

中国科技核心期刊 中文核心期刊

2018

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第39卷

VOL.39

第6期 NO.6



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 6 期

2018 年 12 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

- 天津近岸人工鱼礁海域浮游植物群落及其变化特征 ..... 张雪 徐晓甫 戴媛媛 王宏 房恩军 侯纯强 高燕 郭彪 陈卫 (1)
- 流沙湾浮游植物群落特征季节变化及其与养殖活动的关系 ..... 苏家齐 朱长波 李俊伟 李婷 陈素文 颜晓勇 张博 (11)
- 象山港中部养殖海区营养盐的季节变化及富营养化 ..... 白怀宇 李秋芬 张艳 陈碧鹃 韩倩 夏斌 曲克明 (24)
- 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性和遗传关系分析 ..... 刘志刚 卢迈新 曹建萌 高风英 (31)
- 河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验 ..... 杨昆明 郭爱民 马江霞 段成任 谢志胜 岳城 (42)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2 种视黄酸受体 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  克隆及组织表达特性 ..... 宋雪松 徐永江 柳学周 史宝 王滨 刘永山 张雅星 (52)
- 热应激对银鲫生化指标和 HSP70 mRNA 表达的影响 ..... 周朝伟 胡续雯 雷骆 刘晓庆 任胜杰 杨旻珉 曹高祥 陈国梁 邓星星 李岩 李路宽 (65)
- 圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达 ..... 张乐乐 边力 常青 侯吉伦 陈四清 赵庆 刘琨 葛建龙 刘长琳 (72)
- 不同水温下无乳链球菌在尼罗罗非鱼体内的动态分布及其消除规律 ..... 郭富强 张德锋 曹建萌 刘志刚 可小丽 卢迈新 (81)
- 3 种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价 ..... 赵亭亭 张岩 陈超 李炎璐 张廷廷 乔莹 翟介明 李文升 (89)
- 草鱼死后常温贮藏过程中的品质变化 ..... 王红丽 施文正 邱伟强 王锡昌 (97)
- WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响 ..... 李旭鹏 孔杰 孟宪红 栾生 罗坤 (106)
- 南极磷虾(*Euphausia superba*)起捕后蛋白自溶进程及其影响因素 ..... 曹荣 余奔珂 赵玲 孙慧慧 刘淇 (114)
- 盐化幅度、速度及方式对凡纳滨对虾仔虾生长和存活率的影响 ..... 赵玉超 李玉全 孙振鹏 王淑生 付瑞江 张绍龙 (119)
- 桑沟湾楮岛大叶藻床区域菲律宾蛤仔的生态贡献 ..... 吴亚林 高亚平 吕旭宁 王晓芹 李凤雪 姜妮妮 王军威 张义涛 蒋增杰 (126)
- 靖海湾条斑紫菜的营养及鲜味评价 ..... 赵玲 曹荣 王联珠 刘淇 陈少凡 符鹏飞 (134)
- 中国近海铜藻 ITS 与 *cox1* 序列相似性分析 ..... 吕芳 郭文 丁刚 刘玮 詹冬梅 吴海一 (141)
- 东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析与比较 ..... 贡艺 李云凯 陈玲 高小迪 陈新军 (147)
- 海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的发酵条件优化 ..... 朱祥杰 王震 苑志欣 郝建华 郑兰红 (155)
- 4 种因子对玫瑰红红球菌 XH2 氨基去除效果的影响 ..... 田雅洁 曹煜成 胡晓娟 黄小帅 徐煜 许云娜 李卓佳 文国樑 (164)

### 研究简报

- 脊尾白虾不同发育期 mtDNA 拷贝数变化特征分析 ..... 张培 徐莞媛 李志辉 高焕 张庆起 赖晓芳 陈建华 阎斌伦 (173)
- 南极磷虾及其制品中总砷含量的分析方法研究 ..... 张学超 刘小芳 邱阿敏 侯钦帅 冷凯良 高华 (180)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.39 No.6 December 2018

- Phytoplankton Community Characteristics and Variation at Artificial Reefs of Tianjin Offshore..... ZHANG Xue, XU Xiaofu,  
.....DAI Yuanyuan, WANG Hong, FANG Enjun, HOU Chunqiang, GAO Yan, GUO Biao, CHEN Wei (1)
- Phytoplankton Community Characteristics in Different Seasons and Their Relationship with Aquaculture in Liusha Bay.....  
.....SU Jiaqi, ZHU Changbo, LI Junwei, LI Ting, CHEN Suwen, XIE Xiaoyong, ZHANG Bo (11)
- Seasonal Variation in Nutrients and Evaluation of Eutrophication in the Aquaculture Areas in the Middle Water Areas of  
Xiangshan Harbor.....BAI Huaiyu, LI Qiufen, ZHANG Yan, CHEN Bijuan, HAN Qian, XIA Bin, QU Keming (24)
- Genetic Diversity and Genetic Relationship Analysis of *Tilapia* “Yuemin No.1” and Its Breeding Populations.....  
.....LIU Zhigang, LU Maixin, CAO Jianmeng, GAO Fengying (31)
- Isolation, Identification, and Antibiotic Sensitivity of Bacillary Enteritis in *Perca fluviatilis* Linnaeus.....  
.....YANG Kunming, GUO Aimin, MA Jiangxia, DUAN Chengren, XIE Zhisheng, YUE Cheng (42)
- Molecular Cloning and Spatial Expression of Two Retinoic Acid Receptors RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  from *Cynoglossus  
semilaevis*.....SONG Xuesong, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, WANG Bin, LIU Yongshan, ZHANG Yaxing (52)
- Effects of Heat Stress on Biochemical Indices and *HSP70* mRNA Expression in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*)  
.....ZHOU Chaowei, HU Xuwen, LEI Luo, LIU Xiaoqing, REN Shengjie, YANG Minmin,  
CAO Gaoxiang, CHEN Guoliang, DENG Xingxing, LI Yan, LI Lukuan (65)
- Cloning and Expression of the *sox9* Gene in Spotted Halibut (*Verasper variegatus*).....  
.....ZHANG Lele, BIAN Li, CHANG Qing, HOU Jilun, CHEN Siqing, ZHAO Qing, LIU Kun, GE Jianlong, LIU Changlin (72)
- Dynamic Distribution and Elimination Patterns of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus* at Different Water  
Temperatures.....GUO Fuqiang, ZHANG Defeng, CAO Jianmeng, LIU Zhigang, KE Xiaoli, LU Maixin (81)
- Analysis of Nutrient Components and Evaluation of Nutritive Quality in Flesh of Three Species of Cultured Groupers.....  
.....ZHAO Tingting, ZHANG Yan, CHEN Chao, LI Yanlu, ZHANG Tingting, QIAO Ying, ZHAI Jieming, LI Wensheng (89)
- Quality Changes of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in the Process of Postmortem Stored at Room Temperature  
.....WANG Hongli, SHI Wenzheng, QIU Weiqiang, WANG Xichang (97)
- Effect of White Spot Syndrome Virus Infection on *bantam* and Candidate Target Genes in the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus  
chinensis*.....LI Xupeng, KONG Jie, MENG Xianhong, LUAN Sheng, LUO Kun (106)
- Study on the Protein Autolysis Process of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Its Influencing Factors.....  
.....CAO Rong, YU Yike, ZHAO Ling, SUN Huihui, LIU Qi (114)
- Effects of High-Salinity Domestication Gradient, Speed, and Mode on Weight Gain, Activity, and Survival Rate of *Litopenaeus  
vannamei* Postlarvae.....ZHAO Yuchao, LI Yuquan, SUN Zhenpeng, WANG Shusheng, FU Ruijiang, ZHANG Shaolong (119)
- Ecological Contribution of *Ruditapes philippinarum* in the Seagrass Meadow of Sanggou Bay.....WU Yalin,  
.....GAO Yaping, LÜ Xuning, WANG Xiaoqin, LI Fengxue, JIANG Weiwei, WANG Junwei, ZHANG Yitao, JIANG Zengjie (126)
- Nutritional Analysis and Umami Assessment of *Pyropia yezoensis* from Jing Bay.....  
.....ZHAO Ling, CAO Rong, WANG Lianzhu, LIU Qi, CHEN Shaofan, FU Pengfei (134)
- Analysis of the Similarity of *ITS* and *cox I* Sequences of *Sargassum horneri* Along the Offshore of China.....  
.....LÜ Fang, GUO Wen, DIND Gang, LIU Wei, ZHAN Dongmei, WU Haiyi (141)
- A Comparative Analysis of Fatty Acid Profiles in Muscle of *Dosidicus gigas* from Different Harvest Locations in the Eastern  
Pacific Ocean.....GONG Yi, LI Yunkai, CHEN Ling, GAO Xiaodi, CHEN Xinjun (147)
- Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* sp. N11-8 on the Production of Protease PBN11-8.....  
.....ZHU Xiangjie, WANG Zhen, YUAN Zhixin, HAO Jianhua, ZHENG Lanhong (155)
- Effects of Four Physical and Chemical Factors on the Ammonia Nitrogen Removal of *Rhodococcus rhodochrous* XH2...  
.....TIAN Yajie, CAO Yucheng, HU Xiaojuan, HUANG Xiaoshuai, XU Yu, XU Yunna, LI Zhuojia, WEN Guoliang (164)
- Profiles of mtDNA Copy Number at Different Developmental Stages of *Exopalaemon carinicauda*.....  
.....ZHANG Pei, XU Wanyuan, LI Zhihui, GAO Huan, ZHANG Qingqi, LAI Xiaofang, CHEN Jianhua, YAN Binlun (173)
- Study on the Analytical Method of Total Arsenic Content in Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Its Related Products.....  
.....ZHANG Xuechao, LIU Xiaofang, QIU Amin, HOU Qinshuai, LENG Kailiang, GAO Hua (180)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171012002

http://www.yykxjz.cn/

张雪, 徐晓甫, 戴媛媛, 王宏, 房恩军, 侯纯强, 高燕, 郭彪, 陈卫. 天津近岸人工鱼礁海域浮游植物群落及其变化特征. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 01–10

Zhang X, Xu XF, Dai YY, Wang H, Fang EJ, Hou CQ, Gao Y, Guo B, Chen W. Phytoplankton community characteristics and variation in artificial reefs of Tianjin offshore. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 01–10

# 天津近岸人工鱼礁海域浮游植物群落 及其变化特征\*



张 雪<sup>1,2</sup> 徐晓甫<sup>1,2</sup> 戴媛媛<sup>1</sup> 王 宏<sup>1,2①</sup> 房恩军<sup>1,2</sup>  
侯纯强<sup>1,2</sup> 高 燕<sup>1,2</sup> 郭 彪<sup>1,2</sup> 陈 卫<sup>1,2</sup>

(1. 天津渤海水产研究所 天津 300457; 2. 天津市海洋牧场技术工程中心 天津 300457)

**摘要** 2016年5月、7月和11月分别对天津近岸海域2010年、2012年和2014年投放的人工鱼礁区及非人工鱼礁区(对照区)进行3个航次的调查,每个区域设置3个站位,共计12个站位。结果显示,共鉴定浮游植物2门28属58种,其中,硅藻门19属44种,甲藻门9属14种。物种以硅藻为主,占总物种的75.9%,其次为甲藻,占总物种的24.1%。浮游植物优势种以硅藻门的圆筛藻属和角毛藻属为主,主要有威氏圆筛藻(*Coscinodiscus wailesii*)、星脐圆筛藻(*C. asteromphalus*)、格氏圆筛藻(*C. granii*)、虹彩圆筛藻(*C. oculusiridis*)、圆筛藻(*Coscinodiscus spp.*)、卡氏角毛藻(*Chaetoceros castracanei*)、劳氏角毛藻(*Ch. lorenzianus*)、旋链角毛藻(*Ch. curvisetus*)、尖刺伪菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)、柔弱几内亚藻(*Guianardia delicatula*)、刚毛根管藻(*Rhizosolenia setigera*)、翼鼻状藻印度变型(*Proboscia alata f. indica*)和夜光藻(*Noctiluca scintillans*)。浮游植物细胞丰度存在明显的季节差异,11月、7月和5月浮游植物细胞丰度分别为 $94.79 \times 10^4$ 、 $39.53 \times 10^4$ 和 $21.5 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>,浮游植物多样性指数也有明显的季节差异,11月香农-威纳多样性指数、丰富度指数和均匀度指数均比5月和7月高。从人工鱼礁区与对照区对比来看,5月浮游植物细胞丰度礁区外显著高于鱼礁区,7月和11月2014年鱼礁区浮游植物细胞丰度显著高于其他鱼礁区和礁区外。浮游植物多样性指数,礁区外和2012年鱼礁区低于2010年和2014年鱼礁区,礁区外最低。研究表明,人工鱼礁的构建对于提高浮游植物群落多样性具有显著效果,但随着时间的延长,浮游植物群落多样性不是一直增高,有一定程度的波动。

**关键词** 浮游植物; 人工鱼礁; 群落结构

中图分类号 Q178 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)06-0001-10

天津海域位于渤海三大渔场之一的渤海湾渔场的中心部位,是渤海湾产卵场主体水域。近年来,开发活动不断增强,环境污染日益加剧,破坏了渤海生态系统的结构,使生物群落生产力下降,生态系统的

\* 天津市农业科技成果转化与推广项目(201304150)和天津市渔业发展服务中心青年科技创新项目(J2018-08青; J2018-14青)共同资助 [This work was supported by Project of Tianjin Transformation and Promotion of Agricultural Science and Technology Achievements (201304150), and Projects of Youth Science and Technology Innovation of Tianjin Fishery Development Service Center (J2018-08青; J2018-14青)]. 张 雪, E-mail: zhangxue430@126.com

① 通讯作者: 王 宏, 工程师, E-mail: redhong-1984@163.com

收稿日期: 2017-10-12, 收修改稿日期: 2018-01-11



稳定性转差,海洋生物逐渐朝着低龄化、小型化、低质化方向演变,渔业资源日益衰退(李文抗等, 2003)。建设人工鱼礁被证明是恢复渔业资源和改善海洋生态环境的一种重要途径(陈勇等, 2014; Powers *et al.*, 2003; 李娇等, 2013)。人工鱼礁通过改变所在海域的环境因子来影响海洋生物环境,达到渔业资源恢复和海洋生态修复的目的。

2009年,天津市第1次在大神堂外海建设海洋牧场示范区,进行人工鱼礁投放。截止到2016年,大神堂附近海域共计投放人工鱼礁礁体19825个,建礁规模7.04万空方,礁区面积10.989 km<sup>2</sup>。2016年,该海域被列为天津市大神堂国家级海洋牧场示范区,目前,该海域人工鱼礁投放已有8年时间,该鱼礁区浮游植物群落结构如何尚未见报道。浮游植物作为海洋生态系统的初级生产者,是多种海洋生物的摄食饵料(王俊等, 1998; 张雪等, 2016),由于浮游植物对海洋生态环境的变化较为敏感,已作为一种生物监测手段,广泛应用于海洋环境富营养化的评价中(邹景忠等, 1983),因此,研究该海域的浮游植物多样性变动及其与环境变化(尤其是人为干扰后的环境)的关系,

具有重要的理论和实际应用价值。

我国海域关于人工鱼礁区浮游植物群落变化有少量报道(张硕等, 2006; 杨柳等, 2011; 江志兵等, 2012; 廖秀丽等, 2013; 王欣等, 2014),浮游植物群落变化已成为一种评价人工鱼礁建设效果的有效方法。本研究依据2016年对不同年份投放的鱼礁区及邻近礁区外进行的生物及环境理化调查数据,对浮游植物群落结构进行了系统分析,以期为人工鱼礁建设效果评价、渔业资源恢复和海洋生态环境的可持续发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 调查海区

2016年5月(春季)、7月(夏季)和11月(秋季)分别对天津近岸海域(117°54.583'E~117°59.627'E, 39°3.15'N~39°7.938'N)2010年、2012年和2014年投放的人工鱼礁区及礁区外(对照区)进行3个航次的调查,每个区域设置3个站位,共计12个站位,站位分布见图1。

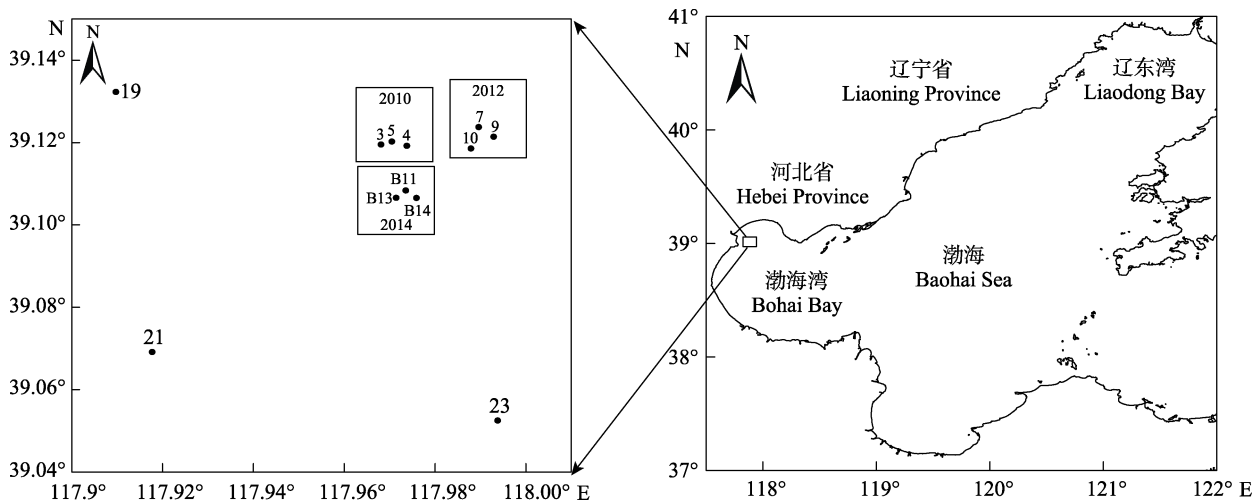


图1 调查海域及站位分布

Fig.1 Survey area and sampling stations

### 1.2 采集方法

样品的采集采用浅水Ⅲ型浮游生物网(网口直径37 cm,网口面积0.1 m<sup>2</sup>,网身长270 cm,网目76 μm),在每个站位自底至表垂直拖网取样,将样品使用5%的甲醛水溶液固定保存,按国家《海洋调查规范-海洋生物调查》(GB/T12763.6-2007)中的方法在实验室内对浮游植物样品进行处理,然后于实验室倒置显微镜(OLYMPUS IX71)下进行物种鉴定及数量统计。水温、盐度、溶解氧(DO)、pH、化学需氧量(COD)等指

标参数用多参数水质监测仪(YSI556)进行现场测定,各水文参数及营养盐(氨氮、硝态氮、亚硝态氮及磷酸盐)的测定均参照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)中规定的方法进行。

### 1.3 数据处理与分析

**1.3.1 物种多样性与优势度** 物种多样性采用香农-威纳指数( $H'$ )(Shannon *et al.*, 1949)表示,物种丰富度和物种均匀度分别用 Margalef 指数( $D$ )(Margalef, 1958)和 Pielou 指数( $J$ )(Pielou, 1969)表示;浮游植物

物种优势度指数( $Y$ )参考 Dufrene 等(1997)的方法。其计算公式分别为:

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \times \log_2 p_i \quad p_i = n_i / N$$

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

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

$$Y = f_i \times p_i$$

式中,  $N$  为总丰度( $\text{cell}/\text{m}^3$ ),  $S$  为样品中的物种总数;  $p_i$  为第  $i$  种的个体数与样品中总个体数的比值,  $f_i$  为第  $i$  物种数量占总个体数量的比例;  $n_i$  为第  $i$  物种的丰度( $\text{cell}/\text{m}^3$ )。

**1.3.2 浮游植物优势种与环境因子的关系** 浮游植物与环境因子之间的关系采用基于 CANOCO 的生态学数据多元统计方法。将浮游植物优势种数据及环境因子数据进行  $\lg(x+1)$  转换。先用物种数据及环境因子数据进行 DCA 分析(除趋势对应分析), 根据分析结果中梯度长度(Lengths of gradient)的大小判断下一步的分析方法。大于 4.0, 选 CCA(典范对应分析); 3.0~4.0 之间, 选 RDA(冗余分析)和 CCA 均可; 小于 3.0, RDA 的结果要好于 CCA (Lepš *et al.*, 2010)。另外, 运用 IBM SPSS Statistics 20 软件对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 以  $P < 0.05$  作为差异显著性判断标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 调查海区环境特征

调查海域环境因子存在显著的季节差异( $P < 0.05$ ), 呈现典型温带海域的季候变化特征。温度变化呈现为 7月( $27^\circ\text{C}$ )>5月( $14^\circ\text{C}$ )>11月( $12^\circ\text{C}$ ); 溶解氧(DO)与之相反; 盐度变化为 11月( $31.5$ )>5月( $30.6$ )>7月( $28.5$ ); pH 值的季节变化与之一致; 透明度的季节变化为 11月( $0.92 \text{ m}$ )>5月( $0.83 \text{ m}$ )>7月( $0.66 \text{ m}$ ); 调查海区全年呈现富营养化的状态, 总氮含量为 5月( $0.68 \text{ mg/L}$ )>11月( $0.48 \text{ mg/L}$ ) > 7月( $0.46 \text{ mg/L}$ ), 总磷含量为 7月( $0.06 \text{ mg/L}$ )>11月( $0.024 \text{ mg/L}$ )>5月( $0.017 \text{ mg/L}$ )。2010年、2012年和2014年的人工鱼礁区及礁区外的温度、溶解氧、盐度、pH值之间无显著性差异, 透明度及营养盐在鱼礁区与礁区外呈现显著性差异, 鱼礁区内的透明度明显低于礁区外, 营养盐则正好相反, 说明礁体改变水流的方向, 促进底层沉积物上移, 引起鱼礁区出现透明度降低、营养盐垂直分布相对均匀的特征。

### 2.2 浮游植物的种类及组成

3 个航次共鉴定浮游植物 2 门 28 属 58 种, 其中,

硅藻门 19 属 44 种, 甲藻门 9 属 14 种。物种以硅藻为主, 占总物种的 75.9%, 其次为甲藻, 占总物种的 24.1%。5 月共鉴定浮游植物 2 门 18 属 27 种, 其中, 硅藻门 15 属 23 种, 占总物种的 85.2%, 甲藻门 3 属 4 种, 占总物种的 14.8%。礁区外、2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区浮游植物物种数分别为 8 种、9 种、6 种和 6 种, 没有显著性差异( $P > 0.05$ )。7 月共鉴定浮游植物 2 门 24 属 39 种, 其中, 硅藻门 15 属 30 种, 占总物种的 76.9%, 甲藻门 9 属 9 种, 占总物种的 23.1%。2010 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区浮游植物物种数显著高于礁区外和 2012 年鱼礁区浮游植物物种数, 依次为 15 种、16 种、8 种和 7 种( $P < 0.05$ )。11 月浮游植物物种数显著高于其他 2 个季节, 共鉴定浮游植物 2 门 21 属 49 种, 其中, 硅藻门 14 属 38 种, 占总物种的 77.6%, 甲藻门 7 属 11 种, 占总物种的 22.4%。礁区外、2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区浮游植物物种数分别为 19 种、20 种、21 种和 20 种, 没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 浮游植物优势种组成

以优势度  $Y > 0.02$  确定为优势种, 调查区各月浮游植物优势种以硅藻门的圆筛藻属(*Coscinodiscus*)和角毛藻属(*Chaetoceros*)为主, 主要有威氏圆筛藻(*Coscinodiscus wailesii*)、星脐圆筛藻(*C. asteromphalus*)、格氏圆筛藻(*C. granii*)、虹彩圆筛藻(*C. oculus-iridis*)、圆筛藻(*Coscinodiscus spp.*)、卡氏角毛藻(*Chaetoceros castracanei*)、劳氏角毛藻(*Ch. lorenzianus*)、旋链角毛藻(*Ch. curvisetus*)、尖刺伪菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)、柔弱几内亚藻(*Guianardia delicatula*)、刚毛根管藻(*Rhizosolenia setigera*)、翼鼻状藻印度变型(*Proboscia alata f. indica*)和夜光藻(*Noctiluca scintillans*)。

浮游植物优势种存在季节演替(表 2), 皆为硅藻物种。其中, 圆筛藻属各个季节都有出现, 是本地常见种。5 月浮游植物优势种为圆筛藻、星脐圆筛藻和柔弱几内亚藻, 优势度介于 0.02~0.2。其中, 柔弱几内亚藻的优势度最大为 0.2, 出现频率较低为 25%, 所占总细胞丰度比例较大为 81.4%。星脐圆筛藻的出现频率最高为 100%。7 月和 11 月优势种类组成较为相似, 共有的优势种分别为威氏圆筛藻、星脐圆筛藻、格氏圆筛藻、劳氏角毛藻、卡氏角毛藻和尖刺伪菱形藻。7 月特有的浮游植物优势种是刚毛根管藻, 浮游植物优势度介于 0.02~0.12, 优势种出现频率介于 41.7%~100%, 其中, 星脐圆筛藻和尖刺伪菱形藻出现频率达 100%, 尖刺伪菱形藻优势度最高为 0.12,

表 1 调查海域浮游植物种类名录  
Tab.1 List of phytoplankton in the surveyed area

种类 Taxa	5 月 May	7 月 July	11 月 November	种类 Taxa	5 月 May	7 月 July	11 月 November
<b>硅藻门 Bacillariophyta</b>				具槽帕拉藻 <i>Paralia sulcata</i>	√		
透明辐杆藻 <i>Bacteriastrum hyalinum</i>		√	√	近缘斜纹藻 <i>Pleurosigma affine</i>		√	
北方角毛藻 <i>Chaetoceros borealis</i>			√	尖刺伪菱形藻 <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	√	√	√
卡氏角毛藻 <i>Chaetoceros castracanei</i>		√	√	翼鼻状藻印度变型 <i>Proboscia alata f. indica</i>	√	√	√
扁面角毛藻 <i>Chaetoceros compressus</i>			√	粗根管藻 <i>Rhizosolenia robusta</i>			√
旋链角毛藻 <i>Chaetoceros curvisetus</i>		√	√	刚毛根管藻 <i>Rhizosolenia setigera</i>	√	√	√
柔弱角毛藻 <i>Chaetoceros debilis</i>		√	√	根管藻 <i>Rhizosolenia</i> spp.			√
双突角毛藻 <i>Chaetoceros didymus</i>			√	斯托根管藻 <i>Rhizosolenia stolterfothii</i>		√	√
克尼角毛藻 <i>Chaetoceros knipowitschii</i>			√	笔尖根管藻 <i>Rhizosolenia styliformis</i>		√	√
劳氏角毛藻 <i>Chaetoceros lorenzianus</i>	√	√	√	优美旭氏藻 <i>Schroderella delicatula</i>			√
暹罗角毛藻 <i>Chaetoceros siamense</i>			√	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	√	√	√
角毛藻 <i>Chaetoceros</i> spp.	√	√	√	掌状冠盖藻 <i>Stephanopyxis palmeriana</i>		√	√
圆柱角毛藻 <i>Chaetoceros teres</i>			√	诺氏海链藻 <i>Thalassiosira nordenskioldi</i>	√	√	
扭链角毛藻 <i>Chaetoceros tortissimus</i>			√	圆海链藻 <i>Thalassiosira rotula</i>		√	√
窄隙角毛藻 <i>Chaetoceros affinis</i>		√	√	佛氏海线藻 <i>Thalassionema frauenfeldii</i>	√	√	√
蛇目圆筛藻 <i>Coscinodiscus argus</i>	√	√	√	<b>甲藻门 Pyrrophyta</b>			
星脐圆筛藻 <i>Coscinodiscus asteromphalus</i>	√	√	√	血红哈卡藻 <i>Akashiwo sanguinea</i>		√	√
格氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus granii</i>	√	√	√	链状亚历山大藻 <i>Alexandrium catenella</i>		√	
虹彩圆筛藻 <i>Coscinodiscus oculus-iridis</i>	√	√	√	叉状角藻 <i>Ceratium furca</i>			√
圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> spp.	√	√	√	梭角藻 <i>Ceratium fusus</i>	√		√
细弱圆筛藻 <i>Coscinodiscus subtilis</i>	√			三角角藻 <i>Ceratium tripos</i>		√	√
威氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus wailesii</i>	√	√	√	多环旋沟藻 <i>Cochlodinium polykrikoides</i>		√	√
小环藻 <i>Cyclotella</i> spp.	√		√	膝沟藻 <i>Gonyaulax</i> spp.		√	√
布氏双尾藻 <i>Ditylum brightwellii</i>	√	√		夜光藻 <i>Noctiluca scintillans</i>	√	√	√
短角弯角藻 <i>Eucampia zodiacus</i>		√	√	叉状原多甲藻 <i>Protoperdinium divergens</i>			√
柔弱几内亚藻 <i>Guianardia delicatula</i>	√	√	√	里昂原多甲藻 <i>Protoperdinium leonis</i>	√		√
薄壁几内亚藻 <i>Guianardia flaccida</i>		√	√	海洋原多甲藻 <i>Protoperdinium marinum</i>		√	
舟形藻 <i>Navicula</i> spp.	√			五角原多甲藻 <i>Protoperdinium pentagonum</i>	√		√
长菱形藻 <i>Nitzschia longissima</i>	√	√	√	原多甲藻 <i>Protoperdinium</i> spp.		√	
中华齿状藻 <i>Odontella sinensis</i>	√	√	√	锥状斯克里普藻 <i>Scrippsiella trochoidea</i>		√	√

优势种占总细胞丰度不高, 介于 2.8%~16.4%。11 月特有的浮游植物优势种是旋链角毛藻、柔弱几内亚藻和翼鼻状藻印度变型, 浮游植物优势种优势度介于 0.02~0.19, 优势种出现频率较高介于 75%~91.7%, 劳氏角毛藻优势度最高为 0.19。

#### 2.4 浮游植物细胞总丰度的变化特征

浮游植物细胞丰度存在明显季节差异, 如图 2 所示, 11 月浮游植物细胞丰度显著高于 5 月和 7 月。同一月浮游植物细胞丰度在礁区内与鱼礁外也不相

同, 5 月浮游植物细胞丰度礁区外显著高于礁区内, 7 月和 11 月浮游植物细胞丰度 2014 年鱼礁区显著高于其他鱼礁区和礁区外。

11 月浮游植物细胞丰度最高, 介于  $1.95 \times 10^4 \sim 185.83 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>, 平均为  $94.79 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>。2014 年鱼礁区丰度最高为  $154.4 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>, 礁区外、2010 年鱼礁区和 2012 年鱼礁区分别为  $66.0 \times 10^4$ 、 $62.8 \times 10^4$  和  $96.0 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>。5 月浮游植物细胞丰度平均为  $21.5 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>, 介于  $0.66 \times 10^4 \sim 106.6 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>,  $0.66 \times 10^4 \sim 106.6 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>, 礁区外浮游植物细胞丰度

表 2 2016 年鱼礁区浮游植物优势种组成  
Tab.2 Composition of phytoplankton dominant species at artificial reef area in 2016

月 Month	编号 No.	物种 Taxa	出现频率 Frequency in samples(%)	占总细胞丰度的比例 Percentage in cell abundance(%)	优势度 Dominance (Y)	
5 月 May	A	圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> spp.	50.0	4.2	0.02	
	B	星脐圆筛藻 <i>Coscinodiscus asteromphalus</i>	100.0	5.7	0.06	
	C	柔弱几内亚藻 <i>Guianardia delicatula</i>	25.0	81.4	0.20	
7 月 July	D	威氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus wailesii</i>	41.7	5.0	0.02	
	E	刚毛根管藻 <i>Rhizosolenia setigera</i>	75.0	2.8	0.02	
	B	星脐圆筛藻 <i>Coscinodiscus asteromphalus</i>	100.0	3.6	0.04	
	F	卡氏角毛藻 <i>Chaetoceros castracanei</i>	41.7	12.9	0.05	
	G	劳氏角毛藻 <i>Chaetoceros lorenzianus</i>	41.7	16.4	0.07	
	H	格氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus granii</i>	83.3	13.0	0.11	
	I	尖刺伪菱形藻 <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	100.0	11.8	0.12	
	J	夜光藻 <i>Noctiluca scintillans</i>	100.0	21.6	0.22	
	11 月 November	K	旋链角毛藻 <i>Chaetoceros curvisetus</i>	83.3	1.9	0.02
		C	柔弱几内亚藻 <i>Guianardia delicatula</i>	75.0	2.1	0.02
L		翼鼻状藻印度变型 <i>Proboscia alata</i> f. <i>indica</i>	75.0	2.6	0.02	
B		星脐圆筛藻 <i>Coscinodiscus asteromphalus</i>	83.3	3.0	0.02	
D		威氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus wailesii</i>	83.3	4.5	0.04	
I		尖刺伪菱形藻 <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	75.0	7.5	0.06	
M		虹彩圆筛藻 <i>Coscinodiscus oculus-iridis</i>	91.7	8.6	0.08	
H		格氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus granii</i>	91.7	14.7	0.13	
F		卡氏角毛藻 <i>Chaetoceros castracanei</i>	83.3	20.6	0.17	
G		劳氏角毛藻 <i>Chaetoceros lorenzianus</i>	91.7	21.1	0.19	

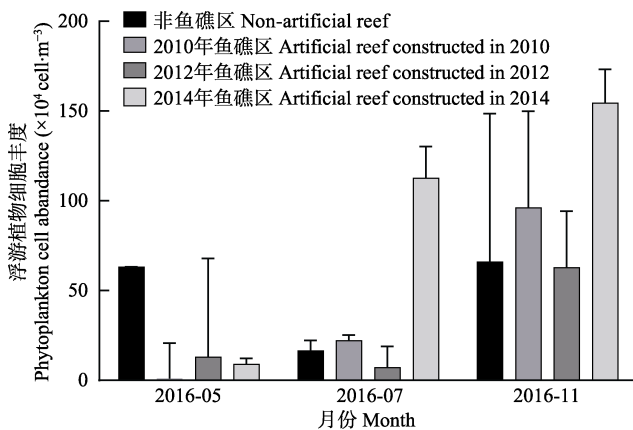


图 2 调查站位浮游植物细胞丰度在不同月的变化  
Fig.2 Variations of phytoplankton cell abundance in different months

显著高于鱼礁区,为  $63.11 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ , 2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区分别为  $12.96 \times 10^4$ 、 $1.09 \times 10^4$  和  $8.86 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。7 月浮游植物细胞丰度介于  $3.43 \times 10^4 \sim 317.78 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ , 平均为  $39.53 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ , 2014 年鱼礁区浮游植物细胞丰度为  $112.58 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ , 显著高于其他 3 个区域, 礁区外、

2010 年鱼礁区、2012 年放鱼礁区分别为  $16.48 \times 10^4$ 、 $7.04 \times 10^4$  和  $22.02 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。

## 2.5 礁区内与礁区外浮游植物细胞丰度的平面分布

浮游植物群落空间分布存在明显区域差异和季节差异。在相同月、不同年份的鱼礁区与礁区外之间浮游植物群落空间分布有较大差异,且不均匀;同一区域在不同月浮游植物群落空间分布也不相同,存在季节差异(图 3)。5 月浮游植物空间分布见图 3a,密集区出现在礁区外的 21 号站位,细胞丰度为  $106.61 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ ,丰度最低值出现在 2012 年鱼礁区的 9 号站位,为  $0.66 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ ,礁区外浮游植物细胞丰度显著高于鱼礁区浮游植物细胞丰度。

7 月浮游植物空间分布见图 3b,密集区出现在 2014 年鱼礁区的 B14 号站位,细胞丰度为  $317.78 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ ,丰度最低值出现在非鱼礁区的 19 号站位,为  $3.43 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ ,2014 年鱼礁区浮游植物细胞丰度平均值最高,但该鱼礁区 3 个站位点间的细胞丰度差异性较大,2012 年鱼礁区浮游植物细胞丰度最低。11 月浮游植物空间分布见图 3c,2014 年鱼礁区浮游植物细

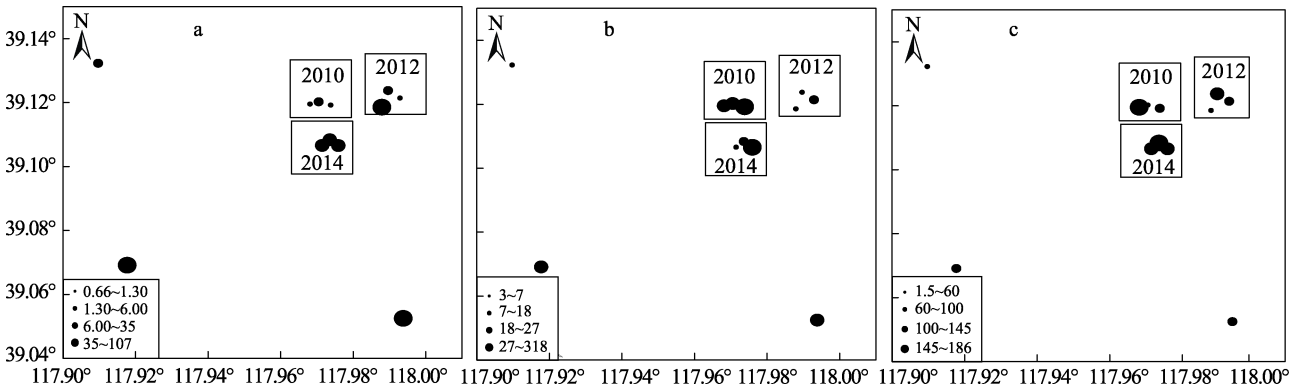


图 3 2016 年浮游植物细胞丰度( $\times 10^4 \text{ cell/m}^3$ )不同月平面分布  
 Fig.3 Horizontal distribution of phytoplankton cell abundance ( $\times 10^4 \text{ cell/m}^3$ ) in 2016

a: 5 月; b: 7 月; c: 11 月 a: May; b: July; c: November

胞分布较为密集, 且比较均匀, 细胞丰度介于  $142.31 \times 10^4 \sim 176.14 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ , 丰度最低值出现在 2012 年鱼礁区的 10 号站位, 为  $1.95 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ , 礁区外浮游植物细胞丰度也较低, 介于  $37.42 \times 10^4 \sim 99.75 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。

2.6 礁区内与礁区外浮游植物群落多样性特征

浮游植物多样性指数香农-威纳指数( $H'$ ), 均匀度指数( $J$ )是表征群落稳定性的指标。一般来说, 一个群落的  $H'$  和  $J$  越高, 则预示着该群落所属的生态系统越稳定和成熟(孙军等, 2004)。调查海域浮游植物多样性指数变化存在季节性差异(图 4 和表 3), 秋季 11 月  $H'$ 、 $D$  和  $J$  都比 5 月和 7 月高。从鱼礁区与礁区外对比来看, 2010 年和 2014 年鱼礁区浮游植物多样性指数高于礁区外和 2012 年鱼礁区, 说明鱼礁区在形成 2~6 年内, 礁区内的浮游植物群落稳定性较高, 但这种稳定性也不是一直增高的, 随着礁区投放时间的延长, 浮游植物群落稳定性会发生一定的波动。

香农-威纳多样性指数( $H'$ )11 月最高, 其次是 7 月, 5 月为最低。11 月礁区外、2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $H'$  无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 7 月 2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $H'$  显著高于礁区外和 2010 年鱼礁区 ( $P < 0.05$ ); 5 月礁区外  $H'$  最低, 2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $H'$  分别为 1.88、1.66 和 1.7。

丰富度指数( $D$ )11 月显著高于 5 月和 7 月, 5 月最低。11 月礁区外、2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $D$  无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 7 月 2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $D$  显著高于礁区外和 2010 年鱼礁区 ( $P < 0.05$ ); 5 月礁区外、2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $D$  无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

浮游植物均匀度指数( $J$ )无显著季节性差异 ( $P > 0.05$ ), 11 月  $J$  稍高于其他月, 5 月最低。11 月礁区外、2010 年鱼礁区、2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区

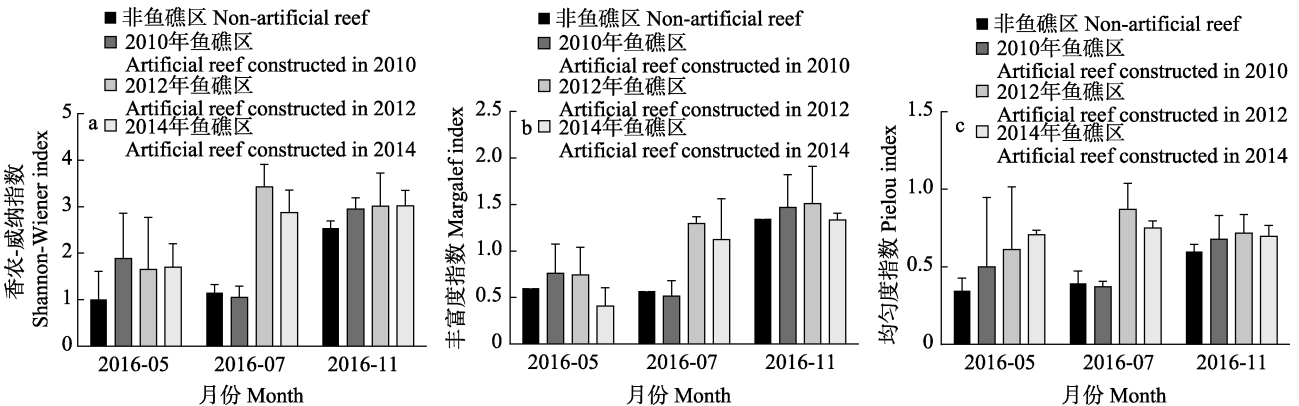


图 4 浮游植物多样性指数各月变化  
 Fig.4 Phytoplankton diversity index changes in different month

a: 香农-威纳指数; b: 丰富度指数; c: 均匀度指数 a:  $H'$ ; b:  $D$ ; c:  $J$



表 3 浮游植物多样性指数各月的变化  
Tab.3 Phytoplankton diversity index changes in different month

项目 Items	月 Month	礁区外 Non-artificial reef area	2010 年鱼礁区 2010 artificial reef area	2012 年鱼礁区 2012 artificial reef area	2014 年鱼礁区 2014 artificial reef area
香农-威纳多样性指数 Shannon-Wiener index	5 月 May	1.01	1.66	1.88	1.70
	7 月 July	1.15	3.43	1.05	2.87
	11 月 November	2.54	3.01	2.95	3.02
丰富度指数 Margalef index	5 月 May	0.60	0.74	0.50	0.41
	7 月 July	0.57	1.29	0.52	1.12
	11 月 November	1.35	1.51	1.47	1.33
均匀度指数 Pielou index	5 月 May	0.35	0.61	0.76	0.71
	7 月 July	0.39	0.87	0.37	0.75
	11 月 November	0.60	0.72	0.68	0.70

$J$  无显著性差异( $P>0.05$ ); 7 月 2012 鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $J$  显著高于礁区外和 2010 年鱼礁区; 5 月礁区外、2010 年鱼礁区、2012 鱼礁区和 2014 年鱼礁区  $J$  逐渐增高。

### 2.7 浮游植物细胞丰度与环境因子的关系

海域环境是浮游植物赖以生存的条件, 本研究通过对调查海域浮游植物优势种丰度与海区相关环境因子(硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐、磷酸盐、溶解氧、化学耗氧量、pH、透明度和温度)等进行相关性分析, 探究影响浮游植物优势种丰度的环境因子。首先对优势种数据及环境因子数据进行 DCA 分析, 梯度长度小于 3.0, 选 RDA(冗余分析)进行分析, 结果见图 5。不同浮游植物物种对环境因子的生态适应性可以通过 RDA 双序轴清楚地显现出来。从图 5 可以看出, 优势种柔弱几内亚藻、威氏圆筛藻、虹彩圆筛藻和翼鼻状藻印度变型主要与透明度呈现出明显的正相关性, 透明度较高的环境条件, 更有利于它们的生长, 圆筛藻和星脐圆筛藻与盐度和亚硝态氮表现良好的正相关性, 刚毛根管藻和水深有较好的正相关性, 卡氏角毛藻、劳氏角毛藻、旋链角毛藻和格氏圆筛藻在排序轴上的位置较集中, 有较近的相似性。

## 3 讨论

### 3.1 天津近岸人工鱼礁区浮游植物群落季节变化

浮游植物以硅藻为主, 浮游植物物种数存在季节差异, 11 月浮游植物物种数显著高于其他 2 个季节。浮游植物优势种除夜光藻外, 都属于硅藻, 以圆筛藻属为主, 存在季节演替, 但种类变化不明显。尤其是 7 月和 11 月, 优势种类组成较为相似, 共同存在的优势种有 6 种, 而 5 月的浮游植物优势种在 11 月的

优势种中也都存在。浮游植物细胞丰度存在明显季节差异, 11 月浮游植物细胞丰度最高, 其次是 7 月, 5 月浮游植物细胞丰度最低。这种现象与温带海域浮游植物出现两周年的年际变化不一致(康元德, 1991)。原因可能是 7 月夜光藻大量暴发, 其个体较大, 在强大的摄食压力下, 导致总细胞丰度减少。5 月细胞丰度最少, 这与该月对虾幼体及其他生物幼体处于摄食高峰期, 下行控制降低了浮游植物的细胞丰度; 而且该月河流径流量少, 导致海区的营养盐得不到及时的补充, 上行控制抑制了浮游植物的生长繁殖。

### 3.2 不同礁区内及礁区外浮游植物群落的比较

除 7 月 2012 年鱼礁区和 2014 年鱼礁区浮游植物物种数显著高于礁区外和 2010 年鱼礁区浮游植物物种数, 5 月和 11 月浮游植物物种数在各个礁区和对照区之间没有显著性差异( $P>0.05$ )。这与杨柳等(2011)对海州湾的研究结果基本一致, 鱼礁区和对照区的浮游植物种类及优势种类差异甚微。

5 月的浮游植物细胞丰度礁区外显著高于鱼礁区, 7 月和 11 月的浮游植物细胞丰度 2014 年鱼礁区显著高于其他鱼礁区和礁区外。浮游植物多样性指数在 5 月、7 月和 11 月都表现为 2012 年和 2014 年鱼礁区高于礁区外和 2010 年鱼礁区, 这也说明投放人工鱼礁有助于改善海域生态环境和提高水域的初级生产力水平。研究表明, 人工鱼礁能够为海洋生物提供摄食、产卵繁殖、生长、避难、休养生息的场所, 同时, 礁体会在很大程度上改变海流的方向, 进而改变海水的营养盐结构, 使底层丰富的营养盐源源不断地输送到上面, 满足不同水层浮游生物的营养需求(章守宇等, 2006), 再通过食物链关系诱集更多的海洋生物, 使人工鱼礁区生物资源量不断扩大(陈丕茂, 2005; 张虎等, 2008)。鱼礁区在刚形成的几年(2~4 年)

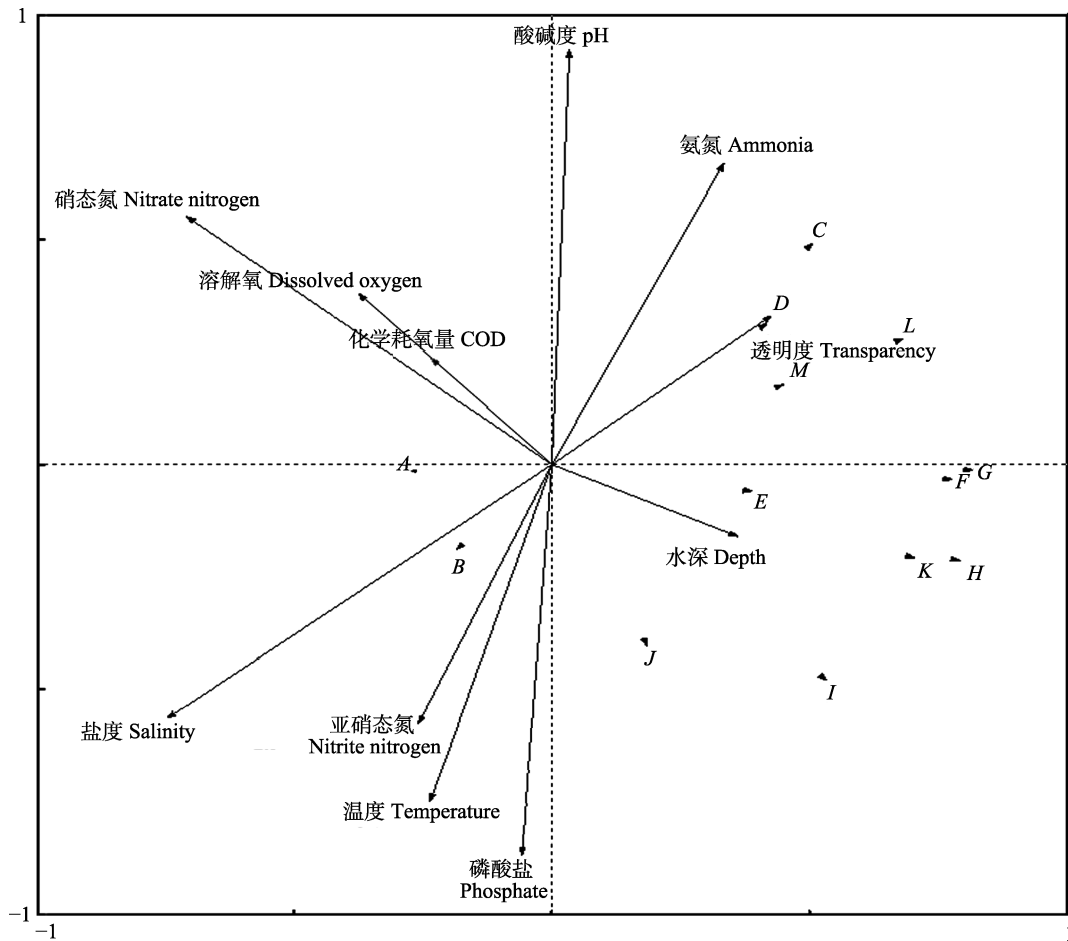


图5 调查海域浮游植物优势种与环境因子的 RDA 双序图

Fig.5 RDA biplot of phytoplankton dominant species and environmental factors in the surveyed area

优势种代码(A~M)见表2 The dominant species codes (A~M) refer to Tab.2

内,对礁区的浮游植物群落稳定性的贡献效果较好,随着礁区时间的延长,推测鱼礁受所在海域底质的影响会存在淤积现象,其产生的流场效应减弱,营养盐交互混合不充分,浮游植物生长受影响,浮游植物群落稳定性逐渐趋于礁区外的水平。本研究结果与多数学者的研究结果一致(张硕等,2006;廖秀丽等,2013),浮游植物丰度在投礁后明显升高,表明人工鱼礁的投放对海域初级生产者的生长繁殖产生了一定的正面效应。

### 3.3 建礁前、后浮游植物群落的比较

建礁前,该海域浮游植物群落的研究较少,李清雪等(2000)对该人工鱼礁区的邻近海域进行调查发现,该海域浮游植物细胞丰度介于  $420 \times 10^4 \sim 7100 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>,5月、8月和10月浮游植物细胞物种数分别为8种、16种和13种。人工鱼礁邻近海域的香农-威纳多样性指数( $H'$ )介于0.27~3.01,丰富度指数( $D$ )介于0.11~0.75,均匀度指数( $J$ )介于0.12~1.00,通过浮游

植物的变化发现,该海域浮游植物群落细胞丰度显著减少,但浮游植物群落多样性指数明显升高,群落结构稳定性增强。由于调查年代相距较远,影响浮游植物群落结构变化的因素较多,而人工鱼礁建设对其变化的影响程度究竟有多大还需进一步调查研究。

### 参 考 文 献

- Chen PM. A survey on catch in artificial reef area of Zhongshan City. *Journal of Tropical Oceanography*, 2005, 24(3): 73-80 [陈丕茂. 中山人工鱼礁区渔获物调查. *热带海洋学报*, 2005, 24(3): 73-80]
- Chen Y, Yang J, Tian T, *et al.* The enhancement effect of fishery resources on artificial reefs in marine ranching area in Zhangzi Island. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(2): 183-187 [陈勇, 杨军, 田涛, 等. 獐子岛海洋牧场人工鱼礁区鱼类资源养护效果的初步研究. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(2): 183-187]
- Dufrene M, Legendre P. Species assemblages and indicator

- species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 1997, 67(3): 345–366
- GB 17378.4-2007 Specifications for marine monitoring. 2007 [GB 17378. 4-2007 海洋监测规范. 2007]
- GB/T 12763.6-2007 Specifications for oceanographic survey: Specifications for marine biological survey. 2007 [GB/T 12763.6-2007 海洋调查规范: 海洋生物调查. 2007]
- Jiang ZB, Chen QZ, Shou L, *et al.* Community composition of net-phytoplankton and its relationship with the environmental factors at artificial reef area in Xiangshan Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(18): 5813–5824 [江志兵, 陈全震, 寿鹿, 等. 象山港人工鱼礁区的网采浮游植物群落组成及其与环境因子的关系. *生态学报*, 2012, 32(18): 5813–5824]
- Kang YD. Phytoplankton quantitative distribution and seasonal variation in Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1991, 12: 31–44 [康元德. 渤海浮游植物的数量分布和季节变化. *海洋水产研究*, 1991, 12: 31–44]
- Li J, Guan CT, Gong PH, *et al.* Preliminary analysis of carbon sink mechanism and potential of artificial reef ecosystem. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 65–69 [李娇, 关长涛, 公丕海, 等. 人工鱼礁生态系统碳汇机理及潜能分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 65–69]
- Li QX, Tao JH. Studies on ecological characteristics of phytoplankton in the waters near Tianjin. *Journal of Tianjin University*, 2000, 33(4): 464–469 [李清雪, 陶建华. 天津近岸海域浮游植物生态特征的研究. *天津大学学报*, 2000, 33(4): 464–469]
- Li WK, Fang EJ. Construction of artificial reefs to repair marine fishery resources and ecological environment. *Tianjin Fisheries*, 2003(4): 5–8 [李文抗, 房恩军. 建设人工鱼礁修复海洋渔业资源生态环境. *天津水产*, 2003(4): 5–8]
- Liao XL, Chen PM, Ma SW, *et al.* Community structure of phytoplankton and its relationship with environmental factors before and after construction of artificial reefs in Yangmeikeng, Daya Bay. *South China Fisheries research*, 2013, 9(5): 109–119 [廖秀丽, 陈丕茂, 马胜伟, 等. 大亚湾杨梅坑海域投礁前后浮游植物群落结构及其与环境因子的关系. *南方水产科学*, 2013, 9(5): 109–119]
- Marfalef R. Information theory in ecology. *General Systems*, 1958, 3: 36–71
- Pielou EC. *An introduction to mathematical ecology*. New York: Wiley-Interscience, 1969, 286
- Powers SP, Grabowski JH, Peterson CH, *et al.* Estimation enhancement of fish production by offshore artificial reefs: Uncertainty exhibited by divergent scenarios. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 264: 265–277
- Shannon CE, Weaver W. *The mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois Press, 1949, 117
- Lepš J, Šmilauer P. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. London: Cambridge University Press, 2010
- Sun J, Liu DY. The application of diversity indices in marine phytoplankton studies. *Acta Oceanologica Sinica*, 2004, 26(1): 62–75 [孙军, 刘东艳. 多样性指数在海洋浮游植物研究中的应用. *海洋学报*, 2004, 26(1): 62–75]
- Wang J, Kang YD. Study on population dynamics of phytoplankton in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1998, 19(1): 43–52 [王俊, 康元德. 渤海浮游植物种群动态的研究. *海洋水产研究*, 1998, 19(1): 43–52]
- Wang 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]
- Yang L, Zhang S, Sun MC, *et al.* The research of relationships between phytoplankton and environmental factors in artificial reef area of Haizhou Bay. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(3): 445–450 [杨柳, 张硕, 孙满昌, 等. 海州湾人工鱼礁区浮游植物与环境因子关系的研究. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(3): 445–450]
- Zhang H, Liu PY, Tang JH, *et al.* Investigation on the macrobenthos of artificial reefs area in the Haizhou Gulf. *Marine Fisheries*, 2008, 30(2): 97–104 [张虎, 刘培廷, 汤建华, 等. 海州湾人工鱼礁大型底栖生物调查. *海洋渔业*, 2008, 30(2): 97–104]
- Zhang S, Zhu KW, Sun MC. Species composition and biomass variation in phytoplankton in artificial reef area in Haizhou Bay. *Journal of Dalian Ocean University*, 2006, 21(2): 134–140 [张硕, 朱孔文, 孙满昌. 海州湾人工鱼礁区浮游植物的种类组成和生物量. *大连水产学院学报*, 2006, 21(2): 134–140]
- Zhang SY, Zhang HJ, Jiao JP, *et al.* Change of ecological environment of artificial reef waters in Haizhou Bay. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(4): 475–480 [章守宇, 张焕君, 焦俊鹏, 等. 海州湾人工鱼礁海域生态环境的变化. *水产学报*, 2006, 30(4): 475–480]
- Zhang X, Luan QS, Sun JQ, *et al.* Annual variation in phytoplankton community and its relationship with ambient environmental factors in adjacent waters of Zhangzi Island. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(3): 315–323 [张雪, 栾青杉, 孙坚强, 等. 獐子岛海域浮游植物群落周年变化及其与环境因子的关系. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(3): 315–323]
- Zou JZ, Dong LP, Qin BP. Preliminary study on eutrophication and red tide in Bohai Bay. *Marine Environmental Science*, 1983, 2(2): 41–54 [邹景忠, 董丽萍, 秦保平. 渤海湾富营养化和赤潮问题的初步探讨. *海洋环境科学*, 1983, 2(2): 41–54]

## Phytoplankton Community Characteristics and Variation at Artificial Reefs of Tianjin Offshore

ZHANG Xue<sup>1,2</sup>, XU Xiaofu<sup>1,2</sup>, DAI Yuanyuan<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1,2</sup><sup>①</sup>, FANG Enjun<sup>1,2</sup>,  
HOU Chunqiang<sup>1,2</sup>, GAO Yan<sup>1,2</sup>, GUO Biao<sup>1,2</sup>, CHEN Wei<sup>1,2</sup>  
(1. Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute, Tianjin 300457;  
2. Tianjin Marine Ranching Technical Engineering Center, Tianjin 300457)

**Abstract** Three cruises were conducted in May, July, and November 2016 in artificial reef areas constructed in 2010, 2012, and 2014, respectively, and the non-artificial reef area (control area) offshore of Tianjin with three sampling stations for each, totaling 12 sites. The results identified 58 taxa of phytoplankton belonging to 2 phyla and 28 genera. Among these species, Bacillariophyta includes 19 genera and 44 species, and Pyrrophyta includes 9 genera and 14 species. Diatom species are dominant, accounting for 75.9% of all species, followed by dinoflagellates, accounting for 24.1%. Dominant phytoplankton species are *Coscinodiscus* and *Chaetoceros* of Bacillariophyta, mainly *Coscinodiscus wailesii*, *C. asteromphalus*, *C. granii*, *C. oculus-iridis*, *C. spp.*, *Chaetoceros castracanei*, *Ch. lorenzianus*, *Ch. curvisetus*, *Pseudo-nitzschiapungens*, *Guianardia delicatula*, *Rhizosolenia setigera*, *Proboscia alata f. indica*, and *Noctiluca scintillans*. Phytoplankton cell abundance showed obvious seasonal changes, with the average cell abundance in November, July, and May at  $94.79 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>,  $39.53 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>, and  $21.5 \times 10^4$  cell/m<sup>3</sup>, respectively. Phytoplankton diversity index also had obvious seasonal variation. In November, the Shannon-Wiener diversity index, Margalef index, and Pielou index were higher than in May and July. Comparing the artificial reef areas with the control area, the phytoplankton cell abundance of the control in May was significantly higher than the artificial reef areas. In July and November, phytoplankton cell abundance at the artificial reef constructed in 2014 was significantly higher than other artificial reef areas and the control area. The diversity index in both the control and the artificial reef area constructed in 2012 was lower than the 2010 and 2014 reefs, and lowest in the non-artificial reef area. Clearly, the construction of an artificial reef had a significant effect in improving phytoplankton community diversity, but this diversity is not always increasing consistently but fluctuating.

**Key words** Phytoplankton; Artificial reef; Community structure

① Corresponding author: WANG Hong, E-mail: redhong-1984@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171024002

http://www.yykxjz.cn/

苏家齐, 朱长波, 李俊伟, 李婷, 陈素文, 颀晓勇, 张博. 流沙湾浮游植物群落特征季节变化及其与养殖活动的关系. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 11-23

Su JQ, Zhu CG, Li JW, Li T, Chen SW, Xie XY, Zhang B. Phytoplankton community characteristics in different seasons and their relationship with aquaculture in Liusha Bay. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 11-23

# 流沙湾浮游植物群落特征季节变化及其与养殖活动的关系\*



苏家齐 朱长波<sup>①</sup> 李俊伟 李婷 陈素文 颀晓勇 张博

(农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 中国水产科学研究院南海水产研究所  
广东省渔业生态环境重点实验室 广州 510300)

**摘要** 流沙湾是中国海水珍珠“南珠”的主产区和广东省重要的贝类养殖区。为评估湾内养殖活动的环境效应,于 2015~2016 年对流沙湾海区进行了夏(8 月)、秋(11 月)、冬(2 月)、春(5 月) 4 个季节的浮游植物和海水理化因子调查。共检出浮游植物 171 种,包括硅藻门 43 属 122 种、甲藻门 10 属 44 种、蓝藻门 2 属 2 种、金藻门 2 属 2 种和裸藻门 1 属 1 种。流沙湾内湾浮游植物细胞丰度为 $(0.05\sim 79.04)\times 10^4$ 个/L,夏季>春季>秋季>冬季,且夏季丰度远大于其他三季,内湾和外湾差异不显著。春季须状角毛藻(*Chaetoceros crinitus*)、红海束毛藻(*Trichodesmium erythraeum*)和明壁圆筛藻(*Coscinodiscus debilis*)为主要优势种,夏季优势种主要为中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*),秋季优势种主要为拟弯角毛藻(*Chaetoceros pseudocurvisetus*)、奇异棍形藻(*Bacillaria paradoxa*)、洛氏角毛藻(*Chaetoceros lorenzianus*),冬季主要优势种为威氏圆筛藻(*Coscinodiscus wailesii*)、柔弱根管藻(*Rhizosolenia delicatula*)、岛脆杆藻(*Fragilaria islandica*)。其中,奇异棍形藻为春、秋、冬季的优势种,红海束毛藻为春、夏、秋季的优势种。冗余分析表明,流沙湾浮游植物优势种在春季与水温 and 氨氮密切相关,夏季受透明度显著影响,而在秋、冬季受亚硝酸氮含量影响显著。流沙湾不同养殖区的浮游植物多态性和丰度有明显季节差异。与 2012 年相比,流沙湾外湾的养殖覆盖率提高了近 50%,内湾的珍珠贝养殖减少了近 90%,养殖品种、规模和分布格局都发生了明显变化,目前流沙湾的浮游植物群落特征正是对其变化的一种响应。夏季鱼类网箱养殖提高了水域营养盐水平并降低了浮游植物多样性。大规模的扇贝养殖则导致了扇贝养殖区浮游植物丰度的降低。

**关键词** 流沙湾;浮游植物;聚类分析;养殖活动

中图分类号 S932.7 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)06-0011-13

水产养殖业属环境依赖型产业,水环境状况与养殖品种的生长繁育息息相关。养殖活动也会影响

周边水域环境和生态系统,从而引发新的生态效应。养殖活动与环境之间的相互作用具有多样性和复杂

\* 广东省海洋渔业科技与产业发展专项项目(Z2015013)和中央级公益性科研院所基本科研业务费南海水产研究所专项资金项目(2013ZD01)共同资助[This work was supported by Special Fund for Marine Fisheries Research and Extension of Guangdong Province (Z2015013), and Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, South China Sea Fisheries Research Institute (2013ZD01)]. 苏家齐, E-mail: sujiaqi2005@126.com

<sup>①</sup> 通讯作者:朱长波,副研究员, E-mail: changbo@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-24, 收修改稿日期: 2017-12-26



性,不同的养殖模式和养殖种类的环境效应也存在较大差异。高密度养殖设施会影响海水流动,造成水文情况的改变。同时,养殖过程中,投药、施肥等养殖管理活动也会造成一定的环境压力。在鱼类网箱养殖投饲过程中产生的大量残饵和粪便会给环境带来大量的营养物质,过高的养殖密度易造成水体的富营养化和污染,进而改变周围环境的生物多样性,甚至造成养殖鱼类的死亡(Grigorakis *et al.*, 2011; Edwards, 2015)。滤食性贝类以有机碎屑和浮游生物为食,规模化养殖可引起养殖区悬浮颗粒物的衰减,影响浮游生物动力学,并加速颗粒有机物的沉积(张继红等, 2009)。相对于鱼类网箱养殖,贝类养殖对浮游生物具有调控作用,一定程度上可以修复或延缓水体的富营养化(张继红等, 2013; 唐启升等, 2016; 蒋增杰等, 2012)。

流沙湾(22.36°~20.50°N, 109.80°~110.02°E)位于广东省湛江市雷州半岛西南部,为西北向呈葫芦形的半封闭海湾,面积约为 69 km<sup>2</sup>,是中国最大的海水珍珠育苗与养殖基地,海水珍珠产量占全国的 60%以上。自 2005 年以来,流沙湾周边养殖户们先后引入了墨西哥湾扇贝(*Argopecten irradians concentricus*)、卵形鲳鲆(*Trachinotus ovatus*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)等养殖品种,至此,流沙湾形成了多品种与模式

共存的养殖格局。随着扇贝等新兴品种养殖生产的扩大,流沙湾的养殖区域和养殖布局也随之发生改变。2015 年流沙湾的养殖面积已达到 16 km<sup>2</sup>,占其总面积的近 1/4。与 2012 年相比,扇贝养殖面积由 1132 hm<sup>2</sup> 增加到 1400 hm<sup>2</sup>,珍珠贝养殖面积由 272 hm<sup>2</sup> 下降至约 100 hm<sup>2</sup>,网箱养殖面积约为 95 hm<sup>2</sup>,其中,新增深水网箱约 27 hm<sup>2</sup>。

流沙湾是粤西典型的养殖海湾,自 2010 年,湾内养殖品种和布局一直在不断调整中,养殖格局的变化必然引起水域环境的响应。多元的养殖品种和养殖方式共同作用,及其与环境因素相互作用,可能对流沙湾的浮游植物的群落结构特征产生潜在影响。本研究针对流沙湾水域开展浮游植物的调查,并对珍珠贝、扇贝和鱼类网箱等不同养殖类型海域的浮游植物群落结构和环境因子进行对比分析,探讨养殖活动对流沙湾浮游植物群落的影响,进而为流沙湾养殖结构优化和生态环境评价提供一定的参考。

## 1 材料与方法

流沙湾海域养殖品种呈多元化,不同品种的养殖方式与养殖周期差异较大,主要养殖品种及养殖周期见表 1。

表 1 流沙湾水域养殖情况  
Tab.1 The information of aquaculture in Liusha Bay

养殖方式 Breeding pattern	主要养殖品种 Main breeding species	放苗时间 Starting time	收获时间 Harvest time	养殖周期 Breeding cycle
鱼类小网箱养殖 Traditional fish cage	卵形鲳鲆 <i>T. ovatus</i>	当年 4 月 April	当年 11 月之前 Before November in the current year	7~8 个月 7~8 months
贝类筏式养殖 Raft breeding	墨西哥湾扇贝 <i>A. irradians concentricus</i>	当年 7~10 月 July to October	当年 5 月之前 Before May in the current year	6~8 个月 6~8 months
	华贵栉孔扇贝 <i>C. nobilis</i>	当年 8 月~次年 1 月 August to January in the next year	全年 Whole year	约 1 年 Nearly 1 year
贝类筏式、桩式养殖 Raft or pile type breeding	合浦珠母贝 <i>Pinetada fucata</i>	3~4 月、8~12 月 March to April, August to December	—	1~2 年 1~2 years

### 1.1 采样站位点的设定

分别于 2015 年 8 月(夏季)、11 月(秋季)和 2016 年 2 月(冬季)、5 月(春季)在流沙湾内港、外港布设 12 个站位,进行 4 个航次的采样调查。采样站位如图 1 所示。其中,扇贝养殖区有 1、2、3 和 6 号站位,珠母贝养殖区有 7 号站。8 号站位位于湾口鱼类网箱

养殖区,4 和 9 号站位分别位于内、外港主航道,5 号站位为外海边界,10 和 11 号站位为内湾采样点,12 号站位为外湾近岸采样点。

### 1.2 浮游植物的采集与分析

浮游植物样品的采集与定量参照《海洋调查规范》(GB17378.7-2007)。定性样品采用浅水Ⅲ型浮游

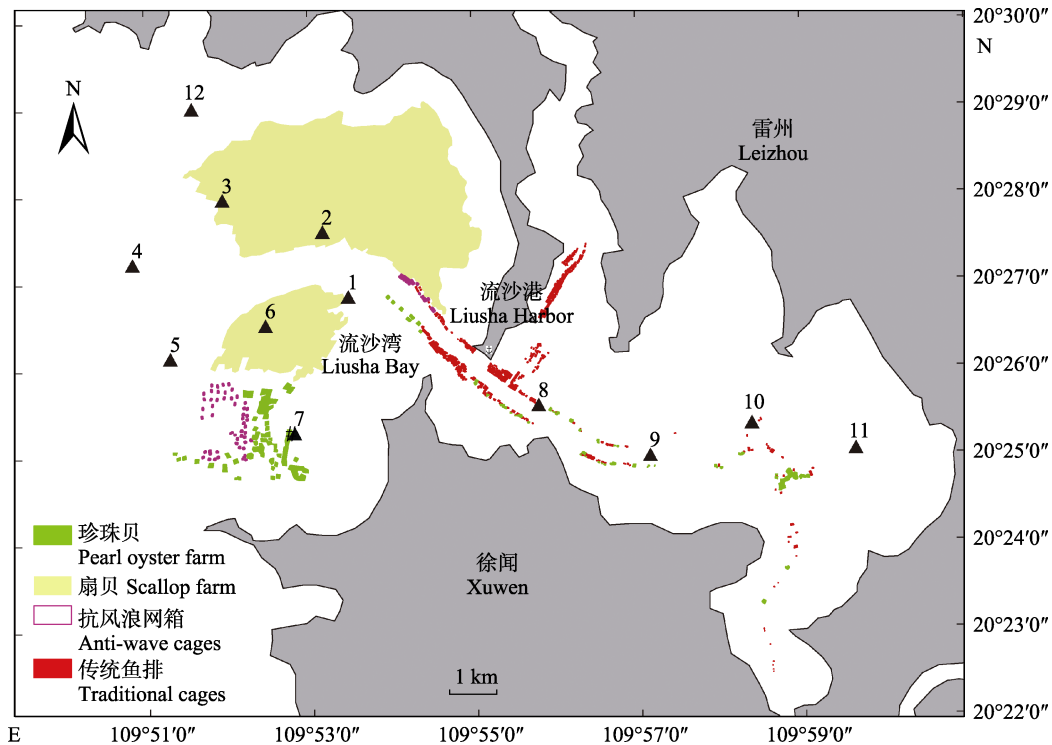


图 1 流沙湾养殖布局及采样站位图

Fig.1 Farming structure layout and sampling stations in Liusha Bay

生物网, 自距底 2 m 深度向海面垂直拖曳, 定量样品采用有机玻璃采水器收集表层及底层的水样(各 1 L)进行混合, 现场用鲁戈氏液固定后带回实验室, 用浮游生物计数框镜检、计数。

### 1.3 环境因子的测定

海水溶解氧(DO)、水温(T)、盐度(S)和 pH 采用便携式水质分析仪(YSI-556 型)现场测定, 透明度(SD)采用萨式盘法测定。水样中, 亚硝酸盐(NO<sub>2</sub>-N)采用萘乙二胺分光光度法, 氨氮(NH<sub>4</sub>-N)采用靛酚蓝法, 硝酸盐(NO<sub>3</sub>-N)采用锌(Zn)-镉(Cd)还原法, 活性磷酸盐(PO<sub>4</sub>-P)采用磷钼蓝分光光度法测定, 总氮(TN)和总磷(TP)采用过硫酸钾氧化法测定。叶绿素 a(Chl-a)颗粒有机物(POM)的测定方法分别为丙酮萃取法和灼烧称重法。以上方法均按照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)指定方法进行。

### 1.4 多样性分析方法

浮游植物的多样性、均匀度分别采用 Shannon-Weaver 多样性指数( $H'$ )和 Pielou 均匀度指数( $J$ ), 计算公式如下:

$$H' = -\sum_{i=1}^s P_i \log_2 P_i \quad (1)$$

$$J = \frac{H'}{\log_2 S} \quad (2)$$

$$\text{优势度} \quad Y = \left( \frac{n_i}{N} \right) * f_i \quad (3)$$

式中,  $s$  为物种数,  $P_i$  为第  $i$  物种在全部采样中的比例,  $n_i$  为第  $i$  种的个体数,  $N$  为所有种的个体总数,  $S$  为样品种类总数,  $f_i$  为第  $i$  种在各站点的监测频率。  $Y \geq 0.02$  视为优势种。

### 1.5 数据处理和分析

采用 PRIMER 6.0 软件对浮游植物丰度进行 4 次方根转换, 建立 Bray-Curtis 相似性聚类分析, 并进行非度量多维尺度排序(nMDS)。用 Canoco4.5 软件分析环境因子对浮游植物物种分布的影响, 相关数据除 pH 外, 经过  $\lg(x+1)$  转换。本研究将各季出现的优势种作为排序物种, 对排序物种数据进行除趋势对应分析(DCA), 发现 4 个轴中梯度最大值  $< 3$ , 故选择 RDA 进行物种-环境相关性分析。采样站位平面图用 ArcMap 10.2 软件绘制。

## 2 结果

### 2.1 浮游植物种类组成及优势种的时空变化特征

2015~2016 年四季流沙湾浮游植物的种类组成见表 2。从表 2 可以看出, 夏、秋、冬、春 4 个航次共鉴定出浮游植物 5 门 58 属, 共 171 种(含变种)。其中, 硅藻 42 属 122 种, 占总种数的 71.35%; 甲藻 10 属

44种, 占总种数的25.73%; 金藻2属2种; 蓝藻2属2种; 裸藻1属1种。在冬季, 硅藻种数最少, 而甲藻种数最多。流沙湾浮游植物优势种见表3。如表3所示, 调查期间发现浮游植物优势种共16种, 秋季最多, 夏季最少。其中, 奇异棍形藻为春、秋、冬季优势种, 红海束毛藻为春、夏、秋季优势种。在夏季, 中肋骨条藻在各采样站占据绝对优势, 其丰度占夏季浮游植物总丰度的69%。

## 2.2 浮游植物丰度及群落结构分析

在调查期间, 流沙湾海域各采样点的浮游植物丰度相差较大。春季, 浮游植物丰度的变化范围为 $0.05 \times 10^4 \sim 13.15 \times 10^4$ 个/L。夏季各采样点浮游植物丰度较高, 其变化范围为 $2.02 \times 10^4 \sim 79.04 \times 10^4$ 个/L。秋季浮游植物丰度变化范围为 $0.11 \times 10^4 \sim 7.45 \times 10^4$ 个/L, 冬季浮游植物丰度较低, 范围为 $0.15 \times 10^4 \sim 4.53 \times 10^4$ 个/L。流沙湾四季平均丰度分别为 $0.10 \times 10^4$ 、 $0.12 \times 10^4$ 、

表2 2015~2016年四季流沙湾浮游植物的种类组成  
Tab.2 Seasonal phytoplankton composition in Liusha Bay during 2015~2016

种类 Species	属/种 Genera/specie			
	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter	春 Spring
硅藻 Bacillariophyta	34/66	26/67	29/56	26/64
甲藻 Pyrrophyta	7/20	4/8	5/30	8/15
蓝藻 Cyanophyta	1/1	2/2	1/1	1/1
其他 Others	1/1	1/1	—	1/1
总计 Total	43/88	33/78	35/87	39/81

表3 流沙湾浮游植物优势种  
Tab.3 Dominant species of phytoplankton in Liusha Bay

季节 Season	优势种 Dominant species	平均丰度 Average abundance (cells/L)	占总细胞丰度百分比 Percent in total abundance(%)	优势度 Y Dominance	编码 Code
夏 Summer	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	$2.10 \times 10^5$	0.69	0.695	1
	红海束毛藻 <i>Trichodesmium erythraeum</i>	$5.64 \times 10^4$	0.19	0.124	2
	刚毛根管藻 <i>Rhizosolenia setigera</i>	$8.02 \times 10^3$	0.03	0.026	3
秋 Autumn	拟弯角毛藻 <i>Chaetoceros pseudocurvisetus</i>	$3.54 \times 10^3$	0.24	0.158	4
	奇异棍形藻 <i>Bacillaria paradoxa</i>	$1.60 \times 10^3$	0.11	0.107	5
	洛氏角毛藻 <i>Chaetoceros lorenzianus</i>	$1.26 \times 10^3$	0.08	0.084	6
	菱形海线藻 <i>Thalassionema nitzschioides</i>	$1.11 \times 10^3$	0.07	0.075	7
	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	$1.12 \times 10^3$	0.08	0.063	
	尖刺拟菱形藻 <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	$1.22 \times 10^3$	0.08	0.054	8
	红海束毛藻 <i>Trichodesmium erythraeum</i>	$9.42 \times 10^2$	0.06	0.042	
	佛氏海毛藻 <i>Thalassiothrix frauenfeldii</i>	$5.12 \times 10^2$	0.03	0.034	9
冬 Winter	威氏圆筛藻 <i>Coscinodisus wailesii</i>	$3.51 \times 10^3$	0.29	0.288	10
	柔弱根管藻 <i>Rhizosolenia delicatula</i>	$1.92 \times 10^3$	0.16	0.158	11
	岛脆杆藻 <i>Fragilaria islandica</i>	$2.17 \times 10^3$	0.15	0.179	12
	明壁圆筛藻 <i>Coscinodiscus debilis</i>	$1.53 \times 10^3$	0.13	0.126	13
	奇异棍形藻 <i>Bacillaria paradoxa</i>	$7.38 \times 10^2$	0.05	0.061	
春 Spring	须状角毛藻 <i>Chaetoceros crinitus</i>	$3.74 \times 10^3$	0.20	0.196	15
	红海束毛藻 <i>Trichodesmium erythraeum</i>	$6.84 \times 10^3$	0.36	0.119	
	明壁圆筛藻 <i>Coscinodiscus debilis</i>	$2.01 \times 10^3$	0.11	0.105	
	圆柱角毛藻 <i>Chaetoceros teres</i>	$8.75 \times 10^2$	0.05	0.034	16
	奇异棍形藻 <i>Bacillaria paradoxa</i>	$5.27 \times 10^2$	0.03	0.028	
	洛氏角毛藻 <i>Chaetoceros lorenzianus</i>	$5.49 \times 10^2$	0.03	0.026	

$0.16 \times 10^4$ 、 $2.52 \times 10^4$  个/L, 季节变化趋势为夏>春>秋>冬, 且夏季内、外湾丰度相差不大。甲藻的丰度在冬季最高, 占冬季总丰度的 6.3%, 在其余季节不超过 1%。蓝藻主要为红海束毛藻, 其丰度在春季最高, 占总丰度的 35.8%。硅藻丰度在春、冬、秋和夏各占总丰度的 63.6%、81.2%、82.3% 和 92.7%。

流沙湾全年浮游植物 nMDS 排序结果如图 2 所示, 不同季节间浮游植物群落组成差异显著。因此, 可将浮游植物群落大致按照季节划分为 4 个大类群, 而各季节不同站位的群落组成相似度有一定差异。分别对春、夏、秋和冬 4 个航次的浮游群落进行 Bray-Curtis 聚类分析, 结果如图 3 所示, 在 50% 的相似度水平上, 春季各站位被分为 5 个类群, 分别为处于航道及附近的 1、2、8 和 9 号站位, 位于内湾的 10 和 11 号站位, 位于扇贝养殖区的 3 号站位, 位于珠母贝养殖区的 7 号站位和位于外湾的其他站位。夏季各站位可以分为 4 个类群: 位于鱼类网箱养殖区及其附近的 8 和 9 号站位、位于内湾的 10 号站位、位于内湾近岸的 11 号站位和位于外湾的其他站位。在秋季, 各站位也被分为 4 个类群: 位于鱼类网箱养殖区及其附近的 8 号站位、位于流沙湾分界点的 5 号站位、位于内湾的 11 和 10 号站位和位于外湾的其他站位。冬季各站位可以分为 3 个类群: 位于内湾的 10 和 11 号站位和位于航道以北的 2、3 和 12 号站位及其他站位。

### 2.3 多样性指数与均匀度的时空分布

流沙湾四季多样性指数( $H'$ )和均匀度指数( $J$ )冬季最高、夏季最低(图 4)。春季, 各站位的浮游植物多样性指数范围为 4.21~2.22, 其中, 2 号站位最高, 为 4.21, 3、9、1 和 7 号站位较低, 分别为 3.10、3.09、2.73 和 2.22。夏季, 各站位的浮游植物多样性指数范围为 2.66~0.23, 其中, 2 号站位最高, 为 2.66, 3、6、9、11、8 和 10 号站位  $H'$  均不超过 1。秋季, 各站位的浮游植物多样性指数范围为 3.60~2.02, 其中, 8 和 9 号站位最高, 为 3.60 和 3.59, 5 和 3 号站位较低, 分别为 2.12 和 2.02。冬季各站位  $H'$  相差不大, 范围为 3.15~2.50, 其中, 9 号站位最高、4 号站位最低。而  $J$  分别为春季 0.469~0.879、夏季 0.522~0.048、秋季 0.440~0.749、冬季 0.520~0.706。

### 2.4 不同季节浮游植物群落结构的影响因素分析

调查期间, 流沙湾 4 个季节环境因子的平均值见表 4。对优势种与环境因子间进行冗余分析(Redundancy analysis, RDA)及 Monte Carlo 置换检验。如图 5 所示, 检验结果显示, 春季温度( $F=4.05$ ,  $P=0.022$ )和氨氮( $F=3.03$ ,  $P=0.05$ )、夏季透明度( $F=58.34$ ,  $P=0.002$ )、秋季亚硝酸氮( $F=4.55$ ,  $P=0.006$ )、冬季亚硝酸氮( $F=3.91$ ,  $P=0.022$ )与流沙湾浮游植物优势种密切相关并影响显著。透明度是影响夏季流沙湾浮游植物优势种的关

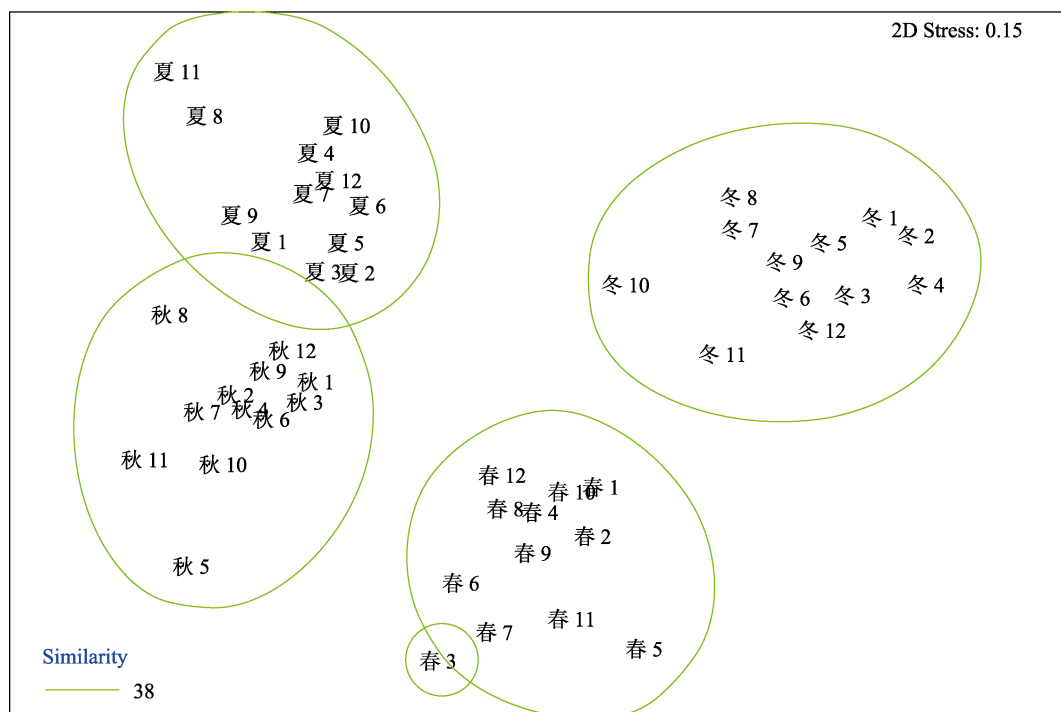


图 2 浮游植物群落的多维尺度分析  
Fig.2 The nMDS of phytoplankton communities

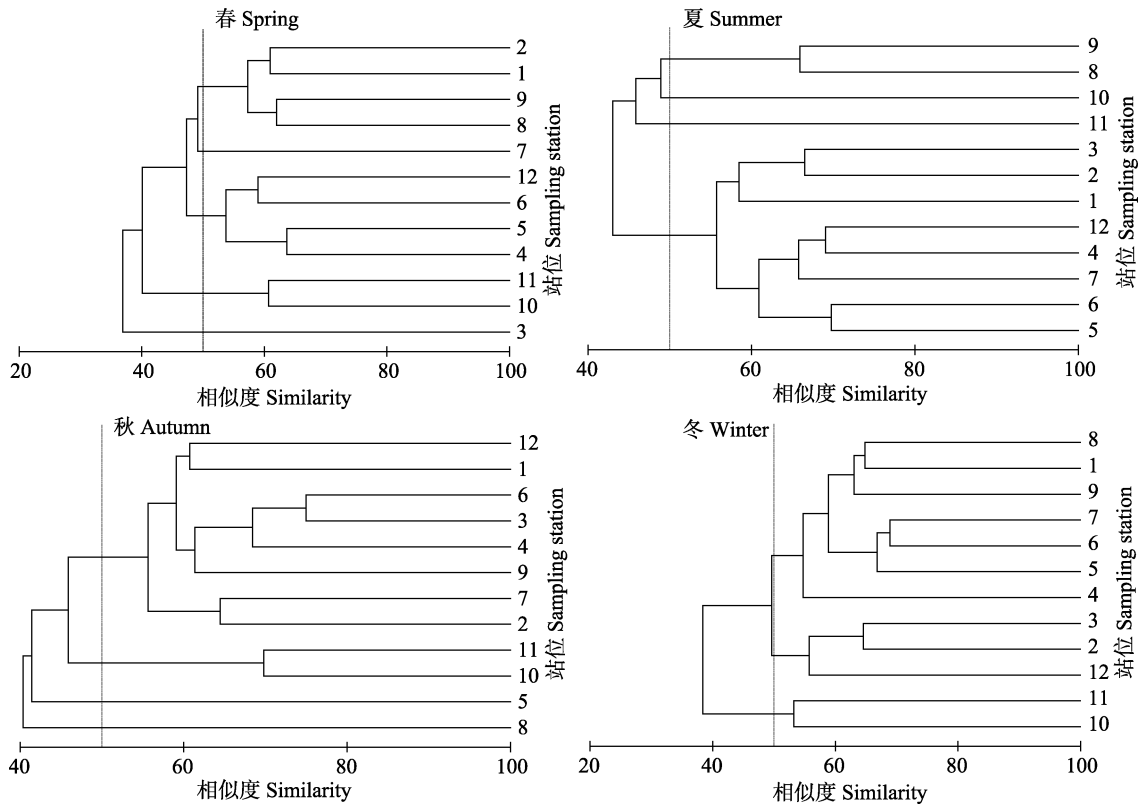


图 3 流沙湾 12 个采样点 4 个季节的聚类  
Fig.3 Cluster of twelve sampling stations of four seasons in Liusha Bay

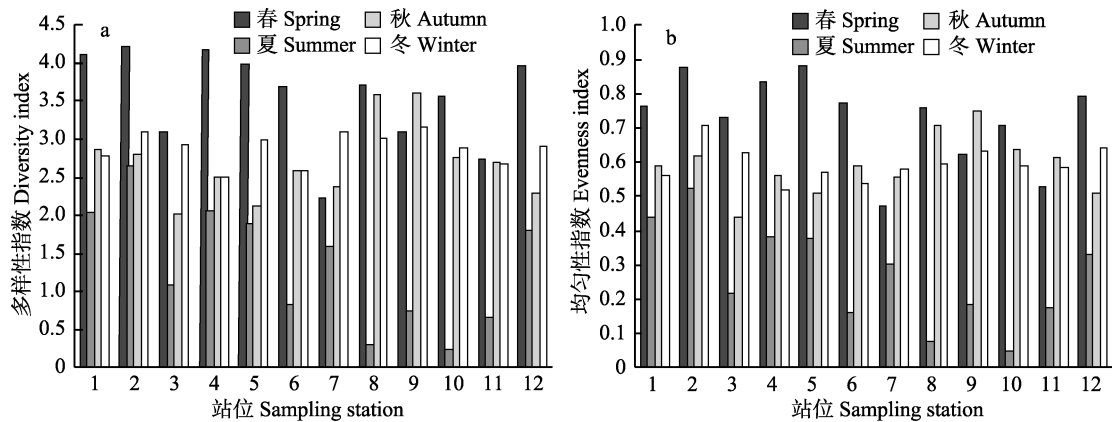


图 4 流沙湾浮游植物多样性指数(a)和均匀度指数(b)  
Fig.4 Diversity index (a) and evenness index (b) of phytoplankton in Liusha Bay

键因子,对浮游植物物种变化的解释度高达 85%;亚硝酸氮对秋、冬季浮游植物物种变化的解释程度分别为 34%和 28%。春季温度和氨氮对浮游植物物种变化的解释度分别为 25%和 15%。

**2.5 流沙湾不同养殖区浮游植物丰度、多样性指数及可溶性营养盐含量**

比较了外湾对照区(4 和 5 号站位)、扇贝主养区(1、3 和 6 号站位)、珍珠贝养殖区(7 号站位)、网箱鱼类养殖区(8 号站位)和内湾区(9 和 10 号站位)的浮

游植物丰度和多样性指数(图 6)。结果显示,在浮游植物丰度方面,鱼类小网箱养殖区浮游植物丰度在秋季和冬季高于其他区域。扇贝养殖区的浮游植物丰度较低,在夏、秋、冬三季低于外湾对照区,除秋季外,低于珍珠贝养殖区。除夏季外,内湾区的浮游植物丰度高于外湾对照区。在多样性方面,春、夏两季贝类养殖区浮游植物多样性小于外海对照区。在夏季,鱼类小网箱养殖区多样性最低。秋季鱼类养殖区与内湾区多样性高于外湾。冬季各区多样性指数均接近。

外湾对照区、扇贝主养区、珍珠贝养殖区、网箱





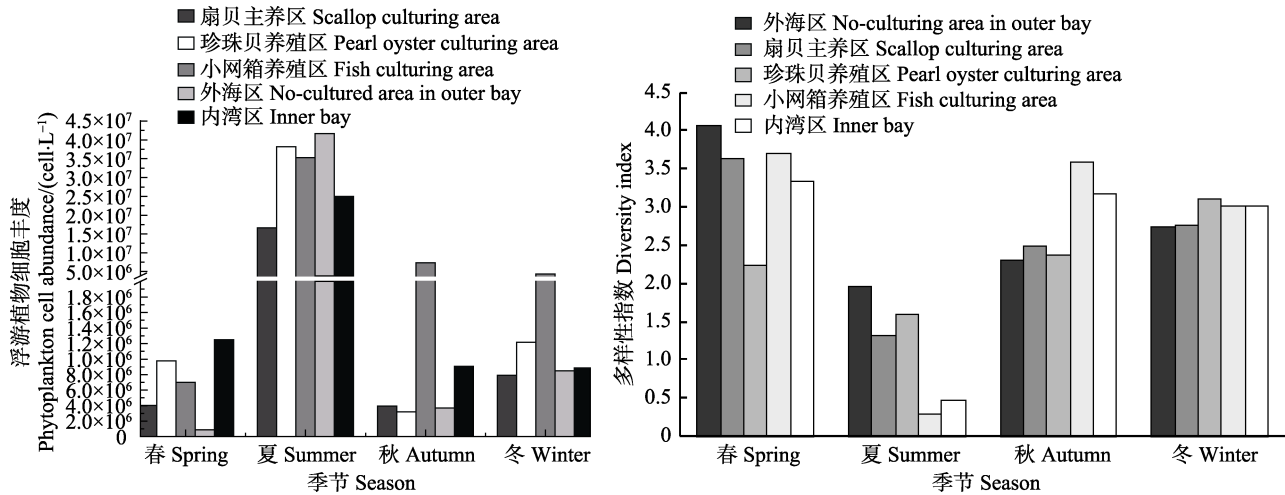


图6 流沙湾不同区域浮游植物浮游植物丰度及多样性指数  
Fig.6 Phytoplankton density and diversity index in different areas in Liusha Bay

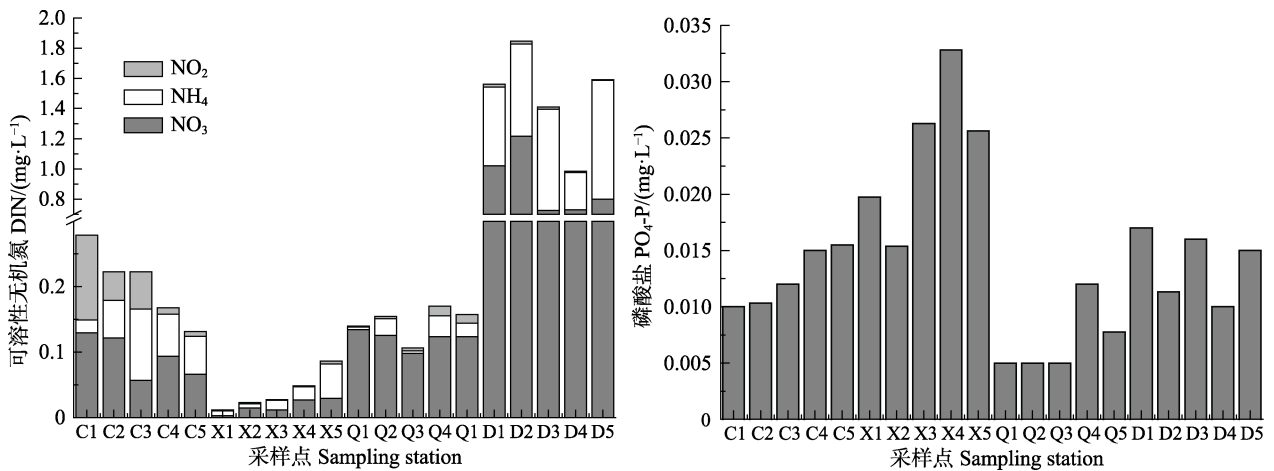


图7 流沙湾不同养殖区可溶性无机氮和磷酸盐含量  
Fig.7 DIN and PO<sub>4</sub>-P of different area in Liusha Bay

1: 外海对照区; 2: 扇贝养殖区; 3: 珍珠贝养殖区; 4: 鱼类小网箱养殖区; 5: 内湾区;

C: 春季; X: 夏季; Q: 秋季; D: 冬季

1: No-culturing area in outer bay; 2: Scallop culturing area; 3: Pearl oyster culturing area; 4: Fish culturing area; 5: Inner bay; C: Spring; X: Summer; Q: Autumn; D: Winter

含量相差不大。冬季鱼类网箱区的 DIN 为各区域之间最低。同时, 流沙湾外海对照区全年的氨氮浓度普遍低于其他海区。在 PO<sub>4</sub>-P 方面, 除冬季外, 鱼类网箱养殖区和内湾区的磷含量高于其他三区。与此同时, 外海对照区的 PO<sub>4</sub>-P 浓度则普遍低于其他海区。

### 3 讨论

#### 3.1 流沙湾浮游植物群落结构的季节变化特征及其影响因素分析

浮游植物在地球生态系统中起着重要的功能和

作用。浮游植物作为海洋食物网的基础, 提供约占全球总产出一半的初级生产量, 在 O<sub>2</sub> 的制造、CO<sub>2</sub> 的固定和储存、海洋营养物质循环等生态过程中有着不可或缺贡献(Not *et al.*, 2012)。浮游植物群落结构对生态系统中环境因子的改变有直接的响应, 其时空变化特征与水文、温度、营养元素等环境因子关系密切(王符菁等, 2015)。Bode 等(2017)对拉科努尼亚沿海地区的浮游植物多样性进行调查, 发现河水径流和海湾上升流共同影响浮游植物的群落结构组成, 同时, 浮游植物的群落结构也受到季节的影响。Wu 等(2014)对大亚湾海区浮游植物群落与环境因子的关系进行了分析, 结果显示, 环境温度和营养等因素对浮游植

物的季节演替率有很大的影响。

在本次调查中,流沙湾海域浮游植物群落的细胞丰度夏季最高,平均丰度为  $2.52 \times 10^4$  个/L,远高于其他 3 个季节。春季、秋季和冬季从高到低依次为  $0.16 \times 10^4$ 、 $0.12 \times 10^4$ 、 $0.1 \times 10^4$  个/L。各季节浮游植物群落的主要优势种出现了明显的更替,夏季主要优势种为中肋骨条藻,占总丰度的 69.5%,秋季优势种较多,但占总丰度的比例不高,其中,主要优势种拟弯角毛藻、奇异棍形藻、洛氏角毛藻的丰度之和仅占总丰度的 43%。冬季主要优势种为威氏圆筛藻、柔弱根管藻、岛脆杆藻,三者占总丰度的 60%。春季以须状角毛藻、红海束毛藻和明壁圆筛藻为主要优势种,3 种微藻的丰度之和共占流沙湾浮游植物总丰度的 67%。多维尺度排序的胁强值为 0.15,表明本次排序结果可以较好地解释物种的群落结构分组情况(Manly, 2005)。结果显示,调查站位在相同季节浮游植物群落组成的相似度较高,即浮游植物群落结构存在明显的季节差异。

在流沙湾海域,奇异棍形藻为秋、冬、春季优势种,红海束毛藻为夏、秋、春季优势种。其中,奇异棍形藻为广温沿岸种(王符菁等, 2015),其在夏季之后在流沙湾海域广泛存在。而红海束毛藻对温度的要求较高(丁昌玲等, 2016),在水温较低的冬季只存在于内湾近岸的 11 号站位,未成为冬季优势种。流沙湾冬季平均水温为  $18.2^\circ\text{C}$ ,期间出现的主要优势种如威氏圆筛藻、柔弱根管藻等也属于不耐高温的温带近岸或广布种。在春、秋两季,出现较多的主要优势种如须状角毛藻、拟弯角毛藻等则属于偏暖性近岸种。在水温最高的夏季,耐高温的中肋骨条藻和喜高温的红海束毛藻成为流沙湾海区的主要优势种。表明环境温度对流沙湾浮游植物的季节演替率有很大的影响。乔倩等(2016)发现,中肋骨条藻可以有效利用多种有机氮源,对无机氮具有较低的亲和能力。夏季流沙湾养殖活动频繁,为海区带来较多的有机氮源,同时, DIN 含量在 4 个季节中最低,也为中肋骨条藻的大量繁殖提供了有利条件。

### 3.2 规模化海水养殖对浮游植物的影响

多样性指数和均匀度是反映水生态稳定性的重要指标,也是评价群落是否成熟和稳定的特征之一(陈露等, 2015)。在夏季各采样点中,8 号站的多样性指数为 0.29,在春、秋、冬季均大于 3,分别为 3.71、3.59、3.01,显示出良好的多态性,表明鱼类网箱养殖在夏季对浮游植物多态性影响显著。夏季,养殖鱼

类生长迅速,因而也是网箱养殖活动的高峰期,传统养殖网箱密集分布通常会造水体富营养化。周志诚等(2014)发现,流沙湾网箱养殖区水体中氮、磷浓度自 5~9 月逐渐增加,10 月开始下降。认为这是网箱养鱼投饵、养殖生物体集中排泄以及浮游生物活动共同作用的结果。

高密度的滤食性贝类养殖会降低浮游植物的多样性。张玲等(2015)对大鹏澳牡蛎养殖区及其邻近海域进行了采样调查,研究表明,牡蛎养殖对浮游植物群落结构造成了一定影响,能够显著降低浮游植物丰度、种类多样性和均匀度。董婧等(2003)在对小窑湾的牡蛎、扇贝养殖区调查中发现,在高密度贝类筏式养殖区,随着贝类摄食强度的增强,浮游植物数量、种类都大量减少,浮游植物群落多样性指数偏低,丰度指数偏低,均匀度指数因季节不同而有较大差异。本次调查中,贝类养殖区平均多样性指数在春、夏两季低于外湾对照区,在秋季则低于内湾区。表明,流沙湾贝类养殖对浮游植物多态性产生了一定的影响。本次调查还发现,位于扇贝养殖区的 3 和 6 号站位在夏、秋季,多样性指数均明显低于其他站位。同时,1 和 2 号站位则表现出很高的多态性,表明在水流通畅的湾口,扇贝养殖活动对浮游植物多样性影响不大。

浮游植物的生长同时受到海水营养盐的上行效应以及浮游动物滤食性双壳类及鱼类下行效应的影响。鱼类网箱养殖产生的残饵和粪便会给海水环境带来大量的有机营养物,而贝类主要以  $\text{NH}_4\text{-N}$  和无机磷酸盐的方式向水中排泄 N 或 P。鱼、贝养殖可以增加海水中营养盐的含量,促进藻类的生长。研究表明,海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和合浦珠母贝的养殖活动会影响海区 DO、COD 和 P、TN 的变化(徐东会等, 2017; 王增焕等, 2011)。流沙湾外海对照区无养殖活动,全年的氨氮浓度普遍低于养殖区,同时,磷酸盐含量往往也低于养殖区。仅在贝类代谢水平降低且无鱼类小网箱养殖活动的冬季,外海对照区磷酸盐含量高于其他区域。同时,在鱼类养殖活动旺盛的夏季,小网箱区的 DIN 和磷酸盐含量明显高于其他海区,而在无养殖活动的冬季则低于其他海区。表明流沙湾海区的多种养殖活动在养殖季节对水质影响较大。

滤食性的扇贝和珍珠贝等贝类能够给浮游植物带来摄食压力。流沙湾扇贝养殖区浮游植物丰度,除春季高于外海对照区外,全年都低于其他海区。而在无贝类摄食压力的鱼类网箱养殖区和内湾区,浮游植物丰度则高于外海对照区。而在珍珠贝区,浮游植物丰度高于扇贝区,可能是因为珍珠贝区养殖规模小,

对浮游植物带来的摄食压力较低的缘故。此外,不同贝类对浮游植物的选择性摄食也可能引起浮游植物群落结构的改变。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)主动选择摄食甲藻和定鞭金藻(*Pavlova gyrans*),对骨条藻的选择性不高。在中肋骨条藻为优势种的夏季,栉孔扇贝胃含物最高的品种为海链藻(*Thalassiosira*)(乔芮, 2015)。而中肋骨条藻可以很好的作为合浦珠母贝幼贝和珠母贝(*Pinctada margaritifera*)的饵料(Kuwatani, 1964; Martínez-Fernández *et al*, 2007)。夏季,流沙湾合浦珠母贝对中肋骨条藻的摄食作用可以在一定程度上抑制中肋骨条藻的优势,导致夏季合浦珠母贝养殖区多样性指数高于扇贝养殖区。

### 3.3 养殖布局对浮游植物的影响

随着水产养殖活动规模的扩大,其对近岸环境的影响和污染问题也越来越突出(鲍旭腾等, 2012)。传统网箱养殖广泛投喂人工饲料和天然杂鱼等饵料,大量的残饵是海域的污染物质来源之一,易造成水体营养指数偏高、底部沉积物堆积、养殖水体底层贫氧现象严重等老化特征。而贝类筏式养殖可以阻挡海水流动,降低养殖海区水体的流速、改变水流方向,使得有机物质和营养盐被截留(苗卫卫等, 2007)。同时,即使在营养盐、水温等富营养化条件满足的情况下,流量、流速和水位等水动力条件也可能成为水体富营养化的制约因子(刘洪波等, 2013)。许栋等(2017)对南渡江下游进行二维水动力及水生态数值模拟,结果显示,枯水期水质富营养化风险远高于丰水期。

与往年调查相比,流沙湾的浮游植物种数和硅藻种数有所恢复,与 2008 年持平(表 5)。然而,丰度和多样性指数( $H'$ )在夏季却出现了较大的波动。吴雪等(2017)认为,一般  $H' < 1$  时,表明浮游植物群落可能受到其他环境因素的干扰;均匀度  $J > 0.3$ ,则表明海区内浮游植物多样性较好。即以  $H' > 1$  且  $J > 0.3$  作为浮游植物多样性较好的评价标准。在本次调查中,夏季内湾 8~11 号站位、外湾扇贝养殖区 3、6 号站位的生物多样性指数和丰富度均低于标准,表明该位点浮游植物多样性差、结构不稳定。郭永坚等(2015)在

2012 年对流沙湾的调查中发现,鱼贝养殖区的多样性指数、均匀度指数较高,且网箱鱼类养殖区的多样性指数一直为各区最高,与本次调查得出的结论完全相反。上述现象可能是因为流沙湾养殖设施增多,对海水流动性的阻碍增大,引起局部水体污染造成的。

张静等(2013)研究表明,流沙湾潮流运动为带有旋转流的往复流运动,落潮流速大于涨潮流速,且余速较强,海水自净能力很强。罗昭林等(2014)的水动力建模表明,流沙湾内、外湾口水体流速差异显著,退潮时,内湾口水流速度趋于静止状态(图 8)。2015 年,外湾扇贝筏式养殖面积进一步扩大,势必对流沙湾的水交换产生更大的影响。朱宜平等(2010)通过围隔装置研究 3 种流速对浮游动植物生长的影响,发现浮游植物生物量随着流速增长出现先升高后降低的趋势,并在总量上小于静水环境。鱼类网箱养殖活动易造成水体的富营养化,水动力不足易造成内湾透明度降低,营养盐水平升高,其与夏季高温的共同作用导致耐高温和盐度适应能力较强的中肋骨条藻在内湾大面积增殖。此外,本次调查发现,红海束毛藻首次在流沙湾海区发现,并在夏季普遍出现于湾外各采样点,秋季则遍布于内外湾,冬季仅存在于水温最高的 11 号站位,春季则出现在内湾的 10、11 号站位和外湾的 3、4 号站位。红海束毛藻体积小,生存温度在  $18^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$  之间,在北部湾海域大量分布(Boatman *et al*, 2017; 丁昌玲等, 2016),几乎不受贝类摄食压力的影响,其在流沙湾全年的时空分布出现了明显的温度相关,也间接地表明,流沙湾水动力受到养殖设施较大的干扰。

与 2012 年相比,流沙湾无机磷和总颗粒有机物的含量有所上升,其中,颗粒有机物范围由原先的 2.64~6.18(郭永坚等, 2015)上升到本次的 5.01~10.22,表明随着水动力不足,部分海域可能出现了富营养化趋势。此外,本次调查中,溶解氧水平低于 2012 年的调查结果,表明流沙湾可能已出现养殖负荷超过系统承载力的状况。水动力不足的情况下,在养殖活动强度大的 5~11 月,应注意赤潮和水中氧含量过低情况的发生。

表 5 近年来流沙湾浮游植物群落特征比较

Tab.5 Comparison of characteristics of phytoplankton community in Liusha Bay in recent years

采样时间 Sampling date	硅藻种数/总种数 Diatom species/total species	丰度 Abundance ( $10^4$ 个/L)	多样性指数 $H'$ Diversity index	参考文献 Reference
2008	123/151	0.24~5.72	1.07~3.35	张才学等(2012)
2012-08~2013-01	69/80	0.00~1.50	1.62~3.74	郭永坚等(2015)
2015-08~2016-05	122/172	0.05~79.04	0.23~4.21	本调查 This study

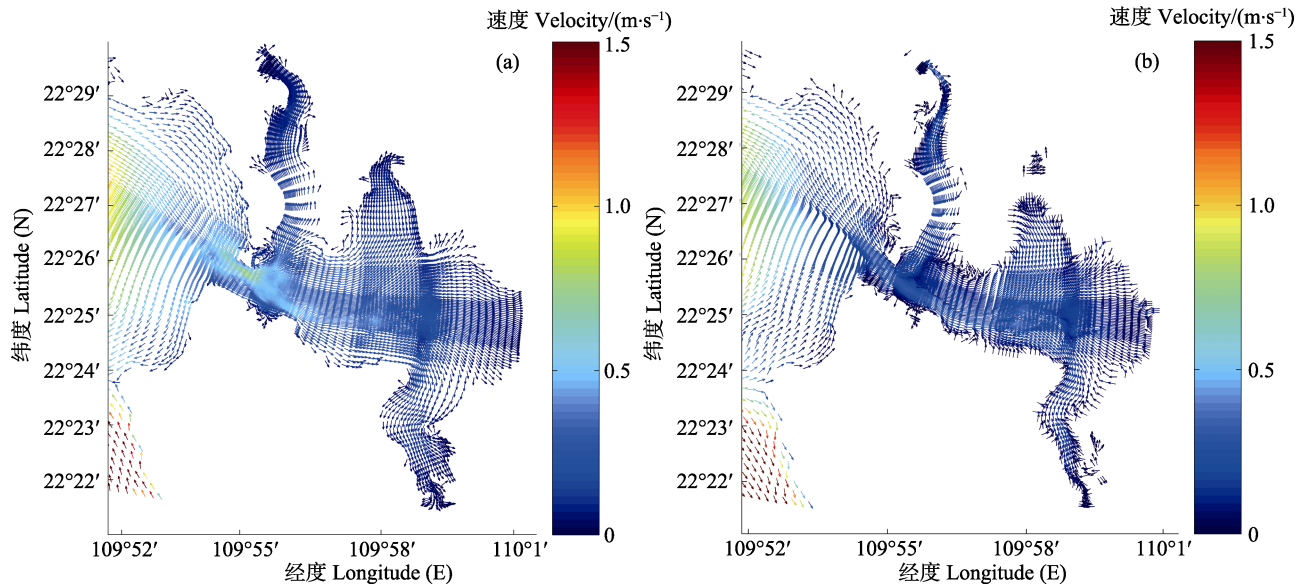


图 8 流沙湾涨/落潮流场(罗昭林等, 2014)

Fig.8 Tidal current at the time of flood and eddy of Liusha Bay (Luo *et al.*, 2014)

## 参 考 文 献

- Bao XT, Xu H, Zhang JH, *et al.* Best management practices for controlling aquaculture non-point pollution. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(3): 79–86 [鲍旭腾, 徐皓, 张建华, 等. 水产养殖面源污染控制的 最佳管理实践. *南方水产科学*, 2012, 8(3): 79–86]
- Boatman TG, Lawson T, Geider RJ. A key marine diazotroph in a changing Ocean: The interacting effects of temperature, CO<sub>2</sub> and light on the growth of *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0168796
- Bode A, Varela M, Prego R, *et al.* The relative effects of upwelling and river flow on the phytoplankton diversity patterns in the ria of A Coruña (NW Spain). *Marine Biology*, 2017, 164(4): 93
- Chen L, Li CH, Wei XL, *et al.* Influence of nitrogen and phosphorus enrichment on phytoplankton community structure in Nansha area in summer. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(5): 56–66 [陈露, 李纯厚, 魏小岚, 等. 南沙海域夏季氮磷添加模拟实验中浮游植物群落的变化. *南方水产科学*, 2015, 11(5): 56–66]
- Ding CL, Sun J, Xue B. Winter and summer diazotrophic cyanobacteria in the western South China Sea. *Haiyang Xuebao*, 2016, 38(4): 84–94 [丁昌玲, 孙军, 薛冰. 冬夏季南海西部固氮蓝藻. *海洋学报*, 2016, 38(4): 84–94]
- Dong J, Bi YP, Wang WB, *et al.* Effect of high density bivalve rafts cultivation on phytoplankton community. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(3): 50–54 [董婧, 毕远溥, 王文波, 等. 小窑湾高密度贝类筏式养殖对浮游植物群落的影响. *海洋水产研究*, 2003, 24(3): 50–54]
- Edwards P. Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*, 2015, 447: 2–14
- Grigorakis K, Rigos G. Aquaculture effects on environmental and public welfare-The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere*, 2011, 85(6): 899–919
- Guo YJ, Luo ZL, Zhu CB, *et al.* Influence of aquaculture on characteristics of phytoplankton community in Liusha Bay. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 57–65 [郭永坚, 罗昭林, 朱长波, 等. 水产养殖对流沙湾浮游植物群落特征的影响. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 57–65]
- Jiang ZJ, Fang JG, Mao YZ, *et al.* Environmental effect of marine fish cage aquaculture and integrated multi-trophic aquaculture. *Environmental Science and Management*, 2012, 37(1): 120–124 [蒋增杰, 方建光, 毛玉泽, 等. 海水鱼类网箱养殖的环境效应及多营养层次的综合养殖. *环境科学与管理*, 2012, 37(1): 120–124]
- Kuwatani Y. Rearing of the pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker), on the diet of *Skeletonema costatum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1964, 30(2): 104–113
- Liu HB, Zhu ML, Wang JZ, *et al.* Influence of reservoir hydrodynamic on eutrophication of water body. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2013, 24(2): 19–21 [刘洪波, 朱梦玲, 王精志, 等. 水库水动力对水体富营养化影响. *水资源与水工程学报*, 2013, 24(2): 19–21]
- Luo ZL, Zhu CB, Guo YJ, *et al.* Distribution characteristics of C, N and P in Liusha Bay surface sediment and their pollution assessment. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(3): 1–8 [罗昭林, 朱长波, 郭永坚, 等. 流沙湾表层沉积物中碳、氮、磷的分布特征和污染评价. *南方水产科学*, 2014, 10(3): 1–8]
- Manly BF. *Multivariate statistical methods: A primer*. Chapman and Hall, 2005: 1–224



- Martínez-Fernández E, Southgate PC. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture*, 2007, 263(1-4): 220-226
- Miao WW, Jiang M. Environmental impacts and sustainable development of aquaculture in China. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(s1): 319-323 [苗卫卫, 江敏. 我国水产养殖对环境的影响及其可持续发展. *农业环境科学学报*, 2007, 26(s1): 319-323]
- Not F, Siano R, Kooistra WHCF, *et al.* Chapter one-diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. *Advances in Botanical Research*, 2012, 64: 1-53
- Qiao Q, Wang CH, Guo X. Effects of nitrogen sources on the growth of *Skeletonema costatum*. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(8): 2110-2116 [乔倩, 王朝晖, 郭鑫. 不同氮源对中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)生长的影响. *生态学杂志*, 2016, 35(8): 2110-2116]
- Qiao R. Microscope and phytoplankton pigments analysis of the shellfish feeding habits. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [乔芮. 基于镜检和浮游植物色素分析的贝类食性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Tang QS, Han D, Mao YZ, *et al.* Species composition, non-fed rate and trophic level of Chinese aquaculture. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 729-758 [唐启升, 韩冬, 毛玉泽, 等. 中国水产养殖种类组成、不投饵率和营养级. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 729-758]
- Wang FJ, Lin YS, Cao WQ, *et al.* The relationship between nutrients and phytoplankton community structure in northern Beibu Gulf. *Journal of Tropical Oceanography*, 2015, 34(6): 73-85 [王符菁, 林元烧, 曹文清, 等. 北部湾北部浮游植物群落结构及其与营养盐的关系. *热带海洋学报*, 2015, 34(6): 73-85]
- Wang ZH, Ke CL, Wang XN, *et al.* Marine environmental quality assessment of shellfish culture in Liusha Bay. *South China Fisheries Science*, 2011, 7(3): 24-30 [王增焕, 柯常亮, 王许诺, 等. 流沙湾贝类养殖海域环境质量评价. *南方水产科学*, 2011, 7(3): 24-30]
- Wu ML, Wang YS, Wang YT, *et al.* Influence of environmental changes on phytoplankton pattern in Daya Bay, South China Sea. *Revista De Biologia Marina Y Oceanografia*, 2014, 49(2): 323-337
- Wu X, Li XL, Yang JL, *et al.* Ecological characteristics of phytoplankton in scallop culture area in Laizhou Bay. *Fisheries Science*, 2017, 36(3): 347-352 [吴雪, 李希磊, 杨俊丽, 等. 莱州湾扇贝养殖区浮游藻类的生态特征. *水产科学*, 2017, 36(3): 347-352]
- Xu D, Wang D, Ji CN, *et al.* Numerical simulation of two-dimensional hydrodynamics and aquatic ecology of the lower reach of Nanduijiang River in Hainan Island, China. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(2): 214-223 [许栋, 王迪, 及春宁, 等. 海南南渡江下游二维水动力及水生态数值模拟. *环境科学研究*, 2017, 30(2): 214-223]
- Xu DH, Chen BJ, Jiang T, *et al.* Temporal and spatial variation characteristics of water nutrients and eutrophication evaluation in aquaculture water areas of Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 1-11 [徐东会, 陈碧鹃, 江涛, 等. 桑沟湾养殖海域营养盐时空分布特征及富营养化评价. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 1-11]
- Zhang CX, Chen HY, Sun SL, *et al.* Temporal and spatial distribution of phytoplankton in Liusha Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(5): 1527-1537 [张才学, 陈慧妍, 孙省利, 等. 流沙湾海草床海域浮游植物的时空分布及其影响因素. *生态学报*, 2012, 32(5): 1527-1537]
- Zhang J, Liu Y, Ma ZH, *et al.* Three-dimensional numerical simulation of tide and tidal currents in Liusha Bay and the study on its sea environmental capacity. *Marine Science Bulletin*, 2013, 32(1): 34-44 [张静, 刘玉, 马志华, 等. 流沙湾海域潮汐潮流的三维数值模拟和海域环境容量研究. *海洋通报*, 2013, 32(1): 34-44]
- Zhang JH, Fang JG, Wang W. Progress in studies on ecological carrying capacity of mariculture for filter-feeding shellfish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(4): 626-632 [张继红, 方建光, 王巍. 浅海养殖滤食性贝类生态容量的研究进展. *中国水产科学*, 2009, 16(4): 626-632]
- Zhang L, Li ZJ, Chen YF, *et al.* Impact of oyster aquaculture on phytoplankton population structure in Dapeng Cove. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 549-555 [张玲, 李政菊, 陈飞羽, 等. 大鹏澳牡蛎养殖对浮游植物种群结构的影响研究. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 549-555]
- Zhang L, Wu T, Xu D, *et al.* Feeding on feces, diets and cage farming sediments of *Paralichthy solivaceus* by Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 96-102 [张继红, 吴桃, 徐东, 等. 虾夷扇贝对牙鲆的粪便、残饵及网箱养殖区沉积物的摄食. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 96-102]
- Zhou ZC, Shen YC, Xue HB. Temporal and spatial variation of nitrogen and phosphorus and their load estimation in cage-culture waters in Liusha Bay, Guangdong. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(3): 65-69 [周志诚, 申玉春, 薛海波. 广东流沙湾网箱养鱼区水体氮磷的时空变化及负荷估算. *广东海洋大学学报*, 2014, 34(3): 65-69]
- Zhu YP, Zhang HP, Li FP, *et al.* Enclosure experiments about the hydrodynamics effects on the plankton. *Environmental Science*, 2010, 31(1): 69-75 [朱宜平, 张海平, 李飞鹏, 等. 水动力对浮游生物影响的围隔研究. *环境科学*, 2010, 31(1): 69-75]

## Phytoplankton Community Characteristics in Different Seasons and Their Relationship with Aquaculture in Liusha Bay

SU Jiaqi, ZHU Changbo<sup>①</sup>, LI Junwei, LI Ting, CHEN Suwen, XIE Xiaoyong, ZHANG Bo

(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, Guangdong Provincial  
Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300)

**Abstract** Liusha Bay is one of the main aquaculture areas of marine mollusks in Guangdong Province, characterized by the main producing areas of South Pearl. To assess the environmental effects of aquaculture activities, the phytoplankton composition, abundance, community structure, diversity, and water physicochemical factors were investigated in each season from August 2015 to May 2016. In total, 171 phytoplankton species were detected, with 122 species of diatom belonging to 43 genera, followed by dinoflagellates represented by 44 taxa (10 genera), blue-green algae by two taxa (two genera), chrysophyceae by two taxa (two genera), and euglena by one taxa (one genus). The range of phytoplankton density was  $0.05 \times 10^4 \sim 79.04 \times 10^4$  cells/L, which ranked as: summer > spring > autumn > winter. In general, the phytoplankton density in the outer bay was similar to that in the inner bay. The abundance of phytoplankton in summer was distinctly higher than that in the other three seasons. The most common dominant species were *Chaetoceros crinitus*, *Trichodesmium erythraeum*, and *Coscinodiscus debilis* in spring, *Skeletonema costatum* in summer, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *Bacillaria paradoxa*, and *Chaetoceros lorenzianus* in autumn, and *Coscinodiscus wailesii*, *Rhizosolenia delicatula*, and *Fragilaria islandica* in winter. *B. paradoxa* was the dominant species in spring, autumn, and winter. *T. erythraeum* was the dominant species in all seasons except for autumn. Redundancy analysis suggested that the main variables affecting the dominant species were water temperature and nitrate (NO<sub>3</sub>-N) in spring, transparency in summer, and nitrite (NO<sub>2</sub>-N) in autumn and winter. The phytoplankton diversity and abundance of different cultured zones presented seasonal differences. Compared to 2012, the total coverage of the aquaculture zone in 2015 increased by approximately 50% in the outer bay. Furthermore, coverage of the pearl oyster farming zone decreased by about 90% in the inner bay. Both the distribution of the aquaculture zone and the scale of the mariculture species were significantly changed, and the characteristics of the phytoplankton community responded to these changes. In summer, cage fish farming could efficiently increase nutrient content in seawater and decrease phytoplankton diversity. Furthermore, phytoplankton abundance was decreased by large-scale scallop culture.

