预设, 并根据模型拟合情况逐步调整, 因此, CV 为本研究中观测误差的主要影响因子。多项式分布的似然函数为:

$$-\ln L = \ln ESS! + \sum \ln C_i! - ESS \sum p_i \ln pred p_i \quad (1)$$

式中,  $\ln L$  为似然函数取对数,  $C_i$  为  $i$  龄的渔获量,  $p_i$  为  $i$  龄的渔获量比例。对数正态分布的似然函数为(共 3 个):

$$-\ln L = 0.5 \ln 2\pi + \sum \ln obs_i + \ln \sigma + 0.5 \sum \frac{[\ln(obs_i) - \ln(pred_i)]^2}{\sigma^2} \quad (2)$$

式中,  $obs_i$  和  $pred_i$  为第  $i$  个数据的观测值和模型估算值,  $\sigma$  为标准差。大眼金枪鱼 ASAP 模型的目标函数主要成分为以上 4 个似然函数之和:

$$\text{objective function} = \lambda_j \sum [-\ln(L)]_j \quad (3)$$

式中,  $\lambda_j$  为第  $j$  个似然函数的权重系数( $j=1\sim 4$ )。

在 ASAP 模型中需要估计的参数有: 各年补充量及其误差、丰度指数对应“渔业”的可捕系数(不随时间变化)、7 种渔业的选择性参数和有效样本量、初始种群结构和资源量、初始年份的完全选择捕捞死亡率及其他各年份的误差(相对于初始年)。无需估算的已知或假设参数有生长参数、成熟度、自然死亡系数、丰度指数误差(设  $CV=0.1$ )。最终估算的参考点有最大持续产量(MSY)、MSY 相应的捕捞死亡系数( $F_{MSY}$ )、当前捕捞死亡系数与  $F_{MSY}$  的比值、当前渔获量与 MSY 的比值、MSY 相应的 SSB(产卵群体生物量)、当前 SSB 与  $SSB_{MSY}$  的比值及当前 SSB 与未开发时 SSB 的比值。

### 1.4 渔获量的不确定性量化及情景假设

如前所述, 渔获量观测误差的主要影响因子为 CV, 模型拟合前需要预设 CV 并根据拟合诊断逐步调整。本研究设定基础模型的渔获量  $CV=0.1$ , 将  $CV=0.05$  和  $0.15$  作为灵敏度分析。同时, 根据 IOTC 对大眼金枪鱼渔获量统计的质量分析, IOTC 估计的部分历史渔获量及名义渔获量的数据统计结果, 假设 10%、15%、20%、-10%、-15% 等 5 个水平的渔获量统计偏差调整量(负数表明 IOTC 高估了历史渔获量), 分不同年段对渔获量进行修正。综上所述, 共组成 13 个模型, 其中, 模型 2 为基础模型(表 1)。

表 1 印度洋大眼金枪鱼基础模型及灵敏度分析模型  
Tab.1 Base case model and sensitivity models for bigeye tuna in the Indian Ocean

模型 Model	变异系数 CV	渔获量时间跨度 Time period of catch	渔获量统计偏差 Adjust level for catch(%)	是否收敛 Converged or not
模型 Model 1	0.05	1979~2015	—	是 Yes
模型 Model 2 (基础模型 Base case)	0.1	1979~2015	—	是 Yes
模型 Model 3	0.15	1979~2015	—	是 Yes
模型 Model 4	0.1	1979~2015	10	是 Yes
模型 Model 5	0.1	1979~2015	15	是 Yes
模型 Model 6	0.1	1979~2015	20	是 Yes
模型 Model 7	0.1	1979~2015	-15	是 Yes
模型 Model 8	0.1	1979~1983	-10	是 Yes
		1984~1995	15	
		1996~2012	20	
		2013~2015	-10	
模型 Model 9	0.1	1979~1983	10	是 Yes
		1984~1995	15	
		1996~2012	20	
		2013~2015	-10	
模型 Model 10	0.2	1979~2015	—	否 No
模型 Model 11	0.25	1979~2015	—	否 No
模型 Model 12	0.1	1979~2015	-10	否 No
模型 Model 13	0.1	1979~2015	-20	否 No

## 2 结果

### 2.1 渔获量误差对拟合诊断的影响

13个模型中, 收敛的模型共9个(表1), 下文仅分析收敛的模型。模型不收敛表明模型的假设或数据相互矛盾, 模型未能获得有效参数。9个模型的丰度指数估算值与观测值的残差如图3、图4所示, 除了早期的1979~1984年, 模型整体拟合的预测值与观测值很相近, 9个模型变化趋势与基础模型(模型2)一致, 且其残差未见有明显的变动趋势, 但西北海域的丰度指数较东北海域的拟合更好(图2), 其丰度指数残差也相对较小。渔获量估算值与观测值的残差如图5所示, 残差未见有明显的变动趋势, 表明评估模型对丰度指

数和渔获量的拟合均可靠。

年龄结构模型的结果输出包括拟合结果和 ASAP 模型结果, 9个模型的拟合结果如表2所示。通过对拟合结果的各个目标函数进行对比分析, 以基础模型(模型2)为参照, 发现当 CV 增加或减少, 其相应的目标函数没有发生明显的增减变化。而针对名义渔获量统计偏差估计的6个模型(模型4~模型9)也没有明显的增减规律, 但模型8的拟合结果相对其他5个模型的结果有较大的差异。

### 2.2 渔获量误差对 $F$ 与 SSB 变动趋势的影响

捕捞死亡系数的估算值见图6。通过比较8个假设模型与基础模型的捕捞死亡系数, 发现所有模型的

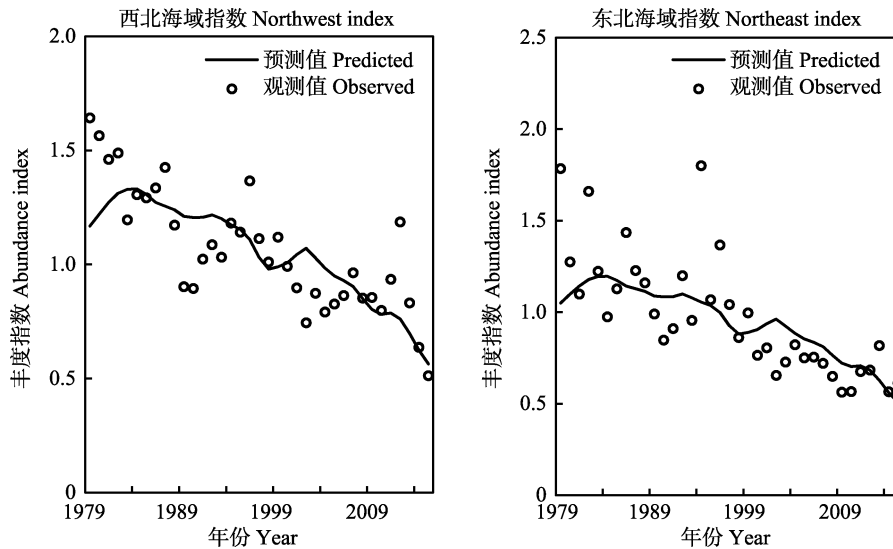


图2 印度洋大眼金枪鱼丰度指数观测值与预测值(基础模型)

Fig.2 Observed and predicted abundance indices of bigeye tuna in the Indian Ocean (base case model)

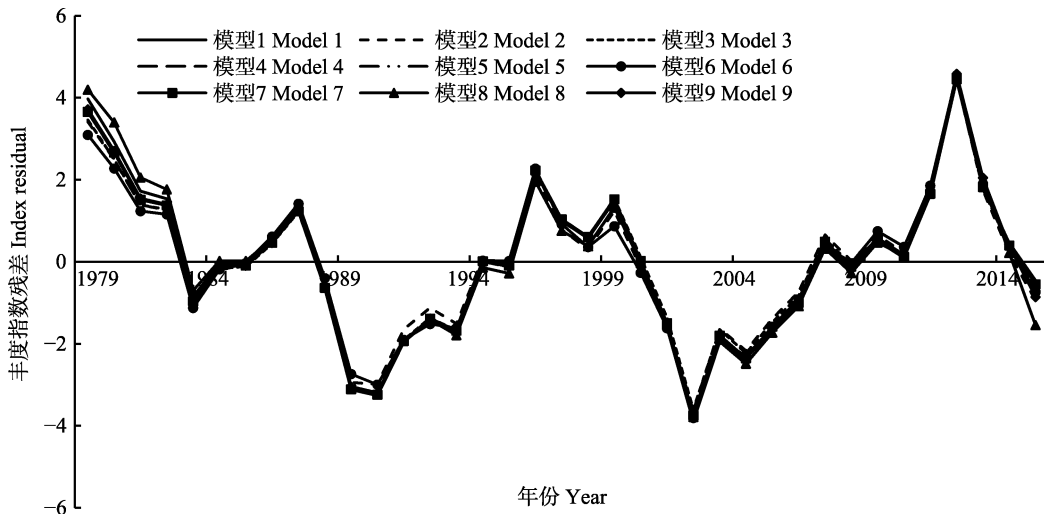


图3 印度洋大眼金枪鱼丰度指数残差(西北海域指数)

Fig.3 Residuals between observed and estimated abundance indices of bigeye tuna in the Indian Ocean (Northwest index)

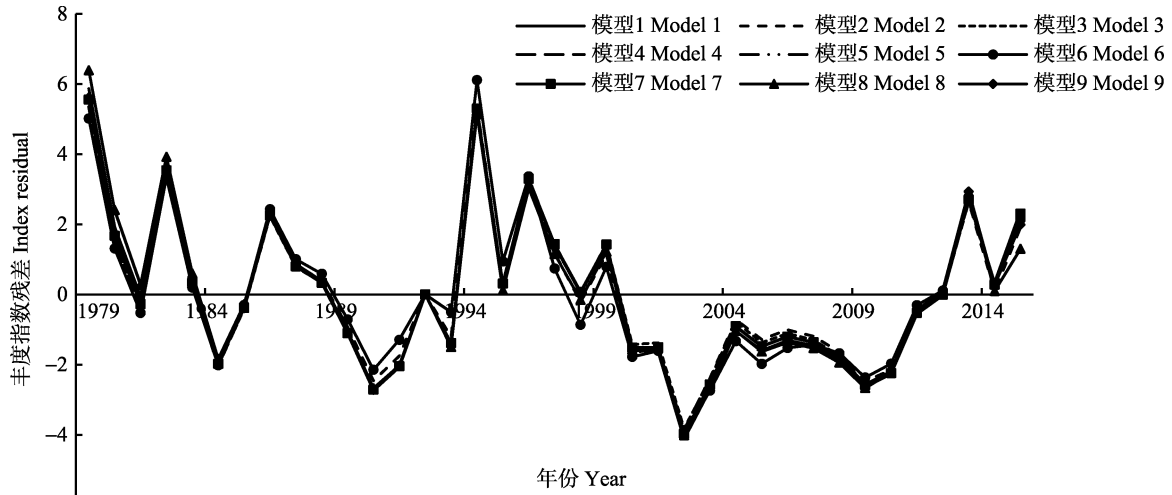


图 4 印度洋大眼金枪鱼丰度指数残差(东北海域指数)

Fig.4 Residual between observed and estimated abundance index of bigeye tuna in the Indian Ocean (Northeast index)

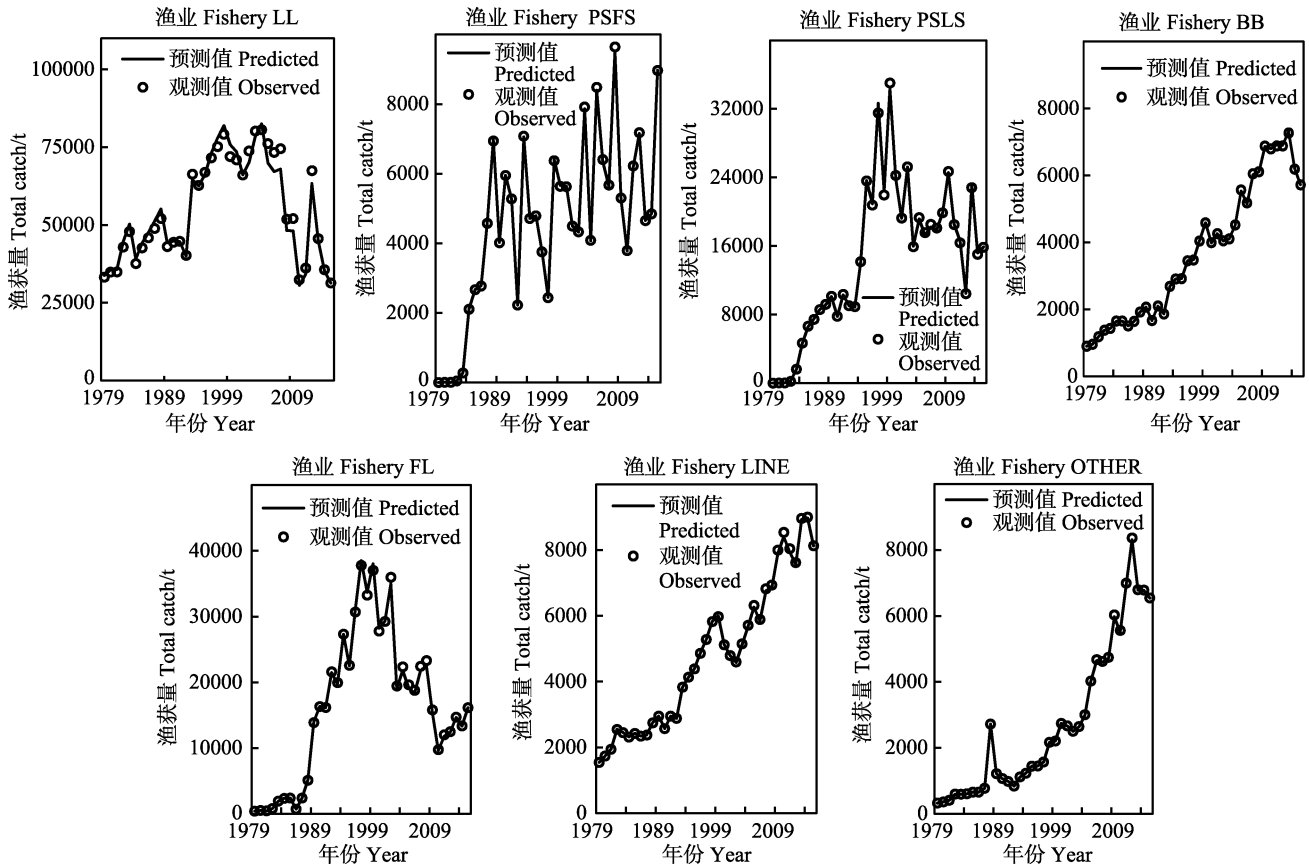


图 5 印度洋大眼金枪鱼渔获量估算值与观测值(基础模型)

Fig.5 Observed and predicted annual catch of bigeye tuna in the Indian Ocean (base case model)

捕捞死亡系数的变化趋势一致,但在不同的假设条件下,其捕捞死亡系数值不同。在 CV 为 0.05 和 0.15 的情况下,捕捞死亡系数的估算值与基础模型的值很接近,变化趋势基本一致。同时,根据渔获量假设的 5 个模型(除模型 8)变化趋势也与基础模型一致。但模型 8 的捕捞死亡系数的估算值自 1983 年始明显低于

其他 8 个模型。但无论在何种假设下,自 1984 年以来,7 种渔业的捕捞死亡系数一直处于上升趋势,尤其是 1984~1999 年,其上升趋势明显加快。

9 个模型的 SSB 变化如图 7 所示。在不同的假设条件下,SSB 的变化趋势基本相同。在 1979~1985 年呈增加趋势,然后逐渐减少,至 2000 年后略有回升,



表2 模型拟合结果  
Tab.2 Model fit summary

Lambda 表达式 Lambda expression			目标函数 Objective function	渔获量成分 Catch	丰度指数成分 Index	渔获年龄组成成分 Age comps	补充量变化成分 Recruit devs	惩罚项 Penalty
			—	7	2	—	1	1000
变异	模型	Model 1	5765.3	1703.7	54.1	3552.9	454.6	0
系数	模型	Model 2	5725.7	1887.7	31.5	3352.7	453.8	0
CV	模型	Model 3	6024.9	1995.8	37.3	3537.2	454.7	0
渔获量 Catch	模型	Model 4	5961.2	1912.6	44.6	3545.4	458.6	0
	模型	Model 5	5972.8	1924.1	44.7	3543.9	460.2	0
	模型	Model 6	5774.3	1937.9	38.2	3338.2	460.1	0
	模型	Model 7	5883.4	1845.9	44.8	3543.7	448.9	0
	模型	Model 8	6731.7	1920.2	59.4	4300.4	451.7	0
	模型	Model 9	5979.4	1923.5	46.7	3547.8	461.4	0

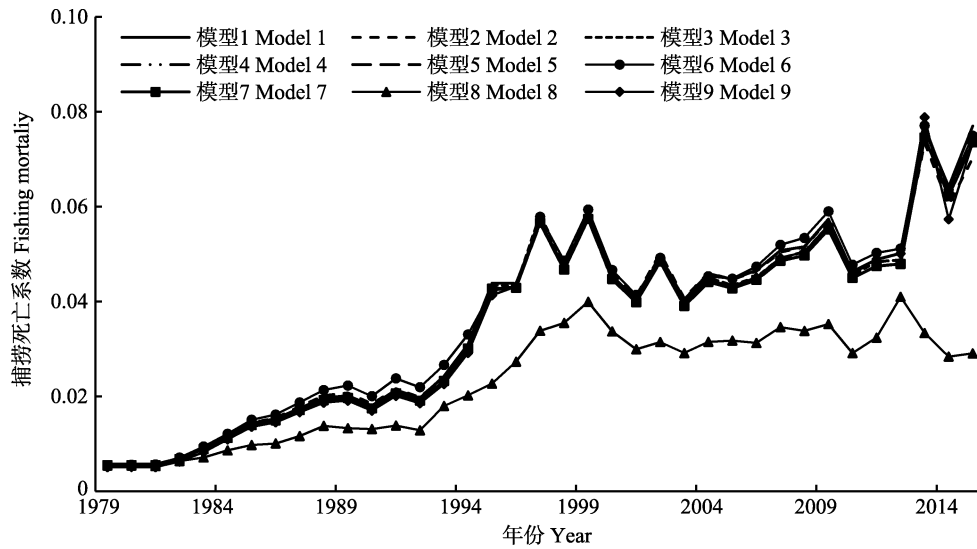


图6 印度洋大眼金枪鱼捕捞死亡系数

Fig.6 Estimated fishing mortality of bigeye tuna in the Indian Ocean

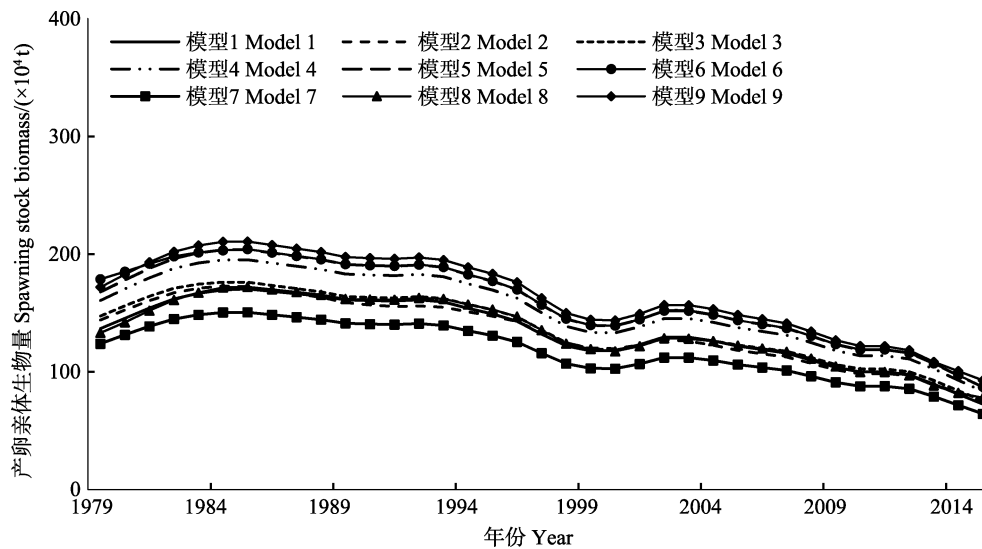


图7 印度洋大眼金枪鱼产卵亲体生物量

Fig.7 Estimated spawning stock biomass (SSB) of bigeye tuna in the Indian Ocean

但接下来至 2015 年, 总体呈下降趋势, 除了模型 9, 2015 年的 SSB 均低于 MSY 相应的水平。在假设 CV 为 0.05 和 0.15 的情况下, SSB 与基础模型没有明显的差异, 而假设的渔获量偏差越高, SSB 估计值越大(模型 2、模型 4~模型 6)。当假设渔获量偏差减少 15% 时, SSB 最低。而根据大眼金枪鱼实际的历史产量分年代设立的模型 9, 其 SSB 估计值最高, 且高于 MSY 相应的水平。

### 2.3 渔获量误差对生物学参考点和资源状态判断的影响

在不同的假设条件下, 各个模型的渔业管理生物学参考点及相关参数的估算值见表 3。基础模型下(模型 2), 当前  $F_{2015}/F_{MSY}$  等于 1, 当前渔获量为 MSY 的 1.02 倍, 当前 SSB 为  $SSB_{MSY}$  的 1.18 倍, 可以确定 2015 年初的资源状况没有“过度捕捞”, 这与 2016 年 IOTC 对印度洋大眼金枪鱼的资源评估结果一致(Adam, 2016)。对比模型 1、模型 2 和模型 3 发现, CV 增加或减小对 MSY 及相关的参考点具有一定的影响, 即当 CV 增加或减小其对应的参考点 MSY、 $F_{MSY}$ 、 $SSB_{MSY}$  均减小, 相应的  $C_{curr}/MSY$ 、 $F_{curr}/F_{MSY}$  均增大,  $SSB_0$  随 CV 增加而增大。对比模型 2、模型 4、模型 5 和模型 6 发现, 当 1979~2015 年渔获量呈不同水平增加, 其参考点  $C_{curr}/MSY$  减小,  $F_{curr}/F_{MSY}$  增大, 而  $SSB_{curr}/SSB_{MSY}$  和  $SSB_{curr}/SSB_0$  没有明显的变化趋势。但当 1979~2015 年渔获量减少 15% 时, 其对应的关键参考点  $F_{curr}/F_{MSY}$ 、 $SSB_{curr}/SSB_{MSY}$ 、 $SSB_{curr}/SSB_0$  均没有明显的变化。而通过对比模型 8 和模型 9 发现, 表 1 对 1979~2015 年分阶段的渔获量假设不同水平的偏差, 其评估结果具有明显的差异,  $F_{curr}/F_{MSY}$  远小于其他模型,  $SSB_{curr}/SSB_{MSY}$  和  $SSB_{curr}/SSB_0$  高于其他模型。

对于渔获量观测误差而言, 对比模型 1 (CV=0.05)、

模型 2 (CV=0.1)与模型 3 (CV=0.15)的  $F_{curr}/F_{MSY}$  与  $SSB_{curr}/SSB_{MSY}$  估计值变化, CV 增大或减小时, 当前的资源状况相对基础模型均有过度捕捞的趋势。对于渔获量统计偏差而言, 假设渔获量增加百分比越高, MSY 估算值越大。结合表 3 的  $F_{curr}/F_{MSY}$  与  $SSB_{curr}/SSB_{MSY}$  的结果可以发现, 只有假设渔获量偏差为 20% 时, 其评估结果相对基础模型有过度捕捞趋势, 而其他假设(10%、15%和-15%)下, 资源评估的结果相对基础模型没有明显的变化。同时, 为验证该结果, 对渔获量增加 16%、17%、18%、19% 并比较评估结果发现, 均没有出现过度捕捞。因此, 在应用 ASAP 模型对大眼金枪鱼资源进行评估时应确保渔获量统计偏差保持在 20% 以内, 这样对资源开发状态的判断是一致的。历史产量统计偏差分年代考察发现, 1979~1983 年渔获量偏差对资源评估结果没有较大的影响, 而 2013~2015 年的渔获量偏差对资源评估结果具有很大的影响。

### 3 讨论

印度洋大眼金枪鱼的资源评估, 在 1998 年以前, 是由印太金枪鱼类开发管理计划(IPTP)进行的, 1999 年以后由印度洋金枪鱼委员会进行。依据最新分析结果, 由于渔业统计中没有包括“未报告的渔获”部分, 所以可能低估了最大可持续产量(MSY)水平。IOTC 当前的评估表明, 印度洋大眼金枪鱼资源目前没有过度捕捞, 但 2015 年初有轻微的过度捕捞趋势, 即  $SSB_{2015}/SSB_{MSY} > 1$ ,  $F_{2015}/F_{MSY}$  可能大于 1。而本研究中基础模型的结果与其一致, 即  $SSB_{2015}/SSB_{MSY} > 1$  (=1.18)、 $F_{2015}/F_{MSY}=1$ 。对比其他 8 个假设模型的评估结果, 发现即使是最冒险的假设(模型 6), 当前资源也没有出现过度捕捞现象, 但仍然有过度捕捞的趋势( $SSB_{2015}/SSB_{MSY} > 1$  (=1.18)、 $F_{2015}/F_{MSY}=1.06$ )。同时,

表 3 各个模型的参考点及相关参数

Tab.3 Biological reference points and related parameters from each assessment model

模型 Model	MSY(t)	$C_{curr}/MSY$	$F_{MSY}$	$F_{curr}/F_{MSY}$	$SSB_{MSY}(t)$	$SSB_{curr}/SSB_{MSY}$	$SSB_0(t)$	$SSB_{curr}/SSB_0$
模型 Model 1	88506	1.05	0.145	1.08	621982	1.16	1967740	0.37
<b>模型 Model 2</b>	<b>91208</b>	<b>1.02</b>	<b>0.146</b>	<b>1.00</b>	<b>629187</b>	<b>1.18</b>	<b>1974170</b>	<b>0.38</b>
模型 Model 3	89439	1.04	0.145	1.04	628136	1.20	1983010	0.38
模型 Model 4	98871	0.94	0.145	1.04	695959	1.20	2200580	0.38
模型 Model 5	103442	0.90	0.145	1.04	727117	1.20	2298140	0.38
模型 Model 6	106374	0.87	0.146	1.06	735084	1.18	2311650	0.38
模型 Model 7	76441	1.21	0.145	1.04	537153	1.19	1697510	0.38
模型 Model 8	126710	0.73	0.178	0.56	633599	1.23	1902070	0.41
模型 Model 9	105637	0.88	0.144	0.75	744251	1.24	2355170	0.39

资源状态评价也可采用产卵群体生物量的比率(SBR)来判断,即当前 SSB 与原始状态(SSB<sub>0</sub>)的比率。当 SBR 越接近于 0,表明资源衰减越严重,SBR 越接近于 1,表明资源的 SSB 可能没有明显减少。本研究中基础模型及 8 个灵敏度分析模型的 SBR 值均表明,印度洋大眼金枪鱼资源目前处于资源衰减状态(SSB<sub>curr</sub>/SSB<sub>0</sub>≈0.4),这表明,在经过了 60 多年的商业性捕捞后,资源生物量已远低于原始水平。

本研究表明,渔获量观测误差对资源评估的结果具有一定程度的影响,在 CV 假设偏小的情况下,得到的资源状态相对于基础模型更为悲观(模型 1、模型 2 和模型 3)。历史渔获量统计偏差方面,如果认为历史渔获量统计偏低,从得到的 C<sub>curr</sub>/MSY 比值来看,评估结果更为乐观(模型 4、模型 5 和模型 6);而认为历史渔获量统计偏高,评估结果略为悲观(模型 7)。如果对历史渔获量偏差进行更具体的分段修正,则上述差别不明显,即评估结果均更为乐观(模型 8 和模型 9)。由于分段渔获量修正更体现了各捕捞船队在历史上不同时期的渔获数据质量,其评估结果可能更反映大眼金枪鱼的真实资源状况。通过对比观测误差和统计偏差的影响,认为渔获量统计偏差对资源评估的影响更加明显。为此,建议在今后的印度洋金枪鱼类资源评估中,应该注重分析历史渔获量统计偏差的大小,并进行适当修正。而对于渔获量观测误差的影响,建议仍对不同误差水平做灵敏度分析,以确保评估结果的可靠性。

## 参 考 文 献

- Appleyard SA, Ward RD, Grewe PM. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *Journal of Fish Biology*, 2002, 60(3): 767-770
- Adam L. Stock assessment of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean for 2016. IOTC-2016-WPTT18-20, 2016, 66-69
- Cao XY, Zhou WF, Fan W, *et al.* Advance on research in the relationship between fishing ground of bigeye tuna and environmental parameters. *Marine Fisheries*, 2008, 3(2): 176-182 [曹晓怡, 周为峰, 樊伟, 等. 大眼金枪鱼渔场与环境关系的研究进展. *海洋渔业*, 2008, 3(2): 176-182]
- Chiang HC, Hsu CC, Wu GC, *et al.* Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research*, 2008, 89(1): 305-312
- Hoyle SD, Kim D, Lee S, *et al.* Collaborative study of tropical tuna CPUE from multiple Indian Ocean longline fleets in 2016. IOTC-2016-WPTT18-14, 2016
- IOTC. Review of the statistical data and fishery trends for tropical tuna. IOTC-2016-WPTT18-07, 2016, 6-13
- IOTC. Report of the fourteenth session of the IOTC working party on tropical tunas. IOTC-2012-WPTT14, 2012, 88
- Kolody D, Herrera M, Million J. Exploration of Indian Ocean bigeye tuna (*Thunnus obesus*) stock assessment sensitivities 1952-2008 using stock synthesis. IOTC-2010-WPTT-04, 2010
- Langley A, Herrera M, Sharma R. Stock assessment of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean for 2012. IOTC-2013-WPTT15-30, 2013
- Laslett GM, Eveson JP, Polacheck T. Growth of tropical tunas using the Laslett, Polacheck and Eveson (LEP) method. IOTC-2008-WPTT-09, 2008
- Miao ZQ, Huang YC. Pelagic tuna fishery. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2003, 24-28 [苗振清, 黄锡昌. 远洋金枪鱼渔业. 上海: 上海科学技术出版社, 2003, 24-28]
- Motomura T, Uchioke S. Review of the production model analyses of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean. *Journal of Ryutsu Keizai University*, 2003, 37(11): 1-18
- Nakatani T, Kimball DF, Larson LE, *et al.* Stock assessment of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) resources in the Indian Ocean by the age structured production model (ASPM) analyses. *Iotc*, 2001, 5(3): Proceedings
- Nishida T, Rademeyer R. Stock and risk assessments on bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean based on AD model builder implemented age-structured production model (ASPM). IOTC-2011-WPTT-42, 2011
- NOAA Fisheries Toolbox at <http://nft.nfsc.noaa.gov>
- Shono H, Satoh K, Okamoto H, *et al.* Updated stock assessment for bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean up to 2008 using stock synthesis III (SS3). IOTC-2009-WPTT-20, 2009
- Zhu JF, Guan WJ, Tian SQ, *et al.* Stock assessment of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean using ASAP. IOTC-2013-WPTT15-28, 2013
- Zhu JF. Stock assessment of Indian Ocean bigeye tuna (*Thunnus obesus*) using age-structured assessment program. IOTC-2016-WPTT18-14, 2016, 11-13

## Impact of Catch Uncertainty on the Stock Assessment of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean

LI Yanan<sup>1</sup>, DAI Xiaojie<sup>1,2,3①</sup>, ZHU Jiangfeng<sup>1,2,3</sup>, GENG Zhe<sup>1</sup>, XIA Meng<sup>1</sup>, HE Shan<sup>1</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306)

**Abstract** Bigeye tuna (BET), *Thunnus obesus* is a large epi- and mesopelagic species distributed in tropical and subtropical waters of the Indian Ocean. Its stock status has been the focus of regional tuna fisheries management organizations. Because of a variety of fishing gear and fishing fleet structures, there have some statistical biases in the historical nominal catches of the Indian Ocean BET. However, the impact of this bias on stock assessment has been neglected in recent years. This paper aimed to assess the impact of observation error and statistical bias of catch on the stock assessment of Indian Ocean BET, using Age-Structured Assessment Program (ASAP) based on fishery-specific catch, catch-at-age, and standardized catch-per-unit-effort data. The results showed that the current stock of BET in the Indian Ocean was not overfished. The results of base model and eight sensitivity analysis models showed that the observation error of catch had influences on the stock status evaluation. When the bias of nominal catch was assumed to be 15% (i.e., the historical catch was underestimated), the assessment result was consistent with the base model (i.e. not overfished). When the bias of nominal catch was assumed to be 20%, the stock might be overfished. Therefore, both the observation error and the statistical bias associated with catch data can have significant impacts on the assessment results, with the latter having a greater effect. This study highlights the importance of considering both the assumption of observation error and statistical bias in catch data in tuna fishery stock assessment, which has been neglected recently.

**Key words** Indian Ocean; *Thunnus obesus*; Stock assessment; Catch; Uncertainty

① Corresponding author: DAI Xiaojie, E-mail: xjdai@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171029003

http://www.yykxjz.cn/

李娇, 张艳, 袁伟, 公丕海, 关长涛. 基于模糊综合评价法的人工鱼礁生态系统健康研究. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 10-19

Li J, Zhang Y, Yuan W, Gong PH, Guan CT. Research on artificial reef ecosystem health assessment based on fuzzy synthetic evaluation. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 10-19

# 基于模糊综合评价法的人工鱼礁 生态系统健康研究\*



李 娇 张 艳 袁 伟 公丕海 关长涛<sup>①</sup>

(农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 碳汇渔业实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 本研究采用模糊综合评价法构建人工鱼礁生态系统健康评价模型,采用层次分析法对各项生态指标的权重进行赋值,并利用综合健康指数模型对北戴河人工鱼礁区和对照海区生态系统健康状况进行评价。根据 2013 年 7 月本底调查和 2014 年 6 月与 2015 年 5 月的跟踪调查数据,分析结果显示,人工鱼礁区和对照区的生态系统都处于健康状态,对照区在 2013 年 7 月和 2014 年 6 月的调查中健康指数均高于鱼礁区,2015 年 5 月调查时,对照区生态健康指数出现下滑,但人工鱼礁区生态系统健康呈现逐步提升的状态,综合健康指数为 0.838,属很健康状态。根据评价结果,北戴河人工鱼礁建设取得良好生态效果,生态系统处于逐步稳定健康发展的状态。本研究采用生态系统健康指数,科学评价人工鱼礁生态效应,对人工鱼礁工程建设、环境资源保护、高效管理和可持续利用具有重要意义。

**关键词** 人工鱼礁; 生态系统健康; 模糊综合评价; 层次分析法

**中图分类号** S953.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0010-10

人工鱼礁生态系统是一个受到人为调控的生态系统,鱼礁投放引起的光、音、声、水体流态等物理环境变化,为海洋生物繁殖、生长和栖息提供了有利条件,这些非生物环境和礁区生物群落之间相互影响和制约形成了鱼礁生态系统。鱼礁生态系统是一个开放式系统,和周围海区时刻进行着物质和能量的交换,礁区环境理化因子和生物因子在内力和外力共同作用下不断变化。生态系统健康是其发挥服务功能和可持续发展的前提,Rapport 等(1998)提出,生态系统

健康是指其具有稳定性和持续性。Costanza 等(1998)认为,健康生态系统受到胁迫后能在一定时间恢复,维持其组织结构和功能的平衡。生态系统健康概念的提出时间虽然很短,却得到不同领域学者的重视,广泛应用在森林、草原、海洋、湖泊等陆地和水生态系统中(Munawar *et al.*, 1993; Evans, 1993; Rosenberg *et al.*, 1994; Sonstegard *et al.*, 1984; Xu, 1996; Malley *et al.*, 1992)。因此,为提高人工鱼礁建设、开发和管理工作的科学性和可持续性,在礁区投入建设后,应定期

\* 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(2016HY-ZD0103)资助[This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0103)].

李 娇, E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 关长涛, 研究员, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-29, 收修修改稿日期: 2017-11-29

对人工鱼礁区生态系统健康状况进行评价。目前, 国内外学者对人工鱼礁生态效应的研究多集中在单个或少量特征指标的分析上(张艳等, 2013; 王欣等, 2014), 对人工鱼礁生态效应及健康水平的综合评价研究较少, 仅有尹增强等(2012)对东海区资源保护型鱼礁生态效果进行初步评价, 佟飞等(2014)利用生态系统健康指标对俚岛人工鱼礁生态系统开展评价分析, 陈应华(2009)对大亚湾大辣甲南人工鱼礁区进行了生态系统健康状况的研究。本研究将生态系统健康指数用于人工鱼礁建设效果评价, 为人工鱼礁生态系统的可持续发展提供科学指导。

## 1 生态系统健康综合评价模型的建立

### 1.1 评价指标

评价指标是构建生态系统健康模型的基础因子, 合理选择评价指标是提高生态系统健康评价质量的关键。评价指标应满足独立性、完备性、针对性和可

操作性原则。根据国内外对海洋生态系统健康的相关研究, 结合人工鱼礁生态系统的结构特征, 选择 pH 值、无机氮, 活性磷酸盐、化学需氧量、溶解氧、悬浮物、氮磷比、沉积物硫化物、沉积物石油类、沉积物中金属(Cu、Hg、Zn、Cd、Pb、As)、底栖生物多样性阈值、底栖生物生物量、浮游植物多样性阈值、浮游植物生物量、浮游动物多样性阈值、浮游动物生物量和渔业资源多样性阈值, 共 22 个评价指标。

### 1.2 评价标准和依据

人工鱼礁生态系统水质环境指标评价按照海水水质标准(GB3097-1997), 沉积物环境指标评价按照海洋沉积物质量(GB18668-2002), 生物因子评价指标按照近岸海洋生态健康评价指南(HY/T087-2005)(表 1), 对以上 3 个标准中没有包含的指标, 参考国内外相关研究成果, 氮磷比指标参照潜在性富营养化级数分类标准(表 2), 生物多样性阈值参照陈清潮等(1994)提出的分级标准(表 3)。

表 1 海湾生态系统生物评价指标  
Tab.1 Evaluation indicator for bay ecosystem organisms

评价项目 Evaluation item	评价等级 Evaluation grade		
	I	II	III
浮游植物密度 Density of phytoplankton ( $\times 10^5$ ind/m <sup>3</sup> )	1.5~15	0.3~1.5 或 15~20	<0.3 或 >20
浮游动物密度 Density of zooplankton ( $\times 10^3$ ind/m <sup>3</sup> )	4.5~12.5	3.0~4.5 或 12.5~15.0	<3.3 或 >15.0
底栖生物生物量 Biomass of benthos (g/m <sup>2</sup> )	18.75~37.5	12.5~18.75 或 37.5~45.0	<12.5 或 >45.0

表 2 潜在性富营养化级数分类  
Tab.2 Grade classification of potential eutrophication

氮磷比 N/P	无机氮 DIN (mg/L)	活性磷酸盐 IP (mg/L)	营养状况 Nutrient salt level	营养级 Grade
8~30	<0.2	<0.03	贫营养 Poor nutrient	I
8~30	0.2~0.3	0.03~0.045	中度营养 Medium nutrient	II
8~30	>0.3	>0.045	富营养 Rich nutrient	III
>30	0.2~0.3	-	磷限制中度营养 Medium nutrient with phosphorous limiting	IV <sub>P</sub>
30~60	>0.3	-	磷中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium phosphorous limiting	V <sub>P</sub>
>60	>0.3	-	磷限制潜在性富营养 Potential eutrophication with phosphorous limiting	VI <sub>P</sub>
<8	-	0.03~0.045	氮限制中度营养 Medium nutrient with nitrogenous limiting	IV <sub>N</sub>
4~8	-	>0.045	氮中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium nitrogenous limiting	V <sub>N</sub>
<4	-	>0.045	氮限制潜在性富营养 Potential eutrophication with nitrogenous limiting	VI <sub>N</sub>

表 3 生物多样性阈值分级评价标准  
Tab.3 Evaluation standard for the threshold of biodiversity

评价项目 Evaluation item	评价等级 Evaluation grade				
	I	II	III	IV	V
多样性阈值 Threshold of biodiversity	<0.6	0.6~1.5	1.6~2.5	2.6~3.5	>3.5
等级 Grade	差 Poor	一般 Middle	较好 Preferable	丰富 Plentiful	非常丰富 High

1.3 指标标准化

人工鱼礁生态系统健康评价包含多个指标, 由于没有统一的度量标准, 各指标之间没有规范比较方法, 为实现指标间的可操作运算, 需对评价指标进行标准化处理。根据人工鱼礁生态系统评价指标相关分类和标准, 采用阈值法对指标进行归一化处理, 评价指标分为逆向指标、正向指标和适度指标, 3 个类型指标的计算公式如下:

逆向指标:

$$EHI_i = \begin{cases} 1 & x_i < x_{min} \\ \left(\frac{x_{max} - x_i}{x_{max} - x_{min}}\right)^k & x_{min} \leq x_i \leq x_{max} \\ 0 & x_i > x_{max} \end{cases} \quad (1)$$

正向指标:

$$EHI_i = \begin{cases} 0 & x_i < x_{min} \\ \left(\frac{x_i - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}\right)^k & x_{min} \leq x_i \leq x_{max} \\ 1 & x_i > x_{max} \end{cases} \quad (2)$$

适度指标:

$$EHI_i = \begin{cases} 0 & x_i < x_{min} \\ \left(\frac{x_i - x_{min}}{a - x_{min}}\right)^k & x_{min} \leq x_i \leq a \\ 1 & a \leq x_i \leq b \\ \left(\frac{x_{max} - x_i}{x_{max} - b}\right)^k & b \leq x_i \leq x_{max} \\ 0 & x_i > x_{max} \end{cases} \quad (3)$$

式中,  $x_i$  表示单项指标的实测值;  $x_{max}$  表示单项指标的最大值;  $x_{min}$  表示单项指标的最小值;  $a$ 、 $b$  表示指标最佳范围阈值;  $k$  是指数。

根据所选人工鱼礁生态系统各评价指标的性质, 按照公式 1、2、3 对其进行分类和标准化计算, 参考对海湾生态系统健康水平分级评价标准(表 4)(李纯厚等, 2013), 指标隶属度函数采用抛物线形分布, 其中, pH 值、无机氮和活性磷酸盐隶属度函数  $k$  值为 1, 其他指标隶属度函数的  $k$  值由其对应的分指数  $\geq 0.6$  计算。

1.4 指标权重赋值

各指标在生态系统中的重要性存在差异, 因此需要确定所有评价指标在生态效应中的权重, 才能对生

表 4 人工鱼礁生态系统健康水平分级  
Tab.4 Grade for health level of artificial reef ecosystem

项目 Item	健康指数分布 Distribution of health index					
	[0~0.2)	[0.2~0.4)	[0.4~0.6)	[0.6~0.8)	[0.8~1.0)	1.0
评价等级 Evaluation level	病态 Sick	一般病态 Sore	亚健康 Sub-healthy	健康 Healthy	很健康 Healthier	最健康 Healthiest

表 5 评价指标归一化函数与标准  
Tab.5 Normalization function and standard of indicator

指标分类 Index category	指标 Index	隶属度函数 Fuzzy membership function	评价标准 Evaluation standard
水质环境 Water quality	pH	$EHI_{pH} = \begin{cases} 1 & 7.8 \leq pH \leq 8.5 \\ 0 & pH < 7.8, pH > 8.5 \end{cases}$	海水水质标准(GB3097-1997)
	无机氮 DIN	$EHI_{DIN} = \begin{cases} 1 & 0.2 \leq DIN \leq 0.3 \\ \left(\frac{0.3 - EHI_{DIN}}{0.3 - 0.2}\right) & 0.3 < DIN \\ 0 & IP < 0.03 \end{cases}$	海水水质标准(GB3097-1997)
	活性磷酸盐 IP	$EHI_{IP} = \begin{cases} 1 & 0.03 \leq IP \leq 0.045 \\ \left(\frac{0.045 - EHI_{IP}}{0.045 - 0.03}\right) & 0.045 < IP \\ 0 & COD < 2 \end{cases}$	海水水质标准(GB3097-1997)
化学需氧量 COD	$EHI_{COD} = \begin{cases} 1 & 2 \leq COD \leq 3 \\ \left(\frac{3 - EHI_{COD}}{3 - 2}\right)^{0.11} & 3 < COD \\ 0 & \end{cases}$	海水水质标准(GB3097-1997)	

续表 5

指标分类 Index category	指标 Index	隶属度函数 Fuzzy membership function	评价标准 Evaluation standard
水质环境 Water quality	悬浮物 SS	$EHI_{SS} = \begin{cases} 1 & SS < 0 \\ \left(\frac{10 - EHI_{SS}}{10 - 0}\right)^{0.073} & 0 \leq SS \leq 10 \\ 0 & 10 < SS \end{cases}$	海水水质标准(GB3097-1997)
	溶解氧 DO	$EHI_{DO} = \begin{cases} 0 & DO < 5 \\ \left(\frac{EHI_{DO} - 5}{6 - 5}\right)^{0.11} & 5 \leq DO \leq 6 \\ 1 & 6 < DO \end{cases}$	海水水质标准(GB3097-1997)
	氮磷比 N/P	$EHI_{N/P} = \begin{cases} 0 & N/P < 8 \\ \left(\frac{EHI_{N/P} - 8}{16 - 8}\right)^{0.077} & 8 \leq N/P < 16 \\ \left(\frac{30 - EHI_{N/P}}{30 - 16}\right)^{0.071} & 16 \leq N/P \leq 30 \\ 0 & N/P > 30 \end{cases}$	潜在性富营养化分级标准(表 2)
沉积环境 Sediment quality	硫化物 Sulfide	$EHI_S = \begin{cases} 1 & S < 0 \\ \left(\frac{300 - EHI_S}{300 - 0}\right)^{0.049} & 0 \leq S \leq 300 \\ 0 & 300 < S \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	石油类 TPHs	$EHI_{pet} = \begin{cases} 1 & pet < 0 \\ \left(\frac{500 - EHI_{pet}}{500 - 0}\right)^{0.047} & 0 \leq pet \leq 500 \\ 0 & 500 < pet \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	铜 Cu	$EHI_{Cu} = \begin{cases} 1 & Cu < 0 \\ \left(\frac{35 - EHI_{Cu}}{35 - 0}\right)^{0.062} & 0 \leq Cu \leq 35 \\ 0 & 35 < Cu \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	汞 Hg	$EHI_{Hg} = \begin{cases} 1 & Hg < 0 \\ \left(\frac{0.2 - EHI_{Hg}}{0.2 - 0}\right)^{0.096} & 0 \leq Hg \leq 0.2 \\ 0 & 0.2 < Hg \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	锌 Zn	$EHI_{Zn} = \begin{cases} 1 & Zn < 0 \\ \left(\frac{150 - EHI_{Zn}}{150 - 0}\right)^{0.053} & 0 \leq Zn \leq 150 \\ 0 & 150 < Zn \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	镉 Cd	$EHI_{Cd} = \begin{cases} 1 & Cd < 0 \\ \left(\frac{0.5 - EHI_{Cd}}{0.5 - 0}\right)^{0.082} & 0 \leq Cd \leq 0.5 \\ 0 & 0.5 < Cd \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)



续表 5

指标分类 Index category	指标 Index	隶属度函数 Fuzzy membership function	评价标准 Evaluation standard
沉积环境 Sediment quality	砷 As	$EHI_{As} = \begin{cases} 1 & As < 0 \\ \left( \frac{20 - EHI_{As}}{20 - 0} \right)^{0.067} & 0 \leq As \leq 20 \\ 0 & 20 < As \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
	铅 Pb	$EHI_{Pb} = \begin{cases} 1 & Pb < 0 \\ \left( \frac{60 - EHI_{Pb}}{60 - 0} \right)^{0.058} & 0 \leq Pb \leq 60 \\ 0 & 60 < Pb \end{cases}$	海洋沉积物质量(GB18668-2002)
浮游植物 Phytoplankton	密度( $\times 10^5$ ) Density	$EHI_{phy} = \begin{cases} 0 & phy < 0.3 \\ \left( \frac{EHI_{phy} - 0.3}{1.5 - 0.3} \right)^{0.043} & 0.3 \leq phy < 1.5 \\ 1 & 1.5 \leq phy \leq 15 \\ \left( \frac{20 - EHI_{phy}}{20 - 15} \right)^{0.039} & 15 < phy \leq 20 \\ 0 & phy > 20 \end{cases}$	近岸海洋生态健康评价指南 (HY/T087-2005)
	多样性阈值 Threshold of biodiversity	$EHI_{div} = \begin{cases} 0 & div < 0.6 \\ \left( \frac{EHI_{div} - 0.6}{3.5 - 0.6} \right)^{0.7} & 0.6 \leq div \leq 3.5 \\ 1 & div > 3.5 \end{cases}$	生物多样性阈值评价标准 (陈清潮等, 1994)
浮游动物 Zooplankton	密度( $\times 10^3$ ) Density	$EHI_{zoo} = \begin{cases} 0 & zoo < 3.0 \\ \left( \frac{EHI_{zoo} - 3.0}{4.5 - 3.0} \right)^{0.069} & 3.0 \leq zoo < 4.5 \\ 1 & 4.5 \leq zoo \leq 12.5 \\ \left( \frac{15 - EHI_{zoo}}{15 - 12.5} \right)^{0.065} & 12.5 < zoo \leq 15 \\ 0 & zoo > 15 \end{cases}$	近岸海洋生态健康评价指南 (HY/T087-2005)
	多样性阈值 Threshold of biodiversity	$EHI_{div} = \begin{cases} 0 & div < 0.6 \\ \left( \frac{EHI_{div} - 0.6}{3.5 - 0.6} \right)^{0.7} & 0.6 \leq div \leq 3.5 \\ 1 & div > 3.5 \end{cases}$	生物多样性阈值评价标准 (陈清潮等, 1994)
底栖生物 Benthos	生物量 Biomass	$EHI_{ben} = \begin{cases} 0 & ben < 12.5 \\ \left( \frac{EHI_{ben} - 12.5}{18.75 - 12.5} \right)^{0.079} & 12.5 \leq ben < 18.75 \\ 1 & 18.75 \leq ben \leq 37.5 \\ \left( \frac{45 - EHI_{ben}}{45 - 37.5} \right)^{0.077} & 37.5 < ben \leq 45 \\ 0 & ben > 45 \end{cases}$	近岸海洋生态健康评价指南 (HY/T087-2005)
	多样性阈值 Threshold of biodiversity	$EHI_{div} = \begin{cases} 0 & div < 0.6 \\ \left( \frac{EHI_{div} - 0.6}{3.5 - 0.6} \right)^{0.7} & 0.6 \leq div \leq 3.5 \\ 1 & div > 3.5 \end{cases}$	生物多样性阈值评价标准 (陈清潮等, 1994)

续表 5

指标分类 Index category	指标 Index	隶属度函数 Fuzzy membership function	评价标准 Evaluation standard
渔业资源 Fishery resources	多样性阈值 Threshold of biodiversity	$EHI_{div} = \begin{cases} 0 & div < 0.6 \\ \left(\frac{EHI_{div} - 0.6}{3.5 - 0.6}\right)^{0.7} & 0.6 \leq div \leq 3.5 \\ 1 & div > 3.5 \end{cases}$	生物多样性阈值评价标准 (陈清潮等, 1994)

态系统健康状态做出准确判断。研究人员在权重分配问题上进行了大量的研究, 将权重确定方法分为专家法、数学法及二者相结合。专家法主要有层次分析法、灰色关联度法等(胡婕, 2007)。本研究选用层次分析法对各项指标进行赋权, 该方法是一种多目标、多准则的决策方法(Guelph, 1998; 郭金玉等, 2008), 已广泛用于不同生态系统健康评价, 其原理是将复杂问题通过层次划分成具体指标使其条理化, 由专家根据客观实际对每个层次上的各项指标进行模糊判断, 再利用数学方法判断每层指标对上一层级的贡献率, 通过层次递阶得到基础指标对研究对象的贡献率, 即各项指标的权重。

### 1.5 生态系统健康综合评价模型

根据各项指标归一化值及其对应的权重, 利用模糊综合评价法(Xu *et al*, 2004)建立人工鱼礁生态系统综合健康指数模型, 得到:

$$EHI = \sum_i W_i \times EHI_i \quad (4)$$

式中, EHI 是生态系统综合健康指数;  $W_i$  是第  $i$

个指标的权重;  $EHI_i$  是第  $i$  个指标的分指数, 综合健康指数 EHI 的分布范围为 [0, 1], 综合健康指数对应的生态系统健康状况见表 4。

## 2 评价模型在人工鱼礁生态系统中的应用

### 2.1 北戴河人工鱼礁区建设概况

北戴河人工鱼礁示范区海域选址在北戴河国家级水产种质资源保护区外公共水域, 符合海洋功能区划要求, 无海底管道线、倾倒地和军事禁区, 是规划中的海洋牧场、休闲渔业和旅游用海。具体地理位置为图 1 中 B1、B2、B3、B4 四点连线所围区域, 地理坐标见表 6。示范区 2013 年 9 月开始投建, 2014 年 12 月完成全部建设, 投放金字塔型鱼礁 40 个、正方形鱼礁 1131 个、星型鱼礁 1044 个和石块礁 14169.4 空方, 总建设面积 58 ha, 共投礁 26567.76 空方。

### 2.2 现场调查与数据采集

根据人工鱼礁区建设海区地理位置及海洋调查规范(GB12763.1-2007), 采用大面调查法, 人工鱼礁

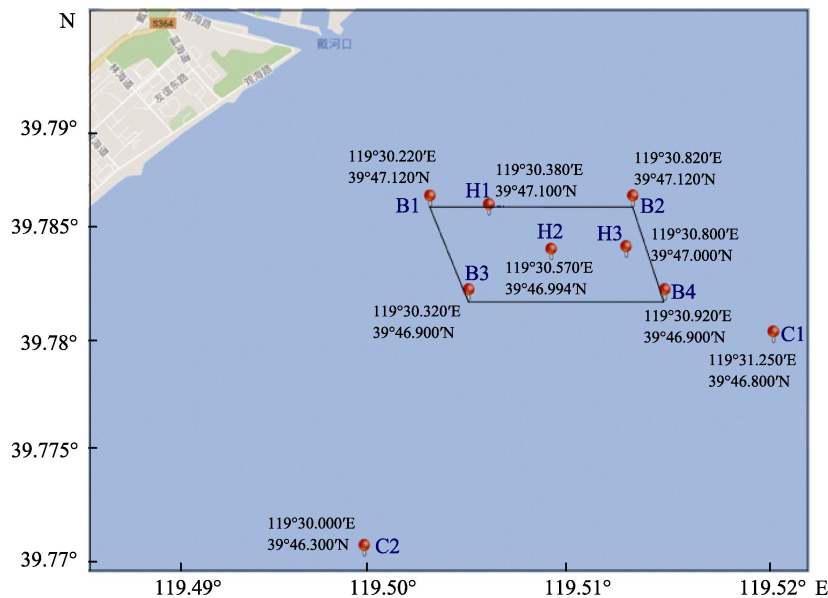


图 1 北戴河生态人工鱼礁区地理位置

Fig.1 Geographic position of ecological artificial reef in Beidaihe area

区设置 3 个站位 H1、H2、H3, 设置 2 个对照站位 C1、C2 (图 1)。对照点 C1、C2 距离礁区的最近距离分别为 600 和 1200 m。

### 2.3 评价结果

利用生态系统综合评价模型评价北戴河生态人工鱼礁系统建设效果进行, 将 2013 年 7 月、2014 年 6 月和 2015 年 5 月的调查数据进行归一化处理, 采用层次分析法对各指标权重进行赋值, 得到鱼礁区

和对照各项评价指标的归一化值、权重和分健康指数 (表 6)。按照公式 4 对各项分指数进行计算, 得到 3 个航次人工鱼礁区和对照区综合健康指数显示, 3 次调查取样时, 人工鱼礁区和对照区的生态系统都达到健康状态。对照区在 2013 年 7 月和 2014 年 6 月的调查中, 健康指数都高于鱼礁区, 在 2015 年 5 月调查时, 对照区生态健康指数出现下滑, 但人工鱼礁区生态系统健康呈现逐步提升的状态, 2015 年 5 月的综合健康指数为 0.838, 属很健康状态。

表 6 生态系统分健康指标分布  
Tab.6 Distribution of ecosystem health index

指标 Index	权重 Weight	归一化值(鱼礁区) Normalization value(reef area)			归一化值(对照区) Normalization value(contrast area)		
		2013-07	2014-06	2015-05	2013-07	2014-06	2015-05
		pH	0.030	1.000	1.000	1.000	1.000
无机氮 DIN	0.015	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
活性磷酸盐 IP	0.030	1.000	1.000	0.460	1.000	1.000	0.925
化学需氧量 COD	0.015	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
悬浮物 SS	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.806	0.000
溶解氧 DO	0.022	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
氮磷比 N/P	0.040	0.933	0.000	0.000	0.951	0.953	0.000
硫化物 Sulfide	0.021	0.998	0.998	0.999	0.997	0.997	0.999
石油类 TPHs	0.021	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999
铜 Cu	0.021	0.990	0.991	0.936	0.993	0.993	0.893
汞 Hg	0.021	0.998	0.999	0.991	0.996	0.998	0.990
锌 Zn	0.021	0.988	0.988	0.984	0.990	0.990	0.983
镉 Cd	0.021	0.959	0.956	0.939	0.964	0.948	0.935
砷 As	0.021	0.998	1.000	0.975	0.997	1.000	0.980
铅 Pb	0.021	0.977	0.985	0.967	0.985	0.986	0.953
浮游植物丰度 Phytoplankton density	0.083	0.980	1.000	0.980	0.970	0.985	0.989
浮游植物多样性阈值 Threshold of phytoplankton biodiversity	0.083	0.627	0.880	0.771	0.499	0.822	0.628
浮游动物丰度 Zooplankton density	0.083	0.000	1.000	1.000	0.000	0.874	0.000
浮游动物多样性阈值 Threshold of zooplankton biodiversity	0.083	0.755	0.609	0.556	0.656	0.348	0.840
底栖生物生物量 Benthos biomass	0.083	1.000	0.000	0.862	0.000	0.000	0.961
底栖生物多样性阈值 Threshold of benthos biodiversity	0.083	0.111	0.959	0.940	0.839	0.899	0.828
渔业资源多样性阈值 Threshold of fishery resources biodiversity	0.167	0.360	0.839	0.929	0.869	0.918	0.285

表 7 生态系统综合健康指数变化  
Tab.7 Change of synthesized health index of ecosystem

	鱼礁区 Reef area			对照区 Contrast area		
	2013-07	2014-06	2015-05	2013-07	2014-06	2015-05
生态健康综合指数 EHI	0.663	0.787	0.838	0.706	0.807	0.671

### 3 讨论

本研究通过生态系统健康质量综合评价人工鱼礁建设生态效应,选择水质环境、沉积环境与生物环境中 22 个参数作为生态系统健康评价指标,建立模糊综合评价模型,并利用模型对北戴河人工鱼礁生态系统健康状况进行评价。通过对比分析人工鱼礁区建礁前后及其与对照区生态系统综合健康指数发现,随着人工鱼礁建设工程的实施完成,其生态系统健康状况逐年提升,并在 2015 年对照区健康状况下降的情况下,仍达到很健康的状态。根据模型评价结果显示,2013 年 7 月投礁前的本底调查中,对照区和拟建礁区均处于健康状态,但对照区 EHI(0.706)高于拟建礁区(0.663),本底调查时,拟建礁区水质理化指标、沉积环境指标的差异性较小,对照区底栖生物和渔业资源多样性阈值明显高于鱼礁区;2014 年 6 月调查时,对照区和鱼礁区的 EHI 均高于本底调查时的同海域,对照区处于很健康状态(EHI 值为 0.807),鱼礁区处于健康状态(EHI 值为 0.787),鱼礁区与对照区水质理化指标、沉积环境指标的差异性较小,生物资源指标中的渔业资源多样性阈值略低于对照区,其他指标高于对照区;2015 年 5 月调查时,鱼礁区的 EHI(0.838)均高于前 2 次调查,属很健康状态,对照区 EHI(0.671)显著低于鱼礁区,礁区渔业资源多样性阈值显著高于对照区,且人工鱼礁区渔业资源多样性阈值分指数呈现逐年增加:0.929(2015)>0.839(2014)>0.360(2013),该项分指标在本底调查时显著低于对照区,项目建设中调查时略低于对照区,2015 年 5 月礁区建设完成近 1 年后调查时显著高于对照区的 0.285,这一结果显示了人工鱼礁对渔业资源的良好养护效果(表 7),与国内外学者在人工鱼礁资源养护效果方面的研究结果相一致(张虎等, 2004; Reubens *et al.*, 2013; Saul *et al.*, 2013; dos Santos *et al.*, 2010; Abelson, *et al.*, 2002; Seaman W, 2007; 焦金菊等, 2011)。另外,本调查对照站位 C1、C2 距离礁区的距离分别为 600 和 1200 m,杨吝等(2005)研究显示,单位鱼礁的主要辐射范围在 200 m 内,对感知范围较大的鱼类,在 800~1200 m 内仍有诱集效果,因此,对照区渔业资源多样性阈值出现降低的其中一个原因可能是礁体投放对周围海域的恋礁型鱼类及其他游泳动物产生的诱集作用。

### 4 结语

人工鱼礁投放后产生的流场效应、饵料效应、声光效应等,对礁区及临近海域的理化环境和海洋生物发挥作用,同时,人工鱼礁生态系统是一个开放的动态系统,与外围海域时刻发生着物质与能量的交换,因此,应开展长期全面的人工鱼礁调查监测,研究人工鱼礁生态系统变化过程与机理,为科学评价人工鱼礁生态效应提供数据支撑。本研究采用模糊综合评价对人工鱼礁生态系统健康状况进行评价,其结果对人工鱼礁工程建设、环境资源保护、高效管理和可持续利用具有重要意义

### 参 考 文 献

- Abelson A, Shlesinger Y. Comparison of the development of coral and fish communities on rock-aggregated artificial reefs in Eilat, Red Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 2002, 59(S1): 122-126
- Chen QC, Huang LM, Yi JQ, *et al.* Biodiversity of zooplankton in Nansha archipelago. Biodiversity of halobios in Nansha archipelago and adjacent waters. Beijing: Ocean Press, 1994, 42-50 [陈清潮, 黄良民, 伊健强, 等. 南沙群岛海区浮游动物多样性研究 I 南沙群岛及其邻近海区海洋生物多样性研究. 北京: 海洋出版社, 1994, 42-50]
- Chen YH. Analysis of ecological effects of southern Dalajia Island artificial reef area in Daya Bay, Guangdong, China. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2009 [陈应华. 大亚湾大辣甲南人工鱼礁区的生态效应分析. 暨南大学博士研究生学位论文, 2009]
- Costanza R, d'Arge R, Groot R, *et al.* The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Ecological Economics*, 1998, 25(1): 3-15
- dos Santos LN, Brotto DS, Zalmon IR. Fish responses to increasing distance from artificial reefs on the Southeastern Brazilian Coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 386(1): 54-60
- Evans MS. Toxic contaminants and Great Lakes ecosystem health: Current understandings and strategies for improved assessments. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1993, 2(2): 87-93
- Guo JY, Zhang ZB, Sun QY. Study and applications of analytic hierarchy process. *China Safety Science Journal*, 2008, 18(5): 148-153 [郭金玉, 张忠彬, 孙庆云. 层次分析法的

- 研究与应用. 中国安全科学学报, 2008, 18(5): 148–153]
- Hu J. Research on ecological environment comprehensive assessment methods for coast marine area. Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2007 [胡婕. 沿岸海域生态环境质量综合评价方法研究. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Jiao JJ, Pan YX, Sun LY, *et al.* Effect of artificial reefs on fish multiplication. *Fisheries Science*, 2011, 30(2): 79–82 [焦金菊, 潘永玺, 孙利元, 等. 人工鱼礁区的增殖鱼类资源效果初步研究. 水产科学, 2011, 30(2): 79–82]
- Li CH, Lin L, Xu SN, *et al.* Establishment of integrated methodology for bay ecosystem health assessment and its application in Daya Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(6): 1798–1810 [李纯厚, 林琳, 徐姗楠, 等. 海湾生态系统健康评价方法构建及在大亚湾的应用. 生态学报, 2013, 33(6): 1798–1810]
- Malley DF, Mills KH. Whole-lake experimentation as a tool to assess ecosystem health, response to stress and recovery: The experimental lakes area experience. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1992, 1(3): 159–174
- Munawar M, Munawar IF, McCarthy L, *et al.* Assessing the impact of sewage effluent on the ecosystem health of the Toronto Waterfront (Ashbridges Bay), Lake Ontario. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1993, 2(4): 287–315
- Rapport DJ, Costanza R, McMichael AJ. Assessing ecosystem health. *Trends in Ecology & Evolution*, 1998, 13(10): 397–402
- Reubens JT, Braeckman U, Vanaverbeke J, *et al.* Aggregation at windmill artificial reefs: CPUE of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and pouting (*Trisopterus luscus*) at different habitats in the Belgian part of the North Sea. *Fisheries Research*, 2013, 139(1): 28–34
- Rosenberg DM, Resh VH. Fresh water biomonitoring and benthic macroinvertebrates. *The Quarterly Review of Biology*, 1994, 69(2): 286–287
- Saul SE, Walter JF, Die DJ, *et al.* Modeling the spatial distribution of commercially important reef fishes on the West Florida Shelf. *Fisheries Research*, 2013, 143(1): 12–20
- Sonstegard RA, Leatherland JF. Great lakes coho salmon as an indicator organism for ecosystem health. *Marine Environmental Research*, 1984, 14(1–4): 480
- Tong F, Zhang XM, Wu ZX, *et al.* The ecosystem health assessment of artificial reef areas in Lidao Island, Rongcheng. *Periodical of Ocean University of China*, 2014, 44(4): 29–36 [佟飞, 张秀梅, 吴忠鑫, 等. 荣成俚岛人工鱼礁区生态系统健康的评价. 中国海洋大学学报, 2014, 44(4): 29–36]
- Guelph UO, Smit B, Waltner-toews D, *et al.* Agroecosystem health: Analysis and assessment. *World Economy*, 1998, 25(4): 563–589
- Wang X, Sheng HX, Tang YL, *et al.* Relationships between the structure of phytoplankton community and environmental factors in three artificial reef areas of Laoshan Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 7–12 [王欣, 盛化香, 唐衍力, 等. 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 7–12]
- Seaman W. Artificial habitats and the restoration of degraded marine ecosystems and fisheries. *Hydrobiologia*, 2007, 580(1): 143–155
- Xu FL, Lam KC, Zhao ZY, *et al.* Marine coastal ecosystem health assessment: A case study of the Tolo Harbour, HongKong, Chian. *Ecological Modelling*, 2004, 173(4): 355–370
- Xu FL. Ecosystem health assessment of Lake Chao, a shallow eutrophic Chinese lake. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 1996, 2(1–2): 101–109
- Yang L, Liu TY, Huang RK. Theory and practice of artificial reefs in China. Guangzhou: Guangdong Science Technology Press, 2005 [杨吝, 刘同渝, 黄汝堪. 中国人工鱼礁的理论与实践. 广州: 广东科技出版社, 2005]
- Yin ZQ, Zhang SY. The ecological effect evaluation system of protective artificial reef in East China Sea. *Marine Fisheries*, 2012, 34(1): 23–31 [尹增强, 章守宇. 东海区资源保护型人工鱼礁生态效果评价体系的初步研究. 海洋渔业, 2012, 34(1): 23–31]
- Zhang H, Zhu KW Tang JH. The effect of fishery resource enhancement in the artificial reef area in the Haizhou Gulf. *Marine Fisheries*, 2005(1): 38–43 [张虎, 朱孔文, 汤建华. 海州湾人工鱼礁养护资源效果初探. 海洋渔业, 2005(1): 38–43]
- Zhang Y, Chen JF, Guo F, *et al.* Variation of seawater quality at the artificial reef area in Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 1–7 [张艳, 陈聚法, 过锋, 等. 莱州人工鱼礁海域水质状况的变化特征. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 1–7]

(编辑 马瑾艳)

## Research on Artificial Reef Ecosystem Health Assessment Based on Fuzzy Synthetic Evaluation

LI Jiao, ZHANG Yan, YUAN Wei, GONG Pihai, GUAN Changtao<sup>①</sup>

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Carbon-Sink Fisheries Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study, fuzzy synthetic evaluation was used to build a reef ecosystem-health assessment model. To eliminate the dimension effect of sub-indexes, normalization processing was used. Analytic hierarchy process was used to assign a threshold of ecological indicator. The synthetic health index was used to assess the health status of artificial reef areas and contrast areas. Sub-indexes of artificial reef ecosystem health assessments included physical, chemical, and biological factors. Assessment standards were based on seawater quality standards, marine sediment quality, and guidance for the assessment of coastal marine ecosystem health. Data and survey results of a background investigation in July 2013, and a tracing investigation in June 2014 and May 2015, were processed using the ecosystem-health synthetic assessment model. The results indicated that both reef area and contrast area are in a healthy state. The health state of the contrast area was better than that of the reef area in July 2013 before reef construction. Data from June 2014 was consistent with that from the background investigation; the health status of the contrast area was also better, which is related to the disturbance of reef construction and the evolution of the reef system. In May 2015, the health index of the contrast area declined, but that of the reef area increased to 0.838, indicating that the reef is very healthy. Health evaluation indicates that the health of the reef ecosystem in the Beidaihe demonstration area is gradually improving. According to the results obtained with the ecosystem health synthetic assessment model, the state of the reef improved with completion of construction and ecosystem stability; therefore, ecosystem health synthetic assessment is an important method for the management and development of reefs. Researching reef ecosystem health and scientifically assessing artificial reef ecological effects are significant for the construction of reef projects, environment protection, stock enhancement, efficient administration, and sustainable development of fisheries.

**Key words** Artificial reef; Ecosystem health; Fuzzy synthetic evaluation; Analytic hierarchy process

<sup>①</sup> Corresponding author: GUAN Changtao, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180112001

http://www.yyxxjz.cn/

白莉, 陈亚东, 夏永涛, 许式见, 胡谋, 沙珍霞. 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因的克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 20-26

Bai L, Chen YD, Xia YT, Xu SJ, Hu M, Sha ZX. Cloning and expression analysis of  $\beta$ -defensin gene from Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 20-26

## 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因的克隆及表达分析\*



白莉<sup>1,3</sup> 陈亚东<sup>2,3</sup> 夏永涛<sup>4</sup> 许式见<sup>4</sup> 胡谋<sup>4</sup> 沙珍霞<sup>2①</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 青岛大学生命科学学院 青岛 266071;

3. 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;

4. 杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司 杭州 311701)

**摘要**  $\beta$ -防御素是一类富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽, 在脊椎动物免疫系统中发挥重要作用。本研究基于转录组 Solexa 测序结果, 利用 PCR 和荧光定量 PCR 技术对俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)  $\beta$ -防御素基因进行了克隆和表达模式分析。结果显示, 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 cDNA 片段长度为 333 bp, 包含开放阅读框(Open reading frame, ORF) 213 bp, 推测编码 71 个氨基酸; SMART 分析显示, 该基因包含 23 个氨基酸的信号肽、1 个防御素- $\beta$ -2 结构域和 6 个保守的半胱氨酸残基, 此结构与其他物种极为相似, 在进化中比较保守。同源比对发现, 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素与鱼类的相似度最高, 为 54%~60%。 $\beta$ -防御素基因在健康俄罗斯鲟 11 种组织(肝、肠、脾、头肾、胃、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺)中均有表达, 其中, 在性腺和皮肤中表达量最高; 病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染后可强烈影响  $\beta$ -防御素基因在 6 种免疫组织(肝、肠、脾、头肾、血液和鳃)中的时空表达。其中, 在头肾中的上调表达最明显, 在感染后 72 h 为表达峰值, 达到 0 h 表达量的 700 倍。在脾、血液和肠中均有几倍至十几倍的上调, 而在肝中整体呈现下调表达趋势。研究表明,  $\beta$ -防御素基因参与了俄罗斯鲟的免疫应答过程, 本结果为俄罗斯鲟的免疫调控和病害防治研究奠定了基础。

**关键词** 俄罗斯鲟;  $\beta$ -防御素; 基因克隆; 基因表达; 嗜水气单胞菌

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0020-07

防御素是一类富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽, 广泛分布于植物、昆虫和脊椎动物中。根据对 6 个保守的半胱氨酸的位置和二硫键连接方式不同将防御素分为 3 个亚家族:  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\theta$ -防御素(Zhu *et al*, 2013)。 $\beta$ -防御素是动物防御素系统中最大的成员, 具有广谱的抗菌活性及不受传统抗生素耐药性菌株影响的抗菌机理, 同时, 与典型抗生素具有协同作用, 能中和

内毒素、调节机体免疫应答和炎症反应、调节组织创伤修复等而备受人们关注(张伟等, 2006)。

目前, 鱼类中只发现了  $\beta$ -防御素, 相对于其他脊椎动物, 研究处于起步阶段。2007 年首次在斑马鱼(*Danio rerio*)和河鲢(*Takifugu rubripes*)中分离鉴定出  $\beta$ -防御素(Zou *et al*, 2007)以来, 迄今仅在金头鲷(*Sparus aurata*) (Cuesta *et al*, 2011)、团头鲂(*Megalobrama*

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014A03XK01)资助项目 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (2014A03XK01)]. 白莉, E-mail: Baili\_soul@163.com

① 通讯作者: 沙珍霞, 研究员, E-mail: shazhenxia@163.com

收稿日期: 2018-01-12, 收修改稿日期: 2018-02-01

*amblycephala*)(Liang *et al.*, 2013)、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)(Zhu *et al.*, 2017)等 14 种鱼类上开展过基因表达和抗菌活性的研究。

鲟鱼被称为“水中活化石”，近年来，俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)养殖业在我国发展较快，由于其性成熟周期较长，养殖过程一旦发生病害，将对养殖业产生巨大影响，而嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是致病的主要病原体之一(杨治国, 2001)。但俄罗斯鲟的免疫基因发掘及免疫机制鲜有报道。本研究在前期俄罗斯鲟性腺转录组(Chen *et al.*, 2016)中挖掘到  $\beta$ -防御素部分序列的基础上，克隆了俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 cDNA 序列，推导出包含信号肽的完整蛋白序列，研究其组织表达及响应病原菌刺激后在免疫组织中的时空表达模式，为俄罗斯鲟免疫机理研究、病害防治和健康养殖提供有价值的研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康 1.5 龄俄罗斯鲟，体长为(47.5±2.5) cm，体重为(450±10) g。取自杭州千岛湖鲟龙集团有限公司，暂养于直径 2 m、水深 0.5 m 的圆形玻璃钢养殖缸中，至少 15 d 后方可进行实验。养殖用水引自乌溪江，水温为 17~20℃。嗜水气单胞菌为实验室保存菌种，分离自俄罗斯鲟病鱼组织，经 16S rRNA 测序进行菌种鉴定。

### 1.2 组织收集

分别收集 3 条健康俄罗斯鲟的肝、肠、脾、头肾、胃、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺 11 种组织，立即放入液氮中，随后将组织转移至-80℃冰箱中保存，用于总 RNA 提取。采用腹腔注射方法按照半致死剂量(2.07×10<sup>4</sup> CFU/g)进行病原感染。对照组注射同等体积的 1×PBS 溶液。收集感染 0、6、12、24、48、72 h 实验组和对照组，各取 3 条俄罗斯鲟的肝、脾、鳃、血液、头肾和肠组织，保存方式同上所述。

### 1.3 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

采用液氮研磨收集的组织，参照总 RNA 提取试剂盒(天根, 北京)说明书进行组织总 RNA 提取。使用 Agilent 2100 生物分析仪(Applied Biosystems, 美国)检测其质量和浓度，通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照 Prime Script™ RT reagent kit (Perfect Real time) (宝生物, 大连)试剂盒合成 cDNA，-20℃保存备用。

### 1.4 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因 cDNA 片段克隆

从俄罗斯鲟性腺转录组中筛选出  $\beta$ -防御素基因部分 cDNA 序列，采用 Primer Premier 5.0 在线软件(www.bio-soft.net)设计特异性引物 P1 和 P2(表 1)，以俄罗斯鲟 11 个组织混合 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。扩增产物连接 T 载体，转化到 T1 感受态细胞中，对阳性克隆进行测序。

表 1 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因克隆和表达分析所用引物

Tab.1 Primers used for cloning and expression of *A. gueldenstaedti*  $\beta$ -defensin

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
P1	TCTCCGAGGACAGCCATGGTAAC	克隆 $\beta$ -防御素基因
P2	GTGTCCTCTCTGACCACAGGTCC	克隆 $\beta$ -防御素基因
P3	GCTGTTGTTACTGGCATCTGT	定量表达引物
P4	TGAAGAAAAGCCCATCTCCAT	定量表达引物
18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	定量表达内参引物
18S-R	CTCAATCCAATTACAGGGCCTC	定量表达内参引物

### 1.5 生物信息学分析

将测序拼接获得的基因序列运用 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)Protein Blast 进行  $\beta$ -防御素氨基酸同源性比对，使用在线软件 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构域；信号肽预测采用 SignalP3.0Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)，应用 ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)、DNASTar(<http://www.dnastar.com/>)、ClustalX1.83 (<http://www.genome.jp/tools/clustalx/>)和 DNAMAN(<http://www.lynnon.com/>)等软件进行俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因开放阅读框的查找及氨基酸多重序列比对分析。利用 MEGA 5.1 重复 1000 次构建 N-J 进化树。应用 CPHmodels3.2server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)在线软件预测  $\beta$ -防御素蛋白的三维结构。

### 1.6 俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因表达的实时定量分析

基因实时定量表达分析参照已报道的方法进行(路颯等, 2013; 于孟君等, 2017)。根据测序得到的俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物为 P3、P4(表 1)，以俄罗斯鲟 18S rRNA 基因为内参设计特异引物 18S-F 和 18S-R(表 1)。用 SYBR Green 荧光定量试剂盒(天根, 北京)按照说明书在 ABI PRISM 7500Fast 实时定量扩增仪上(ABI, 美国)进行该基因的实时定量分析(qRT-PCR)。每个样品设置 3 个生物学重复，使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量，*Ct*



值取 3 个平行样品的平均值。qRT-PCR 检测结果使用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)的 Duncan 法对多组样本均数进行两两比较分析, P<0.05 时, 认为存在显著性差异。

### 2 结果

#### 2.1 俄罗斯鲟 β-防御素基因序列分析

克隆测序得到的俄罗斯鲟 β-防御素基因部分 cDNA 片段长度为 333 bp, 用 ORF finder 软件分析其 ORF 长度为 213 bp, 编码 71 个氨基酸(图 1), 与其他物种的同源序列所包含的 ORF 长度相当。信号肽和结构域分析结果显示, 该基因序列包含 23 个氨基酸的信号肽、完整的 β-防御素-2 结构域(82~234)。



图 1 俄罗斯鲟 β-防御素 cDNA 序列和推测的氨基酸序列 Fig.1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of A. gueldenstaedti β-defensin

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方, 用大写字母表示; 双下划线(=)所示为信号肽; 方框所示为起始密码子(ATG)、星号(\*)所示为终止密码子(TAG); 下划线(—)为 defensin-β-2 结构域

Translated amino acid sequence was shown under nucleotide sequence as uppercase; The iniation codon and termination codon were marked by a box and an asterisk, respectively; Signal peptide was shown with double solid line(=); Defensin-β-2 domain was shown with underline(—)

#### 2.2 俄罗斯鲟 β-防御素基因同源比对及系统进化分析

推导的俄罗斯鲟 β-防御素氨基酸序列和其他物

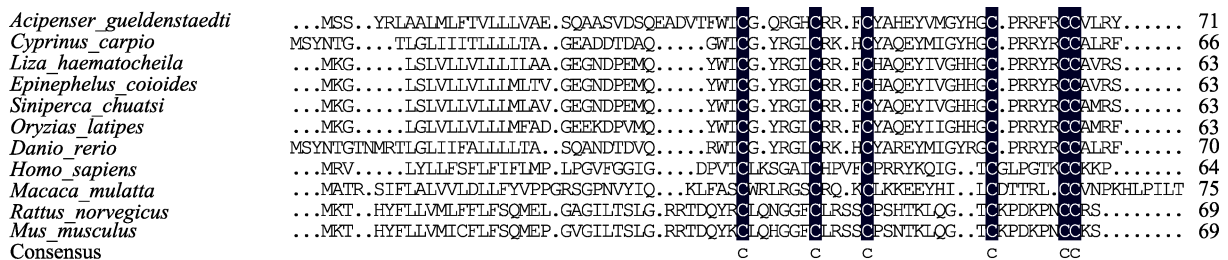


图 2 推导的俄罗斯鲟 β-防御素氨基酸与其他物种已知同源序列比对

Fig.2 Multiple alignment of A. gueldenstaedti β-defensin deduced amino acid sequence with other known orthologs

图中黑标处表示 6 个保守的半胱氨酸残基及位置, 分别是 C38、C44、C48、C60、C66 和 C67 Six conserved Cysteine residues (C38, C44, C48, C60, C66 and C67) in β-defensin protein were highlighted by black color

种的 β-防御素氨基酸序列如斑马鱼(Danio rerio, NP\_001075024.1)、青鳉(Oryzias latipes, ACG55699.1)、鳊(Epinephelus coioides, AFA41485.1)、鲤(Cyprinus carpio, AGZ03658.1)、梭鱼(Liza haematocheila, AIK66783.1)、点带石斑鱼(Epinephelus coioides, AFA41485.1)、福鼎蝾螈(Cynops fudingensis, AHF22421.1)、原鸡(Gallus gallus, ALI16124.1)、小鼠(Mus musculus, EDL32923.1)、大鼠(Rattus norvegicus, AAC61871.1)、恒河猴(Macaca mulatta, AAC61871.1)和人(Homo sapiens, AAH93985.1)等进行同源比对。结果显示, 俄罗斯鲟 β-防御素与其他物种的氨基酸序列同源性在 39%~60%之间, 其中, 与斑马鱼和鲤鱼的同源性最高, 为 60%, 其次是鳊鱼 59%, 与青鳉的同源性最低, 为 54%。但在不同的物种之间, 都具有 6 个保守的半胱氨酸残基(图 2)。

利用 MEGA 5.1 以 N-J 法构建基于上述物种 β-防御素氨基酸序列的分子系统进化树。结果显示, 系统进化树分为两个大的分支, 俄罗斯鲟 β-防御素与斑马鱼、青鳉、鳊、梭鱼、点带石斑鱼聚为一大支, 其中俄罗斯鲟单独聚为一个亚支, 与斑马鱼和鲤进化关系最近; 小鼠、大鼠和人聚为另外一个大支, 其中, 鼠类按亲缘关系远近聚成相应的亚支; 两栖类福鼎蝾螈单独聚为一个分支(图 3)。

#### 2.3 β-防御素蛋白质空间结构预测

预测的俄罗斯鲟 β-防御素的 3D 结构如图 4 所示。结果显示, C38 和 C66、C44 和 C60 及 C48 和 C67 之间分别形成 3 对二硫键, 6 个保守的半胱氨酸残基按照箭头方向形成反向平行的 β 片层折叠结构, 对 β-防御素结构稳定具有重要作用。该结构与斑马鱼 β-防御素-2 非常相似, 从结构上判断, 获得的俄罗斯鲟 β-防御素基因应属于 β-防御素-2 基因。

#### 2.4 β-防御素基因在俄罗斯鲟健康组织中的表达分析

qRT-PCR 结果显示, β-防御素基因在检测的健康

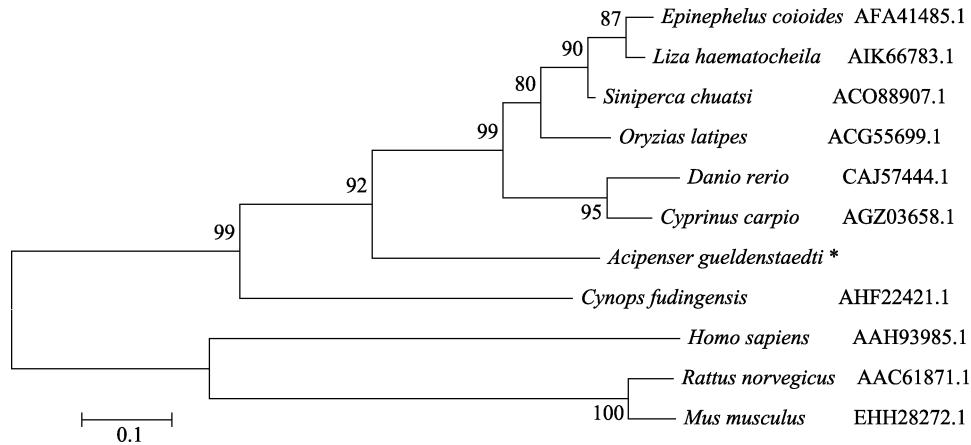


图 3 俄罗斯鲟与其他物种的  $\beta$ -防御素系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic tree of  $\beta$ -defensin of *A. gueldenstaedti* and other vertebrates

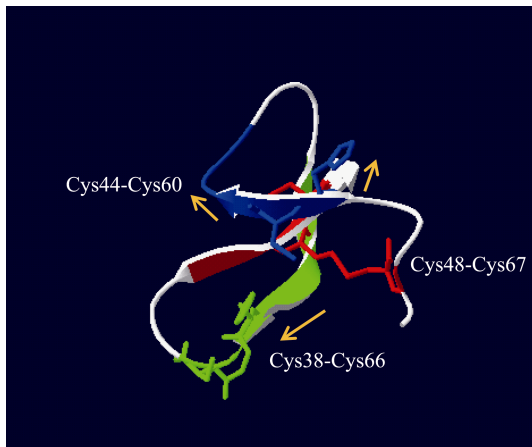


图 4 预测的俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素蛋白质三维结构

Fig.4 Three-dimensions structure of deduced protein of *A. gueldenstaedti*  $\beta$ -defensin

三个二硫键: C38 和 C66(绿色), C44 和 C60(蓝色)和 C48 和 C67(红色), 箭头方向表示  $\beta$ -片层折叠  
 Three disulfied bonds were formed C38-C66 (green), C44-C60 (blue) and C48-C67 (red), respectively  
 Arrow mark indicates  $\beta$ -sheet

俄罗斯鲟 11 种组织(肝、肠、脾、头肾、胃、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺)中均有不同程度的表达(图 5)。以表达量最低的血液(1.0)为对照, 相对表达量最高的组织是性腺(21.75), 其次是皮肤(10.05)、胃(2.5)、肌肉(2.4), 在肝(1.5)和脾(1.5)、鳃(1.05)、肠(1.2)、脑(1.25)及头肾(1.1)中的表达量相对较低,  $\beta$ -防御素基因在不同组织中表达存在特异性。

### 2.5 俄罗斯鲟感染嗜水气单胞菌后 $\beta$ -防御素基因在免疫组织中的表达分析

嗜水气单胞菌感染俄罗斯鲟 0、6、12、24、48 和 72 h 后,  $\beta$ -防御素基因在 6 种免疫组织(肝、肠、

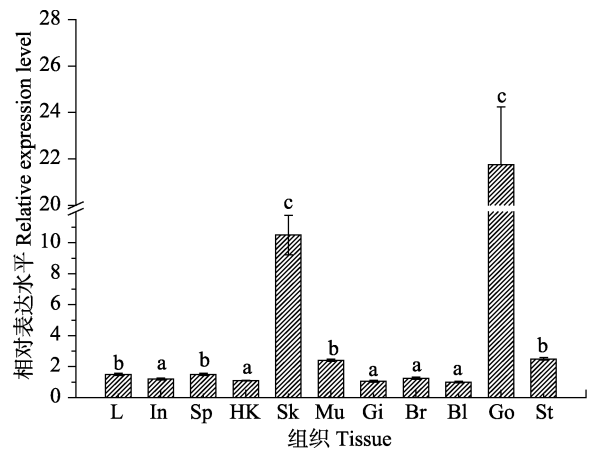


图 5  $\beta$ -防御素基因在健康俄罗斯鲟组织中的表达

Fig.5  $\beta$ -defensin gene expressions in 11 tissues of healthy *A. gueldenstaedti*

L: 肝; In: 小肠; Sp: 脾; HK: 头肾; Sk: 皮肤; Mu: 肌肉; Gi: 鳃; Br: 脑; Bl: 血液; Go: 性腺; St: 胃。字母“a, b, c”代表 SPSS 多重分析的不同分组, 有相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 无相同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同  
 L: Liver; In: Intestine; Sp: Spleen; HK: Head-Kidney; Sk: Skin; Mu: Muscle; Gi: Gill; Br: Brain; Bl: Blood; Go: Gonad; St: Stomach. The letters ‘a, b, c, d’ are subsets by Duncan algorithm. The same letters indicate insignificant difference ( $P>0.05$ ), the different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

脾、头肾、鳃和血液)中呈现不同的表达特征, 结果如图 6 所示。嗜水气单胞菌感染俄罗斯鲟后,  $\beta$ -防御素在头肾、血液、肠、脾和鳃 5 种组织中均呈现上调表达, 只是各组织中峰值出现的时间点不同, 在肝中则呈现下调趋势。其中,  $\beta$ -防御素基因在头肾中呈现最为显著的上调表达, 与 0 h 相比, 在感染后 6 h 后即出现了 10 倍的增加, 在感染后的 12~48 h, 基因表达表现为几十倍到上百倍不等的上调, 到感染 72 h 达到峰值, 为 0 h 表达量的 700 倍;  $\beta$ -防御素基因在

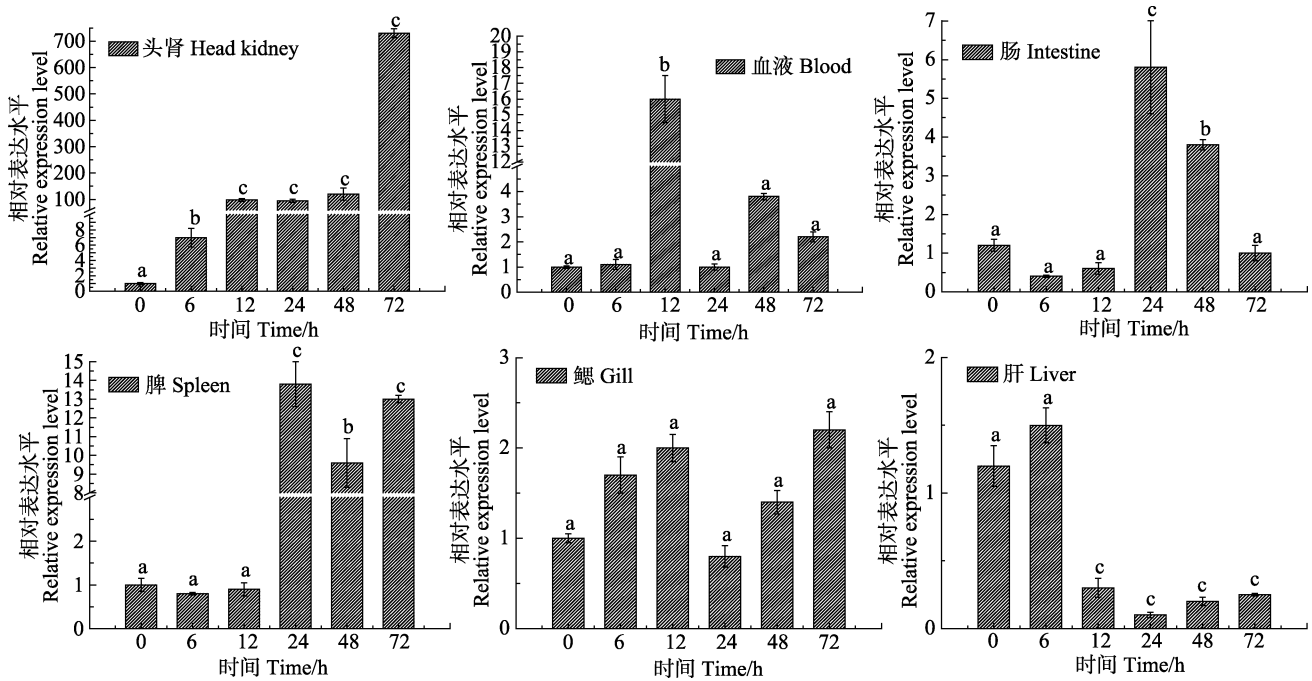


图6 俄罗斯鲟感染嗜水气单胞菌后 $\beta$ -防御素基因在免疫组织中的表达

Fig.6  $\beta$ -defensin gene expressions in immune tissues of *A. gueldenstaedti* after *Aeromonas hydrophila* challenge

每个时间点的 $\beta$ -防御素的表达量为感染组除以PBS组的相对表达量

The expression level of  $\beta$ -defensin at each timepoint was presented as relative expression in which the infected group divided by the PBS group

小肠、血液和脾中整体上表现为上调表达,最大表达峰值达到几倍到十几倍,在鳃中表达量变化不大,最高的表达量出现在感染后12h,为0h表达量的2倍,其他时间点表达量与0h相当; $\beta$ -防御素基因在肝脏中则总体呈现下调表达模式,感染12~72h后,表达量与0h相比,呈现近5倍的明显下调表达。

### 3 讨论

养殖环境的生态环保对鱼类健康养殖产业提出了严格要求,发展替代抗生素的绿色无污染的渔药如抗菌肽等势在必行。鱼类 $\beta$ -防御素已被证明具有明显的抗菌、抗病毒功能(Jin *et al*, 2010; Casadei *et al*, 2009),具有广阔的应用前景。但目前鱼类 $\beta$ -防御素的研究不深入,亟待更多的鱼种和功能分析上进行更深入的研究。俄罗斯鲟是生产鱼子酱的主要鱼种之一,经济价值很高,开展免疫机理和绿色病害防治研究,对发展和稳定鲟鱼养殖产业具有重要意义。本研究关于俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因的克隆和表达研究,是俄罗斯鲟宿主免疫的首次报道。

俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因cDNA长度为333bp,ORF为213bp,编码71个氨基酸,包含23个氨基酸

的信号肽和48个成熟肽,目前报道的不同鱼类的 $\beta$ -防御素前体分子一般由62~77个氨基酸残基组成,信号序列和前导序列含有22~38个氨基酸残基,成熟肽序列由39~45个氨基酸残基组成(Casadei *et al*, 2009),本研究结果与报道结果吻合。另外,俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素C端包含6个保守的半胱氨酸残基,形成3个二硫键结构,与报道的鱼类 $\beta$ -防御素结构一致(Dong *et al*, 2015; Ruangsri *et al*, 2013; Guo *et al*, 2012; Ellis, 2001)。俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素蛋白质空间结构预测形成3个 $\beta$ -片层折叠,与斑马鱼BD-2的结构(Ellis, 2001)很类似,SMART结构域预测,俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素包含 $\beta$ -防御素-2结构域,同源序列比对的结果也证实其与斑马鱼BD-2的相似度最高,为60%,这些证据都指明所获得俄罗斯鲟 $\beta$ -防御素基因应属于 $\beta$ -防御素-2,在进化上还是属于相对原始的类型。

鱼类 $\beta$ -防御素是抗菌肽的重要成员,在各组织中广泛表达,罗非鱼 $\beta$ -防御素在检测的9种组织(心、肝、脾、鳃、头肾、肠、胃、肌肉和皮肤)中都有表达,其中,在皮肤中表达量最高,其次是在脾、头肾和肌肉中有较高的表达,在肝、心、肠、胃和鳃中的表达量最低(Dong *et al*, 2015)。 $\beta$ -防御素基因在健康斑点叉尾鲟前肠、肝脏、头肾、肾、鳃、后肠、皮肤、

胃中均有表达, 在皮肤中表达量最高(Zhu *et al.*, 2017)。俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因在检测的 11 种健康组织(肝、小肠、脾、头肾、后肾、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉和性腺)中均有表达, 其中, 在皮肤和性腺表达最高, 3 种鱼在共同检测到的组织中, 都是在皮肤中表达量最高, 表达模式相似但又不完全相同, 说明不同物种  $\beta$ -防御素的功能存在相似性, 但表达还具有组织特异性和物种特异性。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)  $\beta$ -防御素能够在睾丸和脑垂体中表达, 推断它可能参与内分泌系统和生殖系统的一些功能(Jin *et al.*, 2010), 俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素的序列来自性腺转录组, 实时定量组织表达分析其在性腺中存在高表达, 在脑中有较高的表达, 暗示俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素同样可能具有内分泌和生殖系统的功能。

目前, 对鱼类  $\beta$ -防御素生物学活性的研究主要集中在抗菌和抗病毒等免疫活性方面, 石斑鱼的防御素对革兰氏菌(阳性或阴性)均具有抗菌活性, 并且还具抗 RGV 病毒活性(Jin *et al.*, 2010)。爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染斑点叉尾鲷 48 h 后,  $\beta$ -防御素在头肾、鳃和皮肤中都有明显的上调表达(Zhu *et al.*, 2017), 用停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)感染梭鱼 48 h 后,  $\beta$ -防御素在脾和肠中都有十几倍的上调表达(Qi *et al.*, 2016), 嗜水气单胞菌可强烈影响俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因的表达, 在头肾中的上调表达最明显, 72 h 到达表达峰值, 为 0 h 表达量的 700 倍。在脾脏、血液和肠中均有几倍至十几倍的上调, 本研究结果与报道的研究结果相似。说明俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素在响应细菌感染的免疫反应中发挥了重要作用。

本研究初步研究了俄罗斯鲟的克隆、组织表达及相应病原刺激的免疫应答, 后续研究尚需进一步深入。由于俄罗斯鲟的基因资源还远远不足, 缺乏基因组及多数组织的转录组数据, 加之俄罗斯鲟的基因组又极其复杂, 染色体数目多达 236 条(尹洪滨等, 2006),  $\beta$ -防御素有可能存在较多的同源基因和重复基因, 在一定程度上对俄罗斯鲟  $\beta$ -防御素基因的克隆和精准分型造成困难。由于获得的俄罗斯鲟 cDNA 片段长度只有 333 bp, 缺乏合适的位点设计 RACE 引物, 我们尝试多次克隆, 仍无法获得完整的 5' 和 3' 全长, 但我们获得了完整的 ORF, 对进一步开展功能研究奠定了良好基础。在后续研究中, 将进一步验证其对不同病原(细菌、病毒)等的体内和体外抗菌活性的研究, 为俄罗斯鲟的绿色病害防治途径探讨可行之路。

## 参 考 文 献

Cuesta A, Meseguer J, Esteban M $\acute{A}$ . Molecular and functional

- characterization of the gilthead seabream  $\beta$ -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, 2011, 48(12–13): 1432–1438
- Casadei E, Wang T, Zou J, *et al.* Characterization of three novel  $\beta$ -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Immunology*, 2009, 46(16): 3358–3366
- Chen Y, Xia Y, Shao C, *et al.* Discovery and identification of candidate sex-related genes based on transcriptome sequencing of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) gonads. *Physiological Genomics*, 2016, 48(7): 464
- Dong JJ, Wu F, Ye X, *et al.* B-defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides. *Gene*, 2015, 566(1): 23–31
- Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative immunology*, 2001, 25(8–9): 827–839
- Guo M, Wei J, Huang X, *et al.* Antiviral effects of  $\beta$ -defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 828–838
- Jin JY, Zhou L, Wang Y, *et al.* Antibacterial and antiviral roles of a fish  $\beta$ -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS One*, 2010, 5(12): e12883
- Liang T, Wang DD, Zhang GR, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of two beta-defensin genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 166(1): 91–98
- Lu Y, Wang QL, Li M, *et al.* Expression analysis of TLR20 and TLR21 genes in channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged by different bacteria and virus. *Progress in Fisheries Science*, 2013, 34(6): 44–51 [路颀, 王启龙, 李敏, 等. 斑点叉尾鲷TLR20 和 TLR21 基因在不同细菌和病毒感染后的表达特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 44–51]
- Qi Z, Xu W, Meng F, *et al.* Cloning and expression of  $\beta$ -defensin from soiny mullet (*Liza haematocheila*), with insights of its antibacterial mechanism. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157544
- Ruangsi J, Kitani Y, Kiron V, *et al.* A novel beta-defensin antimicrobial peptide in Atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62302
- Yang ZG. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from sturgeons. *Freshwater Fisheries*, 2001, 31(5): 43–44 [杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定. *淡水渔业*, 2001, 31(5): 40–41]
- Yin HB, Sun ZW, Sun DJ *et al.* Cytogenetic analysis of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 181–184 [尹洪滨, 孙中武, 孙大江, 等. 俄罗斯鲟的细胞遗传学分析. *水产学报*, 2006, 30(2): 181–184]
- Yu MJ, Sun LM, Chen YD *et al.* Cloning and expression of the c-Jun gene in immune response to pathogen challenge in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress*

- in Fisheries Science, 2017, 38(2): 31–39 [于孟君, 孙璐明, 陈亚东, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) c-Jun 基因的克隆及免疫应答分析. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 31–39]
- Zhu S, Gao B. Evolutionary origin of beta-defensins. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 39: 79–84
- Zou J, Mercier C, Koussounadis A, *et al.* Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 638–647
- Zhu J, Wang H, Wang J, *et al.* Identification and characterization of a  $\beta$ -defensin gene involved in the immune defense response of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Molecular Immunology, 2017, 85: 256
- Zhang W, Zhu LQ, Zhao FL, *et al.* Progress on  $\beta$ -defensin. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(5): 47–50 [张伟, 朱连勤, 赵凤立, 等.  $\beta$ -防御素研究进展. 动物医学进展, 2006, 27(5): 47–50]

(编辑 冯小花)

## Cloning and Expression Analysis of $\beta$ -Defensin Gene from Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*)

BAI Li<sup>1,3</sup>, CHEN Yadong<sup>2,3</sup>, XIA Yongtao<sup>4</sup>, XU Shijian<sup>4</sup>, HU Mou<sup>4</sup>, SHA Zhenxia<sup>2①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071; 3. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. Hangzhou Qiandaohu Xunlong Sci-Tech Co. Ltd. Hangzhou 311701)

**Abstract**  $\beta$ -defensins are cysteine, cationic, antibacterial peptides that play very important roles in the vertebrate immune system. In this study, the cDNA fragment of  $\beta$ -defensin gene from *Acipenser gueldenstaedti* was cloned using a PCR method based on the Solexa sequencing results of gonad transcriptome, and gene expression was performed by qRT-PCR. The results showed that cDNA of  $\beta$ -defensin was 333 bp in length and contained an open reading frame (ORF) with 213 bp, which was deduced to encode a precursor peptide of 71 amino acids consisting of a signal peptide of 23 amino acid residues and a mature peptide of 48 amino acid residues. Russian sturgeon  $\beta$ -defensin possessed six conserved cysteine residues, forming three disulfide bridges at C38~C66, C44~C60 and C48~C67, and containing 1 defensin- $\beta$ -2 domain. This structure is very similar to other species and conserved in evolution. Homologous alignment revealed that Russian sturgeon  $\beta$ -defensin had the highest sequence identity with fish species, about 54%~60%. qRT-PCR analysis showed the  $\beta$ -defensin transcript is constitutively expressed in 11 tissues (liver, intestine, spleen, head-kidney, gill, blood, brain, skin, muscle and gonad, stomach) in healthy fish, with highest expression in the gonads and skin. Artificial infection of *A. gueldenstaedti* with *Aeromonas hydrophila* resulted in a significantly upregulated expression in the intestine, spleen, head kidney, blood, and gill while downregulating expression in the liver. The most significant upregulated expression and the peak level at 72 h reached 700 times baseline in the head-kidney. The results indicate *Acipenser gueldenstaedti*  $\beta$ -defensin genes are involved in the immune response.