**Key words** Liusha Bay; Phytoplankton; Cluster analysis; Aquaculture activity

① Corresponding author: ZHU Changbo, E-mail: changbo@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171018001

http://www.yykxjz.cn/

白怀宇, 李秋芬, 张艳, 陈碧鹃, 韩倩, 夏斌, 曲克明. 象山港中部养殖海区营养盐的季节变化及富营养化. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 24–30

Bai HY, Li QF, Zhang Y, Chen BJ, Han Q, Xia B, Qu KM. Seasonal variation in nutrients and evaluation of eutrophication in the aquaculture areas in the middle water areas of Xiangshan Harbor. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 24–30

# 象山港中部养殖海区营养盐的 季节变化及富营养化\*



白怀宇<sup>1</sup> 李秋芬<sup>1</sup> 张艳<sup>1</sup> 陈碧鹃<sup>1,2</sup>  
韩倩<sup>1</sup> 夏斌<sup>1,2</sup> 曲克明<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

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

**摘要** 根据 2014 年 11 月, 2015 年 1 月、3 月和 7 月在象山港中部养殖海区开展的海洋调查所获得的海水营养盐数据, 分析了该海域营养盐含量的季节变化, 评价了海水的富营养化状况。结果显示, 该海域无机氮平均含量秋季最高, 春季次之, 冬季最低; 活性磷酸盐平均含量秋季最高, 夏季次之, 冬季最低。对不同养殖区域分析, 宁海海藻养殖区和西沪港海带养殖区的无机氮浓度除冬季 1 个站点外均劣于国家海水四类水质标准(0.50 mg/L), 活性磷酸盐浓度在春、秋两季劣于国家海水四类水质标准(0.045 mg/L)。全年各水层的 N/P 比值均高于 Redfield 比值, 磷相对缺乏。根据富营养化评价模式, 象山港中部养殖海区营养水平属于磷中等限制潜在性富营养型。

**关键词** 象山港; 营养盐; 季节变化; 富营养化

**中图分类号** X821 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0024-07

海湾是大陆和海洋相连接的区域。除地表径流和大洋环流等自然因素的影响外, 工业废水及生活污水的排放、海水养殖和海洋开发等人类活动导致近海的环境污染问题日趋严重, 特别是氮、磷等营养盐过剩而引起的富营养化已经成为世界沿海各国需要关注的一个重要的环境问题(戴纪翠等, 2009)。海水富营养化会破坏海洋生态系统的平衡, 其引起的赤潮会造成严重的经济损失, 从而影响海洋经济的发展。所以, 开展近海特别是海湾的富营养化水平调查评价, 对深入认识人类活动对海洋环境的影响具有重要意义。

象山港位于浙江省宁波市东南部, 是一个西南至

东北方向的狭长半封闭海湾, 已成为浙江省最大的水产养殖基地, 主要以海带、网箱养殖为主(刘永超等, 2016)。近年来, 随着沿岸人口的激增和工业、水产养殖业的迅速发展, 象山港的海水水质逐渐恶化, 特别是富营养化问题日益突出。目前, 针对象山港的海水富营养化问题, 已采取了控制网箱养殖规模、扩大大型藻类养殖、放流底栖贝类等措施, 进行生态修复。对象山港海域营养盐水平进行连续调查研究, 可以掌握该海域海水水质的变化规律, 对养殖生产及生态环境修复效果评价具有重要的指导作用(黄秀清等, 2015)。关于象山港海水环境质量评价的研究已有报

\* 海洋公益性行业科研专项(201305043-3)和国家自然科学基金委-山东省联合基金项目(U1606404)共同资助[This work was supported by the National Marine Public Welfare Research Project(201305043-3), and the Joint Fund Project of National Fund Committee and Shandong Province(U1606404)]. 白怀宇, E-mail: xuehaiyouwo@163.com

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

收稿日期: 2017-10-18, 收修改稿日期: 2017-11-22

道,张丽旭等(2008、2011)研究了 2005 年春季、夏季和秋季象山港营养盐的分布特征及近 20 年来象山港海域无机氮、活性磷酸盐和化学需氧量(COD)的变化趋势;付翔等(2012)建立了海湾养殖生态系统箱式模型,对海湾富营养化发展趋势进行了预测。基于象山港的养殖特点,对不同养殖区域进行营养盐季节变化分析的研究尚未有报道。本研究于 2014 年 11 月,2015 年 1 月、3 月和 7 月对象山港中部养殖海区开展了海洋环境质量调查,分析了象山港海区主要营养盐的季节变化,并进行了富营养化评价,为有效保护象山港的生态环境提供了科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区域概况

象山港流域面积为 1455 km<sup>2</sup>,岸线全长为 392 km,其中,大陆岸线长 260 km,属于亚热带季风区,以低山丘陵为主,天然淤积海岸、侵蚀海岸和人工海岸交替分布(刘永超等,2016)。象山港地处 121°25'~122°00'E 和 29°23'~29°49'N 之间,是一个纵长约为 62.8 km、面积为 563 km<sup>2</sup>的半封闭港湾,水域面积为 391.8 km<sup>2</sup>,滩涂面积为 171.2 km<sup>2</sup>,平均水深为 10 m,港口宽度约为 9.5 km,流域年均径流量为 1.3×10<sup>9</sup> m<sup>3</sup>。

象山港狭湾外段夏季主要受台湾暖流的影响,冬季主要受长江径流的影响,余环流基本上以水平结构为主,狭湾内段海域受外界影响较小,而中段则受 2 种环流结构叠加的影响(林忠洲等,2014)。港内滩涂养殖业发达,养殖条件良好,是浙江省最大的水产养殖基地。

### 1.2 采样站点与时间

分别于 2014 年 11 月(秋季),2015 年 1 月(冬季)、3 月(春季)和 7 月(夏季)在象山港中部养殖海区布设 8 个调查站位(图 1)。其中, L1 站位为非养殖区,宁海海藻养殖区包括 L2、L3 和 L4,以海带(*Laminaria japonica*)、龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)为主要养殖对象,面积约为 40 hm<sup>2</sup>,每年 12 月初放苗,次年 4、5 月收获。L5 为毛蚶(*Scapharca subcrenata*)底播区,是当地增殖放流试验区,每年放流数量不等,约为 0.2~1.8 亿粒/次。L6 为西沪港网箱养殖区,养殖面积约 3.33 hm<sup>2</sup>,常年养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)等经济鱼种,投喂鲜杂鱼和其他人工饵料。西沪港海带养殖区包括 L7 和 L8,养殖面积约为 2.67 hm<sup>2</sup>,每年 12 月初放苗,次年 4、5 月收获。

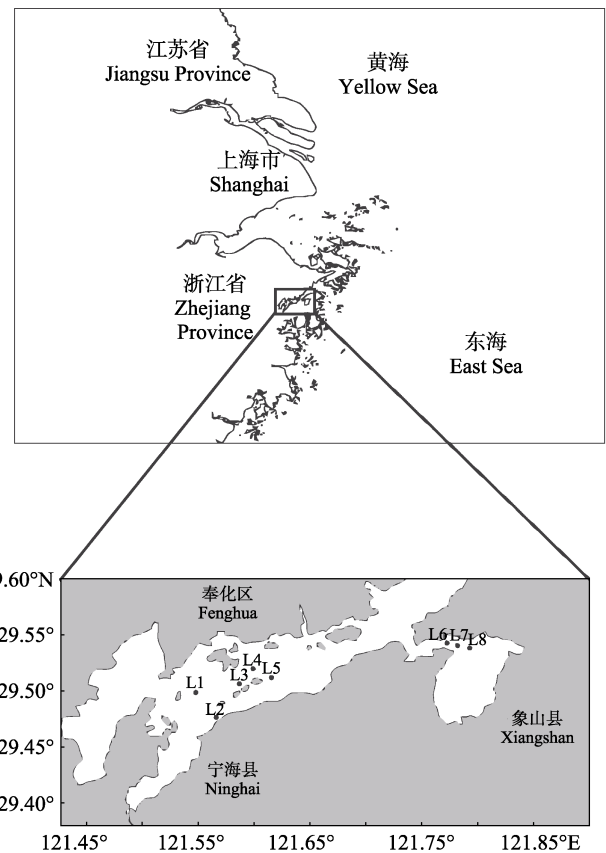


图 1 调查站点分布  
Fig.1 Distribution of investigation stations

### 1.3 样品测定与分析方法

样品的采集和现场处理及分析方法参照《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007)执行。水样用 Niskin 采水器采集,采样的层次为表层和底层。样品的测定分析包括:亚硝酸盐(NO<sub>2</sub>-N)、硝酸盐(NO<sub>3</sub>-N)、氨盐(NH<sub>4</sub>-N)和磷酸盐(PO<sub>4</sub>-P)。NO<sub>2</sub>-N 采用萘乙二胺分光光度法测定,NO<sub>3</sub>-N 采用镉柱还原法测定(相对误差为 1.4%),NH<sub>4</sub>-N 采用次溴酸盐氧化法测定(相对误差为 0.4%),PO<sub>4</sub>-P 采用磷钼蓝分光光度法测定(相对误差为 1.8%)。可溶性无机氮(DIN)的含量为 NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N 和 NH<sub>4</sub>-N 三者之和。根据郭卫东等(1998)提出的潜在性富营养化评价模式,对象山港中部养殖海区 4 个季节总体富营养化水平进行评价。

## 2 结果与讨论

### 2.1 营养盐的季节变化特征

象山港中部海域春季、夏季、秋季和冬季营养盐含量如表 1 所示,从季节变化来看,表、底层 DIN 平均含量为秋季>春季>夏季>冬季,PO<sub>4</sub>-P 含量为秋季>夏季>春季>冬季。

表 1 象山港海区营养盐平均浓度  
Tab.1 The average contents of nutrients in Xiangshan Harbor ( $\mu\text{g/L}$ )

季节 Season	水层 Water-course	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NH}_4\text{-N}$	DIN	$\text{PO}_4\text{-P}$
春季 Spring	表层 Surface	24.6 (22~27)	1294 (730~1570)	84.5 (71~96)	1403 (847~1861)	49.8 (41~67)
	底层 Bottom	25.1 (24~26)	1130 (950~1420)	87.1 (65~100)	1242 (109~1509)	49.5 (39~63)
夏季 Summer	表层 Surface	10.7 (5.2~14)	984 (814~1170)	110 (80~150)	1104 (966~1288)	58 (22~77)
	底层 Bottom	8.5 (3.6~13)	1026 (911~1130)	106 (46~160)	1140 (963~1270)	65 (57~78)
秋季 Autumn	表层 Surface	15.3 (10~24)	1237 (909~1650)	136 (100~184)	1389 (1026~1844)	77 (65~98)
	底层 Bottom	13.5 (7.8~19)	1144 (850~1790)	110 (64~190)	1267 (1022~1867)	72.9 (63~91)
冬季 Winter	表层 Surface	11.5 (9.2~17)	659 (439~816)	51.5 (39~67)	722 (502~869)	36.6 (29~50)
	底层 Bottom	12.5 (8.7~19)	637 (401~897)	54.5 (45~70)	704 (482~978)	39.9 (31~52)

注：括号内数据为变化范围

Note: Data in brackets are the ranges

对于 DIN, 表、底层水域  $\text{NO}_2\text{-N}$  的平均含量以春季最高, 夏季最低; 表、底层水域  $\text{NO}_3\text{-N}$  的平均含量以春季最高, 冬季最低; 表、底层水域  $\text{NH}_4\text{-N}$  的平均含量以秋季最高, 冬季最低。在四季调查中,  $\text{NO}_3\text{-N}$  在春季、夏季、秋季和冬季所占比例分别为: 表层 92.22%、89.10%、89.10%和 91.27%, 底层 90.96%、89.97%、90.28%和 90.49%。 $\text{NO}_3\text{-N}$  为溶解无机氮的主要存在形式, 这主要因为  $\text{NO}_2\text{-N}$  是  $\text{NH}_4\text{-N}$  氧化或  $\text{NO}_3\text{-N}$  还原过程的中间产物, 而  $\text{NH}_4\text{-N}$  是生物代谢产物和死亡分解的最终产物(吕华庆等, 2009), 也是藻类的优先吸收对象, 使得  $\text{NO}_2\text{-N}$  和  $\text{NH}_4\text{-N}$  的含量相对较少。象山港海域 DIN 整体水平严重超标, 除冬季 L8 站位底层海水(0.482 mg/L)外, 其他站位、水层 DIN 含量均劣于海水四类标准(0.50 mg/L), 这可能与冬季两岸生产活动及地表径流减少有关。对于  $\text{PO}_4\text{-P}$ , 在四季调查中, 只有 L7 站的夏季(0.022 mg/L)和冬季(0.029 mg/L)表层海水  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量优于海水二类标准(0.030 mg/L), 其他站位点的  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量均劣于海水二类标准。

与张丽旭等(2008)的研究结果相比, 发现象山港在近 10 余年的时间里, DIN 及  $\text{PO}_4\text{-P}$  浓度进一步升高。虽然象山港养殖的龙须菜及海带可以消耗大量的营养盐, 在 L7 和 L8 站位能看到一些效果, 但对于降低整个海区营养盐含量的效果仍不太显著, 这可能与陆源地表径流大量营养盐的输入超过了海藻的净化能力有关。

## 2.2 营养盐的区域分布特征

象山港中部养殖海区表、底层海水的 DIN 浓度在各个养殖区的季节差异较大, 非养殖区季节差异相对不显著(图 2)。从不同季节来看, 春、夏两季海藻生长旺盛, 大量吸收海水中的 DIN, 使得宁海海藻养殖区和西沪港海带养殖区的 DIN 浓度低于毛蚶底播区, 尤其是夏季底层海水, 甚至低于非养殖区。但秋季的表、底层 DIN 浓度相对于非养殖区并未明显降低, 一方面因为海带等受到温度和光照等条件的影响, 对 DIN 的吸收能力减弱(吴荣军等, 2009), 另一方面由于养殖区受到陆源因素(地表径流、人类活动等)的影响。毛蚶底播区海水的 DIN 浓度在春、秋两季均维持在较高水平, 尤其是在表层海水中更为明显; 而在底层海水中 DIN 浓度则随着季节变化逐渐降低。这主要是由于毛蚶的排泄物以氨类废物为主, 从中等规格开始, 随着壳长的增加即个体的生长, 排氨率逐渐降低(沈伟良等, 2008; 王庆志等, 2015)。

从不同季节来看, 所有调查区域表层海水  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量以秋季最高, 冬季最低(图 3)。底层海水除西沪港网箱养殖区外,  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量也以秋季最高, 冬季最低, 并且呈现由春至秋逐渐增加的情况。这可能是夏、秋季节无藻类养殖活动, 而陆源径流量增大的结果: 一方面港区内船舶产生的废水及渔民的生活污水增加; 另一方面, 夏季多雨, 致使地表径流带来的城市污水含有的  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量增加, 从而加剧了这一情况(吕华庆等, 2009)。西沪港网箱养殖区和毛蚶底播养



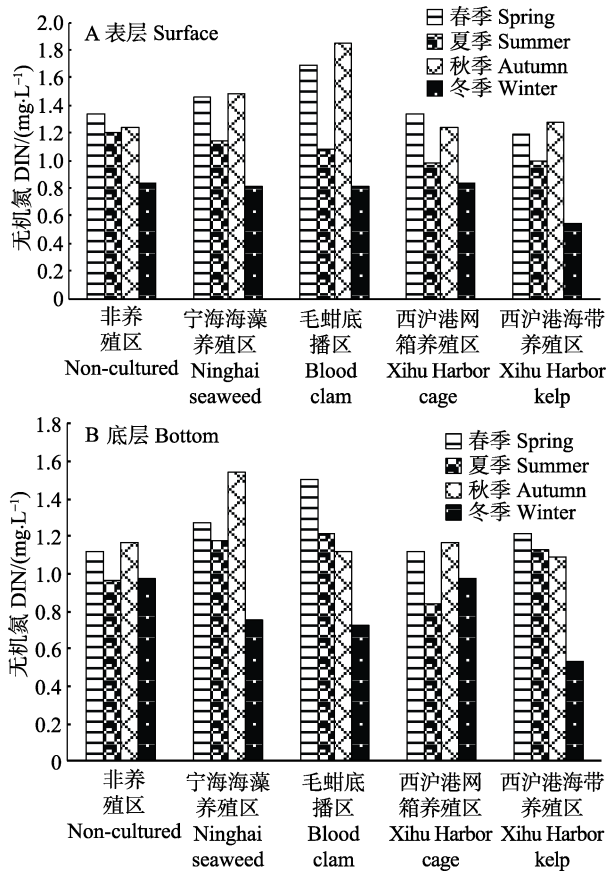


图 2 象山港不同区域的 DIN 浓度

Fig.2 Regional distributions of DIN in Xiangshan Harbor

殖区表、底层海水  $PO_4\text{-P}$  浓度与非养殖区相比无显著差异。

养殖龙须菜和海带能吸收水体中的无机氮和磷酸盐, 有利于控制并减少网箱养殖活动产生的营养盐含量。象山港养殖区通过合理规划、分区养殖的发展模式, 实现了鱼贝藻搭配、协同收益的良好局面(韩芳等, 2012)。但同时也应看到, 象山港海水污染问题由来已久(张丽旭等, 2005), 陆源径流和人类活动对象山港的环境质量影响较大。目前, 龙须菜和海带养殖规模还不足以对象山港的富营养化污染有明显的改善效果, 治理海水污染也不可能在短时间内一蹴而就。桑沟湾和象山港养殖品种相似, 地理环境略有差异, 但是象山港海域的无机氮和磷酸盐含量远高于桑沟湾(张继红等, 2010), 这主要也是由于陆源径流和人类活动对象山港的影响较大所致。

### 2.3 营养盐结构分析

Redfield 等(1963)研究表明, 浮游植物通常以约为 16 : 1 的 N/P 比值(原子比)摄取海水中的氮和磷, 当 N/P 比值大于 16 : 1 时, 表明水体为磷限制, 当 N/P 比值小于 16 : 1 时, 表明水体为氮限制, 过高或

过低于这个比值均会引起浮游植物生长受限, 这个比值通常称为 Redfield 比值。根据本次调查对象山港中部养殖海区的统计分析(图 4), 象山港海水四季的 N/P 比值均超过 Redfield 比值, 特别是在春季, 表、底层海水的 N/P 比值分别达到 62.44 和 55.57, 均高于其他季节表、底层的海水的 N/P 比值。这表明, 活性磷酸盐可能成为象山港海域浮游植物生长的限制因子之一, 这与韩芳等(2012)的研究结果一致, 说明象山港中部海域一直处于相对磷限制和氮过剩的状态。

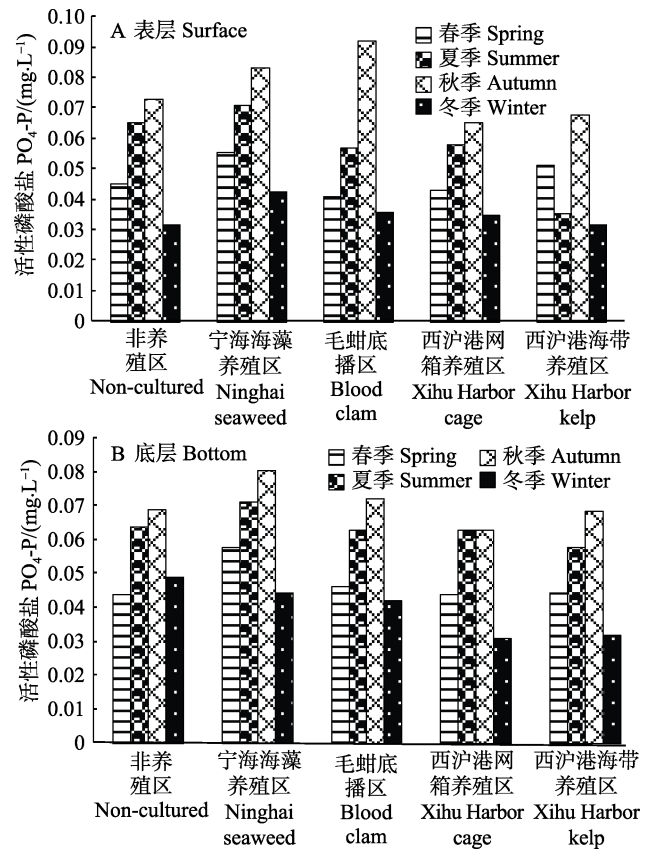


图 3 象山港不同区域的  $PO_4\text{-P}$  浓度

Fig.3 Regional distributions of  $PO_4\text{-P}$  in Xiangshan Harbor

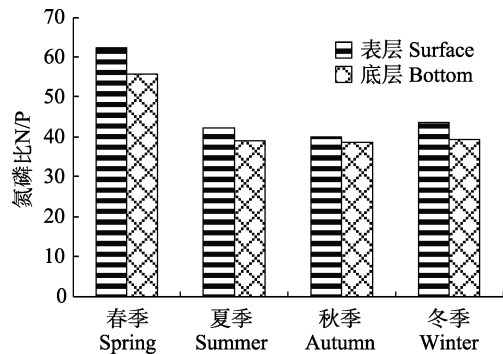


图 4 象山港调查海区四季的氮磷比

Fig.4 The N/P value of the investigation areas in Xiangshan Harbor in four seasons



从不同分区来看(表 2),在不同季节、不同水层,养殖区的 N/P 比值差异较大(29.38~91.33)。在毛蚶底播区,春季表、底层海水的 N/P 比值高达 91.33 和 72.64;但即使是最低的西沪港网箱养殖区底层海水

(29.38)也依然高于 Redfield 比值。同时,海水 N/P 比值过高,会降低虹彩圆筛藻(*Coscinodiscus oculusiridis*)等硅藻的竞争能力(曲克明等,2000),从而影响浮游植物的多样性。

表 2 象山港不同调查海区营养盐氮磷比  
Tab.2 The N/P value of different investigation areas in Xiangshan Harbor

季节 Season	水层 Water-course	非养殖区 Non-cultured	宁海海藻养殖区 Ninghai seaweed	毛蚶底播区 Blood clam	西沪港网箱养殖区 Xihu Harbor cage	西沪港海带养殖区 Xihu Harbor kelp
春季 Spring	表层 Surface	65.74	58.28	91.33	68.80	51.04
	底层 Bottom	56.46	48.87	72.64	56.46	60.36
夏季 Summer	表层 Surface	40.95	35.72	42.00	37.34	61.63
	底层 Bottom	33.32	36.66	42.58	29.38	42.93
秋季 Autumn	表层 Surface	37.61	39.50	44.38	42.24	41.36
	底层 Bottom	37.39	42.29	34.53	40.95	35.14
冬季 Winter	表层 Surface	58.06	42.26	49.58	53.08	38.07
	底层 Bottom	44.20	37.53	38.00	69.86	36.29

## 2.4 富营养化评价

根据富营养化评价方法的划分标准,对象山港海域的富营养化水平进行评价。结果显示,象山港 4 个季节均属于磷中等限制潜在性富营养(表 3)。韩芳等(2012)的研究表明,2010 年象山港网箱养殖海域处于严重富营养化状态,这表明近年来象山港海域富营养化状况有所改善,但海水富营养化问题仍然是象山港一直存在的生态环境问题,这主要与象山港养殖活动、近岸生活污水的排放以及象山港的地理位置有关(曾相明等,2011)。象山港海域水体交换能力弱,港区置换 65%的水体需要 125 d,置换 90%的水体需要 305 d(林忠洲等,2014),不利于污染物的扩散,加剧了象山港海水的富营养化程度。在港湾内开展海水养殖,一方面,促进了海洋生态系统的高效产出,保障了水产品的持续供给;另一方面,其最大程度地挖掘了以

碳汇扩增为特点的生态服务功能,保障了生态系统健康。但这在短时间内没有改变象山港海水高污染及重度富营养化的现状。尤其是随着沿海港湾经济的快速发展,人口急剧聚集,导致大量的陆地污染物随地表径流及雨水冲刷注入港内,致使象山港海水富营养化现象更加突出。因此,在今后象山港养殖发展的过程中,需要特别关注养殖生态容纳量与养殖品种的搭配、营养物质循环与养殖生物的互补互益、系统产出与生态和社会效益等科学数据的支撑,实验经济效益与环境发展和谐统一。

## 3 结论

象山港中部养殖海区无机氮平均含量以秋季为四季最高,春季次之,冬季最低;活性磷酸盐平均含量以秋季最高,夏季次之,冬季最低。比照海水水质标准,全年除冬季外 DIN 总体水平平均劣于海水第四类标准(0.50 mg/L); PO<sub>4</sub>-P 水平春秋两季劣于海水第四类标准(0.045 mg/L)。

从不同区域来看,宁海海藻养殖区和西沪港海带养殖区的 DIN 浓度全年劣于国家海水四类标准, PO<sub>4</sub>-P 浓度全年劣于国家海水第四类标准,但在冬春季略优于其他海域;毛蚶底播区的 DIN 和 PO<sub>4</sub>-P 浓度在春秋两季有显著的增高情况。

象山港中部养殖海区表层、底层的 N/P 比值均高于 Redfield 比值,呈现磷限制状态。根据营养化评价模式,象山港中部养殖海区四季的营养盐水平仍较高,为磷中等限制潜在性富营养。

表 3 象山港海区营养类型评价  
Tab.3 Nutrition style assessment in Xiangshan Harbor

季节 Season	DIN (mg/L)	PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	N/P	营养级 Nutrition level
春季 Spring	1.323	0.0496	59.06	V <sub>P</sub>
夏季 Summer	1.122	0.0615	40.40	V <sub>P</sub>
秋季 Autumn	1.328	0.0749	39.26	V <sub>P</sub>
冬季 Winter	0.713	0.0383	41.22	V <sub>P</sub>

## 参 考 文 献

- Dai JC, Gao XW, Ni JR, *et al.* Status analysis of nutrients and eutrophication assessment in Shenzhen coastal waters. *Environmental Science*, 2009, 30(10): 2879–2883 [戴纪翠, 高晓薇, 倪晋仁, 等. 深圳近海海域营养现状分析与富营养化水平评价. *环境科学*, 2009, 30(10): 2879–2883]
- Fu X, Hao K, Liu CG, *et al.* Simulation for polyculture and eutrophication in Xiangshan Harbor. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(1): 1–9 [付翔, 郝镡, 刘诚刚, 等. 象山港多品种养殖与富营养化状况的数值模拟. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 1–9]
- Guo WD, Zhang XM, Yang YP, *et al.* Potential eutrophication assessment for Chinese coastal waters. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1998, 17(1): 64–70 [郭卫东, 章小明, 杨逸萍, 等. 中国近岸海域潜在性富营养化程度的评价. *台湾海峡*, 1998, 17(1): 64–70]
- Han F, Huo YZ, Du X, *et al.* Effect of fish-cage culture on water environment in Xiangshan Harbor. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 825–830 [韩芳, 霍元子, 杜霞, 等. 象山港网箱养殖对水域环境的影响. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 825–830]
- Huang XQ, Qi P, Qin WH, *et al.* Research on the evaluation method of marine ecological environment in Xiangshan Bay. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(8): 63–75 [黄秀清, 齐平, 秦渭华, 等. 象山港海洋生态环境评价方法研究. *海洋学报*, 2015, 37(8): 63–75]
- Lin ZZ, Yan XJ, Lencart E Silva JD. Study on the features of water exchange in Xiangshan Bay. *Journal of Ningbo University(NSEE)*, 2014, 27(1): 1–7 [林忠洲, 严小军, Lencart E Silva JD. 象山港水交换能力研究. *宁波大学学报(理工版)*, 2014, 27(1): 1–7]
- Liu YC, Li JL, Yuan QX, *et al.* Comparative research on the impact of human activities on changes in coastline and landscape in bay areas: A case study with Xiangshangang Bay, China and Tampa Bay, USA. *Acta Geographica Sinica*, 2016, 71(1): 86–103 [刘永超, 李加林, 袁麒麟, 等. 人类活动对港湾岸线及景观变迁影响的比较研究——以中国象山港与美国坦帕湾为例. *地理学报*, 2016, 71(1): 86–103]
- Lv HQ, Chang KM, Shi GD. Circulation and distribution of nitrogen and phosphorus in Xiangshan Bay, China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(2): 138–144 [吕华庆, 常抗美, 石钢德. 象山港氮、磷营养盐环流和分布规律的研究. *海洋与湖沼*, 2009, 40(2): 138–144]
- Qu KM, Chen BJ, Yuan YX, *et al.* A preliminary study on influence of N and P on population constituent of planktonic diatoms in seawater. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(3): 445–448 [曲克明, 陈碧鹃, 袁有宪, 等. 氮磷营养盐影响海水浮游硅藻种群组成的初步研究. *应用生态学报*, 2000, 11(3): 445–448]
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA. The influence of organisms on the composition of sea-water. In: Hill MN (Ed). *The sea: Ideas and observations on progress in the study of the seas*. New York: Interscience Publishers, 1963, 26–77
- Shen WL, You ZJ, Shi WL. Study on size and salinity related oxygen consumption and ammonia excretion of *Scapharca subcrenata* spat. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(2): 53–56 [沈伟良, 尤仲杰, 施祥元. 不同规格及不同盐度下毛蚶稚贝耗氧率和排氨率的研究. *海洋水产研究*, 2008, 29(2): 53–56]
- Wang QZ, Zhang M, Teng WM, *et al.* A review: Research progress of biology in ark shell *Scapharca subcrenata* insight from aquaculture. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(4): 437–443 [王庆志, 张明, 滕炜鸣, 等. 毛蚶养殖生物学研究进展. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(4): 437–443]
- Wu RJ, Zhang XL, Zhu MY, *et al.* A model for the growth of Haidai (*Laminaria Japonica*) in Aquaculture. *Marine Science Bulletin*, 2009, 28(2): 34–40 [吴荣军, 张学雷, 朱明远, 等. 养殖海带的生长模型研究. *海洋通报*, 2009, 28(2): 34–40]
- Zeng XM, Guan WB, Pan C. Cumulative influence of long term reclamation on hydrodynamics in the Xiangshangang Bay. *Journal of Marine Sciences*, 2011, 29(1): 73–83 [曾相明, 管卫兵, 潘冲. 象山港多年围填海工程对水动力影响的累积效应. *海洋学研究*, 2011, 29(1): 73–83]
- Zhang JH, Jiang ZJ, Wang W, *et al.* Seasonal distribution and variation of nutrients and nutrients limitation in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 16–25 [张继红, 蒋增杰, 王巍, 等. 桑沟湾营养盐时空分布及营养盐限制分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(4): 16–25]
- Zhang LX, Jiang XS, Cai YH. Characteristics of nutrient distributions and eutrophication in seawater of the Xiangshan Harbor. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(5): 488–491 [张丽旭, 蒋晓山, 蔡燕红. 象山港海水中营养盐分布与富营养化特征分析. *海洋环境科学*, 2008, 27(5): 488–491]
- Zhang LX, Ren S, Jiang XS. Characteristics polluted by nitrogen and phosphorus and potential eutrophication assessment in Xiangshan Harbor. *Marine Environmental Science*, 2005, 24(3): 68–71 [张丽旭, 任松, 蒋晓山. 象山港海域 N、P 污染特征及潜在性富营养化程度评价. *海洋环境科学*, 2005, 24(3): 68–71]
- Zhang LX, Zhao M, Cai YH. Variation trends of N, P and COD<sub>Mn</sub> in Xiangshan Harbor and the relationship between them with eutrophication. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(1): 81–85 [张丽旭, 赵敏, 蔡燕红. 象山港海域 N、P 和 COD<sub>Mn</sub> 的变化趋势及其与富营养化的关系. *海洋环境科学*, 2011, 30(1): 81–85]

## Seasonal Variation in Nutrients and Evaluation of Eutrophication in the Aquaculture Areas in the Middle Water Areas of Xiangshan Harbor

BAI Huaiyu<sup>1</sup>, LI Qiufen<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, CHEN Bijuan<sup>1,2</sup>, HAN Qian<sup>1</sup>, XIA Bin<sup>1,2</sup>①, QU Keming<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** Based on data from the aquaculture sea-areas of the middle part of Xiangshan Harbor surveyed in autumn of 2014, and spring, summer, and winter of 2015, nutrient levels and seasonal variation in nutrients were evaluated. The results showed that the inorganic nitrogen and phosphorus levels in autumn were higher than those in spring, summer, and winter. Among all regions, the DIN (Dissolved inorganic nitrogen) concentrations in Ninghai seaweed and Xihu Harbor kelp culture areas were higher than the fourth level of seawater standard (0.50 mg/L), except one sampling station in the winter. PO<sub>4</sub>-P content were higher than the fourth level of seawater standard (0.045 mg/L) in the spring and autumn. This may be due to human activity, which was focused on the development of local economy and urban upgrading. Additionally, the rivers that flowed through the metropolis around Xiangshan Harbor carried domestic wastewater and rainfall, consisting of superfluous inorganic nitrogen and inorganic phosphorus, to the sea water. Conversely, seaweed, as well as algae such as kelp, was originally cultivated to reduce the level of DIN and PO<sub>4</sub>-P, and has not functioned optimally during recent years, contradicting with the nutrient data from previous investigation. The N/P ratios of the sea water in the middle areas of Xiangshan Harbor were higher than the Redfield ratio in four seasons, lacking in inorganic phosphorus correspondingly. According to the potential eutrophication assessment model, Xiangshan Harbor possessed potential, rich nutrition, with medium levels of restricted phosphorus in four seasons.

**Key words** Xiangshan Harbor; Nutrient; Seasonal variation; Eutrophication

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180428001

http://www.yykxjz.cn/

刘志刚, 卢迈新, 曹建萌, 高风英. 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性和遗传关系分析. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 31-41

Liu ZG, Lu MX, Cao JM, Gao FY. Genetic diversity and genetic relationship analysis of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 31-41

## 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性和遗传关系分析\*



刘志刚 卢迈新<sup>①</sup> 曹建萌 高风英

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与  
养殖重点实验室 广州 510380)

**摘要** 罗非鱼“粤闽 1 号”是用尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)培育的全雄罗非鱼新品种。采用同工酶电泳技术和线粒体 DNA 控制区序列分析方法,对罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性、遗传结构及群体之间的遗传关系进行研究。同工酶电泳结果显示,酯酶(EST)和乳酸脱氢酶(LDH)的酶谱具有组织和群体特异性。肌肉和脾脏中的 EST 表达量极低,而肝脏中的 EST 表达量较高,LDH 在 3 种组织中均有较高表达,但酶谱存在差异。在罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体中,共检测到 10 条 EST 酶带和 5 条 LDH 酶带,多态性位点比例( $P$ )为 12.50%~71.43%,平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.0417~0.6143,Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $D$ )为 -0.2347~0.9072。线粒体 DNA 控制区序列分析结果显示,mtDNA D-loop 区的碱基组成无显著差异,均呈现出 A+T 碱基偏向性(63.39%)。在罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体中,共发现 20 种单倍型,核苷酸多样性指数( $P_i$ )为 0~0.0519,奥尼罗非鱼雌鱼(WY1)、尼罗罗非鱼雌鱼(XX)、尼罗罗非鱼雄鱼(XY)和罗非鱼“粤闽 1 号”(XY2)群体的  $P_i$  值(0.0440~0.0519)明显高于超雄尼罗罗非鱼(YY1)、超雄奥尼罗非鱼(YY2)和奥利亚罗非鱼雌鱼(WZ)群体的  $P_i$  值(0~0.0009)。各群体之间的遗传分化指数( $F_{ST}$ )为 -0.0115~0.9963,XY2 与 WY1 群体之间、XX 与 XY 群体之间以及 WZ 和 YY2 群体之间的遗传分化不显著( $F_{ST} < 0.05$ ,  $P > 0.05$ )。XY2 群体与尼罗罗非鱼群体(XX 群体和 XY 群体)和奥利亚罗非鱼群体(WZ 群体)之间的平均遗传距离分别为 0.0639 和 0.0695。在 NJ 系统进化树中,XX、XY、YY1 和 XY2 群体聚为一支,WY1、WZ 和 YY2 群体聚为另一支。本研究揭示了罗非鱼“粤闽 1 号”的生化及分子遗传特征,为其种质鉴定、繁育群体的构建和优良性状的稳定遗传提供理论基础。

**关键词** 罗非鱼“粤闽 1 号”;同工酶;线粒体 DNA 控制区;遗传多样性;遗传关系

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0031-11

罗非鱼“粤闽 1 号”为本研究团队与福建百汇盛源 水产种业有限公司和西双版纳同益水产科技有限公

\* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46)、广东省自然科学基金(2016A030313146)和广州市科技计划项目(201803020034)共同资助[This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-46), Natural Science Foundation of Guangdong Province(2016A030313146), and Science and Technology Program of Guangzhou(201803020034)].  
刘志刚, E-mail: wenliugang@163.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 卢迈新, 研究员, E-mail: mx-lu@163.com

收稿日期: 2018-04-28, 收修改稿日期: 2018-05-21

司在漳州市和西双版纳育种基地历经 7 年(2010~2016 年)培育出来的全雄罗非鱼新品种, 该罗非鱼新品种以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)为基础群体, 通过群体选育、家系选育、杂交育种和遗传全雄罗非鱼(Genetic male tilapia, GMT)技术等复合育种技术培育而成, 其培育技术路

线见图 1。近年来, 罗非鱼“粤闽 1 号”分别在云南、广东、福建、广西和海南等省进行了池塘、网箱和水库中试养殖, 结果显示, 其具有雄性率高、生长快、抗病力强、出肉率高和饲料转化率高等特点。为了揭示其种质特征, 有必要对罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性和遗传关系进行研究。

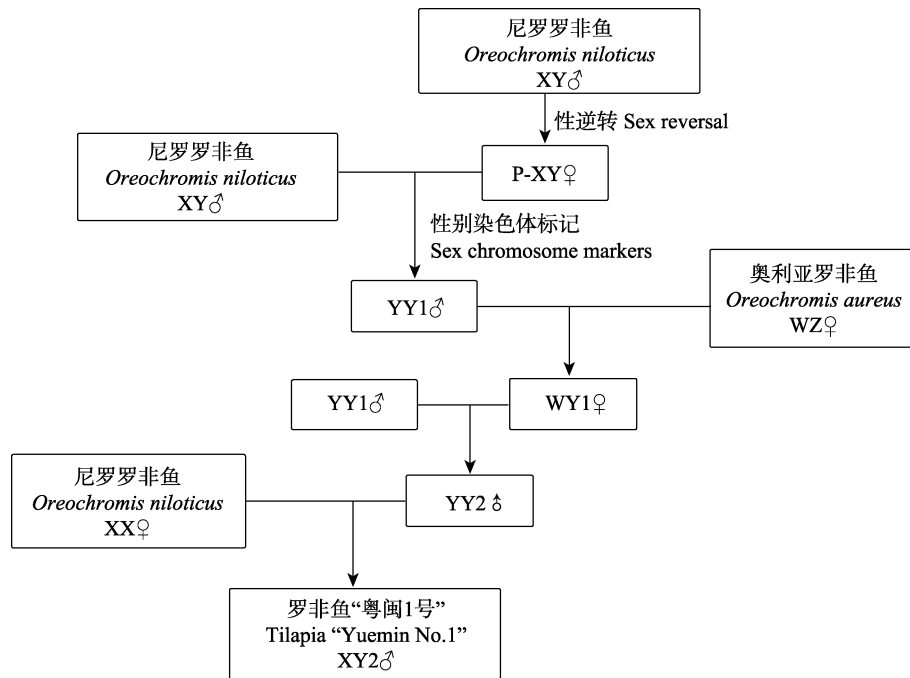


图 1 罗非鱼“粤闽 1 号”的培育技术路线

Fig.1 The technical route of tilapia “Yuemin No.1” breeding

同工酶在生物界广泛存在, 变异丰富, 呈共显性遗传, 由 1 个或多个基因座位编码, 能比较客观地代表基因组的变异, 可揭示生物种群的进化和亲缘关系, 是一种生化表现型的遗传标志, 且有实验条件简单、成本低、结果快速可靠等优点, 被广泛应用于水产物种鉴定、种间亲缘关系和遗传进化分析(杨淞等, 2006; 张健东等, 2015; 丁金强等, 2013)。线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是细胞核外具有自主复制、转录和翻译能力的环状双螺旋 DNA, 具有分子量小、结构简单、进化速度快、高度多态、母性遗传等特点, 被广泛应用于鱼类种群的进化和遗传研究(Teletchea *et al*, 2009; 胡玉婷等, 2015)。mtDNA D-loop 区是线粒体基因组中变异最大、进化速度最快的区域, 具有较高的突变积累, 适用于种内、种群或个体间遗传多样性的研究, 也可用于种间遗传差异分析(吴长敬等, 2010; 颀晓勇等, 2014; 刘红等, 2016)。

本研究采用同工酶电泳技术和 mtDNA 控制区测序分析方法, 对罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体进行遗传多样性、遗传结构和遗传关系分析, 从而揭示罗非鱼“粤闽 1 号”的生化 and 分子遗传特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体共 7 个罗非鱼群体的样品均采集于本研究团队与福建百汇盛源水产种业有限公司和西双版纳同益水产科技有限公司在漳州市和西双版纳的育种基地。尼罗罗非鱼雌鱼(XX)、尼罗罗非鱼雄鱼(XY)、奥利亚罗非鱼雌鱼(WZ)为以生长速度为群体选育指标的 F<sub>5</sub> 代, 超雄尼罗罗非鱼(YY1)为 F<sub>4</sub> 代尼罗罗非鱼雄鱼(XY)与尼罗罗非鱼伪雌鱼(P-XY)交配后, 通过性别标记筛选获得的群体。奥尼罗非鱼雌鱼(WY1)为超雄尼罗罗非鱼(YY1)

与 F<sub>5</sub> 代奥利亚罗非鱼雌鱼(WZ)杂交后获得的雌鱼群体。超雄奥尼罗非鱼(YY2)为超雄尼罗罗非鱼(YY1)与奥尼罗非鱼雌鱼(WY1)交配后获得的雄鱼群体。罗非鱼“粤闽 1 号”(XY2)为 F<sub>5</sub> 代尼罗罗非鱼雌鱼(XX)与超雄奥尼罗非鱼(YY2)杂交后获得的子代, 样品具体信息见表 1。无菌解剖, 取其肌肉、肝脏和脾脏, 置于液氮中冻存, 用于研磨后进行同工酶电泳分析; 剪取其尾鳍, 置于无水乙醇中固定, 用于抽提 DNA, 进行 mtDNA D-loop 区序列分析。

表 1 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体样品采集信息  
Tab.1 Sampling information of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations

罗非鱼群体 Populations of tilapia	编号 Code	样本数 Sample size	与罗非鱼“粤闽 1 号”的关系 Relationship to tilapia “Yuemin No.1”
罗非鱼“粤闽 1 号” Tilapia “Yuemin No.1”	XY2	20	—
尼罗罗非鱼雌鱼 Female <i>O. niloticus</i>	XX	20	XY2 母本 Female parent ♀
超雄奥尼罗非鱼 Supermale hybrid tilapia	YY2	20	XY2 父本 Male parent ♂
尼罗罗非鱼雄鱼 Male <i>O. niloticus</i>	XY	20	YY1 父本 Male parent ♂
奥利亚罗非鱼雌鱼 Female <i>O. aureus</i>	WZ	20	WY1 母本 Female parent ♀
超雄尼罗罗非鱼 Supermale <i>O. niloticus</i>	YY1	20	YY2 父本 Male parent ♂
奥尼罗非鱼雌鱼 Female hybrid tilapia	WY1	20	YY2 母本 Female parent ♀

## 1.2 实验方法

**1.2.1 同工酶电泳样品制备** 将 1.1 中冻存的罗非鱼的肌肉、肝脏和脾脏置于 0.8% 的生理盐水中, 洗涤 2 次, 除去血污, 用滤纸吸干后分别称取约 0.25 g 组织, 置于无菌离心管中。按 1 : 6(重量 g/体积 ml) 的比例加入预冷的 0.1% mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.0), 采用组织匀浆器粉碎组织, 置于低温离心机中, 4℃ 下 12000×g 离心 20 min, 其中, 肝脏需离心 2 次。吸取上清液, 转移至新的离心管中, 分装后置于 -80℃ 冰箱中冻存备用。

**1.2.2 酯酶和乳酸脱氢酶电泳** 采用 Bio-Rad 电泳仪和聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳槽进行电泳, 酯酶和乳酸脱氢酶电泳所用的非变性聚丙烯酰胺凝胶均为 3.75% 的浓缩胶和 7.5% 的分离胶, 酯酶电泳采用 EBT

(pH=8.0)电泳缓冲体系, 乳酸脱氢酶电泳采用 TC (pH=8.0)缓冲体系, 聚丙烯酰胺凝胶体系和电泳缓冲体系参照朱蓝菲(1992)和吴燕燕等(2008)的方法操作。样品中加入上样缓冲液, 每个孔点 15 μl, 先在 4℃ 下 100 V 预电泳 40 min, 然后调高电压至 200 V, 电泳 2~4 h。

**1.2.3 同工酶染色、固定及酶谱分析** 电泳完毕后, 取下凝胶, 加入染色液, 置于 37℃ 染色 30 min, 直至酶带清晰, 酯酶染色液和乳酸脱氢酶染色液参照吴燕燕等(2008)的方法配制。染色后, 用蒸馏水漂洗 2 遍, 置于 7% 的醋酸溶液中固定, 扫描, 根据酶谱和相对迁移率绘制模式图, 并参照李思发(1998)的方法对各酶带进行命名和遗传学分析。

多态位点比例  $P=(K/n) \times 100\%$

平均杂合度的观测值  $H_o=1/n \sum H_i^*$

平均杂合度期望值  $H_e=1/n \sum (1 - \sum P_i^2)$

位点有效等位基因数  $A_e=1/n \sum a_i$

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数  $D=(H_o - H_e)/H_e$

式中,  $K$  为多态性位点数,  $n$  为所测位点总数,  $H_i^*$  = 单个位点杂合子观测值/该位点观察个体总数,  $P_i$  为第  $i$  位等位基因的频率,  $a_i$  为第  $i$  个位点的等位基因总数。

**1.2.4 基因组 DNA 提取** 采用动物基因组 DNA 提取试剂盒(Magen)提取罗非鱼尾鳍基因组 DNA, 操作步骤参照试剂盒说明书。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整性, 用核酸蛋白定量仪检测其浓度。

**1.2.5 mtDNA D-loop 区扩增及测序** 罗非鱼线粒体 DNA D-loop 区扩增引物和扩增条件参照杨洁等(2014), PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测后, 由广州艾基生物有限公司进行 PCR 产物测序。

**1.2.6 数据分析** 采用 Contig-Express 软件对所测序列进行拼接, 采用 Bioedit 软件对拼接序列进行校正, Blast 分析表明, 所获序列为罗非鱼 mtDNA D-loop 区目的片段。采用 ClustalW 软件对序列进行多重比对, 采用 DnaSP 5.0 软件计算单倍型多样性(Haplotype diversity,  $h$ )、核苷酸多样性(Nucleotide diversity,  $P_i$ )、平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide differences,  $K$ )和核苷酸多态位点数(Numbers of polymorphic sites,  $S$ ), 采用 Arlequin 3.5 软件计算遗传分化指数( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ )和基因流( $N_m$ )。采用 MEGA 5.0 软件中的 Kimura 2-Parameter 程序计算群体间遗传距离, 用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建群体间的分子系统进化树。



## 2 结果

### 2.1 酯酶和乳酸脱氢酶酶谱分析

对罗非鱼“粤闽1号”及其繁育群体中6个罗非鱼群体的肌肉、脾脏和肝脏中的酯酶(EST)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果显示,肌肉和脾脏中EST的表达量极低,酶谱很浅,无法进行辨别;肝脏中的EST表达量较高,其酶谱和模式图见图2。在6个罗非鱼群体肝脏中,共检测到10条EST酶带,按迁移率的快慢分别命名为EST-1~EST-10。EST-6~EST-9酶带颜色较深,酶活力较强;EST-2、EST-3、EST-7

和EST-9酶带存在于所有罗非鱼群体中。YY2群体的酶带最多(8条),YY1和WZ群体的酶带最少(5条)。罗非鱼“粤闽1号”的父本(YY2群体)的主带为EST-6、EST-7和EST-9,母本(XX群体)的主带为EST-7、EST-8和EST-9,罗非鱼“粤闽1号”(XY2群体)的主带为EST-6、EST-7、EST-8和EST-9,表现出杂合现象。尼罗罗非鱼群体XX和YY1中有EST-8主带,不含EST-6主带;奥利亚罗非鱼群体WZ与之相反;在奥尼杂交罗非鱼群体中,除了YY2群体,在WY1和XY2群体中,同时出现EST-6和EST-8酶带。

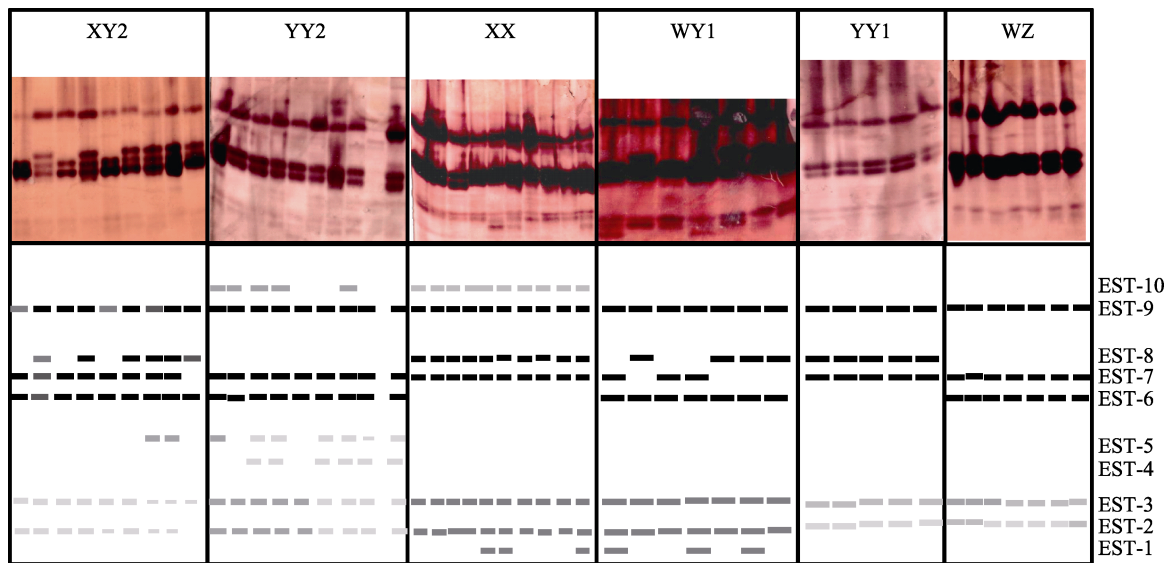


图2 罗非鱼“粤闽1号”及其繁育群体的肝脏中酯酶的电泳图谱和模式图

Fig.2 Electrophoretogram and the model of EST in liver of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations

对6个罗非鱼群体的肌肉、脾脏和肝脏中的乳酸脱氢酶(LDH)进行电泳分析。结果显示,在3种组织中均能检测到清晰酶带,其酶谱和模式图如图3所示,共检测到5条酶带,根据其迁移率快慢分别命名为LDH-1~LDH-5。LDH的表达具有明显的组织特异性,在肌肉中检测到5条酶带(LDH-1~LDH-5),而在脾脏和肝脏中均检测到3条酶带(LDH-2、LDH-3和LDH-5);LDH-2酶带在所有组织中颜色均最深。6个罗非鱼群体肌肉中均含有LDH-1和LDH-2酶带,WY1群体中含有LDH-3酶带,XX群体中含有LDH-3、LDH-4和LDH-5酶带。XY2、YY2和WZ群体脾脏中的LDH酶谱一致,均含有LDH-2、LDH-3和LDH-5酶带,XX和YY1群体脾脏中的LDH酶谱一致,均含有LDH-2和LDH-3酶带,WY1群体脾脏中只有LDH-2酶带。YY2和YY1群体的肝脏中只有LDH-2酶带,XY2和WZ群体的肝脏中只有LDH-2

和LDH-5酶带,XX群体的肝脏中含LDH-2和LDH-3酶带,WY1群体的肝脏中含有LDH-2、LDH-3和LDH-5酶带,且具有个体差异性。

### 2.2 同工酶遗传结构分析

根据6个罗非鱼群体组织中酯酶和乳酸脱氢酶电泳酶谱,对其群体遗传结构参数进行分析。结果显示,不同群体的基因位点数存在差异(6~9个),XY2和YY2群体中基因位点数最多(9个);6个罗非鱼群体的平均有效等位基因数( $A_e$ )为1.13~1.71;多态性位点比例( $P$ )为12.50%~71.43%;平均期望杂合度( $H_e$ )为0.0347~0.3221;平均观测杂合度( $H_o$ )为0.0417~0.6143;上述4个遗传学参数均在XX群体中的值最大,在WZ群体中的值最小;6个罗非鱼群体中,哈迪-温伯格平衡偏离指数( $D$ )为-0.2347~0.9072,其中,WY1群体最小(-0.2347),XX群体最大(0.9072)(表2)。

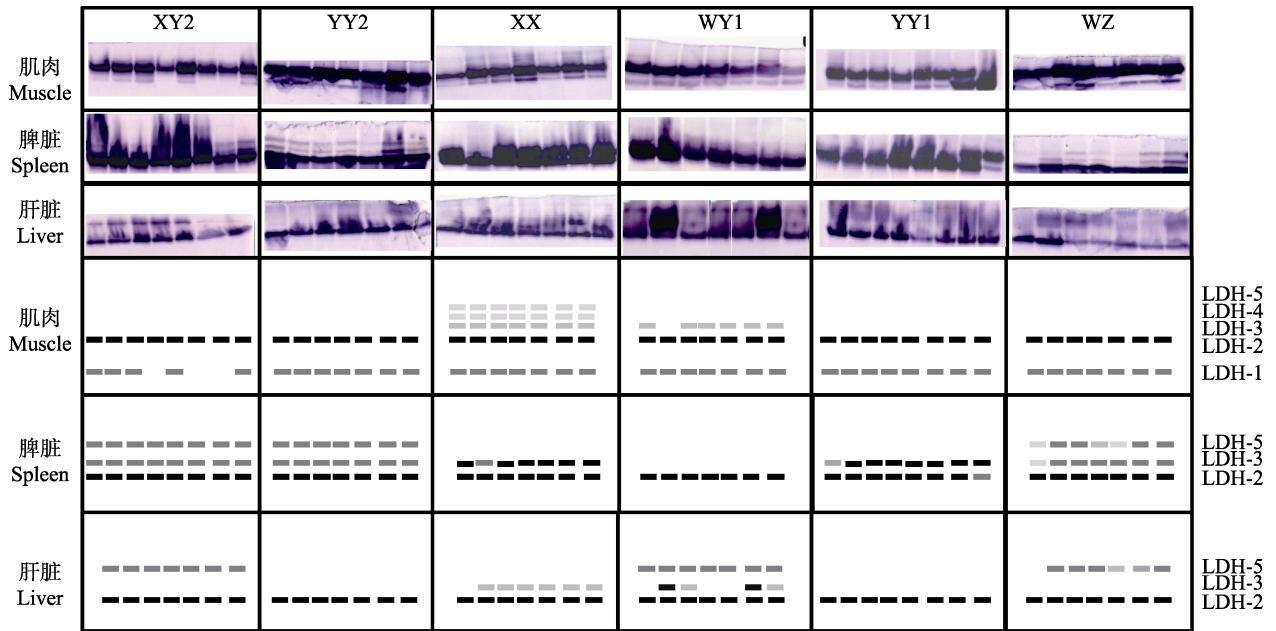


图 3 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的不同组织中乳酸脱氢酶的电泳图谱和模式图

Fig.3 Electrophoretogram and the model of LDH in different tissues of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations

表 2 基于酯酶和乳酸脱氢酶的遗传结构分析

Tab.2 Genetic structure analysis based on EST and LDH

群体 Populations	位点 Locus (N)	平均有效 等位基因 Average effective allele ( $A_e$ )	多态性位点 比例(%) Proportion of polymorphic loci ( $P$ )	平均期望杂合度 Average expected heterozygosities ( $H_e$ )	平均观测杂合度 Average observed heterozygosities ( $H_o$ )	遗传偏离指数 Genetic deviation index ( $D$ )
XY2	9	1.22	22.22	0.0827	0.0978	0.1826
YY2	9	1.33	33.33	0.1299	0.1733	0.3341
XX	7	1.71	71.43	0.3221	0.6143	0.9072
WY1	8	1.38	37.50	0.1487	0.1138	-0.2347
YY1	6	1.33	33.33	0.1296	0.2217	0.7106
WZ	8	1.13	12.50	0.0347	0.0417	0.1998
均值 Mean	7.83	1.35	35.05	0.1413	0.2104	0.3499

### 2.3 mtDNA D-loop 区序列变异和单倍型分析

通过 PCR 产物双向测序、拼接、比对和人工校正, 获得罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体共 7 个群体的线粒体 DNA 控制区序列 880 bp。7 个罗非鱼群体 mtDNA D-loop 区的碱基组成之间无显著差异, C、T、A 和 G 的平均含量分别为 22.28%、31.86%、31.54% 和 14.33%, A+T 含量(63.39%)明显高于 G+C 含量(36.61%)。在 880 个位点中包括保守位点 737 个, 增添/缺失位点 16 个, 变异位点 127 个(3 个单碱基变异位点和 124 个简约信息位点), 变异位点在序列中的分布情况见表 3。

在 7 个罗非鱼群体共 140 条序列中共发现 20 种单倍型(表 3), 其在不同群体中的分布情况见表 4。

20 种单倍型中共享单倍型有 8 种(40%), 12 种为群体特异性单倍型(60%)。Hap-2 和 Hap-19 单倍型的共享率最高, 为 4 个罗非鱼群体共享。YY1 群体只有 1 种单倍型, 其他群体的单倍型数为 5~6 种。WY1、XX、XY2、XY、YY1、WZ 和 YY2 群体的优势单倍型分别是 Hap-2/Hap-19、Hap-7、Hap-2、Hap2/Hap7、Hap5、Hap-10 和 Hap-10。

### 2.4 群体遗传多样性和遗传分化

通过 DnaSP 5.0 软件对 7 个罗非鱼群体的遗传多样性参数进行分析。结果显示, WY1、XX、XY2 和 XY 4 个群体的单倍型多样性( $H_d$ )、多态性位点数( $S$ )、平均核苷酸差异数( $K$ )、核苷酸多样性指数( $P_i$ )都明显高于 YY1、YY2 和 WZ 3 个群体的相应值, 其中,



表 4 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的单倍型及其分布  
Tab.4 The haplotypes and their distribution in the tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations

单倍型 Haplotype	WY1	XX	XY2	XY	YY1	WZ	YY2	总计 Total	单倍型 Haplotype	WY1	XX	XY2	XY	YY1	WZ	YY2	总计 Total
Hap-1	1							1	Hap-11							1	1
Hap-2	7	7	10	5				29	Hap-12						3		3
Hap-3		1	2					3	Hap-13							1	1
Hap-4		1		4				5	Hap-14						1	1	2
Hap-5							20	20	Hap-15							1	1
Hap-6				3				3	Hap-16						1		1
Hap-7		10		5				15	Hap-17	1							1
Hap-8				1				1	Hap-18	3		5					8
Hap-9							1	1	Hap-19	7	1	2	2				12
Hap-10	1					14	16	31	Hap-20			1					1

YY1 群体的遗传多样性最低(表 5)。通过用 MEGA 5.0 软件中的 Kimura 2-Parameter 模型计算群体内和群体间遗传距离。结果显示, WY1 群体内的遗传距离最大(0.0564), YY1 群体内的遗传距离最小(0); WZ 群体与 YY2 群体之间的遗传距离最小(0.0008), XX 群体与 WZ、YY2 群体之间的遗传距离最大(0.1043)。XY2 群体与奥利亚罗非鱼群体(WZ)之间的遗传距离(0.0695)大于其与尼罗罗非鱼群体(XX、XY)之间的遗传距离(0.0639)(表 6)。通过 Arlequin 3.5 软件计算群体间遗传分化指数( $F_{ST}$ )和基因流( $N_m$ )。结果显示, 除

了 XY2 与 WY1 群体之间、XX 与 XY 群体之间及 WZ 与 YY2 群体之间的遗传分化不显著( $F_{ST}<0.05$ ,  $P>0.05$ )之外, 其他群体之间均存在极显著的遗传分化( $F_{ST}>0.05$ ,  $P<0.01$ ); WY1 与 XY2 群体之间、XY2 与 XX 群体之间、XY 与 WY1 群体之间、XY 与 XX 群体之间以及 XY 与 XY2 之间的基因流  $N_m>1$ , 而其他群体之间的基因流  $N_m<1$  (表 7)。

### 2.5 群体遗传进化关系

根据群体之间的遗传距离, 采用 MEGA 5.0 软件

表 5 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性参数  
Tab.5 Genetic diversity paramaters of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations

群体 Populations	样本数 Sample size	单倍型数 Number of haplotypes ( <i>h</i> )	单倍型多样性 Haplotype diversity ( $H_d$ )	多态性位点 Number of polymorphic sites ( <i>S</i> )	平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences ( <i>K</i> )	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity ( $P_i$ )
WY1	20	6	0.7632	93	44.8737	0.0519
XX	20	5	0.6526	115	38.0105	0.0440
XY2	20	5	0.7000	89	44.2947	0.0513
XY	20	6	0.8421	114	40.2105	0.0465
YY1	20	1	0	0	0	0
WZ	20	5	0.5053	6	0.7684	0.0009
YY2	20	5	0.3684	4	0.6579	0.0008

表 6 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体间(左下)和群体内遗传距离(对角线)

Tab.6 Genetic distance among (left lower) and within (diagonal line) tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations

群体 Populations	WY1	XX	XY2	XY	YY1	WZ	YY2
WY1	0.0564						
XX	0.0807	0.0471					
XY2	0.0572	0.0677	0.0558				
XY	0.0722	0.0458	0.0601	0.0499			
YY1	0.0684	0.0433	0.0485	0.0379	0		
WZ	0.0518	0.1043	0.0695	0.0955	0.1042	0	
YY2	0.0519	0.1043	0.0696	0.0955	0.1042	0.0008	0

表 7 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体遗传分化指数  $F_{ST}$ (右上)和基因流  $N_m$ (左下)

群体 Populations	WY1	XX	XY2	XY	YY1	WZ	YY2
WY1		0.3476**	0.0239	0.2673**	0.5898**	0.4490**	0.4512**
XX	0.9385		0.2426**	0.0024	0.4978**	0.7618**	0.7623**
XY2	20.4556	1.5609		0.1255**	0.4269**	0.5942**	0.5953**
XY	1.3706	205.2613	3.4857		0.3454**	0.7356**	0.7363**
YY1	0.3478	0.5044	0.6711	0.9477		0.9957**	0.9963**
WZ	0.6136	0.1564	0.3414	0.1797	0.0021		-0.0115
YY2	0.6082	0.1559	0.3399	0.1791	0.0018	-43.9405	

\*\* 表示差异极显著,  $P < 0.01$

\*\* represented highly significant difference,  $P < 0.01$

中的邻接法构建群体间的分子系统进化树。结果显示, 7 个罗非鱼群体可以聚为两大支, XX、XY、YY1 和 XY2 群体聚为一支, WY1、WZ 和 YY2 群体聚为另一支, XY2 群体与尼罗罗非鱼的亲缘关系比其与奥利亚罗非鱼的亲缘关系近(图 4)。

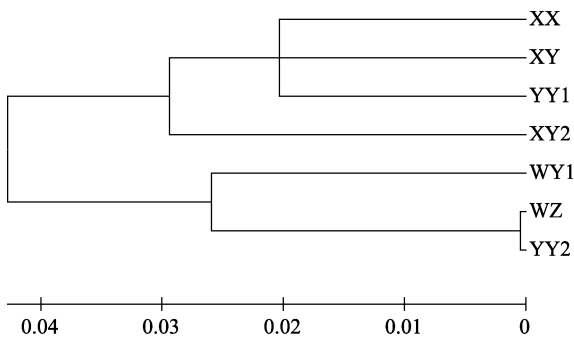


图 4 基于 mtDNA D-loop 区序列构建的罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的 NJ 系统进化树

Fig.4 Neighbor-joining phylogenetic tree of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations constructed based on the sequences of mtDNA D-loop region

### 3 讨论

#### 3.1 同工酶酶谱的群体和组织特异性

EST 是一种水解酶类, 除维持正常的能量代谢外, 还可以催化酯类化合物水解为相应的醇和酸(韩庆等, 2015)。本研究表明, 在罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体共 6 个群体的肌肉和脾脏中 EST 表达量极低, 而肝脏中的 EST 表达量较高, 具有明显的组织特异性, 与李思发等(1995)的研究结果类似, 这可能与鱼类肝脏中脂类代谢旺盛, 具有降解代谢废物和毒素的解毒功能有关(韩庆等, 2015)。大多数鱼类的 EST 为单体, 通常由 2 个以上的等位基因控制, 多态性现象普遍, 酶谱复杂(熊全沫, 1992)。杨淞等

(2006)在荷那龙罗非鱼(*O. hornorum*)和莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)中共检测到 13 条 EST 酶带。本研究在 6 个罗非鱼群体肝脏中共检测到 10 条 EST 酶带, YY2 群体中酶带最多(8 条), YY1 和 WZ 群体中酶带最少(5 条), 且存在个体差异性, 这说明不同罗非鱼种类或群体的 EST 表达具有特异性。罗非鱼“粤闽 1 号”的 EST 的酶谱与其父母本群体相比, 表现出杂合现象, 该现象也同样出现在奥尼杂交罗非鱼群体中, 这说明 EST-8 为尼罗罗非鱼特有谱带, EST-6 为奥利亚罗非鱼特有谱带, 由不同的等位基因控制, 杂交子代中可同时获得这 2 个谱带。LDH 是一种四聚体糖酵解酶, 主要参与乳酸的产生和利用, 它可在无氧条件下将丙酮酸还原为乳酸, 产能以维持机体的能量需求(杨玲等, 2014)。罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的 LDH 酶谱具有组织和群体特异性, 在肌肉中检测到 5 条酶带, 而在脾和肝脏中都只检测到 3 条酶带, 这可能与肌肉中无氧代谢较旺盛有关。

#### 3.2 群体遗传多样性

多态性位点比例( $P$ )和平均杂合度( $H$ )是评估鱼类群体遗传变异及多态性的重要指标。研究表明, 淡水鱼类的多态性位点比例为 0.118~0.333, 平均杂合度为 0.080~0.100, 均值为 0.043; 海水鱼类的平均杂合度为 0.029~0.088, 均值为 0.063 (Gyllensten, 1985; 徐成等, 2001)。本研究对 6 个罗非鱼群体不同组织中 EST 和 LDH 电泳酶谱进行遗传结构分析, 结果显示, 多态性位点比例( $P$ )为 12.50%~71.43%, 平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.0417~0.6143, 这说明 6 个罗非鱼群体多样性处于较高水平, 遗传多样性较丰富。Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $D$ )用于检验群体的遗传平衡状况,  $D$  值越趋于 0, 该群体的基因分布就越接近平衡状态,  $D > 0$  表明杂合子过剩,  $D < 0$  表明杂合子缺失(杨元昊等, 2015)。本研究表明, 6 个罗非鱼群体的

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $D$ )为 $-0.2347\sim 0.9072$ , 其中, WY1 群体最小( $-0.2347$ ), XX 群体最大( $0.9072$ ), 说明 WY1 群体存在杂合子缺失现象, 遗传变异较小, 而其他群体表现为不同程度的杂合子过剩现象, 其中 XX 群体遗传变异最大, 遗传多样性最高。

由于同工酶只能检测基因表达产物, 易受外界环境和表达调控的影响, 反映的遗传变异和亲缘关系不够全面。因此, 本研究进一步利用 mtDNA D-loop 区部分序列对罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性进行研究。研究表明, 罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体共 7 个群体的 mtDNA D-loop 区序列的碱基组成差异较小, 均呈现出 A+T 碱基偏向性(63.39%), 这与脊椎动物线粒体 DNA 序列的特点相一致(Broughton *et al.*, 2001)。在 7 个罗非鱼群体中共发现 20 种单倍型, 多数群体的单倍型数为 5~6 种, YY1 群体只有 1 种单倍型, 其单倍型多样性( $H_d$ )为 0, 说明 YY1 群体的遗传多样性较低, 这与 YY1 群体来自尼罗罗非鱼雄鱼与尼罗罗非鱼伪雌鱼交配获得, 近亲繁殖严重, 子代趋于纯合有关。核苷酸多样性( $P_i$ )是分子遗传学中评价遗传多样性的重要指标, 杨洁等(2014)对 8 个养殖尼罗罗非鱼群体的研究结果显示, 其  $P_i$  值为  $0.0008\sim 0.0569$ ; 本研究中的 7 个罗非鱼群体的  $P_i$  值为  $0\sim 0.0519$ , 与其结果相近, WY1、XX、XY2 和 XY 群体的  $P_i$  值( $0.0440\sim 0.0519$ )明显高于 YY1、YY2 和 WZ 群体的  $P_i$  值( $0\sim 0.0009$ ), 说明 WY1、XX、XY2 和 XY 群体的遗传多样性较高, 而 YY1、YY2 和 WZ 群体的遗传多样性较低。虽然 YY1、YY2 和 WZ 群体的高度纯合现象有利于其优良性状的稳定遗传, 但作为罗非鱼“粤闽 1 号”的繁育群体, 高度纯合不利于这些纯种的保存和复壮。因此, 应该扩大选育群体数量, 避免过度近亲繁殖和遗传漂变导致群体遗传多样性的下降和优良性状的衰退(吴长敬等, 2010)。

### 3.3 群体间的遗传差异与亲缘关系

同工酶谱差异是由同工酶基因变异导致同工酶结构差异所引起。一般认为, 酶带相似则同工酶的氨基酸组成也相似, 因而可能具有较近的亲缘关系; 若酶谱差异较大, 则表明在生化水平上存在一定分化(Janko *et al.*, 2007; 魏玉众等, 2017)。XY2、YY2 和 WZ 群体脾脏中的 LDH 酶谱一致, XX 和 YY1 群体脾脏中的 LDH 酶谱一致, 说明这些酶谱相似的群体之间的亲缘关系较近。

遗传分化指数( $F_{ST}$ )是评价群体间遗传分化程度的重要指标,  $F_{ST}<0.05$  时, 表明群体间无遗传分化

(Wright, 1978)。本研究表明, 7 个罗非鱼群体之间的  $F_{ST}$  为 $-0.0115\sim 0.9963$ , 除了 XY2 与 WY1 群体之间、XX 与 XY 群体之间以及 WZ 和 YY2 群体之间的遗传分化不显著( $P>0.05$ )之外, 其他群体之间均存在极显著的遗传分化( $P<0.01$ ), 这表明罗非鱼“粤闽 1 号”与尼罗罗非鱼群体和奥利亚罗非鱼群体均存在显著遗传分化, 而与奥尼杂交罗非鱼 WY1 群体遗传分化不明显。XY2 群体与尼罗罗非鱼群体(XX 和 XY 群体)之间的基因流  $N_m>1$ , 说明它们之间的遗传分化主要由基因流引起, 而 XY2 群体与奥利亚罗非鱼群体(WZ 群体)之间的基因流  $N_m<1$ , 其遗传分化主要由遗传漂变导致(Slatkin, 1987)。

群体间遗传距离直接反映了各群体之间的亲缘关系, 本研究表明, XY2 群体与其父母本(YY2 群体 ♂ 和 XX 群体 ♀)的遗传距离分别为 0.0696 和 0.0677, 其与母本的亲缘关系较近, 这与 mtDNA 为母系遗传有关。XY2 的父本(YY2 群体)与奥利亚罗非鱼群体(WZ 群体)的亲缘关系明显近于尼罗罗非鱼群体(XX 群体和 XY 群体), 这有利于 XY2 群体最大限度地获得奥利亚罗非鱼的优良性状。本研究还显示, XY2 群体与尼罗罗非鱼群体(XX 群体和 XY 群体)的平均遗传距离为 0.0639, 与奥利亚罗非鱼群体(WZ 群体)之间的遗传距离为 0.0695, 在构建的分子系统进化树中, XY2 群体也与尼罗罗非鱼群体(XX 和 XY 群体)聚为一大支, 表明 XY2 群体与尼罗罗非鱼的亲缘关系较近, 而与奥利亚罗非鱼的亲缘关系较远。

## 参 考 文 献

- Broughton RE, Milam JE, Roe BA, *et al.* The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research*, 2001, 11(11): 1958–1967
- Ding JQ, Liu P, Li J, *et al.* Genetic variation analysis of four geographic populations of *Charybdis japonica* by isozyme. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 82–89 [丁金强, 刘萍, 李健, 等. 日本鳊 4 个地理群体遗传变异的同工酶分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 82–89]
- Gyllensten U. The genetic structure of fish: Differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *Journal of Fish Biology*, 1985, 26(6): 691–699
- Han Q, Zhao DH. Comparative study on three isozymes in different tissues of catfish (*Silurus asotus*) with different color in Dongting Lake. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015(2): 104–107, 113 [韩庆, 赵东海. 洞庭湖不同体色鲶不同组织同工酶的比较研究. *广东农业科学*, 2015(2): 104–107, 113]



- Hu YT, Hu W, Jiang H, *et al.* Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 63–70 [胡玉婷, 胡王, 江河, 等. 滁州鲫(*Carassius auratus*)线粒体全基因组序列分析及系统进化. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 63–70]
- Janko K, Flajšhans H, Choleva L, *et al.* Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): An update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination. *Journal of Fish Biology*, 2007, 71(Suppl C): 387–408
- Li SF, Cai WQ. Introgression in hatchery stocks of *Tilapia nilotica* and *Tilapia aurea* in China. *Journal of Fisheries of China*, 1995, 19(2): 105–111 [李思发, 蔡完其. 我国尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼养殖群体的遗传渐渗. *水产学报*, 1995, 19(2): 105–111]
- Li SF. Genetical characterization of major freshwater culture fishes in China. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1998, 189–193 [李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究. 上海: 上海科技出版社, 1998, 189–193]
- Liu H, Zhang HQ, Cai SL, *et al.* Analysis of the genetic diversity of six populations of cultured *Litopenaeus vannamei* based on the mitochondrial DNA control region. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 63–73 [刘红, 张海强, 蔡生力, 等. 基于线粒体 DNA 控制区序列的 6 个凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖群体的遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 63–73]
- Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 1987, 236(4803): 787–792
- Teletchea F. Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2009, 19(3): 265–293
- Wei YZ, Zhang GR, Huo B, *et al.* A comparative study on lactate dehydrogenase isozymes in six species of *Schizothoracinae*. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(5): 3–8 [魏玉众, 张桂蓉, 霍斌, 等. 雅鲁藏布江中游 6 种裂腹鱼乳酸脱氢酶同工酶的比较研究. *淡水渔业*, 2017, 47(5): 3–8]
- Wright S. *Evolution and the genetics of populations: Variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978, 580
- Wu CJ, Zou ZY, Yang H, *et al.* Structure of the mitochondrial DNA D-Loop region and analysis of genetic diversity in different strains of tilapia (*Oreochromis*). *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(5): 121–128 [吴长敬, 邹芝英, 杨弘, 等. 罗非鱼 mtDNA D-loop 区部分序列结构和种群遗传多样性分析. *动物学杂志*, 2010, 45(5): 121–128]
- Wu YY, Li LH, Han JL. Studies on four isozyme from several tissues of Jifu tilapia. *Biotechnology Bulletin*, 2008(Suppl), 319–323 [吴燕燕, 李来好, 韩君莉. 吉富罗非鱼不同组织中 4 种同工酶研究. *生物技术通报*, 2008(增刊): 319–323]
- Xie XY, Li SF. Comparison of base sequence diversity of Cytb and D-loop gene of Nile tilapia. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(5): 982–985 [颀晓勇, 李思发. 罗非鱼选育群体 Cytb 与 D-loop 序列变异信息对比分析. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(5): 982–985]
- Xiong QM. *Isozymes analysis of fishes (Vol. 1)*. Hereditas (Beijing), 1992, 14(2): 41–44, 48 [熊全沫. 鱼类同工酶谱分析(上). *遗传*, 1992, 14(2): 41–44, 48]
- Xu C, Wang KL, You F, *et al.* Biochemical genetics of *Lateolabrax japonicus* population I biochemical genetic analysis of isozymes. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(1): 42–49 [徐成, 王可玲, 尤锋, 等. 鲈鱼群体生化遗传学研究 I 同工酶的生化遗传分析. *海洋与湖沼*, 2001, 32(1): 42–49]
- Yang J, He AY, He XJ, *et al.* Genetic diversity and relationships of mitochondrial DNA control region from the eight domesticated populations of Nile tilapia. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 693–699 [杨洁, 何安元, 何学军, 等. 尼罗罗非鱼 8 个养殖群体线粒体控制区遗传多样性和遗传关系分析. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 693–699]
- Yang L, Lu H, Liu YQ, *et al.* Study on the tissue specificity of 8 isozymes in *Cyprinus carpio* from Dongping Lake. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(14): 26–32 [杨玲, 卢红, 刘羽清, 等. 东平湖鲤 8 种同工酶的组织特性研究. *中国农学通报*, 2014, 30(14): 26–32]
- Yang S, Huang ZH, Ye X, *et al.* Preliminary study on three isozymes of *Oreochromis hornorum* and *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(2): 122–126 [杨淞, 黄樟翰, 叶星, 等. 荷那龙罗非鱼和莫桑比克罗非鱼 3 种同工酶的分析. *大连水产学院学报*, 2006, 21(2): 122–126]
- Yang YH, Zhou JS, Li L, *et al.* Preliminary analysis on isozymes in different tissues and population genetic structure of *Silurus lanzhouensis*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 25–29 [杨元昊, 周继术, 李蕾, 等. 兰州鲌不同组织同工酶及群体遗传结构初步分析. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 25–29]
- Zhang JD, He GQ, Chen G, *et al.* The tissue-specificities of isozymes and the genetic structure in three species of *Theraponidae*. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2015, 38(5): 27–34 [张健东, 何国清, 陈刚, 等. 三种鲮科鱼类同工酶组织特异性及群体遗传结构分析. *湖南师范大学自然科学学报*, 2015, 38(5): 27–34]
- Zhu LF. Gradient gel electrophoresis on polyacrylamide of isozymes and proteins of fishes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 183–185 [朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法. *水生生物学报*, 1992, 16(2): 183–185]

## Genetic Diversity and Genetic Relationship Analysis of Tilapia “Yuemin No.1” and Its Breeding Populations

LIU Zhigang, LU Maixin<sup>①</sup>, CAO Jianmeng, GAO Fengying

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510380)

**Abstract** “Yuemin No.1” is a novel holandric species of tilapia, which was bred with *Oreochromis niloticus* and *O. aureus*. In order to reveal the genetic characteristics of tilapia “Yuemin No.1,” the genetic diversity, genetic structure, and genetic relationships among groups of tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations were studied by isozyme electrophoresis and sequence analysis of the D-loop region of mtDNA. The results of isozyme electrophoresis showed that the zymogram of esterase (EST) and lactate dehydrogenase (LDH) were population- and tissue-specific in tilapia. The expression level of EST in the muscle and spleen was extremely low, whereas that in the liver was high. LDH was highly expressed in all the tissues, as revealed by the different zymograms. Ten bands of EST and five of LDH were detected in tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations. The proportion of polymorphic loci ( $P$ ) ranged from 12.50% to 71.43%, the average observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from 0.0417 to 0.6143, and the Hardy-Weinberg genetic deviation index ( $D$ ) ranged from  $-0.2347$  to  $0.9072$ . The result of sequence analysis of the D-loop region of mtDNA revealed that no significant difference occurred in base composition, and that A+T content (63.39%) bias was widespread in all the populations. There were 20 haplotypes in tilapia “Yuemin No.1” and its breeding populations. The nucleotide diversity index ( $P_i$ ) ranged from 0 to 0.0519. The  $P_i$  value of WY1, XX, XY2, and XY populations (0.0440~0.0519) were significantly higher than that of YY1, YY2, and WZ populations (0~0.0009). The genetic differentiation index ( $F_{ST}$ ) among populations ranged from  $-0.0115$  to  $0.9963$ . There was no significant genetic differentiation ( $F_{ST}<0.05$ ,  $P>0.01$ ) between the XY2 and WY1, XX and XY, and WZ and YY2 populations. The average genetic distance between XY2 population and *O. niloticus* (XX and XY populations) was 0.0639, whereas that between the XY2 population and *O. aureus* (WZ population) was 0.0695. Cluster analysis revealed two clusters; one cluster included XY, XX, YY1, and XY2 populations, and the other cluster included WY1, WZ, and YY2 populations. This study revealed the biochemical and molecular genetic features of tilapia “Yuemin No.1,” and provide research data for germplasm identification, establishment of breeding populations, and maintenance of stable inheritance of desirable traits.

**Key words** Tilapia “Yuemin No.1”; Isozyme; Mitochondrial DNA control region; Genetic diversity; Genetic relationship

① Corresponding author: LU Maixin, E-mail: mx-lu@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171205002

http://www.yykxjz.cn/

杨昆明, 郭爱民, 马江霞, 段成任, 谢志胜, 岳城. 河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 42-51

Yang KM, Guo AM, Ma JX, Duan CR, Xie ZS, Yue C. Isolation, identification, and antibiotic sensitivity of bacillary enteritis in *Perca fluviatilis* Linnaeus. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 42-51

## 河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验\*

杨昆明 郭爱民 马江霞 段成任 谢志胜 岳城<sup>①</sup>

(新疆农业大学动物医学学院 乌鲁木齐 830052)



**摘要** 河鲈(*Perca fluviatilis* Linnaeus)是新疆额尔齐斯河特有的土著鱼类,已开展人工养殖,但其病害相关研究较少。2016年,五家渠某水产推广站河鲈突然大批死亡,作者从发病的河鲈肝脏和肠道分离病原菌,对分离菌进行了传代纯化培养。结果显示,在20℃培养24 h后,ZL1能形成边缘整齐、中间微隆起、表面光滑、浅黄色、有特殊芳香气味、大小为1.5~2 mm的菌落,在血琼脂平板上能形成明显的β-溶血圈;ZL3和ZL5可形成圆形、微隆起、表面湿润光滑、灰白色、半透明、菌落大小为0.5~1 mm的菌落,但在血琼脂平板上不能形成溶血圈。经革兰氏染色、生理生化、16S rRNA序列比对和基因序列进化树分析,鉴定ZL1株为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*),ZL3和ZL5株为迟缓爱德华菌(*Edwardisella tarda*)。药敏实验结果显示,ZL1株对庆大霉素、米诺环素、头孢他啶等药物高度敏感,对链霉素、青霉素、克拉霉素等耐药;ZL3和ZL5株对左氧氟沙星、链霉素和恩诺沙星敏感,对庆大霉素、氨苄西林、青霉素、复方新诺明等药物耐药。人工感染结果显示,分离菌均具有明显致病性。

**关键词** 河鲈;温和气单胞菌;迟缓爱德华菌;鉴定;药敏实验

**中图分类号** S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0042-10

河鲈(*Perca fluviatilis* Linnaeus),地方名为五道黑,属于鲈形目(Perciformes)、鲈科(Percidae)、鲈属(*Perca*),是肉食性凶猛鱼类,广泛分布于欧洲、亚洲北部和美洲北部,在我国仅产于新疆的额尔齐斯河和乌伦古湖水域(唐富江等,2009),是新疆额尔齐斯河重要的土著经济鱼类之一(任慕莲等,2002),有生长速度快、抗病能力强等特点,其肉质鲜美,市场需求十分紧俏(唐富江等,2008)。近年来,由于过度捕捞和环境因素的影响,河鲈野生资源量大幅下降,目前

已开展人工养殖。2016年5月,新疆五家渠某池塘人工养殖河鲈出现食饵量下降、精神萎靡、对外界刺激反应不灵敏、时而侧游的现象,病鱼有肛门红肿、腹部膨大、体表鳞片脱落、烂尾烂鳃等症状,发病水温高(25℃),每个池子死亡数达250~350尾/d,造成巨大的经济损失。通过临床剖检、寄生虫学、细菌学、病理学等方法进行了诊断,在体表发现有锚头鳋(*Lernaea*),但寄生数量不多,不是造成河鲈死亡的首要因素,在排除了寄生虫感染和病毒感染造成死亡的

\* 国家自然科学基金项目(31360644)、国家科技支撑计划项目(2012BAD25B10-03)、新疆维吾尔自治区推广项目(2016C03013)和新疆农业大学研究生科研创新项目(XJAUGRI2016006)共同资助[This work was supported by National Natural Sciences Foundation of China (31360644), National Science-Technology Support Plan Projects (2012BAD25B10-03), Xinjiang Uygur Autonomous Region Scientific and Technological Projects (2016C03013), Xinjiang Agricultural University Graduate Student Scientific Research Innovation Projects (XJAUGRI2016006)]. 杨昆明, E-mail: ykunming@aliyun.com

<sup>①</sup> 通讯作者:岳城,教授, E-mail: yuechengxnd@aliyun.com

收稿日期:2017-12-05,收修改稿日期:2017-12-22

情况下, 怀疑是细菌感染所致。剖检病鱼内脏, 进行细菌分离纯化, 通过革兰氏染色、生理生化实验、药物敏感性实验、分子生物学实验对分离菌进行了初步鉴定, 在此基础上通过测序对细菌 16S rRNA 基因序列进行分析, 并构建进化树, 以探讨分离菌在所属菌群中的分类位置。本研究旨在丰富河鲈细菌病病原研究资料, 并为河鲈细菌病的防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

来自新疆五家渠某养殖场的患病河鲈 16 尾, 病鱼有鳞片脱落、腹部膨胀、肛门红肿外突的症状。体长约为 15~28 cm, 体重约为 170~300 g, 用于临床剖检、病料采集和病原菌分离。剖检时, 已有部分鱼翻肚、死亡。实验用河鲈为该场未发病同批次鱼池, 体长约为 12~22 cm, 体重约为 145~250 g, 在实验室暂养 3 周, 确定健康无病后, 用于回归感染实验。

LB 肉汤、LB 琼脂、M-H 培养基购自青岛日本水生物技术有限公司; 细菌微量生化实验管、革兰氏染液、药敏纸片购自杭州天河微生物试剂有限公司; 细菌 16S rRNA 通用引物、序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; 胶回收试剂盒购自 OMEGA 生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒购自全式金生物科技有限公司。

### 1.2 剖检观察

肉眼检查病鱼体表有无甲壳类寄生虫, 同时, 分别刮取鳃丝粘液和体表粘液, 在体视显微镜下观察粘液中是否有寄生虫(赵江山等, 2011)。依次检查鱼头、腹、鳍、肛门有无病变; 剖开腹部, 检查有无腹腔液, 肝脏、胆囊、脾脏和肾脏等器官质地、形态, 有无出血, 肠壁弹性及肠道内容物。

### 1.3 细菌分离培养

无菌条件下, 采集病鱼腹腔液、肝脏、脾脏、肠和肾脏。腹腔液用接菌环蘸取, 在 LB 琼脂培养基上划线; 内脏用灭菌手术剪剪开, 用横断面在 LB 琼脂培养基上涂抹, 再持接菌环在涂抹处划线, 20℃倒置培养 16~24 h。挑取形态一致的单个优势菌落, 进行分离传代纯化培养。

### 1.4 细菌鉴定

挑取琼脂平板上单菌落, 经稀释、涂片、固定和染色后, 显微镜油镜下观察菌体形态和颜色, 镜下观察菌体单一后, 挑取单个菌落接种于 Mueccler-

Hinton(M-H)液体培养基, 置于 20℃恒温摇床, 培养 24 h, 用培养的菌液进行 V-P、H<sub>2</sub>S 等生理生化实验, 实验结果参照房海等(2014)进行分析。

分离纯化的细菌接种于 LB 液体培养基中, 于 20℃恒温摇床培养 24 h 后, 用 30%甘油与菌液 6:4 加到 EP 管中混匀封口, 作为菌种保存。以菌液为底物, 进行菌液 PCR。选用细菌通用引物扩增 16S rRNA(正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGC-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 反应体系(25 μl): Super mix 12.5 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, 底物 2 μl, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μl。PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 40 s, 54℃退火 60 s, 72℃延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃再延伸 10 min。

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 连接转化并提取质粒, 质粒送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 上 Blast 比对, 用 MEGA6.0 软件对序列进行多重比较, 并构建系统发育树。

### 1.5 致病菌药敏实验

吸取 100 μl M-H 液体培养基培养的菌液, 均匀涂布于 M-H 琼脂培养基表面, 用烧灼后的无菌镊子夹取药敏片, 以适当间隔粘贴于琼脂培养基表面, 并轻压药敏片, 使之与培养基充分接触。正置 0.5 h, 然后, 倒置于 20℃恒温培养箱, 培养 16~24 h 后, 观察并测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈的大小来判断该菌对相应药物的敏感程度(尚红等, 2015)。

### 1.6 病理组织切片

将健康鱼和患病鱼的肝脏和肠体完整切下并保存在 4%甲醛中, 按照病理组织切片法(李钰等, 2014), 采用 LEICA RM2235 手摇连续切片机进行石蜡组织切片, 并对切片进行染色, 镜下对比病变内脏切片与健康内脏切片间组织的变化。

### 1.7 回感实验

实验设 3 个浓度组, 每个浓度组 2 个梯度浓度, 高浓度组:  $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$  CFU/ml; 中浓度组:  $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$  CFU/ml; 低浓度组:  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$  CFU/ml。测定 3 个目标菌液在 OD<sub>600 nm</sub> 下的吸光值, 用无菌生理盐水调至相同后, 再稀释成相应浓度的细菌悬浊液。每尾腹部肌肉注射 0.1 ml, 对照组注射等量的无菌生理盐水, 每组注射 10 尾, 保持水温为 20℃, 不间断供氧, 连续观察 7 d, 每天定时投喂, 观察并记

记录实验鱼的症状及每天死亡数目,死鱼及时捞出并剖检,检查其体表及内脏器官的病变情况并做记录,同时,进行细菌分离。参考累积法(Reed-Muench)计算半数致死量(LD<sub>50</sub>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 体表检查及病理剖检结果

在鱼背鳍基部和腹部发现锚头蚤,剥落之后,鳞片基部有出血,鱼腹部膨胀,肛门红肿外突,严重者轻压腹部可见淡黄色液体从肛门流出。剖开腹部,有腹水;肝脏肿大,出血不明显;肠壁淤血严重,肠道内几乎没有食物,整个肠道有大量胶冻状黄色黏液,肠壁变薄且无弹性。

### 2.2 致病菌形态特征

从患病鱼肝脏、肠道分离得到优势菌,革兰氏染色均为阴性短杆菌,无荚膜,也不形成芽孢,菌体成对或单独存在,有时可见首尾相连,形成有弧度的长链状菌体,但是,调节细准焦螺旋可见是由几个单独的短杆菌形成;在 LB 琼脂培养基上,ZL1 可形成边缘整齐、微隆起、表面光滑、浅黄色、有特殊芳香气味、菌落大小为 1.5~2 mm (20℃, 24 h)的菌落,且在血琼脂平板上能形成明显的 β-溶血圈;ZL3 和 ZL5 可形成圆形、微隆起、表面光滑且湿润、灰白色、半透明、菌落大小为 0.5~1 mm (20℃, 24 h)的菌落,在血琼脂平板上不能形成溶血圈。

### 2.3 生理生化结果

生理生化反应显示,ZL1 株产酸不产气,能利用 V-P、蔗糖、葡萄糖、明胶、枸橼酸(Simmons);在含 5% (W/V) NaCl 的培养基中能生长,高于 6%不生长;不利用果糖、水杨苷、纤维二糖、H<sub>2</sub>S、酒石酸、阿拉伯糖。ZL3、ZL5 株产酸、产气,能利用葡萄糖、硫化氢;在含 4% NaCl 的培养基中能生长,高于 5%不生长;V-P、明胶、枸橼酸反应阴性;不利用蔗糖、果糖、水杨苷、纤维二糖、阿拉伯糖、酒石酸(表 1)。

### 2.4 PCR 鉴定及系统发育树构建

对分离菌 16S rRNA 进行 PCR 扩增,通过 1%琼脂糖凝胶电泳可见,片段长度约为 1600 bp。把测序反馈序列上传 NCBI 进行基因序列比对,结果显示,ZL1 株为温和气单胞菌,ZL3、ZL5 2 株菌为迟缓爱德华氏菌。将 3 株菌序列在 EzBioCloud 上同时进行比对,结果与 NCBI 比对结果相同,其中,ZL1 株的相似率为 99.78%,ZL3 的相似率为 99.17%,ZL5 的

表 1 分离菌的生理生化特性  
Tab.1 Physiological-biochemical characteristics of isolated bacteria

测试项目 Test item	菌株 Strain				
	ZL3	ZL5	迟缓爱 德华氏菌 <i>E. tarda</i> *	ZL1	温和气 单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i> *
V-P 反应 V-P reaction	-	-	+	+	+
硫化氢 H <sub>2</sub> S	+	+	-	-	-
明胶 Gelatin liquefaction	-	-	-	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	-	+
西蒙氏枸橼酸钠 Simmons sodium citrate	-	-	-	+	+
酒石酸 Tartaric acid	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-
水杨苷 Salicin	-	-	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-	-	+	+
1% NaCl	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+	+
5% NaCl	-	-	+	+	+
6% NaCl	-	-	-	-	-
4℃	-	-	-	+	+
20℃	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+
37℃	+	+	+	±	+

+ : 阳性; - : 阴性; ± : 生长缓慢。\* : 参考文献(房海等, 2010)

+ : Positive; - : Negative; ± : Slow growth. \* : Reference (Fang, *et al*, 2010)

相似率为 99.31%。初步修饰后将序列上传 NCBI 并获得 3 个序列号(MF767618、MF980985 和 MF992220)。选择 8 个气单胞菌属标准参考株,运用 Mega 6.0 建立系统发育树,以 *Bacterium* 为外类群,所做进化树显示,ZL1 与上海株 *A. sobria* KX692881 聚为 1 支,置信度为 88 (图 1)。

选择 12 个爱德华氏菌属标准参考株,以维氏气

单胞菌(*Aeromonas veronii* KY767542)为外类群,所做进化树显示,ZL3 与四川株 KF872771 聚为 1 支,置

信度为 67; ZL5 与广州株 JX393017 聚为 1 支,置信度为 72 (图 2)。

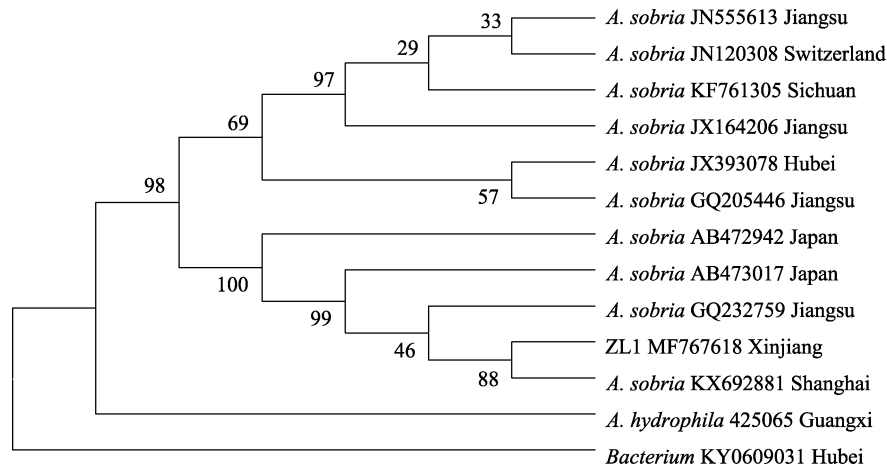


图 1 基于分离菌株 ZL1 16S rRNA 基因与同源性菌株相应基因构建的系统发育树  
Fig.1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene of isolated strain ZL1 and corresponding genes of homologous strains

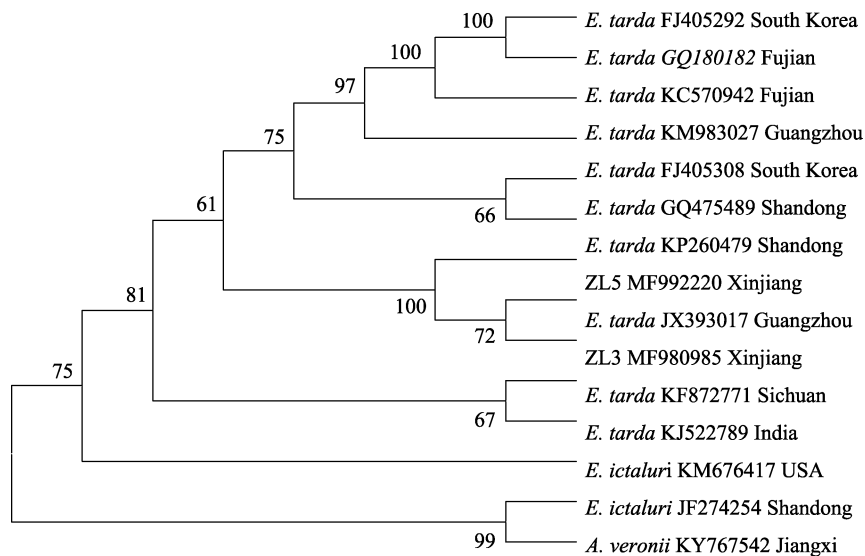


图 2 基于分离菌株 ZL3 和 ZL5 16S rRNA 基因与同源性菌株相应基因构建的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA genes of isolated strain ZL3, ZL5, and corresponding genes of homologous strains

## 2.5 药敏实验结果

用 21 种水产常用药进行药敏实验,药敏实验判定结果参照美国临床实验室标准化委员会 VET01-A4 标准(表 2)。结果显示,ZL1 株对庆大霉素、米诺环素、头孢他啶等药物高度敏感;对链霉素、青霉素、克拉霉素、哌拉西林、卡那霉素等耐药。ZL3 株对恩诺沙星、左氧氟沙星、链霉素敏感;对庆大霉素、青霉素、复方新诺明等药物耐药。ZL5 株对左氧氟沙星、链霉素、恩诺沙星敏感;对庆大霉素、氨苄西林、青

霉素、复方新诺明等药物耐药。

## 2.6 病理组织切片

正常肠道由内向外分为粘膜、粘膜下层、肌层和外层,其中,粘膜和粘膜下层向肠道内突出形成褶皱状的肠绒毛。通过病理组织切片染色,可观察到病鱼肠粘膜变性坏死(图 3A),肠道细胞呈凝固性坏死(图 3B)。正常肝脏细胞呈多边形,边缘整齐,细胞核在中间(图 3D);而病鱼肝脏炎性细胞浸润,脂肪空泡变性(图 3C)。



表2 病原菌的药敏实验结果  
Tab.2 Results of antibiotic sensitivity test of strain pathogenic bacteria

抗生素 Antibiotics	含药量 Content of dispersion ( $\mu\text{g}/\text{pill}$ )	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>		迟缓爱德华菌 <i>E. tarda</i>			
		ZL1 抑菌圈 Inhibition zone of ZL1	判定结果 Result	ZL3 抑菌圈 Inhibition zone of ZL3	判定结果 Result	ZL5 抑菌圈 Inhibition zone of ZL5	判定结果 Result
庆大霉素 Gentamycin	10	22	S	12	R	10	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	30	14	I	23	S	24	S
阿米卡星 Amikacin	30	14	I	12	I	14	I
链霉素 Streptomycin	10	2	R	19	R	18	R
头孢噻肟 Cefotaxime	30	32	S	25	S	23	S
大观霉素 Spectinomycin	5	16	I	10	R	8	R
氨曲南 Aztreonam	30	36	S	34	S	32	S
复方新诺明 Sulfamethoxazole	23.75/1.25	0	R	0	R	0	R
哌拉西林 Piperacillin	100	0	R	0	R	0	R
氨苄西林 Ampicillin	10	4	R	0	R	0	R
克拉霉素 Clarithromycin	2	12	R	14	R	12	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	20	S	12	S	10	R
青霉素 Penicillin G	10	0	R	6	R	6	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	13	I	26	S	18	S
卡那霉素 Kanamycin	30	14	I	16	I	14	I
苯唑西林 Oxacillin	1	0	R	8	R	6	R
四环素 Tetracycline	30	12	R	10	R	12	R
氟苯尼考 Florfenicol	30	16	I	20	S	16	I
米诺环素 Minocycline	30	30	S	18	I	18	I
阿洛西林 Azlocillin	75	20	S	20	S	20	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	32	S	24	R	18	I

注: R: 耐药; I: 中度耐药; S: 敏感

Note: R: Resistant; I: Intermediately resistant; S: Sensitive

## 2.7 致病菌回感实验

为了探究主要致病菌, 进行分组人工回感实验。腹部肌肉注射 ZL1 6 h 后, 可见高浓度组游动缓慢; 12 h 后, 高浓度组开始出现翻肚的现象, 且腹部注射处皮肤红肿; 18 h 后, 开始有死亡现象; 96 h 后, 高浓度 II 组全部死亡; 8 d 内高浓度组全部死亡。

人工腹部肌肉注射 ZL3、ZL5 后, 首日高浓度组可见死亡, ZL5 低浓度组也出现死亡, 怀疑是注射时鱼体的应激所造成。实验鱼注射 12 h 后, 高浓度组出现翻肚侧游现象, 且腹部注射处皮肤红肿; 18 h 后, ZL5 组死亡 4 尾, ZL3 组死亡 2 尾; 96 h 后, ZL5 高浓度 II 组全部死亡; 7 d 内 ZL5 高浓度组全部死亡; 15 d 内 ZL3 高浓度组全部死亡。

将 ZL1、ZL3 和 ZL5 等浓度混匀, 人工腹部肌肉注射 0.1 ml, 正常饲养 3 h 后, 高浓度组和中浓度组出现侧游情况; 6 h 后, 有鱼死亡; 48 h 后, 高浓度

几乎全部死亡; 中浓度 II 组在 5 d 全部死亡。

实验期间, 高浓度组在注射菌液后正常投喂期间, 进食量明显低于低浓度组; 发病时间短于低浓度组; 注菌各组发病症状相似, 从各组死亡与濒临死亡的实验鱼肝脏、肠道等处分离得到与 ZL1、ZL3、ZL5 的形态、生理生化特征相一致的细菌。ZL1、ZL3 和 ZL5 的  $LD_{50}$  依次分别为  $8.91 \times 10^5$ 、 $4.47 \times 10^4$  和  $1.12 \times 10^4$  CFU/ml, 混合组的  $LD_{50}$  为  $0.32 \times 10^4$  CFU/ml。对照组饮食正常, 没有死亡。结果显示, 分离菌都具有致病性, 其中, 迟缓爱德华菌(ZL3 和 ZL5)的致病力更强(表 3)。

## 3 讨论

### 3.1 温和气单胞菌和迟缓爱德华菌对水产业的危害

温和气单胞菌隶属于弧菌科、气单胞菌属, 是水体常见菌, 广泛分布于各类水体中, 是一种条件性致

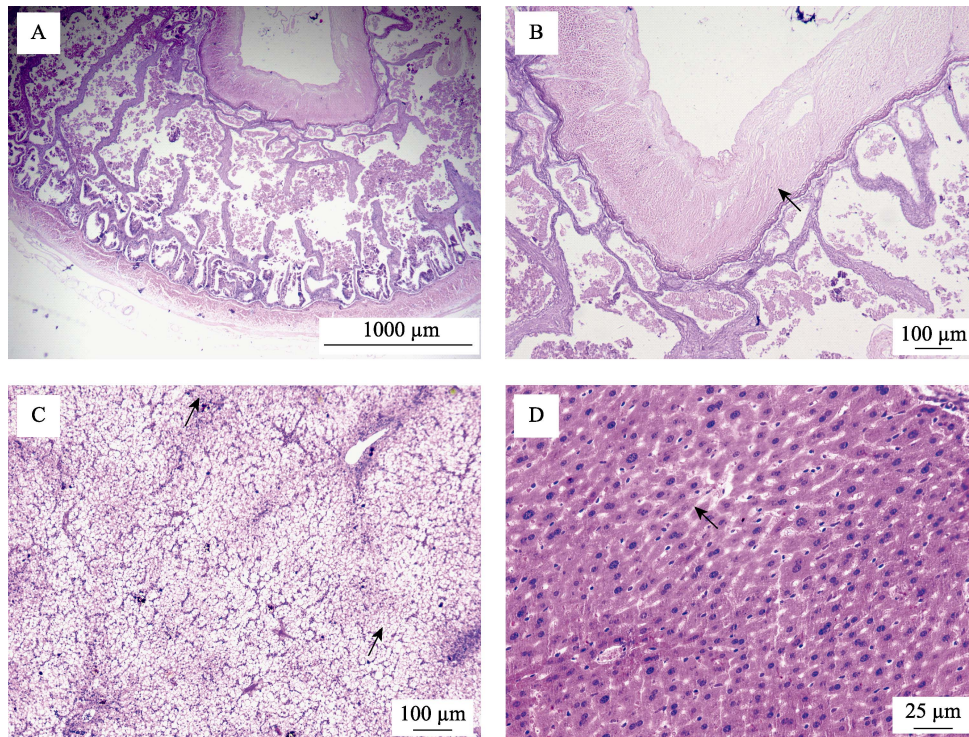


图 3 病理组织切片

Fig.3 Pathological tissue sections

- A: 病变肠道纵切面; B: 肠粘膜变性坏死; C: 肝脏炎性细胞浸润、脂肪空泡变性; D: 正常肝脏  
 A: Infected intestinal longitudinal section; B: Intestinal mucosal degeneration and necrosis;  
 C: Liver inflammatory cells infiltration, hepatic fatty vacuolar degeneration; D: Normal liver