**Key words** *Acipenser gueldenstaedti*;  $\beta$ -Defensin; Gene cloning; Gene expression; *Aeromonas hydrophila*

① Corresponding author: SHA Zhenxia, E-mail: shazhenxia@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170814001

http://www.yykxjz.cn/

孙超, 刘洪波, 姜涛, 轩中亚, 杨健. 不同鲚属鱼类 Cyt *b* 和 D-loop 序列的比较及其判别早期生活史个体的潜力分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 27-35

Sun C, Liu HB, Jiang T, Xuan ZY, Yang J. Comparison of D-loop and Cytochrome *b* sequences among different *Coilia* Species and their potential use in analysis for the identification of species at early life stages. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 27-35

## 不同鲚属鱼类 Cyt *b* 和 D-loop 序列的比较 及其判别早期生活史个体的潜力分析\*

孙 超<sup>1</sup> 刘洪波<sup>2</sup> 姜 涛<sup>2</sup> 轩中亚<sup>1</sup> 杨 健<sup>1,2</sup>①

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心  
中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室 无锡 214081)

**摘要** 使用 mtDNA 作为分子标记, 基于 1022 bp 和 1322 bp 左右的部分序列分析刀鲚(*Coilia nasus*)、湖鲚(*C. nasus taihuensis*)、七丝鲚(*C. grayii*)及凤鲚(*C. mystus*)成鱼之间的遗传关系。结果显示, 刀鲚和湖鲚间的遗传距离分别为  $0.0036 \pm 0.0008$  和  $0.0038 \pm 0.0008$ , 凤鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为  $0.1215 \pm 0.0111$ 、 $0.1228 \pm 0.0111$  (Cyt *b*) 和  $0.1075 \pm 0.0108$ 、 $0.1067 \pm 0.0107$  (D-loop), 七丝鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为  $0.0342 \pm 0.0056$ 、 $0.0351 \pm 0.0057$  (Cyt *b*) 和  $0.0527 \pm 0.0069$ 、 $0.0529 \pm 0.0070$  (D-loop), 七丝鲚和凤鲚间的遗传距离分别为  $0.1158 \pm 0.0111$  和  $0.1123 \pm 0.0111$ 。用 Kimura 双参数模型构建的 2 种序列的 NJ 分子系统树均显示, 湖鲚和刀鲚不能形成独立的分支, 而是混合聚在一起形成 1 个分支; 七丝鲚和凤鲚则形成另外 2 个分支。首先根据采样点不同可初步断定未知仔幼鱼为刀鲚, 稚鱼为湖鲚, 而后对未知种仔幼鱼、稚鱼和刀、凤鲚鱼卵的 2 种序列的分析发现, 不同采集点内部的这些早期生活个体间的遗传距离分别为  $0.0024 \sim 0.0032$  和  $0.0025 \sim 0.0082$ 。在 Kimura 双参数模型构建的 NJ 分子系统树中, 未知种仔幼鱼、稚鱼、刀鲚鱼卵与刀鲚、湖鲚聚为一类, 凤鲚鱼卵与凤鲚聚为一支。由此可见, Cyt *b* 基因序列和 D-loop 序列作为分子标记, 虽然可以区分刀鲚、凤鲚以及七丝鲚的仔幼、稚鱼及鱼卵, 但不能有效区分湖鲚和刀鲚的早期生活个体。

**关键词** 鲚属; 早期生活史; Cyt *b* 基因; D-loop 序列

**中图分类号** Q958.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0027-09

对处于早期生活史的鱼类的种类进行准确的鉴定是进行渔业资源量评估的重要方面, 也是进行鱼类整个生活史研究的基础工作。传统的形态学鉴定方法一般基于鱼类的形态学和解剖学特征(何文平等, 2011), 操作简单, 样品可重复使用。在鱼类早期生

活史阶段, 可通过光学显微镜观察鱼卵的形状、颜色、纹理、卵直径和胚胎色素沉着等特征以及胚胎发育过程中鱼卵形态的连续变化来鉴别鱼卵所属物种(Mork *et al*, 2011; Hofmann *et al*, 2017); 也可通过在显微镜下细数仔稚鱼、幼鱼的一些形态学参数判别其所属物

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2016PT01)和国家自然科学基金项目(31372533; 31602159)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes(2016PT01), and National Natural Science Foundation of China (31372533, 31602159)]. 孙 超, E-mail: sunchao159@126.com

① 通讯作者: 杨 健, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2017-08-14, 收修改稿日期: 2017-10-16

种(Webb *et al.*, 2006; 何文平等, 2011)。但这种传统方法操作过程费时费力、依赖经验、主观性较大。不仅如此, 形态特征在不同的物种间(特别是早期生活史个体)还会产生重叠(张冬良等, 2009; Mork *et al.*, 2011), 容易产生误判; 有时采样只采到形态不完整的个体(Webb *et al.*, 2006), 这时利用传统的物种鉴定方法很难准确判别, 而分子生物学方法能克服形态学鉴定中主观性强、要求研究者具备较高的形态学研究素养、要求样本个体完整性高等局限, 且具有重复性好、灵敏度高等优点(孙超等, 2011)。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是一种闭合的环状分子, 分子结构简单, 遵循严格的母系遗传, 几乎不发生重组, 进化速度相对较快, 且不同的区域进化速度存在差异, 因而, 可以选择不同区域进行不同时间尺度的进化分析, 是鱼类分子群体遗传学和分子系统学研究中的重要标记(Xiao *et al.*, 2000)。其中, 细胞色素 *b* 基因(Cyt *b*)进化速率适中, 能很好地反映系统演化的较晚期历史(Xiao *et al.*, 2000; 孙超等, 2013); 线粒体控制区序列(D-loop)无编码选择压力, 进化速率较其他线粒体基因快, 适合于研究种内种群遗传结构和遗传分化(Liu *et al.*, 2004)。线粒体控制区序列(D-loop)较 mtDNA 的其他序列, 其进化速率较快(Liu *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2016)。因此, 结合线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 两种分子序列标记研究鱼类种内的遗传变异和不同的科、属、种的系统进化关系更可靠(胡玉婷等, 2015)。这 2 种线粒体基因已应用于不同物种、群体间的遗传多样性和系统发育物种鉴定研究等方面(阎雪岚等, 2009; 何文平等, 2011; Chan *et al.*, 2016; Mansourkiaei *et al.*, 2016), 如针对水生生物的物种鉴定(李渊等, 2013; Cheng *et al.*, 2013; 张静

等, 2016)、鱼卵仔稚鱼鉴定(Perez *et al.*, 2005; Pegg *et al.*, 2006; 周美玉等, 2015)、水产品检测(Shen *et al.*, 2016; 安丽艳等, 2016)、隐存种发掘(Zemlak *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015)新纪录种的发现(Guo *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011)等。然而, 从鲟属鱼类的研究来看, 仅有基于 Cyt *b* 基因序列的刀鲟和凤鲟仔稚鱼判别尝试(何文平等, 2011), 但尚未有涉及鱼卵的相关研究报道。本研究采用 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列作为分子标记, 将凤鲟、刀鲟鱼卵、未知鲟属仔稚鱼和幼鱼所得序列与刀鲟[*Coilia nasus*, 含其陆封生态型湖鲟(*C. nasus taihuensis*)]、凤鲟(*C. mystus*)、七丝鲟(*C. grayii*)成鱼的相应序列进行比对, 通过计算遗传距离、构建分子系统树等方法对处于早期生活史的鲟属鱼类个体所属的种进行判别, 为分子生物学技术应用于鲟属鱼卵、仔稚鱼鉴别提供理论参考和技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本采集

于 2007 年 5 月~2012 年 2 月间采集样本。湖鲟采自太湖平台山, 七丝鲟采自广东十五涌, 凤鲟鱼卵采自瓯江七都岛永加蒲东村段所获亲鱼, 刀鲟鱼卵采自鄱阳湖星子县所获亲鱼, 未知鲟属稚鱼采自太湖仙岛, 未知鲟属仔幼鱼分别采自长江口崇明岛区域和长江口东滩区域。其中, 凤鲟鱼卵(4~5 期卵)与刀鲟鱼卵(3~4 期卵)(Li *et al.*, 2007)分别取自雌性凤鲟和刀鲟体内。研究中刀鲟、湖鲟、七丝鲟和凤鲟成鱼均按照生态习性和形态特征加以鉴别(袁传忠等, 1980)。样本信息见表 1。其中, 未知鲟属仔鱼、稚鱼和幼鱼

表 1 本研究中鲟属鱼类样本的背景  
Tab.1 Background information of *Coilia* species in the present study

样本类别 Categorization	采样地点 Sampling location	数量 Number	缩写 Abbreviation
湖鲟 <i>C. nasus taihuensis</i> **	太湖平台山 Pingtaishan of Taihu Lake	9	CET
七丝鲟 <i>C. grayii</i> **	广东十五涌 Shiwuchong in Guangdong	5	CG
刀鲟 <i>C. nasus</i> *	—	—	CE
凤鲟 <i>C. mystus</i> ***	—	—	CM
凤鲟鱼卵 Eggs of <i>C. mystus</i>	七都岛永加蒲东村(瓯江)Qidu Island Yongjiapudong Village (Oujiang River)	10	LOJCM
刀鲟鱼卵 Eggs of <i>C. nasus</i>	鄱阳湖星子县 Xingzi County of Poyang Lake	10	PYCE
未知稚鱼 Unknown juveniles	三山岛(太湖仙岛)Sanshan Island (Taihuxian Island) of Taihu Lake	8	NCET
未知仔幼鱼 Unknown larvae	长江口东滩(东旺沙)、崇明岛 Dongtan of Yangtze River Estuary (Dongwangsha), Chongming Island	12	DTCE, CNJ

\*: 全部序列载自 GenBank; \*\*: 部分序列载自 GenBank; \*\*\*: 部分序列引自孙超等(2013), 部分序列载自 GenBank

\*: Sequences were loaded from GenBank entirely; \*\*: Sequences were partially loaded from GenBank; \*\*\*: Sequences were cited from Sun *et al.*(2013) partially or loaded from GenBank partially

(袁传宓等, 1978; 张冬良等, 2009)的体长分别为 16.4~18.3 mm, 43.5~53.25 mm 和 100.6~122.5 mm; 但部分未知鲚属样本形态不完整, 鱼体残缺无法进行测量。

## 1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及目的片段的纯化

总 DNA 提取采用传统的“酚-氯仿”法(Sambrook *et al*, 1989)。使用 0.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。Cyt b 基因扩增使用通用引物 L14724(5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TC-3')和 H15915(5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3')(Xiao *et al*, 2001), PCR 扩增体系和条件参照何文平等(2011)。D-loop 序列扩增使用引物序列为 DF1(5'-CTA ACT CCC AAA GCT AGA ATT CT-3')和 DR2(5'-ATC TTA GCA TCT TCA GTG-3'), PCR 扩增体系和条件参照唐文乔等(2007)。PCR 扩增完成后, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。扩增产物用生工生物工程(上海)股份有限公司的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收。

## 1.3 目的片段的克隆和测序

用购自 TaKaRa 公司的连接试剂盒(pMD<sup>®</sup>18-T Vector)将经纯化回收的目的基因片段与载体进行连接(16°C)。将重组子转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞(由上海生工高效感受态 Cell 制备试剂盒制备)中, 涂布于 LB 氨苄抗生素(Amp)抗性平板, 经 37°C 过夜培养后, 挑取明显的白斑进行菌液 PCR 验证(菌液量为 5  $\mu$ l)。对确认含有目的基因片段的菌液进行扩大培养, 之后送上海生工进行双向测序。部分样本直接采用 PCR 扩增产物纯化后产物进行测序, 测序不理想样本经上述步骤后进行菌液测序。

## 1.4 数据分析

使用 MEGA 5.05 软件(Tamura *et al*, 2011)中的 ClustalW 程序对比排列所得序列并辅以手工校正。同时, 利用该软件中的 Kimura 双参数模型计算序列之间的遗传距离(K2P 距离), 并根据 K2P 距离采用邻接法(Neighbour-joining method, NJ)构建种间分化的系统树。通过自展分支检验(Bootstrapping), 获得系统树分支的置信度, 重复次数为 1000 次。

## 2 结果

鲚属成鱼、未知鲚属仔稚鱼、幼鱼及鱼卵样本的 Cyt b 基因和 D-loop 序列均在 1300 bp 左右。经过序列比对和手工校正后, 分别选择其中的 1022 bp 和

1322 bp 进行进一步分析。其中, 本研究所得鲚属成鱼序列已上传至 GenBank(登录号分别为 JX030385~JX030394、JX030382~JX030383 和 JX442546)。部分成鱼序列载自 GenBank, 即 Cyt b: CE01~10 (GU371509~18), CET01~02 (EU694405~06); D-loop: CE01~10 (GU371625, 27, 29, 31, 33, 34, 37, 39, 41, 43), CM01~04 (EF419828~31), CET01~08 (EF419804, 06, 08, 22, 23, 25~27), CG02~05 (EF419800~03)。部分序列引自孙超等(2013), 即 Cyt b: CM01~05 (JX030395~96), D-loop: CM05 (JX030384)。

Kimura 双参数模型估算刀鲚、湖鲚、七丝鲚、凤鲚成鱼、未知鲚属仔幼鱼、稚鱼及刀鲚、凤鲚鱼卵间 Cyt b 基因片段和 D-loop 序列的遗传距离见表 2。结果显示, 刀鲚和湖鲚间的遗传距离分别为  $0.0036 \pm 0.0008$  和  $0.0038 \pm 0.0008$ , 凤鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为  $0.1215 \pm 0.0111$ 、 $0.1228 \pm 0.0111$  (Cyt b)和  $0.1075 \pm 0.0108$ 、 $0.1067 \pm 0.0107$  (D-loop), 七丝鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为  $0.0342 \pm 0.0056$ 、 $0.0351 \pm 0.0057$  (Cyt b)和  $0.0527 \pm 0.0069$ 、 $0.0529 \pm 0.0070$  (D-loop), 七丝鲚和凤鲚间的遗传距离分别为  $0.1158 \pm 0.0111$  (Cyt b)和  $0.1123 \pm 0.0111$  (D-loop)。Kimura 双参数模型估算, 未知仔幼鱼、稚鱼、刀鲚和凤鲚鱼卵 4 类各别内个体间的平均遗传距离分别为  $0.0032 \pm 0.0009$ 、 $0.0029 \pm 0.0010$ 、 $0.0024 \pm 0.0009$  和  $0.0029 \pm 0.0008$  (Cyt b);  $0.0076 \pm 0.0015$ 、 $0.0062 \pm 0.0015$ 、 $0.0082 \pm 0.0020$  和  $0.0025 \pm 0.0007$  (D-loop)。数据显示, 未知仔幼鱼与刀鲚、湖鲚间的遗传距离分别为  $0.0037 \pm 0.0008$ 、 $0.0028 \pm 0.0007$  (Cyt b)和  $0.0060 \pm 0.0012$ 、 $0.0060 \pm 0.0011$  (D-loop); 而未知仔幼鱼与七丝鲚与凤鲚间的遗传距离较大, 分别为  $0.0349 \pm 0.0057$ 、 $0.1222 \pm 0.0111$  (Cyt b)和  $0.0534 \pm 0.0069$ 、 $0.1089 \pm 0.1078$  (D-loop); 未知稚鱼与刀鲚、湖鲚间的遗传距离分别为  $0.0037 \pm 0.0008$ 、 $0.0026 \pm 0.0008$  (Cyt b)和  $0.0056 \pm 0.0012$ 、 $0.0054 \pm 0.0012$  (D-loop), 而未知稚鱼与七丝鲚、凤鲚间的遗传距离较大, 分别为  $0.0344 \pm 0.0056$ 、 $0.1219 \pm 0.0111$  (Cyt b)和  $0.0528 \pm 0.0068$ 、 $0.1085 \pm 0.0107$  (D-loop); 凤鲚鱼卵与凤鲚间的遗传距离最小为  $0.0016 \pm 0.0005$  (Cyt b)  $0.0037 \pm 0.0009$  (D-loop), 与刀鲚、湖鲚、七丝鲚的遗传距离分别为  $0.1208 \pm 0.0109$ 、 $0.1215 \pm 0.0110$ 、 $0.1152 \pm 0.0110$  (Cyt b)和  $0.1071 \pm 0.0108$ 、 $0.1063 \pm 0.0107$ 、 $0.1121 \pm 0.0112$  (D-loop); 刀鲚鱼卵与刀鲚、湖鲚的遗传距离都较小, 分别为  $0.0033 \pm 0.0008$ 、 $0.0025 \pm 0.0007$  (Cyt b)和  $0.0068 \pm 0.0015$ 、 $0.0070 \pm 0.0015$  (D-loop), 而与七丝鲚、湖鲚的遗传距离较大, 分别为  $0.0344 \pm$



0.0056、 $0.1220 \pm 0.0112$  (Cyt b)和  $0.0522 \pm 0.0067$ 、 $0.1083 \pm 0.0107$  (D-loop)。

用 Kimura 双参数模型构建的包括刀鲚、湖鲚、七丝鲚和凤鲚成鱼 Cyt b 基因片段序列和 D-loop 序列的 NJ 树明显分为三支：刀鲚和湖鲚不能形成彼此独立的分支，混合聚在一起形成一支；七丝鲚和凤鲚各自形成一单支(图略)。将未知鲚属仔幼鱼、稚鱼和刀鲚、凤鲚鱼卵一并加入分析后，未知鲚属仔幼鱼、稚鱼、刀鲚鱼卵、刀鲚成鱼和湖鲚成鱼混合聚在一起形成一支(支持率分别为 99%和 100%)，不能各自形成独立的分支；七丝鲚成鱼形成一单支(支持率分别为 98%和 100%)；凤鲚成鱼和凤鲚鱼卵混合在一起形成一支(支持率分别为 99%和 100%)，没有各自形成独立的分支(图 1)。

### 3 讨论

#### 3.1 不同鲚属鱼类 Cyt b 和 D-loop 序列的比较

由于湖鲚在生活习性和形态上与洄游型刀鲚有一定的差异，袁传宓等(1976、1980)认为，湖鲚属于刀鲚的一个亚种。然而，由于刀鲚和湖鲚的可数和可量性状上存在较大重叠(唐文乔等, 2007)，因此，湖鲚的亚种地位一直存在着争议，部分学者(Cheng *et al.*, 2004; 刘文斌等, 1995; 唐文乔等, 2007; 许志强等, 2009; 周晓犊等, 2010)通过形态学、生物化学和分子生物学方法对湖鲚亚种的有效性秉持否定的观点，认为湖鲚是刀鲚的一个不同生态型种群，而非一个亚种。本研究用线粒体 Cyt b 和 D-loop 序列构建的系统树显示刀鲚和湖鲚不具单系性，两种序列构成的系统

表 2 不同鲚属鱼类及其早期生活史个体的平均 Kimura 双参数遗传距离

Tab.2 Mean value of the Kimura's two-parameter distance among different *Coilia* species and corresponding eggs, larvae and juveniles

	刀鲚 <i>C. nasus</i>	湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>	七丝鲚 <i>C. grayii</i>	凤鲚 <i>C. mystus</i>	未知仔幼鱼 Unknown larvae	未知稚鱼 Unknown juveniles	凤鲚鱼卵 Eggs of <i>C. mystus</i>	刀鲚鱼卵 Eggs of <i>C. nasus</i>
刀鲚 <i>C. nasus</i>	-	0.0038± 0.0008	0.0527± 0.0069	0.1075± 0.0108	0.0060± 0.0012	0.0056± 0.0012	0.1071± 0.0108	0.0068± 0.0015
湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>	0.0036± 0.0008	-	0.0528± 0.0070	0.1067± 0.0107	0.0060± 0.0011	0.0054± 0.0012	0.1063± 0.0107	0.0070± 0.0015
七丝鲚 <i>C. grayii</i>	0.0342± 0.0056	0.0351± 0.0057	-	0.1123± 0.0111	0.0534± 0.0069	0.0528± 0.0068	0.1121± 0.0112	0.0522± 0.0067
凤鲚 <i>C. mystus</i>	0.1215± 0.0111	0.1221± 0.0111	0.1158± 0.0111	-	0.1089± 0.1078	0.1085± 0.0107	0.0037± 0.0009	0.1083± 0.0107
未知仔幼鱼 Unknown larvae	0.0037± 0.0008	0.0028± 0.0007	0.0349± 0.0057	0.1222± 0.0111	0.0032±0.0009 (Cyt b)/ 0.0076±0.0015 (D-loop)	-	-	-
未知稚鱼 Unknown juveniles	0.0037± 0.0008	0.0026± 0.0008	0.0344± 0.0056	0.1219± 0.0111	-	0.0029±0.0010 (Cyt b)/ 0.0062±0.0015 (D-loop)	-	-
凤鲚鱼卵 Eggs of <i>C. mystus</i>	0.1208± 0.0109	0.1215± 0.0110	0.1152± 0.0110	0.0016± 0.0005	-	-	0.0024±0.0009 (Cyt b)/ 0.0082±0.0020 (D-loop)	-
刀鲚鱼卵 Eggs of <i>C. nasus</i>	0.0033± 0.0008	0.0025± 0.0007	0.0344± 0.0056	0.1220± 0.0112	-	-	-	0.0029±0.0008 (Cyt b)/ 0.0025±0.0007 (D-loop)

注：对角线下方：基于 Cyt b 基因序列；上方：基于 D-loop 序列；对角线：类别内个体间的平均 Kimura 双参数遗传距离；-：表示数据未显示

Note: Lower diagonal: Based on Cyt b gene; Upper diagonal: Based on D-loop sequence; Diagonal: Mean value of the Kimura's two-parameter distance among individual within groups; -: Data not displayed

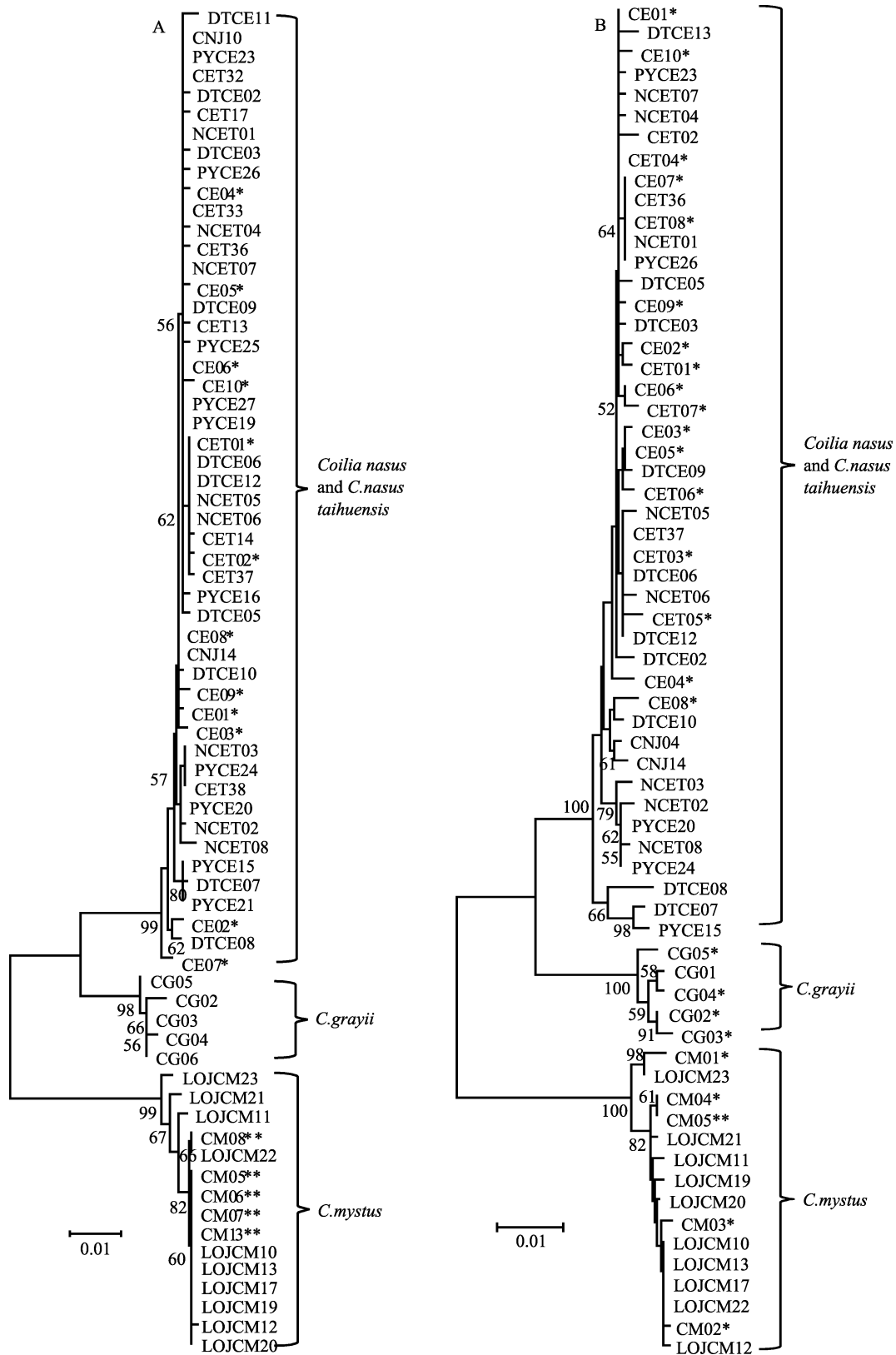


图 1 不同鲚属鱼类基于 Cyt b 基因(A)和 D-loop 序列(B)构建的 NJ 分子系统发生树

Fig.1 Neighbour-joining molecular dendrogram of different *Coilia* species based on the sequences of Cyt b gene (A) and D-loop (B)

\*: 载自 GenBank; \*\*: 孙超等(2013); 节点处数字为大于 50%的支持率的自展分支检验值

\*: Loaded from GenBank; \*\*: Sun *et al*(2013); Numbers at nodes represented bootstrap values, and only bootstrap values greater than 50% were shown

树中都有湖鲚构成小的分支后与刀鲚相聚或湖鲚直接与刀鲚构成一个分支的情况,这与许志强等(2009)的研究结果相同;刀鲚与湖鲚间的平均遗传距离分别为  $0.0036 \pm 0.0008$  和  $0.0038 \pm 0.0008$ , 介于二者各自内部个体间的遗传距离(Cyt *b*:  $0.0023 \sim 0.004$ ; D-loop:  $0.0034 \sim 0.0042$ ), 且明显小于湖鲚与凤鲚和七丝鲚间的平均遗传距离。因此,从线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 序列分析看,湖鲚与刀鲚是同一物种的不同生态型,并未达到亚种水平。因此,应用线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 序列虽然可以区分刀鲚、凤鲚以及七丝鲚的仔幼、稚鱼及鱼卵,但很难有效区分湖鲚和刀鲚的早期生活个体。

### 3.2 基于 Cyt *b* 和 D-loop 序列判别鲚属鱼类早期生活史个体的潜力

本研究中未知鲚属仔幼鱼、稚鱼和刀鲚、凤鲚鱼卵 4 类早期生活个体各类别内个体间基于线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 序列的平均遗传距离最大分别为 0.0032 和 0.0082, 远小于相应序列得出的刀鲚(湖鲚)、凤鲚和七丝鲚等 3 种不同种的成鱼之间的遗传距离,表明该 4 类早期生活个体各自属于同一物种。用 Kimura 双参数模型分别计算 4 类早期生活个体与 3 种不同成鱼的遗传距离(表 2)并构建 NJ 系统树(图 1), 可以看出,未知鲚属仔幼鱼及稚鱼与刀鲚和湖鲚的遗传距离明显低于不同种之间的遗传距离,且系统树中与刀鲚、湖鲚、刀鲚鱼卵混在一起,因此,这些未知鲚属仔幼鱼及稚鱼可能是刀鲚或湖鲚,另外,由于刀鲚的另一种淡水定居生态型-短颌鲚与刀鲚、湖鲚也不能有效区分(许志强等, 2009; 周晓棣等, 2010), 所以也有可能是短颌鲚,但长江口和太湖区域一般没有短颌鲚分布(袁传宓等, 1980; 袁传宓等, 1984)。因此未知鲚属仔幼鱼及稚鱼应属于刀鲚或湖鲚。由于湖鲚一般分布于太湖,而在长江口出现的可能性不大(袁传宓等, 1980), 所以采自太湖的稚鱼应为湖鲚,采自长江口的未知鲚属仔鱼和幼鱼应判别为刀鲚,而稚鱼采自太湖,应均为湖鲚(李秀启等, 2015)。同时,刀鲚、凤鲚鱼卵在遗传距离和 NJ 树中也能准确定种。

凤鲚和刀鲚在长江口的繁殖时间有重叠(袁传宓等, 1980), 因此,有理由怀疑凤鲚和刀鲚的早期生活个体有一定的混杂,但目前关于长江口仔稚鱼分布的大量调查中(蒋玫等, 2006; 蒋日进等, 2008; 葛珂珂等, 2009), 尚未有在同一调查中的同一站点发现刀鲚和凤鲚并存的报道。何文平等(2011)认为,长江口刀鲚和凤鲚在仔鱼阶段的空间生态位存在明显的分离,在本研究中未知鲚属幼鱼于 2 月采自长江口东滩样点,根据序列分析结果及生态分布分析表明该批幼

鱼都为刀鲚。该结果说明了长江口刀鲚和凤鲚在幼鱼阶段的空间生态位也存在明显的分离。与此同时,本研究采用 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列对采自刀鲚和凤鲚体内的鱼卵成功进行了区分,由于 mtDNA 呈母系遗传,雌鱼体内鱼卵与未来的受精卵应该有着同一套 mtDNA,而七丝鲚一般分布于闽江、九龙江和珠江口区域(袁传宓等, 1980; 姜涛等, 2015), 不会在长江口与刀鲚、凤鲚产生混淆;因此,本研究的分子生物学方法应该具有判别野外采集到的鲚属鱼类受精卵的潜力。其将有利于今后进一步研究长江口刀鲚和凤鲚早期生活个体间的空间分布和环境因子的关系,闽江、九龙江和珠江口凤鲚和七丝鲚早期生活个体的空间分布特征,从对总体揭示鲚属鱼类的相互作用关系及资源(鱼卵和仔稚鱼)补充过程差异提供重要的理论支撑。

**致谢:** 本研究相关基因序列分析得到了中国水产科学研究院淡水渔业研究中心傅洪拓研究员、乔慧博士的支持;论文的撰写得到了南京农业大学无锡渔业学院 LY Sokta 女士、Khumbanyiwa Davison Daniel 先生的协助,谨此感谢。

## 参 考 文 献

- An LY, Meng Z, Qiu K, *et al.* Development of a method for the identification of tuna species in canned tuna by FINS. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(6): 159-163 [安丽艳, 孟镇, 仇凯, 等. 应用 PCR-FINS 技术鉴定金枪鱼罐头中金枪鱼种类. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 159-163]
- Chan J, Li W, Hu X, *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of Qinghai-Tibetan plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) based on mtDNA D-loop sequences. Biochemical Systematics and Ecology, 2016, 69: 152-160
- Chen W, Ma X, Shen Y, *et al.* The fish diversity in the upper reaches of the Salween River, Nujiang River, revealed by DNA barcoding. Scientific Reports, 2015, 5: 17437
- Cheng FP, Wang MX, Sun X, *et al.* DNA barcoding of Antarctic marine zooplankton for species identification and recognition. Advances in Polar Science, 2013, 24(2): 119-127
- Cheng QQ, Han JD. Morphological variations and discriminant analysis of two populations of *Coilia ectenes*. Journal of Lake Sciences, 2004, 16(4): 356-364 [程起群, 韩金娣. 鲚属两种群的形态变异及综合判别. 湖泊科学, 2004, 16(4): 356-364]
- Gao TX, Ji DP, Xiao YS, *et al.* Description and DNA barcoding of a new *Sillago* species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from coastal waters of China. Zoological Studies, 2011, 50(2): 254-263

- Ge KK, Zhong JS, Wu MQ, *et al.* Distribution and abundance of larval Japanese grenadier anchovy *Coilia nasus* in the surf zone of the Yangtze River estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 923–930 [葛珂珂, 钟俊生, 吴美琴, 等. 长江口沿岸碎波带刀鲚仔稚鱼的数量分布. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 923–930]
- Guo EM, Liu Y, Liu J, *et al.* DNA barcoding discriminates *Pampus minor* from *Pampus* species. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(6): 1266–1274
- He WP, Cheng F, Li YX, *et al.* Molecular identification of *Coilia ectenes* and *Coilia mystus* and its application on larval species. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4): 565–571 [何文平, 程飞, 黎雨轩, 等. 刀鲚和凤鲚的分子鉴定及其在仔鱼种类鉴定中的应用. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 565–571]
- Hofmann T, Kneibelsberger T, Kloppmann M, *et al.* Egg identification of three economical important fish species using DNA barcoding in comparison to a morphological determination. *Journal of Applied Ichthyology*, 2017, 33(5): 925–932
- Hu YT, Hu W, Ling J, *et al.* Comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial Cytochrome *b* gene and control region from natural triploid (*Carassius auratus gibelio*) in Chuzhou. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 101–108 [胡玉婷, 胡王, 凌俊, 等. 滁州鲫线粒体细胞色素 *b* 基因和控制区序列比较及其系统进化分析. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 101–108]
- Jiang M, Shen XQ, Chen LF, *et al.* Relationship between with abundance distribution of fish eggs, larvae and environmental factors in the Changjiang estuary and vicinity waters in spring. *Marine Environmental Science*, 2006, 26(2): 37–44 [蒋玫, 沈新强, 陈莲芳. 长江口及邻近水域春季鱼卵仔鱼分布与环境因子的关系. *海洋环境科学*, 2006, 26(2): 37–44]
- Jiang RJ, Zhong JS, Zhang DL, *et al.* Species composition and diversity of fish larvae and juveniles in the surf zone of the Yangtze River estuary. *Zoological Research*, 2008, 29(3): 297–304 [蒋日进, 钟俊生, 张冬良, 等. 长江口沿岸碎波带仔稚鱼的种类组成及其多样性特征. *动物学研究*, 2008, 29(3): 297–304]
- Jiang T, Liu HB, Huang HH, *et al.* Otolith microchemistry of *Coilia grayii* from the pearl river estuary, China. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(4): 816–821 [姜涛, 刘洪波, 黄洪辉, 等. 珠江口七丝鲚耳石微化学初报. *水生生物学报*, 2015, 39(4): 816–821]
- Li XQ, Liu F, Leng CM, *et al.* Genetic structure and diffusion of population of *Coilia ectenes taihuensis* in Lake Nansi inferred from the mitochondrial control region. *Journal of Lake Sciences*, 2015, 27(4): 686–692 [李秀启, 刘峰, 冷春梅, 等. 基于线粒体 DNA 控制区的南四湖湖鲚 (*Coilia ectenes taihuensis*) 群体遗传结构和种群扩散. *湖泊科学*, 2015, 27(4): 686–692]
- Li Y, Song N, Khan FS, *et al.* New evidence of morphological characters and DNA barcoding of *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1601–1608 [李渊, 宋娜, Khan FS, 等. 银鲳形态特征与 DNA 条形码研究. *水产学报*, 2013, 37(11): 1601–1608]
- Li YX, Xie SG, Li ZJ, *et al.* Gonad development of an anadromous fish *Coilia ectenes* (Engraulidae) in lower reach of Yangtze River, China. *Fisheries Science*, 2007, 73(6): 1224–1230
- Liu WB. Biochemical and morphological comparison and interspecific relationships of four species of the genus *Coilia* in China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1995, 26(5): 558–565 [刘文斌. 中国鲚属 4 种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究. *海洋与湖沼*, 1995, 26(5): 558–565]
- Liu ZJ, Cordes JF. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238(1–4): 1–37
- Mansourkiaei A, Mostafavi PG, Fatemi SMR, *et al.* Phylogenetic relationships of *Scomberomorus commerson* using sequence analysis of the mtDNA D-loop region in the Persian Gulf, Oman Sea and Arabian Sea. *International Aquatic Research*, 2016, 8(2): 137–148
- Mork J, Solemdal P, Sundnes G. Identification of marine fish eggs: A biochemical genetics approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2011, 40(3): 361–369
- Pegg GG, Sinclair B, Briskey L, *et al.* mtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia Marina*, 2006, 70(70): 7–12
- Perez J, Álvarez P, Martínez JL, *et al.* Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples. *ICES Journal of Marine Science*, 2005, 62(5): 908–914
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd edn). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Shen YJ, Kang JL, Chen WT, *et al.* DNA barcoding for the identification of common economic aquatic products in Central China and its application for the supervision of the market trade. *Food Control*, 2016, 61: 79–91
- Sun C, Liu HB, Jiang T, *et al.* The comparison of ITS1 and Cyt *b* gene sequences in tapertail anchovy *Coilia mystus*. *Fisheries Science*, 2013, 32(9): 536–540 [孙超, 刘洪波, 姜涛, 等. 凤鲚 ITS1 与 Cyt *b* 基因序列的比较研究. *水产科学*, 2013, 32(9): 536–540]
- Sun C, Su YP, Liu HB, *et al.* The Identification of closely related species and origin of aquatic organisms by molecular approaches. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(3): 53–59 [孙超, 苏彦平, 刘洪波, 等. 水生生物近缘种和产地的分子生物学判别. *水产学杂志*, 2011, 24(3): 53–59]
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739

- Tang WQ, Hu XL, Yang JQ, *et al.* Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control region. *Biodiversity Science*, 2007, 15(3): 224–231 [唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性. *生物多样性*, 2007, 15(3): 224–231]
- Webb KE, Barnes DKA, Clark MS, *et al.* DNA barcoding: A molecular tool to identify Antarctic marine larvae. *Deep Sea Research II*, 2006, 53(8–10): 1053–1060
- Xiao WH, Zhang YP, Liu HZ. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18(2): 163–173
- Xiao WH, Zhang YP. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 384–391 [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 384–391]
- Xu ZQ, Ge JC, Huang C, *et al.* Taxonomy of short jaw tapertail anchovy *Coilia brachygnathus* by jaw Length and mitochondrial Cytochrome *b* gene analysis. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(3): 242–246 [许志强, 葛家春, 黄成, 等. 基于颌骨长度和线粒体 Cyt *b* 序列变异探讨短颌鲚的分类地位. *大连海洋大学学报*, 2009, 24(3): 242–246]
- Yan XL, Tang WQ, Yang JQ, *et al.* Population genetic structure of tapertail anchovy (*Coilia mystus*) in coastal waters of southeast China based on mtDNA control region sequences. *Biodiversity Science*, 2009, 17(2): 143–150 [阎雪岚, 唐文乔, 杨金权. 基于线粒体控制区的序列变异分析中国东南部沿海凤鲚种群遗传结构. *生物多样性*, 2009, 17(2): 143–150]
- Yuan CB, Lin JB, Liu RH, *et al.* On the age and growth of the Chinese anchovy, *Coilia ectenes*, from the Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1978, 6(3): 285–296 [袁传宓, 林金榜, 刘仁华, 等. 刀鲚的年龄和生长. *水生生物学集刊*, 1978, 6(3): 285–296]
- Yuan CB, Lin JB, Qin AL, *et al.* The history and current situation of the classification of Chinese genus *Coilia*-some experience on the transformation of the old taxonomy of fishes. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 1976(2): 1–12 [袁传宓, 林金榜, 秦安龄, 等. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状-兼谈改造旧鱼类分类学的几点体会. *南京大学学报(自然科学版)*, 1976(2): 1–12]
- Yuan CB, Qin AL, Liu RH, *et al.* On the classification of the anchovies, *Coilia*, from the lower Yangtze River and the southeast coast of China. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 1980(3): 67–82 [袁传宓, 秦安龄, 刘仁华, 等. 关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼类种下分类的探讨. *南京大学学报(自然科学版)*, 1980(3): 67–82]
- Yuan CB, Qin AL. Ecological habits and distribution of *Coilia* along the Chinese coast and its changes of output. *Marine Sciences*, 1984(5): 35–37 [袁传宓, 秦安龄. 我国近海鲚鱼生态习性及其产量变动状况. *海洋科学*, 1984(5): 35–37]
- Zemlak TS, Ward RD, Connell AD, *et al.* DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(S1): 237–242
- Zhang DL, Li L, Zhong JS, *et al.* Morphological study on larvae and juveniles of *Coilia nasus* in the surf zone of Yangtze River estuary. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, 18(2): 150–154 [张冬良, 李黎, 钟俊生, 等. 长江口碎波带刀鲚仔稚鱼的形态学研究. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(2): 150–154]
- Zhang J, Li Y, Song N, *et al.* Species identification and phylogenetic relationship of *Thryssa* species in the coastal waters of China. *Biodiversity Science*, 2016, 24(8): 888–895 [张静, 李渊, 宋娜, 等. 我国沿海梭鲷属鱼类的物种鉴定与系统发育. *生物多样性*, 2016, 24(8): 888–895]
- Zhou MY, Chen X, Yang SY, *et al.* Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water. *Marine Environmental Science*, 2015, 34: 120–125 [周美玉, 陈骁, 杨圣云, 等. 采用 DNA 条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定. *海洋环境科学*, 2015, 34: 120–125]
- Zhou XD, Yang JQ, Tang WQ, *et al.* Species validities analyses of Chinese *Coilia* fishes based on mtDNA COI barcoding. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2010, 35(4): 819–826 [周晓犊, 杨金权, 唐文乔, 等. 基于线粒体 COI 基因 DNA 条形码的中国鲚属物种有效性分析. *动物分类学报*, 2010, 35(4): 819–826]

(编辑 冯小花)

## Comparison of D-loop and Cytochrome *b* Sequences Among Different *Coilia* Species and Their Potential Use in Analysis for the Identification of Species at Early Life Stages

SUN Chao<sup>1</sup>, LIU Hongbo<sup>2</sup>, JIANG Tao<sup>2</sup>, XUAN Zhongya<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1,2①</sup>

(1. Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Fishery Ecological Environment Assessment and Resource Conservation in Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Chinese Academy of Fishery Sciences; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

**Abstract** Based on 1022 bp and 1322 bp sequences, partial nucleotide sequences of Cyt *b* and D-loop segments of mtDNA were analyzed for *Coilia nasus*, *C. nasus taihuensis*, *C. grayii*, and *C. mystus* to develop a reference dataset for species identification in the genus *Coilia*. The genetic distances were 0.00360±0.00083 and 0.00378±0.00082 between *C. nasus* and *C. nasus taihuensis*, 0.12146±0.01106 and 0.10753±0.01076 between *C. mystus* and *C. nasus*, 0.12207±0.01111 and 0.10674±0.01074 between *C. mystus* and *C. nasus taihuensis*, 0.03418±0.00561 and 0.05267±0.00686 between *C. nasus* and *C. grayii*, 0.03506±0.00568 and 0.05287±0.00698 between *C. nasus taihuensis* and *C. grayii*, as well as 0.11585±0.01109 and 0.11233±0.01114 between *C. grayii* and *C. mystus*, respectively. Based on the sequences of the Cyt *b* gene and D-loop and the neighbor-joining (NJ) molecular dendrogram using Kimura 2-parameters, individuals of *C. nasus* and *C. nasus taihuensis* were combined in a cluster while *C. mystus* and *C. grayii* formed another two clusters. First, based on sampling sites, the identities of the unknown larvae from the estuary of the Yangtze River and unknown juveniles from the Taihu Lake could be deduced preliminarily as *C. nasus* and *C. nasus taihuensis*, respectively. Then, nucleotide sequences of Cyt *b* and D-loop of larvae and eggs of genus *Coilia* were analyzed and compared with the reference established above. Genetic distance ranged from 0.0024 to 0.0032 and 0.0025 to 0.0082, respectively, within the larva and egg individuals collected from different places. The NJ molecular dendrogram showed that all the unknown larvae, the eggs of *C. nasus*, adult *C. nasus*, and *C. nasus taihuensis* clustered together. In contrast, individual eggs of *C. mystus* and adult *C. mystus* formed a separate cluster. Thus, Cyt *b* and D-loop sequence analysis could be used to identify unknown *Coilia nasus*, *C. grayii*, and *C. mystus* at early life stages, but could not effectively be used to identify unknown individuals at early life stages between *C. nasus* and *C. nasus taihuensis*.

**Key words** Genus *Coilia*; Early life stage; Cyt *b* gene sequence; D-loop sequence

① Corresponding author: YANG Jian, E-mail: jiany@ffrc.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170712001

http://www.yykxjz.cn/

吴明林, 李海洋, 江河, 何吉祥, 侯冠军, 蒋阳阳. 草鱼呼肠孤病毒 AH528 株全基因组特征及进化分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 36-43

Wu ML, Li HY, Jiang H, He JX, Hou GJ, Jiang YY. Genomic characterization and phylogenetic analysis of grass carp reovirus AH528 strain. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 36-43

# 草鱼呼肠孤病毒 AH528 株全基因组 特征及进化分析\*



吴明林 李海洋 江 河 何吉祥<sup>①</sup> 侯冠军 蒋阳阳

(安徽省农业科学院水产研究所 合肥 230031)

**摘要** 草鱼出血病是由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)引起的严重危害 1~2 龄草鱼的一种传染性疾病。本研究从安徽合肥地区患典型草鱼出血病的病鱼组织中分离到 1 株新的 GCRV 致病株, 暂命名为 GCRV-AH528。鱼体人工感染实验结果显示, 实验鱼出现典型的出血病症状: 体背发黑, 鳍基部、腹部、口腔、鳃丝、肠道充血发红。全基因组特征分析显示, GCRV-AH528 由 11 个双链 RNA 节段组成, 节段大小在 1027~3925 bp 之间, AT 平均含量为 50.2%, GC 平均含量为 49.8%。与其他 GCRV II 型毒株相比, L1 节段在 701~702 位置缺少 3 个核苷酸(TAT), 少编码 1 个酪氨酸; M4 节段出现突变, 含 2 个开放阅读框, 编码 2 个非结构蛋白 NS9 和 NS69。所有节段两端均含有 6 bp 保守的末端核苷酸序列 5'-GUAA<sup>U</sup>/<sub>C</sub>U...U<sup>U</sup>/<sub>G</sub>CAUC-3'; 另除 L1、M6 节段外, 其余 9 个节段均在编码区两侧发现 5~9 bp 的颠倒互补序列。GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒核苷酸平均相似度在 37.1%~98.1%之间; 编码蛋白平均相似度在 24.3%~98.3%之间。基于 VP1 蛋白的聚类分析结果显示, 该病毒属于水生呼肠孤病毒属, 在氨基酸水平上与典型株 GCRV-873 株的进化关系较远。本研究结果表明, 该毒株为一株新的草鱼呼肠孤病毒 II 型致病株。

**关键词** 草鱼出血病; 草鱼呼肠孤病毒; VP1 蛋白; 水生呼肠孤病毒

**中图分类号** S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0036-08

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国淡水养殖的主要品种之一, 除西藏、青海零星养殖外, 在我国各地均有较大规模的养殖。中国渔业统计年鉴显示, 2015 年我国淡水鱼类养殖产量为 3062.27 万 t, 其中, 草鱼的养殖产量为 567.62 万 t, 为我国所有养殖鱼类之首(农业部渔业渔政管理局, 2016)。草鱼养殖为保

障我国农产品市场供给和人民生活水平的提高做出了重要贡献。然而, 草鱼也是水产养殖动物中病害最为多发的一种鱼类, 主要病害包括草鱼出血病、肠炎病、赤皮病、烂鳃病等(程文超等, 2016)。在感染草鱼的所有病原中, 由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)感染引起的草鱼出血病是草鱼养殖

\* 安徽省农业科学院学科建设项目(17A0515)、现代农业产业技术体系(CARS-46)、国家星火计划项目(2015GA710004)和安徽省农业科学院科技创新团队(13C0506)共同资助 [This work was supported by the Subjects Construction Fund of Anhui Academy of Agricultural Sciences (17A0515), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46), China Spark Program (2015GA710004), and the Scientific and Technological Innovation Fund of Anhui Academy of Agricultural Sciences (13C0506)]. 吴明林, E-mail: flyinghu2017@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 何吉祥, 副研究员, E-mail: flyinghu2008@foxmail.com

收稿日期: 2017-07-12, 收修改稿日期: 2017-07-27

中最为常见的疾病, 成为我国淡水水产养殖中最为突出的问题之一, 于 2008 年被农业部规定为水生动物二类疫病。据不完全统计, 我国每年由草鱼出血病导致的经济损失在 10 亿元以上(Liang *et al.*, 2014; Rodger, 2016)。

GCRV 是中国分离的第一种鱼类病毒, 属于呼肠孤病毒科、水生呼肠孤病毒属, 其变异性强, 不同地区存在不同的毒株(Fan *et al.*, 2013; 郝贵杰等, 2011; 刘永奎等, 2011)。GCRV 毒株的地域差异性给该病的防治带来巨大困难。不同分离株在毒力水平、细胞培养特性、免疫抗原性和对草鱼的致病力等方面都具有较大的差异性(Fan *et al.*, 2013; 柯丽华等, 1990; 张超等, 2010)。GCRV 不同分离株的基因组均由 11 个节段组成, 按分子量大小可分为 3 组, 即较大节段(L1、L2 和 L3)、中等节段(M4、M5 和 M6)和较小节段(S7、S8、S9、S10 和 S11)(张超等, 2010)。研究表明, 分节段的双链 RNA 病毒, 易于发生抗原变异及遗传变异(Jiang, 2009; 黄毅昌等, 2016)。根据现有的分离株序列信息进行核苷酸序列与氨基酸序列比对以及构建系统进化树分析, GCRV 至少存在 3 种基因型, 按照基因序列差异分为 I 型(代表株 GCRV-873)、II 型(代表株 GCRV HZ08)和 III 型(代表株 GCRV104)(Wang *et al.*, 2012)。

本研究通过对采集自安徽合肥的发病草鱼样品进行病毒分离纯化, 获得 1 株 GCRV 致病株, 暂定名为 GCRV-AH528。通过人工感染实验、核酸分析、序列测定、进化分析等方法对该毒株进行研究, 解析草鱼出血病的分子流行病学特征, 为该病害的防治提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

Trizol、*Taq* DNA 聚合酶、pMD™18-T Vector、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; 青霉素、链霉素购自碧云天; T4 RNA ligase 购自 Promega 公司; 引物、琼脂粉、LB 培养基购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN; PCR 仪为 ABI Veriti 96 孔; 超微量分光光度计为 Quawell Q5000。

### 1.2 样品的采集与处理

发病草鱼采集自安徽合肥, 临床症状表现为鱼体变黑, 鳍基部、鳃盖、鳃丝、眼眶、口腔和肠道充血发红, 肛门红肿。收集病鱼的肝、肾、脾和肠组织,

用无菌剪刀剪碎, 加入 10 倍体积含双抗(100 IU/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在冰浴下研磨成组织匀浆液, 将组织匀浆液转移至 50 ml 离心管中, 在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻后于室温再融化, 反复冻融 3 次。随后在 $4^{\circ}\text{C}$ 、8000 r/min 离心 30 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤器除菌后, 置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.3 人工感染实验

将体重为(100 $\pm$ 20) g 的健康草鱼随机分成 2 组, 每组 30 尾。实验鱼饲养水温保持在(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ , 每天投喂 3 次, 投喂量占鱼体重的 3%~4%。实验组通过腹鳍注射上述制备的病料组织悬液(0.5 ml/尾), 对照组注射等量的 PBS。

### 1.4 病毒细胞培养

草鱼肾脏组织细胞系(CIK)在塑料培养瓶中传代培养, 至细胞长成单层后, 吸出培养基。每瓶接种 0.5 ml 病毒悬液,  $28^{\circ}\text{C}$  吸附 1 h, 每隔 15~20 min 轻微晃动培养瓶以便均匀吸附。吸附结束后, 吸出多余的组织匀浆滤液, 加入含 2% 血清的 DMEM 细胞培养基, 显微镜下观察细胞增殖情况。病毒传代时, 将病毒细胞培养物反复冻融 2 次, 继续按上述接种方法传代培养。病样组织匀浆液接种 CIK 后, 连续观察 7 d, 没有出现明显的细胞病变(CPE), 盲传至第 8 代, 连续观察仍未出现明显的 CPE。

### 1.5 病毒基因组提纯与克隆

将含病毒的细胞培养物,  $-80^{\circ}\text{C}$  至室温反复冻融 2 次,  $4^{\circ}\text{C}$ 、4000 r/min 离心 30 min, 上清液 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤, 滤液 20000 r/min、 $4^{\circ}\text{C}$  离心 2 h, 弃上清液, 沉淀用超纯水重悬后提纯病毒(Qiu *et al.*, 2001)。Trizol 法提取病毒 RNA 后, 采用加接头引物的 RT-PCR 法扩增病毒基因组节段(Attoui *et al.*, 2000)。首先在核酸的 3'端连接接头引物 A(5'-PO<sub>4</sub>-AGGTC-TCGTAGACCGTGCACC-NH<sub>2</sub>-3'), 然后利用 A 的互补引物 B(5'-GGTGCACGGTCTACGAGACCT-3')反转录, 最后利用 B 进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶回收后, 与 pMD™18-T 载体连接过夜, 连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.6 序列分析

应用 Lasergene 数据包中的 SeqMan 程序对核苷酸序列进行拼接(Burland, 1999); 使用 NCBI 的 ORFfinder 推测开放阅读框(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>); 用 ExPASy 在线完成蛋白质理化特性分析



(<http://web.expasy.org/protparam/>)。使用 Motif Scan 进行蛋白基序的分析([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan))；用蛋白质分析软件 Antheplot 中的 GOR I method 对蛋白序列进行二级结构预测(Deléage *et al*, 2001)。应用 Lasergene 数据包 MegAlign 模块中的 ClustalW 对呼肠孤病毒核苷酸及其氨基酸序列进行同源性分析(Burland, 1999)。根据 Neighbor-Joining(NJ)法, 用 MEGA 软件构建进化树(Tamura *et al*, 2013)。

## 2 结果

### 2.1 人工感染实验

人工感染实验结果表明, GCRV-AH528 对草鱼具有较强的毒力。草鱼被攻毒后, 出现典型的出血病症状: 体色发黑, 鳍基部、腹部、口腔、鳃丝和肠道充血发红(图 1)。

### 2.2 GCRV-AH528 全基因组序列特征

GCRV-AH528 全基因组由 11 个双链 RNA 组成, 核苷酸序列长度在 1027~3925 bp 之间(登录号: KR180368-KR180378), 序列两端含保守的核苷酸序列 5'-GUAA<sup>U</sup>/<sub>C</sub>U...U<sup>U</sup>/<sub>G</sub>CAUC-3'。GCRV-AH528 的

11 个节段 AT 含量为 48.42%~54.23%, 平均 AT 含量为 50.20%; GC 含量为 45.77%~51.58%, 平均 GC 含量为 49.80%, AT 含量略大于 GC 含量。进一步比较分析发现, 除 L1、M6 节段外, 其他 9 个节段均在编码区两侧发现 5~9 bp 的颠倒互补序列(表 1)。所有节段中, M4 节段含有 2 个终止密码子, 编码 2 个蛋白, 其余 10 个节段均编码 1 个蛋白。

### 2.3 L 组节段核苷酸序列分析及编码的蛋白功能预测

GCRV-AH528 L1 节段全长 3925 bp, 编码 1 个含 1293 个氨基酸的 VP1 结构蛋白, 该蛋白与鸟苷酸转移酶/甲基转移酶同源, 属于呼肠孤病毒 L2 超家族。GCRV-AH528 L1 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 37.1%~98.6%、24.2%~98.6%。

GCRV-AH528 L2 节段全长 3867 bp, 编码 1 个含 1272 个氨基酸的 VP2 结构蛋白, 该蛋白为 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)。GCRV-AH528 L2 具有呼肠孤病毒科 RdRp 的 3 个保守基序: motif I (IKACDASITPD YFLS) 位于 591~605 氨基酸; motif II (SG) 位于 687~688 氨基酸; motif III (GDD) 位于 738~740 氨基酸。GCRV-AH528 L2 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 46.2%~98.5%、43.3%~98.2%。



图 1 草鱼出血病典型症状

Fig.1 The typical symptoms of grass carp hemorrhage disease

A: 体色发黑; B: 腹部出血; C: 口腔充血; D: 鳃丝红肿; E: 肠道出血

A: Blackened dorsum; B: Abdominal bleeding; C: Oral cavity hyperemia; D: Red and swollen gill; E: Intestine hemorrhage

**表 1 GCRV-AH528 全基因组序列特征**  
Tab.1 Characteristics of GCRV-AH528 genome segments

节段 Segment	长度 Length (bp)	非编码区 Non-coding region (bp)		保守末端序列 Conserved terminal sequence	颠倒互补序列 Inverted complementary sequence	登录号 GenBank No.
		5'	3'			
L1	3925	17	26	5'-GUAACU UUCAUC-3'		KR180368
L2	3867	15	33	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-CUGAU AUCAG-3'	KR180369
L3	3753	15	39	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UGTGC GCACA-3'	KR180370
M4	2265	24	89	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UGAGC GCUCA-3'	KR180371
M5	2230	12	37	5'-GUAACU UUCAUC-3'	5'-UGCGAU AUCGCA-3'	KR180372
M6	2028	40	35	5'-GUAUUU UUCAUC-3'		KR180373
S7	1604	17	48	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UACUGCCAA UUGGCAGUA-3'	KR180374
S8	1560	47	427	5'-GUAUUU UGCAUC-3'	5'-GACCUU AAGGUC-3'	KR180375
S9	1320	22	41	5'-GUAACU UUCAUC-3'	5'-GAGUCGACUC-3'	KR180376
S10	1124	24	62	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-CUCUG CAGAG-3'	KR180377
S11	1027	34	60	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UGUGCU AGCACA-3'	KR180378

GCRV-AH528 L3 节段全长 3753 bp, 编码 1 个含 1232 个氨基酸的内壳体蛋白 VP3, 该蛋白具有解旋酶及 NTP 酶的功能。序列分析发现, GCRV-AH528 VP3 有 1 个保守的锌指结构域(Cys-His-Cys-His), 位

于氨基酸的第 137~158 位(CKVCLLEFDSLDKLQY-HQALAH)。GCRV-AH528 L3 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 40.1%~98.4%、29.9%~99.3%(表 2 和表 3)。

**表 2 GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒同源蛋白比较**  
Tab.2 Comparison of homologous proteins encoded by GCRV-AH528 and other reovirus

GCRV-AH528	GCRV-873	GCRV104	AGCRV	MRV	ARV
蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length
VP1/1293	VP1/1299	VP1/1294	VP1/1298	Lambda2/1289	Lambda-C/1285
VP2/1272	VP2/1274	VP2/1274	VP2/1274	Lambda3/1267	Lambda-B/1259
VP3/1232	VP3/1214	VP3/1224	VP3/1215	Lambda1/1275	Lambda-A/1293
NS9&NS69/76&624	NS1/742	VP66/715	NS73/735	Mu-NS/721	Mu-NS/635
VP5/726	VP5/728	VP5/638	VP5/728	Mu-2/736	Mu-A/732
VP4/650	VP4/648	VP4/609	VP4/650	Mu-1/708	Mu-B/676
VP56/512	-	-	-	Sigma1/455	-
VP41/361	-	-	-	-	-
VP6/418	VP6/412	VP6/418	VP6/413	Sigma2/418	Sigma-A/416
NS38/345	-	-	-	-	Sigma-NS/367
VP35/310	-	-	-	-	-

草鱼呼肠孤病毒 AH528(GCRV-AH528): AMR58955.1-AMR58965.1; 草鱼呼肠孤病毒 873(GCRV-873): AAG10435.1-AAG10437.1, AAM92735.1-AAM92743.1; 草鱼呼肠孤病毒 104(GCRV104): AFG73672.1-AFG73681.1, ADM25848.3; 美国草鱼呼肠孤病毒(AGCRV): YP\_001837094.1-YP\_001837105.1; 哺乳动物呼肠孤病毒(MRV): ABP48913.1-ABP48922.1; 禽呼肠孤病毒(ARV): YP\_004226521.1-YP\_004226530.1

表 3 GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒核苷酸及氨基酸相似度比较(%)  
Tab.3 Comparison of nucleotide and amino acid sequence identity between GCRV-AH528 and other reovirus (%)

节段 Segment	株型 Strain											
	GCRV-873		GCRV HZ08		GCRV104		AGCRV		MRV		ARV	
	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA
L1	43.7	30.2	98.6	98.6	41.5	28.9	43.9	30.8	41.4	27.8	37.1	24.2
L2	52.1	47.0	98.5	98.2	49.0	45.1	51.5	46.0	47.8	43.3	46.2	45.2
L3	48.8	37.3	98.4	99.3	48.2	38.0	47.3	37.0	40.7	31.4	40.1	29.9
M4	39.7	18.1	98.7	98.6	37.4	21.2	39.5	18.3	34.5	18.3	29.9	19.4
M5	43.2	27.6	97.5	98.3	39.0	21.2	44.5	26.9	33.5	18.8	38.1	20.1
M6	47.4	37.3	96.6	98.1	43.5	32.4	45.2	34.7	36.4	20.6	28.7	23.8
S7	-	-	97.1	95.9	-	-	-	-	39.1	13.9	-	-
S8	-	-	99.1	98.1	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	41.1	21.8	97.4	98.1	36.1	19.4	40.0	21.8	36.4	20.6	33.9	22.0
S10	-	-	99.0	100.0	-	-	-	-	-	-	42.6	17.9
S11	-	-	98.5	97.7	-	-	-	-	-	-	-	-
均值 Average	45.1	31.3	98.1	98.3	42.1	29.5	44.6	30.8	38.7	24.3	37.1	25.3

草鱼呼肠孤病毒 873(GCRV-873): AH009795.2, AF403390.1-AF403397.1, AAG10435.1-AAG10437.1, AAM92735.1-AAM92743.1; 草鱼呼肠孤病毒 HZ08(GCRV HZ08): GQ896334.1-GQ896337.1, GU350742.1-GU350748.1, ADJ75335.1-ADJ75345.1; 草鱼呼肠孤病毒 104(GCRV104): JN967629.1-JN967639.1, AFG73672.1-AFG73681.1, ADM25848.3; 美国草鱼呼肠孤病毒(AGCRV): NC\_010584.1-NC\_010594.1, YP\_001837094.1-YP\_001837105.1; 哺乳动物呼肠孤病毒(MRV): EF494435.1-EF494444.1, ABP48913.1-ABP48922.1; 禽呼肠孤病毒(ARV): NC\_015126.1-NC\_015135.1, YP\_004226521.1-YP\_004226530.1; 核苷酸: NT; 氨基酸: AA

#### 2.4 M 组节段核苷酸序列分析及编码的蛋白功能预测

GCRV-AH528 M4 节段全长 2265 bp, 含 2 个开放阅读框, 编码 2 个非结构蛋白 NS9(76 个氨基酸)、NS69(624 个氨基酸), 2 个蛋白由 46 bp 的非编码区间隔。GCRV-AH528 M4 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 29.9%~98.7%、18.1%~98.6%。

GCRV-AH528 M5 节段全长 2230 bp, 编码 1 个含 726 个氨基酸的 VP5 蛋白, 该蛋白属于呼肠孤病毒微管相关蛋白 Mu-2 超家族。GCRV-AH528 M5 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 33.5%~97.5%、18.8%~98.3%。

GCRV-AH528 M6 节段全长 2028 bp, 编码 1 个含 650 个氨基酸的 VP4 蛋白, 属于呼肠孤病毒主要结构蛋白 Mu-1/Mu-1C(M2)超家族。该蛋白含 2 个保守的自溶性切割位点, 分别位于 Asn 42 和 Pro 43。GCRV-AH528 M6 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 28.7%~96.6%、20.6%~98.1%(表 2 和表 3)。

#### 2.5 S 组节段核苷酸序列分析及编码的蛋白功能预测

GCRV-AH528 S7 节段全长 1604 bp, 编码 1 个含 512 个氨基酸的 VP56 蛋白, 该蛋白与水生呼肠孤病毒无同源性蛋白, 但与哺乳动物呼肠孤病毒(MRV) Sigma 1

和人腺病毒(Human adenovirus)fiber 具有同源性。

GCRV-AH528 S8 和 S11 节段分别编码 VP41(361 个氨基酸)和 VP35(310 个氨基酸)蛋白, 2 个蛋白与其他呼肠孤病毒无同源性蛋白。

GCRV-AH528 S9 节段全长 1320 bp, 编码 1 个含 418 个氨基酸的 VP6 蛋白, 该蛋白属于呼肠孤病毒科 Sigma1/Sigma2 超家族。GCRV-AH528 S9 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别在 33.9%~97.4%、19.4%~98.1%。

GCRV-AH528 S10 节段全长 1124 bp, 编码 1 个含 345 个氨基酸的 NS38 蛋白, 该蛋白有 1 个保守的结构域, 属于 PolyG-pol 超家族, 具有 poly(C)依赖的 poly(G)聚合酶活性。GCRV-AH528 S10 与 ARV sigma NS 的核苷酸、氨基酸同源性分别为 42.6%、17.9%(表 2 和表 3)。

#### 2.6 GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒典型株基因组特征比较

水生呼肠孤病毒有 11 个节段, 而正呼肠孤病毒仅有 10 个节段, 2 个属的病毒编码 7 个同源性蛋白, 同源蛋白平均相似度为 24.3%~98.3%(表 3)。进一步分析显示, 2 个属的病毒 5'末端序列相差较大, 但 3'末端序列较保守, 存在共同的序列 UCAUC-3'(表 4)。

表 4 呼肠孤病毒保守末端序列比较  
Tab.4 Comparison of conserved terminal nucleotide sequences

呼肠孤病毒 Reovirus	节段数 Segment number	保守末端序列 Conserved terminal sequence
GCRV-AH528	11	5'-GUAA <sup>U</sup> / <sub>C</sub> U...U <sup>U</sup> / <sub>G</sub> CAUC-3'
GCRV873	11	5'-GUUAUU... <sup>U</sup> / <sub>A</sub> UCAUC-3'
GCRV104	11	5'-GAAUU <sup>U</sup> / <sub>A</sub> ...UCAUC-3'
AGCRV	11	5'-GUUUUA... <sup>U</sup> / <sub>A</sub> UCAUC-3'
MRV	10	5'-GCUA...UCAUC-3'
ARV	10	5'-GCUUUU... <sup>U</sup> / <sub>C</sub> UCAUC-3'

### 2.7 GCRV-AH528 系统进化分析

在 GenBank 数据库中搜索与 GCRV-AH528 VP1 蛋白具有同源性的序列, 构建系统进化树(图 2)。研究表明, VP1 同源性蛋白至少分布于 2 个属, 分别为水生呼肠孤病毒属和正呼肠孤病毒属。GCRV-AH528 株与水生呼肠孤病毒聚为一簇, 为草鱼呼肠孤病毒 II 型株中的 1 个成员。

## 3 讨论

### 3.1 草鱼出血病流行病学特征

近年来, 草鱼的高密度养殖造成其病害频发, 细

菌、寄生虫等引起的疾病较易控制, 但由 GCRV 引起的草鱼出血病较难治疗。草鱼出血病疫情主要有以下流行病学特征: 发病鱼主要为 1~2 龄草鱼, 5~11 月均有发病, 同一渔场内的鱼塘相互感染, 发病时呈急性大规模死亡, 2~3 d 内可死亡养殖草鱼总量的 30% 左右。水质较差的鱼塘还容易造成多种病原菌的继发感染, 从而加重疫情, 如出现烂鳃、赤皮、肠炎等。调查还发现, 季节交替阶段、昼夜温差大的气候天气, 特别是大雨后水温在回温过程中, 病害较易发生。从攻毒实验可以看出, 本研究获得的病毒使当年草鱼种出现典型的出血病症状, 可见 GCRV-AH528 具有极强的致病性。以 VP1 蛋白为基础构建系统进化树, GCRV-AH528 株与水生呼肠孤病毒聚为一簇, 进一步聚类于 GCRV-II 型株, 与 GCRV-I 型(GCRV-873)、GCRV-III 型(GCRV104)在内的其他水生呼肠孤病毒属于不同的分支, 距离较远。GCRV-AH528 株与 GCRV-873 株、GCRV104 株存在较大差异, 却与近来发现的浙江湖州地区的 HZ08 株、湖北省的 GCRV-109 株具有极高的同源性(Pei *et al*, 2014), 这不仅证明了草鱼呼肠孤病毒基因组的多样性分布, 还从一定程度上说明 GCRV-II 型株是近年来的主要流行毒株。

### 3.2 呼肠孤病毒基因多样性分析

呼肠孤病毒末端结构在病毒组装与功能识别方

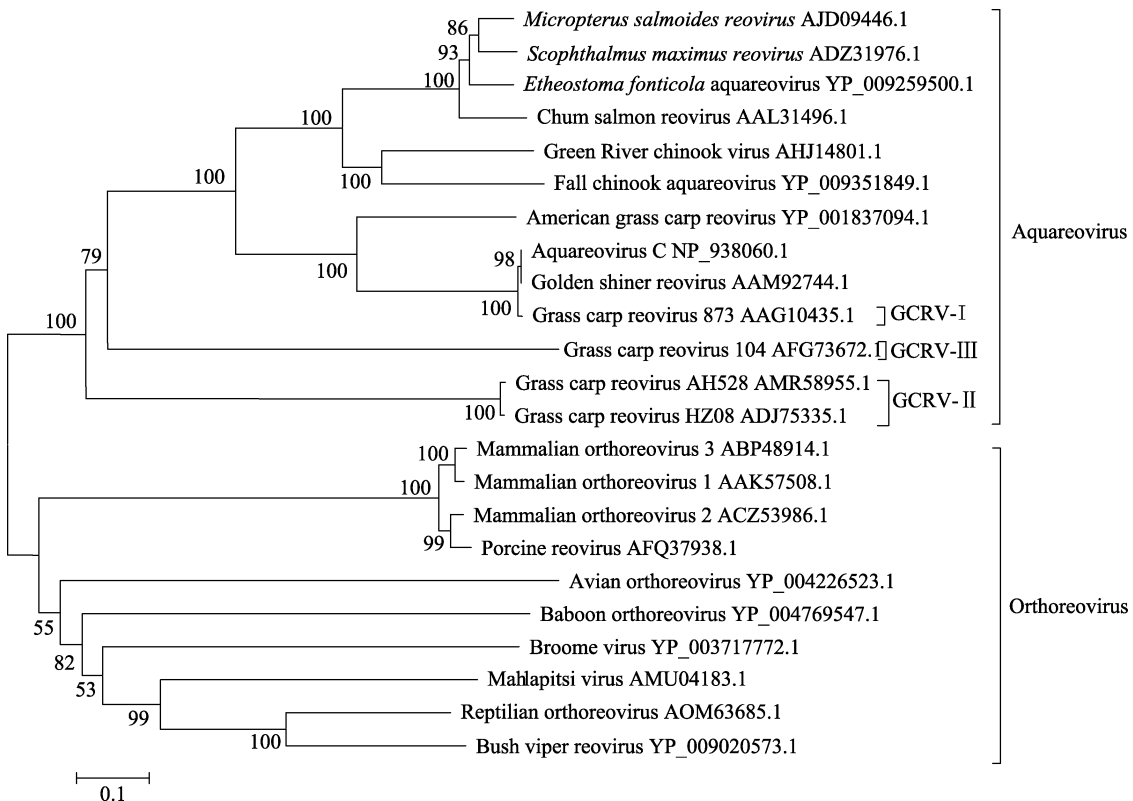


图 2 基于 VP1 构建的系统进化树  
Fig.2 Phylogenetic trees based on VP1

面发挥极其重要的作用,也是鉴别呼肠孤病毒的重要依据。GCRV 相同基因型的毒株其末端特征基本一致,但不同基因型的毒株之间存在个别碱基的差别(Fan *et al.*, 2013; 柯丽华等, 1990; 张超等, 2010)。GCRV-AH528 基因组在 5'和 3'末端含有特异的保守序列和短的节段特异的颠倒互补序列。Anzola 等(1987)推测末端保守序列是病毒基因组的信号区域,而颠倒互补序列为病毒基因组某一节段的信号序列。与其他 II 型 GCRV 相比,本实验室分离的 GCRV-AH528 毒株 L1 节段编码区在 701~702 位置缺少 3 个核苷酸,少编码 1 个氨基酸; M4 节段在 253~255、2174~2176 位置均出现终止密码子 UAG,因此, M4 节段存在 2 个开放阅读框,编码 2 个蛋白。研究结果充分说明,在进化过程中, GCRV 毒株在一定程度上发生碱基的缺失或突变,导致核苷酸编码区发生变化,编码的蛋白发生差异,可见, GCRV 存在较强的变异性。

不同类型、不同来源的呼肠孤病毒,其基因组序列、功能蛋白序列存在一定程度的差异。水生呼肠孤病毒均含有 11 个节段,而正呼肠孤病毒仅含有 10 个节段,这 2 个属的病毒基因组各个节段分子量有较大差异,但基因组总分子量相差不大(曾令兵等, 1991)。另对这 2 个属病毒编码的蛋白分析表明,它们之间仅 7 种蛋白存在同源性,可见呼肠孤病毒不同属之间存在一定的差异。序列相似度分析表明, GCRV-AH528 与正呼肠孤病毒核苷酸、氨基酸的同源性低于水生呼肠孤病毒。但进一步研究发现, GCRV-AH528 与 GCRV-I 型(GCRV-873)、GCRV-III 型(GCRV104)仅存在 7 种同源性蛋白,却与 MRV、ARV 存在 8 种同源性蛋白。GCRV-AH528 S7、S10 节段编码的 VP56、NS38 蛋白与水生呼肠孤病毒无同源性蛋白,但分别与 MRV Sigma 1 蛋白、ARV sigma NS 蛋白存在同源性序列,暗示 GCRV-AH528 在进化上比 GCRV-873 更趋于正呼肠孤病毒。

#### 4 结论

本研究从分子生物学角度对 GCRV-AH528 新毒株进行鉴定,为安徽合肥地区草鱼出血病的防治提供了理论依据,同时,为免疫工作的开展提供了基础性的参考资料。在实际生产中应及早对该病病原进行检测,尽早预防和治疗。

#### 参 考 文 献

Anzola JV, Xu ZK, Asamizu T, *et al.* Segment-specific inverted

- repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(23): 8301-8305
- Attoui H, Billoir F, Cantaloube JF, *et al.* Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *Journal of Virological Methods*, 2000, 89(1-2): 147-158
- Burland TG. DNASTAR's lasergene sequence analysis software. Humana Press, 1999, 71-91
- Cheng WC, Zhou Y, Li WW, *et al.* Analysis of old and new three diseases in grass carp. *Ocean and Fishery*, 2016(4): 68-70 [程文超, 周亚, 李万文, 等. 草鱼老三病与新三病的分析. *海洋与渔业*, 2016(4): 68-70]
- Deléage G, Combet C, Blanchet C, *et al.* ANTHEPROT: An integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Computers in Biology and Medicine*, 2001, 31(4): 259-267
- Fishery Bureau of Department of Agriculture. China yearbook of fishery statistics. Beijing: China Agriculture Press, 2016 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- Fan YD, Rao S, Zeng LB, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China. *Journal of General Virology*, 2013, 94(10): 2266-2277
- Hao GJ, Shen JY, Pan XY, *et al.* Isolation and identification of a strain of Grass carp reovirus in Huzhou. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 47-52 [郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺, 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 47-52]
- Huang YC, Lei Y, Yang YT, *et al.* Molecular epidemiology of hemorrhage disease of grass carp and the diversity research of GCRV. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(11): 120-125, 153 [黄毅昌, 雷燕, 杨玉滔, 等. 草鱼出血病分子流行病学及 GCRV 多样性研究. *安徽农业科学*, 2016, 44(11): 120-125, 153]
- Jiang YL. Hemorrhagic disease of grass carp: Status of outbreaks, diagnosis, surveillance, and research. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2009, 61(3): 188-197
- Ke LH, Fang Q, Cai YQ. Characteristics of a novel isolate of grass carp hemorrhagic virus. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, 14(2): 153-159 [柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性. *水生生物学报*, 1990, 14(2): 153-159]
- Liang HR, Li YG, Zeng WW, *et al.* Pathogenicity and tissue distribution of grass carp reovirus after intraperitoneal administration. *Virology Journal*, 2014, 11(1): 1-8
- Liu YK, Wang Q, Zeng WW, *et al.* Isolation and identification of grass carp reovirus strain JX-0902. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(5): 1077-1083 [刘永奎, 王庆, 曾伟伟, 等. 草鱼呼肠孤病毒 JX-0902 株的分离和鉴定. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1077-1083]
- Pei C, Ke F, Chen ZY, *et al.* Complete genome sequence and

- comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2435–2440
- Qiu T, Lu RH, Zhang J, *et al.* Molecular characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus. *Archives of Virology*, 2001, 146(7): 1391–1397
- Rodger HD. Fish disease causing economic impact in global aquaculture. In: Adams A (Ed.), *Fish Vaccines*. Springer, Basel, 2016, 1–34
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729
- Wang Q, Zeng WW, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466
- Zeng LB, Zuo WG. Genome SDS-PAGE analysis and nucleic acid identification of grass carp hemorrhage virus strain 854. *Freshwater Fisheries*, 1991(5): 17–19 [曾令兵, 左文功. 草鱼出血病病毒 854 株基因组 SDS-PAGE 分析及其核酸类型鉴定. *淡水渔业*, 1991(5): 17–19]
- Zhang C, Wang Q, Shi CB, *et al.* Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRV HZ08. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1257–1263 [张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1257–1263]

(编辑 冯小花)

## Genomic Characterization and Phylogenetic Analysis of Grass Carp Reovirus AH528 Strain

WU Minglin, LI Haiyang, JIANG He, HE Jixiang<sup>①</sup>, HOU Guanjun, JIANG Yangyang

(*Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031*)

**Abstract** Grass carp haemorrhage is an epidemic disease, which is caused by grass carp reovirus (GCRV). Grass carp fingerlings and yearlings are vulnerable to GCRV. A virulent reovirus, tentatively named GCRV-AH528, was isolated from a diseased grass carp exhibiting typical hemorrhage symptoms in Hefei, Anhui Province. Intraperitoneal injection with the virus suspension led to hemorrhage similar to the observed clinical symptoms of blackened dorsum and hemorrhage around the mouth cavity, gill, intestine, belly, and base of the fin ray. The GCRV-AH528 genome contained 11 double-stranded RNA segments ranging from 1027 to 3925 bp, and its average content of AT and GC was 50.2% and 49.8%, respectively. Compared with registered GCRV II strains, the GCRV-AH528 L1 segment had lost three continuous nucleotides (TAT) at nt 701~702, leading to the loss of a tyrosine, and the M4 segment mutated two ORFs encoding two non-structural proteins (NS9 and NS69). All segments had 6 bp-conserved terminal nucleotides 5'-GUAA<sup>U</sup>/<sub>C</sub>U...U<sup>U</sup>/<sub>G</sub>CAUC-3'. Except for the L1 and M6 segments, the two ends in the coding region of the other nine segments existed at 5~9 bp short specific inverted complementary sequences. GCRV-AH528 showed 37.1%~98.1% nucleotide and 24.3%~98.3% AA sequence identities with other reovirus. A phylogenetic tree based on VP1 protein revealed that GCRV-AH528 clustered with members of the genus Aquareovirus and was far from GCRV-873. These results indicated that the GCRV-AH528 isolate was a new GCRV II type virulent strain.

**Key words** Grass carp haemorrhage disease; Grass carp reovirus; VP1 protein; Aquareovirus

① Corresponding author: HE Jixiang, E-mail: flyinghu2008@foxmail.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170626001

http://www.yykxjz.cn/

钟声平, 陈超, 庄志猛. 日本东京湾云纹石斑鱼染色体核型研究. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 44-49  
Zhong SP, Chen C, Zhuang ZM. Chromosome karyotype of *Epinephelus moara* (Temminck & Schlegel 1842) of Tokyo Bay population. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 44-49

# 日本东京湾云纹石斑鱼染色体核型研究

钟声平<sup>1,2</sup> 陈超<sup>2</sup> 庄志猛<sup>2</sup>



(1. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000;  
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071)

**摘要** 采用 PHA 体内直接注射法制备了云纹石斑鱼(*Epinephelus moara* Temminck & Schlegel 1842)东京湾群体头肾组织染色体标本并分析其核型。结果显示, 其东京湾群体二倍体染色体数为 48, 其中, 亚中部着丝粒 3 对; 其余 21 对染色体为端部着丝粒染色体, 其染色体臂数 NF 为 54, 核型公式为:  $2n = 48, 6sm + 42t, NF = 54$ ; 第 24 对染色体的短臂的形态具有多态性。该鱼染色体臂数高于石斑鱼类的原始核型类群, 属于石斑鱼属的特化类群。云纹石斑鱼日本东京湾群体与厦门群体染色体核型存在显著差异, 东京湾群体比厦门群体多 1 对亚中部着丝粒染色体, 可能是长期隔离导致染色体重组进化形成的。结果表明, 云纹石斑鱼不同地理群体间存在丰富的遗传差异, 可利用不同地理群体间的种内杂交优势改良云纹石斑鱼种质。

**关键词** 云纹石斑鱼; 染色体; 核型

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0044-06

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara* Temminck & Schlegel 1842)俗称草斑、油斑, 为中下层礁栖鱼类, 主要分布于太平洋西岸的日本、韩国和中国海域(郭明兰等, 2008)。其个体大、生长速度快、适应能力强、肉质鲜嫩可口, 是我国东南沿海重要经济养殖对象, 具有良好的养殖开发前景(陆丽君等, 2011)。然而, 因其人工催产和苗种培育技术难度较高, 日本在 2001 年才实现云纹石斑鱼苗种规模化繁育(王民生, 2001)。在我国, 中国水产科学研究院黄海水产研究所 2010 年突破了其苗种规模化繁育技术(林时雨, 2010; 宋振鑫等, 2012)。近几年, 有关云纹石斑鱼的研究主要集中在种间杂交(李炎璐等, 2012; 张梦淇等, 2016)、生长营养(陆丽君等, 2011; 宋振鑫等, 2014; 张廷廷等, 2016)、免疫抗逆(Tian *et al.*, 2017; 廖雅丽

等, 2016; 潘桂平等, 2016; 施兆鸿等, 2015)以及养殖技术(梁友等, 2014; 宋振鑫等, 2012)等方面, 仍缺乏该鱼种质遗传多样性相关研究。本文研究了日本东京湾云纹石斑鱼染色体核型, 并与该鱼厦门群体的染色体核型进行比较, 以期云纹石斑鱼种质资源的保护及遗传育种研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

所用材料采自山东省烟台开发区天源水产有限公司养鱼场, 为日本东京湾海域捕获的幼鱼, 引种后在室内 24 m<sup>2</sup> 水泥池人工驯养 1 个月, 养殖期间投喂鲜杂鱼饵料, 日投饵 2~3 次, 总的投饵量约为体重的

\* 广西重点研发计划(桂科 AB16380105)和引进国际先进农业科学技术(948)项目(2008-Z8)共同资助 [This work was supported by Scientific Research and Technology Development Program of Guangxi (AB16380105), and the Introduction of International Advanced Agricultural Science and Technology (948) Project (2008-Z8)].

① 通讯作者: 钟声平, E-mail: shpzhong@foxmail.com

收稿日期: 2017-06-26, 收修改稿日期: 2017-07-11

8%。本实验随机挑选 6 尾幼鱼, 体长为 20.3~23.6 cm, 体重为 127~161 g。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 染色体标本的制备** 参照 PHA(植物凝集素)(林义浩, 1982)体腔直接注射法制备染色体标本, 略作修改。取充气暂养于 25℃ 海水 24 h 后的云纹石斑鱼, 按 PHA 剂量为 10 μg/g 鱼体重进行腹腔活体注射, 3 h 后按 1 μg/g 鱼体重的剂量注射秋水仙素, 1 h 后剪鳃放血, 然后取出头肾于生理盐水中洗涤、剪碎, 用纱布过滤细胞悬浮液至离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用生理盐水洗涤细胞 2 次, 1000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 加入 0.075 mol/L 的 KCl 溶液于 32℃ 低渗处理 20 min, 1000 r/min 离心 10 min, 收集细胞, 加入预冷新配制的卡诺氏固定液(甲醇: 乙酸=3: 1, V: V)(固定 90 min, 每 30 min 更换固定液, 共换液 2 次。冷滴片法制片, 空气干燥过夜。染色体玻片用 10% 吉姆萨染色液染色 30 min, 自然干燥后显微镜(Olympus BX51)观察拍照。

**1.2.2 核型分析** 选取清晰的染色体中期分裂相计数确定染色体众数。选取 10 个分散效果良好、着丝粒清晰、长度适中、2 条染色单体适度分开的中期分裂相放大、测量、统计, 使用 Photoshop 软件依据

相对大小从大到小编号, 根据 Levan 等(1964)的标准进行核型分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 染色体数目

本实验对 464 个中期分裂相计数、统计。结果显示, 76.72% 的中期分裂相染色体数目为 48 (表 1), 据此确定云纹石斑鱼日本东京湾群体二倍体染色体众数是 48, 即:  $2n = 48$ 。

### 2.2 染色体组组成

对 10 个中期分裂相进行镜检和测量, 统计了染色体的相对长度和臂比以及染色体类型, 结果见表 2。分析显示, 云纹石斑鱼日本东京湾群体的染色体可配对成 24 对同源染色体, 按 Levan 命名法可分为 2 组, 其中, 具亚中部着丝粒(sm)3 对; 其余 21 对染色体为端部着丝粒(t)染色体(图 1 和图 2)。24 对染色体中, 第 24 对染色体的相对长度明显短于其他 23 对染色体, 其他 23 对染色体彼此相对长度差异不明显, 从  $5.13 \pm 0.15$  均匀递减至  $2.81 \pm 0.13$  (表 2), 根据染色体的相对长度、着丝点位置和特征, 确定云纹石斑鱼日本东京湾群体染色体核型公式为:  $2n = 48, 6sm + 42t, NF = 54$ 。

表 1 云纹石斑鱼染色体数目统计结果  
Tab.1 Chromosome numbers of *E. moara*

项目 Items	染色体数 Number of chromosome						总和 Sum
	≤44	45	46	47	48	≥49	
分裂相数 Number of metaphase	36	13	34	16	356	9	464
出现频率 Percentage of metaphase (%)	7.76	2.80	7.33	3.45	76.72	1.94	100

### 2.3 染色体形态多态性

对云纹石斑鱼中期分裂相进行镜检后发现: 第 24 对染色体的短臂的形态具有可变性。部分中期分裂相中短臂形态清晰, 为 sm 型染色体(图 2c); 部分中期分裂相中短臂变短消失, 为 t 型染色体(图 2b), 或变长表现为丝状, 为次缢痕(图 2a)。

## 3 讨论

生物遗传信息一般以染色体为主要载体, 染色体核型在很大程度上反映了该物种的进化历史及其物种间的亲缘关系。染色体核型的变异可能会导致该物种生物学特征的变异、生殖隔离的发生, 乃至新物种产生(郭明兰, 2008)。对已报道的国内外鱼类的染色体核型进行统计比较研究, 结果显示, 淡水鱼类染色

体二倍数变化较大, 多数为 48 和 50 (Yu *et al*, 1987; 余先觉等, 1989), 海水鱼类的染色体二倍数则相对一致, 多数为 48 (Junior *et al*, 2006)。据此推测, 淡水鱼类的基本二倍体数目是  $2n = 48$  和  $2n = 50$ , 其原始染色体核型为  $2n = 48t$  或  $50t$ ; 海水鱼类的基本二倍体数目是  $2n = 48$ , 其原始染色体核型为  $2n = 48t$ 。有关研究指出, 石斑鱼属的原始染色体核型也为  $2n = 48t$ , 符合海水鱼类原始核型特征(刘莉等, 2016; 钟声平等, 2010)。其他具有中部、亚中部和亚端部着丝粒染色体应该是由端部着丝粒染色体经易位、倒位等染色体重组的方式进化而来, 属于比较特化的类型(王世锋, 2007)。日本东京湾云纹石斑鱼的染色体核型公式为:  $2n = 48, 6sm + 42t, NF = 54$ , 其染色体臂数为 54, 高于石斑鱼属鱼类的原始核型染色体臂数 48, 属于石斑鱼属的特化类群, 推测是石斑鱼属演化过程中较晚出



表 2 云纹石斑鱼各染色体的相对长度和臂比值

Tab.2 Relative length and arm ratio of chromosomes of *E. moara* (n = 10;  $\bar{X} \pm SD$ )

染色体序号 Chromosome No.	染色体相对长度 Relative length (%)	臂比 Arm ratio	染色体类型 Type
1	5.13±0.15	∞	t
2	4.88±0.10	∞	t
3	4.71±0.05	∞	t
4	4.59±0.05	∞	t
5	4.53±0.05	∞	t
6	4.47±0.03	∞	t
7	4.41±0.04	∞	t
8	4.36±0.05	∞	t
9	4.30±0.05	∞	t
10	4.27±0.04	∞	t
11	4.24±0.05	∞	t
12	4.20±0.05	∞	t
13	4.16±0.05	∞	t
14	4.11±0.21	2.35±0.14	sm
15	4.10±0.04	∞	t
16	4.07±0.18	2.71±0.24	sm
17	4.03±0.05	∞	t
18	3.97±0.06	∞	t
19	3.92±0.05	∞	t
20	3.85±0.06	∞	t
21	3.78±0.08	∞	t
22	3.68±0.11	∞	t
23	3.44±0.19	∞	t
24	2.81±0.13	1.99±0.13	sm

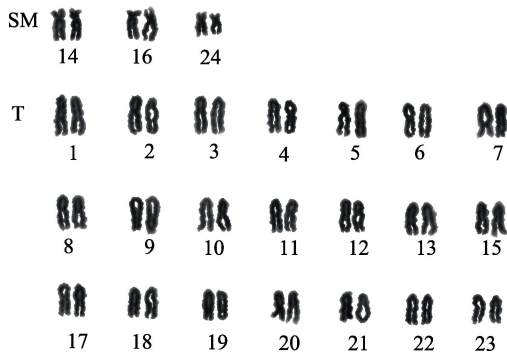


图 1 云纹石斑鱼染色体核型  
Fig.1 Karyotype of *E. moara*

现的物种之一。郭明兰(2008)对厦门群体云纹石斑鱼的核仁组织区银染(Ag-NORs)实验结果显示, 其中期分裂相中主要有 2 对 Ag-NORs, 也高于石斑鱼属具有 1 对 Ag-NORs 数目的原始核仁组织区特征, 推测其原始 1 对核仁组织区在进化中由于染色体易位重组, 导致 2 对染色体都具有核仁组织区。核仁组织区结果同样显示, 云纹石斑鱼属于石斑鱼属的特化类

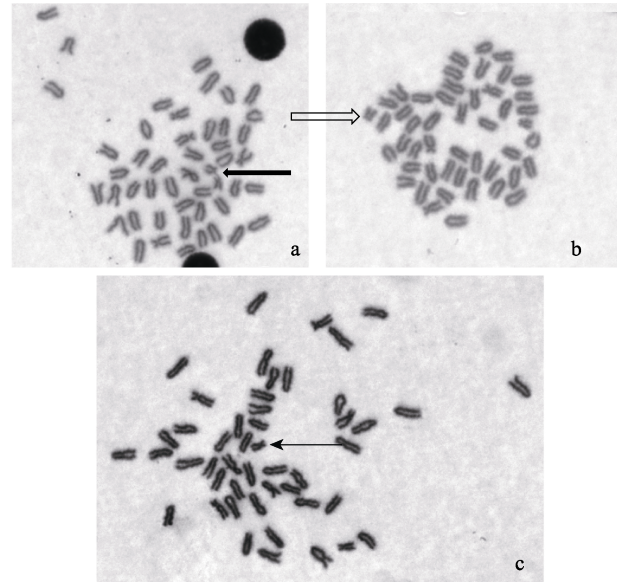


图 2 云纹石斑鱼不同中期分裂相中第 24 对染色体 (不同箭头所指) 三种形态

Fig.2 Polymorphism of chromosome pair No. 24 (indicating by different arrows) of *E. moara*

a: 丝状; b: T 型; c: SM 型  
a: Filiform; b: T type; c: SM type

群。此外, 郭明兰(2008)研究表明, 石斑鱼属鱼类核仁组织区位置具有很高的同源性, 一般位于最小的 1 对染色体(第 24 对染色体)上, 且石斑鱼属大多数种类第 24 对染色体形态高度保守, 为该属原始核型的 T 型染色体。迄今, 包括本研究在内的已报道的 26 种石斑鱼中, 仅有 4 种石斑鱼[云纹石斑鱼(郭明兰, 2008), 斜带石斑鱼(*E. coioides*) (丁少雄等, 2004; 王云新等, 2004), 褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*) (廖经球等, 2006), 褐石斑鱼(*E. bruneus*) (郭明兰, 2008; 王世锋, 2007)]的第 24 对染色体形态发生了改变, 为 SM 型染色体。该结果也支持云纹石斑鱼属于石斑鱼属的特化类群的推论。

研究显示, 一个物种的染色体核型特征, 包括染色体数目和染色体类型是相对稳定的, 海水鱼类中同物种不同地理群体, 甚至同个体不同细胞、不同发育阶段染色体核型特征有差异时有发生(郭明兰, 2008)。在石斑鱼类中有研究报道, 斜带石斑鱼、褐石斑鱼及云纹石斑鱼厦门群体个体中第 24 对染色体在不同中期分裂相中存在不同形态的短臂。推测其原因, 可能与核仁组织区的 rDNA 表达活性相关, 表达活性强时, 短臂明显, 反之则不可见。本研究结果显示, 云纹石斑鱼东京湾群体个体中第 24 对染色体形态也存在多态性, 表现为 sm 型染色体、t 型染色体, 或变长表现为丝状, 为该鱼厦门群体研究结果相同, 推

测其多态性也与第24对染色体上核仁组织区的 rDNA 表达活性相关。另外, 比较大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 岱衢族和闽粤东族群体的染色体核型, 显示2个地理群体间染色体核型存在显著差异: 岱衢族群体的染色体核型公式为 $2n = 48, 6m + 6sm + 36t, NF = 60$ ; 而闽粤东族群体的染色体核型公式为 $2n = 48, 6st + 42t, NF = 48$ 。因适应不同生长环境、长期地理隔离, 可能是大黄鱼不同地理群体间染色体核型存在显著差异重要原因之一(王德祥等, 2006)。此外, 花尾胡椒鲷(*Plectorhinchus cinctus*) (曹伏君等, 2008; 覃映雪等, 2003)、中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*) (费志清等, 1987; 沈亦平等, 1994) 和黑鲷(*Sparus macrocephalus*) (刘静等, 1991; 喻子牛等, 1993) 等海水鱼类均报道存在染色体核型多态。石斑鱼属鱼类中, 拟青石斑鱼(*E. fasciatus*) (王世锋, 2007; 郑莲等, 2005)、赤点石斑鱼(*E. akaara*) (王世锋, 2007; 王云新等, 2004) 和鲑点石斑鱼(*E. fario*) (陈毅恒等, 1990; 郑莲等, 2005) 等种类也存在染色体核型多态。本研究结果表明, 云纹石斑鱼日本东京湾群体与厦门群体染色体核型也存在显著差异: 日本东京湾群体的染色体核型公式为 $2n = 48, 6sm + 42t, NF = 54$ ; 而厦门群体染色体核型公式为 $2n = 48, 4sm + 44t, NF = 52$ 。云纹石斑鱼不同地理群体间存在丰富的遗传多样性, 可利用不同地理群体间遗传差异加速该鱼的种质改良进展。推测其可能因为长期的地理隔离, 导致该鱼2个地区群体染色体进化重组而存在差异, 有待进一步证实。该结果也提示, 云纹石斑鱼不同地理群体间存在丰富的遗传多样性, 可利用不同地理群体间遗传差异加速该鱼的种质改良进展。

## 参 考 文 献

- Cao FJ, Liu CW. Studies on karyotype and Ag-NORS banded of *Plectorhinchus cinctus* and *Plectorhinchus pictus*. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2008, 27(1): 47-50 [曹伏君, 刘楚吾. 花尾胡椒鲷、胡椒鲷的染色体核型与 Ag-NORS 带研究. 台湾海峡, 2008, 27(1): 47-50]
- Chen YH, Rong SP, Liu SQ. The karyotypes of *Epinephelus fario*. Fujian Fisheries, 1990, 12(1): 23-25 [陈毅恒, 容寿柏, 刘绍琼. 鲑点石斑鱼的核型. 福建水产, 1990, 12(1): 23-25]
- Ding SX, Wang SF, Wang DX, et al. Karyotypes of *Epinephelus coioides* and *Epinephelus akaara*. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2004, 43(3): 426-428 [丁少雄, 王世锋, 王德祥, 等. 斜带石斑鱼染色体核型分析. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(3): 426-428]
- Fei ZQ, Tao RQ. The karyotype studies of four Goby fish. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1987, 6(2): 127-131 [费志清, 陶荣庆. 鰕虎鱼亚目四种鱼的染色体组型的初步研究. 浙江水产学院学报, 1987, 6(2): 127-131]
- Guo ML, Su YQ, Chen XF, et al. Comparative studies on morphology of *Epinephelus moara* and *E. bruneus*. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(6): 106-114 [郭明兰, 苏永全, 陈晓峰, 等. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼形态比较研究. 海洋学报, 2008, 30(6): 106-114]
- Guo ML. Comparative studies of *Epinephelus moara* and *Epinephelus bruneus*. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2008, 51-70 [郭明兰. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼的比较研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2008, 51-70]
- Junior PMG, Molina WF, Affonso PRA, et al. Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. Genetica, 2006, 126(1): 161-177
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220
- Li YL, Wang QY, Chen C, et al. Embryonic and morphological development in larva, juvenile, and young stages of  $F_1$  by *Epinephelus moara* ( $\text{♀}$ )  $\times$  *E. septemfasciatus* ( $\text{♂}$ ). Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 821-832 [李炎璐, 王清印, 陈超, 等. 云纹石斑鱼( $\text{♀}$ )七带石斑鱼( $\text{♂}$ )杂交子一代胚胎发育及仔稚幼鱼形态学观察. 中国水产科学, 2012, 19(5): 821-832]
- Liang Y, Lei JL, Ni Q, et al. The industrial farming technology of *Epinephelus moara* in recirculation aquaculture water system. Fishery Modernization, 2014, 41(4): 26-28 [梁友, 雷霖霖, 倪琦, 等. 云纹石斑鱼工厂化循环水养殖技术. 渔业现代化, 2014, 41(4): 26-28]
- Liao JQ, Yi SW, Chen GH, et al. The karyotype of grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Fisheries Science, 2006, 25(11): 567-569 [廖经球, 尹绍武, 陈国华, 等. 褐点石斑鱼的核型研究. 水产科学, 2006, 25(11): 567-569]
- Liao YL, Zhang CJ, Peng SM, et al. Effects of salinity on activities of liver antioxidant enzymes and plasma lysozyme of *Epinephelus moara*. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(2): 169-176 [廖雅丽, 张晨捷, 彭士明, 等. 盐度对云纹石斑鱼抗氧化酶及溶菌酶活性的影响. 上海海洋大学学报, 2016, 25(2): 169-176]
- Lin SY. 2010-11-08. *Epinephelus moara* achieve large-scale seed breeding. China Fishery News [林时雨. 2010-11-08. 云纹石斑鱼实现规模化苗种繁育. 中国渔业报]
- Lin YH. A PHA injection method *in vivo* for the rapid obtainment of large numbers of metaphase figures from kindery cells of teleosts. Journal of Fisheries of China, 1982, 6(3): 201-208 [林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法. 水产学报, 1982, 6(3): 201-208]
- Liu J, Tian MC. A chromosome study on two sparid fishes (*Pagrosomus major* and *Sparus macrocephalus*). Marine

- Sciences, 1991, 15(3): 64–67 [刘静, 田明诚. 真鲷和黑鲷的染色体组型研究. 海洋科学, 1991, 15(3): 64–67]
- Liu L, Zhan Y, Chen C, *et al.* Preparation of chromosomes and analysis of karyotypes of hybrid F<sub>1</sub> (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂) groupers. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 33–40 [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)F<sub>1</sub>染色体制备方法 & 核型分析. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 33–40]
- Lu LJ, Chen C, Ma AJ, *et al.* Studies on the feeding behavior and morphological developments of *Epinephelus moara* in early development stages. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(6): 822–829 [陆丽君, 陈超, 马爱军, 等. 云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)早期发育阶段的摄食与生长特性. 海洋与湖沼, 2011, 42(6): 822–829]
- Pan GP, Liu BW, Zhou WY. The effects of cold stress on the antioxidant defense and immune parameters of juvenile *Epinephelus moara*. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(1): 78–85 [潘桂平, 刘本伟, 周文玉. 低温胁迫对云纹石斑鱼幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. 上海海洋大学学报, 2016, 25(1): 78–85]
- Qin YY, Su YQ, Wang SQ, *et al.* The karyotypes of *Plectorhinchus cinctus*. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 25(4): 147–150 [覃映雪, 苏永全, 王胜强, 等. 花尾胡椒鲷染色体组型分析. 海洋学报(中文版), 2003, 25(4): 147–150]
- Shen YP, Wang XJ, Chen XH, *et al.* Karyotype study of *Bostrichthys sinensis lacepede*. Journal of Wuhan University (Natural Science), 1994, 65(4): 120–122 [沈亦平, 王孝举, 陈晓汉, 等. 中华乌塘鳢染色体核型研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1994, 65(4): 120–122]
- Shi ZH, Zhang YL, Gao QX, *et al.* Effects of low-temperature stress on serum biochemical parameters and metabolic enzyme activity in juvenile *Epinephelus moara*. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(8): 2222–2228 [施兆鸿, 张艳亮, 高权新, 等. 云纹石斑鱼幼鱼血清生化指标对低温胁迫的响应. 生态学杂志, 2015, 34(8): 2222–2228]
- Song ZX, Chen C, Wu LM, *et al.* Growth characteristics of *Epinephelus septemfasciatus* and *Epinephelus moara* in recirculating aquaculture systems (RAS). Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 91–96 [宋振鑫, 陈超, 吴雷明, 等. 七带石斑鱼和云纹石斑鱼幼鱼在封闭循环水条件下的生长特性. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 91–96]
- Song ZX, Chen C, Zhai JM, *et al.* Biological characteristics and progress of artificial breeding technique for kelp bass, *Epinephelus moara*. Fishery Information and Strategy, 2012, 27(1): 47–53 [宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼生物学特性及人工繁育技术研究进展. 渔业信息与战略, 2012, 27(1): 47–53]
- Tian Y, Chen Z, Tang J, *et al.* Effects of cryopreservation at various temperatures on the survival of kelp grouper (*Epinephelus moara*) embryos from fertilization with cryopreserved sperm. Cryobiology, 2017, 75: 37–44
- Wang DX, Su YQ, Wang SF, *et al.* The karyotypes and their polymorphisms of the *Pseudosciaena crocea* from different populations. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(6): 176–178 [王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 不同地理种群大黄鱼染色体核型的比较研究. 海洋学报, 2006, 28(6): 176–178]
- Wang MS. Japanese *Epinephelus septemfasciatus* and *E. moara* seed production success. Chinese Fisheries Economics, 2001, 20(6): 54 [王民生. 日本七带石斑鱼和云纹石斑鱼苗种批量生产成功. 中国渔业经济, 2001, 20(6): 54]
- Wang SF. Comparative karyotype characterization and chromosomal evolution of six groupers. Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2007, 33–62 [王世锋. 六种石斑鱼核型特征比较和染色体进化研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2007, 33–62]
- Wang YX, Wang HD, Zhang HF, *et al.* Karyotypes of *Epinephelus coioides* and *Epinephelus akaara*. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2004, 24(3): 4–8 [王云新, 王宏东, 张海发, 等. 斜带石斑鱼与赤点石斑鱼的核型研究. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 4–8]
- Yu X, Zhou T, Li K, *et al.* On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. Genetica, 1987, 72(3): 225–235
- Yu XJ, Zhou D, Li YC, *et al.* China's freshwater fish chromosomes. Beijing: Science Press, 1989 [余先觉, 周墩, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社, 1989]
- Yu ZN, Kong XY, Xie ZY, *et al.* Studies on the karyotypes and Ag-NOR banding of *Pagrosomus major* and *Sparus macrocephalus*. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 35(3): 107–115 [喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗塘, 等. 真鲷 *Pagrosomus major* 和黑鲷 *Sparus macrocephalus* 的核型及 Ag-NOR 带研究. 青岛海洋大学学报, 1993, 35(3): 107–115]
- Zhang MQ, Chen C, Li YL, *et al.* Effect of salinity on the hatching of the fertilized eggs of (*Epinephelus moara* ♀) (*Epinephelus lanceolatus* ♂) and the observation of the morphological development of larvae, juvenile and young fish. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(4): 81–89 [张梦淇, 陈超, 李炎璐, 等. 盐度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂)受精卵孵化的影响及杂交仔稚幼鱼形态发育观察. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 81–89]
- Zhang TT, Chen C, Shao YX, *et al.* Adaptation of juvenile *Epinephelus moara* fed diets with high energy and low nitrogen. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(9): 2977–2986 [张廷廷, 陈超, 邵彦翔, 等. 云纹石斑鱼幼鱼对高能低氮饲料的适应性. 动物营养学报, 2016, 28(9): 2977–2986]
- Zheng L, Liu CW, Li CL. Studies on the karyotype of 4 groupers. Marine Sciences, 2005, 29(4): 51–55 [郑莲, 刘楚吾, 李长玲. 4 种石斑鱼染色体核型研究. 海洋科学, 2005, 29(4):

51–55]  
Zhong SP, Chen C, Wang J, *et al.* Chromosome karyotype of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg,

1793). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 150–155 [钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 150–155]

(编辑 冯小花)

## Chromosome Karyotype of *Epinephelus moara* (Temminck & Schlegel 1842) of Tokyo Bay Population

ZHONG Shengping<sup>1,2</sup>①, CHEN Chao<sup>2</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Shandong Provincial Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Qingdao 266071)

**Abstract** Cytogenetic analysis is a valuable tool for germplasm study and protection. In order to clarify the Germplasm resources of *Epinephelus moara*, the metaphase chromosomes of *E. moara* of Tokyo Bay population were obtained from the head kidney tissue by the method of PHA and colchicine injection and the karyotype was analyzed by using microscopes. We observed 464 mitotic metaphases from 6 individuals, and 356 of all observed mitotic metaphases (76.72%) showed  $2n = 48$  chromosomes, which indicated that there were 48 chromosomes in the diploid. We then analyzed 10 mitotic metaphases and calculated the relative length and arm ratio of the chromosomes. The relative length of the chromosomes in *E. moara* of Tokyo Bay population varied from  $(5.13 \pm 0.15) \%$  to  $(2.81 \pm 0.13) \%$ . The arm ratio of the 14<sup>th</sup> chromosome was  $2.35 \pm 0.14$ , and the arm ratio of the 16<sup>th</sup> chromosome was  $2.71 \pm 0.24$ . The 24<sup>th</sup> chromosome had the minimum arm ratio, which was  $1.99 \pm 0.13$ . According to arm ratio, the diploid consisted of 6 submetacentric, and 42 telocentric chromosomes, and the fundamental number of chromosome arms was 54, which indicated karyotypic formula in *E. moara* of Tokyo Bay population was  $2n = 48$ ,  $6sm + 42t$ ,  $NF = 54$ . The form of the 24<sup>th</sup> chromosome was changed in different metaphase from the same individual (the shorter arm changed among filiform, T type, and SM type), which may be related with the expressed activity of the rDNA in nucleolar organizing region. By comparison with the chromosome karyotypes of other *Epinephelus species*, *E. moara* has the evolutive characteristics of karyotypic pattern and belongs to the specialization group. As detected, the karyotypes of *E. moara* were different between Japan (Tokyo Bay) and China (Xiamen coastal waters) samples, which may be caused by geographic isolation. There were abundant genetic diversity among different geographic populations, and the germplasm improvement of *E. moara* could be accelerated by heterosis among different geographic groups.

**Key words** *Epinephelus moara*; Chromosome; Karyotype

① Corresponding author: ZHONG Shengping, E-mail: shpzhong@foxmail.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170804001

http://www.yykxjz.cn/

边力, 刘刚, 张庆文, 刘琨, 陈四清, 李凤辉, 孟乾, 刘长琳, 葛建龙. 不同规格绿鳍马面鲈形态性状对体重影响的通径分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 50-57

Bian L, Liu G, Zhang QW, Liu K, Chen SQ, Li FH, Meng Q, Liu CL, Ge JL. Path analysis of the effects of morphometric traits on body weight for *Thamnaconus septentrionalis* at different size. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 50-57

## 不同规格绿鳍马面鲈形态性状 对体重影响的通径分析\*



边 力<sup>1</sup> 刘 刚<sup>2</sup> 张庆文<sup>1</sup> 刘 琨<sup>1,3</sup> 陈四清<sup>1①</sup>  
李凤辉<sup>1</sup> 孟 乾<sup>1</sup> 刘长琳<sup>1</sup> 葛建龙<sup>1</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. 青岛市黄岛区海洋与渔业局 青岛 266400; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 为优化绿鳍马面鲈(*Thamnaconus septentrionalis*)养殖技术、扩大产业化规模,本研究利用通径分析方法探究了不同规格绿鳍马面鲈形态性状对体重的影响。以体重为依据,将获得的绿鳍马面鲈样品划分为 3 个不同规格(小、中和大),分别测量了体重与全长(FL)、体长(BL)、体高(BH)、头长(HL)、吻长(SL)、眼径(ED)、尾柄长(CL)和尾柄高(CH)8 个形态性状,通过相关分析和通径分析,计算各个形态性状间的相关系数,以及各个形态指标对于体重的通径系数、决定系数,最终建立依据形态性状估算体重的最优线性回归方程。结果显示,影响不同规格绿鳍马面鲈体重的主要形态指标存在差异,小规格为体高、体长、眼径和尾柄长,中规格为体长、尾柄高、头长、体高、全长和尾柄长,大规格为体高、全长和尾柄高。小、中及大规格的回归方程分别为: $Y=-84.753+17.263X_{BH}+6.572X_{BL}-28.928X_{ED}-11.353X_{CL}$ ;  $Y=-325.824+20.321X_{BL}+94.047X_{CH}-11.425X_{HL}+15.713X_{BH}-7.218X_{FL}+15.744X_{CL}$ ;  $Y=-516.433+38.012X_{BH}+10.545X_{FL}+82.752X_{CH}$ 。3 个不同规格绿鳍马面鲈,形态性状对体重的决定系数之和均大于 0.85,说明本研究得到的形态性状为影响绿鳍马面鲈体重的重点性状。本研究阐明了不同规格绿鳍马面鲈体重和形态性状的相关关系,对全人工养殖技术的完善具有重要的参考价值。

**关键词** 绿鳍马面鲈; 形态性状; 相关分析; 通径分析; 回归分析

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0050-08

绿鳍马面鲈(*Thamnaconus septentrionalis*)俗称剥皮鱼、马面鱼、面包鱼,为我国沿海深受人们喜爱的食用经济性鱼类。在我国主要分布于东海、南海、黄海、渤海和台湾沿海,栖息于水深 50~120 m 的海

区(苏锦祥等, 2002)。绿鳍马面鲈自 1974 年开始成为我国东海的主要捕捞对象之一, 1989 年该鱼种全国渔获量达到 30 多万 t (丁民权, 1994)。绿鳍马面鲈具有很高的经济价值,其肉质洁白坚实、味道鲜而不腻,

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费项目(20603022017014)资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022017014)]. 边 力, E-mail: bianli@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2017-08-04, 收修改稿日期: 2017-08-17

可做生鱼片、鱼松; 鱼肉纤维较长, 可制成鱼绒或鱼糜制品; 头、皮、内脏部分可以制成鱼粉(孟宪菊等, 2009)。近年来, 由于过度捕捞以及生存环境的破坏, 绿鳍马面鲈的渔获量出现了显著下降(陈丕茂等, 2000)。通过建立绿鳍马面鲈的全人工养殖技术, 一方面可以满足日益增长的市场需要, 另一方面可以有效降低对野生群体的需求, 保护绿鳍马面鲈的自然资源。目前, 我国水产科研人员已突破了绿鳍马面鲈的苗种繁育技术(关键等, 2011; 薛美岩, 2011; 张家男, 2011), 并初步建立了苗种养成阶段的网箱养殖技术(李平伦等, 2002)。为优化绿鳍马面鲈的养殖技术, 扩大养殖规模, 需要对体重、体长等关系到经济价值的重要性状进行进一步研究。

体重作为水产品最为重要的经济性性状, 在养殖实践过程中经常难以准确测量, 这主要由鱼体表面残留的水分导致。形态性状则具备更好的度量性, 更易于准确测量。通过通径分析的手段, 可以估算形态性状与体重的相关性, 筛选影响体重的重点形态性状, 建立以形态性状为自变量估算体重的回归方程。因此, 基于对形态性状的准确测量, 结合通径分析的统计手段, 可实现对体重的准确估计, 为养殖实践提供参考。目前, 这种技术手段在鱼类(耿绪云等, 2011; 王新安等, 2013; 严福升等, 2010)、贝类(白临建等, 2012; 吴彪等, 2010; 张嘉丽等, 2014)、虾蟹类(边力等, 2013; 高保全等, 2008; 李洋等, 2012)等水产动物的研究中得到了广泛应用。绿鳍马面鲈的苗种繁育技术已经获得突破, 目前正在优化从育苗到后期养成的一整套全人工养殖技术, 开展形态性状对体重影响的通径分析可以为养殖技术的完善提供理论指导。

本研究采集了山东省近海海域的绿鳍马面鲈, 依据体重将其划分为3个规格, 测量了多个形态性状及体重, 通过相关分析和通径分析, 计算各个形态性状间的相关系数以及各个形态指标对体重的通径系数、决定系数, 最终分别建立了3个不同规格依据形态性状估算体重的最优线性回归方程。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所使用的绿鳍马面鲈采自山东省烟台市和日照市的近海海域, 收购自当地近海捕鱼的渔船, 共采集258尾, 体重范围为20.7~502.3 g, 采集时间为2017年2~5月。由于缺乏较为可靠的研究支持, 难以确定体重与月(年)龄的准确对应关系, 本研究以小规格(<100 g, 103尾)、中规格(100~250 g, 85尾)

和大规格(>250 g, 70尾)的方式对处于不同生长阶段的绿鳍马面鲈进行了划分。测量前, 擦干鱼体表面水分, 电子天平测量体重(精确到0.01 g), 利用游标卡尺(精确到0.1 mm)准确测量全长(Full length, FL)、体长(Body length, BL)、体高(Body height, BH)、头长(Head length, HL)、吻长(Snout length, SL)、眼径(Eye diameter, ED)、尾柄长(Caudal peduncle length, CL)和尾柄高(Caudal peduncle height, CH), 图1为所测形态性状的示意图。

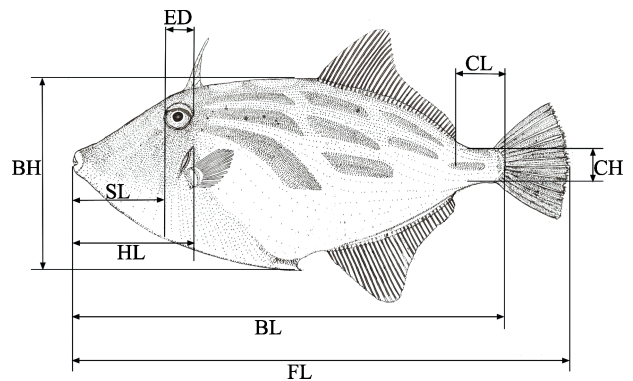


图1 绿鳍马面鲈形态参数测定示意图

Fig.1 Sketch of morphometric traits in *T. septentrionalis*

BH: 体高; BL: 体长; CH: 尾柄高; CL: 尾柄长;

ED: 眼径, FL: 全长; HL: 头长; SL: 吻长

BH: Body height; BL: Body length; CH: Caudal peduncle

height; CL: Caudal peduncle length; ED: Eye diameter;

FL: Full length; HL: Head length; SL: Snout length

### 1.2 分析方法

利用SPSS 19.0软件对3个生长期绿鳍马面鲈的形态性状和体重分别进行描述性统计分析, 计算变异系数(Coefficient of variation, CV)。计算各个性状间的Pearson相关系数, 利用 $t$ 检验的方法检验相关系数的显著性。相关系数的计算公式:

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

计算各形态性状对体重的通径系数及决定系数, 解析各形态指标的直接作用和间接作用。通径系数 $P_i$ 就是标准化变量的偏回归系数, 计算公式为:

$$P_i = b_{y, x_i} \times \frac{\sigma_{x_i}}{\sigma_y}$$

式中,  $P_i$ 为直接通径系数,  $b_{y, x_i}$ 为形态性状 $x_i$ 的回归系数,  $\sigma_{x_i}$ 为形态性状 $x_i$ 的标准差,  $\sigma_y$ 为体重的标准差。

间接途径系数的计算公式:

$$P_{x_i x_j} = r_{ij} P_j (i \neq j)$$

式中,  $P_{x_i x_j}$  为形态性状  $x_i$  通过形态性状  $x_j$  对体重的间接途径系数,  $r_{ij}$  为两形态性状间的相关系数,  $P_j$  为形态性状  $x_j$  对体重的直接途径系数。

决定系数分为 2 种, 单个决定系数:  $d_i = P_i^2$ ; 两个性状对体重的共同决定系数:  $d_{ij} = 2r_{ij} \times P_i \times P_j$ 。

将形态性状作为自变量, 体重作为因变量, 采用逐步引入法建立形态性状估计体重的最优回归方程。

多元线性回归方程模型:

$$y_p = \alpha + \sum_{j=1}^k \beta_j x_{jp} + \varepsilon_p, p = 1, 2, \dots, n$$

式中,  $y_p$  为在随机误差为  $\varepsilon_p$  时的因变量值,  $\alpha$  为常数项,  $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$  为偏回归系数,  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_n$  是相互独立且服从正态分布  $N(0, \sigma^2)$  的随机变量。

## 2 结果与分析

### 2.1 表型参数值

不同规格绿鳍马面鲈表型参数值列于表 1。小、中和大规格绿鳍马面鲈的体重均值分别为 51.48、164.26 和 337.63 g。3 个规格表型参数变异系数最大的均为体重。在不考虑体重的情况下, 小规格和中规格绿鳍马面鲈变异系数最大的形态性状为尾柄长, 大规格为吻长。

表 1 3 个不同规格绿鳍马面鲈体重和形态性状的表型参数值

Tab.1 Descriptive statistics of the body weight and morphometric traits of *T. septentrionalis* at three different sizes

性状 Traits	小规格 Small size			中规格 Medium size			大规格 Large size		
	平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV (%)	平均值 mean	标准差 SD	变异系数 CV (%)	平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV (%)
全长 FL (cm)	15.40	2.34	15.19	22.88	2.00	8.74	29.72	2.56	8.60
体长 BL (cm)	13.32	1.84	13.81	19.72	1.77	8.98	25.41	1.82	7.17
体高 BH (cm)	5.30	0.90	16.98	7.94	0.67	8.44	10.07	1.14	11.31
头长 HL (cm)	3.68	0.55	14.95	5.17	0.47	9.09	6.30	0.59	9.38
吻长 SL (cm)	2.75	0.44	16.00	3.91	0.38	9.72	4.89	0.60	12.21
眼径 ED (cm)	0.81	0.13	16.05	1.10	0.13	11.82	1.33	0.11	8.56
尾柄长 CL (cm)	1.70	0.37	21.76	2.59	0.38	14.67	3.46	0.37	10.82
尾柄高 CH (cm)	1.20	0.21	17.50	1.57	0.11	7.01	1.91	0.20	10.50
体重 BW (g)	51.48	20.70	40.21	164.26	43.84	26.69	337.63	82.37	24.40

### 2.2 形态性状间的相关系数

不同规格绿鳍马面鲈各个性状间的相关系数列于表 2。3 个不同规格绿鳍马面鲈所有性状之间的相关系数均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 而小规格绿鳍马面鲈形态性状之间的相关系数要高于中规格和大规格。小规格和大规格, 与体重相关系数最大的性状均为体高; 中规格与体重相关系数最大的为体长。

### 2.3 各形态性状对体重的通径系数及作用分析

通径系数为多元回归分析过程获得的标准化系数(偏回归系数), 绿鳍马面鲈形态性状对体重的通径系数结果列于表 3。3 个不同规格绿鳍马面鲈体高对体重的通径系数均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 说明体高是影响绿鳍马面鲈体重的关键形态指标。小规格绿鳍马面鲈的体高、体长、眼径和尾柄长对体重的通径系数均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。体高和体长对体重的直接作用大于间接作用, 而眼径和尾柄长对体重的通

径系数为负值, 且直接作用小于间接作用, 说明眼径和尾柄长对体重具有负影响, 并主要通过其他性状间接影响体重。对于中规格绿鳍马面鲈, 体长、尾柄高、头长、体高、全长和尾柄长极显著地影响着体重, 除体长外, 其余性状均通过其他性状间接地影响体重, 头长和全长对体重有负影响。大规格绿鳍马面鲈的体高、全长和尾柄高对体重的通径系数均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 体高对体重的直接作用大于间接作用。

### 2.4 形态性状对体重的决定程度分析

单个决定系数:  $d_i = P_i^2$ ; 两性状对体重的共同决定系数  $d_{ij} = 2r_{ij} \times P_i \times P_j$  计算各性状对体重的决定系数, 结果列于表 4。小规格、中规格和大规格绿鳍马面鲈形态性状对体重决定系数总和分别为 0.942、0.885 和 0.902, 均大于 0.85, 说明本研究得到的形态性状为影响绿鳍马面鲈体重的重点性状, 在养殖实践中具有重要的参考价值。

表 2 3 个不同规格绿鳍马面鲈各性状间的相关系数  
Tab.2 The phenotype correlation coefficients among the traits of *T. septentrionalis* at three different sizes

规格 Size	性状 Traits	全长 FL	体长 BL	体高 BH	头长 HL	吻长 SL	眼径 ED	尾柄长 CL	尾柄高 CH	体重 BW
小规格 Small size	全长 FL	1	0.963**	0.942**	0.945**	0.943**	0.876**	0.883**	0.951**	0.926**
	体长 BL		1	0.923**	0.928**	0.920**	0.848**	0.884**	0.939**	0.936**
	体高 BH			1	0.924**	0.914**	0.847**	0.892**	0.933**	0.947**
	头长 HL				1	0.984**	0.890**	0.840**	0.920**	0.895**
	吻长 SL					1	0.861**	0.824**	0.911**	0.890**
	眼径 ED						1	0.819**	0.875**	0.776**
	尾柄长 CL							1	0.896**	0.827**
	尾柄高 CH								1	0.906**
中规格 Medium size	全长 FL	1	0.920**	0.712**	0.780**	0.741**	0.593**	0.684**	0.523**	0.725**
	体长 BL		1	0.740**	0.731**	0.728**	0.533**	0.734**	0.578**	0.851**
	体高 BH			1	0.537**	0.559**	0.515**	0.649**	0.679**	0.804**
	头长 HL				1	0.958**	0.582**	0.491**	0.393**	0.514**
	吻长 SL					1	0.524**	0.504**	0.450**	0.543**
	眼径 ED						1	0.437**	0.474**	0.483**
	尾柄长 CL							1	0.716**	0.787**
	尾柄高 CH								1	0.763**
大规格 Large size	全长 FL	1	0.956**	0.661**	0.816**	0.836**	0.615**	0.787**	0.645**	0.804**
	体长 BL		1	0.559**	0.750**	0.745**	0.548**	0.725**	0.540**	0.723**
	体高 BH			1	0.474**	0.579**	0.491**	0.452**	0.784**	0.900**
	头长 HL				1	0.940**	0.685**	0.535**	0.516**	0.604**
	吻长 SL					1	0.644**	0.562**	0.655**	0.729**
	眼径 ED						1	0.417**	0.456**	0.546**
	尾柄长 CL							1	0.511**	0.579**
	尾柄高 CH								1	0.824**
	体重 BW									1

“\*\*”表示与体重的相关性达到极显著水平( $P<0.01$ )

“\*\*” indicates the correlation coefficient reaches highly significant level at  $P<0.01$

### 2.5 建立最优线性回归方程

采用逐步回归法, 剔除标准化系数(偏回归系数)不显著的形态性状, 建立 3 个不同规格绿鳍马面鲈的最优线性回归方程, 分别为:

小规格:  $Y = -84.753 + 17.263X_{BH} + 6.572X_{B-} - 28.928X_{ED} - 11.353X_{CL}$

中规格:  $Y = -325.824 + 20.321X_{BL} + 94.047X_{CH} - 11.425X_{HL} + 15.713X_{BH} - 7.218X_{FL} + 15.744X_{CL}$

大规格:  $Y = -516.433 + 38.012X_{BH} + 10.545X_{FL} + 82.752X_{CH}$

标准化系数显著性检验结果列于表 5, 不同规格绿鳍马面鲈回归方程所保留形态性状的标准化系数均达到极显著水平。多元回归方程方差分析结果列于表 6, 3 个不同规格绿鳍马面鲈方程的回归关系都达

到极显著水平, 回归效果十分明显, 说明本研究得到的回归方程对于各个规格绿鳍马面鲈的体重均有较好的估算, 具有很好的参考价值。

## 3 讨论

### 3.1 不同规格绿鳍马面鲈形态性状对体重的影响

本研究采用通径分析的方法, 分析不同规格绿鳍马面鲈形态性状对体重的影响, 剔除标准化系数不显著的形态性状, 获得了影响不同规格绿鳍马面鲈体重的主要形态性状。3 个不同规格绿鳍马面鲈, 体高对体重的通径系数均达到极显著水平( $P<0.01$ ), 说明体高是影响绿鳍马面鲈体重的关键形态指标。绿鳍马面鲈的身体较为扁平, 体高较高, 该结果符合其外部形态特征。与此同时, 部分通径分析获得的形态性状对



表3 绿鳍马面鲈形态性状对体重的通径系数及作用分析  
Tab.3 Direct and indirect path coefficients of morphological traits to body weight of *T. septentrionalis*

规格 Size	性状 Traits	相关系数 $R_{ij}$	直接作用 $P_i$	间接作用 Indirect path coefficient						
小规格 Small size			$\Sigma$	体高 BH	体长 BL	眼径 ED	尾柄长 CL			
	体高 BH	0.947**	0.747**	0.200		0.540	-0.157	-0.183		
	体长 BL	0.936**	0.585**	0.351	0.689		-0.157	-0.181		
	眼径 ED	0.776**	-0.185**	0.961	0.633	0.496		-0.168		
	尾柄长 CL	0.827**	-0.205**	1.032	0.666	0.517	-0.152			
中规格 Medium size			$\Sigma$	体长 BL	尾柄高 CH	头长 HL	体高 BH	全长 FL	尾柄长 CL	
	体长 BL	0.851**	0.822**	0.028		0.142	-0.090	0.178	-0.303	0.101
	尾柄高 CH	0.763**	0.246**	0.516	0.475		-0.048	0.163	-0.172	0.098
	头长 HL	0.514**	-0.123*	0.637	0.601	0.097		0.129	-0.257	0.067
	体高 BH	0.804**	0.240**	0.564	0.608	0.167	-0.066		-0.234	0.089
	全长 FL	0.725**	-0.329**	1.054	0.756	0.129	-0.096	0.171		0.094
	尾柄长 CL	0.787**	0.137*	0.650	0.603	0.176	-0.060	0.156	-0.225	
大规格 Large size			$\Sigma$	体高 BH	全长 FL	尾柄高 CH				
	体高 BH	0.900**	0.526**	0.374		0.216	0.158			
	全长 FL	0.804**	0.327**	0.477	0.347		0.130			
	尾柄高 CH	0.824**	0.201**	0.623	0.412	0.211				

“\*”表示达到显著水平( $P<0.05$ ), “\*\*”表示达到极显著水平( $P<0.01$ )

“\*” indicates the correlation coefficient and path coefficient reach significant level at  $P<0.05$ , “\*\*” indicates the correlation coefficient and path coefficient reach highly significant level at  $P<0.01$

表4 不同规格绿鳍马面鲈形态性状对体重的决定系数  
Tab.4 The determinant coefficients of the morphometric traits to body weight of *T. septentrionalis* at different size

规格 Size	性状 Traits	体高 BH	体长 BL	眼径 ED	尾柄长 CL			
小规格 Small size	体高 BH	0.558	0.807	-0.234	-0.273			
	体长 BL		0.342	-0.184	-0.212			
	眼径 ED			0.034	0.062			
	尾柄长 CL				0.042			
中规格 Medium size		体长 BL	尾柄高 CH	头长 HL	体高 BH	全长 FL	尾柄长 CL	
	体长 BL	0.676	0.234	-0.148	0.292	-0.498	0.165	
	尾柄高 CH		0.061	-0.024	0.080	-0.085	0.048	
	头长 HL			0.015	-0.032	0.063	-0.017	
	体高 BH				0.058	-0.112	0.043	
	全长 FL					0.108	-0.062	
	尾柄长 CL						0.019	
大规格 Large size		体高 BH	全长 FL	尾柄高 CH				
	体高 BH	0.277	0.227	0.166				
	全长 FL		0.107	0.085				
	尾柄高 CH			0.040				

体重具有负影响,如小规格的眼径和尾柄长,中规格的头长和全长。产生负影响的均为鱼体的横向形态性状,而纵向指标如体高均对体重具有正影响,这从一个侧面反映出纵向指标对于绿鳍马面鲈的体重具有重要影响。因而,在养殖生产实践中,应着重关注绿鳍马面鲈的体高情况,由体高可以较好地估计绿

鳍马面鲈的体重情况。

另一方面,研究结果显示,对于不同规格的绿鳍马面鲈,影响其体重的主要形态性状也存在差别。与本研究结果相类似,2月龄和18月龄的黄姑鱼(*Nibea albiflora*)规格大小存在差异,影响2月龄黄姑鱼的主要形态性状为躯干长和全长,而影响18月龄的为体

表 5 标准化系数(偏回归系数)  
Tab.5 Standardized coefficient (Partial regression coefficient)

规格 Size	变量 Variable	非标准化系数		标准化系数 Standardized coefficient	t	显著性水平 Sig.
		Unstandardized coefficient 系数 B	标准误 SE			
小规格 Small size	常量 Constant	-84.753	4.233		-20.024	0
	体高 BH	17.263	1.654	0.747	10.440	0
	体长 BL	6.572	0.784	0.585	8.384	0
	眼径 ED	-28.928	7.649	-0.185	-3.782	0
	尾柄长 CL	-11.353	3.218	-0.205	-3.528	0.001
中规格 Medium size	常量 Constant	-325.824	28.479		-11.441	0
	体长 BL	20.321	2.659	0.822	7.643	0
	尾柄高 CH	94.047	23.174	0.246	4.058	0
	头长 HL	-11.425	5.739	-0.123	-1.991	0.050
	体高 BH	15.713	4.228	0.240	3.717	0
	全长 FL	-7.218	2.370	-0.329	-3.046	0.003
	尾柄长 CL	15.744	7.655	0.137	2.057	0.043
	常量 Constant	-516.433	37.947		-13.609	0
大规格 Large size	体高 BH	38.012	4.746	0.526	8.010	0
	全长 FL	10.545	1.717	0.327	6.140	0
	尾柄高 CH	82.752	26.523	0.201	3.120	0.003

表 6 多元回归方程方差分析表  
Tab.6 Analysis of variance of multiple regression equation

规格 Size		平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	显著性水平 Sig.
小规格 Small size	回归 Regression	41196.962	4	10299.241	398.960	0
	残差 Residual	2529.893	98	25.815		
	总计 Total	43726.855	102			
中规格 Medium size	回归 Regression	143114.269	6	23852.378	101.476	0
	残差 Residual	18334.259	78	235.055		
	总计 Total	161448.528	84			
大规格 Large size	回归 Regression	422310.934	3	140770.311	202.803	0
	残差 Residual	45812.149	66	694.123		
	总计 Total	468123.083	69			

高和全长(黄伟卿等, 2016)。在卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)的研究方面, 1 月龄和 4 月龄卵形鲳鲹对体重影响最大的性状为全长, 而规格更大的 7~13 月龄则为体高(区又君等, 2013)。这说明对于不同规格大小的绿鳍马面鲈, 需要参考不同的重点形态性状对体重加以估计。

### 3.2 影响绿鳍马面鲈体重的重点形态性状的确定

本研究利用逐步回归的分析方法, 将形态性状逐个引入, 采用  $F$  检验对引入的形态性状进行统计检验, 只有检验达到显著性的形态性状才会被引入到回归方程中, 并最终保留成为影响绿鳍马面鲈体重的重

点性状。基于此方法, 在小规格, 体高、体长、眼径和尾柄长为影响体重的重点性状; 体长、尾柄高、头长、体高、全长和尾柄长被保留为影响中规格绿鳍马面鲈体重的重点性状; 大规格为体高、全长和尾柄高。

在此基础上, 本研究进一步计算了各重点性状对体重的决定系数, 小、中和大规格绿鳍马面鲈形态性状对体重决定系数总和分别为 0.942、0.885 和 0.902。在表型相关分析的基础上进行通径分析和决定程度分析时, 只有当各自变量对依变量的单独决定系数及两两共同决定系数的总和在数值上大于或等于 0.85 即 85% 时才表明所包含的自变量为影响因变量的最主要自变量(刘小林等, 2004)。本研究 3 个不同规格

绿鳍马面鲈重点形态性状对体重的决定系数总和均大于 0.85, 说明影响体重的重点形态性状已经找到, 其他形态性状对于体重的影响较小, 保留的重点形态性状在养殖生产实践中具有重要的参考价值。

### 3.3 需进一步研究的问题

由于缺乏较为可靠的研究数据支持, 本研究在对处于不同生长阶段的绿鳍马面鲈进行划分时选择了小、中和大规格这样的方式, 而非传统的月龄或者年龄, 作为绿鳍马面鲈养殖的理论参考时可能略显模糊。本研究选择的样本为野生绿鳍马面鲈, 野生环境与人工养殖环境在饵料供应、水质和活动空间等方面存在差异, 这些差异可能会对形态性状与体重的相关关系产生一定影响。因而, 在下一步的研究中, 通过养殖实践, 明确绿鳍马面鲈生长月龄和体重的关系, 确定养殖环境下体重与形态性状的相关关系, 对于进一步优化完善本研究的实验结果具有重要意义。另外, 本研究使用样本为黄海群体, 我国沿海还分布着渤海群体以及东海群体, 不同群体绿鳍马面鲈形态性状与体重的相关关系是否存在差异同样有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- Bai LJ, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* Effects of morphometric traits on weight traits of *Atrina pectinata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 87–92 [白临建, 杨爱国, 周丽青, 等. 栉江珧形态性状对重量性状的影响. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 87–92]
- Bian L, Zhong SP, Liu HT, *et al.* Path analysis of the effects of morphometric traits on body weight for 2-month-old *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 2013, 52(3): 427–432 [边力, 钟声平, 刘洪涛, 等. 两月龄日本囊对虾形态性状对体质量的通径分析. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2013, 52(3): 427–432]
- Chen PM, Zhan BY. Age and growth of *Thamnaconus septentrionalis* and rational exploitation. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(1): 35–40 [陈丕茂, 詹秉义. 绿鳍马面鲈年龄生长与合理利用. *中国水产科学*, 2000, 7(1): 35–40]
- Ding MQ. On the stocks of filefish *Navodon septentrionalis* and their distributions in the East China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(1): 45–56 [丁民权. 东海绿鳍马面鲈群体及其分布. *水产学报*, 1994, 18(1): 45–56]
- Gao BQ, Liu P, Li J, *et al.* The relationship between morphometric characters and body weight of *Portunus trituberculatus*. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(1): 44–50 [高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹形态性状对体重影响的分析. *海洋水产研究*, 2008, 29(1): 44–50]
- Geng XY, Ma WL, Li XP, *et al.* Morphometric attributes to body weight for the redlip mullet *Liza haematocheila*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 530–537 [耿绪云, 马维林, 李相普, 等. 梭鱼(*Liza haematocheila*)外部形态性状对体重影响效果分析. *海洋与湖沼*, 2011, 42(4): 530–537]
- Guan J, Chen ZX, Zhang JN, *et al.* Investigation of embryonic development of *Thamnaconus modestus* in artificial breeding condition. *Advances in Marine Science*, 2011, 29(4): 498–505 [关健, 陈志信, 张家男, 等. 人工培育条件下绿鳍马面鲈 *Thamnaconus modestus* 胚胎发育的研究. *海洋科学进展*, 2011, 29(4): 498–505]
- Huang WQ, Yu ZJ. Correlation analysis of morphometric traits on body weight of spotted maigre *Nibea albiflora* at different growth stages. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 557–561 [黄伟卿, 余祚渊. 不同生长时期黄姑鱼形态性状对体质量的影响效果分析. *水产科学*, 2016, 35(5): 557–561]
- Li PL, Jiang MC, Xu JB, *et al.* The cage culture technique of *Thamnaconus septentrionalis*. *China Fisheries*, 2002, 321(8): 61–62 [李平伦, 姜明成, 徐金波, 等. 绿鳍马面鲈海上网箱养殖技术. *中国水产*, 2002, 321(8): 61–62]
- Li Y, Liu P, Li J, *et al.* Correlation and path analysis of morphometric traits on body weight for *Exopalamon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 59–65 [李洋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾形态性状对体重的相关性通径分析. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 59–65]
- Liu XL, Wu CG, Zhang ZH, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight of *Penaeus vannamei*. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 857–862 [刘小林, 吴长功, 张志怀, 等. 凡纳对虾形态性状对体重的影响效果分析. *生态学报*, 2004, 24(4): 857–862]
- Meng XJ, Zhang LM. The biological features and culture potential of *Thamnaconus septentrionalis*. *Shandong Fisheries/Qilu Yuye*, 2009, 26(6): 47–48 [孟宪菊, 张利民. 绿鳍马面鲈的生物学特性及人工养殖前景. *齐鲁渔业*, 2009, 26(6): 47–48]
- Ou YJ, Ji L, Li JE, *et al.* Correlation analysis of major morphometric traits and body weight of selective group at different month ages of *Trachinotus ovatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7): 961–969 [区又君, 吉磊, 李加儿, 等. 卵形鲳鲹不同月龄选育群体主要形态性状与体质量的相关性分析. *水产学报*, 2013, 37(7): 961–969]
- Su JX, Li CS. Osteichthyes-Tetraodontiformes, Pegasiformes, Gobiociformes, Lophiiformes. *Fauna Sinica*. Beijing: Science Press, 2002, 125–132 [苏锦祥, 李春生. *中国动物志: 硬骨鱼纲—鲈形目、海蛾鱼目、喉盘鱼目、鲛鳗目*. 北京: 科学出版社, 2002, 125–132]
- Wang XA, Ma AJ, Zhuang ZM, *et al.* Effects of morphometric attributes on body weight of *takifugu rubripes* (temminck et schlegel). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 135–140 [王新安, 马爱军, 庄志猛, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)形态性状对体重的影响效果. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 135–140]
- Wu B, Yang AG, Liu ZH, *et al.* The relationship between morphometric traits and body weight of *Scapharca broughtonii* in two different populations. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 54–59 [吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(6): 54–59]

- Xue MY. Study on early development and growth of *Navodon septentrionalis*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011 [薛美岩. 绿鳍马面鲈早期发育及生长的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Yan FS, Wang ZG, Liu XD, *et al.* Path analysis of the effects of morphometric traits on body weight for 3-month aged *Paralichthys olivaceus*. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(2): 45–50 [严福升, 王志刚, 刘旭东, 等. 3月龄牙鲆形态性状对体质量的通径分析. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 45–50]
- Zhang JN. Reproductive regulation and fry breeding technology of *Thamnaconus septentrionalis* Günther. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [张家男. 绿鳍马面鲈的生殖调控与苗种繁育技术. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Zhang JL, Wang QH, Deng YW, *et al.* Effects of morphological traits on the weight of *Meretrix lamarchii*. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(6): 110–113 [张嘉丽, 王庆恒, 邓岳文, 等. 斧文蛤(*Meretrix lamarchii*)形态性状对体质量的影响效果分析. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 110–113]

(编辑 冯小花)

## Path Analysis of the Effects of Morphometric Traits on Body Weight of *Thamnaconus septentrionalis* at Different Sizes

BIAN Li<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>2</sup>, ZHANG Qingwen<sup>1</sup>, LIU Kun<sup>1,3</sup>, CHEN Siqing<sup>1①</sup>,  
LI Fenghui<sup>1</sup>, MENG Qian<sup>1</sup>, LIU Changlin<sup>1</sup>, GE Jianlong<sup>1</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. Huangdao Ocean and Fisheries Administration, Qingdao 266400; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** *Thamnaconus septentrionalis* is a common economic marine fish species that can be found in coastal waters of China. The artificial breeding technique has been established for *T. septentrionalis*. In order to optimize artificial culture techniques and to promote industrialization of *T. septentrionalis*, path analysis was conducted to investigate the effects of morphological traits on body weight. According to body weight, the samples were divided into 3 groups (small size, medium size, and large size). Full length (FL), body length (BL), body height (BH), head length (HL), snout length (SL), eye diameter (ED), caudal peduncle length (CL), caudal peduncle height (CH), and body weight (BW) of *T. septentrionalis* were measured. We calculated the correlation coefficients, path coefficients and determination coefficients. The regression equations with morphological traits as variables and body weight as the dependent variable at each size were established. The results showed that the morphological traits affecting body weight at different sizes were different. Body height, body length, eye diameter, and caudal peduncle length were the significant traits affecting body weight at small sizes; for medium *T. septentrionalis*, the morphometric traits that significantly affected body weight were body length, caudal peduncle height, head length, body height, full length, and caudal peduncle length; for large *T. septentrionalis*, the significant traits were body height, full length, and caudal peduncle height. The regression equations for small, medium and large size:  $Y = -84.753 + 17.263X_{BH} + 6.572X_{BL} - 28.928X_{ED} - 11.353X_{CL}$ ;  $Y = -325.824 + 20.321X_{BL} + 94.047X_{CH} - 11.425X_{HL} + 15.713X_{BH} - 7.218X_{FL} + 15.744X_{CL}$ ;  $Y = -516.433 + 38.012X_{BH} + 10.545X_{FL} + 82.752X_{CH}$ . The sums of the coefficients of determination at each size were all greater than 0.85. This indicates the main morphological traits affecting body weight were found. This study can serve as a valuable tool to improve the culture industry of *T. septentrionalis*.

**Key words** *Thamnaconus septentrionalis*; Morphometric traits; Correlation analysis; Path analysis; Regression analysis

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170813001

http://www.yykyjz.cn/

刘峰, 吕小康, 刘阳阳, 楼宝, 陈睿毅, 王立改, 詹炜. 饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉中氨基酸和脂肪酸组成的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 58–65

Liu F, Lü XK, Liu YY, Lou B, Chen RY, Wang LG, Zhan W. Effect of starvation on amino acids and fatty acids of juvenile *Larimichthys crocea*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 58–65

## 饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉中氨基酸和 脂肪酸组成的影响\*



刘 峰<sup>1</sup> 吕小康<sup>1</sup> 刘阳阳<sup>1,2</sup> 楼 宝<sup>1①</sup>  
陈睿毅<sup>1</sup> 王立改<sup>1</sup> 詹 炜<sup>1</sup>

(1. 浙江省海洋水产研究所 浙江省海水增殖重点实验室 浙江海洋大学海洋与渔业研究所 舟山 316021; 2. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 舟山 316022)

**摘要** 为了研究饥饿对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)幼鱼肌肉中氨基酸和脂肪酸含量的影响,取大黄鱼幼鱼 540 尾,体重均值为(40.80±3.40) g,分组进行为期 0 d (S0)、4 d (S4)、8 d (S8)、12 d (S12)、16 d (S16)、20 d (S20)的饥饿处理,测定背部肌肉的氨基酸和脂肪酸含量。结果显示,测定的大黄鱼背肌的 16 种氨基酸中,蛋氨酸含量在不同饥饿处理时间之间差异显著( $P<0.05$ ),饥饿持续 8 d 其含量达到最小(0.48%±0.12%),16 d 时达到最高(1.62%±0.23%);其余 15 种氨基酸含量的差异均不显著( $P>0.05$ ),但均表现出随着饥饿时间延长先上升后下降的趋势,在 16 d 时达到最高,20 d 时明显降低。非必需氨基酸、必需氨基酸、呈味氨基酸、鲜味氨基酸及氨基酸总量的变化趋势与上述 15 种氨基酸一致。在不同饥饿处理组的大黄鱼背肌中脂肪酸含量差异显著( $P<0.05$ )。其中,饱和脂肪酸(SFA)含量随着饥饿时间延长呈先升高后下降的趋势,在 S8 组达到最大,为 30.90%±0.28%;单不饱和脂肪酸(MUFA)含量在不同处理组之间差异不显著( $P>0.05$ ),但所有处理组均稍大于对照组(S0);多不饱和脂肪酸(PUFA)含量则呈先下降后升高的趋势,在 S12 组时达到最低,其值为 31.87%±0.65%。由上可知,通过适当的饥饿处理,可以改变肌肉中氨基酸和脂肪酸含量,从而较好地改善大黄鱼的肉质风味。

**关键词** 大黄鱼; 饥饿; 氨基酸; 脂肪酸; 肉质

**中图分类号** S968.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0058-08

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)分布于我国黄海南部、东海、台湾海峡以及南海北部(Feng *et al*, 1979), 与小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus japonicas*)、墨鱼(*Sepiella maindron*)并称为我国“四大

\* 浙江省重点研发计划项目(2016C02055-7)、浙江省科技计划项目(2016F50043)、舟山市科技计划项目(2016C31054)和浙江海洋大学博士启动基金项目(22135010715)共同资助 [This work was supported by the Special Fund for the Key Research and Development Project of Zhejiang Province(2016C02055-7), the Project of Science and Technology Research of Zhejiang Province (2016F50043), the Project of Science and Technology Research of Zhoushan City (2016C31054), and the Startup Foundation for Doctors of Zhejiang Ocean University (22135010715)]. 刘 峰, E-mail: lengfeng0210@126.com

① 通讯作者: 楼 宝, 研究员, E-mail: loubao6577@163.com

收稿日期: 2017-08-13, 收修改稿日期: 2017-09-04

海产”(刘峰等, 2016a), 其肉质细嫩, 味道鲜美, 富含蛋白质, 广受消费者喜爱。20 世纪 90 年代后期, 大黄鱼养殖在福建和浙江等省推广后, 迅速成为主要经济鱼类(Ao *et al*, 2015)。但是, 随着大黄鱼养殖业的迅速发展, 经过连续多代盲目的人工繁育和高密度不科学饲养, 现今大黄鱼品质明显下降, 表现为肉质松软、口感差, 脂肪含量过高(颜孙安等, 2015), 以及肌肉的鲜味、口感、嫩度及可接受性等方面低于野生大黄鱼(缪伏荣等, 2007), 导致其市场价格和销量急剧下降, 严重影响了大黄鱼养殖业的健康持续发展。因此, 采取有效措施实现养殖大黄鱼的品质改良, 成为大黄鱼养殖业持续发展的关键问题之一(林利民等, 2006)。为此, 相关学者分别从养殖模式的改变、饲料营养调控、功能性饲料添加剂添加、良种选育等方面探索大黄鱼品质改良的有效方法, 取得了一定的成果(郑斌等, 2003; 李祥云等, 2009; 曹娟娟等, 2015; 沈伟良等, 2017)。此外, 在养殖过程中, 改变投喂策略也是一种改善调控肉质的有力手段, 在生产实践中得到积极而广泛的应用(Andersen *et al*, 2005)。研究指出, 上市前对养殖鱼进行禁食处理, 可获得更新鲜度的鱼产品(Ginés *et al*, 2002), 但仅通过对达到上市规格的成鱼进行短期禁食, 品质改良效果较小, 而如果进行长时间的禁食, 可能导致鱼类由于饥饿出现严重的自残和死亡, 影响经济收益, 因此, 如果在幼鱼养殖过程中, 进行肉质改善, 再配合上市前的短期禁食, 将很大程度上避免出现上述情况, 从而获得更大的经济收益。对于大黄鱼而言, 禁食对其成鱼体成分、肌肉脂肪酸组成和血清生化指标均有较大影响(张振宇等, 2016), 关于养殖过程中幼鱼肌肉营养成分受到饥饿的影响研究尚未见报道。为此, 本次研究以大黄鱼幼鱼为研究对象, 分析饥饿条件下背肌中氨基酸和脂肪酸含量的变化, 旨在阐明饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉品质的影响, 为大黄鱼的肉质改良, 最终获得品质优良的商品规格大黄鱼积累基础性资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验于 2016 年 10 月中旬在浙江省海洋水产研究所西轩渔业科技岛进行, 实验鱼取自实验基地人工繁殖的大黄鱼群体, 选取规格相近、体表无伤、体格健壮的大黄鱼共计 540 尾, 体重为(40.80±3.40) g, 随机平均分为 6 组, 每组设 3 个平行, 每个平行 30 尾, 暂养于 0.5 m<sup>3</sup> 的底部圆锥形的圆筒形玻璃钢桶中, 养殖用水为经黑暗沉淀和砂滤后的自然海水, 盐度为

26.0~28.0, 水温为 26.0~27.0℃, 自然光照, 流水培育(流速大约为 60 L/h), 从实验桶底部充气, 保持水体含氧量在 5.5 mg/ml 以上, 每天 07:00、16:00 两次饲喂配合饲料(鱼宝 5#, 颗粒直径 5 mm), 进行饱食投喂, 投喂后 30 min 左右清除桶底残饵和粪便。

### 1.2 实验方法

6 个处理组依次编为 S0、S4、S8、S12、S16 和 S20, 其中, S0 组正常投喂, 为对照组; S4、S8、S12、S16 和 S20 组分别进行为期 4、8、12、16 和 20 d 的饥饿处理。分别在各实验组饥饿处理结束时对其进行取样, 每组随机取 9 尾, 每个平行 3 尾, 首先进行体重测量, 然后进行取样。取样方法参照刘峰等(2016b), 用纯水冲洗鱼体后, 置于冰盘上冰冻处死, 迅速剪取背部肌肉, 盛放于 5 ml 离心管中, -80℃超低温保存, 用于氨基酸和脂肪酸的测定。氨基酸的测定采用酶水解法测定(Biochrom 30 氨基酸自动分析仪), 按照 GB/T 5009.124-2003 执行, 其中, 色氨酸在水解过程中被破坏, 因此, 未进行色氨酸含量的分析。脂肪酸的测定采用气相色谱分析法(Agilent 6890 气相色谱仪), 按照 GB/T 22223-2008 执行。

### 1.3 数据处理和统计分析

采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行单因子方差分析(One-way ANOVA), 多重比较用 Duncan's 进行差异显著性检验, 并用标记字母法表示结果,  $P < 0.05$  为差异显著, 结果用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 实验鱼体重分析

对各组实验鱼初始和终末体重进行描述性统计, 并进行组间差异显著性检验。结果显示, 不同实验组之间实验鱼的初始体重差异不显著( $P > 0.05$ ), 据此可以排除初始体重差异对实验结果的影响(表 1)。实验终末实验鱼体重在不同实验组中差异显著, 随着饥饿时间延长体重逐渐下降。

### 2.2 氨基酸组成和含量的分析

各组幼鱼背肌中的氨基酸组分及含量的分析结果见表 2。共检测获得了 16 种氨基酸, 其中, 各处理组间的大黄鱼幼鱼背肌中的蛋氨酸含量差异显著( $P < 0.05$ ), 随着饥饿时间的延长, 其含量呈现出下降-上升-下降的变化趋势, 在饥饿 8 d 时达到最小值(0.48%±0.12%), 显著低于其他各组, 16 d 时达到最大值(1.62%±0.23%), 显著高于对照组, 继续饥饿,

表 1 实验鱼体重统计分析  
Tab.1 Statistical analysis for body weight of the testing fish

组别 Group	数量 Number	初始 Initial (Mean±SE)	终末 Final (Mean±SE)
S0	90	42.80±0.71 <sup>a</sup>	46.96±1.11 <sup>a</sup>
S4	90	39.92±2.45 <sup>a</sup>	35.48±0.43 <sup>b</sup>
S8	90	36.96±3.35 <sup>a</sup>	34.66±1.16 <sup>b</sup>
S12	90	41.83±0.75 <sup>a</sup>	32.34±1.44 <sup>bc</sup>
S16	90	40.97±1.35 <sup>a</sup>	30.14±0.93 <sup>cd</sup>
S20	90	42.33±1.13 <sup>a</sup>	28.13±1.26 <sup>d</sup>

注：同行数据上标字母不同表示差异显著，下同

Note: The values with different small letter superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ). The same as below

表 2 饥饿对大黄鱼幼鱼氨基酸含量的影响  
Tab.2 The effect of starvation on amino acid composition of juvenile *L. crocea*

组分 Composition	氨基酸含量 Contents of amino acids (dry weight) (%)					
	S0	S4	S8	S12	S16	S20
天冬氨酸 Asp <sup>#△</sup>	6.72±0.14	6.60±0.34	6.93±0.35	7.14±0.31	7.16±0.21	6.52±0.20
丝氨酸 Ser	2.78±0.06	2.75±0.14	2.86±0.15	2.93±0.14	2.97±0.09	2.68±0.09
谷氨酸 Glu <sup>#△</sup>	10.58±0.24	10.36±0.56	10.92±0.54	11.21±0.55	11.34±0.38	10.37±0.33
甘氨酸 Gly <sup>#</sup>	3.02±0.10	2.99±0.14	3.12±0.17	3.12±0.19	3.17±0.10	3.13±0.17
丙氨酸 Ala <sup>#</sup>	3.99±0.09	3.95±0.22	4.12±0.21	4.24±0.21	4.25±0.13	3.93±0.13
酪氨酸 Tyr	2.36±0.05	2.33±0.14	2.43±0.11	2.52±0.13	2.52±0.09	2.29±0.07
脯氨酸 Pro	2.20±0.07	2.09±0.10	2.15±0.08	2.24±0.15	2.43±0.01	2.30±0.10
苏氨酸 Thr <sup>*</sup>	2.98±0.06	2.92±0.15	3.06±0.16	3.17±0.16	3.17±0.09	2.91±0.10
缬氨酸 Val <sup>*</sup>	3.26±0.07	3.22±0.17	3.38±0.16	3.45±0.15	3.43±0.11	3.16±0.09
蛋氨酸 Met <sup>*</sup>	0.94±0.17 <sup>b</sup>	0.91±0.20 <sup>b</sup>	0.48±0.12 <sup>a</sup>	1.04±0.22 <sup>bc</sup>	1.62±0.23 <sup>c</sup>	1.28±0.20 <sup>bc</sup>
异亮氨酸 Ile <sup>*</sup>	3.00±0.09	3.03±0.18	3.19±0.16	3.14±0.14	3.12±0.10	2.88±0.07
亮氨酸 Leu <sup>*</sup>	5.44±0.13	5.39±0.29	5.65±0.28	5.71±0.23	5.78±0.17	5.29±0.15
苯丙氨酸 Phe <sup>*</sup>	2.80±0.06	2.81±0.16	2.89±0.14	2.99±0.14	2.98±0.10	2.71±0.08
组氨酸 His	1.39±0.03	1.38±0.07	1.43±0.06	1.51±0.05	1.50±0.07	1.39±0.05
赖氨酸 Lys <sup>*</sup>	6.36±0.13	6.22±0.33	6.60±0.29	6.75±0.31	6.62±0.17	6.09±0.15
精氨酸 Arg	4.09±0.10	4.03±0.22	4.25±0.21	4.34±0.24	4.35±0.14	4.03±0.14
非必需氨基酸 NEAA	31.63±0.71	31.07±1.59	32.53±1.59	33.41±1.68	33.83±1.01	31.22±1.02
必需氨基酸 EAA	30.27±0.69	29.91±1.46	30.93±1.60	32.11±1.21	32.57±1.19	29.74±0.98
呈味氨基酸 FAA	28.38±0.63	27.94±1.46	29.34±1.48	30.05±1.49	30.27±0.96	27.98±0.91
鲜味氨基酸 DAA	17.29±0.38	16.97±0.90	17.85±0.89	18.36±0.86	18.50±0.59	16.89±0.53
氨基酸总量 TAA	61.90±1.39	60.98±3.05	63.46±3.19	65.52±2.89	66.40±2.20	60.96±1.97

\*: 必需氨基酸; #: 呈味氨基酸; △: 鲜味氨基酸

\*: Essential amino acid; #: Delicious amino acid; △: Flavor amino acid

其含量有较大幅度的降低。其余 15 种氨基酸含量在不同实验组中差异不显著( $P>0.05$ )，饥饿 4 d 时，大多数氨基酸含量出现轻微下降，从饥饿 4 d 时开始，随着饥饿时间的延长均表现为先上升后下降的趋势。分析非必需氨基酸、必需氨基酸、呈味氨基酸、鲜味氨基酸及氨基酸总量发现，在不同实验组中各含量的变化趋势与前述 15 种氨基酸一致，均在饥饿 16 d 时达到最大，依次为 33.83%±1.01%、32.57%±1.19%、30.27%±0.96%、18.50%±0.59%和 66.40%±2.20%，在

饥饿 20 d 的实验组中，其含量均有较大幅度降低。饥饿 8~16 d，鲜味氨基酸、呈味氨基酸及氨基酸总量均稍大于对照组，饥饿 20 d 时，三者均小于对照组。说明适当的饥饿胁迫可以增加鲜味氨基酸和呈味氨基酸含量(表 2)。

### 2.3 饥饿对脂肪酸组成及含量的影响

不同饥饿强度处理的各实验组共检测到脂肪酸 21 种，起始碳链长度在 14~24 碳之间，包括 7 种饱

和脂肪酸(SFA), 占脂肪酸总量的 28.50%~30.90%, 其中, C16:0 含量最高(19.48%~21.80%); 6 种单不饱和脂肪酸(MUFA), 占脂肪酸总量的 36.02%~37.60%, 其中, C18:1n-9c 含量最高(26.95%~28.70%); 8 种多不饱和脂肪酸(PUFA), 均在 18 碳以上, 占脂肪酸总量的 31.87%~34.28%, C18:2n-6c 含量最高(18.22%~20.04%)。不同实验组脂肪酸含量比较分析结果列于表 3。结果显示, 不同饥饿处理组之间脂肪酸含量差异显著( $P<0.05$ ), 表明饥饿对大黄鱼幼鱼肌肉中脂肪酸含量有显著影响。

SFA 含量在不同处理组之间差异显著( $P<0.05$ ), 呈先升高后下降的变化趋势, 在 S8 组达到最大

(30.90%±0.28%)。SFA 中的 7 种脂肪酸组分含量在不同实验组中均存在显著差异( $P<0.05$ )。MUFA 含量在不同处理组之间差异不显著( $P>0.05$ ), 但其变化趋势与 SFA 相同, 呈先上升后下降的趋势, 在 S16 组时达到最大(37.60%±0.47%)。另外, 所有饥饿处理组 MUFA 含量均大于 S0 组, 说明饥饿处理使大黄鱼幼鱼肌肉中 MUFA 含量有一定程度的升高。PUFA 含量在处理组之间同样表现出显著差异( $P<0.05$ ), 呈先下降后升高的趋势, 在 S12 组时达到最低(31.87±0.65%), S20 时最高(34.18±0.59%)。8 种 PUFA 种包括了 3 种必需脂肪酸[亚油酸(C18:2n-6c)、亚麻酸(C18:3n-3)和花生四烯酸(C20:4n-6)], 其含量在不同实验组中均表

表 3 饥饿对大黄鱼幼鱼脂肪酸含量的影响  
Tab.3 The effect of starvation on fatty acid composition of juvenile *L. crocea*

组分 Composition	脂肪酸含量 Contents of fatty acids (dry weight) (%)					
	S0	S4	S8	S12	S16	S20
C14:0	2.02±0.08 <sup>b</sup>	1.89±0.03 <sup>ab</sup>	2.36±0.04 <sup>c</sup>	1.64±0.09 <sup>a</sup>	1.62±0.10 <sup>a</sup>	1.98±0.01 <sup>b</sup>
C15:0	0.23±0.02 <sup>b</sup>	0.23±0.01 <sup>b</sup>	—	0.16±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>ab</sup>	0.24±0.01 <sup>b</sup>
C16:0	20.68±0.22 <sup>bc</sup>	21.05±0.01 <sup>c</sup>	21.80±0.50 <sup>c</sup>	21.54±0.80 <sup>c</sup>	19.68±0.12 <sup>ab</sup>	19.48±0.02 <sup>a</sup>
C17:0	0.59±0.09 <sup>ab</sup>	0.68±0.01 <sup>ab</sup>	0.47±0.16 <sup>ab</sup>	0.63±0.01 <sup>ab</sup>	0.38±0.11 <sup>a</sup>	0.77±0.03 <sup>b</sup>
C18:0	5.84±0.16 <sup>a</sup>	5.98±0.17 <sup>ab</sup>	5.63±0.04 <sup>a</sup>	6.46±0.01 <sup>b</sup>	6.01±0.14 <sup>ab</sup>	5.77±0.14 <sup>a</sup>
C20:0	0.42±0.01 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.41±0.03 <sup>a</sup>	0.39±0.02 <sup>a</sup>	0.40±0.02 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>b</sup>
C22:0	0.23±0.01 <sup>ab</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.24±0.02 <sup>ab</sup>	0.24±0.01 <sup>ab</sup>	0.23±0.01 <sup>ab</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>
C16:1	5.39±0.08 <sup>ab</sup>	5.61±0.05 <sup>b</sup>	5.28±0.26 <sup>ab</sup>	5.13±0.15 <sup>a</sup>	5.43±0.11 <sup>ab</sup>	5.08±0.09 <sup>a</sup>
C17:1	0.30±0.04 <sup>b</sup>	0.29±0.03 <sup>b</sup>	0.19±0.01 <sup>ab</sup>	0.26±0.01 <sup>ab</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.04 <sup>ab</sup>
C18:1n-9c	27.08±0.46	27.41±0.41	27.07±0.20	28.52±0.06	28.70±0.53	26.95±0.53
C20:1n-9	0.46±0.04	0.47±0.01	0.46±0.03	0.48±0.02	0.50±0.02	0.39±0.09
C22:1n-9	2.76±0.14 <sup>a</sup>	2.72±0.11 <sup>a</sup>	2.97±0.28 <sup>ab</sup>	2.56±0.12 <sup>a</sup>	2.55±0.13 <sup>a</sup>	3.40±0.10 <sup>b</sup>
C24:1n-9	0.37±0.01 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.38±0.04 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>	0.45±0.02 <sup>b</sup>
C18:2n-6c*	18.68±0.49 <sup>ab</sup>	18.22±0.32 <sup>a</sup>	20.03±0.43 <sup>ab</sup>	19.40±0.08 <sup>ab</sup>	20.04±0.27 <sup>b</sup>	18.90±0.04 <sup>ab</sup>
C20:2	0.34±0.01	0.32±0.02	0.33±0.01	0.35±0.01	0.34±0.01	0.34±0.01
C22:2	0.37±0.02 <sup>ab</sup>	0.31±0.02 <sup>b</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>ab</sup>	0.34±0.01 <sup>ab</sup>	0.34±0.02 <sup>ab</sup>
C18:3n-3*	4.33±0.08 <sup>ab</sup>	4.16±0.10 <sup>a</sup>	4.57±0.12 <sup>bc</sup>	4.23±0.05 <sup>ab</sup>	4.21±0.11 <sup>ab</sup>	4.70±0.16 <sup>c</sup>
C20:4n-6*	0.71±0.02 <sup>cd</sup>	0.67±0.01 <sup>bc</sup>	0.59±0.06 <sup>ab</sup>	0.56±0.06 <sup>a</sup>	0.69±0.03 <sup>bcd</sup>	0.80±0.03 <sup>d</sup>
C20:5n-3/EPA	2.83±0.13 <sup>c</sup>	2.78±0.01 <sup>c</sup>	2.17±0.05 <sup>ab</sup>	2.10±0.14 <sup>a</sup>	2.58±0.05 <sup>bc</sup>	2.90±0.11 <sup>c</sup>
C22:5n-3/DPA	0.85±0.05 <sup>ab</sup>	0.83±0.03 <sup>ab</sup>	0.69±0.01 <sup>a</sup>	0.72±0.04 <sup>ab</sup>	0.71±0.03 <sup>ab</sup>	0.87±0.05 <sup>b</sup>
C22:6n-3/DHA	5.19±0.27 <sup>b</sup>	5.17±0.04 <sup>b</sup>	4.16±0.10 <sup>a</sup>	4.19±0.25 <sup>a</sup>	4.71±0.18 <sup>ab</sup>	5.34±0.26 <sup>b</sup>
EPA/DHA	0.55±0.01 <sup>bc</sup>	0.54±0.01 <sup>bc</sup>	0.52±0.01 <sup>ab</sup>	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.55±0.01 <sup>c</sup>	0.54±0.01 <sup>bc</sup>
EPA+DHA	8.02±0.40 <sup>b</sup>	7.95±0.01 <sup>b</sup>	6.33±0.15 <sup>a</sup>	6.29±0.40 <sup>a</sup>	7.29±0.22 <sup>ab</sup>	8.23±0.37 <sup>b</sup>
SFA	30.01±0.27 <sup>bc</sup>	30.46±0.11 <sup>c</sup>	30.90±0.28 <sup>c</sup>	30.86±0.74 <sup>c</sup>	28.50±0.23 <sup>a</sup>	29.00±0.06 <sup>ab</sup>
MUFA	36.02±0.58	36.90±0.36	36.25±0.17	37.16±0.02	37.60±0.47	36.46±0.55
PUFA	33.30±0.42 <sup>ab</sup>	32.35±0.47 <sup>ab</sup>	32.85±0.45 <sup>ab</sup>	31.87±0.65 <sup>a</sup>	33.63±0.67 <sup>ab</sup>	34.18±0.59 <sup>b</sup>
∑n-3PUFA	13.20±0.48 <sup>bc</sup>	12.94±0.13 <sup>abc</sup>	11.59±0.03 <sup>ab</sup>	11.24±0.49 <sup>a</sup>	12.21±0.36 <sup>abc</sup>	13.80±0.57 <sup>c</sup>
∑n-6PUFA	19.39±0.47 <sup>ab</sup>	18.70±0.31 <sup>a</sup>	20.62±0.49 <sup>b</sup>	19.95±0.14 <sup>ab</sup>	20.73±0.30 <sup>b</sup>	19.70±0.02 <sup>ab</sup>
∑n-3/∑n-6PUFA	0.69±0.04 <sup>ab</sup>	0.69±0.01 <sup>ab</sup>	0.56±0.02 <sup>a</sup>	0.56±0.02 <sup>a</sup>	0.59±0.01 <sup>ab</sup>	0.70±0.03 <sup>b</sup>

\*: 必需脂肪酸 Essential fatty acids



现为显著差异( $P < 0.05$ ), 其中, 亚油酸(C18:2n-6c)和亚麻酸(C18:3n-3)随着饥饿时间的延长呈波动式变化, 而花生四烯酸(C20:4n-6)含量随着饥饿时间的延长呈先下降后上升的变化趋势。此外, DPA、DHA、EPA、EPA/DHA、EPA+DHA 以及 $\sum n-3$ PUFA 在不同处理组中, 呈先下降后上升的变化趋势, 其中, DPA 和 DHA 在饥饿 8 d 时达到最低值; EPA、EPA/DHA、EPA+DHA 及 $\sum n-3$ PUFA 在饥饿 12 d 时才达到最低。 $\sum n-6$ PUFA 在各实验组中呈锯齿状波动;  $\sum n-3$ PUFA/ $\sum n-6$ PUFA 在不同实验组间同样存在显著差异。

分析发现, 在饥饿过程中, PUFA 含量首先降低, 说明机体首先分解利用 PUFA, 导致 SFA 和 MUFA 含量相对有所增加, 在饥饿 16 d 时, 由于 PUFA 的大量消耗, SFA 开始被分解利用, 其含量显著下降, MUFA 含量在整个饥饿过程中变化不大, 直至饥饿 20 d 时才有较大下降。由此, 可以判定 3 种脂肪酸利用的先后顺序为 PUFA、SFA 和 MUFA。

### 3 讨论

#### 3.1 氨基酸组成及营养评价

鱼类受到饥饿胁迫时, 开始消耗蓄积于体内的三大营养物质(蛋白质、脂肪和糖类), 进行内源性营养代谢以维持生命活动(Sheridan *et al.*, 1991; Gillis *et al.*, 1996), 因此, 鱼类在经历一定时间的饥饿后, 肌肉中三大营养物质的含量会发生一定的变化。蛋白质中的氨基酸在代谢过程中起到重要作用, 可以转化成葡萄糖作为能量来源。本研究中, 大黄鱼幼鱼在经过不同强度的饥饿处理后, 背部肌肉中各氨基酸组分含量均发生了一定的变化, 在饥饿早期呈逐渐上升的趋势, 饥饿 16 d 时达到最大, 继续饥饿到 20 d 时, 则迅速下降, 可能原因如谭肖英等(2009)所述, 即在饥饿胁迫的早期, 氨基酸作为功能性物质保留下来, 导致其含量有所升高, 但由于高强度的饥饿胁迫, 保留下来的氨基酸最终也要被分解利用, 以保证机体的正常生存, 所以最终氨基酸含量有较大幅度降低。此外, 本研究中, 绝大多数氨基酸组分及氨基酸总量在饥饿早期稍微低于对照组, 随着饥饿时间的延长, 呈现先上升后下降的趋势, 此结果与遮目鱼(*Chanos chanos*) (Shiau *et al.*, 2001)的研究结果存在较大差异, 可能与饥饿处理方式的差异有关。

已有报道指出, 氨基酸的含量对鱼肉品质具有重要影响(Li *et al.*, 2009), 鱼类蛋白质的鲜美程度主要取决于呈鲜味的谷氨酸和天冬氨酸以及呈甘味的甘氨

酸和丙氨酸的组成与含量(区又君等, 2010; 曹栋正等, 2016)。本研究发现, 大黄鱼幼鱼饥饿 8~16 d 时, 其呈味氨基酸和鲜味氨基酸含量均逐渐增加并且大于对照组, 在饥饿 16 d 时达到最大值, 饥饿 20 d 时各氨基酸含量则迅速下降, 由此可知, 适当的饥饿处理有益于提高大黄鱼肌肉品质。

#### 3.2 脂肪酸组成及营养评价

脂肪酸在动物代谢活动中起着十分重要的作用, 其中, 多不饱和脂肪酸(PUFA)是维持细胞膜结构和机能完整性的重要成分(彭士明等, 2010), 对于多种疾病具有较好的免疫调节作用(杭晓敏等, 2001)。此外, 脂肪酸经过一系列化学反应会产生肉类特有的香味, 是肌肉中产生香味的重要基础, 所以脂肪酸含量与肌肉品质密切相关。因此, 研究改变大黄鱼肌肉脂肪酸组成种类和含量, 对于提高大黄鱼品质至关重要。

饥饿对于鱼类脂肪酸的影响研究已经有较多报道, 如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)在饥饿胁迫过程中, 肌肉中 SFA、MUFA 和 $\sum n-6$ PUFA 的含量显著下降, 而 $\sum n-3$ PUFA 显著增加(谭肖英等, 2009); 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和锦鲤(*Cyprinus carpio*)随着饥饿时间的延长, 体内 SFA 和 MUFA 含量下降, PUFA 含量上升(Murata *et al.*, 1980; Kiessling *et al.*, 1989); 非洲鲶(*Clarias gariepinus*)中则是 SFA 含量下降, MUFA 和 PUFA 含量上升(Zamal *et al.*, 1995)。由此得知, 不同鱼种在饥饿胁迫条件下, 脂肪酸利用的先后顺序存在明显差异。本研究分析了不同饥饿强度对大黄鱼幼鱼肌肉中脂肪酸含量的影响, 共检测到 7 种 SFA, 其中主要是 C16:0 和 C18:0, 与徐继林等(2008)的结果一致; 不同饥饿强度组, 肌肉中 SFA 和 PUFA 含量变化显著, 随着饥饿时间的延长, SFA 含量呈先上升后下降的趋势, 此结果与大鳍鱈(*Mystus macropterus*)的研究结果正好相反(马珊等, 2010), 说明不同品种之间 SFA 利用先后顺序具有明显差异。PUFA 含量在饥饿早期呈下降趋势, 在饥饿 12 d 之后开始逐渐上升。SFA 含量在饥饿早期呈现轻微的上升趋势, 在饥饿 8 d 后开始逐渐下降, 由此可知, 大黄鱼幼鱼在饥饿早期首先消耗 PUFA, 饥饿一定时间之后才开始分解 SFA。张振宇等(2016)指出, 大黄鱼成鱼在禁食期间, 肌肉中 SFA 和 MUFA 变化不明显, PUFA 和 $\sum n-3$ HUFA 呈现下降趋势。说明不同生长时期的大黄鱼脂肪酸变化情况存在一定差异。此外, 本研究结果与太平洋鲑(*Oncorhynchus spp.*) (陈斌等, 2012)以及点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*) (陈波等, 2008)等鱼类的研究结果也存在较大差异, 出现这种差异可

能与鱼种、规格或禁食条件不同有关,具体原因需要进一步研究探讨。本研究中,  $\Sigma n-6$ PUFA 随着饥饿强度的增加呈现锯齿状变化,说明在饥饿时对体内  $\Sigma n-6$ PUFA 的利用可能存在周期性的变化,这与真鲷 (*Pagrosomus major*) (张波等, 2000) 的研究结果相似,出现这一现象的可能原因是,鱼类在饥饿状态下,通过动态调节自身代谢水平,减少能量消耗,同时保持一定的应激能力(陈斌等, 2012)。

PUFA 中的亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸被称为必需脂肪酸(EFA)。花生四烯酸能够促进生物体内脂肪代谢,对心脑血管疾病的预防有重要作用(迟淑艳等, 2007)。本研究发现,所有饥饿处理组 EFA 含量均大于对照组,可能原因是饥饿过程中其他组分被分解消耗,导致 EFA 含量相对增加。其中,亚油酸和亚麻酸含量在饥饿过程中变化显著,亚油酸在饥饿 16 d 时含量最高;亚麻酸含量在饥饿 20 d 时最高。花生四烯酸含量随着饥饿时间的延长,呈先下降后上升的变化趋势,在饥饿 12 d 时达到最低。由此可知,适当的饥饿处理可以增加 EFA 的相对含量,使大黄鱼具有更高的营养价值。

#### 4 结论

在不同饥饿处理条件下,大黄鱼幼鱼肌肉中各氨基酸、脂肪酸组分含量均出现了一定的变化,其中,蛋氨酸含量呈现出下降-上升-下降的变化趋势,在饥饿 8 d 时达到最小值,16 d 时达到最大值,继续饥饿,其含量有较大幅度的降低。鲜味氨基酸和呈味氨基酸在饥饿 8~16 d 时,其含量均稍大于对照组,饥饿 20 d 时,二者均小于对照组。PUFA 含量呈先下降后升高的趋势,在饥饿 12 d 时达到最低,饥饿 20 d 时最高。SFA 和 MUFA 含量表现为先上升后下降的变化趋势,前者在饥饿 8 d 时最高,后者在饥饿 16 d 时最高。上述结果表明,饥饿处理对氨基酸和脂肪酸具有一定的影响。通过本研究可以得知,通过适当的饥饿处理,可以改变背肌中氨基酸和脂肪酸的相对含量,从而一定程度上影响肉质风味。研究结果为大黄鱼肉质改良研究提供了基础性资料,进而推动大黄鱼的健康养殖。本次研究不足之处在于,饥饿处理后的恢复投喂对大黄鱼幼鱼肉质以及营养成分的影响未进行研究,下一步将开展后续研究。

#### 参 考 文 献

Andersen HJ, Oksbjerg N, Young JF, *et al.* Feeding and meat quality - a future approach. *Meat Science*, 2005, 70(3):

- 543-554
- Ao J, Mu Y, Xiang LX, *et al.* Genome sequencing of the Perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005118
- Cao DZ, Zhang XZ, Chen SQ, *et al.* Analysis and evaluation of nutritive composition in muscles of *Platichthys stellatus*, *Kareius bicoloratus* and their reciprocal hybrids. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 34-41 [曹栋正, 张小忠, 陈四清, 等. 星突江鲮(*Platichthys stellatus*)、石鲮(*Kareius bicoloratus*)及其正反杂交种肌肉的营养成分分析及评价. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 34-41]
- Cao JJ, Zhang WB, Xu W, *et al.* Dietary selenium requirement of juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 241-249 [曹娟娟, 张文兵, 徐玮, 等. 大黄鱼幼鱼对饲料硒的需求量. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 241-249]
- Chen B, Feng J, Wu B, *et al.* The effects of starvation on fat and fatty acids composition in Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1247-1253 [陈斌, 冯健, 吴彬, 等. 饥饿对太平洋鲑 (*Oncorhynchus* spp.) 鱼体脂肪与脂肪酸的影响. *海洋与湖沼*, 2012, 43(6): 1247-1253]
- Chen B, Liu MH, Shi ZH, *et al.* The effects of starvation and re-feeding on fatty acid and amino acid composition in juvenile of *Epinephelus malabaricus* Bloch & Schneider. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2008, 17(6): 674-679 [陈波, 柳敏海, 施兆鸿, 等. 饥饿和再投喂对点带石斑鱼幼鱼脂肪酸和氨基酸组成的影响. *上海海洋大学学报*, 2008, 17(6): 674-679]
- Chi SY, Zhou QC, Zhou JB, *et al.* Comparative nutrition components in five cultured molluscs in coastal south China. *Fisheries Science*, 2007, 26(2): 79-83 [迟淑艳, 周歧存, 周健斌, 等. 华南沿海 5 种养殖贝类营养成分的比较分析. *水产科学*, 2007, 26(2): 79-83]
- Feng Z, Cao Q. *Ichthyology*. Beijing: Agricultural Press House, 1979, 217
- Gillis TE, Ballantyne JS. The effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in lake sturgeon. *Journal of Fish Biology*, 1996, 49(6): 1306-1316
- Ginés R, Palicio M, Zamorano MJ, *et al.* Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture International*, 2002, 10(5): 379-389
- Hang XM, Tang YL, Liu XL. Progress in the research on polyunsaturated fatty acids. *China Biotechnology*, 2001, 21(4): 18-21 [杭晓敏, 唐涌濂, 柳向龙. 多不饱和脂肪酸的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2001, 21(4): 18-21]
- Kiessling A, Johansson L, Storebakken T. Effects of reduced feed ration levels on fat content and fatty acid composition in

- white and red muscle from rainbow trout. *Aquaculture*, 1989, 79(1-4): 169-175
- Li MY, Zheng YF, Guan DD, *et al.* The nutrition of fatty acid and amino acid analysis of four genealogies *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(4): 632-638 [李多云, 郑岳夫, 管丹东, 等. 大黄鱼四家系肌肉营养成分差异及品质选育分析. *水产学报*, 2009, 33(4): 632-638]
- Li P, Mai K, Trushenski J, *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43-53
- Lin LM, Wang QR, Wang ZY, *et al.* Comparison of biochemical compositions of muscle among three stocks and wild-caught large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 286-291 [林利民, 王秋荣, 王志勇, 等. 不同家系大黄鱼肌肉营养成分的比较. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 286-291]
- Liu F, Chen L, Lou B, *et al.* Correlation and path coefficient analysis on body weight and morphometric traits of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016a, 47(3): 655-662 [刘峰, 陈琳, 楼宝, 等. 小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)形态性状与体质量的相关性及通径分析. *海洋与湖沼*, 2016a, 47(3): 655-662]
- Liu F, Liu YY, Lou B, *et al.* Effect of water temperature on antioxidant and digestive enzymes activities in *Larimichthys polyactis*. *Haiyang Xuebao*, 2016b, 38(12): 76-85 [刘峰, 刘阳阳, 楼宝, 等. 温度对小黄鱼体内抗氧化酶及消化酶活性的影响. *海洋学报*, 2016b, 38(12): 76-85]
- Ma S, Jiang HB, Yao JJ. Biochemical composition, amino acid and fatty acid composition of *Mystus macropterus* under short-term starvation. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(2): 61-65 [马珊, 姜海波, 姚俊杰. 短期饥饿对大鳍鱯生化组成、氨基酸和脂肪酸组成的影响. *水生态学杂志*, 2010, 3(2): 61-65]
- Miao FR, Liu J, Wang DH, *et al.* Meat quality of *Pseudosciaena crocea* cultivated by different methods. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 22(4): 372-377 [缪伏荣, 刘景, 王淡华, 等. 不同养殖模式大黄鱼肉质性状的分析研究. *福建农业学报*, 2007, 22(4): 372-377]
- Murata H, Higashi T. Selective utilization of fatty acid as energy source in carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1980, 46(11): 1333-1338
- Peng SM, Shi ZH, Hou JL. Study on the lipid nutrition and artificial diet of marine fish. *Marine Fisheries*, 2010, 32(2): 218-224 [彭士明, 施兆鸿, 侯俊利. 海水鱼脂类营养与饲料的研究进展. *海洋渔业*, 2010, 32(2): 218-224]
- Ou YJ, Li J. Analysis and evaluation of the nutrient contents in the muscle of high finned grouper *Cromileptes altivelis*. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2010, 29(4): 503-509 [区又君, 李加儿. 驼背鲈肌肉营养成分的分析与评价. *台湾海峡*, 2010, 29(4): 503-509]
- Sheridan MA, Mommsen TP. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 81(3): 473-483
- Shen WL, Wu XF, Shentu JK, *et al.* The effects of different diets and culture environments on the morphological variations in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 70-77 [沈伟良, 吴雄飞, 申屠基康, 等. 不同饵料及养殖环境对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)形态差异的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 70-77]
- Shiau CY, Pong YP, Chiou TK, *et al.* Effect of starvation on free histidine and amino acids in white muscle of milkfish *Chanos chanos*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, 128(3): 501-506
- Tan XY, Luo Z, Wang WM, *et al.* Effects of starvation on body weight and body composition of small-sized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(1): 39-45 [谭肖英, 罗智, 王为民, 等. 饥饿对小规格斑点叉尾鲷体重及鱼体生化组成的影响. *水生生物学报*, 2009, 33(1): 39-45]
- Xu JL, Yan XJ, Luo YP, *et al.* Comparison of lipids and fatty acids composition in muscle between wild and farmed *Pseudosciaena Crocea* from Tai-chu Race. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2008, 8(1): 108-114 [徐继林, 严小军, 罗瑜萍, 等. 岱衢族野生大黄鱼与养殖大黄鱼肌肉脂类和脂肪酸组成的比较研究. *中国食品学报*, 2008, 8(1): 108-114]
- Yan SA, Yao QH, Lin XX, *et al.* Nutrient profile of large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea* Richardson) grown under different aquacultural settings. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(8): 736-744 [颜孙安, 姚清华, 林香信, 等. 不同养殖模式大黄鱼肌肉营养成分比较. *福建农业学报*, 2015, 30(8): 736-744]
- Zamal H, Ollevier F. Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile catfish. *Journal of Fish Biology*, 1995, 46(3): 404-414
- Zhang B, Sun Y, Tang QS. The effects of starvation on growth and biochemical composition in *Pagrosomus major*. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 206-210 [张波, 孙耀, 唐启升. 饥饿对真鲷生长及生化组成的影响. *水产学报*, 2000, 24(3): 206-210]
- Zhang ZY, Wang QR, Ye K, *et al.* Effect of fasting on body composition, muscle fatty acid profiles and serum biochemical parameters of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(9):

1440–1450 [张振宇, 王秋荣, 叶坤, 等. 禁食对养殖大黄鱼体成分、肌肉脂肪酸组成和血清生化指标的影响. 水产学报, 2016, 40(9): 1440–1450]  
Zheng B, Xu JZ, Liu SZ. Study on biochemical composition in

muscle and blood of *Pseudosciaena crocea*. Journal of Jimei University (Natural Science), 2003, 8(4): 295–300 [郑斌, 徐君卓, 刘士忠. 大黄鱼肌肉和血液生化组分的分析. 集美大学学报(自然科学版), 2003, 8(4): 295–300]

(编辑 冯小花)

## Effect of Starvation on Amino Acids and Fatty Acids of Juvenile *Larimichthys crocea*

LIU Feng<sup>1</sup>, LÜ Xiaokang<sup>1</sup>, LIU Yangyang<sup>1,2</sup>, LOU Bao<sup>1①</sup>, CHEN Ruiyi<sup>1</sup>, WANG Ligai<sup>1</sup>, ZHAN Wei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province, Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Marine and Fishery Institute of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021; 2. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022)

**Abstract** To investigate the effect of starvation on amino acids and fatty acids of muscle in juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea*, 540 healthy fish with similar body weight ( $40.80 \pm 3.40$  g) were selected for the experiment. The muscle was sampled from experimental fish after 0, 4, 8, 12, 16, and 20 days of starvation for chemical analysis, respectively. Results showed that starvation significantly affected methionine content ( $P < 0.05$ ), which reached the lowest content ( $0.48\% \pm 0.12\%$ ) after 8 days of starvation and obtained the highest content ( $1.62\% \pm 0.23\%$ ) after 16 days of starvation. However, the other 15 kinds of amino acids showed no significant difference among the different groups ( $P > 0.05$ ), with the same trends of increased at first and then decreased when starvation time was prolonged. Also, the non-essential amino acids, essential amino acids, flavored amino acids, essential amino acids and total amino acids showed the same changing trends as the 15 kinds of amino acids. As for fatty acid, starvation had significant effects on the fatty acid content in muscle of juvenile *L. crocea* ( $P < 0.05$ ). Among them, the saturated fatty acids (SFA) increased first and then decreased with the prolongation of starvation, and reached the maximum content after 8 days of starvation ( $30.90\% \pm 0.28\%$ ); monounsaturated fatty acid (MUFA) content among different treatment groups was not significantly different ( $P > 0.05$ ), but all the treatment groups were slightly larger than that of the control group (starvation for 0 day); polyunsaturated fatty acid (PUFA) content showed an increasing trend after the first drop, and the lowest value was in the group of that was starved for 12 days ( $31.87\% \pm 0.65\%$ ). From the above research results, we know that the amino acid and fatty acid contents in the muscle related to meat quality can be changed by proper starvation treatment, which can improve the meat flavor of *L. crocea*. These results have important theoretical and directive significance for improving meat quality of *L. crocea* through proper starvation treatment in the process of *L. crocea* culturing.

**Key words** *Larimichthys crocea*; Starvation; Amino acid; Fatty acid; Meat quality

① Corresponding author: LOU Bao, E-mail: loubao6577@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180213001

http://www.yykxjz.cn/

周丽青, 王雪梅, 吴彪, 孙秀俊, 陈四清, 刘志鸿, 杨爱国, 张盛农, 赵庆, 张高伟. 栉江珧染色体制备及核型分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 66-72

Zhou LQ, Wang XM, Wu B, Sun XJ, Chen SQ, Liu ZH, Yang AG, Zhang SN, Zhao Q, Zhang GW. Chromosome preparation and karyotypes analysis of both male and female *Atrina pectinata*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 66-72

## 栉江珧染色体制备及核型分析\*

周丽青<sup>1,4</sup> 王雪梅<sup>2</sup> 吴彪<sup>1,4</sup> 孙秀俊<sup>1,4</sup> 陈四清<sup>1,4</sup>  
刘志鸿<sup>1,4</sup> 杨爱国<sup>1,4①</sup> 张盛农<sup>1</sup> 赵庆<sup>1,3</sup> 张高伟<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. 山东省日照市海洋与渔业研究所 日照 276800; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
4. 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** 为了解栉江珧(*Atrina pectinata*)的细胞遗传学特征, 取暂养促熟的雌雄亲贝共 12 枚为研究对象, 通过调节暂养水温、采用鳃丝及鳃丝对应部位创面的愈合增生组织为染色体制备材料来改良染色体制备方法, 采用常规的热滴片法制备出大量形态好且分散均匀的染色体标本, 并进行染色体核型分析。结果显示, 适度调节暂养水温和给鳃组织制造微创并以创面愈合增生组织为染色体制备材料均能有效增加组织细胞的分裂增生能力, 为染色体制备提供了充足的材料; 栉江珧二倍体染色体数目  $2n=34$ , 雄性染色体组型为  $2n = 8m+10sm+16st$ , 雌性染色体组型为  $2n = 6m+10sm+18st$ , 染色体组型中, 雌雄两性中期分裂相的染色体排序基本一致, 都有 1 对染色体相对长度明显大于其他染色体; 两性染色体组型有两处明显不同, 其一, 雄性第 14 对染色体为中着丝粒染色体, 而雌性相对应的是亚端着丝粒染色体; 其二, 雄性栉江珧相对长度最大的染色体存在异形情形, 雌性最大的染色体对则为同形, 基本确定栉江珧存在初级的性染色体分化, 属于 XX/XY 型性别决定方式。大型贝类染色体制备方法的改进将有助于丰富贝类细胞遗传学和分类学的研究内容。

**关键词** 栉江珧; 染色体核型; 异形染色体; 分类

**中图分类号** Q243 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0066-07

栉江珧(*Atrina pectinata* Linnaeus)广泛分布于印度-太平洋地区海域, 形态变异较大, 仅在我国沿海就已经发现了多个不同的形态类型(任建峰等, 2005), 给栉江珧的分类带来了极大的困惑, 分类地位比较混乱。Liu 等(2011)通过基因序列比较和形态特征分析, 研究了 16 个中国沿海地理群体和 1 个日本沿海群体栉江珧的遗传分化及演化历史, 认为栉江珧存在 5 个

遗传分化较大的进化支系, 并可能存在 5 个隐存种。Yan 等(2013)和严加坤等(2013a、b)基于线粒体基因组、16S rRNA、28S rRNA 和 CO I 基因等序列, 分析了我国不同地理群体栉江珧遗传多样性及系统发生的状况, 并推测我国栉江珧可能由于地理隔离而分化为南方、北方两个不同亚种。但至今有关栉江珧分类、遗传分化等方面研究报道仍不多。长期滥捕导致

\* 山东省重点研发计划(2016GSF115012)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022018004)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Plan of Shandong Province (2016GSF115012), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022018004)]. 周丽青, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-02-13, 收修改稿日期: 2018-03-15

栉江珧野生资源严重衰退, 很多海域已经很难采捕到。由于栉江珧的经济价值和在海水养殖业上的巨大发展潜力, 其人工育苗日益受到重视, 这需要更多的种质资源和生物学基础资料的支撑。

各种生物的染色体具有一定的类型和组数, 染色体组型或核型一般是以处于体细胞有丝分裂中期的染色体数目和形态来表示, 常采用由 Levan 等(1964)所提出的根据着丝粒的位置进行分类的方法。研究物种染色体不仅可以探讨其分类地位和系统演化, 也有助于近缘物种的鉴定和群落分析。迄今为止, 未见栉江珧染色体核型分析的报道, 本研究从改变暂养条件和取材方法上刺激成贝体细胞应激性增生, 有效增加中期分裂相数目, 建立大型贝类染色体制备技术并研究其核型, 对于丰富贝类遗传学和分类学内容、探究该物种的起源及分类进化地位、指导遗传育种生产实践都有重要的意义。

栉江珧多为雌雄异体, 但存在雌雄同体现象(王梅芳等, 2000)。栉江珧个体发育各阶段尚未发现明显的雌雄性别特征, 只有繁殖盛期性腺充分发育时, 通过解剖依据性腺色泽才能准确判断雌雄, 尚无有效剔除雌雄同体个体的方法, 这更加限制了栉江珧规模化人工苗种繁育技术的研究。本研究拟建立快捷便利的染色体制备技术, 通过核型分析, 为鉴定育苗亲贝的性别奠定细胞遗传学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

2016年6月17日和2017年6月8日, 2批次从山东省日照市海洋与渔业研究所取健康的人工促熟栉江珧亲贝共12枚, 5♀, 7♂。雄性壳绞合部长为(21.77±3.72) cm, 体重为(291.46±40.72) g, 雌性壳绞合部长为(20.98±1.07) cm, 体重为(283.26±53.06) g。雌雄分开暂养于25 L水槽中, 暂养水温为20~23℃, 高于原养殖场水温3℃左右, 饲以实验室培育的扁藻(*Platymonas*)和叉鞭金藻(*Dicrateria inornata*), 每天早晚各投饵1次, 每天换水1次, 每次换一半过滤海水。

### 1.2 实验方法

提前准备好染色体制片的载玻片, 要求干净、无油污、不挂水。栉江珧细小前端朝下斜靠墙角阴干10~30 min, 宽大的后端双壳即张开, 用一个厚约1 cm的软塑料板塞在壳腹缘处使双壳无法闭合, 迅速沿鳃丝边界剪取0.2 cm宽、0.3 cm长的鳃丝, 制造微小创面, 把栉江珧放回水体中精养2~3 d后, 再取该创

面的愈合增生组织。所取鳃丝和愈合增生组织在过滤海水中漂洗后, 立即放入含有0.04%秋水仙素的50%无菌海水(纯净水与海水等体积混合)处理30~45 min, 用镊子取出组织放入0.075 mol/L KCl溶液中低渗30~45 min, 再取出组织用预冷的新鲜配制的卡诺氏(Carnoy's)液(甲醇:冰醋酸=3:1)充分固定。制片时先用50%的冰醋酸将固定的组织解离成细胞悬浊液, 热滴片法制片, 10%的Giemsa染液染色30 min, 自来水冲洗, 晾干后镜检, 拍照。

### 1.3 栉江珧核型分析与比较

选取染色体收缩适中、分散好的雄性栉江珧中期分裂相18个, 雌性中期分裂相16个, 进行显微照相并放大测量, 并用下式计算相对长度和臂比:

$$\text{相对长度} = (\text{实测染色体长度} / \text{全部染色体长度总和}) \times 100$$

$$\text{臂比} = \text{长臂长度} / \text{短臂长度}$$

用Excel求出它们的平均数和标准差, 按Levan等(1964)确定的标准进行染色体分类, 臂比值1~1.7为中着丝粒染色体, 1.7~3为亚中着丝粒染色体, 3~7为亚端着丝粒染色体, 7~∞为端着丝粒染色体。依据染色体相对长度由大到小排序配对, 得出栉江珧的染色体核型公式, 中、亚中、亚端着丝粒染色体臂数(NF)均记为2条。

## 2 结果

### 2.1 栉江珧染色体数目的确定

5枚雌性和7枚雄性栉江珧均观察到清晰分裂相, 雌雄分别随机挑选50个中期分裂相进行染色体众数统计, 结果见表1, 确定二倍体染色体众数 $2n=34$ 。

### 2.2 栉江珧染色体相对长度和臂比值分析结果

雌雄栉江珧染色体相对长度和臂比值见表2, 二者中期分裂相皆为二倍体, 雌雄都有1对相对长度大型的染色体, 序号为1。其中雄性第1对染色体的相对长度存在明显差异, 雄性最大的染色体比雌性最大的染色体略大, 其余各对染色体间相对长度差异不明显, 但第14对染色体的类型在雌雄中明显不同, 雄性为中着丝粒染色体, 雌性为亚端着丝粒染色体。

### 2.3 栉江珧染色体组型

雌性和雄性的染色体依据相对长度从大到小依次排序, 二者染色体排序基本一致, 雄性染色体组型为 $2n = 8m + 10sm + 16st$ , 臂数NF=68(图1); 雌性染色体组型为 $2n = 6m + 10sm + 18st$ , 臂数NF=68(图2),

表 1 雌性和雄性栉江珧中期分裂相二倍体染色体计数

Tab.1 Mitotic metaphase cells number, chromosome number, and percentage of male and female *Atrina pectinata*

	雄性细胞数 Male cells	雌性细胞数 Female cells	细胞总数 Meiotic metaphase cells	百分比 Percentage (%)	染色体数 Chromosome number
	12	15	27	27	31-33
	36	35	71	71	34 (2n)
	2	0	2	2	≈68 (4n)
总数 Total	50	50	100	100	

注: 中期分裂相二倍体染色体众数(2n)=34

Note: Modal diploid chromosome number(2n)=34

表 2 栉江珧染色体类型、相对长度及臂比

Tab.2 Relative length and arm ratio of metaphase chromosome of *A. pectinata*

染色体序号 Chromosome No.	雌 Female ♀				雄 Male ♂			
	臂比 Arm ratio	类型 Type	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Type	相对长度 Relative length		
1	1.21±0.14	m	5.35±0.33	1.22±0.12	m	5.79±0.45		
1	1.20±0.16	m	5.13±0.39	1.23±0.16	m	4.93±0.36		
2	5.46±1.95	st	3.96±0.37	4.88±1.59	st	3.84±0.29		
3	4.71±1.93	st	3.52±0.22	4.24±1.10	st	3.55±0.20		
4	4.36±1.32	st	3.30±0.29	4.76±1.75	st	3.23±0.19		
5	2.45±0.38	sm	3.27±0.31	2.49±0.41	sm	3.24±0.32		
6	4.44±1.99	st	3.01±0.16	4.36±1.56	st	3.04±0.19		
7	2.37±0.36	sm	2.89±0.22	2.48±0.39	sm	2.85±0.18		
8	4.67±1.92	st	2.88±0.15	4.15±1.06	St	2.79±0.17		
9	1.23±0.18	m	2.59±0.17	1.47±0.22	m	2.78±0.31		
10	2.48±0.31	sm	2.78±0.20	2.48±0.40	sm	2.68±0.20		
11	4.45±1.78	st	2.66±0.13	4.60±1.46	st	2.66±0.16		
12	2.26±0.35	sm	2.59±0.25	2.49±0.43	sm	2.46±0.21		
13	4.28±1.48	st	2.54±0.13	4.30±1.60	st	2.47±0.18		
14	4.71±1.67	st	2.39±0.18	1.27±0.18	m	2.39±0.21		
15	2.33±0.44	sm	2.32±0.27	2.40±0.40	sm	2.35±0.23		
16	1.26±0.17	m	2.34±0.20	1.28±0.21	m	2.19±0.22		
17	4.68±1.54	st	2.02±0.24	4.36±1.14	st	2.12±0.26		

注: m: 中部着丝粒染色体; sm: 亚中部着丝粒染色体; st: 亚端部着丝粒染色体

Notes: m: Metacentric; sm: Submetacentric; st: Subtelocentric

雌雄栉江珧的染色体组型略有不同,第 1 对染色体为最大号中着丝粒染色体,雄性第 1 对染色体呈现异形的性别分化,或 1 大 1 小(图 1d),或有些大小分化不是特别明显,但形态(着丝点位置)明显不同(图 1b),雄性最大的染色体分化比雌性最大的染色体分化更加突出。由此可见,最大的 1 对染色体出现了性染色体分化,但不完全等同于人类(*Homo sapiens*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和线虫(*Caenorhabditis elegans*)性染色体的分化,推测是低等生物的初级分化,属于 XX/XY 型性别决定方式。第 14 对染色体在雄贝中属于中着丝粒染色体(图 1b、图 1d),在雌贝中属于亚端着丝粒染色体(图 2b)。

### 3 讨论

#### 3.1 栉江珧染色体的遗传分化

本研究所取的 12 枚栉江珧亲贝从当地养殖场购得,并饲养于相同的环境中,但研究发现,雌雄个体间存在染色体组型差别,不仅存在 1 对染色体类型的区别,还存在雄性相对长度最大的 1 对染色体呈异形的情形,这是本研究的意外发现。迄今为止,国内已报道过的贝类染色体中均未发现异形的性染色体,国外仅在腹足类报道发现有 XO 型或 XY 型性染色体,这似乎与腹足纲贝类一般具有第二性征(交接器官)相吻合(陈宇, 2007)。Twyman(2002)认为,大部分雌雄

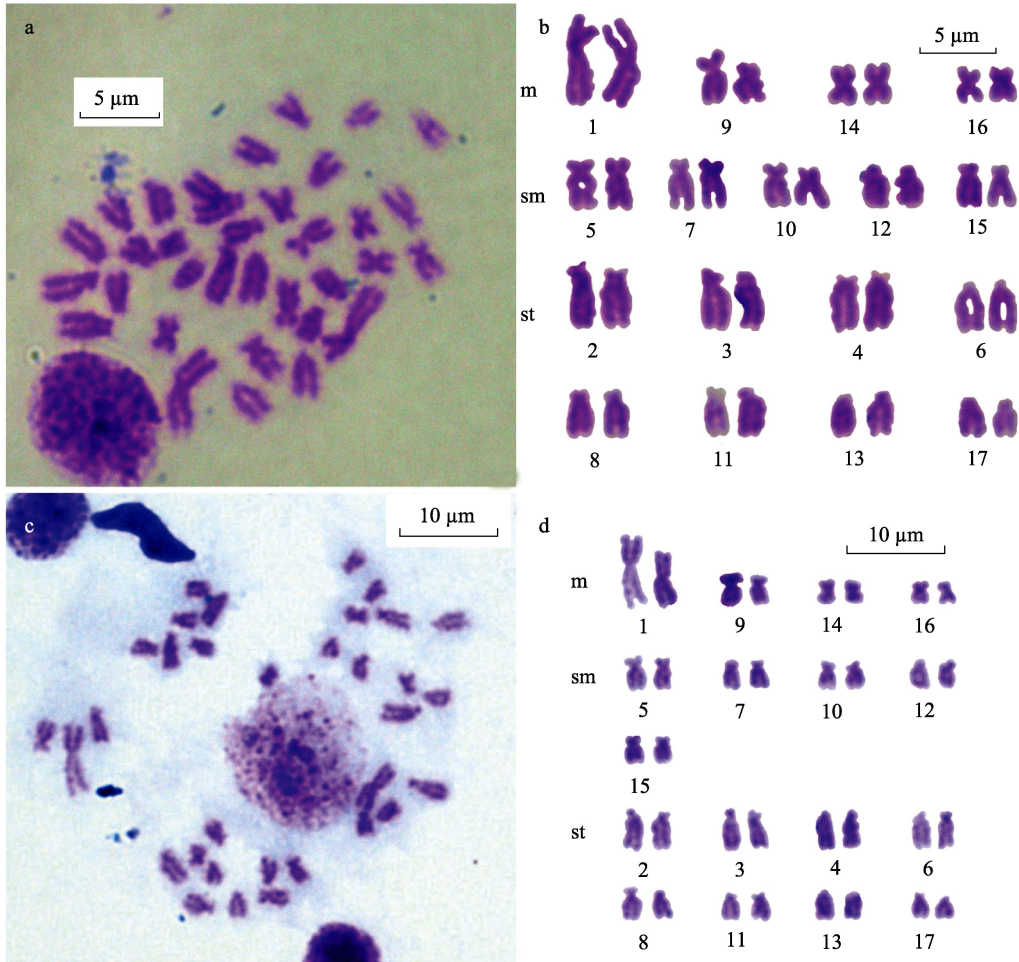


图 1 雄性栉江珧中期分裂相染色体及核型

Fig.1 The metaphase chromosome and karyotype of *A. pectinata*

a、c: 雄性栉江珧中期分裂相染色体; b、d: 雄性栉江珧染色体核型

a and c: Metaphase chromosomes of male *A. pectinata*; b and d: Karyotype of male *A. pectinata*

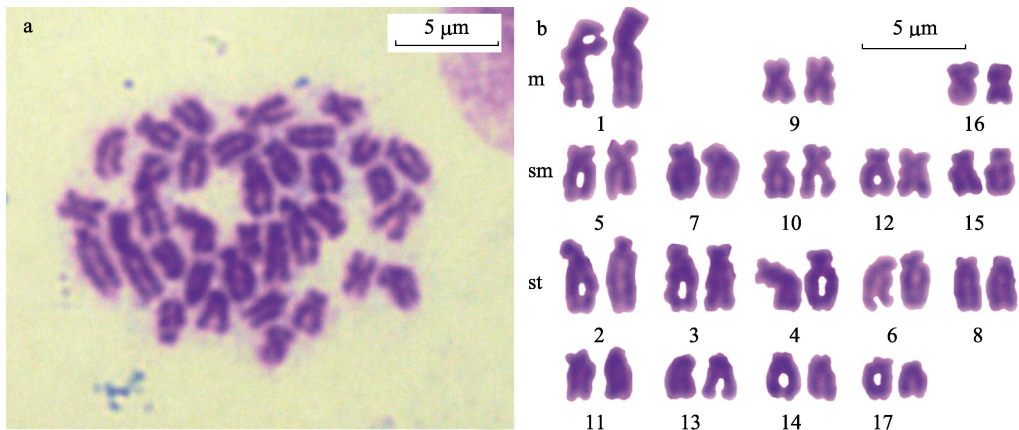


图 2 雌性栉江珧中期分裂相染色体及核型

Fig.2 The metaphase chromosome and karyotype of female *A. pectinata*

a: 雌性栉江珧中期分裂相染色体; b: 雌性栉江珧染色体核型

a. Metaphase chromosomes of female *A. pectinata*; b. Karyotype of female *A. pectinata*



异体型动物原始性别是由性染色体决定的,第二性征可以仍由性染色体决定,但还要受发育过程中性腺释放的荷尔蒙调控。本研究还发现,栉江珧的染色体组成基本稳定,但雄性最大的 1 对染色体的异形情况不太稳定,可能处于初级的性别分化阶段,也有可能是正常的同种异体核型多态性现象。高等哺乳动物染色体中,罗伯逊异位(包括着丝粒融合或断裂)、存在 B 染色体、结构重排(导致染色体长度变化)等是引起同种异体核型多态现象的主要原因(粘伟红, 2006)。雌雄个体间第 14 对染色体类型的区别是否属于性别分化还不能完全确定,这是今后要解决的问题之一。从事贝类染色体核型分析的科研人员也发现,贝类核型存在多态性,即同一种贝类的核型会有差异,孙振兴(1991)认为,各研究者采用实验方法不同,如秋水仙素浓度、低渗液的种类和浓度以及处理时间等,均可对染色体的形态和长度产生影响。Komaru 等(1985)也发现,以同一种贝类的不同组织为材料,即使采用同样方法制片后的染色体长度也有变化。王琼等(1994)则认为地域差异形成的不同地理种群之间会有核型多态现象。

目前,北方海域栉江珧人工育苗还处于试验阶段,尚未见有大规模人工育苗成功的报道,主要原因是人工诱导栉江珧亲贝排放精卵量少,幼虫上浮粘连导致幼虫大量死亡,不能满足生产需求(郑言鑫等, 2015)。正如前言所述,栉江珧分类和系统进化尚存在很多疑问,课题组前期在对栉江珧遗传变异分析中发现,即便是同一群体中的不同个体的微卫星标记都存在很大的区别,如:同一对引物在某个个体中能扩增出条带,而在另一个个体中却扩增不出条带,不同个体间微卫星等位基因杂合度( $H_O$  和  $H_E$ )变化范围分别为 0.0714~0.9231 以及 0.1948~0.9237(Wu *et al.*, 2014), 栖息同一海区的栉江珧种内差异也十分明显(任建峰等, 2005)。本实验结果显示,不同个体的最大号出现性别分化的染色体形态存在一定的多态性。栉江珧群体内个体间分子标记遗传多样性丰富的原因是什么? 亲贝遗传组成差异大或染色体存在多态性是否与人工育苗难点有关? 排序相同的一对染色体类型不同,以及雄性最大一对染色体异形是否真的是性别分化染色体? 这些问题都有待进一步考证。

纵观动物由低等向高等进化历程,遗传分化中遗传因素的作用逐渐增强,环境因素的影响渐渐减弱(Volff *et al.*, 2003)。贝类是无脊椎动物漫长进化过程中较独特的一支,性别表型多样,雌雄同体和性变的现象时有发生,大多数人认为双壳贝类的性别是在相同遗传背景下生殖细胞分化的结果,分化过程如受环

境影响可能会发生性别逆转。王梅芳等(1999)在江珧科栉江珧和二色裂江珧中发现,性逆转及雌雄同体的个体,雌雄滤泡在性腺中分布有两种类型:一种为滤泡混合型,另一种为滤泡并存型。性变方向有雄性转化为雌性、雌性转化为雄性及两种性别均衡发育等三种类型,且以雄性转化为雌性为主。并据此推测,性变及雌雄同体在江珧科是较普遍的现象。栉江珧性变是否与染色体变异有关也有待进一步的实验论证。

### 3.2 大型贝类染色体制备方法的改进

北方海区尚未见有栉江珧人工育苗技术成功的报道,很难获得组织细胞分裂增生能力强的幼虫和稚贝,杨青等(2009)观察人工诱导栉江珧第 1 卵裂抑制型雌核发育二倍体的染色体时,认为栉江珧二倍体细胞染色体数为 32,与本研究观察的二倍体染色体众数 34 有出入,且论文中展示的幼虫细胞中期分裂相染色体图片中未见有本研究观察到的特大号染色体,他们观察雌核发育二倍体胚胎倍数为  $1N=16\pm 1$ ,  $2N=32\pm 2$ ,其他视为非整倍体,则与本研究观察结果稍吻合,他们的结果是否也预示栉江珧染色体较容易发生变异? 这也有待进一步考证。本研究所获得的栉江珧大多都是野生采捕的成年贝,生长缓慢,组织细胞分裂增生的能力较弱,而要制备大量的染色体收缩适中、分散好的中期分裂相需要细胞分裂增生能力强的组织材料,如胚胎、幼虫、幼贝和成贝的鳃、生殖腺、肾脏等(吴宝铃, 1999),但这些取材都需要解剖杀死试验动物。早在 1991 年,Alvarez 提出通过取鱼类的尾鳍进行原代培养获得成纤维细胞制备染色体的方法(Alvarez *et al.*, 1994),尽管该方法理论上对鱼体损伤很小,一个样品还可重复取样或进行其他研究,但细胞培养的操作要求严格,实验条件要求也较高,并不是每次或每个物种的细胞培养都能成功,且时间跨度较长,一般数天或者数周。但到目前为止,贝类的组织培养还未取得突破性的进展,多停留在原代培养的探索阶段(李建军等, 2015; 陈宇, 2007),仅有建立了一种淡水蜗牛担轮幼虫胚胎(*Biomphalaria glabrata embryonic*, BGE)细胞系(Hansen, 1976)的报道,除此之外,未见有其他贝类细胞建系的报道。因此,采用培养细胞制备贝类染色体标本目前尚不可取。作者曾建立直接剪取波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)鳍条边缘及剪鳍后的愈合增生组织制备染色体的方法,未对鱼体健康造成明显伤害,且整个过程操作简便,可在实验基地或生产单位随时开展(周丽青等, 2010)。基于实验对象少而珍贵的情况,作者借鉴这种方法,利用贝类鳃丝也具有伤口修复的能

力, 获取大量分裂增生的愈合增生组织的细胞用于染色体制备, 取得了相当好的结果, 而且还能保证实验动物仍能健康存活, 取鳃丝时还能观察性腺色泽进行性别的初步判断。

众所周知, 成贝的生长速率随着年龄的增长而下降甚至停滞, 体细胞的分裂增生能力有限。通过适当地改变成贝的暂养条件来刺激生物体体细胞的分裂增生能力, 尚未见有报道。本研究通过改变暂养温度和加强营养供给, 使实验成贝的体细胞在短期内出现应激性的增生高峰, 取得了非常好的实验效果。采用创口愈合增生组织制备动物中期分裂相染色体的报道也较少, 仅见合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)成贝外套膜再生组织染色体制备技术的报道, 而且分析的核型与其他学者使用不同的材料和方法制备的染色体核型有较大的差异(沈亦平等, 1993), 这与本研究的结果类似。本研究建立的调节暂养水温、采用鳃丝及鳃丝对应部位创面的愈合增生组织制备大型贝类染色体技术简单快捷、实用性强、可重复操作。

## 参 考 文 献

- Alvarez MC, Otis J, Amores A, *et al.* Short-term cell culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 1991, 39(6): 817–824
- Chen Y. The study on cytology of *Lamprotula fibrosa*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 [陈宇. 绢丝丽蚌细胞学研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Hansen EL. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): Establishment and characteristics. In: Maramorosch K Ed. *New York: Invertebrate tissue culture: Research applications*, 1976: 77–99
- Li JJ, Huang BY. Technology and application of marine shellfish cell culture. *Marine Science Bulletin*, 2015, 34(3): 247–251 [李建军, 黄宝玉. 海洋贝类细胞培养技术及其应用. 海洋通报, 2015, 34(3): 247–251]
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201–220
- Liu J, Li Q, Kong LF, *et al.* Cryptic diversity in the pen shell *Atrina pectinata* (Bivalvia: Pinnidae): High divergence and hybridization revealed by molecular and morphological data. *Molecular Ecology*, 2011, 20(20): 4332–4345
- Komaru A, Wada KT. Karyotypes of four species in the *Pectinidae* (Bivalvia: Pteriomorphia). *Japanese Journal of Malacology Venus*, 1985, 44(4): 249–259
- Nian WH. Verification of Y chromosome of the tufted deer by FISH and studies of the mechanisms of karyotype polymorphism. Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2006 [粘伟红. FISH 技术验证毛冠鹿 Y 染色体及核型多态性机理初步研究. 南京师范大学硕士研究生学位论文, 2006]
- Ren JF, Yang AG. Current status of study on pen shell *Atrina pectinata* and its prospects of application and exploitation. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(4): 84–88 [任建峰, 杨爱国. 栉江珧研究现状及开发利用前景. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 84–88]
- Shen YP, Wang XJ, Ma WT, *et al.* A technique for preparation of metaphase chromosome from mantle tissue of adult pearl oyster *Pinctada martensii* Dunker. *Journal of Wuhan University (Science Edition)*, 1993(5): 121–122 [沈亦平, 王孝举, 马文涛, 等. 合浦珠母贝成贝外套膜染色体制备技术. 武汉大学学报(理学版), 1993(5): 121–122]
- Sun ZX. A method for observing the chromosomes of shellfish. *Chinese Journal of Zoology*, 1991, 26(4): 34–35 [孙振兴. 一种观察贝类染色体的制片法. 动物学杂志, 1991, 26(4): 34–35]
- Twyman RM. *Instant notes in developmental biology*. Molecular Biotechnology Unit. John Innes Centre, Norwich, UK. Bios Scientific Publishers Limited, 2002, 151–159
- Volff JN, Zarkower D, Bardwell VJ, *et al.* Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57(S1): S241–S249
- Wang MF, Yu XY, Ye FL. The gonad development of *Pinna (Atrina) pectinata* in Beibu Gulf and adjoining coast. *Guangxi Sciences*, 2000, 7(2): 140–143, 157 [王梅芳, 余祥勇, 叶富良. 北部湾及附近海域栉江珧性腺发育研究. 广西科学, 2000, 7(2): 140–143, 157]
- Wang MF, Yu XY, Wang JY. The hermaphrodites and sex-reversal of *Atrina pectinata* Linnaeus and *Pinna bicolor* Gmelin. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 1999, 19(4): 6–10 [王梅芳, 余祥勇, 王君彦. 两种江珧雌雄同体及性转换现象. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(4): 6–10]
- Wang Q, Tong SL. The karyotype and banding-patterns of blue mussel, *Mytilus edulis*. *Acta Zoologica Sinica*, 1994, 40(3): 309–316 [王琼, 童裳亮. 贻贝(*Mytilus edulis*)核型及染色体带型分析. 动物学报, 1994, 40(3): 309–316]
- Wu B, Bai LJ, Yang AG, *et al.* Novel polymorphic microsatellite markers isolated from the pen shell *Atrina pectinata* (Mollusca: Bivalvia: Pinnidae). *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(4): 10643–10647
- Wu BL. Biology of settlement and metamorphosis in molluscs reproduction. In: *Fundamental research on elite germplasm and disease resistance of mariculture organism*. Jinan: Shandong Science & Technology Press, 1999, 137–144 [吴宝铃. 海水增殖生物优良种质和抗病力的基础研究 贝类繁殖附着变态生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 1999, 137–144]
- Yan JK, Wu B, Yang AG, *et al.* The complete mitochondrial genome of the pen shell *Atrina pectinata* (Mollusca: Bivalvia: Pinnidae): The first representative from the family Pinnidae. *Mitochondrial DNA*, 2013, 24(4): 368–369
- Yan JK, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* The genetic diversity and phylogenetic studies of five populations of *Atrina pectinata* in China. *Progress in Fishery Sciences*, 2013a, 34(2): 29–35 [严加坤, 杨爱国, 周丽青, 等. 我国不同地理群体栉江珧遗传多样性及系统发生分析. 渔业科学进展, 2013a, 34(2): 29–35]
- Yan JK, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* The genetic diversity of five

- populations of *Atrina pectinata* in China based on mitochondrial 16S rRNA gene. *Marine Science*, 2013b, 37(2): 36–42 [严加坤, 杨爱国, 周丽青, 等. 基于线粒体16S rRNA 基因研究 5 个栉江珧野生群体的遗传多样性. *海洋科学*, 2013b, 37(2): 36–42]
- Yang Q, Li Q, Yu RH, *et al.* Artificial induction of gynogenetic diploids by suppression of the first cleavage in *Atrina pectinata*. *Marine Sciences*, 2009, 33(10): 63–67 [杨青, 李琪, 于瑞海, 等. 栉江珧第 1 卵裂抑制型雌核发育二倍体人工诱导的研究. *海洋科学*, 2009, 33(10): 63–67]
- Zheng YX, Yang AG, Wu B, *et al.* Studies on the spawning inducement and the conditions for the larval of *Atrina pectinata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 127–133 [郑言鑫, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉江珧(*Atrina pectinata*)催产方法及幼虫培养条件. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 127–133]
- Zhou LQ, Yang AG, Wu B, *et al.* A preliminary study on chromosome preparation and karyotype of humphead wrasse *Cheilinus undulatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 54–58 [周丽青, 杨爱国, 吴彪, 等. 波纹唇鱼染色体制备及核型的初步研究. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 54–58]

(编辑 冯小花)

## Chromosome Preparation and Karyotypes Analysis of Both Male and Female *Atrina pectinata*

ZHOU Liqing<sup>1,4</sup>, WANG Xuemei<sup>2</sup>, WU Biao<sup>1,4</sup>, SUN Xiujun<sup>1,4</sup>, CHEN Siqing<sup>1,4</sup>,  
LIU Zhihong<sup>1,4</sup>, YANG Aiguo<sup>1,4</sup>①, ZHANG Shengnong<sup>1</sup>, ZHAO Qing<sup>1,3</sup>, ZHANG Gaowei<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. Rizhao Municipal Ocean and Fishery Research Institute of Shandong Province, Rizhao 276800; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** The pen shell, *Atrina pectinata*, has high commercial and scientific research value because of the lack of large-scale culture in China. In recent decades, many problems such as overfishing, deterioration of marine eco-environment, and failure of artificial seedling breeding, have drastically reduced the amount of wild sources. However, there are few reports on *A. pectinata* systematic classification and no karyotype reports until now. To explore the cytogenetical characters and identify the status of germplasm resources of *A. pectinata* in northern China, by adjusting the water temperature of temporary rearing, and using the healing hyperplasia tissue of gills for chromosomal investigation, we improved the methods of chromosome preparation, and obtained many well-spread mitotic chromosomal plates of seven male and five female *A. pectinata*. The results revealed that a certain degree of temperature-change stress during temporary rearing could promote the proliferation of somatic cells effectively in the short term; gill-healing hyperplastic tissue has mass proliferation of cells in mitotic metaphase. The karyotypes of both sexes were examined separately. *A. pectinata* has 17 pairs of chromosomes (i.e.  $n=17$ , and  $2n=34$ ); there were obvious differences in karyotype between males and females; male karyotype formula is  $2n=8m+10sm+16st$ ; female karyotype formula is  $2n=6m+10sm+18st$ . The first pair of the particularly larger chromosomes were heterotypic in male somatic cells; the No.14 pair of chromosomes was metacentric in males but telocentric in female metaphase somatic cells; the primary sex-determination mechanism is XX/XY type. The newly improved methods for chromosome preparation could be beneficial to large-scale shellfish germplasm identification and classification.