病菌(陈小莉, 2010)。近年, 气单胞菌造成的水生动物细菌性疾病频发, 从患病异育银鲫(刘永涛等, 2017)、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)(赵静等, 2016)、鲟鱼(*Acipenser sinensis*)(肖艳翼等, 2015)、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)(杨移斌等, 2017)、泥鳅(*Oriental weatherfish*)(姚东瑞等, 2010)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(刘敏等, 2005)、黄鳝(*Monopterus albus*)(任红梅等, 2010)、黄沙鳖(*Truogx sinensis*)(农新闻等, 2015)、黄金鲫(*Carassius auratus auratus*)(梁利国等, 2013)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(彭宣宪等, 2001)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)(蔡完其等, 2002)等水生动物体表和肝脏等处分离并鉴定出温和气单胞菌。温和气单胞菌可产生溶血素(hly)(Heuzenroeder *et al*, 1999)、气溶素(aer)(Singh *et al*, 2008)、细胞兴奋性肠毒素(alt)(Granum *et al*, 1998)等毒力因子。

爱德华菌属主要有迟缓爱德华菌和鲇鱼爱德华菌(*E. ictaluri*)。迟缓爱德华菌属于肠杆菌科爱德华氏菌属, 是淡水和海水养殖鱼类的一种重要致病菌(Mohanty *et al*, 2007)。迟缓爱德华菌造成斑点叉尾鲟(段翠兰等, 2013)、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)(张晓君等, 2005)、罗非鱼(邓显文等, 2009)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

*idella*)(辛静等, 2011)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)(董传甫等, 2002)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus* Linnaeus)(董丽, 2009)、黄鳝(Shao *et al*, 2016)、中华鳖(*Trionyx sinensis*)(朱芸, 2007)等多种温水性水产动物患病, 很少造成冷水性鱼类患病。刘韬等(2014)报道, 从齐口裂腹鱼体内分离得到该菌, 其他冷水性鱼类未见报道。

迟缓爱德华菌能引起人的脑膜炎、腹膜炎、败血症、软组织感染、肠道疾病, 在热带和亚热带最为常见(Schlenker *et al*, 2009), 中国台湾报道的 22 例肠道感染病例中, 死亡率为 23%, 因此, 提出将此菌作为肠道感染常规检查内容, 以腹泻病原菌高度重视(Wang *et al*, 2005)。崔新风等(2006)临床报道称, 该菌也可造成肝脓肿。

### 3.2 分离菌药敏结果分析及中药防控优势

通过以上药敏实验, 可见温和气单胞菌对链霉素、青霉素、克拉霉素、哌拉西林、卡那霉素等药耐受, 对水产常用药氟苯尼考、左氧氟沙星、恩诺沙星等药呈中度耐受。本结果与梁利国等(2013)和胡琳琳等(2008)的研究结果相似, 但与杨移斌等(2017)的研究结果有所不同。2 株迟缓爱德华菌对庆大霉素、氨

表3 人工回感实验  
Tab.3 Artificial experimental infection

菌株 Strain	浓度组 Group	注射浓度 Injection concentration (CFU/ml)	注射量 Injection volume (ml)	注射尾数 Injection mantissa	实验鱼死亡数量 Deaths of test fish (ind.)							死亡率 Mortality rate (%)	半数致死量 Half lethal dose (CFU/ml)
					1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
ZL1	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	$8.91 \times 10^5$
		$1 \times 10^5$		10	0	0	0	1	0	0	0	10	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	0	0	1	0	0	0	1	20	
		$1 \times 10^7$		10	1	0	1	2	0	1	0	50	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	1	2	3	2	1	0	0	90	
	High	$1 \times 10^9$	10	1	3	3	2	0	0	0	100		
ZL3	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	$4.47 \times 10^4$
		$1 \times 10^5$		10	0	0	0	0	0	1	0	10	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	0	0	0	1	0	0	1	20	
		$1 \times 10^7$		10	0	0	1	1	1	0	0	30	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	0	2	2	2	0	0	1	70	
	High	$1 \times 10^9$	10	2	2	3	2	0	0	0	90		
ZL5	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	1	0	0	0	0	0	0	10	$1.12 \times 10^6$
		$1 \times 10^5$		10	0	1	0	0	0	0	0	10	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	0	0	0	1	1	0	1	30	
		$1 \times 10^7$		10	0	1	2	1	1	0	1	60	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	1	3	2	2	1	1	0	100	
	High	$1 \times 10^9$	10	3	3	2	2	0	0	0	100		
混合 Mixture	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	2	1	0	1	0	0	0	40	$0.32 \times 10^4$
		$1 \times 10^5$		10	2	1	1	1	0	0	0	50	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	3	2	1	1	0	0	0	70	
		$1 \times 10^7$		10	4	3	1	1	1	0	0	100	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	7	2	1	0	0	0	0	100	
	High	$1 \times 10^9$	10	9	1	0	0	0	0	0	100		
无菌生理盐水 Sterile saline			0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	

苜西林、青霉素、复方新诺明耐药，对氟苯尼考、卡那霉素、阿米卡星中度耐受，与刘韬等(2014)的研究结果相似，实验结果不同可能是和渔场日常使用抗生素的不同有关，重复的使用一种抗生素，是造成细菌耐药的主要原因之一。据报道，使用中草药治疗鱼类细菌病具有安全、绿色、环保、减少耐药性、降低生产成本、提高鱼体抵抗力的优点，使其在防控鱼类细菌病中有一定的优势。陈晓利(2010)报道，五倍子、黄芩和杨树花对温和气单胞菌抑菌效果较好。梁利国等(2010)、高桂生等(2016)和金洁南(2016)也对温和气单胞菌进行过中草药抗菌研究，结果表明，使用中草药治疗气单胞菌引起的水产病害是可行的。陈言峰等

(2011)和刘春等(2013)使用五倍子和石榴皮对迟缓爱德华菌进行体外抑菌实验，证明二者抑菌作用明显。张文青等(2012)实验证明五倍子、五味子和乌梅对嗜水气单胞菌有明显抑菌作用。这些结果均可作为温和气单胞菌、迟缓爱德华菌感染引起的水生动物细菌病的中草药治疗提供科学、安全的用药依据。

河鲈是我国仅分布于额尔齐斯河和乌伦古湖的一种名贵冷水性鱼类，本研究首次对人工养殖的河鲈进行了细菌病的研究，从其体内分离并鉴定出2种致病菌，且均具有较高的致病性及致死性。目前，以河鲈等为代表的额尔齐斯河土著鱼类的养殖较为活跃，其细菌病的防控不容小觑。

## 参 考 文 献

- Cai WQ, Sun PF, *et al.* A pathogen study on disease caused by *Aeromonas sobria* in tilapia and drug sensitive test. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3): 243–246 [蔡完其, 孙佩芳. 罗非鱼温和气单胞菌病的病原研究和药敏试验. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 243–246]
- Chen XL. Study on preventive measures for *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in rice field eel (*Monopterus albus*). Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2010, 48–56 [陈晓利. 黄鳝嗜水气单胞菌病和温和气单胞菌病的防治研究. *四川农业大学硕士研究生学位论文*, 2010, 48–56]
- Chen YF, Zou JX. *In vitro* antibacterial activity of 20 Chinese herbs to pathogenic *Edwardsiella tarda*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(5): 110–113 [陈言峰, 邹记兴. 20种中草药对迟缓爱德华氏菌的体外抑菌试验. *水生态学杂志*, 2011, 32(5): 110–113]
- Cui XF, Liu Z, Sun D, *et al.* Complex bacterial liver abscess 1 case report. *Chinese Journal of Infection Control*, 2006, 5(4): 372, 324 [崔新风, 刘真, 孙丹, 等. 复数菌肝脓肿1例报告. *中国感染控制杂志*, 2006, 5(4): 372, 324]
- Deng XW, Xie ZX, Liu JB, *et al.* Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* in *Tilapia nilotica*. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(1): 114–117 [邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟缓爱德华氏菌的分离与鉴定. *水生态学杂志*, 2009, 2(1): 114–117]
- Dong CF, Lin TL, Chen RS, *et al.* Studies on pathogenicities and biochemical characteristics of pathogens which caused *Anguilla japonica* bacterial septicaemia and ascites. *Fisheries Science*, 2002, 21(1): 5–8 [董传甫, 林天龙, 陈日升, 等. 日本鳗鲡败血症水病病原研究. *水产科学*, 2002, 21(1): 5–8]
- Dong L. Identification and aethionological of pathogenic bacteria of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2009, 15–29 [董丽. 养殖大菱鲆几种重要细菌性疾病病原菌的鉴定及其病原学初步研究. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2009, 15–29]
- Duan CL, Liu XM, Wang XD, *et al.* Separation of *Edwardsiella hoshinae* and histopathological changes of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(3): 89–92 [段翠兰, 刘训猛, 王习达, 等. 斑点叉尾鲷保科爱德华氏菌的分离鉴定和组织病理观察. *广东海洋大学学报*, 2013, 33(3): 89–92]
- Fang H, Chen CZ, Zhang XJ. *Aquaculture animal pathogenic bacteriology*. Beijing: China Agriculture Press, 2010, 170–173, 410–412 [房海, 陈翠珍, 张晓君. *水产养殖动物病原细菌学*. 北京: 中国农业出版社, 2010, 170–173, 410–412]
- Gao GS, Zhang YY, Gao GP, *et al.* Isolation, identification of pathogenic bacteria of rotten skin disease in *Tilapia mossambica* and sensitivity test to Chinese herbal medicine. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2016, 45(5): 148–151 [高桂生, 张艳英, 高光平, 等. 罗非鱼腐皮病原菌分离鉴定及其对中草药敏感性试验. *河南农业科学*. 2016, 45(5): 148–151]
- Granum PE, O'Sullivan K, Tomás JM, *et al.* Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1998, 21(2): 131–137
- Heuzenroeder MW, Wong CYF, Flower RLP. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp: Correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(1): 131–136
- Hu LL, Fang WH, Liang SC, *et al.* Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas sobria* from goldfish. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(3): 285–290 [胡琳琳, 房文红, 梁思成, 等. 金鱼温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验. *上海水产大学学报*, 2008, 17(3): 285–290]
- Jin JN. Isolation and identification of pathogenic bacteria from hybrid snakehead (*Channa maculate*♀×*Channa argus*♂) with ulcer disease and screening of Chinese herbal medicine for prevention and treatment. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016, 42–44 [金洁南. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)溃疡病病原的分离、鉴定及其防治中草药的筛选. *华中农业大学硕士研究生学位论文*, 2016, 42–44]
- Li Y, Liu J, Wei DD, *et al.* Study on the improvement of histopathological tissue slicing method. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(8): 154–157 [李钰, 刘佳, 韦丹丹, 等. 动物病理组织切片制作方法改良的探讨. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(8): 154–157]
- Liang LG, Bing XW, Zhang XJ, *et al.* The antimicrobial effects of 18 kinds of Chinese herbs decoction to pathogenic *Aeromonas sobria* *in vitro*. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(1): 66–69 [梁利国, 邴旭文, 张晓君, 等. 18种中草药煎液对温和气单胞菌的抑、杀菌效果. *淡水渔业*, 2010, 40(1): 66–69]
- Liang LG, Ma XY, Xie J. Isolation, identification and detection of hemolysin of *Aeromonas sobria* from *Carassius auratus auratus*. *Journal of Hydroecology*, 2013, 34(5): 76–81 [梁利国, 马昕羽, 谢骏. 黄金鲫温和气单胞菌鉴定及溶血素基因检测. *水生态学杂志*, 2013, 34(5): 76–81]
- Liu C, Li KB, Wang Q, *et al.* Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(3): 105–111 [刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性. *华中农业大学学报*, 2013, 32(3): 105–111]
- Liu M, Han Y. Isolation and identification of *Aeromonas sobria* from infected carps and sensitivity to drugs. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2005, 36(4): 486–489 [刘敏, 韩英. 鲤鱼温和气单胞菌的分离鉴定和药敏试验. *东北农业大学学报*, 2005, 36(4): 486–489]

- Liu T, Wang KY, Geng Y, *et al.* Identification of *Edwardsiella tarda* from infected *Schizothorax prenanti*. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(8): 636–640 [刘韬, 汪开毓, 耿毅, 等. 齐口裂腹鱼源致病性爱德华菌的鉴定及致病性研究. 中国预防兽医学报, 2014, 36(8): 636–640]
- Liu YT, Li L, Yang H, *et al.* The antibacterial effect of tilmicosin on aquatic pathogenic bacteria *in vitro* and *in vivo* and toxic effect of tilmicosin on *Carassius auratus gibelio*. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(4): 51–58 [刘永涛, 李乐, 杨红, 等. 替米考星对水产致病菌体内外抗菌和对异育银鲫毒性作用. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(4): 51–58]
- Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: A brief review. Journal of Biosciences, 2007, 32(Suppl3): 1331–1344
- Nong XW, Huang YH, Long S, *et al.* Isolation, identification and virulence gene detection of pathogenic *Aeromonas sobria* from *Truogx sinensis*. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1322–1328 [农新闻, 黄艳华, 龙苏, 等. 黄沙鳖致病性温和气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1322–1328]
- Peng XX, Chen Y, Wang SY, *et al.* Effect of passive immunization on Crucian carp against *Aeromonas sobria*. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(4): 41–45 [彭宣宪, 陈艳, 王三英, 等. 被动转移免疫在鲫感染温和气单胞菌中的作用. 中国水产科学, 2001, 8(4): 41–45]
- Ren HM, He Z, Yang DY, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of causative pathogen for muscular ulcer in *Monopterus albus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(6): 1106–1112 [任红梅, 何智, 杨德英, 等. 黄鳝体表溃疡病原菌的分离与鉴定. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1106–1112]
- Ren ML, Guo Y, Zhang RM, *et al.* The Irtysh fish resources and fisheries of China. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health Press, 2002, 177–183 [任慕莲, 郭焱, 张人铭, 等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2002, 177–183]
- Schlenker C, Surawicz CM. Emerging infections of the gastrointestinal tract. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2009, 23(1): 89–99
- Shang H, Wang SS, Shen ZY. National clinical laboratory procedures. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015, 578–594 [尚红, 汪毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 北京: 人民卫生出版社, 2015, 578–594]
- Shao JC, Yuan JF, Shen YL, *et al.* First isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from diseased Asian swamp eel, *Monopterus albus* (Zuiew). Aquaculture Research, 2016, 47(11): 3684–3688
- Singh V, Rathore G, Kapoor D, *et al.* Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(4): 453–458
- Tang FJ, Jiang ZF, Adakbek K, *et al.* Perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus) growth variation and inducing reasons of Lake Ulungur, Xinjiang Province in the last two decades. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(1): 117–122 [唐富江, 姜作发, 阿达可白克·可尔江, 等. 新疆乌伦古湖河鲈二十年来种群生长变化及原因. 湖泊科学, 2009, 21(1): 117–122]
- Tang FJ, Jiang ZF, Adakbek K, *et al.* Diet composition of Perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus) in Ulungur Lake. Chinese Journal of Fisheries, 2008, 21(1): 49–52 [唐富江, 姜作发, 阿达可白克·可尔江, 等. 新疆乌伦古湖河鲈食性变化的研究. 水产学杂志, 2008, 21(1): 49–52]
- Wang IK, Kuo HL, Chen YM, *et al.* Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. International Journal of Clinical Practice, 2010, 59(8): 917–921
- Xiao YY, Wang B, Xia YT, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *Aeromonas sobria* from sturgeon. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(10): 1909–1914 [肖艳翼, 王斌, 夏永涛, 等. 鲟病源性温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验. 南方农业学报, 2015, 46(10): 1909–1914]
- Xin J, Sun HC, Yan SH, *et al.* Isolation and identification of 1 pathogenic bacteria strain of juvenile grass carp and drug susceptibility test. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2011(5): 90–91 [辛静, 孙翰昌, 闫胜华, 等. 1株幼草鱼病原菌的分离鉴定及药敏试验. 黑龙江畜牧兽医, 2011(5): 90–91]
- Yang YB, Xu N, Dong J, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas sobria* from *Ictalurus punctatus* and its antimicrobial susceptibility. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(4): 45–50 [杨移斌, 胥宁, 董靖, 等. 斑点叉尾鲟病原中温和气单胞菌的分离鉴定及药敏特性分析. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(4): 45–50]
- Yao DR, Bing XW, Zhu M, *et al.* Molecular identification and drug resistance of pathogenic *Aeromonas sobria* isolated from *Misgurnus anguillicaudatus*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5): 756–762 [姚东瑞, 邴旭文, 朱明, 等. 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)分子鉴定及耐药性研究. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 756–762]
- Zhang WQ, Gong YF, Jin S, *et al.* Antimicrobial tests of Chinese herbal medicines and their mixtures on *Aeromonas hydrophila*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 114–121 [张文青, 龚一富, 金思, 等. 中草药及其配伍对嗜水气单胞菌的抑菌作用. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 114–121]
- Zhang XJ, Zhan WB, Chen CZ, *et al.* Studies on the infection and pathogen of *Edwardsiella tarda* in flounder *Paralichthys olivaceus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(1): 31–37 [张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟缓爱德华氏菌感染症及其病原的研究. 水生生物学报, 2005, 29(1): 31–37]
- Zhao J, Wang L, Zhong HM. Changes of serum antioxidant enzymes in *Schizothorax prenanti* artificially infected with



- Aeromonas sobria*. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2016, 42(6): 621–625 [赵静, 王利, 钟红梅. 温和气单胞菌对齐口裂腹鱼血浆中抗氧化酶的影响. 西南民族大学学报(自然科学版), 2016, 42(6): 621–625]
- Zhao JS, Yao WJ, Jiao L, *et al.* Monogeneans of Ergis River fishes III. A new record of the genus *Dactylogyrus* in China. Journal of Hydroecology, 2011, 32(2): 140–142 [赵江山, 姚卫建, 焦丽, 等. 额尔齐斯河鱼类单殖吸虫研究III. 指环虫属一新记录. 水生态学杂志, 2011, 32(2): 140–142]
- Zhu Y. The identification of bacterial pathogen of *Trionyx sinensis* and the clone of *Hermolysin actlvatorgene* of *Edwardsiella tarda*. Master's Thesis of Guangxi University, 2007, 17–19 [朱芸. 中华鳖“浮肿病”病原菌的鉴定及迟钝爱德华氏菌溶血活化基因的克隆. 广西大学硕士研究生学位论文, 2007, 17–19]

(编辑 马璀璨)

## Isolation, Identification, and Antibiotic Sensitivity of Bacillary Enteritis in *Perca fluviatilis* Linnaeus

YANG Kunming, GUO Aimin, MA Jiangxia, DUAN Chengren, XIE Zhisheng, YUE Cheng<sup>①</sup>

(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

**Abstract** The current development of Xinjiang indigenous fish *via* large-scale farming has been listed for the positioning and development of aquaculture in Xinjiang. *Perca fluviatilis* Linnaeus is an indigenous fish and peculiar to the Ergis River in Xinjiang. *P. fluviatilis* is a cold-water fish, but very few studies have investigated cold-water fish diseases, including bacterial disease. Presently, artificial breeding of perch is being initiated. However, there have been few analyses of disease in perch. In 2016, a large number of perch in the Wujiaqu Fisheries Extension Station died suddenly. Diseased fish exhibited anal swelling, abdominal swelling, surface scale cast-off, rotten tail, and rotten gill symptoms. The dominant bacterial strain was isolated from the fish liver and intestines. After culturing for 24 h at 20°C, ZL1 formed neat edges with a slight uplift in the middle, a smooth surface, a light-yellow color, a special aromatic odor, and bacterial colonies 1.5~2 mm in size. It formed a clear  $\beta$ -hemolysis circle on blood agar. ZL3 and ZL5 formed a round, slightly uplifted, smooth, moist, off-white, translucent, colony of 0.5~1 mm in size, but did not form a hemolysis circle on blood agar. The isolated bacteria were cultured, the bacterial species were identified, and drug susceptibility and pathogenicity tests were performed. Pathogenicity tests and morphological observation showed that the isolates had obvious pathogenicity. Gram staining, physiological and biochemical characteristics, analysis of 16S rRNA gene sequences, and phylogenetic tree development identified ZL1 as *Aeromonas sobria*, and ZL3 and ZL5 as *Edwardsiella tarda*. Drug sensitivity test showed that ZL1 was highly sensitive to gentamycin, minocycline, and ceftazidime, and resistant to streptomycin, penicillin, and clarithromycin. ZL3 and ZL5 were highly sensitive to levofloxacin, streptomycin, and enrofloxacin, and resistant to gentamicin, ampicillin, penicillin, and sulfamethoxazole.

**Key words** *Perca fluviatilis* Linnaeus; *Aeromonas sobria*; *Edwardsiella tarda*; Identification; Drug sensitive test

① Corresponding author: YUE Cheng, E-mail: yuechengxnd@aliyun.com



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171220003

http://www.yykxjz.cn/

宋雪松, 徐永江, 柳学周, 史宝, 王滨, 刘永山, 张雅星. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种视黄酸受体RAR $\alpha$ 和RAR $\gamma$ 克隆及组织表达特性. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 52–64  
Song XS, Xu YJ, Liu XZ, Shi B, Wang B, Liu YS, Zhang YX. Molecular cloning and spatial expression of two retinoic acid receptors RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  from *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 52–64

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种视黄酸受体 RAR $\alpha$ 和 RAR $\gamma$ 克隆及组织表达特性\*

宋雪松<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>1</sup> 柳学周<sup>1①</sup> 史宝<sup>1</sup>  
王滨<sup>1</sup> 刘永山<sup>1,2</sup> 张雅星<sup>1,2</sup>



(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种视黄酸受体 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  的 cDNA 全长序列, 并采用定量 PCR 技术分析了其组织表达特性。半滑舌鳎 RAR $\alpha$  cDNA 序列全长为 1823 bp, 编码 443 个氨基酸; RAR $\gamma$  cDNA 序列全长为 1959 bp, 编码 489 个氨基酸。同源性分析显示, 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  同源性高达 60.8%, 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)同源性高达 97.0%, 具有较强的进化保守性。系统进化分析显示, 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  分别归属于单独的分支, 且与其他鱼类聚合成簇。组织表达分析显示, RAR $\alpha$  mRNA 在肾中表达量最高, 而 RAR $\gamma$  mRNA 在脾中表达量最高, RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  mRNA 在其他组织中均有表达, 表明半滑舌鳎 2种 RAR 都可能参与多种生理过程调控。半滑舌鳎 2种 RAR mRNA 在有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤中的表达量依次升高, 且发现 RAR $\alpha$  在正常有眼侧皮肤的表达高于 RAR $\gamma$ , 而 RAR $\gamma$  在无眼侧正常皮肤中的表达显著高于 RAR $\alpha$ , 无眼侧黑化皮肤中 RAR $\alpha$  表达高于 RAR $\gamma$ 。RAR 基因在有眼侧和无眼侧皮肤组织中的差异表达可能和 RA/RAR 系统调节体色有关。

**关键词** 半滑舌鳎; 视黄酸受体; 基因克隆; 表达模式; 无眼侧黑化

**中图分类号** TS201.4; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0052-13

视黄酸(Retinoic acid, RA)是一种脂溶性小分子物质, 又称维甲酸, 是维生素 A(V<sub>A</sub>)在机体内经过一系列水解和酶催化作用生成的最终代谢产物。视黄酸合成进入细胞后先与重组人胞内维甲酸结合蛋白-1

(CRABP1)和 CRABP2 蛋白结合, 转运进入细胞核, 形成核受体二聚体, 调节相关基因的表达(Budhu *et al*, 2002)。RA 的作用是通过定位在靶细胞核内的特异性受体介导的。目前, 已发现两类视黄酸受体: 视黄酸

\* 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(2017GH05; 2017GH17)、国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)、国家自然科学基金(31502145; 31602133)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022017016)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS) (2017GH05; 2017GH17), China Agricultural Research System (CARS-47), National Natural Science Foundation of China (31502145; 31602133), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017016)]. 宋雪松, E-mail: 746284973@qq.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-20, 收修改稿日期: 2018-01-29

受体(RAR)和视黄酸 X 受体(RXR), 作为配体激活的转录因子(Chambon, 1996)。RAR 是一类细胞核受体, 属于类固醇和甲状腺激素受体超家族, 其通过与 RXR 形成异源二聚体(RAR/RXR), 增加与视黄素应答元件的亲合力, 由此加强本身的转录活性和对配体的敏感性(Kliewer *et al*, 1992; Hallenbeck *et al*, 1992)。哺乳动物 RAR 有 3 种亚型: RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  和 RAR $\gamma$ , 配体为顺式视黄酸(9-*cis*-RA)和反式视黄酸(ATRA)(Brand *et al*, 1988), 但鱼类中目前没有发现 RAR $\beta$  亚型的存在(Jones *et al*, 1995)。研究发现, RA/RAR 系统具有抑制肿瘤生长、保护上皮组织、促进胚胎骨骼心脏功能和视觉发育功能(De Luca, 1991; Zhou *et al*, 2017; Isojima *et al*, 2014), 并且在抑制细胞凋亡(Herget *et al*, 1998)和免疫调节(Erkelenz *et al*, 2017)也有重要生理作用, 是机体维持稳态的重要因子。

RA 及其受体 RAR 系统在鱼类中的研究较少(Faehnrich, 2016; Zhang *et al*, 2013; 冷向军, 2017)。在鲆鲽类中, RA/RAR 系统对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)骨骼发育和眼睛位移等变态发育过程(Haga *et al*, 2002; Martinez *et al*, 2007), 对塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)(Ignacio *et al*, 2009)和大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)(Lewis-McCrea *et al*, 2010)骨骼发育畸形都具有重要的生理调控作用。对牙鲆的研究表明, 利用 9-*cis*-RA 或者 ATRA 处理变态前仔鱼, 可以通过 RA/RAR 信号通路的介导作用抑制鱼苗眼睛完成位移。同时发现, 牙鲆和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)皮肤的 RA 浓度在有眼侧皮肤高于无眼侧皮肤, 且光照可通过 RA/RAR 信号通路诱导牙鲆无眼侧色素过度沉着(黑化), 表明 RA/RAR 信号通路在半滑舌鳎、牙鲆的体色左右不对称发育模式中起重要调控功能(Shao *et al*, 2017), 但 RA/RAR 系统对半滑舌鳎体色调控的具体机制仍待进一步研究。

半滑舌鳎属鲆形目、舌鳎科、舌鳎属, 为我国近海自然分布的重要经济鱼类, 自人工繁育技术取得突破以来, 其养殖产业得到快速发展, 已成为鲆鲽类三大主导养殖品种之一(邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2006、2014)。养殖生产中发现, 半滑舌鳎无眼侧黑化(色素沉积过多)问题日益凸显, 而无眼侧发生黑化的商品鱼市场价格较无眼侧正常鱼价格低 20%以上, 成为制约半滑舌鳎养殖产业经济效益的瓶颈之一。目前, 国内外对半滑舌鳎无眼侧黑化发生的相关机制鲜有报道, 本实验室前期研究了半滑舌鳎体色相关功能基因 POMC、MCHR 与 MCH 等的克隆、表达调控及其与体色的关系(史学营等, 2015、2017; 朱学武等,

2016; 徐永江等, 2017), 为认识半滑舌鳎无眼侧体色调控机制积累了资料。本研究拟开展半滑舌鳎 RAR 结构及其表达特性研究, 以期探究 RA/RAR 系统在养殖半滑舌鳎无眼侧黑化调控中的作用机制提供基础资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验用鱼及样品处理

实验用半滑舌鳎于 2017 年 6~8 月取自山东省海阳市黄海水产有限公司。取样实验鱼 3 尾(都存在一定程度无眼侧黑化), 体长为(33 $\pm$ 3) cm, 体重为(237 $\pm$ 30) g, 用于 RAR 基因克隆与组织表达特性分析。实验鱼以 MS-222 (280 mg/L)麻醉后, 快速取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧正常皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤组织投入液氮速冻后, 转入-80 $^{\circ}$ C 保存, 用于总 RNA 的提取。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂盒并按照操作说明提取各组织样品总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, NanoDrop 2000 (Thermo, 美国)测定 RNA 浓度。取适量鳃组织总 RNA, 以 PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链。以 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, 美国)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第 1 链, 用于 RAR 基因 RACE 全长克隆。取等量各组织样品的总 RNA, 用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链, 用于 RAR mRNA 组织表达特性及分析。各操作步骤均严格按照使用说明书进行。

### 1.3 总 RNA 提取和中间片段扩增

根据 GenBank 登记的 XM\_017034299.1、XM\_008318896.2 预测半滑舌鳎 RARs 序列保守区设计特异引物(表 1), 以肝脏组织为模板, 扩增 RAR $\alpha$  基因的核心序列, PCR 反应体系(25  $\mu$ l): 0.2  $\mu$ l *Taq* 酶、2.5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer、2  $\mu$ l dNTP Mixture、0.5  $\mu$ l 模板、1  $\mu$ l RAR $\alpha$ -F、1  $\mu$ l RAR $\alpha$ -R、17.8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增 RAR $\gamma$  基因的模板为脾脏, PCR 反应体系和条件同 RAR $\alpha$ ; PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T1 载体(北京全式

表 1 半滑舌鲷 RAR 基因克隆使用的 PCR 扩增引物  
Tab.1 Primers used for PCR amplification of RAR of *C. semilaevis*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
RaRa-F1	GGTTCTTCAGGCGGAGCAT	中间片段克隆 1 段
RaRa-R1	TGTGGCTGGACTGCTTTGG	
RaRa-F2	GCCCACCTACTCCTACTTCTTCC	中间片段克隆 2 段
RaRa-R2	GCACTCCTGCTTCTTCTCATCCT	
RaR $\gamma$ -F	GTATCCCTTCGCCTTCAAC	中间片段克隆
RaR $\gamma$ -R	CACTGTGCCCTCCAAA	
RaRa1	GGGCGGGCTTGGCACTATCTC	5'-RACE PCR
RaRa2	GGGTGGGAAGAAGTAGGAGTAGGTG	
RaRa1	CTACACGCCAGAGCAGGACA	3'-RACE PCR
RaRa2	ACTTGAGCAGGCGGATAAA	
RaR $\gamma$ 1	GCGATGGTGAGGGTGGTGAAT	5'-RACE PCR
RaR $\gamma$ 2	GAGAACTGGGCACCATCTCCTCT	
RaR $\gamma$ 1	CCTTTGGAAATGGACGATACGG	3'-RACE PCR
RaR $\gamma$ 2	CTCCTCAGTGCCATCTGCCTCA	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCA	5'和 3'-RACE PCR
NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
qRaRa-F	GTGTGGAGATCGCCAGGACTTG	RaRa qPCR
qRaRa-R	TGATGCTCCTCAGGTCGGTGAT	
qRaR $\gamma$ -F	CAGTTCTCCGTCTCCACCTCCA	RaR $\gamma$ qPCR
qRaR $\gamma$ -R	GCGGTTGCGTGTGACCTTGT	
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	内参基因
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	

金生物公司)连接,转化至 Trans1-T1 感受态细胞(全式金),LB 固体培养基 37℃ 培养过夜,挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序;RAR 的中间序列已上传 NCBI 数据库(RAR $\alpha$  登录号:MG596268;RAR $\gamma$  登录号:MG596269)。

#### 1.4 RAR 的 RACE 扩增

根据克隆验证的中心片段设计 RACE 引物。用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech,美国)进行梯度 PCR 扩增。第 1 次 PCR,反应体系:17  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu$ l Buffer、2  $\mu$ l 50 $\times$ dNTP Mix、0.5  $\mu$ l 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix、1  $\mu$ l cDNA、引物 RAR $\alpha$ 1 1  $\mu$ l 和 1  $\mu$ l UPM,共计 25  $\mu$ l。设计 Touchdown PCR,反应条件为 94℃ 30 s,66℃ 30 s,72℃ 2 min,15 个循环, $T_m$  值每 5 个循环降低 2℃;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,20 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。以第 1 次 PCR 产物稀释 10 倍为模板,进行巢式 PCR,反应体系:17  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu$ l Buffer、2  $\mu$ l 50 $\times$ dNTP Mix、0.5  $\mu$ l 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix、1  $\mu$ l cDNA、1  $\mu$ l NPM 和 1  $\mu$ l RAR $\alpha$ 2 引物,共

计 25  $\mu$ l。PCR 反应条件同第 1 次 PCR。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的条带进行胶回收、载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。RAR $\gamma$  反应体系与条件同 RAR $\alpha$ 。

#### 1.5 RAR mRNA 定量表达分析

根据获得的半滑舌鲷 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物 qRAR $\alpha$  和 qRAR $\gamma$ (表 1),以 18S 为内参。利用 Mastercycler ep realplex real-time PCR 仪(Eppendorf,德国),使用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒(TaKaRa)进行定量扩增,PCR 体系(20  $\mu$ l):1  $\mu$ l cDNA 模板、上下游引物各 0.8  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L)、10  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 和 7.4  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 5 s,58℃ 20 s、共 40 个循环。每个样品测试设置 3 个重复。RAR mRNA 的表达量以 18S mRNA 表达量为基础,利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算获得(Livak *et al*, 2001)。

#### 1.6 序列分析及数据处理

半滑舌鲷 RAR 基因的结构、分子量预测、等电

点预测使用 ExPASy 在线数据库预测([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)); 氨基酸序列推导、序列拼接和氨基酸同源性分析均使用软件 DNAMAN 6.0, 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。亚细胞定位使用 PSORT II 软件(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)。结构域预测使用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalW 在线软件(<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)和 MEGA 7 软件。通过 SOPMA 软件([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))分析蛋白质二级结构, 通过 SWISS-MODEL 在线软件(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)分析预测蛋白质三级结构。

实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, 多组数据间比较采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、Duncan 和 SNK 多重比较分析, 当  $P < 0.05$  时表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 RAR cDNA 序列结构

半滑舌鳎 RAR $\alpha$  cDNA 序列全长为 1823 bp (图 1), 包括 17 bp 的 5' 非编码区(UTR)、1332 bp 的开放阅读框(ORF)和 474 bp 的 3' 非编码区(UTR), 编码 443 个氨基酸, 预测编码蛋白分子量为 49 kb, 等电点为 8.47。半滑舌鳎 RAR $\gamma$  cDNA 序列全长为 1959 bp (图 2), 包括 305 bp 的 5' (UTR)、1497 bp 的 ORF 和 98 bp 的 3' (UTR), 编码 498 个氨基酸, 预测编码蛋白的分子量为 55.8 kb, 等电点为 4.99。预测 2 种 RAR 基因的亚细胞定位均位于细胞核。

### 2.2 RAR 编码蛋白质空间结构预测

通过 SOPMA 软件分析 RAR 编码蛋白的空间二级结构: 在 RAR $\alpha$  成熟蛋白的二级结构中,  $\alpha$ -螺旋占 34.31%,  $\beta$ -转角占 8.35%, 无规则卷曲占 43.12%, 延伸链占 14.22%。在 RAR $\gamma$  成熟蛋白的二级结构中,  $\alpha$ -螺旋占 36.75%,  $\beta$ -转角占 9.44%, 无规则卷曲占 40.36%, 延伸链占 13.45%。通过 SWISS-MODEL 网站同源建模方法构建了半滑舌鳎 RAR 编码的蛋白质可能的三级结构, 以同源建模的方法与各自的 50 个 RA 核受体家族模板构建预测可能的蛋白质三级结构, RAR $\alpha$  获得 6 种三级结构模型, 选取 GMQE 评价价值 0.55、QMEAN 稳定系数 -2.79 (负值越大越稳定) 构建模型; RAR $\gamma$  有 5 种, 选取 GMQE 评价价值 0.61,

QMEAN 稳定系数 -2.13 构建模型。三级结构模型显示(图 3), RAR 蛋白质分为 3 部分, 蓝色的 DBD 区和 LBD 区通过橘黄色的 D 区铰链区相连。

### 2.3 RAR 的氨基酸序列同源性比较

同源性分析显示, 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  的氨基酸序列与同属鲈形目的牙鲆的同源性最高, 为 97.0%, 其次为银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)92.2%、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)87.9%、斑马鱼(*Danio rerio*)86.8%、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)64.6%, 且与两栖类、爬行类、啮齿类、鸟类和人(*Homo sapiens*)的相似度分别为 79.6%、82.2%、80.5%、81.5%和 80.7%。半滑舌鳎 RAR $\gamma$  的氨基酸序列同样与牙鲆同源性最高, 达 97%, 与其他鱼类的同源性均达 90.5%以上, 与两栖类、啮齿类和人的相似度分别为 71.4%、84.5%和 80.7%。另外, 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  的氨基酸序列相似度为 60.8% (表 2)。

通过结构域预测发现, 半滑舌鳎与鲈鱼、人、斑马鱼具有相似的功能结构域, 都具有 DNA 结合区(DBD 区)和配体结合区(LBD)区。利用 ClustalW 对半滑舌鳎 RAR 的氨基酸序列与其他物种的 RAR 氨基酸序列进行了比较(图 4)。结果发现, 半滑舌鳎与其他鱼类 RAR 的氨基酸序列整体保守性较强, 除在 N 端的 A/B 区和 C 端的 F 区末尾保守型较差外, 中间的 DNA 与配体结合区保守度较高。

### 2.4 RARs 系统进化分析

利用 NJ 法构建了基于氨基酸序列的半滑舌鳎 RAR $\alpha$ 、RAR $\gamma$  和其他脊椎动物的系统进化树(图 5), 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  都分别与鲈形目、鲈形目、鲤形目等其他鱼类形成独立的分支, 而两栖类、哺乳类和爬行类形成独立的分支。

### 2.5 RAR mRNA 的组织表达特性

半滑舌鳎 2 种 RAR 基因在所有检测组织中都有表达。RAR $\alpha$  mRNA 在肾脏和眼中表达量最高, 与除胃的其他组织差异显著, 在胃中的表达也较高, 在脑、脾脏、鳃、无眼侧白皮肤、性腺、有眼侧肌肉、肠、心脏、无眼侧黑化皮肤、无眼侧肌肉、有眼侧皮肤等其他组织中也检测到一定的表达量。半滑舌鳎 RAR $\gamma$  mRNA 在脾脏和鳃中表达量最高, 在心脏和肾脏表达量也较高, 与其他组织差异显著; 而在无眼侧白皮肤、脑、眼、胃、性腺、无眼侧黑化皮肤、无眼侧肌肉、垂体等其他组织表达量相对较低。在肾脏中, 2 种 RAR mRNA 表达水平都很高。脾脏、心脏、鳃、肾

```

17   ACA TGG ACT GAG CCG TC
1    ATG GCT GGG AAG GGC AAC CCA CAC CTC AAC GGC TTC CCC ATG CCC ACC TAC TCC TAC TTC
1    M A G K G N P H L N G F P M P T Y S Y F
61   TTC CCA CCC ATG CTG GGA AGC CTG TCA CCT CCA GCT CTG CCA GGA CTG CCC ATC AGT GGG
21   F P P M L G S L S P P A L P G L P I S G
121  TAC AGC ACC CCG TCA CCA GCC ACT ATC GAG ACC CAG AGT ACC AGC TCA GAG GAG ATA GTG
41   Y S T P S P A T I E T Q S T S S E E I V
181  CCA AGC CCG CCC TCG CCT CCC CCA CCG CCC CGC GTC TAC AAA CCC TGC TTT GTG TGC CAG
61   P S P P S P P P P R V Y K P C F V C Q
241  GAC AAG TCC TCA GGG TAC CAC TAC GGT GTC AGC GCC TGC GAG GGC TGC AAG GGG TTC TTC
81   D K S S G Y H Y G V S A C E G C K G F F
301  AGG CGG AGC ATC CAG AAG AAC ATG GTG TAT ACC TGT CAC CGG GAG AAG AAC TGT ATC ATC
101  R R S I Q K N M V Y T C H R E K N C I I
361  AAC AAA GTC ACA CGC AAC CGC TGC CAG TAC TGT CGG CTG CAG AAG TGC CTG GAC GTG GGG
121  N K V T R N R C Q Y C R L Q K C L D V G
421  ATG TCC AAG GAG TCA GTG AGG AAC GAC AGG AAC AAG AAA AAG GAT GAG AAG AAG CAG
141  M S K E S V R N D R N K K K K D E K K Q
481  GAG TGC ACG GAG AGC TAC GTG ATG ACT CCT GAC ACG GAG CAG ATG ATC GAC AGG GTC CGC
161  E C T E S Y V M T P D T E Q M I D R V R
541  AAG GCC CAC CAG GAG ACT TTC CCC TCT CTC TGC CAG CTG GGC AAA TAC ACT ACG ACT AAC
181  K A H Q E T F P S L C Q L G K Y T T T N
601  AGC TCA GAA CGA CGC GTG TCC TTG GAT GTA GAT CTG TGG GAC AAA TTC AGC GAG CTC TCC
201  S S E R R V S L D V D L W D K F S E L S
661  ACC AAG TGC ATC ATC AAG ACG GTG GAG TTC GCC AAG CAG CTG CCA GGC TTC ACC ACG CTC
221  T K C I I K T V E F A K Q L P G F T T L
721  ACC ATC GCT GAC CAG ATC ACT CTC CTC AAA GCA GCC TGT CTC GAC ATC CTG ATA CTG CGG
241  T I A D Q I T L L K A A C L D I L I L R
781  ATC TGT ACA CGC TAC ACG CCA GAG CAG GAC ACC ATG ACC TTC TCC GAT GGA CTC ACG TTA
261  I C T R Y T P E Q D T M T F S D G L T L
841  AAC CGG ACC CAG ATG CAC AAT GCC GGC TTC GGT CCC CTC ACT GAC TTG GTT TTT GCA TTT
281  N R T Q M H N A G F G P L T D L V F A F
901  GCC AAT CAG CTT CTT CCT CTG GAG ATG GAC GAT GCA GAG ACA GGG CTC CTC AGC GCC ATC
301  A N Q L L P L E M D D A E T G L L S A I
961  TGT TTG CTG TGT GGA GAT CGC CAG GAC TTG GAG CAG GCG GAT AAA GTG GAC GTC CTT CAG
321  C L L C G D R Q D L E Q A D K V D V L Q
1021 GAG CCT CTA CTG GAG GCG CTG AAA ATT TAC GTG AGG AAA AGG AGG CCC CAC AAA CCG CAC
341  E P L L E A L K I Y V R K R R P H K P H
1081 ATG TTC CCC AAG ATG CTG ATG AAG ATC ACC GAC CTG AGG AGC ATC AGT GCT AAA GGA GCT
361  M F P K M L M K I T D L R S I S A K G A
1141 GAA CGG GTC ATC ACC CTG AAG ATG GAG ATT CCT GGC TCC ATG CCC CCT CTC ATC CAG GAG
381  E R V I T L K M E I P G S M P P L I Q E
1201 ATG CTA GAA AAC TCT GAA GGT CTG GAG AGT GGG GCC ACG GGT AGT CGT GGC AGT GGC GCC
401  M L E N S E G L E S G A T G S R A S G A
1261 CCC CCT GGT AGT TGC AGC TCC AGT CTC TCC CCA AGC TCT GCC CAA AGC AGT CCA GCC ACA
421  P P G S C S S S L S P S S A Q S S P A T
1321 CAT TCA CCG TAG TAG GCA GTG GAA CTG GCT CGC TCT TTT TAT TTT TCC TCA CAG TGC TCT
441  H S P * *
1381 CTC TCC TCC TCC TTT CAA TGT CCT GAG GAG GAG GAG GAG CGA AGG AGG AAG GCC CTG ACT
1441 GTG ACT GCT GAA AAC AGG AGA CCT GCA GAG CCA ACC TCC TCC CTC TCC TAT CAC AGA GAT
1501 TCC CCA CCT CCT CAT CTG CTT TCT CTC ACT CTG GAA CAC CGT CCT GGC TTG AGG GTG AGG
1561 TAA AGT CAG GGC TGG CCA GGG AGG AGA CGG GGC GCC TCC TGG AGA CCA CAC CGT TAA CAC
1621 TGC TGA TGA TGA TGA TAA CTC CTC CAC GTC CTA CCA TTT TCC TCC TCA TCC TCT TTA CTG
1681 TTC TTG GAA AGA CTA ATA GAG ACT AAA CCT GGA CGA GGC AGA GAC CAG TGT GTG ATG GAG
1741 CTG AGT CTG GTC GGA GAG TGT AGG ACA AAT GTT TGG ACA AGA AAA AAA AAA AAA AAA
1801 AAA AAA

```

图 1 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence of *C. semilaievis* RAR $\alpha$  gene and its deduced amino acid sequence

推导的氨基酸序列用单字母表示，从阴影显示的起始甲硫氨酸开始计数。终止密码子用\*表示。下同  
The deduced amino acid residues were represented as single letter abbreviations and numbered from the initiating methionine which was shadowed. Termination codon was marked with \*. The same as below

```

-305 GGT A
-301 TTT AGG TCT GTT ACG GCA GAC AGG GAG CAG CTC ACC CAA GGG CAG GGG GAG ACA GGG AGT
-241 CGG AGA CAA CAG TCA GCT CAG CCA GGC AGG AAC CAG ATC AGC AGT CCA GCT GAG GAG GAA
-181 AGA GAG AAA GTA GGA CAG TGT CAG GAC AGA ACA GGC AGA CGG AGG GAC AGT GAG ACA TAA
-121 GTG AGG ACA GCA GCT CCT GCT AGC TGT TGC TGC CGA CTG TTG TTG TCA CTG CCT CAG CCA
-61 GTG ACG TGA GCA GTG GAA GCA GGA CAG GAC AGG ACA GGA CAG GAC GCA GGC AGG ACA GGG
1 GGA CAG ACA GAC TGG TAG TGA TTT TCT CTG CTG TAG GTT GTG GCT GGT GGG AGG GCT GCC
1 ATG TTC GAC TGT ATG GAG GCT CTG GGA ATG GGC CCC CGT CAG CTG TAT GAT GTC AGC AGC
1 M F D C M E A L G M G P R Q L Y D V S S
61 CGC GGT GCG TGC ATG CTA CGG AAG GCA AGC CCC TTC TTT GCG GGG CTG AAC CCC TTC GCT
21 R G A C M L R K A S P F F A G L N P F A
121 TGG ACA GGC AGT GCG AGC ATT CAG TCC GTG GAG ACC CAG AGC ACC AGC TCA GAG GAG ATG
41 W T G S A S I Q S V E T Q S T S S E E M
181 GTG CCC AGT TCT CGG TCT CCA CCT CCA CGG CCT CGT GTC TAC AAA CCC TGC TTC GTG TGC
61 V P S S P S P P P P P R V Y K P C F V C
241 CAG GAC AAG TCC TGG GGG TAC CAC TAT GGG GTC AGC TCC TGT GAG GGC TGC AAG GGA TTT
81 Q D K S S G Y H Y G V S S C E G C K G F
301 TTC CGC CGC AGC ATC CAG AAG AAC ATG GTG TAC ACC TGC CAC CGA GAC AAA AAC TGT CAG
101 F R R S I Q K N M V Y T C H R D K N C Q
361 ATC AAC AAG GTC ACA CGC AAC CGC TGT CAG TAC TGC AGG CTG CAG AAG TGC TTC GAG GTC
121 I N K V T R N R C Q Y C R L Q K C F E V
421 GGC ATG TCG AAG GAA GCC GTG CGC AAC GAC AGG AAC AAG AAG AAG AAG GAG CTG AAG GAG
141 G M S K E A V R N D R N K K K K D V K E
481 GAG GTG GTG CTT CCT GAG AGC TAC GAA CTG AGC GGA GAG TTG GAG GAG TTG GTC AAT AAA
161 E V V L P E S Y E L S G E L E E L V N K
541 GTC AGC AAA GCC CAC CAA GAG ACG TGC CCC TCC CTC TGC CAG CTG GGC AAA TAC ACC ACC
181 V S K A H Q E T C P S L C Q L G K Y T T
601 AAC TCC AGT GCA GAG CAC CGT GTC CAG CTG GAT CTG GGT CTG TGG GAC AAG TTC AGT GAG
201 N S S A E H R V Q L D L G L W D K F S E
661 CTG TCC ACC AAG TGC ATC ATT AAG ATT GTG GAA TTT GCC AAA CGG CTG CCA GGA TTC ACC
221 L S T K C I I K I V E F A K R L P G F T
721 ACC CTC ACC ATC GCA GAC CAG ATC ACT CTG CTG AAG TCG GCC TGT CTG GAC ATA CTG ATG
241 T L T I A D Q I T L L K S A C L D I L M
781 CTG AGG ATC TGT ACA CGC TAC ACT CCA GAA CAG GAC ACT ATG ACC TTC TCA GAT GGT CTG
261 L R I C T R Y T P E Q D T M T F S D G L
841 ACT CTG AAC CGG ACT CAG ATG CAC AAC GCT GGG TTT GGA CCG CTC ACA GAC CTG GTG TTT
281 T L N R T Q M H N A G F G P L T D L V F
901 GCC TTT GCT GGT CAG CTT CTA CCT TTG GAA ATG GAC GAT ACG GAA ACT GGC CTC CTC AGT
301 A F A G Q L L P L E M D D T E T G L L S
961 GCC ATC TGC CTC ATC TGT GGA GAT CGT ATG GAT CTA GAA GAA CCC CAG AAA GTG GAC AAA
321 A I C L I C G D R M D L E E P Q K V D K
1021 CTC CAA GAA CCT CTA CTG GAG GCT CTG AAG ATC TAC GCC CGC CGC CGT CGC CCC AAC AAA
341 L Q E P L L E A L K I Y A R R R R P N K
1081 CCT CAC ATG TTC CCC CGC ATG CTG ATG AAG ATC ACT GAC CTC AGG GGA ATC AGC ACC AAA
361 P H M F P R M L M K I T D L R G I S T K
1141 GGT GCA GAG AGA GCC ATC ACT CTG AAG ATG GAG ATC CCA GGT CCG ATG CCG CCT CTG ATC
381 G A E R A I T L K M E I P G P M P P L I
1201 AGA GAG ATG CTG GAG AAC CCC GAG GCG TTC GAG GAC CAA ACA GAG TGC AAC GAC AGC CCG
401 R E M L E N P E A F E D Q T E C N D S P
1261 CCC CCA CCT CCG CCA CCT CCG CCG CCA GCT ACA GTG AAG CAG GAA GCC GAG GAC GAG GAC
421 P P P P P P P P P A T V K Q E A E D E D
1321 GAC AGC TGG GCT ACG GAA AAC GGC AGC GAG CCT TCA CCG GAG GAG GAG GAC GAG GAC GAC
441 D S W A T E N G S E P S P E E E D E D D
1381 GAT GAT GAC GTG GGA GAC GAG GAG AGA GAC AGG GGC TGG GAC AGT GAC GGG GAG TCC TGG
461 D D D V G D E E R D R G S D S D G E S W
1441 GGG GCT CTG GAT GCC ATC GAT GGG GCG AGG AAA GGC CTT TTT GGG AGG GCA GAG TGA ACA
481 G A L D A I D G A R K G L F G R A Q *
1501 CAG CAT TTC ATA CAC ACA ATC ACG CAC TCA CAC ACA CAC GTT ACA CAC ACA CAC A CA CAC
1561 ACA CAC ACA CAC GCA AAA AAA AAA AAA AAA AA

```

图 2 半滑舌鳎 RAR $\gamma$  基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列Fig.2 The full-length cDNA sequence of *C. semilaevis* RAR $\gamma$  gene and its deduced amino acid sequence



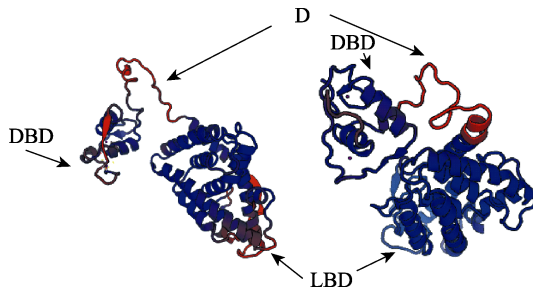


图 3 SWISS-MODEL 预测的半滑舌鳎 RAR $\alpha$ (左)和 RAR $\gamma$ (右)蛋白质三级结构

Fig.3 Tertiary structure of *C. semilaevis* RAR $\alpha$  (left) and RAR $\gamma$  (right) proteins predicted by SWISS-MODEL

脏、无眼侧白皮肤等组织中 RAR $\gamma$  mRNA 表达量高于 RAR $\alpha$ ，而在眼、胃、肠、性腺、肌肉、肝脏、有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤等组织中，RAR $\alpha$  mRNA 表达量高于 RAR $\gamma$ ，脾脏、心脏、鳃和肾脏组织中 RAR $\gamma$  与 RAR $\alpha$  表达差异显著，而其他组织中 RAR $\gamma$  与 RAR $\alpha$  表达差异不显著。脑中 2 种 RAR mRNA 表达量基本一致，表明这 2 种 RAR 基因在不同组织中的

生理功能可能存在差异，即使在同一组织中其生理功能也多存在一定的差异(图 6)。

分析有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧白皮肤中 2 种 RAR 基因 mRNA 的表达情况(图 7)，发现无眼侧白皮肤的 2 种 RAR mRNA 的表达量最高，其次为无眼侧黑化皮肤，最低的为有眼侧皮肤，其中，RAR $\gamma$  表达差异显著。RAR $\gamma$  在无眼侧未黑化皮肤中的表达显著高于 RAR $\alpha$  ( $P < 0.05$ )，而在正常有眼侧皮肤和无眼侧黑化皮肤中，RAR $\alpha$  的表达高于 RAR $\gamma$ ，表明可能 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  对皮肤组织中色素的调控作用具有不同的调控机制。

### 3 讨论

本研究获得了半滑舌鳎 RAR 的 2 个亚型 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  cDNA 序列全长，并研究了其组织表达特性，为研究 RA/RAR 系统对体色异常调控提供了基础材料。本研究获得了半滑舌鳎 2 个 RAR 亚型的结构，预测未发现跨膜结构和信号肽(Napoli, 1996)。同其他

表 2 半滑舌鳎 RAR 氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较

Tab.2 Comparison of homology of the precursor peptide sequences of RAR gene between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank accession No.	与 RAR $\alpha$ 同源性 Homology with RAR $\alpha$ (%)	与 RAR $\gamma$ 同源性 Homology with RAR $\gamma$ (%)
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i> - $\alpha$	MG596268	100	60.80
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i> - $\gamma$	MG596269	60.80	100
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> - $\alpha$	XP_019964742.1	97.00	75.30
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> - $\gamma$	XP_019951749.1	63.40	97.00
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> - $\alpha$	ABF22438.1	64.60	94.60
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> - $\gamma$	NP_001027925.1	63.30	95.80
鲈鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i> - $\alpha$	AEU04706.1	87.90	70.80
鲈鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i> - $\gamma$	AEU04705.1	64.30	95.80
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> - $\alpha$	NP_571481.2	86.80	70.70
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> - $\gamma$	CAM16092.1	65.70	90.50
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> - $\alpha$	NP_001164665.1	79.60	71.70
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> - $\gamma$	NP_001081663.1	71.20	84.40
银大麻哈 <i>Oncorhynchus kisutch</i> - $\alpha$	XP_020309254.1	92.20	71.40
银大麻哈 <i>Oncorhynchus kisutch</i> - $\gamma$	XP_020315261.1	64.20	91.10
小鼠 <i>Mus musculus</i> - $\alpha$	NP_001169999.1	80.50	69.50
小鼠 <i>Mus musculus</i> - $\gamma$	AAA40036.1	68.60	84.50
人 <i>Homo sapiens</i> - $\alpha$	NP_001019980.1	80.70	70.10
人 <i>Homo sapiens</i> - $\gamma$	AAA52692.1	69.60	80.70
野猪 <i>Sus scrofa</i> - $\alpha$	XP_003131521.1	80.10	69.30
鸡 <i>Gallus gallus</i> - $\alpha$	NP_989867.1	81.50	70.40
北美绿蜥蜴 <i>Anolis carolinensis</i> - $\alpha$	XP_003222505.1	82.20	70.10

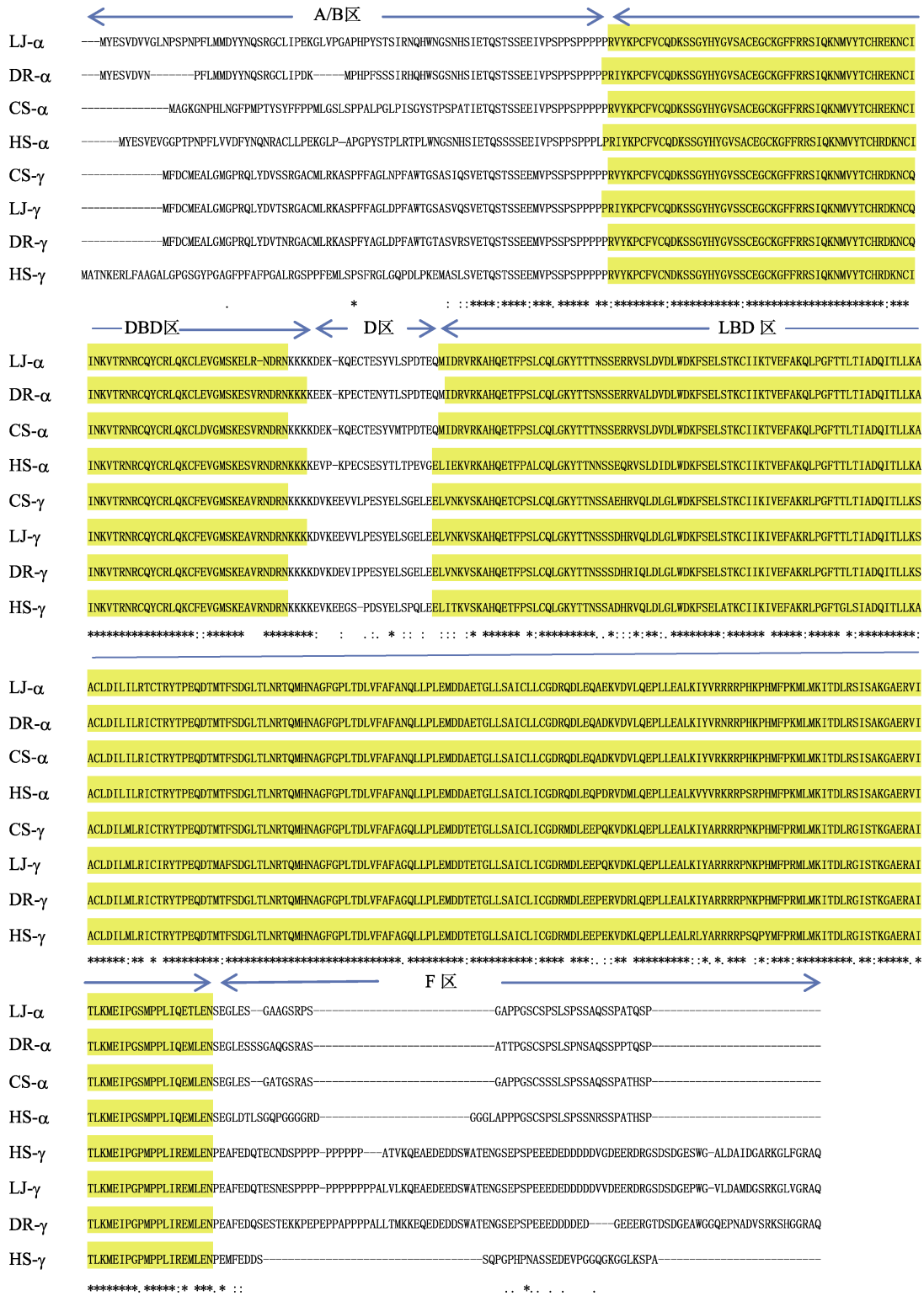


图 4 半滑舌鲷与其他物种的 RAR 氨基酸序列比较

Fig.4 Comparison of the amino acid sequences of *C. semilaevis* RAR and other species

“\*”表示一致的氨基酸; “.”表示高度保守度的氨基酸; “:”表示低保守度的氨基酸; 阴影部分表示 DBD 和 LBD 功能结构域; RAR 氨基酸序列号见表 2; CS: 半滑舌鲷; DR: 斑马鱼 LJ: 鲈鱼; HS: 人 Asterisks (\*) indicated identical amino acid sequences; Dot (.) indicated highly conserved amino acid sequences; Dot (:) indicated amino acid sequences of low degree conserved; GenBank accession numbers were shown in Tab.2. The shadow part represents the DBD and LBD functional domains  
CS: *Cynoglossus semilaevis*; DR: *Danio rerio*; LJ: *Lateolabrax japonicus*; HS: *Homo sapiens*

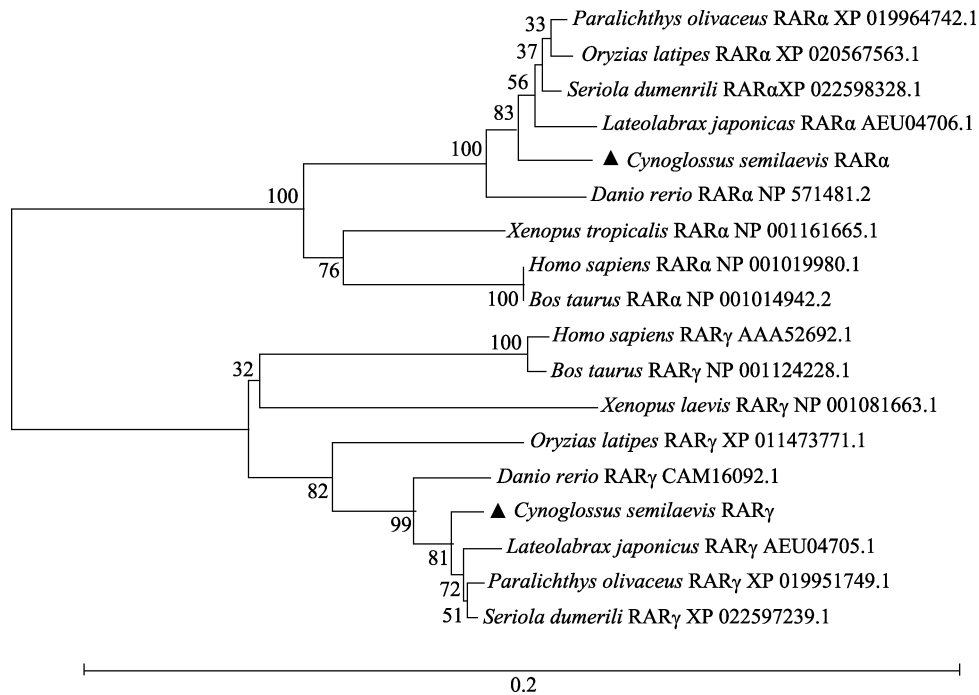


图 5 基于 RAR 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.5 NJ phylogenetic tree based on RAR amino acid sequences

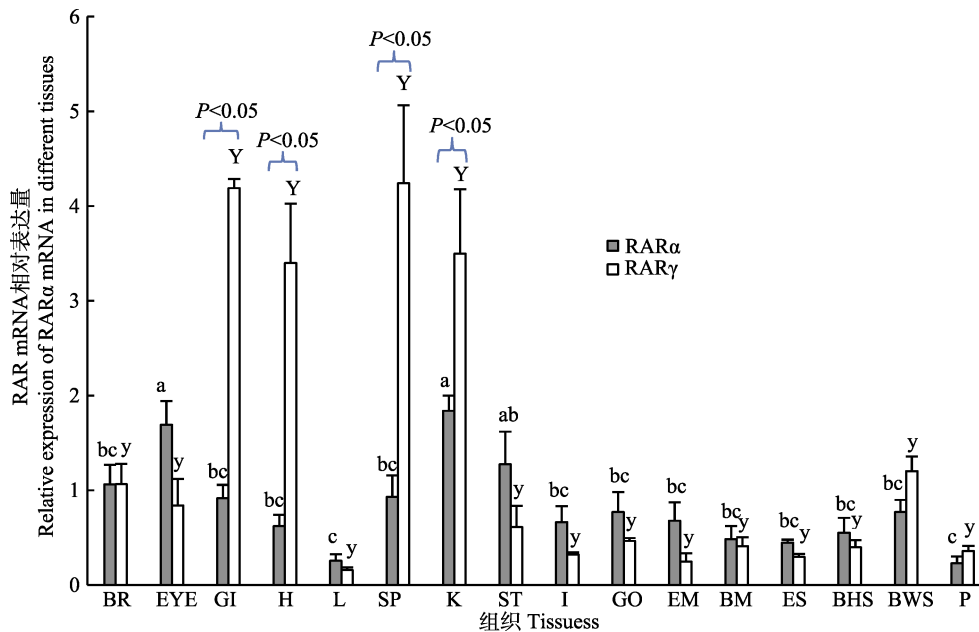


图 6 半滑舌鳎 RAR mRNA 在不同组织中的相对表达量

Fig.6 Relative expression of RAR mRNA in different tissues of *Cynoglossus semilaevis*

BR: 脑; EYE: 眼; GI: 鳃; H: 心脏; L: 肝脏; SP: 脾脏; K: 肾脏; ST: 胃; I: 肠; GO: 性腺; EM: 有眼侧肌肉; BM: 无眼侧肌肉; ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤; BWS: 无眼侧白皮肤; P: 垂体。不同组织表达差异分析中 Y 和 y 字母代表单独分析 RARγ 的 2 个显著差异集合, RARα 单独分析使用 a、b、c, 代表 3 个显著差异集合, 同一组织 2 种基因表达显著差异 ( $P < 0.05$ ) 用大括号表示, 下同

B: Brain; EYE: Eye; GI: Gill; H: Heart; L: Liver; SP: Spleen; K: Kindey; ST: Stomach; I: Intestine; GO: Gonad; EM: Eye-side muscle; BM: Blind-side muscle; ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side hypermelanosis skin; BWS: Blind-side white skin; P: Pituitary. In different tissue expression analysis, Y and y letters represent two distinct different sets of RARγ analysis separately, RARα analysis alone, a, b and c represent three significant different sets. The significant difference in the expression of two genes in the same tissue is expressed in braces ( $P < 0.05$ ), the same as below

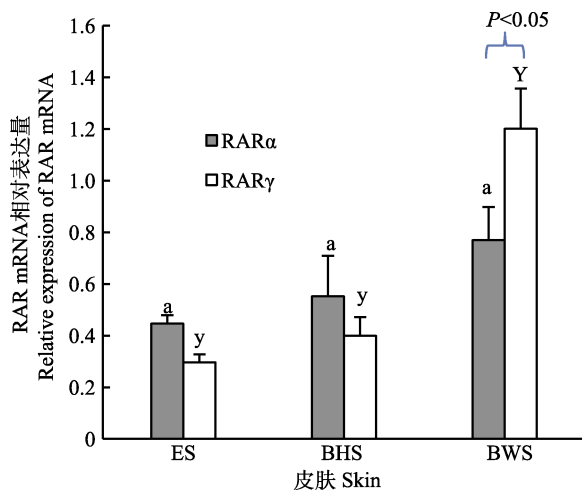


图 7 半滑舌鳎 RAR mRNA 在皮肤组织中的相对表达量

Fig.7 Relative expression of RAR mRNA in the skin of *Cynoglossus semilaevis*

ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤;

BWS: 无眼侧白皮肤

ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side hypermelanosis skin;

BWS: Blind-side white skin

脊椎动物一致, 半滑舌鳎 RAR 具备 A~F 共 6 个功能域, 在进化过程中高度保守, 其中, C 区最为保守, 具有锌指结构功能的为 DBD 区。E 区在配体结合中起辅助作用, 形成疏水氨基酸残基。D 区作为铰链连接 DBD 和 LBD (Leid *et al*, 1992)。同源性分析表明, 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  的氨基酸序列与牙鲆的同源性最高, 达 97%, 与其他鱼类、两栖类、爬行类、啮齿类和人的氨基酸同源性也处于较高水平, 表明其在进化过程中保守性较强。同时, 本研究显示, 半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  的氨基酸同源性达 60.8%, 但在进化树上属于 2 个不同的进化分支, 表明在进化过程中 2 种 RAR 受体基因出现了进化差异。

本研究发现, 半滑舌鳎 2 种 RAR 基因 mRNA 在所有检测组织中均有表达, 表明其均具有广泛的生理作用。RAR $\alpha$  mRNA 在肾脏中表达量最高, 表明肾脏可能为其主要靶器官, 而同时在眼、脑和胃中的表达量高于其他组织, 表明 RAR $\alpha$  在这些组织器官的生理功能中都可能起重要的调控作用, 这种组织表达分布特征与斑马鱼 (Joore *et al*, 1994)、鲈鱼 (钱云霞等, 2012) 以及哺乳动物 (Meng *et al*, 2011) RAR $\alpha$  的组织表达特性相似。另外, 半滑舌鳎 RAR $\gamma$  mRNA 的主要靶器官为脾脏和鳃, 同时, 在心脏和肾脏中均有高表达量, 表明 RAR $\gamma$  主要在这些器官中起重要的表达调控作用。2 种 RAR 受体 mRNA 都在肾脏中具有高表达, 推测肾脏可能是 RA/RAR 信号通路的重要作用靶点, 具体作用方式有待于下一步深入研究。对虹鳟 (*Oncorhynchus*

*mykiss*) 的研究结果表明, 鳃是 RAR 的主要表达器官, 推测与其较高的新陈代谢速率有关, 也可能与 RAR 调节细胞生长与凋亡功能相关 (Alsop *et al*, 2001)。本研究也发现, 鳃中 2 种 RAR 受体基因的表达量较高, 但其具体的生理功能有待于进一步研究。在对鸡 (*Gallus gallus*) 的 RAR $\gamma$  研究中, 发现鸡与哺乳动物有相似的表达特异性, 即 RAR $\gamma$  表达高度限制在皮肤中 (Michaille *et al*, 1994), 然而, 半滑舌鳎 RAR 表达在皮肤和肌肉相对其他组织较少, 这种组织分布的差异主要可能是由种的差异引起的。

本研究中, 比较了有眼侧皮肤、无眼侧白皮肤和无眼侧黑化皮肤中 2 种 RAR 基因 mRNA 的表达情况和两者的相互关系, 发现在正常有眼侧皮肤中和在无眼侧黑化皮肤中 RAR $\alpha$  的表达略高于 RAR $\gamma$ , 而在无眼侧未发生黑化的皮肤中, RAR $\gamma$  的表达却显著高于 RAR $\alpha$ 。先前对半滑舌鳎色素细胞的研究表明, 黑色素与虹彩细胞等的数量分布以有眼侧皮肤中最多, 无眼侧黑化皮肤中其次, 而无眼侧白皮肤中无黑色素细胞分布 (史学营等, 2015)。这种不同状态的皮肤组织中 RAR 转录产物表达与黑色素细胞分布的关系表明, RAR $\gamma$  与 RAR $\alpha$  均参与了半滑舌鳎皮肤组织中黑色素细胞的生长发育与分布调控过程, 但其在皮肤组织中黑色素细胞的形成方面具有差异表达调控作用。与 RAR $\gamma$  相比, RAR $\alpha$  与皮肤中黑色素细胞的生长及数量分布调控可能具有更为密切的关系。今后应结合鲆鲽类黑色素相关基因 (如 MCH、MCHR、POMC 等) 的表达和作用机理进行深入研究, 探讨它们之间的相互作用关系。

在牙鲆研究中, RARs 与配体 ATRA 结合作用于苗种骨骼变态和体色沉着 (Haga *et al*, 2003)。Shao 等 (2017) 通过转录组研究发现, 牙鲆和半滑舌鳎有眼侧皮肤 ATRA 和 9-cis-RA 浓度均高于无眼侧皮肤, 但两侧皮肤中 RAR 和 RXR 的基因表达没有明显差异。本研究未能测定不同类型皮肤中的 RAR 配体浓度, 是否是配体浓度梯度的差异导致受体基因表达量的差异有待于今后深入研究。结合本研究 RAR 在皮肤中的分布, 推测半滑舌鳎 RAR 可能与黑色素细胞的发育及分布具有不同的关系。已有研究证明, 在斑马鱼中存在 RAR $\alpha$ -a 和 RAR $\alpha$ -b 亚型 (Hale *et al*, 1993), 而半滑舌鳎基因组预测其具有 RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  和 RAR $\gamma$  三种亚型, 同时, 每一种亚型又有数种不同的分子形式 (Chen *et al*, 2014), 开展 RAR 基因在不同组织器官中的表达特征和可能的生理功能研究有助于阐明 RA/RAR 系统在无眼侧黑化发生的机理。本研究中, 还发现半滑舌鳎 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  mRNA 在肾脏、脾

脏、脑、眼、胃、无眼侧白皮肤、性腺等组织中同时具有高表达,且在不同的组织中 2 种受体基因表达量不同,表明半滑舌鳎 2 种 RAR 基因在不同的组织中生理功能不同。Shao 等(2017)在成年牙鲆两侧皮肤中发现,感光视蛋白对光照刺激有应答反应,在光刺激下会影响配体 RA 在体两侧的浓度差,作用于 RA/RAR 系统导致无眼侧发生黑化。工厂化养殖环境中发现,幼鱼通过补充 RAR 的配体 RA 控制了鲆鲽类有眼侧无黑色素沉着现象(白化),而过量的 RA 补充却会导致无眼侧黑色素沉着过多(黑化)(Miwa *et al.*, 1999)。研究发现,改变光照(Shao *et al.*, 2017)、铺沙(Estevez *et al.*, 2001)、栖息环境颜色(Takahashi *et al.*, 2004)和养殖密度(Bolker *et al.*, 2000)等也会影响无眼侧黑色素沉着,且这些外源刺激都与摄食 RA 或通过眼和皮肤的感光视蛋白接收刺激产生 RA,从而调控 RAR 表达,并最终作用于鲆鲽类的体色沉着有一定关系。Isojima 等(2014)研究表明,鲆鲽类体色发生与分布受到多种基因表达调控。深入开展 RA/RAR 系统对体色的调控作用及其信号通路的系统研究将有助于揭示半滑舌鳎无眼侧黑化的分子调控机制。

## 参 考 文 献

- Alsop D, Brown S, Kraak GVD. Development of a retinoic acid receptor-binding assay with rainbow trout tissue: Characterization of retinoic acid binding, receptor tissue distribution, and developmental changes. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 123(3): 254–267
- Bolker JA, Hill CR. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(5): 1029–1052
- Brand N, Petkovich M, Krust A, *et al.* Identification of a 2nd human retinoic acid receptor. *Nature*, 1988, 332(6167): 850–853
- Budhu AS, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Molecular & Cellular Biology*, 2002, 22(8): 2632–2641
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*, 1996, 10(9): 940–954
- Chen SL, Zhang GJ, Shao CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB Journal*, 1991, 5(14): 2924–2933
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Composition and quantity distribution of the Bohai Sea fish species. *Marine Fisheries Research*, 1988(9): 11–89 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. *海洋水产研究*, 1988(9): 11–89]
- Erkelens MN, Mebius RE. Retinoic acid and immune homeostasis: A balancing act. *Trends in Immunology*, 2017, 38(3): 168–180
- Estevez A, Kaneko T, Seikai T, *et al.* Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism. *Aquaculture*, 2001, 202(1): 131–143
- Faehnrich B, Lukas B, Humer E, *et al.* Phytogetic pigments in animal nutrition: Potentials and risks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(5): 1420–1430
- Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T, *et al.* A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2003, 221(1): 381–392
- Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T, *et al.* Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science*, 2002, 19(10): 1105–1112
- Hale LA, Tallafuss A, Yan YL, *et al.* Characterization of the retinoic acid receptor genes RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  during zebrafish development. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(5): 546–555
- Hallenbeck PL, Marks MS, Lippoldt RE, *et al.* Heterodimerization of thyroid hormone (TH) receptor with H-2RIIBP (RXR beta) enhances DNA binding and TH-dependent transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1992, 89(12): 5572–5576
- Herget T, Specht H, Esdar C, *et al.* Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line. *Journal of Neurochemistry*, 1998, 70(1): 47–58
- Ignacio F, Matas P, Juanb OD, *et al.* Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 2009, 295(3–4): 250–265
- Isojima T, Tagawa M. Transplantation of pigmented and non-pigmented scales into the ocular and blind sides of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, suggesting the presence of ocular-side characteristic inducer in pigmented scales. *Fisheries Science*, 2014, 80(5): 1027–1035
- Jones BB, Ohno CK, Allenby G, *et al.* New retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-cis retinoic acid. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(10): 5226–5234
- Joore J, van der Lans GB, Lanser PH, *et al.* Effects of retinoic acid on the expression of retinoic acid receptors during zebrafish embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 1994, 46(2): 137–150
- Kliwier SA, Umesono K, Noonan DJ, *et al.* Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling



- pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 1992, 358(6389): 771–774
- Leid M, Kastner P, Chambon P, *et al.* Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, 1992, 17(10): 427–460
- Leng XJ. Research advance in vitamin nutrition of aquatic animals. *Feed Industry*, 2017, 38(16): 1–6 [冷向军. 水产动物维生素营养研究进展. *饲料工业*, 2017, 38(16): 1–6]
- Lewis-McCrea LM, Lall SP. Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity, and lipid peroxidation on skeletal abnormalities in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(2): 334–343
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17–24 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17–24]
- Liu XZ, Zhuang ZM. Reproduction biology and culture technology of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Beijing: China Agriculture Press, 2014, 1–10 [柳学周, 庄志猛. 半滑舌鳎繁育理论与养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 2014, 1–10]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Martinez GM, Baron MP, Bolker JA. Skeletal and pigmentation defects following retinoic acid exposure in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38(3): 353–366
- Meng QY, Chen XN, Zhao J, *et al.* Distribution of retinoic acid receptor- $\alpha$  immunoreactivity in the human hypothalamus. *Neuroscience*, 2011, 174: 132–142
- Michaille JJ, Blanchet S, Kanzler B, *et al.* Characterization of cDNAs encoding the chick retinoic acid receptor gamma 2 and preferential distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during chick skin development. *Developmental Dynamics*, 1994, 201(4): 334–343
- Miwa S, Yamano K. Retinoic acid stimulates development of adult-type chromatophores in the flounder. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 1999, 284(3): 317–324
- Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996, 80(3): 52–62
- Qian YX, Han L, Tong CH, *et al.* Retinoic acid receptor  $\alpha$  and retinoic acid receptor  $\gamma$  in *Lateolabrax japonicus*: cDNA cloning and gene expression analysis. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2012, 24(4): 712–721 [钱云霞, 韩柳, 童彩环, 等. 鲈鱼视黄酸受体 $\alpha$ 和视黄酸受体 $\gamma$  cDNA克隆和基因表达分析. *动物营养学报*, 2012, 24(4): 712–721]
- Shao CW, Chen SL, Bao BL, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119–124
- Shi XY, Liu XZ, Shi Y, *et al.* Molecular characterization of *MCHR* and its correlation with blind-side hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 91–102 [史学营, 柳学周, 石莹, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素聚集素受体(*MCHR*)表达特性及其与无眼侧黑化的关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 91–102]
- Shi XY, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54 [史学营, 柳学周, 徐永江, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45–54]
- Takahashi A, Tsuchiya K, Yamanome T, *et al.* Possible involvement of melanin concentrating hormone in food intake in a teleost fish, barfin flounder. *Peptides*, 2004, 25(10): 1613–1622
- Xu YJ, Zhu XW, Liu XZ, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 81–90 [徐永江, 朱学武, 柳学周, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 81–90]
- Zhang JL, Zuo ZH, Zhu WW, *et al.* Sex-different effects of tributyltin on brain aromatase, estrogen receptor and retinoid X receptor gene expression in rockfish (*Sebastes marmoratus*). *Marine Environmental Research*, 2013, 90(3): 113–118
- Zhou WD, Wang LL, Zhou LB, *et al.* All-trans retinoic acid upregulates the expression of ciliary neurotrophic factor in retinal pigment epithelial cells. *Cell Biochemistry and Function*, 2017, 35(4): 202–208
- Zhu XW, Xu YJ, Liu XY, *et al.* In vitro expression and bioactivity analysis of melanin concentration hormone from *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1595–1605 [朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鳎黑色素聚集激素重组制备与生物活性分析. *水产学报*, 2016, 40(10): 1595–1605]



## Molecular Cloning and Spatial Expression of Two Retinoic Acid Receptors RARalpha and RARgamma from *Cynoglossus semilaevis*

SONG Xuesong<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>1</sup>, LIU Xuezhou<sup>1</sup>①, SHI Bao<sup>1</sup>,  
WANG Bin<sup>1</sup>, LIU Yongshan<sup>1,2</sup>, ZHANG Yaxing<sup>1,2</sup>

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

**Abstract** Two retinoic acid receptors, RARalpha and RARgamma, were cloned from *Cynoglossus semilaevis* using RT-PCR and RACE methods, and their spatial expression patterns were investigated using a quantitative PCR assay. The results showed that full-length cDNA sequence encoding the RARalpha gene is 1823 bp in length, its open reading frame (ORF) length is 1332 bp, encoding 443 amino acids; the RARgamma cDNA sequence is 1959 bp in length, and the length of ORF is 1497 bp, encoding 489 amino acids. Homology analysis showed that *C. semilaevis* RARalpha and RARgamma have homology identity of 60.8%, and both have 97% homology identity with the Japanese flounder. Phylogenetic analysis showed that *C. semilaevis* RARalpha and RARgamma clustered into a separate branch with other fish counterparts. Spatial expression analysis showed that the highest expression level of RARalpha mRNA occurred in the kidney, whereas the highest expression level of RARgamma mRNA was in the spleen. RARgamma was also highly expressed in the gill, kidney, and heart. Furthermore, RARalpha and RARgamma mRNA expression were detected in all examined tissues, which indicated that these two retinoic acid receptors were both involved in multiple physiological regulation processes. In addition, the differential expression of these two RAR genes were found in the blind side and ocular skins, wherein they both had highest expression levels in the normal blind side skin, followed by the blacking blind side skin and had the lowest expression levels in the ocular side skin. In ocular skin and blind-side blacking skin, the RARalpha expression levels were higher than RARgamma but without significant difference, wherein in blind-side normal skin, the RARgamma expressed significantly higher than RARalpha. This differential expression pattern indicated that they might play important physiological roles in blind-side hypermelanosis regulation of *Cynoglossus semilaevis*.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis*; Retinoic acid receptor; Gene cloning; Expression pattern; Hyperpigmentation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171012001

http://www.yykyjz.cn/

周朝伟, 胡续雯, 雷骆, 刘晓庆, 任胜杰, 杨旻珉, 曹高祥, 陈国梁, 邓星星, 李岩, 李路宽. 热应激对银鲫生化指标和 *HSP70* mRNA 表达的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 65–71

Zhou CW, Hu XW, Lei L, Liu XQ, Ren SJ, Yang MM, Cao GX, Chen GL, Deng XX, Li Y, Li LK. Effects of heat stress on biochemical indices and *HSP70* mRNA expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 65–71

# 热应激对银鲫生化指标和 *HSP70* mRNA 表达的影响\*

周朝伟<sup>#①</sup> 胡续雯<sup>#</sup> 雷 骆 刘晓庆 任胜杰 杨旻珉  
曹高祥 陈国梁 邓星星 李 岩 李路宽

(西南大学动物科学学院水产系 重庆 402460)



**摘要** 本研究旨在探讨热应激对银鲫(*Carassius auratus gibelio*)生化指标及肝脏 *HSP70* mRNA 表达的影响, 选取平均体重为(72.8±10.1) g 的银鲫, 分别在热应激前(25℃, 对照组)、热应激后(32℃, 0 h、2 h、6 h、10 h)和恢复适温后 6 h(25℃, 恢复组)的条件下, 测定机体血浆乳酸(LD)、血浆葡萄糖(Glu)、肝糖原(Gly)、己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)和肝脏 *HSP70* mRNA 表达量变化。研究表明, 实验组乳酸含量从热应激开始至恢复期, 差异始终不显著( $P>0.05$ ); 实验组血浆葡萄糖水平在热应激后 0 h、2 h、6 h, 极显著高于对照组( $P<0.01$ ); 实验组肝糖原水平在热应激 0 h 时, 极显著高于对照组( $P<0.01$ ), 其余时间点差异不显著( $P>0.05$ ); 己糖激酶活力在热应激后 2 h, 显著高于对照组( $P>0.05$ ); 丙酮酸激酶活力在热应激后 6 h, 极显著高于对照组( $P<0.01$ ); 热应激后 2 h, 肝脏中 *HSP70* mRNA 表达量达到最高( $P<0.01$ ), 恢复至适温后, 表达量与应激前无差异( $P>0.05$ )。本研究为进一步探究银鲫的高温应激作用机制及调控机理提供参考数据, 同时, 也为银鲫养殖和育种等生产实践提供相应参考依据。

**关键词** 银鲫; 热应激; 生化指标; *HSP70*

中图分类号 Q344<sup>+</sup>.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)06-0065-07

应激是一种常见的动物生理状态, 是动物机体对外界环境或自身内部产生异常刺激时做出的各种生理应答反应的总和(李红军等, 2006)。生活在水中的鱼类, 容易受到水环境变化的刺激, 主要的环境因子包括水温、溶解氧、盐度、氨和重金属离子等, 其中, 水温是重要的因素之一。当养殖环境的温度高于或低于最适生长温度时, 会引起一系列的生理或病理变

化, 导致血液中各项生理生化指标改变, 此时, 可通过测定生化指标来反映机体代谢和健康状况(宁军号等, 2017)。温海深等(2016)研究发现, 急性高温胁迫可以引起许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)机体血清中的皮质醇、葡萄糖和蛋白等指标变化。邵彦翔等(2017)发现, 水温变化会引起云龙石斑鱼(*Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)血清总胆固醇和

\* 中央高校基本科研基金(XDJK2016C047)资助[This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2016C047)]

#并列第一作者: 周朝伟, E-mail: zcwzq666@163.com; 胡续雯, E-mail: 2312669206@qq.com

① 通讯作者: 周朝伟, E-mail: zcwzq666@163.com

收稿日期: 2017-10-12, 收修改稿日期: 2017-11-25

葡萄糖等指标变化。何福林等(2007)研究发现,水温变化会使虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的红细胞、血红蛋白和血糖等指标改变。黄正澜懿等(2016)研究发现,热应激会引起齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenati*)髓过氧化物酶和谷草转氨酶等的改变。热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是一类在进化上高度保守的蛋白,广泛存在于生物体中。研究表明,应激诱导表达热应激蛋白与生物体的适应能力有重要的相关性(刘秀荣, 2015; 生安志等, 2016)。热休克蛋白 70 (HSP70), 作为目前研究最广泛的和最保守的一族热休克蛋白(Basu *et al.*, 2002), 能在应激情况下迅速合成, 并对应激产生保护耐受作用(Morimoto, 1993)。近年来, 鱼类 HSP70 在各种应激条件下的表达情况受到广泛关注。

银鲫(*Carassius auratus gibelio*), 俗称鲫瓜子或红鲫, 鲫的近缘亚种。隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)(马波等, 2013), 是一种重要的经济鱼类, 主要分布于欧、亚大陆的温带水域, 其经济性状、适应能力都优于鲫鱼(*Carassius auratus*)。目前, 银鲫在我国养殖范围广, 市场需求旺盛、价格稳定、养殖效益明显。在生产实践中, 鱼类应对环境胁迫如高温、高密度、缺氧和细菌等的能力存在种间特异性。本研究分析了持续热应激对银鲫血浆葡萄糖、血浆乳酸等生化指标及 HSP70 mRNA 表达的影响, 旨在为探究银鲫高温应激作用机制及调控机理提供参考数据, 为进一步探究鱼类应激研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与设计

实验动物购自重庆市荣昌区双河鱼技中心, 挑选体格健康、大小均匀的银鲫 300 尾, 平均体重为(72.8±10.1) g。用 4% 的食盐水浸泡 10 min 后, 随机平均放入 6 个已消毒的室内玻璃缸(130 cm×55 cm×55 cm)内, 暂养驯化 1 个月, 水温为(25±1)°C, 饲料采用通威 152 饲料(粗蛋白 32%), 每天投喂 2 次(09:00 和 17:00)。

### 1.2 实验设计及样品采集

本研究设置(25±1)°C 的常温对照组、(32±1)°C 的高温热应激实验组和(25±1)°C 的高温热应激后恢复至常温的实验组, 每组设 3 个重复, 每个重复 50 尾鱼。实验期间, 于 25°C 随机选取 4 尾鱼作为空白对照, 3 个实验缸采用加热棒(加热棒的最高温度为 32°C), 以 3°C/h(经过预实验表明, 3 个加热棒每小时

能提高 3°C)的升温速度使水温升至 32°C, 在温度达 32°C 后(温度保持在 32°C 不变)的 0 h、2 h、6 h、10 h, 每个缸各采集 4 尾鱼作为不同时间点的热应激组, 3 个实验缸中剩余样本快速使用冰袋降温至 25°C, 6 h 后, 从每个缸中随机取 4 尾作为恢复组。采样时, 将鱼投入浓度为 40 mg/L 的丁香酚水溶液快速深度麻醉, 静脉取血, 置于有肝素抗凝剂的 EP 管中, 4°C、3000 r/min 离心 10 min, 制备血浆, 收集上清液, 保存于-80°C。采血后解剖, 取约 100 mg 肝胰脏, 冻存于液氮中。

### 1.3 生化指标的测定方法

取-80°C 保存的血浆, 使用南京建成生物工程研究所试剂盒, 比色法测定乳酸浓度、己糖激酶活力和丙酮酸激酶活力; 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定血浆葡萄糖浓度; 蒽酮法测定肝糖原含量。

### 1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

**1.4.1 RNA 提取及反转录** Trizol 法提取总 RNA, 用紫外分光光度计确定 RNA 浓度及 OD 值, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。参照反转录试剂盒说明书(TaKaRa, 大连)进行反转录。

**1.4.2 引物设计与合成** 银鲫与鲫鱼具有高同源性, 依据 GenBank 公布的鲫鱼 HSP70 (GenBank 序列号为 AB092839.2)和  $\beta$ -actin mRNA 全序列(GenBank 序列号为 AB039726), 使用软件 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物: HSP70 F, 5'-TGATGGAGGGAAGCC-GAAAG-3'; HSP70 R, 5'-GAAATAGGCAGGAACTG-TGAT-3';  $\beta$ -actin F, 5'-ATGCGGAACTGGAAAGG-3';  $\beta$ -actin R, 5'-TGAGGGCAGAGTGGTAGA-3'。引物由华大基因科技股份有限公司合成。

**1.4.3 qRT-PCR 反应** 采用 SYBR Green (TaKaRa, 大连)染料法, 参照荧光定量说明书(Bio-Rad)进行。对 PCR 产物进行熔解曲线分析, 同时, PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性。以 1 个样品的 cDNA 为模板, 进行 10 倍梯度稀释, 分别取每个数量级稀释液 2  $\mu$ l 作为模板进行 qRT-PCR。反应体系为 (25  $\mu$ l): Premix Ex Taq (2 $\times$ ), 12.5  $\mu$ l; 上下游引物各为 0.5  $\mu$ l; 无菌水 9.5  $\mu$ l; cDNA 模板 2  $\mu$ l。反应程序: 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 45 个循环。每个样品设 3 个重复, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。

### 1.5 数据统计分析

实验中所涉及的数据均用平均值±标准差(Mean±

SD)表示, 采用 SPSS 21.0 软件处理实验数据。在经过方差同质性检验后, 使用单因方差分析(One-way ANOVA)对数据进行分析,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 热应激对血浆乳酸的影响

热应激后 0 h, 血浆中乳酸含量升高并达最大值(图 1), 随着时间的增加, 乳酸含量在热应激后 2 h、6 h、10 h 逐渐降低, 10 h 时, 乳酸含量显著低于热应激后 0 h ( $P < 0.05$ ), 恢复至适温 6 h 后, 恢复组血浆乳酸含量与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

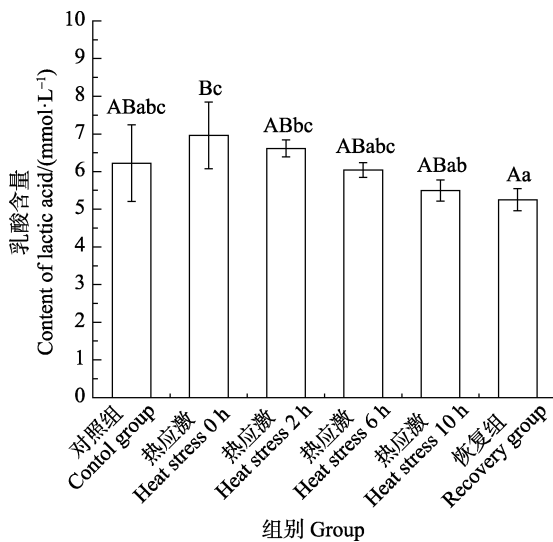


图 1 热应激对血浆乳酸含量的影响

Fig.1 The effects of heat stress on the content of lactic acid 不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ),

不同大写字母代表差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同  
Different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ), different capital letters mean highly significant difference ( $P < 0.01$ ), the same as below

### 2.2 热应激对血浆葡萄糖的影响

与对照组相比, 热应激后 0 h、2 h、6 h 和 10 h 的血浆葡萄糖含量升高(图 2), 且在 0 h、2 h 和 6 h 极显著高于热应激前 ( $P < 0.01$ ), 恢复至适温 6 h 后, 恢复组血浆葡萄糖含量与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 热应激对肝糖原的影响

热应激后 0 h, 肝糖原含量极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 热应激后 2 h 和 10 h 低于热应激后 0 h, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 但与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

恢复至适温 6 h 后, 肝糖原含量低于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

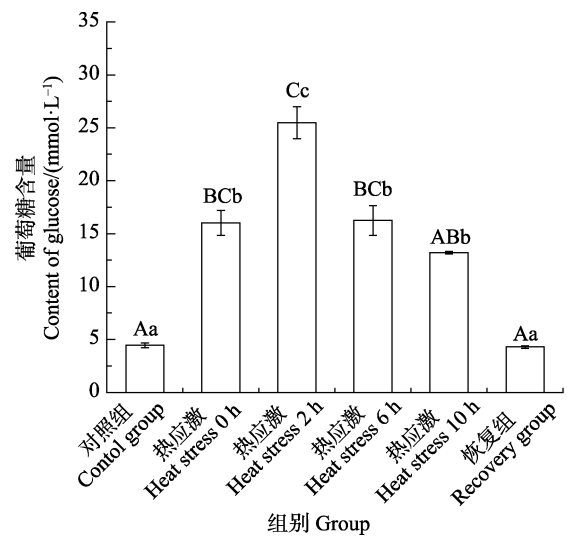


图 2 热应激对血浆葡萄糖含量的影响

Fig.2 The effects of heat stress on the content of glucose

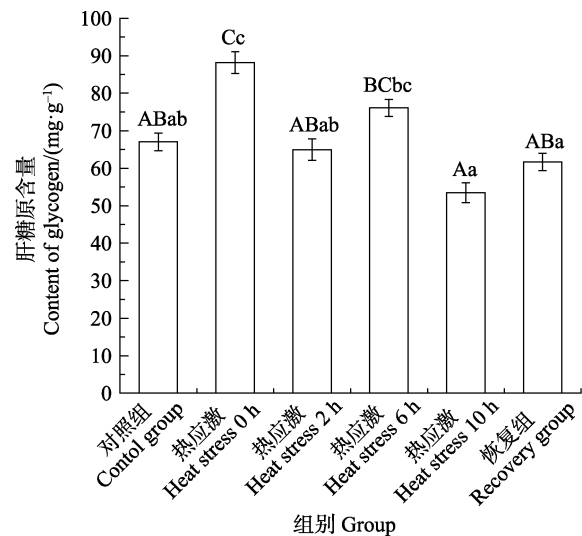


图 3 热应激对肝糖原含量的影响

Fig.3 The effects of heat stress on the content of glycogen

### 2.4 热应激对己糖激酶活力的影响

己糖激酶活力在热应激后 2 h 达到最大值(图 4), 显著高于应激前 ( $P < 0.05$ ); 热应激后 6 h, 仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ). 恢复后 6 h, 恢复组己糖激酶活力与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 热应激对丙酮酸激酶活力的影响

热应激处理后, 丙酮酸激酶活力呈下降趋势(图 5)。热应激后 2 h, 丙酮酸激酶活力低于对照组,

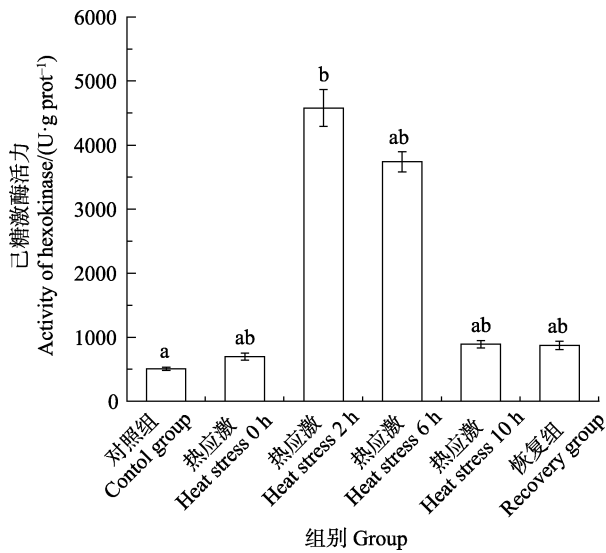


图4 热应激对己糖激酶活力的影响

Fig.4 The effects of heat stress on hexokinase activity

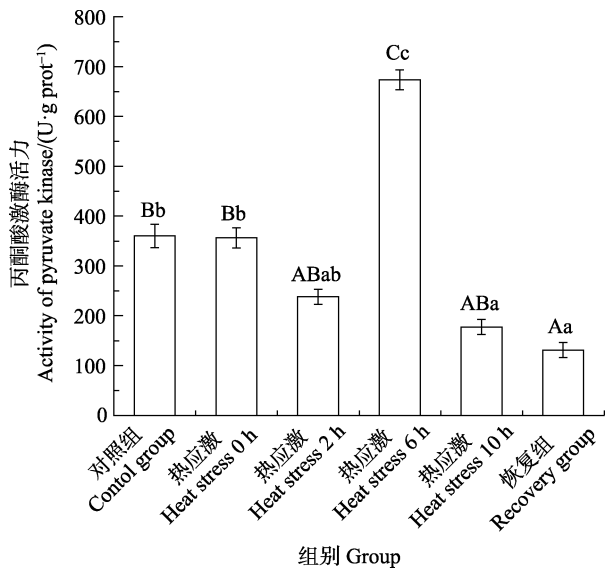


图5 热应激对丙酮酸激酶活力的影响

Fig.5 The effects of heat stress on pyruvate kinase activity

但差异不显著( $P>0.05$ ),而后逐渐升高,在热应激后6 h达到最大值,极显著高于对照组( $P<0.01$ );恢复适温6 h时,恢复组丙酮酸激酶活力低于对照组,且差异极显著( $P<0.01$ )。

## 2.6 热应激对肝脏中HSP70 mRNA表达量的影响

银鲫遭受热应激时,肝脏中HSP70 mRNA表达量升高(图6),热应激2 h后表达量达到最高,为对照组的1.96倍,差异极显著( $P<0.01$ ),热应激6 h后仍极显著高于对照组( $P<0.01$ );恢复适温6 h后,恢复组HSP70 mRNA表达量略高于对照组,但差异不显著( $P>0.05$ )。

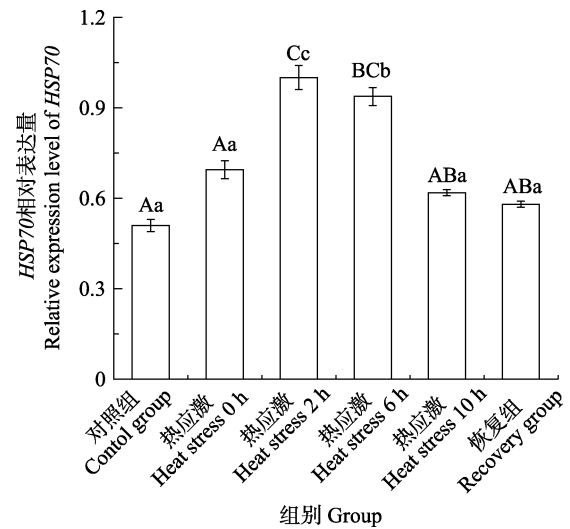


图6 热应激对银鲫HSP70 mRNA表达的影响

Fig.6 The effect of heat stress on HSP70 mRNA expression in *C. auratus gibelio*

## 3 讨论

### 3.1 热应激对银鲫血浆生理指标的影响

乳酸是机体无氧代谢的产物(邹思湘, 2012),本研究中,热应激后,银鲫的血浆乳酸含量先升高,后逐渐降低,说明机体在热应激后首先会进行无氧运动,然后机体进行自身代谢调整,减缓无氧运动,刘凤华等(2002)对仔鸡(*Gallus gallus*)的研究结果也支持这一论点。另外,热应激初期,银鲫运动较为剧烈,随后逐渐平静,此时,乳酸浓度也随运动剧烈程度先升高后降低,说明鱼类血浆乳酸的浓度与其应激后的活动强度有关(Fanouraki *et al*, 2011),这与Vijayan (1992)和Vijayan等(1997)对应激条件下莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis spp*)和虹鳟的研究结果一致。应激反应是一种耗能过程,会导致血浆葡萄糖水平的变化,因此,葡萄糖水平常被作为可靠的生理应激指标之一(Silbergeld, 1974; Sun *et al*, 1992)。热应激处理后,乳酸含量升高时,糖原降低;接着乳酸含量降低,血浆葡萄糖含量增加;随后肝糖原降低,葡萄糖继续升高,说明鱼类机体代谢水平易受外界温度的影响,随着温度的升高,银鲫体内物质代谢逐渐加快,导致糖的利用率加快,糖原等转化成葡萄糖的速率也加快,从而使得血浆葡萄糖的浓度显著升高,此研究结果与Hyndman等(2003)的研究结果一致。随着热应激时间延长,血浆葡萄糖含量逐渐降低,机体代谢虽减缓但仍在继续,这是由于垂体-肾上腺皮质激素(ACTH)能对热应激生理过程起到一定的调节作用(王启军等, 2006),如糖异生作用加强,维持血浆葡萄糖

糖恒定。同时,肝糖原表达量在热应激后先降低再升高,最后逐渐降低,说明肝糖原是应激过程中的重要能量物质。热应激后,肝糖原含量降到最低时,血浆中葡萄糖却显著升高,说明糖原是鱼体内糖的主要储存形式,是鱼类应激反应的重要能量来源,应激后,鱼体可通过分解肝糖原来提供血糖,Wendelaar Bonga (1997)对热应激后鱼类机体的研究也与上述结论相符。

己糖激酶和丙酮酸激酶是糖酵解反应过程中的关键酶,其活性的变化对机体血糖水平具有重要影响,己糖激酶和细胞膜上葡萄糖转运蛋白功能相互偶联,影响机体细胞内葡萄糖流量和代谢(Allert *et al.*, 1991)。丙酮酸激酶可通过调节细胞中 ATP、ADP 和糖酵解的中间产物,来控制糖酵解速率(邹思湘, 2012)。机体内主要供能的是葡萄糖,并且葡萄糖的流量与己糖激酶活力紧密相关(Allert *et al.*, 1991),本研究结果显示,热应激后 0~2 h,己糖激酶活力与葡萄糖含量都显著增加( $P<0.05$ ),变化趋势几乎一致,说明热应激后,机体通过己糖激酶的刺激提高血糖的流量来满足机体的需要,机体葡萄糖的大量消耗,通过糖异生作用来补充。本研究中,热应激后 2 h,银鲫的己糖激酶活力达到最高水平,糖酵解作用加剧,糖异生作用抑制,以维持机体的血糖水平,满足代谢的需要,说明银鲫葡萄糖水平是通过糖酵解和糖异生这 2 个相对立的过程来保持的,Metón(2003)对金头鲷(*Sparus aurata*)的研究也支持这一论点。

丙酮酸激酶(PK)在糖酵解过程中能够起到关键作用(郭彪等, 2008),本研究中,丙酮酸激酶活力在热应激后先降低后升高,说明随着应激时间的增加,耗氧率也会升高,机体供氧不足,糖酵解作用加强。热应激 6 h 时,丙酮酸激酶活力显著高于对照组,这是由于机体的代谢活动减慢,糖酵解作用降低,氧化磷酸化作用加强,致使丙酮酸激酶活力下降,这与郭彪等(2008)对对虾的研究结果一致。恢复组的丙酮酸激酶活力显著低于对照组( $P<0.01$ ),是由于糖酵解作用抑制太大,机体受影响较大,而酶活力的恢复是一个漫长的过程,所以丙酮酸激酶活力无法迅速恢复至正常值。

### 3.2 热应激对肝脏中 HSP70 mRNA 表达量的影响

本研究中,热应激后 HSP70 mRNA 表达量显著增加,并在 2 h 后达到最高,应激后 6 h 和 10 h,表达逐渐降低,恢复后表达量与对照组无差异,此变化趋势与此前报道的其他水生生物研究结果一致,如:鲫鱼在应激后 1 h HSP70 mRNA 表达量有所升高,4 h 时达到最高值后逐渐降低,48 h 降至最初值(苏岭等,

2010); 34℃持续 24 h 热应激团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肝脏中 HSP70 mRNA 相对表达量呈先上升后降低的趋势(Ming *et al.*, 2010); 地中海贻贝(*Mytilus edulis*)在 35℃热激 1 h, 16℃恢复 3 h 后,消化腺 HSP70 mRNA 的含量达到最大值,随后 5~24 h 内逐渐减少(Franzellitti *et al.*, 2005); 虹鳟 RTG-2 细胞在 28℃持续应激 24 h 后,2 种 HSP70 mRNA 的表达量均呈现先上升后降低的趋势,应激后 3 h 表达量达最大值(王艳妮等, 2015); 大正三色锦鲤(*Taisho sanshoku*)32℃应激后 2 h 和 26 h, HSP70 mRNA 的相对表达量与应激前相比显著上升,应激后 6~22 h,相对表达量与应激前无显著差异( $P>0.05$ )(张崇英等, 2012)。以上结果说明,调节热应激蛋白的表达量是机体细胞应对热应激的反应之一(曲凌云等, 2005),瞬时热刺激诱导机体内变性蛋白、异常蛋白量增加,正常状态的蛋白平衡被打破,从而引发一些维持正常生命功能的酶活减弱甚至丧失。HSP70 基因通过相关途径的调节,细胞中 HSP70 mRNA 含量升高,表达的蛋白增加。作为“分子伴侣”,HSP70 结合变性蛋白折叠、装配中的中间产物,促进多肽链向天然构象转变,修复应激给机体带来的损害。应激后恢复时间增长,蛋白质变性现象减少, HSP70 的表达量回落。HSP70 mRNA 表达受热应激调节,从而保护机体内部分功能不受损伤。另有学者指出, HSP70 具有高度保守的序列和在受胁迫后能够大量表达的特性,使其可能成为一种诊断鱼类生理状态的生物指标(祝璟琳等, 2007)。

综上所述,热应激会引起银鲫强烈的应激反应,血浆中乳酸含量、葡萄糖含量、肝糖原含量、己糖激酶活力和丙酮酸激酶活力先升高后恢复,表明机体通过调节以上指标对抗热应激。热应激下 HSP70 基因的表达受热应激调节,诱导表达的 HSP70 使机体具备一定的高温耐受力,对应激起到一定的保护作用。本研究为了解银鲫抗热应激的调控机理提供一定的参考数据,为研究抗热应激预防措施等提供新的思路。

## 参 考 文 献

- Allert S, Ernest I, Poliszczak A, *et al.* Molecular cloning and analysis of two tandemly linked genes for pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 200(1): 19-27
- Basu, N, Todgham AE, Ackerman PA, *et al.* Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 2002, 295(2): 173-183
- Fanouraki E, Mylonas CC, Papandroulakis N, *et al.* Species



- specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(2): 313–322
- Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336(4): 1157–1163
- Guo B, Wang F, Hou CQ, *et al.* Effects of acute temperature fluctuation on HK and PK activity, HSP70 relative content in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(5): 885–889 [郭彪, 王芳, 侯纯强, 等. 温度突变对凡纳滨对虾己糖激酶和丙酮酸激酶活力以及热休克蛋白表达的影响. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 885–889]
- He FL, Xiang JG, Li CJ, *et al.* Preliminary study on the effect of water temperature on hematology indices of rainbow trout. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3): 363–369 [何福林, 向建国, 李常健, 等. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. *水生生物学报*, 2007, 31(3): 363–369]
- Huang ZLY, Chen SJ, Zhang ZS, *et al.* Effects of heat stress on some non-specific immune factors and blood cell apoptosis in *Schizothorax prenati*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(6): 1152–1157 [黄正澜懿, 陈世静, 张争世, 等. 热应激对齐口裂腹鱼非特异性免疫功能及细胞凋亡的影响. *水生生物学报*, 2016, 40(6): 1152–1157]
- Hyndman CA, Kieffer JD and Benfey TJ. The physiological response of diploid and triploid brook trout to exhaustive exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2003, 134(1): 167–179
- Li HJ, Tian XQ, Xu MJ. Recent advance in animal stress research. *Feed Research*, 2006(10): 6–11 [李红军, 田夏清, 徐美娟. 动物应激的研究进展. *饲料研究*, 2006(10): 6–11]
- Liu FH, Wu GJ, Wang ZH, *et al.* Effect on chicken serum biochemical and immune parameters in acute heat-stress. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2002, 17(4): 51–54 [刘凤华, 吴国娟, 王占贺, 等. 热应激对仔鸡血清生化及免疫指标的影响. *北京农学院学报*, 2002, 17(4): 51–54]
- Liu XR. Gene cloning, sequence analysis and cold adaptation studies on *Hsp70* and *Hsp90 $\beta$*  genes from *Chionodraco hamatus* and *Trematomus bernacchii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [刘秀荣. 独角雪冰鱼和伯氏肩孔南极鱼 HSP70 和 HSP90 $\beta$  基因的克隆、序列分析及低温适应性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Ma B, Huo TB, Li J, *et al.* Comparative analysis between two types of female silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* in the Irtys River using morphology and mitochondrial control regions. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 157–165 [马波, 霍堂斌, 李喆, 等. 额尔齐斯河 2 种类型雌性银鲫的形态特征及 D-loop 基因序列比较. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 157–165]
- Metón I, Fernández F and Baanante IV. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 2003, 225(1–4): 99–107
- Ming JH, Xie J, Xu P, *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 407–418
- Morimoto RI. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 1993, 259(5100): 1409–1410
- Ning JH, Qin YB, Hu LC, *et al.* Effects of abrupt and gradual decreases in water temperature on blood physiological and biochemical parameters in dusty rabbit fish *Siganus fuscescens*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(3): 294–301 [宁军号, 秦宇博, 胡伦超, 等. 水温骤降和缓降胁迫对褐篮子鱼血液生理生化指标的影响. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(3): 294–301]
- Qu LY, Xiang JH, Sun XQ, *et al.* Expression analysis of HSP70 in various tissues of *Chlamys farreri* under thermal stress. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(5): 96–100 [曲凌云, 相建海, 孙修勤, 等. 温度刺激下栉孔扇贝不同组织热休克蛋白 HSP70 的表达研究. *高技术通讯*, 2005, 15(5): 96–100]
- Shao YX, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of low temperature stress on serum biochemical indices of the juvenile hybrid of *Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 70–76 [邵彦翔, 陈超, 李炎璐, 等. 低温胁迫对云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 70–76]
- Sheng AZ, Ju HM, Li GY, *et al.* Expression patterns of Hsp90 of *Paralichthys olivaceus* in response to temperature treatment and *Vibrio anguillarum* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 1–8 [生安志, 鞠辉明, 李贵阳, 等. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Hsp90 mRNA 在温度刺激和鳃弧菌感染下的表达特征. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 1–8]
- Silbergeld EK. Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1974, 11(1): 20–25
- Su L, Li SW, Wang D, *et al.* Semi-quantitative RT-PCR method of detection of heat stress on fish liver content of HSP70 mRNA. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(Sup): 100–104 [苏岭, 李绍成, 王荻, 等. 半定量 RT-PCR 方法检测热应激对鲫鱼肝脏中 HSP70 mRNA 含量的影响. *华北农学报*, 2010, 25(Sup): 100–104]
- Sun LT, Chen GR, Chang CF. The physiology responses of tilapia exposed to low temperature. *Journal of Thermal Biology*, 1992, 17(3): 149–153
- Vijayan M. Acute handling stress alter hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1992, 49: 2260–2266
- Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, *et al.* Metabolic responses

- associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 1997, 116(1): 89–95
- Wang QJ, Zhang HF, Lu QP, *et al.* Effect of heat exposure on body fat deposition and some biochemical indices of broiler blood. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2006, 34(9): 1886–1887, 1890 [王启军, 张宏福, 卢庆萍, 等. 热应激对肉仔鸡脂肪沉积及血液生化指标的影响. *安徽农业科学*, 2006, 34(9): 1886–1887, 1890]
- Wang YN, Liu Z, Kang YJ, *et al.* Effects of heat stress on some non-specific immunity parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(5): 634–642 [王艳妮, 刘哲, 康玉军, 等. 热应激对虹鳟部分非特异性免疫指标的影响. *农业生物技术学报*, 2015, 23(5): 634–642]
- Wen HS, Lv LK, Li LM, *et al.* Effect of temperature on physiological and biochemical parameters and gene expression of male *Sebastes schlegelii*. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(11): 44–51 [温海深, 吕里康, 李兰敏, 等. 急性高温胁迫对雄性许氏平鲷血液生理生化及相关基因表达的影响. *中国海洋大学学报*, 2016, 46(11): 44–51]
- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591–625
- Zhang CY, Xing W, Li TL, *et al.* Effects of heat stress on nonspecific immune parameters and *HSP70* gene expression in Taisho Sanke koi (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(3): 336–342 [张崇英, 邢薇, 李铁梁, 等. 热应激对大正三色锦鲤非特异性免疫指标及 *HSP70* 基因表达的影响. *水产学报*, 2012, 36(3): 336–342]
- Zhu JL, Wang GL. The research progress on *HSP70* in fish species. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2007, 20(4): 446–450 [祝璟琳, 王国良. 鱼类 *HSP70* 的研究进展. *宁波大学学报(理工版)*, 2007, 20(4): 446–450]
- Zou SX. *Animal biochemistry*. Beijing: China Agriculture Press, 2012 [邹思湘. *动物生物化学*. 北京: 中国农业出版社, 2012]

(编辑 马璀璨)

## Effects of Heat Stress on Biochemical Indices and *HSP70* mRNA Expression in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*)

ZHOU Chaowei<sup>#①</sup>, HU Xuwen<sup>#</sup>, LEI Luo, LIU Xiaoqing, REN Shengjie, YANG Minmin, CAO Gaoxiang, CHEN Guoliang, DENG Xingxing, LI Yan, LI Lukuan  
(Department of Fisheries, College of Animal Sciences, Southwest University, Chongqing 402460)

**Abstract** The aim of the present study was to assess the effects of heat stress and recovery on biochemical indices and *HSP70* mRNA expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). The fishes were selected as experimental animals with an average weight of (72.8±10.1) g under laboratory conditions. Samples used to determine lactic acid (LD) content, glucose (Glu) content, glycogen (Gly) content, hexokinase (HK) activity, pyruvate kinase (PK) activity, and *HSP70* mRNA expression were obtained before heat stress (25°C, the control group), 0, 2, 6, and 10 h after stress (32°C), and heat stress recovery (25°C, HSR), respectively. The results revealed no significant difference in LD content compared with that in the control group ( $P>0.05$ ). Glu content was significantly increased at 0, 2, and 6 h ( $P<0.01$ ). Gly was significantly increased at 0 h ( $P<0.01$ ). HK activity was significantly increased at 2 h ( $P<0.01$ ). PK activity significantly increased at 6 h ( $P<0.01$ ). Meanwhile, the highest *HSP70* mRNA expression was observed at 2 h under heat stress ( $P<0.01$ ). Following HSR (25°C, 6 h), the *HSP70* mRNA expression level recovered to the pre-stress levels ( $P>0.05$ ). The results provide basic data for research on the mechanism of high temperature adaption in gibel carp, as well as a scientific basis for acute temperature change in aquaculture and breeding.

**Key words** *Carassius auratus gibelio*; Heat stress; Biochemical indices; *HSP70*

# Co-first authors

① Corresponding author: ZHOU Chaowei, E-mail: zcwlzq666@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171010001

http://www.yykxjz.cn/

张乐乐, 边力, 常青, 侯吉伦, 陈四清, 赵庆, 刘琨, 葛建龙, 刘长琳. 圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 72-80

Zhang LL, Bian L, Chang Q, Hou JL, Chen SQ, Zhao Q, Liu K, Ge JL, Liu CL. Cloning and expression of the *sox9* gene in spotted halibut (*Verasper variegatus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 72-80

## 圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达\*

张乐乐<sup>1,2</sup> 边力<sup>2</sup> 常青<sup>2</sup> 侯吉伦<sup>3</sup> 陈四清<sup>2①</sup>  
赵庆<sup>1,2</sup> 刘琨<sup>1,2</sup> 葛建龙<sup>2</sup> 刘长琳<sup>2</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100)

**摘要** 本研究筛选到圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)的性别相关基因 *sox9*, 并通过 RACE 技术获得了全长序列, 基因全长为 3287 bp, 包括 1431 bp 的 ORF, 编码 477 个氨基酸, 368 bp 的 5' UTR 和 1488 bp 的 3' UTR。在 3' UTR 中有多聚腺苷酸尾和加尾信号 AATAAA。通过荧光定量 PCR 测定了 *sox9* 基因在圆斑星鲈成鱼不同组织中的表达水平, 发现 *sox9* 基因在圆斑星鲈的脑、眼、鳃、心、肝、胆、肠、精巢、卵巢、肾和肌肉等各个组织中都有不同程度的表达。在鳃、脑和精巢组织中检测到较高水平的 *sox9* 转录, 其中精巢中的转录水平显著高于其他组织, *sox9* 基因在性腺中的表达显示出性别两相性差异。其在精巢中的表达水平要显著高于卵巢, 说明 *sox9* 基因与雄性性腺发育相关。通过测定 *sox9* 基因在圆斑星鲈幼鱼不同发育时期(20、30、40、50、60、70 和 80 日龄)的表达水平, 发现其在 20~50 日龄表达量逐渐下降, 在 60 日龄时表达量上升, 推测表达量上升可能与幼鱼性腺分化相关。

**关键词** 圆斑星鲈; *sox9*; 性别基因; mRNA 表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)06-0072-09

基因 *sox*(SRY-related HMG-box)是与哺乳动物睾丸决定基因 *SRY*(Sex determination Region of Y chromosome)的保守区 HMG 基序有 60%以上同源性的一类基因的统称, 而 *sox9*(Sex determining region Y-box 9)是 *sox* 基因家族中重要的一员(Foster *et al.*, 1994)。东天等(2015)研究表明, *sox9* 基因是目前发现的大多数脊椎动物睾丸发育的主要基因之一, 被认为与性逆转、性别分化胚胎期的细胞分化以及精原细胞的形成有关。哺乳类 *sox9* 下调 *wnt4* (Wingless-type

MMTV integration site family, member 4)的表达, 性腺将发育成睾丸(侯林等, 2007); *sox9* 参与激活 *amh* (Anti-mullerian hormone), 可以使哺乳动物性腺向精巢方向发育(文爱韵等, 2011)。目前, 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、高身丽脂鲤(*Astyanax altiparanae*)、西伯利亚鲟鱼(*Acipenser baerii*)和牙汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)等多种鱼类中获得了 *sox9* 基因(Kobayashi *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2012; Fernandino *et al.*, 2003; Adolphi *et al.*, 2015;

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016005)和天津市农业科技成果转化与推广项目(201604100)共同资助[This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016005), and Agriculture Science and Technology Achievement Transformation and Generalization Project in Tianjin (201604100)]. 张乐乐, E-mail: 2459823080@qq.com

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

收稿日期: 2017-10-10, 收修改稿日期: 2017-10-30

Berbejillo *et al.*, 2013)。证实了 *sox9* 基因在鱼类性别分化和性腺发育过程中发挥着重要的作用。李永婧等 (2017) 研究发现, *sox9* 的突变会导致雌性个体出现雄性表型, 这可能与生殖细胞数目的减少相关, 表明在硬骨鱼类中 *sox9* 基因可能具有新的功能, 即在生殖细胞系维持和存活方面发挥了重要作用。

圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 是一种具有广阔养殖前景的新兴养殖对象, 雌性在生长速度与体型上明显比雄性大, 5~8 cm 的圆斑星鲈经养殖 4 年, 雌、雄鱼的体重分别达 4.3 kg 和 1.2 kg (叶建生等, 2006)。通过进行性别控制, 培育单一雌性苗种, 可以有效提高其养殖效益。性别决定机制与性别分化特征的研究对实现单性化繁殖十分重要。迄今圆斑星鲈性别相关基因的研究还未见报道。作者克隆了圆斑星鲈 *sox9* 基因的全长序列, 并分析其在圆斑星鲈成鱼不同组织及在幼鱼不同发育阶段的表达差异, 为圆斑星鲈的性别决定及性腺发育机制提供了基础资料和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 成鱼各组织样品的制备** 圆斑星鲈成鱼取自蓬莱天源水产有限公司, 解剖鱼体, 观察其性腺, 确定性别, 然后取成体雄鱼和雌鱼各 3 尾, 体长为 (23.5±0.5) cm、体重为 (340±20) g, 取其组织 (全脑、眼、鳃、心、肝、胆、肠、精巢、卵巢、肾和肌肉), 置于有 RNA later 试剂的离心管中, 液氮速冻后, 将样品保存于 -80℃ 超低温冰箱, 待用。

**1.1.2 仔鱼各发育时期样品的制备** 不同发育时期的仔鱼取自于山东省威海市乳山市的山东科合海

洋高技术有限公司。选取 20、30、40、50、60、70 和 80 日龄仔鱼, 其全长分别为 (10.5±0.7)、(13.5±0.6)、(19.6±1.8)、(29.6±2.4)、(36.2±2.5)、(45.1±2.3) 和 (57.7±2.8) cm, 每个日龄取 10 尾鱼, 去头去尾保留腹部, 处理后装入冻存管中, 液氮速冻, 于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

### 1.2 RNA 提取及反转录

本研究采用 Trizol 法提取成鱼不同组织以及仔鱼各发育时期性腺组织的 RNA。用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 质量。用 DEPC 处理水将 RNA 稀释成浓度为 1 μg/μl 的溶液, 并使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa), 以稀释后的 RNA 为模板, 将 RNA 反转录成 cDNA。具体实验步骤为: 在冰上, 向 0.2 ml 的 PCR 管中依次加入 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μl, gDNA Eraser 1.0 μl, Total RNA 1 ng, RNase Free dH<sub>2</sub>O 补至 10 μl; 42℃ 水浴 2 min, 置于冰上; 再加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μl, RT Primer Mix 1.0 μl, 5×PrimeScript Buffer 2 4.0 μl, RNase Free dH<sub>2</sub>O 4.0 μl; 然后, 37℃ 水浴 15 min, 85℃ 水浴 5 s, 置于冰上。产物 cDNA 转移至 -20℃ 保存备用。

### 1.3 *sox9* 基因核心片段的克隆

基于本课题组前期获得的圆斑星鲈转录组数据 (Ge *et al.*, 2017), 使用软件 Oligo7 设计特性引物 *sox9*-S1 和 *sox9*-A1 (表 1), 以成鱼性腺组织的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *sox9* 核心序列。

PCR 反应体系 (50 μl): 在 0.2 ml PCR 管中依次加入 2×TSINGKE Master Mix 25 μl, *sox9*-S1 (10 μmol/L)

表 1 本实验所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>sox9</i> -S1	TGCTCGCCTCCTCCACCCAA	克隆 <i>sox9</i> 基因
<i>sox9</i> -A1	TCGCAACTCGCCTTCTCGTCT	To amplify the <i>sox9</i> gene
β-actin-S	TTCTGGTGATGGTGTGAC	
β-actin-A	GTGGTGGTGAAGGAGTAG	荧光定量
<i>sox9</i> -S2	GACCAGTACCCGCATCTGCAC	Real-time PCR
<i>sox9</i> -A2	TCAGACGCTCCGCTTCCTCCA	
5'GSP-1	ATCGGCACCAGCGTCCAGTCGTA	5' RACE 第一轮 First round
5'GSP-2	AGCCCTTCAGCACCTGGGACA	5' RACE 第二轮 Second round
3'GSP-1	TCCCAGGTGCTGAAGGGCTACGA	3' RACE 第一轮 First round
3'GSP-2	CAGAACTCAGCAAGACCCTGGGCAA	3' RACE 第二轮 Second round
M13-S1	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	PCR
M13-A1	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	PCR

1  $\mu\text{l}$ , *sox9*-A1(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 加双蒸水补至 50  $\mu\text{l}$ ; PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 7 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物中的目的条带。UV2 下切胶, 使用 SanPrep 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒(生工)和 PMD<sup>TM</sup> 18-T 载体(TaKaRa)对目的 DNA 片段进行回收、连接和转化培养。具体步骤参考试剂盒使用说明书。菌液 PCR 进行阳性克隆筛选。

菌液 PCR 反应体系(10  $\mu\text{l}$ )如下, 在 0.2 ml PCR 管中依次加入 2 $\times$ TSINGKE Master Mix 5  $\mu\text{l}$ , M13-S1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{l}$ , M13-A1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{l}$ , 菌液 2  $\mu\text{l}$ , 加双蒸水补至 10  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带(原目的条带加 150~200 bp 为阳性克隆)。有目的条带的菌液送测。测序结果与 NCBI 数据库进行对比, 确定序列为 *sox9* 基因的核心序列。

#### 1.4 *sox9* 基因 5' UTR 和 3' UTR 的扩增

使用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification RACE (TaKaRa)反转录试剂盒, 以性腺组织 RNA 为模板制备 5'和 3'cDNA 的第一条链。根据前面所得的核心序列设计特异性引物 3' GSP-1 和 3' GSP-2 扩增 *sox9* 基因的 3' UTR。设计特异性引物 5' GSP-1 和 5' GSP-2 扩增 *sox9* 基因的 5' UTR(表 2)。5' UTR 和 3' UTR 扩增都采用巢式 PCR 方法, 共 2 轮 PCR 反应, 第一轮以 5'和 3' cDNA 的第一条链为模板及外侧特异引物 GSP-1 进行扩增, 第二轮以第一轮 PCR 产物为模板及内侧特异引物 GSP-2 进行扩增。

反应体系 25  $\mu\text{l}$ : 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTP (2.5 mmol/L) 0.5  $\mu\text{l}$ , UPM 2.5  $\mu\text{l}$ , 5'或 3'特异引物 0.5  $\mu\text{l}$ , 5'或 3' RACE 模板 1.25  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 68 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min。

将 PCR 所得的 5'和 3'端产物进行电泳检测, UV2 下切胶回收 DNA 片段, 并连接转化, 挑取阳性克隆测序。测序结果与 NCBI 数据库进行比对, 确定为 *sox9* 基因的片段。

#### 1.5 序列和系统发育分析

使用软件 Gene Tool 对 *sox9* 基因进行序列分析, 使用软件 DNAMAN 对其进行蛋白序列多重比对分析, 使用软件 MEGA 5 进行系统进化分析。

#### 1.6 荧光定量 PCR

根据 *sox9* 基因的核心序列, 运用软件 Oligo7 设计多对特异性引物, 以圆斑星鲈成鱼不同组织和幼鱼不同发育阶段性腺组织的 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR(qRT-PCR)测定 *sox9* 基因在圆斑星鲈不同组织和幼鱼不同发育阶段的表达水平。特异性引物要进行引物试扩增, 检测其条带的特异性及扩增效率, 找出最佳的特异引物。通过预实验筛选出最佳引物 *sox9*-S2 和 *sox9*-A2(表 1), 目的基因 *sox9* 与内参基因  $\beta$ -actin 的扩增效率都接近 100%, 扩增效率一致, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法分析基因相对表达量。

qRT-PCR 反应体系(20  $\mu\text{l}$ )为 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (TaKaRa) 10 $\mu\text{l}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{l}$ , 正反向引物各 0.8  $\mu\text{l}$ , ROX Reference Dye II 0.4  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu\text{l}$ 。扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s (1 个循环); 94 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  34 s (40 个循环); 95 $^{\circ}\text{C}$  15s (1 个循环); 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min (1 个循环); 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s (1 个循环)。每一实验样品重复扩增 3 次, 用于后续实验数据。运用 SPSS 19.0 软件进行 One-way ANOVA 差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 序列和系统发育分析

通过对 *sox9* 基因核心片段的克隆以及对其 5' UTR 和 3' UTR 的扩增, 得到了 *sox9* 基因的全长序列。基因全长为 3287 bp, 经软件预测 *sox9* 基因包括 1431 bp 的 ORF, 可编码 477 个氨基酸, 368 bp 的 5' UTR 和 1488 bp 的 3' UTR(图 1)。在 3' UTR 中有多聚腺苷酸尾和加尾信号 AATAAA。

如图 2 所示, 将圆斑星鲈 Sox9 蛋白序列与其他物种的 Sox9 蛋白序列进行比对分析, 比对所用的物种包括: 人(*Homo sapiens*, CAA86598.1)、原鸡(*Gallus gallus*, AAB09663.1)、鼠(*Mus musculus*, NP\_035578.3)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NP\_001084276.1)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*, ART89197.1)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*, ACO40490.1)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*, AAT77677.1)和青鳉(*Oryzias latipes*, Sox9a: NP\_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)。比对结果显示, 包括圆斑星鲈在内的鱼类 Sox9 蛋白均含有高度保守的 HMG 结构域。*sox9* 基因编码的 477 个氨基酸, 其中 103~173 aa 为 HMG 结构域。

根据已发表的各个物种的 Sox9 蛋白序列, 采用 MEGA 软件的邻接法(Neighbor-joining, NJ), 自举次

```

1 tctaatacga ctcaatag ggcaagcagt ggtatcaacg cagagtacat gggagactcc tcagccatcc tccaagagcg cgtctctcct
91 cacagttctc ttcaaaagta cactttcaga gtcaagcatc ggagcgacat cactcgaac tcgcttctc gtctcgttaa aagtcaaaag
181 agcgtccaga agtttttttc tgtttggctt ttttggttct gccttgcact caaggattca ggtttgccag tcgagctgtg cgccctcaca
271 gactgtcact gcagctctctg ggcaacagcgc ttggatttta gaaagaagga tttttctcct tttttatctg tgatacgcgg ttcctcaatt
      M N L L D P Y L K M T E E Q E K C H S D A P S P S M S E
361 tttttcgcAT GAATCTCTC GACCCTTACC TGAAGATGAC AGAAGAACAG GAGAAGTGTC ACTCCGACGC TCCCAGCCCC AGCATGTCTG
      D S A G S P C P S G S G S D T E N T R P I D N H L L L G P D
451 AGGACTCCGC GGGCTCTCCG TGCCCGTCCG GCTCCGGCTC GGACACCCAG AACACCCCGT CGATCGACAA CCACCTCCTC CTGGGCCCCAG
      Y K K E G E E E K F P V C I R D A V S Q V L K G Y D W T L V
541 ACTACAAGAA GGAGGGCGAG GAAGAGAAGT TCCCGTGTG CATCAGGGAT CCGGTGTCCC AGGTGCTGAA GGGCTACGAC TGGACGCTGG
      P M P V R V N G S S K N K P H V K R P M N A F M V W A Q A A
631 TGCCGATGCC AGTGCCTGTC AACGGCTCAA GCAAAAACAA ACCTCACGTC AAAAGACCCA TGAACGCATT CATGGTGTGG GCACAAGCCG
      R R K L A D Q Y P H L H N A E L S K T L G K L W R L L N E V
721 CGCGGAGGAA GCTGGCCGAC CAGTACCCGC ATCTGCACAA CGCAGAATC AGCAAGACCC TGGGCAAACT TTGGAGATTG CTCACACGAA
      E K R P F V E E A E R L R V Q H K K D H P D Y K Y Q P R R R
811 TCGAGAAGCG CCGCTTGTG GAGGAAGCG AGCGTCTGAG AGTGCAGCAC AAGAAGGATC ATCCCGACTA CAAATATCAG CCGAGGCCGA
      K S V K N G Q N E T E D G E Q T H I S P N A I F K A L Q Q A
901 GAAAGTCTGT GAAGAACGGA CAAAACGAAA CCGAGGACGG CGAGCAATC CACATATCTC CCAATGGCAT TTGAGGATG CTCACACGAA
      D S P A S S M G E A H S P G E H S G Q S Q G P P T P P T T P
991 CCGATTCCCC GCGCTCGAGC ATGGGCGAGG CGCACTCTCC AGGAGAACAT TCAGGTCAAT CCCAGGCCCC ACCAACACCC CCAACACCCC
      K T D L P T T K V D L K R E G R P I Q E G T S R Q L N I D F
1081 CCAAGACACC CTTGCCACC ACCAAGTTG ACCTGAAGCG TGAGGGCCGC CCCATTCAGG AGGGCACCAG TCCGACGTC AACATCGACT
      G A V D I G E L S S E V I S N M G S F D V D E F Q Y L P L
1171 TTGGAGCCGT GGACATTGGC GAGCTGAGCA GCGAAGTCAT CTCCAACATG GGGAGCTTTG ACGTCGATGA GTTTGACCAG TACCTGCCG
      H S H A G V A G A A Q A G Y T G S Y G I S S S S V G Q A A N
1261 TTCACAGCCA CGTGGGGTG GCCGGCCGAC CCCAGGCCGG CTACTCTGGC AGCTACGGCA TCAGCAGCTC CTCAGTCCGC CAGGCAGCCA
      V G A H A W M S K Q Q Q H S L T T L G G G G G E Q D G Q Q
1351 ATGTCCGGGC CCACGCTTGG ATGTCCAAGC AGCAGCAGCA CTCTCTGACC ACCTTGGGTG GAGGAGGCGA GCAGGGCCAA CAGGTCAAC
      R T T Q I K T E Q L S P S H Y S E Q Q G S P Q H V T Y G S F
1441 AAAGAACCAC CCAGATCAAG ACGGAGCAGC TGAGCCCCAG TCACTACAGC GAGCAGCAAG GCTCCCCACA GCACGACC TACGGGTCTY
      N L Q H Y S A S S Y P S I T R A Q Y D Y S E H G A N S Y
1531 TCAACCTGCA GCACTACAGC GCCTCCTCTT ACCCTCTAT CACAAGAGCA CAGTATGACT ATTCTGAACA CCAAGGTGGT GCCAACTCCT
      Y S H A A G Q G S G L Y S T F S Y M S P S Q R P M Y T P I A
1621 ACTACAGCCA TGCAGTGGC CAGGGCTCCG GCCTGTACTC PACTTTCAGC TACATGAGCC CAGCCAGAGC GCCGATGTAC ACCCCGATCG
      D T T G V P S V P Q T H S P Q H W E Q Q P I Y T Q L S R P
1711 CAGACACCAC CGGAGTGCCC TCTGTACCCC AGACCCACAG TCCQAGCAC TGGGAGCAGC AGCCCATTTA CACACAGCTG TCCAGGCCGT
1801 gaagaggcag cctcagcact gactgtacaa cactcgcccc cagcagataga cttctctctg cccggtggcc ttcgcccgc cactccacca
1891 ccccccccc ccccccccc gcattgccaa cagaaaaaca tgacaaggac tttttatag tactgaaata tatctttgga ttggctcaca
1981 acagtgccct tttgtattgg ttggaattgt gattatatt ttttagatat aatgtttaa aaagttaa cctctgtgag gacatactgg
2071 ttataaatat ttagtatgt actgtgatg tgttctgctc ttgtcctcct catcttggtg atcagtgta tagaactcct catcgtaacg
2161 atttgaaggt ctcacacggt ttaaaggagc cggagtgccg agtaaatca ccctcagtg ccttacttct cactaatgta tttttgtac
2251 aggaagtaag aaacgtttac tgacactgcc atcttataat agccttcatt ctgctttgaa cttttgtact gtacatagt tattgtaatt
2341 cccgtgagat gcaaggtttg agcaatgcac gttagaaata gatttgaa ttttggccat gatatgact gtgcatcagt gaattagta
2431 aatattctca ttctgttct ttgctttagc tcaaacgatt gttgtgaaa cgctatagca ggtgccatgt aacttacta gggccctac
2521 cgtgttgcta gacgtaactg agcaatgctt gcttttact gggtactgct ttgataccat tgggtcctct ggagccatc tagagcggct
2611 cagtcactg gcattgcagt gtcaaaaaca cagcgtagtt ctgacttct gttgagggg gaatacagga agtgaccatt tacctgactt
2701 tcttcagcag ccagcaggtt tgagtcgggc gtacttctgt catccccaca gcctttctc aacctttta ttttctaat ttattcttta
2791 gcataaaatt tatttgaana taactatttg caattatctt ttaattcag cagcagctta caaccgctga catatgtggt acaaaattgt
2881 ttatttatca ttgttaaatg ttccgtatt aaagtttcct ttactatga ttagttatg tacagattac ttataatag ccgataagtc
2971 ttttttttaa aaaaagaaaa actggaagtt ttctgtcttt tctttttaac aaaaagaa atgtatatgg aagccgtggc cgttttgtaa
3061 agaatttgct ggaatcccca ggatactttt tgtttttgaa aaaaaaaaa aggttgtgtt cctcattta tattctgtat cattagttct
3151 tcttttgta tcttttttaa tgcagtttcc ctatagtaa acatgccatt gttttaaaag cttatctttt gttttttatt gtttgaata
3241 aaaaacaaac actgagaaat aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa

```

图 1 圆斑星鲈 *sox9* 基因核苷酸序列Fig. 1 The nucleotide sequence of the *sox9* gene in spotted halibut

大写字母: 编码区; 小写字母: 非编码区

Uppercase letters: Coding regions; Lowercase letters: Untranslated regions (UTR)

数(bootstrap)1000次,构建NJ分子系统进化树(图3)。进化树构建所用的Sox9蛋白的其他物种包括:人(*H. sapiens*, CAA86598.1)、原鸡(*G. gallus*, AAB09663.1)、鼠(*M. musculus*, NP\_035578.3)、沼泽鳄(*Crocodylus palustris*, ACU12296.1)、红鳍东方鲀(*T. rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1)、大菱鲆(*S. maximus*, ART89197.1)、牙鲆(*P. olivaceus*,

ACO40490.1)、斑马鱼(*Barchydanio rerio*, Sox9a: AAG09814.1, Sox9b: AAG09815.1)、赤点石斑鱼(*E. akaara*, AAT77677.1)和青鳉(*O. latipes*, Sox9a: NP\_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)。从图3可以看出,哺乳类(如人)、鸟类(如原鸡)和爬行类(如沼泽鳄)的Sox9聚在了一起,圆斑星鲈Sox9与牙鲆、青鳉等其他硬骨鱼类的Sox9聚在了一起。



<i>E.akaara</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SDNHL L L G . C D Y K K E G E E E K F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>G.gallus</i>	Sox9	MNLLDPFVKMTDECEKGLSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	PCENTFPKGDPELKKESDEEKFPVCI	REAVSCVLKGYDVTLV	90
<i>H.sapiens</i>	Sox9	MNLLDPFVKMTDECEKGLSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	CENTFPKGEPLKKESDEEKFPVCI	REAVSCVLKGYDVTLV	89
<i>M.musculus</i>	Sox9	MNLLDPFVKMTDECEKGLSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	CENTFPKGEPLKKESDEEKFPVCI	REAVSCVLKGYDVTLV	89
<i>O.latipes</i>	Sox9a	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SDNHL I R G . P D Y K K E G E E E K F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>O.latipes</i>	Sox9b	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SDNHL I R G . P D Y K K E G E E E R F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SDNHL L L G G . P D Y K K E G E E E K F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>S.maximus</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SDNHL L L L G . P D Y K K E G E E E E K F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SDNHL L L L G . P D Y K K E N E E E K F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	MNLLDPYLKMTDECEKGLSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	SENGLMRA . D C D L K K D E E D K F P A C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>V.variegatus</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	I D N H L L L G . P D Y K K E G E E E E K F P V C I	RDAVSCVLKGYDVTLV	88
<i>X.laevis</i>	Sox9a	MNLLDPFVKMTDECEKCHSDAPSPNS	DSAGSPSPSGSGSDTENTRP	CENTFPKGCCELKKETEDEFKFPVCI	REAVSCVLKGYDVTLV	89
<i>E.akaara</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>G.gallus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNESEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	180	
<i>H.sapiens</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNESEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	179	
<i>M.musculus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNESEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	179	
<i>O.latipes</i>	Sox9a	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>O.latipes</i>	Sox9b	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>S.maximus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>V.variegatus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>X.laevis</i>	Sox9a	PNPVVRVNGSSKPKPHVKRPANAFMVA	AARRKLAADCYPHLHNAELSKTLGKLVRL	LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	179	
<i>E.akaara</i>	Sox9	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>G.gallus</i>	Sox9	KIVKNGCEAEAEATE . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	PLAEGCR .	265
<i>H.sapiens</i>	Sox9	KSVKNGCOAEAEATE . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	PLAEGCR .	264
<i>M.musculus</i>	Sox9	KSVKNGCOAEAEATE . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	PLAEGCR .	264
<i>O.latipes</i>	Sox9a	KSVKNGCEAEADS . EPTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>O.latipes</i>	Sox9b	KSVKNGCEAEADS . EPTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>S.maximus</i>	Sox9	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>V.variegatus</i>	Sox9	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	RPVCEGTS .	261
<i>X.laevis</i>	Sox9a	KSVKNGCNDPEDG . ECTHI SPNAI	FKALCOADSP . ASSNAGEVHSPGE	HSGGSCGPPTTPTTPKTDLP . SSKADLKREG .	PLCENGR .	264
<i>E.akaara</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>G.gallus</i>	Sox9	CPPHIDFRDVCIDGELSSDVI . SINI	ETFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>H.sapiens</i>	Sox9	CPPIDFRDVCIDGELSSDVI . SINI	ETFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>M.musculus</i>	Sox9	CPPIDFRDVCIDGELSSDVI . SINI	ETFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>O.latipes</i>	Sox9a	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>O.latipes</i>	Sox9b	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>S.maximus</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	RCLNIDFRDVCIDGELSSDVI . SHI	ETFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>V.variegatus</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI . NELSSSEVI . SINI	CSFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>X.laevis</i>	Sox9a	CPPRIDFRDVCIDGELSSSEVI . STI	ETFDVDFEFCYLP . PPHSHAGVTGAA .	CAG . YTGSGY .	SSSSVSCAANVGAVHMS .	KCCCCC . . . . .
<i>E.akaara</i>	Sox9	... HSLTTLGGG . . . . .	GEPVCCG . . . . .	CCRTTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	QHATYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>G.gallus</i>	Sox9	ACPPACHTLPS . . . . .	TERECGP . . . . .	ACCRPH .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>H.sapiens</i>	Sox9	CAPPAPCAPPCCAPAPCCAP . . . . .	CAAPPCAP . . . . .	CCCAHTLTLSSPECCSCRT .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>M.musculus</i>	Sox9	CAPPAPCAPPCCAPAPCCAP . . . . .	CAAPPCAP . . . . .	CCCAHTLTLSSPECCSCRT .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>O.latipes</i>	Sox9a	... SLATLGGG . . . . .	GDCSCCG . . . . .	CCRTTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>O.latipes</i>	Sox9b	... SLATLGGG . . . . .	GDCSCCG . . . . .	CCRTTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	... HSLTTLGGG . . . . .	GECGCCG . . . . .	CCRTTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>S.maximus</i>	Sox9	... PSLTTLGGG . . . . .	GECGCCG . . . . .	CCRTTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	CCCHSLTALSGG . . . . .	GECSCCG . . . . .	CCRPAC .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	C . . . . .	HTLTLVGG . . . . .	SSTEA .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>V.variegatus</i>	Sox9	... HSLTTLGGG . . . . .	GECGCCG . . . . .	CCRTTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>X.laevis</i>	Sox9a	... CCHSLTALNS . . . . .	ECSG . . . . .	SCCRTI .	KTECLSPSHYSECCESSP . . . . .	CHVYGSFNLCHYSTSS . Y
<i>E.akaara</i>	Sox9	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSDF . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>G.gallus</i>	Sox9	PPH . . . . .	TRASE . . . . .	YDYTE . . . . .	CNSGS . . . . .	YSSHA . . . . .
<i>H.sapiens</i>	Sox9	PPH . . . . .	TRASC . . . . .	YDYTF . . . . .	CNSSS . . . . .	YSSHA . . . . .
<i>M.musculus</i>	Sox9	PPH . . . . .	TRASC . . . . .	YDYADF . . . . .	CNSGS . . . . .	YSSHA . . . . .
<i>O.latipes</i>	Sox9a	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSDF . . . . .	CNSAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>O.latipes</i>	Sox9b	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSDF . . . . .	CNSAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSEC . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>S.maximus</i>	Sox9	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSEC . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSEC . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSEC . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>V.variegatus</i>	Sox9	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSEC . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .
<i>X.laevis</i>	Sox9a	PSI . . . . .	TRAC . . . . .	YDYSEC . . . . .	CGGAN . . . . .	SYSSHA . . . . .

图 2 鱼类 Sox9 蛋白序列比对分析

Fig.2 Alignment analysis of Sox9 protein sequences of fishes

人(*H. sapiens*, CAA86598.1)、原鸡(*G. gallus*, AAB09663.1)、鼠(*M. musculus*, NP\_035578.3)、非洲爪蟾(*X. laevis*, NP\_001084276.1)、红鳍东方鲀(*T. rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1)、大菱鲆(*S. maximus*, ART89197.1)、牙鲆(*P. olivaceus*, ACO40490.1)、赤点石斑鱼(*E. akaara*, AAT77677.1)和青鲈(*O. latipes*, Sox9a: NP\_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)

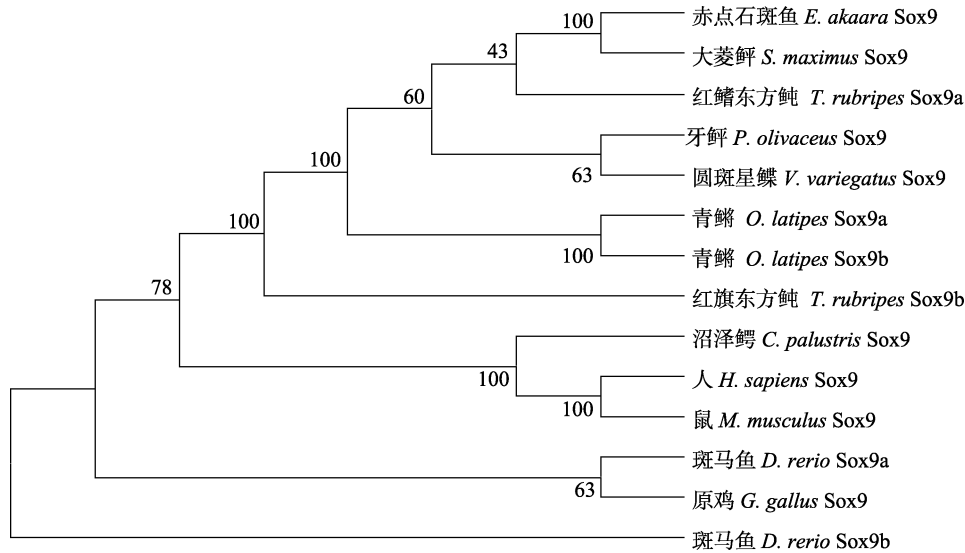


图 3 多个物种 Sox9 蛋白序列的系统进化分析

Fig.3 A neighbor-joining tree based on multiple Sox9 protein sequences

人(*H. sapiens*, CAA86598.1); 原鸡(*G. gallus*, AAB09663.1); 鼠(*M. musculus*, NP\_035578.3); 沼泽鳄(*C. palustris*, ACU12296.1); 红鳍东方鲀(*T. rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1); 大菱鲆(*S. maximus*, ART89197.1); 牙鲆(*P. olivaceus*, ACO40490.1); 斑马鱼(*B. rerio*, Sox9a: AAG09814.1, Sox9b: AAG09815.1); 赤点石斑鱼(*E. akaara*, AAT77677.1); 青鲷(*O. latipes*, Sox9a: NP\_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)

### 2.2 *sox9* 基因在成体各组织中的表达分析

荧光定量 PCR 测定圆斑星鲷 *sox9* 基因在成体各组织中的表达水平, 结果显示, 圆斑星鲷 *sox9* mRNA 普遍存在于成体各组织中(脑、眼、鳃、心、肝、肠、胆、精巢、卵巢、肾和肌肉)(图 4)。比较雌雄个体相同组织的表达水平, 可以发现 *sox9* 基因在鳃和性腺组织中的表达显示出性别两相性差异( $P < 0.05$ ), 雄鱼的表达水平要显著高于雌鱼; 比较不同组织的表达水平, 可以发现 *sox9* 基因在雌鱼鳃、脑和肠组织中表达水平较高, 在卵巢、肌肉、心和肾脏组织中表达水平较低, 在雄鱼鳃、脑和精巢组织中表达水平较高, 在肌肉、心和肾脏中表达水平较低。

### 2.3 *sox9* 基因在仔鱼发育时期的表达分析

荧光定量 PCR 测定圆斑星鲷 *sox9* mRNA 在仔鱼各发育时期的表达水平。结果显示, *sox9* 基因在仔鱼 20~50 日龄表达量逐渐下降, 在 60 日龄表达量上升, 在 70 日龄之后表达量下降(图 5)。

## 3 讨论

本研究克隆了圆斑星鲷 *sox9* 基因, 并通过 RACE 技术得到了 *sox9* 基因的全长。*sox9* mRNA 全长为 3287 bp, 编码 477 个氨基酸。将其蛋白序列与其他

物种 Sox9 蛋白序列进行比对, 发现其 103~173 aa 为高度保守的 HMG 结构域。利用已知物种的 Sox9 蛋

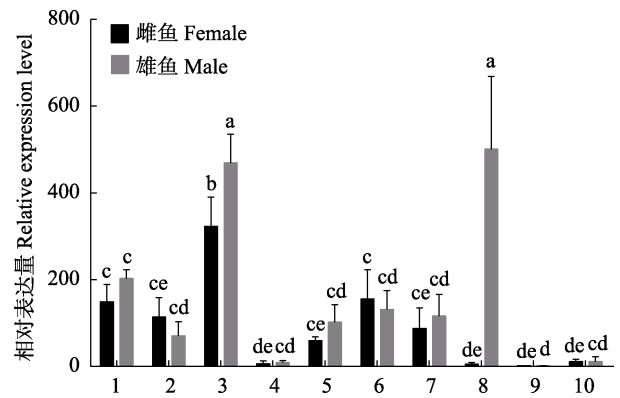


图 4 *sox9* 基因在圆斑星鲷成鱼不同组织中表达的定量分析

Fig.4 Quantitative analysis of the expression of *sox9* gene in different tissues of adult spotted halibut

1: 脑; 2: 眼; 3: 鳃; 4: 心; 5: 肝; 6: 肠; 7: 胆; 8: 性腺; 9: 肾; 10: 肌肉

a、b、c、d 表示组间具有显著性差异( $P < 0.05$ ), ce、cd、de 含相同字母表示组间差异不显著

1: Brain; 2: Eye; 3: Gill; 4: Heart; 5: Liver; 6: Intestine; 7: Gallbladder; 8: Gonad; 9: Kidney; 10: Muscle

a, b, c, and d indicated the expression levels are significantly different among tissues ( $P < 0.05$ ), ce, cd and de which have one identical letter indicated the expression levels are not significantly different among tissues

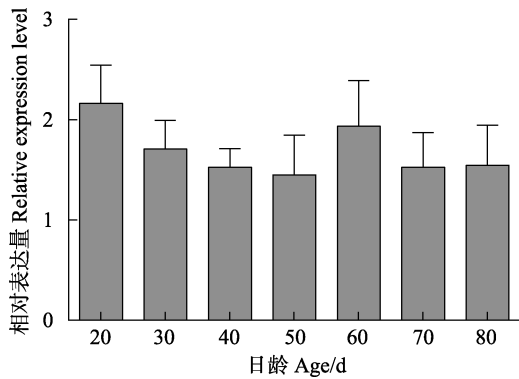


图 5 *sox9* 基因在仔鱼发育时期表达的定量分析

Fig.5 Quantitative analysis of the expression of *sox9* gene in the larval developmental stages of spotted halibut

白序列构建分子系统进化树,发现圆斑星鲽 *Sox9* 与牙鲆等硬骨鱼类的 *Sox9* 聚在一起,说明 *sox9* 基因在鱼类中是比较保守的。而且其与牙鲆 *Sox9* 在同一分支,则说明二者亲缘关系最近。同时,通过系统进化树可发现,在人、鼠和原鸡等较高等的脊椎动物中只出现一种 *sox9* 基因,而在斑马鱼、青鳉和红鳍东方鲀等鱼类中出现 2 种类型的 *sox9* 基因,即 *sox9a* 和 *sox9b*。斑马鱼的 *Sox9a* 和原鸡在同一分枝上,而斑马鱼 *Sox9b* 却在另一分支,这说明斑马鱼 *Sox9a* 与鸟类等较高等脊椎动物 *Sox9* 亲缘关系较近,功能也会更相似,这一点与 Rodríguez-Marí 等(2005)的研究发现相吻合。Rodríguez-Marí 等(2005)研究发现,斑马鱼 *sox9a* 基因在精巢组织的 Sertoli 细胞中表达,而 *sox9b* 基因则在卵巢的卵母细胞中表达。我们在研究中发现,圆斑星鲽也存在 2 种类型的 *sox9* 基因,但只成功克隆出 1 种类型的 *sox9* 基因,因 *sox9* 亚型的划分没有公认的标准,暂时将其命名为 *sox9* 基因。

通过荧光定量 PCR 分析圆斑星鲽 *sox9* 基因在成体各组织中的表达,发现其在圆斑星鲽成体的各组织中都有不同程度的表达,这与牙鲆和许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*) *sox9* 基因的研究结果一致(文爱韵等, 2011; 马丽曼, 2014)。 *sox9* 在精巢中的表达量要显著高于卵巢,显示出性别两相性差异,与裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、尼罗罗非鱼和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) *sox9* 基因的表达情况一致(Smith *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2007),说明 *sox9* 基因与雄性性别相关,推测 *sox9* 基因可能参与了圆斑星鲽精巢发育过程。*sox9* 基因除在精巢中表达最高,在鳃和脑组织中也有较高表达,说明 *sox9* 在其他组织的发育过程中也发挥了作用。如 Dong 等(2011)发现,半滑舌鳎 (*Cynoglossus semaluevas*)

*sox9a* 基因在雄性的脑、垂体和性腺中的表达都显著高于雌性,且 9 月龄的半滑舌鳎精巢中的表达量达到峰值,在原肠胚期的表达量高于其他时期,说明 *sox9a* 基因对半滑舌鳎的脑-垂体-性腺轴及精原细胞的形成起重要作用。青鳉 *sox9b* 基因的突变会导致雌性个体出现雄性表型,可能与生殖细胞数目的减少相关,表明在硬骨鱼类中可能具有新的功能,在生殖细胞系维持和存活方面发挥了重要作用(李永婧等, 2017)。此外,在斑马鱼、黄鳝 (*Monopterus albus*) 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 等鱼类中发现了 2 个 *sox9* 基因(Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2003; 俞菊华等, 2005)。Rodríguez-Marí 等(2015)在斑马鱼中筛选到 *sox9a* 和 *sox9b* 两个 *sox9* 基因。*sox9a* 在精巢和脑等多个组织中表达,在卵巢中不表达;*sox9b* 仅在卵巢中表达,在其他组织中不表达。而 Zhou 等(2003)在黄鳝中发现 *sox9a<sub>1</sub>* 和 *sox9a* 两个基因,其在精巢、卵巢和间性性腺(精卵巢)中都表达。这说明 *sox9* 基因的 2 个分型的功能是不同的。Volf 等(2005)指出,在硬骨鱼类中存在 2 种类型的 *sox9* 基因,也许是由鱼类特有的基因组复制导致的。

荧光定量 PCR 测定了圆斑星鲽 *sox9* 基因在仔鱼各发育时期的表达水平,结果显示, *sox9* 基因在仔鱼 20~50 日龄表达量逐渐下降,而在 60 日龄时表达量上升,这与许氏平鲈 *sox9* 基因在其仔鱼不同发育阶段的表达模式相同,即在孵化后 5 d 和 10 d 表达量有降低的趋势,15 d 和 25 d 的表达量逐渐上升,许氏平鲈在孵化后约 25~35 d 性腺开始分化,因此,许氏平鲈 *sox9* 基因在 25 日龄表达量达到较高的水平可能与性腺的分化有关(马丽曼等, 2014)。圆斑星鲽性腺分化的研究未见报道,而条斑星鲽 (*Verasper moseri*) 在 60~70 日龄性腺开始分化(李忠红, 2009),这与圆斑星鲽 *sox9* 基因表达量上升的时间接近,因此,推测表达量上升可能与幼鱼性腺分化有关。

## 参 考 文 献

- Adolfi MC, Carreira AC, Jesus LW, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2015, 13: 2
- Berbejillo J, Martínez-Bengochea A, Bedó G, *et al.* Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(1): 91-94
- Dong T, Liu FJ, Hu HX, *et al.* Research progress on sex differentiation related genes on sturgeon. *Biotechnology*

- Bulletin, 2015, 31(10): 62–70 [东天, 刘凤娇, 胡红霞, 等. 鲟鱼性别分化相关基因研究进展. 生物技术通报, 2015, 31(10): 62–70]
- Dong XL, Chen SL, Ji XS, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of *Sox9a* and *Foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(1): 68–77
- Fernandino JL, Guilgur LG, Strobl-Mazzulla PH, *et al.* Molecular cloning of SOX9, DMRT1 and SF1 cDNA partial sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1–4): 145–146
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, *et al.* Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, 1994, 372(6506): 525–530
- Ge J, Chen S, Liu C, *et al.* Characterization of the global transcriptome and microsatellite marker information for spotted halibut *Verasper variegatus*. *Genes and Genomics*, 2017, 39(3): 307–316
- Hou L, Cui YX, Yao B. Progress in sexual determination related SOX9. *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 2007, 15(8): 1–2, 9 [侯林, 崔英霞, 姚兵. 性别决定相关基因 SOX9 研究进展. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(8): 1–2, 9]
- Kobayashi T, Kajirua- Kobayashi H, Guan G, *et al.* Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*, 2008, 237(1): 297–306
- Li YJ, Wu LM, Li XJ. A review on the genes related with sex determination and differentiation in teleosts. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(4): 72–78 [李永婧, 吴利敏, 李学军. 硬骨鱼类性别决定与分化相关基因研究进展. 河南师范大学学报(自然科学版), 2017, 45(4): 72–78]
- Li ZH. Gynogenesis induced and histological observation on gonadal sex differentiation in barfin flounder (*Verasper moseri*). Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2009, 28–34 [李忠红. 条斑星鲈 *Verasper moseri* 雌核发育诱导及性别分化过程的初步研究. 东北农业大学硕士学位论文, 2009, 28–34]
- Luo YS, Hu W, Liu XC, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression pattern of *Sox9* during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 2010, 306(1–4): 322–328
- Ma LM. Study on sex related genes *Sox3*, *Sox9* and *Dmrt1* in black rockfish, *Sebastes Schlegeli*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014, 79–91 [马丽曼. 许氏平鲈性别相关基因 *Sox3*、*Sox9* 和 *Dmrt1* 的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014, 79–91]
- Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, *et al.* Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29982
- Rodríguez-Mari A, Yan YL, BreMiller RA, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish *anti-Müllerian hormone (amh)* relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cypl9ala*, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5: 655–667
- Smith EK, Guzmán JM, Luckenbach JA. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 165(2): 125–137
- Volff JN. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 2005, 94(3): 280–294
- Wen AY, You F, Sun P, *et al.* Study on cloning and expression of gene *sox9* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1): 97–104 [文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲆 *sox9* 基因的克隆与表达研究. 海洋科学进展, 2011, 29(1): 97–104]
- Xia W, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 263(1–2): 156–172
- Ye JS, Wang XQ, Ma S, *et al.* Studies on biological and advances of *Verasper variegates*. *Fisheries Economy Research*, 2006(6): 5–7 [叶建生, 王兴强, 马牲, 等. 圆斑星鲈的生物学特性及其研究进展. 渔业经济研究, 2006(6): 5–7]
- Yu JH, Li JL, Cao LP, *et al.* Isolation and analysis of *Sox9* derived from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(5): 620–623 [俞菊华, 李建林, 曹丽萍, 等. 黄颡鱼 *Sox9* 基因的分离及分析. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 620–623]
- Zhou R, Liu L, Guo Y, *et al.* Similar gene structure of two *Sox9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Molecular Reproduction and Development*, 2003, 66(3): 211–217

## Cloning and Expression of the *sox9* Gene in Spotted Halibut (*Verasper variegatus*)

ZHANG Lele<sup>1,2</sup>, BIAN Li<sup>2</sup>, CHANG Qing<sup>2</sup>, HOU Jilun<sup>3</sup>, CHEN Siqing<sup>2①</sup>,  
ZHAO Qing<sup>1,2</sup>, LIU Kun<sup>1,2</sup>, GE Jianlong<sup>2</sup>, LIU Changlin<sup>2</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;  
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Beidaihe Central  
Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100)

**Abstract** Significant differences exist in the growth rate and body size of male and female spotted halibut (*Verasper variegatus*), with the females being significantly larger than the males. All-female cultivation can improve breeding efficiency. Studies investigating the mechanism of sex determination and features of sex differentiation may provide valuable information for all-female cultivation. In this study, we successfully identified the *sox9* gene of spotted halibut. The total length is 3287 bp, including a 1431 bp ORF, encoding 477 amino acids; the 5' UTR is 368 bp and the 3' UTR is 1488 bp. Polyadenylic acid tails and AATAAA caudal signals were identified in the 3' UTR. The expression of the *sox9* gene differed in the brain, eye, gills, heart, liver, gallbladder, intestine, testis, ovary, kidney, and muscle in spotted halibut. Transcript levels were high in the gill, brain, and testis, and were significantly higher in the testis than in the other tissues. A two-phase gender difference was observed in the gonads; *sox9* expression was significantly higher in the testis than in the ovary, indicating that *sox9* might be associated with male gonad development. The dynamic expression patterns of the *sox9* gene in spotted halibut larvae gradually declined from 20 to 50 d after hatching, with a sudden rise observed after 60 d. This increased expression might be associated with differentiation of larval gonad.

**Key words** *Verasper variegatus*; *sox9*; Sex genes; mRNA expression

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



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171101001

http://www.yykxjz.cn/

郭富强, 张德锋, 曹建萌, 刘志刚, 可小丽, 卢迈新. 不同水温下无乳链球菌在尼罗罗非鱼体内的动态分布及其消除规律. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 81–88

Guo FQ, Zhang DF, Cao JM, Liu ZG, Ke XL, Lu MX. Dynamic distribution and elimination patterns of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus* at different water temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 81–88

# 不同水温下无乳链球菌在尼罗罗非鱼体内的 动态分布及其消除规律\*



郭富强<sup>1,2</sup> 张德锋<sup>1,3</sup> 曹建萌<sup>1</sup> 刘志刚<sup>1</sup> 可小丽<sup>1,3</sup> 卢迈新<sup>1,3①</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 3. 广东省水产动物免疫技术重点实验室 广州 510380)

**摘要** 本研究以腹腔注射无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, WC1535 菌株)后的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GIFT strain)为研究对象, 研究不同水温下无乳链球菌在尼罗罗非鱼体内的动态分布及消除规律。首先, 分析 25℃、29℃和 33℃3 个实验组罗非鱼的感染累积死亡率; 其次, 对 3 个实验组罗非鱼进行无乳链球菌的体外分离、培养和计数; 然后, 分析感染后不同实验组罗非鱼脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中无乳链球菌的浓度。结果显示, 随着水温的升高罗非鱼的累积死亡率也随之升高, 25℃、29℃和 33℃组的累积死亡率分别为 6.67%、25.56%和 78.90%。菌落统计结果显示, 随着水温的升高, 无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度加快, 同时, 单位质量组织(脑、肝脏、脾脏和肾脏)中无乳链球菌的最大载菌量也随之升高。本研究还发现, 无乳链球菌在罗非鱼脾脏中的浓度最高, 在肾脏中的存活时间最长。综上可知, 尼罗罗非鱼感染无乳链球菌后, 体内各组织中链球菌的增殖、消除速度均与水温密切相关。本研究为研究无乳链球菌的致病机制奠定基础, 也为通过合理调控水温及施药等措施防治尼罗罗非鱼链球菌病的暴发提供科学依据。

**关键词** 温度; 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌; 动态分布; 消除规律

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0081-08

罗非鱼(*Oreochromis* sp.)因其食性广、生长快、抗病力强以及环境适应性强而著称, 被誉为未来动物性蛋白质的主要来源之一, 已被联合国粮农组织向全世界推广。但是, 随着我国罗非鱼养殖规模的扩大、养殖密度的提高以及养殖环境的恶化, 近年来, 各种

病害的暴发也越来越频繁, 其中, 链球菌病是我国罗非鱼主要的细菌性疾病, 该病的连年暴发给罗非鱼养殖业带来了巨大的经济损失(朱洁莲等, 2017)。流行病学研究发现, 罗非鱼链球菌病的主要病原是无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)(方伟等, 2016; 张德锋

\* 现代农业产业技术体系专项(CARS-46)、广东省自然科学基金项目(2014A030310097)和广东省海洋和渔业发展专项资金(鱼病防治)(20170070000600403)共同资助[This work was supported by the China Agriculture Research System(CARS-46), the Natural Science Foundation of Guangdong Province(2014A030310097), and the Special Project for Marine and Fishery Development (Fish Disease Control) in Guangdong Province(20170070000600403)]. 郭富强, E-mail: gfq07083737@163.com

① 通讯作者: 卢迈新, 研究员, E-mail: mx-lu@163.com

收稿日期: 2017-11-01, 收修改稿日期: 2017-11-16



等, 2017), 该病的流行时间为每年的 5~10 月, 其中, 7~9 月为流行高峰期。当水温在 28℃ 以上时易发病, 当水温高于 32℃ 时极易暴发, 死亡率可高达 80%~95%(卢迈新等, 2010; 张新艳等, 2008)。如, 2009 年的高温季节, 广东、海南、福建和广西等罗非鱼主养区链球菌病的发病率为 20%~50%, 死亡率高达 50%~70%(卢迈新, 2010), 这表明罗非鱼链球菌病的暴发与水温密切相关。

目前, 国内外关于罗非鱼链球菌病的研究主要集中在病情描述、病原菌的分离鉴定(黄艳华等, 2014; 谭晶晶等, 2010; 张德锋等, 2015)、疫苗研发(Evans *et al*, 2004; Klesius *et al*, 2000; Sun *et al*, 2010; 王蓓等, 2014; 吴斌等, 2016)和药物防治(邓恒为等, 2014; 王德强等, 2017)等研究领域, 而无乳链球菌在不同水温下罗非鱼体内主要器官组织中增殖和消除规律的研究鲜见报道。由于水温是罗非鱼链球菌病发病或暴发极为重要的诱因之一, 因此, 了解无乳链球菌在罗非鱼体内的组织动态分布以及增殖、消除规律对有效防治罗非鱼链球菌病是十分重要的。

本研究以人工感染无乳链球菌的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, GIFT strain) 为研究对象, 采用平板计数法分析不同水温条件下罗非鱼感染无乳链球菌后的脑、肝脏、脾脏和肾脏等主要器官组织中病原菌的动态分布以及增殖、消除规律, 以期为罗非鱼链球菌病的预防、诊断和药物防控提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验鱼** 实验鱼为尼罗罗非鱼, 由中国水产科学研究院珠江水产研究所高要水产种质中心提供。本研究选取健康罗非鱼 1980 尾, 体重为 40~60 g/尾, 实验前进行抽样检测, 结果显示, 该批次罗非鱼未携带无乳链球菌。

**1.1.2 菌株** 无乳链球菌 WC1535 菌株由本实验室分离、鉴定并保存, 该菌株对罗非鱼具有强致病性。根据预实验获得 30℃ 时无乳链球菌对罗非鱼的半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)为 5.0×10<sup>7</sup> CFU/ml。实验前, 在血琼脂平板上进行活化培养, 并挑取单克隆接种于脑心浸出液肉汤(BHI)液体培养基中, 在 28℃ 培养箱中培养至对数生长期, 收集菌体, 用无菌 PBS 缓冲液将菌液稀释至 5.0×10<sup>7</sup> CFU/ml 备用。

### 1.2 方 法

**1.2.1 人工感染实验** 选取 540 尾健康罗非鱼, 分

为 25℃、29℃ 和 33℃ 3 个实验组, 25℃、29℃ 和 33℃ 3 个对照组, 每组 90 尾, 在循环水玻璃缸中暂养 1 周后用于实验。实验养殖条件: 实验组和对照组的水温分别调至 25℃、29℃ 和 33℃, 实验期间, 各组水温变动幅度为 ±0.5℃; 为保证良好的水质条件及溶氧, 整个实验过程采用循环水养殖, 并不间断充气; 每天投喂饲料 2 次, 每日投喂量约为鱼体重的 3.0%。实验组罗非鱼每尾腹腔注射 0.1 ml 浓度为 5.0×10<sup>7</sup> CFU/ml 的无乳链球菌, 对照组罗非鱼腹腔注射等体积的无菌 PBS 缓冲液。感染后, 每天观察实验鱼的发病情况, 并及时清除死鱼, 记录各组的死鱼数量, 持续观察 7 d 后, 统计各组实验鱼的死亡数。

**1.2.2 无乳链球菌的分离培养** 选取 1440 尾健康罗非鱼, 分 25℃、29℃ 和 33℃ 3 个实验组, 25℃、29℃ 和 33℃ 3 个对照组, 每组设置 3 个重复, 25℃ 和 29℃ 各组每个重复 60 尾鱼, 33℃ 实验组和对照组每个重复 120 尾鱼(为保证能够连续取样), 分别于循环水玻璃缸中暂养 1 周后用于实验。

实验组罗非鱼每尾腹腔注射 0.1 ml 浓度为 5.0×10<sup>7</sup> CFU/ml 的无乳链球菌, 对照组注射等体积的无菌 PBS 缓冲液。分别在感染后 3 h、6 h、12 h、24 h、2 d、4 d、6 d、10 d、15 d、20 d 和 30 d, 从各实验组的每个重复中随机选取 3 尾体表症状相似且尚未死亡的罗非鱼, 无菌条件下取脑、肝脏、脾脏和肾脏等组织, 称重后以 0.20 g/ml 的比例加入 PBS 缓冲液, 用高通量组织研磨仪(北京鼎昊源科技有限公司, 型号 TL-2010S)充分研磨, 然后 1500 r/min 低速离心 30 s 沉淀组织碎片, 取上清液, 进行 10 倍系列梯度稀释, 吸取 10 μl 涂布于 BHI 琼脂平板上, 每个样品 6 个重复, 28℃ 培养箱中培养 36 h, 观察菌落形态, 统计菌落数量, 并根据相应菌落数计算各组织中单位质量的菌体浓度。同样地, 无菌条件下分别取对照组的脑、肝脏、脾脏和肾脏等组织, 称重、研磨、短暂离心, 稀释后涂布于 BHI 平板上进行无乳链球菌培养和菌落计数。

**1.2.3 菌落的形态判定和分子鉴定** 每个时间点取样统计菌落数时, 随机挑取 10 个形态相近的单克隆菌落用无乳链球菌特异基因 *cfb* 的引物(*cfb*-F: 5'-TAGCTTAGTTATCCCAAATCCC-3', *cfb*-R: 5'-TAAAGACTTCATTGCGTGCC-3')进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析(刘志刚等, 2013)。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 进行 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

**1.2.4 数据处理与分析** 采用 SPSS 22.0 软件的单

因素方差分析法(One-way ANOVA)、卡方检验分析法(Chi-square test), 分别对不同温度下罗非鱼体内无乳链球菌浓度和感染无乳链球菌后罗非鱼累积死亡率进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。采用 GraphPad Prism 6 的 Survival 和 Column-Mean $\pm$ SD 对累积死亡率及病原菌浓度进行作图和分析。

## 2 结果

### 2.1 人工感染实验结果

不同实验组罗非鱼感染无乳链球菌后, 25℃、29℃和 33℃组的累积死亡率分别为 6.67%、25.56%和 78.90%, 对照组均未出现死亡。从生存曲线可以看出(图 1), 25℃组的罗非鱼在感染后 48 h 内未出现死亡, 48 h 后开始出现少量死亡; 29℃实验组在感染 24 h 后开始死亡, 24~48 h 的死亡量缓慢增加, 之后死亡量逐渐减少; 33℃高温组的罗非鱼感染 9 h 后即出现死亡, 在 12~24 h 内的死亡量急剧升高, 为发病高峰期, 48 h 后的死亡量逐渐趋于稳定。

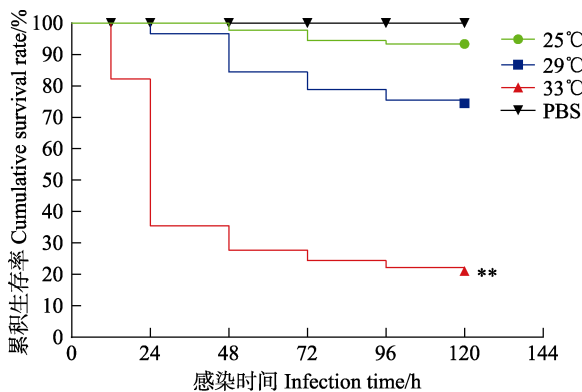


图 1 尼罗罗非鱼感染无乳链球菌后的生存曲线  
Fig.1 The survival curve of *O. niloticus* infected with *S. agalactiae*

\*\*为差异极显著( $P < 0.01$ )

\*\* denoted highly significant differences ( $P < 0.01$ )

实验组罗非鱼感染无乳链球菌后, 不同发病时期的症状存在差异。发病初期( $< 9$  h), 各实验组罗非鱼体表无明显症状, 25℃实验组的罗非鱼内脏器官无明显病变, 29℃和 33℃实验组罗非鱼的肝脏、脾脏轻微肿大。感染后 12~24 h, 25℃实验组无症状, 29℃实验组部分出现侧翻、打转症状, 33℃实验组表现出明显的侧翻、打转和离群独游等现象, 并出现大量死亡。进入发病期后(12~72 h), 25℃实验组发病罗非鱼的症状仍不明显, 29℃实验组和 33℃实验组部分病

鱼眼球突出或浑浊、眼眶充血、肛门红肿、腹部膨大、体表发黑, 并出现侧翻、打转和离群独游等现象, 解剖可见脑膜炎, 肝脏充血肿大发黑、肾脏肿大、脾脏充血发暗, 为典型的无乳链球菌感染症状。

### 2.2 病原菌的分离培养和菌落数统计

分析各实验组罗非鱼的脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中的病原菌浓度(表 1~表 3)可知, 感染后 3 h, 实验组罗非鱼脑、肝脏、脾脏和肾脏组织内均可分离到无乳链球菌, 但是各组织中的病原菌浓度均处于较低水平( $5.29 \times 10^3 \sim 1.96 \times 10^6$  CFU/g)。感染后 6 h, 3 个实验组罗非鱼各组织中病原菌的浓度逐渐增加, 其中, 33℃实验组罗非鱼各组织中的无乳链球菌增殖速度极快(最高可达  $3.84 \times 10^9$  CFU/g·h)。所有对照组罗非鱼体内未分离到无乳链球菌。

表 1 25℃水温条件下尼罗罗非鱼 4 种组织中无乳链球菌平均浓度与感染时间的关系

Tab.1 Relationship between infection time and average abundance of *S. agalactiae* in the four tissues of *O. niloticus* at 25℃ water temperature(CFU/g)

感染时间 Infection time	无乳链球菌平均浓度 Average abundance of <i>S. agalactiae</i>			
	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	脑 Brain
3 h	$1.41 \times 10^5$	$7.06 \times 10^5$	$3.56 \times 10^5$	$5.29 \times 10^3$
6 h	$4.36 \times 10^5$	$8.85 \times 10^6$	$5.55 \times 10^6$	$6.18 \times 10^3$
12 h	$1.61 \times 10^6$	$2.32 \times 10^7$	$1.12 \times 10^7$	$6.08 \times 10^4$
24 h	$1.55 \times 10^7$	$8.18 \times 10^7$	$6.26 \times 10^7$	$2.73 \times 10^5$
2 d	$8.72 \times 10^5$	$3.19 \times 10^6$	$1.21 \times 10^7$	$1.52 \times 10^4$
4 d	$1.76 \times 10^3$	$2.68 \times 10^4$	$1.77 \times 10^4$	$1.15 \times 10^4$
6 d	$7.96 \times 10^3$	$8.88 \times 10^3$	$1.14 \times 10^4$	$3.39 \times 10^3$
10 d	94.15	$4.38 \times 10^3$	$4.28 \times 10^3$	339.36
15 d	34.91	111.36	951.01	53.82
20 d	49.53	145.03	783.31	0
25 d	0	0	28.51	0
30 d	0	0	0	0

感染后 12 h, 33℃实验组各组织中无乳链球菌浓度即可达到峰值, 其脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中无乳链球菌含量分别为( $9.18 \times 10^8 \pm 1.44 \times 10^8$ )、( $4.60 \times 10^9 \pm 2.19 \times 10^8$ )、( $3.46 \times 10^{10} \pm 2.06 \times 10^9$ )、( $8.08 \times 10^9 \pm 2.19 \times 10^9$ ) CFU/g (表 3)。感染后 24 h, 25℃实验组罗非鱼体内脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中的无乳链球菌浓度均达到峰值, 其含量分别为( $2.73 \times 10^5 \pm 5.20 \times 10^4$ )、( $1.55 \times 10^7 \pm 3.64 \times 10^6$ )、( $8.18 \times 10^7 \pm 1.26 \times 10^7$ )、( $6.26 \times 10^7 \pm 7.52 \times 10^6$ ) CFU/g (表 1)。29℃实验组罗非鱼肝脏、脾脏和肾脏中无乳链球菌浓度同样在感染后 24 h 达到

表2 29℃水温条件下尼罗罗非鱼4种组织中无乳链球菌平均浓度与感染时间的关系

Tab.2 Relationship between infection time and average abundance of *S. agalactiae* in the four tissues of *O. niloticus* at 29℃ water temperature(CFU/g)

感染时间 Infection time	无乳链球菌平均浓度 Average abundance of <i>S. agalactiae</i>			
	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	脑 Brain
3 h	$3.02 \times 10^5$	$1.61 \times 10^6$	$3.33 \times 10^6$	$5.90 \times 10^3$
6 h	$4.20 \times 10^6$	$1.66 \times 10^7$	$1.59 \times 10^8$	$6.63 \times 10^4$
12 h	$9.31 \times 10^7$	$3.90 \times 10^8$	$3.65 \times 10^8$	$5.01 \times 10^5$
24 h	$1.76 \times 10^9$	$3.56 \times 10^9$	$2.70 \times 10^9$	$1.22 \times 10^8$
2 d	$1.74 \times 10^7$	$1.51 \times 10^8$	$5.38 \times 10^8$	$7.87 \times 10^8$
4 d	$9.67 \times 10^4$	$1.10 \times 10^6$	$1.23 \times 10^6$	$4.73 \times 10^6$
6 d	$1.38 \times 10^2$	$1.99 \times 10^3$	$2.06 \times 10^3$	$9.90 \times 10^3$
10 d	0	0	$3.03 \times 10^4$	23.53
15 d	0	0	56.31	0
20 d	0	0	0	0

表3 33℃水温条件下尼罗罗非鱼4种组织中无乳链球菌平均浓度与感染时间的关系

Tab.3 Relationship between infection time and average abundance of *S. agalactiae* in the four tissues of *O. niloticus* at 33℃ water temperature (CFU/g)

感染时间 Infection time	无乳链球菌平均浓度 Average abundance of <i>S. agalactiae</i>			
	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	脑 Brain
3 h	$3.57 \times 10^5$	$1.96 \times 10^6$	$1.62 \times 10^6$	$1.30 \times 10^4$
6 h	$1.39 \times 10^8$	$1.46 \times 10^8$	$6.26 \times 10^7$	$1.61 \times 10^6$
12 h	$4.60 \times 10^9$	$3.46 \times 10^{10}$	$8.08 \times 10^9$	$9.18 \times 10^8$
24 h	$1.06 \times 10^9$	$6.04 \times 10^9$	$1.18 \times 10^8$	$1.34 \times 10^8$
2 d	$5.48 \times 10^6$	$7.49 \times 10^5$	$6.62 \times 10^6$	$2.35 \times 10^4$
4 d	$3.29 \times 10^5$	$2.52 \times 10^5$	$2.07 \times 10^6$	$1.60 \times 10^3$
6 d	$4.99 \times 10^2$	$4.00 \times 10^2$	$2.44 \times 10^4$	$6.90 \times 10^3$
10 d	0	0	0	0

峰值,其含量分别为( $1.76 \times 10^9 \pm 1.97 \times 10^8$ )、( $3.56 \times 10^9 \pm 4.93 \times 10^8$ )和( $2.70 \times 10^9 \pm 3.65 \times 10^8$ ) CFU/g,但是,脑组织中无乳链球菌浓度峰值出现在感染后48 h,其含量为( $7.87 \times 10^8 \pm 8.87 \times 10^7$ ) CFU/g(表2)。

分析无乳链球菌在罗非鱼体内的平均增殖速度可知,33℃组罗非鱼4个组织中无乳链球菌的平均增殖速度均比29℃组和25℃组的要快。本研究中,罗非鱼脾脏中无乳链球菌的平均增殖速度最大,33℃组、29℃组和25℃组脾脏组织中无乳链球菌的平均增殖速度分别为 $3.84 \times 10^9$ 、 $1.69 \times 10^8$ 和 $3.56 \times 10^6$  CFU/g·h。脑组织中的平均增殖速度最小,分别为 $1.02 \times 10^8$ 、 $1.75 \times 10^7$ 和 $1.27 \times 10^4$  CFU/g·h(表4)。

表4 不同实验组罗非鱼体内不同组织中无乳链球菌的平均增殖速度

Tab.4 Average propagation speed of *S. agalactiae* in various infected tissues of *O. niloticus* in different experimental groups [CFU/(g·h)]

组别 Group	平均增殖速度 Average propagation speed			
	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	脑 Brain
25℃	$7.33 \times 10^5$	$3.56 \times 10^6$	$2.96 \times 10^6$	$1.27 \times 10^4$
29℃	$8.37 \times 10^7$	$1.69 \times 10^8$	$1.28 \times 10^8$	$1.75 \times 10^7$
33℃	$5.11 \times 10^8$	$3.84 \times 10^9$	$8.98 \times 10^8$	$1.02 \times 10^8$

各实验组罗非鱼体内无乳链球菌浓度达到峰值后,随着感染时间的延长,体内无乳链球菌浓度逐渐下降(表1~表3)。感染2 d后,33℃实验组的4个组织(脑、肝脏、脾脏和肾脏)中无乳链球菌浓度即明显下降(降低2~4个数量级),而25℃和29℃实验组在感染4 d后,4个组织(脑、肝脏、脾脏和肾脏)中无乳链球菌浓度才呈现明显下降趋势;感染6 d后,各实验组存活罗非鱼体内无乳链球菌浓度均降至较低水平( $1.38 \times 10^2 \sim 2.44 \times 10^4$  CFU/g),感染10 d后,33℃实验组存活罗非鱼体内已分离不到无乳链球菌;29℃实验组感染15 d后,只能从存活罗非鱼肾脏中分离到少量无乳链球菌,但是感染20 d后,则分离不到无乳链球菌;感染25 d后,25℃实验组存活罗非鱼肾脏中能够分离到少量的无乳链球菌,但感染30 d后,存活的罗非鱼体内分离不到无乳链球菌。

### 2.3 病原菌浓度、累积生存率与感染时间的关系

分析尼罗罗非鱼感染无乳链球菌后,脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中病原菌浓度、累积生存率与感染时间之间的关系(图1~图5)可知,水温越高,罗非鱼感染的累积死亡率越高,各组织中病原菌的增殖速度越快,组织中病原菌的浓度也越高。实验表明,高温组

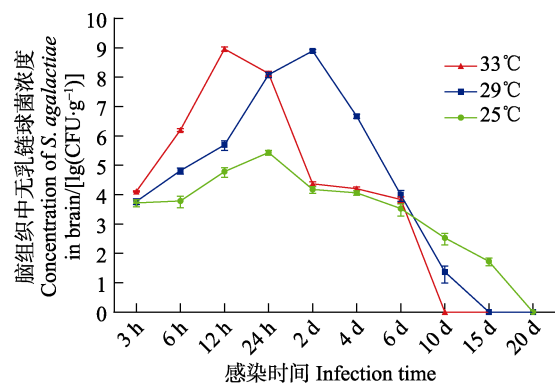


图2 尼罗罗非鱼脑组织中无乳链球菌浓度随感染时间的变化趋势

Fig.2 Variation of the concentration of *S. agalactiae* with infection time in the brain of *O. niloticus*

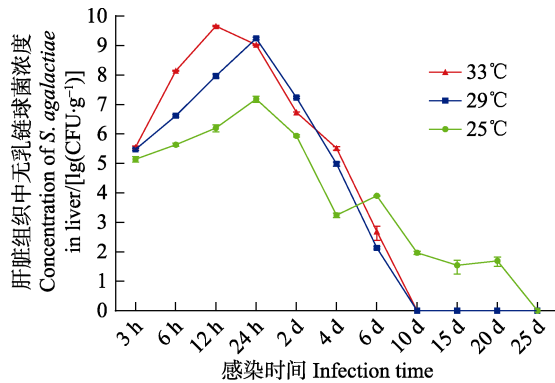


图 3 尼罗罗非鱼肝脏组织中无乳链球菌浓度随感染时间的变化趋势

Fig.3 Variation of the concentration of *S. agalactiae* with infection time in the liver of *O. niloticus*

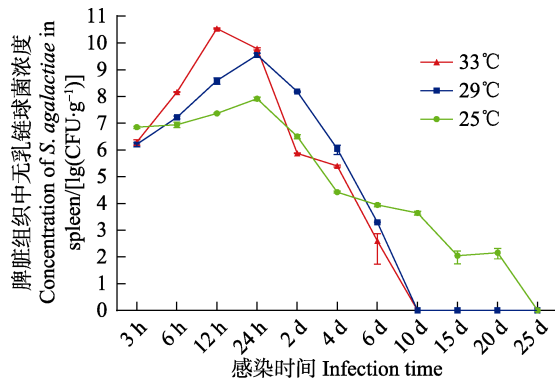


图 4 尼罗罗非鱼脾脏组织中无乳链球菌浓度随感染时间的变化趋势

Fig.4 Variation of the concentration of *S. agalactiae* with infection time in the spleen of *O. niloticus*

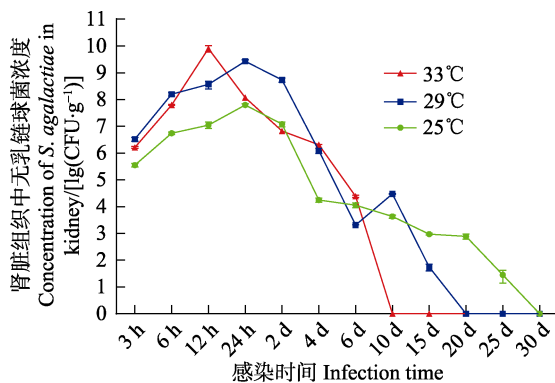


图 5 尼罗罗非鱼肾脏组织中无乳链球菌浓度随感染时间的变化趋势

Fig.5 Variation of the concentration of *S. agalactiae* with infection time in the kidney of *O. niloticus*

(33°C)罗非鱼的脾脏和肾脏中无乳链球菌的浓度峰值极显著高于 25°C 和 29°C 实验组 ( $P < 0.01$ )。研究发现, 同一温度组罗非鱼感染无乳链球菌后, 不同组织中无乳链球菌的增殖速度却不相同, 肝脏、脾脏和肾脏中

病原菌增殖速度较快, 脑组织中无乳链球菌的增殖速度相对较慢(表 4)。相同温度组的罗非鱼体内各组织中的无乳链球菌最大浓度也不相同, 感染初期(0~2 d)脑组织中无乳链球菌的浓度通常低于同时期肝脏、脾脏和肾脏等组织中无乳链球菌的浓度。

## 2.4 菌落的形态特征和分子鉴定

对每个时间点取样涂布过夜培养的平板进行菌落观察, 其中, 表面光滑、湿润、圆形、边缘整齐、乳白色、直径为 0.5~2.0 mm 的菌落即为疑似无乳链球菌。挑取疑似单菌落, 将无乳链球菌特异基因 *cfb* 作为检测对象, 每组随机挑取 10 个单菌落进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 170 bp 的目的条带, 与预期相符, 则确定疑似菌落为无乳链球菌。

## 3 讨论

罗非鱼链球菌病作为国家三类动物性疫病, 是一种高温高发、高传染性、高死亡率的细菌性疾病(可小丽等, 2013)。近年来, 链球菌病在我国南方罗非鱼主养区呈现暴发性流行, 其发病率和死亡率均较高, 特别是在高温季节(卢迈新, 2010)。因此, 研究水温与罗非鱼链球菌病暴发之间的关系具有重要的理论和现实意义。本研究为了解不同水温条件下, 无乳链球菌在罗非鱼体内的动态分布规律, 选取 33°C、29°C 和 25°C 3 个温度组, 分别代表了高温期间链球菌病极易暴发的温度、罗非鱼最适生长温度和低温时几乎无链球菌病发病的温度, 以人工注射感染的方式, 通过对感染后罗非鱼的脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中无乳链球菌的分离、鉴定以及菌落数统计分析, 以期模拟不同发病过程中, 无乳链球菌在罗非鱼群体体内的动态分布及其增殖、消除规律。由于实验过程中样本量不够大以及罗非鱼存在个体差异的原因, 本研究中罗非鱼体内无乳链球菌动态变化主要是指群体中病原菌的动态分布。

本研究表明, 水温越高罗非鱼链球菌病的发病越快, 死亡率越高。水温由 25°C 升至 33°C 时, 罗非鱼感染无乳链球菌后的发病死亡时间从 48 h 缩短至 9 h, 而且高温组罗非鱼的累积死亡率(78.90%)极显著高于低温组(6.67%) ( $P < 0.01$ )。高温组患病罗非鱼的临床症状如打转、侧翻、离群狂游、体色发黑等, 与前人所报道的结果十分相似(邝伟键等, 2017; 王均等, 2011; 魏顺等, 2016)。然而, 低温组发病罗非鱼仅出现体色发黑、游动缓慢的症状。以上结果表明, 水温显著影响了罗非鱼链球菌病的发病进程和临床症状。



高水温条件下,罗非鱼感染无乳链球菌后发病迅速、死亡率高,这与每年高温季节罗非鱼链球菌病易暴发、发病快和死亡率高特征十分吻合。可能是因为高温时无乳链球菌在罗非鱼的体内繁殖快、毒力强,无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度大于消除速度,导致了罗非鱼链球菌病发病迅速、死亡率高、病程长、治/自愈慢等现象。在高温条件下,无乳链球菌毒力相关基因、嘌呤代谢和铁摄取相关基因表达与低温相比呈上升趋势,而且高温时,无乳链球菌对宿主的侵袭力(包括黏附、定植、入侵、繁殖、扩散及抵抗宿主防御的能力等)和产毒素能力均比低温条件下的高(Freitas Lione *et al*, 2010; Mereghetti *et al*, 2008; 石洁等, 2012),以上这些因素导致了无乳链球菌对罗非鱼的致病力增强。此外,研究发现,高温能够引起罗非鱼免疫力降低,如抗氧化酶活性、巨噬细胞溶菌酶活性、补体活性下降和血清溶菌酶活性受到抑制等,导致鱼体对病原菌的易感性增强(陈家长等, 2011)。以上综合因素共同作用致使罗非鱼在高温时感染无乳链球菌的死亡率显著升高,这也暗示水温可显著影响无乳链球菌对罗非鱼的致病力。

本研究发现,水温越高无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度越快。菌落统计结果显示,高温组(33℃)罗非鱼体内无乳链球菌的浓度在感染后 12 h 即达到峰值;然而,29℃组和 25℃组罗非鱼体内无乳链球菌达到峰值需要 24 h,甚至 48 h。25℃实验组、29℃实验组和 33℃实验组无乳链球菌在罗非鱼体内的最大平均增殖速度分别为  $3.56 \times 10^6$ 、 $1.69 \times 10^8$  和  $3.84 \times 10^9$  CFU/g·h。水温从 25℃升到 33℃,无乳链球菌在罗非鱼体内的平均增殖速度提高了 1079.5 倍,这表明,水温可显著影响无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度,而且水温越高,无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度越快。

与其增殖速度相比,当实验组罗非鱼体内无乳链球菌浓度达到峰值后,其消除速度均较慢。数据分析表明,无乳链球菌的消除速度随着温度的升高而加快,水温越高消除速度越快,所需消除时间越短,例如:25℃组罗非鱼体内无乳链球菌完全被清除需要 30 d,而 29℃组和 33℃组分别需要 20 和 10 d。而且无乳链球菌在肾脏中的滞留时间最长,肾脏可能是无乳链球菌侵染罗非鱼的主要靶器官。此外,通过分析无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度和消除速度发现,水温越高无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度和消除速度均较快,并且明显快于低温组。研究表明,无乳链球菌可以在巨噬细胞内存活(Guo *et al*, 2014),其通过转录调控以适应吞噬体内的环境,形成胞内寄

生,使得无乳链球菌逃避宿主的免疫监视(Zlotkin *et al*, 2003),这也解释了为何无乳链球菌可以在罗非鱼体内长期存活。然而,水温可以明显影响无乳链球菌在罗非鱼体内的存活时间,即逃逸时间,本研究将为进一步揭示其免疫逃逸机制提供科学依据。

本研究发现,罗非鱼感染无乳链球菌后,水温越高,单位质量组织(脑、肝脏、脾脏和肾脏)中无乳链球菌的浓度越高。分析不同实验组罗非鱼各组织中的最大载菌量可以发现,33℃组脾脏中的最大载菌量分别是 29℃和 25℃组的 9.7 倍和 422.8 倍;33℃组肾脏中的最大载菌量分别是 29℃和 25℃组的 3.0 倍和 129.1 倍;33℃组脑中的最大载菌量分别是 29℃和 25℃组的 1.2 倍和 3361.1 倍;33℃组肝脏中的最大载菌量分别是 29℃和 25℃组的 2.6 倍和 296.5 倍,表明水温可以显著影响无乳链球菌在罗非鱼体内的浓度。高温组罗非鱼体内无乳链球菌的浓度高,其死亡率也高;低温组罗非鱼体内无乳链球菌的浓度低,其死亡率也低。表明高温条件下罗非鱼体内无乳链球菌浓度的增加也是导致罗非鱼死亡率升高的重要原因之一,这也表明罗非鱼体内无乳链球菌的浓度与其死亡率存在密切的关系。本研究结果显示,与高温组相比,低温组(25℃)罗非鱼脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中无乳链球菌的最大载菌量均较低,表明低温条件下无乳链球菌对罗非鱼的以上 4 种组织的侵染能力降低,尤其是脑组织,这解释了低温组发病罗非鱼的链球菌病症状(如侧翻、打转游动)不明显的原因。此外,本研究中,发病时期罗非鱼脾脏的无乳链球菌浓度通常比其他 3 个组织中的高,暗示脾脏也可能是无乳链球菌侵袭罗非鱼的重要靶器官。

综上所述,尼罗罗非鱼感染无乳链球菌后,养殖水温越高,其感染死亡率越高,单位质量的脑、肝脏、脾脏和肾脏组织中无乳链球菌的最大载菌量也越高。本研究发现,水温能够影响无乳链球菌在罗非鱼体内的增殖速度和存活时间,可显著影响无乳链球菌在罗非鱼体内的浓度,进而影响无乳链球菌对罗非鱼的致病性,这表明,温度是罗非鱼链球菌病暴发的关键因子之一。本研究较好地解释了高温季节罗非鱼链球菌病易暴发、死亡率高这一现象。研究表明,在罗非鱼养殖过程中,应注意链球菌病暴发时期的水温,建议根据不同的养殖水温采取不同的防控措施和施药策略。本研究也将为罗非鱼链球菌病的弱毒活疫苗研发提供参考依据,即免疫时期水温的高低将影响弱毒株在罗非鱼体内的存活时间,进而影响疫苗株对机体免疫刺激的时间。

## 参 考 文 献

- Chen JZ, Zang XL, Qu JH, *et al.* The immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under temperatures stress. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(9): 1896–1901 [陈家长, 臧学磊, 瞿建宏, 等. 温度胁迫下罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)机免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响. *农业环境科学学报*, 2011, 30(9): 1896–1901]
- Deng HW, Guo WL, Sun XF, *et al.* Optimization of the extraction conditions of active components for inhibition of *Streptococcus agalactiae* from *Salvia miltiorrhiza* Bge. using response surface methodology. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 132–140 [邓恒为, 郭伟良, 孙晓飞, 等. 响应面法优化丹参中抗无乳链球菌活性成分的提取工艺. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 132–140]
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine*, 2004, 22(27–28): 3769–3773
- Fang W, Liang YH, Ning D, *et al.* Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* in tilapia in Guangdong. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2016, 55(2): 97–101, 110 [方伟, 梁宇恒, 宁丹, 等. 广东地区感染养殖罗非鱼的无乳链球菌分子分型研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 2016, 55(2): 97–101, 110]
- Freitas Lione VO, Bittencourt Dos Santos MH, Ulisses Carvalho TM, *et al.* Fever temperature enhances mechanisms of survival of *Streptococcus agalactiae* within human endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2010, 26(4): 511–516
- Guo CM, Chen RR, Kalhor DH, *et al.* Identification of genes preferentially expressed by highly virulent piscine *Streptococcus agalactiae* upon interaction with macrophages. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87980
- Huang YH, Peng Y, Liu J, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility test of tilapia pathogen *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(3): 498–504 [黄艳华, 彭亚, 刘杰, 等. 罗非鱼致病性无乳链球菌的分离鉴定及药敏试验. *南方农业学报*, 2014, 45(3): 498–504]
- Ke XL, Lu MX, Li QY, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of tilapia *Streptococcus agalactiae* based on *cfb* and *16S rRNA* gene. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(20): 52–62 [可小丽, 卢迈新, 李庆勇, 等. 罗非鱼无乳链球菌鉴定及基于 *cfb* 和 *16S rRNA* 基因同源性分析. *中国农学通报*, 2013, 29(20): 52–62]
- Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2000, 188(3–4): 237–246
- Kuang WJ, Huang LZ, Liu MJ, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 49(9): 62–66 [邝伟键, 黄良宗, 刘明杰, 等. 罗非鱼源无乳链球菌的分离鉴定及药敏试验. *畜牧与兽医*, 2017, 49(9): 62–66]
- Liu ZG, Ke XL, Lu MX, *et al.* Effect of temperature on the virulence of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1733–1741 [刘志刚, 可小丽, 卢迈新, 等. 温度对尼罗罗非鱼无乳链球菌毒力的影响. *水产学报*, 2013, 37(11): 1733–1741]
- Lu MX, Li J, Ye X, *et al.* Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan Provinces. *Microbiology China*, 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]
- Lu MX. Review of research on *Streptococcosis* in tilapia. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(1): 75–79 [卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展. *南方水产科学*, 2010, 6(1): 75–79]
- Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, *et al.* Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2785
- Shi J, Wang CJ. Bacterial strategies for overcoming the defense of host cells. *Microbiology China*, 2012, 39(1): 90–98 [石洁, 王长军. 病原菌逃避宿主细胞防御的策略. *微生物学通报*, 2012, 39(1): 90–98]
- Sun Y, Hu YH, Liu CS, *et al.* Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine. *Vaccine*, 2010, 28(23): 3905–3912
- Tan JJ, Chen CF, Gao Y, *et al.* Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Streptococcus agalactiae* from hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(6): 745–751 [谭晶晶, 陈昌福, 高宇, 等. 奥尼罗非鱼无乳链球菌的鉴定、致病性及药物敏感性研究. *华中农业大学学报*, 2010, 29(6): 745–751]
- Wang B, Li GH, Wang P, *et al.* Expression and immunogenicity analysis of hemolysin gene in *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 60–67 [王蓓, 李桂欢, 王培, 等. 罗非鱼源无乳链球菌溶血素基因体外表达及其免疫原性. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 60–67]
- Wang DQ, Tong YN, Li FY, *et al.* Study on combination of Chinese herbal medicine against tilapia *Streptococcus* disease in vitro. *Journal of Aquaculture*, 2017, 38(1): 47–51 [王德强, 佟延南, 李芳远, 等. 中草药联用对罗非鱼无乳链球菌作用的研究. *水产养殖*, 2017, 38(1): 47–51]
- 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]
- Wei S, Zhang Z, Li YH, *et al.* Epidemic and antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) in Guangdong Province. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 503–511 [魏顺, 张泽, 李宇辉, 等. 广东地区吉富罗非鱼无乳链球菌病的流行情况与耐药性. *水产学报*, 2016, 40(3): 503–511]
- Wu B, Fan HP, Zhang XY, *et al.* Preparation of the oral microencapsulated vaccine of *Streptococcus agalactiae* from tilapia and its immunological effect. *Journal of*



- Fisheries of China, 2016, 40(8): 1258–1264 [吴斌, 樊海平, 张新艳, 等. 罗非鱼无乳链球菌微胶囊口服疫苗的研制及其免疫效果. 水产学报, 2016, 40(8): 1258–1264]
- Zhang DF, Liu LH, Ren Y, *et al.* Isolation, identification, and molecular characteristics of a new genotype of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 1044–1054 [张德锋, 刘礼辉, 任燕, 等. 我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离, 鉴定及其分子特征. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1044–1054]
- Zhang DF, Yuan W, Ke XL, *et al.* Molecular characteristics and transmission of *Streptococcus agalactiae* in a major tilapia culturing area of China. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 606–614 [张德锋, 袁伟, 可小丽, 等. 中国罗非鱼主养区无乳链球菌的分子流行特征及其传播方式. 中国水产科学, 2017, 24(3): 606–614]
- Zhang XY, Fan HT, 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]
- Zhu JL, Gao TT, Zhong XJ, *et al.* Immunoprotection of the inactivated vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(5): 636–643 [朱洁莲, 高婷婷, 钟孝俊, 等. 罗非鱼源无乳链球菌灭活疫苗免疫效果的研究. 中国兽医科学, 2017, 47(5): 636–643]
- Zlotkin A, Chilmonczyk S, Eyngor M, *et al.* Trojan horse effect: Phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. Infection and Immunity, 2003, 71(5): 2318–2325

(编辑 马瑾艳)

## Dynamic Distribution and Elimination Patterns of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus* at Different Water Temperatures

GUO Fuqiang<sup>1,2</sup>, ZHANG Defeng<sup>1,3</sup>, CAO Jianmeng<sup>1</sup>, LIU Zhigang<sup>1</sup>, KE Xiaoli<sup>1,3</sup>, LU Maixin<sup>1,3</sup>①

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;

2. National Demonstration Center for Experimental National Demonstration Center for Experimental, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Guangzhou 510380)

**Abstract** Based on the dynamic distribution and elimination patterns of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus* at different water temperatures, we provide a foundation for research on *S. agalactiae* pathogenesis in *O. niloticus*, as well as a scientific basis for the prevention and control of *S. agalactiae* infection in *O. niloticus* by controlling water temperature and the rational use of drugs. We used *O. niloticus* infected with *S. agalactiae* (WC1535 strain) by artificial intraperitoneal injection. First, the mortality rates of infected *O. niloticus* were assessed at 25°C, 29°C, and 33°C. Then, we performed *in vitro* isolation, cultured and counted *S. agalactiae* from the infected fish maintained at three temperatures. Next, we assessed the abundance of *S. agalactiae* in the brain, liver, spleen, and kidney tissues of the infected fish at the three temperatures. The results showed that fish mortality rate increased with increasing water temperature, and the cumulative mortality rate was 6.67%, 25.56%, and 78.90% at 25°C, 29°C and 33°C, respectively. Furthermore, the maximum abundance of *S. agalactiae* in unit mass of the brain, liver, spleen, and kidney tissues of *O. niloticus* increased with increasing water temperature. Thus, at a high temperature, *S. agalactiae* propagated rapidly in *O. niloticus*, whereas the residence time was short. In contrast, at a lower temperature, the propagation time decreased, but the residence time increased. Moreover, our results showed that *S. agalactiae* abundance was the highest in the spleen and survival time was the longest in the kidney. In conclusion, the propagation and elimination speeds of *S. agalactiae* in tissues of infected *O. niloticus* were closely related to water temperature. Our results provide important data for further study of *S. agalactiae* pathogenesis, ensuring effective prevention and control measures.

**Key words** Temperature; *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; Dynamic distribution; Elimination patterns

① Corresponding author: LU Maixin, E-mail: mx-lu@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170914001

http://www.yykxjz.cn/

赵亭亭, 张岩, 陈超, 李炎璐, 张廷廷, 乔莹, 翟介明, 李文升. 3 种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 89-96

Zhao TT, Zhang Y, Chen C, Li YL, Zhang TT, Qiao Y, Zhai JM, Li WS. Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 89-96

## 3 种养殖石斑鱼的肌肉营养成分 分析与品质评价\*



赵亭亭<sup>1,2</sup> 张岩<sup>2</sup> 陈超<sup>2①</sup> 李炎璐<sup>2</sup> 张廷廷<sup>2</sup>  
乔莹<sup>2</sup> 翟介明<sup>3</sup> 李文升<sup>3</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 261418)

**摘要** 本研究对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)、云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)的杂交种(俗称云龙石斑鱼)3种石斑鱼肌肉的营养成分和品质进行了分析评价。结果显示,这3种石斑鱼肌肉的粗蛋白含量分别为20.60%、19.30%和20.00%,粗脂肪的含量分别为2.60%、1.60%和4.30%。3种石斑鱼的肌肉均检测出16种常见氨基酸。其中,云纹石斑鱼肌肉的氨基酸总量、必需氨基酸含量和鲜味氨基酸的含量分别为16.95%、7.11%和6.31%(湿重),鞍带石斑鱼的分别为17.46%、7.18%和6.83%,云龙石斑鱼的分别为18.56%、7.69%和7.16%。其必需氨基酸的组成比例均符合FAO/WHO标准。3种石斑鱼肌肉的支链氨基酸和芳香族氨基酸的比值(*F*值)分别为2.22、2.57和2.60。依据氨基酸评分(AAS)和化学评分(CS)分值,蛋氨酸为3种石斑鱼的第一限制性氨基酸,缬氨酸为第二限制性氨基酸。另外,3种石斑鱼肌肉的矿物质含量丰富,常量元素均以钾含量最高,微量元素均以锌含量最高。研究表明,3种石斑鱼均是符合人体营养需求的优质海水鱼。

**关键词** 石斑鱼; 肌肉; 营养成分; 品质评价

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)06-0089-08

石斑鱼属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*),是暖水性近海底层鱼类,为重要的世界性海洋经济鱼类,也是名贵的海水养殖鱼类之一。其肉质肥美丰腴,洁白鲜嫩类似鸡肉,口感佳且营养丰富,素有“海鸡肉”之称。随着生活质量的提高,人们对鲜活海产品的需求量与日俱增,石斑

鱼作为一种低脂肪、高蛋白的食用鱼类,深得人们喜爱,石斑鱼市场供不应求。

关于石斑鱼肌肉营养成分分析有较多研究,如七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)、龙虎石斑鱼(*E. fuscoguttatus* ♀×*E. lanceolatus* ♂)、美洲黑石斑

\* 山东省自然科学基金项目(ZR2015PC015)、中国东盟海上合作基金项目和冷温性石斑鱼规模化苗种繁育关键技术引进项目(2012FDA30360)共同资助[This work was supported by Natural Science Funds of Shangdong Province (ZR2015PC015), China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project, and the Introduction of Key Techniques for Large-Scale Fry Breeding of Cold Temperature Grouper(2012FDA30360)]. 赵亭亭, E-mail: 2467832293@qq.com

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

收稿日期: 2017-09-14, 收修改稿日期: 2017-11-15

鱼(*Centropristis striata*)、点带石斑鱼(*E. malabarica*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)的肌肉营养成分与品质相关报道(程波等, 2009; 郭永军等, 2009; 黎祖福等, 2008; 于宏等, 2014; 党冉等, 2010; 徐大为等, 2008; 孔祥迪等, 2016)。本研究对云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交新品系云龙石斑鱼的常规营养成分、氨基酸组成及矿物质含量进行了分析与评价, 旨在为 3 种石斑鱼之间的营养优势是否可以顺利表达进行评估; 为石斑鱼家族中杂交的合理性、可靠性进行评估; 为提高人工养殖条件下的商品质量及配合饲料的研制提供基础数据和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

云纹石斑鱼、云龙石斑鱼取自山东省莱州明波水产有限公司, 鞍带石斑鱼(龙胆)由海南省海王星水产科技有限公司提供。每组取石斑鱼样 10 尾, 分别测量体重和体长。云纹石斑鱼平均体重为(340.50±12.50) g、平均体长为(21.60±1.23) cm; 鞍带石斑鱼平均体重为(297.05±14.60) g、平均体长为(20.10±1.50) cm; 云龙石斑鱼平均体重为(320.60±20.48) g、平均体长为(21.70±0.53) cm。

### 1.2 样品处理

样品鱼经 MS-222 麻醉后, 测量体重和体长, 洗净后解剖, 每尾鱼自头背部两侧至尾柄前去皮后取肌肉样品。肌肉切小块等比例混合, 用组织粉碎机搅碎、混匀, 在-40℃条件下冷冻保存备用。肌肉组织样品送青岛市华测检测技术有限公司进行检测, 每个样品检测 2 次。

### 1.3 测试项目与方法

水分含量采用直接干燥法测定(GB 5009.3-2016); 灰分测定采用马弗炉 550℃高温灼烧法(GB 5009.4-2016); 粗蛋白含量使用全自动凯氏定氮仪(GB 5009.5-2010)测定; 粗脂肪含量采用索氏抽提法(GB/T 5009.6-2003)测定。氨基酸的测定依据 GB/T 5009.124-2003, 使用日立 L-8800 型氨基酸分析仪测定。采用 GB/T 5009.13、14、87、90、91、92)-2003 和 GB 5009.93-2010 方法测定各种矿物质含量。

### 1.4 营养品质评价方法

根据 FAO/WHO 1973 年建议的氨基酸评分标准模式(Pellet *et al*, 1980)和中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所提出的鸡蛋蛋白的氨基酸模式, 计算

3 种石斑鱼的氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)及氨基酸的支芳值(*F* 值)。公式如下:

$$AAS = \frac{\text{待测蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}{\text{FAO评分模式某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}$$

$$CS = \frac{\text{待测蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}{\text{鸡蛋蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}$$

式中, 氨基酸含量指每克氮中氨基酸的毫克数。

氨基酸含量(mg/g N) =

$$\frac{\text{氨基酸含量\% (鲜样)}}{\text{粗蛋白含量\% (鲜样)}} \times 6.25 \times 1000$$

*F* 值是支链氨基酸(BCAA)与芳香族氨基酸(AAA)的比值(黄薇等, 2014), 公式如下:

$$F = (\text{缬氨酸} + \text{亮氨酸} + \text{异亮氨酸}) / (\text{苯丙氨酸} + \text{酪氨酸})$$

### 1.5 数据处理与分析

3 种鱼各个营养成分的数值为每组混合肌肉样品重复测试获得数据的平均值, 使用 Excel 2013 软件处理实验数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 肌肉常规营养成分

3 种石斑鱼肌肉的常规营养成分见表 1。云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和云龙石斑鱼肌肉中粗蛋白含量分别为 20.60%、19.30%和 20.00%, 粗脂肪的含量分别为 2.60%、1.60%和 4.30%。鞍带石斑鱼肌肉中的水分含量最高, 为 77.10%, 云纹石斑鱼和云龙石斑鱼次之, 分别为 75.70%和 74.40%。3 种石斑鱼肌肉的灰分含量分别为 1.30%、1.10%和 1.20%。

### 2.2 肌肉氨基酸组成与品质评价

**2.2.1 氨基酸含量** 3 种石斑鱼肌肉氨基酸含量的测定结果见表 2。3 种石斑鱼的肌肉共检测出 16 种常见氨基酸, 包括 7 种必需氨基酸(Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe 和 Lys)、2 种半必需氨基酸(His 和 Arg)和 7 种非必需氨基酸(Asp、Glu、Gly、Ala、Tyr、Pro 和 Ser)。其中, 云纹石斑鱼氨基酸总量占肌肉鲜重的 16.95%, 必需氨基酸含量为 7.11%, 半必需氨基酸与非必需氨基酸分别占肌肉鲜重的 1.59%和 8.25%。鞍带石斑鱼氨基酸总量占肌肉鲜重的 17.46%, 必需氨基酸含量与云纹石斑鱼相近, 为 7.18%, 半必需氨基酸与非必需氨基酸分别占肌肉鲜重的 1.57%和 8.71%。云龙石斑鱼肌肉中氨基酸总量为 18.56%, 必需氨基酸、半必需氨基酸和非必需氨基酸含量分别为 7.69%、1.67%和 9.20%。3 种石斑鱼肌肉中必需氨基

表 1 3 种石斑鱼与其他经济鱼类肌肉常规营养成分的比较(%，湿重)

Tab.1 Nutrients in muscles of 3 species of grouper compared with some other economic fish species (%，wet weight)

种类 Species	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	灰分 Ash	参考文献 Reference
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	75.70	20.60	2.60	1.30	本文
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	77.10	19.30	1.60	1.10	本文
云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)	74.40	20.00	4.30	1.20	本文
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	77.10	18.80	2.20	1.16	郭永军等, 2009
点带石斑鱼 <i>E. malabaricus</i>	76.63	19.14	1.41	0.99	徐大为等, 2008
淡水石斑鱼 <i>Cichlasoma managuense</i>	76.00	18.90	3.00	1.73	黄海等, 2012
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	73.27	19.15	4.27	1.33	林建斌等, 2010
豹纹鳃棘鲈 <i>Plectropomus leopardus</i>	79.30	17.60	0.90	1.80	尤宏争等, 2014
珍珠龙胆 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)	75.55	19.95	2.29	1.24	王际英等, 2015
七带石斑鱼 <i>E. septemfasciatus</i>	74.10	19.60	2.70	1.70	程波等, 2009

表 2 3 种石斑鱼肌肉氨基酸组成及含量(%，湿重)

Tab.2 Amino acid in muscles of 3 species of grouper (%，wet weight)

氨基酸 Amino acids	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)
苏氨酸* Thr	0.75	0.91	0.99
缬氨酸** Val	0.88	0.87	0.91
蛋氨酸* Met	0.56	0.57	0.59
异亮氨酸** Ile	0.83	0.88	0.96
亮氨酸** Leu	1.62	1.54	1.67
苯丙氨酸*• Phe	0.89	0.69	0.73
赖氨酸* Lys	1.58	1.72	1.84
天冬氨酸# Asp	1.69	1.98	2.15
谷氨酸# Glu	1.06	2.61	2.73
甘氨酸# Gly	1.53	1.05	1.04
丙氨酸# Ala	2.03	1.19	1.24
酪氨酸• Tyr	0.61	0.59	0.63
脯氨酸 Pro	0.36	0.56	0.63
丝氨酸 Ser	0.97	0.73	0.78
组氨酸& His	0.53	0.39	0.43
精氨酸& Arg	1.06	1.18	1.24
必需氨基酸 Essential amino acids (EAA)	7.11	7.18	7.69
非必需氨基酸 Nonessential amino acids (NEAA)	8.25	8.71	9.20
半必需氨基酸 Semi-essential amino acids (SEAA)	1.59	1.57	1.67
鲜味氨基酸 Delicious amino acids (DAA)	6.31	6.83	7.16
总氨基酸 Total amino acids (TAA)	16.95	17.46	18.56
支链氨基酸 Branched-chain amino acid (BCAA)	3.33	3.29	3.54
芳香族氨基酸 Aromatic amino acid (AAA)	1.50	1.28	1.36
$W_{EAA}/W_{TAA}$	41.95	41.12	41.43
$W_{EAA}/W_{NEAA}$	72.26	69.84	70.75
$W_{DAA}/W_{TAA}$	37.23	39.12	38.58
$F(BCAA/AAA)$	2.22	2.57	2.60

\*为必需氨基酸，&amp;为半必需氨基酸，#为鲜味氨基酸，\*\*为支链氨基酸，•为芳香族氨基酸

\*: Essential amino acid (EAA); &amp;: Semi-essential amino acid (SEAA); #: Delicious amino acid (DAA);

\*\*: Branched-chain amino acid (BCAA); •: Aromatic amino acid (AAA)

酸与总氨基酸的比值( $W_{EAA}/W_{TAA}$ )均相近,分别为41.95%、41.12%和41.43%;必需氨基酸与非必需氨基酸含量的比值( $W_{EAA}/W_{NEAA}$ ),分别为72.26%、69.84%和70.75%。根据FAO/WHO的理想模式,质量较好的蛋白质,其组成氨基酸的 $W_{EAA}/W_{TAA}$ 为40%左右, $W_{EAA}/W_{NEAA}$ 在60%以上(邴旭文等,2005)。由此,3种石斑鱼肌肉氨基酸的组成比例均符合以上指标要求,其氨基酸具有良好的平衡性,属于优质的蛋白质源。

云纹石斑鱼肌肉的氨基酸中丙氨酸含量最高,为2.03%,其次为天冬氨酸(1.69%)、亮氨酸(1.62%)、赖氨酸(1.58%)。鞍带石斑鱼和云龙石斑鱼肌肉中的氨基酸均以谷氨酸含量最高(2.61%和2.73%),其次是天冬氨酸(1.98%和2.15%)、赖氨酸(1.72%和1.84%)、亮氨酸(1.54%和1.67%)。3种石斑鱼肌肉中含量较低的氨基

酸均为以下4种:脯氨酸、组氨酸、蛋氨酸和酪氨酸。**2.2.2 肌肉必需氨基酸组成评价** 根据蛋白质评价标准,将3种石斑鱼肌肉中必需氨基酸含量转换为每克氮中所含氨基酸的毫克数(mg/g N),计算出3种石斑鱼肌肉各个必需氨基酸的AAS和CS分值(表3)。由表3可知,无论是以AAS还是CS为标准,3种石斑鱼的第一限制性氨基酸均为蛋氨酸,第二限制性氨基酸均为缬氨酸。云纹石斑鱼肌肉中必需氨基酸除蛋氨酸和缬氨酸外,其他各必需氨基酸的AAS均接近或大于1。以CS为标准,云纹石斑鱼蛋氨酸的CS最小,为0.44,其他各必需氨基酸的CS均大于0.6。鞍带石斑鱼和云龙石斑鱼肌肉中必需氨基酸除蛋氨酸外,其他各必需氨基酸的AAS均接近或大于1,CS均大于0.6。说明上述3种石斑鱼肌肉的必需氨基酸含量丰富,组成相对均衡。

表3 3种石斑鱼肌肉中必需氨基酸组成评价  
Tab.3 Evaluation on essential amino acid components in muscles of 3 species of grouper

必需氨基酸 Essential amino acids	FAO/WHO 标准 FAO/WHO standard	鸡蛋蛋 白标准 Egg protein standard	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>			鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>			云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)			
			氨基酸 质量分数 Amino acid mass fraction		氨基酸 质量分数 Amino acid mass fraction		氨基酸 质量分数 Amino acid mass fraction		AAS	CS	AAS	CS
			AAS	CS	AAS	CS	AAS	CS	AAS	CS		
苏氨酸 Thr	250	292	228	0.91	0.78	295	1.18	1.01	309	1.24	1.06	
缬氨酸 Val	310	411	267	0.86 <sup>&amp;</sup>	0.65 <sup>&amp;</sup>	282	0.91 <sup>&amp;</sup>	0.69 <sup>&amp;</sup>	284	0.92 <sup>&amp;</sup>	0.69 <sup>&amp;</sup>	
蛋氨酸 Met	220	386	170	0.77 <sup>*</sup>	0.44 <sup>*</sup>	185	0.84 <sup>*</sup>	0.48 <sup>*</sup>	184	0.84 <sup>*</sup>	0.48 <sup>*</sup>	
异亮氨酸 Ile	250	331	252	1.01	0.76	285	1.14	0.86	300	1.2	0.91	
亮氨酸 Leu	440	534	492	1.12	0.92	499	1.13	0.93	522	1.19	0.98	
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	380	565	455	1.20	0.81	415	1.09	0.73	425	1.12	0.75	
赖氨酸 Lys	340	441	479	1.41	1.09	557	1.64	1.26	575	1.69	1.30	
合计 Total	2190	2960	2343			2518			2599			

注: \*为第一限制氨基酸; &为第二限制氨基酸

Note: \* means the first limiting amino acids; & means the second limiting amino acids

**2.2.3 肌肉鲜味氨基酸组成评价** 由表2可知,云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和云龙石斑鱼3种石斑鱼肌肉中鲜味氨基酸的含量分别为6.31%、6.83%和7.16%,分别占氨基酸总量( $W_{DAA}/W_{TAA}$ )的37.23%、39.12%和38.58%。云纹石斑鱼肌肉的鲜味氨基酸中以丙氨酸含量最高,为2.03%,其次为天冬氨酸(1.69%)、甘氨酸(1.53%)、谷氨酸(1.06%)。鞍带石斑鱼和云龙石斑鱼肌肉中鲜味氨基酸含量的高低排序是一致的,均以谷氨酸含量最高,分别为2.61%和2.73%,其次为天冬氨酸(1.98%和2.15%)、丙氨酸(1.19%和1.24%)、甘氨

酸(1.05%和1.04%)。

### 2.3 矿物元素含量分析

3种石斑鱼肌肉中矿物质元素含量见表4。常量元素中均为K的含量最高,分别为4450.00、3766.50和3490.50 mg/kg,在云纹石斑鱼和云龙石斑鱼肌肉中,其次为Mg(1210.50和1335.00 mg/kg)、Na(579.50和554.50 mg/kg)、P(203.00和183.00 mg/kg)、Ca(115.50和175.00 mg/kg);在鞍带石斑鱼肌肉中,其次为Mg(1137.00 mg/kg)、Na(904.50 mg/kg)、

表 4 3 种石斑鱼肌肉矿物质含量(mg/kg, 湿重)

Tab.4 Contents of minerals in muscles of 3 species of grouper (mg/kg, wet weight)

矿物质元素 Mineral elements	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)
钾 K	4450.00	3766.50	3490.50
钠 Na	579.50	904.50	554.50
钙 Ca	115.50	193.50	175.00
镁 Mg	1210.50	1137.00	1335.00
磷 P	203.00	162.50	183.00
铜 Cu	0.10	0.15	0.35
锌 Zn	3.34	4.87	3.10
铁 Fe	2.89	1.95	3.08
硒 Se	0.41	0.21	0.30
锰 Mn	—	—	—

注: —表示未检出

Note: — denote undetectable

Ca(193.50 mg/kg)、P(183.00 mg/kg)。微量元素中, 均是 Zn 的含量最高, 分别为 3.34、4.87 和 3.10 mg/kg, 在云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼肌肉中, 其次为 Fe (2.89 和 1.95 mg/kg)、Se(0.41 和 0.21 mg/kg)、Cu(0.10 和 0.15 mg/kg); 在云龙石斑鱼肌肉中, 其次为 Fe (3.08 mg/kg)、Cu(0.35 mg/kg)、Se(0.30 mg/kg)。3 种石斑鱼肌肉中的 Mn 均低于检出限。

### 3 讨论

#### 3.1 常规营养成分

鱼类营养价值的高低主要是由肌肉中蛋白质和脂肪的含量决定的。本研究中 3 种石斑鱼肌肉中粗蛋白含量均相对较高, 分别为 20.60%、19.30%、20.00%, 均高于棕点石斑鱼(郭永军等, 2009)、点带石斑鱼(徐大为等, 2008)、淡水石斑鱼(*Cichlasoma managuense*) (黄海等, 2012)、赤点石斑鱼(林建斌等, 2010)、豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*) (尤宏争等, 2014) 等多种石斑鱼的粗蛋白含量, 与珍珠龙胆石斑鱼(王际英等, 2015)、七带石斑鱼(程波等, 2009) 等石斑鱼的粗蛋白含量相近(表 1)。3 种石斑鱼肌肉中粗脂肪的含量分别为 2.60%、1.60% 和 4.30%, 在一定范围内, 鱼体肌肉脂肪的含量与肉质的风味呈正相关关系, 脂肪含量在 3.5%~4.5% 具有良好的适口性(刘玉芳, 1991), 说明云龙石斑鱼在适口性上优于前二者。本研究中的 3 种石斑鱼均是蛋白质含量丰富且脂肪含量相对适中的优质海水鱼类, 其中, 云纹石斑鱼肌肉中粗蛋白含量较后二者略高, 而云龙石斑鱼肌肉的适口性较好。

#### 3.2 氨基酸组成与营养品质

**3.2.1 氨基酸组成** 食品中蛋白质营养价值的高低, 主要取决于其所含氨基酸的组成与含量。在 3 种石斑鱼肌肉中均检测出 16 种常见氨基酸, 氨基酸总量相差较大, 分别为 16.95%、17.46% 和 18.56%, 可以看出, 云龙石斑鱼氨基酸总量最高。三者的氨基酸总量均高于褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)(14.72%)、东星斑(*Plectropomus leopardus*)(14.4%)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)(14.80%)(谢瑞涛等, 2016)、淡水石斑鱼(15.74%)(黄海等, 2012) 等多种石斑鱼肌肉的氨基酸总量。

本研究发现, 云纹石斑鱼肌肉的氨基酸中丙氨酸含量最高, 占氨基酸总量的 11.98%。丙氨酸可以增强鱼肉的鲜味, 且具有预防肾结石、协助葡萄糖代谢的作用, 有助于缓和低血糖, 改善身体能量。鞍带石斑鱼和云龙石斑鱼肌肉的氨基酸均是谷氨酸含量最高, 分别占氨基酸总量的 14.95% 和 14.71%。谷氨酸在人体组织代谢过程中起解除氨毒害的作用(孙中武等, 2008), 也是参与脑组织生化代谢和多种生理活性物质合成的重要氨基酸(张昌颖等, 1988)。另外, 值得一提的是, 本研究中 3 种石斑鱼肌肉中赖氨酸的含量(湿重)均较高, 分别为 1.58%、1.72% 和 1.84%, 其 AAS 和 CS 分值均已超过 FAO/WHO 标准和鸡蛋蛋白标准, 是前者的 1.41~1.69 倍。我国居民普遍以谷物为主食, 而赖氨酸是一般谷类和人乳蛋白质的第一限制性氨基酸(徐善良等, 2012), 由此, 3 种石斑鱼均可作为国民弥补因以谷物为主食所引起的赖氨酸摄入不足, 同时也可以开发为优质的催乳食品(徐革锋等, 2013)。3 种石斑鱼不仅氨基酸含量丰富, 还具有良好的营养和保健作用, 是人类优质的氨基酸补充源。

**3.2.2 氨基酸营养品质评价** FAO/WHO 根据婴儿的必需氨基酸需求量(各年龄段人群中最高)制定了最低限度的评分标准(AAS)。鸡蛋蛋白质被认为是营养最全面的, 因此也被制定蛋白质的评定标准(CS)(刘俊利等, 2011)。二者被广泛认为是评定食品中氨基酸营养价值的重要指标。在本研究中, 3 种石斑鱼的肌肉中除缬氨酸和蛋氨酸外, 其他氨基酸的 AAS 均接近或大于 1; 除蛋氨酸外, 其他氨基酸的 CS 均大于 0.6。说明这 3 种石斑鱼均可以为人类提供丰富的必需氨基酸, 且氨基酸的平衡性较好。研究表明, 无论是以 AAS 还是 CS 为标准, 3 种石斑鱼的第一限制性氨基酸均为蛋氨酸, 第二限制性氨基酸均为缬氨酸。因此, 在对 3 种石斑鱼进行饲养或食品加工时, 额外添加这 2 种必需氨基酸, 能够进一步提高石斑鱼



的鱼肉品质。

鱼肉的鲜美程度由肌肉中鲜味氨基酸的组成与含量决定。3种石斑鱼肌肉中鲜味氨基酸的含量分别为6.31%、6.83%和7.16%(表2)。鲜味氨基酸中以谷氨酸的鲜味最强,3种石斑鱼肌肉中的谷氨酸含量分别为1.06%、2.61%和2.73%。由此可以看出,3种石斑鱼肌肉中鲜味氨基酸的含量均较高,其中,云龙石斑鱼肌肉中鲜味氨基酸总量最高,且谷氨酸含量最高。因此,云龙石斑鱼的鲜美程度上要优于前二者。

3种石斑鱼肌肉中的支链氨基酸(Val、Ile和Leu)分别占氨基酸总量的19.65%、18.84%和19.07%,支链氨基酸含量均较高。支链氨基酸与芳香族氨基酸的比值称为支芳值( $F$ )。人和哺乳动物的 $F$ 值在正常情况下为3.0~3.5,而当肝受损伤时,则降为1.0~1.5,因此,支链氨基酸可用于治疗肝硬化(黄薇等,2014)。3种石斑鱼肌肉的 $F$ 值分别为2.22、2.57和2.60(表2),均明显高于人体肝脏受损伤时的水平。因此,3种石斑鱼肌肉均可较好地肝病者补充支链氨基酸,具有良好的保健作用。

### 3.3 矿物质元素组成评价

矿物质元素通过参与人体新陈代谢及各种生化反应,维持机体渗透压和酸碱平衡。本研究检测了K、Na、Ca、Mg、P、Zn、Cu、Fe、Mn和Se共10种矿物质元素,除微量元素Mn未被检出外,其他矿物质元素均有检出。3种石斑鱼的肌肉中均是K含量最高,K可以维持人体体液的酸碱平衡和神经肌肉的应激性,调节机体渗透压。Na和K一样,参与维持机体多种代谢平衡,通常与K配合发挥作用。3种石斑鱼肌肉中的K/Na分别为7.7、4.2和6.3,说明3种石斑鱼均属于高钾低钠食物。K可以促进Na的排除,能够通过扩张血管,降低血管阻力从而降低血压。因此,K含量丰富的3种石斑鱼均适合高血压及心血管疾病患者食用。另外,这3种石斑鱼肌肉中的Zn含量均较为丰富。Zn对婴幼儿十分重要,儿童缺Zn会导致免疫力和智力下降,引起厌食及赖氨酸缺乏等症状。本研究显示,3种石斑鱼肌肉中富含多种矿物质元素,尤其是K和Zn,可为人类尤其是儿童提供丰富的Zn。

对鱼类而言,肌肉中有恒定的钙磷比,3种石斑鱼肌肉中的钙磷比分别为0.57、1.19和1.96,高于其他多种鱼类。因此,在配制饲料的过程中,需要注意饲料中的钙磷比例。另外,3种石斑鱼肌肉的锌铜比分别为32.8、32.2和8.9,锌铁比分别为1.2、2.5和1.0。按照Hill和Matron提出的“理化性质相似的元素,其生物学功能相互拮抗”,且这种拮抗作用通常

发生在锌铜比 $>10$ 及锌铁比 $>1$ 的情况下(Pellet *et al.*, 1980)。由此可知,云龙石斑鱼肌肉中的Cu、Fe、Zn比例比较合理。云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼肌肉中的Zn含量远远高于Cu和Fe,从而影响Cu和Fe的吸收,导致二者摄入不足。因此,在食用这2种石斑鱼时,需注意Cu和Fe的摄入,使三者能充分吸收利用。

## 4 结论

3种石斑鱼均是蛋白质含量丰富且脂肪含量相对适中的优质海水鱼类,其氨基酸种类齐全且平衡性好,必需氨基酸组成符合FAO/WHO的理想模式,支链氨基酸与芳香族氨基酸的比值均接近正常人体水平,氨基酸总量、必需氨基酸和鲜味氨基酸含量均较高,说明本研究中的3种石斑鱼均是味道鲜美且营养价值高的优质蛋白源。根据AAS和CS,3种石斑鱼肌肉的第一限制性氨基酸均为蛋氨酸,第二限制性氨基酸均为缬氨酸。3种石斑鱼肌肉中含有多种矿物质元素,可为人体补充多种矿物质。

## 参 考 文 献

- Bing XW, Cai BY, Wang LP. Evaluation of nutritive quality and nutritional components in *Spinibarbus sinensis* muscle. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(2): 211-215 [邢旭文, 蔡宝玉, 王利平. 中华倒刺鲃肌肉营养成分与品质评价. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 211-215]
- Cheng B, Chen C, Wang YG, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation in *Epinephelus septemfasciatus* muscles. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(5): 51-57 [程波, 陈超, 王印庚, 等. 七带石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 51-57]
- Dang R, Zhu JQ, Qiu XZ. Analysis of flesh content and nutrient components in the muscle of *Centropristis striata*. *Journal of Marine Sciences*, 2010, 28(2): 60-66 [党冉, 竺俊全, 邱新志. 美洲黑石斑含肉率及肌肉营养成分分析. *海洋学研究*, 2010, 28(2): 60-66]
- Guo YJ, Xing KZ, Xu DW, *et al.* Evaluation of nutritive quality and components in muscle of brownmarbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Fisheries Science*, 2009, 28(11): 635-638 [郭永军, 邢克智, 徐大为, 等. 棕点石斑鱼的肌肉营养成分分析. *水产科学*, 2009, 28(11): 635-638]
- Huang H, Yang N, Zhang X. Analysis of the ration of flesh content and nutrition composition of the muscle of *Cichlasoma managuense*. *Fisheries Science & Technology Information*, 2012, 39(2): 87-91 [黄海, 杨宁, 张希. 淡水石斑鱼含肉率和肌肉营养成分分析. *水产科技情报*, 2012, 39(2): 87-91]
- Huang W, Zhang ZH, Shi YH, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of cultured *Synechogobius*

- ommaturus*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(9): 2866–2873 [黄薇, 张忠华, 施永海, 等. 养殖斑尾复虾虎鱼肌肉营养成分的分析和评价. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2866–2873]
- Kong XD, Liu L, Li YL, *et al.* Nutritional values of 2-year-old cultured *Epinephelus akaara* and causes of its common deformities. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(5): 38–45 [孔祥迪, 刘莉, 李炎璐, 等. 养殖 2 龄赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 的营养价值与畸形原因分析. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 38–45]
- Li ZF, Fu QQ, Zhang YS. An analysis of the nutritive composition and the contents of amino acids in muscle of *Epinephelus lanceol.* South China Fisheries Science, 2008, 4(5): 61–64 [黎祖福, 付倩倩, 张义顺. 鞍带石斑鱼肌肉营养成分及氨基酸含量分析. 南方水产, 2008, 4(5): 61–64]
- Lin JB, Chen DH, Zhu QG, *et al.* Nutritional quality and composition in flesh of three species of groupers. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2010, 25(5): 548–553 [林建斌, 陈度煌, 朱庆国, 等. 3 种石斑鱼肌肉营养成分比较初探. 福建农业学报, 2010, 25(5): 548–553]
- Liu JL, Xiong BX, Lü GJ, *et al.* Comparison on muscle composition of *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys mobilis* in two reservoirs with different trophic levels. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 1098–1104 [刘俊利, 熊邦喜, 吕光俊, 等. 两种不同营养类型水库鲢、鳙肌肉营养成分的比较. 水产学报, 2011, 35(7): 1098–1104]
- Liu YF. Analysis of fatty acid composition of five freshwater fishes in China. Journal of Fisheries of China, 1991, 15(2): 169–171 [刘玉芳. 中国 5 种淡水鱼脂肪酸组成分析. 水产学报, 1991, 15(2): 169–171]
- Pellet PL, Young VR. Nutritional evaluation of protein foods. Food and nutrition. Tokyo: United Nations University, 1980, 26–29
- Sun ZW, Li C, Yin HB, *et al.* Analysis of the nutritional composition in muscle of five varieties of *Oncorhynchus mykiss*. Acta Nutrimenta Sinica, 2008, 30(3): 298–302 [孙中武, 李超, 尹洪滨, 等. 不同品系虹鳟的肌肉营养成分分析. 营养学报, 2008, 30(3): 298–302]
- Wang JY, Zhang DR, Ma JJ, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation of ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. Lanceolatus* muscles. Transactions of Oceanology and Limnology, 2015(4): 61–69 [王际英, 张德瑞, 马晶晶, 等. 珍珠龙胆石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. 海洋湖沼通报, 2015(4): 61–69]
- Xie RT, Yang LY, Zhang HT, *et al.* Protein nutritional value evaluation in three species of cultured groupers muscle. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(16): 151–153 [谢瑞涛, 杨丽云, 张海涛, 等. 3 种人工养殖石斑鱼肌肉的蛋白质营养价值评价. 安徽农业科学, 2016, 44(16): 151–153]
- Xu DW, Xing KZ, Zhang SS, *et al.* Analysis of nutritional components in muscle of *Epinephelus malabaricua*. Reservoir Fisheries, 2008, 28(3): 54–56 [徐大为, 邢克智, 张树森, 等. 点带石斑鱼的肌肉营养成分分析. 水利渔业, 2008, 28(3): 54–56]
- Xu GF, Wang YY, Bai QL, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in muscle of *Lota lota* (Linnaeus). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(12): 3027–3032 [徐革锋, 王裕玉, 白庆利, 等. 江鳕肌肉营养成分分析与品质评价. 动物营养学报, 2013, 25(12): 3027–3032]
- Xu SL, Wang DL, Xu JL, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of *Pampus argenteus*, *P. cinereus* and *P. sinensis* from the East China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 775–782 [徐善良, 王丹丽, 徐继林, 等. 东海银鲳 (*Pampus argenteus*)、灰鲳 (*P. cinereus*) 和中国鲳 (*P. sinensis*) 肌肉主要营养成分分析与评价. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 775–782]
- You HZ, Sun ZJ, Zhang Q, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation in *Plectropomus leopardus* muscles. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1168–1172 [尤宏争, 孙志景, 张勤, 等. 豹纹鳃棘鲷肌肉营养成分分析与品质评价. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1168–1172]
- Yu H, Wan GT, Cheng MJ, *et al.* Analysis of the nutritive components of muscle from pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). Journal of Guangdong Ocean University, 2014, 34(6): 83–87 [于宏, 万刚涛, 程民杰, 等. 龙虎斑鱼肌肉营养成分分析. 广东海洋大学学报, 2014, 34(6): 83–87]
- Zhang CY, Li L, Li CF. Biochemistry. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988, 305–561 [张昌颖, 李亮, 李昌甫. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 305–561]

## Analysis of Nutrient Components and Evaluation of Nutritive Quality in Flesh of Three Species of Cultured Groupers

ZHAO Tingting<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, CHEN Chao<sup>2①</sup>, LI Yanlu<sup>2</sup>, ZHANG Tingting<sup>2</sup>,  
QIAO Ying<sup>2</sup>, ZHAI Jieming<sup>3</sup>, LI Wensheng<sup>3</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co. Ltd, Yantai 261418)

**Abstract** Grouper is an important global, marine economic resource. As a low-fat, high-protein edible fish, it is in high demand, and thus, its supply is not adequate to meet this demand. In order to improve the muscle quality of the cultured grouper and provide basic data for the development of compound feed, the nutritional components in the muscles of *Epinephelus moara*, *E. lanceolatus*, and *E. moara* (♀) × *E. lanceolatus* (♂) (hereinafter *Yunlong*) were analyzed and evaluated by routine biochemical methods. The results showed that the content of crude protein in the muscles of the three grouper species were 20.60%, 19.30%, and 20.00%, respectively, and the content of crude fat were 2.60%, 1.60%, and 4.30%. Sixteen common amino acids were detected in the muscles of the three grouper species. The content of total amino acids (TAA), essential amino acids (EAA), and delicious amino acids (DAA) in wet-weight fish flesh were respectively 16.95%, 7.11%, and 6.31% in *E. moara*; 17.46%, 7.18%, and 6.83% in *E. lanceolatus*; and 18.56%, 7.69%, and 7.16% in *Yunlong*. The proportions of the essential amino acids in the muscles of three grouper species are all in accordance with the FAO/WHO standard. The ratios of branched chain amino acids to aromatic amino acids (*F* values) in the muscles of the three grouper species were 2.22, 2.57, and 2.60, respectively. According to the amino acid score (AAS) and chemical score (CS), the first limiting amino acid of the three grouper species was methionine, and the second limiting amino acid was valine. In addition, muscles from the three group species were all rich in minerals. Potassium levels were the highest among those of all macroelements, and zinc levels were the highest among those of all trace elements. Studies have shown that these three species of groupers are high-quality marine fish with high nutritional value, which have good prospects for commercial exploitation and utilization.