**Key words** *Atrina pectinata*; Chromosome karyotypes; Heterotypic chromosome; Phylogeny

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170513001

http://www.yykxjz.cn/

李瑶瑶, 刘云国, 刘晓玲, 刘凌霄, 马超. 基于线粒体基因组 *COI* 和 *12S rRNA* 序列的魁蚶中国群体分类学地位研究. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 73–80  
Li YY, Liu YG, Liu XL, Liu LX, Ma C. The taxonomic status of Chinese population of *Scapharca broughtonii* based on sequences of *COI* and *12S rRNA* genes. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 73–80

# 基于线粒体基因组 *COI* 和 *12S rRNA* 序列的 魁蚶中国群体分类学地位研究\*



李瑶瑶<sup>1</sup> 刘云国<sup>1,2①</sup> 刘晓玲<sup>1</sup> 刘凌霄<sup>3</sup> 马 超<sup>4</sup>

(1. 烟台大学生命科学学院 烟台 264005; 2. 新疆大学生命科学与技术学院 乌鲁木齐 830046;  
3. 临沂市农业科学院 临沂 276012; 4. 烟台蓝白餐饮有限公司 烟台 264001)

**摘要** 东北亚地区不同地理种群魁蚶(*Scapharca brouhtonii*)的分类学地位仍存在较大争议。为探讨魁蚶中国群体的分类地位,测定了魁蚶中国群体线粒体基因组 *COI* 和 *12S rRNA* 序列,并从 GenBank 中下载了蚶科 26 种贝类的同源序列进行分析。以贻贝科的贻贝(*Mytilus edulis*)为外群,用邻近法和最大简约法构建了蚶科贝类的分子系统进化树,分析其分子系统进化关系和分类等级。结果显示,魁蚶中国群体的 *COI* 和 *12S rRNA* 基因的碱基组成、密码子使用率及变异位点等与魁蚶日本群体和粗饰蚶属的 *Anadara sativa* 相似,且遗传距离很小,进化树中聚为一支,亲缘关系很近,初步确定魁蚶中国群体的分类地位和魁蚶日本群体一致。本研究结果初步阐明了魁蚶中国群体的分子系统进化地位,有利于掌握魁蚶的遗传背景和资源状况,以应用于自然资源的保护和推动养殖业的发展。

**关键词** 魁蚶; *COI* 和 *12S rRNA*; 系统发育; 分类地位

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0073-08

魁蚶(*Scapharca brouhtonii*)俗称赤贝、血贝、大毛蛤,是一种大型底栖经济贝类(孙楠等, 2015)。魁蚶广泛分布于太平洋西部沿岸、日本北海道以南、朝鲜半岛和俄罗斯东南部(姚红伟等, 2010)。在我国,魁蚶主要分布于辽东半岛东南部、山东半岛北部和东部等海区。魁蚶属于大型蚶,成体个体肥大、肉质鲜美,具有很高的经济价值。目前,对于不同地理种群魁蚶的分类学地位存在较大争议(梁超等, 2010; 孔晓瑜等, 2001; 喻子牛等, 1998a、b),无论是在外部

形态上,还是线粒体基因组的序列特征上,不同群体魁蚶都显示了较大的差异(Yokogawa *et al*, 1997; Liu *et al*, 2013、2014; Cho *et al*, 2007)。魁蚶养殖业的发展需了解养殖品种清晰的遗传背景和分类进化地位,明确分类等级,理清相互之间的进化关系,以掌握其资源状况,为魁蚶养殖业的发展奠定基础。

随着 DNA 测序技术和生物信息学的飞速发展,分子系统学日臻完善。线粒体 DNA(mtDNA)因具有进化速率快、群体内变异大、分子结构简单、极少发

\* 新疆天山学者科研启动金(45030)和新疆高层次人才引进工程专项经费(45049)共同资助 [This work was supported by grants from the Tianshan Scholar High-Level Talent Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region(45030), and Special Funds for Introduction of High-Level Talents of Xinjiang Uygur Autonomous Region(45049)]. 李瑶瑶, E-mail: liyaoyao678@126.com

① 通讯作者: 刘云国, 教授级高级工程师, E-mail: yguoliu@163.com

收稿日期: 2017-05-13, 收修改稿日期: 2017-06-08

生重组等特点,在分子系统学研究中得到了较广泛的应用,已成为物种起源、分类学定位、分子进化和系统发育研究的重要分子标记(孔晓瑜等, 2001; 崔文涛等, 2013; 金逍逍等, 2013; 梁日深等, 2014; 孙毅, 2015)。分子生物学分析方法能克服贝类形态学分析的困难,更能真实有效地反映其分类地位及进化关系。目前,包括毛蚶属贝类在内的双壳贝类的线粒体基因组测序工作正在大量开展(Serb *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007; Mjelle *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2016),已测出 4 种蚶科贝类的线粒体全基因组序列,为本研究的实施创造了条件。

很多蚶科贝类的线粒体基因组全序列测定工作陆续完成。目前,对于魁蚶的研究主要集中在生物学特性(张玉玺等, 1995; 周玮等, 2011; 王子臣等, 1987; 常亚青等, 1992; 吴彪等, 2010)、营养组分分析(王颖等, 2013)及繁育技术(邹琰等, 2010; 张启刚等, 2003; 杨青等, 2011)等,而利用分子生物学手段对遗传信息

的研究相对较少。东北亚不同地理种群魁蚶存在形态学和遗传学上的差异(喻子牛等, 1997、1998; Cho *et al.*, 2007; 梁超等, 2010)。本研究通过测定魁蚶中国群体线粒体基因组 *COI* 和 *12S rRNA* 序列,从 GenBank 中下载了蚶科 26 种贝类的同源序列进行比对和系统发育分析,从分子水平上探讨魁蚶中国群体的分类学地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集

选取蚶科 27 种贝类样本进行分析,其中,魁蚶中国群体的线粒体 *COI* 和 *12S rRNA* 的全长序列为本研究首次获取,其他线粒体基因组序列从 NCBI 的 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索并下载得到,所有物种的命名和分类地位采用 Nelson(2006)提出的分类标准。本研究涉及物种的种名及序列 GenBank 登录号等相关信息见表 1。

表 1 蚶科 26 种贝类的线粒体基因组的基本信息  
Tab.1 Basic mitochondrial genome information of 26 Arcidae shellfish

亚科 Subfamily	属 Genus	物种 Species	基因登录号 GenBank No.	
			<i>COI</i>	<i>12S rRNA</i>
蚶亚科 Arcinae	蚶属 <i>Arca</i>	舟蚶 <i>Arca navicularis</i>	HQ258825	JN974670
		偏胀蚶 <i>Arca ventricosa</i>	AB076935	
		椿蚶 <i>Arca avellana</i>	HM180483	
		布氏蚶 <i>Arca boucardi</i>	KJ774462	
	须蚶属 <i>Barbatia</i>	<i>Barbatia fusca</i>	AB050899	
		<i>Barbatia lacerata</i>	AB076932	
		青蚶 <i>Barbatia virescens</i>	HQ258841	
	白蚶属 <i>Acar</i>	褶白蚶 <i>Acar plicata</i>	FJ480472	
	扭蚶属 <i>Trisidos</i>	鳞片扭蚶 <i>Trisidos kiyonoi</i>	HQ258846	JN974675
		扭蚶 <i>Trisidos tortuosa</i>	KX713506	
		深海蚶属 <i>Bathyarca</i>	<i>Bathyarca glacialis</i>	KP976044
	<i>Bathyarca pectunculoides</i>		KF644132	
	底蚶属 <i>Bentharca</i>	彩红底蚶 <i>Bentharca rubrotincta</i>	KJ774471	
	粗饰蚶亚科 Anadarinae	粗饰蚶属 <i>Anadara</i>	夹粗饰蚶 <i>Anadara vellicata</i>	NC_028227
<i>Anadara sativa</i>			NC_024927	
密肋粗饰蚶 <i>Anadara crebricostata</i>			HQ258847	JN974643
古蚶 <i>Anadara antiquata</i>		AB050895	JN974645	
毛蚶属 <i>Scapharca</i>		魁蚶 <i>Scapharca broughtonii</i>	AB729113	
		毛蚶 <i>Scapharca kagoshimensis</i>	NC_025509	
		角毛蚶 <i>Scapharca cornea</i>	HQ258860	
		圆毛蚶 <i>Scapharca globosa ursus</i>	AB254194	
		舵毛蚶 <i>Scapharca gubernaculum</i>	HQ258857	JN974646
		不等壳毛蚶 <i>Scapharca inaequalvis</i>	AB076937	JN974651
		球蚶属 <i>Potiarca</i>	球毛蚶 <i>Potiarca pilula</i>	HQ258862
泥蚶属 <i>Tegillarca</i>		泥蚶 <i>Tegillarca granosa</i>	AB050897	
	结蚶 <i>Tegillarca nodifera</i>	AB050893	JN974657	

魁蚶样品采自山东威海乳山, 均为自然群体, 样品采集后即保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用, 鉴定后取闭壳肌肌肉组织提取 DNA。

## 1.2 基因组 DNA 提取

20 个样品中各取闭壳肌约 100 mg, 充分剪碎, 用动物细胞组织线粒体 DNA 萃取试剂盒(上海哈灵生物有限公司)提取线粒体基因组, 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

## 1.3 PCR 扩增和测序

*COI*引物设计参考孔晓瑜等(2001), 扩展序列为魁蚶线粒体基因组 1490~2198 bp 的片段(AB729113)。引物序列: COIL1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAA-GATATTGG-3'; COIH2198: 5'-TAAACTTCAGGGT-GACCAAAAAATCA-3'。*12S rRNA* 基因的引物设计在魁蚶日本群体 *12S rRNA* 基因序列的基础上, 使用 Primer Premier 5.0 设计。引物序列: F1: 5'-GCGGCTA ATGTAATGCCAGCAG-3'; R1: 5'-ACGGGAACGTGT CTCCTCAC-3'。

PCR 反应体系为 40  $\mu\text{l}$ , 包含 20  $\mu\text{l}$  2 $\times$ U *taq* PCR MasterMix, 14  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )

各 2.0  $\mu\text{l}$  和 2.0  $\mu\text{l}$  的 DNA 模板。PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  条件下变性 45 s,  $52^{\circ}\text{C}$  退火 40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共循环 30 次,  $72^{\circ}\text{C}$  充分延伸 5 min。将 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, PCR 扩增产物送深圳市恒创基因科技有限公司测序, 为保证序列的准确性, 序列经正反 2 次重复测定。

## 1.4 基因组序列分析

将双向测序的结果用 ClustalX 1.8 进行全序列自动对准, 并辅以人工校对。利用 MEGA5.05(Kumar *et al.*, 2001)软件对基因序列进行比对, 统计分析序列组成、碱基含量、结构特征及变异特点等信息, 并计算转换(Ts)/颠换(Tv)比和两两序列间的遗传距离。

## 1.5 系统发育分析

利用软件 ClustalX 对蚶科贝类线粒体基因组序列进行多重比对并人工校正, 以贻贝科的贻贝(*Mytilus edulis*)为外群, 通过 MEGA 5.05 软件进行整理和分类, 并用邻接法(Neighbor-joining, NJ)和最大简约法(Maximum-Parsimony, MP)构建了蚶科贝类的系统进化树(图 1 和图 2), 其各分支的置信度经 Bootstrap 法检验, 共 1000 次循环(金道道等, 2013)。

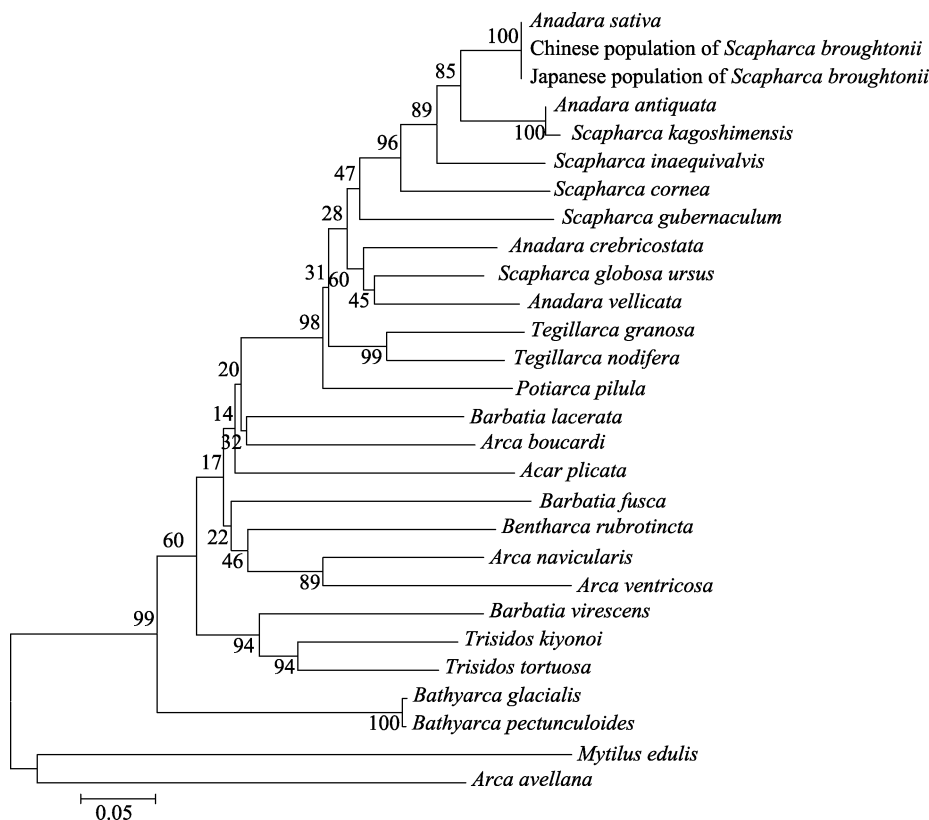


图 1 根据 *COI* 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Fig.1 NJ phylogenetic tree constructed according to the sequence of *COI* gene

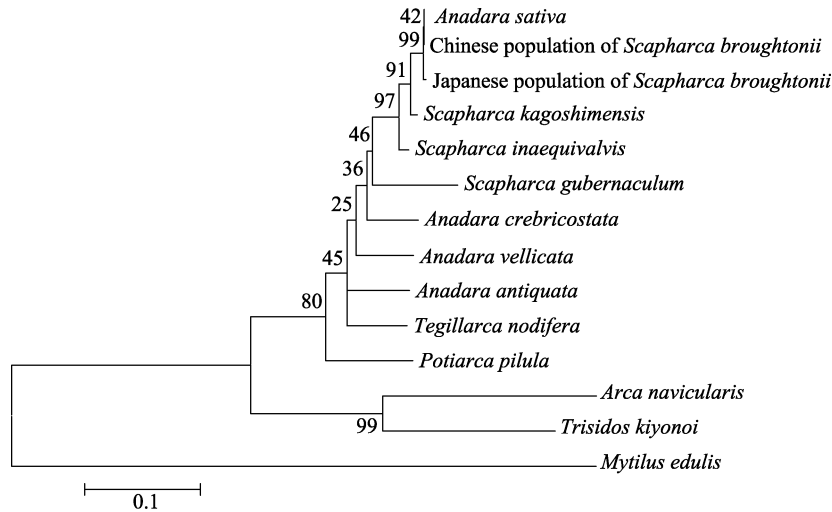


图 2 根据 *12S rRNA* 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Fig.2 NJ phylogenetic tree constructed according to the sequence of *12S rRNA* gene

## 2 结果与分析

### 2.1 魁蚶中国群体线粒体 *COI* 和 *12S rRNA* 基因序列

*COI* 是编码细胞色素 C 氧化酶基因亚基 I 的蛋白质编码基因, 全长 1584 bp, T、C、A 和 G 含量分别为 39.3%、14.3%、24.9% 和 21.5%, A+T、G+C 含量分别为 64.2%、35.8%。*COI* 基因编码 518 个氨基酸, 密码子 3 个位点的碱基频率统计值见表 2: 在 3 个位点上均表现出明显的 AT 偏向性, 特别是第 3 个密码子, AT 含量达 77.1%, 与无脊椎动物偏好以 A 或 T 结尾一致 (Brown, 1985)。密码子第 3 位点表现出明显的不平衡性, T 的频率达到 47%, 而 C 只有 7.2%。

*12S rRNA* 为编码核糖体核糖核酸的基因, 全长为 673 bp, T、C、A 和 G 含量分别为 26.3%、19.0%、27.3% 和 27.3%, A+T、G+C 含量分别为 53.6%、46.3%。

### 2.2 蚶科 27 种贝类 *COI* 和 *12S rRNA* 基因序列变异及碱基组成

将魁蚶中国群体的 *COI* 和 *12S rRNA* 基因与另外 26 种蚶科贝类的 *COI* 和 *12S rRNA* 基因序列进行比对分析。*COI* 基因的长度为 1455~1584 bp, T、C、A 和 G 碱基平均含量为 40.2%、14.7%、21.4 和 23.7%, A+T 的平均含量 (61.6%) 大于 G+C 的平均含量 (38.4%)。*COI* 基因编码 302 个氨基酸, 密码子 3 个位点的碱基使用频率统计值见表 2: 在 3 个位点上均表现出明显的 AT 偏向性, 特别是在第 1 位点上, 达到 71.7%。按照无脊椎动物线粒体密码表, 编码苯丙氨酸 Phe 和色氨酸 Trp 的密码子 UUU 和 UGG 是使用最频繁的密码子, 分别达 26.7% 和 15.8%, 存在明显的密码子使用偏好。蚶科 27 种贝类 3 个密码子位

点上碱基使用频率无显著差异, 显示出相似的序列组成特征。特别是魁蚶中国群体、魁蚶日本群体和 *Anadara sativa* 在某些位点上碱基组成相同。蚶科 27 种贝类 *COI* 基因共有 787 个变异位点, 占总位点数的 49.7%; 其中含有简约信息位点 531 个, 为总变异位点的 67.4%; 核苷酸的替换以颠换为主, 转换/颠换比值平均为 0.79。与外群比对后长度为 1665 bp, 有 660 个变异位点, 占总位点数的 39.6%, 各种间序列变异位点明显颠换多于转换。

*12S rRNA* 基因的平均长度为 673 bp, T、C、A 和 G 碱基平均含量为 26.8%、19.0%、27.1% 和 27.1%, A+T 的平均含量 (53.9%) 大于 G+C 的平均含量 (46.1%)。13 种蚶科贝类共有 344 个变异位点, 占总位点数的 51.1%; 其中, 含简约信息位点 148 个, 为总变异位点的 43.0%; 核苷酸的替换以转换为主, 转换/颠换比值平均为 1.24。对 13 种蚶科贝类的 *12S rRNA* 基因用 Kimura 双参数法计算遗传距离, 计算结果见表 3, 魁蚶中国群体和魁蚶日本群体以及 *Anadara sativa* 的遗传距离为最小, 说明它们的亲缘关系最近, 与毛蚶的遗传距离为 0.019, 亲缘关系次之。

### 2.3 系统发育分析

*COI* 和 *12S rRNA* 是蚶科贝类线粒体内具有较好的系统发育信息的基因, 通过对其进行 PCR 扩增和序列测定, 分析比较蚶科贝类的种间变异程度和亲缘关系。*COI* 和 *12S rRNA* 都是蚶科线粒体中相对保守的序列, 可以用于分析物种进化关系。

以贻贝为外群, 蚶科 27 种贝类的 *COI* 和 *12S rRNA* 基因为基础, 使用 MEGA5.05 软件中的 NJ 法和 ML 法构建了蚶科贝类的分子系统进化树, 结果如

表 2 蚶科 27 种贝类密码子不同位点碱基组成频率  
Tab.2 Nucleotide composition frequency of three code sites of 27 Arcidae shellfish

物种 Species	位置 Position											
	1st				2nd				3rd			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
<i>Arca navicularis</i>	50	5.2	23.4	21.2	27	16.0	24.5	32.3	43	23.1	12.7	21.3
<i>Arca ventricosa</i>	37	12.9	15.2	34.4	28	17.2	21.5	32.8	43	22.2	14.2	20.5
<i>Barbatia fusca</i>	49	6.0	25.5	19.9	33	14.6	19.9	32.5	44	21.9	13.9	19.9
<i>Barbatia virescens</i>	46	9.3	7.8	36.8	30	16.0	24.5	29.4	44	20.9	11.6	23.5
<i>Trisidos kiyonoi</i>	51	6.3	17.5	25.3	29	15.2	25.3	30.1	44	19.0	12.7	23.9
<i>Tegillarca granosa</i>	47	7.0	22.8	22.8	30	15.2	27.2	27.8	42	20.5	14.9	22.5
<i>Tegillarca nodifera</i>	52	4.6	21.9	21.9	29	15.6	27.5	27.5	43	20.5	14.6	22.2
<i>Anadara crebricostata</i>	52	5.9	17.8	23.8	30	16.0	25.3	28.6	44	20.1	12.3	23.5
<i>Scapharca globosa ursus</i>	54	4.8	26.0	15.2	29	16.4	25.2	29.6	44	18.9	13.9	23.3
<i>Anadara vellicata</i>	49	5.8	23.7	21.9	29	16.7	25.8	28.0	41	18.1	18.4	22.1
<i>Potiarca pilula</i>	51	4.1	17.5	27.1	30	17.5	24.9	27.5	44	20.9	12.7	22.4
<i>Anadara antiquata</i>	47	8.6	26.5	18.2	30	16.9	25.5	27.5	44	19.5	13.9	22.2
<i>Scapharca kagoshimensis</i>	48	9.1	26.7	16.6	30	17.5	27.8	25.1	42	18.5	17.7	21.7
<i>Anadara sativa</i>	47	6.8	30.4	15.5	29	17.4	26.9	26.9	42	18.6	17.5	22.0
Chinese population of <i>S. broughtonii</i>	47	6.8	30.4	15.5	29	17.4	26.9	26.9	42	18.6	17.5	22.0
<i>Scapharca broughtonii</i>	47	6.8	30.4	15.5	29	17.6	26.9	26.7	42	18.6	17.5	22.2
<i>Scapharca inaequalvis</i>	42	9.9	32.1	15.9	29	17.9	25.5	27.5	44	19.2	14.2	22.5
<i>Scapharca cornea</i>	46	8.2	27.1	19.0	29	16.7	26.4	27.5	44	20.5	12.3	23.1
<i>Scapharca gubernaculum</i>	45	8.9	24.2	21.6	29	17.8	25.7	27.1	44	20.5	13.4	22.4
<i>Barbatia lacerata</i>	43	8.9	19.9	28.1	29	16.9	24.8	28.8	44	22.5	13.2	19.9
<i>Arca boucardi</i>	47	10.2	12.6	29.9	39	14.3	24.6	22.2	44	25.4	11.9	19.0
<i>Bentharca rubrotincta</i>	57	2.4	21.3	19.7	28	18.3	31.0	23.0	44	23.8	11.9	20.6
<i>Bathyarca glacialis</i>	46	9.3	20.1	24.5	31	17.6	27.9	23.0	45	22.9	11.2	21.0
<i>Bathyarca pectunculoides</i>	46	9.5	20.5	23.8	31	17.6	27.1	23.8	44	22.4	11.4	21.9
<i>Trisidos tortuosa</i>	58	4.1	15.5	22.3	30	17.3	25.5	26.8	45	19.1	13.6	21.8
<i>Arca avellana</i>	48	7.1	29.5	15.2	30	14.2	27.0	28.8	47	21.7	12.8	18.1
<i>Acar plicata</i>	35	4.8	20.4	39.5	29	16.1	30.4	25.0	45	23.8	12.5	18.5
平均 Average	48	7.2	23.7	21.4	30	16.7	25.9	27.7	43	20.3	14.6	21.8

图 1~图 2 所示。ML 树的拓扑结构与 NJ 树相似, 图片不再列出。通过系统发育树可得知, 蚶科表现为单系性, 但须蚶属 *Barbatia* 表现为复系, 粗饰蚶亚科 *Anadarinae* 和泥蚶属 *Tegillarca* 表现为单系群。魁蚶中国群体与毛蚶属的魁蚶日本群体和粗饰蚶属的 *Anadara sativa* 亲缘关系最近, 在 *COI* 和 *12S rRNA* 基因这 2 个序列的基础上分析, 魁蚶中国群体与魁蚶日本群体的差异不大, 隶属于双壳纲(Bivalvia)、翼形亚纲(Pteriomorphia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae)、毛蚶属(*Scapharca*), 但魁蚶中国群体更确切的分类地

位还需通过简化基因组测序等进一步验证。

### 3 讨论

Yokogawa(1997)研究了中、日两国魁蚶的壳高、壳长和壳重等形态上的差异, 魁蚶中国群体平均壳高、壳长和壳重分别是日本群体的 1.09 倍、1.11 倍和 1.58 倍, 中国群体壳面的放射肋条数为 45.83, 而日本群体只有 41.25, 形态学上的比较显示出了显著差异。并利用等位基因酶研究了其遗传差异, 计算得到的遗传距离达 0.108。该研究认为, 两国魁蚶在形态和遗传



表3 13种蚶科贝类 *12S rRNA* 的 Kimura 双参数遗传距离  
Tab.3 Kimura 2-Parametr distance on *12S rRNA* of 13 Arcidae shellfish

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1													
2	0.000												
3	0.000	0.000											
4	0.019	0.019	0.019										
5	0.028	0.028	0.028	0.025									
6	0.099	0.099	0.099	0.099	0.090								
7	0.112	0.112	0.112	0.112	0.100	0.118							
8	0.099	0.099	0.099	0.099	0.087	0.141	0.109						
9	0.108	0.108	0.108	0.105	0.096	0.128	0.119	0.112					
10	0.158	0.158	0.158	0.147	0.138	0.168	0.166	0.145	0.137				
11	0.112	0.112	0.112	0.106	0.106	0.154	0.138	0.144	0.147	0.172			
12	0.428	0.428	0.428	0.427	0.422	0.497	0.429	0.440	0.404	0.433	0.414		
13	0.388	0.388	0.388	0.373	0.378	0.366	0.394	0.397	0.364	0.401	0.375	0.343	

注: 1. *A. sativa*; 2. Chinese population of *S. broughtonii*; 3. Japanese population of *S. broughtonii*; 4. *S. kagoshimensis*; 5. *S. inaequalvis*; 6. *T. nodifera*; 7. *A. antiquate*; 8. *A. vellicata*; 9. *A. crebricostata*; 10. *P. pilula*; 11. *S. gubernaculum*; 12. *Atuca navicularis*; 13. *Trisidos kiyonoi*

传上差异非常明显, 已完全达到亚种甚至种的水平。依据传统分类学方法(徐凤山等, 2008), 将蚶科分为2个亚科: 蚶亚科和粗饰蚶亚科, 共12属, 中国已发现50多种。魁蚶隶属于蚶科、粗饰蚶亚科、毛蚶属。

目前, 可用于系统发育分析的 mtDNA 基因主要有 *12S rRNA*、*16S rRNA*、*COI*、*COII*、*ND1*、*ND2* 和 *ND5* 等, 其中以 *16S rRNA*、*COI* 作为 DNA 条形码对物种系统发生关系的研究尤为普遍, 本研究选取了线粒体基因组中的 *COI* 和 *12S rRNA* 进行了魁蚶中国群体的分类学地位研究。从 GenBank 数据库中下载已经完成测序的蚶科 *COI* 和 *12S rRNA* 基因和本研究测序得到的魁蚶中国群体线粒体 *COI* 和 *12S rRNA* 基因序列, 分析其组成结构和变异特点, 通过构建蚶科贝类的系统发育树来探讨各物种间的系统发育关系, 并与传统蚶科分类作比较。

本研究从 *COI* 和 *12S rRNA* 这2个基因上分析, 魁蚶中日群体的遗传距离很小, 密码子使用率和碱基组成等相似度高, 进化树中魁蚶中国群体和日本群体聚为一支, 亲缘关系很近, 说明魁蚶中国群体与传统的蚶科分类中魁蚶日本群体的分类地位相同, 隶属于蚶科、粗饰蚶亚科、毛蚶属。本研究初步探索了魁蚶中国群体的分子系统进化地位, 有利于掌握魁蚶的遗传背景和资源状况, 为魁蚶种质资源的管理、保护与合理利用提供理论基础, 从而推动魁蚶养殖业的发展。虽然 *COI* 和 *12S rRNA* 基因能够将魁蚶中国群体进行

定位, 但由于本研究所选取的物种分布不均、数量有限, 且仅凭单基因对魁蚶中国群体进行定位有其不足之处。要更加系统地对魁蚶中国群体进行分类, 还需借助于其他的分子标记或与其他基因联合分析。

## 参 考 文 献

- Brown WM. The mitochondrial genome of animals. In: Macintyre RJ (ed) Molecular evolutionary genetics. Plenum Press, New York, 1985, 95–130
- Chang YQ, Wang ZC. A preliminary study on the oxygen consumption rate of ark-shell *Scapharca broughtonii*. Fisheries Science, 1992(12): 1–6 [常亚青, 王子臣. 魁蚶耗氧率的初步研究. 水产科学, 1992(12): 1–6]
- Cho ES, Jung CG, Sohn SG, et al. Population genetic structure of the ark shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia Based on *COI* gene sequences. Marine Biotechnology, 2007, 9(2): 203–216
- Cui WT, Liu LQ, Li HM, et al. Phylogenetic study of Octopodinae in the China seas based on *COII* partial sequences. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(3): 21–28 [崔文涛, 刘立芹, 李红梅, 等. 基于 *COII* 基因序列的中国近海12种蛸亚科动物的分子系统进化研究. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 21–28]
- Hou Y, Wu B, Liu ZH, et al. Complete mitochondrial genome of Ark shell *Scapharca subcrenata*. Mitochondrial DNA, 2016, 27(2): 939–940
- Jin XX, Sun YN, Wang RX, et al. Characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genome in the

- gobies. *Hereditas*, 2013, 35(12): 1391–1402 [金逍逍, 孙悦娜, 王日昕, 等. 虾虎鱼类线粒体全基因组序列结构特征分析及系统发育关系探讨. *遗传*, 2013, 35(12): 1391–1402]
- Kong XY, Jiang YY, Xiang JH, *et al.* Sequencing and potential uses of mitochondrial *16S rRNA* and *COI* gene fragments in blood clam *Scapharca broughtonii*. *Marine Sciences*, 2001, 25(12): 46–48 [孔晓瑜, 姜艳艳, 相建海, 等. 魁蚶线粒体 *16S rRNA* 和 *COI* 基因片段序列测定及其应用前景. *海洋科学*, 2001, 25(12): 46–48]
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: Molecular evolutionary genetic analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 244–245
- Liang C, Yang AG, Liu ZH, *et al.* RAPD analysis of genetic variations in four geographical populations of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 59–64 [梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 59–64]
- Liang RS, Liang ZG, Fang HH, *et al.* Molecular phylogenetic relationships of 16 sweetlips fishes based on the sequence of NADH dehydrogenase subunit I gene. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(10): 25–32 [梁日深, 梁志刚, 方浩航, 等. 基于 *ND1* 基因序列的 16 种胡椒鲷鱼类分子系统进化关系研究. *海洋学报*, 2014, 36(10): 25–32]
- Liu YG, Kurokawa T, Sekino M, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequence of the ark shell *Scapharca broughtonii*: An ultra-large metazoan mitochondrial genome. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics*, 2013, 8(1): 72–81
- Liu YG, Kurokawa T, Sekino M, *et al.* Tandem repeat arrays in the mitochondrial genome as a tool for detecting genetic differences among the ark shell *Scapharca broughtonii*. *Marine Ecology-An Evolutionary Perspective*, 2014, 35(3): 273–280
- Mjelle KA, Karlsen BO, Jorgensen TE, *et al.* Halibut mitochondrial genomes contain extensive heteroplasmic tandem repeat arrays involved in DNA recombination. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 10
- Nelson JS. *Fishes of the world*. 4th ed. New York: John Wiley and Sons, 2006
- Serb JM, Lydeard C. Complete mtDNA sequence of the North American freshwater mussel, *Lampsilis ornata* (Unionidae): An examination of the evolution and phylogenetic utility of mitochondrial genome organisation in Bivalvia (Mollusca). *Molecular Biology & Evolution*, 2003, 20(11): 1854–1866
- Smith DR, Snyder M. Complete mitochondrial DNA sequence of the scallop *Placopecten magellanicus*: Evidence of transposition leading to an uncharacteristically large mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 2007, 65(4): 380–391
- Sun N, Li Q, Yu H, *et al.* Parentage determination of *Scapharca broughtonii* based on microsatellite analysis. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(9): 42–48 [孙楠, 李琪, 于红, 等. 利用微卫星标记的魁蚶混交家系鉴定. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(9): 42–48]
- Sun S, Kong L, Yu H, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Scapharca kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(6): 957–9588
- Sun Y. Phylogenetic analysis of Salmonidae based on mitochondrial genes *COX1*, *Cytb* and *ND4*. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2015, 36(9): 9–17 [孙毅. 基于线粒体基因 *COX1*、*Cytb* 和 *ND4* 的鲑科鱼类的系统发育. *畜牧与饲料科学*, 2015, 36(9): 9–17]
- Wang Y, Wu ZH, Li HY, *et al.* Analysis and evaluation of nutrition composition in soft tissue of *Anadara uropygimelana*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 133–139 [王颖, 吴志宏, 李红艳, 等. 青岛魁蚶软体部营养成分分析及评价. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 133–139]
- Wang ZC, Zhang GF, Gao YM, *et al.* The effects of temperature and foods on the development of gonad of the blood cockle, *Arca inflata*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 1987, 8(2): 1–10 [王子臣, 张国范, 高悦勉, 等. 温度和饵料对魁蚶性腺发育的影响. *大连水产学院学报*, 1987, 8(2): 1–10]
- Wu B, Yang AG, Liu ZH, *et al.* The relationship between morphometric traits and body weight of *Scapharca broughtonii* in two different populations. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 54–59 [吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(6): 54–59]
- Xu FS, Zhang SP. *Marine bivalve in Chinese*. Beijing: Science Press, 2008, 27–45 [徐凤山, 张素萍. *中国海产双壳类图志*. 北京: 科学出版社, 2008, 27–45]
- Xu K, Kanno M, Yu H, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequence and phylogenetic analysis of Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia: Pectinidae). *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(5): 3067–3074
- Yang Q, Li Q, Nie HT, *et al.* Artificial induction of gynogenesis in *Scapharca broughtonii*. *Marine Sciences*, 2011, 35(10): 11–15 [杨青, 李琪, 聂鸿涛, 等. 魁蚶雌核发育的人工诱导. *海洋科学*, 2011, 35(10): 11–15]
- Yao HW, Guo J, Jing NN. Culture status and research progress on genetic diversity of *Scapharca broughtonii*. *Hebei Fisheries*, 2010(5): 45–47 [姚红伟, 郭晋, 景娜娜. 魁蚶增殖养殖状况及遗传多样性研究进展. *河北渔业*, 2010(5): 45–47]
- Yokogawa K. Morphological and genetic differences between Japanese and Chinese red ark shell *Scapharca broughtonii*. *Fisheries Science*, 1997, 63(3): 332–337
- Yu Z, Wei Z, Kong X, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequence of oyster *Crassostrea hongkongensis*-a case of "Tandem duplication-random loss" for genome rearrangement in Crassostrea? *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 477
- Yu ZN, Kong XY, Yang R, *et al.* Allozyme variation in populations of *Scapharca broughtonii*. *Journal of Ocean*

- University of Qingdao, 1998, 28(1): 51–58 [喻子牛, 孔晓喻, 杨锐, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)等位基因酶遗传变异研究. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 51–58]
- Yu ZN, Yang R, Kong XY, *et al.* Investigation of allozyme variation in bloody clam (*Scapharca broughtonii* Schrenck) from Qingdao coastal waters. Transactions of Oceanology and Limnology, 1998(3): 471–476 [喻子牛, 杨锐, 孔晓瑜, 等. 青岛近海毛蚶群体等位基因酶遗传变异. 中国水产科学, 1998(3): 471–476]
- Zhang QG, Wang SJ, Liao GR, *et al.* Artificial breeding technology of *Scapharca broughtonii*. Shandong Fisheries, 2003(8): 22–23 [张启刚, 王书军, 缪国荣, 等. 魁蚶人工育苗技术. 齐鲁渔业, 2003(8): 22–23]
- Zhang YX, Zhou XJ, Jiang HB, *et al.* Investigation on the ecological habits of *Scapharca broughtonii* from Shandong coastal waters. The collection of shellfish (5–6th series), Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1995 [张玉玺, 周学家, 姜海滨, 等. 山东近海魁蚶生态习性的调查. 贝类学论文集(第五–六辑). 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995]
- Zhou W, Liu YB, Li K, *et al.* Observation of burrowing behavior and ability of spat with different sizes in *Scapharca broughtonii* Schrenck. Journal of Dalian Fisheries University, 2011, 26(6): 550–553 [周玮, 刘一兵, 李坤, 等. 魁蚶苗种的潜沙行为观察. 大连海洋大学学报, 2011, 26(6): 550–553]
- Zou Y, Zheng YY, Qiu ZX, *et al.* Technology on maturation inducement and healthy seed rearing of *Scapharca broughtonii*. Fisheries Science & Technology Information, 2010, 37(2): 95–98 [邹琰, 郑永允, 邱兆星, 等. 魁蚶亲贝促熟与健康苗种培育技术. 水产科技情报, 2010, 37(2): 95–98]

(编辑 冯小花)

## The Taxonomic Status of Chinese Population of *Scapharca broughtonii* Based on Sequences of *COI* and *12S rRNA* Genes

LI Yaoyao<sup>1</sup>, LIU Yunguo<sup>1,2①</sup>, LIU Xiaoling<sup>1</sup>, LIU Lingxiao<sup>3</sup>, MA Chao<sup>4</sup>

(1. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005; 2. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046; 3. Linyi Academy of Agricultural Sciences, Linyi 276012; 4. Yantai Lanbai Dining Co., Ltd., Yantai 264001)

**Abstract** There still exists considerable controversy regarding the taxonomic status of different geographical populations of *Scapharca broughtonii* in Northeast Asia. To study the taxonomic status of the Chinese population of *S. broughtonii*, the mitochondrial genomic *COI* and *12S rRNA* sequences of the Chinese population of *S. broughtonii* were determined using PCR amplification and sequencing. To analyze the molecular phylogenetic relationships and classification, the homologous sequences of 26 species of shellfish were downloaded from GenBank, the molecular phylogenetic trees of *COI* and *12S rRNA* of Arcidae molluscs were constructed using the neighbor-joining and maximum-parsimony methods with *Mytilus edulis* as the outgroup taxa. The results showed that the base composition, codon utilization, and mutation locus of *COI* and *12S rRNA* genes were similar to those of the Japanese population of *S. broughtonii* and *A. sativa*, while the genetic distance was small, showing the genetic relationship was close. The classification status of the Chinese population of *S. broughtonii* was consistent with that of *S. broughtonii*. The purpose of this research was to better understand the arkshell genetic background and resources, to protect the natural resources, and promote the development of aquaculture.

**Key words** *Scapharca broughtonii*; *COI* and *12S rRNA*; Phylogeny; Taxonomic status

① Corresponding author: LIU Yunguo, E-mail: yguoliu@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171106001

http://www.yykxjz.cn/

涂佑欢, 张曦, 陶琳丽, 杨秀娟, 邓君明. 橡胶籽油替代豆油对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能、消化酶活性及部分生化指标的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 81-90

Tu YH, Zhang X, Tao LL, Yang XJ, Deng JM. Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on growth performance, digestive enzyme activities, and partial biochemical indices of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 81-90

## 橡胶籽油替代豆油对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 生长性能、消化酶活性及部分生化指标的影响\*

涂佑欢 张 曦 陶琳丽 杨秀娟 邓君明<sup>①</sup>

(云南农业大学动物科学技术学院 昆明 650201)



**摘要** 为研究橡胶籽油替代豆油对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能、消化酶活性、血脂水平、蛋白质代谢及抗氧化功能的影响,分别以橡胶籽油替代0(对照组)、25%、50%、75%和100%豆油配制5种等氮等能饲料,进行10周饲养实验。实验显示,0~50%替代组草鱼增重率、日增重系数显著高于100%替代组( $P<0.05$ )。随着橡胶籽油替代豆油比例的升高,饲料系数呈先下降后上升的趋势,其中,25%替代组饲料系数最低,显著低于50%~100%替代组( $P<0.05$ );25%替代组蛋白质效率最高,显著高于其他处理组( $P<0.05$ )。随着橡胶籽油替代比例的升高,肠道胰蛋白酶、脂肪酶活性呈先上升后下降的趋势,其中,25%替代组脂肪酶活性最高,显著高于其他处理组( $P<0.05$ ),50%替代组胰蛋白酶活性最高,显著高于对照组、75%和100%替代组( $P<0.05$ )。0~50%替代组肝脏胰脏蛋白酶活性显著高于75%和100%替代组( $P<0.05$ )。25%~100%替代组血清总胆固醇(TC)含量显著低于对照组( $P<0.05$ )。随着橡胶籽油替代比例的升高,肝脏天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性呈先下降后上升的趋势,其中,25%替代组AST、ALT活性最低,显著低于对照组和100%替代组( $P<0.05$ )。0~25%替代组血浆总抗氧化力(TAC)显著低于75%和100%替代组( $P<0.05$ )。对照组血浆、肝脏丙二醛(MDA)含量显著高于100%替代组( $P<0.05$ )。由此可知,橡胶籽油替代25%~50%豆油对草鱼生长性能、饲料利用率、血脂水平、抗氧化功能指标均无不良影响;但替代超过50%时显著降低草鱼生长性能和消化酶活性。

**关键词** 草鱼; 橡胶籽油; 豆油; 生长性能; 消化酶活性; 抗氧化功能

**中图分类号** S963.71 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0081-10

豆油是世界上产量最大的植物油,是鱼类饲料中常用的优质脂肪源(胡水鑫等,2012)。然而,随着饲料工业和水产养殖业的快速发展,豆油消耗量与日俱增,价格大幅度上涨,其在水产饲料中的使用量逐渐

受到限制,如何用其他更加优质、廉价的脂肪源部分或全部替代豆油已成为水产饲料行业的研究热点(Xing *et al*, 2004)。

橡胶树是一种重要的经济树种,全世界40多个

\* 云南农业大学杰出人才专项(2015JY04)和云南省淡水渔业产业技术体系专项(2017KJT0019) [This work was supported by Special Talents of Yunnan Agricultural University (2015JY04), and Special Technical System of Freshwater Fishery Industry in Yunnan Province(2017KJT0019)]. 涂佑欢, E-mail: 1129298431@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 邓君明, 教授, E-mail: djunming@163.com

收稿日期: 2017-11-06, 收修改稿日期: 2017-12-09

国家和地区均有大量种植,面积近 1000 万  $\text{hm}^2$ ,其中,90%种植区域集中在东南亚,以印度尼西亚、泰国、中国等为主(郭志勇等,2009)。中国橡胶种植区域主要集中在云南省、海南省和广东省,若按 25%~38%的种子出油率计算,仅 2013 年我国就可产橡胶籽油 55.97 万 t,产量相当可观(郑云武等,2016)。然而,我国每年约 95%橡胶籽被废弃于橡胶林中,未得到有效利用,造成资源严重浪费。橡胶籽油中不饱和脂肪酸含量为 74.52%,饱和脂肪酸含量为 25.24%。此外,橡胶籽油中富含  $\alpha$ -亚麻酸(20%~24%),是大豆油和菜籽油的 3~4 倍(赵瀛华等,2013)。研究表明,长期食用橡胶籽油具有明显降低血脂的功能(刘超然等,1983),对大鼠(*Rattus norvegicus*)胚胎发育无明显致畸和毒副作用(杨丽萍等,2003),对鸡(*Gallus domesticus*)平均日增重和饲料转化率无显著影响(Nwokolo *et al.*, 1989),可明显提高虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生长性能和饲料利用率(王坤等,2017)。因此,橡胶籽油可作为优质脂肪替代源,但迄今为止鲜见橡胶籽油在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)饲料中的应用。

草鱼是我国四大家鱼之一,因其生长速度快、饲料来源广、肉质细嫩、肌间刺少,在国内有大量养殖。近年来,有关草鱼的研究主要集中在营养需求和健康养殖等方面,对草鱼饲料中橡胶籽油替代豆油的研究尚未见报道。因此,本研究选用草鱼为研究对象,于饲料中添加不同比例的橡胶籽油,研究其对草鱼生长性能、消化酶活性、血脂水平、蛋白质代谢及抗氧化功能的影响,以期为进一步开发橡胶籽油在水产饲料中的应用提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

实验以豆粕为蛋白源,豆油、橡胶籽油为脂肪源,配制 5 种等氮(32%)等能(20 MJ/g)饲料。其中,0 替代组草鱼饲料未添加橡胶籽油,作为对照组;25%~100%替代组草鱼饲料橡胶籽油添加量分别为 1.4%~5.4%替代 25%~100%豆油,饲料配方和营养组成见表 1,脂肪酸组成见表 2。

配制饲料前,所有原料经粉碎机(SFSP 系列,昆明华明粮油饲料设备厂生产)粉碎,且全部过 60 目筛。将粉碎好的饲料原料按表 1 饲料配方混合均匀,加入豆油、橡胶籽油和大豆卵磷脂(先溶于豆油或橡胶籽油中),手工将油脂微小颗粒搓散,于塑料薄膜袋中手工混合均匀,最后加入适量蒸馏水使粉状饲料形成硬团,于颗粒饲料机(SKJ-200,济南牧农机械有限公

表 1 实验饲料配方和营养组成(%干物质基础)  
Tab.1 Formula and nutrient composition of experimental diets (% dry-matter basis)

原料 Ingredients	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
豆粕 Soybean meal <sup>1</sup>	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
次粉 Wheat shorts <sup>1</sup>	34.54	34.54	34.54	34.54	34.54
草粉 Grass meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -Starch	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
大豆卵磷脂 Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
豆油 Soy oil	5.40	4.00	2.70	1.40	0.00
橡胶籽油 Rubble seed oil	0.00	1.40	2.70	4.00	5.40
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
维生素 C Vitamin C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
氯化钠 NaCl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
氯化胆碱(40%) Choline chloride	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
维生素预混料 Vitamin premix <sup>2</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 Mineral premix <sup>3</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
蛋氨酸 Met	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
赖氨酸 Lys	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
组氨酸 His	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
抗氧化剂 Antioxidant	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
营养组成 Nutrient composition					
干物质 Dry matter (%DM)	89.84	88.28	89.77	88.10	88.63
粗蛋白 Crude protein (%DM)	32.96	32.84	32.59	32.88	32.69
粗脂肪 Crude lipid(%DM)	7.09	7.31	7.17	7.48	7.38
粗灰分 Crude ash (%DM)	6.05	6.00	5.93	5.98	5.96
总能 Gross energy(MJ/g)	20.19	19.84	19.89	19.91	19.90

注:1. 由云南昆明田园有限公司提供。豆粕:水分 10.65%,粗蛋白 50.38%,粗脂肪 0.68%;次粉:水分 12.65%,粗蛋白 18.28%,粗脂肪 0.86%

2. 维生素预混料(g/kg): V<sub>A</sub>, 2; V<sub>D3</sub>, 0.03; V<sub>E</sub>, 30; V<sub>K</sub>, 3; V<sub>B12</sub>, 0.02; 盐酸硫胺, 8; 核黄素, 11; 盐酸吡哆醇, 8; 抗坏血酸, 50; 生物素, 0.1; 烟酸, 30; 泛酸钙, 32; 肌醇, 25

1. Supplied by Kunming Tianyuan Feed Co., Ltd.: Soybean meal: moisture 10.65%, crude protein 50.38%, crude lipid 0.68%; Wheat shorts, moisture 12.65%, crude protein 18.28%, crude lipid 0.86%

2. Vitamin premix (g/kg): V<sub>A</sub>, 2; V<sub>D3</sub>, 0.03; V<sub>E</sub>, 30; V<sub>K</sub>, 3; V<sub>B12</sub>, 0.02; Thiamine hydrochloride, 8; Riboflavin, 11; Pyridoxine HCl, 8; Ascorbic acid, 50; Biotin, 0.1; Niacin acid, 30; Pantothenic acid, 32; Inositol, 25

3. 矿物质预混料 Mineral premix(g/kg): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 180; KI, 1; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 260; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 180; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 25; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 180; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.75

表2 实验饲料脂肪酸组成(%总脂肪酸)  
Tab.2 Fatty acid composition of experimental diets (% total fatty acids)

项目 Items	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
月桂酸 C12:0	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18
豆蔻酸 C14:0	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18
软脂酸 C16:0	11.77	11.02	10.34	9.67	8.96
硬脂酸 C18:0	4.13	5.44	6.63	7.79	9.02
花生酸 C20:0	0.19	0.22	0.24	0.26	0.28
油酸 C18:1n-9	23.02	22.34	21.72	21.11	20.48
亚油酸 C18:2n-6	53.97	50.84	48.00	45.21	42.28
亚麻酸 C18:3n-3	6.54	9.73	12.62	15.45	18.43
花生一烯酸 C20:1n-9	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18
n-3/n-6	0.12	0.19	0.26	0.34	0.44

司生产)中将饲料挤压成直径为 1.0 mm 的条状, 40℃ 恒温干燥 12 h, 置于-20℃ 冰箱保存备用。

## 1.2 实验动物及饲养管理

实验用草鱼由云南省玉溪市元江县鱼种技术推广站提供, 实验于云南农业大学动物科学技术学院水产养殖实验室进行。采用室内网箱养殖, 养殖用水为曝气除氯自来水。实验前, 先将草鱼幼鱼用商业饲料暂养 2 周以适应养殖环境。

实验开始时将草鱼禁食 24 h, 然后选择初始平均体重为(5.80±0.01) g、体长为(6.41±0.11) cm 草鱼幼鱼 600 尾, 随机分于 15 个养殖网箱(0.9 m×0.9 m×1.0 m), 5 个处理组, 每组 3 个重复, 每网箱 40 尾鱼进行实验。养殖周期为 10 周, 早晚饱食投饵 2 次(07:00, 17:00)。整个养殖实验期间连续充氧, 自然光照, 水温保持在 24~26℃。

## 1.3 样品收集

养殖实验开始时, 随机挑取草鱼幼鱼 30 尾置于-20℃ 冰箱保存备用。养殖实验结束后, 禁食 24 h, 对每个重复组草鱼进行计数并称量。从每网箱中随机抽取 8 尾草鱼, 用丁香酚(1:10000)麻醉, 从尾静脉用注射器采集血液, 血清置于普通离心管, 血浆置于抗凝剂肝素钠离心管中, 4℃、4000 r/min 离心 10 min, 取得血清、血浆上清液, 置于-80℃ 冰箱保存待测。草鱼采血后在冰盘上解剖, 取完整肝胰脏、肠道, 迅速置于密封袋中, -80℃ 下保存。另外, 每组再处死 4 条鱼进行全鱼鱼体成分分析。

## 1.4 分析测定

鱼体和饲料粗蛋白质、粗脂肪、粗灰分测定参照

AOAC 测定方法。粗蛋白采用凯氏定氮法(N×6.25); 粗脂肪采用索氏抽提法; 粗灰分采用马福炉 550℃ 灼烧法(16 h); 总能采用氧弹式测量热仪(PARR6300, 美国)测定。饲料水分采用 103℃ 常压烘箱干燥法(16 h)测定; 鱼体水分采用冷冻干燥机(FD-1C-50, 北京博医康实验仪器有限公司)测定。饲料脂肪酸组成成分采用高效气相色谱仪(GC-2014, 日本岛津公司)测定。

血浆、肝胰脏谷氨酸脱氢酶(GDH)采用固相夹心酶联免疫吸附法(ELISA 试剂盒)测定, 购自 R&D 公司。其他血液、肝胰脏和肠道生理生化指标的测定, 均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行。测定指标包括胰蛋白酶、二糖酶、脂肪酶(LPS)、淀粉酶(AMS)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、尿素氮(BUN)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷氨酰转移酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、一氧化氮(NO)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GR)、总抗氧化能力(TAC)、丙二醛(MDA)以及总蛋白等。低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)采用 Friedewald 等(1972)公式计算得到。匀浆液的制备, 准确称取一定量的肝脏、肠道组织, 用 0.87% 的生理盐水按质量体积比 1:9 进行匀浆, 4℃ 下 4000 r/min 离心 12 min。详细操作见南京生物工程研究所提供的试剂盒说明书。

## 1.5 计算与统计分析

增重率(WGR) = (末重 - 初重) / 初重

日增重系数(DGC, %/d) =

$$100 \times (\text{末重}^{1/3} - \text{初重}^{1/3}) / \text{饲养天数}$$

摄食量(FI, g/fish) =

$$\text{采食饲料} / (\text{初始尾数} + \text{终末尾数}) / 2$$

平均代谢体重(MBW) =

$$[\text{初重}(\text{g}) / 1000]^{0.75} + [\text{末重}(\text{g}) / 1000]^{0.75} / 2$$

摄食率(FR, g/kg MBW/d) =

$$\text{摄食量} / \text{平均代谢体重} / \text{饲养天数}$$

饲料系数(FCR) =

$$\text{采食干重饲料重}(\text{g}) / \text{鱼体湿增重}(\text{g})$$

蛋白质效率(PER, %) =

$$100 \times \text{鱼体湿增重}(\text{g}) / \text{采食蛋白重}(\text{g})$$

成活率(SR, %) = 100 × 终末尾数 / 初始尾数

表中所有数据均表示平均值 ± 标准误(Mean ± SE)。

统计分析前所有百分率均先经 Arcsine 转换。使用单因素方差分析(One-way ANOVA), 当组间差异显著时( $P < 0.05$ ), 用 Duncan's 检验进行多重比较。所有统计分析均采用 SPSS 17.0 软件进行处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 橡胶籽油替代豆油对草鱼生长性能的影响

养殖实验期间,各处理组草鱼成活率为95%~100%,不同处理组成活率无显著性差异(表3)。随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼末重、增重率和日增重系数呈下降趋势,其中,100%替代组末重、增重率和日增重系数显著低于0~50%替代组( $P<0.05$ )。随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼饲料系数呈先下降后上升的趋势,其中,25%替代组饲料系数最低,显著低于50%~100%替代组( $P<0.05$ );25%替代组蛋白质效率最高,显著高于其他处理组( $P<0.05$ )。

### 2.2 橡胶籽油替代豆油对草鱼消化酶活性的影响

随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼肠道淀粉酶和二糖酶活性呈下降趋势,其中,100%替代组肠道淀粉酶活性显著低于对照组和25%替代

组( $P<0.05$ ),100%替代组肠道二糖酶活性显著低于对照组( $P<0.05$ )(表4)。随着饲料中橡胶籽油替代比例的提高,草鱼肠道胰蛋白酶和脂肪酶活性呈先上升后下降的趋势,其中,50%替代组肠道胰蛋白酶活性最高,显著高于对照组、75%和100%替代组( $P<0.05$ ),25%替代组肠道脂肪酶活性最高,显著高于其他处理组( $P<0.05$ )。

0~50%替代组草鱼肝胰脏胰蛋白酶活性显著高于75%和100%替代组( $P<0.05$ )。0~50%替代组肝胰脏淀粉酶活性显著低于75%和100%替代组( $P<0.05$ )。对照组草鱼肝胰脏二糖酶活性显著高于其他替代组( $P<0.05$ )。

### 2.3 橡胶籽油替代豆油对草鱼血脂水平的影响

25%~100%替代组草鱼血清TC、HDL-C含量显著低于对照组( $P<0.05$ ),50%和100%替代组血清LDL-C含量显著低于对照组( $P<0.05$ )(表5)。对照组血清TG、LDL-C/HDL-C与其他替代组相比无显

表3 橡胶籽油替代豆油对草鱼生长性能的影响

Tab.3 Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on growth performance of *C. idellus*

项目 Items	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
末重 FW (g)	29.86±0.23 <sup>a</sup>	27.25±0.61 <sup>ab</sup>	27.20±0.14 <sup>ab</sup>	24.69±0.55 <sup>bc</sup>	23.56±0.66 <sup>c</sup>
增重率 WGR	4.15±0.04 <sup>a</sup>	3.70±0.10 <sup>ab</sup>	3.70±0.04 <sup>ab</sup>	3.28±0.07 <sup>bc</sup>	3.11±0.10 <sup>c</sup>
日增重系数 DGC (%/d)	1.87±0.02 <sup>a</sup>	1.73±0.03 <sup>ab</sup>	1.73±0.01 <sup>ab</sup>	1.60±0.03 <sup>bc</sup>	1.54±0.04 <sup>c</sup>
摄食量 FI (g/fish)	36.91±1.44 <sup>a</sup>	30.44±0.59 <sup>ab</sup>	34.77±0.47 <sup>ab</sup>	30.72±0.83 <sup>ab</sup>	28.27±0.87 <sup>b</sup>
摄食率 FR (g/kg MBW/d)	11.36±0.80	9.88±0.32	11.29±0.13	10.55±0.14	9.97±0.15
饲料系数 FCR	1.54±0.07 <sup>ab</sup>	1.42±0.04 <sup>b</sup>	1.62±0.01 <sup>a</sup>	1.62±0.01 <sup>a</sup>	1.59±0.01 <sup>a</sup>
蛋白质效率 PER (%)	1.99±0.09 <sup>b</sup>	2.15±0.06 <sup>a</sup>	1.90±0.01 <sup>c</sup>	1.87±0.01 <sup>c</sup>	1.93±0.01 <sup>c</sup>
成活率 SR (%)	97.5±1.40	96.3±2.20	95.0±1.40	98.8±0.70	100.0±0.00

注:同行上标不同字母代表显著差异( $P<0.05$ ),下同

Notes: Means in the same row with different upper letter indicated significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

表4 橡胶籽油替代豆油对草鱼肠道和肝胰脏消化酶活性的影响

Tab.4 Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on intestine and hepatopancreas digestive enzyme activities of *C. idellus*

项目 Items	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
肠道 Intestine					
胰蛋白酶 Trypsin (U/μg protein)	3.05±0.03 <sup>b</sup>	3.77±0.02 <sup>ab</sup>	4.02±0.15 <sup>a</sup>	3.26±0.06 <sup>b</sup>	2.50±0.08 <sup>c</sup>
脂肪酶 Lipase (U/mg protein)	8.16±0.67 <sup>b</sup>	12.62±1.13 <sup>a</sup>	7.79±0.91 <sup>bc</sup>	4.61±0.20 <sup>cd</sup>	2.94±0.27 <sup>d</sup>
淀粉酶 Amylase (U/mg protein)	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.01 <sup>b</sup>	0.19±0.01 <sup>c</sup>	0.19±0.01 <sup>c</sup>	0.18±0.00 <sup>c</sup>
二糖酶 Disaccharidase (U/g protein)	8.25±0.74 <sup>a</sup>	4.98±0.08 <sup>b</sup>	5.08±0.22 <sup>b</sup>	4.53±0.26 <sup>b</sup>	3.53±0.14 <sup>b</sup>
肝胰脏 Hepatopancreas					
胰蛋白酶 Trypsin (U/μg protein)	1.38±0.01 <sup>a</sup>	1.31±0.15 <sup>a</sup>	1.27±0.06 <sup>a</sup>	0.62±0.06 <sup>b</sup>	0.58±0.06 <sup>b</sup>
淀粉酶 Amylase (U/mg protein)	0.37±0.02 <sup>b</sup>	0.38±0.01 <sup>b</sup>	0.35±0.03 <sup>b</sup>	0.49±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.01 <sup>a</sup>
二糖酶 Disaccharidase (U/g protein)	24.70±0.93 <sup>a</sup>	11.45±0.68 <sup>bc</sup>	8.21±0.49 <sup>c</sup>	12.37±0.17 <sup>b</sup>	12.16±1.51 <sup>bc</sup>

表5 橡胶籽油替代豆油对草鱼血脂水平的影响

Tab.5 Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on serum lipid levels of *C. idellus*

项目 Items	0	25%	50%	75%	100%
甘油三酯 TG (mmol/L)	3.06±0.10 <sup>ab</sup>	2.80±0.05 <sup>b</sup>	2.95±0.07 <sup>ab</sup>	3.70±0.03 <sup>a</sup>	3.39±0.07 <sup>ab</sup>
总胆固醇 TC (mmol/L)	8.42±0.20 <sup>a</sup>	6.34±0.30 <sup>b</sup>	6.45±0.08 <sup>b</sup>	6.54±0.29 <sup>b</sup>	6.61±0.51 <sup>b</sup>
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C (mmol/L)	5.20±0.30 <sup>a</sup>	3.30±0.14 <sup>c</sup>	4.15±0.03 <sup>b</sup>	3.78±0.18 <sup>bc</sup>	4.23±0.15 <sup>b</sup>
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C (mmol/L)	2.62±0.07 <sup>a</sup>	2.48±0.30 <sup>ab</sup>	1.71±0.04 <sup>b</sup>	2.03±0.11 <sup>ab</sup>	1.71±0.28 <sup>b</sup>
LDL-C/HDL-C	0.51±0.04 <sup>ab</sup>	0.76±0.10 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>b</sup>	0.57±0.09 <sup>ab</sup>	0.40±0.05 <sup>b</sup>

著差异( $P>0.05$ )。

#### 2.4 橡胶籽油替代豆油对草鱼蛋白质代谢的影响

随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼血浆总蛋白含量呈上升趋势,其中,75%替代组血浆总蛋白含量显著高于对照组和25%替代组( $P<0.05$ )。血浆BUN含量呈下降趋势,其中,100%替代组显著低于其他处理组( $P<0.05$ )(表6)。随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼血浆GGT活性呈先上升后下降的趋势,其中,50%替代组血浆GGT活性最高,显著高于对照组、75%和100%替代组( $P<0.05$ )。血浆GDH活性呈先下降后上升的趋势,其中,50%替代组血浆GDH活性最低,显著低于对照组、75%和100%替代组( $P<0.05$ )。各实验组血浆ALT活性无显著差异( $P>0.05$ )。50%替代组血浆AST活力显著高于对照组和75%替代组( $P<0.05$ )。

随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼肝胰脏GGT和GDH活性呈下降趋势,其中,100%替代组肝胰脏GGT活性显著低于对照组和25%替代组( $P<0.05$ ),100%替代组肝胰脏GDH活性显著低于

对照组、25%和50%替代组。此外,随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼肝胰脏AST、ALT活性呈先下降后上升的趋势,其中,25%替代组肝胰脏AST、ALT活性最低,显著低于对照组和100%替代组( $P<0.05$ )。

#### 2.5 橡胶籽油替代豆油对草鱼抗氧化功能的影响

随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例的提高,草鱼血浆TAC活性呈上升趋势,其中,100%替代组血浆TAC活性显著高于对照组和25%替代组( $P<0.05$ )。血浆MDA含量呈下降趋势,其中,100%替代组血浆MDA含量显著低于对照组和25%替代组( $P<0.05$ )(表7)。不同处理组草鱼血浆NO、GR活性无显著差异( $P>0.05$ )。对照组血浆GSH-Px活性最高,显著高于其他替代组( $P<0.05$ )。25%替代组血浆POD活性最低,显著低于其他替代组( $P<0.05$ )。对照组血浆CAT活性显著低于50%和100%替代组( $P<0.05$ )。

随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例提高,草鱼肝胰脏MDA含量呈下降趋势,其中,100%替代组肝胰脏MDA含量显著低于其他处理组( $P<0.05$ )。75%替

表6 橡胶籽油替代豆油对草鱼蛋白质代谢指标的影响

Tab.6 Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on protein metabolism indices of *C. idellus*

项目 Items	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
血浆 Plasma					
总蛋白 Total protein (g/L)	36.55±0.55 <sup>c</sup>	42.73±0.22 <sup>b</sup>	50.70±1.51 <sup>a</sup>	52.56±1.73 <sup>a</sup>	48.91±0.94 <sup>a</sup>
尿素氮 BUN (mmol/L)	2.66±0.11 <sup>a</sup>	2.88±0.06 <sup>a</sup>	2.77±0.18 <sup>a</sup>	3.09±0.12 <sup>a</sup>	2.02±0.12 <sup>b</sup>
天门冬氨酸氨基转移酶 AST (U/ml)	17.87±0.17 <sup>bc</sup>	22.05±0.36 <sup>abc</sup>	29.28±2.70 <sup>a</sup>	14.75±0.29 <sup>c</sup>	26.32±1.61 <sup>ab</sup>
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/ml)	13.03±0.11	15.60±1.45	14.52±0.67	14.38±0.18	13.30±0.33
谷氨酰转移酶 GGT (U/ml)	1.63±0.13 <sup>c</sup>	4.65±0.54 <sup>a</sup>	5.12±0.23 <sup>a</sup>	3.03±0.14 <sup>b</sup>	1.63±0.13 <sup>c</sup>
谷氨酸脱氢酶 GDH (U/ml)	7.28±0.90 <sup>b</sup>	3.46±0.31 <sup>c</sup>	1.77±0.33 <sup>c</sup>	6.74±0.64 <sup>b</sup>	10.27±0.14 <sup>a</sup>
碱性磷酸 ALP (U/dl)	11.51±0.65 <sup>a</sup>	7.46±0.13 <sup>b</sup>	7.54±0.36 <sup>b</sup>	6.39±0.14 <sup>b</sup>	6.70±0.22 <sup>b</sup>
肝胰脏 Hepatopancreas					
天门冬氨酸氨基转移酶 AST (U/μg protein)	34.86±2.75 <sup>a</sup>	19.54±2.12 <sup>b</sup>	30.85±3.52 <sup>ab</sup>	35.96±3.07 <sup>a</sup>	41.68±0.37 <sup>a</sup>
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/μg protein)	24.63±0.76 <sup>a</sup>	5.54±0.45 <sup>c</sup>	7.12±0.40 <sup>c</sup>	7.58±0.87 <sup>c</sup>	13.45±2.48 <sup>b</sup>
谷氨酰转移酶 GGT (U/mg protein)	0.89±0.10 <sup>a</sup>	0.52±0.08 <sup>b</sup>	0.43±0.04 <sup>bc</sup>	0.20±0.05 <sup>c</sup>	0.15±0.01 <sup>c</sup>
谷氨酸脱氢酶 GDH (U/mg protein)	88.68±0.68 <sup>a</sup>	71.58±5.59 <sup>a</sup>	39.90±7.61 <sup>b</sup>	27.35±1.70 <sup>bc</sup>	16.93±0.50 <sup>c</sup>
碱性磷酸酶 ALP (U/g protein)	74.71±7.11 <sup>a</sup>	64.97±8.11 <sup>ab</sup>	49.91±2.98 <sup>b</sup>	48.76±1.13 <sup>b</sup>	51.70±1.45 <sup>ab</sup>



表7 橡胶籽油替代豆油对草鱼抗氧化功能的影响

Tab.7 Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on antioxidant capacities of *C. idellus*

项目 Items	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
血浆 Plasma					
一氧化氮 NO (mmol/L)	0.10±0.01	0.12±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01
过氧化氢酶 CAT (U/ml)	3.79±0.92 <sup>b</sup>	5.56±0.70 <sup>b</sup>	11.52±1.33 <sup>a</sup>	6.91±1.02 <sup>b</sup>	11.52±1.17 <sup>a</sup>
过氧化物酶 POD (U/ml)	33.11±0.64 <sup>b</sup>	25.34±1.02 <sup>c</sup>	35.56±0.77 <sup>b</sup>	102.8±1.41 <sup>a</sup>	108.4±1.44 <sup>a</sup>
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/ml)	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.00 <sup>b</sup>	0.26±0.01 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>b</sup>
谷胱甘肽还原酶 GR (U/ml)	28.94±1.86	26.22±2.85	26.72±1.15	25.72±2.56	28.93±3.71
总抗氧化能力 TAC (U/ml)	5.68±0.29 <sup>b</sup>	5.80±0.36 <sup>b</sup>	6.42±0.29 <sup>ab</sup>	7.28±0.07 <sup>a</sup>	7.29±0.12 <sup>a</sup>
丙二醛 MDA (μmol/L)	7.21±0.17 <sup>a</sup>	7.12±0.44 <sup>a</sup>	6.73±0.22 <sup>ab</sup>	6.54±0.22 <sup>ab</sup>	5.77±0.33 <sup>b</sup>
肝胰脏 Hepatopancreas					
过氧化氢酶 CAT (U/μg prot)	19.02±0.43 <sup>b</sup>	21.94±0.99 <sup>ab</sup>	18.97±1.41 <sup>b</sup>	23.83±1.12 <sup>a</sup>	26.07±0.28 <sup>a</sup>
过氧化物酶 POD (U/μg prot)	4.74±0.13 <sup>a</sup>	3.50±0.20 <sup>c</sup>	3.92±0.18 <sup>bc</sup>	4.63±0.19 <sup>ab</sup>	4.23±0.10 <sup>abc</sup>
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/μg prot)	1.67±0.04 <sup>b</sup>	1.68±0.02 <sup>ab</sup>	2.02±0.16 <sup>a</sup>	1.87±0.05 <sup>ab</sup>	1.65±0.03 <sup>b</sup>
谷胱甘肽还原酶 GR (U/mg prot)	53.25±0.74 <sup>a</sup>	18.71±0.66 <sup>d</sup>	22.94±0.91 <sup>d</sup>	41.41±3.05 <sup>b</sup>	32.31±1.79 <sup>c</sup>
总抗氧化能力 TAC (U/μg prot)	1.39±0.08 <sup>a</sup>	0.79±0.10 <sup>b</sup>	0.82±0.10 <sup>b</sup>	1.44±0.03 <sup>a</sup>	1.04±0.14 <sup>ab</sup>
丙二醛 MDA (μmol/g prot)	1.75±0.08 <sup>a</sup>	1.75±0.02 <sup>a</sup>	1.64±0.09 <sup>a</sup>	1.60±0.09 <sup>a</sup>	1.09±0.02 <sup>b</sup>

代组 TAC 活性显著高于 25% 和 50% 替代组 ( $P < 0.05$ )。此外, 随着饲料中橡胶籽油替代豆油比例提高, 草鱼肝胰脏 GSH-Px 活性呈先上升后下降的趋势, 其中, 50% 替代组 GSH-Px 活性组最高, 显著高于对照组和 100% 替代组 ( $P < 0.05$ )。

25% 替代组肝胰脏 POD 活性最低, 显著低于对照组和 75% 替代组 ( $P < 0.05$ )。对照组肝胰脏 GR 活性显著高于其他替代组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.6 橡胶籽油替代豆油对草鱼鱼体常规成分的影响

不同处理组草鱼鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪含量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 8)。仅 50% 替代组草鱼鱼体粗灰分含量显著低于其他处理组 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 橡胶籽油替代豆油对草鱼生长性能的影响

本研究结果表明, 草鱼饲料中低比例橡胶籽油替代

豆油对草鱼生长性能无不良影响, 但当替代比例超过 50% 显著降低草鱼生长性能。这与文远红等 (2016) 棕榈油替代低比例大豆油对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 幼鱼生长性能无不良影响的研究结果相同。周继术 (2001) 研究发现, 罗非鱼主要需要 n-6 系列脂肪酸, n-3 系列脂肪酸对罗非鱼营养作用不如 n-6 系列脂肪酸明显。而 Takeuchi 等 (1991) 研究发现, 草鱼对脂肪酸的需要量与鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 类似, 饲料中 n-3 系列与 n-6 系列必需脂肪酸的最适宜比值为 0.5~1:1。本研究中, 0~50% 替代组之间草鱼增重率、日增重系数无显著差异, 但随着橡胶籽油替代豆油比例的增加, 草鱼增重率、日增重系数呈下降趋势。这与王坤等 (2017) 橡胶籽油替代豆油不仅未降低虹鳟幼鱼的增重率和日增重系数, 反而蛋白质效率得到提高的研究结果不同, 并且也与 Nwokolo 等 (1989) 饲喂 8% 的橡胶籽油或玉米油对鸡平均日增重无显著影响的研究结果不同。而本研究中, 随着橡胶籽油替代豆油比例的增加, 草鱼饲料 n-3 系列与 n-6 系列脂肪酸比

表8 橡胶籽油替代豆油对草鱼鱼体常规成分的影响(%)

Tab.8 Effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on common body composition of *C. idellus* (%)

项目 Items	组别 Diets				
	0	25%	50%	75%	100%
水分 Moisture	69.39±0.19	68.64±0.18	69.14±0.45	68.44±0.16	69.07±0.06
粗蛋白 Crude protein	14.40±0.18	14.79±0.23	14.10±0.15	14.79±0.12	14.91±0.09
粗脂肪 Crude lipid	12.77±0.09	12.78±0.14	13.25±0.16	13.66±0.40	12.84±0.14
粗灰分 Crude ash	2.53±0.03 <sup>a</sup>	2.52±0.04 <sup>a</sup>	2.36±0.03 <sup>b</sup>	2.62±0.02 <sup>a</sup>	2.57±0.01 <sup>a</sup>

值不断增大, 趋于1:2, 说明出现这种现象的原因不仅是由脂肪酸的构成和实验对象不同所引起的, 而且更可能同橡胶籽油中的某些抗营养因子有关(如橡胶烃), 需进一步研究。

### 3.2 橡胶籽油替代豆油对草鱼消化酶活性的影响

研究表明, 不同食性鱼类会有不同消化酶活性(Buchet *et al*, 2000), 消化酶种类及数量与鱼的食性密切相关(Prejs *et al*, 1997; Hofer *et al*, 1981)。Baragi 等(1986)在研究条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)、Pedersen 等(1987)在研究大西洋鲱鱼(*Clupea harengus*)幼鱼消化酶活性中均发现, 鱼类脂肪酶活性大小与所摄取的食物性质相关联。本研究中, 随着橡胶籽油替代豆油比例的提升, 草鱼肠道脂肪酶活力呈先上升后下降的趋势。这与张宝龙等(2016)用不同比例豆油替代鱼粉对鲤鱼肠道脂肪酶的活性类似。此外, 对照组草鱼肠道淀粉酶和二糖酶活性均高于25%~100%替代组, 即橡胶籽油替代豆油抑制草鱼肠道淀粉酶和二糖酶的活性; 但肠道胰蛋白酶活力呈先上升后下降的趋势, 说明随着橡胶籽油替代豆油比例的增加, 橡胶籽油具有促进肠道胰蛋白酶的活性且呈先上升后下降的趋势。而相关研究表明淀粉酶、二糖酶在碳水化合物的水解过程中起重要作用。胰蛋白酶是消化蛋白质的主要酶之一, 可直接影响蛋白质在肠内的消化。但在实验配方中, 饲料油脂水平不发生变化, 仅油脂成分发生变化, 说明草鱼肠道消化酶活性变化是由饲料中脂肪酸组成成分发生变化造成的, 需进一步研究。实验结果还表明, 对照组草鱼肝胰脏胰蛋白酶活性显著高于75%和100%替代组, 而在正常情况下, 肉食性鱼类蛋白酶活性最高, 草食性鱼类蛋白酶活性最低, 其强弱顺序为肉食性>杂食性>滤食性>草食性(Hofer *et al*, 1981)。

### 3.3 橡胶籽油替代豆油对草鱼血脂水平的影响

研究表明, 血脂水平是反映体内脂肪代谢水平的重要生理指标, 高血脂会引起机体脂肪代谢紊乱、细胞损伤, 进而影响机体生长发育, 而在多种鱼类的研究中已证实, 血液胆固醇与动脉粥样硬化变化之间具有相关关系(García-Garrido *et al*, 1993; Gong *et al*, 2011; Farrelli *et al*, 1986)。本研究结果显示, 25%~100%替代组草鱼血清总胆固醇含量显著低于对照组, 说明橡胶籽油替代豆油具有降低草鱼血清总胆固醇、防止动脉粥样硬化的作用。这与刘超然等(1983)橡胶籽油具有降低猕猴(*Macaca mulatta*)血脂

胆固醇的研究结果一致。胶籽油中亚油酸与亚麻酸分别占脂肪酸的40%和20%(Nwokolo, 1996), 与其他植物油相比, 亚麻酸含量特别高。而多不饱和脂肪酸的降脂原理, 与增加血脂排泄和减少血脂合成、调整血脂在血液及其他组织中的分配利用、改变脂蛋白的结构等有关(李运珊等, 1994)。25%~100%替代组草鱼血清 HDL-C 含量显著低于对照组, 说明橡胶籽油具有降低 HDL-C 的作用。这与文远红等(2016)棕榈油替代50%、100%豆油对吉富罗非鱼幼鱼血清 HDL-C 的研究结果相同。而文远红等(2016)研究表明, 血清 HDL-C 水平反应肝脏合成高密度脂蛋白的能力, 它可将总胆固醇、甘油三酯等物质从外周组织运输到肝脏分解, 防止总胆固醇在血管壁的沉积。因此, 实验中造成 HDL-C 含量下降的原因很可能与总胆固醇含量的下降有关。而 LDL-C/HDL-C 可反应胆固醇的转运情况, 也是动脉粥样硬化的衡量指标, 实验结果显示, 随着橡胶籽油替代豆油比例的提高, 25%~100%替代组草鱼血清 LDL-C/HDL-C 与对照组无显著差异, 说明橡胶籽油对胆固醇逆向转运无显著影响。

### 3.4 橡胶籽油替代豆油对草鱼蛋白质代谢的影响

研究表明, 血液总蛋白是反映动物营养状况的指标, 良好的营养可使血液总蛋白维持在较高水平, 当日粮蛋白营养不足时总蛋白含量下降(Mommsen *et al*, 1980)。而 GGT 是谷氨酸循环的关键酶, 为蛋白质生物合成提供原料, GGT 活性升高表明细胞对氨基酸需求量增多, 提高了蛋白质生物合成(姜春英等, 1998)。研究表明, 各处理组草鱼血浆总蛋白含量显著高于对照组, 即橡胶籽油替代豆油促进了草鱼对饲料蛋白质的利用; 并且随着胶籽油替代豆油比例的提高, 草鱼血浆 GGT 活性呈先上升后下降趋势, 其中, 对照组与100%替代组活性差异不显著, 说明橡胶籽油具有促进草鱼体内蛋白质合成的作用, 但100%替代时作用不明显。GDH 具有固氮功能, 是氨基酸代谢过程中非必需氨基酸合成的关键酶, 参与蛋白质生物合成(José *et al*, 2006), 研究表明, 对照组草鱼血浆 GDH 活性显著低于100%替代组, 说明橡胶籽油替代100%豆油时, 促进了非必需氨基酸的蛋白质生物合成。因此, 实验中造成 GGT、GDH 对蛋白质合成差异的原因可能是由它们所介导合成的蛋白质不同所引起的, 需进一步研究。转氨酶是动物体氨基酸代谢过程中的重要酶类, 正常情况下血液中转氨酶活性较低, 当动物体受到各种营养不良或胁迫作用尤其是肝脏受损时, 往往导致血液中转氨酶活性升高

(Barton *et al.*, 1991)。本研究结果显示, 橡胶籽油替代豆油显著影响草鱼血浆 AST、肝胰脏 AST 和 ALT 的活性。这与王坤等(2017)橡胶籽油替代豆油对虹鳟幼鱼蛋白质代谢的研究结果不同, 而造成这种现象的原因可能是由实验误差、实验动物不同所形成的。但总体来说, 橡胶籽油替代 25%豆油对草鱼蛋白质代谢有一定的促进作用, 而替代 50%~100%豆油对蛋白质代谢没有明显的负面效应。

### 3.5 橡胶籽油替代豆油对草鱼抗氧化功能的影响

研究表明, 抗氧化指标反映了机体健康状况, 它由两部分组成, 一是非酶系统, 主要包括谷胱甘肽、维生素 C、维生素 E、一氧化碳等; 二是酶系统, 主要包括过氧化氢酶、过氧化物酶等(王俊锋等, 2014)。研究结果显示, 橡胶籽油替代豆油使草鱼血浆 TAC 能力呈上升趋势, 但不同处理组草鱼 NO 含量无显著差异, 说明橡胶籽油替代豆油提升了草鱼总抗氧化能力, 但未影响机体过氧化反应程度, 造成这种现象的原因可能是饲料中的油脂不仅能提供脂肪酸, 还能提供抗氧化剂, 影响机体抗氧化能力(Menoyo *et al.*, 2005)。CAT 是脊椎动物主要保护系统, 催化  $H_2O_2$  分解成水, 保护机体免受自由基损伤; POD 是将组织中低浓度过氧化物进一步催化分解, 从而降低自由基的损害作用(Hayes *et al.*, 1995)。研究结果显示, 橡胶籽油替代豆油显著影响了草鱼血浆 CAT、POD 活力, 其中, 50%和 100%替代组 CAT 活力显著高于其他处理组, 75%和 100%替代组 POD 活力显著高于对照组, 说明橡胶籽油替代豆油具有促进  $H_2O_2$  分解的作用, 降低了自由基对机体的损伤。而 MDA 是脂质过氧化反应的主要代谢产物, 其含量的降低实际上是脂质过氧化物降低的表现(Martínez-Álvarez *et al.*, 2002)。实验中草鱼血浆和肝胰脏 MDA 含量随橡胶籽油替代比例的提升呈下降趋势, 在 100%替代时 MDA 含量最低, 显著低对照组。这也进一步说明, 橡胶籽油中不饱和脂肪酸有助于提升草鱼的抗氧化能力, 在 100%替代时效果最佳。

## 4 结论

综上所述, 草鱼饲料中橡胶籽油替代 25%~50%豆油对草鱼生长性能、饲料利用率、消化酶活性、血脂水平、抗氧化功能、蛋白质代谢指标均无不良影响; 但替代超过 50%时显著降低草鱼生长性能和消化酶活性。由此可知, 草鱼饲料中橡胶籽油可替代 25%~50%的豆油, 即橡胶籽油在草鱼饲料中的适宜添加量为 1.4%~2.7%。

## 参 考 文 献

- Baragi V, Lovell R. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1986, 115(3): 478-484
- Barton BA, Iwama GK. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991, 1(1): 3-26
- Buchet V, Infante JL Z, Cahu CL. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*, 2000, 184(3): 339-347
- Farrelli AP, Saunders RL, Freeman HC, *et al.* Arteriosclerosis in atlantic salmon: Effects of dietary cholesterol and maturation. *Arteriosclerosis*, 1986, 6(4): 453-461
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 1972, 18(6): 499-502
- García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R, De AV. Coronary arteriosclerosis in dogfish (*Scyliorhinus canicula*): An assessment of some potential risk factors. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13(6): 876-885
- Gong BQ, Farrell AP. A method of culturing coronary artery explants for measuring vascular. *Canadian Journal of Zoology*, 2011, 73(4): 623-631
- Guo ZY, Liu XQ, Wang T, *et al.* Major components and change of cyanide in Hainan rubber seeds. *Food Science*, 2009, 30(20): 359-362 [郭志勇, 刘小琴, 王铜, 等. 海南橡胶籽主要成分及氰化物变迁分析. *食品科学*, 2009, 30(20): 359-362]
- Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione s-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radical Research*, 1995, 22(3): 193-207
- Hofer R, Schiemer F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia*, 1981, 48(3): 342-345
- Hu SX, Wang JT, Han T, *et al.* Analysis of the source and prospect of aquatic feed fat. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2012, 18(9): 183-185 [胡水鑫, 王骥腾, 韩涛, 等. 水产饲料脂肪来源及前景分析. *安徽农学通报*, 2012, 18(9): 183-185]
- Jiang CY, Ding K, Liu XX, *et al.* Study on the enzyme markers in colorectal cancer tissues. *Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine*, 1998(6): 16-19 [姜春英, 丁克, 刘贤锡, 等. 大肠癌组织酶标志物研究. *中国中西医结合外科杂志*, 1998(6): 16-19]
- José FBM, Licia ML, Isidoro M, *et al.* Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen*, (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2006, 145(2): 181-187
- Li YS, Liu CR, Wang MY. Crowd census and clinical observation of the role of rubber seed oil in reducing blood

- lipid. *Journal of Clinical Cardiology*, 1994(1): 24–26 [李运珊, 刘超然, 王明英. 橡胶种子油降血脂作用的人群普查与临床观察. *临床心血管病杂志*, 1994(1): 24–26]
- Liu CR, Li YZ, Chen GZ, *et al.* Mechanism of hypolipidemic effect of rubber seed oil-its effect on cholesterol tolerant test in rhesus monkey. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 1983, 4(2): 35–38 [刘超然, 李运洲, 陈国珍, 等. 橡胶种子油降血脂原理的研究—对猕猴胆固醇耐量试验的影响. *热带作物学报*, 1983, 4(2): 35–38]
- Martínez-Álvarez RM, Hidalgo MC, Domezain A, *et al.* Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(23): 3699–3706
- Menoyo D, López-Bote CJ, Obach A, *et al.* Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism, and oxidative stability of Atlantic salmon. *Journal of Animal Science*, 2005, 83(12): 2853–2862
- Mommsen TP, French CJ, Hochachka PW. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Canadian Journal of Zoology*, 1980, 58(10): 1785–1799
- Nwokolo E. Rubber (*Hevea brasiliensis*, L) seed, oil and meal. *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*, 1996, 333–344
- Nwokolo E, Yang XJ, Tang NS. Effects of rubber seed oil as the use of chicken feed. *World Tropical Agriculture Information*, 1989, 28(4): 4–7 [Nwokolo E, 杨湘江, 汤汝松. 橡胶籽油作为养鸡饲料的利用. *世界热带农业信息*, 1989, 28(4): 4–7]
- Pedersen BH, Nilssen EM, Hjelmeland K. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Marine Biology*, 1987, 94(2): 171–181
- Prejs A, Blaszczyk M. Relationships between food and cellulase activity in freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 1977, 11(5): 447–452
- Takeuchi T, Watanabe K, Yong WY, *et al.* Essential fatty acids of grass carp *ctenopharyngodon idella*. *Nippon Suisan Gakkaishi = Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1991, 57(3): 467–473
- Wang JF, Zhang P. Effects of fat powder on antioxidation property, protein metabolism and thyroid hormone in black-boned chicken with black feather. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2014, 43(4): 119–122 [王俊锋, 章平. 脂肪粉对黑凤鸡抗氧化性能、蛋白质代谢及甲状腺激素水平的影响. *河南农业科学*, 2014, 43(4): 119–122]
- Wang K, Zhang X, Zhan GR, *et al.* Effects of using soy oil with rubber seed oil on growth performance, the blood and liver biochemical indexes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2017, 32(4): 1–9 [王坤, 张曦, 邓君明, 等. 橡胶籽油替代豆油对虹鳟幼鱼生长性能、血液及肝脏生化指标的影响. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, 32(4): 1–9]
- Wen YH, Mi HF, Zhang L, *et al.* Effects of soybean oil replacement by palm oil on growth performance, muscle nutritional composition and serum biochemical indexes of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(3): 953–960 [文远红, 米海峰, 张璐, 等. 棕榈油替代大豆油对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、肌肉营养组成和血清生化指标的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(3): 953–960]
- Xing JJ, Vane HE, Li DF, *et al.* Effects of emulsification, fat encapsulation, and pelleting on weanling pig performance and nutrient digestibility. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(9): 2601–2609
- Yang LP, Qiao WW, Yang YM, *et al.* Effects of rubber plant seed oil on rat embryo development. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 2003, 23(1): 26–28 [杨丽萍, 乔伟伟, 杨幼明, 等. 橡胶籽油对大鼠胚胎发育的影响. *上海实验动物科学*, 2003, 23(1): 26–28]
- Zhang BL, Qu M, Cheng ZY, *et al.* The influence of replacing fish meal with soybean oil on carp growth, immunity and digestive enzyme activities. *Feed Industry*, 2016, 37(20): 17–21 [张宝龙, 曲木, 程镇燕, 等. 饲料中豆油替代鱼粉对鲤鱼生长、免疫力及消化酶活性的影响. *饲料工业*, 2016, 37(20): 17–21]
- Zhao YH, Fan WP, Fan WB. Development and utilization of whole ingredients of rubber seed. *Tropical Agricultural Engineering*, 2013, 37(2): 46–49 [赵瀛华, 范武平, 范武波. 橡胶籽的全成分开发与利用. *热带农业工程*, 2013, 37(2): 46–49]
- Zheng YW, Yang XQ, Huang YB, *et al.* Study on preparation technology of conjugated linolenic acid of rubber seed oil by alkali catalytic isomerization. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(16): 253–258 [郑云武, 杨晓琴, 黄元波, 等. 橡胶籽油碱催化异构化合成共轭亚油酸的制备工艺研究. *食品工业科技*, 2016, 37(16): 253–258]
- Zhou JS. The effect of EFA n-6/n-3 rate and lipid level on the growth of hybrid tilapia (*T. autea* ♂ × *T. nilotica* ♀). Master's Thesis of Southwest Agricultural University, 2001, 41–42 [周继术. 必需脂肪酸 n-6/n-3 比例与油脂水平对奥尼罗非鱼生长的影响. *西南农业大学硕士研究生学位论文*, 2001, 41–42]

## Effects of Replacing Soybean Oil with Rubber Seed Oil on Growth Performance, Digestive Enzyme Activities, and Partial Biochemical Indices of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

TU Youhuan, ZHANG Xi, TAO Linli, YANG Xiujuan, DENG Junming<sup>①</sup>

(College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

**Abstract** This experiment was conducted to evaluate the effects of replacing soybean oil with rubber seed oil on growth performance, digestive enzyme activities, serum lipoprotein levels, protein metabolism indices and antioxidant capacities of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Five isoproteic and isolipidic experimental diets were formulated with rubber seed oil replacing 0%, 25%, 50%, 75%, and 100% of soybean oil (R0, R25, R50, R75, and R100), respectively. The results showed that the weight gain, daily gain coefficient in fish fed R0 and R50 diets were significantly higher than those in fish fed the R100 diet ( $P < 0.05$ ). With increasing rubber seed oil replacement level, the feed coefficient first decreased and then increased, and the lowest value was observed in fish fed the R25 diet, which was significantly lower than that in fish fed the R50, R75, and R100 diets ( $P < 0.05$ ). Conversely, protein efficiency first increased and then decreased, and the highest value was observed in fish fed the R25 diet, which was significantly higher than that in fish fed other diets ( $P < 0.05$ ). With increasing rubber seed oil replacement level, intestinal trypsin and lipase (LPS) activity first increased and then decreased, and the highest values of intestinal LPS activity were observed in fish fed the R25 diet, which were significantly higher than that in fish fed other diets ( $P < 0.05$ ). The highest values of intestinal trypsin activity were observed in fish fed the R50 diet, which were significantly higher than that in fish fed R0, R75, and R100 diets ( $P < 0.05$ ). Hepatopancreas trypsin activity in fish fed R0 and R50 diets was significantly higher than that in fish fed R75 and R100 diets ( $P < 0.05$ ). The serum total cholesterol (TC) level in fish fed R25, R50, R75, and R100 diets were significantly lower than that in fish fed the R0 diet ( $P < 0.05$ ). With increasing rubber seed oil replacement level, hepatopancreas hepatic aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities first increased and then decreased, and the lowest value was observed in fish fed the R25 diet, which was significantly lower than that in fish fed R0 and R100 diets ( $P < 0.05$ ). Further, plasma total antioxidant (TAC) capacity in fish fed R0 and R25 diets was significantly lower than that in fish fed R75 and R100 diets ( $P < 0.05$ ). Conversely, plasma and hepatopancreas malondialdehyde (MDA) levels in fish fed the R0 diet were significantly higher than in fish fed the R100 diet ( $P < 0.05$ ). These results indicated that replacing 25% to 50% of soybean oil with rubber seed meal had no obvious negative effects on growth performance, feed utilization rates, serum lipoprotein levels, protein metabolism indices, or antioxidant capacities, whereas replacing 50% of soybean oil with rubber seed oil may have depressed the growth performance and digestive enzyme activities of grass carp.

**Key words** *Ctenopharyngodon idellus*; Rubber seed oil; Soybean oil; Growth performance; Digestive enzyme activities; Antioxidant capacities

① Corresponding author: DENG Junming, E-mail: djunming@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170822001

http://www.yykxjz.cn/

韩莎, 胡炜, 李成林, 朱夕波, 赵斌, 张少春, 孙永军. pH胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 91-98

Han S, Hu W, Li CL, Zhu XB, Zhao B, Zhang SC, Sun YJ. Effects of pH stress on survival rate, growth and antioxidant enzyme activities of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 91-98

## pH 胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响\*

韩 莎<sup>1</sup> 胡 炜<sup>1</sup> 李成林<sup>1①</sup> 朱夕波<sup>2</sup> 赵 斌<sup>1</sup> 张少春<sup>1</sup> 孙永军<sup>3</sup>

(1. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104; 2. 日照市岚山区渔业技术推广站 日照 276800;

3. 好当家集团有限公司 威海 264300)



**摘要** 本研究比较分析了在对照组(pH 为 8.4)、低 pH 胁迫组(pH 为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6 和 7.8)和高 pH 胁迫组(pH 为 8.6、8.8、9.0、9.2、9.4 和 9.6)的养殖水环境下,胁迫 36 d 对刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)存活、生长及抗氧化酶活性的影响。结果显示,不同 pH 对刺参存活、生长及抗氧化酶活性有显著影响。在 pH 7.4~9.0 范围内,刺参存活率为 100%,随着 pH 胁迫强度和胁迫时间的增加,刺参存活率逐渐降低,当 pH 为 6.8、7.0 和 9.6 时,自第 3 天起,刺参处于过度应激状态,继而有死亡个体出现,至 30 d 时刺参死亡率为 100%。不同 pH 显著影响刺参生长,刺参特定生长率随 pH 胁迫程度增加呈下降趋势,当 pH 为 9.0 时,刺参出现负增长。各 pH 胁迫组刺参超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性均高于对照组,且随 pH 胁迫程度的增加呈先升高后下降的变化趋势。在低 pH 组中,以 pH=7.4 时刺参 SOD 和 CAT 活性最高,分别达到(74.92±2.24) U/ml 和(14.99±2.38) U/ml,显著高于对照组;而在高 pH 组中,SOD 和 CAT 活性分别以 pH 8.8 和 9.0 时最高,分别达到(72.90±1.10) U/ml 和(15.68±0.89) U/ml,显著高于对照组。结果表明,pH 在 7.4~9.0 范围内是刺参存活与生长的适宜水环境,过高或过低均会引起刺参不同程度的应激反应,进而导致刺参的死亡。

**关键词** 刺参; pH; 存活; 生长; 抗氧化酶

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0091-08

刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)以极高的营养价值和经济价值成为海水养殖单品种产值最高的品种,近年来,刺参养殖产业发展迅猛,养殖规模和空间拓展不断扩大。目前,我国刺参增养殖面积为 20 余万 hm<sup>2</sup>,年产量约 20.4 万 t,年产值超过 350 亿元(李成林等, 2010、2017)。然而,在刺参产业迅猛

发展的同时,生产中也出现了一系列不同程度的瓶颈问题,诸如养殖生态环境恶化、种质资源退化、病害频繁发生等,严重制约了刺参养殖产业的持续稳定发展(常亚青等, 2006; 李成林等, 2010、2017)。其中,环境胁迫是人工养殖条件下导致刺参应激或发病的主要因素之一。在环境因子胁迫下,刺参会产生不同

\* 泰山产业领军人才工程(LJNY201613)、山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新团队建设工程(SDAIT-22-01; SDAIT-22-05)、山东省农业良种工程、山东省科技发展计划(2014GNC111022)和山东省星火科技示范项目(2015XH006)共同资助 [This work was supported by Taishan Industry Leading Talents Project (LJNY201613), Sea Cucumber Innovation Team of Shandong Province Agriculture Research System (SDAIT-22-01, SDAIT-22-05), Agriculture Seed Project of Shandong Province, Science and Technology Development Project of Shandong Province (2014GNC111022), and Spark Program of Shandong Province (2015XH006)]. 韩 莎, E-mail: shahan\_2012@163.com

① 通讯作者: 李成林, 研究员, E-mail: lcl\_xh@hotmail.com

收稿日期: 2017-08-22, 收修改稿日期: 2017-10-26

程度的应激反应,过度的应激反应会使刺参出现异常的生理状态,进而导致其生长缓慢、免疫力降低,大大增加感染疾病的几率。目前,许多学者对刺参的环境胁迫适应机制进行了研究,多集中在盐度(胡炜等, 2012; 董晓亮等, 2013; 庚辰帆等, 2015; 赵斌等, 2015)、温度(董云伟等, 2009)、低溶氧(李根瑞等, 2016)、氨氮(臧元奇等, 2012)、亚硝态氮(陈芸燕等, 2013)等胁迫因子的研究上,而有关环境因子中 pH 对刺参生理生态影响的研究甚少。

酸碱度作为水环境生态平衡的关键指标之一,是水中化学性状和生命活动的综合反映(赵先银等, 2011),不仅直接影响水生生物的存活、生长等生理机能,还会影响水体中氨态氮、硫化氢和重金属离子等化学物质的存在形式及含量,间接影响水生生物的生长、存活与繁殖(曾媛媛等, 2008)。通常情况下,自然海水 pH 范围为 7.8~8.5,水质条件的变化时常会导致水体 pH 在 4~10 范围内波动变化(Zhao *et al.*, 2010)。在刺参养殖池塘中,水体 pH 常因连续阴天、持续高温、骤降暴雨、水质污染、生物种群突变、底质老化等因素的影响而发生变化,时常呈现周期性或临时性的波动。

迄今为止,有关 pH 对刺参生理生态影响的研究仅限于对刺参苗期存活率、生长指标及免疫功能等的评价(Zhao *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010),而对其在养殖期间生理指标变化的研究尚未见相关报道。本实验以大规格刺参为研究对象,研究了不同 pH 对刺参存活、生长及免疫功能的影响,旨在进一步探明刺参对 pH 的适应性,以及在 pH 胁迫下的刺参免疫调节机制,以期对刺参健康养殖过程中水环境调控提供科学依据和理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用刺参取自山东省海洋生物研究院种质资源研究中心,选取表观正常、伸展自如、健康活力强的刺参,平均体重为(7.02±0.81) g,置于容积为 1.0 m<sup>3</sup>的圆形玻璃钢水槽中暂养,实验于 2016 年 4 月在本中心实验室进行。实验用水为经沉淀、砂滤的自然海水,温度为 18.8~23.9℃,盐度为 31.3±0.6。实验期间,24 h 充气,日投喂人工配合饲料 1 次,投喂量为刺参体重的 3%~5%,每天全量换水并清除残饵和粪便,暂养适应 15 d 后进行实验。

### 1.2 实验设计

实验共设 12 个 pH 处理组,分别为 6 个低 pH 组

(pH 为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6 和 7.8)和 6 个高 pH 组(pH 为 8.6、8.8、9.0、9.2、9.4 和 9.6),并设对照组(pH=8.4)。各处理组和对照组实验刺参均为 10 头,放养于 80 cm×60 cm×48 cm 的整理箱中,每处理组均设 3 个平行。各实验组使用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH,整个实验期间,每日定时采用哈纳 HI98185 多参数水质分析仪测定并及时校正水的 pH 值,变化幅度不超过±0.05 个单位。pH 调节采取逐步变化的方式,日全量换水 1 次,pH 日变化幅度为 0.2 个单位,各实验组 pH 达到实验设计 pH 时,开始胁迫实验。

实验期间,观测刺参存活、摄食及活动情况,发现死亡个体及时清除,每 6 d 统计各 pH 组刺参死亡数量,每 12 d 测定 1 次生长情况,实验周期为 36 d。

### 1.3 样品采集与免疫酶指标测定

在胁迫实验结束时,从每个处理组中随机选取刺参 3~5 头,用 5.0 ml 一次性注射器抽取刺参体腔液,将其在 4℃ 下以 1000 r/min 离心 10 min,取上清液分装于 500 μl 灭菌离心管中,置于-80℃ 冰箱中待测。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性的测定均采用南京生物工程研究所研制的试剂盒测定。

### 1.4 存活和生长指标的计算

实验期间刺参累计死亡率采用以下公式计算:

$$\text{累计死亡率}(\%) = D_t / N_0 \times 100$$

式中, $N_0$  为实验开始时刺参头数, $D_t$  为实验期间测定时刺参累计死亡头数。

实验期间刺参特定生长率(Specific growth rate, SGR)采用以下公式计算:

$$\text{SGR}(\%/d) = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100$$

式中, $W_0$  为初始体重(g), $W_t$  为终末体重(g), $t$  为实验天数(d)。

通过测定摄食率(Feeding rate, FR)与食物转化率(Food conversion efficiency, FCE),观测 pH 胁迫对刺参摄食的影响。计算公式如下:

$$\text{FR}(\%) = 2F / [t(W_t + W_0)] \times 100$$

$$\text{FCE}(\%) = 100 \times (W_t - W_0) / F$$

式中, $W_0$  为体重初始值(g), $W_t$  为测定值(g), $t$  为实验时间(d), $F$  为饲料总摄入量(g)。

### 1.5 数据统计

采用 SPSS 16.0 和 Excel 2007 软件进行统计学分析,利用单因素方差分析(One-way ANOVA)和多重比较分析不同 pH 组之间的差异。实验所得数据表示为平均值±标准误(Mean±SE), $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 pH 胁迫对刺参存活的影响

经不同 pH 胁迫后, 刺参的存活情况受到不同程度的影响, 刺参累计死亡率如图 1 所示。至实验结束时, 在 pH 为 7.4~9.0 处理组中, 刺参存活率最高, 均为 100%; 存活率最低的为 pH 6.8、7.0 和 9.6 组, 至实验结束时刺参存活率均为 0; 其余各 pH 处理组刺参存活率差异较大, 随着胁迫程度的加强, 存活率显著下降( $P<0.05$ )。

在低 pH 处理组中, pH 6.8 和 7.0 组刺参胁迫至第 3 天时, 开始出现吐肠、化皮等应激反应, 胁迫 6 d 后, 刺参累计死亡率呈现显著差异( $P<0.05$ ), 死亡率均为 6.67%, 且随着实验的持续进行, 2 组的累计死亡率均大幅升高, 至 12 d 时差异显著( $P<0.05$ ), 至第 30 天时实验刺参均全部死亡, 而 pH 7.2 组刺参在胁迫 12 d 后出现死亡个体, 随后刺参死亡个体数逐日小幅增加, 至实验结束时累计死亡率达到 46.67%。

在高 pH 处理组中, pH 9.6 组胁迫至第 5 天时, 开始出现化皮现象, 至 6 d 时累积死亡率达到 6.67%, 且随着实验的持续进行, 累计死亡率大幅升高( $P<0.05$ ),

至第 30 天时实验刺参均全部死亡; 而 pH 9.0 和 9.2 组刺参在胁迫 6 d 后才出现死亡个体, 之后累计死亡率小幅上升, 至实验结束时, pH 9.0 和 9.2 组的累计死亡率分别为 36.67% 和 50.00%。

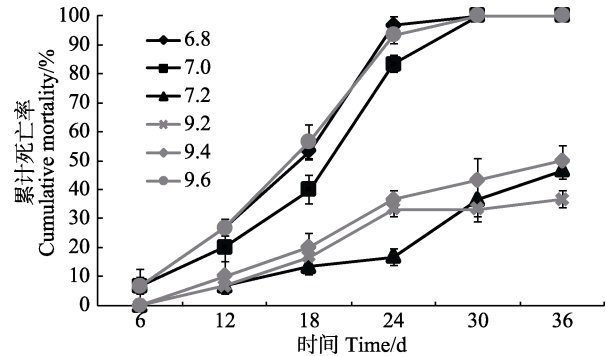


图 1 pH 胁迫对刺参累计死亡率的影响  
Fig.1 Effects of pH on the cumulative mortality of sea cucumber

### 2.2 pH 胁迫对刺参生长的影响

pH 胁迫对刺参生长的影响见表 1。由表 1 可以看出, 至胁迫实验结束时, 对照组刺参终末体重最高, 平均体重达(8.95±2.06) g。随着胁迫程度的加强, 各

表 1 pH 胁迫对刺参生长的影响  
Tab.1 The growth of sea cucumber at different pH

pH	初始体重 Initial body weight (g)	终末体重 Final body weight (g)	SGR <sub>1</sub> (0~12 d) (%/d)	SGR <sub>2</sub> (12~24 d) (%/d)	SGR <sub>3</sub> (24~36 d) (%/d)	SGR (0~36 d) (%/d)
6.8	6.98±0.17 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—
7.0	7.06±0.14 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—
7.2	6.96±0.17 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—
7.4	6.93±0.20 <sup>a</sup>	7.83±2.06 <sup>c</sup>	0.77±0.04 <sup>c</sup>	0.51±0.20 <sup>d</sup>	-0.29±0.15 <sup>c</sup>	0.33±0.19 <sup>d</sup>
7.6	7.14±0.19 <sup>a</sup>	8.29±2.11 <sup>b</sup>	0.77±0.34 <sup>c</sup>	0.75±0.17 <sup>c</sup>	-0.27±0.22 <sup>c</sup>	0.42±0.16 <sup>c</sup>
7.8	7.14±0.04 <sup>a</sup>	8.61±2.15 <sup>a</sup>	1.30±0.27 <sup>b</sup>	1.32±0.05 <sup>b</sup>	-1.06±0.45 <sup>b</sup>	0.52±0.12 <sup>b</sup>
8.4	6.98±0.16 <sup>a</sup>	8.95±2.06 <sup>a</sup>	0.63±0.14 <sup>a</sup>	0.70±0.53 <sup>a</sup>	0.72±0.28 <sup>a</sup>	0.68±0.19 <sup>a</sup>
8.6	7.11±0.14 <sup>a</sup>	7.82±1.99 <sup>c</sup>	0.67±0.24 <sup>a</sup>	0.28±0.18 <sup>d</sup>	-0.16±0.07 <sup>d</sup>	0.26±0.24 <sup>e</sup>
8.8	7.09±0.17 <sup>a</sup>	7.65±1.98 <sup>c</sup>	0.79±0.14 <sup>c</sup>	0.29±0.31 <sup>d</sup>	-0.43±0.31 <sup>e</sup>	0.21±0.28 <sup>e</sup>
9.0	6.97±0.13 <sup>a</sup>	6.44±1.86 <sup>d</sup>	0.38±0.33 <sup>e</sup>	0.28±0.43 <sup>d</sup>	-1.45±1.29 <sup>f</sup>	-0.26±0.34 <sup>f</sup>
9.2	6.92±0.12 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—
9.4	6.94±0.10 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—
9.6	6.96±0.10 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—

注: 不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。下同

Note: The means with different letters within the same column are significantly different at the 0.05 probability level. The same as below

pH 处理组刺参终末体重均呈现逐渐下降的趋势, 除 pH 7.8 组外, 其他各实验组刺参平均体重均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 尤其是 pH 9.0 组刺参出现体重负增长, 体重最低, 为(6.44±1.86) g。

在低 pH 处理组中, 当 pH 为 7.4~7.8 时, 至 12 d 时, 刺参 SGR<sub>1</sub> 显著高于对照组( $P<0.05$ ), 而随着实验的持续进行, pH 7.4 组刺参 SGR<sub>2</sub> 逐渐下降且低于对照组, 当胁迫时间超过 24 d 时, 刺参 SGR<sub>3</sub> 均大幅



降低, 呈现为负值( $P<0.05$ )。

在高 pH 处理组中, 当 pH 为 8.6~8.8 时, 至 12 d 时, 刺参 SGR<sub>1</sub> 高于对照组, 而 pH 9.0 组 SGR<sub>1</sub> 显著低于对照组( $P<0.05$ ); 而 12 d 之后, 高 pH 组刺参 SGR<sub>2</sub> 均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 尤其是在 24 d 后, SGR<sub>3</sub> 均降为负值。至实验结束时, 对照组 SGR 为(0.68±0.19)%/d, 其他胁迫组刺参 SGR 均显著低于对照组, 其中, pH 9.0 组 SGR 最低, 为(-0.26±0.34)%/d。高 pH 胁迫对刺参生长的影响更为显著。

### 2.3 pH 胁迫对刺参摄食的影响

不同 pH 胁迫下刺参摄食率(FR)和刺参食物转化率(FCE)见表 2。从表 2 可以看出, 刺参的摄食率以对照组摄食率最大, 为(2.26±0.15)%。随着 pH 胁迫程度的增加, 刺参摄食率呈现下降的趋势。在低 pH 处理组中, 低于 pH 7.6 的实验组刺参摄食率组内差异显著( $P<0.05$ ), 实验刺参所排泄粪便呈细短状; 在高 pH 处理组中, 高于 pH 8.8 的实验组刺参摄食率大幅下降, 显著低于对照组( $P<0.05$ ), 实验刺参出现整个身体逐渐收缩至紧缩、体表棘刺短平、活力较弱、排泄粪便不成形等现象。

表 2 显示, 不同 pH 胁迫对刺参食物转化率有显著影响。pH=7.8 时, 实验组刺参的 FCE 达到最大值, 为(24.86±1.15)%, 但与对照组差异不显著( $P>0.05$ ), 其他各 pH 胁迫组刺参的 FCE 均显著低于对照组( $P<0.05$ )。从表 2 明显看出, 与低 pH 胁迫相比, 高 pH 胁迫对刺参食物转化率的影响更为显著。

表 2 pH 胁迫对刺参摄食率和食物转化率的影响  
Tab.2 The feeding rate and food conversion efficiency of sea cucumber at different pH

pH	摄食率 Feeding rate (%)	食物转化率 Food conversion efficiency (%)
6.8	—	—
7.0	—	—
7.2	—	—
7.4	1.78±0.17 <sup>c</sup>	18.96±2.19 <sup>b</sup>
7.6	2.04±0.13 <sup>b</sup>	20.30±1.53 <sup>b</sup>
7.8	2.09±0.14 <sup>ab</sup>	24.86±1.13 <sup>a</sup>
8.4	2.26±0.15 <sup>a</sup>	24.01±1.15 <sup>a</sup>
8.6	1.90±0.18 <sup>b</sup>	14.03±1.35 <sup>d</sup>
8.8	1.44±0.19 <sup>d</sup>	14.75±1.65 <sup>d</sup>
9.0	0.31±0.16 <sup>f</sup>	—
9.2	0.26±0.13 <sup>g</sup>	—
9.4	0.24±0.13 <sup>g</sup>	—
9.6	—	—

### 2.4 pH 胁迫对刺参 SOD 活性的影响

不同 pH 对刺参体内 SOD 活性的影响见图 2。从图 2 可以看出, 随着高、低 pH 胁迫程度的加强, 刺参体内 SOD 活性均呈现先升高后降低的峰值变化趋势。在低 pH 组中, 以 pH 7.4 时刺参体内 SOD 活性最高, 为(74.92±2.24) U/ml, 与对照组相比, 差异显著( $P<0.05$ ), 而 pH 7.6、7.8 组 SOD 活性均与对照组无显著差异( $P>0.05$ ); 在高 pH 组中, 当 pH 为 8.6~8.8 时, SOD 活性显著增加( $P<0.05$ ), 以 pH 8.8 组刺参的 SOD 活性最高, 为(72.90±1.10) U/ml, 之后随着 pH 升高 SOD 活性逐渐下降, 但与对照组差异不显著。

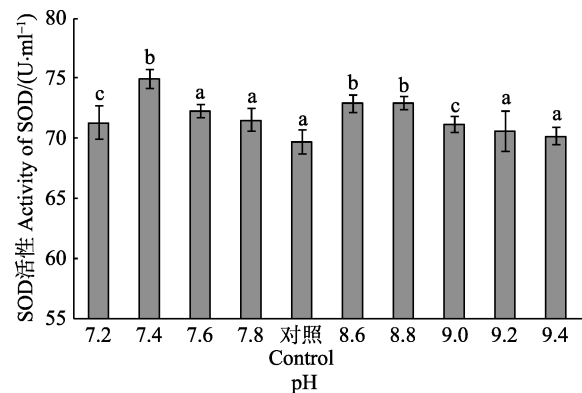


图 2 不同 pH 对刺参体内 SOD 活性的影响  
Fig.2 Effect of different pH on the activity of SOD of sea cucumber

### 2.5 pH 胁迫对刺参 CAT 活性的影响

不同 pH 对刺参体内 CAT 活性的影响见图 3。从图 3 可以看出, 随着高、低 pH 胁迫程度的加强, 刺参 CAT 活性均呈现先升高后降低的峰值变化趋势。在低 pH 组中, pH=7.4 时达到最高值, 为(14.99±2.38) U/ml, 各实验组刺参 CAT 活性均与对照组差异显著( $P<0.05$ );

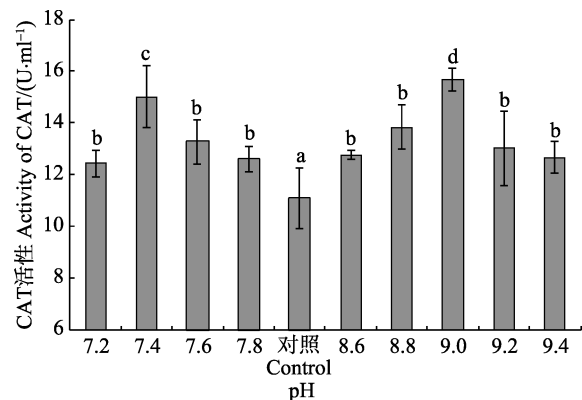


图 3 不同 pH 对刺参体内 CAT 活性的影响  
Fig.3 Effect of different pH on the activity of CAT of sea cucumber

在高 pH 组中, pH=9.0 时刺参体内 CAT 活性达到最高, 为(15.68±0.89) U/ml, 之后随着 pH 升高 CAT 活性继而逐渐下降, 各实验组刺参 CAT 活性均与对照组有显著差异( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 pH 对刺参存活的影响

在自然环境下, pH 是随着时间和空间变化而变化的环境理化因子, 水生生物的存活、生长和摄食与 pH 密切相关。不同的水生生物品种和发育阶段适宜的 pH 不同, 毛蚶(*Scapharca subcrenata*)稚贝适宜的 pH 范围为 7.5~8.5 (方军等, 2008), 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)生活在 7.6~9.0 的海水中最适宜(何玉英等, 2008), 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的适宜生存 pH 为 5.2~7.6 (吴萍等, 2001)。本研究发现, 刺参适宜生存的 pH 范围与大多数海洋生物基本一致。在 pH 7.4~9.0 条件下, 刺参生存状况良好, 实验期间内无死亡现象, 是刺参生活的相对安全 pH 值范围。但是, 如果刺参生活环境 pH 值超过此范围时, 对刺参的生长发育产生极为不利的影 响, 致使刺参产生不同程度的应激反应。本研究表 明, 刺参适宜生活的水环境 pH 最高值不宜超过 9.2, 最低值不宜低于 7.2, 若超出此 pH 值范围, 持续时间均不宜超过 6 d, 否则会引起刺参的过度应激反应, 引发吐肠、 溃烂甚至病变或者死亡。

#### 3.2 pH 对刺参摄食和生长的影响

环境因子在适宜的范围内变化, 对水生生物存活和生长影响不大, 但超过了适宜的范围就会产生抑制作用。水环境 pH 变化对水生生物是一种应激, 本研究发 现, pH 在适宜的范围内变化或者短时间内变动, 对刺参摄食和生长有一定的积极作用。实验结果显示, 当 pH 在 7.4~7.8 范围时, 短时间内(12 d)刺参出现生长速率加快的现象, 这说明在一定范围内相对低 pH 对刺参生长具有一定的积极作用。究其原因, 可能是低浓度的 H<sup>+</sup>降低了刺参肠道中的 pH 值, 有利于创造出适合消化酶发挥活性的低 pH 环境, 从而提高饲料的消化吸收来促进刺参生长。本研究结果与添加酸化剂对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的促生长效应规律类似(潘庆等, 2004)。但随着 pH 胁迫时间的延长, 相对低浓度的 pH 增益效果逐渐消失, 刺参生长受到抑制, 进而出现负增长。在高 pH 环境中, 当 pH 高于 8.8 时, 刺参表现为摄食量减少、消化能力差、排 泄粪便不成形、个体出现明显萎缩、肉刺呈圆钝状,

整个体表逐渐变得平滑, 生长受到显著抑制。本结果 与在 pH 8.5 和 pH 9.5 水体中的鲫(*Carassius Auratus Gibelio*)生长较慢的结果(李文祥等, 2011)相似。

本研究中, 高、低 pH 条件对刺参生长和摄食影响不同, 反映出刺参对不同 pH 的耐受范围不同。长期处在 pH 胁迫环境中, 一方面影响刺参对饲料的摄食和消化利用, 另一方面使刺参机体大部分能量用于自身代谢进行内环境酸碱平衡调节, 而用于生长的能量大幅减少, 这一研究结果与鱼类、甲壳类水生动物有相同的变化规律(洪美玲等, 2007; 李波等, 2011)。本研究结果表明, pH 在 7.6~8.8 范围内, 如果是在短时间内变动, 其对刺参摄食和生长影响不明显, 而若超出此范围或者长时间的胁迫, 会对刺参生长产生明显的抑制作用。

#### 3.3 pH 对刺参抗氧化酶活性的影响

刺参的免疫机制以非特异性免疫反应为主, 研究认为, 环境胁迫因子中诸如水体 pH、温度、盐度等变化诱导的生理效应可能经由氧化还原途径实现, 即环境胁迫因子造成生物体有氧代谢异常, 活性氧自由基大量积累而引起氧化损伤(Ryter *et al*, 2007)。抗氧化酶在清除活性氧自由基、抵御氧化损伤方面发挥着重要作用。因此, 可将抗氧化酶作为评估 pH 胁迫对生物体产生氧化胁迫效应的一类生物标志物, 而 SOD 和 CAT 是生物体内重要的抗氧化酶, 也是反映生物应对各种胁迫的重要指标(沙飞等, 2015)。SOD 能将 O<sub>2</sub>催化歧化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在 CAT 的作用下分解成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>, 从而联合清除活性氧自由基, 维持细胞和机体的正常活动。

本研究中, 在 pH 7.4~8.8 范围内, SOD 活性随着 pH 胁迫程度的升高逐渐上升, 这说明在此 pH 范围胁迫下, 刺参体内的 SOD 能够有效发挥防御作用, 而超出此 pH 范围, 随着 pH 胁迫强度的增强, 当大量产生的活性氧自由基超出刺参自身清除阈值时, SOD 不能及时补充, 导致 SOD 活性逐渐下降。CAT 活性在 pH 7.4~9.0 范围内与 SOD 活性变化趋势一致, 这说明 SOD 与 CAT 二者在功能上具有相对的独立性, SOD 被抑制后 CAT 会显著提高(沙飞等, 2015), 二者联合清除活性氧自由基, 协同对机体进行免疫保护。研究结果表明, 当 pH 低于 7.4 或高于 9.0 时, 随着 pH 胁迫程度的增强, 当抗氧化酶难以抵御大量产生的活性自由基时, 刺参抗氧化酶 SOD 和 CAT 遭到破坏, 机体持续受到氧化损伤, 逐渐加剧细胞的变性或者死亡, 进而导致刺参的高死亡率, 这一点与各实验组刺参存活率的变化结果一致。另外, 其他环境

胁迫因子如亚硝酸氮对刺参抗氧化酶的影响的研究与本研究结果类似,如低于 2.3 mg/L 的亚硝酸氮胁迫在短期内提高了 SOD 和 CAT 活性,而高于 11.5 mg/L 的亚硝酸氮胁迫却抑制了 SOD 和 CAT 活性(陈芸燕等, 2013)。

### 3.4 刺参对 pH 变化的生理适应性

本研究发现,刺参在不同 pH 胁迫环境条件下,其存活、生长、摄食等均受到不同影响,从宏观角度直接反映出刺参对低 pH 环境相对于高 pH 环境的适应性更强,其体内抗氧化酶活性的变化趋势与之基本一致。本研究结果表明,在刺参养殖水环境中, pH 对刺参存活、摄食和生长具有显著影响,尤其是在刺参池塘养殖过程中,由于受温度、盐度、水体藻菌相失衡、底质老化、浒苔等大型藻类等因素的影响,池中 pH 常处于动态变化中。因此,在刺参养殖过程中,科学调控水质和底质,稳定水质理化因子,显得尤为重要,关系到刺参养殖的好坏和成败。将刺参栖息生活的水环境 pH 保持在 7.4~9.0 范围内,更有利于刺参的生长发育。

## 参 考 文 献

- Chang YQ, Sui XL, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture. *Fishery Science*, 2006, 25(4): 198–201 [常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增养殖业现状、存在问题与展望. *水产科学*, 2006, 25(4): 198–201]
- Chen YY, Tian XL, Yu X, *et al.* Effects of nitrite stress on the non-specific immune response and HSP70 expression of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(11): 35–42 [陈芸燕, 田相利, 于晓, 等. 亚硝酸氮胁迫对刺参体壁非特异性免疫能力及 HSP70 表达的影响. *中国海洋大学学报*, 2013, 43(11): 35–42]
- Dong XL, Li CL, Zhao B, *et al.* Effects of low salinity stress on the activities of non-specific immune enzymes and antibacterial activity of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 82–87 [董晓亮, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参非特异性免疫酶活性及抗菌活力的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 82–87]
- Dong YW, Dong SL. Advances of ecological physiology in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(5): 908–912 [董云伟, 董双林. 刺参对温度适应的生理生态学研究进展. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(5): 908–912]
- Fang J, Yan MC, Zhang JM, *et al.* Preliminary studies on the effects of pH and ammonia on growth and survival to *Scapharca subcrenata* juveniles. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2008, 27(3): 281–285 [方军, 闫茂仓, 张炯明, 等. pH 和氨氮对毛蚶稚贝生长与存活影响的初步研究. *浙江海洋学院学报*, 2008, 27(3): 281–285]
- Geng CF, Tian Y, Zhang YP, *et al.* Effects of acute low salinity stress on the physiological indices of *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fishery Science of China*, 2015, 22(4): 666–674 [庚辰帆, 田焱, 张宇鹏, 等. 低盐胁迫对仿刺参相关生理指标的影响. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 666–674]
- He YY, Li J, Liu P, *et al.* Comparison of the resistance to pH value an ammonia in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) families. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(5): 761–765 [何玉英, 李健, 刘萍, 等. 中国对虾家系幼体对氨氮和 pH 值的耐受性比较. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(5): 761–765]
- Hong ML, Chen LQ, Gu SZ, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412–418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 412–418]
- Hu W, Li CL, Zhao B, *et al.* Effects of low salinity stress on survival, growth and feeding rate of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 92–97 [胡炜, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参存活、摄食和生长的影响. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 92–97]
- Li B, Fan QX, Yang K, *et al.* Effects of chronic ammonia stress on foraging, growth and haematological parameters of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) juveniles. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(6): 824–829 [李波, 樊启学, 杨凯, 等. 慢性氨氮胁迫对黄颡鱼摄食、生长及血液指标的影响. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(6): 824–829]
- Li CL, Hu W. The development situation, trend and suggestions on the *Apostichopus japonicus* Selenka aquaculture industry of China. *Marine Economy of China*, 2017(1): 3–20 [李成林, 胡炜. 我国刺参产业发展状况、趋势与对策建议. *中国海洋经济*, 2017(1): 3–20]
- Li CL, Song AH, Hu W, *et al.* Status analysis and sustainable development strategy of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka aquaculture industry in Shandong Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 126–132 [李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. *渔业科学进展*, 2010, 31(4): 126–132]
- Li GR, Ren LH, Sun GH, *et al.* Effects of hypoxic stress on oxidative stress indices in *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 133–139 [李根瑞, 任利华, 孙国华, 等. 低溶氧胁迫对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 氧化应激指标的影响. *渔业科学进展*, 2016,

- 37(5): 133–139]
- Li WX, Xie J, Song R, *et al.* Effects of pH stress on cortisol and non-specific immunity of *Carassius Auratus Gibelio*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 256–261 [李文祥, 谢骏, 宋锐, 等. 水体 pH 对异育银鲫皮质醇激素和非特异性免疫的影响. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 256–261]
- Pan Q, Tan YG, Bi YZ, *et al.* Effects of acid supplement on growth and feed utilization in tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(6): 682–688 [潘庆, 谭永刚, 毕英佐, 等. 酸制剂对罗非鱼生长和饲料利用的影响. *水产学报*, 2004, 28(6): 682–688]
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(1): 49–89
- Sha F, Chang YQ, Ding J. Effects of two cooling modes of low temperature stress on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(1): 25–29 [沙飞, 常亚青, 丁君. 两种降温模式的低温胁迫对刺参抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(1): 25–29]
- Wu P, Cao ZH, Yang LR, *et al.* Effects of pH on survival and growth to yellow catfish (*Pelteobagres fulvidraco*). *Reservoir Fisheries*, 2001, 21(6): 3–6 [吴萍, 曹振华, 杨立荣, 等. pH 对黄颡鱼生存和生长的影响. *水利渔业*, 2001, 21(6): 3–6]
- Yuan XT, Yang HS, Wang LL, *et al.* Effects of salinity on energy budget in pond-cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, 2010, 306: 348–351
- Zang YQ, Tian XL, Dong SL, *et al.* The activities of immunoenzymes and heat shock protein 70 content of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka) to chronic stress of ammonical nitrogen. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42: 60–66 [臧元奇, 田相利, 董双林, 等. 氨氮慢性胁迫对刺参免疫酶活性及热休克蛋白表达的影响. *中国海洋大学学报*, 2012, 42: 60–66]
- Zeng YY, Ai CX, Liu JG, *et al.* Effects of pH on some immune factors of mud crab, *Scylla paramamosain*. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2008, 47(3): 413–418 [曾媛媛, 艾春香, 刘建国, 等. pH 胁迫对拟穴青蟹体内几种免疫因子的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2008, 47(3): 413–418]
- Zhao B, Hu W, Li CL, *et al.* The effects of low salinity on the growth and activities of digestive enzymes in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 91–96 [赵斌, 胡炜, 李成林, 等. 低盐环境对 3 种规格刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长与消化酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 91–96]
- Zhao W, Liang M, Zhang P. Effect of yeast polysaccharide on the immune function of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka under pH stress. *Aquaculture International*, 2010, 18(5): 777–786
- Zhao XY, Li J, Chen P, *et al.* Effects of pH stress on survival rate and activities of ion-transport enzyme, immune-related enzymes in three species of shrimps. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(5): 720–728 [赵先银, 李健, 陈萍, 等. pH 胁迫对 3 种对虾存活率、离子转运酶和免疫酶活力的影响. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(5): 720–728]

(编辑 冯小花)

## Effects of pH Stress on Survival Rate, Growth and Antioxidant Enzyme Activities of the Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka

HAN Sha<sup>1</sup>, HU Wei<sup>1</sup>, LI Chenglin<sup>1</sup>①, ZHU Xibo<sup>2</sup>, ZHAO Bin<sup>1</sup>, ZHANG Shaochun<sup>1</sup>, SUN Yongjun<sup>3</sup>

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104; 2. Extension Station of Fishery Technology of Lanshan District, Rizhao 276800; 3. Haodangjia Group Corporation, Weihai 264300)

**Abstract** pH is an important environmental factor affecting the survival, growth, and immunity of aquatic animals. In general, alteration of environmental conditions often results in pH fluctuation in the aquaculture water of *Apostichopus japonicus* Selenka. However, little is known about the physiological response of sea cucumbers under pH stress. Therefore, the survival rate, growth, and antioxidant enzyme activities of sea cucumbers (7.02±0.81 g) were analyzed under different pH (control group, pH=8.4), low pH (pH 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, and 7.8), high pH (pH 8.6, 8.8, 9.0, 9.2, 9.4, and 9.6)) stress for 36 days. The survival rate of sea cucumbers decreased gradually with pH intension increasing and time extension, which in the groups ranging from pH 7.4 to pH 9.0 were 100%. There appeared to be a stress response and then death of individuals in the groups of pH 6.8, 7.0 and 9.6 from the third day, in which the whole group of sea cucumbers died after 30 days. Under different pH stress, the growth of the sea cucumbers differed significantly. The specific growth rate decreased with pH intension increasing and growth was negative growth in the group of pH 9.0. The superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity of sea cucumbers among the pH treatment groups increased and was significantly higher than those of the control group, which increased at first and then decreased with pH intension increasing. The activity of SOD and CAT of sea cucumber in low pH groups increased to (74.92±2.24) U/ml and (14.99±2.38) U/ml peaking at pH 7.4, which was significantly higher than the control group. While in high pH groups, the activity of SOD and CAT of sea cucumber increased to (72.90±1.10) U/ml and (15.68±0.89) U/ml, peaking at pH 8.8 and pH 9.0 respectively. The results indicate that the pH range from 7.4 to 9.0 is appropriate for survival and growth of sea cucumbers, otherwise stress responses and even death of sea cucumbers are imminent.

**Key words** *Apostichopus japonicus* Selenka; pH; Survival; Growth; Antioxidant enzyme

① Corresponding author: LI Chenglin, E-mail: lcl\_xh@hotmail.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170527002

http://www.yykxjz.cn/

刘旭佳, 沈夏霜, 黄国强, 彭银辉, 吴黎红. 水体中饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率及排氨率的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 99-105

Liu XJ, Shen XS, Huang GQ, Peng YH, Wu LH. Effects of suspended feed amount on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of different sized *Sipunculus nudus* Linnaeus. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 99-105

# 水体中饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率及排氨率的影响

刘旭佳<sup>1①</sup> 沈夏霜<sup>2</sup> 黄国强<sup>3</sup> 彭银辉<sup>1</sup> 吴黎红<sup>2</sup>

(1. 广西海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000;

2. 广西大学动物科学技术学院 南宁 530004; 3. 钦州学院海洋学院 钦州 535011)

**摘要** 为研究饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫(*Sipunculus nudus* Linnaeus)呼吸代谢的影响, 采用实验生态学方法, 研究了不同螺旋藻(*Spirulina platensis*)投喂量(5、10、15、20 和 25 mg/L)对 3 种规格[小(S)(1.58±0.48) g、中(M)(4.90±1.06) g 和大(L)(7.96±0.94) g]光裸方格星虫耗氧率和排氨率的影响。结果显示, 饵料投喂量对耗氧率和排氨率均影响显著( $P<0.05$ ), 饵料投喂量和规格的交互作用对光裸方格星虫耗氧率和排氨率影响极显著( $P<0.01$ )。当饵料投喂量达到 15 mg/L 时, 3 组规格光裸方格星虫的耗氧率和排氨率均出现显著下降。光裸方格星虫耗氧率和排氨率均随着饵料投喂量增加而明显降低, 且与饵料投喂量呈一元三次函数关系:  $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$ 。对于耗氧率, a 值的范围为 0.003~0.033, b 值的范围为 -1.698~-0.053, c 值的范围为 -1.805~18.873, d 值的范围为 -15.675~79.940。对于排氨率, a 值的范围为 0.0003~0.004, b 值的范围为 -0.172~-0.003, c 值的范围为 -0.326~1.972, d 值的范围为 3.634~14.008。光裸方格星虫耗氧率和排氨率均随着体重增加表现出曲线增加的规律。耗氧率与体重呈指数函数关系:  $y = ae^{bx}$ , a 值的范围为 8.082~20.934, b 值的范围为 0.217~0.270; 排氨率与体重呈幂函数关系:  $y = ax^b$ , a 值的范围为 1.441~3.598, b 值的范围为 0.521~0.747。光裸方格星虫的氧氮比(O/N)范围为 1.26~10.60。研究表明, 高浓度饵料投喂量会对光裸方格星虫的呼吸代谢产生负作用, 当饵料投喂量达到 20 mg/L 时, 光裸方格星虫的耗氧率和排氨率波动较大且显著下降。

**关键词** 光裸方格星虫; 饵料悬浮; 规格; 耗氧率; 排氨率

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0099-07

耗氧率和排氨率是评价海洋生物生理状态和代谢活动的重要指标(焦海峰等, 2017), 通过研究呼吸代谢, 了解其与环境及生物因素之间的相互关系, 从

而掌握海洋生物呼吸代谢水平、营养状况、最适生长条件以及所能承受的环境阈值, 由此可以深入研究生理学、营养需求与能量消耗以及生态学等问题, 并且

\* 广西自然科学基金(2015GXNSFBA139081)、广西科技攻关项目(1598006-6-6; AB16380167)、国家自然科学基金项目(31160532)和广西科学院业务费项目(13YJ22HYS14)共同资助 [This work was supported by Guangxi Natural Science Foundation (2015GXNSFBA139081), Guangxi Science and Technology Project (1598006-6-6; AB16380167), National Natural Science Foundation of China (31160532), and Guangxi Academy of Science Project (13YJ22HYS14)].

① 通讯作者: 刘旭佳, E-mail: lxu0312@126.com

收稿日期: 2017-05-27, 收修改稿日期: 2017-07-26

对于经济海产种的滩涂养殖容量规划和健康可持续发展具有重要的指导意义。

光裸方格星虫(*Sipunculus nudus* Linnaeus)是我国重要的经济类底栖动物,为北部湾特有的名贵经济海产种(许明珠等, 2016)。光裸方格星虫作为一种底栖碎屑食性的滩涂无脊椎生物,主要通过吻部摄食沙质沉积物中的有机质、细菌和腐烂碎屑等,可以将表层沉积物中有机物向深层转移,因此,对沿岸滩涂沉积物的能量和生源要素流动产生重要影响(Li *et al.*, 2015)。近年来,光裸方格星虫滩涂增养殖规模不断发展,开展基础呼吸代谢研究可以掌握其个体营养需求、代谢物排放量、最适生长条件以及对生长水环境影响等基础生理生态问题,从而可以合理规划和指导光裸方格星虫健康养殖。有关盐度、温度和体重对光裸方格星虫呼吸代谢影响的研究已有报道(刘旭佳等, 2017; 逯云召等, 2012),但未见饵料投喂量对其耗氧率和排氮率影响的研究报道。本文主要研究了不同饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率、排氮率和氧氮比(O/N)的影响,以期能为光裸方格星虫能量学和滩涂养殖容量规划提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用光裸方格星虫幼虫取自广西海洋研究所海水增养殖实验基地,其他规格取自养殖海域。按体重大小分为3组:小(S)[(1.58±0.48) g]、中(M)[(4.90±1.06) g]和大(L)[(7.96±0.94) g]组。将3组方格星虫放入PVC水箱(100 cm×60 cm×60 cm)中暂养,20条/箱。PVC箱底铺设10 cm厚中粗砂,保持连续充气,将螺旋藻(*Spirulina platensis*)粉充分混匀于海水中,再投喂到PVC箱中。实验设立5个投喂量梯度,每升海水中分别投喂5、10、15、20和25 mg螺旋藻粉,在PVC箱中每天定时投喂饵料,将方格星虫驯化7 d。实验期间,水温保持在27.7~29.7℃,海水盐度维持在30~31。

### 1.2 实验处理

暂养的方格星虫驯化7 d,禁食1 d。小、中和大规格方格星虫分别放入相同饵料投喂量的1、2和5 L锥形瓶中,测定代谢率。每个锥形瓶铺10 cm厚、经清洗暴晒过的石英砂,每一规格、每一饵料投喂量设15个平行,每瓶放1条,外加3个空白对照,装满对应饵料浓度梯度的海水,用塑料薄膜封口。实验采用静水方法,24 h后打开薄膜抽取水样。溶氧和氨氮分别采用美国 YSI professional series 溶氧仪和法国

Alliance-Futura/Proxima 连续流动分析仪进行测定。

### 1.3 测定方法

采用水瓶法测定光裸方格星虫环境水体中代谢瓶和对照瓶的溶解氧(DO<sub>t</sub>、DO<sub>0</sub>, μg/L)和氨氮(A<sub>t</sub>、A<sub>0</sub>, μg/L)含量。耗氧率和排氮率的计算公式为:

$$\text{耗氧率}(\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}) = (\text{DO}_0 - \text{DO}_t) \times V / (\text{DW} \cdot t)$$

$$\text{排氮率}(\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}) = (\text{A}_t - \text{A}_0) \times V / (\text{DW} \cdot t)$$

式中,  $V$  为实验瓶体积(L),  $DW$  为体重(g),  $t$  为代谢时间(h)。

氧氮原子数比的计算公式:

$$\text{氧氮比}(\text{O}/\text{N}) = (\text{耗氧率}/16) / (\text{排氮率}/14)$$

### 1.4 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件对所有代谢数据进行了方差和双因子方差分析,采用 LSD 方法进行比较检验, $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率的影响

方差分析显示,饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率的影响显著( $P < 0.05$ )(图 1)。小规格光裸方格星虫在饵料投喂量为 5 和 10 mg/L 时的耗氧率显著高于其他饵料投喂量( $P < 0.05$ ),且 5 mg/L 饵料投喂量下的耗氧率显著高于 10 mg/L 饵料投喂量,其他处理间差异均不显著( $P > 0.05$ )。中规格光裸方格星虫在饵料投喂量 5 和 10 mg/L 时显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ),且 15 mg/L 饵料投喂量下的耗氧率显著高于 20 mg/L 饵料投喂量( $P < 0.05$ ),其他处理组间均未出现显著差异( $P > 0.05$ )。大规格光裸方格星虫在饵料投喂量 5、10

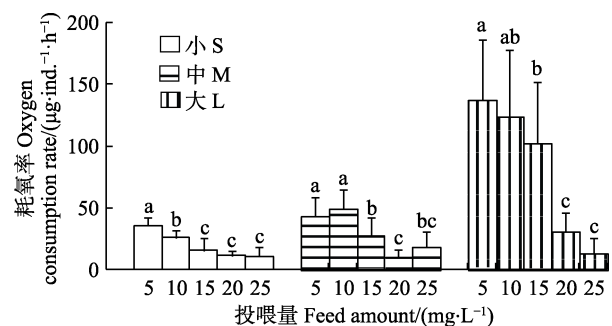


图 1 饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率的影响  
Fig.1 Effects of feed amount on the oxygen consumption rate of different sized *S. nudus*

不同字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。下同  
Different letters indicate significant difference among groups ( $P < 0.05$ ). The same as below

和 15 mg/L 时耗氧率显著高于 20 和 25 mg/L 饵料投喂量( $P<0.05$ ), 且 5 mg/L 饵料投喂量下的耗氧率显著高于 15 mg/L 饵料投喂量, 其他处理间差异均不显著( $P>0.05$ )。

综合以上结果, 当饵料投喂量增加至 15 mg/L, 3 种规格光裸方格星虫的耗氧率均表现显著降低现象。经双因子方差分析表明, 饵料投喂量和体重二者的交互作用对耗氧率影响表现极显著( $P<0.01$ )。

由以上结果可以得出, 在设定的饵料投喂量范围内, 光裸方格星虫耗氧率随着饵料投喂量的增加而降低。对光裸方格星虫耗氧率与饵料投喂量进行拟合, 最符合一元三次函数关系:  $y=ax^3+bx^2+cx+d$  ( $a$ 、 $b$ 、和  $d$  均为常数,  $x$  为饵料投喂量,  $y$  为耗氧率), 见表 1。

对光裸方格星虫耗氧率与体重进行拟合, 最符合指数函数:  $y=ae^{bx}$  ( $a$ 、 $b$  均为常数,  $x$  为体重,  $y$  为耗氧率)。当饵料投喂量达到 20 mg/L 时, 光裸方格星虫耗氧率与体重之间无规律关系, 见表 2。

## 2.2 饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫排氨率的影响

方差分析显示, 饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫排氨率的影响显著( $P<0.05$ ) (图 2)。小规格光裸方格星虫在饵料投喂量为 15 和 20 mg/L 时均与 25 mg/L 时排氨率之间差异不显著( $P>0.05$ ), 而其余饵料投喂量处理组间排氨率均表现差异显著( $P<0.05$ )。中规格光裸方格星虫在饵料投喂量为 5 和 10 mg/L 时的排氨率均显著高于 20 和 25 mg/L 处理组( $P<0.05$ ), 且饵料投喂量为 10、15 和 20 mg/L 时, 排氨率间均出现显著差异( $P<0.05$ ), 而其余饵料投喂量处理间未出现显著差异( $P>0.05$ )。大规格光裸方格星虫在饵料投喂量为 5 和 10 mg/L 时, 排氨率显著高于其他 3 个处理组( $P<0.05$ ), 同时, 饵料投喂量为 15 mg/L 的排氨率显著高于 25 mg/L 处理组( $P<0.05$ ), 其余饵料投喂量处理间差异均不显著( $P>0.05$ )。

表 1 光裸方格星虫饵料投喂量与耗氧率的回归 ( $y=ax^3+bx^2+cx+d$ )

Tab.1 Regression between feed amount and oxygen consumption rate of *S. nudus* ( $y=ax^3+bx^2+cx+d$ )

规格 Size	数量 Number	耗氧率 Oxygen consumption rate ( $\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}$ )						
		a	b	c	d	F	P	R <sup>2</sup>
小 S	65	0.003	-0.053	-1.805	45.698	35.712	0	0.649
中 M	65	0.036	-1.610	18.873	-15.675	21.175	0	0.506
大 L	65	0.033	-1.698	18.736	79.940	18.925	0	0.503

表 2 光裸方格星虫体重与耗氧率的回归 ( $y=ae^{bx}$ )

Tab.2 Regression between body weight and oxygen consumption rate of *S. nudus* ( $y=ae^{bx}$ )

饵料投喂量 Feed amount (mg/L)	数量 Number	耗氧率 Oxygen consumption rate ( $\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}$ )				
		a	b	F	P	R <sup>2</sup>
5	45	20.934	0.217	91.471	0	0.680
10	45	16.858	0.246	124.132	0	0.743
15	45	8.082	0.270	45.630	0	0.515

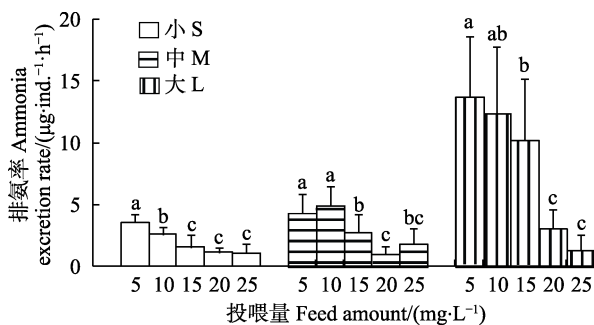


图 2 饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫排氨率的影响  
Fig.2 Effects of feed amount on the ammonia excretion rate of different sized *S. nudus*

表明, 饵料投喂量和体重二者的交互作用对排氨率的影响极显著( $P<0.01$ )。

由以上结果可以得出, 在设定的饵料投喂量范围内, 光裸方格星虫排氨率随着饵料投喂量的增加而降低。对光裸方格星虫排氨率与饵料投喂量进行拟合, 最符合一元三次函数关系:  $y=ax^3+bx^2+cx+d$  ( $a$ 、 $b$ 、 $c$  和  $d$  均为常数,  $x$  为饵料投喂量,  $y$  为排氨率), 见表 3。

对光裸方格星虫排氨率与体重进行拟合, 最符合幂函数:  $y=ax^b$  ( $a$ 、 $b$  均为常数,  $x$  为体重,  $y$  为排氨率), 见表 4。

## 2.3 不同饵料投喂量下光裸方格星虫的氧氮比

综上所述, 当饵料投喂量增加至 15 mg/L, 3 种规格光裸方格星虫的排氨率均显著降低。双因子方差分析

小、中和大 3 种规格的光裸方格星虫的 O/N 见



表 3 光裸方格星虫饵料投喂量与排氨率的回归 ( $y=ax^3+bx^2+cx+d$ )  
Tab.3 Regression between feed amount and ammonia excretion rate of *S. nudus* ( $y=ax^3+bx^2+cx+d$ )

规格 Size	数量 Number	排氨率 Ammonia excretion rate ( $\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}$ )						
		a	b	c	d	F	P	R <sup>2</sup>
小 S	65	0.0003	-0.003	-0.326	7.057	33.376	0	0.606
中 M	65	0.004	-0.172	1.972	3.634	9.022	0	0.282
大 L	65	0.004	-0.163	1.187	14.008	24.055	0	0.567

表 4 光裸方格星虫体重与排氨率的回归 ( $y=ax^b$ )  
Tab.4 Regression between body weight and ammonia excretion rate of *S. nudus* ( $y=ax^b$ )

饵料投喂量 Feed amount (mg/L)	数量 Number	排氨率 Ammonia excretion rate ( $\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}$ )				
		a	b	F	P	R <sup>2</sup>
5	45	3.598	0.683	60.861	0	0.592
10	45	2.992	0.747	164.256	0	0.808
15	45	1.807	0.736	20.877	0	0.343
20	45	1.441	0.584	22.466	0	0.398
25	45	1.743	0.521	15.990	0	0.302

表 5。随着饵料投喂量的增加, 3 种规格光裸方格星虫的 O/N 值整体呈下降的趋势。同一饵料投喂量下, 除 25 mg/L 投喂量外, 大规格光裸方格星虫 O/N 值最高, 中规格的 O/N 值最低。同一规格光裸方格星虫在不同饵料投喂量处理时, 小规格的 O/N 值在各饵料投喂量组间差异均不显著( $P>0.05$ )。中规格光裸方格星虫的 O/N 值在饵料投喂量为 5 和 10 mg/L 时显著高于 20 和 25 mg/L 处理组( $P<0.05$ ), 且饵料投喂量 15 mg/L 显著高于 20 mg/L 处理组( $P<0.05$ ), 其余组间差异均不显著( $P>0.05$ )。大规格光裸方格星虫 O/N 值在饵料投喂量 5、10 和 15 mg/L 均显著高于 25 mg/L 投喂量( $P<0.05$ ), 其他饵料投喂量组间均无显著差异( $P>0.05$ )。

表 5 不同饵料投喂量、不同规格光裸方格星虫的 O/N 值  
Tab.5 O/N values of different sized *S. nudus* under different feed amount

饵料投喂量 Feed amount (mg/L)	氧氮比 O/N		
	小 S	中 M	大 L
5	5.86±0.94 <sup>a</sup>	3.83±0.99 <sup>a</sup>	7.38±2.05 <sup>a</sup>
10	6.07±1.14 <sup>a</sup>	4.01±0.98 <sup>a</sup>	8.80±4.38 <sup>a</sup>
15	5.13±2.10 <sup>a</sup>	3.42±1.84 <sup>ab</sup>	10.60±5.20 <sup>a</sup>
20	6.00±3.88 <sup>a</sup>	1.26±0.66 <sup>c</sup>	6.92±4.67 <sup>ac</sup>
25	4.99±4.44 <sup>a</sup>	2.69±2.13 <sup>bc</sup>	2.32±2.39 <sup>bc</sup>

### 3 讨论

呼吸与排泄是海洋动物代谢活动的重要特征, 而耗氧率和排氨率则是呼吸代谢主要测量指标, 不但可

以反映水产动物单位个体的代谢水平高低及变化规律, 而且对于掌握水生动物呼吸代谢特征、最适生长条件、养殖水域生态效应和所能承受阈值的评估, 具有重要参考价值(冯雪等, 2012)。在水产动物育苗和养殖过程中, 不同饵料种类和浓度可以满足其不同的营养需求, 同时影响其生长和能量代谢活动。饵料被摄食后用于消化、吸收和合成能量物质, 从而引起水产动物耗氧率和排氨率以及能量代谢消耗的增加(钱周兴等, 2005)。

本研究选择光裸方格星虫养殖过程蛋白质含量较高的螺旋藻作为饵料, 研究结果表明, 饵料投喂量对光裸方格星虫的耗氧率和排氨率影响显著, 当饵料投喂量达到 15 mg/L 时, 3 种规格光裸方格星虫的耗氧率和排氨率均显著降低, 随着饵料投喂量的继续增加, 耗氧率和排氨率均再次显著降低。低浓度饵料投喂量(5 和 10 mg/L)下, 光裸方格星虫代谢率较高, 其耗氧率和排氨率显著高于高浓度饵料处理组, 说明低饵料投喂量水平下光裸方格星虫的摄食行为(伸出吻吞食表层沙粒)可能更活跃, 排粪速率可能更快, 体内的生理活动较强, 行为活动的增加导致能量代谢的提高, 表现为耗氧率和排氨率较高。而随着饵料投喂量的增加, 这种觅食和吞食行为可能减弱, 超过正常代谢水平, 能量代谢率也随之下降, 光裸方格星虫耗氧率和排氨率均出现显著降低现象, 因此, 高浓度的螺旋藻投喂到光裸方格星虫水体环境中, 会对其呼吸代谢产生一定抑制作用, 从而减少耗氧和排泄, 以便适应不利的水环境。

目前, 国内外有关饵料投喂量对水生生物代谢的

影响的研究报道较少,本研究结果与一些海洋生物的代谢结果不同。王海艳等(2001)研究发现, 饵料投喂量在一定范围内时, 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的耗氧率和排氨率随着饵料投喂量的增大而增大, 超过这一范围, 其排氨率随饵料投喂量的增大而减小。唐保军(2005)研究发现, 文蛤(*Meretrix meretrix*)的耗氧率和排氨率随着饵料(三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum*、等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 和扁藻 *Platymonas subcordiformis*)浓度的上升而增加。此外, 饵料投喂量对食用鸟蛤(*Cerastoderma edule*) (Navarro *et al.*, 1994)和砂海螂(*Mya arenaria*) (Bacon *et al.*, 1998)的影响较大, 而对贻贝(*Mytilus edulis*) (Bayne *et al.*, 1993)和海湾扇贝(*Placopecten magellanicus*) (Ward *et al.*, 1992)则无任何影响。夏苏东(2012)研究发现, 刺参(*Apostichopus japonicus*)耗氧率和排氨率随饲料蛋白质含量的增加而升高, 但超过一定蛋白含量时, 呼吸代谢率则出现降低。贝类为滤食性动物, 选择饵料主要为活体藻类饵料, 同时, 滤食性贝类会根据饵料质量和数量进行选择摄食(Bacon *et al.*, 1998)。刺参主要摄食微生物(包括底栖硅藻、细菌、原生动物等)、动植物有机碎屑等(袁秀堂等, 2016), 饲料中的蛋白质含量增加, 会引起其代谢率增加(夏苏东, 2012)。

本研究中光裸方格星虫为底栖、钻沙食碎屑动物, 以沙质中有机质、细菌和腐烂碎屑等为食物来源, 饵料投喂量的高低不但反映其代谢情况, 同时影响底质和水环境中有机质含量变化, 当饵料超过一定浓度时, 光裸方格星虫摄食活动减弱、呼吸代谢率降低、消耗的能量减少, 是其环境适应能力的体现, 及在不利环境保存能量的一种方式。本研究结果与贝类、刺参等研究结果不同, 这可能与研究对象的生活习性和饵料形态以及种类不同有关。

通过研究光裸方格星虫呼吸代谢情况, 发现在同等规格条件下, 随着饵料投喂量的增加, 耗氧率和排氨率与饵料投喂量呈现一定规律性, 基本符合一元三次函数回归关系  $y=ax^3+bx^2+cx+d$ , 饵料投喂量对光裸方格星虫代谢的影响存在显著差异。而在同一饵料投喂浓度下, 光裸方格星虫耗氧率与体重最符合指数函数  $y=ae^{bx}$ , 而当饵料投喂量达到 20 mg/L 时, 光裸方格星虫耗氧率与体重之间无明显规律, 说明饵料浓度增加至一定程度, 各种规格光裸方格星虫耗氧均严重降低。而光裸方格星虫排氨率与体重呈幂函数关系  $y=ax^b$ , 这与许多水生动物的耗氧率和排氨率随体重增加而减小的研究结果刚好相反(史宝等, 2008; 冯雪等, 2012; 吴文广等, 2013), 水生动物的耗氧率和排氨

率受多种因素的影响, 这可能是由于光裸星虫摄食和潜沙的行为所引起的代谢类型不同所导致。3 种规格光裸方格星虫单位个体的耗氧率和排氨率之间差异均显著, 本研究中光裸方格星虫耗氧率和排氨率随体重增加而增加, 表现出小规格最小、大规格最高的变化趋势, 这表明大规格的光裸方格星虫代谢活动量比较旺盛, 需要消耗较多能量用于摄食活动。

氧氮比表示在动物生长代谢过程中蛋白质、脂肪和碳水化合物等能源物质的来源和能量代谢的途径, 是衡量动物能量代谢的一项重要指标, 可用来评估动物对营养物质的利用特性。本研究中, 饵料投喂量在 5~25 mg/L 范围内, 光裸方格星虫的 O/N 值为 1.26~10.60。在 5~15 mg/L 饵料投喂量范围内, 3 种规格光裸方格星虫 O/N 值差异不显著, 随着饵料投喂量继续增加到 20 mg/L 时, 中规格和大规格光裸方格星虫排氨率大幅增加, O/N 值显著降低, 说明代谢底物中蛋白质的比例增加, 而利用脂肪和碳水化合物的比例降低。在本研究设定的饵料投喂量范围内, 光裸方格星虫的代谢底物主要以利用蛋白质供能为主。对于大规格而言, 光裸方格星虫 O/N 值较高, 说明消化、吸收和生长等生理活动需要消耗更多的能量, 通过以蛋白和脂肪供能为主来适应外界环境变化。近年来, 国内外有关饵料投喂量对水生动物呼吸排泄的研究较少, 无脊椎动物主要集中在贝类上, 耗氧率和排氨率一般随饵料浓度的增加而上升, O/N 值受饵料种类和浓度的影响较大, 这是由于贝类为滤食性动物, 饵料浓度会直接影响其呼吸代谢效率(王海艳等, 2001; 唐保军, 2005; 李金碧, 2009)。而光裸方格星虫通过吞食底栖沙并过滤其中有机质等碎屑为食, 摄食能量代谢消耗较大, 与贝类摄食行为差异较大。本研究认为, 当外界生长水体中的饵料投喂量较低时, 光裸方格星虫代谢活动较强, 消耗较多能量物质用于生长, 一旦超出其生长环境适宜范围时, 呼吸代谢水平则降低, 选择消耗较少的物质和能量供能, 以适应外界环境变化。

#### 4 结论

本研究表明, 饵料投喂量对不同规格光裸方格星虫耗氧率和排氨率影响显著, 投喂螺旋藻粉浓度不宜超过 15 mg/L, 因为高饵料投喂量会对光裸方格星虫的呼吸代谢产生负作用, 当投喂量达到 20 mg/L 时, 光裸方格星虫的耗氧率和排氨率波动较大且出现显著下降现象。同时, 光裸方格星虫对外界水体环境中饵料投喂浓度的变化会积极做出反应, 可以通过降低

呼吸代谢来适应环境的变化。本研究对光裸方格星虫滩涂养殖和池塘养殖具有重要指导意义,同时,也为广西沿海光裸方格星虫养殖容量规划提供重要参考数据。

## 参 考 文 献

- Bacon GS, MacDonald BA, Ward JE. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles: I. Feeding activity and selection. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 1998, 219(1-2): 105-125
- Bayne BL, Iglesias JIP, Hawkins AJS, *et al.* Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: Responses to variations in quantity and organic content of the seston. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 1993, 73(4): 813-829
- Feng X, Chen PM, Qin CX. Advancement of the study on respiratory metabolism of fishery resources organism. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(4): 92-96 [冯雪, 陈丕茂, 秦传新. 渔业资源生物呼吸代谢研究进展. 广东农业科学, 2012, 39(4): 92-96]
- Jiao HF, Zheng D, Yan QN, *et al.* Effects of water temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Saccostrea cucullata*. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(2): 692-699 [焦海峰, 郑丹, 严巧娜, 等. 温度、盐度及交互作用对僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)呼吸排泄的影响. 生态学报, 2017, 37(2): 692-699]
- Li JB. The effects of environmental factors on energy budget of *Atrina pectinate*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2009, 42-49 [李金碧. 环境因子对栉江珧能量收支的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2009, 42-49]
- Li JW, Zhu CB, Guo YJ, *et al.* Experimental study of bioturbation by *Sipunculus nudus* in a polyculture system. *Aquaculture*, 2015, 437(9): 175-181
- Liu XJ, Shen XS, Huang GQ, *et al.* Effects of salinity and body weight on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Sipunculus nudus* Linnaeus. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(1): 64-69 [刘旭佳, 沈夏霜, 黄国强, 等. 盐度和规格对光裸方格星虫耗氧率及排氨率的影响. 水产学报, 2017, 41(1): 64-69]
- Lu YZ, Wang QH, Du XD. Effects of salinity and body weight on the oxygen consumption and ammonia excretion rates of *Sipunculus nudus* Linnaeus. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 32(1): 87-91 [逯云召, 王庆恒, 杜晓东. 温度和体质量对光裸星虫排氨率和耗氧率的影响. 广东海洋大学学报, 2012, 32(1): 87-91]
- Navarro E, Larretxea X. The basis for a functional response to variable food quantity and quality in cockles *Cerastoderma edule* (Bivalvia, Cardiidae). *Physiological Zoology*, 1994, 67(2): 468-496
- Qian ZX, Fang YF. Research progress about specific dynamical action in the marine species. *Journal of Marine Sciences*, 2005, 23(3): 30-35 [钱周兴, 方一峰. 特殊动力作用在海洋生物中的研究进展. 海洋学研究, 2005, 23(3): 30-35]
- Shi B, Xu T, Ma S. Effect of salinity on the oxygen consumption rate, ammonia excretion rate of *Arca subcrena* Lischke. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2008(1): 107-108 [史宝, 徐涛, 马甦. 盐度对毛蚶(*Arca subcrena* Lischke)呼吸与代谢的影响. 海洋湖沼通报, 2008(1): 107-108]
- Tang BJ. Effects of environmental factors and food on the energy budget and larval development of *Meretrix meretrix*. Master's Thesis of Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2005, 35-40 [唐保军. 环境因子和饵料对文蛤能量收支与幼虫生长发育的影响. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2005, 35-40]
- Wang HY, Xue QZ, Li J. Effects of diet concentrations on respiration rate and ammonia excretion of clam *Ruditapes philippinaru*. *Marine Sciences*, 2001, 25(4): 37-39 [王海艳, 薛钦昭, 李军. 饵料浓度对菲律宾蛤仔呼吸和排泄的影响. 海洋科学, 2001, 25(4): 37-39]
- Ward JE, Gassell HK, MacDonald BA. Chemoreception in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). I. Stimulatory effects of phytoplankton metabolites on clearance and ingestion rates. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 1992, 163(2): 235-250
- Wu WG, Zhang JH, Fang JG, *et al.* Effects of salinity on oxygen consumption and ammonia excretion rate of different sizes of *Bullacta exarata*. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(9): 2457-2461 [吴文广, 张继红, 方建光, 等. 盐度对不同规格泥螺耗氧率和排氨率的影响. 生态学杂志, 2013, 32(9): 2457-2461]
- Xia SD. Study on feeding behavior and protein requirement of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas*. Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2012, 70-75 [夏苏东. 刺参幼参摄食行为与蛋白质营养需要研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2012, 70-75]
- Xu MZ, Zhang Q, Tong T, *et al.* Effects of dietary Zinc content on growth performance, body composition, coelomic fluid zinc content and alkaline phosphatase activity of juvenile peanut worm, *Sipunculus nudus* Linnaeus. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(7): 2292-2299 [许明珠, 张琴, 童潼, 等. 饲料锌含量对方格星虫稚虫生长性能、体成分、体腔液中锌含量及碱性磷酸酶活性的影响. 动物营养学报, 2016, 28(7): 2292-2299]

Yuan XT, Yang HS, Zhou Y, *et al.* Salinity effect on respiration and excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(4):

348–354 [袁秀堂, 杨红生, 周毅, 等. 盐度对刺参 (*Apostichopus japonicus*)呼吸和排泄的影响. *海洋与湖沼*, 2006, 37(4): 348–354]

(编辑 冯小花)

## Effects of Suspended Feed Amount on Oxygen Consumption Rate and Ammonia Excretion Rate of Different Sized *Sipunculus nudus* Linnaeus

LIU Xujia<sup>1</sup>⊙, SHEN Xiashuang<sup>2</sup>, HUANG Guoqiang<sup>3</sup>, PENG Yinhui<sup>1</sup>, WU Lihong<sup>2</sup>

(1. Guangxi key laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004;

3. Ocean College, Qinzhou University, Qinzhou 535011)

**Abstract** Peanut-worms *Sipunculus nudus* are exploited as a popular seafood in international and domestic markets due to high nutritional and pharmaceutical value. In recent years, over-exploitation of *S. nudus* has caused that natural resource to be degraded greatly, therefore study on *S. nudus* respiratory metabolism needs to be carried out to better understand the culture capacity and sustainable development of *S. nudus* resources. The effects of suspended feed concentration (5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L) and body weight S(1.58±0.48 g), M(4.90±1.06 g) and L(7.96±0.94 g) on oxygen consumption rate (OR) and ammonia excretion rate (AR) rate of *Sipunculus nudus* Linnaeus were studied using experimental ecology methods. The results indicated that suspended feed concentration had significant effects on OR and AR ( $P<0.05$ ), and interaction of the both factors had a significant effect on OR and AR ( $P<0.01$ ). When feed concentration reached 15 mg/L, the OR and AR decreased significantly. Both the OR and AR decreased with the increasing feed concentration. The relationship between OR or AR and suspended feed concentration can be represented by the cubic function  $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$ , where a values of OR or AR ranged in 0.003~0.033 and 0.0003~0.004, b values ranged in -1.698~-0.053 and -0.172~-0.003, c values ranged in -1.805~18.873 and -0.326~1.972, d values ranged in -15.675~79.940 and 3.634~14.008. Both the OR and AR increased with increasing body weight. The relationship between OR and body weight can be represented by the exponential function  $y = ae^{bx}$ , where a values ranged in 8.082~20.934 and b values ranged in 0.217~0.270. The relationship between AR and body weight can be represented by the power function  $y = ax^b$ , where a values ranged in 1.441~3.598, and b values ranged in 0.521~0.747. The O/N value ranged from 1.26 to 10.60. The study showed that high suspended feed concentration had a negative influence on *S. nudus*; once it reached 20 mg/L, the OR and AR fluctuated and declined significantly.

**Key words** *Sipunculus nudus* Linnaeus; Suspended feed concentration; Body weight; Oxygen consumption rate; Ammonia excretion rate

⊙ Corresponding author: LIU Xujia, E-mail: lxu0312@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171220001

http://www.yykxjz.cn/

孟祥宇, 张艳丽, 霍忠明, 牟政强, 王化敏, 闫喜武.  $\beta$ -1,3-葡聚糖对副溶血弧菌感染菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的存活及两种免疫基因表达影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 106–113

Meng XY, Zhang YL, Huo ZM, Mu ZQ, Wang HM, Yan XW. Effects of  $\beta$ -1,3-glucan on the survival and expression of two immune genes in *Ruditapes philippinarum* infected with *Vibrio parahaemolyticus*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 106–113

# $\beta$ -1,3-葡聚糖对副溶血弧菌感染菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的存活及两种免疫基因表达影响\*



孟祥宇 张艳丽 霍忠明<sup>①</sup> 牟政强 王化敏 闫喜武

(大连海洋大学 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心 农业农村部北方海水增殖重点实验室 大连 116023)

**摘要** 本文以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)为材料,开展了不同浓度 $\beta$ -1,3-葡聚糖对正常菲律宾蛤仔及副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后蛤仔的存活率和凝集素基因(*Lectin*)、Toll 样受体 2 基因(*TLR2*)的表达研究。结果显示,  $\beta$ -葡聚糖浸泡蛤仔可以有效提高副溶血弧菌感染后蛤仔的存活率,在 1000 mg/L 浓度下,存活率最高,未感染组的鳃组织中, *TLR2* 在 6 h 时达到峰值,显著高于其他时间( $P < 0.05$ )。在感染组中, *TLR2* 呈先升高后降低的趋势,在 1.5 h 时达到峰值。感染组和未感染组的 *Lectin* 表达均为先升高后下降趋势。在 3 h 时,100 mg/L 未感染组的 *Lectin* 相对表达量显著高于 100 mg/L 感染组( $P < 0.05$ )。在外套膜中,感染组和未感染组 *TLR2* 在 3~12 h 之间表达量逐渐降低。在 24 h 时,1000 mg/L 未感染组表达量最高。感染组 *Lectin* 在外套膜中,浓度为 1000 mg/L 的实验组比 100 mg/L 实验组各时段都有更高的表达量,但只有 0 和 24 h 时差异显著( $P < 0.05$ )。蛤仔鳃和外套膜 *Lectin* 的表达模式不同,但 $\beta$ -葡聚糖的浸泡都促进了 *Lectin* 在感染初期的表达。从结果上看, $\beta$ -葡聚糖的浸泡会增加这 2 种基因的相对表达,被 $\beta$ -葡聚糖浸泡过的蛤仔被副溶血弧菌感染后,会更为快速地表达 *TLR2* 和 *Lectin*。本研究旨在通过不同浸泡浓度 $\beta$ -葡聚糖对蛤仔存活及免疫基因表达的影响,初步了解 $\beta$ -葡聚糖对蛤仔免疫力的作用,为蛤仔亲贝的保种、苗种繁育及池塘养殖的疾病防控提供一定的理论依据。

**关键词**  $\beta$ -葡聚糖; 菲律宾蛤; 副溶血弧菌; 免疫基因

中图分类号 S944.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0106-08

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是我国四大养殖贝类之一。目前,我国蛤仔年产量约 300 万 t,约占世界蛤仔总产量的 90%(张国范等, 2010)。但近年来,由于水质环境恶化,养殖生产盲目扩大,主要

蛤仔养殖区病害频发,使产业遭受了巨大的损失,其中弧菌属(*Vibrio*)的病原菌是蛤仔疾病的主要致病因素(Moreira *et al*, 2012)。

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐

\* 国家贝类产业技术体系专项(CARS-49)和国家自然科学基金(31502163)共同资助[This work was supported by National Science Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49), and National Natural Science Foundation of China (31502163)]. 孟祥宇, E-mail: 1048982628@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 霍忠明, E-mail: huozm@dlou.edu.cn

收稿日期: 2017-12-20, 收修改稿日期: 2018-02-27

的革兰氏阴性菌,是弧菌属的一个种类。副溶血弧菌是海水养殖动物主要病原菌之一,虾蟹(王小玉等, 2006; Krantz *et al.*, 1969)及贝类(Bartley *et al.*, 1971)等水产动物都是其侵染对象。它通过与宿主细胞间相互作用产生致病毒素直至宿主死亡。沈亚林等(1993)报道了副溶血弧菌对健康文蛤(*Meretrix meretrix*)具有很强的致病性,患病文蛤足伸出、对刺激反应迟纯、外壳边缘附有粘液、离水不久体液溢出。林强等(2012)研究表明,牡蛎(*Crassostrea*)养殖中水温和副溶血弧菌总量呈正相关,盐度和副溶血弧菌总量呈负相关。副溶血弧菌感染菲律宾蛤仔的研究只有零星报道。仅见于菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物能够抑制副溶血弧菌活性的报道(万慧一, 2012; 刘淇等, 2013)。

$\beta$ -葡聚糖( $\beta$ -1,3-glucans)是由  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)糖苷键连接  $\alpha$ -D-葡萄糖形成的葡萄糖聚合物,具有增强水产养殖动物自身的免疫力,提高抗逆性,减少死亡率,改善生长状况和饲料利用的效率,促进营养物质代谢等生物功能。现已被广泛认为是一种潜力巨大的免疫促进剂(Williams *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 2003)和非特异性免疫的免疫激活剂(杜肖娜等, 2001)。目前,  $\beta$ -葡聚糖作为免疫促进剂在贝类中的应用,仅见于王晶(2007)对菲律宾蛤仔的酚氧化酶的影响的研究,在其他贝类中尚无报道。

与其他无脊椎动物一样,蛤仔缺乏特异性免疫系统,只能依赖其非特异性免疫来防御疾病。TLR2 (Toll-like receptor 2)具有识别病原体,启动天然免疫等功能,在抗感染过程中起到尤为重要的作用(唐深等, 2004)。TLR2 信号途径的激活,可以产生促凋亡蛋白(FADD, Fas-associated death domain protein)和 Caspase-8,导致表达 TLR2 的细胞发生凋亡,从而可降低过度的免疫应答,调控机体对入侵病原体的免疫应答在适度的水平(Means *et al.*, 1999)。而动物凝集素也是无脊椎动物抵御病原体入侵过程中的极其重要的因子,可以识别外源物质。此外,动物凝集素能与体液或细胞表面的糖配体结合,对细胞产生信号,调节细胞与细胞、细胞与基质间的反应(朱月, 2005)。Wang 等(2011)在对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)凝集素基因研究发现,其存在于扇贝 TLR 信号通路的免疫系统中,在抵御鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染过程中起着至关重要的作用。

本研究旨在通过不同浸泡浓度  $\beta$ -葡聚糖对蛤仔存活及免疫基因表达的影响,初步了解  $\beta$ -葡聚糖对蛤仔免疫力的作用,为蛤仔亲贝的保种、苗种繁育及池塘养殖的疾病防控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

本研究菲律宾蛤仔采自大连黑石礁海区的野生群体。蛤仔壳长为 2.5~3.5 cm,在实验室暂养 1 周,养殖水温为 18 $^{\circ}$ C~21 $^{\circ}$ C, 24 h 连续充气培养。副溶血弧菌取自大连海洋大学水产病害研究室。

### 1.2 菌株的制备

菌株接种于 NA 营养培养基上(取 33 g NA 培养基用 1000 ml 蒸馏水加热溶解,于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌锅中灭菌 20 min,倒板备用),7 $^{\circ}$ C 时培养 24 h,然后用灭菌海水洗下菌苔,以 2000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液,收集沉淀,再用灭菌海水洗 3 次,配成浓度为  $3 \times 10^9$  cell/ml [ $10^8$ ~ $10^9$  CFU/ml (CFU/ml 指的是每毫升样品中含有的细菌菌落总数;CFU/g 指的是每克样品中含有的细菌菌落总数)]的菌悬液,用于活菌免疫诱导。

### 1.3 蛤仔病原菌的人工感染

共设置 5 个实验组,分别为副溶血弧菌感染的蛤仔实验组(C)、100 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸浴蛤仔实验组(A<sub>1</sub>)、1000 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸浴蛤仔实验组(A<sub>2</sub>)、100 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸浴后副溶血弧菌感染的蛤仔实验组(B<sub>1</sub>)、1000 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸浴后副溶血弧菌感染的蛤仔实验组(B<sub>2</sub>)。每组设 3 个平行,每个实验组 38 个健康蛤仔。

用天平称取 200 g  $\beta$ -葡聚糖粉末(河北银峰食品科技有限公司,白色粉末,化学式[C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sub>n</sub>),在容量瓶中加入 20 L 海水和称取好的粉末,配制成 10 g/L 的母液(无色透明粘稠液体)备用。向容积为 30 L 水槽中加入  $\beta$ -葡聚糖母液,配置浓度为 100 mg/L(A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>)和 1000 mg/L(A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>)的  $\beta$ -葡聚糖母液。分别向各个实验组放入 38 个健康蛤仔。 $\beta$ -葡聚糖浸泡 1 d 后,向 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、C 水槽中的蛤仔注射副溶血弧菌,用注射器吸取浓度为  $3 \times 10^9$  CFU/ml 的副溶血弧菌 10  $\mu$ l,从蛤仔壳后缘倾斜插入到壳顶部位,吸收到血液后连同血液和菌液一起注入胸腔内,立即放回水槽中。向 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 中,以同样的方式注入 PBS。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

在注射副溶血弧菌后的 0、1.5、3、6、12 和 24 h,分别对 5 个实验组的蛤仔取样。每个时间点取 3 个个体的鳃组织和外套膜组织,用液氮速冻,储存在-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。将保存好的鳃和外套膜从-80 $^{\circ}$ C 冰箱取

出,在液氮下研磨后,按照天根生化科技(北京)有限公司的动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取,再按照 TaKaRa Primer Script™ RT Reagent Kit 说明合成 cDNA。从本实验室菲律宾蛤仔转录组中选取核心序列,用 Primer 5.0 设计引物,由大连万泽生物公司合成 *TLR2*, *Lectin* 引物。本研究采用  $\beta$ -actin 作为内参基因,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequence

基因 Gene	引物 Primers (5'~3')
<i>TLR2</i>	F: ATAGAGTGGCACCCCTCAGACAGAA R: CTGGAATAGTGAGACCAAAAAGAGC
<i>Lectin</i>	F: TACTAGGTAACGTAATCGCT R: ATGATCCATTGCATTAGCGA
$\beta$ -actin	F: CTCCCTTGAGAAGAGCTACGA R: GATACCAGCAGATTCCATACCC

将反转录所得的全部 cDNA 各取 2  $\mu$ l 混合,做为 cDNA 的混合模板,按照 5<sup>0</sup>、5<sup>1</sup>、5<sup>2</sup>、5<sup>3</sup>、5<sup>4</sup>、5<sup>5</sup> 倍数梯度稀释,制备目的基因和内参基因的扩增曲线。在每个扩增效率合格后(1.9~2.1),使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa, 大连)在 LightCycler® 480 定量 PCR 仪(Roche, 上海)上对候选基因进行扩增,反应体系为 20  $\mu$ l,每个样品 3 组重复,反应体系见表 2。实验采用两步法 PCR 反应程序,反应条件为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 30 s,共 40 个循环。熔解曲线反应条件为 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 60℃~95℃; 50℃ 30 s。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系  
Tab.2 Quantitative real-time PCR detecting system

反应体系 Reaction system	体积 Volume ( $\mu$ l)
SYBR premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$ )	10
PCR forward primer(10 $\mu$ mol/L)	0.8
PCR reverse primer(10 $\mu$ mol/L)	0.8
DNA 模板	2
dH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)	6.4
合计 Total	20

### 1.5 数据统计

24 h 后统计各实验组存活率。对于荧光定量结果的分析采用二阶导数  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 2 种蛤仔的免疫基因在  $\beta$ -葡聚糖对副溶血弧菌感染的鳃和外套膜中相对表达量的变化。2 种蛤仔免疫相关基因的平均标准化表达量均用 C 组表达量校准。最终计算结果用平均

值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  具体计算方法如下:

$\Delta Ct = \text{目的基因 } C_t - \text{内参基因 } C_t$ ;

$\Delta\Delta Ct = \text{实验组 } \Delta Ct - \text{对照组 } \Delta Ct$ ;

最后,计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值,得出的值就是基因的相对表达量。

结果分析比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用 SPSS20.0 处理数据,差异显著性设置为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 各实验组存活率比较

各实验组蛤仔存活率见图 1。从图 1 可以看出, A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 组的存活率显著高于对照组( $P < 0.05$ ),但彼此之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

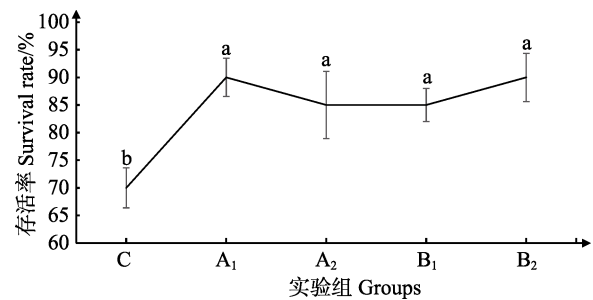


图 1 不同实验组的存活率

Fig.1 Survival rate of different experimental groups

C: 未经  $\beta$ -葡聚糖浸泡,感染副溶血弧菌; A<sub>1</sub>: 100 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸泡,未感染副溶血弧菌; A<sub>2</sub>: 1000 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸泡,未感染副溶血弧菌; B<sub>1</sub>: 100 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸泡,感染副溶血弧菌; B<sub>2</sub>: 1000 mg/L  $\beta$ -葡聚糖浸泡,感染副溶血弧菌。下同。相同字母表示无显著差异( $P > 0.05$ ),不同字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )

C: Without  $\beta$ -glucan, infected with *V. parahaemolyticus*; A<sub>1</sub>: 100 mg/L  $\beta$ -glucan, without *V. parahaemolyticus* infection; A<sub>2</sub>: 1000 mg/L  $\beta$ -glucan, without *V. parahaemolyticus* infection; B<sub>1</sub>: 100 mg/L  $\beta$ -glucan, with *V. parahaemolyticus* infection; B<sub>2</sub>: 1000 mg/L  $\beta$ -glucan, with *V. parahaemolyticus* infection. The same as below. There is no significant difference between the same letters ( $P > 0.05$ ), and the different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ )

### 2.2 *TLR2* 表达

蛤仔鳃中 *TLR2* 表达情况见图 2。结果显示, A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub> 组中, *TLR2* 在 6 h 时达到峰值,显著高于其他时间( $P < 0.05$ ),其他时间段均无显著差异( $P > 0.05$ )。在 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 组中, *TLR2* 呈先升高后降低的趋势,在 1.5 h 时达到峰值。在 6 h 时, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 组 *TLR2* 相对表达量显著低于 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 组( $P < 0.05$ )。12 h 时, B<sub>1</sub> 组中,

*TLR2* 相对表达量显著高于其他组( $P<0.05$ )。24 h 时,  $B_1$  组表达量仍显著高于  $A_1$  组( $P<0.05$ )。  $B_1$  组 0、1.5 和 12 h 时, *TLR2* 基因相对表达量无显著差异, 但都显著高于 3 和 6 h 时 *TLR2* 相对表达量( $P<0.05$ )。  $B_2$  组在 0、1.5 h 时, *TLR2* 相对表达量显著高于其他时间(24 h 除外)( $P<0.05$ )。

蛤仔外套膜中 *TLR2* 表达情况见图 3。结果显示,

同一时间下, 0 h 时  $A_1$  组 *TLR2* 相对表达量显著低于  $A_2$  组( $P<0.05$ )。所有实验组 *TLR2* 在 3~12 h 之间表达量逐渐降低, 而在 24 h 时,  $A_2$  组表达量最高。但 3~24 h 时, 各实验组 *TLR2* 相对表达量无显著差异( $P>0.05$ )。相同实验条件下,  $A_2$ 、 $B_1$ 、 $B_2$  组的 *TLR2* 相对表达量在 24 h 显著高于 12 h 时各组对应的 *TLR2* 相对表达量( $P<0.05$ )。

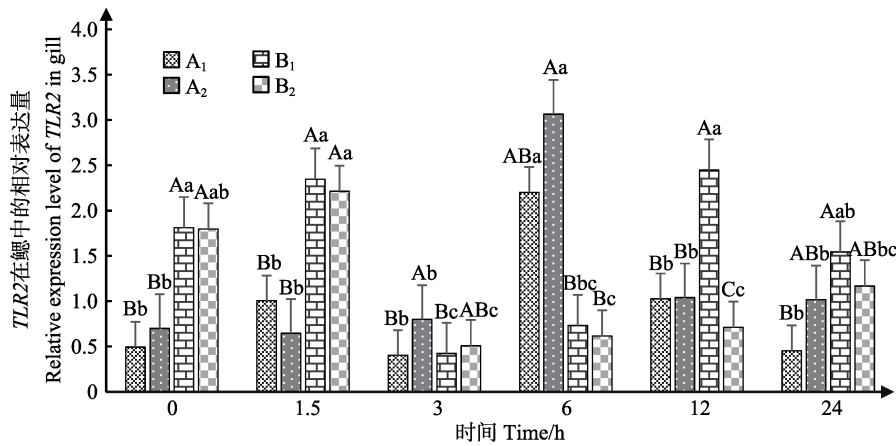


图 2 鳃组织中 *TLR2* 的表达

Fig.2 The expression level of *TLR2* in gill

同一时间, 大写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ), 相同字母表示无显著差异( $P>0.05$ ); 同一实验条件下, 不同小写字母表示各组在不同时间点差异显著( $P<0.05$ ), 相同字母者表示差异不显著( $P>0.05$ )。下同

In the same experimental period, different capital letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ), the same letter indicate no significant difference ( $P>0.05$ ); In the same experimental treatment, different small letters indicate significant difference( $P<0.05$ ), the same letter indicate no significant difference ( $P>0.05$ ). The same as below

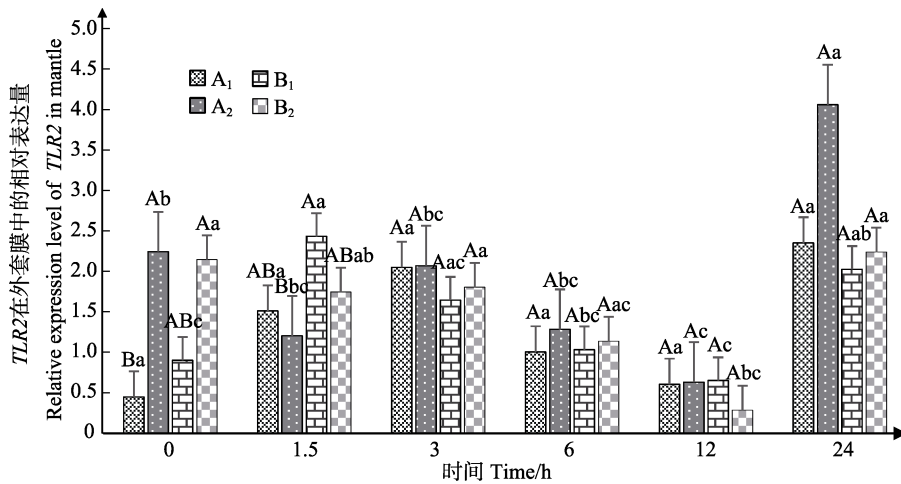


图 3 外套膜中 *TLR2* 的表达

Fig.3 The expression of *TLR2* in mantle

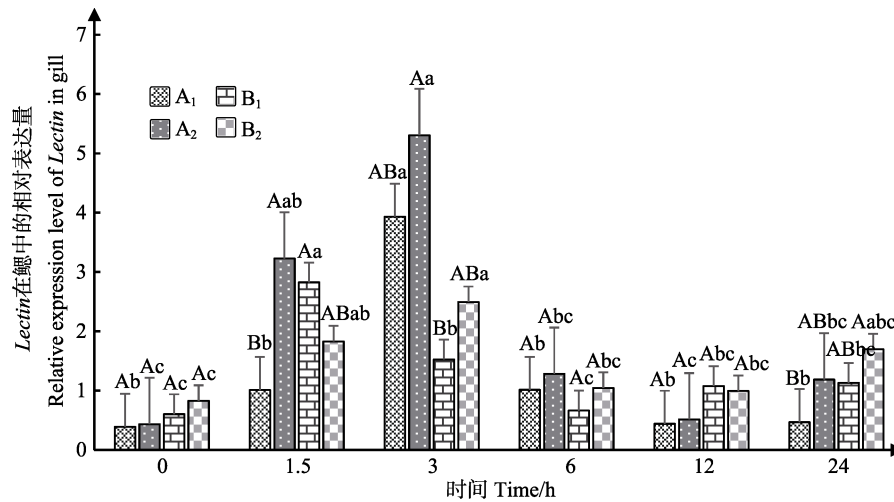
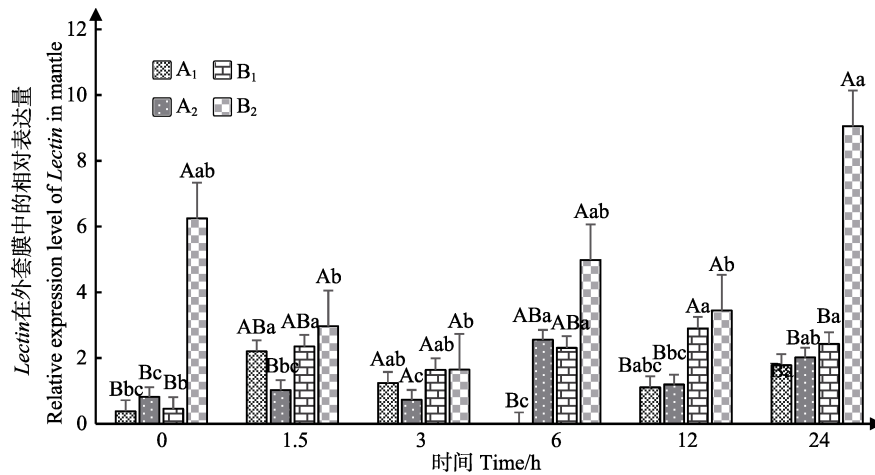
### 2.3 Lectin 表达

蛤仔鳃中 *Lectin* 表达情况见图 4。结果表明, 各个实验组 *Lectin* 表达趋势均为先升高后下降。在 1.5~3 h 之间 *Lectin* 表达出现峰值。1.5 h 时,  $A_2$ 、 $B_1$  组的 *Lectin* 相对表达量显著高于  $A_1$  组( $P<0.05$ )。3 h 时,

$A_1$  组的 *Lectin* 相对表达量显著高于  $B_1$  组( $P<0.05$ )。6、12 h 时, 各实验组的 *Lectin* 相对表达量无显著差异( $P>0.05$ ), 且在 6~24 h 之间, 各实验组 *Lectin* 表达模式趋于稳定, 无显著变化( $P>0.05$ )。

蛤仔外套膜中 *Lectin* 表达情况见图 5。结果表明, 相同时间下, 0 h 时,  $B_2$  实验组 *Lectin* 相对表达量显



图4 鳃组织中 *Lectin* 的表达Fig.4 The expression of *Lectin* in gill图5 外套膜中 *Lectin* 的表达Fig.5 The expression of *Lectin* in mantle

著高于其他实验组。3 h 时, 各实验组 *Lectin* 相对表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。12 h 时,  $A_1$ 、 $A_2$  和  $B_1$ 、 $B_2$  组之间, *Lectin* 相对表达量无显著差异, 但  $B_1$ 、 $B_2$  组 *Lectin* 相对表达量显著高于  $A_1$ 、 $A_2$  组 ( $P < 0.05$ )。24 h 时,  $B_2$  组 *Lectin* 相对表达量显著高于其他实验组 ( $P < 0.05$ )。  $B_2$  组 *Lectin* 表达量始终高于  $B_1$  组, 但只有 0 和 24 h 时差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

$\beta$ -葡聚糖是一种广泛地存在于细菌、真菌、植物内部用于构筑多种细胞壁的材料。 $\beta$ -葡聚糖有很好的应用前景, 已被广泛认为是一种非特异性免疫激活剂, 也可促进与补体相关的特异性抗体应答。本研究结果表明,  $\beta$ -葡聚糖可有效提高副溶血弧菌感染的蛤仔的存活率, 且浸泡 1000 mg/L  $\beta$ -葡聚糖的蛤仔的存活率高于浸泡 100 mg/L  $\beta$ -葡聚糖的蛤仔。目前, 关于

$\beta$ -葡聚糖对鱼类免疫作用的研究已有较多报道(刘露等, 2017; Robertsen *et al.*, 1990; Rørstad *et al.*, 1993; Aakre *et al.*, 1994)。但  $\beta$ -葡聚糖在双壳贝类的研究相对较少, Anderson 等(2011)在弗吉尼亚牡蛎(*Crassostrea virginica*)中发现,  $\beta$ -葡聚糖能提高循环血细胞的数量用于防御反应, 促进血细胞的免疫活性, 并加强血液凝集。

菲律宾蛤仔为滤食性动物, 滤食水中的  $\beta$ -葡聚糖会产生一系列免疫作用。本研究发现, 在鳃中,  $A_1$  和  $A_2$  组的 *TLR2* 在 6 h 时达到峰值, 显著高于其他时间 ( $P < 0.05$ ), 在其他时间段均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在  $B_1$  和  $B_2$  组中, *TLR2* 呈先升高后降低的趋势, 在 1.5 h 时达到峰值。可以看出, 感染组较未感染组提前出现基因表达峰, 说明副溶血弧菌感染蛤仔后, 蛤仔能迅速的表达 *TLR2* 来应对 LPS 的感染。但相同时间下, 不同  $\beta$ -葡聚糖浸浴浓度感染组内(即  $B_1$  和  $B_2$  组)数据无明显规律更没有显著差异, 不同  $\beta$ -葡聚糖

浸浴浓度的未感染组(即  $A_1$  和  $A_2$  组)在 3~6 h 时,  $A_2$  组高于  $A_1$  组, 但差异不显著。而外套膜中, 感染组与未感染组之间基因表达量无显著差异。目前, 在露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)(Samanta *et al.*, 2012)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Zhang *et al.*, 2016)和石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Li *et al.*, 2011a)的相关研究中发现, *TLR2* 的表达在寄生虫和细菌感染下, 均出现显著的升高。另外, 在贝类相关的研究中, 栉孔扇贝存在一个相当典型的 MyD88 依赖的 TLR 信号通路, 并确定该通路在扇贝固有免疫系统, 特别是在抵御鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染过程中起至关重要的作用, 其具体机制可能包括调控抗氧化基因的表达、维持内环境稳定以及调控抗菌蛋白基因的表达(Wang *et al.*, 2011)。Qiu 等(2007)发现, 栉孔扇贝血细胞中, *cdtoll-1* 在 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 刺激下表达量在 6 h 时增加了 2 倍, 但在 100  $\text{ng/ml}$  浓度时, 出现表达下调。结果表明, *cdtoll-1* 的表达可能受 LPS 的诱导, 这种调节是剂量依赖性的。关于长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中 *TLR* 的研究表明, *TLR* 定位于内涵体中发挥作用, 并且 *TLR* 通路中 *TLR* 被 Oyster Herpesvirus-1 (Oshv-1) 诱导上调并且在一些时间点与对照形成显著差异 ( $P < 0.05$ )(杜以帅, 2013)。

在本研究中, 各个实验组的鳃组织中, *Lectin* 表达趋势均为先升高后下降。在 1.5~3 h 之间, *Lectin* 表达出现峰值。说明  $\beta$ -葡聚糖对 *Lectin* 表达有促进作用且副溶血弧菌的感染引起了机体内的免疫应答。外套膜 B 组内浸泡浓度 1000  $\text{mg/L}$  的实验组比 100  $\text{mg/L}$  组各时段都有更高的表达量, 但只有 0 和 24 h 时差异显著 ( $P < 0.05$ )。相对表达量的增值与  $\beta$ -葡聚糖浓度的关系仍需要进一步探究。在甲壳纲中, 段亚飞等(2017)报道, 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)能引起脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)血细胞和肝胰腺中的 C 型凝集素基因(*CTL*)表达出现先增加后下降的趋势。*CTL* 可作为脊尾白虾感染粪肠球菌疾病的监测指标。对于双壳贝类 *Lectin*, 谈艳苗(2013)研究发现, 栉孔扇贝 *Cflec290* 在血细胞以及其他各组织中均有表达, 但在外套膜、肾脏以及性腺中的转录水平最高, 血细胞、鳃和肝胰腺次之, 在肌肉中的转录水平较弱。另外, 王昊(2006)研究发现, 在革兰氏阳性菌溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)和革兰氏阴性菌鳗弧菌刺激后, 栉孔扇贝血液中 *CFlec-1* 的表达均显著高于对照组, 并且呈明显的随时间变化趋势, 其结果说明, *CFlec-1* 不仅具有识别入侵微生物的功能, 而且可能作为效应因子起到直接杀灭入侵微生物的作用。

其他贝类的相关研究也得到了相同的表达趋势(吴彪等, 2013; 李猛等, 2015), 这表明, 凝集素基因参与对外源生物入侵的免疫应答, 有助于提高免疫防御能力。关于菲律宾蛤仔 *Lectin* 免疫应答方面的研究, Adhya 等(2010)发现, 各组织中 *Lectin* 在帕金虫(*Perkinsus olseni*)和弧菌(*Vibrio tapetis*)感染后表达量均显著上升。Li 等(2011b)发现, 鳗弧菌刺激后, 菲律宾蛤仔血细胞中唾液酸结合凝集素(SABL)表达呈先下降后上升的趋势。

本研究表明,  $\beta$ -葡聚糖浸浴蛤仔会增加 *TLR2* 和 *Lectin* 的相对表达量。被  $\beta$ -葡聚糖浸浴过的蛤仔被副溶血弧菌感染后, 会快速表达 *TLR2* 和 *Lectin*, 识别异物物质。本研究为蛤仔亲贝的保种、苗种繁育及池塘养殖的疾病防控提供一定的理论依据。

## 参 考 文 献

- Aakre R, Wergeland HI, Aasjord PM, *et al.* Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing  $\beta$ -1,3-M-Glucan as adjuvant. *Fish & Shellfish Immunology*, 1994, 4(1): 47-61
- Adhya M, Choi KS, Yu Y, *et al.* Expression and localization of MCSialec, a sialic acid-specific lectin in the marine bivalve Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(11): 889-899
- Anderson RS, Ozbay G, Kingsley DH, *et al.* Oyster hemocyte mobilization and increased adhesion activity after beta-glucan administration. *Journal of Shellfish Research*, 2011 30(3): 635-641
- Bartley CH, Slanetz LW. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine waters and oysters of New Hampshire. *Applied Microbiology*, 1971, 21(5): 965-966
- Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 2003, 19(3): 311-315
- Du XN, Wang RT, Liu DW, *et al.* Preliminary study on anti-tumor mechanism of polyporus polysaccharide. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2001, 21(3): 296-297 [杜肖娜, 王润田, 刘殿武, 等. 中药猪苓多糖抑瘤作用机理的初探. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(3): 296-297]
- Du YS. Study on the Toll like receptor and RIG-I like receptor signal pathways and their immune functions in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2013 [杜以帅. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)TLR 和 RLR 信号通路的免疫功能研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2013]
- Duan YF, Li J, Li JT, *et al.* The expression profiles of immunity-related genes after pathogenic *Enterococcus faecalis* challenge in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 148-155 [段亚飞, 李健, 李吉涛, 等. 致病性粪肠球菌对脊尾白虾(*Exopalaemon*

- carinicauda*)免疫相关基因表达的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 148–155]
- Krantz GE, Colwell RR, Lovelace E. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. Science, 1969, 164(3885): 1286
- Li C, Yu S, Zhao J, et al. Cloning and characterization of a sialic acid binding lectins (SABL) from Manila clam *Venerupis philippinarum*. Fish & Shellfish Immunology, 2011a, 30(4–5): 1202–1206
- Li M, Zhou SM, Liu L, et al. Molecular clone and expression of C-type lectin in *Meretrix Meretrix*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1186–1192 [李猛, 周素明, 刘璐, 等. 文蛤(*Meretrix meretrix*)C-型凝集素基因的分子克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1186–1192]
- Li YW, Luo XC, Dan XM, et al. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR2, MyD88 and IL-1 $\beta$  involved in anti-*Cryptocaryon irritans*, response. Fish & Shellfish Immunology, 2011b, 30(6): 1230–1240
- Lin Q, Li NQ, Fu XZ, et al. The relationship of *Vibrio parahaemolyticus* densities and water quality factor during oyster culture. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 415–421 [林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎养殖过程中副溶血弧菌与水质因子间的关系. 水产学报, 2012, 36(3): 415–421]
- Liu L, Li D, Xiao Q. Effect of beta glucan on the related immune function of fish. Feed Research, 2017(1): 13–18 [刘露, 李代宗, 肖勤.  $\beta$ -葡聚糖对鱼类相关免疫功能的影响. 饲料研究, 2017(1): 13–18]
- Liu Q, Xie S, Zhao L, et al. Antimicrobial activity of hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(2): 109–113 [刘淇, 谢沙, 赵玲, 等. 菲律宾蛤仔酶解产物的抑菌活性. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 109–113]
- Means TK, Wang S, Lien E, et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology, 1999, 163(7): 3920–3927
- Moreira R, Balseiro P, Planas JV, et al. Transcriptomics of *in vitro* immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. PLoS One, 2012, 7(4): e35009
- Qiu L, Song L, Xu W, et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(5): 451–466
- Robertsen B, Rørstad G, Engstad R, et al. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. Journal of Fish Diseases, 1990, 13(5): 391–400
- Rørstad G, Aasjord PM, Robertsen B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish & Shellfish Immunology, 1993, 3(3): 179–190
- Samanta M, Swain B, Basu M, et al. Molecular characterization of toll-like receptor 2 (TLR2), analysis of its inductive expression and associated down-stream signaling molecules following ligands exposure and bacterial infection in the Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(3): 411–425
- Shen YL, Yu YS. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* to healthy clam *Meretrix meretrix* and the prevention and treatment of *Vibrio* infections. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(3): 249–252 [沈亚林, 于业绍. 副溶血弧菌对文蛤的致病性及其防治. 水产学报, 1993, 17(3): 249–252]
- Tan YM. Agglutination activities of haemolymph and tissue extracts in scallop *Chlamys farreri* and development and characterization of monoclonal antibody of a C-type lectin. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [谈艳苗. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)组织凝集活性分析及一种 C-型凝集素单克隆抗体的研制和特性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Tang S, Leng J. The research progress of TLR family and its function. Progress in Microbiology and Immunology, 2004, 32(2): 42–45 [唐深, 冷静. TLR 家族及其功能研究进展. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(2): 42–45]
- Wan HY. Study on the preparation of antibacterial hydrolysates of *Ruditapes philippinarum* and its antimicrobial mechanism. Master's Thesis of Qingdao University, 2012 [万慧一. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)抑菌酶解物的制备与作用机理研究. 青岛大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Wang H. Study on Lectin gene family of scallop *Chlamys farreri*. Master's Thesis of Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2006 [王昊. 栉孔扇贝凝集素家族基因的研究. 中国科学院研究生院硕士研究生学位论文, 2006]
- Wang M, Yang J, Zhou Z, et al. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(4): 511–520
- Wang XY, Yu DH, Huang GJ, et al. Preliminary study on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* to *Penaeus vannamei* and the antibacterial activity of flavonoids. Reservoir Fisheries, 2006, 26(3): 89–91 [王小玉, 喻达辉, 黄桂菊, 等. 副溶血弧菌对南美白对虾致病力及黄酮抗菌作用初步研究. 水利渔业, 2006, 26(3): 89–91]
- Wang J. Effects of several immunostimulants on the yield, activities of phenoloxidase and the number, ultrastructure of hemocytes in clam *Ruditapes philippinarum*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [王晶. 几种免疫促进剂对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)酚氧化酶的产量和活性以及血细胞的数量和超微结构的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Williams DL, Pretus HA, McNamee RB, et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Immunopharmacology, 1991, 22(3): 139–156
- Wu B, Chi CF, Yang AG, et al. A preliminary study on the maternal transfer and bacteriostasis of a C-type lectin in scallop (*Patinopecten yessoensis*). Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 777–783 [吴彪, 迟长风, 杨爱国, 等. 虾夷扇贝 C-型凝集素母源传递与抑菌作用的初步研究. 水产学报, 2013, 37(5): 777–783]
- Zhang GF, Yan XW. Clam aquaculture study. Beijing: Science

Press, 2010, 113–135 [张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学. 北京: 科学出版社, 2010, 113–135]  
Zhang H, Hu G, Liu Q, *et al.* Cloning and expression study of a Toll-like receptor 2 (*tlr2*) gene from turbot, *Scophthalmus*

*maximus*. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 137–148  
Zhu Y. The function and application of agglutinin. Fisheries Science, 2005, 24(12): 48–49 [朱月. 凝集素的作用与应用. 2005, 24(12): 48–49]

(编辑 马瑾艳)

## Effects of $\beta$ -1,3-Glucan on the Survival and Expression of Two Immune Genes in *Ruditapes philippinarum* Infected with *Vibrio parahaemolyticus*

MENG Xiangyu, ZHANG Yanli, HUO Zhongming<sup>①</sup>,

MU Zhengqiang, WANG Huamin, YAN Xiwu

(Dalian Ocean University; Engineering and Technology Research Center of Shellfish Breeding of Liaoning Province;  
Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian 116023)

**Abstract** In this study, the effect of beta-glucan on survival rates and the mRNA expression of *Lectin* and *TLR2* in both uninfected and infected Manila clams *Ruditapes philippinarum* were studied. The results showed that beta-glucan could effectively improve the survival rate of Manila clams infected by *Vibrio parahaemolyticus*. The survival rate was highest at a beta-glucan concentration of 1000 mg/L. In the gill tissues of the uninfected group (A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>), the *TLR2* peaked at 6 h, which was significantly higher than that of other times ( $P < 0.05$ ). In the infected group, *TLR2* increased to a peak at 1.5 h and then decreased. *Lectin* expression in both the infected and the uninfected group increased first and then decreased. The relative expression of *Lectin* in the A<sub>1</sub> group was significantly higher than that of the B<sub>1</sub> group at 3 h ( $P < 0.05$ ). In the mantle, the expression of *TLR2* in both infected and uninfected groups decreased gradually between 3~12 h. At 24 h, the expression of group A<sub>2</sub> was highest. However, in the infected group, the expression of *Lectin* in 1000 mg/L beta-glucan was higher than at 100 mg/L in the mantle, but there was only a significant difference at 0 h and 24 h ( $P < 0.05$ ). The expression patterns of *Lectin* in the gill and in the mantle were different, but the feeding of beta-glucan promoted the expression of *Lectin* during the early stages of infection. From these results, beta-glucan soaking can increase the relative expression of the two genes, and *TLR2* and *Lectin* are expressed more quickly after infection by *V. parahaemolyticus* when soaked with beta-glucan. The aim of this study is to understand the dose dependent effect conferred by beta-glucan on the immune system and the survival rate of Manila clams, which might provide some theoretical basis for the stock culture, seed breeding and disease control in pond culture of Manila clams.