**Key words** Grouper; Muscle; Nutrient component; Quality evaluation

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180810003

http://www.yykxjz.cn/

王红丽, 施文正, 邱伟强, 王锡昌. 草鱼死后常温贮藏过程中的品质变化. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 97-105  
Wang HL, Shi WZ, Qiu WQ, Wang XC. Quality changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in the process of postmortem stored at room temperature. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 97-105

## 草鱼死后常温贮藏过程中的品质变化\*

王红丽 施文正<sup>①</sup> 邱伟强 王锡昌

(上海海洋大学食品学院 国家淡水水产品加工技术研发分中心(上海) 上海 201306)



**摘要** 为了研究草鱼死后常温贮藏过程中的品质变化,以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)背肉为研究对象,测定了草鱼死后 30 h 内质构、pH、乳酸、游离氨基酸、ATP 及其关联化合物等指标的变化。结果显示,草鱼肉的硬度和咀嚼性在死后 23 h 时达到最大值,弹性、内聚性及回复性均随着时间的延长而降低。pH 呈先降低后升高的趋势,在 23 h 达到最大值。乳酸含量则先增加后减少。在整个贮藏过程中,鲜甜味游离氨基酸的总含量逐渐减少,而苦味游离氨基酸的总含量则逐渐增加。ATP 含量在草鱼死后 10 h 内显著增加,具有鲜味的 IMP 含量则迅速减少,呈苦味的 HxR 和 Hx 含量逐渐增加。在整个贮藏过程中,K 值一直增加。K 值的变化情况表明,草鱼死后常温贮藏 10 h 内可保持较高鲜度,27 h 时,K 值达到 68.99%,表明鱼肉已经腐败。研究表明,草鱼死后室温贮藏时应在 10 h 内尽快加工。

**关键词** 草鱼; 死后变化; 游离氨基酸; ATP 及其关联化合物; K 值

**中图分类号** TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0097-09

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国主要的淡水经济鱼类,与青、鲢、鳙并称为“四大家鱼”,2016 年养殖产量为 590 万 t(中国渔业年鉴,2017),居淡水鱼之首。草鱼营养丰富、肉质鲜美,但由于其具有水分含量高、富含营养素、pH 中性等特点,货架期相对较短(Abdollahi *et al.*, 2014)。

鱼死后通常经历 4 个阶段:初期生化反应、僵硬期、解僵期、自溶与腐败。这些过程发生的快慢以及持续时间与鱼的种类、捕获季节、致死方式、宰前生理状况、贮藏温度、微生物污染等因素有关。Iwamoto 等(1987)比较了 0~20℃ 不同贮藏温度对褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)宰后僵直的影响,发现 0℃ 条件下,褐牙鲆宰后 3 h 开始僵直,15 h 僵直达到最大;

在 5~15℃ 贮藏时,死后 28 h 僵直达到最大。Okamoto 等(2006)比较了不同季节捕获的三线矶鲈(*Parapristipoma trilineatum*)在 0~20℃ 不同贮藏温度下的僵直情况,结果显示,冬季和夏季捕获的三线矶鲈均是在 10℃ 贮藏时可以延长其僵硬期。

有关鱼类死后变化的研究主要集中在海水鱼类,而淡水鱼死后变化的研究相对较少,且温度多为 4℃ 贮藏(刘晓畅等,2016)、冰上贮藏(Ocaño-Higuera *et al.*, 2009)。本研究测定了草鱼死后常温贮藏 30 h 内质构、pH、乳酸、游离氨基酸、ATP 及其关联化合物、K 值等的变化,旨在丰富鱼类死后变化的基础理论,为草鱼流通过程中的品质控制及保鲜加工提供参考。

\* 国家自然科学基金面上项目(31471685)资助[This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31471685)]. 王红丽, E-mail: 18221338903@163.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 施文正, 教授, E-mail: wzshi@shou.edu.cn

收稿日期: 2018-08-10, 收修改稿日期: 2018-08-14

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

鲜活草鱼购于上海市临港新城古棕路农工商超市, 每尾体重为(1600±100) g、体长为(42.5±3.2) cm。

腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷酸(Adenosine diphosphate, ADP)、肌苷酸(Inosine monophosphate, IMP)、次黄嘌呤(Hypoxanthine, Hx)(均为色谱纯, Sigma 公司, 美国); 一磷酸腺苷(Adenosine monophosphate, AMP)、次黄嘌呤核苷(Inosine, HxR)(TCI 公司, 日本); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(色谱纯)、三氯乙酸(分析纯)、高氯酸、NaOH、KOH(优级纯)(国药集团化学试剂有限公司); 17 种氨基酸混标(色谱纯)(中国计量科学研究院化学计量与分析科学研究所); 乳酸测试盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 仪器与设备

TA-XT Plus 型质构仪 (Stable Micro System 公司, 英国); SHP-2500 型低温生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); H2050R 型高速冷冻离心机(长沙湘仪有限公司); L-8800 型氨基酸自动分析仪(Hitachi 公司, 日本); W2690/5 型高效液相色谱仪(Waters 公司, 美国); UV-1800PC 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); FE20 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 原料预处理** 鲜活草鱼经充氧运回实验室, 采用即杀(重击头部致晕)方式, 去除内脏, 用流动自来水冲洗干净, 沥干后整条装入聚乙烯保鲜袋中, 置于 25℃ 培养箱中贮藏。分别在 0、5、10、15、19、23、27、30 h 时, 随机选取 3 条鱼进行指标测定。

**1.3.2 质构的测定** 参考马海建(2016)的方法, 略作修改。采取横向切片, 将样品切成 2 cm×2 cm×1 cm 大小的肉块。测定模式为 TPA, 采用 P/6 平底柱形探头, 测试前速率为 3.00 m/s, 测试速率为 1.00 mm/s、返回速率为 1.00 mm/s、压缩程度为 50%, 2 次压缩间停留时间为 5 s, 触发值为 5 g, 数据采集速率 200 pps。每组样品测定 8 次。

**1.3.3 pH 的测定** 参考吕斌等(2001)的方法, 略作修改。称取绞碎、混合均匀的 2.0 g 鱼肉于离心管中, 加 18 ml 蒸馏水, 均质 2 min, 10000 r/min 离心 10 min, 过滤, 取上清液, 用 pH 计测定。

**1.3.4 乳酸的测定** 采用比色法, 按照南京建成生物工程研究所乳酸测试试剂盒说明进行。取 2.0 g 草

鱼背肉, 用 18 ml 0.85% 生理盐水匀浆 30 s, 4℃ 条件下匀浆, 以 10000 g 离心 10 min, 收集上清液, 使用双缩脲法(Torten *et al.*, 2010)测定上清液的蛋白质浓度, 用测定试剂盒(No.A019, 南京建成生物工程研究所)在 530 nm 处用分光光度法测定乳酸, 结果显示为乳酸/g 蛋白质(mmol/g 蛋白质)。

**1.3.5 游离氨基酸含量的测定** 参考陈剑岚等(2017)的方法, 略作修改。称取样品 2.0 g, 加入质量分数为 15% 的三氯乙酸溶液 15 ml, 匀浆 2 min 后, 静置 2 h, 4℃ 条件下, 10000 r/min 离心 15 min, 过滤, 取上清液 5 ml, 用浓度为 3 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 2.0, 定容至 10 ml, 摇匀, 过 0.22 μm 膜, 滤液上机检测。

**1.3.6 核苷酸类化合物含量及 K 值的测定** 参考 Yokoyama 等(1992)的方法, 略作修改。称取样品 5.0 g 置于 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 质量分数为 10% 的 HClO<sub>4</sub>, 高速匀浆 2 min, 4℃ 条件下, 10000 r/min 离心 15 min, 过滤, 取上清液。用 5 ml 质量分数为 5% 的 HClO<sub>4</sub> 洗涤沉淀, 再次离心, 合并上清液。调节上清液 pH 至 6.5, 静置 30 min 后, 定容至 50 ml, 摇匀, 过 0.45 μm 膜待测。

高效液相色谱条件: ODS-SP C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), ODS-SP 保护柱柱芯(4 mm×10 mm, 5 μm); 流动相 A 为 pH 是 6.5 的 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 : 1) 溶液, 流动相 B 为甲醇溶液, 流速 1 ml/min 等梯度洗脱; 柱温 28℃; 进样量 10 μl; 检测波长 254 nm。

K 是 ATP 降解的产物 HxR 和 Hx 含量之和与 ATP 关联物总和的百分比(汤水粉等, 2014)。其计算公式:

$$K(\%) = \frac{(HxR + Hx)}{(ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)} \times 100\%$$

式中, ATP、ADP、AMP、IMP、HxR 和 Hx 分别为相应化合物, 即腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷酸、肌苷酸、肌苷(次黄嘌呤核苷)和次黄嘌呤的浓度, 以 μmol/g 湿重表示(李辉等, 2011)。

### 1.4 数据处理

实验数据以 3 个平行样品的平均值±标准差 (Mean±SD) 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 采用 Duncan 法进行多重比较, 采用 Origin 8.5 (OriginLab Corp, Hampton, 美国) 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 草鱼死后贮藏过程中质构特性的变化

草鱼死后 30 h 内硬度、弹性、内聚性、咀嚼性

以及回复性的变化见表 1。从表 1 可以看出, 鱼肉的硬度可用于评价其新鲜度, 刚宰杀的草鱼硬度为(423.91±8.88) g, 在草鱼死后 23 h 时, 硬度达到最大值, 为(538.96±11.80) g, 随后急剧下降。这与 Abe 等(1991)的研究结果基本一致。鱼肉的弹性和内聚性均随着时间的延长呈下降趋势, 但变化幅度不大。咀嚼性和回复性在贮藏后期下降明显。鱼死后, 肌肉

质构特性的变化不仅与胶原蛋白等基质蛋白的破坏有关, 而且与肌原纤维蛋白的变化有关(Martinez *et al.*, 2011)。Li 等(2017)研究表明, 鱼死后硬度和弹性的变化与 pH 降低速率和肌原纤维的破坏有关。Sato 等(1991)提出酶的作用也是引起鱼贮藏过程中质构变化的重要因素。Bahuaud 等(2010)也发现, 大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)组织蛋白酶的作用导致弹性下降。

表 1 草鱼死后 25℃贮藏过程中质构的变化

Tab.1 Changes in texture of postmortem grass carp during storage at 25℃

贮藏时间 Storage time(h)	硬度 Hardness(g)	弹性 Springiness	内聚性 Cohesiveness	咀嚼性 Chewiness(g)	回复性 Resilience
0	423.91±8.88 <sup>e</sup>	0.89±0.04 <sup>a</sup>	0.43±0.02 <sup>a</sup>	179.38±8.27 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>
5	440.42±19.80 <sup>de</sup>	0.88±0.03 <sup>ab</sup>	0.39±0.02 <sup>b</sup>	233.43±9.75 <sup>a</sup>	0.22±0.001 <sup>b</sup>
10	457.42±19.97 <sup>cd</sup>	0.85±0.04 <sup>bc</sup>	0.35±0.02 <sup>c</sup>	141.77±3.83 <sup>c</sup>	0.16±0.01 <sup>c</sup>
15	469.52±19.78 <sup>bc</sup>	0.84±0.01 <sup>c</sup>	0.31±0.02 <sup>d</sup>	128.13±4.66 <sup>d</sup>	0.14±0.01 <sup>d</sup>
19	480.25±22.44 <sup>b</sup>	0.84±0.03 <sup>c</sup>	0.30±0.01 <sup>d</sup>	110.95±3.99 <sup>d</sup>	0.13±0.00 <sup>e</sup>
23	538.96±11.80 <sup>a</sup>	0.78±0.04 <sup>d</sup>	0.23±0.01 <sup>e</sup>	84.56±3.66 <sup>e</sup>	0.10±0.00 <sup>g</sup>
27	363.13±14.89 <sup>f</sup>	0.79±0.00 <sup>d</sup>	0.21±0.01 <sup>f</sup>	76.00±2.80 <sup>f</sup>	0.10±0.00 <sup>g</sup>
30	336.57±17.34 <sup>g</sup>	0.76±0.02 <sup>d</sup>	0.20±0.00 <sup>f</sup>	62.16±4.30 <sup>f</sup>	0.10±0.00 <sup>g</sup>

注: 同列标注不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Note: The different superscript letters in the same column indicates significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

## 2.2 草鱼死后贮藏过程中 pH 的变化

从图 1 可知, 刚宰杀草鱼的 pH 为 7.26±0.02, 高于鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)的初始 pH(史策, 2015)。鱼肉的初始 pH 值与种类、季节、饲料、死前活动水平以及肌肉类型等因素有关。草鱼死后的 30 h 内, pH 呈先下降后上升的趋势, 死后 23 h 时, 下降至 6.74±0.02, 在 30 h 时升高至 7.15±0.03。刘晓畅等(2016)研究发现, 长丰鲢(*Changfeng silver carp*)宰杀后在 4℃条件下, pH 在 24 h 时达到最低值, 之后

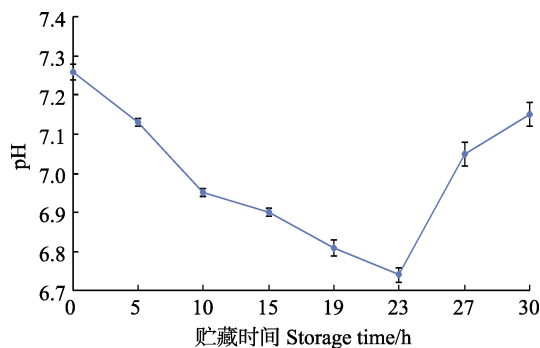


图 1 草鱼死后 25℃贮藏过程中 pH 的变化  
Fig.1 Changes in pH value of postmortem grass carp during storage at 25℃

开始升高, 与本研究的结果基本一致。草鱼死后 pH 下降是由于糖原无氧酵解产生乳酸以及 ATP 和磷酸肌酸等物质逐渐分解产生磷酸所致(Hong *et al.*, 2012; 熊雄等, 2012)。之后, 由于内源酶和鱼肉表面细菌分解蛋白质等含氮化合物, 产生碱性物质, 导致鱼肉 pH 逐渐升高(Fan *et al.*, 2014)。

## 2.3 草鱼死后贮藏过程中乳酸含量的变化

从图 2 可以看出, 草鱼死后贮藏过程中, 乳酸含

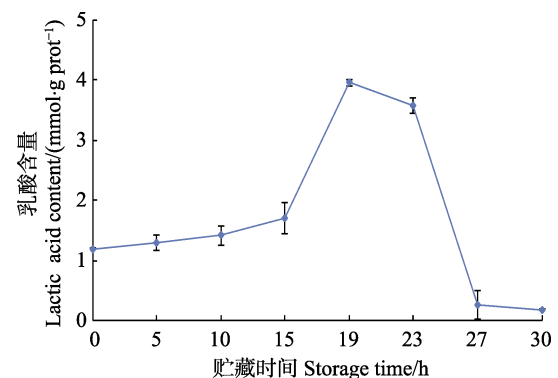


图 2 草鱼死后 25℃贮藏过程中乳酸含量的变化  
Fig.2 Changes in lactic acid content of postmortem grass carp during storage at 25℃



量呈先增加后减少的趋势。刚宰杀草鱼的乳酸含量为(1.20±0.08) mmol/g prot, 随后逐渐增加, 在 19 h 时达到最大值, 为(3.96±0.05) mmol/g prot, 23 h 后, 乳酸含量急剧下降, 30 h 时, 乳酸含量仅为(0.20±0.02) mmol/g prot。草鱼死后, 肌肉中的糖元在无氧条件下经过糖酵解生成乳酸(Poli *et al*, 2015), 乳酸的生成造成 pH 降低, 导致肌质网积蓄  $Ca^{2+}$  的功能下降,  $Ca^{2+}$  溶出促进了草鱼死后僵硬的进程(宋永令等, 2010)。

#### 2.4 草鱼死后贮藏过程中游离氨基酸含量的变化

游离氨基酸是一类重要的滋味成分, 可以呈现出酸、鲜、甜、苦、硫味等, 对鱼肉的感官品质有重要影响。鱼死后, 肌肉中的蛋白质会发生分解, 使游离氨基酸的含量增加, 同时, 为细菌的生长繁殖创造了有利条件, 加速了鱼体的解僵和自溶过程。当鱼肉中的某些游离氨基酸浓度足够高时, 能够独立于其他成分对鱼的整体风味起作用(任仙娥等, 2003)。如组氨酸(His)、酪氨酸(Tyr)、赖氨酸(Lys)等具有苦味(施文正等, 2014), 天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)等呈鲜味。鲜味氨基酸与呈味核苷酸还具有协同作用(杨阳等, 2015; 陈剑岚等, 2017)。

草鱼死后游离氨基酸含量的变化见表 2。从表 2 可以看出, 游离氨基酸总量随贮藏时间的延长呈总体增加的趋势, 其中, 组氨酸、甘氨酸、丙氨酸含量相对较高。游离氨基酸的呈味作用不仅与绝对含量有关, 更与阈值相关。草鱼死后贮藏过程中, 组氨酸的含量远高于其阈值(20 mg/100 g), 表明对草鱼死后滋味有着重要的作用, 而其他种类的游离氨基酸含量均在阈值水平以下。从图 3 可以看出, 草鱼死后贮藏过程中, 鲜甜味氨基酸的总含量呈下降趋势, 而苦味游离氨基酸的总含量则逐渐增加, 这可能与僵硬后期以

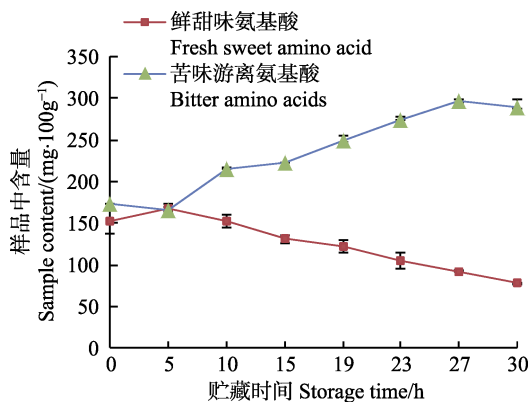


图 3 草鱼死后 25°C 贮藏过程中鲜甜味和苦味氨基酸含量的变化

Fig.3 Changes in content of fresh sweet and bitter amino acids of postmortem grass carp during storage at 25°C

及自溶和腐败变质阶段鱼肌肉中不同类型的蛋白质降解有关。此外, 氨基酸的分解和汁液流失等也会产生一些影响(Erkan *et al*, 2011)。

#### 2.5 草鱼死后贮藏过程中 ATP 关联化合物及 K 值的变化

从表 3 可以看出, 刚宰杀的草鱼 ATP 含量为(3.68±0.37) mg/100 g, 在 10 h 时上升至(12.54±0.41) mg/100 g, 随后略微下降。ADP 含量变化相对较小。

AMP 能抑制苦味, 使食品产生理想的咸味与甜味, 且与 IMP 具有协同作用(张佳琪, 2013), 草鱼死后, AMP 含量在 30 h 内略有波动, 整体呈增加趋势。IMP 是重要的鲜味物质(Okamoto *et al*, 2006), 刚宰杀的草鱼 IMP 含量较高, 随后, 在内源性 IMP 磷酸水解酶和微生物的作用下降解为 HxR 和 Hx; 30 h 时, IMP 含量降至(12.66±0.79) mg/100 g。Hx 和 HxR 具有苦味, 其含量在贮藏过程中明显增加, 是导致鱼肉整体风味劣化的重要原因。

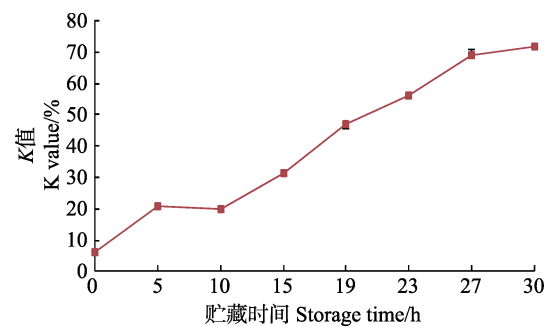


图 4 25°C 贮藏条件下草鱼死后过程中 K 值的变化  
Fig.4 Changes in K-value of postmortem grass carp during storage at 25°C

草鱼死后 30 h 内 K 值的变化见图 4。从图 4 可以看出, K 值是反映鱼死后鲜度变化以及风味相关的生化指标。K 值一般记为 HxR 和 Hx, 二者含量之和与 ATP 及其关联化合物总量的百分比, K 值越小说明其鲜度越好。低于 20% 为非常新鲜, 20%~50% 为相对新鲜, 高于 70% 时表明已经腐败(Saito *et al*, 1959)。本研究中, 刚宰杀草鱼的 K 值为 6.19%, 此后, 在贮藏过程中迅速增加, 在 10 h 内鱼肉保持较高鲜度, 27 h 时 K 值已达到 68.99%, 表明鱼肉已达到腐败程度。

### 3 结论

草鱼死后, 常温贮藏过程中, 鱼肉的硬度和咀嚼性在死后 23 h 时达到最大值, 弹性、内聚性及回复性则随时间的延长呈整体下降趋势。草鱼死后 pH 迅速降低, 23 h 时达到最小值, 在僵硬后期 pH 又逐

表 2 草鱼死后 25℃贮藏过程中游离氨基酸含量的变化  
 Tab.2 Changes in the contents of free amino acids of postmortem grass carp during storage at 25℃

氨基酸 种类 Amino acid species	呈味特征 Taste attribute	阈值 Threshold (mg/100 g)	含量 Content (mg/100 g)							
			0 h	5 h	10 h	15 h	19 h	23 h	27 h	30 h
天冬氨酸 Asp <sup>*</sup>	鲜/酸(+) Fresh/Acid	3	0.56±0.03 <sup>b</sup>	0.67±0.05 <sup>a</sup>	0.64±0.04 <sup>a</sup>	0.55±0.04 <sup>b</sup>	0.48±0.02 <sup>c</sup>	0.41±0.02 <sup>d</sup>	0.40±0.02 <sup>d</sup>	0.40±0.05 <sup>d</sup>
苏氨酸 Thr <sup>*</sup>	甜(+) Sweet	260	17.87±0.77 <sup>bc</sup>	24.06±0.83 <sup>a</sup>	18.97±2.94 <sup>b</sup>	16.31±0.91 <sup>cd</sup>	15.83±0.40 <sup>cd</sup>	15.04±0.72 <sup>d</sup>	14.97±1.06 <sup>d</sup>	12.36±0.53 <sup>e</sup>
丝氨酸 Ser <sup>*</sup>	甜(+) Sweet	150	8.80±0.32 <sup>b</sup>	11.46±0.08 <sup>a</sup>	9.61±0.61 <sup>b</sup>	6.41±0.48 <sup>c</sup>	5.84±0.92 <sup>c</sup>	5.01±0.22 <sup>d</sup>	4.93±0.33 <sup>d</sup>	3.60±0.31 <sup>e</sup>
谷氨酸 Glu <sup>*</sup>	鲜/酸(+) Fresh/Acid	30	3.84±0.07 <sup>c</sup>	6.58±0.23 <sup>a</sup>	4.30±0.10 <sup>b</sup>	3.18±0.02 <sup>d</sup>	3.08±0.08 <sup>de</sup>	2.92±0.08 <sup>ef</sup>	2.84±0.06 <sup>fg</sup>	2.66±0.10 <sup>g</sup>
甘氨酸 Gly <sup>*</sup>	甜(+) Sweet	130	86.48±4.14 <sup>ab</sup>	91.24±3.92 <sup>a</sup>	84.62±4.01 <sup>ab</sup>	75.19±4.76 <sup>bc</sup>	71.10±4.99 <sup>c</sup>	58.62±9.45 <sup>d</sup>	47.83±2.17 <sup>de</sup>	41.83±0.84 <sup>e</sup>
丙氨酸 Ala <sup>*</sup>	甜(+) Sweet	60	21.45±0.53 <sup>a</sup>	22.12±1.03 <sup>a</sup>	21.26±0.76 <sup>a</sup>	19.12±0.15 <sup>b</sup>	17.40±0.11 <sup>c</sup>	15.54±0.35 <sup>d</sup>	14.21±0.28 <sup>e</sup>	11.88±0.63 <sup>f</sup>
半胱氨酸 Cys	苦/甜/硫(-) Bitter/Sweet/ Sulfur	ND	6.88±0.26 <sup>d</sup>	5.33±0.21 <sup>f</sup>	5.56±0.43 <sup>f</sup>	6.19±0.09 <sup>e</sup>	4.32±0.04 <sup>g</sup>	8.08±0.11 <sup>c</sup>	10.14±0.01 <sup>b</sup>	19.39±0.35 <sup>a</sup>
缬氨酸 Val <sup>▲</sup>	甜/苦(-) Sweet/Bitter	40	5.44±0.23 <sup>e</sup>	2.04±0.13 <sup>g</sup>	4.37±0.05 <sup>f</sup>	6.49±0.37 <sup>d</sup>	6.39±0.35 <sup>cd</sup>	9.91±0.23 <sup>c</sup>	13.06±0.58 <sup>b</sup>	14.47±0.28 <sup>a</sup>
蛋氨酸 Met <sup>▲</sup>	苦/甜/硫(-) Bitter/Sweet/ Sulfur	30	3.52±0.40 <sup>ab</sup>	2.30±0.05 <sup>b</sup>	4.21±0.45 <sup>ab</sup>	4.04±0.15 <sup>ab</sup>	3.78±0.51 <sup>ab</sup>	4.79±0.17 <sup>a</sup>	4.46±0.61 <sup>a</sup>	3.78±0.51 <sup>ab</sup>
异亮氨酸 Ile <sup>▲</sup>	苦(-) Bitter	90	5.30±0.21 <sup>b</sup>	4.42±0.68 <sup>c</sup>	4.13±0.22 <sup>c</sup>	5.46±0.47 <sup>b</sup>	5.63±0.13 <sup>b</sup>	7.19±0.30 <sup>a</sup>	7.40±0.24 <sup>a</sup>	7.47±0.03 <sup>a</sup>
亮氨酸 Leu <sup>▲</sup>	苦(-) Bitter	190	8.42±0.16 <sup>c</sup>	7.38±0.81 <sup>cd</sup>	7.25±0.01 <sup>d</sup>	9.82±0.58 <sup>b</sup>	9.97±0.40 <sup>b</sup>	12.40±0.47 <sup>a</sup>	12.12±0.56 <sup>a</sup>	12.88±0.13 <sup>a</sup>

续表 2

氨基酸 种类 Amino acid species	呈味特征 Taste attribute	阈值 Threshold (mg/100 g)	含量 Content (mg/100 g)							
			0 h	5 h	10 h	15 h	19 h	23 h	27 h	30 h
酪氨酸 Tyr <sup>▲</sup>	苦(-) Bitter	ND	4.76±0.18 <sup>b</sup>	5.28±0.04 <sup>b</sup>	7.89±0.08 <sup>a</sup>	7.61±0.50 <sup>a</sup>	8.07±0.62 <sup>a</sup>	7.88±0.95 <sup>a</sup>	8.35±0.11 <sup>a</sup>	8.44±0.52 <sup>a</sup>
苯丙氨酸 Phe <sup>▲</sup>	苦(-) Bitter	90	4.86±0.06 <sup>c</sup>	5.65±0.03 <sup>bc</sup>	6.34±0.49 <sup>ab</sup>	6.44±0.21 <sup>ab</sup>	6.82±0.46 <sup>a</sup>	6.21±0.01 <sup>ab</sup>	6.03±0.01 <sup>ab</sup>	6.85±0.08 <sup>a</sup>
赖氨酸 Lys <sup>▲</sup>	甜/苦(-) Sweet/Bitter	50	19.49±0.98 <sup>e</sup>	16.38±0.01 <sup>g</sup>	28.12±0.30 <sup>f</sup>	30.31±1.46 <sup>d</sup>	33.91±1.21 <sup>d</sup>	41.84±1.56 <sup>c</sup>	41.40±0.49 <sup>b</sup>	47.01±0.49 <sup>a</sup>
组氨酸 His <sup>▲</sup>	苦(-) Bitter	20	112.45±0.23 <sup>d</sup>	115.87±1.92 <sup>d</sup>	138.39±0.21 <sup>c</sup>	139.29±2.28 <sup>c</sup>	158.70±2.91 <sup>b</sup>	166.26±4.63 <sup>b</sup>	184.72±5.47 <sup>a</sup>	168.12±8.85 <sup>b</sup>
精氨酸 Arg <sup>▲</sup>	甜/苦(-) Sweet/Bitter	50	9.96±0.04 <sup>c</sup>	6.20±0.15 <sup>d</sup>	14.97±0.28 <sup>b</sup>	13.75±0.95 <sup>b</sup>	15.14±1.51 <sup>b</sup>	17.72±1.03 <sup>a</sup>	19.30±0.52 <sup>a</sup>	19.10±0.11 <sup>a</sup>
脯氨酸 Pro <sup>*</sup>	甜/苦(+) Sweet/Bitter	300	12.60±0.45 <sup>a</sup>	11.33±0.38 <sup>b</sup>	12.80±0.62 <sup>a</sup>	10.33±0.38 <sup>c</sup>	8.18±0.59 <sup>d</sup>	7.51±0.15 <sup>de</sup>	6.84±0.60 <sup>e</sup>	5.15±0.15 <sup>f</sup>
总和 Total			340.87±5.45 <sup>e</sup>	341.79±3.71 <sup>c</sup>	369.36±4.67 <sup>cd</sup>	363.11±0.37 <sup>d</sup>	377.95±0.88 <sup>bc</sup>	381.96±1.99 <sup>b</sup>	398.67±3.40 <sup>a</sup>	385.35±9.50 <sup>b</sup>

“★”代表鲜甜味氨基酸，“▲”代表苦味氨基酸，“+”代表味道愉悦，“-”代表味道不好，“ND”表示阈值未检测到。同行标注不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

“★” means fresh sweet amino acids; “▲” means bitter amino acids; “+” means pleasant taste; “-” means unpleasant taste; “ND” means the threshold is not detected. The different superscript letters in the same row indicates significant difference ( $P<0.05$ )

表 3 草鱼死后 25℃贮藏过程中 ATP 及其关联化合物的变化

Tab.3 Changes in ATP-related compounds of postmortem grass carp during storage at 25℃

时间 Time(h)	含量 Content (mg/100 g)					
	肌苷酸 IMP	腺嘌呤核苷 三磷酸 ATP	二磷酸腺酸 ADP	一磷酸腺苷 AMP	次黄嘌呤 Hx	次黄嘌呤核苷 HxR
0	212.53±9.81 <sup>a</sup>	3.68±0.37 <sup>c</sup>	14.69±0.22 <sup>c</sup>	8.36±0.43 <sup>d</sup>	2.16±0.20 <sup>d</sup>	13.46±1.22 <sup>f</sup>
5	157.68±7.43 <sup>b</sup>	4.57±0.45 <sup>c</sup>	15.87±0.16 <sup>b</sup>	8.09±0.70 <sup>d</sup>	3.12±0.25 <sup>cd</sup>	46.26±2.46 <sup>e</sup>
10	161.71±7.33 <sup>b</sup>	12.54±0.41 <sup>a</sup>	17.87±0.63 <sup>a</sup>	11.74±0.37 <sup>a</sup>	4.17±0.20 <sup>c</sup>	46.95±0.32 <sup>e</sup>
15	111.69±4.96 <sup>c</sup>	9.32±0.04 <sup>b</sup>	17.86±0.18 <sup>a</sup>	9.83±0.96 <sup>c</sup>	4.95±0.13 <sup>c</sup>	63.27±0.14 <sup>d</sup>
19	57.74±2.94 <sup>d</sup>	10.44±0.00 <sup>b</sup>	16.00±0.08 <sup>b</sup>	10.42±1.15 <sup>ab</sup>	7.36±0.11 <sup>b</sup>	75.76±2.01 <sup>c</sup>
23	41.61±4.45 <sup>e</sup>	10.16±0.01 <sup>b</sup>	15.48±0.32 <sup>bc</sup>	11.32±0.18 <sup>ab</sup>	8.47±0.66 <sup>b</sup>	92.66±6.80 <sup>b</sup>
27	14.66±0.62 <sup>f</sup>	10.17±1.33 <sup>b</sup>	16.22±0.62 <sup>b</sup>	11.60±0.23 <sup>a</sup>	19.40±0.08 <sup>a</sup>	97.52±4.75 <sup>b</sup>
30	12.66±0.79 <sup>f</sup>	10.20±0.11 <sup>b</sup>	15.52±0.37 <sup>bc</sup>	11.40±0.03 <sup>a</sup>	21.30±0.27 <sup>a</sup>	105.17±1.48 <sup>a</sup>

渐增高。乳酸含量呈现先增加后减少的趋势。鲜甜味游离氨基酸的总含量逐渐减少,而苦味游离氨基酸的总含量则逐渐增加,同时,具有鲜味的 IMP 含量迅速减少,而呈现苦味的 HxR 和 Hx 含量则逐渐增加。K 值的变化情况表明,草鱼死后常温贮藏 10 h 内可保持较高鲜度,27 h 时达到腐败。因此,应尽量在草鱼死后 10 h 内进行加工。

## 参 考 文 献

- Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. Influence of chitosan/clay functional bio-nanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *International Journal of Food Science and Technology*, 2014, 49(3): 811–818
- Abe H, Okuma E. Rigor-mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(11): 2095–2100
- Anonymous. *Fishery yearbook in China in 2017*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2017 [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2017]
- Bahuaud D, Gaarder M, Veiseth-Kent E, *et al.* Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 2010, 310(1–2): 213–220
- Chen JL, Chen SS, Shi WZ, *et al.* Study of water-soluble flavor components in fish meat of different size of grass carp. *Food and Fermentation Industry*, 2017, 43(1): 213–217 [陈剑岚, 陈舜胜, 施文正, 等. 大小草鱼肉呈味水溶性成分的比较. *食品与发酵工业*, 2017, 43(01): 213–217]
- Erkan N, Uretener G, Alpas H, *et al.* The effect of different high pressure conditions on the quality and shelf life of cold smoked fish. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2011, 12(2): 104–110
- Fan HB, Luo YK, Yin XF, *et al.* Biogenic amine and quality changes in lightly salt- and sugar-salted black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fillets stored at 4 °C. *Food Chemistry*, 2014, 159: 20–28
- Hong H, Luo Y, Zhou Z, *et al.* Effects of low concentration of salt and sucrose on the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4°C. *Food Chemistry*, 2012, 133(1): 102–107
- Iwamoto M, Yamanaka H, Watabe S, *et al.* Effect of storage temperature on Rigor-Mortis and ATP degradation in place *Paralichthys olivaceus* muscle. *Journal of Food Science*, 1987, 52(6): 1514–1517
- Li H, Liu LF, Yang BF, *et al.* Studies on the texture and rheological properties of *Paralichthys olivaceus* under controlled freezing point storage. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(03): 63–68 [李辉, 刘莲风, 杨博峰, 等. 冰温保鲜条件下牙鲈的鲜度及质构变化. *渔业科学进展*, 2011, 32(3): 63–68]
- Li Q, Zhang LT, Lu H, *et al.* Comparison of postmortem changes in ATP-related compounds, protein degradation and endogenous enzyme activity of white muscle and dark muscle from common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4°C. *Food Science and Technology*, 2017, 78: 317–324
- Liu XC, Jiang Y, Shen S, *et al.* Postmortem changes of Changfeng sliver carp during storage at 4°C. *Meat Research*, 2016, 30(5): 20–24 [刘晓畅, 蒋妍, 申松, 等. 4°C 冷藏条件下长丰鲢尸僵过程中的品质变化规律. *肉类研究*, 2016, 30(5): 20–24]
- Lü B, Chen SS, Deng DW. Variations of glycogen, lactic acid content and pH value in muscle of three species of cultured freshwater fishes during storage. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2001, 10(3): 239–242 [吕斌, 陈舜胜, 邓德文. 三种淡水鱼肌肉的糖元、乳酸含量和 pH 值及在冷藏中的变化. *上海水产大学学报*, 2001, 10(3): 239–242]
- Ma HJ. Effects of ultra-high pressure treatment on the quality of grass carp meat and surimi. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [马海建. 超高压处理对草鱼鱼肉和鱼糜制品品质的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]

- Martinez I, Wang PA, Slizyte R, *et al.* Protein expression and enzymatic activities in normal and soft textured Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle. *Food Chemistry*, 2011, 126(1): 140–148
- Ocaño-Higuera VM, Marquez-Ríos E, Canizales-Dávila M, *et al.* Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chemistry*, 2009, 116(4): 933–938
- Okamoto A, Hamada Y, Miura K, *et al.* Influence of killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2006, 72(5): 918–923
- Poli BM, Parisi G, Scappini F, *et al.* Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 2005, 13(1–2): 29–49
- Ren XE, Zhang SH. The research status of fish flavor. *China Condiment*, 2003, 28(12): 17–21 [任仙娥, 张水华. 鱼肉风味的研究现状. *中国调味品*, 2003, 28(12): 17–21]
- Saito T, Arai K, Matsuyoshi M. A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1959, 24(9): 749–750
- Sato K, Ohashi C, Ohtuki, K, *et al.* Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1991, 39(7): 1222–1225
- Shi C. Changes of the ATP-related compounds and biochemical properties of silver carp during early stage post-mortem and chilled storage. Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 [史策. 鲢鱼尸僵及贮藏过程中 ATP 关联物及生化特性变化规律的研究. 中国农业大学博士学位论文, 2015]
- Shi WZ, Chen QY, Wan JQ, *et al.* Effect of frozen on freshness and taste of grass carp mea. *Food Industry Technology*, 2014, 35(16): 334–336, 341 [施文正, 陈青云, 万金庆, 等. 冷冻对不同部位草鱼肉鲜度和滋味的影响. *食品工业科技*, 2014, 35(16): 334–336, 341]
- Song YL, Luo YK, Zhang LN, *et al.* Study on bream (*Megalobrama amblycephala*) quality variation during storage under different temperatures. *Journal of China Agricultural University*, 2010, 15(4): 104–110 [宋永令, 罗永康, 张丽娜, 等. 不同温度贮藏期间团头鲂品质的变化规律. *中国农业大学学报*, 2010, 15(4): 104–110]
- Tang SF, Qian ZZ, Luo FF, *et al.* Determination of ATP-related compounds in aquatic products by high performance liquid chromatography. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 110–116 [汤水粉, 钱卓真, 罗方方, 等. 高效液相色谱法测定水产品中 ATP 关联化合物. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 110–116]
- Torten J, Whitaker JR. Evaluation of the biuret and dye-binding methods for protein determination in meats. *Journal of Food Science*, 2010, 29(2): 168–174
- Xiong X, Peng ZQ, Jin HG, *et al.* Changes in muscle pH and rigor index of big head carp during ice storage and their effects on gel properties of salt-soluble proteins from big head carp. *Journal of Food Science*, 2012, 33(9): 87–90 [熊雄, 彭增起, 靳红果, 等. 鲢鱼宰后 pH 值和僵直指数的变化及其对盐溶蛋白凝胶特性的影响. *食品科学*, 2012, 33(9): 87–90]
- Yang Y, Shi WZ, Wang ZH, *et al.* Effect of ultra-high pressure on the flavor of cooked white shrimp meat. *Food Industry Technology*, 2015, 36(18): 87–92, 98 [杨阳, 施文正, 汪之和, 等. 超高压对南美白对虾熟制虾仁风味的影响. *食品工业科技*, 2015, 36(18): 87–92, 98]
- Yokoyama Y, Sakaguchi M, Kawai F, *et al.* Change in concentration of ATP-related compounds in various tissues of oyster during ice storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(11): 2125–2136
- Zhang JQ. A simplified method for extration of ATP related compounds in fish meat and its application. Master's Thesis of Zhejiang University, 2013, 2–4 [张佳琪. 鱼肉中 ATP 关联化合物提取方法的改进及应用. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2013, 2–4]

(编辑 陈辉)

## Quality Changes of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in the Process of Postmortem Stored at Room Temperature

WANG Hongli, SHI Wenzheng<sup>①</sup>, QIU Weiqiang, WANG Xichang

( College of Food Science and Technology, National R&D Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing  
Technology (Shanghai), Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In order to study the quality changes of grass carp during postmortem at room temperature (25°C), the changes in texture, pH, lactic acid, free amino acids, and ATP-related compounds in the dorsal meat of grass carp were measured using texture analyzer, pH meter, lactic acid kit, automatic amino acid analyzer, and high-performance liquid chromatography method in the postmortem process within 30 h. The results showed that hardness and chewiness of the grass carp reached its maximum at 23 h and then rapidly decreased, while springiness, cohesiveness, and resilience of grass carp decreased with the extension of storage time. pH showed a trend of decreasing first and then increasing, and it reached its maximum at 23 h. The content of lactic acid increased initially and then decreased, which reached its minimum value at 23 h. The total amount of fresh sweet amino acids gradually decreased during the postmortem process, while bitter amino acids were just the opposite, which increased during the postmortem process. The content of ATP increased significantly within 10 h, while the content of IMP with umami taste decreased rapidly. Furthermore, the content of HxR and Hx with bitter taste increased gradually during the storage process. The K value increased during the postmortem process. The change in K value indicated that grass carp could maintain high freshness after storage for 10 h at room temperature, and it reached 68.99% at 27 h, which showed that the fish had spoiled at that time. Therefore, it should be processed as soon as possible, ideally within 10 hours after the death of grass carp at room temperature. This study will enrich the basic theory of postmortem variation of fish and provide support for the quality change of aquatic products.

**Key words** *Ctenopharyngodon idellus*; Postmortem; Free amino acids; ATP-related compounds; K-value

① Corresponding author: SHI Wenzheng, Email: wzshi@shou.edu.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171106002

http://www.yykxjz.cn/

李旭鹏, 孔杰, 孟宪红, 栾生, 罗坤. WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 106–113

Li XP, Kong J, Meng XH, Luan S, Luo K. Effect of white spot syndrome virus infection on *bantam* and candidate target genes in the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 106–113

# WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响\*



李旭鹏<sup>1</sup> 孔杰<sup>1,2①</sup> 孟宪红<sup>1</sup> 栾生<sup>1,2</sup> 罗坤<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** *Bantam* 能够调控细胞增殖、细胞凋亡等过程, 影响生物的免疫过程。本研究利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对感染 WSSV 的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肝胰腺和鳃组织内 *bantam* 表达水平进行检测, 发现感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾肝胰腺中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的(0.16±0.03)( $P<0.05$ )、(0.63±0.26)、(0.32±0.06)( $P<0.05$ )和(0.41±0.13)倍; 中国明对虾鳃中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的(0.30±0.17)( $P<0.05$ )、(1.88±0.26)( $P<0.01$ )、(0.84±0.36)和(0.51±0.25)倍。利用 miRanda 软件进一步对中国明对虾 *bantam* 靶基因进行预测分析, 评分最高的靶基因是泛素缀合酶 E2。中国明对虾泛素缀合酶 E2 包含 UBCc 功能域。多序列比对显示, UBCc 功能域氨基酸残基序列在不同物种间保守性较高。进化树分析显示, 分类学地位相近的物种的泛素缀合酶 E2 聚为一类。qRT-PCR 检测感染 WSSV 的中国明对虾肝胰腺和鳃中的泛素缀合酶 E2 表达水平, 结果显示, 在感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾肝胰腺中泛素缀合酶 E2 的表达水平分别是对照组的(0.54±0.10)、(1.19±0.62)、(3.69±0.51)( $P<0.01$ )和(1.94±0.07)( $P<0.05$ )倍; 中国明对虾鳃中泛素缀合酶 E2 的表达水平分别是对照组的(0.22±0.05)、(1.34±0.38)、(4.29±0.52)( $P<0.01$ )和(1.28±0.79)倍。研究表明, *bantam* 和泛素缀合酶 E2 的表达都受 WSSV 侵染的影响, 可能与中国明对虾和 WSSV 之间的互作相关。但 *bantam* 和泛素缀合酶 E2 表达水平的变化是对虾抵抗 WSSV 侵染过程的免疫反应, 还是宿主基因被病毒胁迫后的结果, 需要进一步验证。

**关键词** 中国明对虾; WSSV; *bantam*; 泛素缀合酶 E2; 表达

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0106-08

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国传统养殖品种, 其肉质鲜美, 营养价值高。中国明对虾

自然群体主要分布于中国的黄海、渤海海域以及朝鲜半岛的西海岸附近(孟宪红, 2010)。白斑综合征(White

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017GH07; 2018GH10)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022015013)、山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2014CQ001)、泰山学者种业人才团队项目、现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)和国家自然科学基金面上项目(41676148; 31572616)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017GH07; 2018GH10), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institutes (20603022015013), Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2014CQ001), Taishan Scholar Program for Seed Industry, China Agriculture Research System(CARS-48), and National Natural Science Foundation of China (41676148; 31572616)].

李旭鹏, E-mail: lixupeng@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2017-11-06, 收修改稿日期: 2017-12-23

spot syndrome, WSS)是目前对虾养殖业中主要病害之一,该病发病后对虾死亡速度快、死亡率高,10 d 内死亡率接近 100%。该病的病原是白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV),该病毒属于线形病毒科(Nimaviridae),是一种双链 DNA 病毒(Huang *et al*, 2002; van Hulten *et al*, 2001; Yang *et al*, 2001)。WSSV 对中国明对虾的致死率高,对虾死亡速度快,人工感染实验中的中国明对虾平均存活时间约为 5~7 d(冯亚萍等, 2017)。microRNA (miRNA)是一类长度约为 21~25 bp 的小分子非编码 RNA,参与转录后调控过程,能够与目标靶基因的 mRNA 结合来调控目的基因的翻译过程,从而起到对基因表达水平的调控。研究表明,miRNA 能够参与宿主与病原的互作过程。前期研究发现,半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miR-223 参与免疫应答过程,在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后的免疫组织中呈现差异表达趋势(颜慧等, 2015)。感染 WSSV 后的斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内 11 种 miRNA 呈现差异表达趋势(Kaewkascholkul *et al*, 2016),日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中发现,miR-965 和 miR-100 可能与对虾和病毒间的互作相关(Le *et al*, 2016; Yang *et al*, 2014)。这些研究提示,特殊 miRNA 在对虾和病毒间互作过程中可能发挥调控作用,但是,哪些 miRNA 发挥了具体调控作用目前还不清楚。*Bantam* 是一种 miRNA,研究表明, *bantam* 能够参与调控生物生长(Hipfner *et al*, 2002)、细胞增殖与凋亡(Nolo *et al*, 2006)。在感染苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)后的斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)中, *bantam* 表达水平呈上调趋势,提示其在宿主-病毒互作中发挥调控作用(Shi *et al*, 2016)。作者对感染 WSSV 后的中国明对虾 *bantam* 及其靶基因特征进行研究,期望能在 miRNA 水平为中国明对虾抗 WSSV 研究提供一些参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验所用中国明对虾为中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心培育的“黄海 2 号”新品种。对虾养殖水经砂滤、紫外线消毒、5 mg/L 有效氯等方法进行处理。

### 1.2 病毒悬液制备和浓度测定

取感染 WSSV 后死亡的中国明对虾肌肉组织,在冰浴中剪碎,按照 1 g 肌肉组织加入 10 ml PBS,

使用 Precellys 24 组织破碎仪(Bertin, 法国)进行破碎,对匀浆液使用 Centrifuge 5804R 离心机(Eppendorf, 德国) 12000 r/min 离心后,取上清液,作为 WSSV 病毒悬液。使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪和 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)(TaKaRa)试剂盒,利用探针法 qRT-PCR 技术对病毒悬液中的 WSSV 含量进行检测。引物和探针序列见表 1。PCR 反应体系: 10  $\mu$ l Premix Ex Taq (Probe qPCR)(2 $\times$ ), 0.4  $\mu$ l ROX Reference Dye II, 0.4  $\mu$ l WSSV forward primer (10  $\mu$ mol/L), 0.4  $\mu$ l WSSV reverse primer (10  $\mu$ mol/L), 0.8  $\mu$ l WSSV probe (10  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ l 病毒悬液, dH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。根据 WSSV 标准品浓度和 C<sub>t</sub> 值进行线性回归分析,根据待检测病毒悬液的 C<sub>t</sub> 值,计算其中的病毒浓度,平行实验重复 3 次。

### 1.3 WSSV 人工感染实验

使用注射器从中国明对虾第 5 腹节处注射 10  $\mu$ l 病毒悬液。每尾对虾的 WSSV 注射量为 1 $\times$ 10<sup>5</sup> copies。分别在注射病毒悬液后的 6、12、24、48 h,取对虾肝胰腺和鳃组织。取正常对虾作为对照。每组实验取 3 个生物学重复,肝胰腺和鳃组织经过液氮速冻后,放入-80 $^{\circ}$ C 保存,用于后期 RNA 提取。

### 1.4 miRNA 提取及 qRT-PCR

使用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒(天根),按照说明书进行 miRNA 的提取。提取后的 miRNA 保存在-80 $^{\circ}$ C,用于后期 qRT-PCR 实验。采用 Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit(Clontech, 美国)进行 miRNA 加 A 尾反转录,合成 cDNA 模板。根据 *bantam* 序列(5'-UGAGAUCAUUGUGAAAGCUGAUU-3')设计 qRT-PCR 引物(表 1)。使用 qRT-PCR 技术,对感染 WSSV 后不同时间段的中国明对虾肝胰腺和鳃组织中的 *bantam* 表达水平进行检测。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa)试剂盒。内参检测选用试剂盒自带的 U6 引物。反应体系: cDNA 模板 2  $\mu$ l、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$ ) 10  $\mu$ l、ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l、RT primer (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ l、mRQ 3' Primer 0.4  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 熔解曲线分析。所有实验设置 3 个平行,使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法对结果进行处理,实验中所涉及的数据均为平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD),使用 SPSS 软件 *t* 检验进行显著性分析, *P*<0.05 为差异显著, *P*<0.01 为差异极显著。

## 1.5 靶基因分析

使用 miRanda 软件 (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 和本实验室已有的中国明对虾高通量转录组测序数据中的 3'UTR 序列, 对 *bantam* 靶基因进行预测。取评分最高靶基因作为研究对象。使用 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3' Kit (Clontech) 试剂盒, 利用 RACE 技术获得靶基因 cDNA 序列。利用 NCBI 数据库中的 Search for Conserved Domains within a protein or coding nucleotide sequence 功能 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对靶基因序列进行功能域分析。从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找其他物种的靶基因氨基酸序列, 利用 MEGA 5 软件 (<http://www.megas-oftware.net>) 进行进化树分析, 用 DNAMAN (version 6) (Lynnon Biosoft, 加拿大) 软件进行多序列对比分析。

提取感染 6、12、24、48 h 后的中国明对虾肝胰腺和鳃组织总 RNA, 按照 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒 (天根) 说明书操作。利用 qRT-PCR 技术对靶基因表达水平进行检测。内参选择 18S rRNA, 引物序列见表 1。反应体系和程序同 *bantam* 表达水平检测实验。

表 1 引物和探针信息  
Tab.1 Primers and probes information

探针/引物名称 Probe/primer name	序列 Sequences
WSSV forward primer	TGGTCCCCTCCTCATCTCAG
WSSV reverse primer	GCTGCCTTGCCGAAATTA
WSSV probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTA TCACACA
<i>bantam</i> RT primer	TGAGATCATTGTGAAAGCTGATT
E2 RT forward primer	TGATGATGTCAGCGAACAAG
E2 RT reverse primer	ATGGAAGCATGAGGTAACGAA
18S forward primer	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S reverse primer	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

## 2 结果

### 2.1 *bantam* 表达水平

研究结果显示, 感染 WSSV 的中国明对虾肝胰腺中的 *bantam* 表达水平呈现下调趋势。在感染 WSSV 后的 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾肝胰腺中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的  $(0.16 \pm 0.03)(P < 0.05)$ 、 $(0.63 \pm 0.26)$ 、 $(0.32 \pm 0.06)(P < 0.05)$  和  $(0.41 \pm 0.13)$  倍。感染 WSSV 的中国明对虾鳃中的 *bantam* 表达水平呈现波动趋势。在感染 WSSV 后的 6、12、24 和 48 h, 中国明对虾鳃中的 *bantam* 表达水平分别是对照组的

$(0.30 \pm 0.17)(P < 0.05)$ 、 $(1.88 \pm 0.26)(P < 0.01)$ 、 $(0.84 \pm 0.36)$  和  $(0.51 \pm 0.25)$  倍。

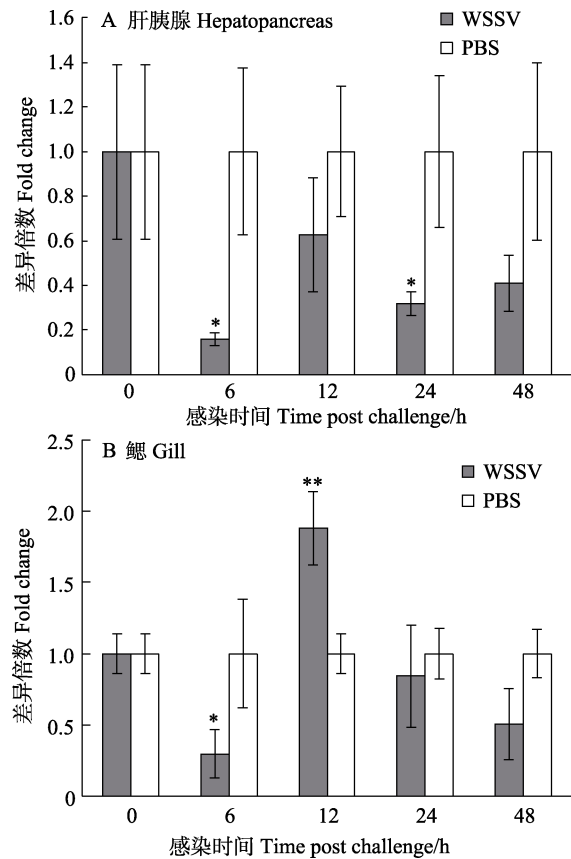


图 1 感染 WSSV 后中国明对虾肝胰腺和鳃中 *bantam* 表达水平

Fig.1 Expression level of *bantam* in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp

\*为差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*为差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下同  
\* denoted significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\* denoted highly significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as below

### 2.2 *bantam* 靶基因预测及序列分析

miRanda 软件预测评分最高的中国明对虾 *bantam* 候选靶基因是泛素缀合酶 E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2), miRanda 评分为 183, 预测 *bantam* 与靶基因泛素缀合酶 E2 结合位点的自由结合能是  $-27.89$  kcal/mol。

中国明对虾泛素缀合酶 E2 基因编码区共 540 bp, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAG, 共编码 179 个氨基酸。功能域预测结果显示, 第 33~80 氨基酸残基构成 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 的 catalytic (UBC) 功能域 (图 2)。由来自 5 种脊椎动物、5 种无脊椎动物、3 种真菌和 2 种植物的泛素缀合酶 E2 氨基酸序列进化树分析结果显示, 中国明对虾的泛素缀合酶 E2 蛋白首先与甲壳动物端足虫 (*Hyalomma azteca*) 聚为一支, 其他无脊椎动物赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、果蝇

(*Drosophila serrata*)、地中海实蝇(*Ceratitis capitata*)泛素缀合酶 E2 聚为一支。5 种脊椎动物分别是小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、人类(*Homo sapiens*)、珍珠鸡(*Numida meleagris*)、大山雀(*Parus major*)泛素缀合酶 E2 聚为一支。3 种子囊菌(*Umbilicaria pustulata*、*Diplocarpon rosae*、*Madurella mycetomatis*)泛素缀合酶 E2 聚为一支。2 种植物分别是可可(*Theobroma cacao*)和菠萝(*Ananas comosus*)泛

素缀合酶 E2 聚为一支(图 3)。多序列比对结果显示,泛素缀合酶 E2 蛋白的 UBCc 功能域氨基酸残基序列在不同物种间保守性较高。其中,5 种脊椎动物的泛素缀合酶 E2 氨基酸序列均以 MASQN 氨基酸残基序列开始,4 种无脊椎动物的泛素缀合酶 E2 氨基酸序列均以 MAQN 氨基酸残基开始。分类学地位较远的物种间的泛素缀合酶 E2 蛋白 N 端氨基酸序列变化较大,保守性总体略低于 C 端氨基酸序列(图 4)。

```

1 M A Q N I A P G N S T T A S P S K G N S D R A I A G R D S H
1 ATGGCCCAAATATCGCACCAGGGAACAGCACGCGGAGTCCGAGCAAAGGGAACAGCGACAGGCCATAGCGGGGAGAGACTCGCAC
31 S V S K R L Q H E L M T L M M S A N K G I S A F P E G D N L
91 TCAGTCAGCAAAGACTTCAACATGAGCTCATGACTTTGATGATGTCAGCGAACAAAGGCATCTCGGCTTCCAGAAAGGTGACAATCTC
61 F K W I G T I I G P A S T V Y E G L S Y K L S L E F P S S Y
181 TTCAAATGGATCGGCACAATCATTGGTCCAGCCTCCACGGTGTATGAGGGACTCTCCTACAAACTGTCTCTAGAATTCCTAGCAGTTAT
91 P Y S A P T V K F V T S C F H P N V D L H G N I C L D I L K
271 CCCTACAGCGCACCAACAGTCAAGTTCGTTACCTCATGCTTCCATCCAAATGTCGACCTCCACGGTAACATCTGTCTAGACATCTTAAAA
121 E K W S A S Y D V R S I L L S I Q S L L G E P N N D S P L N
361 GAGAAGTGGTCTGCGTCATACGATGTGCGGTCGATTCTCCTTTCGATCCAGTCATTACTTGGAGAACCGAATAATGACAGTCCCTGAAAC
151 G H A A E L W A N Q V A Y K K H L L E H Y K K N N G D E K *
451 GGCCATGCAGCTGAGCTCTGGGCCAACCAAGTGGCATAAAGAAACACCTGTTAGAGCACTACAAGAAGAATAATGGCGACGAGAAATAG
    
```

图 2 泛素缀合酶 E2 核酸以及预测氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the ubiquitin-conjugating enzyme E2 起始密码子和终止密码子用方框标出。UBCc 功能域用下划线标出  
The initiation and termination codons are boxed. The UBCc domain is underlined

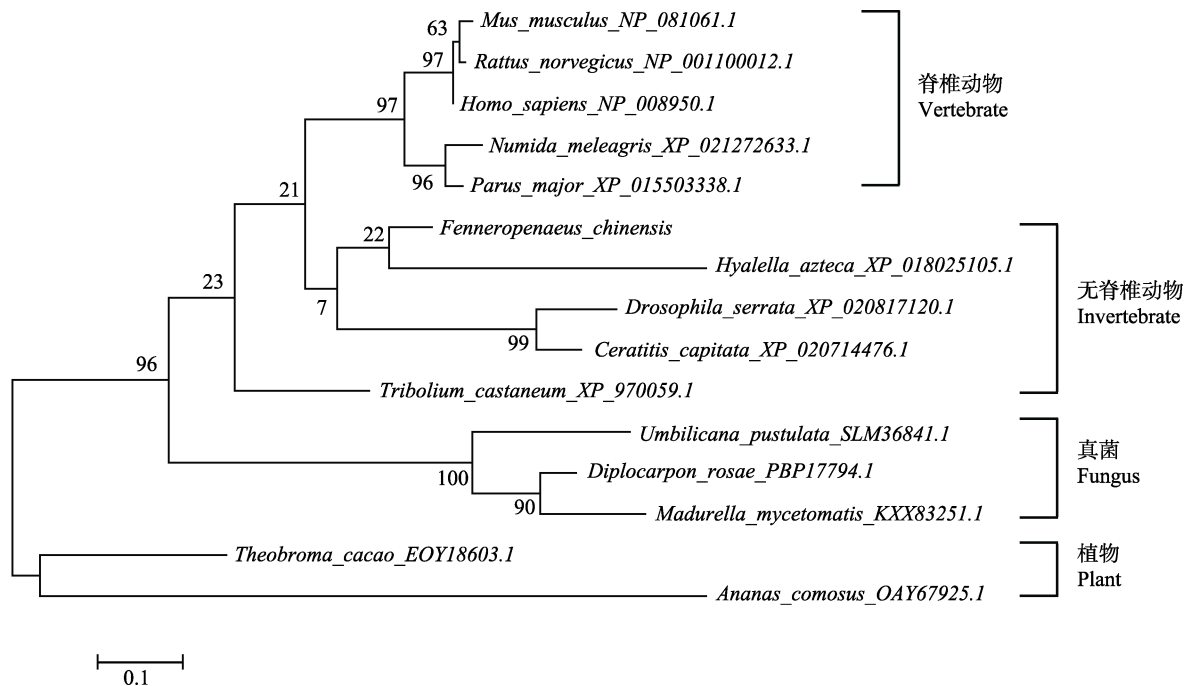


图 3 基于泛素缀合酶 E2 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis based on the deduced amino acid sequences of the ubiquitin-conjugating enzyme E2

### 2.3 泛素缀合酶 E2 表达水平

qRT-PCR 结果显示,在感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h 的中国明对虾肝胰腺中,泛素缀合酶 E2 的表达水平分别是对照组的(0.54±0.10)、(1.19±0.62)、

(3.69±0.51)( $P<0.01$ )和(1.94±0.07)( $P<0.05$ )倍。在感染 WSSV 后 6、12、24 和 48 h 的中国明对虾鳃中,泛素缀合酶 E2 表达水平是对照组的(0.22±0.05)、(1.34±0.38)、(4.29±0.52)( $P<0.01$ )和(1.28±0.79)倍(图 5)。



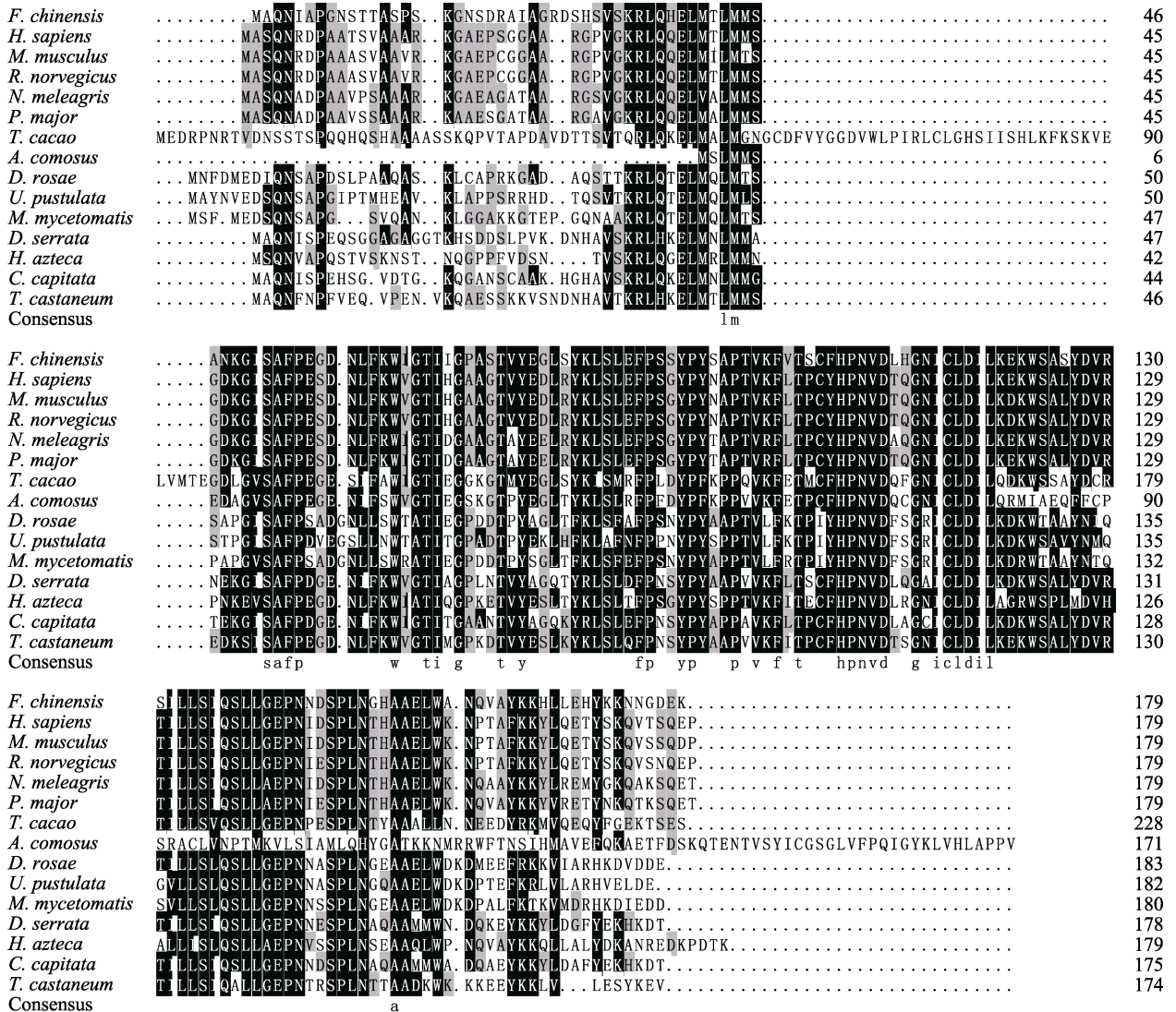


图 4 泛素缀合酶 E2 氨基酸多序列比对

Fig.4 Multiple alignments of deduced amino acid sequences of the ubiquitin-conjugating enzyme E2

多序列比对所用序列与图 3 中所用序列一致

The sequences used in the multiple alignments are the same sequences shown in Fig.3

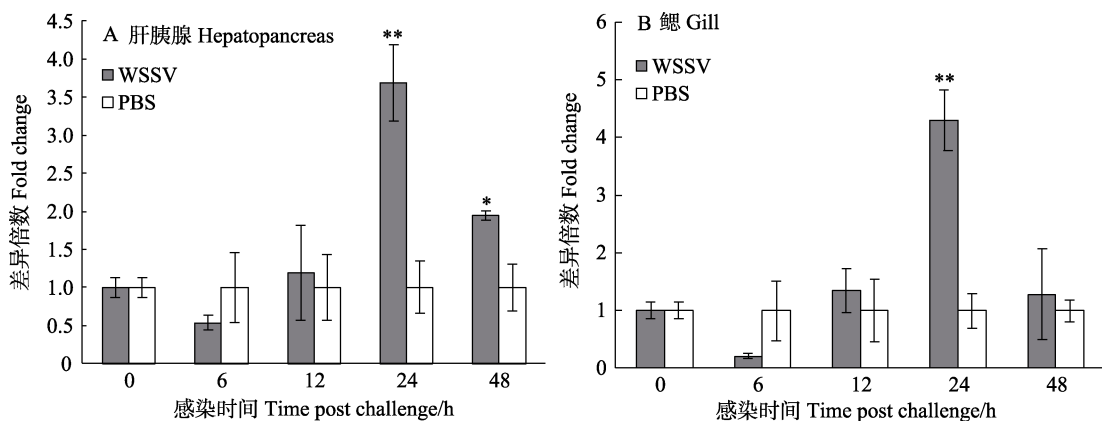


图 5 感染 WSSV 后中国明对虾肝胰腺和鳃内泛素缀合酶 E2 基因表达水平

Fig.5 Gene expression level of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp

### 3 讨论

高致死率的 WSSV 对中国明对虾产业发展带来巨大的影响。目前, 在中国明对虾抗 WSSV 研究领域, miRNA 方面的研究相对较少。针对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的研究表明, 8 种 miRNA 在感染 WSSV 后的对虾体内呈现差异表达 (Zeng *et al.*, 2015)。在桃拉病毒感染的凡纳滨对虾体内, 22 种 miRNA 发生差异表达, 其中, 有 8 种 miRNA 上调表达, 14 种下调表达 (马宁等, 2015)。这些研究提示, miRNA 在对虾与病毒互作中可能发挥重要调控作用。

本研究表明, *bantam* 在感染 WSSV 后的中国明对虾体内呈现显著的表达变化。研究表明, *bantam* 主要参与调控细胞增殖、细胞凋亡过程 (Brennecke *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014)。同时, 有关于 *bantam* 参与免疫过程的报道。在感染桃拉病毒后的凡纳滨对虾肝胰腺内, *bantam* 的表达量下降到正常水平的 0.34 倍 (马宁等, 2015)。感染 WSSV 的凡纳滨对虾肝胰腺内 *bantam* 的表达水平显著下调至正常对虾的 0.3 倍 (Zeng *et al.*, 2015)。上述研究结果与本研究类似。*bantam* 在感染 WSSV 初期的对虾肝胰腺中呈现下调表达趋势, 提示 *bantam* 可能与对虾和病毒间的互作过程相关。但是, 本研究发现感染 WSSV 后的中国明对虾鳃中 *bantam* 表达呈现出先下调后上调的波动变化。肝胰腺是发挥免疫作用的组织, 鳃是 WSSV 侵染的主要靶器官, WSSV 的侵染对这 2 种组织内 *bantam* 表达水平的影响不同, 提示不同组织应答病毒侵染的机制不同。考虑到 *bantam* 主要参与调控细胞增殖和细胞凋亡过程, 这可能提示, 通过 *bantam* 的转录后调控过程, 病毒侵染影响了宿主的细胞凋亡过程。

泛素缀合酶 E2 是参与蛋白泛素化反应的酶, 蛋白的泛素化通过泛素活化酶 E1、泛素缀合酶 E2、泛素蛋白连接酶 E3 将泛素与蛋白酶连接, 泛素化蛋白酶发挥水解作用。因此, 该酶在生物细胞周期调控、细胞增殖、细胞凋亡过程中发挥重要作用 (Chang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2009)。陈学昭等 (2015) 研究报道, 泛素缀合酶 E2 在鳃弧菌感染后的松江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) 肝脏、脾脏内表达水平迅速上升, 提示该基因与鱼类的免疫功能可能相关。Jeena 等 (2012) 在斑节对虾抗 WSSV 研究中发现, 感染 WSSV 后 24 h, 对虾体内的泛素缀合酶 E2 表达水平显著升高, 随后表达水平开始下降, 泛素缀合酶 E2 表达特征与本研究十分相似, 进一步提示, 泛素缀合酶 E2 可能与对虾和 WSSV 互作过程相关。

*bantam* 和泛素缀合酶 E2 都是与细胞增殖、细胞凋亡过程相关的调控因子。研究表明, 在感染 WSSV 后的中国明对虾体内 *bantam* 和泛素缀合酶 E2 呈现显著表达变化 ( $P < 0.05$ ), 提示中国明对虾在感染 WSSV 后可能通过泛素-蛋白酶体途径 (Ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 对某些特殊靶蛋白进行选择性地降解, 影响细胞的凋亡过程。但是, 这种变化是中国明对虾对 WSSV 侵染过程的免疫应答, 还是宿主基因被 WSSV 挟持为病毒侵染过程服务, 需要进一步研究来证实。

### 参 考 文 献

- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, *et al.* *bantam*, encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 2003, 113(1): 25–36
- Chang R, Wei L, Lu Y, *et al.* Upregulated expression of ubiquitin-conjugating enzyme E<sub>2</sub>Q<sub>1</sub> (UBE<sub>2</sub>Q<sub>1</sub>) is associated with enhanced cell proliferation and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Molecular Histology*, 2015, 46(1): 45–56
- Chen XZ, Zhang L, Yu SS, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2-D2 in roughskin sculpin, *Trachidermus Fasciatus*. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(10): 133–140 [陈学昭, 张雷, 于珊珊, 等. 松江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) 泛素结合酶 E2-D2 基因的分子克隆及组织表达分析. *海洋学报*, 2015, 37(10): 133–140]
- Feng YP, Kong J, Luo K, *et al.* The comparison of the sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 78–84 [冯亚萍, 孔杰, 罗坤, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 对白斑综合征病毒的敏感性比较. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 78–84]
- Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. The *bantam* gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*, 2002, 161(4): 1527–1537
- Huang C, Zhang X, Lin Q, *et al.* Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2002, 1(3): 223–231
- Huang H, Li J, Hu L, *et al.* *Bantam* is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling. *Developmental Biology*, 2014, 385(2): 211–217
- Jeena K, Prasad KP, Pathan MK, *et al.* Expression profiling of



- WSSV ORF 199 and shrimp ubiquitin conjugating enzyme in WSSV infected *Penaeus monodon*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2012, 25(8): 1184–1189
- Jiang L, Bao Y, Luo C, *et al.* Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E<sub>2</sub>C/UbcH<sub>10</sub> expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis *in vitro*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2010, 136(2): 211–217
- Kaewkascholkul N, Somboonviwat K, Asakawa S, *et al.* Shrimp miRNAs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection. Developmental and Comparative Immunology, 2016, 60: 191–201
- Lam V, Tokusumi T, Tokusumi Y, *et al.* *bantam* miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 453(3): 467–472
- Le S, Li C, Zhang X. The role of shrimp miR-965 in virus infection. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 54: 427–434
- Ma N, Zeng DG, Li M, *et al.* Study on differential expression of microRNAs in *Litopenaeus vannamei* induced by Taura syndrome virus infection. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(5): 2310–2315 [马宁, 曾地刚, 黎铭, 等. 桃拉综合症病毒感染诱导的凡纳滨对虾 microRNA 表达差异的研究. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2310–2315]
- Maeda H, Miyajima N, Kano S, *et al.* Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer. Molecular Cancer Research, 2009, 7(9): 1553–1562
- Meng XH. The analysis of WSSV resistance of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [孟宪红. 中国对虾“黄海 2 号”对 WSSV 的抗病性分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- Nolo R, Morrison CM, Tao C, *et al.* The *bantam* microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. Current Biology, 2006, 16(19): 1895–1904
- Shi X, Ran Z, Li S, *et al.* The effect of microRNA *bantam* on Baculovirus AcMNPV infection *in vitro* and *in vivo*. Viruses, 2016, 8(5): 136
- van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology, 2001, 286(1): 7–22
- Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virology, 2001, 75(23): 11811–11820
- Yan H, Zeng Y, Gong GY, *et al.* The expression pattern of miR-223 in different tissues of *Cynoglossus semilaevis* and the regulation of expression in response to infections. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 37–44 [颜慧, 曾艳, 公光业, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miR-223 的表达特征及免疫应答分析. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 37–44]
- Yang L, Yang G, Zhang X. The mir-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 146–153
- Zeng DG, Chen XL, Xie DX, *et al.* Identification of highly expressed host microRNAs that respond to white spot syndrome virus infection in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). Genetic and Molecular Research, 2015, 14(2): 4818–4828

(编辑 马瑾艳)

## Effect of White Spot Syndrome Virus Infection on *bantam* and Candidate Target Genes in the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

LI Xupeng<sup>1</sup>, KONG Jie<sup>1,2①</sup>, MENG Xianhong<sup>1</sup>, LUAN Sheng<sup>1,2</sup>, LUO Kun<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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** *Bantam* is a type of miRNA involved in cell proliferation and apoptosis, and can affect immune processes in animals. In the present study, *bantam* expression in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* was determined using the qRT-PCR technique. The results showed that *bantam* expression in the hepatopancreas of Chinese shrimp 6, 12, 24, and 48 h post infection was (0.16±0.03)( $P<0.05$ ), (0.63±0.26), (0.32±0.06) ( $P<0.05$ ), and (0.41±0.13) fold that of the expression in the controls, respectively. *Bantam* expression in the gill of Chinese shrimp 6, 12, 24, and 48 h post infection was (0.30±0.17) ( $P<0.05$ ), (1.88±0.26) ( $P<0.01$ ), (0.84±0.36), and (0.51±0.25) fold that of the expression in the controls, respectively. The target genes of *bantam* were predicted using the miRanda software. The ubiquitin-conjugating enzyme E2 was the predicted target gene with the highest score. The Chinese shrimp ubiquitin-conjugating enzyme E2 contains the ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic (UBCc) domain. Multiple alignment results showed that the UBCc domain was relatively conserved among different species. Phylogenetic analysis showed that the ubiquitin-conjugating enzyme E2 in species with closer taxonomic status was clustered in a branch. Pair-wise and multiple sequence alignment revealed that the ubiquitin-conjugating enzyme E2 was relatively well-conserved. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 expression in the hepatopancreas and gill of WSSV-infected Chinese shrimp was further determined using qRT-PCR. The results showed that the expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the hepatopancreas of Chinese shrimp 6, 12, 24, and 48 h post-WSSV infection was (0.54±0.10), (1.19±0.62), (3.69±0.51)( $P<0.01$ ), and (1.94±0.07)( $P<0.05$ ) fold that of the expression in the controls, respectively. The expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the gill of Chinese shrimp 6, 12, 24 and 48 h post WSSV infection was (0.22±0.05), (1.34±0.38), (4.29±0.52) ( $P<0.01$ ), and (1.28±0.79) fold that of the expression in the controls. These results suggest that both *bantam* and the target gene ubiquitin-conjugating enzyme E2 might be involved in the interaction between Chinese shrimp and WSSV. Whether the altered expression of *bantam* and ubiquitin-conjugating enzyme E2 represents the immune response of shrimps to WSSV infection, or the hijacking of cells by WSSV during the viral infection process, needs further study.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; WSSV; *bantam*; Ubiquitin-conjugating enzyme E2; Expression

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171106003

http://www.yykxjz.cn/

曹荣, 余弈珂, 赵玲, 孙慧慧, 刘淇. 南极磷虾(*Euphausia superba*)起捕后蛋白自溶进程及其影响因素. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 114–118

Cao R, Yu YK, Zhao L, Sun HH, Liu Q. Study on the protein autolysis process of Antarctic krill (*Euphausia superba*) and its influencing factors. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 114–118

# 南极磷虾(*Euphausia superba*)起捕后 蛋白自溶进程及其影响因素\*



曹 荣<sup>1,2</sup> 余弈珂<sup>3</sup> 赵 玲<sup>1</sup> 孙慧慧<sup>1</sup> 刘 淇<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室 青岛 266071;

3. 辽渔集团有限公司 大连 116113)

**摘要** 为了有效保持南极磷虾(*Euphausia superba*)原料品质, 实现其高质化利用, 本研究选取冷冻南极磷虾作为研究对象, 在实验室条件下以非蛋白氮(NPN)含量、三氯乙酸(TCA)可溶性蛋白含量与氨基酸态氮含量为指标, 证实了南极磷虾 NPN 含量的变化可以表征蛋白自溶进程, 且可以实现海上处理样品、运至陆地实验室后进行分析的目的。在此基础上, 选取完整的及挤压破损的新鲜南极磷虾作为研究对象, 以 0~8 h 南极磷虾样品的 NPN 为指标, 研究了南极磷虾起捕后蛋白自溶进程以及挤压破损对该过程的影响。结果显示, 南极磷虾起捕死亡后的 1 h 内, NPN 无显著变化 ( $P>0.05$ ), 1 h 后 NPN 迅速增加, 挤压破损加速了南极磷虾的自溶进程, 因此, 目前的拖网作业方式有待改进。

**关键词** 南极磷虾; 蛋白质; 自溶; 非蛋白氮

**中图分类号** TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0114-05

南极磷虾(*Euphausia superba*)广泛分布于环南极大陆架海域(Siegel *et al.*, 2013)。南极磷虾资源量巨大, 已成为世界渔业发达国家竞相开发利用的海洋新资源(陈雪忠等, 2009)。我国于 2009 年开始对南极磷虾进行商业化捕捞和加工, 已初步形成以冻虾、虾粉、虾油等产品类型为主的产业模式(黄洪亮等, 2015)。

南极磷虾体内具有活性极高的自溶酶系(Sjödahl *et al.*, 2002), 捕获死亡后的南极磷虾肌肉蛋白会发生快速降解, 造成原料品质的劣化。因此, 南极磷虾捕获后一般需尽快冷冻或加工处理。南极磷虾的流通运输也需要在低温条件下进行。国内外学者对南极磷虾

冷链流通的多个环节进行了研究, 如冻结(刘会省等, 2013)、冻藏(迟海等, 2012)、解冻(曹荣等, 2015)、冷藏(李学英等, 2010), 但多数研究是以历经长途、长时运输的冷冻磷虾作为实验材料, 研究结果具有一定的局限性。

在南极磷虾作业船上, 往往存在捕捞过于集中、原料量大、加工不及时的情况, 长时间暂存会导致原料品质的劣化, 因此, 有必要对南极磷虾起捕后的品质变化进行研究。但该部分研究需要以鲜活的南极磷虾样品作为实验材料, 而我国目前的南极磷虾作业船尚不具备开展大规模科学实验的条件, 有关南极磷虾

\* 国家科技支撑计划(2013BAD13B03)资助 [This work was supported by National Science and Technology Support Plan Project (2013BAD13B03)]. 曹 荣, E-mail: caorong@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 刘 淇, 研究员, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-11-06, 收修改稿日期: 2017-11-27

起捕后品质变化的研究几乎空白。另外,目前中国的南极磷虾捕捞船均采用拖网的作业方式,会造成大量的原料挤压破损,在何种程度上对原料品质造成影响也尚未可知。

在世界近海渔业资源普遍衰退的背景下,南极磷虾的开发利用具有重要的战略意义,而目前我国在南极磷虾高效利用方面的基础研究还比较薄弱(黄洪亮等, 2015)。尤其是受科考条件的限制,目前,尚没有足够的实验数据阐明南极磷虾起捕后在暂存过程中的品质变化情况。本研究旨在证实南极磷虾中非蛋白氮含量的变化是否可以表征蛋白自溶进程,且可以实现海上处理样品、运至陆地实验室后进行分析的目的,在此基础上研究了南极磷虾起捕后蛋白自溶进程以及挤压破损对该过程的影响。研究结果有助于阐明南极磷虾起捕后的自溶进程,为保持南极磷虾原料品质及其高效利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

南极磷虾冷冻虾块由辽渔集团有限公司提供,系2014年由运输船正常运至国内南极磷虾样品。

鲜活南极磷虾样品,系“南极磷虾资源分布与冷链技术”课题组人员于2015年随辽渔集团“福荣海”号南极磷虾作业船在南极海域现场采集。

### 1.2 样品制备

**1.2.1 实验室条件下样品制备** 块状冻虾样品真空包装,历经3个月左右的冷链运输,运抵实验室后,立即置于自来水流下流水解冻(水温约为12℃),磷虾个体间基本分离为解冻终点。

解冻后的样品置于10℃恒温培养箱(模拟南极磷虾作业船的船舱温度),分别在0、1、2、4、6、8 h取样,将磷虾按照1:10(m/v)比例匀浆。称取匀浆液100 g,加入质量分数为10%的三氯乙酸(TCA)100 ml,震荡2 min,静置15 min,8000 r/min离心20 min,取上清液。

**1.2.2 船上样品制备** 南极磷虾随捕捞船的拖网到达甲板后,立即选取体长为5~6 cm、形态完整的南极磷虾作为组I,另选取体长为5~6 cm、破损(表现为虾体受挤压严重,头胸部部分脱离)的南极磷虾作为组II。

2组样品分别在0、1、2、4、6、8 h取样。将南极磷虾按照1:10(m/v)比例匀浆。称取匀浆液10 g,加入质量分数为10%的TCA溶液10 ml,震荡1 min,静置30 min,快速滤纸过滤。取上清液,置于50 ml

冻存管中,船上-25℃冰柜保存。

### 1.3 指标检测

**1.3.1 非蛋白氮(NPN)含量测定** 取1.2.1制备的上清液10 ml,参照食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定(GB5009.5-2010),采用凯氏定氮法测定其中的氮元素含量,即非蛋白氮。将1.2.1制备的剩余上清液贮存于-20℃冰柜中,分别在30、60、90 d取样,测NPN含量变化。船上制备的样品,随远洋运输船运抵实验室后,继续保存于-80℃超低温冰箱中备用。测定指标时,取出冻存管流水快速解冻,取10 ml上清液,参照GB5009.5-2010,采用凯氏定氮法测定NPN含量。

**1.3.2 TCA可溶性蛋白含量测定** 取1.2.1制备的上清液,采用双缩脲法测定蛋白含量,即为TCA可溶性蛋白含量。

**1.3.3 氨基酸态氮含量测定** 取1.2.1制备的上清液,参照酱油卫生标准的分析方法(GB/T5009.39-2003),采用比色法测定。

### 1.4 数据处理

采用SPSS 17.0软件对数据进行处理,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示,显著性以 $P<0.01$ 为极显著, $P<0.05$ 为显著, $P>0.05$ 为不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷冻南极磷虾原料蛋白自溶过程中相关指标变化

#### 2.1.1 冷冻南极磷虾NPN含量随时间的变化情况

以南极磷虾冷冻虾块作为实验原料,通过凯氏定氮法测得其总氮含量为25.36 mg/g,推算出蛋白质含量为158.50 mg/g。近几年,有关南极磷虾基本化学组成的研究报道较多(Yoshitomi, 2004; 孙雷等, 2008; 刘丽等, 2010; Liu *et al.*, 2012),但数值相差较大,这可能与所选用原料的捕捞海域、季节、年龄以及性成熟等多种因素有关,同时,原料所历经的物流过程对实验数据也可能有较大的影响。

分析蛋白质降解程度可以通过检测大分子蛋白质的减少或是检测降解产物(如肽、氨基酸等)的增加来实现。NPN是指大分子蛋白质以外的含氮化合物的总称,既包含了酰胺类、氨以及铵盐等含氮化合物,也包括了蛋白质降解所产生的小分子肽类和游离氨基酸(Sakaguchi, 2001)。当南极磷虾肌肉组织在蛋白酶系的作用下发生自溶降解时,会产生多肽、寡肽、氨基酸等分子量相对较小的化合物,NPN会相应增加。

实验数据表明,块状冻虾的初始NPN为5.25 mg/g,占总氮的20.70%,这说明历经长时间冷链运输的磷

虾原料,其肌肉蛋白已经有相当比例发生了降解。由图1可知,在实验室10℃条件下,南极磷虾NPN随存放时间的延长迅速增加,在8h内几乎呈线性变化,相关性系数达到0.9891。

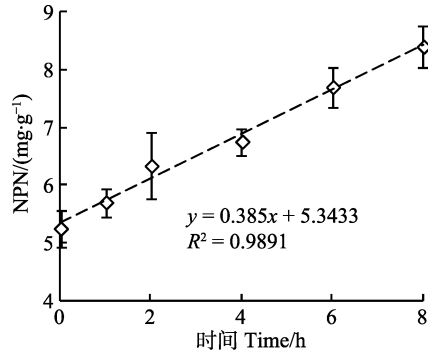


图1 实验室条件下南极磷虾NPN含量随存放时间的变化  
Fig.1 Changes in NPN content of Antarctic krill during storage at 10℃ in the laboratory

所用原料为历经3个月冷链运输的块状冷冻南极磷虾,图2和图3同

The raw materials are frozen Antarctic krill, which had been in transportation in cold chain for 3 months. The same as in Fig.2 and Fig.3

**2.1.2 冷冻南极磷虾TCA可溶性蛋白与氨基酸态氮随时间的变化情况** TCA可以沉淀大分子蛋白质,分子量小于10 kDa的多肽组分则可以溶解在TCA溶液中,因此,TCA可溶性蛋白含量的增加可以表征南极磷虾自溶时蛋白质发生的降解作用。由图2可以看出,TCA可溶性蛋白含量随时间延长迅速增加,8h后,TCA可溶性蛋白已由初始的14.06 mg/g增至38.37 mg/g,这是造成NPN快速增加的主要原因。氨基酸态氮的变化趋势与TCA可溶性蛋白基本一致,但氨基酸态氮的含量较低,初始值为0.056 mg/g,8h后也仅为0.101 mg/g,与TCA可溶性蛋白含量相比显著偏低

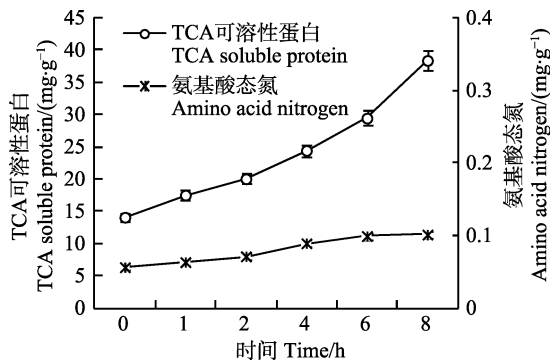


图2 实验室条件下南极磷虾TCA可溶性蛋白与氨基酸态氮随存放时间的变化  
Fig.2 Changes in TCA-soluble protein and amino acid nitrogen of Antarctic krill during storage at 10℃ in the laboratory

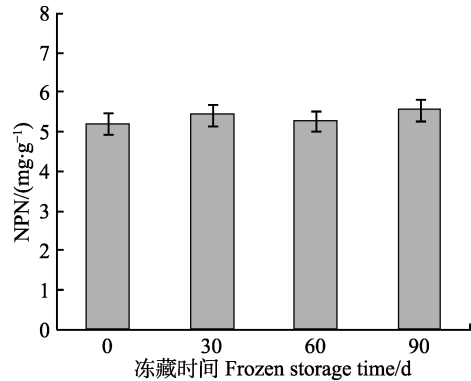


图3 制备的南极磷虾样品在冷冻保存过程中NPN含量的变化  
Fig.3 Changes in NPN content of Antarctic krill during frozen storage in the laboratory

( $P < 0.01$ ),这说明南极磷虾自溶初期主要是大分子蛋白被降解为肽类,而自溶酶系分解蛋白质产生的游离氨基酸非常有限,因此,NPN的组分以TCA可溶性蛋白为主。

**2.1.3 南极磷虾样品在冷冻保存过程中NPN含量的变化情况** 在实验室条件下提取南极磷虾的NPN,样品在-20℃保存,90 d内的变化情况见图3。从图3可以看出,所制备样品的NPN含量在冷冻保存过程中无明显变化,样品冻藏0、30、60、90 d对应的NPN含量之间无显著差异( $P > 0.05$ )。由此,船上制备的NPN样品经冷链运输至实验室后,NPN总量不会在运输途中发生变化。

综上,NPN含量与南极磷虾蛋白自溶密切相关。尽管NPN的组成较为复杂,且有可能在贮存期间发生进一步的降解,但NPN总量稳定,可以表征南极磷虾蛋白自溶进程,且可以实现在船上制备样品、陆基实验室分析的目的。

## 2.2 新鲜南极磷虾自溶过程NPN含量变化以及挤压破损对自溶进程的影响

### 2.2.1 南极磷虾起捕后NPN随存放时间的变化

鲜活南极磷虾的NPN仅为0.81 mg/g,占总氮含量的3.19%,这与块状冻虾的NPN(5.25 mg/g)相比,有极显著差异( $P < 0.01$ )。南极磷虾起捕死亡后,在1 h内NPN无显著变化( $P > 0.05$ )(图4),这与实验室条件下冷冻磷虾原料NPN含量随存放时间迅速增加的现象有所不同(图1)。起捕1 h后,在自溶酶系的作用下,南极磷虾的NPN含量迅速增加,至8 h时达到1.31 mg/g。从品质保持的角度,南极磷虾起捕后应尽快进行冷冻或加工处理。

**2.2.2 挤压破损对南极磷虾自溶进程的影响** 我国目前的南极磷虾捕捞船均采用拖网的作业方式,不

可避免会造成原料的挤压破损。由图 5 可以看出, 挤压破损磷虾原料的 NPN 含量在起捕后最初的 1 h 内与完整态磷虾相比无显著差异( $P>0.05$ ), 但 1 h 后的各个取样点, 破损磷虾的 NPN 含量均显著高于完整磷虾( $P<0.01$ )。Ellingsen 等(1987)研究发现, 造成南极磷虾蛋白降解的酶系主要来源于消化器官, 该酶系包含了类胃蛋白酶、羧肽酶 A 和类胰蛋白酶(杭虞杰等, 2011)。挤压使得南极磷虾消化器官中的蛋白酶在磷虾体内得以扩散, 这可能是加速磷虾自溶的主要原因。从品质保持的角度, 目前的拖网作业方式还有待改进。

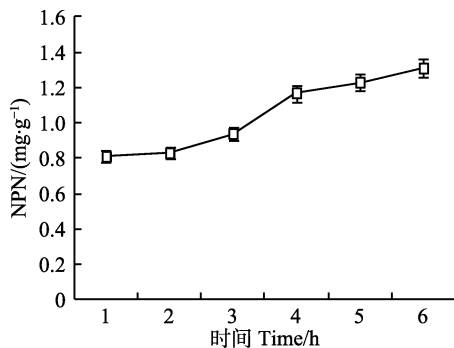


图 4 作业船上南极磷虾起捕后 NPN 含量随存放时间的变化

Fig.4 Changes in NPN content of Antarctic krill after being captured on the fishing vessel

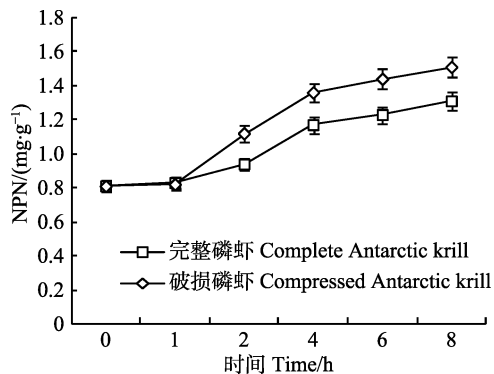


图 5 作业船上挤压破损对南极磷虾 NPN 含量变化的影响  
Fig.5 Effect of compression damage on the NPN content of Antarctic krill on the fishing vessel

### 3 结论

南极磷虾 NPN 含量可以表征其蛋白自溶进程, 实验室条件下存放 8 h 内 NPN 的组分以 TCA 可溶性蛋白为主。所制备样品的 NPN 在 90 d 冷冻保存过程中, 含量无明显变化。由此, NPN 这一指标可以实现船上提取、陆基实验室分析的目标, 适宜用来评定南极磷虾起捕死亡后的品质变化。

块状冻虾的初始 NPN 为 5.25 mg/g, 而鲜活磷虾的 NPN 仅为 0.81 mg/g, 二者存在极显著差异( $P<0.01$ )。南极磷虾起捕死亡后的 1 h 内, NPN 无显著变化, 1 h 后 NPN 迅速增加, 从品质保持的角度, 南极磷虾起捕后应尽快进行冷冻或加工处理。挤压加速了南极磷虾的自溶, 目前的拖网作业方式有待改进。

### 参 考 文 献

- Cao R, Chen Y, Zhao YR, *et al.* Effect of thawing methods on processing quality of Antarctic krill. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(17): 289–294 [曹荣, 陈岩, 赵玉然, 等. 解冻方式对南极磷虾加工品质的影响. 农业工程学报, 2015, 31(17): 289–294]
- Chen XZ, Xu ZL, Huang HL. Development strategy on Antarctic krill resource utilization in China. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 451–458 [陈雪忠, 徐兆礼, 黄洪亮. 南极磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析. 中国水产科学, 2009, 16(3): 451–458]
- Chi H, Li XY, Yang XS, *et al.* Analysis of quality changes and shelf-life of Antarctic krill (*Euphausia superba*) at frozen temperature. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 153–160 [迟海, 李学英, 杨宪时, 等. 南极磷虾冻藏温度下的品质变化及其货架期分析. 水产学报, 2012, 36(1): 153–160]
- Ellingsen TE, Mohr V. Biochemistry of the autolytic processes in Antarctic krill post mortem. Autoproteolysis. Biochemical Journal, 1987, 246(2): 295–305
- Hang YJ, Li XY, Yang XS, *et al.* Properties of autolysis enzymes from Antarctic krill. Food Science, 2011, 32(13): 198–200 [杭虞杰, 李学英, 杨宪时, 等. 南极磷虾自溶酶性质的初步研究. 食品科学, 2011, 32(13): 198–200]
- Huang HL, Chen XZ, Liu J, *et al.* Analysis of the status and trend of the Antarctic krill fishery. Chinese Journal of Polar Research, 2015(1): 25–30 [黄洪亮, 陈雪忠, 刘健, 等. 南极磷虾渔业近况与趋势分析. 极地研究, 2015(1): 25–30]
- Li XY, Chi H, Yang XS, *et al.* Quality change of Antarctic krill during chilling storage. Food Science, 2010, 31(20): 464–468 [李学英, 迟海, 杨宪时, 等. 南极磷虾冷藏过程中的品质变化. 食品科学, 2010, 31(20): 464–468]
- Liu HX, Hai C, Yang XS, *et al.* Effects of freezing methods on the quality of Antarctic krill (*Euphausia superba*). Modern Food Science & Technology, 2013, 29(7): 1601–1605 [刘会省, 迟海, 杨宪时, 等. 冻结方式对南极磷虾品质的影响. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1601–1605]
- Liu L, Liu CC, Li JL. Comparison of biochemical composition and nutritional value of Antarctic krill (*Euphausia superba*) with several species of shrimps. Advanced Materials Research, 2012, 361–363: 799–803
- Liu L, Liu CC, Zhao Y, *et al.* Recent advances in the healthcare function and food safety of Antarctic krill. Food Science,



- 2010, 31(17): 443–447 [刘丽, 刘承初, 赵勇, 等. 南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价. 食品科学, 2010, 31(17): 443–447]
- Sakaguchi M. Nitrogenous low-molecular-weight components and palatability of fish and shellfish. *Nihon-Suisan-Gakkai-Shi*, 2001, 67(5): 787–793
- Siegel V, Reiss CS, Dietrich KS, *et al.* Distribution and abundance of Antarctic krill (*Euphausia superba*) along the Antarctic Peninsula. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2013, 77(4): 63–74
- Sjödahl J, Åsa Emmer, Vincent J, *et al.* Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Protein Expression & Purification*, 2002, 26(1): 153–161
- Sun L, Zhou DQ, Sheng XF. Nutrition and safety evaluation of Antarctic krill. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 57–64 [孙雷, 周德庆, 盛晓风. 南极磷虾营养评价与安全性研究. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 57–64]
- Yoshitomi B. Utilization of Antarctic krill for food and feed. *Developments in Food Science*, 2004, 42(4): 45–54
- Yu SY, Bao JQ, Li YH, *et al.* Quality changes of Antarctic krill (*Euphausia superba*) stored at different frozen temperatures. *Food & Fermentation Industries*, 2014, 40(1): 232–237 [俞所银, 包建强, 李越华, 等. 南极磷虾在不同冻藏温度下品质变化. 食品与发酵工业, 2014, 40(1): 232–237]

(编辑 冯小花)

## Study on the Protein Autolysis Process of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Its Influencing Factors

CAO Rong<sup>1,2</sup>, YU Yike<sup>3</sup>, ZHAO Ling<sup>1</sup>, SUN Huihui<sup>1</sup>, LIU Qi<sup>1①</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Liaoyu Group Co. Ltd, Dalian 116113)

**Abstract** The aim of this study was to elucidate protein autolysis in Antarctic krill (*Euphausia superba*) after capture on fishing vessels and the maintenance of product quality. Under laboratory conditions, frozen Antarctic krill was used to verify the correlation between non-protein nitrogen (NPN) content and the degree of protein autolysis. The stability of NPN content during 90-days storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  was also examined. Fresh Antarctic krill, complete in form or broken because of compression during trawling of the Antarctic krill fishing vessel were selected. The NPN content of Antarctic krill samples at different storage times were measured. The results showed that the NPN content of Antarctic krill had a good correlation with protein autolysis, and there were no significant changes in the NPN content during the 90-day of storage. Therefore, NPN was suitable for evaluating changes in the quality of Antarctic krill after capture. There was no significant change in NPN content during the first hour after the death of the captured Antarctic krill. However, the NPN content increased rapidly afterwards. Antarctic krill should be frozen or processed as soon as possible after capture. Compression during trawling damaged Antarctic krill and accelerated protein autolysis. Thus, the method of trawling used during Antarctic krill fishing requires improvement.

**Key words** *Euphausia superba*; Protein; Autolysis; Non-protein nitrogen

① Corresponding author: LIU Qi, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171010002

http://www.yykxjz.cn/

赵玉超, 李玉全, 孙振鹏, 王淑生, 付瑞江, 张绍龙. 盐化幅度、速度及方式对凡纳滨对虾仔虾生长和存活率的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 119-125

Zhao YC, Li YQ, Sun ZP, Wang SS, Fu RJ, Zhang SL. Effects of high-salinity domestication gradient, speed, and mode on weight gain, activity, and survival rate of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 119-125

## 盐化幅度、速度及方式对凡纳滨对虾仔虾 生长和存活率的影响\*



赵玉超<sup>1</sup> 李玉全<sup>1①</sup> 孙振鹏<sup>1</sup> 王淑生<sup>2</sup> 付瑞江<sup>3</sup> 张绍龙<sup>3</sup>

(1. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 青岛 266109; 2. 滨州市渔业技术推广站 滨州 256616;  
3. 滨州市北海新区海缘养殖科技有限公司 滨州 251907)

**摘要** 本研究测定了盐化幅度(3/d、6/d、9/d、12/d 和 15/d)、盐化速度(1、3、6、12 和 18 h/次)和盐化方式(前期盐化、中期盐化、后期盐化和间隔盐化)与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)仔虾生长发育、活力和存活率的关系。研究结果显示,不同盐化幅度、盐化速度和盐化方式均显著影响盐化标粗过程中仔虾的生长发育、活力和存活率( $P<0.05$ )。综合考虑生长性能、苗种活力和存活率等因素,最适盐化幅度为 3~6/d,在该盐化幅度范围内,仔虾存活率可达 74.07%~78.83%;盐化幅度超过 9/d 时,仔虾存活率显著下降( $P<0.05$ ),其中,盐化幅度达到 15/d 时,存活率仅为 43.37%。过快的盐化速度导致存活率和活力显著下降,盐化速度>1 h/次时,仔虾死亡率接近 50%;随着盐化速度的放缓,仔虾生长速度加快,盐化速度为 6~18 h/次时,生长速度维持稳定,日增重量为 1.48~1.51 mg。在盐化方式方面,后期盐化和间隔盐化时,苗种的质量和存活率优于前期盐化和中期盐化,仔虾活力表现为间隔盐化>后期盐化>中期盐化>前期盐化。综合考虑,仔虾的最适盐化幅度为 3~6/d,最佳盐化速度为 6~12 h/次,后期盐化和间隔盐化更有助于仔虾保持较好活力和较高存活率。本研究通过探讨凡纳滨对虾苗种盐化标粗的最适盐化幅度、盐化速度和盐化方式,丰富了凡纳滨对虾高盐环境抗逆性研究,为凡纳滨对虾苗种的盐化标粗生产实践提供了理论支持。

**关键词** 凡纳滨对虾; 盐化; 生长性能; 存活率

**中图分类号** S966.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0119-07

盐度是影响水生动物繁殖、生长、发育和存活等的重要环境因子,一直是水产养殖学和逆境生物学研究的热点(申玉春等, 2012; 付萍等, 2017; 李娜等, 2018)。在不同盐度环境条件下养殖的水产品,其肉质和口感存在明显差异(王士稳等, 2006; 梁萌青等,

2009; 戴习林等, 2012),以高盐水体养殖产品品质最佳。中国沿海或西北地区存在大量的高盐水体,山东沿海盐度为 30~70 的养殖池塘面积约有 13.3 万  $\text{hm}^2$ ,如何有效开发利用这些高盐水域,是关乎当地民生的重要问题。高盐对虾的养殖是有效途径之一。高盐对

\* 国家自然科学基金项目(31101916)、山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队(SDAIT-15-011)和山东省一流学科建设项目共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31101916), Shandong Modern Agricultural Technology System of Shrimp and Crab Innovation Team (SDAIT-15-011), and First Class Discipline Construction Projects of Shandong]. 赵玉超, E-mail: yuchaoqau@163.com

① 通讯作者: 李玉全, 教授, E-mail: jiangfangqian@163.com

收稿日期: 2017-10-10, 收修改稿日期: 2017-12-06

虾的养殖和推广,可以解决高盐水体目前存在的诸如闲置、养殖物种匮乏、资源利用率低、经济效益差等问题,对于改善当地人民的养殖结构,促进创业就业,提高经济效益和生活水平具有重要意义。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾,属广盐性虾类,耐受盐度为 0.5~78(陈永乐等, 2003),具有生长速度快、抗病力强、适高密度养殖等特点,是中国目前养殖规模和产量最大的对虾品种。凡纳滨对虾的生活史主要包括受精卵、胚胎发育、无节幼体、蚤状幼体、糠虾、仔虾、幼虾和成虾 8 个阶段。各发育阶段对盐度的要求不同,仔虾期是对虾生活史中最佳的盐度调节时期,可实现盐度驯化,以便于苗种的投放,一般称此操作为“标粗”。根据最终驯化盐度的不同又分为“淡化标粗”和“盐化标粗”(李春玲等, 2009)。近年来,随着国内外对虾价格走高和新品种、新技术的推广应用,对虾养殖不再局限于传统的海水养殖,淡水养殖和高盐水域养殖逐步成为对虾养殖产量提升、特色品牌打造的重点。当前,在高盐水域凡纳滨对虾苗种的投放和养殖过程中,普遍存在苗种体质较弱、成活率较低等问题。如何提高高盐水体苗种的成活率和保障其活力成为高产的关键,因此,确立最佳的盐化幅度、盐化速度和盐化方式是亟待解决的问题。目前,国内外对凡纳滨对虾仔虾的淡化标粗和淡水养殖研究较多(唐建洲等, 2016; 边绍新等, 2014; 郝登春等, 2018)。然而,关于盐化标粗的研究较少,对其仔虾高盐驯化的梯度、速度和时间的相关研究尚未见报道。

本研究以凡纳滨对虾仔虾为研究对象,通过设置不同的盐化梯度、盐化速度和盐化方式,分析仔虾的生长性能、活力和存活率,探讨高盐苗种盐化标粗的最适盐化幅度、盐化速度和盐化方式,旨在丰富凡纳滨对虾高盐逆境生物学研究,为盐化标粗生产实践提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验地点与材料

于 2017 年 4~6 月在滨州市北海新区海缘养殖科技有限公司和青岛农业大学海洋科学与工程学院开放实验室进行仔虾盐化实验,实验用凡纳滨对虾仔虾取自公司的育苗车间,选用规格整齐、健康活泼、不携带病原菌的同批次同家系 P4 期个体。体长为(0.515±0.022) cm,体重为(1.3±0.3) mg。实验用海水经过滤、杀菌、曝气处理,高盐海水由海水晶溶解于普通海水再经过滤调配获得,使用前曝气处理 1 d。实验温度维持在(31.0±0.5)℃,pH 为 8.0~8.5,光照周

期为 14L : 10D,连续充氧,溶解氧保持在 5 mg/L 以上。高盐驯化全程投喂大卤虫(*Artemia salina*)和仔虾专用配合饲料(粗蛋白 46%,粗脂肪 10.6%,粗纤维 1.8%,粗灰分 13%,赖氨酸 2.3%,水分 5%),每天投喂 5 次(07:00、11:00、15:00、19:00、23:00),大卤虫交替投喂,全程饱食投喂(投喂配合饵料每次 3.2~5.0 g/m<sup>3</sup>,每尾仔虾投喂大卤虫 5~30 只/d,具体投喂量根据幼体实际摄食情况和存活率及时调整),投喂结束 1 h 后,清除残饵和粪便。每 3 d 换水 1 次,换水量为总量的 1/3。

### 1.2 实验设计

**1.2.1 高盐驯化幅度实验** 实验在 100 L 白色塑料桶中进行,设置 3/d、6/d、9/d、12/d 和 15/d 5 个盐化梯度,每个梯度设 3 个平行,共 15 个处理,每个处理放养规格整齐的 P4 期仔虾 1000 尾。整个盐化过程需由盐度 30 提升至 60,历时 13 d,盐化速度为 6 h/次。整个盐化过程采取间隔盐化方式,其中,3/d 处理的盐度变化为 30→33→36→39→42→46→49→51→54→57→60;6/d 处理的盐度变化为 30→36→42→48→54→60;9/d 处理的盐度变化为 30→39→48→57→60;12/d 处理的盐度变化为 30→36→48→60;15/d 处理的盐度变化为 30→45→60。

**1.2.2 高盐驯化速度实验** 实验在 35 cm×25 cm×20 cm 白色塑料箱中进行,设置 1、3、6、12、18 h/次 5 个盐化速度梯度,每个梯度设 3 个平行,共 15 个处理,每个处理放养规格整齐的 P4 期仔虾 200 尾。通过向原水体中加注等量高盐海水的方法,养殖水体盐度由 30 提升至 60,注水速度变化通过调节换水阀门流量完成。整个盐化标粗时间为 13 d,盐化幅度为 6/d,整个盐化过程采取间隔盐化方式。

**1.2.3 盐化方式实验** 实验在 35 cm×25 cm×20 cm 白色塑料箱中进行,养殖水体盐度由 30 提升至 60,历时 15 d。将 15 d 苗种标粗时间均分为 3 个阶段,每阶段 5 d,分别标注为前期(第 1~5 天)、中期(第 6~10 天)、后期(第 11~15 天)。实验将盐化时间分别集中于仔虾标粗的 3 个阶段中,进行连续 5 d 的盐化操作,分别标注为前期盐化方式、中期盐化方式、后期盐化方式。此外设置间隔盐化方式,即分别于 2、5、8、11 和 14 d 时盐化 1 次,直至水体盐度提升至 60。每次盐化幅度为 6/d,盐化速度为 12 h/次。每种盐化方式均设 3 个平行,共 15 个处理,每个处理放养规格整齐的 P4 期仔虾 200 尾。

**1.2.4 仔虾活力判定标准** 健康苗种应满足大小均匀整齐、体色透明、体表干净、肢体完整,对外界

刺激反应灵敏, 肠胃充实饱满等条件。而在仔虾活力判定方面, 主要通过以下 2 种方法进行判别。

方法 1: 取 50 尾仔虾, 放入盛有育苗池水的白色塑料盆中, 用手顺时针或逆时针转动盆内水体, 使水体形成漩涡, 使仔虾苗集中于盆中央, 待水流稍缓时, 能够迅速散开并逆水游动的仔虾为活力强的健康苗种; 能够迅速散开, 仅少部分仔虾逆水游动为活力较强的仔虾; 待漩涡水流速度趋向于静止时, 仔虾才从漩涡中挣脱出来, 此类仔虾活力可定为活力较弱。

方法 2: 取 100 尾仔虾, 放置于湿毛巾中小心包裹, 静置 10 min, 放回原观察杯中, 存活率 > 80%, 可判定为优质健康、活力强的苗种; 存活率为 30%~80%, 为活力较强的苗种; 苗种死亡率较高, 存活率 < 30%, 则判定为活力较弱苗种。

### 1.3 数据测定和记录

所有实验均于开始前测定每组 15 尾仔虾的体长和体重, 实验结束后, 再次测定每组仔虾的体长和体重, 计算盐化标粗的存活率, 并对照仔虾活力评定标准, 测定苗种活力状况。

### 1.4 数据统计与处理

实验数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 利用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)以及 Duncan 多重比较检验数据差异的显著性, 以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐化幅度对凡纳滨对虾仔虾生长发育和存活率的影响

从表 1 可以看出, 随着盐化幅度的增加, 仔虾的体重增加量呈先增加后降低的趋势, 盐化幅度为 9/d 时, 增重量达到最高值。盐化幅度为 6/d 和 9/d 两处理间增重量差异不显著( $P > 0.05$ ); 盐化幅度为 15/d 时, 仔虾增重量最低, 生长速度最慢, 与其他各处理间均差异显著( $P < 0.05$ ); 盐化幅度为 3/d 时, 仔虾生长速度较慢, 与盐化幅度为 6/d 处理间差异显著( $P < 0.05$ ), 但与盐化幅度为 12/d 处理间差异不显著( $P > 0.05$ ), 盐化幅度为 6/d 处理的增重量比 3/d 时提高了 8.52%。

表 1 盐化幅度对凡纳滨对虾仔虾增重量和活力的影响

Tab.1 Effects of salinity domestication gradient on the weight gain and activity of *L. vannamei* post larvae

项目 Items	盐化幅度 Salinity domestication gradient				
	3/d	6/d	9/d	12/d	15/d
增重量 Weight gain (mg)	17.6±0.2 <sup>b</sup>	19.1±0.6 <sup>c</sup>	19.4±0.4 <sup>c</sup>	17.2±0.7 <sup>b</sup>	15.2±0.4 <sup>a</sup>
仔虾活力 Postlarvae activity	强 Strong	强 Strong	较强 Medium	弱 Weak	弱 Weak

注: 不同处理组间标注相同字母代表差异不显著( $P > 0.05$ ), 不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Note: Values in different groups with the same letters showed no significant differences ( $P > 0.05$ ), different letters indicated significant different ( $P < 0.05$ ). The same as below

此外, 由图 1 可知, 随着盐化幅度的升高, 仔虾存活率也表现出先升高后下降的趋势。从最终存活率来看, 盐化幅度为 6/d 处理组最高, 达 78.8%。盐化幅度为 3/d 和 6/d 处理间存活率差异不显著( $P > 0.05$ )。盐化幅度 > 6/d 时, 存活率呈降低趋势, 盐化幅度为 6/d 和 9/d 处理间存活率差异不显著( $P > 0.05$ ), 但盐化幅度为 6/d 和 12/d 处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

在苗种活力方面, 盐化幅度为 3/d 和 6/d 时, 仔虾活力强, 但盐化幅度为 3/d 处理的仔虾幼体因每天都需要进行盐度驯化, 应激表现明显, 部分个体摄食较差, 出现红体症状; 盐化幅度为 6/d 时, 仔虾表现良好。随着盐化幅度的升高, 仔虾活力明显下降。盐化幅度为 9/d 时, 首次盐化后, 仔虾个体活力强, 之后活力迅速减弱; 盐化幅度为 12/d 和 15/d 处理组, 与 9/d 处理组变化趋势相似, 首次盐度调整后, 仔虾

表现出对高盐环境和盐度变化具有良好的适应力, 当盐度 > 50 时, 仔虾活力明显下降, 死亡率逐步升高。

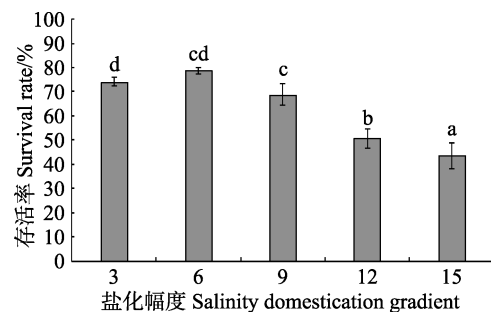


图 1 盐化幅度对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响

Fig.1 Effects of salinity domestication gradient on the survival rate of *L. vannamei* post larvae  
不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同  
Different letters indicated significant different ( $P < 0.05$ ).  
The same as below

## 2.2 盐化速度对凡纳滨对虾仔虾生长发育和存活率的影响

如表2所示,不同盐化速度对凡纳滨对虾仔虾的增重率影响显著,随着盐化速度的升高,仔虾体重增加表现出先升高后维持稳定的趋势。盐化速度对仔虾生长速度影响显著,盐化速度为1 h/次和3 h/次与其他处理间均差异显著( $P<0.05$ )。其中,盐化速度为1 h/次对仔虾生长影响最为显著,且与其他处理间的增重率差异均显著( $P<0.05$ ),在此盐化速度下,仔虾

增重量为16.7 mg,日均增重量为1.28 mg。盐化速度为3 h/次和6 h/次处理间仔虾的生长速度差异显著( $P<0.05$ )。盐化速度 $>6$  h/次时,盐化速度对仔虾生长速度无显著影响( $P>0.05$ ),日增重量为1.48~1.51 mg。

在最终存活率方面,盐化速度为12 h/次处理的成活率最高,达到81.7%,1 h/次处理的成活率最低,为51.8%。各盐化速度下,仔虾存活率呈先升高后降低的趋势,成活率由高到低依次为12 h/次 $>18$  h/次 $>6$  h/次 $>3$  h/次 $>1$  h/次(图2)。

表2 盐化速度对凡纳滨对虾仔虾增重量和活力的影响

Tab.2 Effects of salinity domestication speed on the weight gain and activity of *L. vannamei* postlarvae

项目 Items	盐化速度 Salinity domestication speed (h/次)				
	1	3	6	12	18
增重量 Weight gain (mg)	16.7±0.4 <sup>a</sup>	18.2±0.7 <sup>b</sup>	19.4±0.5 <sup>c</sup>	19.3±0.2 <sup>c</sup>	19.6±0.9 <sup>c</sup>
仔虾活力 Postlarvae activity	较强 Medium	较强 Medium	强 Strong	强 Strong	强 Strong

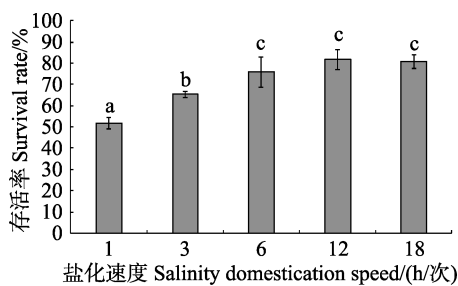


图2 盐化速度对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响  
Fig.2 Effects of salinity domestication speed on the survival rate of *L. vannamei* postlarvae

在仔虾活力方面,盐化速度越快,仔虾应激表现越明显,摄食量下降,出现红体、空肠空胃等症状。盐化后期,仔虾因活力降低,死亡率逐步升高。盐化速度 $>6$  h/次,仔虾应激表现有所缓解,2次盐化间隔期应急反应缓解,活力正常。

## 2.3 盐化方式对凡纳滨对虾仔虾生长发育和存活率的影响

从表3可以看出,盐化方式对仔虾生长有显著影响。前期盐化(第1~5天)中的仔虾生长速度显著慢于

中期盐化(第6~10天)、后期盐化(第11~15天)和间隔盐化( $P<0.05$ )。相较于其他几种盐化方式,前期盐化会在实验前期较短的时间内完成仔虾的整个盐化过程,在剩余的实验时间内,仔虾将长时间处于较高的高盐胁迫状态,需要更多的能量来进行自身渗透压调节,生长速度缓慢;而对于中期盐化方式,仔虾在标粗前期未进行盐度调整,仔虾发育较快,完成盐化操作后,仔虾体重的增长量较前期盐化显著提高( $P<0.05$ ),体重增加了33.07%;对于后期盐化方式,仔虾体重在前期、中期得到迅速的增长,在增重量方面要高于前期盐化和中期盐化2种方式;间隔盐化,仔虾的生长速度与后期驯化相似,两处理间的增重量差异不显著( $P>0.05$ )。

在存活率方面,随着盐化时间的后延,仔虾存活率升高。在前期或中期进行盐化,由于仔虾个体较小,对盐度突变的耐受能力较差,生长发育较慢,存活率显著低于后期盐化和间隔盐化( $P<0.05$ );通过后盐化和间隔盐化,仔虾存活率分别达到70.5%和77.0%,是前期盐化方式下仔虾存活率的2.04倍和2.23倍。

在仔虾活力方面,受盐化和仔虾发育阶段的影

表3 盐化方式对凡纳滨对虾仔虾增重量和活力的影响

Tab.3 Effects of salinity domestication mode on the weight gain and activity of *L. vannamei* postlarvae

项目 Items	盐化方式 Salinity domestication mode			
	前期盐化 Early salinization	中期盐化 Medium-term salinization	后期盐化 Later salinization	间隔盐化 Interval salinization
增重量 Weight gain (mg)	12.7±1.2 <sup>a</sup>	16.9±0.5 <sup>b</sup>	19.9±0.7 <sup>c</sup>	20.5±0.3 <sup>c</sup>
仔虾活力 Postlarvae activity	弱 Weak	较强 Medium	较强 Medium	强 Strong

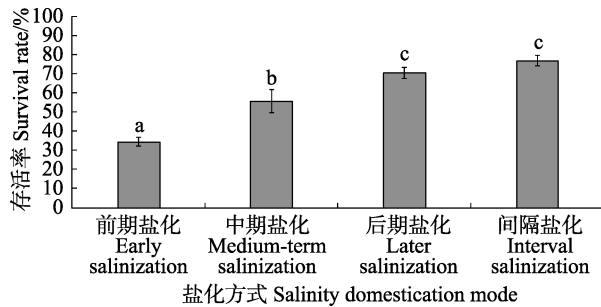


图 3 盐化方式对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响  
Fig.3 Effects of salinity domestication mode on the survival rate of *L. vannamei* postlarvae

响, 仔虾活力表现为间隔盐化>后期盐化>中期盐化>前期盐化。仔虾盐化时间与仔虾活力和仔虾的存活率存在正相关关系, 随着盐化时间的延后或间隔, 仔虾活力逐步增强, 存活率也逐步升高。为达到较高的驯化盐度和较好的仔虾活力, 可采取间隔盐化方式。

### 3 讨论

盐度是影响对虾生长、存活的重要因素。仔虾阶段是凡纳滨对虾盐度调整的最佳时期, 通常由 P3~P5 期仔虾, 经过 13~15 d 完成盐度驯化和短期苗种标粗操作, 使之适应不同养殖环境, 增加苗种放养后的成活率。本研究结果显示, 从生长速度来看, 凡纳滨对虾仔虾最适盐化幅度为 6/d 和 9/d; 从存活率来看, 最适盐化幅度为 3/d 和 6/d; 综合考虑生长速度和存活率两方面因素, 仔虾最适盐化幅度为 6/d。盐化幅度>6/d 时, 随着盐化幅度的升高, 仔虾存活率显著下降。Saoud 等(2003)认为, 外界环境发生改变, 处于非等渗环境时, 仔虾会根据环境盐度做出应激反应。对虾也会依靠机体调控血淋巴渗透压来实现调节过程, 以维持虾体内环境的稳定。作者认为, 当盐化幅度过高时, 可能由于仔虾机体调控血淋巴渗透压能力有限, 加之摄食不足导致的机体能量的不足, 会加剧肝胰脏和免疫系统的负担, 随着养殖时间的延长, 仔虾生长速度减慢、死亡率升高。

由于生产需要和天气变化等原因, 盐度突变普遍存在于整个对虾养殖周期。在适宜的突变盐度范围内, 对虾可通过调节自身渗透压和提升免疫机能来适应。王良臣等(1991)认为, 虾苗对盐度突变适应范围小, 对渐变适应范围较宽。廖永岩等(2004)通过对凡纳滨对虾仔虾淡化幅度和速度的研究发现, 淡化速度快慢不仅影响凡纳滨对虾仔虾的生长性能和抗病力, 也影响仔虾的存活率, 较快的盐化速度限制仔虾的生长, 死亡率显著升高。李俊峰(2009)认为, 淡化速度过快的虾苗体质均较弱, 养成过程中容易感染疾病,

并在一定程度上影响生长速度。本研究表明, 盐化速度显著影响仔虾的生长发育, 较快的驯化速度显著降低了仔虾活力, 导致死亡率升高。这与廖永岩等(2004)对仔虾淡化的研究结果相似。因此, 仔虾高盐驯化不能急于求成, 应循序渐进, 严格控制驯化速度是仔虾驯化标粗成功的关键, 盐化时间间隔超过 6 h 更加有利于仔虾的盐化。臧维玲等(2003)研究也获得了相似的结果, 认为适于规模化生产的淡化速度为 6 h/次。

凡纳滨对虾的等渗点在盐度 25 左右(陈垂坤等, 2015), 当盐度超过或低于等渗点时, 对虾会主动调节渗透压(李英等, 2010; Chen *et al.*, 1996)。外界盐度与等渗点的差值越大, 对虾通过补偿机制来补偿调节渗透压的能耗就越多(吴立峰等, 2011; 钱佳慧等, 2015), 长时间的高盐胁迫会显著抑制对虾的生长速度, 使死亡率升高。Bray 等(1994)研究认为, 凡纳滨对虾幼体最适生长盐度为 25, 在低盐度环境条件下对虾生长较快, 而在高盐度水体中其生长则会受抑制。通过研究盐化标粗生产过程中仔虾在不同盐化方式下的生长和存活情况, 发现仔虾在生长速度和存活率方面, 前期盐化和中期盐化均显著低于后期盐化和间隔盐化, 产生此结果的原因可能在于前期盐化或中期盐化时, 因仔虾个体较小, 对高盐突变的适应能力弱; 此外, 前期盐化也会延长仔虾在较高盐度下的胁迫时间, 进而导致存活率、生长性能和活力下降; 而在间隔盐化方式中, 仔虾通过一定的时间间隔不断地调节自身生理机能, 以适应外界盐度的提高。由此可见, 仔虾盐化标粗过程中适宜的时间间隔有助于提高盐化效果。

### 参 考 文 献

- Ban SX, Ma YC, Zhang L, *et al.* The key points of desalting and rearing for *Penaeus vannamei*. Hebei Fisheries, 2014(10): 31-32 [边绍新, 马云聪, 张玲, 等. 南美白对虾淡化标粗技术要点. 河北渔业, 2014(10): 31-32]
- Bray WA, Lawrence AL, Leung-Turjillo JR. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, 1994, 122: 133-146
- Chen CK, Gao WH. Research progress on effects of salinity and nutrients on crustacean nutrition physiology. *Journal of Yangtze University(Natural Science Edition)*, 2015, 12(3): 47-51 [陈垂坤, 郜卫华. 盐度和营养对甲壳动物营养生理的影响研究进展. 长江大学学报(自然科学版), 2015, 12(3): 47-51]
- Chen JC, Lin JN, Chen CT, *et al.* Survival, growth and intermolt period of juvenile *Penaeus chinensis* (Osbeck) reared at different combinations of salinity and temperature. *Journal*



- of Experimental Marine Biology & Ecology, 1996, 204(1): 169-178
- Chen YL, Zhang LS, Zhu XP, *et al.* Biology of *Litopenaeus vannamei* and its culture technology. Freshwater Fisheries, 2003, 33(1):54-55 [陈永乐, 张亮森, 朱新平, 等. 南美白对虾的生物学及其养殖技术要素. 淡水渔业, 2003, 33(1): 54-55]
- Dai XL, Zhang LT, Zang WL, *et al.* Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and salinity on survival, growth and shrimp taste of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 914-921 [戴习林, 张立田, 臧维玲, 等.  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、盐度对凡纳滨对虾存活、生长及风味的影响. 水产学报, 2012, 36(6): 914-921]
- Fu P, Lv JJ, Liu P, *et al.* Effects of different salinity level on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(3): 374-381 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中游离氨基酸含量的影响. 水产学报, 2017, 41(3): 374-381]
- Hao DC, Luan S, Cao BX, *et al.* Genetic parameters of survival of juvenile families of *Litopenaeus vannamei* during desalination and culture stages. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 90-96 [郝登春, 栾生, 曹宝祥, 等. 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 90-96]
- Li CL, Wang JS, Pei XY, *et al.* Techniques for seed salting of *Penaeus vannamei*. Shandong Fisheries, 2009, 26(5): 32-33 [李春玲, 王继苏, 裴秀艳, 等. 南美白对虾苗种盐化技术. 齐鲁渔业, 2009, 26(5): 32-33]
- Li JF. Study on the desalting form and aquaculture technology of *Penaeus vannamei*. Master's Thesis of Soochow University, 2009 [李俊峰. 南美白对虾的淡化及养成技术的研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Li N, Zhao YC, Wang RJ, *et al.* Effects of high salinity on digestive and immunity-related enzymes in *Litopenaeus vannamei*. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(4): 1411-1417 [李娜, 赵玉超, 王仁杰, 等. 高盐胁迫对凡纳滨对虾消化及免疫相关酶活力的影响. 生态学报, 2018, 38(4): 1411-1417]
- Li Y, Wang F, Dong SL, *et al.* Effects of salinity fluctuation on the molt and respiratory metabolism of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(7): 47-52 [李英, 王芳, 董双林, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾稚虾蜕皮和呼吸代谢的影响. 中国海洋大学学报, 2010, 40(7): 47-52]
- Liang MQ, Wang SW, Wang JL, *et al.* Effects of different salinities on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(2): 34-39 [梁萌青, 王士稳, 王家林, 等. 不同盐度对凡纳滨对虾血淋巴及肌肉游离氨基酸组成的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 34-39]
- Liao YY, Zhong DH. Effect of speed and range of desalination on survival and vigor of the larvae of *Penaeus vannamei*. Marine Science Bulletin, 2004, 23(1): 58-63 [廖永岩, 钟导宏. 淡化速度和幅度对凡纳对虾幼体存活和活力的影响. 海洋通报, 2004, 23(1): 58-63]
- Qian JH, Li ZM, Ye N, *et al.* Combined effects of temperature and salinity on the growth and survival of *Fenneropenaeus meiguensis*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 62-67 [钱佳慧, 栗志民, 叶宁, 等. 温度和盐度对墨吉明对虾(*Fenneropenaeus meiguensis*)生长与存活的联合效应. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 62-67]
- Saoud IP, Davis DA, Rouse DB. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. Aquaculture, 2003, 217(1-4): 373-383
- Shen YC, Chen ZZ, Liu L, *et al.* The effects of salinity and nutrition on molt and growth of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 290-299 [申玉春, 陈作洲, 刘丽, 等. 盐度和营养对凡纳滨对虾蜕壳和生长的影响. 水产学报, 2012, 36(2): 290-299]
- Tang JZ, Liu Z, Wang XL, *et al.* Effects of desalination on survival rate, osmolality and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of *Penaeus vannamei*. Freshwater Fisheries, 2016, 46(3): 82-86 [唐建洲, 刘臻, 汪星磊, 等. 淡化对南美白对虾存活率、渗透压和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响. 淡水渔业, 2016, 46(3): 82-86]
- Wang LC, Liu XY. Shrimp aquaculture. Tianjin: Nankai University Press, 1991, 34-36 [王良臣, 刘修业. 对虾养殖. 天津: 南开大学出版社, 1991, 34-36]
- Wang SW, Liang MQ, Lin H, *et al.* The comparison of sensory components between maricultured and freshwater cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Marine Fisheries Research, 2006, 27(5): 79-84 [王士稳, 梁萌青, 林洪, 等. 海水和淡水养殖凡纳滨对虾呈味物质的比较分析. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 79-84]
- Wu LF, Zhang LP, Hu CQ, *et al.* Comparison on growth rates of two full-sib families of *Litopenaeus vannamei* in different salinities. Journal of Tropical Oceanography, 2011, 30(1): 152-158 [吴立峰, 张吕平, 胡超群, 等. 2 个凡纳滨对虾全同胞家系在不同盐度下的生长比较. 热带海洋学报, 2011, 30(1): 152-158]
- Zang WL, Lin XC, Dai XL, *et al.* Effects of desalination method and salinity on survival rate and growth of *Penaeus vannamei* juvenile. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(4): 308-312 [臧维玲, 林喜臣, 戴习林, 等. 淡化方式与盐度对凡纳对虾幼虾生长的影响. 上海水产大学学报, 2003, 12(4): 308-312]

## Effects of High-Salinity Domestication Gradient, Speed, and Mode on Weight Gain, Activity, and Survival Rate of *Litopenaeus vannamei* Postlarvae

ZHAO Yuchao<sup>1</sup>, LI Yuquan<sup>1</sup>①, SUN Zhenpeng<sup>1</sup>, WANG Shusheng<sup>2</sup>, FU Ruijiang<sup>3</sup>, ZHANG Shaolong<sup>3</sup>

(1. Marine Science and Engineering College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109;

2. Binzhou Fisheries Technology Extension Station, Binzhou 256616;

3. Beihai New District of Binzhou Haiyuan Aquaculture Technology Co. Ltd, Binzhou 251907)

**Abstract** To investigate the optimum high-salinity domestication gradient, speed, and mode of *Litopenaeus vannamei* postlarvae, a salinization experiment was designed. Salinity increased from 30 to 60. Different high-salinity domestication gradients (3/d, 6/d, 9/d, 12/d, and 15/d), speeds (1, 3, 6, 12, and 18 h/time), and modes (early salinization, medium-term salinization, later salinization, and interval salinization) were used. The weight gain, activity, and survival rate of *L. vannamei* postlarvae were tested during high-salinity domestication. The results showed that the different high-salinity domestication gradients, speeds, and modes had significant effects on the weight gain, activity, and survival rate of postlarvae ( $P < 0.05$ ). The optimal high-salinity domestication gradient was 3~6/d; the survival rate of postlarvae remained at 74.07% to 78.83% in this gradient. When the high-salinity domestication gradient exceeded 9/d, the survival rate of postlarvae decreased sharply ( $P < 0.05$ ), and was only 43.37% in the high-salinity domestication gradient of 15/d. In addition, the rapid high-salinity domestication speed decreased the survival rate and activity. When the domestication speed was faster than 1 h/time, the survival rate of postlarvae was reduced to nearly 50%; as the domestication speed decreased, the growth rate of postlarvae increased. When the high-salinity domestication speed was 6~18 h/time, the daily weight gain of postlarvae was stable at 1.48~1.51 mg. The later salinization and interval salinization were superior to the early salinization and medium-term salinization regarding the postlarvae activity and survival rate, the postlarvae activity was as follows: interval salinization > later salinization > medium-term salinization > early salinization. Overall, the optimal high-salinity domestication gradient was 3~6/d, the best high-salinity domestication speed was 6~12 h/time, which will help postlarvae to reach the scheduled standard and achieve the target weight gain with later salinization and interval salinization.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; High-salinity domestication; Growth performance; Survival rate

① Corresponding author: LI Yuquan, E-mail: jiangfangqian@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171011001

http://www.yykxjz.cn/

吴亚林, 高亚平, 吕旭宁, 王晓芹, 李凤雪, 姜妮妮, 王军威, 张义涛, 蒋增杰. 桑沟湾楮岛大叶藻床区域菲律宾蛤仔的生态贡献. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 126–133  
Wu YL, Gao YP, Lü XN, Wang XQ, Li FX, Jiang WW, Wang JW, Zhang YT, Jiang ZJ. Ecological contribution of *Ruditapes philippinarum* in the seagrass meadow of Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 126–133

## 桑沟湾楮岛大叶藻床区域菲律宾蛤仔的生态贡献\*

吴亚林<sup>1,2</sup> 高亚平<sup>2,3</sup> 吕旭宁<sup>1,2</sup> 王晓芹<sup>1,2</sup> 李凤雪<sup>1,2</sup>  
姜妮妮<sup>2</sup> 王军威<sup>4</sup> 张义涛<sup>4</sup> 蒋增杰<sup>2,3①</sup>



(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛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. 荣成楮岛水产有限公司 荣成 264312)

**摘要** 桑沟湾楮岛大叶藻(*Zostera marina* L.)床周边存在大量的底栖菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*), 为摸清菲律宾蛤仔的生理活动与大叶藻的相互作用, 2016年5~7月, 在菲律宾蛤仔和大叶藻集中分布区, 评估了菲律宾蛤仔种群资源量, 现场流水法测定了菲律宾蛤仔个体水平的摄食、代谢生理, 围隔实验法探讨了种群水平蛤仔与大叶藻的相互作用。结果显示, 桑沟湾楮岛大叶藻床海区菲律宾蛤仔的平均生物量为(572.00±20.23) ind./m<sup>2</sup>, 大(壳长为3.50~4.10 cm)、中(壳长为3.00~3.50 cm)、小(壳长为2.00~3.00 cm)规格各占9.01%、43.60%和47.38%。菲律宾蛤仔的排氮率、耗氧率、滤水率、摄食率分别为(0.44±0.15)~(1.40±0.35) μmol/(ind.·h)、(0.21±0.02)~(0.33±0.08) mg/(ind.·h)、(0.69±0.38)~(0.83±0.66) L/(ind.·h)和(2.57±0.41)~(3.41±0.68) mg/(ind.·h), 且都随体重的增加而增大。围隔实验设有3个实验组(蛤仔组、大叶藻组和大叶藻+蛤仔组), 1个空白组, 每组3个平行(大叶藻30茎枝左右、蛤仔15个左右), 实验进行4 h。研究表明, 蛤仔组、大叶藻+蛤仔组和大叶藻组间的溶氧浓度存在显著差异( $P<0.05$ ); 蛤仔组与其他3组的氨氮浓度存在显著差异( $P<0.05$ ); 蛤仔组、大叶藻+蛤仔组与空白组的水体颗粒物浓度存在显著差异( $P<0.05$ ), 大叶藻组与空白组差异不显著( $P>0.05$ )。桑沟湾楮岛海区菲律宾蛤仔养殖面积约为0.5 km<sup>2</sup>, 蛤仔每天可以过滤46 t海水中的悬浮颗粒物, 并为大叶藻提供0.4 t的氨氮。本研究为深入揭示大叶藻海区菲律宾蛤仔的生态作用提供了基础数据。

**关键词** 大叶藻; 菲律宾蛤仔; 摄食生理; 代谢生理; 桑沟湾

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0126-08

海草为生活在海洋中的高等显花植物的统称, 它花传粉及种子的产生等一系列生物过程。全球海草约72种, 在温带各海草种类中, 以大叶藻(*Zostera marina*)

\* 国家自然科学基金项目(41761134052; 41676147)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山科技创新计划项目(2016ASKJ02)和现代农业产业技术体系(CARS-49)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41761134052; 41676147), the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2016ASKJ02), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 吴亚林, E-mail: 1836482630@qq.com

① 通讯作者: 蒋增杰, 研究员, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-11, 收修改稿日期: 2017-11-14

L.)分布最为广泛。在我国, 该种高等显花植物的分布见于山东、辽宁和河北沿海(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1992)。大叶藻广泛生长形成的草床可为周围生物提供栖息和育幼场所(Ward, 1985), 极大地增加周围环境的生物多样性, 并能稳固潮滩、净化水质等(Ward *et al.*, 1984), 与珊瑚礁和红树林同为三大典型海洋生态系统, 在浅海生态系统中发挥着重要的生态功能。然而, 自 20 世纪开始, 由于各种自然因素和人为扰动的影响, 大叶藻海草床处于不断退化的状态(Lorus *et al.*, 1951), 到目前为止, 已有约 29% 的海草床消失(Waycott *et al.*, 2009)。

桑沟湾(37°01'~37°09'N, 122°24'~122°35'E)位于山东半岛东端, 水域广阔, 海岸线长, 资源丰富, 南端楮岛海区分布有桑沟湾面积最大、分布最为集中的大叶藻床。据报道, 1983 年, 桑沟湾楮岛海区大叶藻分布面积约为 100 hm<sup>2</sup>, 至 2008 年初, 增加至 200 hm<sup>2</sup>, 2009 年底, 大叶藻分布面积接近 400 hm<sup>2</sup>(高亚平, 2009)。在全球海草床资源日益衰退的背景下, 桑沟湾楮岛海区的大叶藻分布面积和资源量却呈现逐年扩大与恢复的趋势, 一方面得益于该地区实施的大叶藻保护措施(2009 年山东省在荣成市楮岛建立了“楮岛藻类种质资源保护区”, 并将其列入山东省渔业资源修复行动计划, 大叶藻也被列为保护对象), 另一方面, 大叶藻床区周边分布的大量的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)资源也可能扮演着非常重要的生态角色。

菲律宾蛤仔具有很强的滤水能力, 可以将大量悬浮物从水体中清除, 其中, 包括沉积物、有机碎屑、细菌、无脊椎幼虫、浮游动物和浮游植物(Davenport *et al.*, 2000; Mazzola *et al.*, 2001), 从而净化水体, 提高光照透射率。另一方面, 菲律宾蛤仔通过排泄作用释放的 N(NH<sub>4</sub>-N) 和 P(PO<sub>4</sub>-P), 可以为海洋中的浮游植物、大型藻类、沉水植物提供营养盐, 维持了海洋重要的初级生产力。

桑沟湾大叶藻分布区内蛤仔存量较大, 可收获生物量约 700 g/m<sup>2</sup>·yr(高亚平等, 2013), 为探讨大叶藻海区菲律宾蛤仔的生态作用, 本研究选取桑沟湾楮岛海草床菲律宾蛤仔为研究对象, 在摸清菲律宾蛤仔种群结构和生物量的基础上, 利用模拟现场流水法, 研究了菲律宾蛤仔的摄食、代谢生理, 并基于现场围隔实验法探讨大叶藻与蛤仔间物质的相互利用, 以期揭示蛤仔在海草床生态系统中的作用, 为海草床的生态恢复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验地点及材料

2016 年 5 月, 现场模拟流水实验在桑沟湾楮岛

海钓码头进行, 实验所需大(壳长为 3.50~4.10 cm)、中(壳长为 3.00~3.50 cm)、小(壳长为 2.00~3.00 cm)规格菲律宾蛤仔均取自桑沟湾楮岛海域(37°02'38.3"N, 122°33'30.3"E)(围隔实验所需中等规格的菲律宾蛤仔以及菲律宾蛤仔的生物量调查都是在此区域), 并暂养于海钓码头附近的海上, 暂养期间, 温度为 19.00℃~20.25℃, pH 为 7.90~8.00, 溶氧为 7.10~7.50 mg/L。7 月群体水平的围隔实验在楮岛码头进行, 10 月进行了蛤仔的生物量调查。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菲律宾蛤仔的生物量统计** 2016 年 10 月, 在楮岛海域(37°02'38.3"N, 122°33'30.3"E)随机选取 5 个大小为 0.5 m×0.5 m 样方, 将样方内的菲律宾蛤仔全部采集, 蛤仔清洗干净后测量壳长并计数。

**1.2.2 现场模拟流水实验** 将暂养的大、中、小规格菲律宾蛤仔各取出 9 个, 标号后分批次放入容积约为 3.3 L 的流水槽内(图 1), 使菲律宾蛤仔的进水口正对水槽进水方向(Eckman *et al.*, 1989), 实验设 9 个平行, 3 个对照, 进水孔位于槽顶下方 2.3 cm 处, 出水孔位于另一端的槽底上方 6.2 cm 处。利用水泵 1 抽取海水到高位集水箱, 溢水口保持集水箱水位, 海水经过 12 个带阀门的硅胶管流入流水槽, 调整流速为 200 ml/min 左右, 驯化 1 h。驯化结束后开始实验, 每种规格的蛤仔实验持续 3 h, 每隔 1 h 测各个流水槽流速, 用 100 ml 的水样瓶同时收集各水槽流水, 利用便携式颗粒计数器 PAMAS(型号 S4031GO, 德国)测定水样瓶中水体颗粒物数量(测定粒径范围为 2~200 μm), 并用 2 L 的聚乙烯瓶收集对照组水样, 经预先烧好的孔径为 1.2 μm 的 GF/C 玻璃纤维滤膜(预先经 450℃灼烧 4 h, 称重, 精确到小数点后 4 位)抽滤, 并用蒸馏水润洗除去盐分, 将滤膜用锡纸包裹, 在-20℃以下的冰箱内冷冻保存。耗氧实验共设 9 个平行, 1 个对照, 打开水泵 2, 集水箱中的海水通过进水管抽到圆柱形容容器中, 并通过出水管流出, 将标号的蛤仔分批次放入 0.4 L 圆柱容器内, 密封, 驯化 1 h 后, 关闭水泵 2, 并关闭盖子上阀门, 开始实验, 实验持续 1 h, 期间水泵 1 持续运行保持水浴状态, 实验结束后, 测各圆柱形容容器内的溶氧, 并用 200 ml 的水样瓶取水样, 采集的水样迅速带回实验室进行氨氮测定。实验期间, 水浴温度变化为 19.20℃~20.10℃, pH 变化为 7.90~8.00, 溶氧变化为 7.15~7.50 mg/L。溶氧、pH、水温 and 盐度等指标使用 In-Situ Inc., Andersonville (美国)测定。

**1.2.3 围隔实验** 围隔实验装置为金属支架撑起

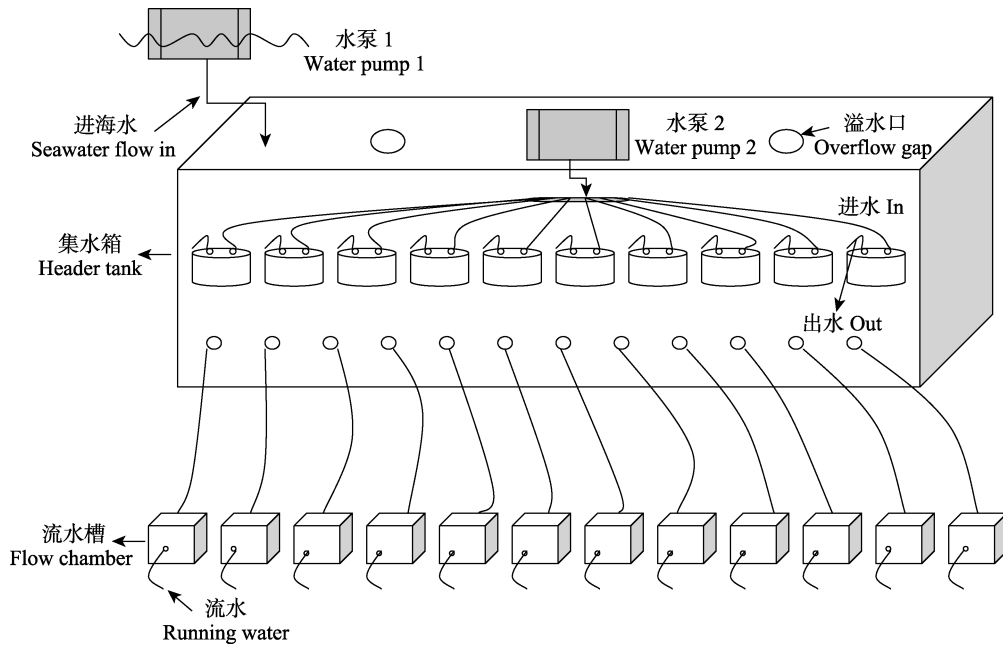


图 1 菲律宾蛤仔的滤水、耗氧实验示意

Fig.1 Diagram of *R. philippinarum* filtration, oxygen consumption experiment

的帆布桶(2.5 m×2.5 m×1 m), 将 12 个自主设计且主体材质为聚甲基丙烯酸甲酯的圆柱形容器(直径为 24 cm、高为 49 cm、体积为 22 L)放在帆布桶内注满水。实验设 4 个组(蛤仔组、大叶藻组、大叶藻+蛤仔组和空白组)(大叶藻 30 茎枝左右、蛤仔 15 个左右), 每组 3 个平行, 实验所用蛤仔的平均壳长为(3.42±0.16) cm, 平均湿重为(5.08±0.99) g, 平均组织干重为(0.35±0.06) g, 平均肥满度为 7.44。抽取沿岸的自然海水于帆布桶内(水域恒温), 先暂养 1 d。实验开始时, 各组初始溶氧浓度约为 6.60 mg/L, 当实验蛤仔开壳进行自然滤水后, 盖上桶盖密封, 进行耗氧、排氨实验, 持续 4 h, 测定实验结束时的溶氧, 取水样(2 份, 各 500 ml), 1 份水样进行氨氮测定, 1 份水样经预先烧好的孔径为 1.2 μm 的 GF/C 玻璃纤维滤膜(预先经 450℃灼烧 4 h, 称重, 精确到小数点后 4 位)抽滤, 并用蒸馏水润洗除去盐分, 将滤膜用锡纸包裹, 在-20℃以下的冰箱内冷冻保存。实验期间, 水浴温度变化为 24℃~25℃, pH 变化为 7.90~8.00, 溶氧变化为 7.50~7.80 mg/L。溶氧、pH、水温和盐度等指标使用 In-Situ Inc., Andersonville (美国)测定。

**1.2.4 样品测定** 按《海洋监测规范》GB17378-2007 规定的方法, 进行样品的采集、处理和保存。实验水样经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤后, 采用次溴酸钠氧化法对 NH<sub>4</sub>-N 进行测定; GF/C 玻璃纤维滤膜 65℃烘箱中烘至恒重称重(W<sub>65</sub>), 450℃灼烧后称重(W<sub>450</sub>)(都精确到小数点后 4 位); 测量蛤仔壳长, 分离软体

组织, 60℃烘干至恒重, 称量软体组织干重(g)。

**1.2.5 各参数的计算方法** 滤水率的计算公式如下:

$$\text{滤水率}[\text{Clearance rate, CR, L}/(\text{ind.} \cdot \text{h})] = \text{流速}(\text{L}/\text{h}) \times (C_0 - C_1) / C_0 \quad (\text{Widdows } et \text{ al, } 1992)$$

式中, C<sub>1</sub> 和 C<sub>0</sub> 分别代表实验组和空白组颗粒物浓度(个/ml)。

水体颗粒物浓度计算公式如下:

$$\text{TPM}(\text{总颗粒物}) = (W_{65} - W_0) / V$$

$$\text{POM}(\text{颗粒有机物}) = (W_{65} - W_{450}) / V$$

式中, W<sub>0</sub> 为预先在马弗炉中经 450℃灼烧 4 h 处理后的 GF/C 玻璃纤维滤膜重量(g), W<sub>65</sub> 为水样经 GF/C 玻璃纤维滤膜过滤后在 65℃烘箱中烘至恒重, 用天平(精确到小数点后 4 位)称重所得, W<sub>450</sub> 为 65℃烘箱中烘至恒重的滤膜再经马弗炉灼烧 4 h 后用天平(精确到小数点后 4 位)称重所得, V 为抽滤水体的体积(L)。

耗氧率的计算公式如下:

$$\text{耗氧率}[\text{Oxygen consumption rate, OR, mg}/(\text{ind.} \cdot \text{h})] = [(DO_0 - DO_t) \times V] / (N \times t)$$

式中, DO<sub>0</sub> 和 DO<sub>t</sub> 分别为空白组、实验组在 t 时水中溶氧量(mg/L); t 为实验持续时间(h); N 为实验蛤仔个数(ind.); V 为实验用水的体积(L)。

排氨率的计算公式如下:

$$\text{排氨率}[\text{Ammonia excretion rate, NR, } \mu\text{mol}/(\text{ind.} \cdot \text{h})] = [(N_t - N_0) \times V] / (N \times t)$$

式中, N<sub>t</sub> 和 N<sub>0</sub> 分别为实验组、空白组在 t 时水

中氮浓度( $\mu\text{mol/L}$ );  $t$  为实验持续时间(h);  $N$  为蛤仔个数(ind.);  $V$  为实验用水的体积(L)。

**1.2.6 数据处理** 数据统计分析采用 SPSS19.0, 对所得数据用单因素方差分析(One-way ANOVA), 存在显著差异时用 Duncan 方法做组间多重比较, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛤仔生物量统计

蛤仔的生物量在 480~600 ind./ $\text{m}^2$ , 平均为(572.00±

20.23) ind./ $\text{m}^2$ 。其中, 大规格蛤仔(壳长为 3.50~4.10 cm) 占 9.01%, 中规格蛤仔(壳长为 3.00~3.50 cm)占 43.60%, 小规格蛤仔(壳长为 2.00~3.00 cm)占 47.38%。

### 2.2 不同规格菲律宾蛤仔的生理代谢

3 种规格蛤仔壳长差异显著, 实验期间, 水体总颗粒物和颗粒有机物浓度范围为 (10.78±2.31)~(10.91±1.97)和(3.72±0.52)~(4.11±0.57) mg/L。实验测得单位个体菲律宾蛤仔的排氮率、耗氧率、滤水率和摄食率变化范围(表 1)。由表 1 可知, 蛤仔排氮率、耗氧率、滤水率、摄食率都随个体规格增大而增加。

表 1 菲律宾蛤仔生物学及生理学参数  
Tab.1 Biological and physiological parameters of *R. philippinarum*

分组 Group	壳长 Shell length (cm)	组织干重 Tissue dry weight (g)	排氮率 NR [ $\mu\text{mol}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ ]	耗氧率 OR [ $\text{mg}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ ]	滤水率 CR [ $\text{L}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ ]	摄食率 IR [ $\text{mg}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ ]
大规格 Large size	4.09±0.11 <sup>a</sup>	0.58±0.10	1.40±0.35	0.33±0.08	0.83±0.66	3.41±0.68
中规格 Medium size	3.13±0.11 <sup>b</sup>	0.25±0.06	0.70±0.25	0.30±0.08	0.75±0.60	2.98±0.58
小规格 Small size	2.36±0.17 <sup>c</sup>	0.12±0.04	0.44±0.15	0.21±0.02	0.69±0.38	2.57 ±0.41

注: 字母不同代表差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

### 2.3 围隔体系中水体特征

实验结束时, 水体溶氧浓度, 蛤仔组<空白组<大叶藻+蛤仔组<大叶藻组, 蛤仔组、大叶藻+蛤仔组和大叶藻组间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 空白组与大叶藻组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 与大叶藻+蛤仔组差异不显著( $P > 0.05$ )(图 2)。

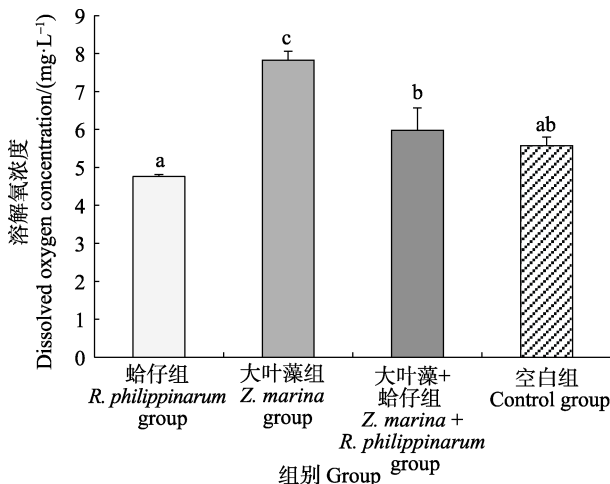


图 2 水体溶解氧浓度

Fig.2 Concentration of dissolved oxygen in seawater

字母相同代表差异不显著( $P > 0.05$ ),

不同代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Values with same letters mean no significant differences ( $P > 0.05$ ), different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ). The same as below

水体氨氮浓度, 大叶藻组<大叶藻+蛤仔组<空白组<蛤仔组, 蛤仔组与其他 3 组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 大叶藻组、大叶藻+蛤仔组和空白组差异不显( $P > 0.05$ )(图 3)。

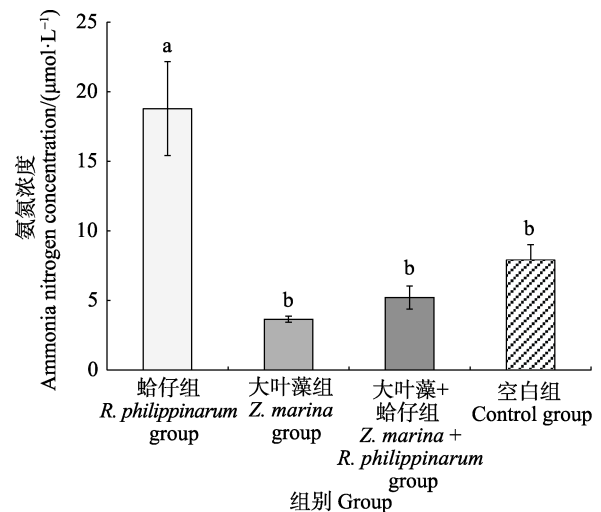


图 3 水体氨氮浓度

Fig.3 Concentration of ammonia nitrogen in seawater

水体中颗粒物浓度, 空白组>大叶藻组>大叶藻+蛤仔组>蛤仔组, 大叶藻组与空白组浓度基本一致, 蛤仔组、大叶藻+蛤仔组与空白组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 大叶藻组与空白组差异不显著( $P > 0.05$ )(图 4)。



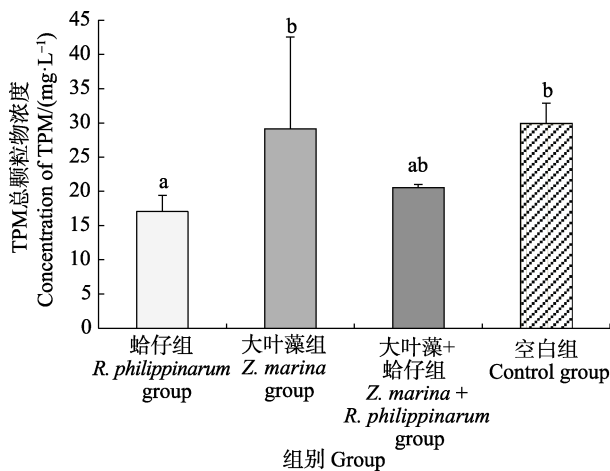


图4 水体总颗粒物浓度  
Fig.4 Concentration of TPM in seawater

### 3 讨论

光照是决定海草植株密度、分布及生产力的首要因素(Gaeckle *et al.*, 2002), 而水下光的减弱被认为是海草床衰退的最主要因素之一(郑杏雯, 2007)。海水养殖设施和大叶藻叶片上附生单细胞藻类对太阳光线的遮挡及水体浑浊度增加是造成大叶藻光可获得性减弱的潜在原因。研究表明, 海水养殖是海草资源衰退的重要因素之一(吴钟解等, 2015), 养殖设施对太阳光线的物理遮挡能够导致海草的分布面积减少高达 75%, 与没有养殖设施的对照海区相比, 牡蛎筏式养殖区(养殖密度 3.2 kg/m<sup>2</sup>)表层到底层水体的光辐射减少了 37.5%, 相对电子传递速率(ETR)减少了 81.5%, 平均光合光量子通量( $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )密度(PPFD)减少了 85.2%(Skinner *et al.*, 2014)。一方面, 大量附生单细胞藻类覆盖在海草叶片表面, 可导致海草的可利用光能大幅度减少 63% (Silberstein *et al.*, 1986), 进而出现光合作用能力下降(Irlandi *et al.*, 2004), 另一方面, 附生藻类并非单纯地覆盖在海草表面遮挡有效光合辐射, 而是显示出像叶绿体一样的吸收特性, 优先的吸收蓝光和红光, 从而形成了与海草叶片表面竞争可利用光子的局面, 在一定程度上加剧了对海草光合作用的限制。菲律宾蛤仔具有很强的滤水能力, 可以滤食水体中的浮游植物、有机碎屑等悬浮物, 不仅可以净化水体, 提高水体透明度, 而且可以降低单细胞藻类在大叶藻叶片的附着率, 进而减少附生单细胞藻类对大叶藻光合作用的影响。本研究结果显示, 桑沟湾楮岛海区底栖自然野生菲律宾蛤仔面积约为 0.5 km<sup>2</sup>, 蛤仔密度为(572.00±20.23) ind./m<sup>2</sup>, 大、中、小规格菲律宾蛤仔的滤水率分别为(0.83±0.66)、

(0.75±0.60)、(0.69±0.38) L/(ind·h), 取 3 种规格蛤仔平均滤水率和摄食率来估算, 蛤仔每天将过滤 4.2×10<sup>6</sup> t 海水, 摄食约 46 t 悬浮颗粒物。围隔实验中的各组颗粒物浓度, 空白组>大叶藻组>蛤仔组>大叶藻+蛤仔组, 空白组与蛤仔组、大叶藻+蛤仔组存在显著差异( $P<0.05$ ), 有蛤仔组颗粒物浓度最低(图 4), 并且实验期间也可以观察到, 有蛤仔组的海水非常清澈, 体现了菲律宾蛤仔对颗粒物的滤除效果。

除了光照对海草的影响外, 从世界六大海草床区系的调查中总结得出, 营养盐是温带海草床所受的主要胁迫与限制的另一个影响因子(Short *et al.*, 2007), 营养盐可以限制海草的生长和降低海草有性繁殖(Agawin *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 1996)。在以砂质和有机质为主的底质环境中(楮岛是砂质和有机质为主的底质环境), 限制海草生长的主导因子是氮(Williams, 1990), 海草可以利用的无机氮源主要包括水体中的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和底质间隙水中的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 氨氮被认为是海草主要的氮营养盐吸收利用形式(Burkholder *et al.*, 1992), 在相同浓度氨氮和硝氮条件下, 海草对氨氮的吸收高于对硝氮的吸收(Ahn *et al.*, 1998; Alexandre *et al.*, 2011; Alexandre *et al.*, 2010)。贝类主要的排泄物是氨, 直接来源于蛋白质的脱氨基作用(Cockcroft, 1990; Hammen, 1968), 此外还有氨基酸、尿酸、尿素等, 氮的代谢终产物主要为氨(Cockcroft, 1990), 所以, 目前对双壳贝类氮排泄的研究大都集中在氨的排泄方面。桑沟湾楮岛海草床中 3 种规格菲律宾蛤仔的排氨率分别为(0.44±0.15)、(0.70±0.25)和(1.40±0.35)  $\mu\text{mol}/(\text{ind}\cdot\text{h})$ , 刘鹏(2013)用呼吸瓶法于 2012 年 5 月~2013 年 1 月测得的 3 种规格菲律宾蛤仔的排氨率范围分别为 0.325~1.469、0.496~1.693 和 0.476~2.459  $\mu\text{mol}/(\text{ind}\cdot\text{h})$ , 与本研究数据相吻合。桑沟湾楮岛海区菲律宾蛤仔的密度为(572.00±20.23) ind./m<sup>2</sup>, 取 3 种规格蛤仔平均排氨率估算, 蛤仔每天将排泄 0.84 g 氨氮, 大叶藻平均生物量为 256 g/(DW·m<sup>2</sup>) (刘旭佳, 2011), 大叶藻叶片氨氮吸收效率为 20.5  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{DW}\cdot\text{h})$  (Thursby *et al.*, 1982), 每平方米大叶藻每天吸收 4.16 g 氨氮, 约 5 m<sup>2</sup> 蛤仔排泄氨氮的量可以满足 1 m<sup>2</sup> 大叶藻的营养需求。围隔实验中的水体氨氮浓度, 蛤仔组>空白组>大叶藻+蛤仔组>大叶藻组, 并且蛤仔组与大叶藻组、大叶藻+蛤仔组存在显著差异( $P<0.05$ ), 大叶藻组与大叶藻+蛤仔组差异不显著( $P>0.05$ ), 说明, 蛤仔排泄的氨氮能被大叶藻有效利用。

本研究中, 3 种规格菲律宾蛤仔的耗氧率范围为(0.21±0.02)~(0.33±0.08) mg/(ind·h), 与刘鹏(2013)在

天鹅湖海草床中测得的菲律宾蛤仔的耗氧率一致。大叶藻的最大净光合速率为 $(8.16 \pm 0.17) \text{ mg O}_2/(\text{gDW} \cdot \text{h})$  (李勇, 2014), 平均生物量为 $256 \text{ g/m}^2$  (刘旭佳, 2011), 取3种规格蛤仔的平均耗氧率估算, 蛤仔耗氧量为 $164.38 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 根据单位面积 $(\text{m}^2)$ 大叶藻产氧量与单位面积菲律宾蛤仔耗氧量, 计算得出, 每平方米大叶藻释放的氧可供约 $13 \text{ m}^2$ 内的蛤仔呼吸所用。围隔实验中的水体溶解氧含量大叶藻组>大叶藻+蛤仔组>空白组>蛤仔组, 并且蛤仔组、大叶藻组和大叶藻+蛤仔组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 说明, 大叶藻光合作用产氧被蛤仔利用。

海草既能通过地上叶片摄取海水中的营养盐, 也能通过地下根吸收沉积物间隙水中的营养盐。Lemmens等(1996)研究表明, 大量的贝类生物沉积物会导致海底沉积物中的有机质含量增加, 沉积物通过微生物降解释放大量的营养盐, 可以满足海草的营养需求。但Terrados等(1999)研究指出, 在有机质丰富的底泥中, 可能有大量的硫酸盐被硫酸盐还原菌还原, 硫酸盐还原形成的主要产物之一是硫化氢, 硫化物已经被证明对大叶藻有剧毒, 是影响大叶藻生长和存活的重要因素之一。贝类生物沉积物对大叶藻的正负效应将在后续的研究中重点关注。

## 参 考 文 献

- Agawin NSR, Duarte CM, Fortes MD. Nutrient limitation of Philippine seagrasses (Cape Bolinao, NW Philippines): *in situ* experimental evidence. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 138(1-3): 233-243
- Ahn O, Petrell RJ, Harrison PJ. Ammonium and nitrate uptake by *Laminaria saccharina* and *Nereocystis luetkeana* originating from a salmon sea cage farm. *Journal of Applied Phycology*, 1998, 10(4): 333-340
- Alexandre A, Silva J, Bouma TJ, *et al.* Inorganic nitrogen uptake kinetics and whole-plant nitrogen budget in the seagrass *Zostera noltii*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 401(1-2): 7-12
- Alexandre A, Silva J, Santos R. Inorganic nitrogen uptake and related enzymatic activity in the seagrass *Zostera noltii*. *Marine Ecology*, 2010, 31(4): 539-545
- Burkholder JM, Mason KM, Glasgow HB. Water-column nitrate enrichment promotes decline of eelgrass *Zostera marina* L.: Evidence from seasonal mesocosm experiments. *Marine Ecology Progress Series*, 1992, 81(2): 163-178
- Chinese Academy of Sciences, Editorial Board of Chinese Flora. Chinese flora: Volume 8. Beijing: Science Press, 1992 [中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第八卷. 北京: 科学出版社, 1992]
- Cockcroft AC. Nitrogen excretion by the surf zone bivalves *Donax serra* and *D. sordidus*. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 60(1-2): 57-65
- Davenport J, Smith RJW, Packer M. Mussels *Mytilus edulis*: Significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 198(1): 131-137
- Duarte CM, Sand-Jensen K. Nutrient constraints on establishment from seed and on vegetative expansion of the Mediterranean seagrass *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany*, 1996, 54(4): 279-286
- Eckman JE, Peterson CH, Cahalan JA. Effects of flow speed, turbulence, and orientation on growth of juvenile bay scallops *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1989, 132(2): 123-140
- Gaeckle JL, Short FT. A plastochrone method for measuring leaf growth in eelgrass, *Zostera marina* L.. *Bulletin of Marine Science*, 2002, 71(3): 1237-1246
- Gao YP. A study on sexual reproductive characteristics and epiphytes of eelgrass (*Zostera marina* L.) in Sango Bay. Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2009, 5-14 [高亚平. 桑沟湾大叶藻有性繁殖生物学及附着生物研究. 华东理工大学硕士研究生学位论文, 2009, 5-14]
- Gao YP, Fang JG, Tang W, *et al.* Seagrass meadow carbon sink and amplification of the carbon sink for eelgrass bed in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 17-21 [高亚平, 方建光, 唐望, 等. 桑沟湾大叶藻海草床生态系统碳汇扩增力的估算. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 17-21]
- Hammen CS. Aminotransferase activities and amino acid excretion of bivalve mollusks and brachiopods. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1968, 26(2): 697-705
- Irandi EA, Orlando BA, Biber PD. Drift algae-epiphyte-seagrass interactions in a subtropical *Thalassia testudinum* meadow. *Marine Ecology Progress Series*, 2004, 279(1): 81-91
- Lemmens JWTJ, Clapin G, Lavery P, *et al.* Filtering capacity of seagrass meadows and other habitats of Cockburn Sound, Western Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 143(1-3): 187-200
- Li Y. Study on the carbon fixation function of seagrasses in the coastal area of Shandong Peninsula: A case study of *Zostera marina* L. in Swan Lake in Rongcheng. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014, 34-35 [李勇. 山东近岸海草植被固碳功能研究——以荣成天鹅湖大叶藻为例. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 34-35]
- Liu P. A Study on ecophysiological characteristics of bivalves in seagrass meadow and ecological restoration of the eelgrass *Zostera marina* L.. Master's Thesis of University of Chinese

- Academy of Sciences, 2013, 3–4 [刘鹏. 海草床双壳贝类生理生态学特征及大叶藻生态恢复研究. 中国科学院大学硕士研究生学位论文, 2013, 3–4]
- Liu XJ. Ecological preliminary study on eelgrass of inshore areas in Shandong. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011, 65–66 [刘旭佳. 山东近岸海域大叶藻的生态学初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 65–66]
- Lorus J, Milne MJ. The eelgrass catastrophe. *Scientific American*, 1951, 184(1): 52–55
- Mazzola A, Sarà G. The effect of fish farming organic waste on food availability for bivalve molluscs (Gaeta Gulf, Central Tyrrhenian, MED): Stable carbon isotopic analysis. *Aquaculture*, 2001, 192(2–4): 361–379
- Short F, Carruthers T, Dennison W, *et al.* Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 350(1–2): 3–20
- Silberstein K, Chiffings AW, McComb AJ. The loss of seagrass in cockburn sound, Western Australia. III. The effect of epiphytes on productivity of *Posidonia australis* Hook. F. *Aquatic Botany*, 1986, 24(4): 355–371
- Skinner MA, Courtenay SC, McKindsey CW, *et al.* Experimental determination of the effects of light limitation from suspended bag oyster (*Crassostrea virginica*) aquaculture on the structure and photosynthesis of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2014, 459(1): 169–180
- Terrados J, Duarte CM, Kamp-Nielsen L, *et al.* Are seagrass growth and survival constrained by the reducing conditions of the sediment? *Aquatic Botany*, 1999, 65(1–4): 175–197
- Thursby GB, Harlin MM. Leaf-root interaction in the uptake of ammonia by *Zostera marina* L.. *Marine Biology*, 1982, 72(2): 109–112
- Ward LG, Kemp WM, Boynton WR. The influence of waves and seagrass communities on suspended particulates in an estuarine embayment. *Marine Geology*, 1984, 59(1): 85–103
- Ward LG. The influence of wind waves and tidal currents on sediment resuspension in middle Chesapeake Bay. *Geo-Marine Letters*, 1985, 5(1): 71–75
- Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJ, *et al.* Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(30): 12377–12381
- Widdows J, Salkeld PN. Practical procedures for the measurement of scope for growth. Map Technical Reports, 1992
- Williams SL. Experimental studies of caribbean seagrass bed development. *Ecological Monographs*, 1990, 60(4): 449–469
- Wu ZJ, Chen SQ, Cai ZF, *et al.* The health assessment of the seagrass bed ecosystem in Xincun Lagoon of Hainan Island. *Environmental Monitoring in China*, 2015, 31(2): 98–103 [吴钟解, 陈石泉, 蔡泽富, 等. 新村港海草床生态系统健康评价. *中国环境监测*, 2015, 31(2): 98–103]
- Zheng XW. Study on photosynthesis of seagrass *Zostera japonica* in Fangcheng of Guangxi. Master's Thesis of Guangxi University, 2007, 180–185 [郑杏雯. 广西防城海草光合作用研究. 广西大学硕士研究生学位论文, 2007, 180–185]

(编辑 马瑾艳)

## Ecological Contribution of *Ruditapes philippinarum* in the Seagrass Meadow of Sanggou Bay

WU Yalin<sup>1,2</sup>, GAO Yaping<sup>2,3</sup>, LÜ Xuning<sup>1,2</sup>, WANG Xiaoqin<sup>1,2</sup>, LI Fengxue<sup>1,2</sup>,  
JIANG Weiwei<sup>2</sup>, WANG Junwei<sup>4</sup>, ZHANG Yitao<sup>4</sup>, JIANG Zengjie<sup>2,3①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Rongcheng Chudao Aquaculture Corporation, Rongcheng 264312)

**Abstract** *Ruditapes philippinarum* is abundant around the seagrass meadow in Chudao, Sanggou Bay. To determine the interactions between *R. philippinarum* and *Zostera marina* L., the amount of *R. philippinarum* was evaluated in the seagrass meadow at Chudao from May to July, 2016. The feeding and metabolic physiology of *R. philippinarum* were determined based on an individual experiment with flowing water from the field. The interactions between *R. philippinarum* and *Z. marina* were investigated in an enclosure experiment in the field. The results showed that the biomass of *R. philippinarum* was  $(572.00 \pm 20.23)$  ind./m<sup>2</sup>, which included 9.01% large (shell length 3.50~4.10 cm), 43.60% medium (shell length 3.00~3.50 cm), and 47.38% small (shell length 2.00~3.00 cm) clams. The ammonia nitrogen excretion, oxygen consumption, clearance rate, and feeding rate were  $(0.44 \pm 0.15)$  to  $(1.40 \pm 0.35)$   $\mu\text{mol}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ ,  $(0.21 \pm 0.02)$  to  $(0.33 \pm 0.08)$   $\text{mg}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ ,  $(0.69 \pm 0.38)$  to  $(0.83 \pm 0.66)$   $\text{L}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ , and  $(2.57 \pm 0.41)$  to  $(3.41 \pm 0.68)$   $\text{mg}/(\text{ind} \cdot \text{h})$ , respectively. These parameters all increased with increasing body weight of the clams. There were four groups (*R. philippinarum*, *Z. marina*, *Z. marina*+*R. philippinarum*, and control) with three replicates each in the enclosure experiment, which was run for 4 h. The results revealed significant differences in dissolved oxygen concentration among the *R. philippinarum*, *Z. marina*+*R. philippinarum*, and *Z. marina* groups ( $P < 0.05$ ). The ammonia nitrogen concentration in the *R. philippinarum* group was significantly higher than that in the other three groups ( $P < 0.05$ ). Total particles in the *R. philippinarum* and *Z. marina*+*R. philippinarum* groups were significantly lower than those in the control ( $P < 0.05$ ), while no significant difference was found between the *Z. marina* group and the control ( $P > 0.05$ ). The area of *R. philippinarum* is about 0.5 km<sup>2</sup> around Chudao in Sanggou Bay, approximately filter 46 t of suspended particulates and provide 0.4 t of ammonia nitrogen to the *Z. marina* meadow by the clam each day. The present findings provides basic data for further revealing the ecological roles of *R. philippinarum* in *Z. marina* meadow areas.

**Key words** *Zostera marina* L.; *Ruditapes philippinarum*; Feeding physiology; Metabolic physiology; Sanggou Bay

① Corresponding author: JIANG Zengjie, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171109001

http://www.yykxjz.cn/

赵玲, 曹荣, 王联珠, 刘淇, 陈少凡, 符鹏飞. 靖海湾条斑紫菜的营养及鲜味评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 134-140  
Zhao L, Cao R, Wang LZ, Liu Q, Chen SF, Fu PF. Nutritional analysis and umami assessment of *Pyropia yezoensis* from Jing Bay. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 134-140

## 靖海湾条斑紫菜的营养及鲜味评价\*



赵玲<sup>1</sup> 曹荣<sup>1</sup> 王联珠<sup>1</sup> 刘淇<sup>1①</sup> 陈少凡<sup>2</sup> 符鹏飞<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 威海市科蓝海洋科技有限公司 文登 264400)

**摘要** 以不同收割期的靖海湾条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)为研究对象,对比分析营养价值并评价其鲜味。通过测定基本营养成分、无机元素组成和氨基酸组成,分析其营养学特征,通过测定游离氨基酸与呈味核苷酸组成,进而计算滋味活性值(Taste active value, TAV)与味精当量(Equivalent umami concentration, EUC)。结果显示,靖海湾条斑紫菜蛋白质含量丰富,头水和二水紫菜的蛋白含量均在 49%以上,显著高于四水和六水紫菜( $P<0.05$ )。不同收割期条斑紫菜的脂肪含量较低,均小于 1.1%。常量元素中 P 含量最低, K 含量最高,约为  $2.59\times 10^4\sim 5.52\times 10^4$  mg/kg;微量元素以 Fe 含量最高, Zn 次之, Co 最低; Pb 含量明显低于 GB 2762-2017 的限量要求。头水、二水紫菜与四水、六水紫菜的必需氨基酸及氨基酸总量间存在显著差异( $P<0.05$ )。游离谷氨酸和次黄嘌呤核苷酸对条斑紫菜的鲜味起主要贡献作用,头水、二水、四水和六水紫菜的 EUC(以干基计)依次降低,分别为 239.71、190.03、108.05 和 51.56 g MSG/100 g。靖海湾条斑紫菜具有较高的营养价值,且收割前期的靖海湾条斑紫菜鲜味度较高,可作为开发调味品的原料。

**关键词** 条斑紫菜; 营养; 鲜味

**中图分类号** TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0134-07

紫菜属于红藻门(Rhodophyta)、原红藻纲(Protofloridae)、红毛菜目(Bangiales)、红毛菜科(Bangiaceae)、紫菜属(*Pyropia*)(宋惠平等, 2015),含有丰富的蛋白质和多种微量元素,具有化痰软坚、清热利水、补肾养心的功效,极富营养价值和药用价值(陈必链等, 2001; 王亚等, 2012)。条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)和坛紫菜(*P. haitnensis*)是主要的养殖种类(李晓蕾等, 2017)。

条斑紫菜经济价值高,是海水藻类中的主要养殖品种,主要分布在江苏、山东,在辽宁也有少量分布(闵建等, 2008)。紫菜的质量随养殖地区、季节、水质等因素的不同而有明显差异。应苗苗等(2009)研究发现,不同收割期的坛紫菜基本营养成分、主要矿物

质及微量元素含量有较大的差异;曾繁杰等(1991)研究表明,中国坛紫菜和条斑紫菜所含的必需氨基酸含量较高,可与蛋、奶等高营养价值的动物蛋白相媲美;纪明侯等(1981)研究表明,条斑紫菜的氨基酸含量依生长海区的不同而各不相同;仲明等(2003)研究表明,条斑紫菜的主要营养成分随着采收期的不同其变化规律不同;胡传明等(2015)研究发现,不同品系条斑紫菜的氨基酸含量随采收期的延迟呈增长趋势,在采收后期达到最高;姚兴存等(2002)对连云港沿海条斑紫菜的营养成分做了一个养殖周期的跟踪分析测定,结果表明其营养成分丰富,蛋白质含量随生产季节逐渐降低,碳水化合物则逐渐升高,其他组成成分变化不明显;但目前未见关于不同收割期条斑紫菜鲜味评

\* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-50)资助[This work was supported by Special Funds for Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-50)]. 赵玲, E-mail: zhaoling@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2017-11-09, 收修改稿日期: 2017-12-12

价的研究。2016年底,条斑紫菜在文登靖海湾海域插杆式试养成功,养殖面积为66.7 hm<sup>2</sup>,本研究分析了不同收割期靖海湾条斑紫菜的主要营养成分和呈味成分,并对其进行鲜味评价,以期为条斑紫菜资源的开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

条斑紫菜干品,由威海市科蓝海洋科技有限公司提供,头水、二水、四水和六水紫菜分别于2016年12月30日、2017年1月17日、2月14日、3月13日采自威海市靖海湾海域(121°59'11.300"N 36°51'17.300"E),干品运至实验室后,分别粉碎,4℃储藏备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基本营养组成测定** 采用直接干燥法测定水分(GB 5009.3-2016);采用高温灼烧法测定灰分(GB 5009.4-2016);采用直接滴定法测定盐分含量(SC/T 3011-2001);采用凯氏定氮法测定粗蛋白质含量(GB 5009.5-2016);采用索氏提取法测定粗脂肪含量(GB 5009.6-2016)。

**1.2.2 元素含量测定** 参照文献(王亚等, 2012; 孙耀帆等, 2012),采用碰撞/反应池电感耦合等离子体质谱仪测定标准物质、空白溶液及样品中各元素含量。

**1.2.3 氨基酸含量测定** 参照 GB 5009.124-2016 测定水解氨基酸的含量,原料经浓盐酸处理后,采用日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪测定;采用磺基水杨酸法处理样品,氨基酸自动分析仪测定游离氨基酸的含量。

**1.2.4 呈味核苷酸含量测定** 参照文献(Yokoyama *et al.*, 1992; 曹荣等, 2018)测定呈味核苷酸的含量。色谱分析条件:色谱柱 Shiseido C18 SG (4.6 mm×150 mm);流动相为乙酸、柠檬酸、三乙胺混合溶液(分别为 20、20、40.0 mmol/L, pH 5.5);流速为 0.8 ml/min;柱温为 40℃;UV 检测器,检测波长为 260 nm;进样量为 10 μl。

**1.2.5 滋味活性值(Taste active value, TAV)计算**

根据龚骏等(2014)的方法计算呈味物质的 TAV,计算公式如下:

$$TAV = \frac{\text{样品中某呈味物质的绝对浓度值}}{\text{该物质的味道阈值}}$$

呈味物质指能使感觉器官产生感觉印象的物质;味道阈值是指某种味道能被感觉到时的最低浓度值。

**1.2.6 味精当量(Equivalent umami concentration, EUC)计算** 味精当量是呈味核苷酸与鲜味氨基酸之间产生的协同增鲜作用,以同等鲜味所需的谷氨酸单钠(Monosodium glutamate, MSG)的浓度来表示。根据姚海芹等(2016)的方法计算,公式如下:

$$EUC(\text{g MSG}/100 \text{ g}) = \sum a_i b_i + 1218(\sum a_i b_i)(\sum a_j b_j)$$

式中,1218为协同作用常数; $a_i$ 为鲜味氨基酸的量(g/100 g); $b_i$ 为鲜味氨基酸相对于谷氨酸钠(MSG)的鲜味系数(Glu, 1; Asp, 0.077); $a_j$ 为呈味核苷酸的量(g/100 g); $b_j$ 为呈味核苷酸相对于IMP的鲜味系数(AMP, 0.18; IMP, 1; GMP, 2.3)。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件处理数据,实验重复 2 次,设 3 个平行,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示,显著性以  $P < 0.01$  为极显著,  $P < 0.05$  为显著,  $P > 0.05$  为不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 基本营养组成测定结果

由表 1 可知,靖海湾条斑紫菜中蛋白质含量丰富,脂肪含量较低。头水和二水紫菜的蛋白质含量均在 49%以上,蛋白含量显著高于四水和六水紫菜( $P < 0.05$ )。随着收割期的延长,灰分含量显著增加,与仲明等(2003)的研究结果一致。六水紫菜的总糖含量最高,因而生产上通常用末水紫菜提取多糖等营养因子(姚兴存等, 2002)。

### 2.2 19种元素含量分析

常量元素和微量元素含量见表 2。从表 2 可以看出,靖海湾条斑紫菜中常量元素以 K 含量最高, P 含量最低,这与王亚等(2012)的研究结果一致;其中二水紫菜中 K 含量最高,四水紫菜次之,头水紫菜中 K 含量最低,这可能是二水紫菜灰分显著高于头水紫菜的主要原因。海带富含 K,姚海芹等(2016)报道,海带中 K 含量约为  $3.50 \times 10^4 \sim 4.86 \times 10^4$  mg/kg,而靖海湾条斑紫菜 K 含量约为  $2.59 \times 10^4 \sim 5.52 \times 10^4$  mg/kg,二者含量相当,因而补充 K,可以适量食用海带和紫菜。微量元素中 Fe 含量最高, Zn 次之, Co 最低。

有害元素的含量见表 3。GB 2762-2017 食品安全国家标准《食品中污染物限量标准》规定, Pb 的限量为 1.0 mg/kg(以干重计),由表 3 可知,靖海湾条斑紫菜中 Pb 含量明显低于 GB 2762-2017 的限量要求;无机 As 的含量范围与尚德荣等(2011)的研究结果一致。



表1 基本营养成分(以干基计, g/100 g)  
Tab.1 Basic nutrition composition (in dry basis, g/100 g)

营养成分 Nutrient content	头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
蛋白 Protein	49.82±0.21 <sup>a</sup>	50.94±0.12 <sup>a</sup>	46.67±0.19 <sup>b</sup>	31.33±0.25 <sup>c</sup>
脂肪 Fat	0.99±0.04 <sup>a</sup>	0.92±0.13 <sup>a</sup>	0.90±0.09 <sup>b</sup>	1.04±0.07 <sup>a</sup>
灰分 Ash	10.39±0.09 <sup>a</sup>	16.58±0.15 <sup>b</sup>	17.94±0.24 <sup>b</sup>	19.54±0.22 <sup>b</sup>
总糖 Total sugar	24.05±0.11 <sup>a</sup>	21.91±0.18 <sup>b</sup>	22.17±0.07 <sup>b</sup>	25.22±0.15 <sup>a</sup>

注: 同一行标注不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Note: In the same line, different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

表2 常量元素和微量元素含量(以干基计, mg/kg)  
Tab.2 The content of macro-and microelement (in dry basis, mg/kg)

元素 Elements	头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
钠 Na	2388±5	3037±9	3894±3	4489±7
镁 Mg	3267±3	3150±8	3081±4	2912±2
钾 K	25853±15	55195±17	43537±21	33430±19
钙 Ca	6550±10	5267±9	4514±13	6542±17
磷 P	388.9±4.2	342.4±2.9	241.0±1.5	216.8±1.8
铁 Fe	649.7±3.9	368.6±1.9	412.3±2.7	689.0±4.1
锰 Mn	31.42±1.65	28.00±1.44	22.82±1.19	20.76±2.01
铜 Cu	9.95±0.51	8.90±0.47	7.37±0.60	7.62±0.43
锌 Zn	116.85±3.55	47.76±1.58	55.44±1.49	57.65±2.11
硒 Se	0.16±0.02	0.19±0.01	0.17±0.03	0.19±0.04
钴 Co	0.33±0.02	0.23±0.05	0.20±0.01	0.26±0.01
镍 Ni	3.27±0.36	1.09±0.12	0.94±0.09	6.91±0.40
钒 V	1.70±0.18	1.75±0.20	7.35±0.43	3.58±0.22

表3 有害元素含量(以干基计, mg/kg)  
Tab.3 The content of harmful elements (in dry basis, mg/kg)

元素 Elements	头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
铅 Pb	0.46±0.14	0.21±0.01	0.20±0.02	0.53±0.07
无机砷 iAs	0.14±0.01	0.15±0.03	0.16±0.02	0.14±0.01

### 2.3 水解氨基酸与游离氨基酸组成

由表4可知, 在水解氨基酸种类上, 靖海湾条斑紫菜中含量较高的氨基酸依次为 Ala、Glu、Asp、Arg 和 Val。随着收割期次的增加, 必需氨基酸(EAA)、非必需氨基酸(NEAA)含量及氨基酸(AA)总量逐渐降低; 头水、二水紫菜与四水、六水紫菜的 EAA、NEAA 含量及 AA 总量间存在显著差异( $P<0.05$ )。

游离氨基酸是影响水产品滋味的重要成分之一。从表5可以看出, 头水紫菜和二水、四水、六水紫菜的鲜味游离氨基酸总量存在极显著差异( $P<0.01$ )。紫

菜中含量较高的鲜味游离氨基酸依次为 Ala、Glu、Asp。Glu 和 Asp, 是典型的呈鲜味氨基酸, 头水紫菜的游离 Glu 和 Asp 含量均极显著高于二水、四水和六水紫菜( $P<0.01$ )。

### 2.4 呈味核苷酸含量

核苷酸及其关联化合物是影响水产品滋味的另一类重要成分, 其中, 鸟嘌呤核苷酸(GMP)、次黄嘌呤核苷酸(IMP)和腺嘌呤核苷酸(AMP)是典型的呈鲜味的核苷酸(Fuke *et al*, 1996)。呈味核苷酸含量见表6,

表 4 水解氨基酸组成(以干基计, g/100 g)  
Tab.4 Hydrolytic amino acid composition(in dry basis, g/100 g)

氨基酸 Amino acids	头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
天冬氨酸 Asp	3.95±0.13 <sup>a</sup>	3.87±0.22 <sup>a</sup>	3.32±0.20 <sup>b</sup>	2.59±0.11 <sup>c</sup>
苏氨酸 Thr*	2.38±0.19 <sup>a</sup>	2.27±0.17 <sup>a</sup>	2.15±0.17 <sup>b</sup>	1.66±0.08 <sup>c</sup>
丝氨酸 Ser	1.96±0.09 <sup>a</sup>	1.83±0.12 <sup>a</sup>	1.66±0.13 <sup>b</sup>	1.33±0.06 <sup>c</sup>
谷氨酸 Glu	5.25±0.17 <sup>a</sup>	4.29±0.29 <sup>b</sup>	3.75±0.23 <sup>c</sup>	2.70±0.15 <sup>d</sup>
甘氨酸 Gly	2.33±0.08 <sup>a</sup>	2.33±0.13 <sup>a</sup>	2.18±0.11 <sup>a</sup>	1.68±0.10 <sup>b</sup>
丙氨酸 Ala	6.29±0.11 <sup>a</sup>	5.23±0.15 <sup>b</sup>	4.53±0.19 <sup>c</sup>	2.88±0.13 <sup>d</sup>
缬氨酸 Val*	2.60±0.15 <sup>a</sup>	2.34±0.23 <sup>b</sup>	2.12±0.09 <sup>b</sup>	1.64±0.12 <sup>c</sup>
蛋氨酸 Met*	0.72±0.04 <sup>a</sup>	0.43±0.10 <sup>b</sup>	0.40±0.03 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>c</sup>
异亮氨酸 Ile*	1.64±0.12 <sup>a</sup>	1.50±0.09 <sup>b</sup>	1.48±0.14 <sup>b</sup>	1.16±0.10 <sup>c</sup>
亮氨酸 Leu*	3.27±0.05 <sup>a</sup>	3.11±0.17 <sup>a</sup>	2.86±0.24 <sup>b</sup>	2.11±0.32 <sup>c</sup>
酪氨酸 Tyr	1.79±0.09 <sup>a</sup>	1.51±0.05 <sup>b</sup>	1.37±0.16 <sup>b</sup>	1.14±0.04 <sup>c</sup>
苯丙氨酸 Phe*	1.78±0.11 <sup>a</sup>	1.60±0.19 <sup>b</sup>	1.64±0.08 <sup>b</sup>	1.25±0.09 <sup>c</sup>
赖氨酸 Lys*	2.39±0.17 <sup>a</sup>	2.24±0.07 <sup>a</sup>	2.06±0.12 <sup>b</sup>	1.48±0.12 <sup>c</sup>
组氨酸 His	1.00±0.14 <sup>a</sup>	1.01±0.05 <sup>a</sup>	1.06±0.08 <sup>a</sup>	0.69±0.05 <sup>b</sup>
精氨酸 Arg	2.67±0.11 <sup>a</sup>	2.59±0.13 <sup>a</sup>	2.15±0.17 <sup>b</sup>	1.54±0.15 <sup>c</sup>
脯氨酸 Pro	0.99±0.03 <sup>a</sup>	1.11±0.03 <sup>b</sup>	1.07±0.07 <sup>b</sup>	0.80±0.03 <sup>c</sup>
Σ EAA	14.78±0.83 <sup>a</sup>	13.49±1.02 <sup>a</sup>	12.11±0.87 <sup>b</sup>	9.26±0.84 <sup>c</sup>
Σ NEAA	26.23±0.95 <sup>a</sup>	23.77±1.17 <sup>b</sup>	20.1±1.14 <sup>c</sup>	14.77±0.82 <sup>d</sup>
Σ AA	41.01±1.78 <sup>a</sup>	37.26±2.19 <sup>a</sup>	32.21±2.01 <sup>b</sup>	24.03±1.66 <sup>c</sup>
Σ EAA/Σ AA	36.04%	36.21%	37.60%	38.54%
Σ EAA/Σ NEAA	56.35%	56.75%	60.25%	62.69%

注: \*: 必需氨基酸; Σ EAA: 必需氨基酸总量; Σ NEAA: 非必需氨基酸总量; Σ AA: 氨基酸总量

Note: \*: Essential amino acids; Σ EAA: Total essential amino acids; Σ NEAA: Non-essential amino acids; Σ AA: Total amino acids

表 5 鲜味游离氨基酸含量(以干基计, mg/100 g)  
Tab.5 The content of free flavor amino acid (in dry basis, mg/100 g)

氨基酸 Amino acids	头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
天冬氨酸 Asp	380.90±1.52 <sup>a</sup>	239.88±1.33 <sup>b</sup>	125.92±1.40 <sup>c</sup>	30.02±0.62 <sup>d</sup>
谷氨酸 Glu	1242.39±2.15 <sup>a</sup>	852.11±1.97 <sup>b</sup>	860.44±1.45 <sup>b</sup>	450.42±0.23 <sup>c</sup>
甘氨酸 Gly	20.99±0.43 <sup>a</sup>	18.77±0.21 <sup>b</sup>	20.99±0.24 <sup>a</sup>	6.83±0.47 <sup>c</sup>
丙氨酸 Ala	2400.84±3.09 <sup>a</sup>	1503.96±2.71 <sup>b</sup>	1500.53±2.13 <sup>b</sup>	544.49±1.51 <sup>c</sup>
酪氨酸 Tyr	14.69±0.40 <sup>a</sup>	12.52±0.23 <sup>b</sup>	10.49±0.31 <sup>c</sup>	4.52±0.28 <sup>c</sup>
苯丙氨酸 Phe	13.64±0.37 <sup>a</sup>	14.60±0.34 <sup>a</sup>	12.23±0.25 <sup>b</sup>	6.66±0.19 <sup>b</sup>
总量 Total	4073.45±7.96 <sup>a</sup>	2641.84±6.79 <sup>b</sup>	2528.86±5.78 <sup>c</sup>	1042.94±3.30 <sup>d</sup>

表 6 呈味核苷酸含量(干基计, mg/100 g)  
Tab.6 The contents of flavor nucleotide (in dry basis, mg/100 g)

核苷酸 Nucleotide	头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
AMP	21.45±0.21 <sup>a</sup>	21.70±1.76 <sup>a</sup>	19.96±0.73 <sup>a</sup>	12.72±0.51 <sup>b</sup>
IMP	108.47±2.45 <sup>a</sup>	118.89±1.98 <sup>b</sup>	57.54±1.29 <sup>c</sup>	61.06±1.63 <sup>c</sup>
GMP	18.09±0.25 <sup>a</sup>	24.17±0.32 <sup>b</sup>	17.39±0.56 <sup>a</sup>	12.75±0.44 <sup>c</sup>

头水、二水紫菜与四水、六水紫菜中呈味核苷酸总量之间存在显著差异( $P<0.05$ ), 二水紫菜中 GMP、IMP 和 AMP 含量最高。

## 2.5 鲜味评价

鲜味是水产品最重要的滋味特征, 通常用 TAV 和 EUC 进行评价。其中, TAV 被广泛用来对食品的滋味强度进行判定, 以及评价某一组分对整体风味的

贡献(曹荣等, 2018)。当化合物 TAV $<1$  时, 该呈味物质对整体滋味作用不明显; 当 TAV $>1$  时, 该呈味物质对整体滋味有重要贡献, 且值越高, 贡献度越大。呈现鲜味的化合物主要有游离氨基酸(Glu、Asp)和核苷酸(AMP、IMP、GMP)等。上述 5 种化合物的阈值及 TAV 见表 7。其中, Glu 对条斑紫菜鲜味的贡献最为突出, 其次是 IMP、Asp 和 GMP, AMP 对鲜味的贡献最小。

表 7 滋味活性物质含量及 TAV  
Tab.7 Taste-active compounds and their TAV values

化合物 Compound	阈值 Threshold value(mg/100 ml)	TAV			
		头水紫菜 Laver of first harvest	二水紫菜 Laver of second harvest	四水紫菜 Laver of fourth harvest	六水紫菜 Laver of sixth harvest
Glu	30	41.41	28.40	28.68	15.01
Asp	100	3.81	2.40	1.26	1.00
GMP	12.5	1.45	1.93	1.39	1.02
IMP	25	4.34	4.76	2.30	2.44
AMP	50	0.43	0.43	0.40	0.25

不同滋味化合物之间的交互作用也是呈味的关键因素之一。当呈味核苷酸与鲜味氨基酸并存时, 产生协同效应, 带来强烈的鲜味(Maehashi *et al*, 1999), 这种协同效应可以用 EUC 来衡量(杨欣怡等, 2016)。头水、二水、四水和六水条斑紫菜的 EUC(以干基计)依次为 239.71、190.03、108.05 和 51.56 g MSG/100 g。根据水分含量换算成鲜品 EUC 分析发现, 头水和二水紫菜的 EUC 高于脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) (12.98 g MSG/100g) 和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (13.43 g MSG/100g) 的 EUC 值, 鲜味度高(曹荣等, 2018; 翁丽萍等, 2015), 这与收割前期的紫菜食用时口感鲜美的结论一致。

## 3 结论

靖海湾条斑紫菜中蛋白质含量丰富, 头水和二水紫菜的蛋白质含量明显高于四水和六水紫菜, 脂肪含量较低。头水、二水紫菜与四水、六水紫菜的必需氨基酸及氨基酸总量间存在显著差异( $P<0.05$ )。常量元素以 P 含量最低, K 含量最高, K 含量约为  $2.59\times 10^4\sim 5.52\times 10^4$  mg/kg; 微量元素中 Fe 含量最高, Zn 次之, Co 最低; Pb 含量明显低于 GB 2762-2017 的限量要求。游离谷氨酸(Glu)和次黄嘌呤核苷酸(IMP)对条斑紫菜的鲜味起主要贡献作用, 头水、二水、四水和六水条斑紫菜的 EUC(以干基计)依次为 239.71、190.03、108.05 和 51.56 g MSG/100 g, 具备理想的鲜味特征。

## 参 考 文 献

- Cao R, Zhao L, Sun HH, *et al*. Nutritional characteristics and umami assessment of *Euphausia superba* and *Exopalaemon carinicauda*. Food Science, 2018, 39(4): 149–153 [曹荣, 赵玲, 孙慧慧, 等. 南极磷虾(*Euphausia superba*)与脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)营养学特征分析及鲜味评价. 食品科学, 2018, 39(4): 149–153]
- Chen BL, Lin YX, Huang J. Nutritional evaluation of *Porphyra haitanensis*. Chinese Journal of Marine Drugs, 2001, 80(2): 51–53 [陈必链, 林跃鑫, 黄键. 坛紫菜的营养评价. 中国海洋药物, 2001, 80(2): 51–53]
- Fuke S, Ueda Y. Interactions between umami and other flavor characteristics. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(12): 407–411
- Gong J, Tao NP, Gu SQ. Overview of umami substance in food and its detection methods. China Condiment, 2014, 39(1): 129–135 [龚骏, 陶宁萍, 顾赛麒. 食品中鲜味物质及其检测研究方法概述. 中国调味品, 2014, 39(1): 129–135]
- Hu CM, Lu QQ, Zhang MR, *et al*. Change characteristics of free amino acid composition and content in harvest time of different strain *Porphyra yezoensis*. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(7): 334–337 [胡传明, 陆勤勤, 张美如, 等. 不同品系条斑紫菜采收期游离氨基酸组成与含量变化特征. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 334–337]
- Ji MH, Pu SZ, Niu ZQ. The amino acid content change of *Porphyra yezoensis* in different sea region. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1981, 12(6): 522–529 [纪明侯, 蒲淑珠, 牛仁庆. 不同海区生长的条斑紫菜的氨基酸含量变化. 海洋与湖沼, 1981, 12(6): 522–529]

- Li XL, Wang WJ, Liang ZR, *et al.* Antioxidant physiological characteristics of wild *Pyropia yezoensis* under desiccation stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 156–163 [李晓蕾, 汪文俊, 梁洲瑞, 等. 野生条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)叶状体对干出胁迫的抗氧化生理响应特征. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 156–163]
- Maehashi K, Matsuzaki M, Yamamoto Y, *et al.* Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63(3): 555–559
- Min J, Xu AD, Zhu YP. The way and countermeasure to realize organic production of *Porphyra yezoensis*. *China Fisheries*, 2008(7): 60–61 [闵建, 许爱东, 朱亚平. 实现条斑紫菜有机化生产的途径和对策. *中国水产*, 2008(7): 60–61]
- Shang DR, Zhao YF, Ning JS, *et al.* Arsenic species variation in the different growth cycles and enrichment effect of arsenic in *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1519–1523 [尚德荣, 赵艳芳, 宁劲松, 等. 条斑紫菜在不同生长周期砷形态变化规律及其对砷的富集效应. *水产学报*, 2011, 35(10): 1519–1523]
- Song HP, Yu J, Li Z, *et al.* The antibacterial activity of peptides from *Porphyra yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 140–145 [宋惠平, 于佳, 李钊, 等. 条斑紫菜蛋白酶解多肽的抑菌活性. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 140–145]
- Sun YF, Li Q, Jiang ZG, *et al.* Study on determination of 34 elements in peanuts by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2012, 31(6): 108–112 [孙耀帆, 李群, 江志刚, 等. 电感耦合等离子体质谱法测定花生中 34 种元素. *分析试验室*, 2012, 31(6): 108–112]
- Wang Y, Zhang CH, Ge Y. Comparison study of 12 elemental concentrations in different *Porphyra* Products. *Guangdong Trace Elements Science*, 2012, 19(9): 14–19 [王亚, 张春华, 葛滢. 不同紫菜产品中 12 种元素含量的比较研究. *广东微量元素科学*, 2012, 19(9): 14–19]
- Weng LP, Zhao Y, Chen FD, *et al.* Study on the taste compounds and the contributions to taste of cultured large yellow croaker. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(3): 82–85, 90 [翁丽萍, 赵芸, 陈飞东, 等. 养殖大黄鱼滋味成分及其呈味贡献的研究. *食品工业科技*, 2015, 36(3): 82–85, 90]
- Yang XY, Song J, Zhao Y, *et al.* Analysis and evaluation of flavor components in meat of sea cage-cultured *Trachinotus ovatus*. *Food Science*, 2016, 37(8): 131–135 [杨欣怡, 宋军, 赵艳, 等. 网箱海养卵形鲳鲹肌肉中呈味物质分析评价. *食品科学*, 2016, 37(8): 131–135]
- Yao HQ, Wang FJ, Liu FL, *et al.* Chemical analysis and nutritional assessment of new varieties of *Saccharina japonica*. *Food Science*, 2016, 37(12): 95–98 [姚海芹, 王飞久, 刘福利, 等. 食用海带品系营养成分分析与评价. *食品科学*, 2016, 37(12): 95–98]
- Yao XC, Qiu CJ, Mu CL. The study in the nutrition content and seasonal change of *Porphyra yezoensis*. *Aquaculture*, 2002(5): 34–35 [姚兴存, 邱春江, 穆春林. 条斑紫菜营养成分与季节变化研究. *水产养殖*, 2002(5): 34–35]
- Ying MM, Shi WZ, Pan F. Nutrient content analysis of laver in different harvest time. *Zhejiang Agriculture Science*, 2009(6): 1227–1228 [应苗苗, 施文正, 潘峰. 紫菜不同收割期营养成分的分析. *浙江农业科学*, 2009(6): 1227–1228]
- Yokoyama Y, Sakaguchi M, Kawai F, *et al.* Changes in concentration of ATP-related compounds in various tissues of oyster during ice storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(11): 2125–2136
- Zeng FJ, Jiang LJ, Xu XZ, *et al.* The amino acid composition and nutritional value of *Porphyra haitanensis* and *Porphyra yezoensis* of China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1991, 22(6): 590–593 [曾繁杰, 蒋丽金, 徐绣璋, 等. 中国坛紫菜和条斑紫菜中的氨基酸组成和营养价值的研究. *海洋与湖沼*, 1991, 22(6): 590–593]
- Zhong M, Zhang R. The main nutritional components change of *Porphyra yezoensis* in different harvest time. *China Feed*, 2003(23): 30–31 [仲明, 张锐. 条斑紫菜不同采收期主要营养成分变化情况. *中国饲料*, 2003(23): 30–31]

(编辑 马瑾艳)

## Nutritional Analysis and Umami Assessment of *Pyropia yezoensis* from Jing Bay

ZHAO Ling<sup>1</sup>, CAO Rong<sup>1</sup>, WANG Lianzhu<sup>1</sup>, LIU Qi<sup>1①</sup>, CHEN Shaofan<sup>2</sup>, FU Pengfei<sup>2</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Weihai Crown Marine Science & Technology Co., Ltd., Wendeng 264400)

**Abstract** *Pyropia yezoensis* at different harvest times were obtained from Jing Bay, and its nutritional and umami characteristics were analyzed. Crude protein, crude fat, ash, inorganic elements, and amino acid composition were determined to analyze its nutritional characteristics. Free amino acids and flavor nucleotides were determined to calculate the taste active value (TAV) and equivalent umami concentration (EUC), which indicated the umami of *P. yezoensis*. The results showed that *P. yezoensis* from Jing Bay had high protein and low fat content. The protein content exceeded 49% in the first and second harvest, indicating that the *P. yezoensis* had higher nutritional value in the early stage of the harvest. The K content was the highest among the constant elements, while the P content was the lowest. Fe content was the highest among the trace elements; Zn content was higher, and Co content was the lowest. Pb content was significantly lower than the limited requirements of GB 2762-2017. There were significant differences between *P. yezoensis* from the first, second harvest and the fourth, sixth harvest in terms of essential and total amino acid content ( $P < 0.05$ ). Glutamic acid and hypoxanthine nucleotide played a major role in the umami contribution; the Equivalent umami concentration (in dry basis) of *P. yezoensis* in the first, second, fourth, and sixth harvests was 239.71, 190.03, 108.05, and 51.56 g MSG/100 g, respectively. *P. yezoensis* from Jing Bay has high nutritional values and desirable umami characteristics in the early stage of harvest, and thus, has great market potential.