**Key words** Beta-glucan; *Ruditapes philippinarum*; *Vibrio parahaemolyticus*; Immune gene

① Corresponding author: HUO Zhongming, E-mail: huozm@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170907001

http://www.yykxjz.cn/

彭军辉, 陈丽英, 程长洪, 冯娟, 马红玲, 郭志勋. 氨氮对拟穴青蟹的急性毒性及对其血清免疫相关酶活力的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 114–121

Peng JH, Chen LY, Cheng CH, Feng J, Ma HL, Guo ZX. Acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla paramamosain* and its influence on immune factors in serum. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 114–121

# 氨氮对拟穴青蟹的急性毒性 及其血清免疫相关酶活力的影响\*



彭军辉<sup>1,2</sup> 陈丽英<sup>3</sup> 程长洪<sup>1</sup> 冯娟<sup>1</sup> 马红玲<sup>1</sup> 郭志勋<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部水产品加工重点实验室 广州 510300;

2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 210306; 3. 广州大学生命科学学院 广州 510006)

**摘要** 采用静水法研究氨氮对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)的急性毒性及在氨氮初始浓度分别为 0(C0, 对照组)、10(C10 组)、20(C20 组)、30(C30 组)、40(C40 组)、50 mg/L(C50 组), 胁迫时间分别为 0、6、24、48、72 h 的条件下对其血清中碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活力的影响。结果显示, 总氨氮对拟穴青蟹 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 104.793、66.124 mg/L, 安全浓度为 7.90 mg/L, 非离子氨对拟穴青蟹 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 8.396、5.298 mg/L, 安全浓度为 0.63 mg/L。在胁迫 6、24、48 与 72 h 时, 各实验组的 LZM 活力均显著低于对照组( $P<0.01$ )。相较于对照组, C10、C20 及 C40 组在 24 h 的 AKP、ACP 活力均显著升高( $P<0.05$ )。C20 组在 24 h 的 SOD 活力则显著低于其他胁迫时间点( $P<0.05$ )。胁迫 72 h 时, C30、C40 及 C50 组的 PO 活力显著高于对照组( $P<0.05$ )。该实验条件下, 不高于 40 mg/L 的氨氮可在 24 h 内使拟穴青蟹血清中的 AKP 与 ACP 活力显著升高, 而 50 mg/L 的氨氮则对其具有抑制作用; 各实验组浓度氨氮均在 72 h 内对拟穴青蟹血清中的 LZM 活力具有显著的抑制作用, 对 PO 活力具有明显的刺激作用, 对 SOD 活力无显著影响。

**关键词** 拟穴青蟹; 氨氮; 安全浓度; 免疫酶活

中图分类号 X503.225 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0114-08

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)俗称青蟹, 具有生长迅速、肉鲜味美、营养价值高等特点, 是我国东南沿海地区重要的养殖蟹类之一, 2016 年我国青蟹养殖总产量达到了 15 万 t(2017 中国渔业统计年鉴)。

但随着青蟹养殖业的迅猛发展, 其养殖水质不断恶化, 致使一些有害的环境因子激增, 从而导致青蟹病害频发, 严重威胁青蟹养殖业的健康发展(张迪等, 2013)。氨氮是养殖水体中一种重要的污染因子, 其

\* 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(2016TS32)、广东省海洋渔业科技与产业发展专项科技攻关与研发项目(A201501B04)、广东省渔港建设和渔业发展专项资金鱼病防治项目(2016-11)和广东省科技计划项目(2013B090300009)共同资助 [This work was supported by Central Level Public Welfare Special Funds for Basic Research and Business Expenses of Scientific Research Institutions (2016TS32); Special Scientific Research and Development Projects for Marine Fishery Science and Technology and Industry Development of Guangdong Province (A201501B04); Fishing Port Construction and Fishery Development Special Funds for Fish Disease Prevention and Control of Guangdong Province (2016-11); Science and Technology Program Project of Guangdong Province (2013B090300009)]. 彭军辉, E-mail: pengjhpeng@163.com

① 通讯作者: 郭志勋, 研究员, E-mail: guozhixun1@163.com

收稿日期: 2017-09-07, 收修改稿日期: 2017-10-22

对养殖水生动物的生长代谢及非特异性免疫功能等具有严重影响(Racotta *et al*, 2000; Cheng *et al*, 2002; Hong *et al*, 2007; 王芸等, 2013; 邓康裕等, 2015)。研究表明, 在 30 d 的慢性氨氮胁迫下, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼的增重率(WGR)和特定生长率(SGR)随着氨氮浓度的升高而降低(肖炜等, 2015)。奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O.areus*)幼鱼在低浓度氨氮胁迫 24 h 后, 其肝脏的过氧化氢酶(CAT)活力显著下降( $P<0.05$ )(韩春艳等, 2014)。而青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和刺参(*Apostichopus japonicus*)等水产养殖动物的组织器官及部分免疫酶活也会在长时间的氨氮胁迫下受到不同程度的损伤及抑制作用(胡毅等, 2012; 张武肖等, 2015; 刘洪展等, 2012)。另外, 细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)对氨氮的耐受力会随着胁迫时间的延长不断降低, 其死亡率会显著升高(Mugnier *et al*, 2008)。而中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的血细胞总数和吞噬能力、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的血细胞数量及酚氧化酶原活力等也会随着氨氮浓度的升高而降低(黄鹤忠等, 2006; 岳峰等, 2010)。此外, 一些虾蟹类体内的腺苷三磷酸酶(ATPase)、溶菌酶(LZM)、谷胱甘肽合成酶(GPX)等也会因氨氮胁迫而受到不同程度的影响, 而使其正常生长代谢受到严重威胁(艾春香等, 2011; 洪美玲等, 2007; 曾媛媛等, 2011; Wang *et al*, 2004)。

该实验主要研究氨氮对拟穴青蟹的急性毒性及其血清中碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活力的影响, 以期探究养殖水体中的氨氮对拟穴青蟹的毒理作用及其免疫机能的影响, 为青蟹的健康养殖提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用青蟹购自江门市, 选取活力旺盛、体色正常的健康青蟹, 平均体重为(29.41±4.12) g, 平均壳长为(52.09±2.26) mm, 平均壳宽为(37.40±2.28) mm。于直径 0.8 m、高 1.2 m 的圆柱形塑料桶中暂养 7 d, 每缸 10~15 只青蟹, 海水盐度为 14.62±1.08, 温度为(27.17±0.14)℃, 溶氧为(5.38±0.35) mg/L, pH 为 8.16±0.06。暂养期间连续充氧, 每天投喂新鲜方形马珂蛤(*Macra veneriformis*) 1 次并及时清理食物残渣和排泄物, 每天换水 1 次, 换水量为总水体的 50%, 暂养阶段未见青蟹有蜕壳现象。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 急性毒性实验** 以分析纯 NH<sub>4</sub>Cl 为氨氮源, 配制成浓度为 4 g/L 的母液, 根据实验要求, 再将母液稀释为 40、60、80、100、120 和 140 mg/L 的 6 个梯度, 每个梯度设 3 个平行, 每个平行 10 只蟹, 实验期间不投饵, 每天用相应氨氮浓度的海水换水, 换水量为总水体的 50%, 及时清理青蟹排泄物。实验期间密切观察青蟹活动, 详细记录 48 h 内的死亡个体数, 并及时清理死亡青蟹。

根据实验结果, 以直线内插法求出 24 h 和 48 h 的半致死浓度(Median lethal concentration) LC<sub>50</sub>, 根据 Turubell 公式(黄鹤忠等, 1998)求出其安全浓度(Safe concentration):

$$SC=(48\text{ h LC}_{50}\times 0.3)/(24\text{ h LC}_{50}/48\text{ h LC}_{50})^2$$

并根据以下公式计算所对应的非离子氨的浓度:

$$C_{\text{NH}_3}=C_{\text{NH}_3\text{-N}}/(10^{\text{pK}_{\text{a}}\text{S,T}}+1) \quad (1)$$

$$\text{pK}_{\text{a,S,T}}=9.24+0.003091\text{S}+0.0324(298-T) \quad (2)$$

(1)、(2)式中, C<sub>NH<sub>3</sub>-N</sub> 表示水体总氨氮浓度, T 表示绝对温度( $T=273^\circ\text{C}+t$ ), t 为摄氏温度, S 为盐度, pK<sub>a,S,T</sub> 为电离常数, pH 为水体 pH 值(钱佳慧等, 2016)。

**1.2.2 血清免疫相关酶实验** 免疫相关酶实验所设氨氮浓度分别为 0(C0 组, 对照组)、10(C10 组)、20(C20 组)、30(C30 组)、40(C40 组)和 50 mg/L(C50 组), 每个浓度设 3 个平行, 每个平行 15 只蟹, 在氨氮胁迫 0、6、24、48 与 72 h 时采血。采血时, 每个平行组随机选取 8 只蟹, 用 1 ml 的一次性注射器从青蟹的第 3 步足基关节处抽取 150~200 μl 血液, 并将其混匀收集于 2 ml 的 EP 管中, 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 再用移液枪抽取上层血清分装到 1.5 ml 的离心管中, 于-20℃保存备用。采完血的青蟹, 用酒精棉球擦拭采血部位并放回原组。

青蟹血清 PO 活力的测定采用改进的 Ashida (1971)方法进行测定, 血清中的 ACP、AKP、LZM、SOD 的测定则采用南京建成生物试剂盒, 参照厂家提供的说明书进行测定。

**1.2.3 数据处理** 实验数据结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 使用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 法进行多重比较, 取  $P<0.05$  为显著性差异水平,  $P<0.01$  为极显著性差异水平。

## 2 结果

### 2.1 急性毒性

该实验条件下, 对照组青蟹未出现死亡(表 1)。

在实验组中,同一胁迫时间下,随着氨氮浓度的升高,青蟹的死亡率不断增高;而在同一氨氮浓度下,随着胁迫时间的延长,青蟹的死亡率也在不断升高,在胁迫时间为48 h、氨氮浓度为120 mg/L及以上时青蟹的死亡率达到100%。

表1 氨氮对拟穴青蟹急性毒性实验  
Tab.1 The acute toxicity test of ammonia nitrogen on *S. paramamosain*

氨氮浓度 Concentration of ammonia-N (mg/L)	死亡率 Mortality rate (%)	
	24 h	48 h
对照组(Control group, <0.02)	0	0
40.00	3.33±0.058	23.33±0.058
60.00	26.67±0.115	43.33±0.115
80.00	33.33±0.208	66.67±0.153
100.00	40.00±0.346	83.33±0.153
120.00	60.00±0.265	100
140.00	76.67±0.153	100

经线性回归分析(图1),氨氮对青蟹24、48 h的LC<sub>50</sub>分别为104.793、66.124 mg/L, SC为7.90 mg/L。并由公式(1)、(2)计算,得非离子氨对青蟹24、48 h的LC<sub>50</sub>分别为8.396、5.298 mg/L, SC为0.63 mg/L。

2.2 血清免疫相关酶实验结果

如图2所示,对照组(C0)的PO活力随时间无显著变化;与对照组相比,C10、C20组的PO活力随胁迫时间先上升后下降,而C30、C40及C50组的PO活力则随胁迫时间先下降后上升;其中,C10组

在24 h显著高于对照组(P<0.05),C30、C40及C50组在72 h显著高于对照组(P<0.05),且C40组与对照组有极显著差异(P<0.01)。

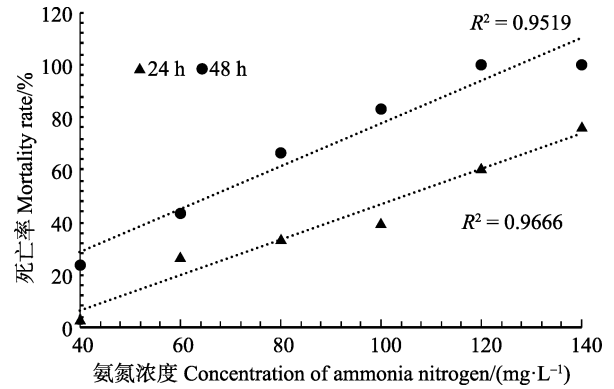


图1 氨氮对拟穴青蟹急性毒性  
Fig.1 The acute toxicity of ammonia nitrogen on *S. paramamosain*

由图3可知,C10、C20、C40组的AKP活力均在胁迫24 h达到最高水平,且与对照组(C0)差异显著(P<0.05),之后持续下降,至72 h又再次升高;C30组的AKP活力则在胁迫72 h达到最高水平,且显著高于C10和C50组(P<0.05);C50组的AKP活力则随胁迫时间先下降后上升,且一直低于对照组水平(除48 h外)。

如图4所示,对照组(C0)的ACP活力随时间无显著变化;与对照组相比,各实验组ACP活力均随胁迫时间先上升后下降,至72 h又趋于对照组水平,其中,C10、C20及C40组的ACP活力在24 h达

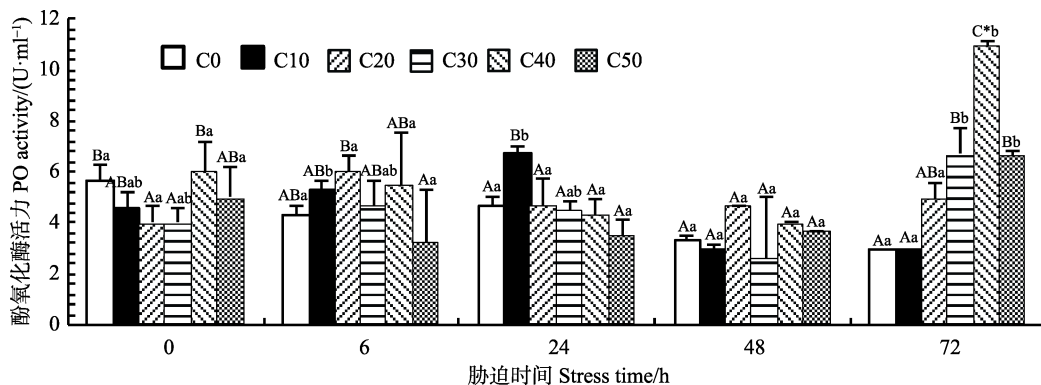


图2 氨氮对拟穴青蟹血清PO活力的影响  
Fig.2 Effects of ammonia nitrogen on PO activity in serum of *S. paramamosain*

图中大写字母表示同一胁迫时间点各组间差异,小写字母表示同组内各胁迫时间点差异,其中,相同字母间表示差异不显著,不同字母间表示差异显著(P<0.05),“\*”表示同一时间点对对照组与实验组差异极显著(P<0.01),下同

Capital letters in the figure represent differences between groups at the same stress time, the lowercase indicate the difference of the stress time in the same group, among which the same letters indicate no significant difference, but the different letters indicate significant difference (P<0.05), “\*” indicates highly significant difference between the control group and test groups at the same stress time, the same below

到最高水平( $P<0.05$ ), 且在 24 h 显著高于对照组( $P<0.05$ ), 而 C50 组的 ACP 活力则在 24 h 显著低于对照组及其他各实验组( $P<0.05$ )。

由图 5 可知, 与对照组(C0)相比, 各实验组的

LZM 活力随着胁迫时间的延长而不断降低, 在胁迫 6、24、48 和 72 h 时的 LZM 活力均显著低于 0 h 时的 LZM 活力均极显著低于对照组( $P<0.01$ )。

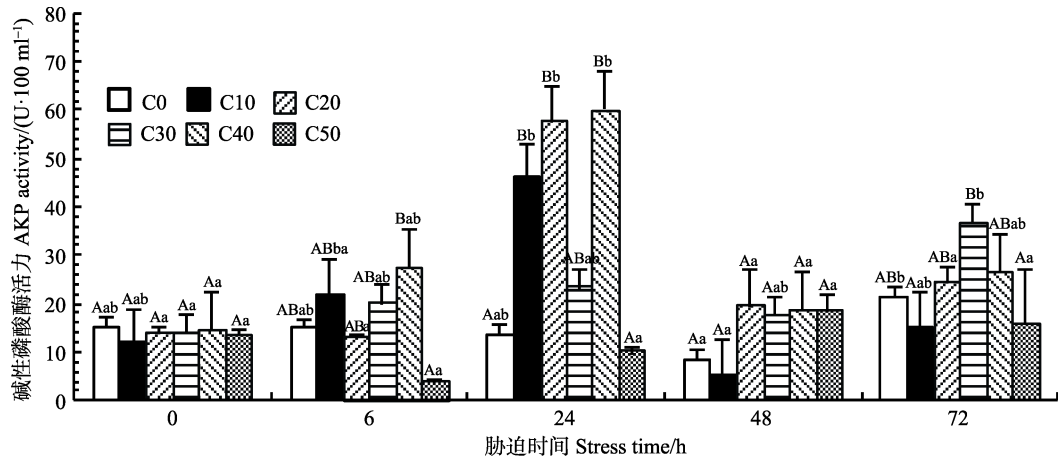


图 3 氨氮对拟穴青蟹血清 AKP 活力的影响

Fig.3 Effects of ammonia nitrogen on AKP activity in serum of *S. paramamosain*

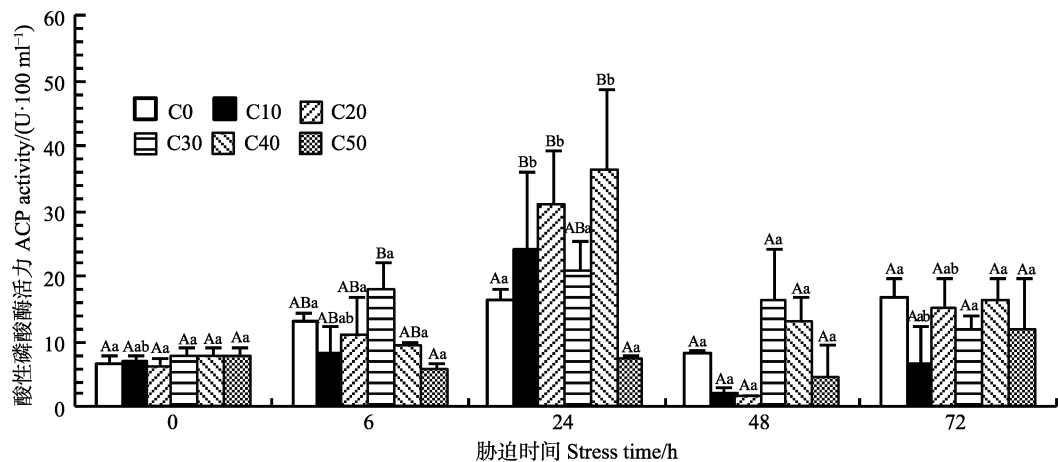


图 4 氨氮对拟穴青蟹血清 ACP 活力的影响

Fig.4 Effects of ammonia nitrogen on ACP activity in serum of *S. paramamosain*

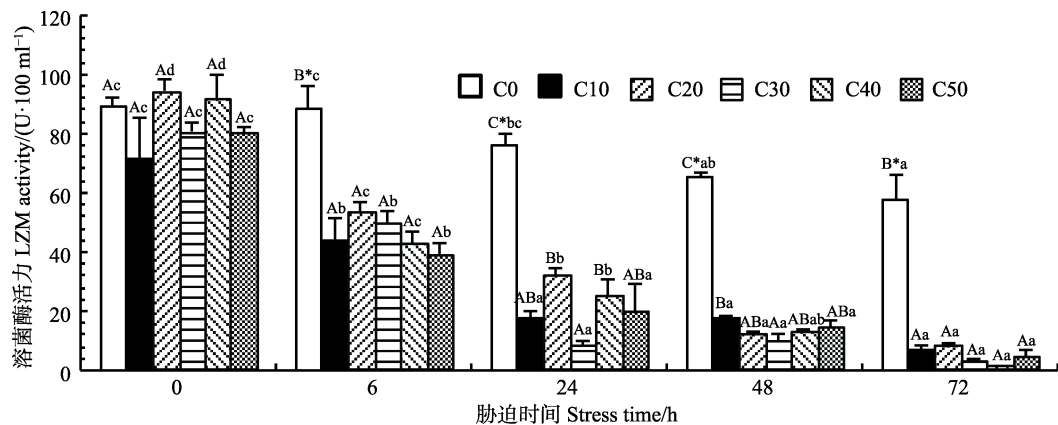


图 5 氨氮对拟穴青蟹血清 LZM 活力的影响

Fig.5 Effects of ammonia nitrogen on LZM activity in serum of *S. paramamosain*



如图 6 所示, 对照组(C0)的 SOD 活力随胁迫时间无显著变化; 与对照组相比, 除 C20 组在 24 h 的

SOD 活力显著低于其他胁迫时间点( $P<0.05$ ), 其余各组的 SOD 活力在胁迫周期内无显著变化。

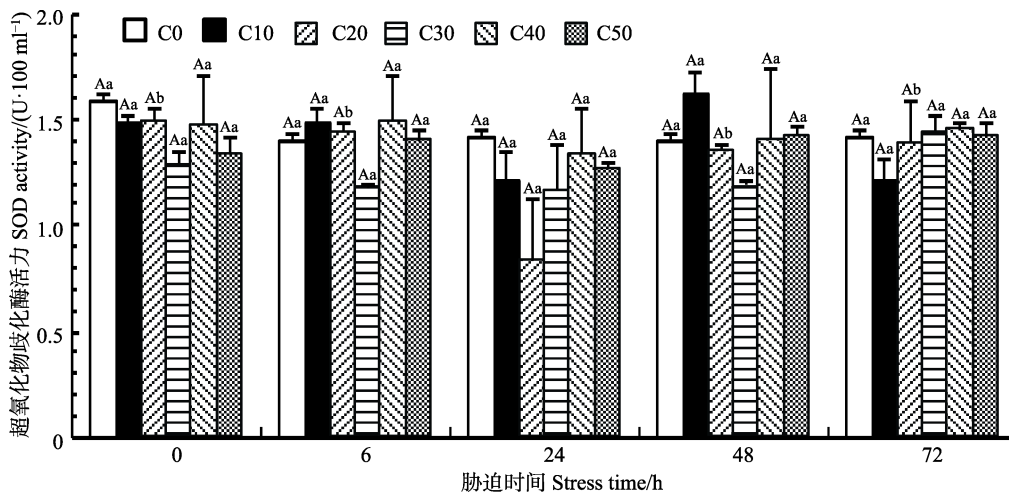


图 6 氨氮对拟穴青蟹血清 SOD 活力的影响

Fig.6 Effects of ammonia nitrogen on SOD activity in serum of *S. paramamosain*

### 3 讨论

养殖水体中的氨氮分为离子氨和非离子氨, 能降低机体的血液载氧能力而引起机体中毒, 对机体的免疫系统具有一定的损伤作用(董玉波等, 2011)。邵鑫斌等(2011)报道, 在水体盐度为 30.6、pH 为  $8\pm 1$  的条件下, 当氨氮浓度为 100 mg/L、胁迫 24 h 后锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 开始出现死亡, 死亡率为 10%。本研究结果显示, 在氨氮浓度为 40 mg/L、胁迫 24 h 后青蟹即开始出现死亡; 而当氨氮浓度为 100 mg/L 时、胁迫 24 h 后青蟹的死亡率达到 40%。当水体的总氨氮浓度及其他条件不变时, 非离子氨的浓度与盐度成反比。由于该实验所设水体盐度低于上述报道的盐度, 故在相同氨氮浓度(100 mg/L)下, 其所含非离子氨的浓度(8.012 mg/L)比上述水体的非离子氨浓度(3.568 mg/L)更高, 而相同浓度下的非离子氨比离子氨对机体具有更强的毒性(Ruyet *et al.*, 1995), 因此, 该实验青蟹的死亡率也更高。本研究结果还显示, 氨氮对青蟹的 SC 为 7.90 mg/L, 高于其对团头鲂(SC=5.649 mg/L)和墨吉明对虾(SC=3.531 mg/L)的安全浓度(张武肖, 2015; 钱佳慧等, 2016)。可见, 与鱼虾相比, 青蟹对氨氮具有一定的耐受性。

PO 受酚氧化酶原(Prophenoloxidase, proPO)激活系统调控, 在甲壳动物体内发挥着重要的免疫防御作用(Ashida *et al.*, 1984)。研究表明, 氨氮胁迫凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)可使其 24 h 内的血清 PO 活力明显上升(Le Moullac *et al.*, 2000); 以 20 mg/L 的氨

氮处理三疣梭子蟹, 其酚氧化酶原活力在 6 h 后显著低于对照组, 但其酚氧化酶原 mRNA 的表达量却显著高于对照组(Yue *et al.*, 2010)。该结果显示, C10、C20 组可分别使青蟹的 PO 活力在 24 h 和 6 h 明显升高, C30、C40 及 C50 组可使其 PO 活力在 72 h 显著升高( $P<0.05$ ), 表明各实验组氨氮在胁迫周期内对青蟹血清中的 PO 活力有明显的促进作用( $P<0.05$ )。

AKP 和 ACP 是水解酶体系的重要组成部分, AKP 能将磷酸基团转移到底物分子上, 在磷化物的消化与吸收中起着重要作用, 同时, 也参与机体的解毒过程; 而 ACP 能增强血细胞对异物的识别和吞噬作用, 是机体杀灭病原体的物质基础(何海琪等, 1992)。艾春香等(2011)研究发现, 10 mg/L 组的拟穴青蟹鳃中的 AKP、ACP 比活力在 72 h 达到最高水平, 之后持续下降; 40 mg/L 组的 AKP 比活力在胁迫周期内一直低于对照组水平。而本研究结果显示, C10、C20、和 C40 组的血清 AKP、ACP 活力在胁迫 24 h 即达到最高水平( $P<0.05$ ), 表现为急性促进作用, 之后开始显著下降。本结果与上述结果存在部分差异, 这可能是因为相较于鳃组织, 磷酸酶及其同工酶主要存在于血细胞的溶酶体中, 而氨氮可导致青蟹血细胞解体(艾春香等, 2011), 故上述浓度的氨氮可在短时间内使血清中的磷酸酶激增, 但随着胁迫时间的延长及氨氮浓度的升高(C50 组), 机体的结构可能受到不可逆的损伤, 以致其磷酸酶的活力受到抑制。

LZM 广泛存在于动植物及微生物的多种组织、体液和分泌物中, 能破坏革兰氏阳性细菌的细胞壁,

使其溶解而失去感染活性, 在生物体的非特异性免疫中起着重要作用(Grinde *et al*, 1988)。王贞杰等(2017)发现, 氨氮胁迫可使圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)的溶菌酶活力在 12~96 h 内持续下降, 且氨氮浓度越高, 酶活下降越快。凡纳滨对虾的溶菌酶活性也会因为氨氮胁迫而持续降低(Qiu *et al*, 2008)。本研究结果表明, 氨氮对青蟹血清 LZM 的活力具有显著的抑制作用。Yue 等(2010)发现, 将三疣梭子蟹暴露在氨氮浓度为 20 mg/L 的水中, 其溶菌酶基因的表达量显著降低( $P < 0.05$ ), 由此说明, 氨氮可能是通过抑制机体中溶菌酶基因的正常表达而使 LZM 活力显著降低。

青蟹血细胞的吞噬过程会产生过氧化氢( $H_2O_2$ )和超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )等氧化物质, 这些氧化物质除了具有杀菌作用外, 也会对自身细胞产生一定的损害作用(姚翠鸾等, 2003), 而 SOD 具有清除机体内这些氧化活性物质的作用, 使机体免于因氧化作用而产生损伤(孔祥会等, 2003)。本研究发现, 短时间的氨氮胁迫对甲壳动物血清中 SOD 活力影响并不显著。黄鹤忠等(2006)报道, 当氨氮浓度为 5.0 mg/L、胁迫 10 d 或 3.0~5.0 mg/L、胁迫 20 d 时, 中华绒螯蟹的 SOD 活性才有明显下降( $P < 0.05$ )。而经氨氮胁迫 4 d, 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的 SOD 活性显示为增高, 至 10 d 才表现为降低(王玥等, 2006)。由此可见, 长时间的氨氮胁迫才有可能导致机体结构的破坏, 致使其免疫系统受损, 从而导致 SOD 活力受到影响。

#### 4 结论

综上所述, 不同浓度氨氮在实验周期内对 SOD 活力无显著影响, 但其会通过急性促进 AKP、ACP 和 PO 或显著抑制 LZM 等酶活力的方式来影响拟穴青蟹的非特异性免疫反应, 且这种急性促进作用通常是血细胞受到破坏而产生的结果, 是不可逆的, 说明略高于安全浓度的氨氮( $\geq 10$  mg/L)即会对拟穴青蟹产生明显的毒害作用。因此, 该研究建议在拟穴青蟹养殖生产中, 要定时检测养殖水体中的氨氮含量并通过适时更换养殖用水等方式将氨氮控制在安全浓度( $C_{NH_3-N}$ , 7.90 mg/L;  $C_{NH_3}$ , 0.63 mg/L)以下, 从而为青蟹提供持续健康的养殖环境。

#### 参 考 文 献

Ai CX, Zeng YY. The effects of ammonia-N stress on the activities of ATPase, ACP and AKP in different tissues and organs of mud crab *Scylla paramamosain*. Journal of

Xiamen University (Natural Science), 2011, 50(4): 772-778 [艾春香, 曾媛媛. 氨氮胁迫对拟穴青蟹腺苷三磷酸酶和磷酸酶比活力的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(4): 772-778]

Ashida M, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 77B(1): 21-26

Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1971, 144(2): 749-762

Cheng W, Chen JC. The virulence of Enterococcus to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(2): 97-109

Deng KY, Meng XH, Kong J, *et al*. Effects of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on non-specific immunity and expression of immune gene under the ammonia stress of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 71-78 [邓康裕, 孟宪红, 孔杰, 等. 聚- $\beta$ -羟基丁酸酯对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 71-78]

Dong YB, Wang K, Wang LT. Research progress in toxicity of ammonia nitrogen to aquatic organisms. Tianjin Fisheries, 2011(Z1): 8-13 [董玉波, 王轲, 王林同. 氨氮对水生生物毒性的研究进展. 天津水产, 2011(Z1): 8-13]

Grinde B, Jollés J, Jollés P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). European Journal of Biochemistry, 1988, 173: 269-273

Han CY, Zheng QM, Chen GD, *et al*. Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). South China Fisheries Science, 2014(3): 47-52 [韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响. 南方水产科学, 2014(3): 47-52]

He HQ, Sun F. Research on acidic and alkaline phosphatase characteristics of *Penaeus chinensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1992, 23(5): 555-560 [何海琪, 孙凤. 中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性研究. 海洋与湖沼, 1992, 23(5): 555-560]

Hong M, Chen L, Sun X, *et al*. Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia. Comparative Biochemistry & Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(3): 363-369

Hong ML, Chen LQ, Gu SZ, *et al*. Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412-418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418]

Hu Y, Huang Y, Zhong L, *et al*. Effects of ammonia stress on the

- gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 538–545 [胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. 水产学报, 2012, 36(4): 538–545]
- Huang HZ, Li Y, Song XH, *et al.*  $\text{NH}_4^+$ -N stress on immune function of *Eriocheir sinensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(3): 198–205 [黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)免疫功能的影响. 海洋与湖沼, 2006, 37(3): 198–205]
- Huang HZ, Liang SR. Toxicity treatment of 3 kinds of drugs on *Eriocheir sinensis* larvae. Reservoir Fisheries, 1998(6): 15–16 [黄鹤忠, 梁守仁. 3 种药物对河蟹幼体的毒性试验. 水生生态学杂志, 1998(6): 15–16]
- Kong XH, Wang GZ, Ai CX, *et al.* Comparative research on total antioxidant capacity and SOD activity in different organs and tissues in *Scylla serrata*. Journal of Applied Oceanography, 2003, 22(4): 469–474 [孔祥会, 王桂忠, 艾春香, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中总抗氧化能力和 SOD 活性的比较研究. 应用海洋学学报, 2003, 22(4): 469–474]
- Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 2000, 191: 121–131
- Liu HZ, Zheng FR, Sun XQ, *et al.* Effect of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus*. Marine Science, 2012, 36(8): 47–52 [刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响. 海洋科学, 2012, 36(8): 47–52]
- Mugnier C, Zipper E, Goarant C, *et al.* Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, 2008, 274(2–4): 398–407
- Qian JH, Li ZM, Liu JY, *et al.* Acute toxicity of ammonia-N and its effect on the immune parameters of *Fenneropenaeus merguensis*. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(2): 211–216 [钱佳慧, 栗志民, 刘建勇, 等. 氨氮对墨吉明对虾的急性毒性及对其免疫因子的影响. 应用海洋学学报, 2016, 35(2): 211–216]
- Qiu DQ, Zhou XJ, Qiu MS, *et al.* Research on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(4): 455–461 [邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学学报, 2008, 32(4): 455–461]
- Racotta IS, Hernándezherrerera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2000, 125(4): 437–443
- Ruyet PL, Chartois H, Quemener L. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquaculture, 1995, 136(1–2): 181–194
- Shao XB, Lü YL, Li K, *et al.* The acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla serrata*, and the effects of temperature to the rate of oxygen consumption and suffocation point. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2011, 30(6): 511–514 [邵鑫斌, 吕永林, 李凯, 等. 氨氮对锯缘青蟹的急性毒性和温度对其耗氧率、窒息点的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(6): 511–514]
- Wang WN, Wang AL, Zhang YJ, *et al.* Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture, 2004, 232(1): 679–686
- Wang Y, Hu YB, Jiang NC. Effect of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2005, 32(6): 698–705 [王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响. 浙江大学学报(理学版), 2005, 32(6): 698–705]
- Wang Y, Li J, Zhang Z, *et al.* Effect of pH and ammonia-N stresses on HSP90 gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43–50]
- Wang ZJ, Chen SQ, Cao DZ, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 61–69 [王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对圆斑星鲃 (*Verasper variegatus*) 幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 61–69]
- Xiao W, Li DY, Xu Y, *et al.* Effects of chronic external ammonia stress on growth, immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 81–87 [肖炜, 李大宇, 徐杨, 等. 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫及代谢的影响. 南方水产科学, 2015, 11(4): 81–87]
- Yao CL, Wang WN, Wang AL. Research progress of superoxide dismutase in aquatic animals. Marine Science, 2003, 27(10): 18–21 [姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展. 海洋科学, 2003, 27(10): 18–21]
- Yue F, Pan LQ, Xie P, *et al.* Effects of ammonia exposure on prophenoloxidase system and immune parameters of swimming crab *Portunus trituberculatus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 761–770 [岳峰, 潘鲁青, 谢鹏, 等. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响. 中国水产科学, 2010, 17(4): 761–770]
- Yue F, Pan LQ, Xie P, *et al.* Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 157(3): 246–251

Zeng YY, Jiang YX, Ai CX. Effects of ammonia-N stress on the activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in different tissues and organs of *Scylla paramamosain*. *Journal of Applied Oceanography*, 2011, 30(2): 210–215 [曾媛媛, 蒋云霞, 艾春香. 氨氮胁迫对拟穴青蟹组织器官中SOD及GPX活性的影响. *应用海洋学学报*, 2011, 30(2): 210–215]

Zhang D, Yang K, Su YL, *et al.* A duplex nested-PCR assay for detection of mud crab reovirus and mud crab dicistrovirus-1. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 808–815

[张迪, 杨铿, 苏友禄, 等. 青蟹呼肠孤病毒和青蟹双顺反子病毒-1 双重巢式 PCR 检测方法的建立. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 808–815]

Zhang WX, Sun SM, Ge XP, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 39(2): 233–244 [张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响. *水产学报*, 2015, 39(2): 233–244]

(编辑 冯小花)

## Acute Toxicity of Ammonia Nitrogen to *Scylla paramamosain* and Its Influence on Immune Factors in Serum

PENG Junhui<sup>1,2</sup>, CHEN Liying<sup>3</sup>, CHENG Changhong<sup>1</sup>, FENG Juan<sup>1</sup>, MA Hongling<sup>1</sup>, GUO Zhixun<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 210306; 3. College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006)

**Abstract** Using the toxicity method, we studied the acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla paramamosain* and its influence on phenol oxidase (PO), alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), superoxide dismutase (SOD), and lysozyme (LZM) in the conditions of different ammonia nitrogen concentrations of 0 (C0, control group), 10 (C10), 20 (C20), 30 (C30), 40 (C40), 50 mg/L (C50) and different times of 0, 6, 24, 48, and 72 h. The results showed that the semi-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) at 24 and 48 h of ammonia-N were 104.793 and 66.124 mg/L respectively, and the safe concentration (SC) was 7.90 mg/L. The LC<sub>50</sub> at 24 and 48 h of NH<sub>3</sub>-N were 8.396 and 5.298 mg/L respectively, and the SC was 0.63 mg/L. The LZM activity of each treatment group was significantly lower than that of C0 group ( $P < 0.01$ ) at 6, 24, 48, and 72 h. AKP and ACP activity of C10, C20, and C40 groups was significantly higher than that of control group at 24 h ( $P < 0.05$ ), while the SOD activity of the C20 group was significantly lower than that of other stress times ( $P < 0.05$ ). At 72 h, the PO activity of C30, C40, and C50 groups were significantly higher than that of C0 group ( $P < 0.05$ ). Under the experimental conditions, ammonia nitrogen that was lower than 40 mg/L could significantly enhance the AKP and ACP activity of *S. paramamosain* over a 24 h period, while 50 mg/L ammonia nitrogen had inhibitory effects. Ammonia nitrogen in all groups had significant inhibitory effects on LZM activity of *S. paramamosain*, which had no significant effect on SOD activity, but had an obvious enhancement effect on activity of PO by 72 h.

**Key words** *Scylla paramamosain*; Ammonia nitrogen; Safe concentration; Immune-related enzyme

① Corresponding author: GUO Zhixun, E-mail: guozhixun1@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170808001

http://www.yykxjz.cn/

林颖辉, 王文磊, 徐燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添. 坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及表达特征. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 122-129

Lin YH, Wang WL, Xu Y, Ji DH, Chen CS, Xie CT. Cloning and expression analysis of serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) genes from *Pyropia haitanensis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 122-129

# 坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的 克隆及表达特征\*



林颖辉 王文磊 徐 燕 纪德华 陈昌生 谢潮添<sup>①</sup>

(集美大学水产学院 厦门 361021)

**摘要** 丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)在植物应答逆境胁迫中发挥着重要作用。本研究以坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)为研究材料,采用普通 PCR 技术克隆得到 2 条坛紫菜的 SHMT 全长基因序列,分别命名为 *PhSHMT-1*(GenBank 收录号: MF687405)和 *PhSHMT-2*(GenBank 收录号: MF687406)。其中, *PhSHMT-1* 序列全长 1710 bp, 包含一个 1491 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 497 个氨基酸, 分子量为 121.443 kDa, 等电点为 4.93; *PhSHMT-2* 序列全长 1957 bp, 包含一个 1395 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 465 个氨基酸, 分子量为 113.969 kDa, 等电点为 4.95。多序列比对和系统进化树分析结果确认 *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因属于 SHMT 基因家族。qRT-PCR 定量分析结果表明, 高温胁迫条件下, 2 条 *PhSHMT* 基因的表达模式基本一致, 均表现为先上调后下调再上调的趋势, 这说明 SHMT 基因可能在坛紫菜应答高温胁迫过程中发挥作用。

**关键词** 坛紫菜; 高温胁迫; 丝氨酸羟甲基转移酶; 活性氧; 基因克隆

中图分类号 S968.43+1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0122-08

丝氨酸羟甲基转移酶(Serine hydroxyl methyltransferase, SHMT)(Schirch *et al*, 2005)广泛存在于真核生物和原核生物中,在高等植物的一碳化合物代谢和光呼吸过程发挥着重要作用,其主要功能是为蛋白质和嘌呤的生物合成提供甘氨酸,并生成 N5,N10-亚甲基四氢叶酸(McClung *et al*, 2000)。四氢叶酸是植物体内参与 C1 转移反应的重要辅酶,并且在植物的甲基循环过程中发挥重要作用(Bekaert *et al*, 2008)。生成的亚甲基四氢叶酸参与了 DNA 和 RNA 的合成,并在亚甲基四氢叶酸还原酶的作用下,再经过一系列的转化,最终生成 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-methionine,

SAM),从而直接参与 DNA 的甲基化过程(Du *et al*, 2017)。植物在缺少 SHMT 时,会发生严重的生长延迟。同时,已有的研究也表明,SHMT 在植物抵抗非生物胁迫时也发挥着重要的作用。例如,谷胱甘肽是清除活性氧的重要抗氧化剂,而谷胱甘肽的合成主要依赖于甘氨酸(Graham *et al*, 1997; 李朝霞等, 2003)。Graham 等(1997)对杨树在逆境胁迫下谷胱甘肽合成的研究中发现,SHMT 基因参与了光呼吸过程并产生甘氨酸。李朝霞等(2003)认为,在逆境胁迫条件下,光呼吸不仅可以促进卡尔文循环参与抗逆反应,而且可以参与甘氨酸的合成进而合成谷胱甘肽清除活性

\* 福建省自然科学基金(杰青)(201412260001)资助 [This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (Outstanding Youth Fund) (201412260001)]. 林颖辉, E-mail: 414350177@qq.com

① 通讯作者: 谢潮添, 教授, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-08, 收修改稿日期: 2017-08-29

氧。此外,对拟南芥 *SHMT* 突变体的研究表明,抑制 *SHMT* 基因的表达,植株抵抗非生物胁迫的能力显著下降,更易受到胁迫的侵害(Moreno *et al.*, 2005)。由此可见,*SHMT* 基因在植物的逆境胁迫应答中发挥着重要的作用。因此,研究逆境胁迫条件下植物体中 *SHMT* 基因的表达变化并应用于转基因实验中,是抗逆植物基因工程研究的一个重要方向。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国南方沿海广泛栽培的大型经济海藻之一,其产量占全国紫菜产量的 70%以上(李晓川, 2011)。坛紫菜生活在潮间带的中高潮区,退潮时,坛紫菜叶状体会直接暴露于空气当中,遭遇高温、失水和高光强等环境因子的逆境胁迫。由于生存环境特殊,使得坛紫菜具备了独特的抵抗逆境胁迫的能力(Blouin *et al.*, 2011)。此外,近年来受到全球气候变暖的影响,海水水温过高严重影响坛紫菜栽培的产量和经济效益(Xu Y *et al.*, 2014; 李兵等, 2013; 张元等, 2011)。因此,研究坛紫菜的抗高温机制,克隆抗高温相关基因,对于后期海藻乃至经济作物抗逆基因工程的研究具有十分重要的理论价值和实际意义。目前,尚无在大型海藻中克隆获得 *SHMT* 相关基因的报导,研究 *SHMT* 基因在抵抗高温等逆境胁迫时如何发挥作用,对于研究大型海藻在抵抗逆境胁迫时的一碳化合物代谢和光呼吸变化十分必要。本研究克隆获得了 2 条坛紫菜 *SHMT* 基因的全长,并通过实时荧光定量 PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)技术分析 *SHMT* 基因在高温胁迫下的表达水平变化,不仅丰富了坛紫菜的基因库,而且可为坛紫菜抗逆机制研究提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 坛紫菜样品及胁迫处理

本实验中所采用的实验材料取自福建省坛紫菜种质资源库, Z-61 品系是经人工诱变和杂交选育出的坛紫菜耐高温纯系(陈昌生等, 2008)。正常条件下培养的坛紫菜 Z-61 叶状体用于总 RNA 的提取,反转录成 cDNA 后进行相关基因的全长克隆。提取各高温胁迫下培养的 Z-61 叶状体总 RNA,用于基因表达水平的 qRT-PCR 分析。

坛紫菜 Z-61 叶状体的正常培养条件:培养温度(21.0±0.5)°C,光照强度 50~60 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照周期 12L:12D,每 48 h 更换一次新鲜的叶状体培养液。叶状体叶片长度培养至(16±2) cm 时,选取叶面平滑、无卷曲且生长状况良好的藻体作为实验材料。

坛紫菜 Z-61 叶状体的高温胁迫培养条件:取(16±2) cm 的健康藻体,分别于(31.0±0.5)°C 的恒温光照培养箱中进行高温胁迫处理(其余培养条件同适宜条件),胁迫处理时间为 0、3、6、12、24、48、96、144 h。

### 1.2 引物及其序列

基因序列的 PCR 扩增、阳性克隆筛选和不同胁迫处理下基因表达水平分析所用的引物序列均由厦门铂尚生物有限公司合成(表 1)。

### 1.3 总 RNA 的分离纯化

用滤纸吸干坛紫菜表面水分后,称取 0.1 g 藻体用于总 RNA 提取。总 RNA 提取采用 E.Z.N.A 植物 RNA 提取试剂盒(OMEGA, 德国)。所提取的总 RNA

表 1 实验中所用引物  
Tab.1 Primers used in the experiment

基因 Gene	引物序列 Sequence(5'~3')	用途 Purpose
<i>PhSHMT1</i>	F: CCACAACGTCCGCCTTCAAC R: CGATTGGCTCCTTGCTGCAC	定量分析 qRT-PCR
<i>PhSHMT2</i>	F: TGATGGAGGCTGGCTACACG R: ACACCGCGTTCTTGTTGAGC	
<i>PhSHMT1</i>	F: CACACTCGCCCACCAATG R: CCCCACTTCCGTCTCACTC	普通 PCR
<i>PhSHMT2</i>	F: GTTCATCCACGCCGACA R: TGCTCCGCACCTCACAGA	普通 PCR
<i>PhUBC</i>	F: TCACAACGAGGATTTACCACC R: GAGGAGCACCTTGAAACG	内参 Internal control
M13	F: CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC R: GAGCGGATAACAATTTACACAGG	阳性克隆筛选 Validate of positive clone

的完整性通过凝胶电泳进行检查,并通过 Cary50 紫外分光光度计(Varian, 美国)分别测定  $OD_{260\text{ nm}}$  和  $OD_{280\text{ nm}}$  值。根据测定结果判断核酸和蛋白质的污染情况,并计算所提取的 RNA 浓度。

#### 1.4 *PhSHMT* 基因的全长克隆

根据坛紫菜转录组数据库(GenBank 登录号: Gfom00000000)unigene 的注释结果,筛选出 2 条注释结果为皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)*SHMT* 基因的 unigene(Cluster-3452.15441, Cluster-3452.16340)序列,进行 *PhSHMT* 基因的克隆。通过 Blast 序列比对分析,发现 Unigene15441 已包含所编码基因 5'端起始密码子和 3'端终止密码子,因此,根据 Unigene15441 的序列设计普通 PCR 引物进行序列扩增验证(表 1);而对 Unigene16340 进行 Blast 比对,同样也已包含了 5'端起始密码子和 3'端终止密码子,因此,同样根据 Unigene16340 序列设计普通 PCR 引物进行序列扩增验证(表 1)。采用普通 PCR 方法对坛紫菜 *SHMT* 基因进行克隆。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒(TIANGEN)对目的片段进行回收,与 pMD19-T 载体(TaKaRa)连接后导入感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  中,筛选出阳性克隆后进行放大培养,采用质粒小提试剂盒(TIANGEN)提取质粒后寄送厦门铂尚生物工程有限公司测序。根据测序结果,获得 2 个 *PhSHMT* 基因全长序列。

#### 1.5 *PhSHMT* 基因的生物信息学分析

基因序列同源性检测:利用 NCBI 的 Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序对所获得的 *PhSHMT* 全长基因序列进行检测。

开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)分析:采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)软件分析 *PhSHMT* 基因的开放阅读框以及其所编码氨基酸序列。

蛋白质序列一级结构分析:使用在线软件 ExPASy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 *PhSHMT* 基因所编码蛋白质的一级结构。

蛋白质序列二级结构分析:使用在线软件 PredictProtein(<https://www.predictprotein.org/>)分析 *PhSHMT* 基因所编码蛋白质的二级结构。

蛋白质跨膜结构分析:通过在线软件 TMHMM Serverv.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 *PhSHMT* 基因所编码蛋白质是否存在跨膜结构域。

亚细胞定位预测:通过在线软件 WoLFPSORT (<http://www.wolfpsort.org/>)对 *PhSHMT* 基因进行亚细

胞定位预测。

采用 ClustalX 进行氨基酸多重序列比对,并采用 MEGA 6.06 软件最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建 *PhSHMT* 蛋白系统进化树。

#### 1.6 *PhSHMT* 基因表达水平的 qRT-PCR 分析

根据已获得的 *PhSHMT* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物(表 1),并以 *PhUBC* 作为内参基因,分别进行 *PhSHMT* 在不同高温胁迫条件下基因表达水平的 qRT-PCR 分析。

提取的各样品总 RNA 按 PrimeScript RtreagentKit (TaKaRa, 大连)的流程将 RNA 反转录成 cDNA 定量模板。qRT-PCR 扩增以 10 $\times$ 梯度稀释的 cDNA 为模板进行,用于制作 *PhSHMT1*、*PhSHMT2* 和内参基因的标准曲线。每个反应设 3 个平行复孔。通过 SPSS 19.0 和 Excel 软件对实验最终定量数据进行统计分析,并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异( $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示极显著差异)。

qRT-PCR 扩增的 20  $\mu$ l 反应体系:10  $\mu$ l 2 $\times$ SYBR Premix *ExTaq*<sup>TM</sup> II (TaKaRa), 6.8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 0.4  $\mu$ l Rox Reference Dye I, 0.4  $\mu$ l 正反向引物和 2  $\mu$ l 反转录产物。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环。循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C, 绘制熔解曲线。qRT-PCR 扩增在 7300 型定量 PCR 仪 (ABI, 美国)上进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PhSHMT* 基因的全长克隆及序列分析

以坛紫菜 Cluster-3452.15441 为核心序列,通过普通 PCR 扩增和测序获得一条 1710 bp 的基因序列(图 1)。经过 Blast 比对,确定该基因为坛紫菜的 *PhSHMT* 基因,命名为 *PhSHMT-1*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,收录号为 MF687405。通过 ORF Finder 在线软件分析发现,该基因 107~1598 个碱基为完整的开放阅读框。使用 ExPASy ProtParam 程序进行一级结构分析发现, *PhSHMT-1* 编码的蛋白质包含 497 个氨基酸,分子式为 C<sub>4235</sub>H<sub>6978</sub>N<sub>1494</sub>O<sub>1762</sub>S<sub>450</sub>, 分子量为 121.443 kDa, 理论等电点为 4.93, 不稳定系数为 48.77, 脂肪系数为 17.60, 总平均疏水度为 0.807。通过 Predict Protein 程序预测 *PhSHMT-1* 的二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 43.46%、12.68%和 34.00%。TMHMM 软件检测发现该蛋白无跨膜结构域,亚细

胞定位软件 WoLFPSORT 预测 *PhSHMT-1* 定位于线粒体中。

以坛紫菜 Cluster-3452.16340 为核心序列, 通过普通 PCR 扩增和测序获得一条 1957 bp 的基因序列 (图 1)。经过 blast 比对, 确定该基因为坛紫菜的 *PhSHMT* 基因, 命名为 *PhSHMT-2*。该基因已提交到 GenBank 数据库中, 收录号为 MF687406。通过 ORF Finder 在线软件分析发现, 该基因 269~1664 个碱基为完整的 ORF。使用 ExPASy ProtParam 程序进行一级结构分析发现, *PhSHMT-2* 基因编码的蛋白质包含 465 个氨基酸, 分子式为  $C_{3992}H_{6588}N_{1398}O_{1670}S_{408}$ , 分子量为 113.969 kDa, 理论等电点为 4.95, 不稳定系数为 51.09, 脂肪系数为 17.60, 总平均疏水度为 0.775。通过 Predict Protein 程序预测 *PhSHMT-2* 的二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 43.23%、16.34%和 29.46%。TMHMM 软件检测发现, 该蛋白无跨膜结构域, 亚细胞定位软件 WoLFPSORT 预测 *PhSHMT-2* 定位于细胞质中。

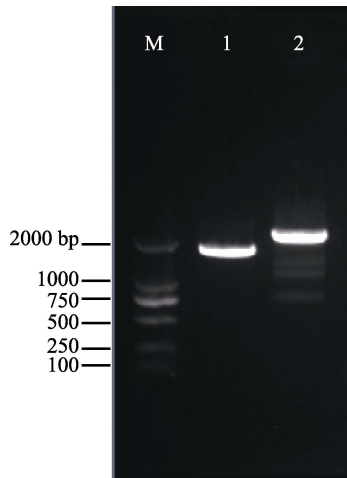


图 1 *PhSHMT* 基因克隆产物电泳  
Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR products of *PhSHMT* genes

1: *PhSHMT-1* 普通 PCR 扩增产物; 2: *PhSHMT-2* 普通 PCR 扩增产物; M: DL2000 DNA marker  
1: PCR products of *PhSHMT-1*; 2: PCR products of *PhSHMT-2*; M: DL2000 DNA marker

多序列比对结果表明, *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 间同源性较高, 且都具有 SHMT 家族特有的保守结构域, 在 *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 序列中均发现了磷酸吡哆醛的结合位点(图 2), 说明 SHMT 是以磷酸吡哆醛作为辅酶进行反应的。

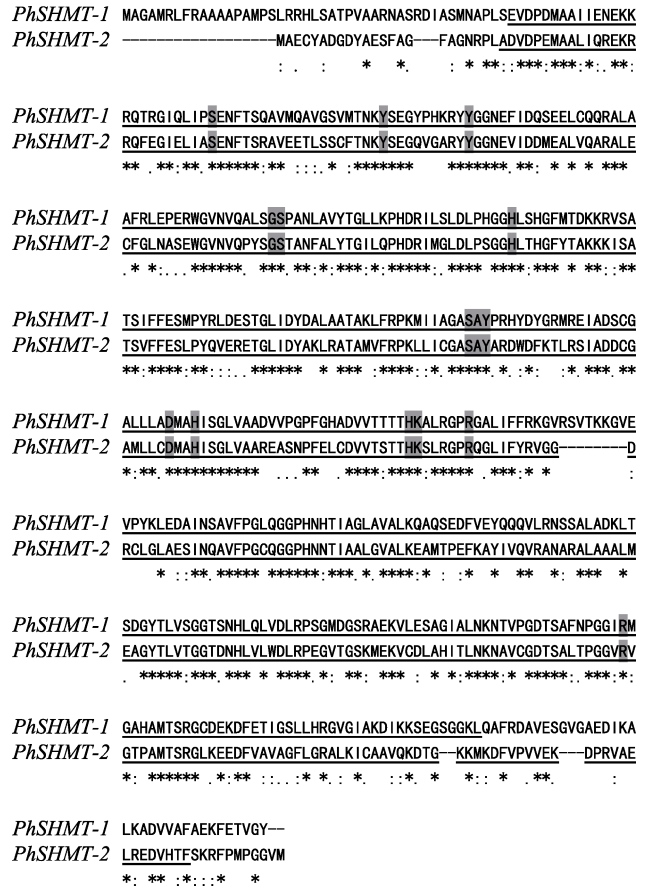


图 2 *PhSHMT* 蛋白氨基酸序列的多重序列比对  
Fig.2 Multi-alignment of amino acid sequence of *PhSHMT*

下划线部分为 *SHMT* 基因家族特有的保守结构域, 阴影标记为磷酸吡哆醛的结合位点, “\*”和“:” 分别表示一致性和相似性的氨基酸残基

The underlined sections were the conserved amino acids motif of *SHMT* gene family. The gray background were marked as the pyridoxal phosphate binding site. Asterisks (\*) and colons (:) indicated identical and similar amino acid residues, respectively

## 2.2 *PhSHMT* 的系统进化分析

为进一步分析 *PhSHMT* 与其他物种的亲缘关系, 从 NCBI 的 GenBank 数据库中选取 10 条 SHMT 相关氨基酸序列, 通过 MEGA 6.06 程序采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统进化树。结果显示, *PhSHMT-1* 基因与一种红藻 (*Cyanidioschyzon merolae strain*) 和邹波角叉菜 (*Chondrus crispus*) 聚为一类, 而 *PhSHMT-2* 与三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*)、一种温泉红藻 (*Galdieria sulphuraria*) 和假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 聚为一类, 且藻类的 *SHMT* 基因与高等植物遗传距离较大 (图 3), 说明藻类中 *SHMT* 基因与高等植物亲缘关系较远。



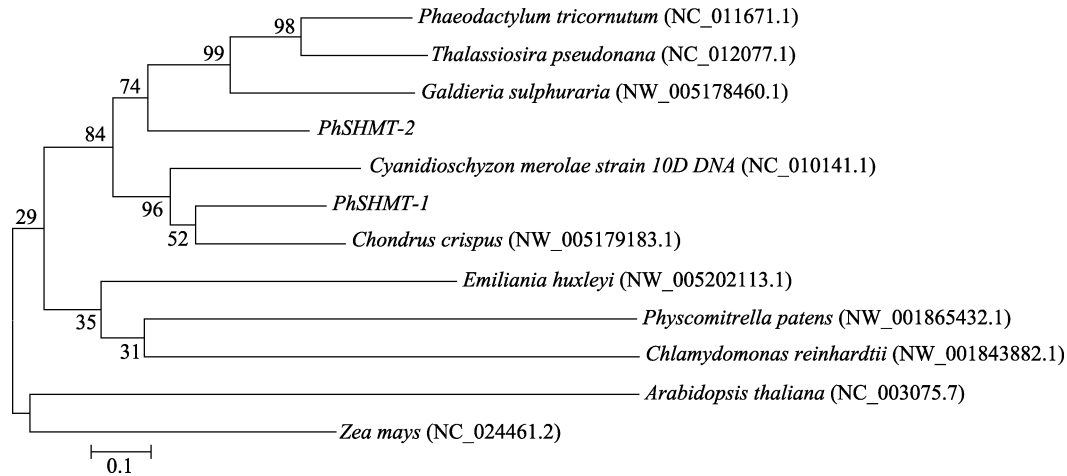


图 3 SHMT 基因的蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of SHMT protein constructed by the maximum likelihood method

### 2.3 PhSHMT 基因表达水平的 qRT-PCR 分析

为研究 *PhSHMT* 基因在坛紫菜响应逆境胁迫中所发挥的功能,本研究对 *PhSHMT* 基因表达水平进行了定量检测。通过 qRT-PCR 技术对 2 条 *PhSHMT* 基因在高温胁迫下的表达特征进行了相对定量分析(图 4、图 5)。

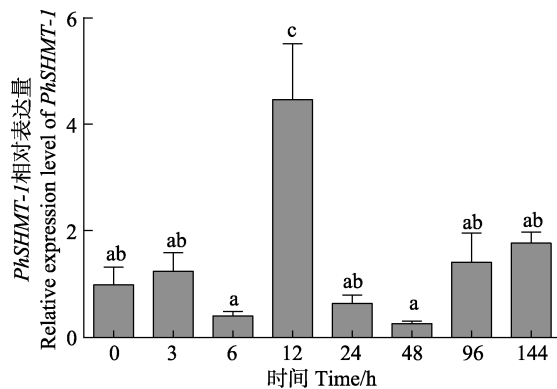


图 4 PhSHMT-1 在高温胁迫水平下的相对表达

Fig.4 Relative expression levels of *PhSHMT-1* gene under high temperature stress

具有不同字母上标的数据间差异显著( $P < 0.05$ ),下同 Bar of each column with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below

结果表明,在  $31^{\circ}\text{C}$  高温胁迫不同时间下,*PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因的表达模式基本一致:在高温胁迫 12 h 时,*PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因的表达水平受到高温刺激,表达水平显著上调( $P < 0.05$ );当高温胁迫超过 12 h 后,*PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因可能已适应高温过程,表达水平恢复到正常值;当高温胁迫超过 4 d 时,*PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因

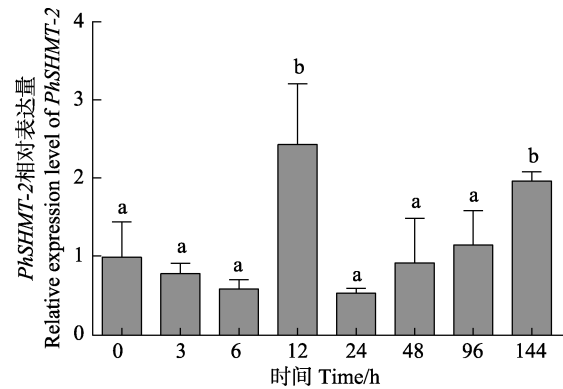


图 5 PhSHMT-2 在高温胁迫下的相对表达

Fig.5 Relative expression levels of *PhSHMT-2* gene under high temperature stress

的表达水平又显著上调( $P < 0.05$ ),这可能是由于过久的高温胁迫,藻体需要更多的谷胱甘肽以清除活性氧,而藻体中的甘氨酸通过合成谷胱甘肽导致含量下降,需要重新合成更多的甘氨酸。

### 3 讨论

甘氨酸作为一种植物抗逆调节剂,通过合成谷胱甘肽来清除活性氧(Yan *et al*, 2013)。植物可以通过光呼吸过程将丝氨酸转化为甘氨酸(马莉等, 2008),而 SHMT 在植物光呼吸过程中发挥着重要作用。研究表明,如果将 *SHMT* 基因敲除,植株的抗逆能力明显降低,更容易受到活性氧的毒害(Moreno *et al*, 2005)。不仅如此,SHMT 在光呼吸过程产生的四氢叶酸可以进一步生成 SAM,其可以调控 CpG 岛胞嘧啶 DNA 的甲基化(Kim, 2005)。然而,目前对于大型海藻中 *SHMT* 基因的研究尚处于空白。本研究以转录组测序获得的 *SHMT* 基因序列为基础,通过普通 PCR 扩增

技术成功克隆了 2 条坛紫菜的 *SHMT* 基因。

植物在逆境胁迫下会导致卡尔文循环障碍, 并产生大量的活性氧, 对植物机体结构造成氧化损伤 (Mittler, 2002)。而光呼吸可以促进卡尔文循环进而提高植物抵抗逆境胁迫的能力, 并且光呼吸过程的代谢中间产物也发挥了重要作用(赵宏伟等, 2016), 如脯氨酸与谷胱甘肽。其中, 脯氨酸是一种重要的细胞渗透调节剂, 其合成主要受到谷氨酸含量的影响, 而光呼吸过程产生的  $\text{NH}_3$  参与了谷氨酸的合成。谷胱甘肽是一种重要的抗氧化物质, 在清除活性氧方面扮演着重要角色, 谷胱甘肽的合成主要依赖于甘氨酸, 而甘氨酸是光呼吸过程的重要代谢产物。*SHMT* 作为一类参与光呼吸与一碳代谢的重要酶类, 目前已经在许多物种中被鉴定出。植物体内存在 3 种形式的 *SHMT*, 包括细胞质 *cSHMT*、线粒体 *mSHMT* 和叶绿体 *SHMT*(Bauwe *et al*, 2003; Garrow *et al*, 1993)。在本研究中, 对克隆出的 2 条 *PhSHMT* 基因进行亚细胞定位发现, *PhSHMT-1* 基因定位于线粒体上, 而 *PhSHMT-2* 基因定位于细胞质上。这说明, 坛紫菜中可能存在细胞质型和线粒体型的 *SHMT*, 而是否存在叶绿体型的 *SHMT* 尚待进一步的研究。根据以往的研究(Kamalay *et al*, 1980、1984)推测: 坛紫菜线粒体型的 *SHMT* 首先在光呼吸过程发挥作用, 将甘氨酸分解形成  $\text{CO}_2$  和  $\text{NH}_3$ , 进而生成丝氨酸; 而随着丝氨酸进入细胞质中被分解, 坛紫菜细胞质型的 *SHMT* 又将丝氨酸催化生成甘氨酸。

植物在应对逆境胁迫时的响应是一个非常复杂的生理生化过程, 其中包括了多种基因、多种生理机制的共同调控。植物在遭受高温胁迫时会产生大量的活性氧, 在植物长期的演变过程中形成了一系列复杂的活性氧清除机制, 例如激活抗氧化酶基因的表达和增强抗氧化酶活性等。坛紫菜的早期研究发现, 坛紫菜在应对高温胁迫时, 其过氧化氢酶基因会在短时间内迅速大幅度上调表达以清除细胞内多余的过氧化物(仵燕青, 2016); 此外, 谷胱甘肽过氧化物酶基因在 12 h 时显著上调表达(张晗等, 2016)。本研究发现, 在 31℃ 高温胁迫条件下, 随着胁迫时间的增加, 坛紫菜 2 条 *PhSHMT* 基因均表现出先上调后下调再上调的趋势, 在高温胁迫时间为 12 h 时, 2 条基因的表达水平平均达到最高; 随着胁迫时间的增加, 2 条基因的表达水平下降, 在高温胁迫时间为 4 d 时, 2 条基因表达水平又显著上调。通过以上结果可以推测: 坛紫菜在高温胁迫下, 光呼吸通过促进卡尔文循环参与抗逆反应中, 光呼吸代谢的许多中间产物在这个阶段也发挥了重要作用。光呼吸过程产生甘氨酸, 甘

氨酸通过合成谷胱甘肽来清除多余的活性氧。*SHMT* 基因作为植物光呼吸过程中关键的基因, 在高温胁迫下通过大量的上调表达以促进光呼吸过程, 进而产生更多甘氨酸用于合成谷胱甘肽来清除多余的氧化活性物质。在这个过程中可能伴随坛紫菜甲基化的过程: 高温引起 *PhSHMT* 基因的大量上调表达, 这个过程中不仅可以合成甘氨酸用以应对高温胁迫, 还产生大量的四氢叶酸。由于四氢叶酸参与 SAM 的合成 (Du *et al*, 2017), 高温胁迫下, 推测可能伴随着坛紫菜甲基化水平的上升, 这与许多物种在高温条件下甲基化水平变化相似(Naydenov *et al*, 2015; Xu *et al*, 2014; 胡能兵等, 2016), 但该推测还需要进一步的实验进行验证。

*SHMT* 基因作为植物中一类响应逆境胁迫的基因, 在坛紫菜响应高温胁迫时发挥了重要的作用。*SHMT* 可以通过参与植物体中谷胱甘肽的合成, 以清除高温胁迫条件下产生的活性氧, 维持坛紫菜细胞内的氧化还原稳态环境。因此, 本研究为理解坛紫菜的耐高温机制以及耐高温品系的培育提供了新的视野和理论基础。

## 参 考 文 献

- Bauwe H, Kolukisaoglu U. Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(387): 1523–1535
- Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahi P, *et al*. Folate biofortification in food plants. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(1): 28–35
- Blouin, Nicolas A, Brodie, *et al*. *Porphyra*: A marine crop shaped by stress. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(1): 29–37
- Chen CS, Ji DH, Xie CT, *et al*. Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(5): 100–106 [陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究. *海洋学报*, 2008, 30(5): 100–106]
- Du J, Wang S, He C, *et al*. Identification of regulatory networks and hub genes controlling soybean seed set and size using RNA sequencing analysis. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(8): 1955–1972
- Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, *et al*. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(16): 11910
- Graham N, Arisi ACM, Lise J, *et al*. The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar: Possible implications for glutathione production during stress. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100(2): 255–263

- Hu NB, Sui YH, Su YJ, *et al.* Effect of heat stress on isoenzyme and DNA methylation of different heat-sensitive peppers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36(1): 131–138 [胡能兵, 隋益虎, 舒英杰, 等. 高温胁迫对不同热敏型辣椒同工酶及 DNA 甲基化的影响. *西北植物学报*, 2016, 36(1): 131–138]
- Kamalay JC, Goldberg RB. Organ-specific nuclear RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(9): 2801–2805
- Kamalay JC, Goldberg RB. Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell*, 1980, 19(4): 935–946
- Kim YI. Nutritional epigenetics: Impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *Journal of Nutrition*, 2005, 135(11): 2703
- Li B, Xu Y, Ji DH, *et al.* Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Porphyra haitanensis*. *Marine Fisheries Research*, 2013, 34(3): 104–110 [李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 104–110]
- Li XC. Industry development, standard and safety assessment of seaweed in China. *Chinese Fishery Quality & Standards*, 2011, 1(3): 9–12 [李晓川. 我国紫菜产业发展、标准状况及安全性评价. *中国渔业质量与标准*, 2011, 1(3): 9–12]
- Li ZX, Zhao SJ, Meng QW. Pathways and function of photorespiration. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(2): 190–197 [李朝霞, 赵世杰, 孟庆伟. 光呼吸途径及其功能. *植物学报*, 2003 20(2): 190–197]
- Ma L, Chen LM, Liu DQ, *et al.* Research progresses on the molecular properties and physiological functions of plant serine hydroxymethyltransferase. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(4): 1357–1359 [马莉, 陈丽梅, 刘迪秋, 等. 植物丝氨酸羟甲基转移酶及其生理作用研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36(4): 1357–1359]
- McClung CR, Hsu M, Painter JE, *et al.* Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiology*, 2000, 123(1): 381–392
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(1): 405–410
- Moreno JI, Mart NR, Castresana C. *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant Journal*, 2005, 41(3): 451–463
- Naydenov M, Baev V, Apostolova E, *et al.* High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2015, 87: 102–108
- Schirch V, Szebenyi DM. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(5): 482–487
- Wu YQ, Xiao HD, Xu K, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of catalase (CAT) gene from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1576–1585 [作燕青, 肖海东, 许凯, 等. 坛紫菜过氧化氢酶基因的克隆及表达特征. *水产学报*, 2016, 40(10): 1576–1585]
- Xu X, Lei J, Zhang C, *et al.* Methylation-sensitive amplified polymorphism analysis of DNA methylation in hot pepper under high temperature and air humidity stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(7): 1175–1180
- Xu Y, Chen C, Ji D, *et al.* Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 607–618
- Yan H, Mao P, Xia F. Research progress in plant antioxidant glutathione (Review). *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(3): 428–434
- Zhang HH, Xu Y, Ji DH, *et al.* Cloning and expression analysis of the glutathione peroxidase gene from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 791–799 [张哈哈, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及表达特征. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 791–799]
- Zhang Y, Xie CT, Chen CS, *et al.* Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 379–386 [张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应. *水产学报*, 2011, 35(3): 379–386]
- Zhao HW, Wang XP, Yu MF, *et al.* Effect of drought stress and rewatering on antioxidant system and proline in rice during tillering stage. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(2): 1–7 [赵宏伟, 王新鹏, 于美芳, 等. 分蘖期干旱胁迫及复水对水稻抗氧化系统及脯氨酸影响. *东北农业大学学报*, 2016, 47(2): 1–7]

(编辑 冯小花)

## Cloning and Expression Analysis of Serine Hydroxyl Methyltransferase (SHMT) Genes from *Pyropia haitanensis*

LIN Yinghui, WANG Wenlei, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian<sup>①</sup>

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021)

**Abstract** Serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) plays an important role in plant response to stress. Under adversity stress, the *SHMT* gene not only promotes the Calvin cycle to participate in the anti-stress reaction, but also participates in the synthesis of glycine, and then synthesis of glutathione, scavenging reactive oxygen species. *Pyropia haitanensis*, naturally grows in the coastal intertidal zone, is an important economic macroalgae in Fujian, Zhejiang and Guangdong provinces. Because of the special living environment, *P. haitanensis* has the unique ability to resist adversity. With global warming, the temperature of seawater increases, which causes damage to seedlings of *P. haitanensis* and leads to great economic losses in the aquaculture industry. As for the physiological and molecular response of *P. haitanensis* to high temperature and dehydration stress conditions, our previous studies found *SHMT* plays an important role in stress resistance. In this study, based on unigene sequences which were obtained from whole transcriptome sequencing of *P. haitanensis*, two full-length *PhSHMT* genes were obtained by ordinary PCR, and named *PhSHMT-1* (GenBank accession No: MF687405) and *PhSHMT-2* (GenBank accession No: MF687406). The full-length cDNA of the *PhSHMT-1* gene comprised 1710 nucleotides and contained an open reading frame (ORF) of 1491 bp, encoding a protein of 497 amino acid residues, with the predicted molecular weight of 121.443 kDa and theoretical isoelectric point of 4.93; and the full-length cDNA of the *PhSHMT-2* gene comprised 1957 nucleotides and contained an ORF of 1395 bp, encoding a protein of 465 amino acid residues with the predicted molecular weight of 113.969 kDa and theoretical isoelectric point of 4.95. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that the *PhSHMT-1* and *PhSHMT-2* belong to the plant *SHMT* enzyme family. The expressions of the two *PhSHMT* genes, as measured by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), were consistent under high temperature stress. During high-temperature stress, the expression levels of the two *PhSHMT* genes were significantly upregulated first and then decreased, but as the high-temperature stress continued, the expression levels were upregulated again. Results suggested that the gene of *PhSHMT* enzyme plays an important role in responses of *P. haitanensis* to high-temperature stress.

**Key words** *Pyropia haitanensis*; High temperature stress; Serine hydroxyl methyltransferase; Active oxygen; Gene cloning

<sup>①</sup> Corresponding author: XIE Chaotian, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170707001

http://www.yykxjz.cn/

刘婵, 冯娟, 谢云丹, 胡万涛, 王江勇, 苏友禄. 基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌三重 PCR 检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 130-136

Liu C, Feng J, Xie YD, Hu WT, Wang JY, Su YL. The application and detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia with a triple PCR based on virulence genes. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 130-136

# 基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌 三重 PCR 检测方法的建立及应用\*



刘 婵<sup>1,2</sup> 冯 娟<sup>2</sup> 谢云丹<sup>1,2</sup> 胡万涛<sup>3</sup> 王江勇<sup>2</sup> 苏友禄<sup>2①</sup>

(1. 天津农学院水产学院 天津 300384; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所  
农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300; 3. 广州大学生命科学学院 广州 510006)

**摘要** 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)作为罗非鱼主要病原, 传染力强、致死率高, 部分鱼从发病到死亡无明显病症, 难以确定鱼体是否携带该病原菌, 建立适用于生产一线的非乳链球菌检测技术势在必行。根据 GenBank 中无乳链球菌透明质酸酶基因(*hylB*)、青霉素结合蛋白基因(*ponA*)和 CAMP 因子基因(*cfb*)的保守序列, 设计 3 对特异性引物, 对多重 PCR 的反应条件和体系进行优化, 建立基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌三重 PCR 检测方法, 并运用该方法检测来自广东省不同地区的罗非鱼组织样品。构建的三重 PCR 检测方法仅在无乳链球菌中扩增出 3 条特异性条带, 而在罗非鱼和常见的水产病原菌菌株中均未扩增出任何条带, 表现出良好的特异性; 以无乳链球菌基因组 DNA 浓度  $7.24 \times 10^{-5} \sim 5.65 \text{ ng}/\mu\text{l}$  为模板进行扩增, 该三重 PCR 能检测到的最低模板浓度为  $1.81 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{l}$ , 表现出较高的灵敏度; 运用该方法检测 188 个罗非鱼组织样品, 其阳性检出率与常规细菌分离鉴定阳性率一致, 以常规细菌分离鉴定为标准, 对该三重 PCR 检测方法进行评价, 其诊断敏感性(Dse)和诊断特异性(Dsp)均为 100%。结果表明, 构建的三重 PCR 检测方法不仅显著提高了检测的准确度和灵敏度, 还可在同一反应中同时检测 3 种无乳链球菌毒力基因, 为无公害水产品中无乳链球菌的快速检测、水产养殖病害早期预警提供了一种快速、精准和高效的检测技术。

**关键词** 罗非鱼; 无乳链球菌; 毒力基因; 三重 PCR

中图分类号 S942 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0130-07

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)也称 B 簇链球菌(Group B streptococci, GBS), 为兼性革兰氏阳性球菌(Rosinski-Chupin *et al*, 2013; Soto *et al*, 2015)。该

菌宿主广泛, 不仅能感染包括人在内的哺乳动物, 还是养殖鱼类的重要病原(Schuchat *et al*, 1998)。罗非鱼为重要的世界性养殖鱼类, 是联合国粮农组织(FAO)

\* 国家自然科学基金(31502210)、广州市珠江科技新星(201610010015)、广东省级鱼病防治专项(2016-302)、广东省自然科学基金(2015A030313688)和“广东特支计划”科技青年拔尖人才(2016TQ03N275)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31502210), Pearl River S&T Nova Program of Guangzhou (201610010015), Special Funds for Fish Diseases of Guangdong Province (2016-302), Natural Science Foundation of Guangdong Province (2015A030313688), and Youth Science and Technology Innovation Talents Funds in Special Support Plan for High Level Talents in Guangdong Province (2016TQ03N275)]. 刘 婵, E-mail: 784102490@qq.com

① 通讯作者: 苏友禄, 副研究员, E-mail: suyoulu@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2017-07-07, 收修改稿日期: 2017-07-31

向全球推广养殖的优良品种, 中国罗非鱼养殖年产量约为 178 万 t, 占世界罗非鱼总产量的三分之一以上, 是水产品出口量最大的品种之一(2016 中国渔业统计年鉴)。近年来, 罗非鱼链球菌病日益严重, 无乳链球菌作为其主要病原, 传染力强, 致死率高, 由此产生的病害给罗非鱼养殖产业带来了巨大的经济损失 (Evans *et al.*, 2008; Kayansamruaj *et al.*, 2015)。

罗非鱼无乳链球菌病发病较快, 部分鱼从发病到死亡无明显病症, 较难确定鱼体是否携带该病原菌, 从而影响对病害的有效处理(程世亮等, 2016)。传统的病原菌分离和生理生化鉴定等方法, 由于操作繁琐、检测周期长, 不能达到快速检测目的(张新艳等, 2008; 卢迈新等, 2010); 普通 PCR 方法, 一次仅能检测 1 个基因, 可能会造成漏检或误检(Wu *et al.*, 2008); 环介导等温扩增(LAMP)方法, 具有灵敏度高、反应时间短、临床使用不需要特殊的仪器、操作简单等优点, 但对引物设计要求比较高, 有些基因可能不适用, 还容易形成气溶胶污染, 造成假阳性(甘文佳等, 2010); 荧光定量 PCR 虽然具有较高的灵敏度, 但检测仪器昂贵, 对实验操作技术水平要求较高(Su *et al.*, 2016)。因此, 建立快速、精准、高效且适用于生产一线的非乳链球菌检测技术势在必行。

多重 PCR 在一次反应中能同时扩增多个目的片段的靶序列, 具有高效、快捷、高度特异、敏感等优势, 已经成为诸多实验室的常规诊断方法(毕艳妮等, 2014)。目前, 多重 PCR 方法已用于养殖对虾中同时检测 6 种病毒(刘飞等, 2014)。本研究以无乳链球菌的毒力基因即透明质酸酶基因 *hylB*、编码表面相关青霉素结合蛋白的 *ponA* 基因和 CAMP 因子的 *cfb* 基因为靶标, 设计 3 对特异性引物, 通过引物组合优化建立一种快速、高效、稳定、特异性好、灵敏度高的无乳链球菌三重 PCR 检测方法, 旨在为无乳链球菌的快速检测和早期预警提供一种准确、高效的检测技术。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

鱼源无乳链球菌标准株(ATCC51487)和人源无乳链球菌标准株(ATCC BAA-1138)购于中国微生物菌种保藏中心。来源于不同年份和地区的无乳链球菌分离株 TZQ0901(2009 年分离自广东省肇庆市)、TGZ1001(2010 年分离自广东省高州市)、TYC1101(2011 年分离自广东省阳春市)、THZ1301(2013 年分离自广东省惠州市惠东区)、GZN1501(2015 年分离自广东省广州市)、TLC1601(2016 年分离自广东省龙川县)均从宿主罗非鱼分离获得, 海豚链球菌(*S. iniae*)、美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)均由实验室分离、鉴定并保存。

### 1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中无乳链球菌 3 个特异性 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因序列, 通过 Primer Premier 6.0 软件设计相应的引物对(表 1), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.3 DNA 模板的制备

各实验菌株的 DNA 提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明, 并保存于-20℃备用。罗非鱼组织中细菌 DNA 提取步骤, 参照 Su 等(2016)的方法。首先取鱼组织约 50 mg, 放入组织匀浆器中研磨, 加入 1000 μl TE 缓冲液, 制成组织匀浆液。取上述匀浆液 180 μl, 加入 20 μl 浓度为 50 mg/ml 的溶菌酶, 30℃孵育 10 min, 后续步骤均参照细菌 DNA 提取试剂盒进行。即得到高纯度的鱼(鱼包括体内细菌)基因组 DNA, 保存于-20℃备用。

表 1 3 对引物的信息

Tab.1 The information of the three pairs of primers

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'~3')	扩增片段 Amplified fragment (bp)	扩增基因 Gene
<i>hylB</i> -F	CGCGACTTTGGCTTTCTGAG	790	<i>hylB</i>
<i>hylB</i> -R	TAATTGAGCGAGGGACACCG		
<i>ponA</i> -F	AGCTATCCCTGGTGTTCAC	598	<i>ponA</i>
<i>ponA</i> -R	ACCGTTAGGTACTGTATTGTTGT		
<i>cfb</i> -F	TGGGATTTGGGATAACTAAGC	348	<i>cfb</i>
<i>cfb</i> -R	TTTGAAGTGCTGCTTGTAAATG		

## 1.4 反应条件的优化与建立

单一引物扩增采用 25  $\mu\text{l}$  反应体系: 2 $\times$ PCR DsMix 12.5  $\mu\text{l}$ , 引物 F(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ , 引物 R(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{l}$ 。利用 3 对引物进行 PCR 扩增, 反应体系组成: 2 $\times$ PCR DsMix 12.5  $\mu\text{l}$ , 各引物上、下游(10  $\mu\text{mol/L}$ )分别为 0.2~1.0  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{l}$ 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。然后取 5  $\mu\text{l}$  扩增产物, 在恒压 120 V 条件下, 1%的琼脂糖凝胶电泳 25 min 检测结果。其中, 无菌超纯水代替 DNA 模板的扩增结果为阴性对照。根据扩增结果, 选择最佳的引物比例和退火温度。同时, 将三重 PCR 方法所扩增的特异性片段送北京六合华大基因科技有限公司(广州)进行测序验证。

## 1.5 特异性实验

分别以鱼源无乳链球菌标准株(ATCC51487)、人源无乳链球菌标准株(ATCC BAA-1138)、6 株罗非鱼无乳链球菌(TZQ0901、TGZ1001、TYC1101、THZ1301、GZN1501 和 TLC1601)、海豚链球菌、美人鱼发光杆菌杀鱼亚种、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、创伤弧菌和迟缓爱德华菌的基因组 DNA 为模板, 根据优化后的多重 PCR 反应条件和体系进行 PCR 扩增。

## 1.6 敏感性实验

测定提取的鱼源无乳链球菌标准株(ATCC51487)基因组 DNA 浓度, 将样品浓度按照  $5^0$ 、 $5^{-1}$ 、 $5^{-2}$ 、 $5^{-3}$ 、 $5^{-4}$ 、 $5^{-5}$ 、 $5^{-6}$  和  $5^{-7}$  进行梯度稀释后分别为模板 DNA, 采用优化的多重 PCR 反应体系和条件进行 PCR 扩增, 确定三重 PCR 检测方法所需模板的最低浓度。

## 1.7 应用

利用构建好的三重 PCR 方法, 检测来自广东省廉江市、高州市、吴川市、开平市、惠城区和龙川县 6 个不同罗非鱼养殖区 188 个罗非鱼组织样品。同时, 利用常规细菌分离鉴定法对每份组织样品进行检测, 比较这 2 种检测方法的结果。

## 1.8 无乳链球菌三重 PCR 检测方法的评价

根据世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疾病诊断手册》(2016)所规定的原则, 在 95%以上的置信区间、允许误差 5%范围内对 188 个罗非鱼组织样品进行检测, 以常规细菌分离鉴定法为标准计算此三重 PCR 检测方法的诊断敏感性(Dse)和诊断特异性(Dsp)。

## 2 结果

### 2.1 三重 PCR 反应体系的优化

分别对各引物加入体系的体积和退火温度进行优化, 优化后的最佳退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$ , 反应体系优化结果见表 2。利用优化后的反应体系和反应条件进行无乳链球菌检测, 出现 3 条特异性条带; 使用单一引物分别扩增 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因, 均出现 1 条特异性条带, 条带位置与预期结果一致(图 1)。此外, 对送测序的特异性条带序列进行 BLAST 比对, 与无乳链球菌 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因的同源性均达到或超过 99%, 表明构建的三重 PCR 所扩增的特异性条带是准确的。

表 2 三重 PCR 反应体系试剂组成  
Tab.2 The content of the reagent in the reaction system of a triple PCR

成份 Ingredients	体积 Volume ( $\mu\text{l}$ )
2 $\times$ PCR DsMix	12.5
<i>hylB</i> -F(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.5
<i>hylB</i> -R(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.5
<i>ponA</i> -F(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.6
<i>ponA</i> -R(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.6
<i>cfb</i> -F(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.5
<i>cfb</i> -R(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.5
DNA 模板	1.0
ddH <sub>2</sub> O	8.3
共计 Total	25.0

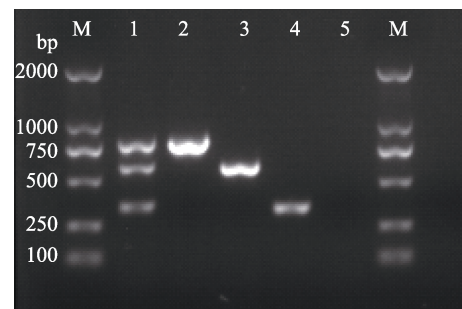


图 1 3 对引物和单一引物 PCR 扩增结果

Fig.1 The amplification of the single primer and three pairs of primers

M: DL2000 bp marker; 1: 三重 PCR 的结果; 2~4 分别表示 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因的扩增片段; 5: 阴性  
M: DL2000 bp marker; Lane 1: the result of three pairs of primers; Lanes 2~4: Amplified fragments of *hylB*, *ponA*, and *cfb*; Lane 5: Negative control

### 2.2 特异性检测

特异性实验结果显示, 鱼源无乳链球菌(ATCC51487)、人源无乳链球菌(ATCC BAA-1138)以

及不同年份和地区的无乳链球菌分离株扩增结果一致, 均扩增出 3 条目的条带。而以罗非鱼、美人鱼发光杆菌杀鱼亚种、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、迟缓

爱德华氏菌、海豚链球菌、创伤弧菌的基因组 DNA 为模板均未扩增出任何条带, 与阴性对照结果相一致 (图 2)。

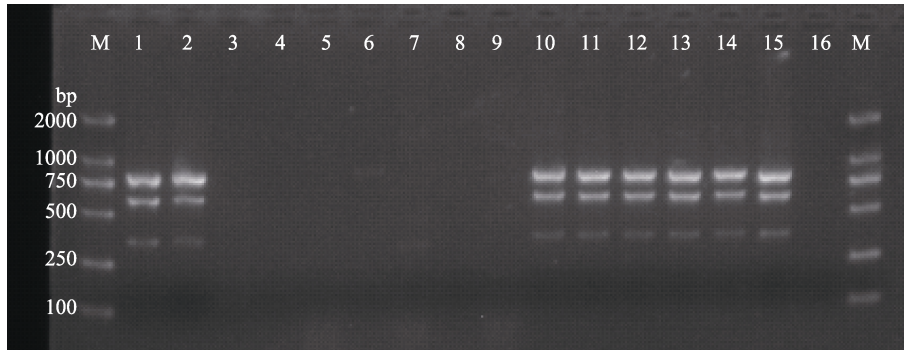


图 2 三重 PCR 特异性检测结果

Fig.2 The specificity result of triple PCR assay

M: DL2000 bp marker; 1: 鱼源无乳链球菌(ATCC51487); 2: 人源无乳链球菌(ATCC BAA-1138); 3: 罗非鱼基因组; 4: 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种; 5: 粪肠球菌; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 迟缓爱德华氏菌; 8: 海豚链球菌; 9: 创伤弧菌; 10~15: 扩增使用的模板为 TZQ0901、TGZ1001、TYC1101、THZ1301、GZN1501 和 TLC1601; 16: 阴性对照

M: DL2000 bp marker; Lane 1: *S. agalactiae* ATCC51487; Lane 2: *S. agalactiae* ATCC BAA-1138;

Lane 3: *Tilapia* genomic DNA; Lane 4: *P. damsela* subsp. *piscicida*; Lane 5: *E. faecalis*; Lane 6: *S. aureus*;

Lane 7: *E. tarda*; Lane 8: *S. iniae*; Lane 9: *V. vulnificus*; Lanes 10~15: TZQ0901, TGZ1001, TYC1101, THZ1301, GZN1501, and TLC1601 of *S. agalactiae*; Lane 16: Negative control

### 2.3 灵敏性检测

以无乳链球菌基因组 DNA 浓度分别为 5.65、1.13、 $2.26 \times 10^{-1}$ 、 $4.52 \times 10^{-2}$ 、 $9.04 \times 10^{-3}$ 、 $1.81 \times 10^{-3}$ 、 $3.62 \times 10^{-4}$  和  $7.24 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l 为模板进行 PCR 扩增, 结果显示, 三重 PCR 能检测到的无乳链球菌基因组 DNA 最低浓度为  $1.81 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ l (图 3)。

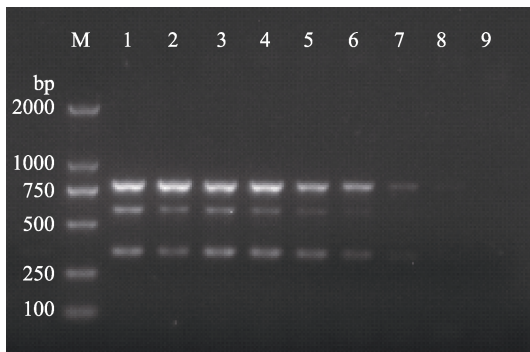


图 3 三重 PCR 敏感性检测结果

Fig.3 The sensitivity result of the triple PCR assay

M: DL2000 bp marker; 1~8: 无乳链球菌模板浓度分别为 5.65、1.13、 $2.26 \times 10^{-1}$ 、 $4.52 \times 10^{-2}$ 、 $9.04 \times 10^{-3}$ 、 $1.81 \times 10^{-3}$ 、 $3.62 \times 10^{-4}$  和  $7.24 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l; 9: 阴性对照

M: DL2000 bp marker; Lanes 1~8: Template concentration of *S. agalactiae* as 5.65, 1.13,  $2.26 \times 10^{-1}$ ,  $4.52 \times 10^{-2}$ ,  $9.04 \times 10^{-3}$ ,  $1.81 \times 10^{-3}$ ,  $3.62 \times 10^{-4}$ , and  $7.24 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l; Lane 9: Negative control

### 2.4 三重 PCR 检测方法的应用

采自廉江、龙川、高州、吴川、开平和惠东的罗非鱼样品阳性检出率分别为 100%(4/4)、100%(8/8)、57.14%(4/7)、50%(2/4)、1.23%(2/159)和 0(0/6); 总体来看, 188 尾罗非鱼组织样品的阳性检出率为 10.6%(20/188), 均与常规细菌分离鉴定结果相一致(表 3)。

### 2.5 三重 PCR 检测方法的评价结果

以常规细菌分离鉴定方法为标准, 根据 Dse 和 Dsp 计算公式得出本研究所建立的三重 PCR 检测方法的 Dse 和 Dsp 均为 100%(表 4)。

## 3 讨论

罗非鱼是我国主要的水产品养殖和出口品种之一, 近几年, 由于罗非鱼产品不合格(农兽药残留、品质不合格、微生物污染、食品添加剂超标等), 出口严重受阻(赵海军等, 2015)。其中, 由无乳链球菌带来的病害给罗非鱼养殖产业带来的损失最为严重。水产品中微生物的检测方法主要有生化培养法、免疫学法和核酸检测法等(应晓国等, 2017), 王远微等(2008)利用三重 PCR 对临床疑似样本的检出率为 81.8%, 对人工攻毒样本的检出率为 87.5%, 两组数据均高于用细菌分离的检出率(40.9%和 67.5%), 说



表 3 组织样品检测结果  
Tab.3 The detection result of the tissue samples

诊断方法 Method	阳性检出数/样本总数 Positive samples/total samples					
	廉江市 Lianjiang	高州市 Gaozhou	吴川市 Wuchuan	开平市 Kaiping	惠城区 Huicheng	龙川县 Longchuan
常规细菌分离鉴定 Conventional method	4/4	4/7	2/4	2/159	0/6	8/8
三重 PCR 检测方法 Triple PCR assay	4/4	4/7	2/4	2/159	0/6	8/8

表 4 两种不同的方法对组织样品的检测  
Tab.4 Two different methods for detection of the tissue samples

项目 Items	罗非鱼组织样品 Tilapia tissue samples	
常规细菌分离鉴定 Conventional method	阳性 P(20)	阴性 N(168)
三重 PCR 检测方法 Triple PCR assay	真阳性 TP(20)	假阳性 FP(0)
	假阴性 FN(0)	真阴性 TN(168)
计算公式 Calculation	$Dse=TP/(TP+FN)\times 100\%=100\%$	$Dsp=TN/(TN+FP)\times 100\%=100\%$

明多重 PCR 可避免单个毒力基因进行检测时漏检情况的发生,同时也暗示多重 PCR 比细菌分离技术更灵敏。

基于 PCR 技术的无乳链球菌检测方法大多选取靶标基因为 16S~23S rRNA 间区序列、sip 和荚膜多糖类编码基因等(王均等, 2011; Forsman *et al.*, 1997)。无乳链球菌普遍存在 20 多种毒力基因(Lin *et al.*, 2011), 透明质酸酶(Hyl)是无乳链球菌重要的毒力因子, 有助于链球菌在巨噬细胞内存活并影响巨噬细胞促炎性因子的表达, 在无乳链球菌致病过程中起关键作用(Wang *et al.*, 2014)。青霉素结合蛋白(PBP1a)在 GBS 抗吞噬清除中起重要作用(Hamilton *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2000), 蔡朝阳等(2006)发现青霉素结合蛋白的改变与金黄色葡萄球菌对甲氧西林等  $\beta$ -内酰胺类抗生素以及万古霉素等糖肽类抗生素耐药有密切关系, 影响药物作用的靶位, 阻止抗生素的杀菌作用。CAMP 因子认为是具有成孔性质的分泌蛋白, 在 GBS 致病过程中发挥重要作用(Udo *et al.*, 2013)。通过基因组的数据检索确认, 不同来源的(包括人及其他动物源)无乳链球菌均包含上述 3 种毒力基因, 说明它们在病原体的侵入、繁殖与扩散及抵抗机体防御中起关键作用(Casadevall *et al.*, 2001), 因此, 选择 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 毒力基因设计引物检测罗非鱼无乳链球菌十分必要。

多重 PCR 方法具有特异性好、灵敏度高的优点, 被广泛应用于水产病原的检测。曾伟伟等(2013)针对草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)各类型毒株的保守序列, 建立了 GCRV 的三重 PCR 检测方法; 危芙蓉等(2010)根据广州管圆线虫核糖体小亚基 *rDNA* 基因序列设计特异性引物, 并与小管福寿螺 16S

*rDNA* 的特异性引物组合, 建立了检测小管福寿螺体内广州管圆线虫的多重 PCR 方法; 李晨等(2010)根据水产上常见病原菌鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)的毒力相关基因, 建立了同时检测 3 种菌的单管多重 PCR 方法。本研究中, 用单一引物分别扩增 *hylB*、*ponA* 和 *cfb* 基因, 可获得特异性扩增条带, 将上述 3 对引物组合并优化出多重 PCR 条件和体系, 可同时扩增出 3 条特异性条带。Su 等(2016)研究发现, 以无乳链球菌的一些毒力基因(如 *sip* 和 *cpsE*)为靶标设计引物进行 PCR 扩增, 存在跟其他病原菌基因组 DNA 交叉反应的现象, 而本研究中未能在其他水产动物病原菌基因组中扩增出条带, 表明所建立的三重 PCR 检测方法特异性强。灵敏度测试发现, 本研究所构建的方法可检测到浓度为  $1.81\times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ l 的细菌基因组 DNA, 比黄锦炉等(2012)构建的三重 PCR 检测方法灵敏度提高了近 200 倍。运用本研究构建的三重 PCR 方法检测广东省各地区罗非鱼组织样品的阳性检出率为 10.6%(20/188), 与细菌分离鉴定的结果吻合, 说明三重 PCR 在罗非鱼样品检测过程中具有广阔的应用前景。该三重 PCR 检测方法准确性高、特异性强、灵敏度高, 为罗非鱼无乳链球菌病的诊断、大规模检疫、流行病学调查等提供了一种快速、准确而有效的方法。

## 参 考 文 献

- Bi YN, Song Y, Ma SQ, *et al.* Progress in the application of multiplex PCR in detection of pathogenic microorganisms. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(12): 1476-1478  
[毕艳妮, 宋宇, 马淑青, 等. 多重 PCR 技术在病原微生

- 物检测中的应用进展. 中国微生态学杂志, 2014, 26(12): 1476–1478]
- Cai ZY. Relationship between penicillin binding protein and drug resistance of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(4): 361–363 [蔡朝阳. 青霉素结合蛋白与金黄色葡萄球菌耐药性关系研究. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 361–363]
- Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. Journal of Infectious Diseases, 2001, 184(3): 337–344
- Cheng SL, Liu XF, Zheng W, *et al.* *Streptococcus agalactiae* infection in fish. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(2): 105–109 [程世亮, 刘新风, 郑文, 等. 鱼类无乳链球菌病. 动物医学进展, 2016, 37(2): 105–109]
- Evans JJ, Klesius PH, Bohnsack JF, *et al.* Genomic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates from multiple hosts and their infectivity in Nile tilapia. International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2008(8): 109
- Forsman P, Tilsala-Timisjärvi A, Alatosava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. Microbiology, 1997, 143(11): 3491–3500
- Gan WJ, Hu XC. LAMP and its use in gene diagnosis of pathogens. Journal of Pathogen Biology, 2010, 5(2): 143–145 [甘文佳, 胡旭初. LAMP 技术及其在病原基因诊断中的应用. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(2): 143–145]
- Hamilton A, Popham DL, Carl DJ, *et al.* Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of group B streptococcus to antimicrobial peptides. Infection & Immunity, 2006, 74(11): 6179–6187
- Huang JL, Wang KY, Xiao D, *et al.* The development and application of a triplex PCR method for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 254–261 [黄锦炉, 汪开毓, 肖丹, 等. 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)三重 PCR 快速检测方法的建立与应用. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 254–261]
- Jones AL, Knoll KM, Rubens CE, *et al.* Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis. Molecular Microbiology, 2000, 37(6): 1444–1455
- Kayansamruaj P, Pirarat N, Kondo H, *et al.* Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains. Infection Genetics & Evolution Journal of Molecular Epidemiology & Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2015, 36: 307–314
- Li C, Wang XH, Huang J. Multiplex PCR for the detection of three main aquatic pathogens. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(3): 100–106 [李晨, 王秀华, 黄捷. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 100–106]
- Lin FP, Lan R, Sintchenko V, *et al.* Computational bacterial genome-wide analysis of phylogenetic profiles reveals potential virulence genes of *Streptococcus agalactiae*. PLoS One, 2011, 6(4): e17964
- Liu F, Zhang BC, Zhang XH, *et al.* Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six viruses in shrimp. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 60–67 [刘飞, 张宝存, 张晓华, 等. 对虾 6 种病毒多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 60–67]
- Lu MX, Li J, Ye X, *et al.* Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces. Microbiology, 2010, 37(5): 766–774 [卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766–774]
- Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Mairey B, *et al.* Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage. BMC Genomics, 2013, 14(1): 252
- Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: Shifting paradigms. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(3): 497–513
- Soto E, Wang R, Wiles J, *et al.* Characterization of isolates of from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf Coast, Latin America, and Thailand. Journal of Aquatic Animal Health, 2015, 27(2): 123–134
- Su YL, Feng J, Li YW, *et al.* Development of a quantitative PCR assay for monitoring *Streptococcus agalactiae*, colonization and tissue tropism in experimentally infected tilapia. Journal of Fish Diseases, 2016, 39: 229–238
- Udo EE, Boswihi SS, Alswaih N. Genotypes and virulence genes in group B streptococcus isolated in the maternity hospital, Kuwait. Medical Principles and Practice, 2013, 22(5): 453–457
- Wang J, Wang KY, Xiao D, *et al.* Development of double PCR for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(5): 496–502 [王均, 汪开毓, 肖丹, 等. 罗非鱼源无乳链球菌双重 PCR 快速检测方法的建立. 中国兽医科学, 2011, 41(5): 496–502]
- Wang YW, Tang C, Yu XH, *et al.* Detecting pathogenic *Aeromonas hydrophila* in fish by triplex PCR. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(7): 947–951 [王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌. 微生物学报, 2008, 48(7): 947–951]
- Wang Z, Guo C, Xu Y, *et al.* Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. Infection & Immunity, 2014, 82(6): 2615–2625
- Wei FR, Liu HX, Lv S, *et al.* Multiplex PCR assay for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Pomacea canaliculata*. China Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2010, 28(5): 355–358 [危芙蓉, 刘和香, 吕山, 等. 用多重 PCR 技术检测小管福寿螺体内广州管圆线虫幼虫. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(5): 355–358]
- Wu J, Liu Y, Hu S, *et al.* Development of a rapid PCR test for identification of *Streptococcus agalactiae* in milk samples collected on filter paper disks. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2008, 21(1): 124–130
- Ying XG, Yuan N, Deng SG, *et al.* Research progress on

detection techniques of aquatic products. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(4): 1196–1202 [应晓国, 袁宁, 邓尚贵, 等. 水产品质量安全检测技术研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2017(4): 1196–1202]

Zeng WW, Wang Q, Wang YY, *et al.* Establishment of multiplex PCR for detection of grass carp reovirus and its application. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 419–426 [曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 419–426]

Zhang XY, Fan HP, Zhong QF, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 772–779 [张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究. *水产学报*, 2008, 32(5): 772–779]

Zhao HJ, Yang BB, Hao Y, *et al.* The actualities and countermeasures of export tilapia in China. *Journal of Food Safety and Quality*, 2015, 6(12): 5100–5106 [赵海军, 杨彬彬, 郝跃, 等. 我国罗非鱼出口现状及对策. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(12): 5100–5106]

(编辑 冯小花)

## The Application and Detection of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Tilapia with a Triple PCR Based on Virulence Genes

LIU Chan<sup>1,2</sup>, FENG Juan<sup>2</sup>, XIE Yundan<sup>1,2</sup>, HU Wantao<sup>3</sup>, WANG Jiangyong<sup>2</sup>, SU Youlu<sup>2①</sup>

(1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384;

2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;

3. School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006)

**Abstract** *Streptococcus agalactiae* has become one of the most important emerging pathogens with strong infectivity and virulence, causing high mortalities and large economic losses in tilapia farming industries in China. There are no obvious symptoms in some tilapia infected by *S. agalactiae*, so it can be difficult to determine if a fish carried the pathogen. Thus, it was necessary to establish an effective method for detection of *S. agalactiae* in the breeding process of tilapia. Three pairs of specific primers were designed based on the conserved sequence of *hylB*, *ponA*, and *cfb* genes encoding hyaluronidase, penicillin binding protein, and CAMP factor of *S. agalactiae* published in GenBank, respectively. After the optimization of the reaction conditions and reaction system of multiplex PCR, the triple PCR method based on the three virulence genes was developed for detection of *S. agalactiae* isolated from tilapia. Furthermore, the established method was applied to detect tissue samples of tilapia collected from different farming areas in Guangdong Province. The detection result of *S. agalactiae* only amplified three specific bands, however there were no bands in the host and the other common bacterial pathogen strains in aquaculture, which indicated that the method had good specificity. The dynamic range of template concentration of *S. agalactiae* was  $7.24 \times 10^{-5}$ – $5.65$  ng/ $\mu$ l. Sensitivity tests showed that the detection limit of the *S. agalactiae* in genomic DNA was  $1.81 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ l, with a higher sensitivity. The positive rate for detection of 188 tissue samples isolated from tilapia using the triple PCR method was consistent with the positive rate by the conventional bacterial identification method. The triple PCR method was evaluated with the conventional method as the standard; diagnostic sensitivity (Dse) and diagnostic specificity (Dsp) were 100%. In summary, the results showed that the triple PCR method not only improved the accuracy and sensitivity of the detection, but also detected three virulence genes of *S. agalactiae* in the same reaction system. Therefore, this method provided a rapid, accurate, and efficient detection technology for monitoring *S. agalactiae* infection in harmless aquatic products and early warning of aquaculture diseases.