**Key words** *Pyropia yezoensis*; Nutrient; Umami

① Corresponding author: LIU Qi, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171121001

http://www.yykxjz.cn/

吕芳, 郭文, 丁刚, 刘玮, 詹冬梅, 吴海一. 中国近海铜藻 *ITS* 与 *coxI* 序列相似性分析. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 141–146  
Lü F, Guo W, Dind G, Liu W, Zhan DM, Wu HY. Analysis of the similarity of *ITS* and *cox I* sequences of *Sargassum horneri* along the offshore of China. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 141–146

## 中国近海铜藻 *ITS* 与 *coxI* 序列相似性分析\*

吕 芳<sup>1,2</sup> 郭 文<sup>1</sup> 丁 刚<sup>1,2</sup> 刘 玮<sup>1,2</sup> 詹冬梅<sup>1,2</sup> 吴海一<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104; 2. 青岛市大型海藻工程技术研究中心 青岛 266104)

**摘要** 本研究分别对 2016 和 2017 年中国近海 10 个铜藻(*Sargassum horneri*)漂浮地理种群以及 3 个定生种群的 51 个采集样本进行了 *ITS* 和 *coxI* 序列分析及相似性比对。结果显示, 51 个样本的 *coxI* 序列完全一致, *ITS* 序列存在 2 个变异位点, 按基因型的异同可分为 4 个类型, 其中大连龙王塘、烟台大钦岛和南隍城岛的漂浮铜藻基因型相同, 青岛金沙滩漂浮型、烟台大钦岛和大连獐子岛的定生铜藻基因型相同, 威海俚岛和温州洞头的漂浮铜藻基因型相同, 青岛雕塑园、王哥庄、大珠山、威海乳山的漂浮型和枸杞岛定生铜藻基因型相同, 而同一种群内部即便是不同年份的个体间基因型并没有差异。基于 *ITS* 序列构建的系统树显示, 来自中国的所有铜藻样本聚为一支, 与来自韩国的铜藻样本有一定的遗传距离。以上结果说明, 我国近海漂浮和定生铜藻的不同地理株间 *ITS* 和 *coxI* 的遗传变异水平较低, 漂浮铜藻可能具有不同的来源, 为进一步探明中国近海海域铜藻的分子遗传背景提供依据。

**关键词** 铜藻; 漂浮; 定生; *ITS*; *coxI*; 序列相似性

**中图分类号** S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0141-06

铜藻 *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh 属于褐藻门、墨角藻目、马尾藻属, 大多生长在低潮带深沼中或大干潮线下 4 m 处的岩石上, 是中国沿海海藻场的重要组成部分(曾奎奎等, 2000)。铜藻是一种重要的经济海藻, 对海水中的富营养化物质具有较强的生物吸附能力, 具有重要的生态价值; 铜藻富含岩藻黄素、褐藻胶、褐藻多酚等生物活性物质, 使其在医药保健、生物制品以及化学工业等领域也极具开发潜力(Liu *et al.*, 2012; 詹冬梅等, 2016)。2007 年以来, 黄海海域连年暴发大规模的浒苔绿潮, 其中还夹着一些漂浮铜藻(蔡永超等, 2014; 陈军等, 2016), 尤其是 2017 年绿潮灾害中漂浮铜藻的生物量显著高于往年同期, 局部海域漂浮的铜藻可达浒苔数量的 20%, 形

成“马尾藻金潮”(http://news.xinhuanet.com/2017-06/17/c\_1121162366.htm)。漂浮铜藻的过量繁殖, 会在水面织成一张网, 导致底层养殖的鱼虾缺氧, 使水体环境恶化, 影响养殖环境。此外, 漂浮的铜藻还会缠绕堆积在紫菜和海带的养殖筏架上, 对筏架养殖造成一定影响(http://www.js.xinhuanet.com/2017-01/11/c\_1120284277.htm)。漂浮铜藻的出现进一步加大了山东半岛绿潮防治的难度, 也成为一种新的灾害现象。目前, 国内外研究主要集中在对绿潮浒苔的溯源和防控等方面(汪文俊等, 2008; 刘峰等, 2012; 王广策等, 2016), 漂浮铜藻的来源及暴发原因到目前尚没有明确的认识, 尚需多方寻求论证。

DNA 分子标记技术已被广泛用于物种鉴定以及

\* 海洋公益性行业科研专项经费项目(201505022)和山东省农业重大应用技术创新项目共同资助[This work was supported by the Public Science and Technology Research Fund Projects of Ocean (201505022), and Agricultural Application Technology Innovation Project of Shandong]. 吕 芳, E-mail: lvfang8254@163.com

① 通讯作者: 吴海一, 研究员, E-mail: wuhaiyi1997@163.com

收稿日期: 2017-11-21, 收修改稿日期: 2017-12-18



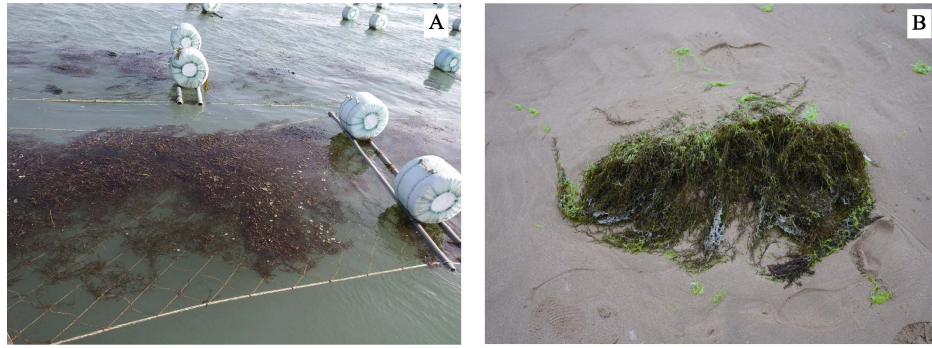


图 1 2017 年威海俚岛湾养殖区紫菜养殖筏架上的铜藻(A)和青岛金沙滩海岸上堆积的铜藻(B)

Fig 1 *S. horneri* on *Porphyra* rafts of Lidao aquaculture area (A) and accumulated on the coast of Golden Beach of Qingdao (B) in 2017

属内种间和不同地理株间的分子系统演化关系等研究(Lane *et al.*, 2007; Kucera *et al.*, 2008; Mcdevit *et al.*, 2009)。尽管铜藻不同地理种群的系统发生研究已有一些相关报道(Hu *et al.*, 2011; 蔡一凡等, 2013), 但由于不同的 DNA 序列进化速率不同, 往往会导致研究结果存在差异, 因此, 进一步选择合适的分子标记以及地理范围分布更广的不同居群进行分析, 可为铜藻的系统发育、遗传多样性分析等提供新的佐证。

本研究分别从我国东海、黄海、渤海等不同海域采集铜藻样品, 通过对其核糖体内转录间隔区 *ITS* (Internal transcribed spacer)和线粒体 *coxI* (细胞色素 c 氧化酶亚基 I)序列进行扩增、测序和分析, 旨在研究我国近海海域铜藻的分子遗传背景以及不同海域漂浮铜藻和野生铜藻的相互关系, 为铜藻的生物地理学研究提供新的证据, 进而为漂浮铜藻的溯源、分布范围和漂移路线的监测等工作提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

铜藻是一种潮下带的大型褐藻, 定生于海底岩礁上, 近年来, 由于海洋生态环境的改变, 铜藻资源不断衰退, 因此, 定生的铜藻种群已很难采集到。本研究所用定生和漂浮铜藻样品采集自中国东海、黄海和渤海海区(表 1), 其中, 定生铜藻种群采集自舟山、烟台和大连 3 个地区, 10 个漂浮铜藻种群采集自温州、青岛、威海、烟台和大连等地区。样品采集后用低温箱迅速运回实验室, 藻体用海水反复冲洗, 去除泥沙及杂质, 然后用消毒海水清洗干净, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2 基因组 DNA 制备

实验采用 TIANGEN 新型植物基因组 DNA 提取

表 1 铜藻样品采集信息

Tab.1 Information of *S. horneri* samples

样品编号 No. of samples	采集地点 Sampling site	生态类型 Ecological type	采集时间 Sampling time	样本数 Number
DT	温州洞头 Wenzhou Dongtou	漂浮 Free-floating	2016-05-10	2
GQD-DS	舟山枸杞岛 Zhoushan Gouqi Island	定生 Benthic	2016-06-05 2017-05-08	4 4
DZS	青岛大珠山 Qingdao Dazhushan	漂浮 Free-floating	2017-07-02	4
JST	青岛金沙滩 Qingdao Golden Beach	漂浮 Free-floating	2017-07-09	4
DSY	青岛雕塑园 Qingdao Sculpture Garden	漂浮 Free-floating	2017-06-28	1
WGZ	青岛王哥庄 Qingdao Wanggezhuang	漂浮 Free-floating	2017-06-25	4
RS	威海大乳山 Weihai Darushan	漂浮 Free-floating	2017-07-17	4
LD	威海俚岛 Weihai Lidao	漂浮 Free-floating	2016-09-22 2017-10-07	4 4
DQD	烟台大钦岛 Yantai Daqin Island	漂浮 Free-floating	2017-08-09	2
NHC	烟台南隍城岛 Yantai Nanhuangcheng Island	漂浮 Free-floating	2017-08-09	2
NHC-DS	烟台南隍城岛 Yantai Nanhuangcheng Island	定生 Benthic	2016-06-13	6
LWT	大连龙王塘 Dalian Longwangtang	漂浮 Free-floating	2016-03-15	2
ZZD-DS	大连獐子岛 Dalian Zhangzi Island	定生 Benthic	2017-08-17	4

试剂盒(DP320)提取铜藻样品的基因组 DNA, 具体步骤参照说明书。提取的 DNA 经 1%琼脂糖电泳检测, 紫外分光光度计定量后, 置于-20℃保存备用。

### 1.3 *ITS* 和 *coxI* 序列的扩增

为了获得尽可能长的 *ITS* 序列, 分别扩增 2 段 *ITS* 片段, 然后进行拼接。其中, 5.8S rDNA-*ITS* 序列的扩增参考 White 等(1990), 引物序列为 *ITS5* 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3'; *ITS4* 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。扩增程序为 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 48℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 总 35 个循环; 72℃延伸 10 min。完整 *ITS2* 序列的扩增参考 Yoshida 等(2000), 引物序列为 BFF 5'-CGATGAAGAACGCAGCGAAATG-CGAT-3'; 25BR2R 5'-TCCTCCGCTTAGTATATGCTTAA-3'。扩增程序为 93℃预变性 1 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 总 35 个循环; 72℃延伸 10 min。

*coxI* 序列的扩增参考 Lane 等(2007), 引物序列为 GazF2: 5'-CCAACCAAAAAGATAT-WGGTAC-3'; GazR2: 5'-GGATGACCAAARAACCAAAA-3'。扩增程序为 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 38 个循环; 72℃延伸 10 min。

PCR 反应体系均为 25 μl, 包含 *Taq* PCR Master mix (BBI, 加拿大) 12.5 μl, 上、下游引物(20 μmol/L) 各 1.0 μl, 模板 DNA 20 ng。

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增成功的 PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司进行正反向测序。

### 1.4 数据分析

用 DNASTar-Editseq 软件和 Chromas 软件对测序结果进行分析、校正, 然后将拼接成功的序列输入到 GenBank 中进行 BLASTn 同源性分析, 再用 Clustal X1.83 软件对序列进行比对分析。用 MEGA 6.06 软件 Kimura 2-parameter 模型计算不同铜藻样品间的遗传分化距离, 构建系统树, Bootstrap 方法进行 1000 次重抽样估计系统树中节点的置信值, 以羊栖菜 (*Sargassum fusiforme*) 作为外类群。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ITS* 区序列分析

本研究中所有样品的 *ITS* 序列长度均为 1506 bp, 包括部分 *ITS1*、完整的 5.8S rDNA 和完整的 *ITS2* 序

列, 其中, *ITS1* 序列长度为 765 bp, 5.8S rDNA 长度为 159 bp, *ITS2* 序列长度为 582 bp, 同一种群个体间测序结果一致。对铜藻样本单个个体的 *ITS* 的 PCR 产物进行双向测序结果显示, LD 和 DT 样本的第 1016 位点正向测序结果是 C, 反向测序结果是 T, LWT、DQD 和 NHC 样本的第 1014 位点正向测序结果是 T, 反向测序结果是 C, 这 2 个变异位点均位于 *ITS2* 区, 后续分析中以兼并碱基 Y 表示。经 ClustalX 比对分析, 结果显示, 51 个样本的 *ITS* 序列仅上述 2 个变异位点存在差异, 按基因型的异同可分为 4 个类型, 其中, LWT、DQD 和 NHC 的漂浮铜藻基因型为 “TGTGYATTTTT”; JST 漂浮型和 DQD、ZZD 的定生铜藻基因型为 “TGTGTATTTTT”, LD 和 DT 的漂浮铜藻基因型为 “TGTGCAYTTTT”, 其余几组样本基因型完全一致, 为 “TGTGCATTTTT” (表 2)。GQD-DS 和 LD 铜藻地理种群采集的是 2016 和 2017 年的样品, 相同年份和不同年份内部个体的基因型均没有差异。

表 2 铜藻 *ITS* 区变异位点  
Tab.2 Variable nucleotide sites of  
*ITS* sequences of *S. horneri*

样品编号 No. of samples	正向测序(5'~3') Forward sequencing	反向测序(5'~3') Reverse sequencing
LD*	TGTGCACTTTT	TGTGCATTTTT
LWT*	TGTGTATTTTT	TGTGCATTTTT
DT*	TGTGCACTTTT	TGTGCATTTTT
DSY	TGTGCATTTTT	TGTGCATTTTT
DZS	TGTGCATTTTT	TGTGCATTTTT
WGZ	TGTGCATTTTT	TGTGCATTTTT
JST	TGTGTATTTTT	TGTGTATTTTT
RS	TGTGCATTTTT	TGTGCATTTTT
DQD*	TGTGTATTTTT	TGTGCATTTTT
NHC*	TGTGTATTTTT	TGTGCATTTTT
GQD-DS	TGTGCATTTTT	TGTGCATTTTT
NHC-DS	TGTGTATTTTT	TGTGTATTTTT
ZZD-DS	TGTGTATTTTT	TGTGTATTTTT

\*表示正反向测序结果不一致

\* indicates inconsistent results of forward and reverse sequencing

与 NCBI 数据库中的相应序列进行比较, 发现与 3 株铜藻的相应序列仅有几个碱基差异, 相似性在 98% 以上, 其中, 藻株 *S. horneri* (序列号为 AY149998.1) 于 1994 年采自韩国江陵市海区, 藻株 *S. horneri* (序列号为 JF710312.1) 于 2008 年采自中国沿海, 藻株 *S. horneri* (序列号为 AY149999.1) 于

1994年采自韩国仁川市海区。

将文献中报道的浙江沿海铜藻样本的2种基因型DT01和HKA01(蔡一凡等, 2013)、2013年绿潮暴发期间采自中国青岛近海漂浮铜藻样本QD2013(陈军等, 2016)以及NCBI数据库采自韩国的铜藻样本AY149998.1和AY149999.1遗传分化距离变异范围为0~0.0175, 不同地理株间ITS区的遗传变异水平较低。其中, AY149999.1与QD2013的遗传分化距离最大, 为0.0175; HKA01、DT01与本研究的51个样本之间的遗传分化距离均为0。

构建的系统进化树显示, 来自中国的所有铜藻样本聚为一支, 然后再与韩国江陵市海区的AY149998.1样本聚合, 而来自韩国仁川市海区AY149999.1样本则自为一支(图2)。

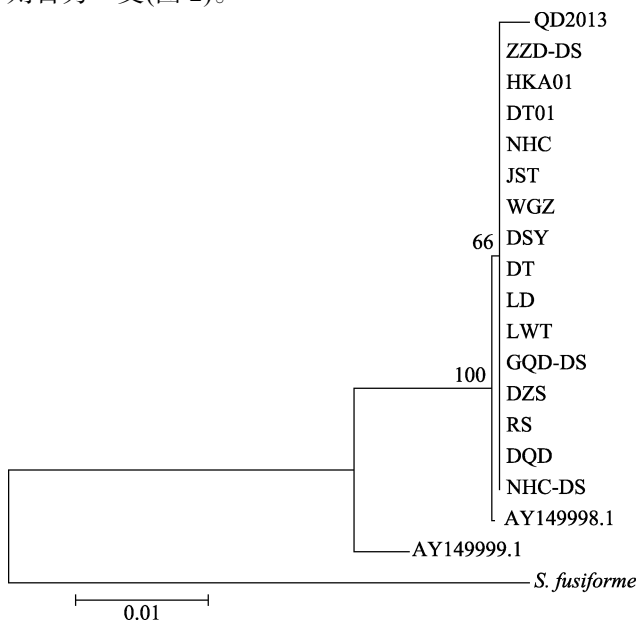


图2 基于铜藻ITS序列构建的系统进化树  
(羊栖菜作为外类群)

Fig.2 Phylogenetic tree based on ITS sequences of *S. horneri* (*S. fusiforme* as an outgroup)

## 2.2 *coxI* 序列分析

本研究中所有样品的 *coxI* 序列长度为 655 bp, 经 ClustalX 比对分析结果显示, 所有样品的 *coxI* 序列完全相同。与 NCBI 数据库中的相应序列进行比较, 发现与来自温州南麂岛小虎屿(27°27'N, 121°04'E)定生铜藻样品的相应序列(KJ938300)完全相同, 与另外2个采集地不详的铜藻(GenBank 序列号为 KC782896、JF718400)覆盖区序列的相似性在 99%以上。

## 3 讨论

利用分子标记进行铜藻不同地理种群的系统发

生研究已有一些相关报道。Hu 等(2011)基于线粒体 *Cox3* 和叶绿体 *rbcL* 基因序列对西北太平洋地区铜藻的生物地理分布及分布影响因子的研究中, 提出在中国黄渤海、东海、南海地区的洋流及沿岸流的影响下, 分布在3个海洋区系内的铜藻形成狭窄的遗传结构, 不具备明显的异质性。蔡一凡等(2013)对我国浙江沿海铜藻群体采集的样品进行 5.8S rDNA-ITS 序列分析, 表明仅有1个变异位点, 说明群体间没有明显的遗传分化, 遗传多样性较低。本研究发现, 2016和2017年的中国近海10个铜藻漂浮地理种群以及3个采集地定生种的51个样本的 *coxI* 序列完全一致, ITS 序列存在2个变异位点, 按基因型的异同可分为4个类型, 而同一地理种群相同年份和不同年份的内部个体间均没有差异。基于 ITS 序列构建的系统树显示, 来自中国的所有铜藻聚为一支, 与来自韩国的铜藻有一定的遗传距离, 说明我国近海铜藻不同地理株间 ITS 和 *coxI* 的遗传变异水平较低, 但基因型存在一定差异, 因此, 漂浮铜藻可能具有不同的来源。而 Su 等(2018)利用多态性微卫星(SSR)标记对黄海、东海13个代表性漂浮种群和3个代表性定生种群遗传结构和亲缘关系进行分析, 结果显示, 相同年份漂浮铜藻的亲缘关系相近, 而不同年份差异显著; 同一漂浮种群内部也存在遗传分化, 推测不同年份漂浮铜藻起源于不同的地点, 同一漂浮种群的个体也可能源自不同地点。由于上述文献中铜藻种群的采集地点存在差异, 所用的DNA分子标记也不同, 因此, 研究结论的不同还需要进一步分析和解析。

铜藻在温度为 7.0℃~20.5℃时, 均可以很好地生长, 在 10℃以下低温期能达到最高生长率, 且对光照的适应范围很广(孙建璋等, 2009), 因此, 铜藻对环境具有较强的适应能力, 可在中国沿海大范围的漂浮生长。2007~2017年卫星遥感的浒苔监测信息和海面风场资料分析表明, 在风场和流场作用下, 铜藻和绿潮浒苔由外长江口以北的黄海中南部漂到黄海北部(Hu, 2009; 金松等, 2016)。Komatsu 等(2007、2008)通过 GPS 定位绑有漂浮藻类的浮标观测发现, 春季到初夏期间, 中国东海区域位于黑潮锋和大陆架之间的区域常有大量漂浮铜藻出现, 进一步观察发现一处浮标可到达日本九州东侧海域, 另一处可到达韩国济州岛南端, 这也是目前关于漂浮铜藻溯源的最直接的证据。尽管铜藻在中国沿海均有分布, 但铜藻主要是浙江沿海优势种, 其中, 南麂列岛和枸杞岛是我国铜藻数量自然分布最集中的水域(孙建璋等, 2008a; 毕远新等, 2014)。由于夏季东黄海盛行东南季风, 在东南季风影响下, 黄海表层海流基本上是由南向北流

动,在黄海沿岸外侧海域,是由东南向西北方向流动(梁兼霞等,2005),而表层流的流向决定海洋中漂浮海藻漂流方向。另外,本研究发现,威海俚岛和温州洞头的漂浮铜藻样本具有相同的 ITS 序列,青岛雕塑园、王哥庄、大珠山、威海乳山的漂浮铜藻和枸杞岛的定生铜藻样本具有相同的 ITS 序列,因此,推测山东沿海漂浮铜藻的源头之一可能在南黄海,在风浪和海流的作用下飘到黄海北部,部分在青岛和威海等地的海岸堆积,部分缠绕在养殖筏架上常年漂浮生长。

孙建璋等(2008b)研究表明,铜藻自然种群的繁衍以有性生殖为主,残枝营养繁殖藻株约占种群藻株总数的5%,但随着海洋污染加剧和海洋环境的变化,天然铜藻海藻场的面积不断缩小(孙建璋等,2008a)。Su等(2018)研究发现,2013年近岸海域人工混凝土礁区采集的漂浮铜藻与2016年该区域发现的定生铜藻的亲缘关系较近,认为向北漂浮的铜藻能够完成生殖过程并在漂移的路径上形成定生的种群。2015~2017年,连续3年跟踪监测威海俚岛海区的漂浮铜藻,发现其形成成熟的有性生殖器官——生殖托的藻株数量不超过种群藻株总数的5%,漂浮铜藻主要通过断枝(Fragmentation)进行营养繁殖,因此,这可能是增加该藻资源量的一条有效途径,在一定程度上可为铜藻产业的发展提供种藻供应。但是,目前我们尚未在该海区发现定生的铜藻,因此,认为漂浮铜藻是否能形成定生种群尚待进一步的实验论证。由于大型漂浮藻类受风浪和海流等多种因素的影响,其时空分布和生物量可能会经常发生变化,因此,需要密切关注它们对生态环境的影响。

致谢:本研究承蒙中国科学院海洋研究所孙忠民老师提供烟台南隍城岛和大连獐子岛铜藻样品,谨此致谢!

## 参 考 文 献

- Bi YX, Zhang SY, Wang WD, *et al.* Vertical distribution pattern of *Sargassum horneri* and its relationship with environmental factors around Gouqi Island. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(17): 4931–4937 [毕远新, 章守宇, 王伟定, 等. 枸杞岛铜藻垂直分布格局及成因分析. *生态学报*, 2014, 34(17): 4931–4937]
- Cai YC, Sun B, Ma JH, *et al.* Molecular identification of floating *Sargassum horneri* in the southern Yellow Sea. *Marine Fisheries*, 2014, 36(2): 102–106 [蔡永超, 孙彬, 马家海, 等. 我国南黄海海域漂浮铜藻的分子生物学鉴定. *海洋渔业*, 2014, 36(2): 102–106]
- Cai YF, Zhang P, Wang TG, *et al.* Genetic analysis based on 5.8S rDNA-ITS sequence of *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh in the coastal areas of Zhejiang Province, China. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2013, 21(2): 147–154 [蔡一凡, 张鹏, 王铁杆, 等. 基于 5.8S rDNA-ITS 序列的我国浙江沿海铜藻群体遗传多样性分析. *热带亚热带植物学报*, 2013, 21(2): 147–154]
- Chen J, Wang YC, Yu QR, *et al.* Molecular phylogenetic analysis of floating *Sargassum horneri* associated with green tides in coastal area of Qingdao. *Journal of Biology*, 2016, 33(1): 39–42 [陈军, 王寅初, 余秋榕, 等. 绿潮暴发期间我国青岛漂浮铜藻的分子鉴定. *生物学杂志*, 2016, 33(1): 39–42]
- Hu CM. A novel ocean color index to detect floating algae in the global oceans. *Remote Sensing of Environment*, 2009, 113(10): 2118–2129
- Hu ZM, Uwai S, Yu SH, *et al.* Phylogeographic heterogeneity of the brown macroalga *Sargassum horneri* (Fucaceae) in the northwestern Pacific in relation to late Pleistocene glaciation and tectonic configurations. *Molecular Ecology*, 2011, 20(18): 3984–3909
- Jin S, Han Z, Liu Y. A remote sensing method for discriminating *Ulva prolifera* and *Sargassum*. *Remote Sensing Information*, 2016, 31(2): 44–48 [金松, 韩震, 刘瑜. 一种区分浒苔和马尾藻的遥感方法. *遥感信息*, 2016, 31(2): 44–48]
- Komatsu T, Matsunaga D, Mikami A, *et al.* Abundance of drifting seaweeds in eastern East China Sea. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5): 801–809
- Komatsu T, Tatsukawa K, Filippi JB, *et al.* Distribution of drifting seaweeds in eastern East China Sea. *Journal of Marine Systems*, 2007, 67(3–4): 245–252
- Kucera H, Saunders GW. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Botany-Botanique*, 2008, 86(9): 1065–1079
- Lane CE, Lindstrom SC, Saunders GW. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(2): 634–648
- Liang JX, Pang CG, Bai XZ. Different methods for computation of wind-induced currents in southern Yellow Sea in summer. *Marine Science*, 2005, 29(9): 60–64, 75 [梁兼霞, 庞重光, 白学志. 夏季南黄海风漂流的不同计算方法的对比分析. *海洋科学*, 2005, 29(9): 60–64, 75]
- Liu F, Pang SJ. Research advances on green tides in the yellow sea. *Advances in Marine Science*, 2012, 30(3): 441–449 [刘峰, 逢少军. 黄海浒苔绿潮及其溯源研究进展. *海洋科学进展*, 2012, 30(3): 441–449]
- Liu L, Heinrich M, Myers S, *et al.* Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 142(3): 591–619
- Mcdevit DC, Saunders GW. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. *Phycological Research*, 2009, 57(2): 131–141
- Su L, Shan TF, Pang SJ, *et al.* Analyses of the genetic structure of *Sargassum horneri* in the Yellow Sea: Implications of the temporal and spatial relations among floating and benthic populations. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(2): 1417–1424
- Sun JZ, Chen WD, Zhuang DG, *et al.* In situ ecological studies of the subtidal brown alga *Sargassum horneri* at Nanji Island of China. *South China Fisheries Science*, 2008a, 4(3): 58–63 [孙建璋, 陈万东, 庄定根, 等. 中国南麂列岛铜藻

- Sargassum horneri* 实地生态学的初步研究. 南方水产, 2008a, 4(3): 58–63]
- Sun JZ, Zhuang DG, Chen WD, *et al.* Studies on sexual reproduction and seedling production of the brown alga *Sargassum horneri*. South China Fisheries Science, 2008b, 4(2): 6–14 [孙建璋, 庄定根, 陈万东, 等. 铜藻 *Sargassum horneri* 繁殖生物学及种苗培育研究. 南方水产, 2008b, 4(2): 6–14]
- Sun JZ, Zhuang DG, Sun QH, *et al.* Artificial cultivation trials of *Sargassum horneri* at Nanji islands of China. South China Fisheries Science, 2009, 5(6): 41–46 [孙建璋, 庄定根, 孙庆海, 等. 铜藻人工栽培的初步研究. 南方水产, 2009, 5(6): 41–46]
- Wang GC, Tang XX, He PM, *et al.* Progress of studies on the responses of the key physiological processes including photosynthesis in *Ulva prolifera* O. F. Müller to environmental factors. Plant Physiology Journal, 2016, 52(11): 1627–1636 [王广策, 唐学玺, 何培民, 等. 浒苔光合作用等关键生理过程对环境因子响应途径的研究进展. 植物生理学报, 2016, 52(11): 1627–1636]
- Wang WJ, Wang FJ, Chen SL, *et al.* PCR amplification and sequence analysis of *ITS* regions of *Enteromorpha prolifera*. Marine Fisheries Research, 2008, 29(5): 124–129 [汪文俊, 王飞久, 陈松林, 等. 浒苔 *ITS* 区的扩增和分析. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 124–129]
- White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols, 1990, 315–322
- Yoshida T, Stiger V, Horiguchi T. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. Phycological Research, 2000, 48(3): 125–131
- Zeng CK, Lu BR. Marine algal flora of China, Volume 3 Phaeophyta, No.2 Fucales. Beijing: Science Press, 2000, 43–44 [曾呈奎, 陆保仁. 中国海藻志第三卷褐藻门第二册墨角藻目. 北京: 科学出版社, 2000, 43–44]
- Zhan DM, Wang XY, Xin ML, *et al.* Nutritional constituents of three kinds of *Sargassum*. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2016, 32(3): 221–225 [詹冬梅, 王翔宇, 辛美丽, 等. 三种马尾藻的营养组成分析. 广西科学院学报, 2016, 32(3): 221–225]

(编辑 马瑾艳)

## Analysis of the Similarity of *ITS* and *cox I* Sequences of *Sargassum horneri* Along the Offshore of China

LÜ Fang<sup>1,2</sup>, GUO Wen<sup>1</sup>, DIND Gang<sup>1,2</sup>, LIU Wei<sup>1,2</sup>, ZHAN Dongmei<sup>1,2</sup>, WU Haiyi<sup>1,2</sup>①

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104;  
2. Qingdao Macroalgae Engineering Technology Research Center, Qingdao 266104)

**Abstract** Large-scale green tides have broken out annually in the Yellow Sea since 2007, which, upon twinning with floating *Sargassum horneri*, became a new hazard and increased the difficulty of preventing and controlling the green tide in Shandong Peninsula. In this study, the similarity of *ITS* and *coxI* sequences were analyzed using *S. horneri* samples collected from ten free-floating populations and three benthic populations in 2016 and 2017 along the offshore of China. The results showed that the *coxI* sequences of 51 samples were consistent, while there were two variable nucleotide sites within the *ITS* sequence. Based on genotypic differences, *S. horneri* samples could be sorted into four categories, among which the genotype of free-floating samples from Dalian Longwangtang, Daqin Island, and Nanhuangcheng Island of Yantai were identical. Free-floating samples from the Golden Beach of Qingdao and benthic samples from Daqin Island of Yantai and Zhangzi Island of Dalian were identical; free-floating samples from Lidao of Weihai and Dongtuo of Wenzhou were identical; and free-floating samples from the Sculpture Garden, Wanggezhuang, Dazhushan of Qingdao, Rushan of Weihai, and benthic samples from Gouqi Island were identical. However, there was no difference in genotype among individuals within the same population, even among those occurring in different years. A phylogenetic tree based on *ITS* sequences of *S. horneri* showed that samples from China were clustered together; however, there was some genetic distance from the Korean samples. It is possible that the genetic variation of *ITS* and *coxI* regions is low in different coastal strains of *S. horneri*, and that drifting population could be of different origins. These findings will provide a basis for further understanding of the molecular genetic background of *S. horneri* along the offshore of China.

**Key words** *Sargassum horneri*; Free-floating; Benthic; *ITS*; *coxI*; Sequence similarity

① Corresponding author: WU Haiyi, E-mail: wuhaiyi1997@163.com



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171208001

http://www.yykxjz.cn/

贡艺, 李云凯, 陈玲, 高小迪, 陈新军. 东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析与比较. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 147-154

Gong Y, Li YK, Chen L, Gao XD, Chen XJ. A comparative analysis of fatty acid profiles in muscle of *Dosidicus gigas* from different harvest locations in the eastern Pacific Ocean. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 147-154

# 东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸 组成分析与比较\*



贡 艺<sup>1</sup> 李云凯<sup>1,2,3,4,5①</sup> 陈 玲<sup>6</sup> 高小迪<sup>1</sup> 陈新军<sup>1,3,4,5</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 农业农村部大洋渔业开发重点实验室 上海 201306; 4. 国家远洋渔业工程技术研究中心 上海 201306; 5. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室 上海 201306; 6. 上海海洋大学海洋生态与环境学院 上海 201306)

**摘要** 茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)是一种广泛分布在东太平洋的大洋性头足类,具有重要的经济价值。本研究以捕获自 3 个作业海区的茎柔鱼为研究对象,对其肌肉脂肪酸含量进行测定、分析和比较。结果显示,各海区茎柔鱼肌肉脂肪酸种类和组成存在显著差异。秘鲁外海样品所含脂肪酸种类最多(共 28 种),中东太平洋赤道海域样品含有脂肪酸 27 种,而智利外海样品所含脂肪酸种类最少,只检测出 24 种。脂肪酸均以多不饱和脂肪酸为主(59.68%~69.28%),其次是饱和脂肪酸(20.71%~27.28%)和单不饱和脂肪酸(10.01%~13.04%)。各海区茎柔鱼肌肉中 C16:0、C18:0、C20:1n9、C18:2n6、EPA 和 DHA 含量较高,均占脂肪酸总含量的 81%以上。脂肪酸组成的空间异质性主要是由各海区 C16:0、C18:2n6、C20:4n6 和 DHA 的含量不同造成的,这种差异可能与各海区海洋环境、食物来源和个体能量需求的差别有关。本研究说明了脂肪酸分析在茎柔鱼食性研究中的潜在作用,对分析不同海区茎柔鱼营养成分和资源合理利用有一定的应用价值。

**关键词** 茎柔鱼; 肌肉; 脂肪酸; 比较分析

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0147-08

茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)是重要的大洋经济性头足类,广泛分布于东太平洋,资源量丰富(陈新军等, 2012a)。据 FAO (2016)统计,茎柔鱼年产量已达到经济性头足类总产量的 24%,超过 100 万 t,其作业海区包括加利福利亚湾、哥斯达黎加外海以及秘鲁与智

利的沿岸和外海。除这些传统的渔场,自 2012 年开始,中东太平洋赤道海域被开发为新的茎柔鱼渔场(陈新军等, 2012b)。茎柔鱼肉质鲜美、营养丰富,可被制作成鱼类饵料和鱼粉等产品,随着食品加工技术的发展,其胴体和腕足被加工为多种即食休闲食品

\* 国家自然科学基金(41541042)、上海市自然科学基金(17ZR1413000)、上海高校水产学一流学科建设项目和青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放基金(2017-1A03)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41541042), Natural Science Foundation of Shanghai (17ZR1413000), Shanghai Leading Academic Discipline Project (Fisheries Discipline), and Open Fund of Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2017-1A03)]. 贡 艺, E-mail: simongy@163.com

① 通讯作者: 李云凯, 副教授, E-mail: ykli@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-12-08, 收修改稿日期: 2017-12-25



(Uriarte-Montoya *et al.*, 2010; Arias-MoscOSO *et al.*, 2011; 杨宪时等, 2013)。但是, 茎柔鱼产量易受到海洋环境变化的影响, 而不同海域受影响的程度不同, 这使得各海区茎柔鱼产品价格存在波动(Markaida, 2006; Medellín-Ortiz *et al.*, 2016)。随着南太平洋区域性渔业管理组织(SPRFMO)成立, 茎柔鱼被纳入监管范围。这迫切需要我国全面了解各海区茎柔鱼的特点, 从而对其资源合理利用, 在国际谈判管理中掌握话语权。

脂肪酸是海产品的主要营养成分之一, 因其具有调节免疫力和降低心血管疾病风险等作用而受到人们的重视(Simopoulos, 2006; 李忠清等, 2016; 柳学周等, 2017)。同时, 脂肪酸作为茎柔鱼生命活动主要的能量来源之一, 与其生命过程中的生理机能具有密切的关系(Phillips *et al.*, 2001; Pethybridge *et al.*, 2013)。海洋生物脂肪酸组成会受到多种因素的影响, 其中, 摄食活动和栖息地的环境条件被认为是影响其组成的最主要因素(Iverson *et al.*, 2004; 许强等, 2011)。这使得脂肪酸成为一种具有示踪海洋生物间营养关系和溯源海产品的生物标志物。目前, 国内对茎柔鱼脂肪酸的研究主要集中在对秘鲁外海茎柔鱼肌肉和腕足的营养成分分析(杨宪时等, 2013)和食品加工领域(王丽丽等, 2014), 国外仅 Saito 等(2014)对秘鲁沿海茎柔鱼不同组织和胃含物的脂肪酸组成进行了研究, 未见针对不同海区茎柔鱼脂肪酸组成进行详细分析报道。因此, 本研究以在中东太平洋赤道海域、秘鲁外海和智利外海捕获的茎柔鱼为研究对象, 对其肌肉脂肪酸组成进行测定和比较。分析各海区茎柔鱼所含脂肪酸种类和组成的潜在差异, 并分析可能造成空间差异的主要脂肪酸种类和原因。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验样品由鱿钓船在中东太平洋赤道海域(CEP)、秘鲁外海(PER)和智利外海(CHI)3个茎柔鱼生产海区采集(图1), 样品经冷冻保存运回实验室, 于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保藏(Phillips *et al.*, 2002)。为了解不同海区茎柔鱼脂肪酸组成差异, 本研究仅选取个体大小相近的样品进行研究。共采集了44尾样品, 样品的具体情况见表1。实验室解冻后, 测定其胴长, 精确至0.1 cm。取茎柔鱼胴体漏斗锁软骨处的肌肉 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ , 去除表皮, 使用超纯水漂洗后放入冷冻干燥机(Christ Alpha 1-4) $-55^{\circ}\text{C}$ 干燥24 h, 干燥后, 用冷冻混合球磨仪(Mixer mill MM440)磨碎成粉末(直径 $5\text{ }\mu\text{m}$ )。

### 1.2 脂肪酸分析测定

**1.2.1 样品处理** 称取样品粉末 200 mg 加入 15 ml 三氯甲烷-甲醇溶液(2 : 1, v/v), 浸泡 24 h。离心后取上清液, 加入 0.9%的氯化钠溶液洗涤, 静置至溶液明显分层。取三氯甲烷层于圆底烧瓶中, 用氮气吹干后, 重量法测定干样中总脂肪含量。加入 4 ml 氢氧化钠-甲醇溶液(0.5 mol/L), 混合后连接水浴回流装置,  $60^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min。之后, 加入 4 ml 三氯化硼-甲醇溶液(14%, w/v), 水浴加热 30 min。冷却至室温, 加入 4 ml 正己烷, 震荡 2 min。再加入 10 ml 氯化钠溶液, 静置分层。正己烷层移入配有聚四氟乙烯瓶盖的厚壁玻璃管。

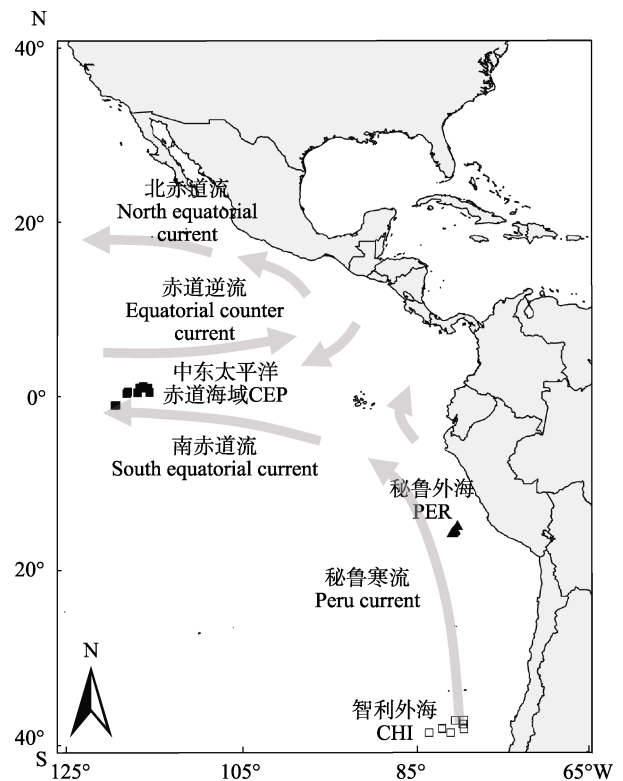


图1 茎柔鱼采样点和主要表层海流(Anderson *et al.*, 2001)

Fig.1 Sampling locations of *Dosidicus gigas* and major surface currents

**1.2.2 脂肪酸分析** 脂肪酸采用气相色谱/质谱联用仪(7890B/5977A, Agilent)进行分析。色谱条件: 毛细管柱型号为 Agilent HP-88( $60\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.20\text{ }\mu\text{m}$ ), 载气为高纯氦气, 分流比为 10 : 1, 进样口温度为 $250^{\circ}\text{C}$ 。升温程序: 初始温度为 $125^{\circ}\text{C}$ , 以 $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 $145^{\circ}\text{C}$ 并保持 26 min, 然后以 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 $220^{\circ}\text{C}$ 并保持 1 min, 最后以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 $227^{\circ}\text{C}$ 并保持 1 min。

表 1 茎柔鱼采样点、基础生物学参数和脂肪含量  
Tab.1 Sampling locations, biological parameters, and total lipids of *D. gigas*

项目 Items	中东太平洋赤道海域 Equatorial central eastern Pacific	秘鲁外海 Off Peru	智利外海 Off Chile
样本量 Sample size	16	13	15
采样时间 Sampling date	2013-04~2013-06	2015-09	2015-11
采样范围 Coordinates	115°45'W~119°00'W 1°11'N~1°00'S	79°45'W~80°21'W 14°53'S~15°22'S	79°00'W~83°00'W 37°06'S~38°30'S
胴长 Mantle length (cm)	30.3±3.6 (22.6, 42.6)	33.9±9.9 (23.8, 49.0)	35.5±3.3 (29.2, 45.0)
脂肪含量(干重) Total lipids (dry weight, %)	6.2±1.2 (3.7, 8.1)	5.9±1.6 (3.3, 7.9)	4.6±1.8 (2.7, 7.8)

注: 数值以均值±标准差(最小值, 最大值)表示

Note: Values were represented as Mean±SD (minimum, maximum)

### 1.3 数据统计

脂肪酸组成采用内标法(GLC 37, Nu-Chek Prep Inc, Elysian)进行定量分析。每种脂肪酸以占各脂肪酸总含量的百分比表示。使用 SPSS19.0 和 Past3 软件对数据进行统计分析。利用主成分分析检验不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成的空间差异。采用 Bray-Curtis 相似性系数, 以相似性分析(ANOSIM)对比海区间空间差异的大小, 并通过分析相似性百分比(SIMPER)检验造成茎柔鱼肌肉脂肪酸组成空间差异的主要脂肪酸种类。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎柔鱼肌肉脂肪含量和脂肪酸组成

本研究中, 各海区茎柔鱼的胴长( $P=0.11$ )和脂肪含量( $P=0.06$ )无显著差异(表 1)。对脂肪酸测定结果分析发现, 3 个海区茎柔鱼肌肉中所含脂肪酸种类不同, 分别检测出 24~28 种脂肪酸(表 2)。捕获自秘鲁外海(PER)的样品所含的种类最多(28 种), 包括 10 种饱和脂肪酸(SAT)、8 种单不饱和脂肪酸(MUFA)和 10 种多不饱和脂肪酸(PUFA)。而中东太平洋赤道海域(CEP)的个体未检出 C20:3n6 (PUFA)。智利外海(CHI)样品中的脂肪酸种类最少(24 种), C14:0、C15:0、C14:1n5 和 C20:3n3 均未检出。

PUFA 是茎柔鱼肌肉脂肪酸含量最高的一类。CHI 样品的 PUFA 总含量最高(69.3%), PER 样品的最低, 但也高达 59.7%, 且与 CEP 样品(61.2%)无显著差异(图 2)。C22:6n3(DHA)是 PUFA 的主要存在形式(>61.2%), 其含量以 CHI 样品最高, CEP 和 PER 样品次之, 但二者差异不显著。茎柔鱼肌肉 SAT 含量为 20.7%~27.3%, CHI 个体的 SAT 含量显著低于其

他 2 个海区(图 2)。在 3 个海区检测出的 SAT 中, 只有 C16:0 和 C18:0 含量较高, 其他种类的百分含量均较低(表 2)。C16:0 是含量最高的 SAT, 占 55.03%~63.11%。茎柔鱼肌肉中 MUFA 的含量低于 SAT 和 PUFA, 仅 10.01%~13.04%。CEP 和 PER 个体的 MUFA 高于 CHI, 而二者差异不显著(图 2)。在全部海区含量均高于 1%的脂肪酸有 10 种, 即 C16:0、C18:0、C16:1n7、C17:1n7、C18:1n9、C20:1n9、C18:2n6、C20:4n6、C20:5n3(EPA)和 DHA(表 2)。其中, 含量排在前 6 位的是 C16:0、C18:0、C20:1n9、C18:2n6、EPA 和 DHA, 这 6 种脂肪酸的总含量在 3 个海区均高达 81.1%以上。

### 2.2 茎柔鱼肌肉脂肪酸组成的空间差异

以 3 个海区茎柔鱼样品为样本单元, 仅选择在全部海区含量均高于 1%的脂肪酸为参数进行主成分分析。有 3 个主成分初始特征值>1, 方差贡献率依次为 34.69%、25.11%和 14.46%, 累计 74.26%, 表明本结果可以反映茎柔鱼肌肉脂肪酸含量的信息。

由主成分散点图可以看出(图 3), 3 个海区基本散布在不同的区域, 说明茎柔鱼脂肪酸组成在海区间存在差异。主成分 1 和 2 能较好地地区分秘鲁和智利外海样品, 但在增加主成分 3 后仍较难区分 CEP 和其他 2 个海区。结合成分矩阵结果(表 3), 对主成分 1 和 2 贡献较大的特征向量为 C18:0、C16:1n7、C17:1n7、C18:1n9、C20:1n9、C18:2n6、C20:4n6 和 C22:6n3, 说明这些脂肪酸可以体现秘鲁和智利外海样品的空间差异。

ANOSIM 显示, 各海区间茎柔鱼脂肪酸组成均存在显著差异( $P<0.05$ )。由于  $R$  值可指示各组海区间差异的大小, PER 与 CHI 的差异( $R=0.87$ )明显大于其他 2 组海区的差异(CEP 与 PER:  $R=0.18$ ; CEP 与 CHI:

表2 茎柔鱼肌肉脂肪酸组成(平均值±标准误差)  
Tab.2 Fatty acid profiles of *D. gigas* muscle tissues (Mean±SE)(%)

脂肪酸 Fatty acid		中东太平洋赤道海域 Equatorial central eastern Pacific (CEP)	秘鲁外海 Off Peru (PER)	智利外海 Off Chile (CHI)
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid	肉豆蔻酸 C14:0	0.66±0.03	0.03±0.02	nd
	十五碳酸 C15:0	1.75±0.11	0.71±0.02	nd
	棕榈酸* C16:0	14.27±0.92	15.66±0.31	13.07±0.41
	十七碳酸 C17:0	1.56±0.08	1.46±0.05	0.77±0.03
	硬脂酸* C18:0	4.70±0.11	5.55±0.16	3.51±0.19
	花生酸 C20:0	1.24±0.09	0.35±0.02	1.01±0.04
	二十一碳酸 C21:0	0.67±0.05	0.24±0.01	0.87±0.03
	二十二碳酸 C22:0	0.10±0.01	1.54±0.09	0.17±0.01
	二十三碳酸 C23:0	0.75±0.06	0.74±0.08	0.56±0.11
	二十四碳酸 C24:0	0.22±0.02	1.00±0.10	0.74±0.06
单不饱和脂肪酸 Monounsaturated fatty acid	肉豆蔻油酸 C14:1n5	1.13±0.11	0.32±0.04	nd
	十五碳一烯酸 C15:1n5	1.12±0.08	0.21±0.02	0.42±0.06
	十六碳一烯酸* C16:1n7	1.11±0.08	1.45±0.08	1.24±0.04
	十七碳一烯酸* C17:1n7	1.45±0.15	1.38±0.19	1.01±0.04
	油酸* C18:1n9	3.01±0.18	3.22±0.22	2.42±0.06
	二十碳一烯酸* C20:1n9	3.46±0.11	3.82±0.13	3.28±0.07
	芥酸 C22:1n9	1.47±0.10	0.92±0.05	0.88±0.03
	二十四碳一烯酸 C24:1n9	0.16±0.01	1.71±0.10	0.75±0.03
多不饱和脂肪酸 Polyunsaturated fatty acid	亚油酸* C18:2n6	3.41±0.24	3.85±0.23	4.57±0.16
	十八碳三烯酸 C18:3n3	0.42±0.03	1.04±0.06	1.23±0.10
	γ-亚麻酸 C18:3n6	0.77±0.06	0.81±0.11	0.95±0.11
	二十碳二烯酸 C20:2	0.95±0.06	1.03±0.05	1.30±0.04
	二十碳三烯酸 C20:3n3	1.76±0.12	1.31±0.06	nd
	二十碳三烯酸 C20:3n6	nd	1.22±0.07	0.22±0.03
	花生四烯酸* C20:4n6	6.03±0.18	2.45±0.11	6.99±0.22
	二十碳五烯酸 EPA* C20:5n3	8.81±0.21	7.85±0.14	8.10±0.19
	二十二碳二烯酸 C22:2n6	1.58±0.25	0.45±0.24	0.18±0.12
	二十二碳六烯酸 DHA* C22:6n3	37.43±1.99	39.67±0.92	45.74±0.64

注: nd: 未检出; \*: 3个海区该种脂肪酸的百分含量均大于1%

Note: nd: Not detected; \*: The amount of the fatty acid was more than 1% in all three areas

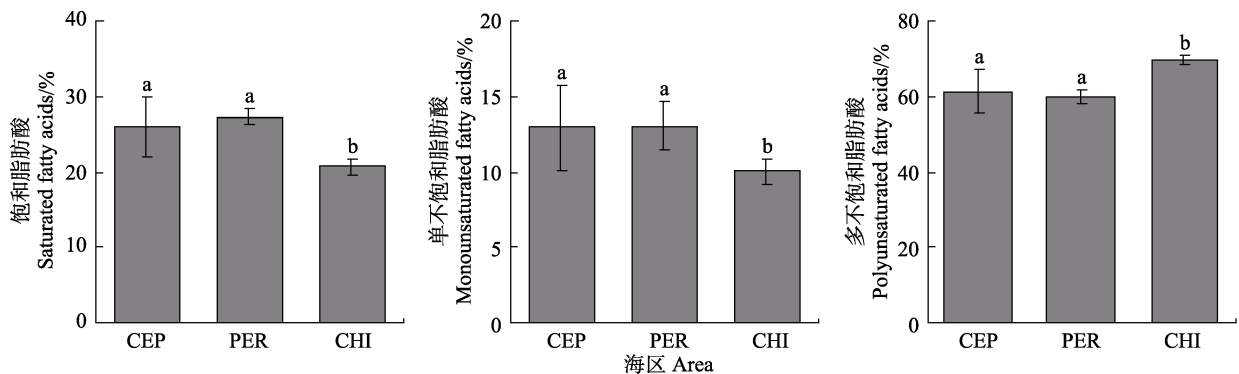


图2 不同海区茎柔鱼肌肉饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸比较(平均值±标准误差)

Fig.2 Comparison of the saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acid profiles of *D. gigas* muscle tissue in three areas (Mean±SE)

CEP: 中东太平洋赤道海域; PER: 秘鲁外海; CHI: 智利外海。不同字母表示数值存在显著差异( $P<0.05$ )

CEP: Equatorial central eastern Pacific; PER: Off Peru; CHI: Off Chile. Values with different letters were statistically different ( $P<0.05$ )

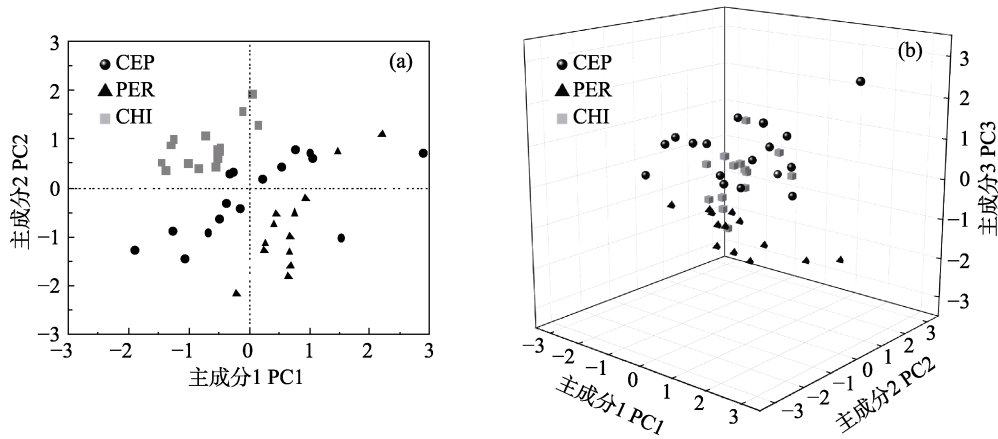


图 3 不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of the fatty acid compositions of *D. gigas* from three areas

CEP: 中东太平洋赤道海域; PER: 秘鲁外海; CHI: 智利外海  
 CEP: Equatorial central eastern Pacific; PER: Off Peru; CHI: Off Chile

表 3 主成分矩阵组成

Tab.3 Component matrix of principal components

变量 Variable	主成分 Principal component		
	1	2	3
C16:0	0.13	-0.57	-0.24
C18:0	<u>0.61</u>	<u>-0.64</u>	0.08
C16:1n7	<u>0.79</u>	0.41	-0.34
C17:1n7	<u>0.72</u>	0.19	0.15
C18:1n9	<u>0.87</u>	0.10	-0.06
C20:1n9	0.30	<u>-0.67</u>	0.17
C18:2n6	0.44	<u>0.79</u>	-0.14
C20:4n6	-0.31	<u>0.69</u>	0.51
C20:5n3	0.14	-0.10	<u>0.93</u>
C22:6n3	<u>-0.88</u>	0.00	-0.27

注: 权重>0.6 或<-0.6 以下划线表示

Note: Variable weight >0.6 or <-0.6 were underlined

R=0.33)。根据 SIMPER 分析结果, 图 4 列出了茎柔鱼肌肉主要脂肪酸种类对空间非相似性的贡献率。对 CEP 和 PER 差异贡献较大的是 C22:6n3、C16:0 和 C18:2n6, 总贡献率为 70.45%。而 CEP 与 CHI 和 PER 与 CHI 的差异主要是来自 C22:6n3、C20:4n6 和 C16:0, 总贡献率分别为 71.20%和 68.18%。

### 3 讨论

本研究对东太平洋 3 个海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析发现, 不同海区茎柔鱼所含的脂肪酸种类存在差异(表 2)。捕获自 PER 的样品共检测到 28 种, 而 CHI 的个体只有 24 种。尽管如此, 各海区茎柔鱼脂肪酸均以 PUFA 为主, 含量占比达到 59.68%~

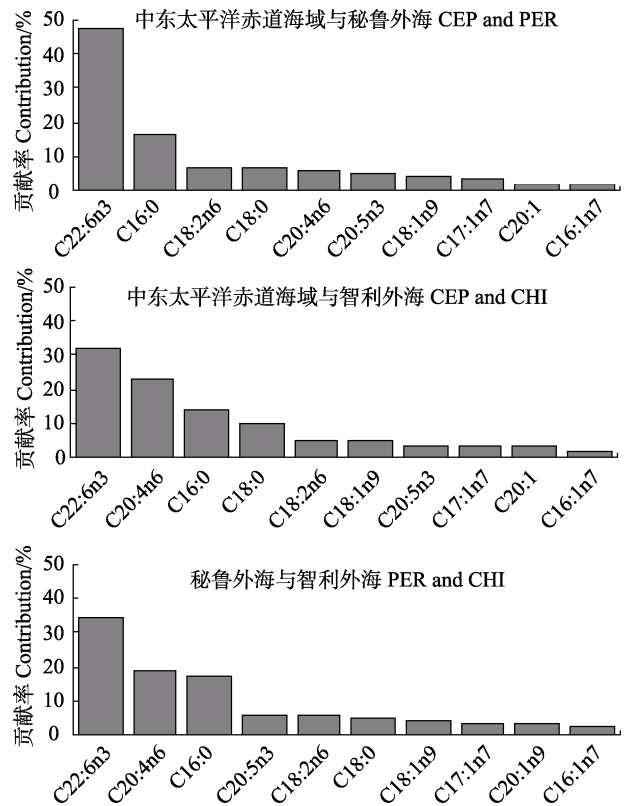


图 4 茎柔鱼肌肉各脂肪酸种类对脂肪酸组成空间差异的贡献率

Fig.4 Contribution of fatty acids in *D. gigas* muscle tissue that caused the spatial differences in SIMPER analysis

69.28%, 其次是 SFA(20.71%~27.28%) 和 MUFA (10.01%~13.04%)。该结果与杨宪时等(2013)和 Saito 等(2014)对秘鲁沿岸和外海茎柔鱼胴体肌肉脂肪酸组成的研究结果相似。类似的不同饱和度脂肪酸的相对含量也出现在其他头足类中。Stowasser 等(2006)对大

西洋短鳍鱿鱼(*Lolliguncula brevis*)肌肉和消化腺脂肪酸组成研究发现,含量由高到低分别为 PUFA、SFA 和 MUFA。南极褶柔鱼(*Todarodes filippovae*)肌肉脂肪酸组成也存在这种关系,但其消化腺的脂肪酸主要以 MUFA 为主(Pethybridge *et al.*, 2013)。与近海种类大西洋短鳍鱿鱼相比,大洋性头足类运动能力强、生长速率快,新陈代谢速率和转化率的差别可能造成了消化腺脂肪酸组成的差异(陈新军等, 2012a; Every *et al.*, 2016)。茎柔鱼消化腺是否具有该特点还有待进一步研究。此外,各海区茎柔鱼肌肉较高的 PUFA 含量显示出其极高的营养价值,特别是含量排在前 6 位的 EPA 和 DHA,被证实具有防治心血管疾病、改善神经和视觉系统等功效(Simopoulos, 2006; 李忠清等, 2016; 柳学周等, 2017)。

根据 SIMPER 分析结果,对脂肪酸组成的空间异质性贡献较高的脂肪酸包括 C16:0、C18:2n6、C20:4n6 和 C22:6n3,这些脂肪酸可能直接反映了各海区食物来源的差异。虽然对茎柔鱼必需脂肪酸种类的研究还未见报道,但在大西洋短鳍鱿鱼室内投喂实验中,Stowasser 等(2006)发现,其肌肉中 C18:2n6 和 C22:6n3 含量与饵料中对应脂肪酸含量的关系最为密切。这 2 种脂肪酸可能是茎柔鱼的必需脂肪酸,并能体现出食物来源的空间差异(Sargent *et al.*, 1995),与茎柔鱼的食性分析结果一致。Alegre 等(2014)对秘鲁海域(PER)茎柔鱼胃含物研究后发现,其主要摄食其他头足类和灯笼鱼(*Vinciguerria lucetia*)。而智利外海(CHI)采集的茎柔鱼胃含物中鱼类的比重超过 80%,头足类极少(Pardo-Gandarillas *et al.*, 2014)。虽然有关中东太平洋赤道海域(CEP)茎柔鱼食物组成的研究还未见报道,但 CEP 样品的特异性脂肪酸组成反映出其与其他 2 个海区食物来源的潜在差异。本研究表明,不同海区茎柔鱼食物来源的复杂性以及脂肪酸分析方法在其食性研究中的潜在价值。

脂肪酸组成的空间异质性也可能与各海区环境条件有关。本研究中,秘鲁和智利外海主要受秘鲁寒流和上升补偿流影响,海域的水温较低。由于智利所处纬度较高,其外海水温相对更低(图 1)。而 CEP 同时受南赤道流和赤道逆流影响,且光照强度高,具有较高的水温(Anderson *et al.*, 2001)。研究发现,在水温降低时,海洋生物会通过提高 PUFA 含量以保持细胞膜活性(Ruyter *et al.*, 2003; Tocher *et al.*, 2004)。水温的这种影响也出现在茎柔鱼中,栖息在最低水温环境的 CHI 个体具有最高含量的 PUFA,特别是 C18:2n6、C20:4n6 和 C22:6n3。此外,在秘鲁和智利外海,上升补偿流会将海底大量的营养盐输送到海洋真光层,

而 CEP 靠近大洋中部,营养盐相对贫瘠。各海区水温、光照强度和营养盐的差异很可能造成了浮游植物种类和丰度的空间差异(杨东方等, 2007)。而某些浮游植物含有特异性脂肪酸种类,并可通过摄食活动反映到高营养级动物脂肪酸组成中(Iverson *et al.*, 2004)。例如,对茎柔鱼脂肪酸组成空间差异贡献较高的 C18:2n6 和 C20:4n6 是大型藻类、红藻或褐藻的特征脂肪酸标志物(Napolitano *et al.*, 1997; Kharlamenko *et al.*, 2001; 李宪瑾等, 2002),而 C22:6n3 可以指示鞭毛藻类(Pond *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 2000)。

另一方面,脂肪是生物体重要的能量储存单元,其中的 SFA 是茎柔鱼重要的储能和供能脂肪酸(Turchini *et al.*, 2003)。茎柔鱼肌肉中含量最高的 SFA 是 C16:0,其空间异质性在一定程度上反映出各海区茎柔鱼对生长和繁殖的能量需求的潜在差异。在茎柔鱼生物学研究中已得到验证,栖息于不同海域的茎柔鱼个体生长速率和初次性成熟胴长均存在显著差异(Chen *et al.*, 2011; 陈新军等, 2012b; Liu *et al.*, 2013)。

#### 4 结 论

本研究通过测定捕获自东太平洋 3 个作业海区的茎柔鱼肌肉脂肪酸,分析了各海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成的特点和差异。结果显示,茎柔鱼肌肉脂肪酸组成存在空间差异,但均以多不饱和脂肪酸为主,该差异主要体现在各海区 C16:0、C18:2n6、C20:4n6 和 C22:6n3 的含量不同。脂肪酸组成的空间异质性可能是由各海区海洋环境、食物来源和个体能量需求差异造成的。本研究结果说明了脂肪酸标志物在追溯茎柔鱼来源、分析群体结构等方面的潜力。但本研究只选取了中型个体样品,今后需要进一步探讨分析这些特征脂肪酸对茎柔鱼来源海区的判别情况。

#### 参 考 文 献

- Alegre A, Ménard F, Tafur R, *et al.* Comprehensive model of jumbo squid *Dosidicus gigas* trophic ecology in the Northern Humboldt Current System. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85919
- Anderson CI, Rodhouse PG. Life cycles, oceanography and variability: Ommastrephid squid in variable oceanographic environments. *Fisheries Research*, 2001, 54(1): 133–143
- Arias-Moscoco JL, Soto-Valdez H, Plascencia-Jatomea M, *et al.* Composites of chitosan with acid soluble collagen from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by-products. *Polymer International*, 2011, 60(6): 924–931
- Chen XJ, Li JH, Liu BL, *et al.* Comparison of fishery biology for *Dosidicus gigas* from three different areas in the eastern Pacific Ocean. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012a, 21(2): 280–287 [陈新军, 李建华, 刘必林, 等. 东太平洋

- 不同海区茎柔鱼渔业生物学的初步研究. 上海海洋大学学报, 2012a, 21(2): 280–287]
- Chen XJ, Li JH, Yi Q, *et al.* Preliminary study on fisheries biology of *Dosidicus gigas* in the waters near the equator of eastern Pacific Ocean. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012b, 43(6): 1233–1238 [陈新军, 李建华, 易倩, 等. 东太平洋赤道附近海域茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)渔业生物学的初步研究. 海洋与湖沼, 2012b, 43(6): 1233–1238]
- Chen XJ, Lu HJ, Liu BL, *et al.* Age, growth and population structure of jumbo flying squid, *Dosidicus gigas*, based on statolith microstructure off the Exclusive Economic Zone of Chilean waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2011, 91(1): 229–235
- Every SL, Pethybridge HR, Crook DA, *et al.* Comparison of fin and muscle tissues for analysis of signature fatty acids in tropical euryhaline sharks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016, 479: 46–53
- FAO. Fishery and aquaculture statistics. FAO yearbook 2014, Rome: FAO, 2016
- Iverson SJ, Field C, Don Bowen W, *et al.* Quantitative fatty acid signature analysis: A new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs*, 2004, 74(2): 211–235
- Kharlamenko VI, Kiyashko SI, Imbs AB, *et al.* Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 220: 103–117
- Li XC, Fan X, Han LJ, *et al.* Fatty acids of common marine macrophytes from the Yellow and Bohai seas. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(2): 215–224 [李宪瑾, 范晓, 韩丽君, 等. 中国黄、渤海常见大型海藻的脂肪酸组成. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 215–224]
- Li ZQ, Xia B, Wang JY, *et al.* Comparative study on nutrient composition of body walls of green and white sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 101–107 [李忠清, 夏斌, 王际英, 等. 青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁营养成分的比较分析. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 101–107]
- Liu BL, Chen XJ, Chen Y, *et al.* Age, maturation, and population structure of the Humboldt squid *Dosidicus gigas* off the Peruvian Exclusive Economic Zones. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2013, 31(1): 81–91
- Liu XZ, Xu YJ, Li R, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition of the muscle of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 128–135 [柳学周, 徐永江, 李荣, 等. 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)肌肉营养组成分析与评价. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 128–135]
- Markaida U. Population structure and reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* from the Gulf of California after the 1997–1998 El Niño event. *Fisheries Research*, 2006, 79(1–2): 28–37
- Medellín-Ortiz A, Cadena-Cárdenas L, Santana-Morales O. Environmental effects on the jumbo squid fishery along Baja California's west coast. *Fisheries Science*, 2016, 82(6): 851–861
- Napolitano GE, Pollero RJ, Gayoso AM, *et al.* Fatty acids as trophic markers of phytoplankton blooms in the Bahía Blanca estuary (Buenos Aires, Argentina) and in Trinity Bay (Newfoundland, Canada). *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, 25(8): 739–755
- Pardo-Gandarillas MC, Lohrmann KB, George-Nascimento, *et al.* Diet and parasites of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Humboldt Current System. *Molluscan Research*, 2014, 34(1): 10–19
- Parrish CC, Abrajano TA, Budge SM, *et al.* Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: Analysis and applications. In: Wangersky PJ (eds). *Marine chemistry. The handbook of environmental chemistry (Vol. 5 Series: Water pollution)*, vol 5D. Springer, Berlin: Heidelberg, 2000
- Pethybridge HR, Nichols PD, Virtue P, *et al.* The foraging ecology of an oceanic squid, *Todarodes filippovae*: The use of signature lipid profiling to monitor ecosystem change. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography*, 2013, 95(15): 119–128
- Phillips KL, Jackson GD, Nichols PD. Predation on myctophids by the squid *Moroteuthis ingens* around Macquarie and Heard Islands: Stomach contents and fatty acid analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 215(1): 179–189
- Phillips KL, Nichols PD, Jackson GD. Lipid and fatty acid composition of the mantle and digestive gland of four Southern Ocean squid species: Implications for food-web studies. *Antarctic Science*, 2002, 14(3): 212–220
- Pond DW, Bell MV, Harris RP, *et al.* Microplanktonic polyunsaturated fatty acid markers: A mesocosm trial. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1998, 46(2): 61–67
- Ruyter B, Røjøl C, Grisdale-Helland B, *et al.* Influence of temperature and high dietary linoleic acid content on esterification, elongation, and desaturation of PUFA in Atlantic salmon hepatocytes. *Lipids*, 2003, 38(8): 833–840
- Saito H, Sakai M, Wakabayashi T. Characteristics of the lipid and fatty acid compositions of the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: The trophic relationship between the squid and its prey. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116(3): 360–366
- Sargent JR, Bell JG, Bell MV, *et al.* Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 1995, 11(3–4): 183–198
- Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: Nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, 60(9): 502–507
- Stowasser G, Pierce GJ, Moffat CF, *et al.* Experimental study on the effect of diet on fatty acid and stable isotope profiles of the squid *Lolliguncula brevis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 333(1): 97–114
- Tocher DR, Fonseca-Madrigal J, Dick JR, *et al.* Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137(1): 49–63
- Turchini GM, Mentasti T, Frøyland L, *et al.* Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical



- composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 2003, 225(1): 251–267
- Uriarte-Montoya MH, Arias-MoscOSO JL, Plascencia-Jatomea M, *et al.* Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 4212–4219
- Wang LL, Yiang XS, Li XY, *et al.* The effect of moisture content on the texture and color of light baked squid tentacles. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(2): 47–50 [王丽丽, 杨宪时, 李学英, 等. 水分含量对软烤鱿鱼足片质构和色泽的影响. *食品与发酵工业*, 2014, 40(2): 47–50]
- Xu Q, Yang HS. Fatty acid biomarker and its application in marine trophic relation studies. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(1): 1–6 [许强, 杨红生. 脂肪酸标志物在海洋生态系统营养关系研究中的应用. *海洋学报*, 2011, 33(1): 1–6]
- Yang DF, Chen ST, Hu J, *et al.* Magnitude order of the effect of light, water temperature and nutrients on phytoplankton growth. *Marine Environmental Science*, 2007, 26(3): 201–207 [杨东方, 陈生涛, 胡均, 等. 光照、水温 and 营养盐对浮游植物生长重要影响大小的顺序. *海洋环境科学*, 2007, 26(3): 201–207]
- Yang XS, Wang LL, Li XY, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional compositions of *Dosidicus gigas* and *Onychoteuthis borealijaponicus okad.* *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(9): 2247–2251, 2293 [杨宪时, 王丽丽, 李学英, 等. 秘鲁鱿鱼和日本海鱿鱼营养成分分析与评价. *现代食品科技*, 2013, 29(9): 2247–2251, 2293]

(编辑 马璀艳)

## A Comparative Analysis of Fatty Acid Profiles in Muscle of *Dosidicus gigas* from Different Harvest Locations in the Eastern Pacific Ocean

GONG Yi<sup>1</sup>, LI Yunkai<sup>1,2,3,4,5①</sup>, CHEN Ling<sup>6</sup>, GAO Xiaodi<sup>1</sup>, CHEN Xinjun<sup>1,3,4,5</sup>

- (1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306; 4. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306; 5. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306; 6. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** The jumbo squid (*Dosidicus gigas*) is a pelagic cephalopod endemic to the eastern Pacific Ocean with a valuable commercial role. In this study, fatty acid profiles were identified in jumbo squid muscle tissues from three harvest locations. Comparative analysis was used to evaluate spatial variation in fatty acid profiles of different geographic origins. Results showed significant differences in fatty acid profiles among squid muscle tissues from different sampling locations. The number of fatty acid types from the squid off Peru (28) was high compared with that from squid in the waters of the equatorial central eastern Pacific (27) and those off Chile (24). Nonetheless, among all three geographic origins, the dominant fatty acids were polyunsaturated fatty acids (PUFA), which accounted for 59.68%~69.28% of the total amount of all fatty acids, followed by saturated fatty acids (SFA, 20.71%~27.28%) and monounsaturated fatty acids (MUFA, 10.01%~13.04%). C16:0, C18:0, C20:1n9, C18:2n6, C20:5n3 (eicosapentaenoic acid, EPA), and C22:6n3 (docosahexaenoic acid, DHA) were the primary fatty acids in jumbo squid muscle tissues, which accounted for more than 81% among all areas. The results of analysis of similarity (ANOSIM) and similarities of variance (SIMPER) showed that the spatial heterogeneity of fatty acid profiles was mainly influenced by C16:0, C18:2n6, C20:4n6, and DHA. We propose that the observed variations could be the result of differences in oceanographic conditions, food sources, and energy demands of squid among varied regions. Overall, these results demonstrated the feasibility of using fatty acid analysis to study the feeding ecology of jumbo squid. Novel information on the heterogeneity of fatty acid profiles among harvest locations may have important implications for their nutrition studies and for better utilizing this important resource.

**Key words** *Dosidicus gigas*; Muscle; Fatty acid; Comparative analysis

① Corresponding author: LI Yunkai, E-mail: ykli@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171009002

http://www.yykxjz.cn/

朱祥杰, 王震, 苑志欣, 郝建华, 郑兰红. 海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的发酵条件优化. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 155-163

Zhu XJ, Wang Z, Yuan ZX, Hao JH, Zheng LH. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus* sp. N11-8 on the production of protease PBN11-8. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 155-163

# 海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的发酵条件优化\*

朱祥杰<sup>1,2</sup> 王震<sup>1,2</sup> 苑志欣<sup>1</sup> 郝建华<sup>1</sup> 郑兰红<sup>1①</sup>

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

**摘要** 本研究采用响应面法(RSM)对南极海洋芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)N11-8 液体发酵产蛋白酶 PBN11-8 的发酵条件进行快速优化。通过单因素实验初步确定南极海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的最佳碳源和氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨;并通过 Plackett-Burman(PB)设计对影响其产酶相关因素进行评估,筛选出具有显著效应的 3 个因素:温度、氮源和碳源;以最陡爬坡实验逼近至上述因子最大响应区域,进而采用 RSM 法对其最佳水平范围进行研究,确定最优发酵条件为:可溶性淀粉 3 g/L,蛋白胨 13.1 g/L,酵母浸粉 2.9 g/L, NaCl 5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2 mmol/L, 初始 pH 值为 7.0, 温度为 34.0℃, 转速为 200 r/min, 装液量为 50 ml/250 ml, 接种量为 4%, 培养时间为 60 h。最终优化后的酶活达到 90.5 U/ml, 比初始酶活提高了 23.6%。

**关键词** 芽孢杆菌;蛋白酶;Plackett-Burman 设计;响应面法

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0155-09

蛋白酶是水解蛋白质肽链的一类酶的总称,在动植物、微生物中均有分布。产蛋白酶的微生物种类主要包括细菌、霉菌和放线菌等(史翠娟等, 2015)。蛋白酶在医学领域主要用于治疗心血管病等疾病,同时在治疗脓毒症、消化系统疾病、炎症、囊性纤维化、视网膜疾病和牛皮癣等疾病方面也有所应用(Gomis-Ruth *et al*, 2003)。目前,在食品、洗涤剂、化妆品及抗肿瘤药物等和疾病的机理研究等方面也有诸多应用(荆谷等, 2002)。迄今为止,有关抗肿瘤活性蛋白酶只有少量报道(Weildle *et al*, 2014; 纪明开等, 2017)。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)N11-8 由南极表层海水中

分离获得(Zheng *et al*, 2016),其所产蛋白酶 PBN11-8 具有较好的应用潜力(郑兰红等, 2015)。为获得更高的产酶量,对芽孢杆菌 N11-8 的培养基与培养条件进行优化。优化实验采用正交实验或响应面实验,其中,正交实验是一种高效处理多因素优化问题的方法,采取部分实验代替全面实验(何磊等, 2011; 李洪康等, 2016)。响应面法是采用拟合因素响应值之间的函数关系,精确分析因子与响应值关系以优化工艺参数的方法,适用性强(刘志祥等, 2009)。响应面法明显优于正交实验,具有实验次数少、周期短、精度高等特点,可快速有效确定多因子系统最佳条件(刘志祥等, 2009; 王茜等, 2015)。本研究通过单因素法进行前期

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014B01YQ01)和山东省科技发展计划项目(2014GSF121016)共同资助[This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2014B01YQ01), and the Science and Technology Development Plans of Shandong Province (2014GSF121016)]. 朱祥杰, E-mail: zhuxiangjie1204@163.com

① 通讯作者: 郑兰红, 副研究员, E-mail: zhenglh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-09, 收修改稿日期: 2017-11-14

优化,再运用响应面法建立模型,分析处理验证,确定培养基与培养条件,从而提高蛋白酶活力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株与培养** 芽孢杆菌 N11-8 由南极表层海水分离获得(Zheng *et al.*, 2016)。ND 培养基(牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, pH 7); 固体 ND 培养基(牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%, pH 7)。

**1.1.2 实验试剂** 葡萄糖、Folin-酚、干酪素等(国药集团化学试剂有限公司), 蛋白胨(北京双旋), 可溶性淀粉(汕头市西陇化工), 酵母浸粉(英国 Oxoid 公司)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 蛋白酶活力测定** 采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力,具体方法参考国家标准 GB/T 23527-2009。每毫升酶液在 30℃、pH 8 条件下水解酪蛋白,每分钟释放 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位(杨娟等, 2017)。

**1.2.2 单因素实验** 在发酵培养基的基础上,其他条件不变,依次测定不同碳源、不同氮源、碳源浓度、氮源浓度、磷酸盐浓度、NaCl 浓度、不同金属离子、金属离子浓度、接种量、装液量、转速、温度和初始 pH 对菌株产酶的酶活影响(马子宾等, 2015; 张丹等, 2011; 张增祥等, 2010)。

**1.2.3 响应面优化实验** Plackett-Burman(PB)实验参照王东等(2016)和梁昌聪等(2014),在单因素实验结果基础上,选出 7 个对产酶量有较大影响的因子(可溶性淀粉、蛋白胨、酵母浸粉、NaCl、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>),设计 PB 实验(表 1、表 2),进一步筛选出 3 个显著影响因子。最陡爬坡实验根据 PB 实验的结果,以蛋白胨、酵母浸粉、温度为主要影响因素设计本实验,培养基中其他因素分别为可溶性淀粉(3 g/L)、NaCl(5 g/L)、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(2 mmol/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1 g/L)、装液量(50 ml),转速(200 r/min),培养时间(60 h)(表 4)。中心组合实验分别以蛋白胨添加量、酵母浸粉添加量和温度为自变量,以蛋白酶的酶活为指标进行液体发酵条件优化(表 5、表 6)。

### 1.3 数 据 统 计 与 分 析

采用 Design-Expert 软件(Version 7.0 Stat-Ease Inc., USA)对响应面实验得到的数据进行线性回归和方差分析。模型及因素的显著性均通过 *F* 值考察

(*P*<0.05),所有实验重复 3 次,结果以蛋白酶活力表示。

## 2 结 果 与 分 析

### 2.1 单因素实验

**2.1.1 不同碳、氮源对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响** 从图 1a 可以发现,当可溶性淀粉为碳源时,产酶量最高。因此,培养基最适碳源为可溶性淀粉。酶的合成往往受到分解代谢阻遏的控制。葡萄糖等易代谢的碳水化合物对细菌的蛋白酶产量都有阻遏作用,在实践中往往采用代谢缓慢的碳源,或者降低糖浓度并采用连续流加法(郭军等, 2003)。图 1b 显示,在实验选取的 7 种氮源中,蛋白胨具有最强的竞争力(产酶量最高)。

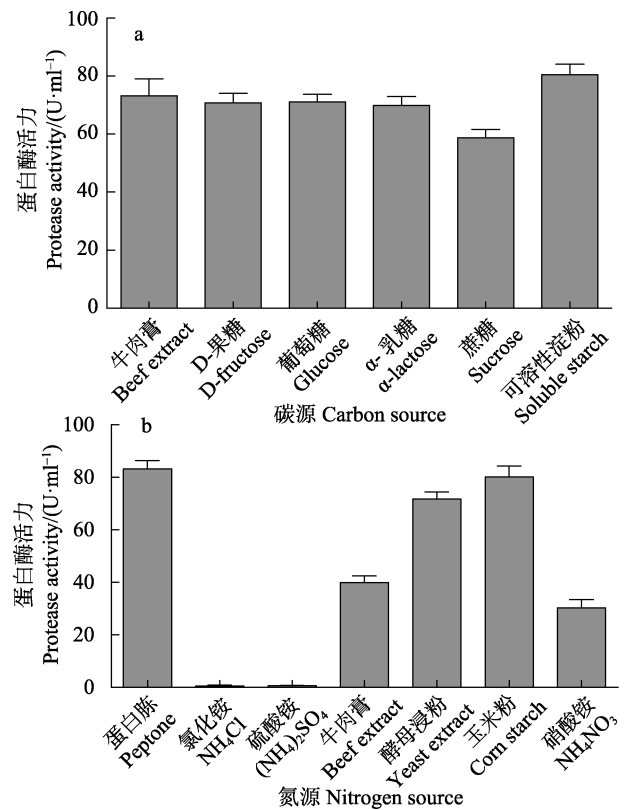


图 1 不同碳、氮源对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响  
Fig.1 Effects of different carbon and nitrogen source on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

**2.1.2 不同碳、氮源浓度对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响** 图 2a 显示,随着可溶性淀粉浓度的不断增加,产酶量逐渐上升;可溶性淀粉浓度达到 3 g/L 时,产酶量达到最高。因此,可溶性淀粉浓度宜取 3 g/L。从图 2b 可以发现,随着蛋白胨浓度的增加,产酶量不断增加,在蛋白胨浓度达到 15 g/L 时,产酶量达到最高。因此,蛋白胨浓度宜取 15 g/L。从

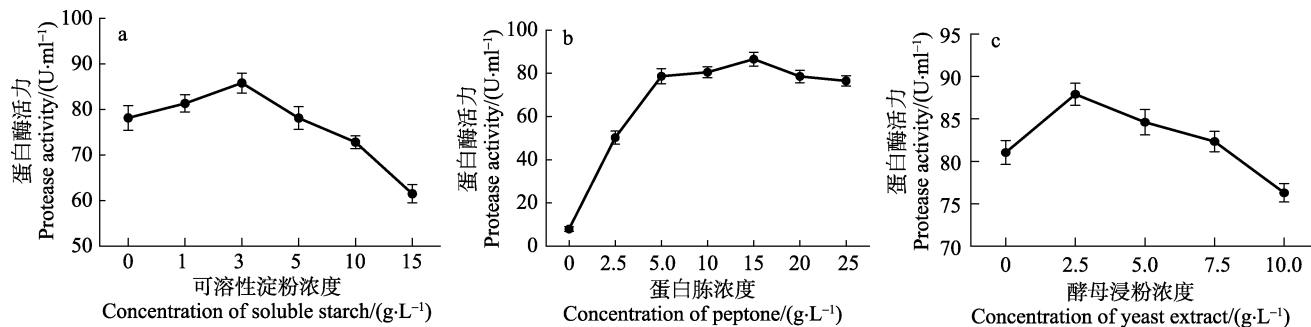


图 2 不同浓度可溶性淀粉、蛋白胨或酵母浸粉对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of soluble starch, peptone and yeast extract on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

图 2c 可知, 在酵母浸粉浓度达到 2.5 g/L 时, 产酶量达到最高。因此, 酵母浸粉浓度宜取 2.5 g/L。

**2.1.3 不同盐浓度对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响**

图 3a 显示, 磷酸盐浓度在 1 g/L 时, 产酶量达到最高。因此, 磷酸盐浓度宜取 1 g/L。由图 3b 可以看出, NaCl 浓度在 5 g/L 时, 产酶量达到最高。因此, NaCl 浓度宜取 5 g/L。

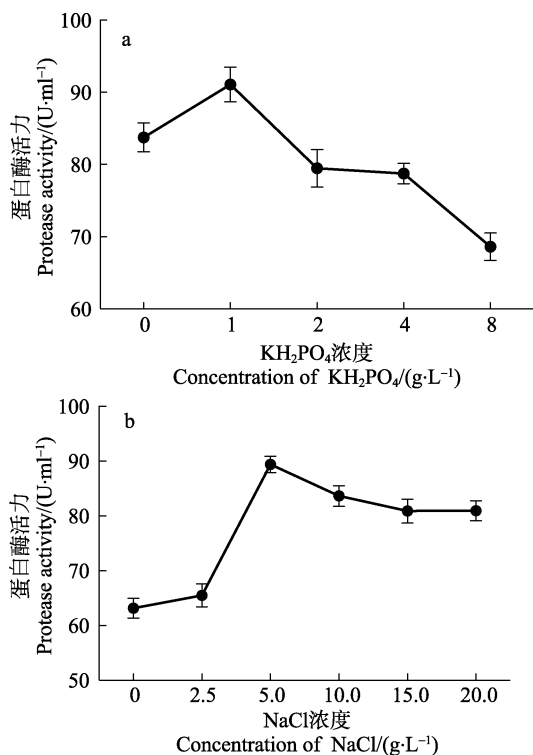


图 3 不同盐浓度对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.3 Effects of different concentration of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> or NaCl on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

**2.1.4 金属离子对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响**

图 4a 显示, 当加入 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 时, 产酶量最高, 即 Fe<sup>3+</sup>对酶活促进作用最强。Fe<sup>2+</sup>对酶活促进作用略低于 Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>对酶活也有一定的促

进作用, 而 Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对酶活都有不同程度的抑制作用, 尤其 Zn<sup>2+</sup>几乎可使蛋白酶完全失活。随着样品中 Fe<sup>3+</sup>浓度的增加, 产酶量不断增加, 当达到 2 mmol/L 时, 产酶量最高(图 4b), 故培养基中宜添加终浓度为 2 mmol/L 的 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O。

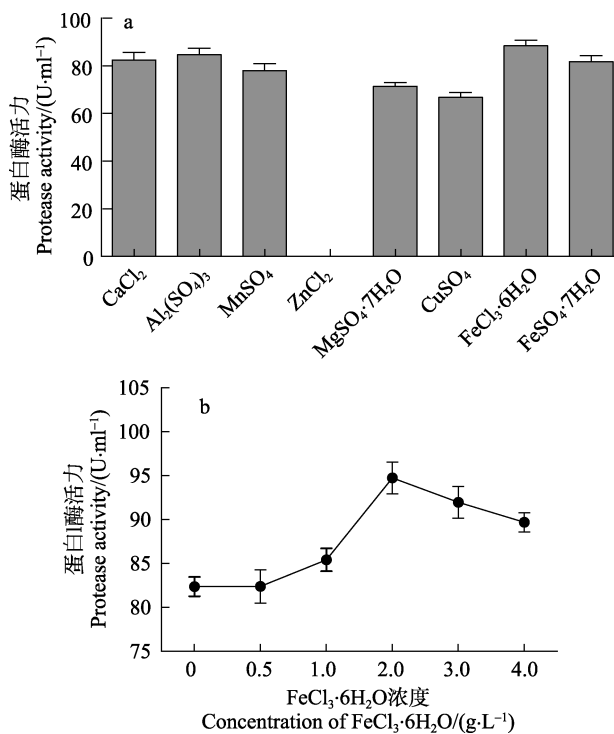


图 4 金属离子对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.4 Effects of metal ion on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

**2.1.5 接种量与装液量对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响**

图 5a 显示, 接种量在 4% 时, 产酶量达到最高。因此, 接种量宜为 4%。从图 5b 可以看出, 装液量在 50 ml 时, 产酶量达最高。因此, 装液量宜为 50 ml。在较高的装液量水平时, 产酶量减少, 可能主要是由于溶氧较低、供氧不足造成的(陈世建等, 2014)。

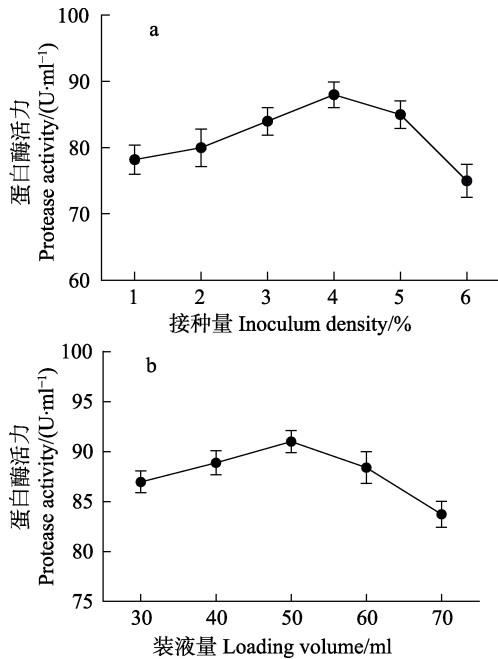


图5 接种量与装液量对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.5 Effects of initial inoculum and culture volume on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

2.1.6 转速与温度对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响

图 6a 显示, 转速在 200 r/min 时, 产酶量达到最高。因此, 转速宜为 200 r/min。图 6b 显示, 温度在 35℃ 时, 产酶量达到最高。因此, 温度宜为 35℃。

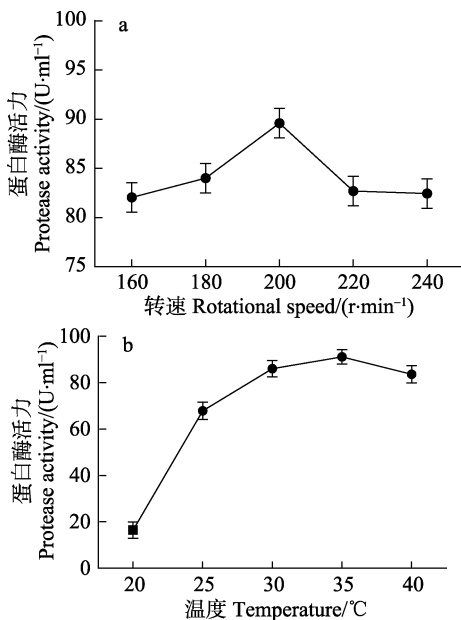


图6 不同转速与温度对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.6 Effects of rotational speed and temperature on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

2.1.7 初始 pH 与时间对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响 图 7a 显示, 初始 pH=7 时, 产酶量达到最高。因此, 初始 pH 宜为 7。然而, 随着时间增加, 产酶量不断增加, 并在 60 h 后趋于稳定, 产酶量达到最高。因此, 时间宜为 60 h (图 7b)。

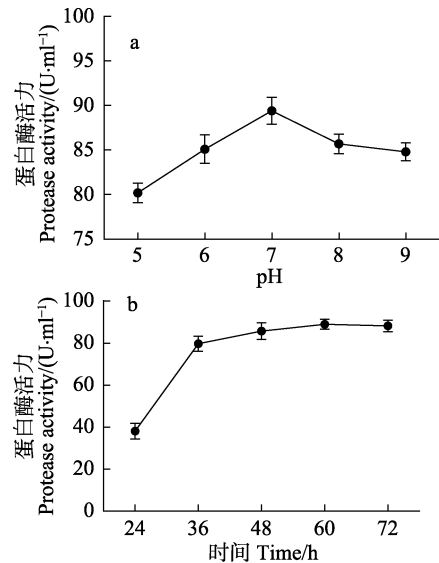


图7 初始 pH 与时间对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.7 Effects of initial pH and time on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

2.2 响应面法优化发酵培养基及发酵条件

2.2.1 PB 实验主要因子筛选 如表 1 所示, 从单因素实验中选择 7 个因素: 可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度、酵母浸粉浓度、NaCl 浓度、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 浓度、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度、温度, 选择高低 2 个水平, 设计实验, 通过 PB 实验为响应面优化条件筛选出主要影响因子。12 组实验的实验结果如表 2 所示。由表 3 可知, 发酵条件的显著影响因子依次为蛋白胨浓度、温度和酵母浸粉浓度。

表 1 Plackett-Burman 实验因子水平

Tab.1 The level of factors in Plackett-Burman assay

代码 Code	因子 Factor	低水平(-1) Low level	高水平(1) High level
A	可溶性淀粉 Soluble starch (g/L)	1.0	5.0
B	蛋白胨 Peptone (g/L)	10.0	20.0
C	酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	1.0	5.0
D	氯化钠 NaCl (g/L)	2.0	10.0
E	六水合三氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (mmol/L)	1.0	3.0
F	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0.5	2.0
G	温度 Temperature (°C)	30.0	40.0

表 2 Plackett-Burman 实验筛选主要影响因素  
Tab.2 Screening of main influence factors in Plackett-Burman

编号 Number	可溶性淀粉 Soluble starch	蛋白胨 Peptone	酵母浸粉 Yeast extract	氯化钠 NaCl	六水合三氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	温度 Temperature	酶活 Enzyme activity(U/ml)
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	78.1
2	1	-1	1	-1	1	1	-1	86.8
3	-1	1	-1	-1	1	1	1	79.8
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	80.2
5	-1	-1	-1	1	1	-1	1	78.7
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	85.4
7	-1	1	1	1	-1	1	1	82.3
8	1	-1	1	1	1	-1	1	86.8
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	78.6
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	81.8
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	88.8
12	1	1	-1	1	1	1	-1	80.9

表 3 Plackett-Burman 实验统计分析

Tab.3 Statistical analysis of the Plackett-Burman assay

代码 Code	因子 Factor	贡献值 Contribution value	F	P	显著性 Significance
A	可溶性淀粉 Soluble starch	1.26	1.23	0.330	
B	蛋白胨 Peptone	20.01	19.57	0.012	*
C	酵母浸粉 Yeast extract	17.44	17.06	0.015	*
D	氯化钠 NaCl	8.46	8.27	0.045	*
E	六水合三氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.82	2.75	0.172	
F	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.47	0.46	0.537	
G	温度 Temperature	18.50	18.09	0.013	*

\*: 差异显著(P<0.05)

\*: Significant differences (P<0.05)

**2.2.2 最陡爬坡实验** 根据 PB 实验统计分析结果,以蛋白胨、酵母浸粉、温度为主要影响因素设计本实验,具体设计方法及实验结果如表 4 所示。显然,第 4 组实验的单位酶活最高,这说明产酶最优点在第 4 组附近。

**2.2.3 中心组实验确定显著因素最优水平** 以最陡爬坡实验的最优组第 4 组为中心,采用二次回归旋转中心组设计,进一步确定蛋白胨、酵母浸粉、温度对菌株产酶的影响。具体设计和实验结果见表 5 和表 6。

表 4 最陡爬坡路径设计方法及实验结果

Tab.4 Experimental design and results of steepest ascent and corresponding results

编号 Number	蛋白胨 Peptone (g/L)	酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	温度 Temperature (°C)	酶活 Enzyme activity (U/ml)
1	7.5	1.0	20.0	2.0
2	10.0	1.5	25.0	3.6
3	12.5	2.0	30.0	73.6
4	15.0	2.5	35.0	86.2
5	17.5	3.0	40.0	74.5
6	20.0	3.5	45.0	72.4

表 5 中心组因素与水平

Tab.5 Factors and coded values of central composite test design

因素 Factor	水平 Level (α=1.7)				
	-1.7	-1	0	1	1.7
A 蛋白胨 Peptone (g/L)	6.5	10.0	15.0	20.0	23.5
B 酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	0.9	1.5	2.5	3.5	4.2
C 温度 Temperature (°C)	26.5	30.0	35.0	40.0	43.5

用 Design-Expert V 8.0.6 对实验数据进行多项式回归分析, P<0.0001 表明该模型是显著的,同时,失拟项 P=0.0970>0.05 表示该模型失拟不显著,因此,该模型是合适的。另外,此模型 R<sup>2</sup>=0.9714,表明该



表6 中心组合实验设计及结果  
Tab.6 Experimental design and the results of central composite test

编号 Number	蛋白胨 Peptone	酵母浸粉 Yeast extract	温度 Temperature	酶活 Enzyme activity (U/ml)	编号 Number	蛋白胨 Peptone	酵母浸粉 Yeast extract	温度 Temperature	酶活 Enzyme activity (U/ml)
1	0	1.68	0	78.2	11	1.68	0	0	62.6
2	0	0	0	91.7	12	-1	-1	1	60.6
3	1	-1	1	70.2	13	0	0	1.68	59.8
4	-1	1	1	76.1	14	-1.68	0	0	76.5
5	1	1	1	62.1	15	-1	1	-1	80.6
6	1	-1	-1	72.5	16	0	0	-1.68	72.1
7	0	0	0	91.9	17	0	0	0	89.1
8	0	0	0	88.3	18	0	0	0	88.2
9	1	1	-1	65.4	19	-1	-1	-1	70.2
10	0	0	0	88.5	20	0	-1.68	0	65.6

表7 响应面模型方差分析  
Tab.7 Variance analysis of the response surface model

变异来源 Sources of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean squares	F值 F-value	P值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	2269.5	9	252.17	37.71	< 0.0001	***
A-蛋白胨 Peptone	21.16	1	121.16	18.12	0.0017	**
B-酵母浸粉 Yeast extract	74.47	1	74.47	11.14	0.0075	*
C-温度 Temperature	119.43	1	119.43	17.86	0.0018	**
AB	211.15	1	211.15	31.58	0.0002	**
AC	9.03	1	9.03	1.35	0.2722	
BC	2.10	1	2.10	0.31	0.5874	
A <sup>2</sup>	648.90	1	648.90	97.04	< 0.0001	***
B <sup>2</sup>	498.15	1	498.15	74.50	< 0.0001	***
C <sup>2</sup>	918.41	1	918.41	137.35	< 0.0001	***
残差值 Residual	66.87	10	6.69			
失拟项 Loss of quasi item	52.06	5	10.41	3.52	0.0970	Not significant
纯误差 Pure error	14.81	5	2.96			
总变异 Total variation	2336.38	19				

注:  $R^2=97.14\%$ ,  $Adj.R^2=94.56\%$ 。  $P<0.05$  表明模型中各项都是显著的。\*: 差异显著( $P<0.05$ ), \*\*: 差异高度显著( $P<0.01$ ), \*\*\*: 差异极显著( $P<0.001$ )

Note:  $R^2=97.14\%$ ,  $Adj.R^2=94.56\%$ .  $P<0.05$  showed all factors in the model are significant. \*: Significant differences ( $P<0.05$ ), \*\*: Highly significant differences ( $P<0.01$ ), \*\*\*: Extremely significant differences ( $P<0.001$ )

模型能较好地解释菌株产酶量的变化。以单位酶活(Y)为因变量, 蛋白胨(A)、酵母浸粉(B)和温度(C)为自变量, 建立回归方程式如下:

$$\text{酶活 } Y = 89.56 - 2.98A + 2.34B - 2.96C - 5.14AB + 1.06AC + 0.51BC - 6.71A^2 - 5.88B^2 - 7.98C^2$$

根据上面的方程绘制响应面分析图、等高线图(图8), 直接反映了各因素对酶活的影响。

用 Design-Expert V8.0.6 计算, 对回归方程求一阶偏导数, 得出模型极值点。即当蛋白胨浓度为 13.1 g/L、酵母浸粉浓度为 2.9 g/L、温度为 34℃时,

酶活力最大, 理论最大值为 90.8 U/ml。

**2.2.4 验证实验** 以上述响应面分析得到的最佳培养基成分与培养条件下, 进行 3 次实验, 实际测定平均酶活为 90.5 U/ml, 和理论值 90.8 U/ml 基本一致, 表明方程拟合度很好, 验证了模型的正确性。

### 3 结论

本研究通过单因素法和响应面法对来自南极表层海水的一株海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶 PBN11-8

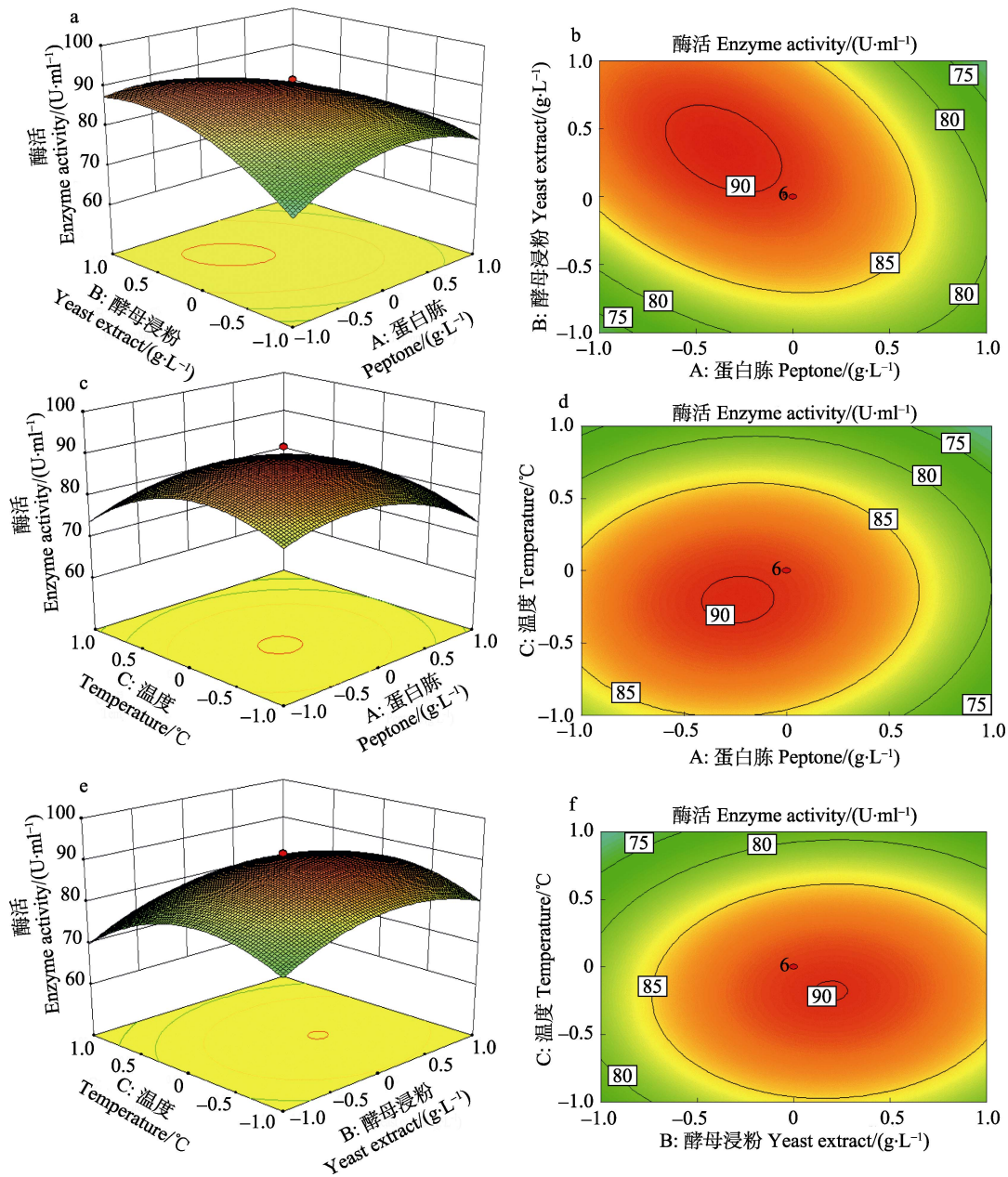


图 8 不同因素对酶活响应值的影响

Fig.8 The influence of three factors on the response value of enzyme activity

的培养基成分和培养条件进行了优化,利用实验设计软件 Design-Expert 建立相应数学模型,经检验证明该模型合理可靠,能够较好地预测并用于优化该菌产蛋白酶发酵条件。对影响产酶量的关键因素及其相互作用进行探讨后,最终确定了以可溶性淀粉(3 g/L)为碳源,蛋白胨(13.1 g/L)和酵母浸粉(2.9 g/L)为复合氮源,  $\text{Fe}^{3+}$ (2 mmol/L)为金属离子,初始 pH 值为 7.0,用 NaCl(5 g/L)调节盐度,250 ml 三角瓶装液 50 ml,接种量为 4%,34℃、200 r/min 发酵培养 60 h,最终优化后的酶活达到 90.5 U/ml,比初始酶活 73.2 U/ml 提高了 23.6%。

## 参 考 文 献

- Brown GT, Murray GI. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *Journal of Pathology*, 2015, 237(3): 273–281
- Chen SJ, Wang W, Sun M. Identification of a marine bacterium producing high-level catalase and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 103–109 [陈世建, 王伟, 孙溢. 一株海洋过氧化氢酶高产菌的鉴定及产酶条件优化. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 103–109]
- Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of

- metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, 2003, 24(2): 157–202
- Guo J, Yang YP, Renqinkaorile. Ascertaining the medium ingredients for a fibrinolytic enzyme secreting *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2003, 24(1): 51–55 [郭军, 杨雨平, 仁庆考日乐. 枯草杆菌溶血纤维蛋白酶发酵培养基配方的确定. *内蒙古农业大学学报*, 2003, 24(1): 51–55]
- He L, Liu JZ, Qin SL, *et al.* Identification of an astaxanthin-producing marine yeast strain YS-185 and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 93–101 [何磊, 刘均忠, 秦胜利, 等. 产虾青素海洋酵母菌 YS-185 的鉴定及发酵条件优化. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 93–101]
- Ji KM, Chen LH, Cheng B, *et al.* The inhibition effects and mechanism of recombinant snake venom metalloproteinase inhibitor on tumor angiogenesis. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(3): 394–400 [纪明开, 陈丽红, 程波, 等. 蛇毒金属蛋白酶抑制剂重组蛋白抗肿瘤血管生成作用及其机制. *中国药理学通报*, 2017, 33(3): 394–400]
- Jing G, Feng J, Kong J, *et al.* Research progress on metalloproteinases from microorganism. *Progress in Biotechnology*, 2002, 22(1): 61–63, 56 [荆谷, 冯静, 孔健, 等. 微生物金属蛋白酶的研究进展. *生物工程进展*, 2002, 22(1): 61–63, 56]
- Li HK, Li YR, Li Y, *et al.* Optimization of fermentation conditions for the production of neutral protease by *Bacillus subtilis*. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(5): 102–107 [李洪康, 李由然, 李赢, 等. 枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件优化. *食品与发酵工业*, 2016, 42(5): 102–107]
- Liang CC, Liu L, Zhang JH, *et al.* Optimization of medium components for sporulation quantity by trichoderma viride strain H06 using response surface methodology. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(2): 333–338 [梁昌聪, 刘磊, 张建华, 等. 响应面法优化绿色木霉 H06 产孢发酵培养基. *热带作物学报*, 2014, 35(2): 333–338]
- Liu ZX, Zeng CZ. The application of response surface method in optimization of fermentation medium. *Northern Horticulture*, 2009(2): 127–129 [刘志祥, 曾超珍. 响应面法在发酵培养基优化中的应用. *北方园艺*, 2009(2): 127–129]
- Ma ZB, Zheng HF, Liu JZ, *et al.* Identification of a marine bacterium S-3685 with high neutral protease and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 131–137 [马子宾, 郑鸿飞, 刘均忠, 等. 一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的鉴定及产酶条件. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 131–137]
- Shi CJ, Yan PS, Zhao RX, *et al.* Advances on enzymes from marine microorganisms. *Current Biotechnology*, 2015, 5(3): 185–190 [史翠娟, 闫培生, 赵瑞希, 等. 海洋微生物酶研究进展. *生物技术进展*, 2015, 5(3): 185–190]
- Wang D, Rong JP, Tang ZZ, *et al.* Response surface method optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* producing neutral protease. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 143–151 [王东, 荣家萍, 唐自钟, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 143–151]
- Wu EX, Wang FF, NormanMcKIE. Matrix metalloproteinase. *Life Science Research*, 1999(3): 175–194 [吴二喜, 王凤飞, NormanMcKIE. 基质金属蛋白酶(英文). *生命科学研究*, 1999(3): 175–194]
- Yang J, Li SY, Ma ZB, *et al.* Optimization of the purification protocol of biomimetic affinity material for marine metalloprotease MP. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(15): 146–152 [杨娟, 李尚勇, 马子宾, 等. 海洋金属蛋白酶 MP 仿生亲和材料纯化条件的优化. *食品工业科技*, 2017, 38(15): 146–152]
- Zhang D, Min WH, Liu JS, *et al.* Response surface optimization of fermentation conditions for protease production by *Pichia kudriavzevii* yeast. *Food Science*, 2011, 32(13): 248–253 [张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件. *食品科学*, 2011, 32(13): 248–253]
- Zhang ZX, Wang W, Wang F, *et al.* Optimization of fermentation conditions for the catalase production by *Aeromonas* sp. CE-2-A. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 95–103 [张增祥, 王伟, 王芳, 等. 过氧化氢酶高产菌株 CE-2-A 的发酵条件优化. *渔业科学进展*, 2010, 31(6): 95–103]
- Zheng LH, Yang KL, Liu J, *et al.* Screening of microorganisms from Antarctic surface water and cytotoxicity metabolites from Antarctic microorganisms. *Food Science and Nutrition*, 2016, 4(2): 198–206
- Zheng LH, Yang KL, Sun M, *et al.* The preparation and application of a marine bacillus polypeptide. *China*, 151008745.8[P]. 2015-02-13 [郑兰红, 杨康利, 孙谧, 等. 一种海洋芽孢杆菌多肽及其制备和应用. *中国*, 151008745.8[P]. 2015-02-13]

(编辑 马璀艳)

## Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* sp. N11-8 on the Production of Protease PBN11-8

ZHU Xiangjie<sup>1,2</sup>, WANG Zhen<sup>1,2</sup>, YUAN Zhixin<sup>1</sup>, HAO Jianhua<sup>1</sup>, ZHENG Lanhong<sup>1</sup>①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In this study, we optimized fermentation conditions to increase the production of PBN11-8 by *Bacillus* sp. N11-8. Response surface methodology (RSM) is a generally available method used to optimize the fermentation conditions of proteases, by fitting factors function relation between response value. The optimal carbon and nitrogen sources for protease production by *Bacillus* sp. N11-8 were starch and peptone respectively, which were verified in single-factor experiments. Other optimal fermentation conditions were determined as follows: temperature 35 °C, incubation time 60 h, rotational speed 200 r/min, pH 7, initial inoculums 4%, culture volume 50 ml in a 250 ml shake flask, and starch, peptone, yeast extract, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and metal ions (Fe<sup>3+</sup>) concentrations of 3 g/L, 15 g/L, 2.5 g/L, 5.0 g/L, 1.0 g/L, and 2.0 mmol/L, respectively. The Plackett-Burman design (PB) method was used to evaluate factors affecting protease production by *Bacillus* sp. N11-8, and three significant factors were identified: temperature, peptone, and yeast extract. Next, we used the steepest ascent design to approach the maximum response area of the three factors. Furthermore, the best scope of fermentation conditions was studied using a central composite test design, which is a type of RSM. Finally, through analysis of variance for the RSM, we obtained a regression equation and calculated the theoretical optimal fermentation conditions as follows: 3 g/L of soluble starch, 13.1 g/L of peptone, 2.9 g/L of yeast extract, 5 g/L of NaCl, 1 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mmol/L of Fe<sup>3+</sup>, pH 7.0, temperature 34 °C, rotational speed 200 r/min, culture volume 50 ml/250 ml, initial inoculums of 4%, incubation time 60 h. Under the optimized fermentation conditions, the theoretical enzyme activity reached 90.8 U/ml, and in the verification test, enzyme activity reached 90.5 U/ml, which increased 23.6% of the initial enzyme activity.

**Key words** *Bacillus* sp.; Protease; Plackett-Burman design; RSM

① Corresponding author: ZHENG Lanhong, E-mail: zhenglh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171101002

http://www.yykyjz.cn/

田雅洁, 曹煜成, 胡晓娟, 黄小帅, 徐煜, 许云娜, 李卓佳, 文国樑. 4 种因子对玫瑰红红球菌 XH2 氨氮去除效果的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 164–172

Tian YJ, Cao YC, Hu XJ, Huang XS, Xu Y, Xu YN, Li ZJ, Wen GL. Effects of four physical and chemical factors on the ammonia nitrogen removal of *Rhodococcus rhodochrous* XH2. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 164–172

## 4 种因子对玫瑰红红球菌 XH2 氨氮去除效果的影响\*



田雅洁<sup>1</sup> 曹煜成<sup>1,2</sup> 胡晓娟<sup>2</sup> 黄小帅<sup>2</sup> 徐煜<sup>2</sup>  
许云娜<sup>2</sup> 李卓佳<sup>2,3</sup> 文国樑<sup>1,2①</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东省渔业生态环境重点实验室 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300; 3. 南海生物资源开发与利用协同创新中心 广州 510275)

**摘要** 菌株 XH2 是从虾池养殖中后期(50 d)水体环境中筛选的 1 株具有氨氮去除功能的菌株, 经 16S rDNA 测序和 Biolog 生化鉴定, 该菌株为玫瑰红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)。分析发现, 该菌株在盐度为 5~45、pH 为 6.0~9.0、温度为 15℃~45℃、通气量为 1~2 L/min 的条件下生长良好, 菌量最高可达  $1.03 \times 10^9$  cells/ml。在盐度为 25~45、pH 为 6.0~9.0、温度为 15℃~30℃、通气量为 1~2 L/min 的条件下, 菌株对氨氮的去除效果显著( $P < 0.05$ ), 在第 1~3 天对培养液中氨氮的最高去除率可达 90.0%~100.0%, 而各实验组中, 亚硝酸盐氮浓度无明显变化。结果显示, 菌株 XH2 对盐度、pH、温度等主要环境因子具有良好的适应性, 与大部分水产养殖池塘水体的盐度、温度、pH 变动区间大体一致; 其对水体氨氮的去除效果良好, 可作为养殖池塘水体氨氮防控菌剂产品研发的备选菌株。

**关键词** 玫瑰红红球菌; 氨氮; 理化因子

**中图分类号** Q178.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0164-09

半集约化、集约化养殖日益受到关注(曹煜成等, 2006), 该模式下水体环境主要依赖人工调控, 水体生物多样性复杂程度低(殷汝新等, 2015; 王善龙等, 2016; 郝建云等, 2016; 李莎莎等, 2017), 有害物质容易大量积累(李卓佳等, 2010), 控制不当容易引起水

质恶化。其中, 氨氮的过量积累对鱼、虾等水产动物具有严重的毒害作用(董玉波等, 2011; 周平, 2013), 其脂溶性强, 可透过细胞膜扰乱水产动物正常代谢活动, 抑制其生长发育, 损伤机体的抗病或抗逆机能, 甚至导致死亡(何玉英等, 2016)。目前, 对养殖水体

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZD0501)、现代农业(虾蟹)产业技术体系专项(CARS-48)、国家自然科学基金(31602167)、广东省渔港建设和渔业发展专项(B201601-02)、中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2016TS03)和广东省科技计划(2017A040405001)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD0501), China Agriculture Research System (CARS-48), National Natural Science Foundation of China (31602167), Special Funds for Fishery Harbour Construction and Fishery Development of Guangdong Province (B201601-02), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2016TS03), and Guangdong Province Science and Technology Plan Project (2017A040405001)]. 田雅洁, E-mail: tiantian\_1029@163.com

① 通讯作者: 文国樑, 副研究员, E-mail: guowen66@163.com

收稿日期: 2017-11-01, 收修改稿日期: 2017-12-22

氨氮的去除方法主要有物理、化学和生物 3 种, 相比而言, 生物方法利用微生物的生理代谢机制去除水体中的氨氮, 具有环境友好, 不易产生二次污染等优点(张峰峰等, 2014; 王磊等, 2016)。研究表明, 对氨氮具有去除功效的微生物有芽孢杆菌(*Bacillus*)(匡群等, 2013)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)(刘芳芳等, 2010)、变形杆菌(*Proteus*)(张庆华等, 2007)和假单胞菌(*Pseudomonas*)(张峰峰等, 2014)等。

红球菌(*Rhodococcus*)作为水体环境中的常见微生物, 具有代谢多样性的特点, 能有效去除多种化合物(孙艳等, 2004)。当前, 对红球菌功能的研究主要集中在生物脱硫(Kirkwood *et al*, 2007), 石油污染修复(杨智等, 2015), 污水处理(Jorge *et al*, 2001), 降解有机农药、有机腈、霉菌毒素(许育新等, 2004; Coady *et al*, 2015; Cserháti *et al*, 2013)等方面。同时, 红球菌可以作为某些水产养殖动物的益生菌(Sharifuzzaman *et al*, 2018; Boutin *et al*, 2013; 邝金媚等, 2010), 提供水产养殖动物必须的类胡萝卜素(郑晓冬等, 2000)。近年来研究表明, 红球菌对氨氮也有一定的去除效果, 这些红球菌主要由油田外排污水(李沛霖, 2006)、土壤(张光亚等, 2003)、养猪厂的废水(张智超等, 2017)、污水处理厂的活性污泥(白志辉等, 2013)等非养殖水体中筛出。目前, 具有氨氮去除功能的红球菌在水产养殖池塘中的筛选、氨氮去除机理、环境适应性及应用方面还少有报道。

本研究采用了前期从虾池养殖中后期(50 d)水体环境中筛选获得的 1 株土著菌株 XH2, 已初步证实具有氨氮去除功效, 经鉴定为玫瑰红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*), 并对其在不同盐度、pH、温度、通气量条件下的生长和氨氮去除效果进行实验, 以期了解上述 4 种因子对菌株 XH2 生长及氨氮去除效果的影响, 确定其适宜生长并有较好氨氮去除效果的条件, 为养殖水体氨氮去除的实际应用提供有效菌源和技术方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 红球菌 XH2 由中国水产科学研究院南海水产研究所提供, 该菌株从对虾集约化养殖中后期(50 d)水体中分离获得, 该水体环境的盐度为 23~25, pH 为 7.3~8.5, 温度为 28℃~30℃。该菌株已于中国典型培养物保藏中心进行了菌种保藏, 保藏编号为 CCTCCM2017437。

**1.1.2 培养基** 光合菌改良液体培养基(杨启霞等,

2009; 杨莺莺等, 2003、2009):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g, 三水合乙酸钠 3 g, 酵母膏 1 g,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, 生长因子 1 ml, 蒸馏水 1000 ml。其中, 生长因子:  $\text{CaCl}_2$  5 g,  $\text{MnSO}_4$  0.25 g,  $\text{FeSO}_4$  0.5 g, 谷氨酸 0.02 g, 蒸馏水 100 ml。光合菌改良固体培养基平板: 在上述培养基的基础上添加琼脂粉 20 g/L。菌株活化种子液: 在光合菌改良液体培养基的基础上, 将  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的添加量改为 0.068 g/L。分析培养液: 在光合菌改良液体培养基的基础上额外添加  $\text{NaNO}_2$  0.134 g/L, 同时, 将  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的添加量改为 0.068 g/L, 使该培养液初始氨氮和亚硝酸盐氮浓度分别达到约 24 和 20 mg/L。

### 1.2 菌株鉴定

**1.2.1 16S rDNA 序列分析** 细菌总 DNA 提取采用 TIANGEN 公司的 TIANamp Bacteria DNA Kit 产品。依照产品说明书提取菌株 XH2 的 DNA 后, 对其 16S rDNA 片段进行 PCR 扩增。16S rDNA 扩增采用的细菌通用引物为: 8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'), 1492R(5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3')。PCR 反应体系采用 50  $\mu\text{l}$  体系, 其中加入 2  $\mu\text{l}$  模板 DNA。PCR 反应条件: 95℃ 4 min; 95℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果用 DNASTar 软件包中的 Editseq 软件拼接, 在 NCBI 数据库 BLAST 检索中进行核酸序列同源性比较, 确定菌株的种属。

**1.2.2 Biolog 系统细菌鉴定** 采用 Biolog 微生物全自动分析仪 Microlog 3 (Microstation)及 Biolog MicroLog 4.2 软件进行菌株的生化反应特性鉴定, 选用 Biolog GP2 微孔鉴定板, 按照 Biolog 自动微生物分析系统的说明书操作, 将所获结果与数据库进行比对, 确定菌株的种属。

### 1.3 不同因子对菌株 XH2 生长及其氨氮去除效果的影响

将保存的菌株 XH2 于光合菌固体培养基平板上活化, 于实验开始前挑取单菌落, 接入 100 ml 菌株活化种子液中(装于 250 ml 锥形瓶内)。设不同梯度的盐度、pH、温度和通气量实验组, 各实验组均使用 1000 ml 锥形瓶, 并向其内添加 600 ml 分析培养液。实验开始时, 将等体积的菌株活化种子液接入各实验组的分析培养液中, 各实验组初始接菌量均为  $10^6$  cells/ml, 每组设 3 个平行。各实验组初始氨氮浓度约为 24 mg/L, 亚硝酸盐氮浓度约为 20 mg/L, 依



照《海洋监测规范》第4部分:海水分析(GB 17378.4-2007)的方法,以靛酚蓝分光光度法和萘乙二胺分光光度法分别测定实验过程中氨氮和亚硝酸盐氮的浓度变化。用血球计数板在光学显微镜下计数,测定菌量变化。

**1.3.1 盐度** 实验系统的盐度梯度为5、15、25、35、45,对照组(盐度为25)不加菌株XH2,通过添加不同剂量的NaCl对盐度进行调节。接菌后放入摇床,pH为6.0,30℃,200 r/min振荡至实验结束,每天用NaOH、HCl调节分析培养液的pH值,保持在6.0左右。于第0、1、2、3、4、5、9天取样检测其氨氮、亚硝酸盐氮含量,同时测定菌量。

**1.3.2 pH** 实验系统的pH梯度为4.5、6.0、7.5、9.0、10.5,对照组(pH为6.0)不加菌株XH2。盐度为25,接菌后放入摇床,30℃,200 r/min振荡至实验结束,每天测定分析培养液pH并进行调节,使各实验组pH维持在初始水平。取样时间以及测定指标同1.3.1。

**1.3.3 温度** 实验系统的温度梯度为5℃、15℃、25℃、35℃、45℃,对照组(温度为30℃)不加菌株XH2。盐度和pH分别设为25和7.5。接菌后放入摇床,30℃,200 r/min振荡至实验结束。取样时间以及测定指标同1.3.1。

**1.3.4 通气量** 以2 L发酵罐(Biostat B型自控通气发酵罐)实验系统为测试平台,将通气量设为高、低2组(2和1 L/min),实验前,需矫正发酵罐溶氧电极和pH电极,该实验系统可自动记录发酵罐中溶氧量的变化以及自动调节罐内分析培养液的温度和pH值。实验过程中的pH为7.5、盐度为25、温度为30℃,

转子转速为200 r/min,在第0、1、2、3、4、5天进行取样,测定指标同1.3.1。

## 1.4 数据分析

采用SPSS 20.0软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),使用Duncan检验方法,显著水平设为 $P<0.05$ 。氨氮去除率的计算:氨氮去除率=(氨氮初始浓度-培养后氨氮剩余浓度)/氨氮初始浓度 $\times 100\%$ 。

## 2 结果

### 2.1 菌株XH2的鉴定

以16S rDNA序列在NCBI数据库中进行核酸数据比对,结果显示,XH2与红球菌属相似度为100%,初步判定菌株XH2为红球菌属。在Biolog细菌鉴定系统中,与XH2相似度最高的菌株为玫瑰红红球菌,其PROB为98%、SIM为0.617、DIST为5.93。综合以上鉴定结果,菌株XH2定为玫瑰红红球菌。

### 2.2 盐度对菌株XH2生长及其氨氮去除效果的影响

除盐度为45实验组外,其他各组菌株均在第1天后进入对数生长期,第3天后,菌量均达到 $10^8$  cells/ml水平,最高为 $3.02 \times 10^8$  cells/ml(图1A)。实验过程中,对照组氨氮浓度无明显变化( $P>0.05$ ),第2天时,盐度为5、15和25实验组的氨氮浓度大幅降低,氨氮去除率分别达到79.2%、79.5%和90.3%,显著优于其他各组( $P<0.01$ ),而后,此3组的氨氮浓度始终稳定保持在较低水平;第3天时,盐度为35和45实验组的氨氮浓度亦明显降低( $P<0.05$ ),到第

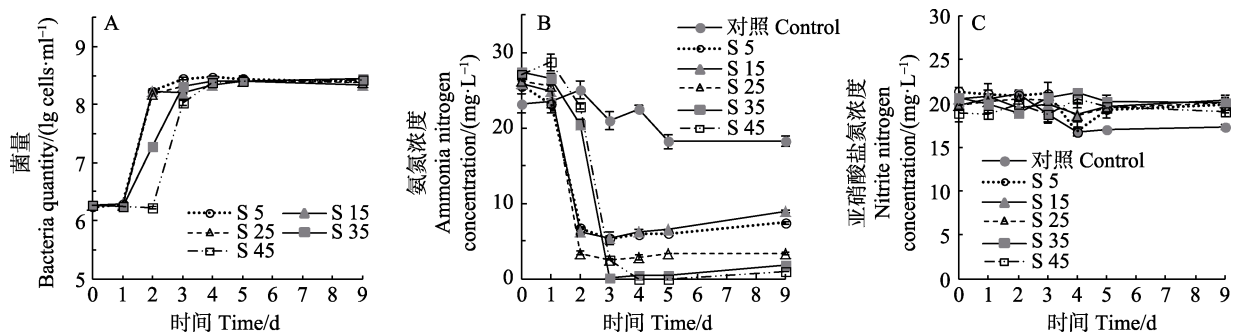


图1 不同盐度条件下XH2的菌量(A)、分析培养液中氨氮(B)、亚硝酸盐氮(C)的含量变化

Fig.1 Variations of strain XH2 amount (A), ammonia nitrogen (B) and nitrite nitrogen (C) concentrations in the medium of different salinities

S: 盐度; 对照: 盐度25, 不加菌株XH2;

氨氮初始浓度: 24 mg/L; 亚硝酸盐氮初始浓度: 20 mg/L, 下同

S: Salinity; Control: Salinity 25 without strain XH2;

Initial ammonia nitrogen concentration: 24 mg/L; Initial nitrite nitrogen concentration: 20 mg/L, the same as below

4 天, 其氨氮去除率达到 100.0%(图 1B)。然而, 菌株 XH2 不能有效去除环境中的亚硝酸盐氮(图 1C), 在 9 d 的监测过程中, 各实验组和对照组分析培养液中的亚硝酸盐氮浓度均无显著变化( $P>0.05$ )。

### 2.3 pH 对菌株 XH2 生长及其氨氮去除效果的影响

菌株 XH2 在 pH 为 6.0~9.0 条件下均能良好生长, 于 2 d 内菌量即可从  $10^6$  cells/ml 增长至  $10^8$  cells/ml, 其中, pH 为 7.5 时, 菌株生长最快; 当初始 pH 为 4.5 或 10.5 时, 菌株生长受到明显抑制(图 2A)。实验过程中, 对照组和 pH 为 4.5 实验组的氨氮浓度始终无明显变化( $P>0.05$ ); pH 为 6.0、7.5 和 9.0 实验组的氨氮浓度总体呈明显下降趋势, pH 为 10.5 实验组的氨氮浓度略有降低, 其中, pH 为 6.0 和 7.5 实验组的氨氮浓度在第 2 天分别大幅降低至 0.26 和 0 mg/L, 此后, pH 为 6.0、7.5、9.0 实验组的氨氮浓度稳定在较

低水平(图 2B)。就亚硝酸盐氮的浓度而言, 对照组和各实验组均未呈现下降趋势, 在 14.97~24.31 mg/L 的范围内小幅波动(图 2C)。

### 2.4 温度对菌株 XH2 生长及其氨氮去除效果的影响

菌株 XH2 在温度为 5℃ 时, 生长受到明显抑制, 在温度为 15℃~45℃ 时, 均能良好生长, 2~3 d 时, 其菌量可从初始的  $10^6$  cells/ml 增长至  $10^8$  cells/ml, 并一直维持在该水平(图 3A)。对照组和温度为 5℃ 实验组的氨氮浓度无明显变化( $P>0.05$ ), 其他各实验组的氨氮浓度总体呈下降趋势。其中, 温度为 30℃、35℃ 和 45℃ 实验组的氨氮浓度在第 2 天时降至最低, 其氨氮去除率分别为 100.0%、93.8% 和 70.1%; 温度为 15℃、25℃ 实验组则在第 3 天降至最低, 其氨氮去除率为 99.6%、97.7%; 其后, 实验组的氨氮浓度均略有升高, 但仍远低于对照组(图 3B)。就亚硝酸盐氮

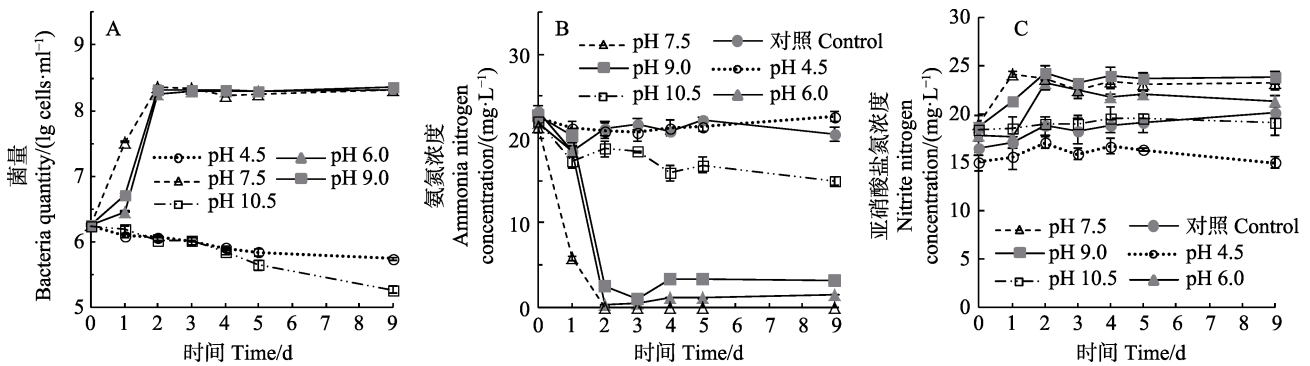


图 2 不同 pH 条件下 XH2 的菌量(A)、分析培养液中氨氮(B)、亚硝酸盐氮(C)的含量变化  
Fig.2 Variations of strain XH2 amount (A), ammonia nitrogen (B) and nitrite nitrogen (C) concentrations in the medium of different pH

对照: pH 6.0, 不加菌株 XH2  
Control: pH 6.0 without strain XH2

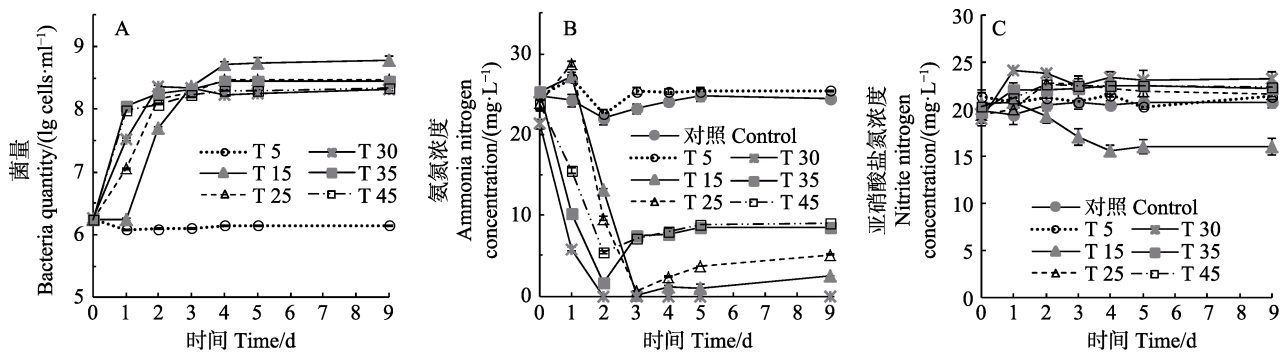


图 3 不同温度条件下 XH2 的菌量(A)、分析培养液中氨氮(B)和亚硝酸盐氮(C)的含量变化  
Fig.3 Variations of strain XH2 amount (A), ammonia nitrogen (B) and nitrite nitrogen (C) concentrations in the medium at different temperatures

T: 温度; 对照: 温度 30℃, 不加菌株 XH2  
T: Temperature; Control: Temperature 30℃ without strain XH2

的浓度而言, 对照组和各实验组在 15.97~22.57 mg/L 的范围内小幅波动(图 3C)。

## 2.5 通气量对菌株 XH2 生长及其氨氮去除效果的影响

通气量为 1 L/min 时, 菌株在 24 h 内进入对数生长期, 并于 36 h 后进入稳定期, 菌量最高可达  $1.03 \times 10^9$  cells/ml, 而培养液中的溶氧含量也相应地在 2 h 时达到最低值, 随后不断升高并稳定在 90.0% 左右; 通

气量为 2 L/min 时, 菌株 12~36 h 进入对数生长期, 60 h 后进入稳定期, 稍迟于上述实验组, 菌量最高可达  $6.78 \times 10^8$  cells/ml (图 4A、图 4B)。菌株在 2 实验组中均表现出对氨氮良好的去除效果, 低通气量组在第 1 天氨氮去除率可达 98.6%, 高通气量组第 2 天的氨氮去除率为 98.2%, 此后, 培养液中的氨氮浓度始终维持在较低水平(图 4C)。但 2 个实验组的亚硝酸盐氮浓度一直维持在 13.63 mg/L 以上的较高水平(图 4D)。

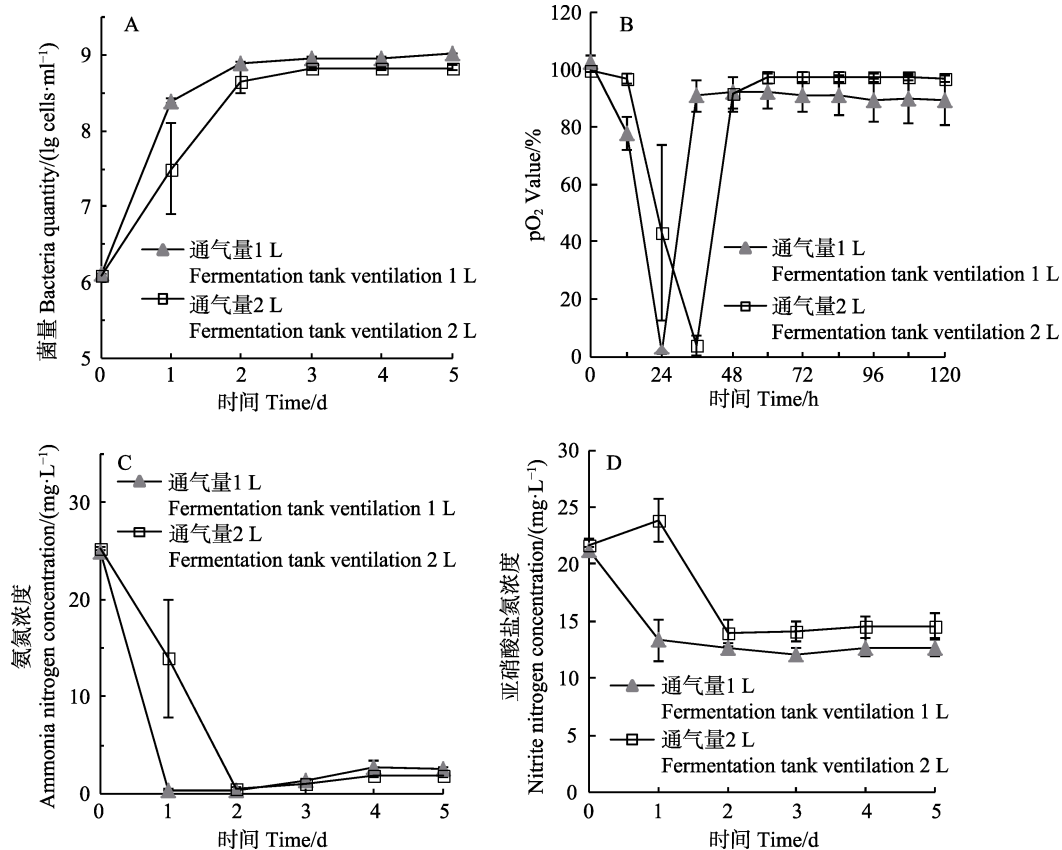


图 4 不同通气量条件下 XH2 的菌量(A)和分析培养液中溶氧(B)、氨氮(C)、亚硝酸盐氮(D)的含量变化

Fig.4 Variations of strain XH2 amount (A), dissolved oxygen (B), ammonia nitrogen (C) and nitrite nitrogen (D) concentrations in the medium with different ventilations

## 3 讨论

现有报道的红球菌多筛选自土壤、工业废水、畜禽养殖废弃物等非水产养殖水体环境。黄钧等(2010)和张智超等(2017)从活性污泥及畜禽养殖排出物中分离出红球菌菌株, 它们 6 d 内的氨氮去除率分别达到 68.9%和 94.4%; 司文攻等(2011)从土壤获得的 1 株红球菌, 其 3 d 内氨氮去除率为 65.0%。相较于上述红球菌, 菌株 XH2 为养殖池塘土著菌, 其在原有环境中的适应性和竞争力更强, 且对原有生态环境相对更为安全(何沉滨等, 2015)。在养殖水体环境中筛选具备生态适应性强、生长性能好、水质净化效率高的菌株,

并结合水产养殖与渔业微生物制剂的生产实际开展针对性研究, 以此研发的微生物制剂方能更切合水产养殖产业的实际需求, 才能更有效地促进其在养殖水体原位净化技术的规模化应用, 助力零换水生态型养殖业的发展。本研究选择以虾池养殖中后期(50 d)水体环境为基础, 从中筛选具有高效氨氮去除功能的土著菌株, 进而获得玫瑰红红球菌 XH2。故从目的性、产业应用预期目标等方面而言, 该研究所获菌株较以往研究定位更明确, 更易满足水产养殖水体净化所需。

盐度、温度、pH 和通气量是水产养殖中的几个重要指标。本研究通过检测分析培养液中菌量、氨氮及亚硝酸盐氮浓度的变化, 进而了解了上述 4 个因子

对菌株生长和氨氮去除效果的影响。菌株 XH2 在盐度为 5~45, pH 为 6.0~9.0, 温度为 15℃~45℃及通气量为 1~2 L/min 的条件下均能生长良好, 在较低盐度(5~25)和较高温度(25℃~45℃)下生长更优。另一方面, 菌株 XH2 在盐度为 5~15 时, 最高氨氮去除率约为 79.0%, 而盐度为 25~45 时, 最高氨氮去除率在 90.0%以上, 说明菌株 XH2 对较高盐度水体环境的氨氮去除效果更佳。在 pH 为 6.0~9.0、温度为 15℃~35℃时, 菌株 XH2 对氨氮的最高去除率在 93.0%以上; 当 pH 为 4.5 和 10.5、温度为 5℃时, 氨氮去除效果不明显, 温度为 45℃时, 最高氨氮去除率仅为 77.1%, 表明其在中性偏碱的条件下有较好的氨氮去除效果, 而温度过高或过低均会弱化其氨氮去除效果。在通气量为 1 和 2 L/min 的条件下, 菌株 XH2 的最高氨氮去除率均在 98.0%以上, 但其在低通气量组时进入对数生长期以及氨氮浓度大幅下降的时间均早于高通气量组。因此, 在实际生产中可采用低通气量来扩培菌株 XH2, 在节约资源的同时不会影响其生长和氨氮去除效果。

在水产养殖生产中, 适宜的水体盐度、pH、温度的覆盖区间分别为 0~38.1、6.9~8.7 和 15℃~35℃, 在不同的养殖品种和养殖模式之间会存在一定的差异(李卓佳等, 2007)。可见, 菌株 XH2 对盐度、pH、温度的适应范围与大部分水产养殖池塘水体的变化区间相吻合。通常具有氨氮去除功能的菌株环境适应范围为盐度 0~35、pH 6.0~9.0 和温度 15℃~40℃, 该条件下菌株对氨氮的去除率为 40.0%~98.0%(李存玉等, 2017; 胡修贵等, 2013)。综合来看, 菌株 XH2 与上述报道相比大体一致, 而其对氨氮的去除效果更优。

微生物转化氨氮为多种形态的氮的形式大体分为 3 类。其一, 氨氮被氧化为亚硝酸盐氮、硝酸盐氮等; 其二, 氨氮被微生物同化吸收以合成其生长所需含氮物质; 其三, 氨氮被转化为含氮气体, 如 NO<sub>x</sub>、N<sub>2</sub> 等(王弘宇等, 2009)。黄雪娇等(2016)发现了一株具有氨氮去除功效的光合菌, 培养过程中并未发现亚硝酸盐氮及硝酸盐氮积累, 其认为该菌通过同化吸收来去除氨氮。刘志云等(2016)筛选出一株能去除氨氮的粉状毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*), 其氨氮去除途径为同化吸收及转化为硝酸盐氮。当前, 鲜有关于红球菌氨氮去除机制的报道(张智超等, 2017)。本研究对各实验组中菌株 XH2 的分析培养液进行了菌量、氨氮和亚硝酸盐氮的检测。各实验组中菌株 XH2 菌量的增加与氨氮去除同步, 且氨氮浓度大幅下降与菌株对数生长期吻合, 同时, 亚硝酸盐氮的浓度没有明显变化, 推测氨氮去除过程主要发生在菌株对数生长期

期, 大部分氨氮被菌株同化, 用于其自身生长繁殖(陈咄圳等, 2009; 张培玉等, 2010)。后期氨氮的小幅回升, 可能是由于分析培养液中营养不足, 菌株进入衰亡期, 菌体自溶释放出的氨氮比菌株去除的氨氮多(李泳洪等, 2016)。由于只检测了氨氮和亚硝酸盐氮, 未检测其他氮元素指标, 并不能明确菌株 XH2 是否能转化成其他形式的氮, 有待进一步的实验来证实。

总体而言, 本研究从虾池养殖水体环境中获得的土著玫瑰红红球菌 XH2 对盐度、pH、温度的适应性良好, 且能有效去除水体环境中的氨氮, 可作为养殖池塘水体氨氮防控菌剂产品研发的备选菌株。当前, 已明确了实验室条件下 4 种因子对菌株 XH2 氨氮去除效果的影响, 之后将会对该菌株的氨氮去除机制及其对养殖池塘水体其他生物群落的影响、菌剂规模化生产工艺、在养殖生产中的应用技术优化等做进一步的研究。

## 参 考 文 献

- Bai ZH, Chen YY, Zhao ZR, *et al.* Production method and application of *Rhodococcus* with denitrification function. CN104140935A, 2013-05-08 [白志辉, 陈月月, 赵志瑞, 等. 一株具有脱氮功能的红球菌及其菌剂的生产方法和应用. CN104140935A, 2013-05-08]
- Boutin S, Audet C, Derome N. Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(10): 662-670
- Cao YC, Li ZJ, Jia XP, *et al.* System configuration of industrial shrimp farming. *South China Fisheries Science*, 2006, 2(3): 72-76 [曹煜成, 李卓佳, 贾晓平, 等. 对虾工厂化养殖的系统结构. 南方水产, 2006, 2(3): 72-76]
- Chen PZ, Wang LG, Wang YC, *et al.* Screening and denitrification characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifier bacteria. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3614-3618 [陈咄圳, 王立刚, 王迎春, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究. 环境科学, 2009, 30(12): 3614-3618]
- Coady TM, Coffey LV, O'Reilly C, *et al.* Substrate evaluation of *Rhodococcus erythropolis* SET1, a nitrile hydrolyzing bacterium, demonstrating dual activity strongly dependent on nitrile sub-structure. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015(5): 1108-1116
- Cserháti M, Kriszt B, Krifaton Cs, *et al.* Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(1): 176-185
- Dong YB, Dai YY. Research survey of toxic effects of nitrite to aquatic animals. *Journal of Aquaculture*, 2011, 32(4): 28-32 [董玉波, 戴媛媛. 亚硝酸盐氮对水产经济动物毒性影响

- 的研究概况. 水产养殖, 2011, 32(4): 28–32]
- He YB, Li Y, Chen YJ, *et al.* Screening *Bacillus subtilis* to use for improving water quality in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) culture ponds. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(4): 86–91 [何沉滨, 李义, 陈亚军, 等. 泥鳅养殖水体中一株芽孢杆菌的筛选及其净水效果研究. 水生态学杂志, 2015, 36(4): 86–91]
- He YY, Li SF, Wang QY, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of glutamate dehydrogenase in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) exposed to ambient ammonia. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 83–91 [何玉英, 李少飞, 王清印, 等. 氨氮胁迫下中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)谷氨酸脱氢酶基因的表达分析. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 83–91]
- Hu XG, Zhao P, Li YH, *et al.* Isolation and identification of heterotrophic nitrosobacteria from bio-flocs and analysis of their characteristics. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 97–103 [胡修贵, 赵培, 李玉宏, 等. 生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 97–103]
- Huang J, Mou LP, Zhao YG. A heterotrophic nitrifying aerobic denitrifying bacterium and its culture method and application. CN101875909A, 2010-11-03 [黄钧, 牟丽娉, 赵永贵. 一种异养硝化好氧反硝化细菌及其培养方法和用途. CN101875909A, 2010-11-03]
- Huang XJ, Yang C, Ni JP, *et al.* Isolation, identification and characteristics of a *Rhodopseudomonas* with high ammonia-nitrogen removal efficiency. *Environmental Science*, 2016, 37(6): 2276–2283 [黄雪娇, 杨冲, 倪九派, 等. 1株高效去除氨氮的红假单胞菌的分离鉴定及特性. 环境科学, 2016, 37(6): 2276–2283]
- Jorge LM, Olga VM, Tamara VT, *et al.* Development of a *Rhodococcus* recombinant strain for degradation of products from anaerobic dechlorination of PCBs. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(4): 663–668
- Kirkwood KM, Andersson JT, Fedorak PM, *et al.* Sulfur from benzothiophene and alkylbenzothiophenes supports growth of *Rhodococcus* sp. strain JVH<sub>1</sub>. *Biodegradation*, 2007, 18(5): 541–549
- Kuang JM, Wu XL, Zhao DH. Research and application on colorants in aquaculture. *Guangdong Feed*, 2010, 19(4): 22–25 [邝金媚, 吴秀丽, 赵典惠. 着色剂在水产养殖中的研究与应用. 广东饲料, 2010, 19(4): 22–25]
- Kuang Q, Sun M, Zhang WN, *et al.* Biological characteristics of *Bacillus megaterium* JSSW-JD and its effect on nitrogen and phosphorus in aquaculture water. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(4): 222–225 [匡群, 孙梅, 张维娜, 等. 巨大芽孢杆菌 JSSW-JD 的生物学特性及对养殖水体氮磷的影响. 江苏农业科学, 2013, 41(4): 222–225]
- Li CY, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Isolation, culture, and identification of two strains of probiotics and their effects on water quality control. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 120–127
- [李存玉, 柳学周, 徐永江, 等. 两株有益菌的分离、培养、鉴定及其水质调控效果评价. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 120–127]
- Li PL. Preliminary research on the ammonia-oxidization and the phenomenon of aerobic denitrification of Chemoautotrophic biofilm. Master's Thesis of Sichuan University, 2006, 8–49 [李沛霖. 自养生物膜氨氧化及其反硝化现象初探. 四川大学硕士研究生学位论文, 2006, 8–49]
- Li SS, Cao YC, Hu XJ, *et al.* Optimization for cultivation parameters of *Bacillus* sp. A4 using response surface methodology. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(5): 85–93 [李莎莎, 曹煜成, 胡晓娟, 等. 响应面法优化芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)A4 的培养参数. 南方水产科学, 2017, 13(5): 85–93]
- Li YH, Chen XL, Xu XP. Isolation and identification of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *Bacillus* sp. JB4. *Journal of Green Science and Technology*, 2016(16): 23–25 [李泳洪, 陈小岚, 许旭萍. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Bacillus* sp. JB4 的分离鉴定试验. 绿色科技, 2016(16): 23–25]
- Li ZJ, Jia XP, Yang YY, *et al.* Microbiological technology and healthy shrimp culture. Beijing: Marine Press, 2007, 68–77 [李卓佳, 贾晓平, 杨莺莺, 等. 微生物技术与对虾健康养殖. 北京: 海洋出版社, 2007, 68–77]
- Li ZJ, Li YW, Cao YC, *et al.* Analysis of physical-chemical factors variation and nutritional status of *Litopenaeus vannamei* high level seawater ponds. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10): 2025–2032 [李卓佳, 李奕雯, 曹煜成, 等. 凡纳滨对虾海水高位池养殖水体理化因子变化与营养状况分析. 农业环境科学学报, 2010, 29(10): 2025–2032]
- Liu FF, Zhou DP, Wu SH, *et al.* Isolation and identification of heterotrophic nitrifiers from cultivation wastewater. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(11): 2232–2237 [刘芳芳, 周德平, 吴淑杭, 等. 养殖废水中异养硝化细菌的分离筛选和鉴定. 农业环境科学学报, 2010, 29(11): 2232–2237]
- Liu ZY, Liu GH, Xie Q, *et al.* Isolation and characterization of an NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N degrading bacterium *Pichia farinosa* NGH for NH<sub>3</sub> reduction from chicken manure. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2016, 37(3): 43–49 [刘志云, 刘国华, 谢庆, 等. 粉状毕赤酵母 NGH 的氨氮降解特性及除氨效果研究. 家畜生态学报, 2016, 37(3): 43–49]
- Sharifuzzaman SM, Rahman H, Austin DA, *et al.* Properties of probiotics *Kocuria* SM<sub>1</sub> and *Rhodococcus* SM<sub>2</sub> isolated from fish guts. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(3): 534–542
- Si WG, Lv ZG, Xu C. Isolation of heterotrophic nitrifiers which can tolerate high concentration of ammonia-nitrogen and the optimization of their nitrogen removal efficiency in wastewater. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2011, 32(11): 3448–3454 [司文攻, 吕志刚, 许超. 耐受高



- 浓度氨氮异养硝化菌的筛选及其脱氮条件优化. 环境科学, 2011, 32(11): 3448–3454]
- Sun Y, Yang XQ, Qian SJ. Cloning and expression of polychlorobiphenyl/biphenyl degrading gene from *Rhodococcus pyridinovorans*. China Environmental Science, 2004, 24(6): 734–737 [孙艳, 杨秀清, 钱世钧. 嗜吡啉红球菌多氯联苯降解基因的克隆与表达. 中国环境科学, 2004, 24(6): 734–737]
- Wang HY, Ma F, Yang K, *et al.* Ammonia removal by two strains of heterotrophic nitrifying bacteria. China Environmental Science, 2009, 29(1): 47–52 [王弘宇, 马放, 杨开, 等. 两株异养硝化细菌的氨氮去除特性. 中国环境科学, 2009, 29(1): 47–52]
- Wang L, Wang ZJ, Gao G, *et al.* Identification and application of a probiotic strain functioning in both ammonia nitrogen removal and *Vibrio parahaemolyticus* antagonism. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 78–84 [王磊, 王志杰, 高戈, 等. 一株兼具氨氮去除能力和对副溶血弧菌拮抗作用的有益菌的筛选及其初步应用. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 78–84]
- Wang SL, Cao YC, Xu Y, *et al.* Regulation of *Bacillus cereus* to microalgae community in shrimp aquaculture water. South China Fisheries Science, 2016, 12(1): 9–16 [王善龙, 曹煜成, 徐煜, 等. 蜡样芽孢杆菌对对虾养殖水体微藻群落的调控研究. 南方水产科学, 2016, 12(1): 9–16]
- Xi JY, Cao YC, Li ZJ, *et al.* Specificity of algicidal activity against four species of microalgae by algicidal bacterium A2. South China Fisheries Science, 2016, 12(5): 34–42 [郗建云, 曹煜成, 李卓佳, 等. 溶藻菌 A2 对 4 种微藻的溶藻效果分析. 南方水产科学, 2016, 12(5): 34–42]
- Xu YX, Dai QH, Li XH, *et al.* Isolation and identification of cypermethrin degrading-bacterium CDT3 and its degradation characters. Journal of Agro-Environment Science, 2004, 23(5): 958–963 [许育新, 戴青华, 李晓慧, 等. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 958–963]
- Yang QX, Chang XB, Liu YX. Problem of photosynthetic bacteria culture in seawater and optimization of culture conditions. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(5): 1901–1902 [杨启霞, 常显波, 刘英霞. 海水培养光合细菌存在的问题及其优化研究. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1901–1902]
- Yang YY, Cao YC, Li ZJ, *et al.* The application of *Rhodopseudomonas palustris* PS1 on purifying waste water from intensive shrimp culture. Chinese Journal of Microecology, 2009, 21(1): 4–6 [杨莺莺, 曹煜成, 李卓佳, 等. PS1 沼泽红假单胞菌对集约化对虾养殖废水的净化作用. 中国微生物生态学杂志, 2009, 21(1): 4–6]
- Yang YY, Li ZJ, Jia XP, *et al.* Effect of biochemical characteristics and environmental factor of water purification photosynthetic bacteria PS2 on its growth. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(4): 293–297 [杨莺莺, 李卓佳, 贾晓平, 等. 水质净化作用菌光合细菌 PS2 的生物学特性及环境因子对其生长的影响. 上海海洋大学学报, 2003, 12(4): 293–297]
- Yang Z, Chen JX, Qin B, *et al.* Characterization and catabolic genes detection of three oil-degrading *Rhodococcus* spp. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(5): 805–812 [杨智, 陈吉祥, 秦波, 等. 3 株石油降解红球菌(*Rhodococcus* spp.)特性及相关基因分析. 应用与环境生物学报, 2015, 21(5): 805–812]
- Yin RX, Yin SR. Study on regulation of eutrophication of aquaculture water by microecological technology. China Fisheries, 2015(6): 76–78 [殷汝新, 殷守仁. 微生态技术对养殖水体富营养化的调控研究. 中国水产, 2015(6): 76–78]
- Zhang FF, Xie FX, Zhou K, *et al.* Isolation and identification of one bacterium species with high effective ability of removing ammonia-nitrogen. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2014, 29(4): 221–225 [张峰峰, 谢凤行, 周可, 等. 一株高氨氮去除能力菌株的分离筛选及鉴定. 华北农学报, 2014, 29(4): 221–225]
- Zhang GY, Chen MC, Han RY, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(2): 156–161 [张光亚, 陈美慈, 韩如吻, 等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. 微生物学报, 2003, 43(2): 156–161]
- Zhang PY, Qu Y, Yu DS, *et al.* Comparison of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification system by strain qy37 and its accelerating removal characteristic of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ . Environmental Science, 2010, 31(8): 1819–1826 [张培玉, 曲洋, 于德爽, 等. 菌株 qy37 的异养硝化/好氧反硝化机制比较及氨氮加速降解特性研究. 环境科学, 2010, 31(8): 1819–1826]
- Zhang QH, Dai XL, Li Y, *et al.* Identification and phylogenesis of ammonifying bacteria from pond water of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 692–698 [张庆华, 戴习林, 李怡, 等. 凡纳滨对虾养殖池水中氨化细菌的鉴定及系统发育分析. 水产学报, 2007, 31(5): 692–698]
- Zhang ZC, Sun H, Wu YF, *et al.* PCR-DGGE assisted selection of ammonia degrading bacteria. Acta Agriculture Zhejiangensis, 2017, 29(2): 286–291 [张智超, 孙宏, 吴逸飞, 等. 基于 PCR-DGGE 技术辅助筛选氨氮降解菌株. 浙江农业学报, 2017, 29(2): 286–291]
- Zheng XD, Wang YY. Study on producing carotenoid with *Rhodococcus*. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2000, 26(5): 516–520 [郑晓冬, 王友永. 用红球菌生产类胡萝卜素的. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(5): 516–520]
- Zhou P. Harm of ammonia nitrogen to aquaculture and its control measures. China Fisheries, 2013(8): 63–64 [周平. 氨氮对水产养殖的危害及防治措施. 中国水产, 2013(8): 63–64]



## Effects of Four Physical and Chemical Factors on the Ammonia Nitrogen Removal of *Rhodococcus rhodochrous* XH2

TIAN Yajie<sup>1</sup>, CAO Yucheng<sup>1,2</sup>, HU Xiaojuan<sup>2</sup>, HUANG Xiaoshuai<sup>2</sup>,  
XU Yu<sup>2</sup>, XU Yunna<sup>2</sup>, LI Zhuojia<sup>2,3</sup>, WEN Guoliang<sup>1,2</sup>①

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300; 3. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510275)

**Abstract** The accumulation of ammonia nitrogen in water is highly toxic to cultured aquatic animals. The microbiological method has received widespread attention as an efficient way to remove ammonia nitrogen in aquaculture because of its high efficiency and environment-friendliness. The genus *Rhodococcus* is a very diverse group of bacteria that can remove a variety of compounds, including ammonia nitrogen. Here, the strain XH2, which potently removes ammonia nitrogen, was isolated from aquaculture water during the middle to late (50 d) phase of shrimp cultivation. Its ecological adaptability and feasibility of use as a probiotic to improve aquaculture water quality was evaluated. According to the results of 16S rDNA sequencing and Biolog identification, XH2 was identified as *Rhodococcus rhodochrous*. Its growth performance and ammonia nitrogen removal efficacy were studied under different salinities (5, 15, 25, 35, and 45), pH (4.5, 6.0, 7.5, 9.0, and 10.5), temperatures (5, 15, 25, 35, and 45°C), and aeration levels (1~2 L/min). The results showed that XH2 had high adaptability to varied ranges of salinity (5~45), pH (6.0~9.0), temperature (15°C~45°C), and ventilation (1~2 L/min), with a maximum observed cell amount of  $1.03 \times 10^9$  cells/ml. Specifically, the concentration of ammonia nitrogen in medium was reduced by 90.0%~100.0% during 1~3 d under the following conditions: salinity 25~45, pH 6.0~9.0, temperature 15°C~30°C and ventilation volume 1~2 L/min ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in nitrite concentrations. Taken together, these data show that the XH2 strain possesses the physico-chemical properties of a suitable alternative in terms of salinity, pH, temperature, and ventilation, which can be applied to most aquaculture ponds for the prevention and control of ammonia nitrogen.

**Key words** *Rhodococcus rhodochrous*; Ammonia nitrogen; Physical and chemical factors

① Corresponding author: WEN Guoliang, E-mail: guowen66@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170921001

http://www.yykxjz.cn/

张培, 徐莞媛, 李志辉, 高焕, 张庆起, 赖晓芳, 陈建华, 阎斌伦. 脊尾白虾不同发育期 mtDNA 拷贝数变化特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 173-179

Zhang P, Xu WY, Li ZH, Gao H, Zhang QQ, Lai XF, Chen JH, Yan BL. Profiles of mtDNA copy number at different developmental stages of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 173-179

## 脊尾白虾不同发育期 mtDNA 拷贝数 变化特征分析\*



张 培<sup>1,2,3,4</sup> 徐莞媛<sup>1,2,3,4</sup> 李志辉<sup>1,2,3,4</sup> 高 焕<sup>1,2,3,4</sup>  
张庆起<sup>5</sup> 赖晓芳<sup>1,2,3,4</sup> 陈建华<sup>1,2,3,4</sup> 阎斌伦<sup>1,2,3,4①</sup>

- (1. 江苏省海洋生物技术重点实验室 淮海工学院海洋生命与水产学院 连云港 222005;
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222001; 3. 江苏省海洋资源开发研究院 连云港 222005;
4. 江苏省农业种质资源保护与利用平台 南京 210014; 5. 连云港赣榆佳信水产开发有限公司 连云港 222100)

**摘要** 为了解脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)在不同发育期线粒体基因组(mtDNA)拷贝数的变化特征,本研究共采集其 8 个时期(受精卵期、溞状幼体 I 期、溞状幼体 II 期、溞状幼体 III 期、溞状幼体 IV 期、溞状幼体 V 期、仔虾期和成虾期)的 DNA 样品,利用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术,对上述各发育期单个细胞中的 mtDNA 拷贝数进行了测定。检测结果显示,脊尾白虾受精卵期、溞状幼体 I 期、溞状幼体 II 期、溞状幼体 III 期、溞状幼体 IV 期、溞状幼体 V 期、仔虾期和成虾期的 mtDNA 拷贝数的均值分别为 2366、2648、2644、2873、3559、9948、6452 和 8872。进一步统计分析结果显示,mtDNA 拷贝数与发育时间存在正相关性,相关系数为 0.83。研究表明,随着脊尾白虾不断生长,其单个细胞中 mtDNA 拷贝数总体呈上升趋势。

**关键词** 脊尾白虾; TaqMan 探针法; 线粒体基因组; 不同发育期; 拷贝数

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0173-07

线粒体是细胞的能量工厂,通过氧化磷酸化为细胞活动提供能量(熊伟等, 2014)。线粒体功能的实现不仅依赖于线粒体基因组的完整性和核基因组的调控,还依赖其基因组的拷贝数(Hock *et al*, 2009)。不同细胞中的 mtDNA 拷贝数并不固定,从几个到几万个不等,这主要取决于细胞及机体所处的生理状况,

如在人类(*Homo sapiens*)胚胎发育的不同阶段,肝脏和肌肉中的 mtDNA 拷贝数与胎龄呈显著正相关(Pejznochova *et al*, 2010),人类心肌细胞中的 mtDNA 拷贝数在不同年龄段也存在着较大的差异(Pohjoismäki *et al*, 2010)。mtDNA 拷贝数在一定程度上反映了线粒体的数量,可作为衡量组织需氧及能量的一种指标

\* 江苏高校优势学科建设工程资助项目、江苏省高等学校自然科学研究重大项目(17KJA240001)、江苏省“六大人才高峰”创新人才团队资助项目(2016-HYGC-CXTD-004)和江苏省研究生实践创新计划(KYLX16\_1417)共同资助[This work was supported by Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions(PAPD), Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China(17KJA240001), “Six Talent Summit” Innovative Talents Team of Jiangsu Province (2016-HYGC-CXTD-004), and Practice Innovation Program for Graduate Students in Jiangsu Province (KYLX16\_1417)]. 张 培, E-mail: 2272525096@qq.com

① 通讯作者: 阎斌伦, 教授, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

收稿日期: 2017-09-21, 收修改稿日期: 2017-11-13

(Kaaman *et al.*, 2007; Justo *et al.*, 2005)。在不同的生理状况下, mtDNA 拷贝数的调控机制至今尚不清楚。目前, 对于 mtDNA 拷贝数的研究主要集中在人类疾病发生方面, 尤其是恶性肿瘤, 如肝癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌等(高原等, 2016; Linkowska *et al.*, 2015; Lemnrau *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2014)。在此类疾病的发生过程中, mtDNA 拷贝数会显著升高或者降低(Akbar *et al.*, 2016; Mambo *et al.*, 2005), 如在肠癌等病变组织中, mtDNA 拷贝数较正常组织显著升高(Qu *et al.*, 2011), 而在肺癌等病变组织中, mtDNA 拷贝数较正常组织显著降低(Lin *et al.*, 2008)。除此之外, 在小鼠(*Mus musculus*)、猪(*Sus scrofa*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)等物种中关于 mtDNA 拷贝数的研究也表明, 机体在不同的生理状况下, 其细胞中 mtDNA 拷贝数会出现显著的变化(Ikeda *et al.*, 2015; 成文敏等, 2012; 周莉娟等, 2013; 叶侃, 2011), 而在甲壳动物中, 除了张培等(2016)对脊尾白虾 mtDNA 拷贝数响应汞胁迫的变化特征外, 关于 mtDNA 拷贝数的研究则未见报道。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是我国的一种重要海洋经济虾类, 具有繁殖周期短、生长速度快和环境适应性广等优点(Xu *et al.*, 2010), 3~4 个月可繁殖 1 代, 可以在短时间内观察到其不同生长阶段的特征, 是开展甲壳动物基础遗传和遗传育种研究的良好模式生物。伴随着脊尾白虾的生长, 其机体各项生理活动及指标也会变化。目前, 脊尾白虾不同生长阶段的研究主要集中在消化和免疫防御、胚胎和幼体存活率、饵料系数等方面(Babulo *et al.*, 2008; 索帅等, 2015; 李玉全, 2014; 冯艳艳等, 2017), 而对于 mtDNA 拷贝数的研究甚少。mtDNA 拷贝数的变化一定程度上反映了机体生命活动耗能的多少, 也从侧面体现了生物体代谢与生长的快慢。本研究在建立一种快速、精确的脊尾白虾 mtDNA 拷贝数检测方法的基础上, 研究了不同发育期脊尾白虾 mtDNA 拷贝数的变化特征, 希望通过对脊尾白虾生长过程中 mtDNA

拷贝数的变化特征分析, 为脊尾白虾在生长过程中的生长情况观测提供新的生物指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用脊尾白虾取自江苏省连云港赣榆佳信水产开发有限公司的养殖池塘, 是由池塘中的野生群体自繁而来。在实验室养殖环境条件下暂养 24 h 后, 进行后续实验。实验期间正常投喂(早晚各 1 次), 连续充气, 水温保持在 25℃左右, 盐度为 26, 溶氧量  $\geq 5$  mg/L, pH 为 8.0~8.5。

### 1.2 引物设计

根据 *ANT*(腺苷酸转移酶基因, GenBank No. KP892663.1, 核基因组单拷贝基因)和 *ATP6*(三磷酸腺苷合成酶 6, GenBank No. NC012566.1, 线粒体基因组单拷贝基因)2 个基因序列, 设计实时定量 PCR (qRT-PCR) 扩增引物及 TaqMan 探针(已申请国家专利, 申请号为 201610906439.X)。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 mtDNA 和 nDNA 标准品的制备

提取脊尾白虾组织总 DNA, 并以此为模板, 分别用 *ANT* 和 *ATP6* 引物进行扩增, 10  $\mu$ l PCR 体系: 7.0  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 1.0  $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 0.6  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 0.2  $\mu$ l dNTPs (10  $\mu$ mol/L), 0.2  $\mu$ l *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ l), 上、下游引物各 0.4  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), 0.2  $\mu$ l mix-DNA (20 ng/ $\mu$ l)。扩增程序: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 1 min、35 个循环; 最后, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物经胶回收纯化后, 按 pEASY-T3 Zero Cloning Kit 操作说明, 把相应的片段连接到质粒载体中, 再转化入 Trans1-T1 phage Resistant 感受态细胞, 利用蓝白斑筛选获得阳性克隆菌株, 挑取含有阳性克

表 1 *ANT*、*ATP6* 基因实时定量 PCR 引物及 TaqMan 探针  
Tab.1 Quantitative real-time PCR primers and TaqMan probes of *ANT* and *ATP6*

引物及探针 Primer and probe	序列 Sequence (5'~3')
ANT-F	GGGTTGAAAGAGGGAATG
ANT-R	CAAGCATTATATTTTGTACAGAC
ATP6-F	TGCATGGTCTCTCTCACGCT
ATP6-R	AGTGAGACGAAGACAAGGGGTGCC
ANT-Probe	FAM-CTTACTACAGGGCATGTCGCTCC-TAMRA
ATP6-Probe	FAM-CCTTTTtagggccagccaacc-TAMRA

隆的单克隆菌落扩大培养, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。经鉴定为阳性质粒的, 用 NanoDrop 2000 测定质粒浓度, 利用双链 DNA 拷贝数计算器(<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>)将质粒质量换算成拷贝数(拷贝/ $\mu\text{l}$ ), 作为 mtDNA 和 nDNA 标准品。

#### 1.4 mtDNA 和 nDNA 标准曲线的建立

使用无 DNA 酶的 ddH<sub>2</sub>O 将质粒标准品 10 倍梯度稀释成 10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup> 拷贝, 各 1000  $\mu\text{l}$ , 并以此制作标准曲线。

qRT-PCR 采用 10  $\mu\text{l}$  扩增体系, 反应体系: 5  $\mu\text{l}$  Premix Ex Taq(qPCR Probe), 0.2  $\mu\text{l}$  上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.2  $\mu\text{l}$  50 $\times$ ROX Reference Dye, 0.2  $\mu\text{l}$  gDNA(20 ng/ $\mu\text{l}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$  TaqMan 探针(0.6  $\mu\text{mol/L}$ )。采用 StepOnePlus™ 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems Inc.) 进行扩增, 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  20 s; 95 $^{\circ}\text{C}$  1 s、60 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 40 个循环。

#### 1.5 脊尾白虾不同发育期 DNA 的提取

脊尾白虾胚胎发育的过程一般分为 2 细胞期、4 细胞期、8 细胞期、16 细胞期、32 细胞期、囊胚期、原肠期、无节幼体期、溞状幼体 I 期、溞状幼体 II 期、溞状幼体 III 期、溞状幼体 IV 期、溞状幼体 V 期、溞状幼体 VI 期和仔虾等时期(梁象秋等, 1988; 武文魁, 1984; 王绪峨, 1991)。本研究选取了受精卵期、溞状幼体 I 期、溞状幼体 II 期、溞状幼体 III 期、溞状幼体 IV 期、溞状幼体 V 期、仔虾期和成虾期 8 个时期的样品, 每个时期各取 3 尾, 经液氮研磨后用 DNA 快速抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取总 DNA, 将 DNA 浓度稀释至 20 ng/ $\mu\text{l}$  备用。

#### 1.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 对数据进行相关性分析。从脊尾白虾核型初步推测其为二倍体, 因此, 每个细胞中的线粒体基因组拷贝数的计算公式为:

$$\text{mtDNA 拷贝数} = 2 \times \text{ATP6 拷贝数} / \text{ANT 拷贝数}$$

## 2 结果

### 2.1 mtDNA 和 nDNA 标准曲线的构建

以 10 倍梯度稀释重组质粒后, 选取 10<sup>7</sup>~10<sup>2</sup> 的稀释标准品进行 qRT-PCR 扩增, 分别获得 ANT 基因与 ATP6 基因的扩增曲线。ATP6 基因的标准曲线的回归方程  $y = -3.402x + 15.928$ ; ANT 基因的标准曲线的回归方程  $y = -3.439x + 15.248$ , 相关系数  $R > 0.99$ , 见图 1。

### 2.2 脊尾白虾不同发育期线粒体基因组拷贝数的变化

利用 qRT-PCR, 根据标准曲线获得各个样本平均每个细胞中线粒体基因组拷贝数, 统计结果显示, 各发育期的 mtDNA 拷贝数随着生长发育总体呈上升趋势(图 2)。受精卵期、溞状幼体 I 期、溞状幼体 II 期、溞状幼体 III 期、溞状幼体 IV 期、溞状幼体 V 期、仔虾期和成虾期 8 个时期的 mtDNA 拷贝数均值分别为 2366、2648、2644、2873、3559、9948、6452 和 8872, 溞状幼体 V 期和成虾期 mtDNA 拷贝数最多, 分别是受精卵期的 4.2 倍和 3.7 倍。进一步统计分析发现, mtDNA 拷贝数和发育时间存正相关性, 相关系数为 0.83, 且溞状幼体 V 期、仔虾和成虾期与其他发育期存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

目前, 检测 mtDNA 拷贝数的方法主要有 SYBR Green I 染料法(何静等, 2014)和 TaqMan 探针法(Chiu *et al*, 2003) 2 种。由于 SYBR Green I 染料法的特异性不强, 多数 mtDNA 拷贝数测定还是采用 TaqMan 探针法。采用 TaqMan 探针法建立的标准曲线具有良好的重复性, 且引物、探针序列和引物探针相互作用关系的双重保证克服了普通 PCR 假阳性的缺陷(Pohjoismäki *et al*, 2010)。本研究通过构建脊尾白虾线粒体及核基因组单拷贝基因的质粒作为标准品, 建立了一种快速、高效、精确的检测脊尾白虾 mtDNA 拷贝数的方法, 并在此基础上, 对脊尾白虾不同发育期的 mtDNA 拷贝数进行了精确定量。

早期胚胎中的 ATP 水平代表着机体胚胎的发育水平(Dumollard *et al*, 2008), 线粒体产 ATP 能力又与细胞内 mtDNA 拷贝数有密切联系(Dumollard *et al*, 2007; Tsai *et al*, 2015), 至今有许多学者将 mtDNA 拷贝数作为评估卵母细胞发育水平的一个指标(Van Blerkom, 2011; Santos *et al*, 2006; Zeng *et al*, 2007), 即 mtDNA 拷贝数越高, 卵母细胞成熟度越高, 受精能力越强, 胚胎发育潜能越高。所以, mtDNA 拷贝数对机体的胚胎发育有着深远影响。本研究结果显示, 随着脊尾白虾的生长, 细胞内的 mtDNA 拷贝数在不断增加, 总体呈上升趋势, 这与谢燕梅(2014)在对猪不同生长阶段不同组织 mtDNA 拷贝数变化研究中得到的结论相似, 即伴随着脊尾白虾的生长, 其活动量增加, 机体能量需求增大, mtDNA 拷贝数也会随之增加。mtDNA 拷贝数在一定程度上反映了脊尾白虾不同生长阶段的能量需求情况, 为评估脊尾白虾生长发育状况提供了一个生物指标。

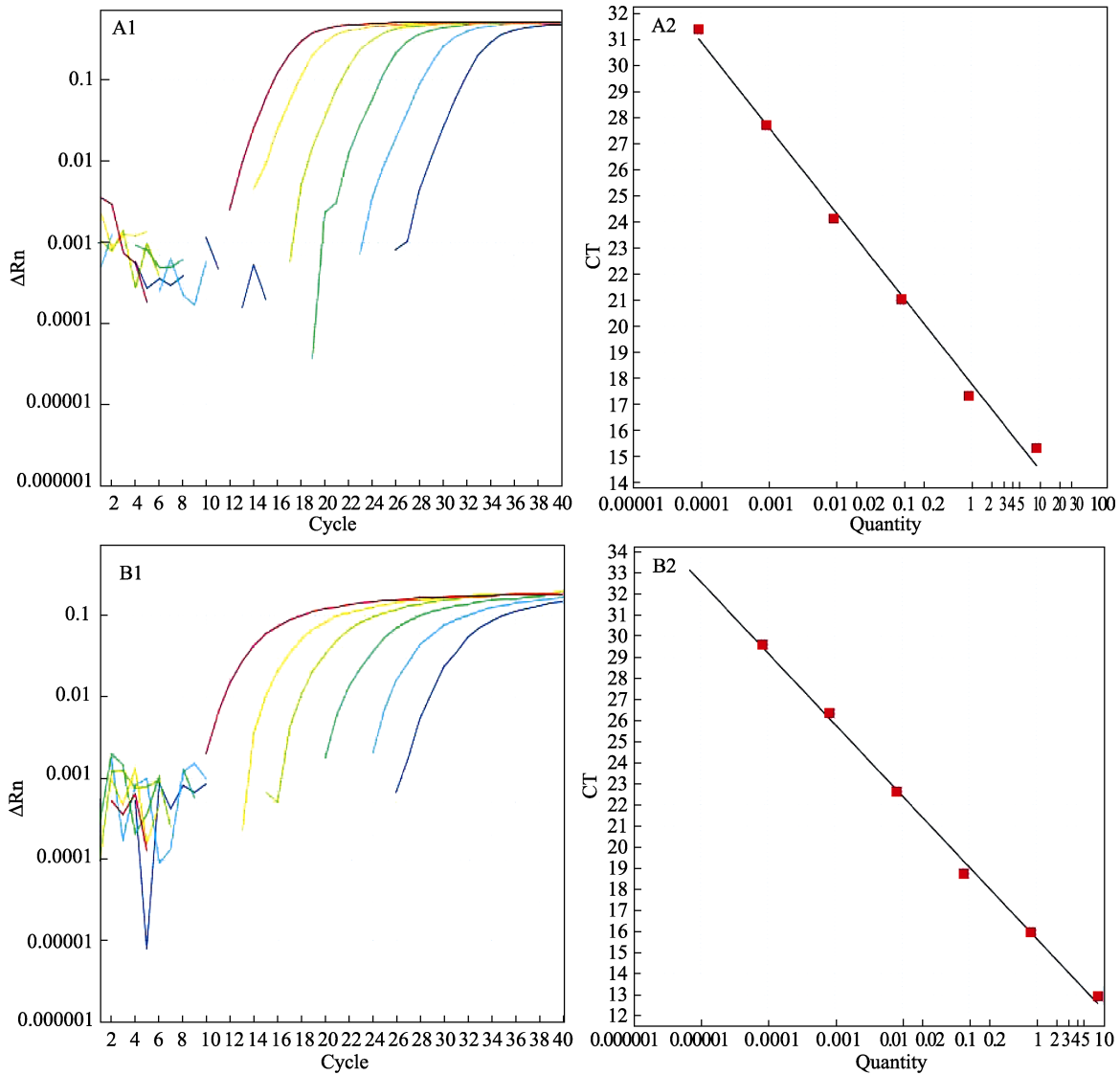


图 1 *ATP6*(A)与 *ANT*(B)荧光定量 PCR 扩增曲线及标准曲线  
 Fig.1 Quantitative PCR amplification curves and standard curves of *ATP6* and *ANT*

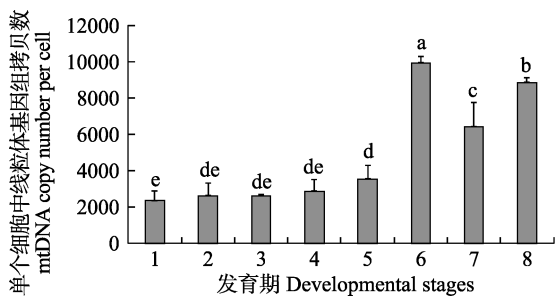


图 2 不同发育期线粒体基因组拷贝数变化  
 Fig.2 Variation of mitochondrial genome copy number at different developmental stages

1: 受精卵期; 2: 溞状幼体 I 期; 3: 溞状幼体 II 期;  
 4: 溞状幼体 III 期; 5: 溞状幼体 IV 期; 6: 溞状幼体 V 期;  
 7: 仔虾期; 8: 成虾期。不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 1: Zygote; 2: Zoea I; 3: Zoea II; 4: Zoea III; 5: Zoea IV;  
 6: Zoea V; 7: Post larvae; 8: Adult shrimps. Different letters indicated significant differences ( $P < 0.05$ )

甲壳动物具有独特的蜕皮生长方式, 在蜕皮生长期间会出现幼体前期的慢生长和幼体后期的快生长, 并伴随着机体变态, 二者相对独立又互相联系(Gore *et al*, 1985; Anger *et al*, 1987)。在十足类幼体发育阶段, 变态期间的快速生长期一般仅限制在幼体生长的倒数第一期和第二期, 此时机体形态变化大、消耗能量多, 是早期幼体慢生长及能量积累的结果。进入成体之后, 机体蜕皮生长间隔变长, 能量累积也随之变缓(McConaugha, 1982、1985)。机体内能量需求越大, mtDNA 拷贝数越高, 这可能是本研究中溞状幼体 V 期 mtDNA 拷贝数高于其他时期的原因之一。另外, 还有可能是机体内 mtDNA 拷贝数调控机制的作用, 目前报道的 mtDNA 拷贝数受线粒体转录因子 A (Lu *et al*, 2013)、同源重组修复蛋白 Rad51(Sage *et al*,

2011)、DNA 聚合酶  $\gamma$ (Kelly *et al.*, 2012)等因素影响, 具体如何调控有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- Akbar M, Essa MM, Daradkeh G, *et al.* Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. *Brain Research*, 2016, 1637: 34–55
- Anger K. The D<sub>0</sub> threshold: A critical point in the larval development of decapod crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1987, 108(1): 15–30
- Babulo B, Muys B, Nega F, *et al.* Household livelihood strategies and forest dependence in the highlands of Tigray, Northern Ethiopia. *Agricultural Systems*, 2008, 98(2): 147–155
- Cheng WM, Wei HJ, Pan WR, *et al.* Genetic variation and phylogenetic analysis of *M* genes of 63 isolate strains of IBV. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 39(1): 127–131 [成文敏, 魏红江, 潘伟荣, 等. 猪孤雌激活早期胚胎线粒体分布及 mtDNA 拷贝数变化的研究. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(1): 127–131]
- Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, *et al.* Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(5): 719–726
- Dumollard R, Campbell K, Halet G, *et al.* Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes. *Developmental Biology*, 2008, 316(2): 431–440
- Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, 2007, 77: 21–49
- Feng YY, Li J, Li JT, *et al.* Effects of florfenicol on the immune and antioxidant activities of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 140–147 [冯艳艳, 李健, 李吉涛, 等. 氟苯尼考对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)免疫和抗氧化功能的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 140–147]
- Gao Y, Nie HJ, Yang D, *et al.* Changes of the mitochondrial DNA copy number and the antioxidant system in the PBMC of hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2016, 32(1): 1–5 [高原, 聂鸿靖, 杨栋, 等. 肝癌患者单个核细胞线粒体 DNA 拷贝数与抗氧化能力的变化. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(1): 1–5]
- Gore RH. Molting and growth in decapod larvae. *Crustacean Issue 2-Larval Growth*, 1985, 52–65
- He J, Xia H, Zhang CM, *et al.* The real-time PCR assay for mitochondrial DNA copy number and its applications in kidney disease diagnosis. *Chinese Journal of Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 2014, 23(4): 342–348 [何静, 夏虹, 张昌明, 等. 线粒体 DNA 拷贝数检测方法的建立及在肾脏疾病诊断中的应用. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2014, 23(4): 342–348]
- Hock MB, Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual Review of Physiology*, 2009, 71: 177–203
- Ikeda M, Ide T, Fujino T, *et al.* Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119687
- Justo R, Oliver J, Gianotti M. Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics. *Mitochondrion*, 2005, 5(1): 45–53
- Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, *et al.* Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*, 2007, 50(12): 2526–2533
- Kelly RDW, Mahmud A, McKenzie M, *et al.* Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(20): 10124–10138
- Kim C, Bassig BA, Seow WJ, *et al.* Pooled analysis of mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in three prospective studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2014, 23(12): 2977–2980
- Lemnrau A, Brook MN, Fletcher O, *et al.* Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells and risk of developing breast cancer. *Cancer Research*, 2015, 75(14): 2844–2850
- Li YQ. Effects of salinity on growth, feeding and conversion rate of *Exopalaemon carinicauda*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(9): 191–193 [李玉全. 盐度对脊尾白虾生长、摄食及饵料转化率的影响. *江苏农业科学*, 2014, 42(9): 191–193]
- Liang XQ, Li YJ, Zhou ZM. The larval development of *Exopalaemon carinicauda* (holthuis). *Journal of Fisheries of China*, 1988, 12(2): 157–168 [梁象秋, 李亚娟, 周昭曼. 脊尾白虾的幼体发育. *水产学报*, 1988, 12(2): 157–168]
- Lin CS, Wang LS, Tsai CM, *et al.* Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 2008, 7(6): 954–958
- Linkowska K, Jawieñ A, Marszałek A, *et al.* Mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  mutations and their implications in mtDNA alterations in colorectal cancer. *Annals of Human Genetics*, 2015, 79(5): 320–328
- Lu B, Lee J, Nie XB, *et al.* Phosphorylation of human TFAM in



- mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA<sup>+</sup> Lon protease. *Molecular Cell*, 2013, 49(1): 121–132
- Mambo E, Chatterjee A, Xing M, *et al.* Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *International Journal of Cancer*, 2005, 116(6): 920–924
- McConaughy JR. Nutrition and larval growth. In: Wenner AM, Balkema AA(ed.), *Larval growth*. Rotterdam, 1985, 127–154
- McConaughy JR. Regulation of crustacean morphogenesis in larvae of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology*, 1982, 223(2): 155–163
- Pejznochova M, Tesarova M, Hansikova H, *et al.* Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. *Mitochondrion*, 2010, 10(4): 321–329
- Pohjoismäki JI, Goffart S, Taylor RW, *et al.* Developmental and pathological changes in the human cardiac muscle mitochondrial DNA organization, replication and copy number. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10426
- Qu FL, Liu XN, Zhou F, *et al.* Association between mitochondrial DNA content in leukocytes and colorectal cancer risk. *Cancer*, 2011, 117(14): 3148–3155
- Sage JM, Gildemeister OS, Knight KL. Discovery of a novel function for human Rad51: Maintenance of the mitochondrial genome. *Mitochondrion*, 2011, 11(4): 676
- Santos TA, Shourbagy EIS, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and Sterility*, 2006, 85(3): 584–591
- Suo S, Li J, Li JT, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth, non-specific immunity and disease resistance of *Exopalaemon carinicauda*. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2015, 5(4): 40–47 [索帅, 李健, 李吉涛, 等. 蛋白质和脂肪水平对脊尾白虾生长、非特异性免疫力及抗病力的影响. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(4): 40–47]
- Tsai S, Chen JC, Spikings E, *et al.* Degradation of mitochondrial DNA in cryoprotectant-treated hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes. *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(3): 420–425
- Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 2011, 11(5): 797–813
- Wang XE. The larval development of *Exopalaemon carinicauda*. *Marine Sciences*, 1991, 15(1): 12–14 [王绪峨. 脊尾白虾的幼体发育. *海洋科学*, 1991, 15(1): 12–14]
- Wu WK. The study on the larval development of *Exopalaemon carinicauda*. *Acta Oceanologica Sinica*, 1984, 5(sup.): 953–962 [武文魁. 脊尾白虾幼体发育的研究. *海洋学报*, 1984, 5(sup.): 953–962]
- Xie YM. Quantitative changes of mitochondrial DNA copy number in various tissues of pigs during growth. Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014, 1–56 [谢燕梅. 猪不同生长阶段不同组织线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数变化. *四川农业大学硕士研究生学位论文*, 2014, 1–56]
- Xiong W, Zhang HY, Yang HJ, *et al.* Research advances in transcription and regulation mechanism of mammalian mitochondrial genome. *Journal of Dali University*, 2014, 13(8): 26–30 [熊伟, 张海洋, 杨红娟, 等. 哺乳动物细胞线粒体基因组的转录及调控机制研究进展. *大理学院学报*, 2014, 13(8): 26–30]
- Xu W, Xie J, Shi H, *et al.* *Hematodinium* infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture*, 2010, 300(1–4): 25–31
- Ye K. Study on the radiation damage of growth and the protection in *Caenorhabditis elegans*. Doctoral Dissertation of Suzhou University, 2011 [叶侃. 辐射对秀丽线虫的生长损伤及其防护研究. *苏州大学博士研究生学位论文*, 2011]
- Zeng HT, Ren Z, Yeung WS, *et al.* Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in *in vitro* matured human oocytes. *Human Reproduction*, 2007, 22(6): 1681–1686
- Zhang P, Li ZH, Zhao L, *et al.* Profiles of mtDNA copy number in response to mercury stress in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 25(4): 78–81 [张培, 李志辉, 赵莲, 等. 汞胁迫下脊尾白虾线粒体基因组拷贝数变化特征分析. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2016, 25(4): 78–81]
- Zhou LJ, Shi CM, Song GX, *et al.* Effect of FABP3 overexpression on heart development and mitochondrial function in zebrafish embryo. *Jiangsu Medical Journal*, 2013, 39(6): 621–624 [周莉娟, 史春梅, 宋桂仙, 等. FABP3 过表达对斑马鱼胚胎心脏发育及线粒体 DNA 拷贝数的影响. *江苏医药*, 2013, 39(6): 621–624]

## Profiles of mtDNA Copy Number at Different Developmental Stages of *Exopalaemon carinicauda*

ZHANG Pei<sup>1,2,3,4</sup>, XU Wanyuan<sup>1,2,3,4</sup>, LI Zhihui<sup>1,2,3,4</sup>, GAO Huan<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Qingqi<sup>5</sup>,  
LAI Xiaofang<sup>1,2,3,4</sup>, CHEN Jianhua<sup>1,2,3,4</sup>, YAN Binlun<sup>1,2,3,4</sup>①

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Marine Life and Fisheries, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang 222001; 3. Marine Resource Development Institute of Jiangsu, Lianyungang 222005; 4. Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014; 5. Ganyu-Jiaxin Aquaculture Limited Company of Lianyungang, Lianyungang 222100)

**Abstract** Mitochondria are important organelles in cells. Mitochondria can produce ATP and provide energy for almost all biological activities. Mitochondria have a relatively independent genetic system, and nuclear genes also encode certain enzymes responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) replication and transcription. Therefore, the number and function of mitochondria is essential for embryonic development. Mitochondrial function depends on the integrity of the mitochondrial genome or the regulation of nuclear genome, as well as the mtDNA copy number. Many studies have investigated mtDNA copy numbers in animals, including studies on oocyte maturation, mammalian embryonic development, and human disease, but none have reported the mtDNA copy number in *Exopalaemon carinicauda*. To study the profiles of mtDNA copy number at different developmental stages of *E. carinicauda*, and the energy expenditure of tissues at the different stages of development, total DNA from zygote, zoea I, zoea II, zoea III, zoea IV, zoea V, post larvae, and adult shrimps were used to analyze the mtDNA copy number. One TaqMan probe-based real-time PCR was established to assess the mtDNA copy number. Our results showed that the average copy number of mtDNA per cell was 2366, 2648, 2644, 2873, 3559, 9948, 6452, and 8872 in the zygote, zoea I, zoea II, zoea III, zoea IV, zoea V, post larvae, and adults, respectively. These results show that mtDNA copy number is positively correlated with age, and the correlation coefficient ( $R$ ) was 0.83, i.e. the copy numbers of mtDNA tend to increase with progressing developmental stages of *E. carinicauda*.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; TaqMan real-time PCR; Mitochondrial genome; Different developmental stages; Copy number

① Corresponding author: YAN Binlun, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171114002

http://www.yykxjz.cn/

张学超, 刘小芳, 邱阿敏, 侯钦帅, 冷凯良, 高华. 南极磷虾及其制品中总砷含量的分析方法研究. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 180-184

Zhang XC, Liu XF, Qiu AM, Hou QS, Leng KL, Gao H. Study on the analytical method of total arsenic content in Antarctic krill (*Euphausia superba*) and its related products. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 180-184

## 南极磷虾及其制品中总砷含量的分析方法研究\*

张学超<sup>1,2</sup> 刘小芳<sup>2</sup> 邱阿敏<sup>3</sup> 侯钦帅<sup>1,2</sup> 冷凯良<sup>2①</sup> 高华<sup>1</sup>

(1. 青岛大学药学院制药工程系 青岛 266021; 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. 青岛大学公共卫生学院 青岛 266021)

**摘要** 本研究比较了电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)、氢化物发生原子荧光光谱法(HG-AFS)以及银盐法测定南极磷虾(*Euphausia superba*)及其不同形式制品总砷含量的适用性, 并采用确定的检测方法对南极磷虾冻虾、南极磷虾粉和市售不同品牌南极磷虾油中的总砷含量进行了系统测定。结果显示, 采用 ICP-MS 法、HG-AFS 法及银盐法检测南极磷虾及其制品中的总砷含量, 3 种方法的加标回收率分别达到 100.26%~110.48%、82.68%~98.50%和 89.64%~94.89%, RSD 均小于 5%。3 种国标方法对于南极磷虾及其相关制品的测定结果基本一致, 但与银盐法相比, ICP-MS 法、HG-AFS 法操作复杂, 仪器昂贵。因此, 银盐法可作为快速测定南极磷虾及其制品中总砷含量的首选方法。采用银盐法测得南极磷虾冻虾、虾粉和虾油中总砷含量分别为 0.44~0.45 mg/kg、1.04~1.91 mg/kg、0.52~5.50 mg/kg。加快建立南极磷虾及其制品中无机砷定量及砷形态分析技术对于科学认识南极磷虾砷的安全性至关重要。

**关键词** 南极磷虾; 总砷; ICP-MS; HG-AFS; 银盐法

中图分类号 TS207.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)06-0180-05

南极磷虾(*Euphausia superba*)是目前南大洋最大的单种生物资源, 生物储量可达 6.5~10 亿 t (刘丽等, 2010)。南极磷虾富含蛋白质、人体所必需的全部氨基酸及钙、钾、镁、镉等多种矿质元素, 同时还含有虾青素、磷脂、EPA/DHA 等 n-3 系列多不饱和脂肪酸等海洋活性成分(龚洋洋等, 2013; 卢坤俊等, 2013; 欢休, 2013), 营养价值极高, 已成为世界远洋捕捞业最重要的开发对象之一(聂玉晨等, 2016; 袁玥等, 2012; 朱国平, 2011; 黄婧, 2014)。目前, 南极磷虾制品形式主要有虾粉、虾油、虾肉、虾糜等(郑晓伟等,

2013; 贺瑞坤等, 2013; 黄洪亮等, 2007), 产品形式不断丰富, 加工产业发展迅猛(陈雪忠等, 2009; Grijalba *et al*, 2016)。作为近年来新开发的远洋生物资源, 关于南极磷虾及其制品的安全性研究尚不多见, 相关研究亟待开展(严俊丽等, 2016)。

砷是一种类金属元素, 在自然界中广泛存在 (Maher *et al*, 2016; 刘守廷等, 2013; Williams *et al*, 2009)。砷元素的毒性与其存在形态密切相关(董丽臻等, 2015; Escudero *et al*, 2013), 无机砷具有致癌毒性, 有机砷通常被认为是低毒或无毒的(Sele *et al*, 2015;

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项课题(2016HY-ZD0902)和农业农村部南极海洋生物资源开发利用项目(2017)共同资助[This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0902), and Special Finance Funds of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Project for Exploitation and Utilization of Antarctic Marine Biological Resources (2017)]. 张学超, E-mail: zhangxuechao2015@163.com

① 通讯作者: 冷凯良, 研究员, E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-11-14, 收修改稿日期: 2017-12-08

Rodriguez *et al.*, 2009)。以砷化合物的半数致死量 LD<sub>50</sub> 计, 其毒性从大到小依次为亚砷酸根 As(III)>砷酸根 As(V)>一甲基砷 MMA>二甲基砷 DMA>砷胆碱 AsC>砷甜菜碱 AsB(王松等, 2016)。总砷含量的测定可为产品质量控制与监管提供依据。目前, 关于南极磷虾及其制品中砷含量及检测技术的研究较少, 戚平等(2011)对氢化物发生原子荧光光谱法(HG-AFS)在南极磷虾粉总砷含量测定的前处理方法做了讨论, 王松等(2016)用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)对南极磷虾油中的总砷做了研究。目前, 尚未有研究对比国标中规定的总砷含量测定方法在南极磷虾及其制品中的适用性, 同时也未见南极磷虾及其不同形式制品总砷含量的系统分析报道。

目前, GB/T5009.11-2014《食品安全国家标准 食品中总砷以及无机砷的测定》对于食品中总砷的测定方法进行了标准化规定, 其中包括电感耦合和等离子体质谱(ICP-MS)、氢化物发生原子荧光光谱(HG-AFS)及银盐法 3 种方法。这 3 种方法均可针对南极磷虾及其相关制品进行总砷含量的分析检测, 但由于这 3 种方法的前处理方式及检测条件具有较大差异, 3 种方法定量限、检出限、线性范围均不相同, 各有利弊。ICP-MS 法的检出限为 0.003 mg/kg, 定量限为 0.010 mg/kg; HG-AFS 法的检出限为 0.010 mg/kg, 定量限为 0.040 mg/kg; 银盐法的检出限为 0.2 mg/kg, 定量限为 0.7 mg/kg。因此, 针对南极磷虾及其制品中的适用性也不尽相同。本研究对比了 3 种方法分析南极磷虾冻虾、虾粉及虾油总砷含量的适用性, 旨在确定快速测定南极磷虾及其制品中总砷含量的首选方法, 以期为南极磷虾实际生产加工与相关产品市场监管提供技术指导。南极磷虾及其产品中砷含量的检测以及控制是南极磷虾市场发展的关键科学问题, 确定准确便捷的总砷含量的分析技术, 对于南极磷虾产业健康发展和市场监管具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验仪器** 电感耦合等离子体质谱 ICP-MS(美国 Aglient700X); 氢化物发生原子荧光光谱 HG-AFS(北京普析公司); UV-2000 紫外分光光度计(尤尼克仪器有限公司); Milliplus 2150 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司); FA1004N 电子天平(上海民侨精密科学仪器有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); 微波消解仪(上海新仪仪器公司); 电炉(龙口市电炉制造厂); 组织匀浆器

(上海标本模型厂); 马弗炉(龙口市电炉制造厂)。

**1.1.2 实验材料** 硝酸、过氧化氢、氢氧化钠、氢氧化钾、硼氢化钾、盐酸、硫酸、高氯酸等均为分析纯; 三氧化二砷, 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

南极磷虾由“南极海洋生物资源开发与利用”项目组于 2015 年 5 月和 2016 年 5 月捕捞自南极 FAO 48.1 区, 捕捞后迅速冷冻, 保证虾块中心温度低于  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下储藏运输至实验室后, 贮藏于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

市售不同品牌南极磷虾粉 9 个、南极磷虾油样品 9 个均由山东青岛南极维康生物科技有限公司协助搜集提供。

### 1.2 检测方 法

**1.2.1 电感耦合和等离子体质谱法** 按照 GB/T5009.11-2014 食品安全国家标准《食品中总砷以及无机砷的测定》第一篇第一法规定执行。

**1.2.2 氢化物发生原子荧光光谱法** 按照 GB/T5009.11-2014 食品安全国家标准《食品中总砷以及无机砷的测定》第一篇第二法规定执行。

**1.2.3 银盐法** 按照 GB/T5009.11-2014 食品安全国家标准《食品中总砷以及无机砷的测定》第一篇第三法规定执行。

### 1.3 数据统 计与分析

数据表示为平均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD), 采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析, 不同检测方法组间采用 One-way ANOVA(Tukey's test)进行两两比较分析, 以  $P<0.05$  为具有统计学意义上的显著差异。

## 2 结果与分 析

### 2.1 3 种国标方法测定南极磷虾及其制品总砷含量的适用性分析

对采用 ICP-MS 法、HG-AFS 法及银盐法测定南极磷虾冻虾、虾粉和虾油中的总砷含量的准确性和精密度进行了考察, 结果见表 1 和表 2。ICP-MS 法、HG-AFS 法及银盐法的加标回收率分别为 100.26%~110.48%、82.68%~98.50%、89.64%~94.89%, RSD( $n=5$ )均小于 5%。结果显示, 3 种方法对于南极磷虾冻虾、虾粉和虾油中的总砷含量的检测准确性和精密度良好, 均可考虑用于南极磷虾及其制品中总砷含量的测定。

对国标中 3 种方法测得的南极磷虾冻虾、虾油、虾粉的总砷数据进行显著性分析, 由表 2 可知, 3 种方法具有较好的一致性, 检测结果无显著性差异

表 1 3 种国标方法测定南极磷虾及其制品总砷含量的准确性

Tab.1 The accuracy of three national standard methods used in determining total arsenic contents in Antarctic krill and its related products

方法 Method	南极磷虾冻虾 Frozen Antarctic krill				南极磷虾粉 Antarctic krill powder				南极磷虾油 Antarctic krill oil			
	本底值 Back ground value (mg/kg)	加标量 Plus scalar ( $\mu\text{g}$ )	加标结果 Spike results ( $\mu\text{g}$ )	加标 回收率 Spike recovery (%)	本底值 Back ground value (mg/kg)	加标量 Plus scalar ( $\mu\text{g}$ )	加标结果 Spike results ( $\mu\text{g}$ )	加标 回收率 Spike recovery (%)	本底值 Back ground value (mg/kg)	加标量 Plus scalar ( $\mu\text{g}$ )	加标结果 Spike results ( $\mu\text{g}$ )	加标 回收率 Spike recovery (%)
ICP-MS	0.45	5	5.13	100.26	1.12	5	5.65	106.22	3.74	5	6.45	110.48
HG-AFS	0.43	5	5.36	98.50	0.79	5	5.24	88.80	3.58	10	12.49	82.68
银盐法 Silver salt method	0.45	5	5.03	91.58	1.04	5	5.50	89.64	3.97	10	18.41	94.89

表 2 3 种国标方法测定南极磷虾及其制品总砷含量的精密度

Tab.2 The precision of three national standard methods used in determining total arsenic contents in Antarctic krill and its related products

样品 Sample (n=5)	ICP-MS		HG-AFS		银盐 Silver salt method	
	总砷含量 Total arsenic (mg/kg)	RSD (%)	总砷含量 Total arsenic (mg/kg)	RSD (%)	总砷含量 Total arsenic (mg/kg)	RSD (%)
南极磷虾冻虾 Frozen Antarctic krill	0.45±0.01	1.22	0.43±0.02	3.54	0.45±0.02	4.70
南极磷虾粉 Antarctic krill powder	1.12±0.03	3.02	0.79±0.01	1.57	1.04±0.05	4.85
南极磷虾油 Antarctic krill oil	3.74±0.03	3.98	3.58±0.11	3.04	3.97±0.16	0.86

( $P>0.05$ )。与银盐法相比, ICP-MS 法和 HG-AFS 法前处理及反应过程复杂, 仪器昂贵, 因此, 银盐法可作为快速测定南极磷虾及其制品中总砷含量的首选方法。银盐法利用氧化镁以及硝酸镁的保护, 在 550℃ 的高温下将有机质彻底灰化, 使试样中所有的砷化合物转化为无机砷进行检测, 海产品中最主要的砷形态为有机砷, 所以, 在 550℃ 的高温下灰化处理可以使南极磷虾中的有机砷完全转化为无机砷, 之后通过显色反应实现总砷的定量。

## 2.2 南极磷虾及其制品中总砷含量的测定

采用银盐法对 2 批次南极磷虾、9 批次南极磷虾粉和 9 个品牌南极磷虾油的总砷含量进行了系统测定, 结果见表 3。由表 3 可知, 南极磷虾冻虾、虾粉和虾油中的总砷含量分别为 0.44~0.45 mg/kg、1.04~1.91 mg/kg、0.52~5.50 mg/kg。GB2762-2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》中对水产品及其制品中的总砷未做限定, 但对于无机砷规定应  $\leq 0.5$  mg/kg。海产品中砷主要以有机砷形式存在, 无机砷含量极低。本研究中, 南极磷虾冻虾的总砷含量  $< 0.5$  mg/kg, 符合国标的规定, 但南极磷虾粉及虾油中总砷的含量高于国标限量, 进一步阐明南极磷虾粉及虾油中有机砷及无机砷的比例和含量至关重要。但由于南极磷虾脂质含量丰富, 且总脂中磷脂含量较高, 直接导致了无法采用国标方法进行南极磷虾粉及虾油中无机砷含量的测定。因此, 加快南极磷虾粉及虾

油中砷形态分析技术的建立, 是科学解释南极磷虾及其制品中砷的安全性问题的关键。

表 3 南极磷虾及其制品总砷含量测定

Tab.3 The total arsenic contents in Antarctic krill and its related products (mg/kg)

样品 Sample	编号 Number	总砷含量 Total arsenic content	总砷含量范围 Range of total arsenic content	
南极磷虾冻虾 Frozen Antarctic krill	1	0.45±0.01	0.44~0.45	
	2	0.44±0.02		
	南极磷虾粉 Antarctic krill powder	1	1.91±0.08	1.04~1.91
		2	1.54±0.03	
		3	1.67±0.03	
		4	1.63±0.05	
		5	1.50±0.02	
		6	1.15±0.03	
		7	1.04±0.04	
南极磷虾油 Antarctic krill oil	1	0.52±0.01	0.52~5.50	
	2	3.28±0.05		
	3	1.43±0.06		
	4	1.80±0.03		
	5	5.50±0.03		
	6	3.74±0.02		
	7	3.59±0.03		
	8	4.48±0.03		
	9	3.40±0.02		

### 3 结论

GB/T5009.11-2014《食品安全国家标准 食品中总砷以及无机砷的测定》规定的 ICP-MS 法、HG-AFS 法及银盐法等 3 种方法, 在南极磷虾冻虾、虾粉和虾油样品总砷含量的测定中均具有较好的适用性, 方法加标回收率分别为 100.26%~110.48%、82.68%~98.50% 和 89.64%~94.89%, RSD( $n=5$ )均小于 5%。其中, 银盐法由于操作较为简单, 不依赖于大型仪器, 可作为快速测定南极磷虾及其制品中总砷含量的首选方法。

采用银盐法对搜集到的南极磷虾冻虾、虾粉和虾油样品总砷含量进行了测定, 其中, 南极磷虾冻虾样品的总砷含量为 0.44~0.45 mg/kg, 南极磷虾粉样品的总砷含量为 1.04~1.91 mg/kg, 南极磷虾油样品的总砷含量为 0.52~5.50 mg/kg。南极磷虾冻虾样品的砷含量符合 GB2762-2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》的限量规定。由于采用目前国标方法无法实现南极磷虾粉及虾油中无机砷含量的测定, 因此, 后期研究应加快建立南极磷虾粉及虾油中砷形态的分析技术, 以阐明南极磷虾粉及虾油中有机砷及无机砷的比例和含量。另外, 生产加工过程中砷含量控制技术, 特别是有机砷脱除技术的研发, 对于南极磷虾产业的发展同样至关重要。

### 参 考 文 献

- Chen XZ, Xu ZL, Huang HL. Development strategy on Antarctic krill resource utilization in China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(3): 451-458 [陈雪忠, 徐兆礼, 黄洪亮. 南极磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析. *中国水产科学*, 2009, 16(3): 451-458]
- Dong LZ, Cui H, Shan BT, *et al.* Analysis of 21 elements in Antarctic krill and its production by ICP-MS. *Farm Products Processing*, 2015(5): 34-37 [董丽臻, 崔鹤, 单宝田, 等. 电感耦合等离子质谱法测定南极磷虾制品中 21 种元素. *农产品加工*, 2015(5): 34-37]
- Escudero LB, Martinis EM, Olsina RA, *et al.* Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 484-490
- Gong YY, Huang YQ, Lu JX, *et al.* Nutritional quality and fluoride content of Antarctic krill meal for feed formulations in sturgeons. *Marine Fisheries*, 2013, 35(3): 349-357 [龚洋洋, 黄艳青, 陆建学, 等. 南极磷虾粉作为鲟鱼饲料蛋白源的营养和氟含量的分析. *海洋渔业*, 2013, 35(3): 349-357]
- Grijalba AC, Fiorentini EF, Martinez LD, *et al.* A comparative evaluation of different ionic liquids for arsenic species separation and determination in wine varieties by liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1462: 44-54
- He RK, Luo HJ. Health benefits of Antarctic krill oil. *Food Research and Development*, 2013, 34(20): 130-133 [贺瑞坤, 罗海吉. 南极磷虾油对人类健康的作用. *食品研究与开发*, 2013, 34(20): 130-133]
- Huan X. The most successful species of life on Earth—Antarctic krill. *Ocean World*, 2013(12): 40-43 [欢休. 地球上最成功的生物物种——南极磷虾. *海洋世界*, 2013(12): 40-43]
- Huang HL, Chen XZ, Feng CL. Analysis of current status of Antarctic krill resources development. *Fisheries Modernization*, 2007, 34(1): 48-51 [黄洪亮, 陈雪忠, 冯春雷. 南极磷虾资源开发现状分析. *渔业现代化*, 2007, 34(1): 48-51]
- Huang J. Experimental research progress on krill oil for fatty liver prevention. *Fine and Specialty Chemicals*, 2014, 22(9): 20-22 [黄婧. 磷虾油防治脂肪肝的实验研究进展. *精细与专用化学品*, 2014, 22(9): 20-22]
- Liu L, Liu CC, Zhao Y, *et al.* Recent advances in the healthcare function and food safety of Antarctic krill. *Food Science*, 2010, 31(17): 443-447 [刘丽, 刘承初, 赵勇, 等. 南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价. *食品科学*, 2010, 31(17): 443-447]
- Liu ST, Jiang TC, Li JM, *et al.* Determination of arsenic speciation in seafood by HPLC-AFS. *Chemical Analysis and Meterage*, 2013, 22(1): 11-14 [刘守廷, 蒋天成, 李健梅, 等. HPLC-AFS 联用测定海产品中砷的形态. *化学分析计量*, 2013, 22(1): 11-14]
- Lu KJ, Wu JK, Wang ZH, *et al.* Determination of heavy metals in Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(2): 64-67 [卢坤俊, 吴继魁, 汪之和, 等. 南极磷虾中重金属含量的测定. *食品工业科技*, 2013, 34(2): 64-67]
- Maher WA, Duncan E, Dilly G, *et al.* Arsenic concentrations and species in three hydrothermal vent worms, *Ridgeia piscesae*, *Paralvinella sulficola* and *Paralvinella palmiformis*. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2016, 116: 41-48
- 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): 1-8 [聂玉晨, 张波, 赵宪勇, 等. 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): 1-8]
- Qi P, Zeng T. Affection of digestion methods on the determination of As in shrimp by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Studies of Trace Elements and Health*, 2011, 28(6): 30-32 [戚平, 曾涛. 消解方式对氢化物原子荧光法测定虾粉中总砷的影响. *微量元素与健康研究*, 2011, 28(6): 30-32]
- Rodriguez IB, Raber G, Goessler W. Arsenic speciation in fish



- sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2009, 112(4): 1084–1087
- Sele V, Sloth JJ, Julshamn K, *et al.* A study of lipid- and water-soluble arsenic species in liver of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*) containing high levels of total arsenic. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015, 30: 171–179
- Wang S, Li K, Cui H, *et al.* Quantitative analysis of total and different species of arsenic in oil of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(5): 767–772 [王松, Li Ke, 崔鹤, 等. 南极磷虾油中总砷含量及砷形态分析. *分析化学*, 2016, 44(5): 767–772]
- Williams G, West JM, Koch I, *et al.* Arsenic speciation in the freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark. *Science of the Total Environment*, 2009, 407: 2650–2658
- Yan JL, Chen SQ, Chang Q, *et al.* Evaluation of nutrition of Antarctic krill meal as dietary protein source for flatfishes. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 74–82 [严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 南极磷虾粉作为鲆形目鱼饲料蛋白源的营养价值评价. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 74–82]
- Yuan Y, Li XY, Yang XS, *et al.* Analysis and comparison on the nutritional components of different Antarctic krill meals. *Marine Fisheries*, 2012, 34(4): 457–463 [袁玥, 李学英, 杨宪时, 等. 南极磷虾粉营养成分的分析与比较. *海洋渔业*, 2012, 34(4): 457–463]
- Zheng XW, Shen J, Cai SJ. Preliminary study on the peeling technology of Antarctic krill. *Marine Fisheries*, 2013, 35(1): 102–107 [郑晓伟, 沈建, 蔡淑君. 南极磷虾虾肉制取技术初步研究. *海洋渔业*, 2013, 35(1): 102–107]
- Zhu GP. Population biology of Antarctic krill *Euphausia superba* I—age, growth and mortality. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 862–868 [朱国平. 南极磷虾种群生物学研究进展 I—年龄、生长与死亡. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 862–868]

(编辑 马瑾艳)

## Study on the Analytical Method of Total Arsenic Content in Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Its Related Products

ZHANG Xuechao<sup>1,2</sup>, LIU Xiaofang<sup>2</sup>, QIU Amin<sup>3</sup>, HOU Qinshuai<sup>1,2</sup>, LENG Kailiang<sup>2①</sup>, GAO Hua<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Pharmaceutical Engineering Department, Qingdao University, Qingdao 266021; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. School of Public Health, Qingdao University, Qingdao 266021)

**Abstract** The applicability of three national standard methods including inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS), and silver salt method used to determine total arsenic content in Antarctic krill (*Euphausia superba*) and its related products were evaluated in this study. The accuracy of the ICP-MS, HG-AF, and silver salt methods were 100.26%~110.48%, 82.68%~98.50%, and 89.64%~94.89%, respectively, and the RSD was less than 5% in all cases. The results of the three national standard methods were consistent. However, compared with the silver salt method, the ICP-MS and HG-AFS methods were complicated and expensive. Therefore, the silver salt method could be chosen as a quick method for determining the total arsenic content in Antarctic krill and its related products. The content of total arsenic in Antarctic krill, Antarctic krill powder, and Antarctic krill oil were 0.44~0.45 mg/kg, 1.04~1.91 mg/kg, and 0.52~5.50 mg/kg, respectively. To accelerate the establishment of methods to evaluate arsenic morphology and estimate inorganic arsenic quantitatively in Antarctic krill and its related products will be important in the future.

**Key words** Antarctic krill (*Euphausia superba*); Total arsenic; ICP-MS; HG-AFS; Silver salt method

① Corresponding author: LENG Kailiang, E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn

# 《渔业科学进展》2018 年第 39 卷总目录



## 第 1 期

### “973”专栏——近海环境变化引起的资源效应

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

### 研究论文

- 山东南部沿海夏季大型底栖动物群落结构特征 ..... 涂梁莉 刘卫霞 隋吉星 曲方圆 赵凡淇 钟海霞 张蒙生 于子山 (27)
- 渤海湾近岸海域浮游纤毛虫丰度和生物量的季节变化 ..... 于 莹 周 锋 房恩军 郭 彪 张博伦 张武昌 (37)
- 黄渤海鱼类优先监控重金属污染物的筛选与评价 ..... 韩丹丹 赵 峰 牟伟丽 张道旭 周德庆 (46)
- 獐子岛邻近海域悬浮颗粒物的时空分布特性 ..... 李 敏 张继红 吴文广 刘 毅 王 巍 蔺 凡 马 莎 杨艳云 (54)
- 基于约束线性回归的柔鱼栖息地指数渔场预报模型构建 ..... 崔雪森 周为峰 唐峰华 戴 阳 张胜茂 程田飞 (64)
- 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析 ..... 王玉红 尹晓雪 丁明媚 付胜利 陈 萌 郭 政 叶剑敏 (73)
- 凡纳滨对虾氨氮急性胁迫应激敏感群体和耐受群体对 WSSV 敏感性的差异分析 ..... 卢 霞 栾 生 曹宝祥 郝登春 孟宪红 曹家旺 代 平 罗 坤 孔 杰 (83)
- 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计 ..... 郝登春 栾 生 曹宝祥 郭聚涛 罗 坤 陈宝龙 孟宪红 许圣钰 孔 杰 (90)
- 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶  $\beta$  亚基(*F-ATPase $\beta$* )基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化 ..... 王竹青 任宪云 高保全 刘 萍 张小辉 张 杰 于 旋 (97)
- 基于高通量测序的虾夷扇贝基因组微卫星特征分析 ..... 倪守胜 杨 钰 柳淑芳 庄志猛 (107)
- 长牡蛎高糖原含量新品系正反交家系的生理代谢 ..... 刘 雨 王卫军 杨建敏 孙国华 马敬骏 李焕军 (114)
- 大竹蛭  $\beta$ -整合素基因 *Sg $\beta$ Int* 的特性分析和重组表达 ..... 刘佳乐 韦秀梅 杨顶珑 童 潼 刘相全 (120)
- 魁蚶 C 型凝集素基因 cDNA 的克隆及表达分析 ..... 沈淑芳 朱 玲 李加琦 薛素燕 李 阳 陈琼琳 毛玉泽 庄志猛 方建光 (128)
- 3 株 O3 血清型鳗弧菌灭活疫苗的免疫原性和免疫保护效果 ..... 李淑芳 唐 磊 李 杰 李贵阳 王晓冉 王小鹿 丁 山 莫照兰 (137)
- 加工方式对海水虾及其制品中 SO<sub>2</sub> 含量的影响 ..... 何 柳 郭莹莹 王联珠 朱文嘉 刘 芬 杨祯祯 (144)
- 《渔业科学进展》录用定稿网络首发征稿启事 ..... (150)

## 第 2 期

### “973”专栏——近海环境变化引起的资源效应

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

### 研究论文

- 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区生态环境质量分析与评价 ..... 滕 瑶 陈碧鹃 夏 斌 曲克明 冯 娟 崔正国 张旭志 丁东生 (34)
- 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲷养殖水质的净化效果 ..... 康传磊 李秋芬 张 艳 陈世波 王 越 (42)
- 牙鲆 *tyrpl1a* 和 *tyrpl1b* 的鉴定及 *tyrpl1a* 与 mmu-miR-143-5p\_R+2 的调控关系 ..... 王若青 王 娜 王仁凯 陈松林 (49)
- 短期温度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响 ..... 刘 玲 陈 超 李炎璐 刘 莉 陈建国 李文升 马文辉 (59)
- 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代染色体核型分析 ..... 成美玲 田永胜 吴玉萍 李振通 张晶晶 王林娜 李文升 马文辉 王晓梅 翟介明 李 波 (67)

翘嘴鲌主要形态性状与体重的相关性及雌雄形态性状差异分析.....董浚键 孙成飞 田园园 曾庆凯 师红亚 卢迈新 叶 星 (76)

饲料蛋白质和能量含量对云纹龙胆石斑鱼幼鱼生长、体组成及消化酶活力的影响.....公绪鹏 李宝山 张利民 张 燕 王际英 (85)

维生素 C 对圆斑星鲈早期发育的影响.....王贞杰 叶保民 常 青 陈四清 刘长琳 胡建成 王志军 (96)

中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析.....王 军 王清印 孔 杰 孟宪红 曹家旺 王明珠 冯亚萍 吕 丁 (104)

中国明对虾 FBA 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析.....史晓丽 孟宪红 孔 杰 栾 生 罗 坤 曹宝祥 曹家旺 陈宝龙 (112)

不同温度下凡纳滨对虾和中国明对虾对白斑综合征病毒(WSSV)耐受性比较.....冯亚萍 孔 杰 罗 坤 栾 生 李旭鹏 史晓丽 曹家旺 王明珠 王 军 董丽君 孟宪红 (120)

2015 年中国典型对虾养殖区 WSSV 流行株高变异区序列的分析比较.....秦梦雪 孙新颖 万晓媛 刘庆慧 黄 捷 (128)

凡纳滨对虾网格重链蛋白与 WSSV 结构蛋白在体外的相互作用.....王中一 刘庆慧 黄 捷 (138)

三疣梭子蟹 *Toll4* 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析.....张 杰 吕建建 刘 萍 李 健 王竹青 张小辉 (146)

三疣梭子蟹线粒体基因组 SNP 在增殖放流家系识别中的应用.....赵 莲 李志辉 张 培 薛 蓓 赖晓芳 张庆起 高 焕 阎斌伦 (156)

西非沿岸乌贼角质颚形态及生长特征.....瞿俊跃 李建华 陈 芑 陈新军 靳 楠 (164)

反相高效液相色谱法测定褐藻中岩藻黄素的含量.....刘小芳 蒋永毅 侯钦帅 苗钧魁 冷凯良 (171)

海参中单糖检测方法的建立及含量测定.....刘 芬 孙晓杰 朱文嘉 郭莹莹 何 柳 杨祯祯 王媛媛 文艺晓 王联珠 (177)

### 第 3 期

#### “973”专栏——近海环境变化引起的资源效应

辽东湾 4 种海洋生物的热耐受性研究.....任中华 宋俊杰 刘永叶 曹 亮 (1)

渤海鱼类的食物关系.....张 波 (11)

环境 DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展.....单秀娟 李 苗 王伟继 (23)

**研究论文**

黄海小黄鱼不同组织中  $\delta^{15}\text{N}$  的分布特征及其生态学意义.....谭鲁玉 王玉瑛 唐学玺 戴芳群 孙 耀 金显仕 (30)

牙鲆抗迟缓爱德华氏菌病家系的继代选育与早期速生家系筛选.....李泽宇 陈松林 郭 华 王 磊 王 倩 李仰真 杨英明 刘寿堂 孙德强 李文升 王晓梅 (36)

牙鲆精氨酸酶 II 基因的克隆以及免疫应答表达分析.....马慧鑫 王 磊 汪林庆 周 茜 陈松林 (44)

牙鲆 *NOD2* 基因的表达分析及在抗迟缓爱德华氏菌感染过程中的功能.....曹丹丹 刘金相 王志刚 张全启 齐 洁 王旭波 于海洋 (53)

饲料中添加  $\beta$ -葡聚糖对虹鳟部分生长指标和血液生理指标的影响.....王 艺 纪利芹 孙国祥 刘 鹰 王顺奎 (65)

饲料蛋白水平对台湾泥鳅幼鱼生长、饲料利用率及免疫酶活性的影响.....周朝伟 朱 龙 曾本和 任胜杰 李明朔 雷 骆 吴 青 (72)

不同耐盐植物人工湿地净化养殖外排水效果.....许永辉 崔正国 曲克明 王艳艳 王加鹏 李悦悦 胡清静 (80)

不同氨氮和溶解氧条件下循环海水养殖系统生物滤池对氨氮、化学耗氧量及颗粒悬浮物的处理效果.....陆伟强 高桦楠 刘春胜 王爱民 顾志峰 林国尧 (89)

低温胁迫条件下中国明对虾生长性状和耐低温性状的遗传参数评估.....王明珠 孟宪红 孔 杰 曹家旺 王 军 冯亚萍 强光峰 (96)

凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析.....贾 丹 史成银 黄 捷 张庆利 万晓媛 许 华 刘冉阳 王海波 郭程程 谢国骝 (103)

几种消毒剂对凡纳滨对虾致病性弧菌的杀灭作用.....刘志轩 王印庚 张 正 王 凯 蔡生力 包海岩 姚学良 张 振 (112)

脊尾白虾不同蜕皮分期免疫酶、几丁质酶及蜕皮激素的变化.....许 杨 李 健 崔彦婷 马 骊 (120)

三疣梭子蟹 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因克隆及其在性腺发育过程中的表达分析.....张 小 辉 孟宪亮 高保全 刘 萍 王竹青 张 杰 蔡 影 (126)

金乌贼成体副缠卵腺的超显微结构.....刘长琳 赵法箴 边 力 葛建龙 谭 杰 陈四清 (137)

曼氏无针乌贼转录组微卫星特征分析.....管 奥 毋玉婷 陈 宇 孙 扬 祁鹏志 郭宝英 (144)

短蛸微卫星多重 PCR 体系建立及交配模式分析.....刘文芬 冯艳微 王卫军 陈建强 杨建敏 (152)

**综述**

水产养殖容量研究进展及应用.....刘 慧 蔡碧莹 (158)

传染性皮下及造血组织坏死病毒致病性研究进展.....闫冬春 陈博瑩 (167)

## 第 4 期

## “973”专栏——近海环境变化引起的资源效应

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

## 研究论文

- 大菱鲆受精卵显微注射技术的建立……崔忠凯 王 倩 刘新富 孟 振 陈松林 (30)
- 虹鳟免疫诱导型基因 *Cathelicidin2* 启动子功能分析……赵紫霞 许 建 江炎亮 白庆利 蒋立坤 陈葆华 徐 鹏 (37)
- 金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式……何暮春 张金勇 刘长琳 项子龙 柳淑芳 庄志猛 薛同明 (46)
- 大黄鱼幼鱼饲料中大豆磷脂油与菜籽油的适宜配比……闫春为 陈乃松 李自强 连雪原 王孟乐 (56)
- n-3/n-6 长链多不饱和脂肪酸对大菱鲆幼鱼脂肪沉积、脂肪吸收及代谢相关酶活性和血清生化指标的影响……谭 青 韩秀杰 王际英 李宝山 李学丽 郝甜甜 张利民 (66)
- 凡纳滨对虾亲虾繁殖期间适宜投喂频率的研究……汪春玲 梁萌青 徐后国 (74)
- 凡纳滨对虾感染肝肠胞虫的群体及组织间差异性分析……程东远 邱 亮 宋增磊 万晓媛 董 宣 谢国驷 黄 健 (83)
- 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp<sub>AHPND</sub>*)的定量分析……陈蒙蒙 董 宣 邱 亮 万晓媛 谢国驷 黄 健 (93)
- 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达……马 骊 葛倩倩 许 杨 彭素晓 李 健 (101)
- 脊尾白虾 *E75* 基因克隆及 *E75*、*ECR* 和 *RXR* 在不同蜕皮分期的表达分析……许 杨 王佳佳 葛倩倩 崔彦婷 马 骊 李 健 (110)
- 温度对凸壳肌蛤能量收支的影响……吕旭宁 王晓芹 吴亚林 姜妮妮 房景辉 方建光 王军威 张义涛 蒋增杰 (119)
- 瘤背石磺肌球蛋白重链(*MyHC*)基因的克隆与表达分析……顾冰宁 刘 欣 沈和定 王冬凤 杨铁柱 朱 敏 史艳梅 李柏航 (126)
- 虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝中的通用性研究……张广明 孙秀俊 吴 彪 杨爱国 刘志鸿 周丽青 刘寒苗 赵 庆 (139)
- 魁蚶中国群体与韩国群体杂交子一代养成期生长比较……郑言鑫 蔡忠强 王 鹏 吴 彪 张树宝 赵春暖 于 涛 林建国 孙 超 (147)
- 海带 *hsp70* 基因的克隆、分析及转录水平定量研究……袁艳敏 刘福利 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 王飞久 (152)
- 3 种氮源加富对半叶马尾藻幼苗生长和生化组成的影响……韩婷婷 齐占会 黄洪辉 梁庆洋 (159)
- 微波-干灰化混合消解和原子荧光光度法测定鱼粉中总砷……刘 慧 李应东 张凤枰 刘耀敏 (167)
- 综述
- Kisspeptin 对鱼类生殖轴的调控机制研究……王 滨 柳学周 徐永江 史 宝 刘 权 (173)

## 第 5 期

## 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)
- 不同规格绿鳍马面鲀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)

### 第 6 期

#### 研究论文

天津近岸人工鱼礁海域浮游植物群落及其变化特征..... 张 雪 徐晓甫 戴媛媛 王 宏 房恩军 侯纯强 高 燕 郭 彪 陈 卫 (1)

流沙湾浮游植物群落特征季节变化及其与养殖活动的关系..... 苏家齐 朱长波 李俊伟 李 婷 陈素文 颀晓勇 张 博 (11)

象山港中部养殖海区营养盐的季节变化及富营养化..... 白怀宇 李秋芬 张 艳 陈碧鹃 韩 倩 夏 斌 曲克明 (24)

罗非鱼“粤闽 1 号”及其繁育群体的遗传多样性和遗传关系分析..... 刘志刚 卢迈新 曹建萌 高风英 (31)

河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验..... 杨昆明 郭爱民 马江霞 段成任 谢志胜 岳 城 (42)

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2 种视黄酸受体 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  克隆及组织表达特性..... 宋雪松 徐永江 柳学周 史 宝 王 滨 刘永山 张雅星 (52)

热应激对银鲫生化指标和 *HSP70* mRNA 表达的影响..... 周朝伟 胡续雯 雷 骆 刘晓庆 任胜杰 杨旻珉 曹高祥 陈国梁 邓星星 李 岩 李路宽 (65)

圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达..... 张乐乐 边 力 常青 侯吉伦 陈四清 赵 庆 刘 琨 葛建龙 刘长琳 (72)

不同水温下无乳链球菌在尼罗罗非鱼体内的动态分布及其消除规律..... 郭富强 张德锋 曹建萌 刘志刚 可小丽 卢迈新 (81)

3 种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价..... 赵亭亭 张 岩 陈 超 李炎璐 张廷廷 乔 莹 翟介明 李文升 (89)

草鱼死后常温贮藏过程中的品质变化..... 王红丽 施文正 邱伟强 王锡昌 (97)

WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响..... 李旭鹏 孔 杰 孟宪红 栾 生 罗 坤 (106)

南极磷虾(*Euphausia superba*)起捕后蛋白自溶进程及其影响因素..... 曹 荣 余奔珂 赵 玲 孙慧慧 刘 淇 (114)

盐化幅度、速度及方式对凡纳滨对虾仔虾生长和存活率的影响..... 赵玉超 李玉全 孙振鹏 王淑生 付瑞江 张绍龙 (119)

桑沟湾楮岛大叶藻床区域菲律宾蛤仔的生态贡献..... 吴亚林 高亚平 吕旭宁 王晓芹 李凤雪 姜妮妮 王军威 张义涛 蒋增杰 (126)

靖海湾条斑紫菜的营养及鲜味评价..... 赵 玲 曹 荣 王联珠 刘 淇 陈少凡 符鹏飞 (134)

中国近海铜藻 *ITS* 与 *cox1* 序列相似性分析..... 吕 芳 郭 文 丁 刚 刘 玮 詹冬梅 吴海一 (141)

东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析与比较..... 贡 艺 李云凯 陈 玲 高小迪 陈新军 (147)

海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的发酵条件优化..... 朱祥杰 王 震 苑志欣 郝建华 郑兰红 (155)

4 种因子对玫瑰红红球菌 XH2 氨氮去除效果的影响..... 田雅洁 曹煜成 胡晓娟 黄小帅 徐 煜 许云娜 李卓佳 文国樑 (164)

**研究简报**

脊尾白虾不同发育期 mtDNA 拷贝数变化特征分析..... 张 培 徐莞媛 李志辉 高 煥 张庆起 赖晓芳 陈建华 阎斌伦 (173)

南极磷虾及其制品中总砷含量的分析方法研究..... 张学超 刘小芳 邱阿敏 侯钦帅 冷凯良 高 华 (180)

## Total Contents of *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*, Vol. 39, 2018

### No.1

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



## No.2

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

Establishment and Determination of Monosaccharide in Sea Cucumber .....	
.....LIU Fen, SUN Xiaojie, ZHU Wenjia, GUO Yingying, HE Liu, YANG Zhenzhen, WANG Yuanyuan, WEN Yixiao, WANG Lianzhu	(177)

### No.3

An Experimental Study on Thermal Tolerance of Four Marine Species in Liaodong Bay.....	
.....REN Zhonghua, SONG Junjie, LIU Yongye, CAO Liang	(1)
Feeding Ecology of Fishes in the Bohai Sea.....	ZHANG Bo (11)
Application of Environmental DNA Technology in Aquatic Ecosystem.....	SHAN Xiujian, LI Miao, WANG Weiji (23)
Distribution Characteristics of the Stable Nitrogen Isotope in Different Tissues of Small Yellow Croaker and the Ecological Significance in the Yellow Sea.....	TAN Luyu, WANG Yukun, TANG Xuexi, DAI Fangqun, SUN Yao, JIN Xianshi (30)
Screening of Disease-Resistant and Fast Growing Families and Subculture Breeding for Resistance Against <i>Edwardsiella tarda</i> in Japanese Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ).....	LI Zeyu, CHEN Songlin, GUO Hua, WANG Lei, WANG Qian, LI Yangzhen, YANG Yingming, LIU Shoutang, SUN Deqiang, LI Wensheng, WANG Xiaomei (36)
The Different Expression Patterns of the Gene Arginase II in <i>Paralichthys olivaceus</i> and the Correlation Between its Expression and <i>Edwardsiella tarda</i> Infection.....	MA Huixin, WANG Lei, WANG Linqing, ZHOU Qian, CHEN Songlin (44)
Expression Analysis and Functional Characterization of <i>NOD2</i> in the Resistance of Japanese Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) to <i>Edwardsiella tarda</i> Infection .....	CAO Dandan, LIU Jinxiang, WANG Zhigang, ZHANG Quanqi, QI Jie, WANG Xubo, YU Haiyang (53)
Effects of Dietary $\beta$ -Glucan on Some Growth and Blood Physiological Indices of Rainbow Trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	WANG Yi, JI Liqin, SUN Guoxiang, LIU Ying, WANG Shunkui (65)
Effects of Dietary Protein Level on Growth Performance, Feed Efficiency, and Immuno-Enzymatic Activity of <i>Paramisgumus</i> <i>dabryanus</i> ssp .....	ZHOU Chaowei, ZHU Long, ZENG Benhe, REN Shengjie, LI Mingshuo, LEI Luo, WU Qing (72)
Purification Efficiency of Mariculture Wastewater in Constructed Wetlands with Two Salt-Tolerant Plants .....	XU Yonghui, CUI Zhengguo, QU Keming, WANG Yanyan, WANG Jiapeng, LI Yueyue, HU Qingjing (80)
Treatment Effect of Ammonia Nitrogen, COD and SS by a Coral Stone Biological Filter in the Recirculating Aquaculture Systems Under Different Concentrations of Ammonia Nitrogen and Dissolved Oxygen .....	LU Weiqiang, GAO Huanan, LIU Chunsheng, WANG Aimin, GU Zhifeng, LIN Guoyao (89)
Evaluation of Genetic Parameters for Growth and Cold Tolerance Traits in <i>Fenneropenaeus chinensis</i> Under Low-Temperature Stress.....	WANG Mingzhu, MENG Xianhong, KONG Jie, CAO Jiawang, WANG Jun, FENG Yaping, QIANG Guangfeng (96)
Identification and Pathogenicity Analysis of Bacterial Pathogen Associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in the Pacific Shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	JIA Dan, SHI Chengyin, HUANG Jie, ZHANG Qingli, WAN Xiaoyuan, XU Hua, LIU Ranyang, WANG Haibo, GUO Chengcheng, XIE Guosi (103)
Germicidal Effect of Several Disinfectants on the Pathogenic Bacteria of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	LIU Zhixuan, WANG Yingeng, ZHANG Zheng, WANG Kai, CAI Shengli, BAO Haiyan, YAO Xueliang, ZHANG Zhen (112)
Changes in Immunity-Related Enzymes, Chitinase Activity, and Molting Ecdysteroid Concentration of <i>Exopalaemon carinicauda</i> During Different Molting Stages .....	XU Yang, LI Jian, CUI Yanting, MA Li (120)
Molecular Cloning of <i>Droscha</i> and <i>Exportin 5</i> and Their Expression During Gonadal Development in the Swimming Crab ( <i>Portunus trituberculatus</i> ) .....	ZHANG Xiaohui, MENG Xianliang, GAO Baoquan, LIU Ping, WANG Zhuqing, ZHANG Jie, CAI Ying (126)
Ultrastructure of the Accessory Nidamental Gland of Adult <i>Sepia esculenta</i> .....	LIU Changlin, ZHAO Fazhen, BIAN Li, GE Jianlong, TAN Jie, CHEN Siqing (137)
Deep Sequence-Based Transcriptome Analysis of Microsatellites in the Cuttlefish ( <i>Sepiella japonica</i> ) .....	GUAN Ao, WU Yuting, CHEN Yu, SUN Yang, QI Pengzhi, GUO Baoying (144)
Development of Microsatellite Multiplex PCR Sets and Its Application in the Reproduction Model Analysis of <i>Amphioctopus</i> <i>fangsiao</i> .....	LIU Wenfen, FENG Yanwei, WANG Weijun, CHEN Jianqiang, YANG Jianmin (152)
Advance in Research and Application on Aquaculture Carrying Capacity .....	LIU Hui, CAI Biying (158)

- Pathogenicity of Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) — A Review ..... YAN Dongchun, CHEN Bokun (167)

## No.4

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

## No.5

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

- Development of Marine Ranching at Tropical Island Area in South China Sea-Advantages, Status and Prospects ..... XU Qiang, LIU Wei, GAO Fei, WANG Aimin (173)

## No.6

- Phytoplankton Community Characteristics and Variation at Artificial Reefs of Tianjin Offshore ..... ZHANG Xue, XU Xiaofu, DAI Yuanyuan, WANG Hong, FANG Enjun, HOU Chunqiang, GAO Yan, GUO Biao, CHEN Wei (1)
- Phytoplankton Community Characteristics in Different Seasons and Their Relationship with Aquaculture in Liusha Bay ..... SU Jiaqi, ZHU Changbo, LI Junwei, LI Ting, CHEN Suwen, XIE Xiaoyong, ZHANG Bo (11)
- Seasonal Variation in Nutrients and Evaluation of Eutrophication in the Aquaculture Areas in the Middle Water Areas of Xiangshan Harbor ..... BAI Huaiyu, LI Qiufen, ZHANG Yan, CHEN Bijuan, HAN Qian, XIA Bin, QU Keming (24)
- Genetic Diversity and Genetic Relationship Analysis of Tilapia "Yuemin No.1" and Its Breeding Populations ..... LIU Zhigang, LU Maixin, CAO Jianmeng, GAO Fengying (31)
- Isolation, Identification, and Antibiotic Sensitivity of Bacillary Enteritis in *Perca fluviatilis* Linnaeus ..... YANG Kunming, GUO Aimin, MA Jiangxia, DUAN Chengren, XIE Zhisheng, YUE Cheng (42)
- Molecular Cloning and Spatial Expression of Two Retinoic Acid Receptors RARalpha and RARgamma from *Cynoglossus semilaevis* ..... SONG Xuesong, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, WANG Bin, LIU Yongshan, ZHANG Yaxing (52)
- Effects of Heat Stress on Biochemical Indices and *HSP70* mRNA Expression in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) ..... ZHOU Chaowei, HU Xuwen, LEI Luo, LIU Xiaoqing, REN Shengjie, YANG Minmin, CAO Gaoxiang, CHEN Guoliang, DENG Xingxing, LI Yan, LI Lukuan (65)
- Cloning and Expression of the *sox9* Gene in Spotted Halibut (*Verasper variegatus*) ..... ZHANG Lele, BIAN Li, CHANG Qing, HOU Jilun, CHEN Siqing, ZHAO Qing, LIU Kun, GE Jianlong, LIU Changlin (72)
- Dynamic Distribution and Elimination Patterns of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus* at Different Water Temperatures ..... GUO Fuqiang, ZHANG Defeng, CAO Jianmeng, LIU Zhigang, KE Xiaoli, LU Maixin (81)
- Analysis of Nutrient Components and Evaluation of Nutritive Quality in Flesh of Three Species of Cultured Groupers ..... ZHAO Tingting, ZHANG Yan, CHEN Chao, LI Yanlu, ZHANG Tingting, QIAO Ying, ZHAI Jieming, LI Wensheng (89)
- Quality Changes of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in the Process of Postmortem Stored at Room Temperature ..... WANG Hongli, SHI Wenzheng, QIU Weiqiang, WANG Xichang (97)
- Effect of White Spot Syndrome Virus Infection on *bantam* and Candidate Target Genes in the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* ..... LI Xupeng, KONG Jie, MENG Xianhong, LUAN Sheng, LUO Kun (106)
- Study on the Protein Autolysis Process of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Its Influencing Factors ..... CAO Rong, YU Yike, ZHAO Ling, SUN Huihui, LIU Qi (114)
- Effects of High-Salinity Domestication Gradient, Speed, and Mode on Weight Gain, Activity, and Survival Rate of *Litopenaeus vannamei* Postlarvae ..... ZHAO Yuchao, LI Yuquan, SUN Zhenpeng, WANG Shusheng, FU Ruijiang, ZHANG Shaolong (119)
- Ecological Contribution of *Ruditapes philippinarum* in the Seagrass Meadow of Sanggou Bay ..... WU Yalin, GAO Yaping, LÜ Xuning, WANG Xiaoqin, LI Fengxue, JIANG Weiwei, WANG Junwei, ZHANG Yitao, JIANG Zengjie (126)
- Nutritional Analysis and Umami Assessment of *Pyropia yezoensis* from Jing Bay ..... ZHAO Ling, CAO Rong, WANG Lianzhu, LIU Qi, CHEN Shaofan, FU Pengfei (134)
- Analysis of the Similarity of *ITS* and *cox I* Sequences of *Sargassum horneri* Along the Offshore of China ..... LÜ Fang, GUO Wen, DIND Gang, LIU Wei, ZHAN Dongmei, WU Haiyi (141)
- A Comparative Analysis of Fatty Acid Profiles in Muscle of *Dosidicus gigas* from Different Harvest Locations in the Eastern Pacific Ocean ..... GONG Yi, LI Yunkai, CHEN Ling, GAO Xiaodi, CHEN Xinjun (147)
- Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* sp. N11-8 on the Production of Protease PBN11-8 ..... ZHU Xiangjie, WANG Zhen, YUAN Zhixin, HAO Jianhua, ZHENG Lanhong (155)
- Effects of Four Physical and Chemical Factors on the Ammonia Nitrogen Removal of *Rhodococcus rhodochromus* XH2 ..... TIAN Yajie, CAO Yucheng, HU Xiaojuan, HUANG Xiaoshuai, XU Yu, XU Yunna, LI Zhuojia, WEN Guoliang (164)
- Profiles of mtDNA Copy Number at Different Developmental Stages of *Exopalaemon carinicauda* ..... ZHANG Pei, XU Wanyuan, LI Zhihui, GAO Huan, ZHANG Qingqi, LAI Xiaofang, CHEN Jianhua, YAN Binlun (173)
- Study on the Analytical Method of Total Arsenic Content in Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Its Related Products ..... ZHANG Xuechao, LIU Xiaofang, QIU Amin, HOU Qinshuai, LENG Kailiang, GAO Hua (180)

# 《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6期 2018年12月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.39 No.6 Dec. 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.yyqxjz.cn>

E-mail: yyqxjz@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 by Ministry of Agriculture, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences  
China Society of Fisheries

Published by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

<http://www.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch

Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading  
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986187