**Key words** Tilapia; *Streptococcus agalactiae*; Virulence gene; Triple PCR

① Corresponding author: SU Youlu, E-mail: suyoulu@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170906001

http://www.yykxjz.cn/

丁山, 李淑芳, 李杰, 唐磊, 王晓冉, 莫照兰, 李杰, 陈娟. 鳗弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 137-142

Ding S, Li SF, Li J, Tang L, Wang XR, Mo ZL, Li J, Chen J. Long-term protection effect of *Vibrio anguillarum* trivalent inactivated vaccine. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 137-142

## 鳗弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果\*

丁 山<sup>1,2</sup> 李淑芳<sup>1,2</sup> 李 杰<sup>2,3</sup> 唐 磊<sup>4</sup> 王晓冉<sup>4</sup>  
莫照兰<sup>2,3①</sup> 李 杰<sup>5</sup> 陈 娟<sup>5</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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术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. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266100;  
5. 山东东方海洋科技股份有限公司 烟台 264003)

**摘要** 鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)是一种能感染多种鱼类的条件致病菌,引起高致死率出血性败血病,流行于我国海水养殖环境,造成极大的经济损失。为此,本研究以鳗弧菌 O1、O2 和 O3 血清型菌株为抗原,制备了鳗弧菌三价灭活疫苗,以腹腔注射途径对健康大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (80.2±4.7) g 进行一次免疫,在一次免疫后 60 d 以同等剂量和途径进行二次免疫。对一免组进行 150 d 的观测,结果显示,大菱鲆血清的 3 种抗原的特异抗体水平在免疫后 14 d 显著升高 ( $P<0.05$ ),免疫后 28 d 达到最大值 1:320,免疫后 28~150 d 稳定在 1:106.7~1:320,在免疫后 14~150 d 血清抗体效价均显著高于对照组 ( $P<0.05$ ); 相对免疫保护率(RPS)的检测结果显示,免疫后 7 d 大菱鲆抵抗鳗弧菌 3 种血清型病原感染的 RPS 分别为 43.8%、38.9%和 16.7%,免疫后 28 d RPS 均达最大值 100%,免疫后 28~120 d 的 RPS 值保持在 70%~100%,免疫后 150 d 的 RPS 值为 35%~100%。对二免大菱鲆观测了 90 d,二免后 3~60 d 的大菱鲆血清抗体水平显著高于同期一免的大菱鲆 ( $P<0.05$ ),二免后 60~90 d 抗体水平下降,与同期一免鱼无显著差异 ( $P>0.05$ ); 二免大菱鲆的 RPS 值均高于 70%,高于同期一免大菱鲆。上述结果显示,以鳗弧菌三价灭活疫苗一次免疫大菱鲆,抗体持续期不少于 150 d,有效免疫保护期(RPS>70%)不少于 120 d; 二次免疫大菱鲆,抗体持续期和有效免疫保护期(RPS>70%)均不少于 150 d。空白组最终体重略高于免疫组,但 2 组的特定生长率(SGR)无明显差异,说明三价疫苗对大菱鲆生长没有影响。

**关键词** 鳗弧菌疫苗; 抗体效价; RPS; 抗体持续期; 免疫保护期

中图分类号 S942.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0137-06

鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)是一种分布广泛的条  
件致病菌,能感染多种经济鱼类,引起宿主出血性败

血症,严重时可导致宿主死亡,造成水产业巨大经济  
损失。自首例鳗弧菌商品疫苗——抗弧菌引起的红嘴

\* 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(2016HY-ZD0505)和青岛海洋科学与技术国家实  
验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution  
Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Science (2016HY-ZD0505), and Aoshan S&T Innovation Project from  
Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 丁 山, E-mail: 13122410021@163.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-09-06, 收修改稿日期: 2017-10-10

病疫苗问世以来,许多学者投入到鳗弧菌疫苗免疫的研发中,目前,鳗弧菌疫苗已成功用于养殖鱼类的鳗弧菌病防治,如针对大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鳕鱼(*Gadus morhua*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、鲷鱼(*Sparus aurata*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的商品化鳗弧菌疫苗已经在挪威、西班牙、日本、韩国及欧洲等国家和地区得到广泛应用(Plant *et al.*, 2011)。我国不少学者也相继开展了鳗弧菌疫苗的研究,在实验室阶段评价了灭活菌苗(朱开玲等, 2004; 张振冬等, 2007; 潘燕华等, 2009; Zhang *et al.*, 2012)、口服疫苗(肖鹏等, 2007)、减毒疫苗(Zhang *et al.*, 2012)、DNA疫苗(Hui *et al.*, 2009)、亚单位疫苗(Xing *et al.*, 2017)、疫苗佐剂(Liu *et al.*, 2015)的免疫保护效果。其中,灭活疫苗因成本低廉,且能有效对抗胞外细菌侵袭,被认为是水产行业最理想的疫苗(Sommerset *et al.*, 2005)。

鳗弧菌血清型十分复杂,在已知的23种血清型中(Grisez *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1999), O1、O2以及部分O3血清型为致病血清型(Pedersen *et al.*, 1999),从流行病学调查结果来看,O1、O2和O3血清型鳗弧菌均在我国海水鱼养殖环境中流行(赵鲁宁等, 2011)。然而,目前国内鳗弧菌疫苗的研究均为以单个血清型为抗原的单价疫苗,而且很少进入中试临床研究阶段。为填补这一空白,本研究以鳗弧菌O1、O2和O3血清型菌株为疫苗株,制备了三价疫苗,免疫大菱鲆后监测该疫苗的抗体持续期和免疫保护期,旨在获取鳗弧菌三价疫苗的免疫效力数据,推动鳗弧菌三价疫苗的临床中试研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株、培养基和培养条件

鳗弧菌 VAM003(O1血清型)、VAM007(O2血清型)和 M2016261(O3血清型)分离自患病海水养殖鱼,由中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室保藏,复壮后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。实验所用液体培养基为胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)或含有3%葡萄糖的TSB,固体培养基为胰蛋白胨大豆肉汤平板(TSA, TSB+1.5%琼脂)。培养温度为 $28^{\circ}\text{C}$ ,转速为150 r/min。

### 1.2 实验用鱼

实验大菱鲆购自山东省烟台市东方海洋科技有限公司,体重为 $(80.2\pm 4.7)$  g,体长为 $(12.0\pm 0.34)$  cm。实验鱼暂养于 $7\text{ m}\times 7\text{ m}\times 1\text{ m}$ 水泥池中,每天早、中、晚各投喂1次,按鱼体重的1.2%~1.5%进行投喂,每

次投喂后均换水1次,每次换水量约为池水总体积的2/3,养殖水温为 $14\sim 16^{\circ}\text{C}$ 。实验前,随机取3~5尾鱼进行细菌分离,确定从鱼的肝、脾、肾中均无细菌检出后,暂养鱼方可用于后续实验。

### 1.3 疫苗制备

将3株菌(VAM003、VAM007和M2016261)从 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱接出,在TSA平板上活化, $28^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。挑取3~5个单菌落接种到5 ml TSB试管,在 $28^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min摇床培养过夜得到种子液,再将种子液按1%接种量转接到200 ml TSB(含3%葡萄糖), $28^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min摇床培养。取24 h培养产物,向培养产物中加入37%福尔马林溶液至甲醛终浓度为0.2%(V/V),在 $28^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min条件下灭活。取灭活12 h和24 h时的菌液分别种到TSA平板和TSB试管,均无活菌检出后,确定完全灭活。将灭活完全的菌液6000 r/min、 $4^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,收集菌体,用PBS缓冲液(0.2 mol/L, pH=7.6)洗涤2遍,再用含有0.1%甲醛的PBS缓冲液悬浮菌体,将3种菌悬液调整到相同 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ ,按1:1:1比例混合制备 $10^9$  cells/ml的三价灭活,在 $4^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

### 1.4 疫苗免疫大菱鲆

实验于2016年5月~2016年10月在山东东方海洋科技股份有限公司进行,共计150 d。将暂养大菱鲆分为2组(免疫组和对照组),每组2500尾。免疫组用连续注射器(德国汉克萨斯)将浓度为 $10^9$  cells/ml的三价疫苗腹腔注射大菱鲆,注射量为0.1 ml/尾,即免疫剂量为 $10^8$  cells/尾;对照组注射等量的灭菌PBS。在一次免疫后60 d,以同等剂量对疫苗免疫的大菱鲆进行二次免疫,二免鱼尾鳍打上橘色标签后与一免鱼混养。

### 1.5 血清抗体效价检测

在首次免疫后3、7、14、21、28、44、56、63、70、77、90、120、150 d,免疫组和空白组分别随机取5尾鱼,从尾静脉取血;二次免疫后3、7、14、21、28、44、60、90 d,从二免组中随机取5尾鱼,从尾静脉取血。所得血液析出血清后,将各尾鱼的血清等体积混合,分装后于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。分别以VAM003、VAM007和M2016261灭活细胞( $10^8$  cells/ml)为抗原,用微量凝集法(Nguyen *et al.*, 2017)检测血清抗体效价。具体方法步骤为:将血清按 $2^n$ 梯度稀释,将各组稀释好的血清按稀释倍数由低到高逐孔加入96孔板中,每孔50  $\mu\text{l}$ ,每个血清样品设置3个重复。将抗原等体积逐孔加入96孔板并吹打混匀,放入 $28^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育4 h后,转入 $4^{\circ}\text{C}$ 静置15 h,用倒置显微

镜观察凝集情况。以能观察到凝集反应的最大血清稀释倍数为血清抗体效价, 效价值以  $\log_2 N$  ( $N$  为最大稀释倍数) 表示。

### 1.6 相对免疫保护率检测

在免疫后 7、14、28、60、90、120 及 150 d, 二免后 30、60 和 90 d, 从各免疫组和 PBS 对照组大菱鲆取鱼, 20 尾/组, 用 VAM003、VAM007 和 M2016261 活菌进行攻毒。攻毒前取对照组鱼评估各菌株的  $LD_{50}$  (50% lethal dose, 半数致死量), 以 10 倍  $LD_{50}$  作为攻毒浓度, 确定 7~90 d 的攻毒浓度为  $10^7$  CFU/ml, 120~150 d 的攻毒浓度为  $10^8$  CFU/ml。攻毒时, 从鱼的背部肌肉注射 0.1 ml/尾。攻毒后观察鱼发病症状, 待死亡情况稳定后(即攻毒后 14 d)统计累计死亡数, 按照如下公式计算疫苗的相对免疫保护率(Relative percent survival, RPS):

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

(Amend, 1981)。

### 1.7 实验鱼体重检测

分别于首次免疫后 0、67、83、126、150 d, 从免疫组和对照组随机取鱼 30 尾检测实验鱼体重, 并计算其特定生长率(SGR):

$$SGR = (\ln W_f - \ln W_i) / t \times 100\%$$

式中,  $W_f$ 、 $W_i$  和  $t$  分别为终末体重(g)、初始体重(g)和养殖天数(d)。

### 1.8 数据处理

血清抗体效价表示为平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD), 用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 检验标准采用 Duncan 法, 以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 血清特异性抗体效价

以剂量为  $10^8$  cells/尾的三价菌苗一次注射免疫大菱鲆后, 在不同的时间取免疫组鱼和对照组的血清, 检测 VAM003、VAM007 和 M2016261 的抗体效价。如图 1 所示, 在整个实验期间对照组的抗体效价在 1:2.0~1:5.1 波动, 而免疫鱼的血清抗体效价呈现先快速升高后保持相对稳定的趋势。免疫后 14 d 即可检测到 3 种抗体水平在 1:66.7~1:80, 显著高于对照组(1:2.0~1:2.9) ( $P < 0.05$ ), 3 种抗体水平在免疫后 28 d 均上升到最高水平 1:320.0 ( $P < 0.05$ ), 在 28~150 d 稳定保持在较高水平, 为 1:106.7~1:

320.0, 显著高于同时期对照组的抗体水平(1:3.0~1:5.1) ( $P < 0.05$ )。结果表明, 以剂量为  $10^8$  cells/尾的鳎弧菌三价菌苗一次注射免疫大菱鲆, 3 种抗体的持续期超过 150 d。

二次免疫后 60 d 内, 与同期一免鱼相比, 二免鱼 3 种抗体水平均显著提高 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。在二免后 3 d 可检测到二免组抗体水平快速上升, 3 种抗体水平分别为 1:160.0 (VAM003)、1:213.3 (VAM007) 和 1:320.0 (M2016261), 均不低于同期一免鱼(63 d)的抗体水平, 1:160.0 (VAM003)、1:160.0 (VAM007) 和 1:177.7 (M2016261); 在二免后 14 d, 3 种抗体水平分别为 1:320.0 (VAM003)、1:640.0 (VAM007) 和 1:640.0 (M2016261), 显著高于同时期一免鱼(70 d)的抗体水平, 1:133.3 (VAM003)、1:151.1 (VAM007) 和 1:284.4 (M2016261), 并且二免后 14~60 d, M2016261 的抗体效价保持在最高水平; 二免后 90 d, 3 种抗体水平分别下降至 1:213.3 (VAM003)、1:68.9 (VAM007) 和 1:151.1 (M2016261), 与同期一免鱼(150 d)的抗体水平无显著差异 ( $P > 0.05$ )。上述结果表明, 二次免疫能够显著提高三价疫苗的抗体水平。

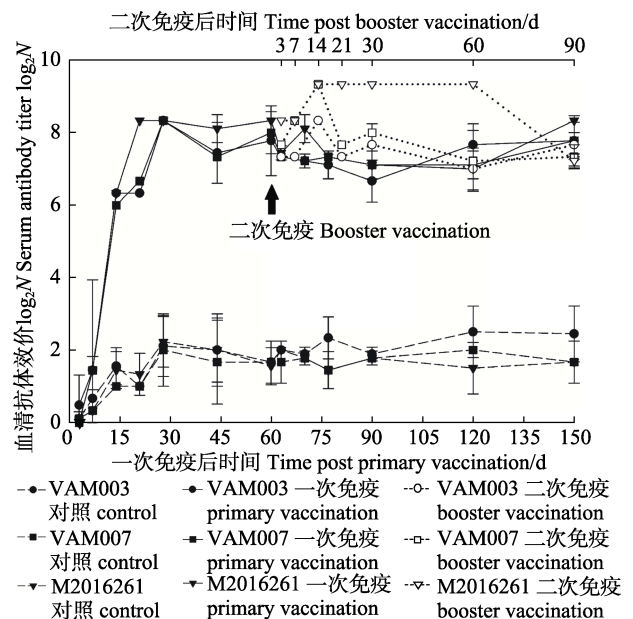


图 1 鳎弧菌三价疫苗免疫大菱鲆后的血清抗体效价  
Fig.1 The serum antibody titer of turbot immunized with *V. anguillarum* trivalent vaccine

### 2.1 相对免疫保护率

在一次免疫后的不同时间, 用 VAM003、VAM007 和 M2016261 分别对免疫大菱鲆进行攻毒, 评估三价疫苗的免疫保护率。如图 2 所示, 大菱鲆免疫后 7 d 获得 RPS 分别为 43.8% (VAM003)、38.9% (VAM007)、

16.7%(M2016261); 在一免后 14~120 d, 针对 3 种病原的攻毒, 免疫大菱鲂的 RPS 为 70%~100%; 一免后 150 d, 免疫鱼获得的 RPS 分别为 35%(VAM003)、65%(VAM007)和 100%(M2016261)。

在二免后 30、60 和 90 d 进行疫苗 RPS 的检测。与同期的一免大菱鲂相比, 二免大菱鲂的 RPS 均有所提高; 特别是, 二免后 90 d 的大菱鲂获得的 RPS 为 75%(VAM003)、90%(VAM007)、100%(M2016261), 高于同期一免后 150 d 的大菱鲂。结果表明, 加强免疫后, 大菱鲂获得的 RPS 提高。若以 RPS>70%为有效免疫保护期, 则一免大菱鲂的有效免疫保护期为 14~120 d, 加强免疫后有效免疫保护期超过 150 d, 加强免疫后免疫保护期明显延长。

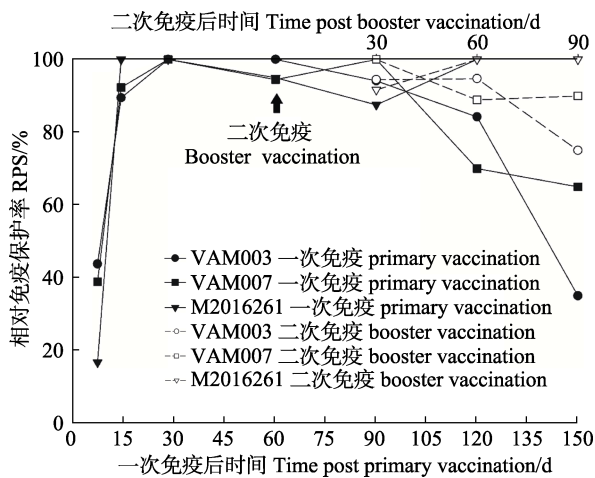


图2 鳗弧菌三价疫苗免疫大菱鲂后的免疫保护率  
Fig.2 The RPS of of turbot after immunization with *V. anguillarum* trivalent vaccine

## 2.2 免疫过程中鱼体长和体重的变化

实验过程中, 不定期从免疫组和对照组取鱼测量其体重, 并计算特定生长率(SGR), 结果如图 3 所示。免疫组的 SGR(0.76)稍低于对照组(0.78), 但二者没有

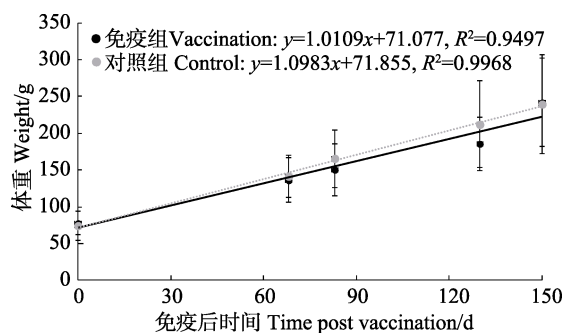


图3 免疫后大菱鲂体重增长  
Fig.3 Weight growth of turbot after immunization with *V. anguillarum* trivalent vaccine

明显差别, 表明鳗弧菌三价疫苗对大菱鲂的生长未产生不良影响。

## 3 讨论

本研究以鳗弧菌的 O1、O2 和 O3 血清型菌株为抗原, 制备了鳗弧菌三价灭活疫苗对养殖大菱鲂进行了一次免疫和二次免疫, 结果显示, 鳗弧菌三价疫苗对大菱鲂起到了有效的免疫保护作用。在整个实验期间, 免疫组大菱鲂的生长与未免疫大菱鲂未有明显区别, 表明该疫苗对大菱鲂的生长没有影响。免疫血清抗体效价是评价疫苗免疫保护效果的重要参数之一, 实验结果显示, 鳗弧菌三价疫苗能够有效地刺激大菱鲂产生特异抗体, 3 种抗原的抗体水平在短期内快速上升到最高水平, 之后进入稳定期, 在检测的 150 d 里保持较高水平。Spinosa 等(2017)的实验也得到了相似结果, 他们以鳗弧菌 O1 血清型菌株和美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)为抗原制备的二联疫苗免疫欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*), 免疫后 22~29 d 针对鳗弧菌的特异抗体水平上升到最高, 并在免疫后 346 d 保持相对稳定的抗体水平。本研究发现, 一免后 7 d 免疫组的 3 种特异抗体的水平迅速升高, 说明鳗弧菌疫苗抗原能够快速地被大菱鲂机体免疫系统识别并产生特异性免疫应答。鳗弧菌灭活疫苗的主要抗原成分为脂多糖 LPS(O 抗原)(Schröder *et al.*, 2006), LPS 不需要抗原递呈细胞的加工处理便能直接激活 B 细胞诱导体液免疫, 因而, 能在较短时间内刺激特异抗体的产生。

相对免疫保护率 RPS 是评价免疫保护效果的另一个重要参数, 结果表明, 鳗弧菌三价疫苗能为免疫鱼提供很好的免疫保护。大菱鲂在一免后 7 d 便获得较高的 RPS, 在免疫后 14~120 d 针对 3 种抗原的 RPS 维持在 70%以上。这些结果表明, 鳗弧菌三价疫苗一次免疫大菱鲂, 能提供至少 120 d 的有效免疫保护期。一次免疫大菱鲂获得的 RPS 的变化趋势与特异抗体水平的变化趋势一致, 一免后 14 d 血清抗体显著升高的同时, RPS 也明显升高; 免疫后 28 d, 血清抗体效价达最大值, RPS 也达到最大值 100%; 免疫后 28~120 d 血清抗体水平维持在较高水平(>1:106), RPS 维持在 70%以上。RPS 与特异抗体水平的一致性说明疫苗产生的免疫保护作用主要来自于抗体介导的免疫应答, Sun 等(2011)也提出了相同观点。此外, RPS 与抗体效价间的相关性提示, 可以通过免疫鱼的特异抗体水平来预测 RPS, 但还需要多次重复实验来建立抗体水平与 RPS 的数值关系。

二次免疫能够提高宿主的抗体水平、延长抗体持续时间,从而延长疫苗的免疫保护期。为了探究鳎弧菌三价疫苗二次免疫的免疫保护效果,在一免后 60 d 对大菱鲆进行了二次免疫,并对比了二免鱼和一免鱼特异抗体的变化和 RPS。结果显示,在二免后 3 d 便检测到二免鱼的特异抗体水平显著高于同期一免鱼的抗体水平,并在 60 d 内维持较高于一免鱼的抗体水平,表明大菱鲆的免疫系统对鳎弧菌疫苗快速产生了二次免疫应答,并合成和分泌更多的特异抗体。同时,二免后,大菱鲆获得的 RPS 也显著高于同期的一免大菱鲆,有效免疫保护期(RPS>70%)大于 150 d,表明鳎弧菌三价疫苗进行二次免疫后能够提高大菱鲆的免疫保护率、延长免疫保护时间。加强免疫时残留的疫苗抗体滴度直接影响抗体应答,且通常表现为负影响。可能是形成了抗原-抗体复合物,降低了可与 B 细胞结合的抗原量。通常一般会在宿主的特异抗体效价下降到较低、RPS 也较低的时候进行二次免疫,以便有效延长抗体持续时间和免疫保护期。在本研究中,一免大菱鲆的特异抗体水平在免疫后 150 d 仍保持较高水平,而 RPS 在 120 d 已下降至 70%,因此,认为鳎弧菌三价灭活疫苗的二免时间在首次免疫后 120 d 左右较合适。

综上所述,鳎弧菌三价灭活疫苗为大菱鲆提供了有效的免疫保护,一次免疫的抗体持续期大于 150 d,有效免疫保护期不低于 120 d;二次免疫的抗体持续期大于 150 d,有效免疫保护期不低于 150 d。在整个实验期间,免疫后的大菱鲆的生长与未免疫大菱鲆没有明显区别。

## 参 考 文 献

- Amend DF. Potency testing of fish vaccine. *Developments in Biological Standardization*, 1981, 49: 447-454
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(9): 643-661
- Grisez L, Ollevier F. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied & Environmental Microbiology*, 1995, 61(12): 4367
- Hui Y, Chen JX, Yang GP, *et al.* Protection of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Vibrio anguillarum* with a DNA vaccine containing the mutated zinc-metalloprotease gene. *Vaccine*, 2009, 27(15): 2150
- Liu X, Hua Z, Yuan G, *et al.* Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administrated with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum*, vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 855-860
- Nguyen HT, Thu Nguyen TT, Tsai MA, *et al.* A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 65: 118-126
- Pan YH, Ma Y, Zhao DL, *et al.* Study on immune response of *Paralichthys olivaceus* induced by live attenuated *V. anguillarum* vaccine. *Food and Drug*, 2009(5): 12-15 [潘燕华, 马悦, 赵东玲, 等. 鳎弧菌减毒活疫苗对牙鲆免疫效果的研究. *食品与药品*, 2009(5): 12-15]
- Pedersen K, Grisez L, Houdt RV, *et al.* Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional o-serogroups. *Current Microbiology*, 1999, 38(3): 183-189
- Plant KP, Lapatra SE. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1256
- Schröder MB, Mikkelsen H, Børdal S. Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture*, 2006, 254(1): 46-53
- Sommerset I, Krossøy B, Biering E, *et al.* Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(1): 89-101
- Spinós E, Kokkoris GD, Bakopoulos V. Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture*, 2017, 471: 172-184
- Sun Y, Liu C, Sun L. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(4): 595-599
- Xiao P, Mo ZL, Zou YX, *et al.* Immune responses and efficacy of an oral-emulsified bivalent vaccine against *Vibrio anguillarum* in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Chinese High Technology Letters*, 2007, 17(9): 979-985 [肖鹏, 莫照兰, 邹玉霞, 等. 鳎弧菌油乳化二价口服疫苗免疫养殖大菱鲆的免疫应答及免疫效果的研究. *高技术通讯*, 2007, 17(9): 979-985]
- Xing J, Xu H, Wang Y, *et al.* Protective efficacy of six immunogenic recombinant proteins of *Vibrio anguillarum* and evaluation them as vaccine candidate for flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 155
- Zhang Z, Wu H, Xiao J, *et al.* Immune responses of zebrafish (*Danio rerio*) induced by bath-vaccination with a live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine candidate. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(1): 36
- Zhang ZD, Zhang PJ, Mo ZL, *et al.* Effect of inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine on phagocytosis of *Paralichthys olivaceus* peripheral blood cells. *Studia Marine Sinica*, 2007, 48: 132-137 [张振冬, 张培军, 莫照兰, 等. 鳎弧菌灭活疫苗对牙鲆外周血细胞吞噬活性的影响. *海洋科学集刊*, 2007, 48: 132-137]
- Zhao LN, Li GY, Li J, *et al.* Serotyping and antibiotics



sensitivity of *Vibrio anguillarum* strains isolated from marine farmed fish. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1109–1118 [赵鲁宁, 李贵阳, 李杰, 等. 海水养殖鱼类鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)临床分离株的血清型和抗生素耐药谱. *海洋与湖沼*, 2011, 46(5): 1109–1118]

Zhu KL, Chen JX, Li Y, *et al.* Study on the vaccination against *V. anguillarum* in farmed marine turbot. *High Technology Letters*, 2004, 14(2): 76–80 [朱开玲, 陈吉祥, 李筠, 等. 鳃弧菌灭活疫苗对海水养殖大菱鲂的免疫预防研究. *高技术通讯*, 2004, 14(2): 76–80]

(编辑 冯小花)

## Long-Term Protection Effect of *Vibrio anguillarum* Trivalent Inactivated Vaccine

DING Shan<sup>1,2</sup>, LI Shufang<sup>1,2</sup>, LI Jie<sup>2,3</sup>, TANG Lei<sup>4</sup>, WANG Xiaoran<sup>4</sup>,  
MO Zhaolan<sup>2,3①</sup>, LI Jie<sup>5</sup>, CHEN Juan<sup>5</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. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266100;

5. Shandong Oriental Ocean Technology Limited Liability Company, Yantai 264003)

**Abstract** *Vibrio anguillarum* is a pathogen that can infect a variety of fish and causes highly fatal hemorrhagic septicemia. Its O1, O2, and O3 serotype strains are prevalent in the mariculture environment of China, causing great economic loss. However, the study of polyvalent vaccines of different pathogenic serotypes of *V. anguillarum* has not been undertaken. For this purpose, a trivalent inactivated vaccine *V. anguillarum* was made, and its antibody duration and immune protection period were evaluated. The trivalent vaccine was administered to turbot (80.2±4.7 g) at a dose of 10<sup>8</sup> cells/individual *via* intraperitoneal injection; booster vaccination was given at 60 days post vaccination (dpv), and the serum antibody titer and RPS of the vaccinated group and control group were compared. Fish vaccinated only once were observed for 150 days, and the results showed that during 14~150 dpv, the antibody level of the vaccinated *V. anguillarum* group was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ), and rose to 1 : 6.7 at 7 dpv, reached peak value at 28 dpv, and during 28~150 dpv hovered between 1 : 106.7~1 : 320. RPS of three serotype *V. anguillarum* were 16.7%~43.8% for 7 dpv, then reached 100% at 28 dpv; during 28~120 dpv was 70%~100%, 35%~100% for 150 dpv. The fish vaccinated twice were observed for 90 days; during 3~60 days post-second vaccination (dpsv), their antibody titer was significantly higher ( $P<0.05$ ) than those vaccinated only once, then went down and was not significantly different ( $P>0.05$ ) than that of those vaccinated only once. RPS of three serotype *V. anguillarum* were still higher than 70% and higher than those of fish only vaccinated once. All in all, antibody durability and efficient immune protection period (RPS>70%) of fish vaccinated with *V. anguillarum* trivalent inactivated vaccine once was longer than 150 days and 120 days respectively, and 150 days for fish that were vaccinated twice. Control group fish reached higher weight in comparison to the vaccinated fish, while SGR between groups for the whole period was not statistically significant ( $P>0.05$ ).

**Key words** *Vibrio anguillarum* vaccine; Serum antibody titer; RPS; Antibodies durability; Immune protection period

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170427001

http://www.yykxjz.cn/

陈晓彤, 黄立萍, 孙谡, 郝建华. 响应面分析法优化 $\alpha$ -环糊精的酶转化工艺. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 143-151

Chen XT, Huang LP, Sun M, Hao JH. Optimization of conversion process of  $\alpha$ -cyclodextrin with enzyme using response surface methodology. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 143-151

# 响应面分析法优化 $\alpha$ -环糊精的酶转化工艺\*



陈晓彤<sup>1,2</sup> 黄立萍<sup>1,2</sup> 孙 谡<sup>1</sup> 郝建华<sup>1①</sup>

(1. 农业农村部极地渔业开发重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 为获得较高的 $\alpha$ -环糊精转化产率,采用单因素实验和响应面实验方法,筛选底物种类、底物浓度、加酶量、酶作用时间、作用温度和 pH 等多个单因素,对海洋芽孢杆菌 Y112 产的 $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶产 $\alpha$ -环糊精的条件进行了优化。然后利用 Plackett-Burman 实验筛选得到影响 $\alpha$ -环糊精转化率的 3 个主要因素:底物浓度、温度和 pH 值。最终采用响应面分析法得到的最佳转化条件为马铃薯淀粉浓度为 5%,加酶量 200 U/g(淀粉),pH 值为 8.4,温度 30℃,200 r/min 反应 6 h, $\alpha$ -环糊精转化率均值为 28.67%,比优化前的产率提高了 2.48 倍。

**关键词**  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶; 响应面分析法;  $\alpha$ -环糊精; 转化工艺

**中图分类号** S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0143-09

环糊精(CD)是由环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)作用于直链淀粉而产生的环状低聚糖(Valle *et al.*, 2004),常见的有 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -环糊精。环糊精可以包埋形状各异和适当大小的疏水性客体分子,进而改变它们的理化性质(Biwer *et al.*, 2002)。环糊精的化学性质均较稳定, $\alpha$ -环糊精在体内的代谢作用最慢且无毒(Arima *et al.*, 2011)。环糊精在医药(朱征等, 2016),化妆品(李姝静等, 2016)、环保领域(张洪伟, 2014)等有良好的应用前景,而且作为一种新型的膳食纤维逐渐走入人们的视野(Artiss *et al.*, 2006)。

大多数 CGTase 生成的是多种环糊精的混合体。Bharat 等(2001)利用来自肺炎克雷伯菌 AS-22 分泌的 CGTase 酶生产 $\alpha$ -环糊精。Duan 等(2013)以 $\alpha$ -CGTase 和异淀粉酶作用于马铃薯淀粉,CD 的总产量达到

84.6%,比单独使用 $\alpha$ -CGTase 的转化率提高了 31.2%。目前,环糊精的应用依然受到环糊精产量的制约,继续研究提高环糊精产率的方法具有重要意义。

本研究对前期筛选到的来自黄海海域的海洋芽孢杆菌 Y112 的 $\alpha$ -CGTase 生产 $\alpha$ -环糊精的条件进行优化,旨在提高 $\alpha$ -环糊精的产量,以便应用于食品药品等领域。

## 1 材料与方法

### 1.1 酶的来源

$\alpha$ -CGTase 酶:由菌株海洋芽孢杆菌 Y112(与 *Bacillus agaradhaerens* DSM8721 的同源性为 100%,本实验室分离自中国黄海水域)发酵提取制备获得。

\* 国家重点研发计划(2018YFC0311100)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室-鳌山科技计划(2016ASKJ14)和青岛市市南区科技发展计划(2018-4-002-ZH)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China(2018YFC0311100), Aoshan Science & Technology Plan of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2016ASKJ14), and Qingdao Shinan Science & Technology Plan (2018-4-002-ZH)]. 陈晓彤, E-mail: cxt1103609717@163.com

① 通讯作者: 郝建华, 研究员, E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-27, 收修改稿日期: 2017-08-04

## 1.2 主要试剂

$\alpha$ -环糊精标准品(Aladdin, HPLC 级); 可溶性淀粉, 玉米淀粉, 马铃薯淀粉, 麦芽糊精(索莱宝); 水溶性淀粉-底物(Aladdin, 药用级); 甲基橙(Aladdin, AR); 其他化学试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

## 1.3 $\alpha$ -CGTase 酶活力的测定

实验组: 取 4 g 水溶性淀粉, 用配制好的 pH=8.5 的 0.2 mol/L 的 NaOH-甘氨酸缓冲液 100 ml (现用现配)溶解并进行加热糊化作为底物, 待其冷却后取 0.9 ml 液体在试管中, 放入 50℃ 水浴锅中预热 5 min, 然后加入适当稀释倍数的粗酶液 0.1 ml 混合均匀, 50℃ 水浴反应 4 min, 取出后迅速加入 1 ml 盐酸溶液 (1 mol/L) 终止反应, 最后加入 4 ml 稀释 4 倍的甲基橙溶液, 混匀, 室温静置 20 min。

对照组: 取底物 0.9 ml 于试管中, 预热 5 min。随实验组放入水浴反应 4 min 后, 加入 1 ml 盐酸溶液混合均匀后, 再加入与实验组相同的粗酶液, 其他处理与实验组相同。用分光光度计在 507 nm 测定实验组与对照组的吸光度。1 个单位酶活定义为上述条件下生成 1  $\mu$ g  $\alpha$ -环糊精需要的酶量(张晓磊等, 2015)。

## 1.4 绘制标准曲线

取一支试管, 分别加入 1 ml 梯度浓度的  $\alpha$ -环糊精标准溶液和 1 ml 1 mol/L 的盐酸, 再加入 4 ml 稀释 4 倍的甲基橙溶液于试管中, 摇匀, 室温静置 20 min, 在 507 nm 处测吸光度。其中, 空白不含  $\alpha$ -环糊精, 其余操作相同。以环糊精浓度为横坐标, 吸光度差值为纵坐标, 绘制标准曲线。吸光度差值( $\Delta$ OD)=空白溶液吸光度-样品吸光度。

## 1.5 $\alpha$ -环糊精含量测定

将待测溶液按照 1.4 的步骤进行测定, 根据标准曲线计算得到  $\alpha$ -环糊精的浓度, 然后得出  $\alpha$ -环糊精的含量值。

## 1.6 单因素法优化 $\alpha$ -CGTase 作用淀粉产 $\alpha$ -环糊精条件

**1.6.1 底物种类对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 取 5% 浓度的玉米淀粉、马铃薯淀粉、麦芽糊精和可溶性淀粉溶液各 100 ml 加热溶解, 待冷却后, 温度 30℃, pH 为 9, 加酶量 200 U/g 淀粉, 200 r/min, 6 h 取出煮沸灭活测  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

**1.6.2 底物浓度对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 分别取 3%、5%、8%、10%、15%、20% 浓度的马铃薯淀粉溶液各 100 ml 加热溶解, 待冷却后, 温度 30℃, pH 为 9,

加酶量 200 U/g 淀粉, 200 r/min, 6 h 取出煮沸灭活测  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

**1.6.3 酶添加量对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 5% 浓度的马铃薯淀粉溶液 100 ml, 温度为 30℃, pH 为 9, 分别加入 100、150、200、250、300 U/g 马铃薯淀粉的  $\alpha$ -CGTase 进行反应, 200 r/min 摇床反应 6 h 后灭活测  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

**1.6.4 温度对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 5% 浓度的马铃薯淀粉溶液 100 ml, pH 为 9, 加酶量 200 U/g 马铃薯淀粉, 分别在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃ 反应, 200 r/min 摇床反应 6 h 后煮沸灭活测定  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

**1.6.5 反应时间对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 5% 浓度的马铃薯淀粉溶液 100 ml 加热溶解, 待冷却后, 温度为 30℃, pH 为 9, 加酶量为 200 U/g 马铃薯淀粉, 200 r/min, 反应分别进行 1、2、4、6、8、10、12、24 h 后煮沸灭活测定  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

**1.6.6 pH 对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 5% 浓度的马铃薯淀粉溶液 100 ml, 温度 30℃, 加酶量 200 U/g 马铃薯淀粉, 分别在 pH 为 6、7、8、9、10 条件下反应, 200 r/min 摇床反应 6 h 后煮沸灭活, 测定  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

**1.6.7  $Mg^{2+}$  浓度对  $\alpha$ -CD 产量的影响** 5% 浓度的马铃薯淀粉溶液 100 ml, pH 值为 9, 温度为 30℃, 加酶量为 200 U/g 马铃薯淀粉, 分别加入终浓度为 0~60 mmol/L 的镁离子, 200 r/min 摇床反应 6 h 后灭酶测定  $\alpha$ -CD 产量。每个梯度做 3 次, 取平均值。

## 1.7 响应面法优化产 $\alpha$ -环糊精条件

**1.7.1 Plackett-Burman 实验** 根据单因素实验, 选取底物浓度、加酶量、温度、时间和 pH 共 5 个因素, 通过 PB 实验为响应面实验筛选出酶催化淀粉生成  $\alpha$ -环糊精的主要影响因子。

表 1 Plackett-Burman 实验设计

Tab.1 Experiment design of Plackett-Burman

水平 Level	A 底物浓度 Substrate concentration (%)	B 加酶量 Enzyme added (U/g)	C 温度 Temperature (°C)	D 时间 Time(h)	E pH
-1	3	150	20	4	8
+1	7	250	40	8	10

**1.7.2 中心组合确定最佳条件** 根据 PB 实验结果用 Design-Expert 8.06 软件设计 BBD 实验并进行分析(表 2)(董延娟等, 2016)。

表 2 Box-Behnken 实验设计  
Tab.2 Experiment design of Box-Behnken

水平 Level	-1	0	+1
底物浓度 Substrate concentration(%)	4	5	6
温度 Temperature(°C)	27	30	33
pH	8	8.5	9

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -环糊精的标准曲线

$\alpha$ -环糊精的标准曲线见图 1, 方程为  $y=0.0373x$  ( $R^2=0.9994$ )。

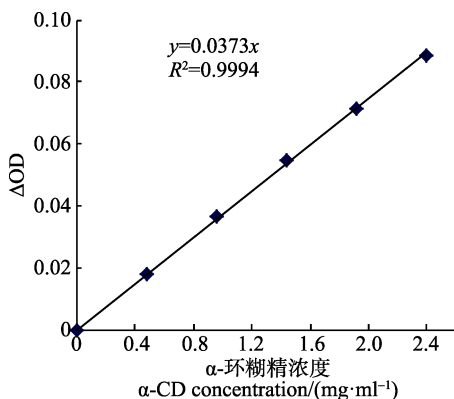


图 1  $\alpha$ -环糊精的标准曲线  
Fig.1 Standard curve of  $\alpha$ -cyclodextrin

### 2.2 单因素实验设计与分析

**2.2.1 底物种类对  $\alpha$ -环糊精生产的影响** 底物种类对  $\alpha$ -环糊精转化率的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出, 可溶性淀粉的环糊精转化率最高, 麦芽糊精的转化率最低。马铃薯淀粉的转化率略低于可溶性淀粉。

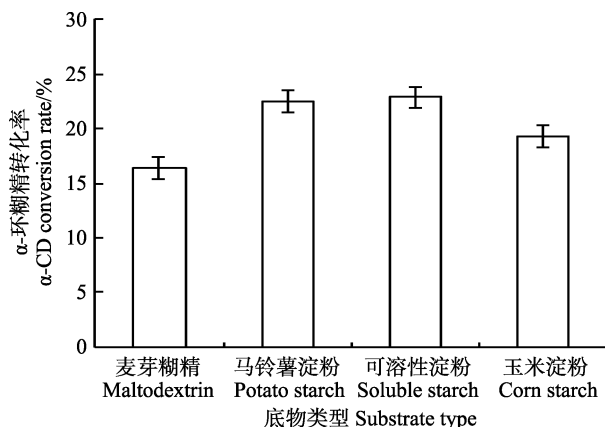


图 2 不同底物对  $\alpha$ -CD 产量的影响  
Fig.2 Effects of different substrate on yield of  $\alpha$ -CD

环糊精可以由环糊精酶作用于不同种类的淀粉、糊精、直链淀粉和支链淀粉产生, 得到高转化率环糊精的底物是淀粉。而淀粉是由直链淀粉和支链淀粉组成, 由于直链淀粉与脂质容易形成复合物, 不易酶活性的作用; 支链淀粉有更多的还原端, 与直链淀粉相比再生缓慢, 以支链淀粉为底物的环糊精产量高于直链淀粉(Pishtiyski *et al*, 2006)。马铃薯淀粉的价格比较低, 使得生产环糊精的成本降低, 因此, 本研究中马铃薯淀粉是适合生产环糊精的底物。

**2.2.2 底物浓度对  $\alpha$ -环糊精生产的影响** 底物浓度对环糊精转化率的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出, 当淀粉浓度为 5% 时,  $\alpha$ -环糊精的转化率为 25.9%, 当淀粉浓度升到 10% 时,  $\alpha$ -环糊精的转化率和 5% 时相比下降 50%, 二者相差较大, 继续增大底物浓度, 转化率降低越明显。可能是因为马铃薯淀粉浓度过大, 加热糊化后粘性过大, 不利于酶与底物的反应过程。相反, 底物浓度越小, 环糊精转化率越高, 但成本升高, 总的产量过低, 综合考虑, 选用 5% 的马铃薯淀粉作为生产  $\alpha$ -环糊精的淀粉浓度。

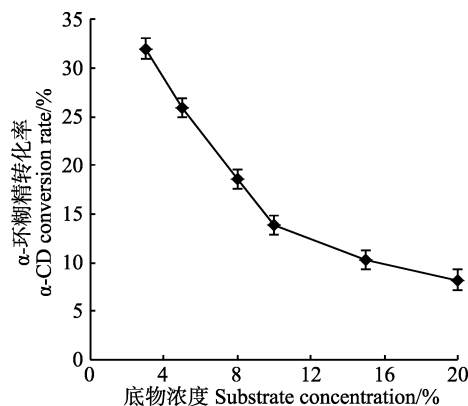
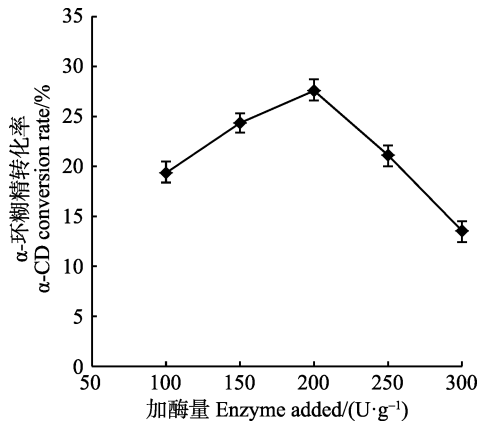


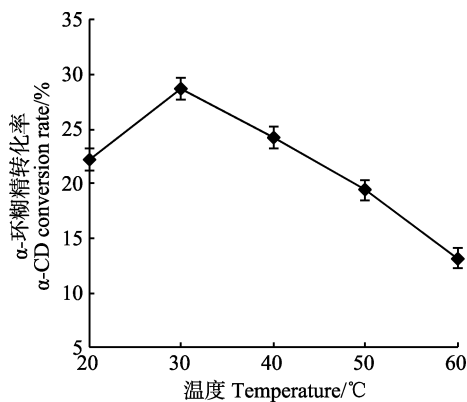
图 3 底物浓度对  $\alpha$ -CD 产量的影响  
Fig.3 Effect of substrate concentration on yield of  $\alpha$ -CD

**2.2.3 加酶量对  $\alpha$ -环糊精生产的影响** 图 4 显示, 在一定范围内,  $\alpha$ -环糊精的转化率随着加酶量的增加呈现先上升后下降的趋势。当加酶量为 200 U/g 时, 转化率达到最高。

环化反应的逆反应是耦合反应, 加酶量的增加, 使酶的歧化、耦合反应能力均增强, 增加了体系中小分子糖的存在, 促进耦合反应的进行, 使得  $\alpha$ -环糊精向  $\beta$ -环糊精转化, 不利于  $\alpha$ -环糊精的生产。控制酶的添加量可以有效提高  $\alpha$ -环糊精的产量, 减少酶的用量也可以降低成本。通过单因素实验, 选择 200 U/g 的加酶量。

图4 酶添加量对 $\alpha$ -CD生产的影响Fig.4 Effect of enzyme addition on  $\alpha$ -CD production

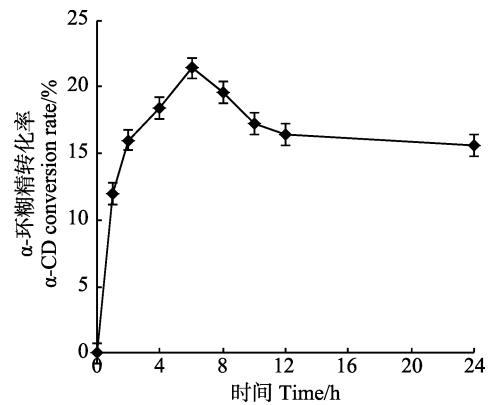
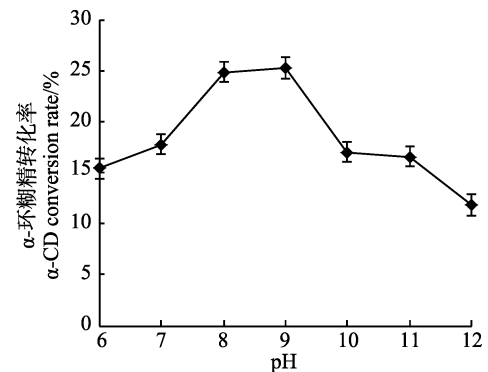
**2.2.4 温度对 $\alpha$ -环糊精生产的影响** 从图5可以看出,不同的温度对转化率的影响比较明显,转化率在30℃时最高,之后随着温度的继续升高, $\alpha$ -环糊精的转化率降低幅度增大。该酶的最适反应温度是55℃,在40℃以下稳定,高于50℃对酶活影响较大,与实验结果基本保持一致,在不失活的状态下,30℃时最有利于 $\alpha$ -环糊精的生产。

图5 温度对 $\alpha$ -CD生产的影响Fig.5 Effects of temperature on  $\alpha$ -CD production

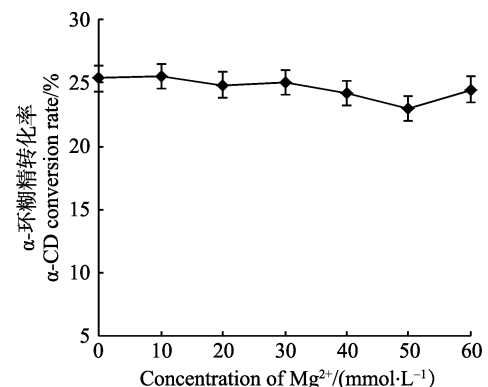
**2.2.5 作用时间对 $\alpha$ -环糊精生产的影响** 由图6可知, $\alpha$ -环糊精转化率达到最高点的时间为6 h,继续增加反应时间,转化率并没有增高,反而有明显的降低趋势。随着反应时间的加长,酶的其他作用增强,造成 $\alpha$ -环糊精的分解。另一方面,反应时间的减少,更有利于节约成本。

**2.2.6 pH对 $\alpha$ -环糊精生产的影响** 通过考察不同pH下 $\alpha$ -环糊精的转化率,结果显示(图7),初始pH为9时,转化率最高,此时即为 $\alpha$ -环糊精转化的最适反应pH。不同的CGT酶反应的体系的pH值是不同的,大多数是弱碱性或中性介质(Jung *et al*, 2007)。有研究表明,底物种类-缓冲液类型对环糊精有重要的

作用(Mau *et al*, 2007),在此未对缓冲液的类型是否对转化率有一定的影响做进一步的探讨。

图6 反应时间对 $\alpha$ -CD生产的影响Fig.6 Effects of reactional time on  $\alpha$ -CD production图7 pH值对 $\alpha$ -CD生产的影响Fig.7 Effects of pH on  $\alpha$ -CD production

**2.2.7  $Mg^{2+}$ 浓度对 $\alpha$ -环糊精生产的影响** 之前的实验中, $Mg^{2+}$ 对酶活性有一定的促进作用,本实验考察反应过程中添加量对反应的影响。由图8可知,由于生产 $\alpha$ -环糊精的时间比较短,在一定范围内 $Mg^{2+}$ 浓度的增减对环糊精的转化率并没有很大的影响,因此,后期实验中不考率金属离子的添加量。

图8  $Mg^{2+}$ 浓度对 $\alpha$ -CD生产的影响Fig.8 Effects of  $Mg^{2+}$  concentration on  $\alpha$ -CD production

## 2.3 响应面实验设计与分析

**2.3.1 PB 实验结果** 用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行处理, 得到 PB 实验设计分析如表 4, 底物浓度、温度和 pH 的  $P$  值小于 0.055 为显著, 因此, 确定三者为酶转化淀粉生产  $\alpha$ -环糊精的主要影响因子。

**2.3.2 中心组合实验设计与结果** 利用 Design-Expert 8.06 软件对实验结果进行多元回归拟合(表 6), 发现该模型是显著的,  $F$  值为 506.71 表示仅有 0.01%

的可能是由噪音引起的, 其中 A、B、C、AC、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  的  $P$  值均小于 0.05, 是显著模型项, 失拟  $F$  值为 0.96( $P=0.4921$ )表示该模型的失拟不显著, 因此该模型是合适的。方程的  $R^2=0.9985$ , 说明  $\alpha$ -环糊精转化率的实测值与预测值的拟合度较好, 该模型能较好解释环糊精产率的变化。 $F$  值越大, 表明影响因子对实验指标的影响越大。由方差分析表可得出,  $FA=369.36$ ,  $FC=303.67$ ,  $FB=33.64$ , 即各因素对产物制备的影响程度大小顺序为底物浓度>pH>温度。

表 3 PB 实验设计及结果  
Tab.3 Design and results in PB

实验号 Number	底物浓度 Substrate concentration (%)	加酶量 Enzyme added (U/g)	温度 Temperature (°C)	时间 Time (h)	pH	转化率 Conversion rate (%)
1	1	1	-1	1	1	12.26
2	-1	1	1	-1	1	12.91
3	1	-1	1	1	-1	7.43
4	-1	1	-1	1	1	18.58
5	-1	-1	1	-1	1	10.50
6	-1	-1	-1	1	-1	28.65
7	1	-1	-1	-1	1	9.50
8	1	1	-1	-1	-1	12.29
9	1	1	1	-1	-1	12.93
10	-1	1	1	1	-1	23.41
11	1	-1	1	1	1	6.40
12	-1	-1	-1	-1	-1	19.76

表 4 PB 实验结果分析  
Tab.4 The analysis of the results of PB

因素 Factors	影响值 Impact value	贡献值 Contribution value	$F$	$P$	显著性 Significance
A-底物浓度 Substrate concentration	1	234.09	22.57	0.0032	*
B-加酶量 Enzyme added	1	8.54	0.82	0.3991	
C-温度 Temperature	1	62.83	6.06	0.049	*
D-时间 Time	1	29.51	2.85	0.1426	
E-pH	1	98.14	9.46	0.0218	*

“\*”表示差异显著( $P<0.05$ ) \* means significant difference ( $P<0.05$ )

二次多项式回归方程为:

$$Y=+28.58-0.91A+0.28B-0.83C+0.012AB+0.57AC-0.13BC-1.30A^2-2.30B^2-2.76C^2$$

根据回归方程, 做响应面图(图 9)。

软件分析得到最大响应值(产量)时 A、B、C 对应的最佳实验条件为: 底物浓度 4.61、温度 30.2°C、pH=8.4、反应时间 6 h,  $\alpha$ -环糊精最大预测转化率为 28.84%。按照实验筛选出的最佳条件, 为方便实验操

作, 在底物浓度 5%、温度 30°C、pH=8.4、加酶量 200 U/g、反应 6 h 条件下进行反应, 实际转化率为 28.67%, 与理论值接近。

## 3 讨论

郭永华等(2016)通过定点饱和突变技术得到 CGTase 突变体 N623T, 在酶的最适温度 60°C 和 pH 为 6.5 条件下反应 24 h, 淀粉总转化率从 11.3%提高

表5 Box-Behnken 实验设计及结果  
Tab.5 Design of Box-Behnken and results

实验号 Number	底物浓度 Substrate concentration(%)	温度 Temperature (°C)	pH	转化率 Conversion rate (%)
1	-1	-1	0	25.72
2	1	-1	0	23.79
3	-1	1	0	26.14
4	1	1	0	24.26
5	-1	0	-1	26.73
6	1	0	-1	23.86
7	-1	0	1	24.04
8	1	0	1	23.43
9	0	-1	-1	23.93
10	0	1	-1	24.84
11	0	-1	1	22.44
12	0	1	1	22.84
13	0	0	0	28.49
14	0	0	0	28.65
15	0	0	0	28.54
16	0	0	0	28.43
17	0	0	0	28.77

至 39.7%，其中， $\alpha$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精所占比例分别为 32.8%和 7.7%， $\alpha$ -环糊精的总转化率为 13.02%。王琰等(2017)利用重组的  $\alpha$ -CGTase 酶转化 5%的马铃薯

淀粉，58℃反应 15 h 后，环糊精的总转化率可达 40.7%，转化生成  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 和  $\gamma$ -CD 比例分别为 43.6%、41.8%和 14.6%，即  $\alpha$ -CD 的转化率为 17.75%。与已报道的产环糊精最高的酶相比(Duan *et al*, 2013)，菌株 Y112 产的 CGTase 酶在碱性环境中更加稳定，反应时间仅为 6 h，大大降低了生产成本，且在不添加有机试剂的条件下，转化率可达到 28.67%，减小了环糊精的毒性，使得环糊精应用范围更广，特别是医药，食品，化妆等方面，具有不可比拟的优势。

#### 4 结论

本研究采用单因素实验分析了  $\alpha$ -CGTase 催化淀粉制备  $\alpha$ -环糊精的条件，初步筛选得到的条件为：以马铃薯淀粉溶液为底物，5%的浓度，加酶量 200 U/g (淀粉)，温度 30℃，pH 为 9，反应时间 6 h；利用 Plackett-Burman 实验设计对影响  $\alpha$ -环糊精转化率的 5 个因素进行筛选，通过分析得知主要影响因素为底物浓度、温度和 pH 值。采用响应面分析法对  $\alpha$ -CGTase 转化淀粉制备  $\alpha$ -环糊精条件进行优化，得到的最佳转化条件为底物浓度 5%、pH 8.4、温度 30℃、200 r/min、反应 6 h。在最佳条件下制备  $\alpha$ -CD 转化率均值为 28.67%，比优化前的产率提高了 2.48 倍。

表6 回归模型系数的显著性  
Tab.6 Significance of regression coefficients for the model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean Square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	82.02	9	9.11	506.71	< 0.0001	**
A	6.64	1	6.64	369.36	< 0.0001	**
B	0.61	1	0.61	33.64	0.0007	**
C	5.46	1	5.46	303.67	< 0.0001	**
AB	$6.25 \times 10^{-4}$	1	$6.25 \times 10^{-4}$	0.035	0.8574	
AC	1.28	1	1.28	71	< 0.0001	**
BC	0.065	1	0.065	3.62	0.099	
A <sup>2</sup>	7.09	1	7.09	394.43	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	22.28	1	22.28	1239	< 0.0001	**
C <sup>2</sup>	32.14	1	32.14	1787.26	< 0.0001	**
残差 Residual	0.13	7	0.018			
失拟差 Lack of fit	0.053	3	0.018	0.96	0.4921	
净误差 Pure error	0.073	4	0.018			
总离差 Cor total	82.15	16				
R <sup>2</sup> =0.9985	Adj R <sup>2</sup> =0.9965	Pred R <sup>2</sup> =0.9883				

“\*\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ ) \*\* means highly significant difference ( $P < 0.01$ )

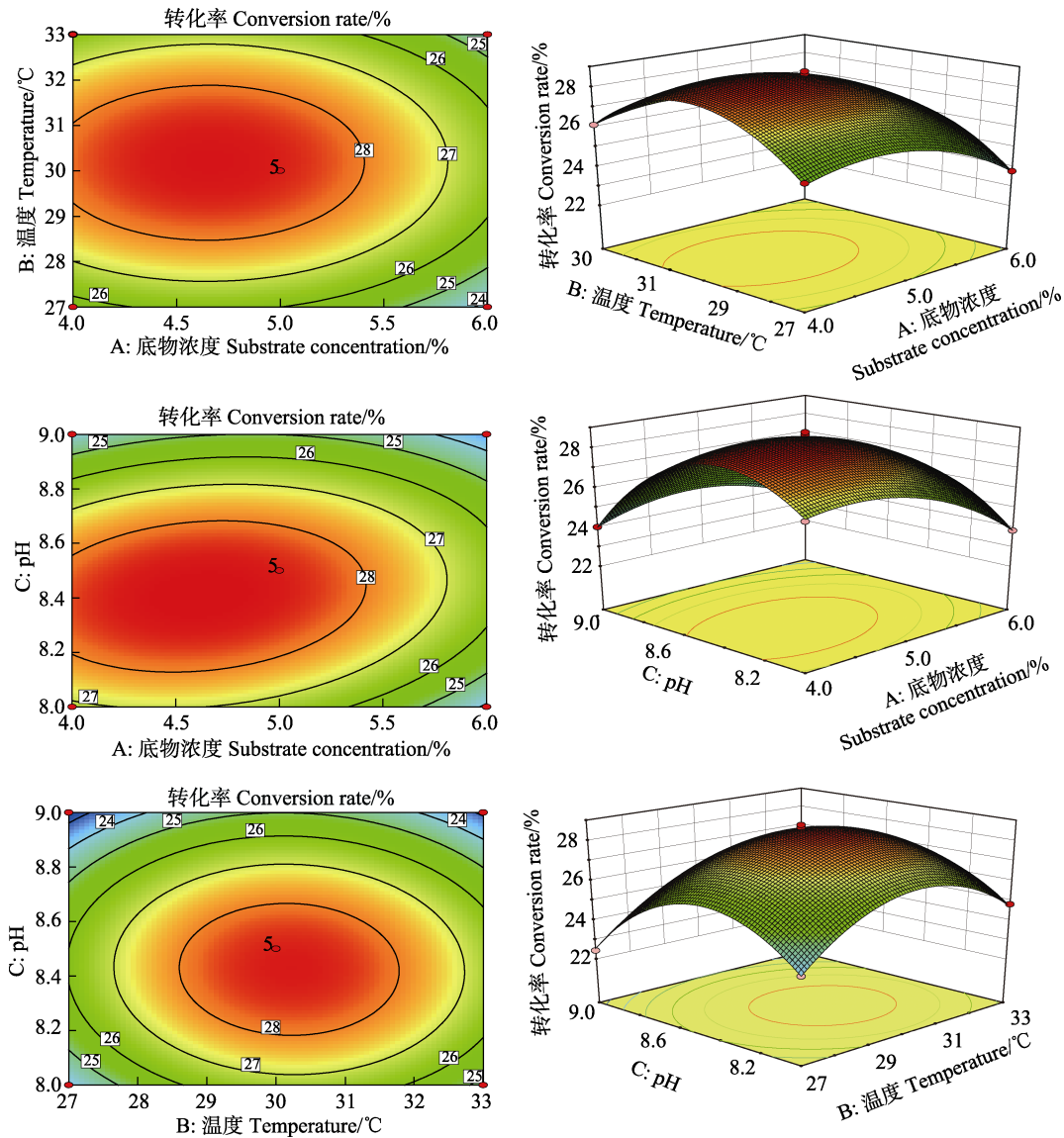


图 9 两两因素交互作用 3D 图和等高线图  
Fig.9 3D and contour plot of interaction between two factors

表 7 与其他研究成果的比较  
Tab.7 Comparison with other research results

来源 Sources	pH	时间 time (h)	温度 Temperature (°C)	$\alpha$ -CD 转化率 Conversion rate (%)	参考文献 Reference
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AS-22	7.5	6	40	41.2	Bharat <i>et al</i> , 2001
$\alpha$ -CGTase 和异淀粉酶	5.6	24	30	79.8	Duan <i>et al</i> , 2013
<i>Geobacillus</i> sp. CHB1 突变体 N623T	6.5	24	60	13.02	郭永华等, 2016
<i>Paenibacillus macerans</i> YLW	5.5	15	58	17.75	王琰等, 2017
海洋芽孢杆菌 Y112	8.4	6	30	28.67	本研究 This study

参 考 文 献

Arima H, Motoyama K, Irie T, *et al*. Recent findings on safety profiles of cyclodextrins, cyclodextrin conjugates and polypseudorotaxanes. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken,

2011, 32: 91-123  
Artiss JD, Brogan K, Brucal M, *et al*. The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and selected blood parameters in rats. *Metabolism*, 2006, 55(2): 195-202  
Bharat G, Anant P. Alpha-cyclodextrin production using



- cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Starch Starke*, 2001, 53(2): 75–83
- Biwer A, Antranikian G, Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(6): 609–617
- Dong YJ, Hao JH, Zhang HF, *et al.* Optimization of the fermentation conditions for xylanase-producing strain YS1069. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 154–159 [董延娟, 郝建华, 郑鸿飞, 等. 产木聚糖酶菌株 YS1069 的产酶条件优化. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 154–159]
- Duan X, Chen S, Chen J, *et al.* Enhancing the cyclodextrin production by synchronous utilization of isoamylase and  $\alpha$ -CGTase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(8): 3467–3474
- Guo YH, Chen JC, Cai HS, *et al.* Saturated mutation effects on catalytic efficiency and product specificity of starch binding site N623 of cyclodextrin glucanotransferase from *Geobacillus* sp. CHB1. *China Biotechnology*, 2016, 36(11): 30–38 [郭永华, 陈济琛, 蔡海松, 等. *Geobacillus* sp. CHB1 环糊精葡萄糖基转移酶淀粉结合位点 N623 饱和突变对催化效率与产物特异性的影响. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(11): 30–38]
- Jung SW, Kim TK, Lee KW, *et al.* Catalytic properties of beta-cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. BL-12 and intermolecular transglycosylation of stevioside. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, 12(3): 207–212
- Li SJ, Zhou ZR. Application of cyclodextrins in the cosmetic field. *Applied Chemical Industry*, 2016, 45(10): 1942–1945 [李姝静, 周自若, 邓小锋, 等. 环糊精在化妆品领域中的应用研究. *应用化工*, 2016, 45(10): 1942–1945]
- Mau GK, Muhammad MN, Osman H, *et al.* The effects of reaction conditions on the production of  $\gamma$ -cyclodextrin from tapioca starch by using a novel recombinant engineered CGTase. *Journal of Molecular Catalysis, B: Enzymatic*, 2007, 9(1–4): 118–126
- Pishtiyski I, Zhekova B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(2): 109–114
- Valle D, Martin EM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 2004, 39(9): 1033–1046
- Wang Y, Li J, Yang GW, *et al.* Study of soluble expression in *Escherichia coli* of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyl transferase produced by *Paenibacillus macerans* and properties of its derivatives. *China Food Additives*, 2017(2): 81–86 [王琰, 李皎, 杨国武, 等. 多黏芽孢杆菌产  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的可溶性表达及其转化产物特异性研究. *中国食品添加剂*, 2017(2): 81–86]
- Zhang HW. Structural characteristics of cyclodextrin and its research status in environmental protection. *Environment and Life*, 2014(22): 319–320 [张洪伟. 环糊精的结构特性及其在环保领域的研究现状. *环境与生活*, 2014(22): 319–320]
- Zhang XL, Hao JH, Zhang HF, *et al.* Optimized fermentation of  $\alpha$ -cyclodextrin glucosyltransferase producing strain. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2015, 34(5): 63–70 [张晓磊, 郝建华, 郑鸿飞, 等. 1 株产  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶菌株的产酶条件优化. *中国海洋药物*, 2015, 34(5): 63–70]
- Zhu Z, Yang M. Evaluation of the effect of high blood fat elimination by alpha cyclodextrin to the clinical biochemical measurement. *Sichuan Medical Journal*, 2016, 37(9): 1048–1052 [朱征, 杨敏.  $\alpha$ -环糊精消除高脂血对临床生化测定影响的效果评价. *四川医学*, 2016, 37(9): 1048–1052]

(编辑 冯小花)

## Optimization of Conversion Process of $\alpha$ -Cyclodextrin with Enzyme Using Response Surface Methodology

CHEN Xiaotong<sup>1,2</sup>, HUANG Liping<sup>1,2</sup>, SUN Mi<sup>1</sup>, HAO Jianhua<sup>1</sup>①

(1. Key Laboratory of Polar Fisheries Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In order to obtain a higher yield of  $\alpha$ -cyclodextrin conversion, we use a single factor experiment and response surface experiment method, to optimize the production of  $\alpha$ -cyclodextrin conditions by  $\alpha$ -cyclodextrin glucosyltransferase. The enzyme is derived from strain Y112. First, the single factor method was used to screen six factors including substrate species, substrate concentration, enzyme content, reaction time, temperature, and pH. Second, these main variables affecting the conversion of  $\alpha$ -cyclodextrin were evaluated with the Plackett-Burman test. The results suggested that substrate concentration, temperature, and pH were the most impactful factors. Finally, the optimal levels of the three factors were determined with central composite design and Design-Expert 8.05 software. The optimum conversion conditions were shown as follows: the concentration of potato starch was 5%, the amount of enzyme 200 U/g (starch), pH 8.4, 200 r/min, reacted at 30°C for 6 h. Under the optimized conditions, the average value of  $\alpha$ -CD conversion was 28.67%, which was an increase of 2.48 times compared with the pre-optimization yield.

**Key words**  $\alpha$ -Cyclodextrin glucosyltransferase; Response surface analysis;  $\alpha$ -Cyclodextrin; Conversion process

① Corresponding author: HAO Jianhua, E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171024001

http://www.yykxjz.cn/

陈怡炫, 陈昕, 王芳, 惠彦行, 盛军, 徐海波, 徐甲坤. 南极磷虾粗酶液中蛋白酶的基础酶学性质研究及抑制剂的开发. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 152–157  
Chen YX, Chen X, Wang F, Hui YX, Sheng J, Xu HB, Xu JK. Study on the basic enzymatic properties of protease in crude enzyme of Antarctic krill and the development of inhibitors. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 152–157

# 南极磷虾粗酶液中蛋白酶的基础酶学 性质研究及抑制剂的开发\*



陈怡炫<sup>1,2</sup> 陈昕<sup>2,4</sup> 王芳<sup>2</sup> 惠彦行<sup>1,2</sup>  
盛军<sup>2</sup> 徐海波<sup>1①</sup> 徐甲坤<sup>2,3①</sup>

(1. 中国海洋大学化学化工学院 青岛 266100; 2. 农业农村部极地渔业开发重点实验室 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药物与生物制品功能实验室 青岛 266071; 4. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 本研究探讨了反应温度、pH、金属离子( $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和  $Ca^{2+}$ )对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响,研究了苯甲基磺酰氟(PMSF)、EDTA·2Na、碘乙酰胺(IAM)和甲苯磺酰-苯丙氨酸氯甲基酮(TPCK)对蛋白酶活性的抑制效果。结果显示,南极磷虾粗酶液中蛋白酶的最适反应温度为 40℃;最适反应 pH 值为 8.0;当金属离子浓度为 0.5 mmol/L 时,  $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和  $Al^{3+}$ 金属离子对蛋白酶活性的抑制率分别为 55.02%、55.02%、35.39%、20.67%和 41.12%,而  $Ca^{2+}$ 离子对蛋白酶活有明显的促进作用;PMSF 和 EDTA·2Na 对蛋白酶酶活具有较为显著的抑制作用,PMSF 的浓度为 8.0 mmol/L 时,抑制率为 60%;EDTA·2Na 浓度为 0.6 mmol/L 时,抑制率为 86.67%;IAM 在低浓度时有一定的抑制作用;TPCK 低浓度时抑制效果不明显,浓度升高时有一定的抑制作用。在 5~30℃ 的温度范围内,随着温度升高,EDTA·2Na 对蛋白酶酶活的抑制效果逐渐增加。本研究阐明了影响南极磷虾粗酶液蛋白酶酶活的因素,开发了针对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的抑制剂,为南极磷虾在食品领域的开发利用提供了基础理论数据。

**关键词** 南极磷虾;粗酶液;基础酶学性质;抑制剂

**中图分类号** Q184.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0152-06

南极磷虾(*Euphausia superba*)是南极海域资源量最大的单物种生物之一,蕴藏量约为 6~10 亿 t,是南

极动物的重要食物来源(岳冬冬等, 2015; Auerswald *et al*, 2015; Siegel *et al*, 2010)。南极磷虾的商业开发

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-XKQ01-01; 2016ZD0902; 2017GH07)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山科技创新计划课题(2015ASKJ02-02-04)、山东省科技发展计划项目(2014GHY115029)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016011)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-XKQ01-01; 2016ZD0902; 2017GH07), Aoshan S&T Innovation Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02-02-04), Science and Technology Development Plan of Shandong Province(2014GHY115029), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016011)]. 陈怡炫, E-mail: chengzi118114@163.com

① 通讯作者: 徐海波, 教授级高级工程师, E-mail: xuwangri@163.com; 徐甲坤, 副研究员, E-mail: xujk@ysfri.ac.cn  
收稿日期: 2017-10-24, 收修改稿日期: 2017-12-05

从 20 世纪 70 年代开始, 2016 年捕捞量为 25.83 万 t (李勋年, 2017)。南极磷虾营养丰富、全面, 蛋白含量(干样)高达 60%–65%, 富含 8 种人体必需氨基酸且比例适宜, 是一种优质动物性蛋白质源(聂玉晨等, 2016), 且富含磷脂、不饱和脂肪酸、酶、多糖、氨基酸等多种活性物质, 是虾糜类制品、蛋白粉、虾油、功能肽等产品的好原料。目前, 世界各国对南极磷虾资源的可持续开发利用均采取非常谨慎的态度, 其生产许可和配额发放也极为严格, 因此, 如何有效提高南极磷虾及其制品的利用率及质量具有重要的现实意义(刘丽, 2015)。在南极磷虾的加工过程中, 受船舶设施装备条件以及加工技术水平制约, 目前, 很大一部分南极磷虾原料均采用船上冷冻保藏并运输到陆地进行二次加工(王南平等, 2012)。在此过程中, 南极磷虾在微生物和自身蛋白酶的作用下容易发生自溶、黑化, 导致品质劣变, 严重影响了南极磷虾品质(Sjödahl *et al*, 2002; Kimoio *et al*, 2006)。本文对南极磷虾粗酶液中蛋白酶的基础酶学性质进行了研究, 阐明了影响南极磷虾粗酶液酶活的因素, 开发了针对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的抑制剂, 为南极磷虾在食品领域的开发利用提供了基础理论数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

南极磷虾由辽渔集团提供, 为 2015 年 10 月在南极海域捕获, 在 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻保存。

### 1.2 试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 三羟甲基氨基甲烷(Tris)·HCl、三氯乙酸(TCA)、二甲基亚砷(DMSO)、抗坏血酸、EDTA·2Na、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$  等金属盐购自国药集团化学试剂有限公司; N- $\alpha$ -D,L-亮氨酸-4-硝基苯胺(BApNA)、碘乙酰胺(Iodoacetamide)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、对甲苯磺酰-苯丙氨酸氯甲基酮(TPCK)均购自日本 TCI 公司。

**1.2.2 主要仪器** UV-2450UV spectrophotometer (日本 Shimadzu 公司), HH-1 电热恒温水浴锅(常州国华电器有限公司), G154D 高压蒸汽灭菌锅(美国 ZEALWAY 公司); Mettler Toledo S20 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; CR21G III 高速冷冻离心机(日本日立), 层析柜(北京松源华兴科技发展有限公司), 恒温金属浴 CHB-100(杭州博日科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 粗酶液的制备** 取冰冻南极大磷虾,  $4^{\circ}\text{C}$  静

置解冻, 取适量南极磷虾虾头, 按虾头: 缓冲液=1:2 ( $m:v$ ) 的比例加入事先预冷至  $4^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L), 匀浆,  $4^{\circ}\text{C}$  11180( $\times g$ ) 离心 30 min, 取上清液, 得粗酶液, 并将 1% 的抗坏血酸溶液加到粗酶液中。

**1.3.2 蛋白酶活性测定** 参考 Wu 等(2014)方法并做相应改进, 将酶液混匀于 pH=8.0 的 50 mmol/L 缓冲液中,  $40^{\circ}\text{C}$  预热 2 min; 加入 BApNA(10 mmol/L), 混匀,  $40^{\circ}\text{C}$  反应 20 min, 加入三氯乙酸(10%)终止反应, 对照管为预先加入三氯乙酸(10%)破坏了酶活性的反应体系。每个样品设 1 个对照、3 个平行样。

将每秒转换 1  $\mu\text{mol}$  底物所需的酶量定义为 1 个酶活力单位, 即:

$$\text{酶活力单位} = \Delta A_{410\text{nm}} / 8800 \times 10^{-6} \times 60 \times 20$$

式中,  $\Delta A_{410\text{nm}}$  为样品管吸收值与空白对照管光吸收值的差值; 8800 为底物 BApNA 的摩尔消光系数;  $10^{-6}$  为单位 mol 与  $\mu\text{mol}$  之间的转换值; 20 为酶反应时间(min); 60 为反应时间分钟与秒之间的转换值(Sjödahl *et al*, 1998)。

**1.3.3 最适反应温度的测定** 以 BApNA 为底物, 将酶置于不同温度条件下( $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $35^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $45^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$  和  $55^{\circ}\text{C}$ ), 以确定最适反应温度, 测定方法同上。

**1.3.4 最适反应 pH 的测定** 将粗酶液置于不同 pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0) 的缓冲溶液中, 以 BApNA 为底物测定酶活力(测定方法同 1.3.2), 确定最适反应 pH 值。所用的缓冲液分别为 50 mmol/L 的  $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH 5.0~6.0)、50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0~9.0)、50 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  (pH 10.0~11.0)。

**1.3.5 金属离子对酶活的影响** 在 pH=8.0、 $40^{\circ}\text{C}$  条件下, 研究  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  金属离子对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响, 将上述金属离子与酶液混匀, 并在 pH=8.0、温度  $30^{\circ}\text{C}$  的条件下孵育 30 min, 然后进行酶活测试, 测定方法同上, 计算不同金属离子对酶活的影响。

抑制率计算公式: 抑制率(%)=(不含抑制剂的酶活力-含抑制剂的酶活力)/不含抑制剂的酶活力 $\times 100\%$ 。

**1.3.6 抑制剂对酶活的影响** 配制不同浓度的苯甲基磺酰氟(PMSF)、EDTA·2Na、碘乙酰胺(IAM)和甲苯磺酰-苯丙氨酸氯甲基酮(TPCK), 在 pH=8.0、温度  $30^{\circ}\text{C}$  的条件下孵育 30 min 后, 测试系列抑制剂对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响, 测定方法同上。

**1.3.7 EDTA·2Na 在不同温度下对蛋白酶活性的影响** 分别设定  $5^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}$ 、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$  和  $30^{\circ}\text{C}$

共6个温度梯度,测定在pH=8.0时,浓度为0.6 mmol/L的EDTA·2Na对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最适反应温度的测定

温度较大幅度控制着虾的生长发育,从而影响其体内蛋白酶的活性(薛素燕, 2015)。由图1可见,当pH=8.0时,温度为25~55℃的反应体系中,该蛋白酶都有活性。在温度为25~40℃范围内,随着温度的逐渐升高,蛋白酶的活性也在逐渐升高,在40℃时,蛋白酶的活性达到最大,在40~55℃范围内,其活性随着温度的升高而降低,最适反应温度为40℃。低温蛋白酶的最适反应温度大多在30~40℃,而目前所用蛋白酶一般为中温蛋白酶,最适反应温度多在50℃左右(Jiang *et al*, 1992); 南极水域水温常年在1~3℃,经过长期的进化适应,南极来源酶已具有适应低温环境的特殊机构和生理生化机制,也具有相对较低的最适反应温度(Salamanca *et al*, 2001),在低温下仍具有较高的活性。

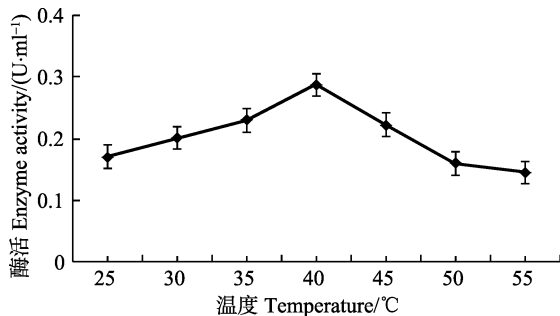


图1 温度对南极磷虾粗酶液中蛋白酶酶活的影响  
Fig.1 Effects of temperature on protease activity in Antarctic krill crude enzyme

### 2.2 最适 pH 的测定

酶的活性受环境 pH 值的影响极为显著, pH 值是酸碱度大小的反映,其对磷虾类生理活动的影响是多方面的。酸碱度的作用一方面是衡量环境因素的主要标志,另一方面也为蛋白酶提供适宜的 pH 值。通常各种酶只有在一定的 pH 值范围内才表现它的活性(李加儿等, 2009),在不同的 pH 条件下,影响酶的空间构象或影响酶分子活性中心有关基团的解离或是中间产物的解离状态,从而影响酶的活性。温度为40℃、不同 pH(5.0~11.0)下,蛋白酶活性随 pH 的变化情况如图2所示。在 pH 为7.0~8.0时,蛋白酶活性随 pH 的升高而急剧增加,在 pH 为8.0~9.0时,蛋白酶活性随 pH 的升高而急剧下降,表明南极磷虾粗

酶液中蛋白酶的最适反应 pH 为8.0。

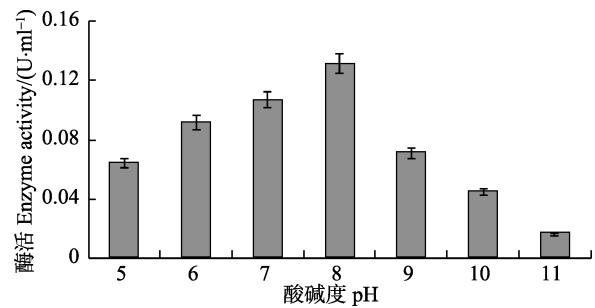


图2 pH对南极磷虾粗酶液中蛋白酶酶活的影响  
Fig.2 Effects of pH on protease activity in Antarctic Krill crude enzyme

### 2.3 金属离子对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活的影响

金属离子可以通过与小分子或酶分子活性中心的活性基团键合,导致蛋白酶的活性下降(王璋, 1997)。在pH=8.0、40℃条件下,Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Al<sup>3+</sup>和Ca<sup>2+</sup>金属离子对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响如图3所示,前5种金属离子均能有效抑制蛋白酶活性,且抑制效果随金属离子浓度增加而增强;当离子浓度为0.5 mmol/L时,Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>和Al<sup>3+</sup>金属离子对蛋白酶酶活的抑制率分别为55.02%、55.02%、35.39%、20.67%和41.12%,表明这些金属离子的加入能够有效抑制蛋白酶的催化活性,可以作为辅助的抑制剂。Ca<sup>2+</sup>是金属蛋白酶活性中心的辅助因子,在一定浓度下,能有效地激活该类蛋白酶的活性(李静等, 2017)。实验结果表明,随着Ca<sup>2+</sup>浓度的增加,南极磷虾粗酶液的活性也逐渐增加,表明该粗酶液中含有金属蛋白酶。

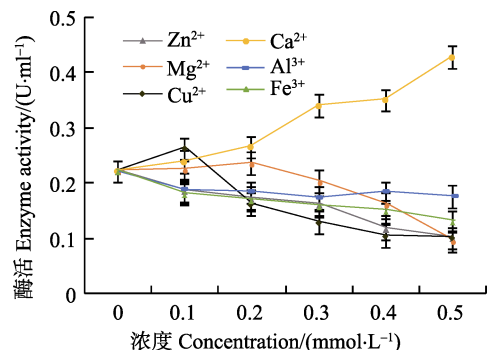


图3 金属离子对南极磷虾粗酶液中蛋白酶酶活的影响  
Fig.3 Effects of metal ions on protease activity in Antarctic Krill crude enzyme

### 2.4 抑制剂对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响

在pH=8.0、40℃条件下,向南极磷虾粗酶液中分别加入苯甲基磺酰氟(PMSF)、EDTA·2Na、碘乙酰

胺(IAM)或甲苯磺酰-苯丙氨酸氯甲基酮(TPCK)抑制剂, 蛋白酶活性的变化情况见图 4。PMSF(图 4a)和 EDTA·2Na(图 4b)对蛋白酶酶活具有较为显著的抑制作用, 抑制率随抑制剂浓度的增加而增大, PMSF 浓度为 8.0 mmol/L 时, 抑制率为 60%; EDTA·2Na 浓度为 0.6 mmol/L 时, 抑制率为 86.67%; IAM 的抑制效果呈现随底物浓度增加先增大再减小的趋势, 浓度为 2.5 mmol/L 时, 抑制率为 66.67%(图 4c); TPCK 低浓度时抑制效果不明显, 浓度升高时有一定的抑制作用(图 4d)。甲壳类中大多数消化酶属于丝氨酸蛋白酶和

金属蛋白酶(Garcia-Carreño *et al.*, 1994)。苯甲基磺酰氟(PMSF)和 EDTA·2Na 是典型的丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶抑制剂(Bustos *et al.*, 1999), 对本研究中南极磷虾粗酶液抑制效果明显。由于 PMSF 严重损害呼吸道粘膜、眼睛及皮肤, 因此, 不能用于食品加工行业。EDTA·2Na 是一种金属离子螯合剂, 含有 4 个羧基基团, 可与金属离子结合从而抑制蛋白酶的活性(戚正武, 2009), 可作为有效的蛋白酶抑制剂应用于南极磷虾的贮藏及运输过程中, 延缓南极磷虾的自溶及蛋白的降解, 提高南极磷虾的品质。

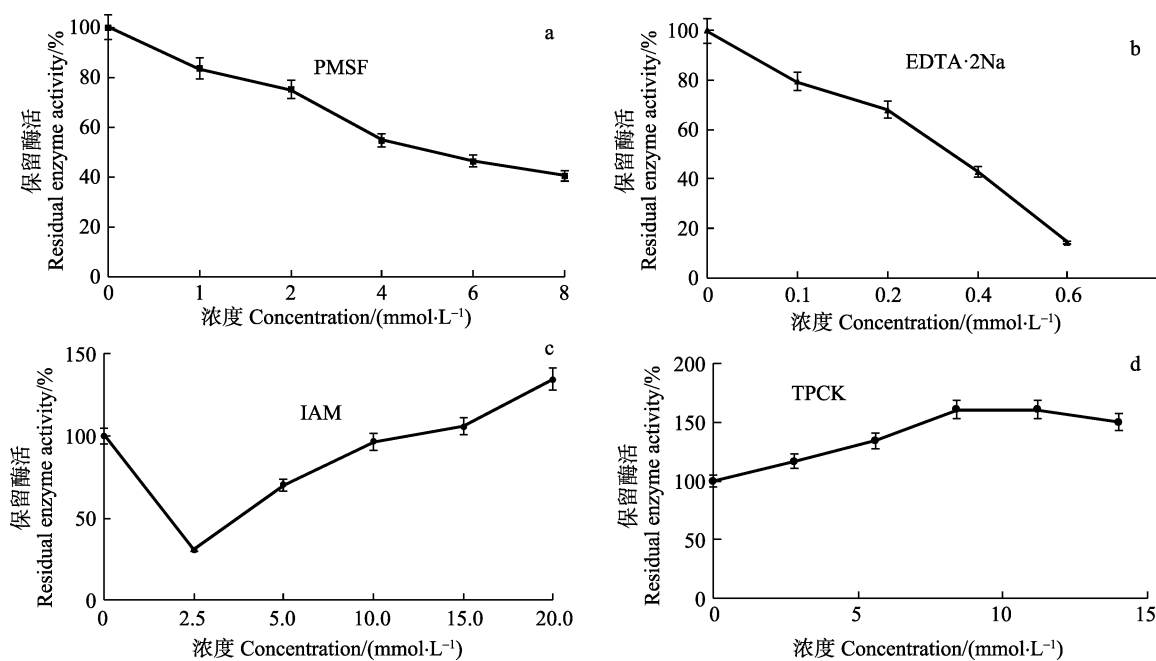


图 4 抑制剂对南极磷虾粗酶液中蛋白酶酶活的影响

Fig.4 Effects of inhibitors on protease activity in Antarctic Krill crude enzyme

### 2.5 EDTA·2Na 在不同温度下对南极磷虾粗酶液中蛋白酶活性的影响

为了进一步深入探讨 EDTA·2Na 在南极磷虾低温贮藏及运输过程中的应用, 研究了当 pH=8.0、EDTA·2Na 浓度为 0.6 mmol/L 时, 温度对酶活抑制率的影响(图 5)。由图 5 可知, 在 5~30℃ 的低温范围内, 随着温度的升高, EDTA·2Na 对酶活的抑制效果逐渐增加, 到室温 25℃ 时, 抑制率已经到达 72.82%, 当温度为 30℃ 时, 抑制率达到 85.02%。由此可知, EDTA·2Na 能够作为南极磷虾蛋白酶的抑制剂用于南极磷虾的贮藏和运输。

## 3 结论

从 1984 年首次南极考察开始, 我国就把南极磷虾资源的研究作为重要的考察内容, 经过几十年的探

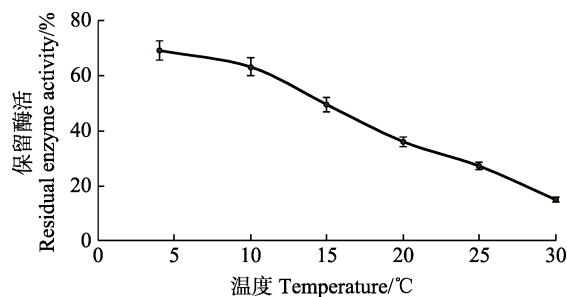


图 5 EDTA·2Na 在不同温度下对粗酶液中蛋白酶活性的影响

Fig.5 Effects of EDTA·2Na at different temperature on protease activity in Antarctic krill crude enzyme

索与积累, 对其生态系统功能与结构已经有了较为系统的认知, 其商业性开发方兴未艾(苏学锋等, 2012)。在传统海洋生物资源日趋衰退或枯竭的背景下, 南极磷虾作为全球最大的单种生物资源之一, 对缓解人类

对水产品的需求具有重要意义(刘志东等, 2012)。本研究阐明了南极磷虾粗酶中蛋白酶的基础酶学性质, 开发的抑制剂能够有效抑制酶的活性, 能够有效缓解南极磷虾及其制品的品质劣化, 对南极磷虾及其制品的加工存储提供了实验支撑。

## 参 考 文 献

- Auerswald L, Meyer B, Teschke M, *et al.* Physiological response of adult Antarctic krill, *Euphausia superba*, to long-term starvation. *Polar Biology*, 2015, 38(6): 763–780
- Bustos RO, Romo CR, Healy MG. Purification of protease-like enzymes from Antarctic krill processing wastewater. *Process Biochemistry*, 1999, 35(3–4): 327–333
- Garcia-Carreño FL, Hernandez-Cortes PM, Haard NF. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(7): 1456–1461
- Jiang ST, Moody MW, Chen HC. Purification and characterization of protease from digestive tract of grass shrimp. *Food Science*, 1992, 56(2): 322–326
- Kimoio K, Kusama S, Murakami K. Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2006, 47(3): 529–534
- Li J, Zhang J, Zhao YX. Progress in research work field with respect to effects of metal ions on protease. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2017, 47(6): 345–351 [李静, 张剑, 赵永祥. 金属离子对蛋白酶作用的研究进展. *日用化学工业*, 2017, 47(6): 345–351]
- Li JR, Zhang JQ, Xu XJ, *et al.* Effects of temperature and pH on the protease and amylase activities in skewband grunt *Haplochromis nitens*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 8–12 [李加儿, 张建强, 许晓娟, 等. 温度和 pH 值对斜带髭鲷蛋白酶、淀粉酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 8–12]
- Li LN. Total production of krill fishing in the Antarctic in 2016 is  $25.83 \times 10^4$  t. *Fishery Information and Strategy*, 2017(1): 77–78 [李励年. 2016 年南极磷虾捕捞总产量  $25.83 \times 10^4$  t. *渔业信息与战略*, 2017(1): 77–78]
- Liu L. Biological characteristics and development prospect of Antarctic krill. *Farm Products Processing*, 2015(5): 60–61 [刘丽. 南极磷虾的生物特性及其开发前景. *农产品加工*, 2015(5): 60–61]
- Liu ZD, Qu YH, Wang Y, *et al.* The development of the bioactive substances of the Antarctic krill. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(10): 1491–1495 [刘志东, 曲映红, 王媛, 等. 南极磷虾生物活性物质的研究进展. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(10): 1491–1495]
- Nie YC, Zhang B, Zhao XY, *et al.* Seasonal variation in lipids and protein content of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 1–7 [聂玉晨, 张波, 赵宪勇, 等. 南极磷虾(*Euphausia superba*)脂肪与蛋白含量的季节变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 1–7]
- Qi ZW. Research retrospect on small molecule protease inhibitors and peptide toxins. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(18): 2734–2745 [戚正武. 小分子蛋白酶抑制剂及多肽毒素的研究回顾. *科学通报*, 2009, 54(18): 2734–2745]
- Salamanca MH, Barria C, Asenjo JA, *et al.* Isolation, purification and preliminary characterization of cryophilic proteases of marine origin. *Bioseparation*, 2001, 10(4): 237–241
- Siegel V. The Antarctic krill: Resource and climate indicator, 35 years of German krill research. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(S1): 41–46
- Sjödahl J, Emmer Å, Karlstam B, *et al.* Separation of proteolytic enzymes originating from Antarctic krill (*Euphausia superba*) by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, 705(2): 231–241
- Sjödahl J, Emmer Å, Vincent J, *et al.* Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Protein Expression and Purification*, 2002, 26(1): 153–161
- Su XF, Feng DN. Development characteristics and trends of Antarctic krill industry. *Food Research and Development*, 2012, 33(12): 214–217 [苏学锋, 冯迪娜. 南极磷虾产业开发特点及发展趋势. *食品研究与开发*, 2012, 33(12): 214–217]
- Wang NP, He L, Cao J, *et al.* Characteristics and utilization of Antarctic krill. *Fisheries Science & Technology Information*, 2012, 39(3): 128–131 [王南平, 何兰, 曹俊, 等. 南极磷虾的特性和利用. *水产科技情报*, 2012, 39(3): 128–131]
- Wang Z. *Food Enzymology*. Beijing: China Light Industry Press, 1997, 176–202 [王璋. *食品酶学*. 北京: 中国轻工出版社, 1997, 176–202]
- Wu ZQ, Wang JR, Shang XM. Purification and characterization of cold adapted proteases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2014, 20(4): 531–543
- Xue SY, Mao YZ, Zhao FZ, *et al.* Effects of temperature on the feeding rate and the digestive enzymes activities of *Eogammarus possjeticus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 95–98 [薛素燕, 毛玉泽, 赵法箴, 等. 温度对中华原钩虾(*Eogammarus possjeticus*)摄食率和消化酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 95–98]
- Yue DD, Wang LM, Huang HL, *et al.* Status of development and countermeasures on utilization technology of Antarctic krill resources in China. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(3): 159–166 [岳冬冬, 王鲁民, 黄洪亮, 等. 我国南极磷虾资源开发利用技术发展现状与对策. *中国农业科技导报*, 2015, 17(3): 159–166]

## Study on the Basic Enzymatic Properties of Protease in Crude Enzyme of Antarctic Krill and the Development of Inhibitors

CHEN Yixuan<sup>1,2</sup>, CHEN Xin<sup>2,4</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, HUI Yanxing<sup>1,2</sup>,  
SHENG Jun<sup>2</sup>, XU Haibo<sup>1①</sup>, XU Jiakun<sup>2,3①</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100;  
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Drugs and Byproducts of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;  
4. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** The effects of reaction temperature, pH, and metal ions ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ , and  $Ca^{2+}$ ) on the protease activity of crude enzymes of Antarctic krill were studied, and the inhibitory effects of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), EDTA·2Na, iodoacetamide (IAM), and toluenesulfonyl-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) on protease activity also were investigated. The experimental results indicated the optimum reaction temperature of the protease in the crude enzyme of Antarctic krill was 40 °C, and the optimum pH was 8.0; when the metal ion concentration was 0.5 mmol/L, the inhibitory rates of  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , and  $Al^{3+}$  on the protease activity of Antarctic krill were 55.02%, 55.02%, 35.39%, 20.67%, and 41.12% respectively, while protease activity increased in the presence of  $Ca^{2+}$ . The protease activity was significantly inhibited by PMSF and EDTA·2Na. When the concentration of PMSF was 8.0 mmol/L, the inhibition rate was 60%; when the concentration of EDTA·2Na was 0.6 mmol/L, the inhibition rate was 86.67%. IAM had a certain inhibitory effect at low concentrations, while TPCK showed no inhibitory effect. With the increase in temperature, the inhibitory effect of EDTA·2Na on enzyme activity was gradually increased in the temperature range of 5–30 °C. This study clarified the factors affecting the enzyme activity of Antarctic krill crude enzyme and developed an inhibitor of protease activity thereof, which provides the basic theoretical data for the development and utilization of Antarctic krill in the food industry.

**Key words** Antarctic Krill; Crude enzyme; Basic enzymatic properties; Inhibitors

① Corresponding author: XU Haibo, E-mail: xuwangri@163.com; XU Jiakun, E-mail: xujk@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170706001

http://www.yykxjz.cn/

周殿芳, 吕磊, 周剑光, 甘金华, 彭婕, 何力. 长江流域黄鳝中全氟化合物的残留特征及其来源探讨. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 158-165

Zhou DF, Lü L, Zhou JG, Gan JH, Peng J, He L. Residual characteristics and source of perfluorinated compounds in *Monopterus albus* of the Yangtze River. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 158-165

# 长江流域黄鳝中全氟化合物的残留特征 及其来源探讨



周殿芳 吕磊 周剑光 甘金华 彭婕 何力<sup>①</sup>

(中国水产科学研究院长江水产研究所 农业农村部水产品质量安全风险评估实验室 武汉 430070)

**摘要** 为探究长江中上游养殖黄鳝(*Monopterus albus*)中全氟化合物(Perfluorinated compounds, PFCs)的残留特征和污染来源, 调查研究了 2015~2016 年采自于湖南、湖北、江西、安徽、四川和重庆 10 个城市的 150 份黄鳝样品, 同时, 2016 年在湖北省潜江市黄鳝养殖基地追踪了黄鳝养殖过程中的 PFCs 污染可能来源, 并探究黄鳝中 PFCs 的来源。样品经提取, 通过 C18 和碳黑(GCB)净化, 利用超高效液相色谱-串联质谱联用分析了 19 种 PFCs 的含量, 并对数据进行分析。结果显示, 长江流域黄鳝中 PFCs 共 8 种物质残留, 主要污染物是全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS); 长江流域 PFCs 污染最严重的是湖北省黄鳝, 其次是江西省黄鳝; PFOS 在湖北省黄鳝中含量最高, 为 5.42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , PFOA 在四川省黄鳝中含量最高, 为 3.66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 同时, 对整个黄鳝养殖过程进行追踪, 结合黄鳝的特殊养殖方式, 发现黄鳝中 PFCs 污染主要来源于黄鳝养殖中摄食的蚯蚓以及所处的养殖环境, 包括池塘水和土壤。

**关键词** 全氟化合物; 黄鳝; 残留特征; 来源

中图分类号 S912 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0158-08

全氟化合物(Perfluorinated compounds, PFCs)是一类含有极高化学键能(约 110 kcal/mol)的 C-F 共价键的新型有机污染物(Persistent organic pollutants, POPs), 因其具有疏油、疏水特性, 广泛用于纺织、造纸、包装、农药和消防等工业和民用领域, 但这类化合物有极强的稳定性(Awad *et al.*, 2011), 在热、光、化学和高等生物等条件下难以降解, 易与蛋白质结合(Bischel *et al.*, 2010)并随食物链的放大在生物体内富集(王亚群等, 2010)。杨帆等(2014)研究表明, PFCs 具有持续性、生物积累毒性(Persistent, Bioaccumulative, Toxicants, PBT), 尤其是对幼儿有潜在的发育神

经毒性; 另外, 彭思远等(2012)研究发现, PFCs 中的全氟辛酸(Perfluorooctanoic acid, PFOA)及其盐类通过干扰众多的代谢途径从而破坏人体的正常生理机能; 同时, Gulkowska 等(2006)推断, 饮食摄入是 PFCs 富集的主要途径。鉴于 PFCs 的危害, 2011 年 3 月, 欧盟委员会发布了 2010/161/EU 号(2011)议案, 提议对鱼、肉等各类动物源性食品开展全氟化合物(PFCs)的监控。

Haug 等(2010)研究发现, 水产品的消费是普通人群 PFCs 暴露的一个主要来源。Schuetze 等(2010)对德国野生鱼类进行 PFCs 检测, 发现全氟辛烷磺酸

\* 国家科技基础性工作专项(2014FYZ30100)资助 [This work was supported by National Basic Science and Technology Major Project (2014FYZ30100)]. 周殿芳, E-mail: haiyudianfang@163.com

① 通讯作者: 何力, E-mail: heli28@sohu.com

收稿日期: 2017-07-06, 收修改稿日期: 2017-08-08

(Perfluorooctanesulfonic acid, PFOS)浓度高达 225  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 同年, Hradkova 等(2010)对捷克市场上的鱼罐头和水产品进行检测发现, 主要有 PFOA 和 PFOS 残留。Domingo 等(2012)对西班牙加泰罗尼亚地区的水产品中检测出 7 种 PFCs, 浓度最高的是 PFOS, 浓度范围为 0.35~5.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。He 等(2015)对丹江口和汉江的鱼类进行检测, 发现 PFOS 是鱼类肌肉及其肝脏的主要污染物, PFOS 浓度范围为 0.45~15.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。长江流域位于中国中部的中纬度亚热带地区, 横贯中国的东西部, 孕育了丰富的渔业资源和发达的渔业, 长江流域淡水渔业产量一直占中国淡水渔业的 60%以上(王利民等, 2004)。但近年来, 由于环境破坏、工业化增加, 导致养殖渔业环境恶化, 鱼类污染严重。前期对长江流域水产品的 PFCs 残留研究发现, 黄鳝(*Monopterus albus*)中 PFCs 检出率相对其他鱼类品种高出很多, 其检出率为 78.5%(周殿芳等, 2016)。

近几年, 黄鳝养殖规模越来越大。据渔业信息报道, 长江流域湖北省共有黄鳝养殖网箱 448 万口, 养殖面积达到 4.9 万  $\text{hm}^2$ , 黄鳝总产量占全国总产量的一半; 另外, 黄鳝的平均收益是常规鱼类品种的 2.5 倍以上; 因此, 对黄鳝中 PFCs 的残留研究很有必要。黄鳝为底栖性鱼类, 适应能力较强, 在自然条件下, 多栖息于河流、池塘、湖泊、水田和沟渠等静水体的埂边钻洞穴居; 在养殖环境中, 大多采用网箱养殖。因这两种特殊的养殖方式, 黄鳝中的 PFCs 污染来源复杂。但黄鳝是一种以动物性食物为主的杂食性鱼类, 网箱养殖过程中, 黄鳝驯化初期, 主要摄食蚯蚓、蝌蚪、小杂鱼虾、螺蛳、河蚌肉等, 养殖后期大多采用白鲢鱼糜以及饲料拌喂养殖。因此, 调查蚯蚓、白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、土壤、饲料以及养殖环境中的 PFCs 能够更好地探明黄鳝中 PFCs 残留的污染来源。

本研究围绕长江中上游湖南(长沙、岳阳)、湖北(武汉、荆州)、江西(九江、南昌)、安徽(安庆、合肥)、四川(成都)和重庆 10 个城市, 于 2015~2016 年分 4 个季度采集 150 份市售黄鳝样品, 并对其 PFCs 的含量和残留特征进行分析; 同时, 在湖北省潜江市黄鳝养殖基地, 追踪整个养殖过程中的 PFCs 残留, 监测了土壤、池塘水、蚯蚓、白鲢和饲料中的 PFCs 残留, 并对其进行分析。本研究的目的是探索黄鳝中 PFCs 的污染状况及其来源, 从而为 PFCs 污染的削减与控制提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与标准物质

实验所用主要试剂均为色谱纯, 试剂和标样以及

标样配制方法参照周殿芳等(2016)。PFCs 19 种标准物质: 全氟丁酸(Perfluorobutanoic acid, PFBA)、全氟戊酸(Perfluoropentanoic acid, PFPeA)、全氟己酸(Perfluorohexanoic acid, PFHxA)、全氟庚酸(Perfluoroheptanoic acid, PFHpA)、全氟辛酸(PFOA)、全氟壬酸(Perfluorononanoic acid, PFNA)、全氟癸酸(Perfluorodecanoic acid, PFDA)、全氟十一烷酸(Perfluoroundecanoic acid, PFUDA)、全氟十二烷酸(Perfluorododecanoic acid, PFDoA)、全氟十三烷酸(Perfluorotridecanoic acid, PFTrDA)、全氟十四烷酸(Perfluorotetradecanoic acid, PFTeDA)、全氟十六烷酸(Perfluorohexadecanoic acid, PFHxDA)、全氟十八烷酸(Perfluorooctadecanoic acid, PFODA)、全氟丁烷磺酸(Perfluorobutanesulfonic acid, PFBS)、全氟己烷磺酸(Perfluorohexanesulfonic acid, PFHxS)、全氟庚烷磺酸(Perfluoroheptanesulfonic acid, PFHpS)、全氟辛烷磺酸(PFOS)、全氟癸烷磺酸(Perfluorodecanesulfonic acid, PFDS)、全氟辛烷磺酰胺(Perfluorodecanesulfonic acid, PFOSA)(Wellington Laboratories 公司)。

### 1.2 样品采集

**1.2.1 市售黄鳝样品** 2015~2016 年分别在长江中上游湖南(长沙、岳阳)、湖北(武汉、荆州)、江西(九江、南昌)、安徽(安庆、合肥)、四川(成都)和重庆共 10 个城市的农贸市场、批发市场、养殖基地和超市采集了黄鳝样品 150 个(5 尾/个), 每个省份分 4 个季度均匀采集样品。

**1.2.2 黄鳝养殖过程中 PFCs 污染来源样品** 在湖北省潜江市养殖基地设置 3 个网箱养殖黄鳝, 分别检测黄鳝、水样、土壤以及黄鳝食物(蚯蚓、饲料和白鲢)中的 PFCs, 追踪黄鳝养殖过程中 PFCs 污染来源。

5~9 月期间, 每月每个网箱采集样品 1 次, 每次 1 个网箱采集 3 个平行样品, 每个平行样品采集黄鳝 5 尾。

设置 2 个采样地点(网箱养殖池塘和养殖池塘边上的沟渠), 均在入水口采集水样, 5~9 月期间, 每月每个采样点采集 3 个平行样品, 水样用 500 ml 聚丙烯管采集并存放, 每个样品采集 500 ml。

设置 2 个采样地点(池塘底部和池塘边田埂), 于 5~9 月期间, 每月每个采样点采集 3 个平行样品, 池塘底部用采泥器采集泥样。

黄鳝是杂食性鱼类, 以鱼类拌饲料为主食, 因此, 选择蚯蚓、白鲢以及饲料, 5~9 月期间, 每月隔 10 d 采集 1 次投喂的蚯蚓、白鲢以及饲料。

### 1.3 样品前处理

**1.3.1 水样** 水样在采样后 72 h 内进行前处理,水样采用 C18 固相萃取柱进行净化,然后甲醇洗脱,氮气吹干,1 ml 甲醇水(1:1, v/v)定容,以 12000 r/min 高速离心 10 min,吸取上清液过 0.22 μm 滤膜,供 HPLC-MS/MS 分析。

**1.3.2 黄鳝、蚯蚓、土壤和饲料** 黄鳝、蚯蚓、白鲢采集后,均质匀浆,即置于-20℃的冰柜中冷藏备用;土壤采集后,50℃恒温烘干,磨成粉末备用;饲料磨成粉末备用。土壤、饲料、蚯蚓和黄鳝样品按照周殿芳等(2015)进行前处理,并运用仪器检测。

称取 5.00 g 匀质试样,于 50 ml 聚丙烯(PP)离心管中,加入内标物(<sup>13</sup>C<sup>4</sup>-全氟辛酸 1 ng、<sup>13</sup>C<sup>4</sup>-全氟辛烷磺酸 5 ng, <sup>13</sup>C<sup>8</sup>-全氟辛烷磺酰 5 ng),再加入超纯水 5 ml,涡旋混匀后再加入 2%甲酸乙腈 10 ml,涡旋均质 1 min,再加入 4 g 无水 MgSO<sub>4</sub>、1 g NaCl,立即涡旋混匀(避免 MgSO<sub>4</sub> 结块),以 8000 r/min 离心 5 min,上清液移至 15 ml 聚丙烯离心管中,待净化。

往 15 ml 聚丙烯离心管中加入 200 mg C18 填料粉末、100 mg 石墨化碳黑(GCB)和 1.5 g 无水 MgSO<sub>4</sub>,充分涡旋后,8000 r/min 离心 5 min,上清液于玻璃氮吹管中,45℃氮吹至干,加入 1 ml 甲醇水(1:1, v/v)定容,以 12000 r/min 高速离心 10 min,吸取上清液过

0.22 μm 滤膜后,供 HPLC-MS/MS 分析。

### 1.4 样品检测

液相色谱条件:Thermo Hypersil GOLD 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 5 μm);Thermo Hypersil GOLD 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 5 μm);柱温:40℃;流速:0.20 ml/min;进样量:25 μl;流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液,B 为甲醇;洗脱梯度:0~8 min,40%~95%甲醇;8~11 min,95%甲醇;11~11.01 min,95%~40%甲醇;11.01~15 min,40%甲醇。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),多反应监测(SRM),负离子模式;喷雾电压:3000 kV;鞘气:30 L/min;辅助气:20 L/min;离子传输毛细管温度:270℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测方法的评价

为保证实验结果的准确性,实验过程中所使用器皿均选择聚丙烯材质,同时,使用前用甲醇和超纯水淋洗,另外,每种基质进行 3 个不同浓度的加标回收率实验,结果见表 1。以 3 倍信噪比计算仪器检出限,另外,由仪器检出限和样品用量计算出方法检出限,结果见表 1。

表 1 方法的检出限及回收率  
Tab.1 LOD and recovery of this method

化合物 Compounds	回收率 Recovery (Mean±SD) (%)						检出限 LOD (μg/kg)
	水样 Water	土壤 Soil	黄鳝 <i>M. albus</i>	饲料 Feed	蚯蚓 Earthworm	白鲢 <i>H. molitrix</i>	
PFBA	85.3±1.5	76.5±1.2	88.6±2.5	75.3±1.4	79.4±2.5	85.3±1.5	0.1
PFPeA	86.1±2.1	81.4±1.6	80.6±1.7	76.1±3.1	84.5±2.4	86.1±2.1	0.1
PFHxA	68.5±1.8	76.5±2.4	85.6±2.8	68.2±4.3	78.2±1.8	78.2±1.8	0.1
PFHpA	74.2±2.4	73.6±3.6	84.2±2.4	74.2±5.2	74.2±2.9	74.2±2.4	0.1
PFOA	82.1±3.4	74.6±4.1	92.1±3.4	72.1±2.6	82.1±5.4	93.1±1.6	0.1
PFNA	85.3±5.3	81.4±4.5	85.3±4.2	75.3±3.5	75.3±4.3	85.3±7.6	0.1
PFDA	76.7±2.1	83.4±1.6	86.7±2.5	66.7±8.9	86.7±2.1	86.7±5.4	0.1
PFUdA	74.6±2.4	72.6±5.3	74.6±2.4	74.6±3.2	74.6±3.4	74.6±2.4	0.1
PFDoA	81.3±2.9	84.6±2.3	81.3±2.9	71.3±5.4	81.3±5.7	85.3±4.2	0.1
PFTTrDA	78.2±3.1	80.7±2.8	88.2±3.1	78.2±6.8	78.2±5.1	88.2±5.8	0.1
PFTeDA	76.4±3.7	72.3±3.4	76.4±5.9	76.4±4.8	76.4±2.6	76.4±6.7	0.1
PFHxDA	71.3±2.6	74.6±2.1	71.3±2.6	61.3±5.1	81.3±2.6	71.3±3.5	0.1
PFODA	75.6±2.9	72.3±3.4	75.6±2.9	75.6±4.8	75.6±6.9	75.6±3.4	0.1
PFBS	76.4±4.7	81.4±5.1	76.4±4.7	66.4±5.6	76.4±5.2	76.4±4.1	0.1
PFHxS	74.3±2.9	73.4±1.8	84.3±2.9	74.3±5.4	74.3±4.5	84.3±5.7	0.1
PFHpS	75.3±3.6	76.5±4.2	85.3±3.6	75.3±4.8	75.3±5.6	85.3±2.8	0.1
PFOS	75.3±5.4	70.4±1.9	85.3±2.5	65.3±6.1	75.3±2.8	86.3±2.7	0.1
PFDS	81.3±5.7	78.5±4.5	81.3±5.7	71.3±3.4	71.3±4.7	85.6±1.8	0.1
PFOSA	78.6±4.3	74.5±2.8	78.6±4.3	68.6±1.9	68.6±4.3	85.1±2.7	0.1

### 2.2 长江流域黄鳝中 $\Sigma$ PFCs 的含量

长江流域黄鳝中 $\Sigma$ PFCs 含量见图 1。污染最严重的是湖北省黄鳝, 武汉市黄鳝的 $\Sigma$ PFCs(以湿重计, 下同)含量值为 8.38  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 荆州市黄鳝为 6.86  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。其次是江西省黄鳝, 南昌和九江黄鳝的 $\Sigma$ PFCs 值分别为 6.59 和 6.24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 安徽省安庆和合肥采集的黄鳝中 $\Sigma$ PFCs 值相对较低, 分别为 5.95 和 5.14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 而四川成都市采集的黄鳝中 $\Sigma$ PFCs 处于中间水平, 为 4.58  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。重庆市和长沙市黄鳝中 $\Sigma$ PFCs 浓度值一样, 为 3.78  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 岳阳市黄鳝的 $\Sigma$ PFCs 值最低, 为 3.26  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。同时, 重庆、长沙和岳阳的浓度值比武汉市的一半还低。Wang 等(2010)研究表明, 武汉是 PFOS 的主要生产基地, 国内 70% PFOS 来源于武汉; 同时, 武汉市废水中的高浓度 PFCs 污染, 可以合理解释武汉市黄鳝的高 $\Sigma$ PFCs 污染残留。

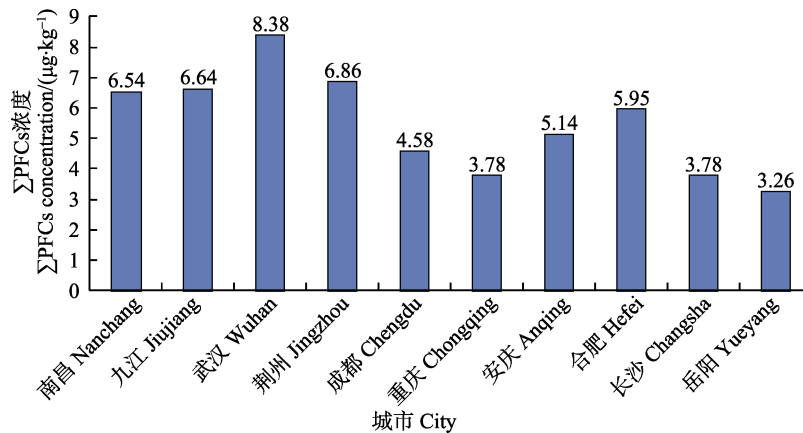


图 1 长江流域黄鳝中 $\Sigma$ PFCs 的浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 湿重)

Fig.1 The concentration of  $\Sigma$ PFCs in *M. albus* of the Yangtze River ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wet weight)

表 3 与其他地区鱼类的 PFCs 浓度对比( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 湿重)

Tab.3 Comparison of PFCs in fish of other areas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wet weight)

地区 Area	PFOA	PFNA	PFDA	PFOS	PFUdA	PFDoA	参考文献 Reference
青藏高原 Qinghai-Tibet Plateau	0.5~1.86	/	1.0~1.95	0.15~7.54	0.7~2.75	/	Shi 等(2010)
江苏 Jiangsu	n.d.~1.51	n.d.~0.2	/	n.d.~0.33	n.d.~0.22	/	Wu 等(2012)
浙江 Zhejiang	n.d.~0.48	/	/	n.d.~0.54	n.d.~0.18	/	
福建 Fujian	n.d.~0.46	/	/	n.d.~0.42	n.d.~0.15	/	
香港 Hong Kong	0.22~0.70	0.15~0.18	0.2~0.21	n.d.~0.9	n.d.~0.14	/	Zhao 等(2011)
厦门 Xiamen	0.2~0.6	0.12~0.15	0.1~0.16	n.d.~1.2	n.d.~0.16	/	
黄河 Yellow River	n.d.~0.17	n.d.~0.18	/	n.d.~0.27	/	/	Peng 等(2010)
辽宁 Liaoning	n.d.~0.4	/	/	n.d.~0.16	/	/	Wu 等(2012)
山东 Shandong	n.d.~0.1	/	/	n.d.~0.2	n.d.~0.2	/	
丹江口 Danjiangkou	0.1~5.55	0.18~4.54	0.18~5.71	0.45~15.9	0.27~13.3	0.17~12.8	He 等(2015)
广州 Guangzhou	n.d.~2.5	n.d.~2.5	n.d.~2.5	0.67~2.93	0.25~0.65	/	Gulkowska 等(2006)
舟山 Zhoushan	n.d.~2.5	n.d.~2.5	n.d.~2.5	0.38~1.77	0.25~0.48	/	
长江流域 Yangtze River	n.d.~13.5	n.d.~2.25	n.d.~1.59	n.d.~30.7	n.d.~3.97	n.d.~0.59	本研究 This study

注: n.d.表示未检出, 下同 Note: n.d.: Not detected. The same as below

所有黄鳝样品中 $\Sigma$ PFCs 总含量均值为 5.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。与国内其他省份进行比较发现, 黄鳝 $\Sigma$ PFCs 残留低于国内青藏高原几大淡水湖(Shi *et al*, 2010)、江苏、浙江和福建(Wu *et al*, 2012)以及香港和厦门(Zhao *et al*, 2011)的鱼类, 但高于黄河(Peng *et al*, 2010)以及辽宁和山东(Wu *et al*, 2012)的鱼类。同时, He 等(2015)研究发现, 丹江口鱼体内的 $\Sigma$ PFCs 为 8.76  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 黄鳝体内相对低些。而 Gulkowska 等(2006)检测我国广州和舟山的海产品中的 PFCs, 发现所有样品中均含有 PFCs, 而且浓度最高的是广州的口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*), 其值为 3.17  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。相比较, 黄鳝体内高些。

### 2.3 长江流域黄鳝中 PFCs 的残留特征

由表 4 和图 2 可知, 在所有被检测的 19 种 PFCs

表4 长江流域黄鳝中 PFCs 的含量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 湿重)  
Tab.4 The content of PFCs in *M. albus* of the Yangtze River ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wet weight)

省份 Province		PFOA	PFNA	PFDA	PFUdA	PFDoA	PFTTrDA	PFOS	PFOSA
江西	均值 Mean	2.72	0.67	0.91	1.06	0.15	0.17	5.17	n.d.
Jiangxi	范围 Range	n.d.~8.04	n.d.~1.53	n.d.~1.37	n.d.~2.64	n.d.~0.39	n.d.~0.5	n.d.~21.76	n.d.
湖北	均值 Mean	0.31	0.52	0.60	0.96	0.14	0.31	5.42	0.15
Hubei	范围 Range	n.d.~0.62	n.d.~0.95	n.d.~1.07	n.d.~2.85	n.d.~0.51	n.d.~1.28	n.d.~30.7	n.d.~0.34
四川	均值 Mean	3.66	0.44	0.35	0.43	n.d.	n.d.	1.92	n.d.
Sichuan	范围 Range	n.d.~13.5	n.d.~0.85	n.d.~1.14	n.d.~0.78	n.d.	n.d.	n.d.~3.46	n.d.
安徽	均值 Mean	0.27	0.44	0.74	1.22	0.18	0.19	3.93	n.d.
Anhui	范围 Range	n.d.~0.55	n.d.~1.01	n.d.~1.53	n.d.~3.97	n.d.~0.29	n.d.~0.32	n.d.~13.5	n.d.
湖南	均值 Mean	0.93	1.00	0.71	0.87	n.d.	n.d.	4.61	n.d.
Hunan	范围 Range	n.d.~1.87	n.d.~2.25	n.d.~1.59	n.d.~2.09	n.d.	n.d.	n.d.~8.29	n.d.
重庆	均值 Mean	1.46	0.36	0.25	0.27	n.d.	n.d.	2.31	n.d.
Chongqing	范围 Range	n.d.~4.83	n.d.~0.76	n.d.~1.36	n.d.~0.56	n.d.	n.d.	n.d.~3.65	n.d.

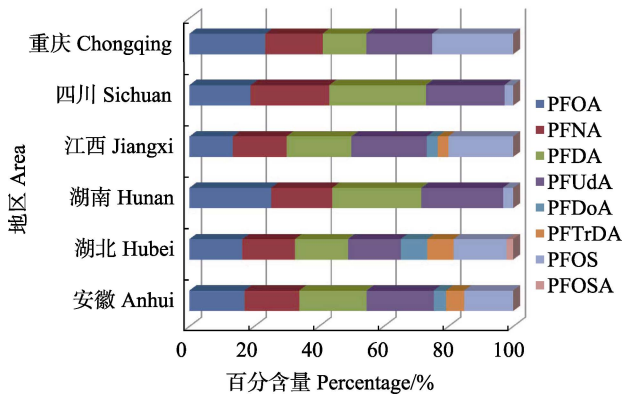


图2 长江流域黄鳝中 PFCs 的组成

Fig.2 Composition of PFCs in *Monopterus albus* of the Yangtze River

中,共检出8种物质,分别是PFOA、PFNA、PFDA、PFUdA、PFDoA、PFTTrDA、PFOS和PFOSA。湖北省黄鳝中8种物质均有检出;江西、安徽黄鳝中的PFCs残留物是PFOA、PFDA、PFNA、PFOS、PFUdA、PFDoA和PFTTrDA。四川、湖南以及重庆黄鳝中主要PFCs残留物是PFDA、PFOA、PFNA、PFUdA和PFOS。

湖北省黄鳝 $\Sigma$ PFCs污染最严重,54.6%的黄鳝中检出PFOS,含量范围为n.d.~30.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均含量为5.42 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,是5个省份中最高的;其次是江西省,黄鳝PFOS含量范围为n.d.~21.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均含量为5.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;同时,其PFOA污染仅次于四川省,含量范围为n.d.~8.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均含量为2.72 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;安徽和湖南黄鳝主要的污染物也是PFOS;重庆黄鳝主要污染物是PFOA和PFOS,它们百分含量相当,分别为1.46和2.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。值得注意的是,四川省黄鳝最主要的污染物是PFOA,49.8%的样品中均检出,

其相应范围为n.d.~13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均值为3.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。其原因可能有:一是吴江平等(2010)研究指出,四川的地形是盆地,其温度、光照强度等环境特征更有利于有机污染物在山区沉降或者储存;二是邢新丽(2009)研究发现,四川的工业化程度和经济水平相对落后,可能未使用环保的物质来代替PFCs,而PFOA及其盐类是PTEE、含氟塑料以及其他表面活性剂等生产的一种过程酸,因此,四川省中PFOA的污染较为严重,黄鳝在这种相对高污染PFOA环境下养殖,导致其残留比其他地区较高。

## 2.4 黄鳝养殖过程中 PFCs 污染来源

本研究尝试追踪整个养殖过程的环境以及投喂食物中的PFCs来探讨黄鳝中PFCs的污染来源。在潜江选定了实验池塘,按照实验设计设置3个网箱养殖黄鳝,按照规定时间采集样品并进行分析,结果见图3和图4。

养殖黄鳝样品中主要的污染物是PFOA和PFOS,PFNA、PFDA、PFUdA和PFDoA残留有少量检出。蚯蚓中的主要污染物也是PFOA和PFOS:养殖初期,蚯蚓中PFOA和PFOS均比黄鳝体内的高;养殖后期,黄鳝中PFOA缓慢增加,而PFOS则呈直线增加。所采集的土壤和池塘水在养殖过程中一直存在PFCs污染,主要污染物是PFOA和PFOS。

整个养殖过程中所采集的蚯蚓,其 $\Sigma$ PFCs值是所有介质中最高的,而在黄鳝养殖驯化初期(5~6月),主要以摄食蚯蚓为主。因此,随着食物链放大从而在黄鳝体内富集,黄鳝在养殖初期其体内的 $\Sigma$ PFCs残留可能来源之一为蚯蚓。黄鳝养殖后期主要以饲料和白

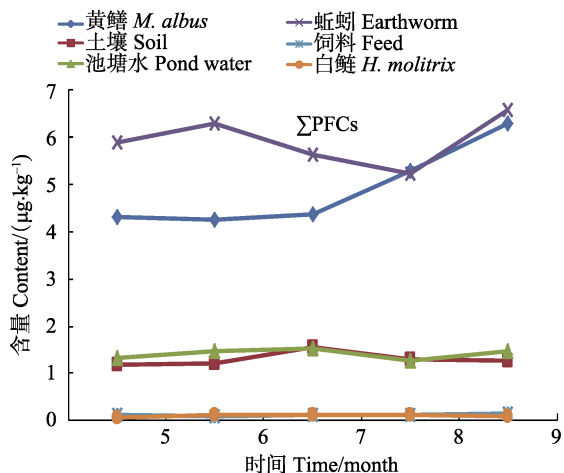


图 3 养殖过程中各介质ΣPFCs 含量

Fig.3 The content of ΣPFCs in the breeding process

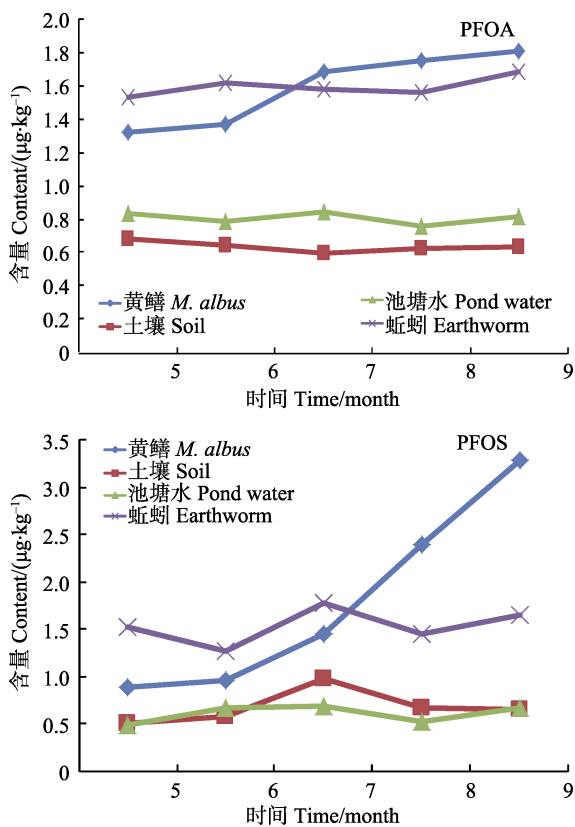


图 4 养殖过程中各介质 PFOA 和 PFOS 的含量

Fig.4 The content of PFOA and PFOS in the breeding process

鳝为主, 饲料和白鳝在整个养殖过程中ΣPFCs 没有明显变化, 检出值很低(约 0.1 µg/kg), 饲料和白鳝对黄鳝中 PFCs 污染贡献相对不明显, 但ΣPFCs 逐渐增加, 而池塘水和土壤中均有 PFCs 残留。因此, 在这种养殖环境下, 后期黄鳝中 PFCs 的污染可能主要来源于池塘水和土壤。

### 3 讨论

黄鳝中 PFCs 残留可能主要来源于蚯蚓以及养殖环境池塘水和土壤。究其原因, 可能如下:

一是与黄鳝的摄食方式有关。黄鳝是杂食性鱼类, 主要以饲料、鱼糜、河蚌肉和蚯蚓等为食, 而 Wu 等(2012)和 Zhang 等(2011)分别对我国 6 个省份和 11 个地区的鱼类样品中 PFASs 进行研究, 发现这 17 个地区都检出了 PFCs 残留; 另外, 林钦等(2014)检测发现, 饲料中主要有全氟壬酸、全氟辛烷磺酸钾和全氟辛酸的污染。因此, 黄鳝在摄食过程中, 鱼类和饲料的 PFCs 污染在黄鳝体内富集, 从而引起黄鳝体内 PFCs 污染。

二是与黄鳝的养殖环境有关。黄鳝一般都栖息在池塘、水田和沟渠等地, 而 PFOA 广泛存在于水环境介质中, 水生生物直接靠体表吸收, 从而在生物体内蓄积放大; 土壤是 PFCs 在环境及其他介质中重要的归趋地, PFCs 能够通过雨水、大气干湿沉降、点源污染以及地表径流等方式进入土壤(Milinovic *et al*, 2015; Li *et al*, 2010)。同时, 何娜等(2012)发现, 短链 PFCs 易于存在于水环境中, 长链 PFCs 易分配在沉积物中(Vanderoost *et al*, 2003)。因此, 在有 PFCs 污染的土壤和池塘水养殖环境下, 因食物链的传递, 导致黄鳝中 PFCs 污染。

三是与长江流域的 PFCs 污染水平以及工业化发展带来的环境污染有关。So 等(2007)在检测珠江和长江流域的 14 种全氟化合物时发现, PFOA 是长江流域水样中的主要 PFCs 污染物。另外, 金一和等(2006)研究发现, 长江三峡库区江水和武汉地区地面水中均广泛存在着 PFOS 和 PFOA 污染。所以, 长江流域的黄鳝在养殖过程中易受到 PFCs 污染。

四是与黄鳝体内的 PFCs 自身降解以及前体物质的迁移转化规律有关。PFOS 和 PFOA 有非常稳定的化学性质, 是大部分 PFCs 降解产物; 同时, 陈清武等研究(2012)发现, PFOS 可降解形成短链 PFCs 和 PFOA。另外, 张长等(2011)研究发现, PFOA 在紫外光照射下能够进一步降解为短链 PFCs。

五是与黄鳝体内的 PFCs 生物富集能力有关。吴江平等(2010)研究发现, PFCs 因碳链长度、与蛋白质结合能力以及在环境介质中的分配行为不同, 导致它们在生物体内的富集能力也不同, 短中链 PFCs 的生物富集能力相对大于长链(Renner *et al*, 2001)。

### 4 结论

本研究主要对长江流域 5 个省份黄鳝中 PFCs 含

量和残留特征进行分析,同时,追踪黄鳝整个养殖过程中的 PFCs 残留,从而探究黄鳝中 PFCs 的来源。结果发现,长江流域黄鳝中 PFCs 共 8 种物质残留,主要污染物是 PFOA 和 PFOS,黄鳝中 PFCs 残留主要来源于蚯蚓以及养殖环境池塘水和土壤。但由于渔业环境的复杂性,现阶段较难确定黄鳝中 PFCs 的来源规律,在今后的工作中,需要进一步研究 PFCs 在各类基质中的分布和转移机制。

## 参 考 文 献

- Awad E, Zhang XM, Bhavsar SP, *et al.* Long-term environmental fate of perfluorinated compounds after accidental release at Toronto airport. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(19): 8081–8089
- Bischel HN, Macmanus-Spencer LA, Luthy RG. Noncovalent interactions of long-chain perfluoroalkyl acids with serum albumin. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(13): 5263–5269
- Chen QW, Zhang H, Chai ZF, *et al.* Residue characteristics and distributions of perfluorinated compounds in surface seawater along Shenzhen coastline. *Environmental Science*, 2012, 33(6): 1795–1800 [陈清武, 张鸿, 柴之芳, 等. 深圳市沿岸表层海水中全氟化合物的残留特征及其分布规律. *环境科学*, 2012, 33(6): 1795–1800]
- Domingo JL, Ericson-Jogsten I, Perelló G, *et al.* Human exposure to perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: Contribution of drinking water and fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(17): 4408–4415
- European Food Safety Authority. The Chemicals Regulation Directorate, the European Food Safety Authority and the European Commission. *EFSA Journal*, 2011, 9(2): 3–16
- Gulkowska A, Jiang QT, So MK, *et al.* Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40: 3736–3741
- Haug LS, Salihovic S, Jogsten IE, *et al.* Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway. *Chemosphere*, 2010, 80(10): 1137–1143
- He N. The distribution of perfluorinated compounds and their precursors in precipitation and waste water treatment plants and the degradation of precursors. Master's Thesis of Nankai University, 2012 [何娜. 全氟化合物及其前体物在降水与污水处理厂中的分布及转化行为研究. 南开大学硕士研究生学位论文, 2012]
- He XM, Dai K, Li AM, *et al.* Occurrence and assessment of perfluorinated compounds in fish from the Danjiangkou Reservoir and Hanjiang River in China. *Food Chemistry*, 2015, 174: 180–187
- Hradkova P, Poustka J, Hlouskova V, *et al.* Perfluorinated compounds: Occurrence of emerging food contaminants in canned fish and seafood products. *Czech Journal of Food Sciences*, 2010, 28(4): 333–342
- Jin YH, Ding M, Zhai C, *et al.* An investigation of the PFOS and PFOA pollution in Three Gorges Reservoir areas of the Yangtze River and surface water of Wuhan areas. *Ecology and Environment*, 2006, 15(3): 486–489 [金一和, 丁梅, 翟成, 等. 长江三峡库区江水和武汉地区地面水中 PFOS 和 PFOA 污染现状调查. *生态环境*, 2006, 15(3): 486–489]
- Li F, Zhang CJ, Qu Y, *et al.* Quantitative characterization of short-and long-chain perfluorinated acids in solid matrices in Hanghai, China. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(3): 617–623
- Lin Q, Fu FF, Chen GN, *et al.* Simultaneous determination of six perfluorinated organic compounds in feed by using polyamide solid-phase extraction with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(7): 723–729 [林钦, 付凤富, 陈国南, 等. 聚酰胺固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测饲料中的 6 种全氟化合物. *色谱*, 2014, 32(7): 723–729]
- Milinic J, Lacorte L, Vidal M, *et al.* Sorption behaviour of perfluoroalkyl substances in soils. *Science of the Total Environment*, 2015, 511: 63–71
- Peng H, Wei QW, Wan Y, *et al.* Tissue distribution and maternal transfer of poly- and perfluorinated compounds in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*): Implications for reproductive risk. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(5): 1868–1874
- Peng SY, Yan LJ, Zhang J, *et al.* Hepatotoxicity of perfluorooctanoic acid in human hepatocytes using metabonomics. *Chinese Journal of Chromatography*, 2012, 30(2): 123–127 [彭思远, 严丽娟, 张洁, 等. 利用代谢组学技术研究全氟辛酸的人肝脏毒性机制. *色谱*, 2012, 30(2): 123–127]
- Renner R. Growing concern over perfluorinated chemicals. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35(7): 154A–160A
- Schuetze A, Heberer T, Effkemann S, *et al.* Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany. *Chemosphere*, 2010, 78(6): 647–652
- Shi Y, Pan Y, Yang R, *et al.* Occurrence of perfluorinated compounds in fish from Qinghai-Tibetan Plateau. *Environment International*, 2010, 36(1): 46–50
- So MK, Miyake Y, Yeung WY, *et al.* Perfluorinated compounds in the Pearl River and Yangtze River of China. *Chemosphere*, 2007, 68(11): 2085–2095
- Vanderoost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 49–57
- Wang LM, Wang D. Fishery and wetland protection in the Yangtze River Basin. *Yangtze River*, 2004, 35(5): 37–40 [王利民, 王丁. 长江流域的渔业与湿地保护. *人民长江*, 2004, 35(5): 37–40]
- Wang YQ, Cai YQ, Jiang GB. Research processes of persistent organic pollutants (POPs) newly listed and candidate POPs in stockholm convention. *Science China*, 2010, 40(2): 99–123 [王亚群, 蔡亚岐, 江桂斌. 斯德哥尔摩公约新增持久性有机污染物的一些研究进展. *中国科学*, 2010,

- 40(2): 99–123]
- Wang YW, Fu JJ, Wang T, *et al.* Distribution of perfluorooctane sulfonate and other perfluorochemicals in the ambient environment around a manufacturing facility in China. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44: 8062–8067
- Wu JP, Guan YT, Li MY, *et al.* Recent research advances on the bioaccumulation potentials of perfluorinated compounds. *Ecology and Environment*, 2010, 19(5): 1246–1252 [吴江平, 管运涛, 李明远, 等. 全氟化合物的生物富集效应研究进展. *生态环境学报*, 2010, 19(5): 1246–1252]
- Wu YN, Wang YX, Li JG, *et al.* Perfluorinated compounds in seafood from coastal areas in China. *Environment International*, 2012, 42: 67–71
- Xing XL. Environmental migration of gas-basin-mountain scale POPs soil to the western edge of Sichuan basin case. Doctoral Dissertation of Wuhan: China University of Geosciences, 2009 [邢新丽. 盆地-山区尺度持久性有机污染物土-气环境迁移研究—以四川盆地西缘为例. 中国地质大学博士研究生学位论文, 2009]
- Yang F, Shi ZX. Human exposure and toxicity of perfluorooctyl sulfonate and perfluorooctanoic acid: A review of recent studies. *Journal of Environment and Health*, 2014, 31(8): 730–733 [杨帆, 施致雄. 全氟辛烷磺酸和全氟辛酸的人群暴露水平和毒性研究进展. *环境与健康杂志*, 2014, 31(8): 730–733]
- Zhang C, Yu Q, Zeng GM, *et al.* Photochemical degradation of PFOA using UV irradiation: A critical review. *Science China*, 2011, 41(6): 964–975 [张长, 于茜, 曾光明, 等. 全氟辛酸(PFOA)紫外光化学降解特性与机理. *中国科学*, 2011, 41(6): 964–975]
- Zhang T, Sun H, Lin Y, *et al.* Perfluorinated compounds in human blood, water, edible freshwater fish, and seafood in China: Daily intake and regional differences in human exposures. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2011, 59(20): 11168–11176
- Zhao YG, Wan HT, Law AYS, *et al.* Risk assessment for human consumption of perfluorinated compound contaminated freshwater and marine fish from Hong Kong and Xiamen. *Chemosphere*, 2011, 85(2): 277–283
- Zhou DF, Gan JH, Lü L, *et al.* Distribution of perfluorinated alkylated substances in aquatic products in the Yangtze River valley. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(2): 57–64 [周殿芳, 甘金华, 吕磊, 等. 全氟烷基化合物在长江流域水产品中的分布研究. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(2): 57–64]

(编辑 冯小花)

## Residual Characteristics and Source of Perfluorinated Compounds in *Monopterus albus* of the Yangtze River

ZHOU Dianfang, LÜ Lei, ZHOU Jianguang, GAN Jinhua, PENG Jie, HE Li<sup>①</sup>

(Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430070)

**Abstract** To explore the residual characteristics and sources of perfluorinated compounds (PFCs) in *Monopterus albus* within the middle and upper reaches of the Yangtze River, 150 *M. albus* were collected from 10 cities in Hunan, Hubei, Jiangxi, Anhui, Sichuan, and Chongqing. The source of PFCs in the *M. albus* was investigated in 2016 in the eel breeding base of Qianjiang City, Hubei Province. The samples were extracted and purified using C18 and carbon black (GCB). The contents of 19 PFCs were analyzed using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The results showed that there were 8 residual PFCs in the eels of the Yangtze River, and the main pollutants were perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS). PFCs in the Yangtze River basin were the most polluted in Hubei Province, followed by Jiangxi Province. The highest content of PFOS in Hubei was 5.42 µg/kg, and PFOA were the highest in Sichuan Province at 3.66 µg/kg. Meanwhile, in the entire farming process, combined with the special breeding methods of *M. albus*, we found that the pollution of PFCs in *M. albus* mainly originated from earthworm feeding and the breeding environment, including pond water and soil.

**Key words** Perfluorinated compounds; *Monopterus albus*; Residue characteristics; Source

① Corresponding author: HE Li, E-mail: heli28@sohu.com



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170705001

http://www.yykxjz.cn/

潘明轩, 李兆新, 邢丽红, 孙晓杰, 彭吉星, 董晓. 甲砒霉素在鲤鱼中的药代动力学研究. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 166-172

Pan MX, Li ZX, Xing LH, Sun XJ, Peng JX, Dong X. Drug pharmacokinetic study of thiamphenicol in *Cyprinus carpio*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 166-172

## 甲砒霉素在鲤鱼中的药代动力学研究\*



潘明轩<sup>1,2,3</sup> 李兆新<sup>1,3</sup>① 邢丽红<sup>1,3</sup> 孙晓杰<sup>1,3</sup> 彭吉星<sup>1,3</sup> 董晓<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306;

3. 农业农村部水产品质量安全风险评估实验室 青岛 266071)

**摘要** 本实验在(26±2)℃的养殖水温下,采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)研究了以 30 mg/(kg·bw)的剂量对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)进行单次投喂药饵后甲砒霉素(Thiamphenicol, TAP)在鲤鱼体内的药物代谢动力学。通过 DAS 2.0 动力学软件分析 TAP 在鲤鱼体内的药-时数据,结果表明符合一级吸收二室模型。TAP 在肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、鳃、脾脏和血浆各组织的药物达峰时间( $T_{peak}$ )分别为 16、2、16、8、0、2 和 16 h, 达峰浓度( $C_{max}$ )分别为 15.6、35.3、12.4、9.0、33.0、11.6 mg/kg 和 21.0 mg/L; 药-时曲线下面积(AUC)分别为 1084.5、1578.1、777.3、541.1、0.1、478.1 mg/(kg·h)和 485.1 mg/(L·h), 消除半衰期( $t_{1/2\beta}$ )分别为 11.4、100.2、54.2、41.1、69.5、38.0 和 71.9 h。TAP 在鲤鱼体内各组织的分布和消除速率相差较大;在肾脏中的药物达峰时间短且达峰浓度高于其他组织,其消除半衰期也明显高于其他组织,推测肾脏是鲤鱼体内 TAP 蓄积和代谢的主要器官。按照农业部《动物性食品中兽药最高残留限量》文件规定,TAP 在水产动物中最高残留限量(MRL)不得高于 50 μg/kg,本研究中,肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、脾脏和血浆的 TAP 残留量低于 MRL 的时间分别从第 16、16、12、12、12、10 和 12 天开始,将肌肉和肾脏作为 TAP 药物残留的靶组织,建议休药期不得低于 16 d。

**关键词** 甲砒霉素; 代谢残留; 鲤鱼; 药代动力学

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0166-07

甲砒霉素(Thiamphenicol, TAP)又称为甲砒氯霉素、硫霉素等,是氯霉素类第二代广谱抗菌药。其抗菌机理与抗菌谱、氯霉素基本相似,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有较强的抑制作用,但毒性有所降低(Yoo *et al*, 2003; Park *et al*, 2004)。TAP 作为氯霉素替代物,抗菌效果佳且物美价廉,常用于治疗细菌性烂鳃病、白皮病、白头白嘴病等水产养殖病害(陈玉露, 2009)。

目前,国内外对甲砒霉素药物代谢动力学研究已有开展,畜禽动物主要集中在牛(*Bovine*)、羊(*Caprinae*)、猪(*Sus scrofa domestica*)和鸡(*Gallus domesticus*)等动物中(AI-Nazawi, 2005; Gamez *et al*, 1992; Mestorino *et al*, 1993; Haritova *et al*, 2002; 唐海蓉等, 2013);在水产动物中,对松浦镜鲤(*Songpu mirror carp*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、红

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD1204)和 2017 国家水产品质量安全风险评估(GJFP201700901)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2016HY-ZD1204), and 2017 National Risk Assessment Program of Aquatic Products for Quality and Safety (GJFP201700901)]. 潘明轩, E-mail: 1054410846@qq.com

① 通讯作者: 李兆新, 研究员, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-07-05, 收修改稿日期: 2017-08-14

笛鯛(*Lutjanus sanguineus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)、罗非鱼(*Oreochromis spp*)等均有报道(杨洪波等, 2013a、b; Castells *et al*, 2000; 秦青英等, 2013; 陈玉露, 2009; 黄郁葱等, 2017; 冯敬宾等, 2005)。鲤鱼(*Cyprinus carpio*), 别称鲤拐子、鲤子和红鱼等, 是我国重要的经济鱼类。近年来, 鲤鱼的高密度养殖在带来高经济效益的同时也引发多种鱼类病害问题, 致使养殖户在养殖过程中存在过度使用或滥用甲砒霉素和其他抗生素药物现象(蔡林宏, 2016), 对环境污染和人类健康都有很大影响。因此, 进行有关 TAP 在鲤鱼体内的药物代谢动力学研究十分有必要。然而, 目前有关 TAP 在鲤鱼体内的药代动力学研究尚未见报道, 仅杨洪波等(2013a)对鲤鱼的杂交亚种松浦镜鲤进行了口灌 TAP 的代谢动力学研究。不同于其他研究学者对水产动物的口灌和肌注给药方法, 本实验采用投喂药饵方法模拟实际养殖中的用药过程。实验在(26±2)℃的养殖水温下, 以 30 mg/(kg·bw)的投喂剂量对鲤鱼进行单次投喂药饵给药, 研究了 TAP 在鲤鱼体内的组织分布和药物代谢随时间的变化规律, 以期为水生动物疾病防治和药物休药期制定提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 药品与试剂** TAP 标准品的纯度为 99.0% (Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 德国); TAP 原料药纯度 98.0%(Macklin 公司), 氘代氯霉素(d5-氯霉素)纯度为 99.0%(Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 德国)。乙酸乙酯(色谱纯, CNW 公司); 氨水(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 正己烷(色谱纯, CNW 公司); 甲醇(色谱纯, Merck 公司); 无水硫酸钠(分析纯, 天津博迪化工股份有限公司); 水为超纯水。

**1.1.2 仪器设备** TSQ Endura 液相色谱-串联质谱仪(Thermo Fisher), CR 22G 冷冻离心机(日立), 小型高速离心机(1-14, Sigma), GHG-9203J 干燥箱(上海三发科学仪器有限公司), HR2014 均质机(珠海经济特区飞利浦家庭电器有限公司), KQ-600DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 涡旋混合器(TAIBOYS), N-EVAP 氮吹仪(24 孔, Organomation 公司), Gradient A10Mill-Q 超纯水器(Millipore)。

**1.1.3 实验动物** 健康鲤鱼 150 条, 平均规格为(1000±50) g, 由赣榆佳信水产开发有限公司提供。

### 1.2 实验方 法

**1.2.1 实验设计** 本实验 2016 年 8 月 1 日~9 月

7 日于江苏省连云港市赣榆佳信水产开发有限公司进行。实验以体重为(1000±50) g 的健康鲤鱼为对象, 实验前经检测无 TAP 残留, 暂养在内设淡水循环设备的水池中, 池长 7 m、宽 5 m、水深 1.5 m, 养殖密度为 150 尾/池。实验期间的水温保持在(26±2)℃, 每天换水 1 次, 持续充氧。以 30 mg/(kg·bw)的剂量对鲤鱼进行单次投喂药饵。正式投喂前 1 d 禁食并采集鲤鱼肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、血浆和鳃的空白组织样品。药饵停喂后分别在 1、2、4、6、8、12、16、20、24、36、48、96、144、192、240、288、384、480、576、672 和 768 h 采样。每个时间点各采集鲤鱼 6 尾作为 1 组平行样, 取鲤鱼尾静脉血 5 ml, 放置预先涂抹肝素钠的玻璃离心管中, 4500 r/min 离心 8 min, 取上层血浆, 保存于 4℃冷藏箱中, 取血后快速取鲤鱼躯体两侧背鳍处的肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、鳃和脾脏放入样品袋中, 保存于-20℃的冰箱中。

**1.2.2 标准储备液制备** 称取 10.0 mg 甲砒霉素标准品, 用甲醇溶液溶解并定容至 100 ml 的棕色容量瓶中, 浓度为 100 μg/ml, -20℃冰箱中避光冷冻保存, 有效期 1 年。

**1.2.3 氘代内标标准储备液制备** 称取 10.0 mg 内标物 d5-氯霉素, 用甲醇溶液溶解并定容至 100 ml 的棕色容量瓶中, 浓度为 100 μg/ml, -20℃冰箱中避光冷冻保存, 有效期 1 年。

**1.2.4 标准工作曲线制备** 移取 1.2.2 中的标准储备液, 用流动相稀释成 10 ng/ml、100 ng/ml 和 1 μg/ml 标准液, 待用。在 6 个进样瓶中分别加入适量工作液, 并分别加 1.0 μg/ml 氘代内标工作液 50 μl, 用流动相定容至 1.0 ml, 配制成流动相空白溶液、2、5、10、20、50 和 100 ng/ml 的标准液。系列标准液用液相色谱-串联质谱检测, 以外标标准物质浓度作为横坐标(X), 以外、内标物的峰面积(响应值)比值作为纵坐标(Y), 得出标准曲线, 并计算回归方程和相关系数。

### 1.3 样品处理

**1.3.1 样品制备和提取** 将血浆和各组织样品放置室温解冻, 用均质机将各组织部位均质, 待用。称取各组织样品[(1.0±0.1) g]和血浆[(1.0±0.1) ml]于 15 ml 聚丙烯离心管中, 加入 1.2.3 中氘代内标工作液 50 μl, 再加入 5 ml 乙酸乙酯, 1 g 无水硫酸钠, 100 μl 氨水, 涡旋提取 5 min, 超声提取 5 min, 以 4500 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 15 ml 比色管中。残渣中再分别加入 3 ml 的乙酸乙酯, 重复上述操作, 合并上清液至 15 ml 的比色管中, 在温度为 40℃下氮吹至干。

**1.3.2 净化** 将比色管中的残渣用 3 ml 的超纯水溶解, 超声 5 min, 加入 3 ml 正己烷, 涡旋混合 1 min,

静置分层, 弃掉上层的正己烷, 再加入 3 ml 的正己烷, 涡旋混合 30 s, 静置分层。最后移取 1 ml 的水相于 1.5 ml 的聚丙烯离心管中, 以 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  水相滤膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

#### 1.4 仪器条件

**1.4.1 色谱条件** 色谱柱: MG II C<sub>18</sub>(2.0 mm  $\times$  100 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为超纯水; 流速: 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ , 进样量: 10  $\mu\text{l}$ ; 梯度洗脱条件见表 1。

**1.4.2 质谱条件** 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 负离子模式; 电喷雾电压: 2500 V; 鞘气压力: 40 Arb; 辅助气压力: 25 Arb; 碰撞气压: 2 mTorr; 离子传输毛细管温度: 340 $^{\circ}\text{C}$ ; 检测方式: 选择反应监测(SRM); 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能见表 2。

表 2 SRM 监测模式下目标物质谱参数

Tab.2 Spectral parameters of target material under SRM monitoring model

目标化合物 Target compound	定性离子对 Qualitative ion pair ( $m/z$ )	定量离子对 Quantitative ion pair ( $m/z$ )	碰撞能 Collision energy (V)
TAP	353.9/290.0	353.9/185.1	11.6
	353.9/185.1		19.8
氘代氯霉素 d <sub>5</sub> -chloramphenicol	326.00/157.0	326.0/157.0	17.0

#### 1.6 数据分析

数据采用 Excel 2007 和 DAS 2.0 数据分析软件对 TAP 在鲤鱼体内各组织药物浓度进行药-时数据处理。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线和最低检测限

采用内标法定量, 以 TAP 浓度( $X$ )为横坐标, 以 TAP 标准物和氘代内标物峰面积的比值( $Y$ )为纵坐标作图, 如图 1 所示。TAP 标准液在 2.0~100.0 ng/ml 浓度范围内线性关系良好, 相关系数( $R^2$ )为 0.99703, 线性回归方程为  $Y=0.03X+0.09$ , 该法最低检测限为 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (信噪比  $S/N=3$ )。结果表明, 该方法灵敏度高, 能够满足实验要求。

### 2.2 回收率与精密度

取鲤鱼的肌肉、鱼皮、肾脏、肝脏、鳃、脾脏和血浆为测回收率与精密度的组织, 每份称取 (1.00 $\pm$ 0.05) g/ml, 加入 TAP 标准液, 使其药物浓度为 20.0、50.0 和 100.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 每个水平 5 个平行, 连续进行 3 d, 结果见表 3。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Tab.1 Gradient elution conditions of mobile phase

时间 Time (min)	流速 Flow rate ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	甲醇 Methanol (%)	水 Water (%)
0.0	0.3	10.0	90.0
0.5	0.3	10.0	90.0
2.0	0.3	90.0	10.0
3.0	0.3	90.0	10.0
3.1	0.3	10.0	90.0
5.0	0.3	10.0	90.0

### 1.5 回收率和精密度

实验用各组织空白样进行加标回收, 在空白样中加入 TAP 标准液, 使其药物浓度为 20.0、50.0 和 100.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 3 个添加水平, 每个水平 5 个平行, 连续 3 d, 计算回收率、日内和日间精密度。

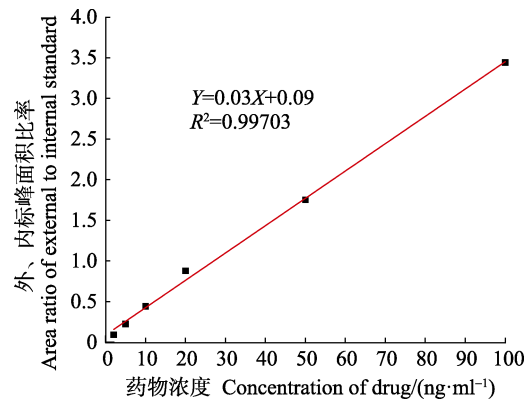


图 1 TAP 标准品标准曲线

Fig.1 Standard curve of TAP standard

### 2.3 TAP 在鲤鱼体内的药-时曲线( $C_i-T_i$ )

本实验在(26 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 的养殖水温下, 以 30 mg/(kg·bw) 的剂量对鲤鱼进行模拟投饵给药, 研究 TAP 在鲤鱼体内的药代动力学。采用高效液相色谱-串联质谱法分析 TAP 在鲤鱼体内各组织的残留量随时间变化的药-时曲线, 见图 2(内嵌 0~50 h 药时曲线图)。如图 2 显示, 鲤鱼肾脏和鳃中的 TAP 残留达峰浓度分别为 35300.1 和 33009.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 且明显高于其他组织;

表 3 回收率与精密度  
Tab.3 Recovery and precision

组织 Tissue	添加水平 Addition level (ng/g)	回收率 Rate of recovery (%)	日内相对标准偏差 Within-day RSD (%)	日间相对标准偏差 Intra-day RSD (%)
肌肉 Muscle	20	95.0±2.5; 93.2±1.3; 90.2±1.9	3.7; 1.9; 0.4	2.6
	50	90.7±3.7; 89.0±3.2; 89.1±1.2	5.8; 5.1; 1.7	1.1
	100	88.7±1.5; 89.1±2.0; 89.2±1.8	0.8; 1.5; 1.1	1.3
血浆 Plasma	20	95.0±2.5; 116.5±4.0; 96.5±5.5	3.7; 4.9; 8.1	11.4
	50	90.7±3.7; 87.0±2.9; 95.1±7.1	5.8; 2.0; 10.6	6.9
	100	84.7±4.6; 89.2±1.0; 86.8±1.7	7.6; 1.5; 2.8	4.3
鱼皮 Fish skin	20	86.8±5.6; 90.0±0.5; 93.5±2.5	9.4; 0.4; 3.8	5.5
	50	83.8±3.2; 87.0±1.2; 92.2±4.2	5.4; 2.0; 6.0	5.8
	100	78.2±2.0; 87.7±0.5; 86.8±1.7	3.5; 0.8; 2.8	5.9
肾脏 Kidney	20	91.0±3.5; 93.2±4.3; 90.2±5.9	4.1; 5.2; 6.1	7.1
	50	91.7±3.1; 87.0±2.2; 89.1±2.2	3.9; 2.8; 2.7	4.1
	100	91.7±1.5; 89.1±3.0; 89.2±1.8	1.2; 4.1; 1.8	3.8
肝脏 Liver	20	86.8±5.6; 90.0±6.5; 93.5±4.5	4.6; 6.1; 5.9	7.2
	50	83.8±3.2; 87.0±1.2; 92.2±4.2	3.9; 1.5; 5.1	4.8
	100	88.2±2.0; 87.7±0.5; 90.8±1.7	2.1; 0.9; 1.5	2.9
鳃 Gill	20	95.0±5.5; 106.5±4.9; 96.5±5.5	6.1; 5.9; 5.6	9.2
	50	87.7±3.7; 89.5±4.2; 89.1±1.2	3.9; 4.3; 2.1	5.9
	100	87.7±3.6; 89.2±2.0; 89.8±2.7	2.9; 2.8; 3.5	4.2
脾脏 Spleen	20	86.8±5.6; 93.0±9.5; 90.5±4.5	6.1; 7.1; 4.9	10.1
	50	92.7±3.7; 89.9±3.4; 89.1±4.2	3.9; 2.9; 4.2	5.3
	100	88.7±3.5; 88.1±2.8; 87.2±3.8	3.0; 2.9; 4.5	5.9

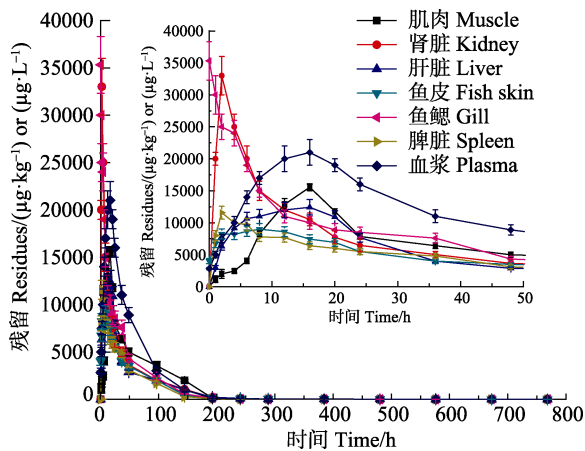


图 2 TAP 药-时曲线  
Fig.2 TAP drug-time curve

脾脏和肾脏中药物达峰时间一致,均在给药后 2 h 达到峰值,后随着时间变化逐渐降低;肌肉、肝脏和血浆的药物达峰时间较接近,在给药后 16 h 达到峰值,随后 TAP 浓度持续下降;鱼鳃中药物浓度给药后即达到峰值,分析可能是由于鳃是鲤鱼主要呼吸器官,血液灌流量较大,且鳃丝表面布满微细血管,部分溶于水中的药物极易在短时间内通过微血管进入鳃

中,双重效果下出现鳃中的即时药物浓度达最大值。

## 2.4 TAP 在鲤鱼体内各组织的主要药动力学参数

TAP 在鲤鱼各组织中的药-时残留数据通过 DAS 2.0 软件分析及房室模型嵌和计算得出符合动力学最佳模型:一级吸收二室模型,TAP 在鲤鱼各组织的残留浓度随时间变化的主要药代动力学参数见表 4。

## 3 讨论

### 3.1 TAP 在鲤鱼体内的药代动力学特征

在(26±2)°C 的养殖水温下,对鲤鱼进行模拟投饵给药 30 mg/(kg·bw)的剂量,体内各组织药-时数据经 DAS 2.0 软件和 Excel 软件拟合,符合一级吸收二室模型。此结果与红笛鲷、鲫鱼、凡纳滨对虾、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 和日本鳗鲡 (*Anguilla japonica Temminck et Schlegel*) (秦青英等, 2013; 杨洪波等, 2013a、b; 陈玲珍等, 2010; 林茂等, 2011; 梁俊平等, 2015) 等动物的房室模型基本一致,但与肉鸡、家兔 (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*)、牛和羊 (郭桂芳等, 2010;

表4 TAP在鲤鱼体内药动学参数  
Tab.4 Pharmacokinetic parameters of TAP in carp

参数 Parameter	单位 Unit	肌肉 Muscle	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	鱼皮 Fish Skin	鳃 Gill	脾脏 Spleen	血浆 Plasma
$\alpha$	1/h	0.01	6.25	0.01	0.40	0.02	0.05	0.01
$\beta$	1/h	0.01	0.06	0.013	0.02	0	0.02	0.01
$K_a$	1/h	15.00	26.12	16.50	83.98	0.03	4.25	26.31
$t_{1/2\alpha}$	h	99.96	0.11	54.17	1.72	35.60	13.58	71.88
$t_{1/2\beta}$	h	11.36	100.24	54.25	41.13	69.47	38.02	71.90
$t_{1/2K_a}$	h	0.05	0.03	0.04	0.01	23.93	0.16	0.03
$K_{10}$	1/h	0.01	0.06	0.01	0.02	184732.30	0.02	0.01
$K_{12}$	1/h	0.01	6.243	0	0.39	0	0.03	0
$K_{21}$	1/h	0.01	6.25	0.01	0.40	0.02	0.04	0.01
$V_{1/F}$	L/kg	0.004	0.001	0.003	0.003	0.002	0.003	0.002
$C_{L/F}$	L/(h·kg)	0	0	0	0	410.03	0	0
AUC(0-t)	$\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$	1084503.54	1578125.26	777334.27	541064.82	0.07	478146.83	485097.86
AUC(0- $\infty$ )	$\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$	1111708.31	495097.86	778918.58	541069.50	0.07	482152.64	1580110.43
$T_{\text{peak}}$	h	16	2	16	8	0	2	16
$C_{\text{max}}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$ or $\mu\text{g}/\text{L}$	15556.3	35300.1	12418.3	9007.5	33009.5	11571.8	21000.6

注： $\alpha$ 为分布速率常数； $\beta$ 为消除速率常数； $K_a$ 为药物吸收速率常数； $t_{1/2\alpha}$ 为分布相半衰期； $t_{1/2\beta}$ 为消除相半衰期； $t_{1/2K_a}$ 为吸收相半衰期； $K_{10}$ 为药物在中央室的消除速率； $K_{12}$ 为药物自中央室到周边室的一级转运速率； $K_{21}$ 为药物自周边室到中央室的一级转运速率； $V_{1/F}$ 为表观分布容积； $C_{L/F}$ 为药物自体内消除的总清除率，AUC<sub>(0-t)</sub>为0~t时的药时曲线下总面积；AUC<sub>(0- $\infty$ )</sub>为0~ $\infty$ 时的药时曲线下总面积； $T_{\text{peak}}$ 为最大达峰时间； $C_{\text{max}}$ 为药物最大达峰浓度

Note:  $\alpha$  denoted distribution rate constant;  $\beta$  denoted elimination rate constant;  $K_a$  denoted the drug absorption rate constant;  $t_{1/2}$  denoted alpha phase half-life;  $t_{1/2\beta}$  denoted elimination half-life;  $t_{1/2K_a}$  denoted absorption half-life;  $K_{10}$  denoted drugs from the central chamber of the towel eliminating rate;  $K_{12}$  denoted transport rate for the drugs from the central compartment to the surrounding room;  $K_{21}$  denoted the drug from the periphery room to a central compartment;  $V_{1/F}$  denoted transport rate;  $C_{L/F}$  denoted apparent volume of distribution; AUC<sub>(0-t)</sub> denoted total area under the time curve of 0~t; AUC<sub>(0- $\infty$ )</sub> denoted the total area under the curve of 0~ $\infty$ ;  $T_{\text{peak}}$  denoted peak time;  $C_{\text{max}}$  denoted drug peak concentration

邢晓玲等, 2009; Mengozzi *et al*, 2002; Abdennebi *et al*, 1994)等动物的研究结果存在差异, 这可能和研究动物的种属、给药方式、给药剂量和实验环境的差异有关。

### 3.2 吸收和分布特征

本实验数据采用经典房室模型和统计矩原理分析 TAP 在鲤鱼体内各组织的药时动态变化规律。达峰时间  $T_{\text{peak}}$  和达峰浓度  $C_{\text{max}}$  是衡量药物吸收速度和程度的重要参数。本实验中, TAP 在鲤鱼的肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、鳃、脾脏和血浆的达峰时间  $T_{\text{peak}}$  分别为 16、2、16、8、0、2 和 16 h, 达峰浓度  $C_{\text{max}}$  分别为 15.6、35.3、12.4、9.0、33.0、11.6 mg/kg 和 21.0 mg/L。实验结果表明, TAP 进入鲤鱼体内后迅速在各组织扩散并在短时间内达到峰值; 鱼鳃的  $T_{\text{peak}}$  最短, 为零, 但不符合实际, 分析可能是由于鳃是鲤鱼主要呼吸器官且表面布满微细血管, 因此, 部分溶解于水中的药物在极短时间内极易通过微血管进入鳃中; 肾脏中 TAP 含量达峰时间短且峰值明显高于其他组织, TAP 在血管丰富、渗透性好的组织中吸收量

较大(Wu *et al*, 2006), 因此, 推测 TAP 在组织中分布速率与残留浓度和血流量有关。

药-时曲线下面积(AUC)是反应药物进入循环系统药量的多少, 是衡量药物在实验动物体内各组织器官吸收的重要指标。结果显示, TAP 在鲤鱼体内肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、鳃、脾脏和血浆的 AUC 分别为 1084.5、1578.1、777.3、541.1、0.1、478.1 mg/(kg·h) 和 485.1 mg/(L·h)。结果表明, TAP 在肾脏中的吸收量明显高于在肌肉、肝脏、鱼皮、鳃和脾脏中的吸收量。此结果与杨洪波(2013a)以 30 mg/(kg·bw)的剂量单次口灌松浦镜鲤的药代动力学研究结果一致。

### 3.3 消除特征

结果表明, 停药后前期 TAP 在鲤鱼各组织的下降速度较快, 后期的消除速率较为缓慢。消除半衰期 ( $t_{1/2\beta}$ )是衡量药物在研究对象体内消除速率的一个重要动力学参数。TAP 在不同研究对象中的消除半衰期差异较大。本研究 TAP 在鲤鱼体内肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、鳃、脾脏和血浆各组织的  $t_{1/2\beta}$  分别为 11.4、100.2、54.2、41.1、69.5、38.0 和 71.9 h。结果表明,

TAP 在肾脏中的消除半衰期较长, 推测 TAP 可能是通过血液吸收分布在各组织中, 再经肾脏代谢排出。另外, 消除相速率常数  $\beta$  宏观体现从中央室向外消除的浓度变化速率。TAP 各组织在鲤鱼体内各组织消除速率常数大小为  $\beta_{\text{肾脏}} 0.061 > \beta_{\text{脾脏}} 0.018 > \beta_{\text{鱼皮}} 0.017 > \beta_{\text{肝脏}} 0.013 > \beta_{\text{血浆}} 0.01 > \beta_{\text{肌肉}} 0.007 > \beta_{\text{鳃}} 0$ , 本实验符合 Ingebrigtsen(1991)的研究结果。Ingebrigtsen(1991)在研究影响鱼药药效中提出药物在鱼肾脏的消除相速率常数高于其他组织, 这可能与肾脏血液灌流量较大有关(Ingebrigtsen *et al*, 1991; Kowalski, 2007)。

综上所述, TAP 在鲤鱼体内吸收迅速且分布广泛, 不同组织间的差异较大。按照农业部《动物性食品中兽药最高残留限量》文件规定 TAP 在水产动物中最高残留限量(MRL)不得高于 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。休药期通常以代谢较为缓慢的组织作为残留靶组织, 以此来确定休药期。本研究中肌肉、肾脏、肝脏、鱼皮、鳃、脾脏和血浆的 TAP 残留量低于 MRL 的时间分别从 16、16、12、12、12、10 和 12 d 开始, 因此, 建议以鲤鱼肌肉和肾脏作为靶组织确定休药期。在(26 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$  养殖水温下, 以 30  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$  剂量对鲤鱼进行单次投喂 TAP 药饵时, 建议休药期不低于 16 d。

## 参 考 文 献

- A1-Nazawi MH. Pharmacokinetics and tolerance of thiamphenicol in camels and sheep. *International Journal of Pharmacology*, 2005, 1(1): 25–28
- Abdennebi EH, Khaled N, Sawchuk RJ, *et al*. Thiamphenicol pharmacokinetics in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1994, 17(1): 12–16
- Cai LH. Carp breeding industry is in decline? Might just need a change. *Ocean and Fishery*, 2016(8): 13 [蔡林宏. 鲤鱼养殖产业正在衰退?需要的也许仅仅是一种转变. *海洋与渔业·水产前沿*, 2016(8): 13]
- Castells G, Intorre L, Bertini S, *et al*. Oral single-dose pharmacokinetics of thiamphenicol in the sea-bass (*Dieiontrarchus labrax*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2000, 23(1): 53–54
- Chen LZ, Yang HS, Wu GH, *et al*. Pharmacokinetics of florfenicol in the Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*): Dose effect. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(4): 102–109 [陈玲珍, 杨洪生, 吴光红, 等. 给药剂量对氟苯尼考在中华绒螯蟹体内的药代动力学影响. *动物学杂志*, 2010, 45(4): 102–109]
- Chen YL. Studies on pharmacokinetics and impact to drug metabolic enzyme of thiamphenicol and florfenicol in *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2009 [陈玉露. 甲砒霉素和氟甲砒霉素在凡纳滨对虾体内的药代动力学和对药酶影响的研究. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Feng JB, Jia XP, Li LD, *et al*. High-performance liquid chromatographic determination of florfenicol in tilapia. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(1): 35–42 [冯敬宾, 贾晓平, 李刘冬, 等. 罗非鱼体内氟甲砒霉素的高效液相色谱测定方法研究. *南方水产*, 2005, 1(1): 35–42]
- Gamez A, Perez Y, Marti G, *et al*. Pharmacokinetics of thiamphenicol in veal calves. *British Veterinary Journal*, 1992, 148(6): 535–539
- Guo GF, Yang DW, Li YJ, *et al*. Pharmacokinetics of thiamphenicol in experimentally infected chickens with *Pasteurella multocida*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(6): 815–817 [郭桂芳, 杨大伟, 李勇军, 等. 甲砒霉素在感染多杀性巴氏杆菌鸡体内的药物动力学. *中国兽医学报*, 2010, 30(6): 815–817]
- Haritova A, Lashev L, Pashov D. Pharmacokinetics of thiamphenicol in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 25(6): 464–466
- Huang YC, Tang JF, Qing QY, *et al*. Pharmacokinetics of thiamphenicol in *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2017, 37(1): 52–57 [黄郁葱, 汤菊芬, 秦青英, 等. 甲砒霉素在眼斑拟石首鱼体内的药代动力学研究. *广东海洋大学学报*, 2017, 37(1): 52–57]
- Ingebrigtsen K. Factors affecting drug disposition in fish. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, 1991, 87: 44–56
- Kowalski P. Capillary electrophoretic determination of thiamphenicol in turkeys serum and its pharmacokinetic application. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2007, 43(1): 222–227
- Liang JP, Duan YF, Li J, *et al*. Pharmacokinetics of difloxacin in turbot (*Scophthalmus maximus*) following intravenous and oral administration. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 131–136 [梁俊平, 段亚飞, 李健, 等. 二氟沙星在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体内的药代动力学特征. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 131–136]
- Lin M, Ji RX, Chen ZQ, *et al*. Pharmacokinetics of florfenicol in *A. japonica* and *A. anguilla*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(36): 22341–22343, 22517 [林茂, 纪荣兴, 陈政强, 等. 氟苯尼考在日本鳊鲈和欧洲鳊鲈体内的药代动力学. *安徽农业科学*, 2011, 39(36): 22341–22343, 22517]
- Mengozi G, Intorre L, Bertini S, *et al*. A comparative kinetic study of thiamphenicol in preruminant lambs and calves. *Research in Veterinary Science*, 2002, 73(3): 291–295
- Mestorino N, Landoni MF, Ah M, *et al*. The pharmacokinetics of thiamphenicol in lactating cows. *Veterinary Research Communications*, 1993, 17(4): 295–303
- Park IS, Kim DK, Adanyi N, *et al*. Development of a direct-binding chloramphenicol sensor based on thiol or sulfide mediated self-assembled antibody monolayers. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, (19): 667–674
- Qin QY, Tang JF, Huang YC, *et al*. The distribution and pharmacokinetics of thiamphenicol in tissues of *Lutjanus sanguineus*. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2013, 47(11): 31–36 [秦青英, 汤菊芬, 黄郁葱, 等. 甲砒霉素在红笛鲷体内的组织分布和药代动力学研究. *中国兽药杂*

- 志, 2013, 47(11): 31–36]
- Tang HR, Chen SJ, Liu XY, *et al.* Poisoning effect of thiamphenicol on testis morphology in broilers. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(8): 1880–1882 [唐海蓉, 陈仕均, 刘兴友, 等. 甲砒霉素对肉鸡睾丸组织结构的影响. *湖北农业科学*, 2013, 52(8): 1880–1882]
- Wu YB, Wang ZS, Liao XT, *et al.* Effects of enrofloxacin on microorganisms in wet lands. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2640–2645
- Xing XL, Wang DD, Yuan XQ, *et al.* The pharmacokinetic comparison between thiamphenicol and HP- $\beta$ -CD thiamphenicol in rabbit. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009, 12:5 [邢晓玲, 王姐姐, 袁小秋, 等. 甲砒霉素及HP- $\beta$ -CD甲砒霉素在家兔体内的药代动力学比较研究. *湖南农业科学*, 2009, 12: 5]
- Yang HB, Wang D, Lu TY, *et al.* Pharmacokinetics of thiamphenicol in Songpu common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2013a, 28(3): 298–302 [杨洪波, 王荻, 卢彤岩, 等. 甲砒霉素在松浦镜鲤体内的药物代谢动力学研究. *大连海洋大学学报*, 2013a, 28(3): 298–302]
- Yang HB, Wang D, Lu TY, *et al.* Pharmacokinetics of thiamphenicol in *Carassius auratus*. *Freshwater Fisheries*, 2013b, 43(3): 72–76 [杨洪波, 王荻, 卢彤岩, 等. 甲砒霉素在鲫体内的药物代谢动力学研究. *淡水渔业*, 2013b, 43(3): 72–76]
- Yang XL, Zhen J, Hu K. The comparative pharmacokinetics of chloramphenicol in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 60–65 [杨先乐, 湛嘉, 胡鲲. 氯霉素在尼罗罗非鱼血浆中的药代动力学研究. *水产学报*, 2005, 29(1): 60–65]
- Yoo MH, Huh MD, Kim E, *et al.* Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. *Aquaculture*, 2003, 217(1): 11–21

(编辑 冯小花)

## Drug Pharmacokinetic Study of Thiamphenicol in *Cyprinus carpio*

PAN Mingxuan<sup>1,2,3</sup>, LI Zhaoxin<sup>1,3</sup>①, XING Lihong<sup>1,3</sup>, SUN Xiaojie<sup>1,3</sup>, PENG Jixing<sup>1,3</sup>, DONG Xiao<sup>1,2,3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071)

**Abstract** In this experiment, the water temperature was raised at (26±2)°C. The experiment used high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS) to study thiamphenicol in pharmacokinetics of carp with 30 mg/(kg·bw) single dose of carp feed. Data were analyzed using DAS 2 dynamics software, and the experimental results suggest a two-compartment model of primary absorption. The peak of thiamphenicol (TAP) in muscles, kidneys, liver, skin, gills, spleen, and plasma were 16, 2, 16, 8, 0, 2, 16 h; the  $C_{max}$  were 15.6, 35.3, 12.4, 9.0, 33.0, 11.6 mg/kg, and 21.0 mg/L; the area under curve (AUC) was 1084.5, 1578.1, 777.3, 541.1, 0.1, 478.1 mg/(kg·h), and 485.1 mg/(L·h); the  $t_{1/2\beta}$  was 11.4, 100.2, 54.2, 41.1, 69.5, 38.0, and 71.9 h. The results showed that the distribution and elimination rate of TAP in carp tissues varied greatly; the peak time of renal drugs is shorter; the peak concentration is higher than in other tissues, and the elimination half-life is higher than that in other tissues, which suggested that kidneys are the main organ of TAP accumulation and metabolism. In accordance with the Ministry of Agriculture, Animal Food in Veterinary Drugs Maximum Residue Limit document provides that the maximum of TAP in aquatic animal residue limit (MRL) shall not be higher than 50  $\mu$ g/kg. In this experiment, the amounts of TAP residues in muscle, kidney, liver, skin, spleen, and plasma were lower than MRL, starting from 16, 16, 12, 12, 12, 10, and 12 d respectively. It is recommended that the period of withdrawal should be no less than 16 d.

**Key words** Thiamphenicol; Metabolic residue; Carp; Pharmacokinetics

① Corresponding author: LI Zhaoxin, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170716001

http://www.yykxjz.cn/

许强, 刘维, 高菲, 王爱民. 发展中国南海热带岛礁海洋牧场——机遇、现状与展望. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 173–180  
Xu Q, Liu W, Gao F, Wang AM. Development of marine ranching at tropical island area in South China Sea—advantages, status and prospects. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 173–180

# 发展中国南海热带岛礁海洋牧场 ——机遇、现状与展望\*



许 强<sup>1</sup> 刘 维<sup>2</sup> 高 菲<sup>1</sup> 王爱民<sup>1①</sup>

(1. 南海海洋资源利用国家重点实验室 海南大学海洋学院 海口 570228;

2. 海南省海洋与渔业科学院 海口 570228)

**摘要** 广阔的南海热带海域拥有得天独厚的岛礁资源与环境优势, 具有巨大的开发利用潜力。近年来, 在国家“海洋强国”战略的提出与稳步践行的背景之下, 加快南海岛礁渔业资源的保护与可持续利用已迫在眉睫。现代海洋牧场是集生境修复、资源养护、休闲渔业和景观生态于一体的渔业生产新业态, 真正实现了海洋经济发展和海洋生态环境保护并重, 但目前南海热带岛礁海洋牧场建设仍严重滞后。充分利用南海热带岛礁海域的资源与环境优势, 发展热带海洋牧场可以有力振兴岛礁经济、保护与合理开发岛礁资源, 同时也是维护南海海洋权益、实践“海洋强国”战略的有力举措。本文论述了南海热带岛礁海域开展海洋牧场建设的优势, 包括政策优势、自然地理优势、资源优势和产业经济优势等; 提出南海热带岛礁海洋牧场的适宜建设模式, 主要包括资源养护与增殖型海洋牧场和休闲旅游型海洋牧场; 综述了广东、广西和海南省在热带近岸和岛礁海洋牧场建设方面的进展; 阐述了热带岛礁牧场建设面临的困难和风险, 包括气候与自然灾害、生物敌害、基础设施落后、海域使用权审批严格等问题; 基于对问题的分析, 提出了相关的对策与建议, 包括科学选址、优化设施设计与投放方案、研发敌害应对技术、提升自动化信息化运营管理能力、创新牧场投资与运行模式、加大政府政策支持与扶持力度等, 相关建议以期为未来南海热带岛礁海洋牧场建设提供策略支持。

**关键词** 南海; 岛礁; 热带; 海洋牧场

**中图分类号** S967.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0173-08

我国的南海面积(九段线以内)约为 300 万 km<sup>2</sup>, 约占到全国海洋面积(473 万 km<sup>2</sup>)的三分之二。辽阔的南海不仅蕴藏着丰富的生物、油气、矿产资源, 也是我国经济与社会可持续发展的强大支持和保障因素。近几年来, 随着南海周边各国的崛起以及对资源的需求愈发紧张, 南海海域的领海归属权和权益之争

正愈演愈烈, 特别是对岛礁的争夺十分激烈。南海问题, 是资源问题, 更是战略问题。中共十八大报告提出了“提高海洋资源开发能力, 发展海洋经济, 保护海洋生态环境, 坚决维护国家海洋权益, 建设海洋强国”的战略。党的十九大报告进一步指出, “坚持陆海统筹, 加快建设海洋强国”。在南海形势错综复杂的

\* 海南省自然科学基金项目(417004)和科技部国际科技合作重点项目(2012DFG32200)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Hainan (417004), and Key Project of International Scientific Co-Operation of S&T Ministry of China (2012DFG32200)]. 许 强, E-mail: xuqianghnu@hainu.edu.cn

① 通讯作者: 王爱民, 教授, E-mail: aimwang@163.com

收稿日期: 2017-07-16, 收修改稿日期: 2017-08-28



当前,提高热带岛礁海域渔业资源开发能力,发展现代渔业,将起到“围渔戍边、守望领海”的作用,对于加强我国在该海域的存在、宣示国家领海主权均具有重要意义。

## 1 南海热带岛礁海域开展海洋牧场建设的必要性和紧迫性

海洋渔业资源的开发历来与国民经济息息相关,渔业产业也一直是我国海洋经济的重要组成部分之一。2016年,全国海洋渔业增加值占到了海洋产业总增加值的 16.2%(数据源自《2016 年中国海洋经济统计公报》)。但近年来,在近海渔业资源衰退的大背景下,南海的传统渔业已面临严峻挑战,渔业产业的转型升级势在必行。

为了有效保护与恢复近海渔业资源,以人工鱼礁投放和资源增殖放流为核心的现代海洋牧场建设应运而生。海洋牧场是基于海洋生态学原理和现代海洋工程技术,充分利用自然生产力,在特定海域科学培育和管理渔业资源而形成的人工渔场(杨红生,2016)。现代海洋牧场的特点集生境修复、资源养护、休闲渔业和景观生态于一体,体现出“生态优先、陆海统筹、三产贯通”的原则。海洋牧场建设通过政府或有雄厚实力的大型企业集团投资,引入高校和科研院所作为技术支撑,在较大范围的海域进行独立的渔场建设与运营,对当地海域与资源进行统一养护、增殖与管理,同时,配建现代化的产品加工、资源环境监测、休闲旅游等相关单元,实现资源的养护与生态化利用。海洋牧场承建企业可通过培训吸纳当地渔民进入企业从事牧场的生产与经营,在实现渔民转产转业的同时普及了海洋保护意识,对当地的资源保护起到积极作用。海洋牧场是资源管理型渔业的主要方式之一,是一个新型的增殖养殖渔业系统(张国胜等,2003)。这种生态型渔业发展模式颠覆了以往单纯的以捕捞、设施养殖为主的传统渔业生产方式,克服了由于过度捕捞带来的资源衰退以及由近海养殖引起的海水污染和病害加剧等弊端,真正实现了海洋经济发展和海洋生态环境保护并重。因此,在某种意义上说,海洋牧场是海洋渔业生产的一次革命,也是渔业产业转型升级的重要出路。

截止 2016 年,全国海洋牧场建设资金的投入已超过 80 亿元,其中,中央财政投入近 7 亿元,全国人工鱼礁建设规模已达 2 千万空方,礁区面积超过 11 万  $\text{hm}^2$ (阙华勇等,2016)。2015~2017 年,农业部先后审核通过了 3 批共计 64 个国家级海洋牧场示范区

(中华人民共和国农业部公告第 2321 号、2476 号、2605 号),推动了以海洋牧场建设为主要形式的区域性渔业资源养护、生态环境保护和渔业综合开发,但其中位于热带海域的仅有 9 家,而且处在用海十分紧张的广东和广西近海,海南岛周边以及西沙、中沙和南沙广阔的热带岛礁海域尚无成熟的示范区入选。

南海热带海域主要是指北回归线以南的水域。相对于渤海、黄海和东海,处于热带的海南岛周边以及西沙、中沙、南沙群岛海域拥有得天独厚的优良水质条件和丰富的生物多样性。早在 20 世纪末就有学者提出了南海农牧化的构想(黄巧珠等,1999);但受交通不便的影响,南海岛礁海域经济发展水平与大陆相比相对滞后,现代化海洋农牧产业形式的推广相较于南海北部近海海域严重滞后;同时,由于从事渔业生产的单位体量较小,多为散户,实力较弱,资源保护意识薄弱,缺乏先进的生产技术,由此造成渔业资源开发形式粗放,近岸和珊瑚礁海域酷渔滥捕猖獗,电鱼、炸鱼、毒鱼事件时有发生,对资源的破坏几乎是毁灭性的。因此,在南海热带岛礁海域引入现代化渔业产业模式、彻底扭转渔业资源开发利用落后的现状已迫在眉睫。

## 2 南海热带岛礁海域发展海洋牧场的优势

南海热带岛礁海域在海洋牧场建设方面具有诸多优势以及良好的条件,主要体现在以下几方面:

### 2.1 政策优势

中共十八大报告首次明确提出了“建设海洋强国”的战略,随之而来的是国家对近海渔业恢复的政策扶持力度逐步加大,我国沿海从南到北均开展了轰轰烈烈的渔业资源修复和海洋牧场建设计划,山东、辽宁、江苏、浙江、广东沿海均取得了卓有成效的进展。在南海众多热带岛礁海域开展海洋牧场建设、振兴岛礁渔业产业经济、保护岛礁资源环境、维护南海海洋权益正是实践“海洋强国”战略的具体举措,且更具有典型性与代表性。

海南是我国唯一全域位于热带的省份。2010 年,根据《国务院关于推进海南国际旅游岛建设发展的若干意见》精神,海南省正式启动“国际旅游岛”建设。2012 年随着三沙市正式成立,海南省成为拥有热带海域面积最广、岛礁数量最多的省份。2013 年,海南省出台了《关于加快建设海洋强省的决定》,文件响应了国家“海洋强国”的政策呼声,进一步明确了海南省海洋经济发展布局和产业发展方向,大力发展现代海洋渔业,培育壮大海洋新兴产业。2018 年 4 月

11 日, 国务院发布的《关于支持海南全面深化改革开放的指导意见》中更明确提出支持海南“建设现代化海洋牧场”的方针政策, 这为南海热带岛礁海洋牧场的发展提供了前所未有的契机。推进新型现代海洋牧场产业模式, 并与三沙海洋休闲旅游有机结合, 能很好满足海南省建设“自由贸易区”和“国际旅游岛”的发展战略要求, 同时也是充分发挥区位优势、建设海洋强省的重要抓手。

## 2.2 自然地理优势

南海热带岛礁海域具有独特的地理条件与特点, 十分适合发展具有鲜明地域特色的现代海洋牧场。以典型的三沙群岛海域为例, 西沙、中沙和南沙群岛海域总面积约 200 万  $\text{km}^2$ , 岛、礁、洲、沙滩 200 余个, 其中, 西沙群岛 40 余个, 中沙群岛 33 个, 南沙群岛 192 个, 岛礁海洋牧场建设空间广阔(陈国宝等, 2005)。三沙海域气候温热, 表层月平均水温在  $25^\circ\text{C}$  以上, 最高可达  $30^\circ\text{C}$ , 一年四季均可下海。海水平均盐度为 35, 属高温高盐海域。岛礁海域水质清新, 透明度高, 拥有众多的热带海岛自然资源, 区域内无污染, 水质优良, 是众多热带经济种类最适宜的资源增殖海域。与此同时, 海岛自然风光秀美绝伦, 丰富的海洋生物、充沛的阳光、清澈的海水等对广大游客具有极大的吸引力, 十分适宜于发展休闲旅游型海洋牧场。

## 2.3 资源优势

南海是一座巨大的渔业宝库, 共分布有 20 余个天然渔场(图 1, 引自《海南省地图集》), 岛礁中上层鱼类渔业资源丰富, 渔获品质优, 总储量巨大。据资源评估调查分析结果, 南海鸕鸟贼夏季资源量约为 236 万 t(李斌等, 2016), 南沙群岛海域金枪鱼年可捕资源量约为 1.7 万 t(张鹏等, 2010)。南海众多岛礁海域珊瑚礁区域广阔, 各种珊瑚礁鱼类、大型石斑鱼、鲷科鱼类资源十分丰富, 东沙、西沙和中沙、南沙群岛分别记录鱼类 514 种、632 种和 548 种(李永振, 2010)。据估算, 南沙群岛岛礁水域鱼类的年生产量不低于  $2.1 \text{ t}/\text{km}^2$ , 以年生产量的 50% 估算, 潜在渔获量不少于 5.5 万 t(李永振等, 2004)。南海的海参资源也很丰富, 据统计, 分布于南海岛礁海域的可食用海参种类有 24 种, 资源量较大的包括梅花参、玉足海参、图纹白尼参、蛇目白尼参、黑海参等, 其中, 又以黑乳参、糙海参、梅花参、花刺参、图纹白尼参、乌皱辐肛参和白底辐肛参经济价值较高(王红勇, 2006), 资源开发潜力巨大。除此之外, 重要的资源种类还包括砗磲等各种贝类以及甲壳类等。南海渔业

资源的可利用潜力巨大, 且因其独特的区位优势而具有很好的开发前景, “三沙海产品”现已成为海南省知名度很高的品牌, 在海南省本岛已形成专门的三沙海产品集散地, 来自三沙清洁海域的优质海产品一直供不应求。通过海洋牧场建设, 进一步增殖高值海产品, 可将该品牌继续做大做强, 打造海南省乃至全国无公害绿色海产品知名品牌。



图 1 南海渔区分布图(引自《海南省地图集》)

Fig.1 Fishing grounds in South China Sea  
(Cited from “Maps of Hainan Province”)

## 2.4 产业经济优势

依托于海南岛打造“自由贸易区”和“国际旅游岛”的契机, 现代海洋牧场建设与海洋旅游业的融合将形成巨大的产业合力。海洋牧场建设与海洋旅游业可达到相辅相成、相互促进的效果: 海洋牧场建设通过恢复增殖丰富的海洋生物资源支持并促进海洋旅游的发展, 而海洋旅游业可显著提高海洋牧场建设的综合经济效益。依托于海洋牧场建设, 发展海洋旅游业对于充分利用本地资源优势、打造特色支柱产业、提升海洋经济和综合实力具有十分重要的意义。海洋

牧场建设可与珊瑚礁观光、科学考察、海底潜水、海洋探险等项目有机结合,同时带动其他诸如海上运动、海上娱乐、豪华邮轮等海洋旅游项目,进一步提升南海岛礁特色海洋旅游产品层次,拓展旅游业的发展空间,增强竞争力。

### 3 南海热带岛礁海洋牧场适宜建设模式

目前,渤海、黄海和东海均已开展了多年的海洋牧场建设,积累了不少经验,但绝大多数都是以收获海产品为主的生产性海洋牧场。综合分析南海热带岛礁海域特殊的自然条件与区位优势,本文对适宜的海洋牧场建设模式及举措提出以下建议:

#### 3.1 建设目标

充分依托南海优良的热带岛礁资源,以珊瑚礁生态系统养护为核心,以人工鱼礁建设、资源养护增殖为技术手段,以高值绿色海产品和高端旅游产业为经济效益最大化出口,采用工程化、生态化理念,引入自动化控制、信息化管理等先进技术,遵循以点带面、逐步推进的原则,科学设计、高标准建设,形成一批热带岛礁资源养护增殖与休闲渔业有机结合的国家级现代化海洋牧场示范区,显著提升南海热带岛礁海域的渔业资源利用能力。

#### 3.2 海洋牧场类型

综合考虑南海热带岛礁海域的自然、地理、产业等方面的优势,适宜建设的海洋牧场类型分为2种:

**3.2.1 热带岛礁资源养护与增殖型海洋牧场** 该类型海洋牧场以生境养护与资源修复增殖为主要目标。选择热带珊瑚礁海域(环礁内部潟湖或礁盘外毗邻水域)为建设区域,以养护、修复原有珊瑚礁生态系统为根本,适当投放人工鱼礁、船礁、浮鱼礁等辅助设施,筛选适宜经济种类(包括石斑鱼类、鲷科鱼类、龙虾、对虾、珍珠贝、海参、鲍等)开展资源增殖。牧场同时配建完善的资源环境监测系统与远程管理单元,保证牧场的高效运营,提升其抵抗自然风险的能力。该类型海洋牧场主要以公益型海洋牧场为主。

**3.2.2 热带岛礁休闲旅游型海洋牧场** 该类型海洋牧场以发展海洋休闲旅游业为建设目标。选择基础设施条件较好、距本岛或大陆较近的岛礁为建设区域,根据实际情况开展自然珊瑚礁生态系统养护、集鱼型人工鱼礁区建设以及景观型人工鱼礁布放等,养护恢复牧场区域的自然鱼类资源,同时,开展高值经济鱼类的增殖放流,为游钓、休闲潜水等旅游项目提

供条件保障。牧场同时配建陆基或船基海上休闲平台以及其他旅游保障单元(酒店、游艇、餐饮等),同时开发其他适宜的海上旅游项目,为游客提供舒适、安全、高水平的服务。该类型海洋牧场主要为经营性海洋牧场,由企业申请海域并开展建设与经营。

### 4 南海热带海洋牧场建设进展

随着南海在国家战略中的地位逐步提升,南海岛礁资源的开发与可持续利用的步伐也正逐步加快,发展热带岛礁海洋牧场正经历着前所未有的契机。广东省在近岸人工鱼礁与海洋牧场研究与建设方面有丰富的经验积累,早在2000年就出台了沿海人工鱼礁建设十年规划,列出了12处重要的人工鱼礁区。之后在大亚湾、南澳岛等海域基于成熟的人工鱼礁区发展海洋牧场,已形成龟龄岛、万山、南澳岛、汕尾遮浪角等8个国家级海洋牧场示范区,为热带岛礁型海洋牧场建设提供了重要的借鉴。广西壮族自治区近几年在海洋牧场方面的建设进展迅速,目前也已有防城港珍珠湾海洋牧场列入国家级海洋牧场示范区。另有4处海洋牧场示范区已列入广西海洋牧场总体建设规划中。

海南省近几年对海洋牧场研究与建设的支持力度正逐步加大。2012年,海南省通过了全省海洋牧场建设规划(2013~2020),规划期内将投资2.5亿元建设6个海洋牧场区,投放人工礁体30万空方,使海南省海洋牧场总面积达到1300余 $\text{hm}^2$ ,完成2个国家级海洋牧场的创建工作,研究探索适合海南热带海域近岸和岛礁型海洋牧场建设模式,同时开展人工增殖放流活动,养护海洋渔业资源,发展休闲渔业,实现渔业的可持续发展。截止2017年,海南省共建成了4个规模化海洋牧场区:三亚红塘湾海洋牧场,投放人工鱼礁6665空方;蜈支洲岛海洋牧场区,投放鱼礁45000空方;三沙市羚羊礁海洋牧场区,投放鱼礁960空方;文昌冯家湾海洋牧场区,投放鱼礁3000余空方(海南省海洋与渔业厅,2017)。其中,蜈支洲岛和羚羊礁海洋牧场是热带岛礁型海洋牧场的典型代表。

从2010年开始,在海南省政府的支持下,三亚蜈支洲岛旅游区启动了我国第一个热带海岛休闲旅游型海洋牧场的建设,一期建设面积为60余 $\text{hm}^2$ 。2011年来,已投放人工鱼礁和船礁45000空方,取得了显著的生境与生物资源恢复效果,珊瑚礁生境得以有效恢复,野生经济鱼类资源量增加显著。海洋牧场的良好效果同时带动了休闲潜水、游钓等海上旅游项目的繁荣。目前,该项目已进入二期建设阶段,未来5年预计投资2亿元,牧场面积将进一步扩大,同

时,将创新引入景观式鱼礁区建设,最终打造充满梦幻海底景观的热带岛礁型海洋牧场。

2016年底,三沙市首个以珊瑚岛礁为核心的海洋牧场示范区完成一期工程验收,该工程由农业部海洋渔业资源保护项目支持,在西沙永乐群岛羚羊礁潟湖内建立了13 hm<sup>2</sup>的海洋牧场示范区,投放小型钢质沉船礁10件,钢筋混凝土礁体120件,种植马尾藻、麒麟菜、江蓠等藻类300 m<sup>2</sup>(刘操,2016)。该项目为热带岛礁海洋牧场建设积累了宝贵的经验,南海热带岛礁海洋牧场建设的大幕正徐徐拉开。未来海南省将继续加大支持力度,扩大牧场规模、完善配套单元,努力达到国家级海洋牧场示范区要求。

## 5 南海热带海洋牧场建设存在的困难、风险及对策

### 5.1 困难与风险

南海热带海域具有建设海洋牧场的诸多优势条件,但同时也存在一些困难和风险。在前期开展的探索性实践工作中也发现了不少问题,有待于下一步重点解决。

**5.1.1 气候与自然灾害** 自然灾害,特别是台风频发是南海热带海域开展海洋牧场建设面临的最突出的风险因子。南海是我国台风灾害最严重的海域,不但种类多,而且灾害影响范围大,损失严重,如台风、风暴潮、海浪等。西沙群岛海域几乎每年都会遭遇多次台风的袭击;南沙群岛远离大陆,基础设施薄弱,抵御自然灾害的能力也很低。台风对海洋牧场的影响主要是直接摧毁陆地、水面以及浅水区域水下的增养殖设施,也会造成水下投放的人工鱼礁出现移位,从而影响礁体布局,甚至会影响到航道的安全。之前在西沙、南沙海域的深水网箱设施多次受到强台风的毁灭性破坏,造成相关企业蒙受巨大经济损失,甚至破产。

同时,南海岛礁海域属于高温高湿高盐环境,对海洋牧场相关的设施、设备性能影响极大,如造成混凝土强度降低,内部钢筋的锈蚀加速,制作的礁体寿命缩短;高湿高盐环境也会使得各种机械设备发生严重腐蚀,难以正常运转,一些电子监控设备也会出现各种故障,造成性能下降和不稳定。

**5.1.2 敌害生物众多** 南海海域分布的岛礁生态系统较为复杂,生物种类丰富,但另一方面敌害生物众多,会对增养殖生物造成潜在威胁,如植食性鱼类(篮子鱼等)会大量啃食养殖的大型藻类(麒麟菜、江蓠等)苗种,肉食性腹足类、蟹类和鱼类会大量捕食底播双壳贝类,增殖放流的鱼类也会被更加凶猛的肉食

性鱼类所捕食。

**5.1.3 交通不便,基础设施落后** 热带岛礁海域开展海洋牧场建设面临的另一突出问题是绝大多数岛礁距离陆地或海南本岛十分遥远,这也成为制约热带海洋牧场开发的瓶颈。岛礁距离遥远会造成一系列的问题,首先是运输成本高,诸如基建材料、设备、物资、苗种、海产品等均需要长途运输才能到达,继而推高了海洋牧场的建设与运营成本。长途运输也会造成海产品的鲜度下降,运输过程中的保鲜技术要求更高。另外,往返岛礁时间久、船期少、海途颠簸、条件艰苦,外省市甚至海南本岛的劳务人员都很难招到,会造成用工荒,制约了海洋牧场的建设与运营。距离远也会造成海洋牧场建设运营过程中的监控和管理难度加大。

尽管近几年国家投入大量资金加强三沙群岛部分岛礁的基础设施建设,许多岛礁已具备较好的工作与生活条件,但绝大多数岛礁仍存在基本生活条件差、保障设施建设滞后的问题。没有基本的淡水、供电、通讯、生活物资、蔬菜、粮食等生活条件,海洋牧场的建设需求难以满足,正常的经营管理更是难以为继。

**5.1.4 海域使用权审批严格,海域使用金费用高昂**

南海热带海域开展海洋牧场建设所需使用的海域均应按照国家海域使用管理办法办理相关申请审批与使用金缴交手续。目前,国内除公益性海洋牧场建设外,经营性海洋牧场建设海域使用权的审批均应走招标采购挂牌程序,但南海热带岛礁海域由于地理位置特殊,绝大部分海域均未开放出让,因此,经营性海洋牧场很难获得海域使用权。国家海域使用金缴交标准按照不同县市所属级别分为六等,海洋牧场建设相关的海域使用性质以“透水构筑物用海”(人工鱼礁)和“开放式养殖用海”为主,前者使用金在0.75~3万元/hm<sup>2</sup>·年不等,后者则由各省、自治区、直辖市自行确定,例如广东省为70~300元/亩·年,广西壮族自治区为不低于100元/亩·年,海南省为50~150元/亩·年(广东省财政厅,2007;广西壮族自治区财政厅,2001;海南省财政厅,2007)。目前,大陆经营性海洋牧场建设多基于原有养殖用海进行升级,使用金一般较低,但海南热带岛礁海域一般均无开放养殖用海活动,如需新申请经营性海洋牧场建设用海,海域使用金的缴交标准只能按照透水构筑物用海执行,且一般需一次性缴交至少15年的费用,数额巨大,加之牧场投资回报周期较长、风险较大,绝大多数企业难以负担。另一方面,目前中央财政在南海海洋牧场方面的投入较少,直到2017年才有千万以上的资金投入

到文昌冯家湾和海口东海岸 2 个海洋牧场示范区的建设中,海南省的财政支持也有限,大大限制了热带岛礁海洋牧场的发展。

## 5.2 对策

针对上述存在的问题,国内学者已从多个角度提出了相关的对策,包括监测能力建设(严慧慧等, 2017)、发展经营策略(田涛等, 2017)、关键技术与保障措施(阙华勇等, 2016)等方面。本文基于上述观点,围绕热带岛礁海域海洋牧场建设进一步提出如下应对措施:

**5.2.1 科学选址** 在岛周尽可能选择避风效果较好的一侧或海湾内,降低台风带来的破坏性。海洋牧场区建设示范点可优先选择基础设施条件较好的岛礁,以期达到良好的示范作用,未来随着三沙各岛礁的发展、各项配套设施逐步完善,再进一步将成功案例进行推广。同时,适时向政府或军事机构呼吁,三沙岛礁海域除军事管理外适度开放民用项目,实现军民融合,共谋岛礁海洋经济的协调发展。

**5.2.2 优化设施设计与投放方案** 针对南海热带海域高温高湿高盐特点,开展专用耐腐蚀材料的研发,提升设施的耐久性;海洋牧场涉及所有的海上设施及其锚固方案,均应评估其抗风浪能力,根据评估结果确定其适宜投放的水域,最大程度保证其抗风浪性能;研发高密闭性电子设备防护系统,提升设备、仪器的防盐雾侵蚀能力,保证其可靠性。

**5.2.3 研发敌害应对技术,提高资源回捕率** 针对敌害生物繁多的问题,可根据捕食生物种群变动规律,采取错峰增养殖的方法,避开敌害生物大量集中摄食期,在其摄食高峰期之前收获;同时,控制底播增殖生物的最小规格,降低其被捕食的几率。两种措施均可提高底播资源生物在自然海域的成活率和回捕率。

**5.2.4 提升自动化、信息化运营管理能力** 在离岸较远的岛礁海洋牧场建设自动化监测、控制与远程管理系统,提高牧场运营的智能化水平,降低牧场运营管理对人力资源的依赖程度;完善牧场信息化系统,建立“陆、海、空、天”监测平台,涵盖气象站、地波雷达、水下远程监测装备、无人机遥感、卫星遥感等技术手段,整合多平台监测数据库,实现牧场风险预警预报和防灾减灾能力的大幅提升。

**5.2.5 创新牧场投资与运行模式** 针对南海岛礁海域使用受限的问题,建议充分利用好中央资金及省级生态补偿资金,重点推进国家或地方政府投资建

设、以生态修复和资源养护为核心目标的公益性海洋牧场。该类型海洋牧场海域使用申请相对容易,同时,牧场在岛礁生态修复与资源恢复方面发挥的重要作用可与国家“保护并开发利用好热带岛礁”的战略要求相契合。与此同时,公益性海洋牧场建成后的科学运行与管理也十分重要,建议通过公开、透明的招投标方式筛选有实力、可靠的涉海企业承接岛礁海洋牧场的运营与管理,可保证牧场的建设效果和效益的持续产出。政府相关职能部门在牧场设立监管机构,监督并定期检查企业的运行情况,可保证牧场的长期稳定运行。

**5.2.6 加大政府政策支持与扶持力度** 2015 年《农业部关于创建国家级海洋牧场示范区的通知》指出,“各级渔业主管部门也要整合现有资源,在海域规划、相关审批、政策扶持和资金投入等方面加大支持力度;同时积极争取地方政府和有关部门的支持,对海洋牧场建设给予地方财政配套,并在减免海域使用费用、简化环评手续,以及信贷、税收、保险等方面进行政策倾斜。”因此,呼吁南海各省市也应尽快出台相关政策措施,在海域使用权审批程序方面给予简化、海域使用金缴交方面给予优惠与减免。例如,2017 年 6 月广西壮族自治区水产畜牧兽医局即发布通知,广西区海洋牧场示范区项目用海实施了按公益性事业用海管理、全部减免项目海域使用金的鼓励政策(广西壮族自治区水产畜牧兽医局, 2017),极大促进了海洋牧场建设进程。未来希望拥有热带海域最广的海南省也能尽快出台政策,推动区域海洋牧场建设的快速发展。

## 6 展望

在南海热带岛礁海域,特别是三沙海域建设海洋牧场,海南省责任重大。在具体工作的实施过程中,应首先依托国内海洋牧场相关科研团队,针对南海热带岛礁海域特点进行相关技术的研发攻关,构建因地制宜的海洋牧场建设技术体系;其次,应坚持试点先行、逐步推进的原则,建议先期在海南本岛周边分布有珊瑚礁生态系统的近岸岛礁海域建立海洋牧场示范点,进行关键技术中试,总结经验;进一步在西沙群岛选择 2~3 个基础设施条件较好的岛礁海域(如赵述岛、羚羊礁)高标准、高起点建设一批独具特色的现代化海洋牧场示范区,未来再将成功经验辐射整个南海热带岛礁海域,最终使得现代海洋牧场成为“屯渔戍边、经略南海、服务国家战略”的重要手段。

## 参 考 文 献

- Aquaculture, Veterinary and Medicine Bureau of the Guangxi Zhuang Autonomous Region. Charge for free for marine ranching sea area in Guangxi. China Fisheries Report, 2017-06-12, A02 [广西壮族自治区水产畜牧兽医局, 广西海洋牧场免收海域使用金. 中国渔业报, 2017-06-12, A02]
- Chen GB, Li YS. Discussion on the sustainable utilization of coral reef fishery in South China Sea. Ocean Development and Management, 2005, 22(6): 84–87 [陈国宝, 李永振. 南海岛礁渔业可持续利用的探讨. 海洋开发与管理, 2005, 22(6): 84–87]
- Financial Department of Guangdong. Charge standard for aquacultural and land reclamation sea area. Guangdong Financial Document No.204, 2007-10-28 [广东省财政厅, 广东省农业填海造地等用海海域使用金征收标准, 粤财综[2007]204号, 2007-10-28]
- Financial Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Charge standard and management regulation for sea area utilization in Guangxi. Guangxi Financial Document No.70, 2001-12-13 [广西壮族自治区财政厅, 广西壮族自治区海域使用金征收管理办法, 桂财综[2001]70号, 2001-12-13]
- Financial Department of Hainan. Charge standard and management regulation for aquacultural, land reclamation and salt industry sea area. Hainan Financial Document No.2087, 2007-12-28 [海南省财政厅. 海南省农业填海造地养殖盐业用海海域使用金征收标准和管理规定, 琼财综[2007]第2087号, 2007-12-28]
- Fisheries and Fisheries Administration of Chinese Ministry of Agriculture. Announcement about the establishment of state marine ranching demonstration district. Agriculture & Fishery Document No.18, 2015-04-20 [中华人民共和国农业部渔业渔政管理局, 农业部关于创建国家级海洋牧场示范区的通知. 农渔发[2015]18号, 2015-04-20]
- Hainan Surveying and Mapping Information Center of the State Bureau of Surveying and Mapping. Maps of Hainan Province. Guangzhou: Guangdong Map Publishing House, 2008 [海南省地图集. 国家测绘局海南测绘资料信息中心编制. 广州: 广东省地图出版社, 2008]
- Huang QZ, Yu DH, Chen YQ. Current status and study assumption of marine ranching in South China Sea. Journal of Zhanjiang Ocean University, 1999, 19(2): 76–80 [黄巧珠, 喻达辉, 陈永青. 南海海洋农牧化研究的现状与研究设想. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(2): 76–80]
- Li B, Chen GB, Guo Y, *et al.* Hydroacoustic assessment of spatial-temporal distribution and biomass of fishery resources in the central South China Sea. South China Fisheries Science, 2016, 12(4): 28–37 [李斌, 陈国宝, 郭禹, 等. 南海中部海域渔业资源时空分布和资源量的水声学评估. 南方水产科学, 2016, 12(4): 28–37]
- Li YZ, Chen GB, Yuan WW. Exploitive status quo and potential of coral reef fishery resources in Nansha islands waters. Journal of Tropical Oceanography, 2004, 23(1): 69–75 [李永振, 陈国宝, 袁蔚文. 南沙群岛海域岛礁鱼类资源的开发现状和开发潜力. 热带海洋学报, 2004, 23(1): 69–75]
- Li YZ. Species diversity and biology of fish in coral reef waters in Xisha, Zhongsha and Nansha islands, South China Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [李永振. 西沙、中沙和南沙群岛海域珊瑚礁鱼类物种多样性与生物学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- List of State Marine Ranching Demonstration Districts (1st group). Announcement of Chinese Ministry of Agriculture, No.2321. Nov. 17, 2015 [国家级海洋牧场示范区名单(第一批), 中华人民共和国农业部公告第2321号, 2015年11月17日]
- List of State Marine Ranching Demonstration Districts (2st group). Announcement of Chinese Ministry of Agriculture, No.2476. Dec. 8, 2016 [国家级海洋牧场示范区名单(第二批), 中华人民共和国农业部公告第2476号, 2016年12月8日]
- List of State Marine Ranching Demonstration Districts (3rd group). Announcement of Chinese Ministry of Agriculture, No.2605. Nov. 13, 2017 [国家级海洋牧场示范区名单(第三批), 中华人民共和国农业部公告第2605号, 2017年11月13日]
- Liu C. The engineer project of the first marine ranching district in Sansha has passed acceptance check. Hainan Daily, 2016-11-01, A09 [刘操. 三沙首个海洋牧场示范区海洋工程顺利通过验收. 海南日报, 2016-11-01, A09]
- Marine and Fishery Agency of Hainan, Hainan encourage companies to invest on marine ranching. China Fisheries Report, 2017-06-05, A01 [海南省海洋与渔业厅, 海南鼓励企业投资海洋牧场. 中国渔业报, 2017-06-05, A01]
- Que HY, Chen Y, Zhang XM, *et al.* Modern marine ranching: Status and development strategy. Chinese Engineering Sciences, 2016, 18(3): 79–84 [阙华勇, 陈勇, 张秀梅, 等. 现代海洋牧场建设的现状与发展对策. 中国工程科学, 2016, 18(3): 79–84]
- State Oceanic Administration. Statistical bulletin of China's Marine economy of 2016. 2017-03-16. [http://www.soa.gov.cn/zwgk/hygb/zghyjjtjgb/201703/t20170322\\_55289.html](http://www.soa.gov.cn/zwgk/hygb/zghyjjtjgb/201703/t20170322_55289.html) [国家海洋局. 2016年中国海洋经济统计公报. 2017-03-16]
- Tian T, Qin S, Liu YH, *et al.* Construction ideas and developing strategy of marine ranching in Hainan Province. Ocean Development and Management, 2017, 34(3): 61–66 [田涛, 秦松, 刘永虎, 等. 海南省海洋牧场的建设思路与发展经营策略分析. 海洋开发与管理, 2017, 34(3): 61–66]
- Wang HY. Sea cucumber resource status and protecting strategies in Hainan Island and Xisha, Zhongsha and Nansha Islands. Beijing Fishery, 2006(1): 46–49 [王红勇. 海南岛及东、南、

- 西、中沙群岛海参资源现状与保护策略. 北京水产, 2006(1): 46–49]
- Yan HH, Wang FX. Primary review on marine ranching development in Hainan Province. Hebei Fishery, 2017(1): 56–60 [颜慧慧, 王凤霞. 海南省海洋牧场发展建设初探. 河北渔业, 2017(1): 56–60]
- Yang HS. Construction of marine ranching in China: Reviews and prospects. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(7): 1133–1140 [杨红生. 我国海洋牧场建设回顾与展望. 水产学报, 2016, 40(7): 1133–1140]
- Zhang GS, Chen Y, Zhang PD, *et al.* Significance and feasibility of establishing marine ranching in Chinese sea area. Journal of Dalian Fisheries University, 2003, 18(2): 141–144 [张国胜, 陈勇, 张沛东, 等. 中国海域建设海洋牧场的意义及可行性. 大连水产学院学报, 2003, 18(2): 141–144]
- Zhang P, Yang L, Zhang XF, *et al.* The present status and prospect on exploitation of tuna and squid fishery resources in South China Sea. South China Fisheries Science, 2010, 6(1): 68–74 [张鹏, 杨吝, 张旭丰, 等. 南海金枪鱼和鳶乌贼资源开发现状及前景. 南方水产, 2010, 6(1): 68–74]

(编辑 冯小花)

## Development of Marine Ranching at Tropical Island Area in South China Sea—Advantages, Status and Prospects

XU Qiang<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, GAO Fei<sup>1</sup>, WANG Aimin<sup>1①</sup>

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228; 2. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 570228)

**Abstract** The tropical South China Sea has profound development potential for its wide sea area, excellent marine environment, high biodiversity, and abundant bio-resource species. Recently, under the background of coastal fishery resource degradation, it has become vital to speed up the protection and sustainable utilization of tropical island fishery resources in this area. Marine ranching is a new type of modern fishery, which combines habitat remediation, bio-resource restocking, leisure fishery, and landscape ecology. It can help to develop the marine economy together with effective protection of the ecological environment. The development of marine ranching in the wide, tropical South China Sea area has been slow. There are several advantages to carrying out marine ranching in the tropical South China Sea, such as in political, natural habitat, bio-resources, and industrial economy aspects, *etc.* Two appropriate marine ranching types were identified, including stock enhancement and tourism and leisure types. The progress of tropical coastal and offshore island marine ranching construction in Guangdong, Guangxi and Hainan provinces were reviewed, especially the first successful construction of island marine ranching around Wuzhizhou Island in Sanya and the first coral reef marine ranching at Lingyang reef in Sanshan. Several potential risks affecting tropical offshore island marine ranching development were also documented, such as extreme weather (typhoon), predators, poor basic living facilities on islands, long distance for transportation, application difficulty on the using right of the marine ranching construction area, expensive fees for use of the sea area, *etc.* Based on considerations above, we provide detailed suggestions, including scientifically selecting sites, optimizing artificial facility design, developing new anti-corrosion reef material, deployment protocols, and anti-wave mooring techniques. We also give suggestions for: development of predator prevention techniques (to increase the recapture rate of released animals); development of automatic operation, monitoring, and management systems; development of feasible investment and operation modes; and more policy support from the government.

**Key words** South China Sea; Offshore island; Tropical area; Marine ranching

① Corresponding author: WANG Aimin, E-mail: aimwang@163.com

# 《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5期 2018年10月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.39 No.5 Oct. 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 金显仕

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

Jin Xianshi

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

10>